

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。ヒト臨床試験用CD4+T細胞吸着器を作成し、滅菌時の保護材について検討し、より安全性の高いトリプトファンで抗体の細胞認識部位の機能保護が可能であることを確認した。多発性硬化症の患者を対象とした治療プロトコールを作成し検討した。

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+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細胞を特異的かつ効率よく除去することに成功した。さらに、臨床応用に向けて、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、臨床に試用できる段階に到達した。また、動物モデルでの検討で、選択的CD4+T細胞除去カラムによる治療が免疫性神経疾患の治療戦略として有用であることを示した。

今年度は、昨年度から評価を実施してきたキトサンに代わる、滅菌時の抗体機能の低下を防ぐ作用の高い材料の探索・検討を実施した。さらに、今後の臨床試用をめざして、臨床研究選択的CD4+T細胞除去器の試作を行い、安全性を確認した。また、実際に免疫性神経疾患の治療に用いる場合を想定して治療プロトコールを作成した。

2. 研究方法

(1) 選択的CD4+T細胞除去カラム（モノクローナル抗体固定除去材）の作成

a) ポリスチレン不織布及び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。この反応液にポリスチレン製不織布 0.8g 及びポリプロピレン製不織布 0.8g をそれぞれ湿潤させ24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。

b) 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。

(2) トリプトファン添加充填液の滅菌保護作用の検討

a) 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(-)水溶液及び 0.5%トリプトファン PBS(-)水溶液をそれぞれ充填液として添加しミニスケールカラムとした。また、同時に PBS(-)水溶液のみを充填液としたミニスケールカラムを作成した。これらミニスケールカラムをコバルト 60 γ 線照射装置にて、照射線量が 20.4 kGy、25kGy、44.3kGy、64.6kGy で照射し滅菌を行った。

b) ミニスケール血液評価

健康人より採取した末梢血液に抗凝固剤として ACD-A を加え（血液：ACD-A=8：1）、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 PBS(-)溶液を 10ml 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。血小板数はマイクロセルカウンター（symex 社製）にて求め、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により、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。

(3) 臨床試験用選択的 CD4+T 細胞除去器の作成

a) カラムの作成

モノクローナル抗体固定除去材を、73.5mm 角に切断し、容量 50ml のカラムに充填し、臨床スケールカラムを作成した。0.5%トリプトファン PBS(-)水溶液を同時に充填し、本カラムをコバルト 60 γ 線照射装置にて、照射線量 25kGy を照射し滅菌を行った。

b) 臨床スケールカラムの基本的安全性（生物学的試験）の確認

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る。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℃ \pm 2℃に保ち汚染をさけて血液ポンプにより、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、室温になるまで放置し、これを試験液とした。

本試験液を用い、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。

(4) 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

T 細胞介在性の免疫性神経疾患である多発性硬化症を対象にした臨床試験に向けて、選択的 CD4+T 細胞除去療法の治療プロトコルを作成し、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. 研究成果

(1) トリプトファン添加充填液の滅菌保護作用の検討

担体にポリプロピレン不織布を用いた濾材より作成したミニスケールカラムを抗凝固剤に ACD-A 液を用いて 5ml の血液を用いた評価を実施した。PBS(-)水溶液を用いた場合、CD4(+)T 細胞除去率は 19.5% \pm 2.6%(mean \pm s.t.d,n=3)で、CD4(-)T 細胞回収率は 78.15% \pm 6.4%(mean \pm s.t.d,n=3)であった。一方、従来用いていた、1%キトサン PBS(-)水溶液を用いた場合、CD4(+)T 細胞除去率は 93.8% \pm 5.5%(mean \pm s.t.d,n=9)で、CD4(-)T 細胞回収率は 78.9% \pm 8.3%(mean \pm s.t.d,n=9)であり、従来の結果を再現した。今回新たに用いた、0.5%トリプトファン PBS(-)水溶液を用いた場合、CD4(+)T 細胞除去率は 92.9% \pm 6.7%(mean \pm s.t.d,n=18)で、CD4(-)T 細胞回収率は 81.6% \pm 4.1%(mean \pm s.t.d,n=18)であり、キトサンとほぼ同等の選択除去性を有することを確認した。(Fig. 1)

白血球、血小板、赤血球の回収率は 1%キトサン PBS(-)水溶液及び 0.5%トリプトファン PBS(-)水溶液でそれぞれ、白血球回収率：68.8% \pm 9.1%(mean \pm s.t.d,n=9)、69.9% \pm 4.8%(mean \pm s.t.d,n=18)、赤血球回収率：98.7% \pm 1.0%(mean \pm s.t.d,n=9)、97.2% \pm 3.2%(mean \pm s.t.d,n=18)、血小板回収率：90.3% \pm 10.6%(mean \pm s.t.d,n=9)、79.5% \pm 18.5%(mean \pm s.t.d,n=18)であった。(Fig.2)

また、 γ 線滅菌時の照射線量を 20.4kGy、44.3kGy、64.6kGy と高めた場合でも、最大の 64.6kGy までは 1%キトサン PBS(-)水溶液とほぼ同等の選択性能を有することが示唆された。(Fig.3, 4)

(2) 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 3L 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。

(3) 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多発性硬化症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（別添 1）。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) 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。

4. 考察

滅菌保護材としてこれまでに臨床で用いられて安全性が確認されている物質として、新たに、トリプトファン PBS(-)水溶液の可能性について検討した。結果、トリプトファンを用いて γ 線滅菌を実施しても、従来用いてきた 1%キトサン PBS(-)水溶液とほぼ同等の CD4+T 細胞の選択性能を有することを確認した。また、赤血球及び血小板の回収率についても滅菌保護材によらずほぼ同等で、高い回収率を示すことを確認した。更に、 γ 線の照射線量を最大 60kGy 照射した場合でも、安定に抗体の細胞認識部位の機能保護が可能であった。

トリプトファンはキトサンに比較して、低い濃度で滅菌保護効果を有したが、これはトリプトファン化学構造によると考えられる。トリプトファンは芳香族環を有するため、より水溶液中のラジカルをトラップできる可能性があると推測された。また、従来用いてきたキトサンと同様にアミノ基を有するため、これがラジカルスカベンジャーとして有用に機能したのと考えられた。

昨年度に引き続き、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た。結果、全ての試験において基準を満たし、昨年度の再現性を確認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て、選択的 CD4+T 細胞除去療法による多発性硬化症急性期の治療プロトコルを作成し、問題点を検討したが、患者に応用する前に、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。

5. まとめ

γ 線滅菌に伴う抗体機能の低下を防ぐ保護材として、トリプトファンについて検討し、25kGy の照射線量で滅菌しても選択的に CD4+T 細胞を除去できることを確認した。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多発性硬化症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ほぼ確立した。

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)

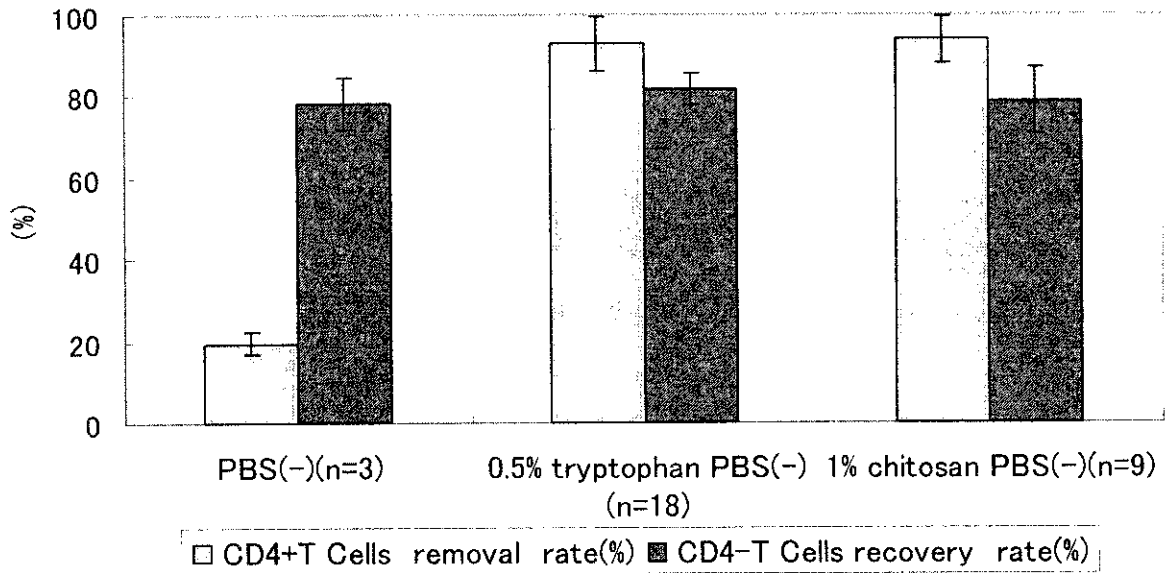


Fig.1 Protective effects of tryptophan on γ -rays sterility.

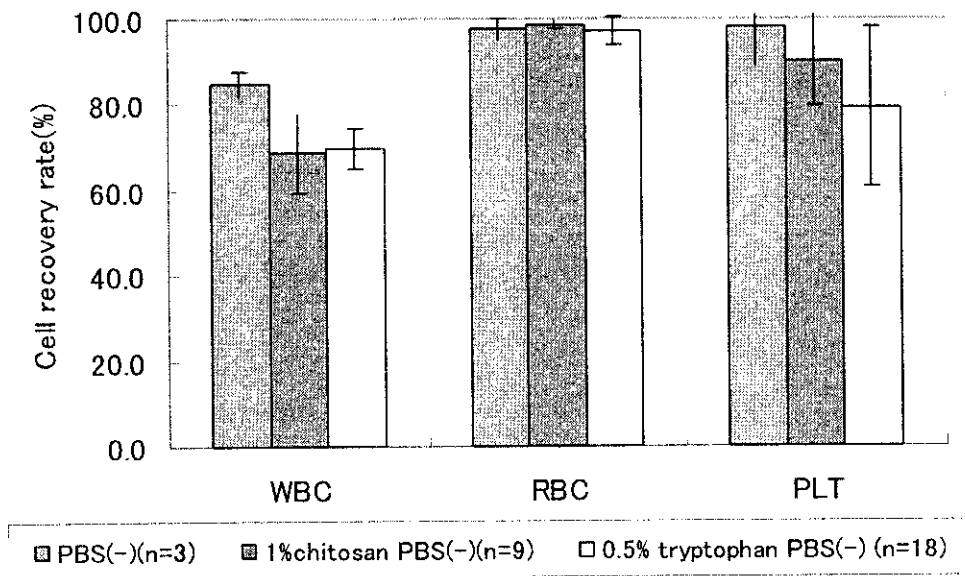


Fig.2 Effects of γ -rays protectings agents.

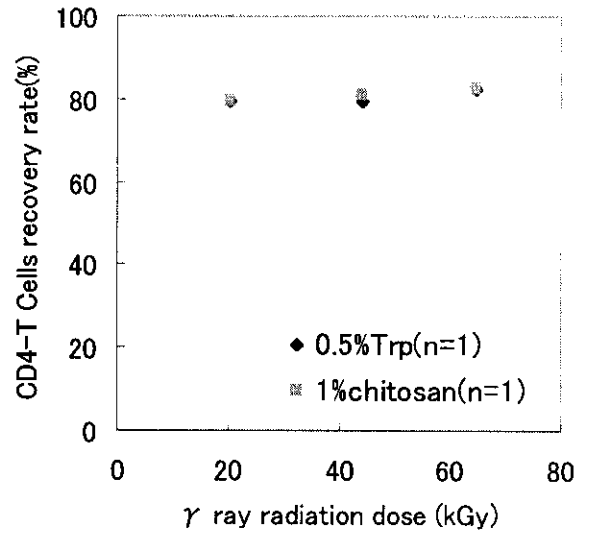
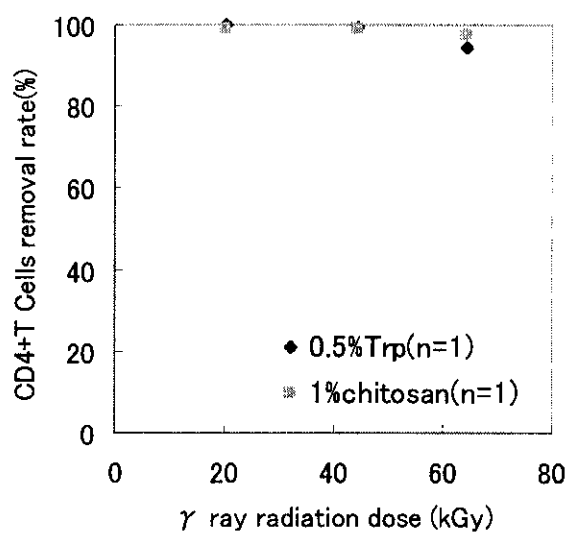


Fig.3.4 Ability of γ -ray protecting agents.

別添1. 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

1. 背景

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、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、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）などに分類される。一方、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 MS 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。このため、病因となる CD4 陽性 T 細胞を ex vivo で除去し免疫療法を行う目的で、国立療養所川棚病院と旭メディカル社の共同により、CD4 陽性 T 細胞吸着カラムを開発した。

今回、再発寛解型 MS 患者の急性増悪期における、CD4 陽性 T 細胞吸着カラムを用いた体外循環治療の有効性および安全性を検討することとした。

2. 目的

再発寛解型 MS 患者の急性増悪期における、CD4 陽性 T 細胞吸着カラムによる体外循環治療の有効性および安全性を検討する。

3. 対象と選択・除外基準

(1) 対象

再発寛解型 MS で急性増悪期の患者。

(2) 選択基準

以下の全ての項目を満たす患者。

- 1) 新しい MS 診断基準（Ann Neurol 50: 121-127: 2001）にて MS と診断される患者。
- 2) 再発寛解型 MS 患者で急性増悪を認め、その状態が24時間以上持続し改善を認めない患者。
- 3) CD4 陽性 T 細胞吸着カラムを用いた体外循環治療の実施に同意している患者。

(3) 除外基準

- 1) 急性増悪後 7 日以上を経過した患者。
- 2) 治療開始前 1 ヶ月以内に、副腎皮質ホルモン大量療法による治療を受けたか、新たな免疫抑制剤による治療を開始した患者。

- 3) 治療開始前 1 ヶ月以内に、これまで受けていた副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤による治療が強化された患者。
- 4) 治療開始前 1 ヶ月以内に他の血液浄化療法を受けている患者。
- 5) 重篤な基礎疾患を有する患者。
心疾患：発症 6 ヶ月以内の虚血性心疾患，加療を要する不整脈。
肝疾患，呼吸器疾患，腎臓疾患，血液疾患，出血性素因，その他
：主治医が適応の可否を決定する。
- 6) 白血球数が 3,000/ μ L 未満の患者。
- 7) 血小板数が 100,000/ μ L 未満の患者。
- 8) 妊婦あるいは妊娠している可能性がある患者，および小児。
- 9) EDSS 8.0 以上の患者。
- 10) その他，主治医が本治療に不相当と判断した患者。

4. 患者の同意

治療の実施に先立ち，主治医は対象となる患者に対し下記内容について十分説明し，本治療への参加について，患者本人の自由意志による同意を得なければならない。この同意は原則として文書にて行われる（同意書）。身体的理由によって文書を残すことができない患者については，口頭での同意も認める。ただしこの際は，その記録と理由を残す。

患者本人が同意能力を欠く場合は，法定代理人等の同意を得て，同意書には同意者と本人との関係を記録する。

患者が未成年の場合は，患者本人と法定代理人等の両者から同意書を得る。

- (1) 本治療の目的および方法。
- (2) 本治療で予期される効果，および危険性。
- (3) 当該疾患に対する他の治療法の有無，およびその内容。
- (4) 本治療の参加に同意しない場合でも，不利益を受けないこと。
- (5) 本治療の参加に同意した場合でも，随時これを撤回できること。
- (6) 治療の結果を公表にあたっては，患者の個人情報秘匿されること。

5. 治療方法

- (1) CD4 陽性 T 細胞吸着カラムを用いた体外循環治療を，初回治療から 10 12 日以内に合計 5 回施行する。
- (2) 治療に先立ち，カラムと回路を 5%ブドウ糖液 1L，引き続き生理食塩水 2L で洗浄する。
- (3) 治療中に抗凝固剤として低分子ヘパリン 1,500 2,000 単位/時間を使用する

- (4) 治療中の血液流速は 30 50 mL/分とし、1 回の処理量は 3L とする。

6. 併用薬剤・理学療法

- (1) CD4 陽性 T 細胞吸着カラムを用いた体外循環治療中、および治療終了後 8 週間以内に以下の治療を新たに行うことは原則として禁止する。
- 副腎皮質ホルモン治療、IFN-β 治療、血液浄化療法、その他免疫抑制療法。
- (2) 治療終了後 8 週間以内に MS 症状の著しい増悪を認めた時は、副腎皮質ホルモン大量療法など他の治療を行うことを可とし、その時点で CD4 陽性 T 細胞吸着カラムを用いた体外循環治療有効性の検討は中止する。
- (3) 既に IFN-β 治療を行っている患者は、CD4 陽性 T 細胞吸着カラムによる体外循環治療中、および治療終了後の IFN-β 治療の継続を可とする。
- (4) 既に少量の副腎皮質ホルモンや免疫抑制剤の内服を行っている患者は、CD4 陽性 T 細胞吸着カラムによる体外循環治療中および治療終了後に、投与量を変更せずに内服継続することを可とする。
- (5) CD4 陽性 T 細胞吸着カラムによる体外循環治療中に血圧低下を認めた場合は、以下の薬剤を用いて加療することは可とする。ただし、その際は使用した薬剤と使用量を記録し、報告する。
- 1) 塩酸エチレフリン（エホチール等）
 - 2) 硫酸アトロピン（アトクイック等）
 - 3) コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム（サクシゾン等）
- (6) 発熱やカテーテル挿入部痛を改善するために、非ステロイド性消炎鎮痛剤を使用することは可とする。
- (7) 治療開始前に理学療法を行っている患者は、CD4 陽性 T 細胞吸着カラムによる体外循環治療中および治療終了後も、同一プログラムで理学療法を継続することを可とする。

7. 観察並びに検査項目と実施時期

(1) 神経学的診察

治療開始前に下記の全項目について診察し記録する。

脳神経系、運動系、腱反射、病的反射、感覚系、協調運動、自律神経。

(2) MS の総合障害度

下記のスケールについて、治療前、治療終了時（あるいは中止時）、治療終了後 2 週間毎に評価し、記録する。

Expanded Disability Status Scale (EDSS)

(3) MRI 検査

治療開始前および治療終了2, 6週間後にMRI撮影を実施する。

1) 装置

必ず同一機器にて検査する。1.0テスラ以上の超電導MRI装置を用いる。

2) 撮影方法

必ず同一条件にて撮影する。

- ・ 撮影部位：脳；皮質下大脳白質から小脳・下部脳幹まで。
脊髄；臨床症状と一致する責任病巣が確認される部位。
- ・ 検査法：スピンエコー法，その他。
- ・ 断面：脳；水平断像，矢状断像，脊髄；矢状断像。
- ・ 種類：T1強調画像，T2強調画像，FLAIR画像，Gd造影画像。
- ・ スライス：5mm厚を5mm間隔で撮影する。

(4) 一般臨床検査

治療前，治療終了時（あるいは中止時），治療終了2, (4), 6週間後に以下の一般臨床検査を実施する。

血液検査：赤血球数，白血球数，白血球分画，ヘモグロビン量，ヘマトクリット値，血小板数。

生化学検査：総蛋白，アルブミン，総ビリルビン，GOT，GPT， γ -GTP，ALP，LDH，総コレステロール，BUN，クレアチニン，Na，K，Cl，Ca。

(5) 髄液検査

治療前，治療終了4週間後に以下の検査を実施する。

細胞数，蛋白，IgG Index，ミエリンベースック蛋白。

(6) 末梢血液CD3, CD4, CD8, CD25細胞数, CD4/CD8比。

- 1) 治療前，治療終了時（あるいは中止時），治療終了2, 4, 6週間後に採血する。
- 2) 検体はBMLが回収し，測定を行う。

8. 中止基準

下記に示す，治療を中止すべき事例が生じた場合は，主治医は治療を中止し適切な処置を取る。

- (1) 有害事象または臨床検査値異常が発現し，治療継続が困難と判断された場合。
- (2) 基礎疾患の悪化により，治療継続が困難と判断された場合。
- (3) その他，主治医が治療継続は困難と判断した場合。
- (4) 患者もしくは法定代理人などから，治療中止の申し出（同意の撤回）があった場合。