

厚生労働科学研究費補助金

こころの健康科学研究事業

選択的リンパ球吸着療法による免疫性神経筋疾患の治療

平成14年度 総括研究報告書

主任研究者 澁谷 統 壽

平成15 (2003) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

選択的リンパ球吸着療法による免疫性神経筋疾患の治療	1
澁谷 統壽	
(資料1) CD4 選択除去器 (CD4-01) の概要書	5
(資料2) 再発寛解型多発性硬化症患者の急性増悪期における新規体外循環システム (CD4 陽性T細胞吸着カラム) による治療実施計画書	23
(資料3) 慢性炎症性脱髄性多発根神経炎患者に対する新規体外循環システム (CD4 陽性T細胞吸着カラム) による治療実施計画書	35
(資料4) CD4 陽性T細胞吸着カラムによる体外循環試験についての説明書	43

I. 総括研究報告書

14年度厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総括研究報告書

選択的リンパ球吸着療法による免疫性神経筋疾患の治療

主任研究者 洪谷統寿 国立療養所川棚病院 院長

研究要旨：多発性硬化症に代表されるT細胞介在性の自己免疫性疾患の治療として、*ex vivo*で病因となるCD4陽性T細胞を選択的に捕捉する細胞吸着材を用いた体外循環治療技術の確立と実用化のための臨床試験を計画した。平成14年度は1)ヒト臨床研究用のCD4+T細胞除去器の製作、2)この特異的細胞吸着療法の治療効果と免疫系への影響について検討するための臨床プロトコールと患者への説明資料の作成、3)本治療法による治療技術の確立と実用化に向けての効果的、効率的適用と安全性の確認のための健常人での臨床試用の準備を行った。

分担研究者

松尾秀徳：国立療養所川棚病院臨床研究部、吉良潤一：九州大学大学院医学研究院神経内科、祖父江元：名古屋大学大学院医学研究科神経内科、荻野美恵子：北里大学医学部神経内科、津田裕士：順天堂大学医学部内科、野村恭一：埼玉医科大学神経内科、藤原一男：東北大学大学院医学系研究科神経内科、服部孝道：千葉大学大学院医学研究院神経内科、菊地誠志：北海道大学大学院医学研究科神経内科

A. 研究目的

免疫性神経疾患は神経組織を標的とした免疫応答異常により発症する。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の重症筋無力症などと、(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(MS)などに区分される。免疫性神経疾患の治療目標は抗原特異的な免疫反応を抑制することであるが、現実的には抗原特異的な免疫療法は一部の実験系でのみ可能であるにすぎない。今日の臨床的に用いられている治療手段は、免疫応答の最終段階であるエフェクター相を抑えるものが多く、薬剤による免疫抑制および免疫調節、体外循環での液性因子の除去による免疫調節などである。これらは、抗体介在性の重症筋無力症では有効であ

るが、T細胞介在性のMSなどでは効果が少ない。T細胞介在性の疾患に対する治療戦略は自己反応性T細胞を除去または不活化し、末梢トランス(アナジー)を導くことにある。MSでは中枢神経(脳・脊髄)の抗原特異的CD4+T細胞が病因に強く関わっており、病気の急性期や再燃時には患者血液中に特定のT細胞の増殖があることが明らかにされている。私達はこの病因となるCD4+T細胞を*ex vivo*で除去し、全血フロー系でCD4+T細胞を効率よく除去する体外循環システムの開発を行い、ヒトに応用できる吸着材を試作し動物モデルでの有用性を確認してきた。

本研究は、*ex vivo*で免疫調節を行う新しい体外循環システムである。医療技術としてモノクローナル抗体をポリスチレン不織布に固定化した選択的細胞吸着材で、世界に類を

みない独創的で画期的な医療技術である。全血フロー系で標的となる CD4+T 細胞や活性化 T 細胞を選択的に捕捉し除去することで免疫調節を行うが、血球成分や血漿成分の非特異的吸着はない（これまでは赤血球や血小板などの非特異吸着に阻害され全血フロー系での選択的な細胞除去は不可能であった）。今後、担体物質の最適化やリガンドの精製技術を改良することで自己反応性 T 細胞または病因となる免疫担当細胞のより選択的な捕捉・除去による免疫調節技術をさらに発展させることが可能である。またこの特異的な細胞吸着療法は T 細胞介在性の自己免疫疾患のみならず骨髄移植や臓器移植における異常免疫反応の抑制や GVHD の予防にも応用しうる画期的なものである。

この新しい体外循環治療の臨床応用には、ヒト免疫性神経疾患での臨床試用を行い有効性および安全性の確認を行う feasibility study が必要である。免疫性神経疾患は症例数が少なく、また体外循環を用いた臨床試験という特殊性から、全国の神経免疫疾患専門の医療施設での共同研究が効率的かつ効果的成果になると期待される。

本治療の有用性が確認されれば、難治性の免疫疾患患者の罹病期間の短縮、QOL の向上、社会生活への復帰および医療費の削減など社会的貢献は計り知れないものがある。

B. 研究方法

1. ヒト臨床研究用 CD4 陽性 T 細胞除去器の製作：体外循環処理量 3 L を目標としたヒト用 CD4 陽性 T 細胞除去器を製作し、ex vivo での回路の設計、試験手順を策定する。

2. 多発性硬化症 (MS) と慢性炎症性脱髄性多発根神経炎 (CIDP) について臨床試験の

プロトコールと患者説明資料を作成し、各施設の倫理委員会に向けて国内 9 施設の神経内科専門医・アフェレシス学会認定専門医で臨床試験を行うにあたっての問題点について検討を行った。

3. ヒト用 CD4 陽性 T 細胞除去器を用い MS や CIDP で、安全性の再確認を含め小規模の feasibility study を行う。

この特異的吸着剤は既に 1. 吸着型血液浄化器基準、2. 医療用具のガイドライン (ISO10993)、3. ヒト又は動物由来の成分を原料として製造される医薬品等の品質および安全性確保について (医薬発 1314 号、H12 年 12 月 26 日、医薬安全局長) 用いる抗体のウイルス否定試験、4. 保存性安定性試験、プライミング性試験などのカラム安全性試験評価基準にすべて合格している。患者を対象とした血漿交換療法など体外循環治療は既に確立された医療技術である。しかし、本研究は患者を対象として新しい治療法の開発を行う臨床研究である。従って臨床試験に際しては、「医薬品の臨床試験の実施基準に関する省令」の規定に準じて、事前に各施設内の倫理委員会でプロトコールの検討を行い、対象被験者に文書による十分なインフォームドコンセントを与え、確実な同意を得て施行すると共に安全性の確保には万全を図ることとした。

C. 研究結果

1. 臨床試験用選択的 CD4+T 細胞除去器の作成と基本的安全性 (生物学的試験) の確認

ヒト全血 3 L 処理用の選択的 CD4+T 細胞除去器を 30 本作成した。抗体固定不織布充填量約 4.2g、除去器のプライミング容量は約 50ml であった。吸着型血液浄化器基準に定められた方法で、発熱物質試験、急性毒性試験、溶

血性試験、皮内反応試験を実施した結果、すべての項目で合格であり、臨床スケールカラムの安全性を確認した。(資料1)

2. 選択的 CD4+T 細胞除去療法による免疫性神経疾患治療プロトコルの作成

これまでの動物モデルでの検討から MS の急性期または再発時が本治療法の良い適応になることが示唆されていることから、これを対象とした治療プロトコルを作成した(資料2)。CIDP についても同様に臨床試験に向けてのプロトコルを作成した(資料3)。作成したプロトコルについて国内9施設の神経内科専門医・アフェレシス学会認定専門医で検討を行った結果、次のような問題点が指摘された。

(a) 選択的 CD4+T 細胞除去に伴う生体反応：生物学的吸着材であるため、用いた抗体に対する生体の反応についての基礎的データを得ておく必要がある。これまでにラットでは抗マウス IgG 抗体が産生されないことが示されているが、ヒトでのデータがない。循環血中より選択的 CD4+T 細胞を除去した場合、実際にヒトではどの程度の CD4+T 細胞の減少がどれくらいの期間続くのかなどの基礎データが必要であり、それをもとに治療回数を設定できる可能性がある。これらは他の大型動物での体外循環による研究結果をヒトに応用するのは困難であり、健常人での体外循環試験が必要と考えられた。

(b) MS の急性期に対する治療法として、現在、メチルプレドニゾロンのパルス療法が施行されることが多いが、体外循環による CD4 陽性 T 細胞除去療法がステロイドパルス療法よりも優れていると実験結果は出ていないので慎重に行うべきである。実験的自己免疫性脳脊髄炎モデルを用いてもう少しはつき

りとした有用性が示された方がよい。

(c) 治療研究を行う過程での有害事象については、体外循環に伴う一般的有害事象はリンパ球除去や血漿交換療法などの体外循環治療の経験から対応が可能と考えられる。しかし、上記の生物学的吸着材使用に伴う反応については慎重に検討する必要がある。体外循環終了後も、比較的長期間(3~6ヶ月)免疫学的検討が必要と思われる。有害事象発生時の賠償方法などについても検討する必要がある。

D. 考察

臨床試験用カラムの製作を行い、吸着型血液浄化器基準での安全性試験を実施し、全ての試験において基準を満たし、ヒト臨床試用への準備が整った。

実際の臨床試験を想定した場合、患者に应用する前に、健常人で本治療法施行時の安全性・生体反応について検討すべきだとの意見が多く、今後、健常人での体外循環試験を行う方向で検討を進めている。(資料4)

E. まとめ

ヒト臨床研究用選択的 CD4+T 細胞除去器を作成し、吸着型血液浄化器基準での安全性試験を終了した。選択的 CD4+T 細胞除去療法による MS および CIDP の治療プロトコルを作成し、問題点を検討した。以上により、ヒトへの臨床試用への準備が整った。

(資料1) CD4 選択除去器(CD4-01)の概要書

平成14年11月29日

旭メディカル株式会社

1. 本研究用用具の開発経緯、原理又は特性等

1-1 開発の経緯

当社は昭和 52 年に血球成分の分離に関する基礎研究を開始し、各種長繊維を用いて白血球の吸着特性を検討した。その結果、ポリエチレンテレフタレート(以下ポリエステル)、ポリアクリロニトリル、ナイロン-6のいずれの不織布も同様の白血球吸着性を有することを見出した。また、白血球の吸着には繊維径が大きく影響し、10 μ m 以下、特に 3 μ m 以下の領域では顕著に吸着性が向上することを見出した。当時、国内で入手可能で最も細い繊維径の極細繊維不織布は、ポリエステル製の不織布であった。また、旭化成工業(株)(現、旭化成(株))でポリエステル製の極細繊維不織布を生産していた。そこでポリエステル製の極細繊維不織布を用いて昭和 59 年から輸血用血液の白血球除去フィルターの開発を開始し、昭和 63 年に製造承認(セパセル 承認番号: 16300BZZ01239000)を取得した。また、昭和 60 年には体外循環用の白血球除去フィルターの開発に着手して、平成元年に膠原病自己免疫疾患を対象に製造承認(セルソーバ 承認番号: 20100BZZ1433000)を、平成 13 年に潰瘍性大腸炎を対象に製造承認(セルソーバE 承認番号 21300BZZ0044000)を取得した。

セルソーバはすべての白血球成分に対して同様の除去能力を有しており、白血球成分の特定の画分を選択的に除去するものでない。

そこで厚生科学研究ヒューマンサイエンス基礎研究(国立療養所川棚病院渋谷先生との共同研究)の下で、細胞性免疫に大きな影響を与えるであろう CD4 陽性 T 細胞を選択的に除去することを目的に検討を行った。結果、共有結合によって抗 CD4 モノクローナル抗体を表面に固定した不織布濾材(抗 CD4 モノクローナル抗体固定濾材)を開発した。該抗 CD4 モノクローナル抗体固定濾材を用いた *in vitro* の小スケールのヒト血液試験、及び EAE ラットでの体外循環試験を実施し、CD4 陽性 T 細胞の選択的除去が可能であることを確認した。

本研究用用具は、厚生労働科学研究事業(こころの科学研究科学事業)の「選択的リンパ球吸着療法による免疫性神経疾患の治療」(H14-こころ-019、主任研究者国立療養所川棚病院渋谷統壽先生)の研究に対して試作提供する研究品である。

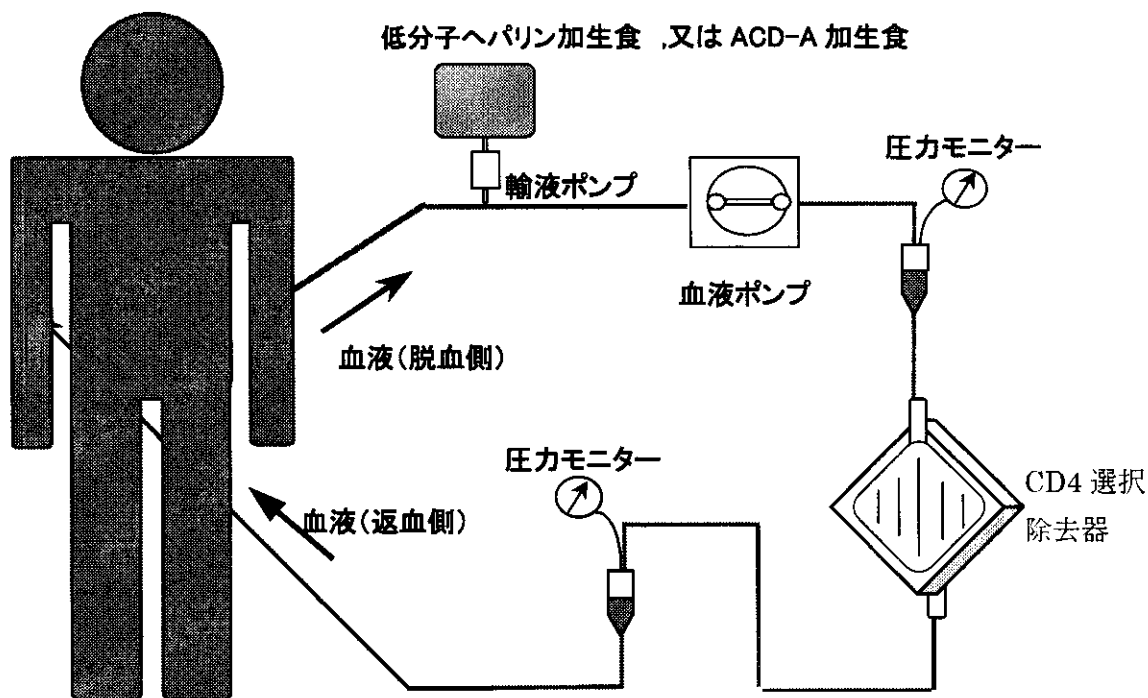
1-2 原理及び性能

概要:本用具はカラム内に抗ヒトCD4モノクローナル抗体を共有結合したポリプロピレン不織布が充填されており、血液中のCD4陽性T細胞を選択的に除去するCD4選択除去器である。

構造:本用具は血液の出入口2ヶ所を有し、内部に抗ヒトCD4モノクローナル抗体を共有結合したポリプロピレン不織布(抗CD4モノクローナル抗体固定濾材)を充填したものである。

原理:患者の血管より血液を取り出し、血液回路で体外閉鎖回路を構成する。血液中のCD4陽性T細胞は、本品によって吸着除去され、CD4陽性T細胞を除去した後の血液が血液回路を通して患者に戻される。

図1 体外循環フロー図



1-3 仕様

表1 CD4 選択除去器(CD4-01)の仕様

部材名	材質等	数量
容器	スチレンブタジエン共重合体	1セット
キャップ	シリコーン	2個
プレフィルター	ポリエステル	2.8~3.8g
抗ヒトCD4モノクローナル抗体 固定フィルター	不織布:ポリプロピレン 抗体:マウスIgG1κ ブロッキング剤:Tween20	3.5~5.0g 4.0~6.0mg 微量
充填液	1%キトサンPBS(-)水溶液	約50ml
滅菌方法	γ線滅菌	
耐圧強度	200mmHg	

1-4 形状、構造、及び寸法
CD4-01構造

図1 全体図

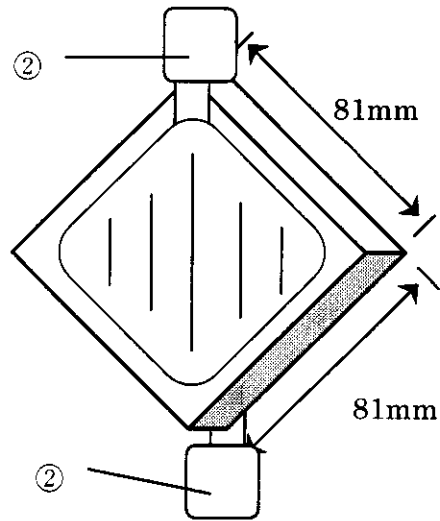


図2 断面図

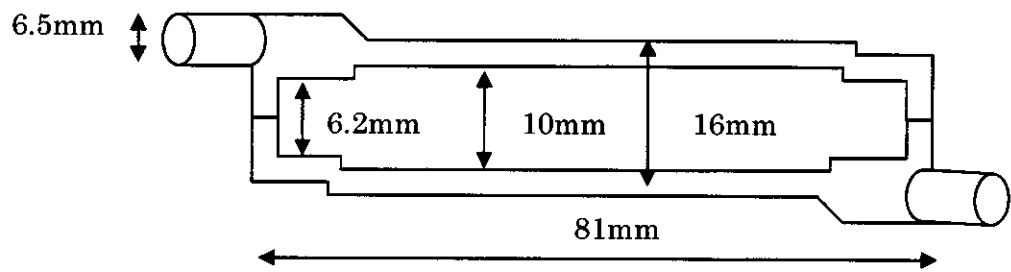


図3 不織布充填構造

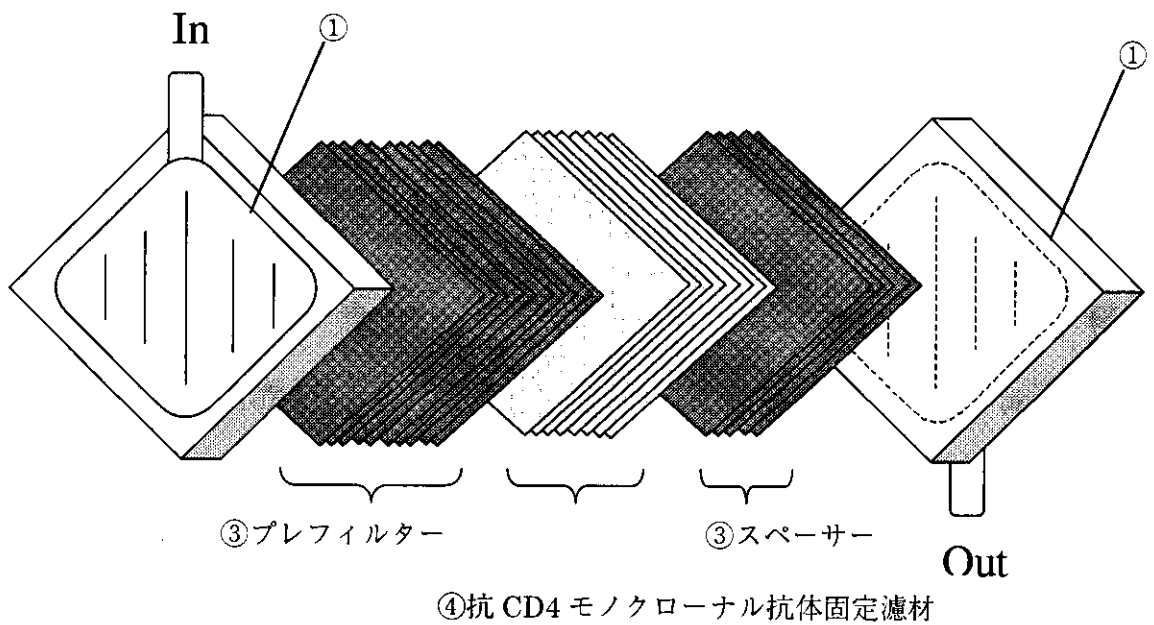
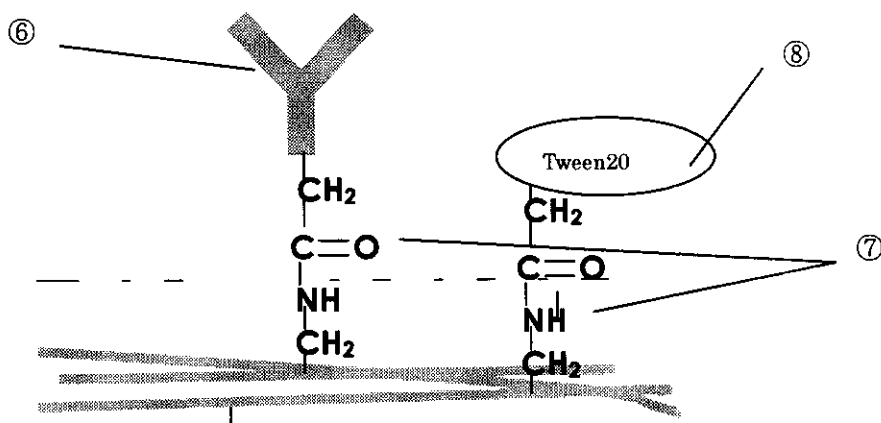


図4 抗ヒト CD4 モノクローナル抗体固定フィルター詳細図



1-5 原材料

次の各部位の番号は、図1～4の図中の番号に対応する。

血液に接触する部分に使用されている原材料には※印をつけた。

表2 原材料

部材名	材質・数量等	
①容器	スチレンブタジエン共重合体	1セット (in 側、out 側)
②キャップ	シリコーン	2 個
③プレフィルター	材質 繊維径(μ m) 重量(g)	ポリエステル 10~40 μ m 2.8g~3.8g
④抗ヒト CD4 モノクローナル抗体固定フィルター	材質 繊維径(μ m) 重量(g) ⑥抗体 サブクラス クローン 細胞株 抗体固定量 ⑦活性基 N-ヒドロキシメチル-アセトアミド ⑧ブロッキング剤 Tween20(東京化成社製)	ポリプロピレン 3.0~4.0 μ m 3.5~5.0mg マウス IgG1 κ (ニチレイ社製) NU-T ヒト活性化 T で免疫した BALB/c のマウス脾細胞由来 4~6mg 1.0~2.0 μ g 微量
⑤充填液	1%キトサン PBS(-)水溶液 キトサン,水溶性 Dulbecco's PBS(-)	約 50ml 植物培養用 (和光純薬社製) 分子量 3,000-30,000 細胞培養用(日水化成社製)

2. 本研究用用具の生物学的安全性、吸着型血液浄化器基準に基づく安全性
2-1 製品安全性試験

1) 生物学的安全性試験

試験ロット: 臨床研究品ロット(1029QSX1)を含む3ロット各 n=1 で実施。

(感作性(フィルターのみで実施)、細胞毒性は n=1)

試験基準: 「医療用具の生物学的試験のガイドライン」に準じ実施した。

試験項目	基準	判定
発熱性試験	三羽の体温上昇 0.6℃以上の試験動物が無く、かつ三羽の合計体温上昇が 1.4℃以下	合格
血液適合性試験 (溶血性試験)	24 時間後の上清液が透明である	合格
細胞毒性試験	細胞毒性強度の標準材料との比較	合格
感作性試験	皮膚感作性の有無	合格
皮内反応試験	注射後 24,48,72 時間毎に観察し、局所に紅斑・浮腫・出血・壊死などを認めない	合格

2) 吸着型血液浄化器基準に基づく安全性試験

試験ロット: 臨床研究品ロット(1029QSX1)を含む3ロットで実施

試験基準: 「吸着型血液浄化器基準」に準じた。

試験項目	基準	判定
無菌試験	真菌・細菌の発育を認めない	合格
耐圧・漏洩試験	耐圧保証の 1.5 倍圧力で耐圧を確認	合格
流出異物数試験	粒径 5 μm 以上: 10 個/ml 以下	合格

試験項目	適応基準	実施本数	結果
部材安全性試験 ■部材溶出物試験	吸着型血液浄化器品質基準 (日本人工臓器工業協会基準)	1本/Lot × 2Lot	
・外観			合格
・泡立ち			合格
・pH			合格
・亜鉛			合格
・KMnO4還元性物質			合格
・蒸発残留物			合格
・紫外吸収スペクトル			合格
・重金属	合格		
製品安全性試験 ■生物学的試験	ISO 10993-11(1993) 吸着型血液浄化器品質基準 "	1本/Lot × 2Lot	合格
・急性毒性試験			
・発熱性物質試験			
・溶血性試験			
・刺激性/皮内反応試験	ISO 10993-10(1995)		
■無菌試験		1本/Lot	合格
■耐圧・漏洩試験		5本/Lot	合格
■微粒子試験		1本/Lot	合格
■細胞毒性試験	ISO 10993-5(1992)	1本/Lot	合格
■感作性試験	ISO 10993-10(1995)	1本/Lot	合格

2-2原材料抗体の安全性試験

試験原材料抗体ロット: 本研究用器具に使用した原材料の抗体ロット

(01E899)

1) ウィルス否定試験

厚生労働省からの「ヒト又は動物由来細胞株を用いて製造されるバイオテクノロジー応用医薬品のウィルス安全性評価」を参考にして、使用する原材料抗体のウィルス否定試験を行った。

試験実施機関: Charles River Laboratories-Wilmington (米国)

試験基準: FDA の「GLP 又は GMP 基準」に準じた。

厚生労働省 推奨試験	実試験項目	評価項目	評価方法	評価基準	結果	判定
レトロウィルス 試験	電子顕微鏡 観察試験	電子顕微鏡によるウィル ス様形態の観察	ウィルス混形態をコント ロールとした電顕による 形態観察	ウィルス様粒子の有無	検出せず	合格
In vitro試験	in vitro試験	ヒト・サル・ウス3種の細 胞にてウィルス否定試験	細胞変性・誘発作用	細胞の形態	正常形態	合格
In vivo試験	in vivo試験	細胞変性・血球吸着等の 感染兆候の無いウィルス 検出	マウス・モルモット・卵に 接種し、ウィルス有無	生死/漿尿膜囊液の赤血 球凝集	異常無し	合格
抗体産生試験	MAP試験	マウス由来の16種類の ウィルス否定試験	マウス由来16種類ウイル スの有無	ウィルス検出有無	検出せず	合格
—	BSAウィルス 混入試験	牛由来9種のウィルス否 定試験	細胞変性・血球吸着・免 疫蛍光測定	ウィルス検出有無	検出せず	合格

※ マウス由来ウィルス 16 種

Name	Family/Genus
Sendai virus	Parainfluenza
Pneumonia virus of mice	Paramyxo
Mouse hepatitis virus	Corona
Minute virus of mice	Parvo
Mouse parvo virus	Parvo
Mouse poliovirus	Picorna
Reovirus Type3	Reo
Epizootic diarrhea of infant mice	Rota
Mouse pneumonitis virus	Papova
Ectromelia	Pox
Polyoma virus	Papova
Mouse adenovirus	Adeno
Lymphocytic choriomeningitis	Arena
Mouse cytomegalovirus	Heerpes
Mouse thymic virus	Heerpes
Hantaan virus	Hanta
Prospect Hill Virus	Hanta
Lactate dehydrogenase virus	Toga

2) マイコプラズマ否定試験

試験実施機関: Charles River Laboratories·Wilmington (米国)

試験基準: FDA の「GLP 基準」に準じた。

実施試験項目	評価項目	評価方法	評価基準	結果	判定
マイコプラズマ否定試験	マイコプラズマの存在	マイコプラズマのコロニー形成	コロニー形成有無	コロニー形成無し	合格

※LIFE-SCIENCE INFORMATION CENTER の「バイオ医薬品および産生細胞の品質・安全性評価法」に記載された「モノクローナル抗体の品質・安全性評価」を参考に実施した。

2-3 滅菌

本研究品 (CD4-01) の滅菌条件は「医療用具の滅菌バリデーションガイドライン」(平成 10 年 5 月 1 日、医薬監第 69 号) に従って表4の通り設定した。

表 滅菌条件

無菌性保証基準(SAL)	10 ⁻⁶
滅菌方法	γ線滅菌
滅菌線量	31kGy

2-4 保存安定性に係る試験結果

試験方法

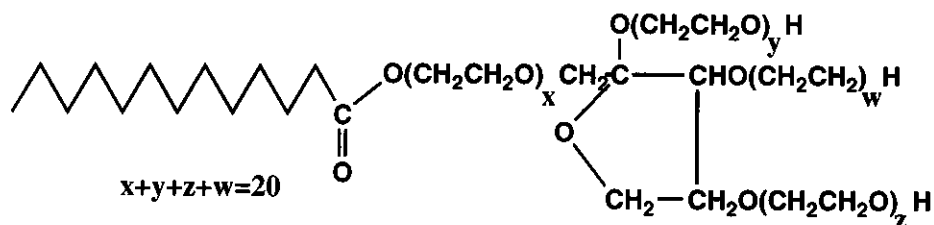
抗CD4モノクローナル抗体固定濾材15mgをミニカラムに充填して各温度で保存し、CD4養成細胞の除去能力の変化を経時的に測定した。試験は、健常ヒト血液8容に対してACD-A1容を加カラム内残留物質の安全性について

・ プライミング後カラム内の残留量

- 1) Tween20
- 2) 抗ヒトCD4抗体
- 3) キトサン
- 4) HMIAA

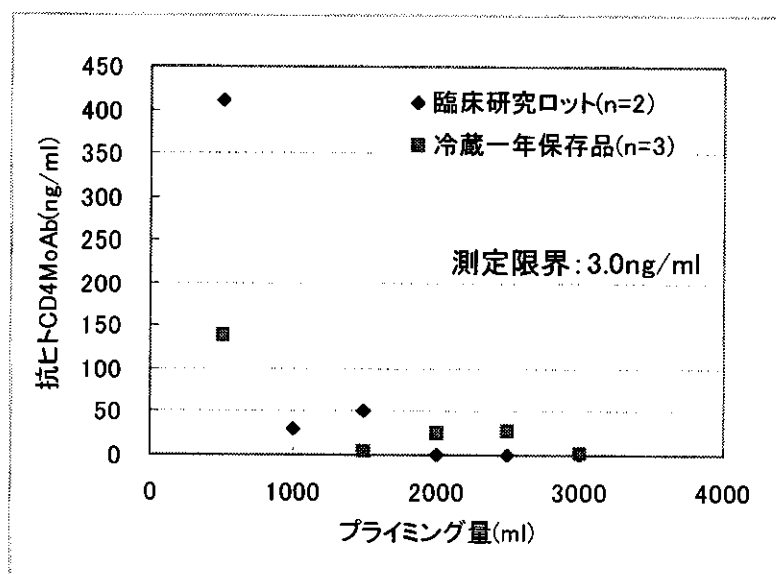
*プライミング条件：5%ブドウ糖注射液1L+生理食塩水2L

1) Tween20：ポリオキシエチレンソルビトールエステル(M.W.約1200)

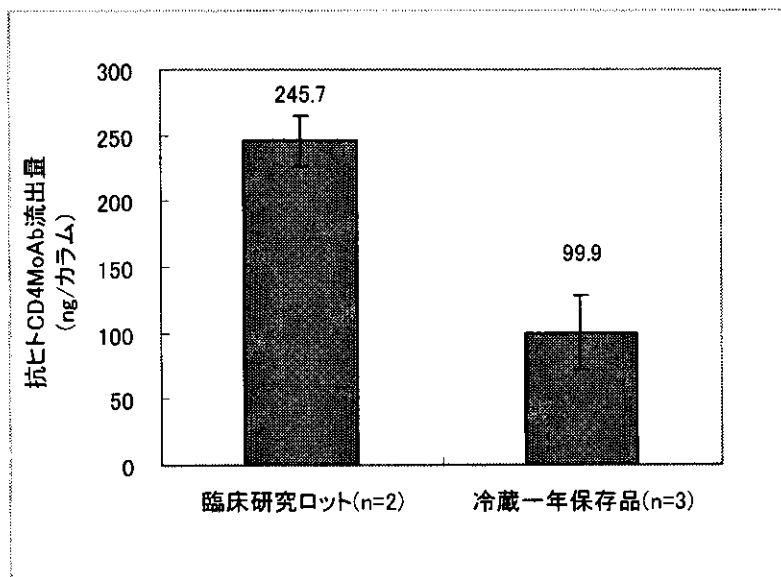


LD50 値	ヒト 50kg での安全係数 ： $\times 10^{-4}$	カラム内最大残留量	安全係数
ivn-mus：1420mg/kg	7.1mg/50kg	0.8mg/カラム未満	1.1×10^{-5}

2) 抗ヒトCD4抗体（クローン；NU-T）



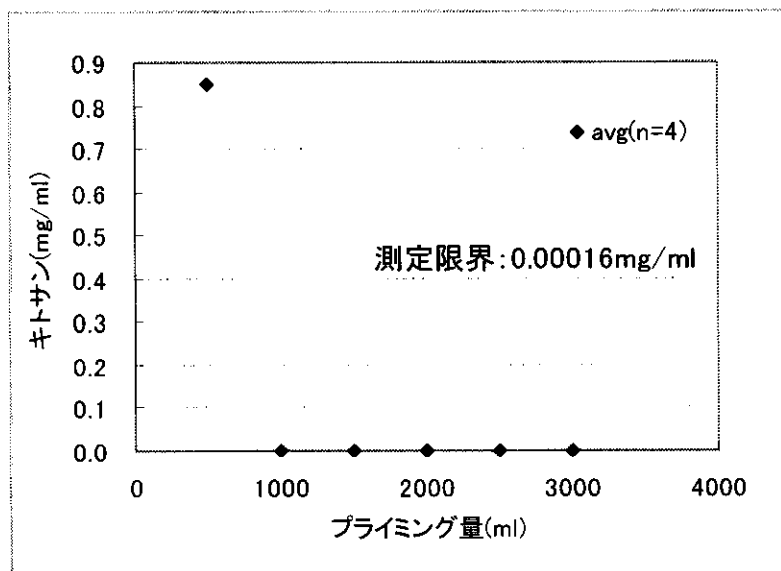
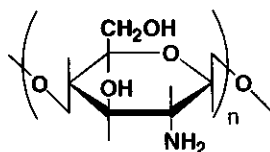
プライミング(3L)流出積算量



プライミング時抗体流出量(ng/カラム)

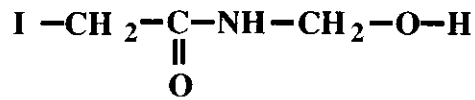
臨床研究ロット(n=2)	同仕様冷蔵一年保存品
245.7 ± 19.1	99.9 ± 28.8

3) キトサン (M.W.3000-30000)



LD50 値 (グルコサミン)	ヒト 50kg での安全係 数 : $\times 10^{-4}$	カラム内残留量 (n=4)	カラム内全量の安 全係数
ivn-mus : 1100mg/kg	5.5mg/50kg	3.9mg/カラム未満	7.0×10^{-5}

4) HMIAA : N-Hydroxy-2-iodoacetamide (M.W.215)



カラム内不織布への HMIAA 固定量 : 1.0-2.0 μg /カラム

LD50 値 (2-Iodo acetamide)	ヒト 50kg での安全係 数 : $\times 10^{-4}$	カラム内固定量	カラム内全量の 安全係数
ivn-mus : 56mg/kg	0.28mg/50kg	1.0-2.0 μg /カラム	7.1×10^{-7}

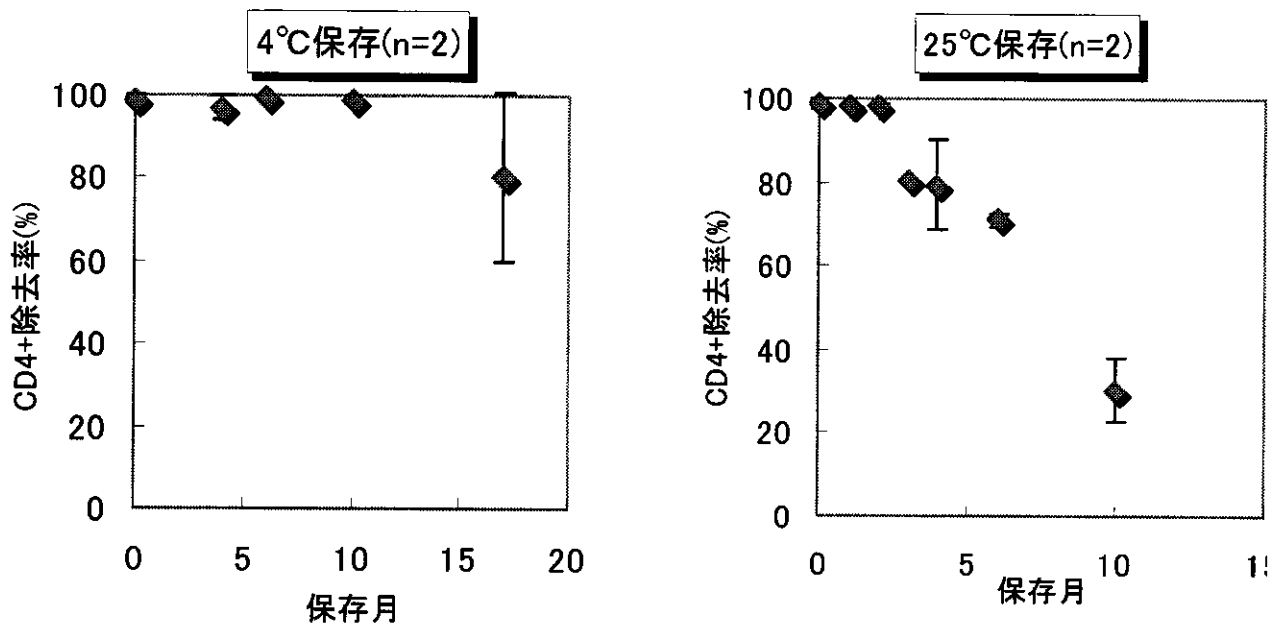
得た血液を、流速 1.0ml/min で灌流して行った。

結論

抗 CD4 モノクローナル抗体固定濾材は、凍結を避けて 4°C で保存する。

保存期間は 6 ヶ月間とする

試験結果



2-5 プライミング性に係る試験結果

結論

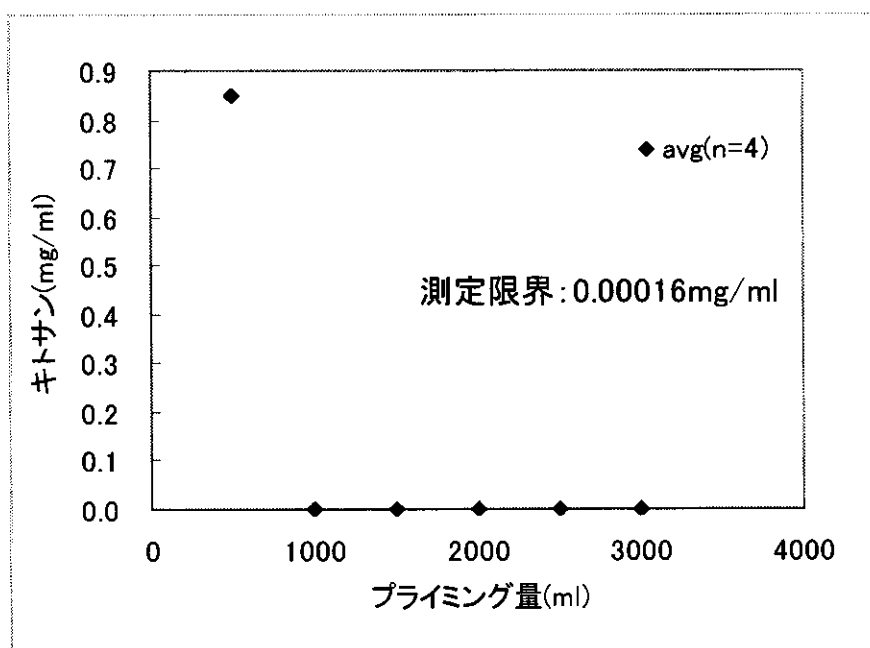
プライミングは、流速 100mL/分であらかじめ 5%ブドウ糖液 1L を灌流した後、生理食塩液を灌流してください。

(1)キトサンの安全性に係る試験結果

試験方法

CD4-01と同様のカラムを試作し、流速 100mL/分であらかじめ 5%ブドウ糖液 1L を灌流した後、生理食塩液を灌流してキトサンの溶出量を測定(蛍光測定法)した。

結果

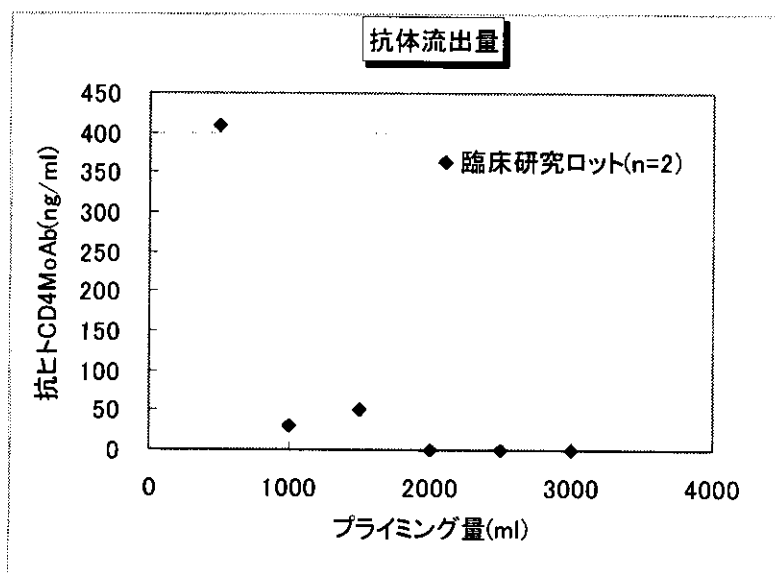


LD50値 (キチン)	ヒト50kgでの安全係数	流出量から推定されるカラム内に残存する最大量(n=4)	カラム内全量の安全係数(体重50kg)
ivn・mus 1100mg/kg	: 5.5mg/50kg : $\times 10^{-4}$	3.9mg/カラム	7.0×10^{-5}

(2)抗体の溶出に係る試験結果

試験方法

CD4-01と同様のカラムを試作し、流速 100mL/分であらかじめ 5%ブドウ糖液 1Lを灌流した後、生理食塩液を2L 灌流して抗体の溶出量を測定 (MicroBCA 法: 蛋白質定量 ELISA) した。



測定限界 3.0ng/ml