

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15年度 総括研究報告書

主任研究者 澁谷 統壽

平成16(2004)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) 健常人に対する選択的CD4陽性T細胞除去カラムによる …… 5
体外循環試験研究有害事象発生報告

(資料2) 有害事象発生原因の検討 …………… 6

(資料3) 「こころの健康科学研究事業」ワークショップ …………… 14
自己免疫疾の発症および病態形成とCD4 T細胞 抄録

I. 総括研究報告

平成15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 渋谷統寿

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15年度は、健常人でCD4+T細胞除去器による体外循環試験を実施し、安全性および選択的細胞除去に伴う生体反応を検討した。その結果に基づき、CD4+T細胞除去器の一部改良を行った。また、ワークショップ「自己免疫疾患の発症および病態形成とCD4T細胞」を開催し、分担研究者および基礎研究者を交えて、最新の情報交換を行い本研究の方向性について検討した。

分担研究者

松尾秀徳（国立療養所川棚病院），吉良潤一（九州大学神経内科），祖父江元（名古屋大学神経内科），荻野美恵子（北里大学神経内科），津田裕士（順天堂大学内科），野村恭一（埼玉医科大学神経内科），服部孝道（千葉大学神経内科），藤原一男（東北大学神経内科），菊地誠志（北海道大学神経内科）

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。臨床的に用いられている今日の治療手段は、免疫応答の最終段階に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、体外循環で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することにある。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、ヒト臨床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. 健常人を対象とした体外循環試験試験のプロトコールと説明資料を作成し、各施設の倫理委員会に諮る。

3. 健常人を対象とした体外循環試験試験を実施し、その結果を解析し、今後の臨床試験の進め方を検討する。

（倫理面への配慮）

この特異的吸着剤は既に 1. 吸着型血液浄化器基準、2. 医療用具の生物学的試験のガイドライン（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）用いる抗体のウィルス否定試験、4. 保存性安定性試験、プライミング性試験、5. 動物体外循環評価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、本研究は患者または健常人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。

2. 選択的 CD4+T 細胞除去療法による健常人での体外循環試験。

一施設では、実際に抗ヒト CD4 モノクローナル抗体固定ミニカラムを用いて末梢血 CD4 細胞吸着能について検討が行われた。ヘパリン加末梢血 5ml をプライミングと同様に流速 1ml/分にてカラム内を通過させた。カラム通過前後の検体をフローサイトメーターにて分析し、リンパ球 3 万個中の CD4、CD8 陽性細胞% を 4 回測定した。本カラムにより検体中の CD4 陽性細胞がほぼ完全に吸着除去されることがわかった。

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。分担研究者の敷施設で健常人での体外循環試験について倫理委員会で審議中である。

倫理委員会で承認された一施設では 2 名の被験者の同意を得て、体外循環を施行した。カラムの直後では CD4 陽性 T 細胞はほとんど吸着され、体外循環中では赤血球、血小板数は変化なく、CD4+T 細胞は一過性の減少が認められたが 1 週間以内に回復した。しかし、一例では体外循環終了直後に、もう一例では体外循環中に悪寒・戦慄、発熱の出現を認めた。さらに、その後の検査で一過性の肝機能障害を認めたが、1-2 週で正常化した。(別添資料 1)。このため、原因が明らかになるまで健常人の体外循環試験を一時中止した。

原因の調査についてカラムの製造元である旭メディカル社と原因について検討した。カ

ラム灌流後の洗浄液中にはエンドトキシンは検出されなかったが、用いたモノクローナル抗体および充填剤であるキトサンにエンドトキシンが含まれていた可能性を示唆する試験結果が得られた(添付資料 2)。

3. 臨床試験用選択的 CD4+T 細胞除去器の改良と基本的安全性(生物学的試験)の確認。

前述の健常人での体外循環試験の結果を踏まえて、選択的 CD4+T 細胞除去器の改良を行い安全性について再度確認した。その結果を倫理委員会に提出し研究再開について審査を受けた。

4. ワークショップの開催

ワークショップ「自己免疫疾患の発症および病態形成と CD4+T 細胞」を開催し、分担研究者および基礎研究者を交えて、最新の情報交換を行い本研究の方向性について検討した(別添資料 3)。

D. 考察

健常人での体外循環試験で、*in vitro* の結果と同様の選択的 CD4+T 細胞除去器の性能が確認され、選択的 CD4+T 細胞除去器を用いた体外循環治療の可能性が示唆された。しかし、一過性ではあるが有害事象も認められ、選択的 CD4+T 細胞除去器の改良と安全性についてのさらなる検討が必要と考えられた。

ワークショップでは CD4+T 細胞の中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示され(別添資料)、疾患の増悪・再燃に関与する T 細胞をより選択的に標的とすることおよび治療の時期(急性増悪期)を選択することで、さらに安全で効率的な治療手段となることが推測される。MS やその動物モデルでは脳脊髄炎惹起性 T 細胞は、活性化した特定の CD4+T 細胞が増殖しており、より

選択的な T 細胞の標的分子として、活性化 T 細胞の表面抗原（クラス II 分子、IL - 2 受容体、各種接着分子など）や特定の TCR が考えられる。活性化 T 細胞の表面分子である CD25 および CD26 もその一つの候補と考えられた。

E. 結論

健康人で CD4+T 細胞除去器による体外循環試験を実施し、安全性および選択的細胞除去に伴う生体反応を検討した。その結果に基づき、CD4+T 細胞除去器の一部改良を行い、安全性の確認を行った。

F. 研究発表

該当なし。

G. 知的所有権の取得状況

該当なし。

(資料1)

健常人に対する選択的CD4陽性T細胞除去カラムによる体外循環試験研究 有害事象発生報告

平成15年7月10日

主任研究者 国立療養所川棚病院 院長 濹谷統壽

当院倫理委員会で承認を得た上記の研究において有害事象の発生があったので報告いたします。

有害事象1 20歳 男性 (悪寒・戦慄, 発熱, 肝機能障害)

平成15年4月7日, 被験者1に選択的CD4陽性T細胞除去カラムによる体外循環試験を実施。体外循環処理3L終了直後より, 悪寒・戦慄が出現。1時間ほど経過を見るも改善しないため, 点滴を施行しながら経過を観察。発熱39.2℃まで上昇したため, 入院とし, サクシゾン100mgを静注し, 抗生物質を点滴静注した。本人の了承を得て家族に連絡し, 状況の説明および入院についての了承を得た。その後徐々に軽快し, 翌日には症状はなくなった。採血では, 白血球の増加およびCRP高値を認めた。自覚症状が消失していたため, 検査結果および経過の観察が必要であることを説明したが, 退院の希望が強く, 定期的経過観察と異常を感じた場合にはすぐに連絡することとして退院とした。1週間後の再診では特に自覚症状なく血液検査では, 肝機能のわずかな異常を認めた。一ヶ月後の経過観察では自覚症状なく, 検査所見も改善していた。以後, 体調に異変があれば連絡し再診することとしている。

有害事象2 27歳 男性 (悪寒・戦慄, 発熱, 肝機能障害)

平成15年4月7日, 被験者2に選択的CD4陽性T細胞除去カラムによる体外循環試験を実施。体外循環処理1Lを経過した時点で, 悪寒・戦慄が出現。有害事象1の経験から直ちに試験を中止。点滴を施行しながら経過を観察。発熱38.5℃で倦怠感あり。入院とし, 輸液およびサクシゾン200mgを静注した。その後, 徐々に軽快し, 翌日には自覚症状はなくなり, 食欲も良好。内科的診察でも明らかな異常を認めなかった。血液検査で白血球増多, CRP高値, 肝機能障害が認められたが, 退院の希望強く, 安静と禁酒の必要なことを説明し, 定期的経過観察と異常を感じた場合にはすぐに連絡すること等を説明して退院とした。1週間後の再診では特に自覚症状なく血液検査では, 白血球数, 炎症所見, 肝機能はほぼ正常化していた。一ヶ月後の経過観察では自覚症状なく, 検査所見も改善していた。以後, 体調に異変があれば連絡し再診することとしている。

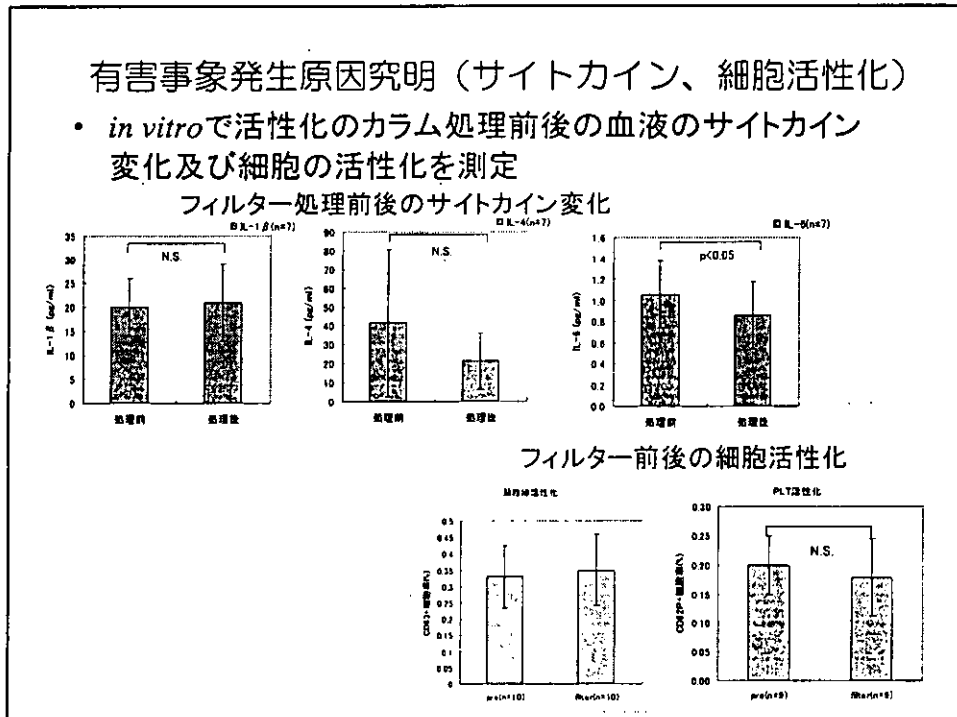
原因の調査について

共同研究者で, カラムの製造元である旭メディカル社と原因について検討した。カラム灌流後の洗浄液中にはエンドトキシンは検出されなかったが, 用いたモノクローナル抗体および充填剤であるキトサンにエンドトキシンが含まれていた可能性を示唆する試験結果が得られた(添付資料参照)。現在, これらの点について改良を加え, 安全性について再度確認する予定である。

(資料2)

有害事象発生原因究明 (エンドトキシン因)			
	対象	エンドトキシン*	発熱性物質試験 ** (3羽合計温度)
部 材	抗体液	NU-T(ニチレイ社)	6.4~7.2EU/mL
	キトサン液	1%キトサン/PBS(-)液	7.55EU/mL
	その他	HMIAA Tween20	何れも 検出限界以下
研 究 品	測定対象	測定方法	CD4-01
	抗体固定 不織布	不織布直接測定 (8mg不織布/100 μ L試験液)	0.11EU/mL (58.8EU/カラム)
		血漿抽出系測定 (8mg不織布/100 μ L血漿)	0.32EU/mL (168EU/カラム)
	充填液	直接濃度定量	7.55EU/mL (377EU/カラム)
	生食抽出液	ブライミング後、生理食塩液300mlを36 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ Cで72hr抽出した液(ガイドライン条件)	検出限界以下

*第十四改正日本薬局方 一般試験法 エンドトキシン試験法を準拠して発熱性物質試験を実施した。(測定限界0.06EU/ml)
(注射用蒸留水規格:0.25EU/ml)
**第十四改正日本薬局方・発熱性物質試験法を参照し、注射後の体温上昇が0.6 $^{\circ}$ C以上の試験動物が無く、かつ3羽の合計体温上昇が1.4 $^{\circ}$ C以下の場合陰性とした。



発熱症状原因究明まとめ

発熱要因	検討結果
エンドトキシン因	カラム内充填液、不織布よりEt検出
サイトカイン因	処理後血液でのサイトカインの産生なし
細胞活性化因	抗体との接触による細胞の活性化なし

・ 発熱原因は、

部材中（抗体液及びキトサン）由来のエンドトキシンが、プライミング後、不織布に吸着残存し、血液との接触により脱着し、体内に入ったため発熱症状が起こった。

改良品(CD4-312) 対策概要

(1) 部材のエンドトキシンプリー化

抗体液(Clone:NU-T)を→イムノテック社製抗体 (Clone:13B8.2) に変更
ウイルス等の安全性試験を実施し合格

キトサン→アスコルビン酸注射液（医薬品）に変更。

キトサンのエンドトキシン除去品は購入不可

除去及び不活化も困難、

→ キトサンの使用を断念

・ その他部材：医薬品あるいは、エンドトキシンプリーの部材へと変更。

(2) 最終製品チェック

・ 研究品出荷に際し、従来のガイドライン抽出に加えて、

①充填液、②充填不織布直接測定及び③血漿抽出でのエンドトキシン試験を追加実施し合格した。

前回品 (CD4-01)と改良品の比較

変更点		前回品(CD4-01)	対策品(CD4-0312)
容器	容器サイズ(cm)	8.1×8.1	10.5×10.5
	容器厚み(cm) かん合	1	0.4
	不織布カットサイズ(cm)	7.3×7.3	9.65×9.65
	有効濾過面積(cm ²)	44.89	81
不織布	カラム容量(mL)	53	65
	不織布重量(g)	4.3±0.7	11.8±2.5
	不織布構成	in プレフィルター:15枚 抗体固定濾材:10枚 out ポストフィルター:5枚	in プレフィルター:5枚 out 抗体固定濾材:12枚
抗体	抗ヒトCD4抗体クローン	クローン:NU-T ニチレイ製	クローン:13B8.2 IMMUNOTECH製
	抗体固定量(mg/カラム)	5.0±1.0	10.5±0.6
溶媒	PBS(-)	Dulbecco's PBS(-) 日水製薬社製	Dulbecco's PBS(-) ナカライテスク社製
充填液	滅菌保護剤	1%キトサン/PBS(-)	10mMアスコルビン酸/PBS(-)

対策カラム改良のポイントと改良品評価結果

	測定対象	改良点	エンドキシン値	
			CD4-0312 改良部材	CD4-01 前回部材
部材	抗体液	抗体クローン及び購入先の変更 NU-T(ニチレイ社) →13B8.2(イムノテック社)	0.03EU/mL以下 (検出限界以下)	6.4~7.2EU/mL
	充填液	滅菌保護材仕様の変更 1%キトサン/PBS(-)液 →10mMアスコルビン酸注射液/PBS(-)液	0.03EU/mL以下 (検出限界以下)	7.55EU/mL
研究品	測定対象	測定方法	CD4-0312 (Lot.No.203YABG)	CD4-01 (Lot.No.101Z5712)
	抗体固定 不織布	不織布直接測定 (8mg不織布/100μL試験液)	0.03EU/mL以下 (検出されず)	0.11EU/mL (58.8EU/カラム)
		血漿抽出系測定 (8mg不織布/100μL血漿)	0.03EU/mL以下 (検出されず)	0.32EU/mL (168EU/カラム)
	充填液	直接濃度定量	0.03EU/mL以下 (検出されず)	7.55EU/mL 377EU/カラム

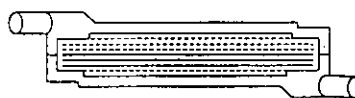
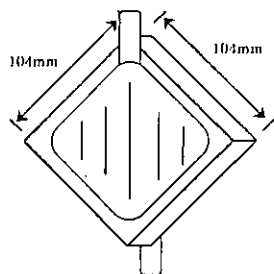
研究品仕様概要

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	シリコン栓*	2個
プレフィルター	ポリエステル*	1.3±0.2g
不織布	ポリプロピレン*	11.8±2.5g
抗ヒトCD4モノクローナル抗体	マウスIgG1 (エンドトキシン, 試験済み, ウイルス試験済み)	10.5±0.6mg
ブロッキング剤	Tween20	極微量
充填液	10mMアスコルビン酸注射液 (VC注) /PBS(-)液	
滅菌方法	γ線滅菌 (2.5 kGy)	
耐圧強度	200mmHg	

原材料

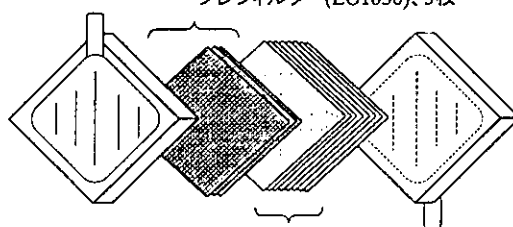
部材名	材質・数量等	
①容器※	スチレンブタジエン共重合体	1セット (in側, out側)
②キャップ	シリコン栓	2個
③プレフィルター	材質 繊維径(μm) 重量(g)	ポリエステル 10~40μm 1.1g~1.5g
④活性基	N-hydroxymethyl-2-iodoacetamido	1.0~2.0μg
⑤抗ヒトCD4モノクローナル抗体固定不織布 ※	材質 繊維径(μm) 重量(g) 抗体 サブクラス クローン(細胞株) 抗体固定基	ポリプロピレン 4.0μm±1.3μm 11.8±2.4g (実測値) マウスIgG1(イムノテック社製) 13B8.2(ヒト活性化Tで免疫したBALB/cの マウス脾細胞由来) 10.5±0.6mg
⑥ブロッキング剤※	Tween20	(東京化成社製) 試薬グレード
⑦充填液	10mMアスコルビン酸注/PBS(-)水溶液 アスコルビン酸: VC注 (医薬品: 日本製薬(株)) 分子量 176.12 ダルベッコPBS(-) (ナカライ化学社製) エンドトキシンフリーグレード (エンドトキシン0.24EU/mL以下, マイコプラズマ: 陰性, 無菌試験: 合格)	

形状、構造、及び寸法



容器はRX-500(ファインセル容器)容器を使用(材質はアサフレックス)

プレフィルター(EO1030)、5枚



抗体固定フィルター 12枚

抗体液 (Clone:13B8.2)

製造元:イムノテック社(仏)
販売:ベックマンコールター社

アフィニティ以外に
水、微生物、寄生虫
等についても検査済み

メーカーの内部管理として
エンドキシンも管理

評価項目	評価基準	frequency	結果
抗体液 (イムノテック試験成績)			
BSA有無	有無		無
防腐剤有無	有無		無
ろ過装置	0.2 μmフィルター処理有無		有
原料水質分析 外観	液体・無臭		有
	無色		有
アルカリ度/酸度	0.01N NaOH 0.1ml以下		有
可溶性物質	なし		有
塩化物	0.5ppm以下		有
硝酸塩	0.2ppm以下		有
硫酸塩	なし		有
アンモニウム	0.2ppm以下		有
カルシウム/マグネシウム	なし		有
重金属	0.1ppm以下		有
熱安定性	0.001%以下		有
原料水無菌試験 総菌数	36°C 44h: 100未満	ロット毎(n=3)	0
	総菌数	22°C 68h: 101未満	0
	大腸菌数	0個/100ml中	0
Pseudomonas aeruginosa	0個/100ml中		0
菌数(Rodier)	0個/100ml中		0
物理/化学的性質 外観	液体		有
	無色		有
	比重	約1	有
	pH	8.8	有
可溶性・揮発性・酸化性	いずれも無し		有
揮発性	水に可溶		有
血清学的ウイルス検査	マウス由来17種virus有無		無
微生物検査	微生物15種の有無		無
寄生虫検査	寄生虫4種の有無		無
外観	目視判定		異常無し
	電子顕微鏡観察		異常無し
(自社評価)	affinity	血液試験 CD4+除去率: 80%以上	有数
発熱性試験	三羽合計体温上昇1.4°C以下		0.18°C
ウイルス否定試験	全ての項目でNegative	検用ロット	Negative

ウイルス否定試験結果

ウイルス否定試験項目：「未加工/未精製バルクにおけるウイルス試験」の試験項目であるin vitro試験を含む、医薬発329号の「ウイルス検出及び確認の為に推奨される試験」全ての項目を実施（下記表）

厚生労働省推奨試験実施試験項目	評価項目	評価方法	評価基準	結果	判定	
レトロウイルス試験	電子顕微鏡観察試験	電子顕微鏡によるウイルス様形態の観察	ウイルス様形態をコントロールとした電顕による形態観察	ウイルス様粒子の有無	ウイルス様粒子無し	合格
in vitro試験	in vitro試験	ヒト・サル・マウス3種の細胞にてウイルス否定試験	細胞毒性・感染作用	細胞の形態	正常形態	合格
in vivo試験	in vivo試験	細胞毒性・血球吸着等の感染兆候の無いウイルス検出	マウス・モルモット・豚に接種し、ウイルス有無	生死/硬膜膜液の赤血球凝集	異常無し	合格
抗体産生試験	MAP試験	マウス由来の18種類のウイルス否定試験	マウス由来18種類のウイルスの有無	ウイルス検出有無	ウイルス無し	合格
-	BSAウイルス混入試験	牛由来9種のウイルス否定試験	細胞毒性・血球吸着・免疫蛍光測定	ウイルス検出の有無	ウイルス無し	合格

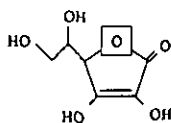
上記全ての、ウイルス否定試験項目で、ウイルスの検出は認められなかった。

併せて、マイコプラズマの否定試験を実施し合格であった。

日本薬局方アスコルビン酸注射液

- 販売名称：ビーシー注
- 製造元：日本医薬品工業(株)

アスコルビン酸注射液VC注(注日本薬局方)



分子式：C₆H₈O₆
分子量：176.12

1管中(1ml)アスコルビン酸100mgを含有
添加物・・・亜硫酸ナトリウム、L-システイン塩
ベンジルアルコール、pH調整剤を含有する。

用法・用量

通常成人1日50mg～2000mgを
1～数回に分けて皮下、筋肉内、
静脈内注射する。

CD4-0312

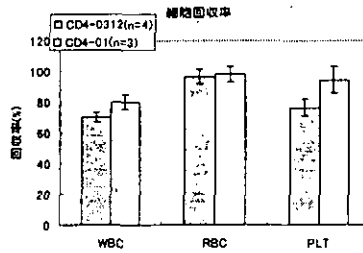
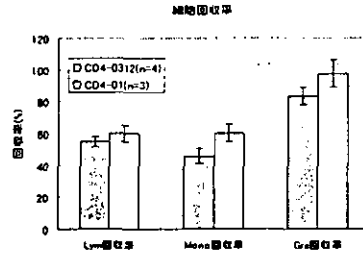
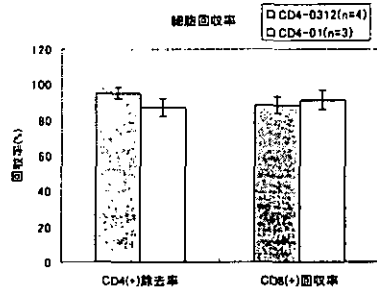
充填液量：65mL 濃度：10mmol/L

充填液中のアスコルビン酸量：0.114g/カラム

滅菌保護機序

・酸化防止材として機能

CD4-0312性能結果



評価カラム：臨床研究品ロット(203YABG)の
1/750スケール (γ線滅菌)
血液：健康人新鮮血液 (血液：ACD-A=8:1)
処理量：4.0ml (フルスケール換算3.0L)

注) CD4-01：前回仕様
CD4-0312:改良品仕様

CD4-0312ラベル

研究用
識別番号: CD4-0312
Lot.No: 203YABG
滅菌方法: γ線滅菌
滅菌日(日.月.年)17.11.03
シリアル番号 01

生物

CD4-0312安全性試験まとめ

試験項目	項目	基準	Lot.203YABG
溶出物試験 ・PP不織布	外観	無色透明で目視にて異物を認めず	無色透明で異物を認めず
	pH	Blankとの差は1.0ml以下	-0.06
	KMnO4消費量	Blankとの差は1.5以下	0.05
	高発熱菌物	Blankとの差は10.ml以下	0.04
	重金属(Zn,Pb)	比較液以下	比較液以下
溶出物試験 ・活性炭不織布	外観	無色透明で目視にて異物を認めず	無色透明で異物を認めず
	pH	泡は3分以内に殆ど消失する	-0.44
	KMnO4消費量	Blankとの差は1.0ml以下	0.33
	高発熱菌物	Blankとの差は1.5以下	0.05
	重金属(Zn,Pb)	Blankとの差は10.ml以下	比較液以下
無菌試験	真菌	菌の判定を認めない事	菌の発育を認めない(n=2)
	細菌	菌の判定を認めない事	菌の発育を認めない(n=2)
生物学的試験	溶血性試験	24h後の上澄液が透明である	合格(溶血を認めない)
耐圧漏洩試験	容器変形・漏洩	どれも認めない	合格
	異物(5μm以下)	100個/ml以下	合格
	異物(10μm以下)	10個/ml以下	合格
	異物(15μm以下)	—	合格
	異物(25μm以下)	—	合格

試験項目	評価対象	基準	臨床研究カラム
細胞毒性試験	最終製品の成分	用途に応じて毒性を判断する	問題なし(細胞株コントロールより低い毒性)
吸着性試験	最終製品の成分	皮膚感作を認めない	感作を認めない
刺激又は皮内反応性試験	製品		合格
全身毒性(急性)試験	製品		異常又は死亡例を認めない
発熱性試験	製品		合格:合計0.01°C(寒測0.01,0.00,0.00)

評価項目	評価項目	基準	臨床研究カラム
動物体外循環評価	犬体外循環	体温の上昇を認めない	犬の体温の上昇は認められなかった。
	急性毒性試験	注射後5日間で以上又は死亡例を認めない	異常又は死亡例を認めない
製品充填液	発熱性物質試験	0.8°C以上の上昇がなく、3羽合計が1.4°C以下	合格:合計0.53°C(0.2,0.33,0.00)
	不織布直挿	0.25EU/mL	抽出限界以下(-0.001EU/mL)
エンドキシン	不織布血液抽出	0.25EU/mL	抽出限界以下(-0.004EU/mL)

(資料3)

ワークショップ

自己免疫疾患の発症および病態形成とCD4 T細胞

プログラム

平成15年10月22日(水)

11:30~13:00 班員会議・昼食

13:00~14:00

特別講演1: 東京大学医科学研究所教授

森本 幾夫 先生

演題: 「CD26分子: ベンチからベッドへ」

14:00~15:00

特別講演2: 京都大学再生医科学研究所教授

坂口 志文 先生

演題: 「CD25+CD4+制御性T細胞による免疫制御
と自己免疫」

15:00~17:00

一般演題:

『CD26 分子：ベンチからベッドへ』

東京大学医科学研究所
先端医療研究センター免疫病態分野
森本 幾夫

CD26 分子は 110kDa の膜糖蛋白で CD4 メモリー T 細胞に選択的に発現され、dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) 酵素活性を含む。RANTES などのケモカインはこの酵素の基質で、切られることでその生物学的活性が修飾を受ける。CD26 は T 細胞の共刺激分子の一つであり、T 細胞活性化に重要である。さらに CD26 と CD45 フォスファターゼとの会合及び DPPIV 酵素活性は CD26 由来 T 細胞活性化の鍵となっている。

CD26 陽性 T 細胞は TH1 型の細胞であり、炎症部分に最も遊走しやすく、関節リウマチや多発性硬化症などの炎症部位での集積が認められ、炎症のエフェクター T 細胞とされている。CD26 分子の多彩な機能や、共刺激の分子機序を明らかにするため、新たなリガンド探索を行い、マンノース 6 リン酸/インスリン増殖因子 II 受容体 (M6P/IGF1IR) を同定した。CD26 分子と M6P/IGF1IR との相互作用により、T 細胞内に CD26 分子が internalization され、そこで種々のシグナル分子と相互作用が行われ、共刺激が誘導されると考えられる。さらに CD26 が T 細胞上の lipid raft に集合し、CD3 ζ 、ZAP70、Lck などのシグナル分子のチロシンリン酸化が惹起されるとともに CD45RO が動員され、CD26-CD45RO の相互作用により、共刺激が誘導されることも見いだした。

CD26 及び CD40-ligand 分子は非ホジキン型 T 細胞リンパ腫/白血病にお互いに排他的に発現され、その中でも CD26 陽性 T 細胞腫は特に予後は悪い。我々は最近、T 細胞リンパ腫の増殖制御機構と CD26 分子の関連について重要な知見を得た。すなわち CD26 Jurkat T 細胞トランスフェクタントや Karpas299 を CD26 抗体で処理すると細胞周期が止まり、増殖抑制が起こり、CDKI の p21 が誘導され、またこれら細胞を SCID マウスに移植し、CD26 抗体を投与したところ、長期生存したが対照群は短期間で死亡した。本講演では、CD26 分子のシグナル伝達機構及びこの分子のベッドサイドへの応用について、我々の最新のデータを紹介する予定である。

CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞による免疫制御と自己免疫

京都大学再生医科学研究所・生体機能調節学

坂口 志文

免疫寛容の導入・維持機構として、クローン排除、クローン不活化、あるいは制御性（抑制性）T 細胞による抑制的制御が知られている。最近、制御性 T 細胞による抑制機構が免疫自己寛容の維持に重要であり、その異常は自己免疫病の直接的原因となる可能性が明らかになりつつある。例えば、正常動物末梢 CD4⁺T 細胞の約 5-10% を占める CD25⁺T 細胞を除去すると、様々な自己免疫病が自然発症し、この細胞群を補えば発症を阻止できる。一方、このような CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の除去により自家腫瘍に対する有効な腫瘍免疫を惹起できる。逆に、制御性 T 細胞の増殖、制御能の強化により移植片に対する免疫寛容を誘導できる。CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の少なくとも一部は、正常胸腺において機能的に成熟した状態で産生され、それらは抑制機能に特化された特異な T 細胞集団である。自己免疫病、アレルギー、炎症性腸炎を主症状とする IPEX (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) の原因遺伝子である Foxp3 遺伝子は、このような制御性 T 細胞の発生・機能のマスター制御遺伝子として働く。実際、Foxp 遺伝子をレトロウイルスベクターに組み込んで正常 T 細胞に導入すると、機能的にも、表現型の上でも制御性 T 細胞に転換できる。また、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞は CTLA-4、TNF レセプターファミリーに属する GITR (glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene) を構成的に発現しており、これらの分子の操作により抑制を解除し、自己免疫病を誘導できる。また腫瘍免疫を惹起できる。本講演では、CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞の機能操作による、自己免疫、腫瘍免疫、移植免疫の制御について論じる。

「日本人多発性硬化症患者におけるリンパ球の動態解析」

東北大学大学院医学系研究科神経内科学分野

藤原 一男

本邦の多発性硬化症 (MS) の代表的な病型として、オリゴクローナルバンド (OB) 陽性で脳室周囲病変のみられる古典的 MS (CMS) と OB 陰性の視神経脊髄型 MS (OSMS) の 2 つがある。CMS は Th1 優位の病態であり、髄液中の CCR5+CD4 細胞の割合は病勢に応じて変動する。CDR3 spectratyping 解析では、再発時に末梢血及び髄液中で増幅する T 細胞クローンは症例により異なるが、Vβ5.2 の割合が高頻度であった。また再発時には髄液中で CCR7 陽性のいわゆる central memory 細胞が増加している。これらは CMS の病勢把握に重要であり、治療の標的や効果判定の指標として期待される。一方、CMS と異なる OSMS に特異な免疫病態の詳細は未だ不明だが、我々は OSMS における Th1 反応の関与が CMS に比べて少ないことを示唆する結果を得ている。現在その免疫反応の質的な相違について検討している。