

平成15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

# 目 次

課題番号		
文献NO 20030933A KH61061	医薬品製造におけるプロセスバリデーションと科学的品質保証に関する研究	森川 馨 …… 1
KH61062 954A	生体適合性・機能性に優れた材料と評価技術の開発に関する研究	土屋利江 …… 20
KH61063 955A	標的指向型DDS製剤を用いた腎疾患治療方法の開発	名取泰博 …… 29
KH61064 956A	新規体外循環システムの創製と評価技術の開発	渋谷統寿 …… 32
KH61065 957A	健康被害をもたらす有害生物の制御・処理技術に関する研究	高鳥浩介 …… 36
KH62080 958A	ヒト肝特異的有機アニオントランスポーター遺伝子LST-1およびLST-2導入肝細胞を用いたハイブリッド型人工肝臓組織の開発	松野正紀 …… 44
KH62083 959A	活性タンパク利用技術としての新規ドラッグ・デリバリー・システムの開発研究	五十嵐理慧 …… 47

## 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

研究要旨 体外循環で特異的にヘルパーT細胞を除去する CD4<sup>+</sup>T 細胞選択細胞除去治療器を試作し、in vitro にてカラム処理前後の顆粒球及び血小板の活性化について、各細胞の活性化マーカーより検討した。カラム処理の前後で、各細胞の活性化マーカーの発現の上昇は認められなかった。イヌ体外循環および健常人での体外循環試験を実施し、可能であった。

安全性を確認した。

### A. 研究目的

自己免疫疾患の治療には、抗原特異的な免疫抑制が理想的である。しかし、臨床的な治療手段は、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い。これらは抗体介在性の疾患では奏効しているが、T 細胞介在性の多発性硬化症 (MS) などには効果が少ない。T 細胞介在性の免疫応答異常が主因の MS などの疾患に対する治療戦略は自己反応性 T 細胞を選択的に除去または不活化することである。MS では中枢 (脳・脊髄) 抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞が病因に強く関わっており、急性期や再燃時には患者血液・髄液中に特定の T 細胞が増殖していることが明らかになっている。われわれは、この病因となる CD4<sup>+</sup>T 細胞を ex vivo で捕捉し免疫調節を行う新しい吸着材による体外循環システムの開発研究を行ってきた。本研究の目的は、この吸着材の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することにある。

昨年度まで、我々は、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器材の検討を実施してきた。更に、体外循環による免疫調節の初期検討として、灌流条件で in vitro でヒト新鮮血液よりヘルパー T 細胞を効率よく除去することに成功した。これに加えて、ex vivo での治療を可能とするために、滅菌技術を確認し、EAE ラットを用いて体外循環で特異的にヘルパー T 細胞を除去する細胞除去器の検討を実施してきた。

今年度は、カラム通過後細胞のサイトカイン産生等の安全性に関する検討を実施した。さらに、イヌおよびヒトでの体外循環により、in vivo での

### B. 研究方法

#### (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 15 ml、ニトロベンゼン 20 ml、パラホルムアルデヒド 0.098 g を入れマグネティ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 1.59 g 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 0.8 g 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。

#### (2) モノクローナル抗体固定除去材の調製

これら活性化不織布に、リガンドとして抗ヒト CD4 IgG1 抗体(mouse IgG, clone:13B8.2, IMMUNOTECH 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) ミニカラムの調製

モノクローナル抗体固定除去材を、内径 6.8 mm、容量 1 ml のカラムに充填し、抗体の滅菌保護材を充填し、コバルト 60γ線照射装置にて、照射線量が 25 kGy で照射し滅菌を行った。

#### (4) ミニスケール血液評価

健常人より採取した末梢血液に抗凝固剤としてフラグミンを加え (フラグミン 1000 IU/L)、これを処理検体とした。ミニカラムに流速 0.22 ml/min で 5 %ブドウ糖液を流した後に生理食塩液を流し、プライミングを行った。処理検体 4ml を流速 0.22 ml/min で、シリンジポンプを用いて灌流し、カラム処理前後の血液をサンプリングした。白血球数、赤血球数、血小板数はマイクロセル

カウンター (Sysmex 社製) にて測定し、細胞の回収率を求めた。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<sup>+</sup>細胞除去率(%)及び CD4<sup>-</sup>細胞回収率(%)を求めた。

#### (5)カラム処理後細胞の活性化評価

カラム処理前後の血液をサンプリングし、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、顆粒球分画を CD15 及び CD63 の 2 カラーで分析し、活性化顆粒球の細胞分率(%)を求めた。さらに、血小板分画を CD41 及び CD62P の 2 カラーで分析し、活性化血小板の細胞分率(%)を求めた。

#### (6)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、96.5 mm 角に切断し、容量 65 ml のカラムに充填し、臨床スケールカラムを作成した。コバルト 60 $\gamma$ 線照射装置にて、照射線量 25 kGy を照射し滅菌を行った。

#### (7)臨床スケールカラムでのイヌ体外循環試験

臨床スケールカラムを回路に接続し、ブドウ糖液 1000 ml、生理的食塩水 2000 ml でプライミングした。イヌ (オス、体重 22.8 kg) の頸部シャントに脱血用回路を接続し、頸部静脈に返血用回路を接続した。抗凝固剤としてフラグミン加生理食塩液 (濃度: 4 IU/ml) を 6 ml/min でフィードしながら、血液循環流速 50 ml/min で 1 時間の体外循環を実施した。イヌの状態変化について観察し、評価項目は、脈拍数、呼吸数、体温について 10 min おきに測定した。

#### (8)臨床スケールカラムでのヒト体外循環試験

臨床試用を想定した治療器 (目標血液灌流量を 3L、CD4<sup>+</sup>T 細胞除去カラム) を作成し、健常人を対象にした体外循環試験を行いその性能および生体反応を評価した。

(倫理面への配慮)

イヌ体外循環において使用するカラムは、臨床可能レベルで試作し安全性を確認した。また、本試験によるイヌの状況に十分配慮し、異常時は速やかに試験を中止するプロトコールとした。施行上も抗凝固剤等の量を体重より換算し、最低限の使用と設定した。また、臨床同様に、抗凝固によるリスクを低減するため、ヘパリンの中和剤も予め準備した。

健常人を対象した体外循環を行う場合には、研究の内容、同意書、説明文の内容、有害事象に対する対応などについて、事前に施設内の倫理委員会で検討し承認を得た。研究協力者には研究の内容、副作用・有害事象の発生の可能性などについて十分な説明をし、同意を得た上で研究を実施した。

## C. 研究成果

### (1) カラム処理後細胞等の活性化評価

フローサイトメトリー分析 (Fig.1) により、カラム処理前後の血液細胞における活性化顆粒球と活性化血小板の細胞分率(%)について測定を行った。結果、活性化顆粒球に関しては、カラム処理前の CD63<sup>+</sup>細胞分率(%)が 0.4 % $\pm$ 0.0 % (mean $\pm$ S.D., n=6) であるのに対し、処理後は 0.38 % $\pm$ 0.08 % (mean $\pm$ S.D., n=6) であり、カラム処理により顆粒球の活性化は認められなかった。また、活性化血小板に関しては、カラム処理前の CD62P<sup>+</sup>細胞分率(%)が、0.20 % $\pm$ 0.0 % であるのに対して、処理後は 0.18 % $\pm$ 0.08 % (mean $\pm$ S.D., n=6) であり、血小板の活性化も見られなかった (Fig.2)。

### (2) イヌ体外循環試験

臨床スケールのカラムを作成し、イヌでの体外循環を実施した。1 時間の体外循環中、脈拍数、呼吸数、体温等のイヌの性状に大きな変動は無く、体外循環可能であった。1 例であるが、in vivo での体外循環の可能性について確認できた。

(Fig.3)

### (3) ヒト体外循環試験

健常人を対象とした体外循環試験では、全血 3L の体外循環処理が施行できた。カラムの直後では CD4 陽性 T 細胞はほとんど吸着され、体循環中では赤血球、血小板数は変化なく、CD4<sup>+</sup>T 細胞は一過性の減少が認められたが 1 週間以内回復した (Fig. 4, 5)。

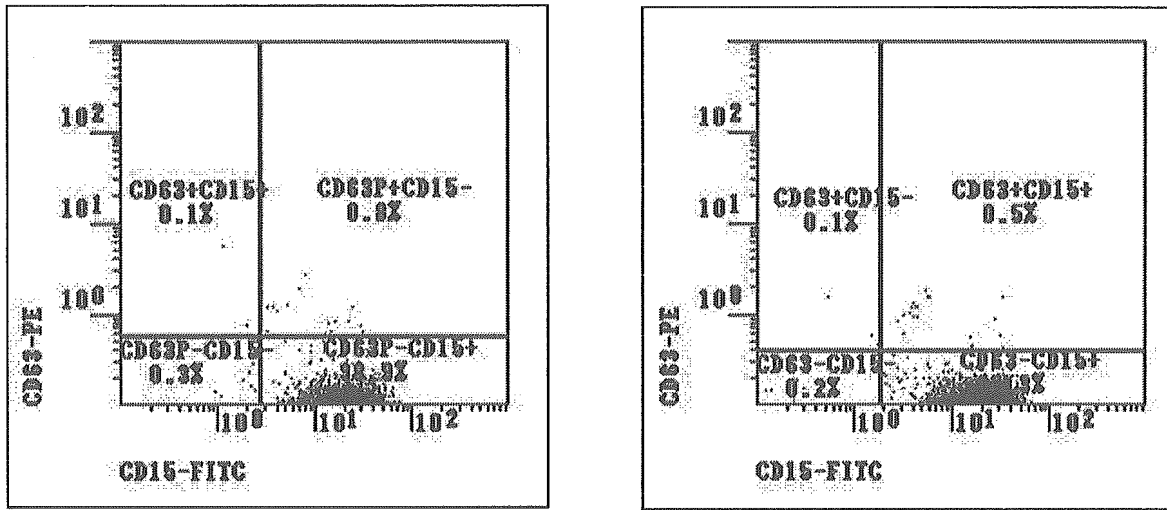
## D. 考察

in vitro で CD4<sup>+</sup>T 細胞選択除去器を通過した顆粒球及び血小板の活性化について、細胞表面の活性化マーカーにて検討した。カラム処理前後で何れも低い値を示し、除去後に於いても活性化細胞の増加は認められなかった。抗体固定除去材による CD4<sup>+</sup>T 細胞の選択除去において、これら細胞の活性化の可能性が低いと考えられた。

イヌおよびヒト体外循環試験により、in vivo で、体外循環が可能で体外循環可能であることを確認できた。

## E. 結論

体外循環による CD4<sup>+</sup>T 細胞除去の臨床応用の可能性が示された



pre CD14/CD63 post CD14/CD63  
 Fig.1 顆粒球の除去器処理前後でのフローサイトメトリーのサイトグラム。

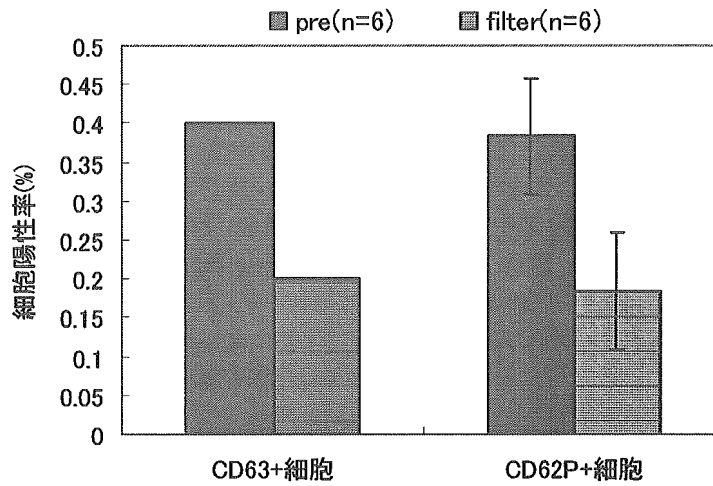


Fig.2 カラム処理後の顆粒球(CD63)・血小板(CD62P)の活性化評価

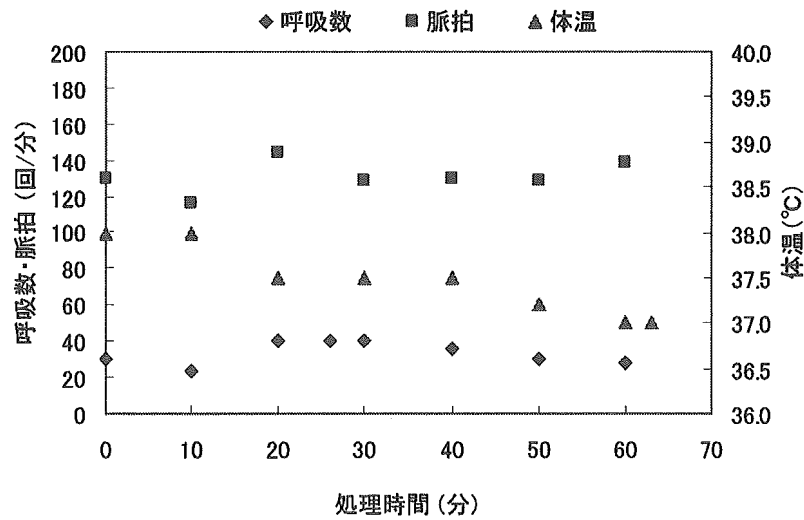


Fig.3 カラム処理時のイヌの性状変化

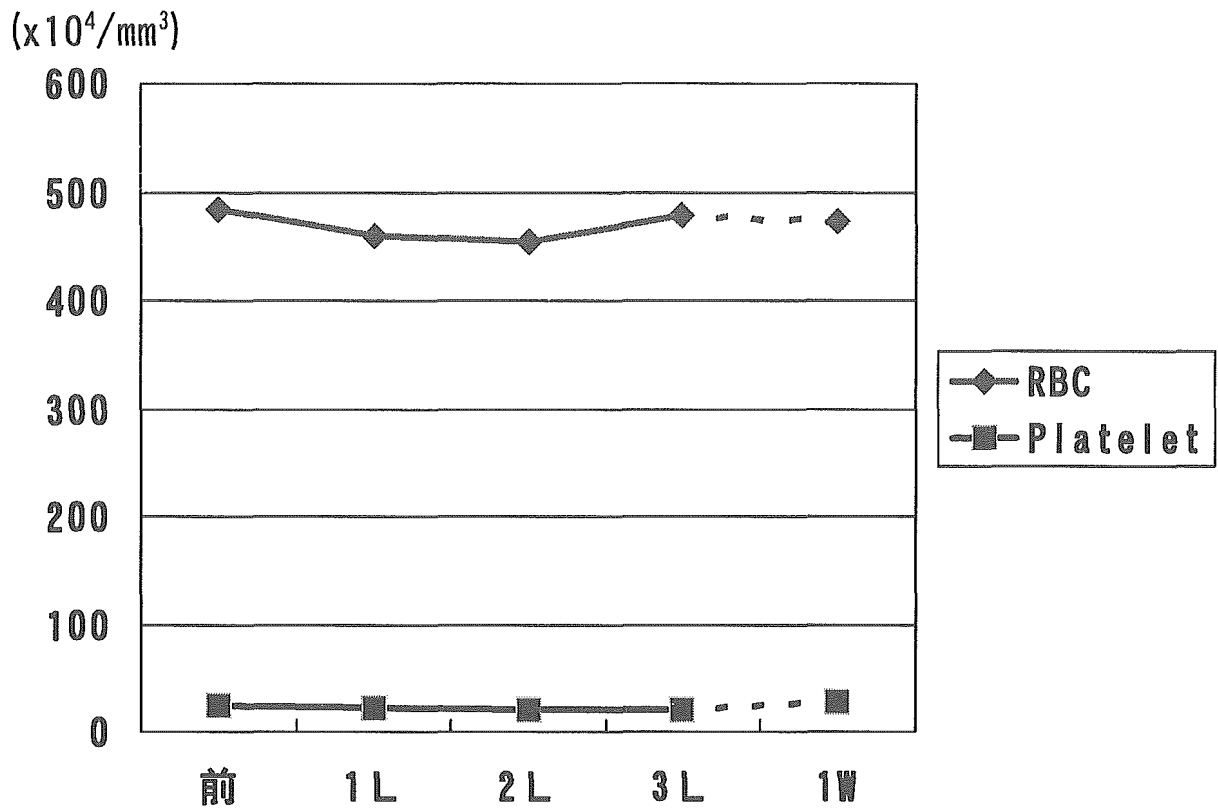


Fig.4 ヒト CD4+T 細胞除去体外循環試験時の赤血球、血小板数の変化

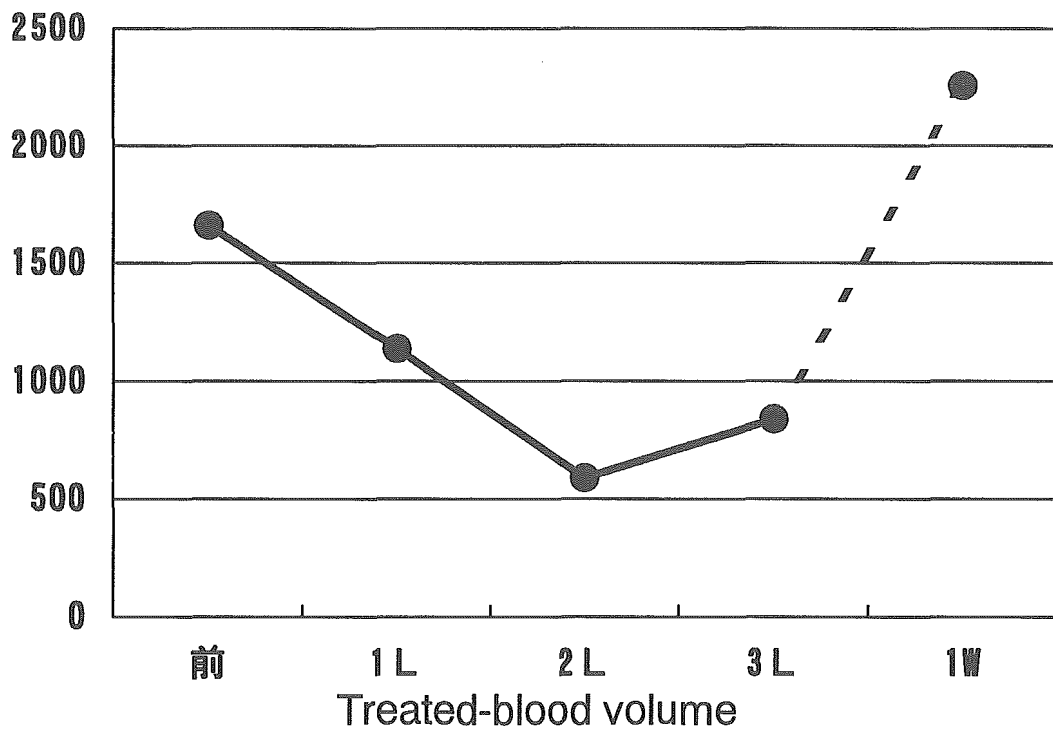


Fig.5 ヒト CD4+T 細胞除去体外循環試験時の CD4+細胞の変化

---

平成15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16年9月30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