

200401420B

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～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 澁谷 統壽

平成17(2005)年3月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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 (CD4-0312) の概要 ..... 5

(資料2) こころの健康科学 (神経分野) 研究成果発表会 ..... 16

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 21

III. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 23

# I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

総合研究報告書

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（MS）などの T 細胞介在性の疾患の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。これらの自己反応性 T 細胞の多くは抗原特異的 CD4<sup>+</sup>T 細胞で、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。この病因となる CD4 陽性 T 細胞を全血フロー系で効率よく除去する体外循環システムの開発し、免疫性神経疾患での臨床試用めざして有効性および安全性の確認を行った。

#### 分担研究者

松尾秀徳（国立病院機構長崎神経医療センター 統括診療部長）、吉良潤一（九州大学大学院医学研究院神経内科 教授）、祖父江 元（名古屋大学大学院医学系研究科 教授）、荻野美恵子（北里大学医学部 講師）、津田裕土（順天堂大学膠原病内科 助教授）、野村恭一（埼玉医科大学総合医療センター神経内科 教授）、服部孝道（千葉大学大学院医学研究院神経病態学 教授）、藤原一男（東北大学大学院医学系研究科神経内科 助教授）、菊地誠志（北海道大学大学院医学研究科神経内科 助教授）

#### A. 研究目的

多発性硬化症（MS）などの 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 陽性 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。この病因となる CD4 陽性 T 細胞を *ex vivo* で除去し、全血フロー系で CD4 陽性 T 細胞を効率よく除去する体外循環システムの開発した。こ

の新しい体外循環治療の免疫性神経疾患での臨床試用めざして有効性および安全性の確認を行った。

#### B. 研究方法

ヒト臨床研究用 CD4 陽性 T 細胞除去器を用い、健常人を対象とした体外循環試験を行い、今後の臨床応用の進め方を検討した。

（倫理面への配慮）

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ので、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. 結果

- 1) ヒト全血 3L 処理用の選択的 CD4 陽性 T 細胞除去器を 30 本作成し、安全性を確認した。
- 2) 選択的 CD4 陽性 T 細胞除去療法による健

常人での体外循環試験を施行した。

3) 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 陽性 T 細胞は一過性の減少が認められたが 1 週間以内に急速に回復することが明らかとなった。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、一過性の肝機能障害を認めたが、1-2 週で正常化した。

4) 上記のため、健常人の体外循環試験を一時中止し、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結果が得られた。

5) 上記の結果を確認するために、ヒト臨床用 CD4 陽性 T 細胞除去器の濾材とウサギ血漿を接触させて得られた抽出液をウサギに静注し発熱試験を行った。この結果、血漿との接触によりエンドトキシンが遊離し、発熱することを確認した。

6) 以上の結果をもとにヒト臨床研究用 CD4 陽性 T 細胞除去器を改良し、上記 4) および 5) の実験系を用い、前回の除去器の濾材と比較検討しながら、エンドトキシンの検出および発熱がないことを確認した。

7) CD4 陽性 T 細胞除去器で体外循環を複数回施行する場合の安全性を確認するために、改良した除去器を用いてイヌで 8 日間の間隔をあけて 2 回の体外循環を施行し、アレルギー・アナフィラキシー症状などの出現がないことを確認した。

8) 以上の結果を踏まえて、選択的 CD4 陽性 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健常人での体外循環試験再開について審査を受け承認された。

9) 健常人での体外循環試験を行い安全に施行できた。in vitro の結果とほぼ同様の選択的 CD4 陽性 T 細胞除去器の性能が確認され、選択的 CD4 陽性 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。肝機能障害、発熱などの有害事象は起こらなかった。

#### D. 考察

治療器の臨床応用に向けて、健常人で体外循環が安全に施行できること、および治療に伴う生体反応の概略が確認できた。当初、2-3 年目に免疫性神経疾患患者を対象とした多施設での体外循環治療を計画したが、実際の臨床試験を想定した場合、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、また、選択的 CD4 陽性 T 細胞除去に伴う生体反応についての基礎的データが不十分なこと、MS の急性期に対する治療法として、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いう根拠がないこと、治療研究を行う過程での有害事象について、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ことなどより、倫理委員会で承認を得ること難しいと判断された。

このため、2 年目以降は健常人での体外循環試験を行い、選択的 CD4 陽性 T 細胞除去の影響検討した。循環血中より選択的 CD4 陽性 T 細胞を除去した場合、実際にヒトではどの程度の CD4 陽性 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。各施設の倫理委員会で承認を得るのに時間を要したこと、2年目に有害事象があり原因の究明が完了するまで体外循環試験を中止したために研究の進行が遅れた。

本研究は、全血フロー系（これまでは赤血球や血小板などの非特異吸着により全血フロー系で選択的に細胞除去はできなかった）で標的となるCD4陽性T細胞や活性化T細胞を特異的に除去することで免疫調節を行うもので、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除去・捕捉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。これらの技術は世界に類をみないもので、全く独創的な研究である。また、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。

MSなどT細胞介在性の自己免疫性疾患では有効な治療法が確立されていないものが多く、再発・後遺症に苦しんでいる患者が多い。この新しい体外循環治療の臨床応用により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。

体外循環試験に伴い、悪寒・戦慄、発熱および一過性の肝機能障害検査を認めたが、その後、被験者に健康障害はなかった。

#### E. 結論

健常人でCD4陽性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陽性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

##### 1) 国内

口頭発表 2件

原著論文による発表 0件

それ以外の発表 0件

そのうち主なもの

学会発表

①松尾秀徳、神原千晶、後藤公文、福留隆泰、澁谷統壽、小野寺和博、吉田 一：免疫性神経疾患に対するサイトフェレシスの臨床応用（シンポジウム）日本医工学治療学会 第19回学術大会 2003.5.17-18（札幌）

②松尾秀徳 井上賞受賞記念講演

Cytapheresis with a filter for selective removal of CD4陽性 T cells 第24回日本アフエリシス学会学術大会 2004,11,19-20（千葉）

##### 2) 海外

口頭発表1件

原著論文による発表 3件

それ以外の発表 0件

そのうち主なもの

論文発表

① Onodera H, Ninomiya K, Yoshida M, Matsuo H, Shibuya N. Development of a device for selective removal of CD4+ T cells. Ther Apher Dial 2003;7:329-333

② Nakane S, Matsuo H, Goto H, Yoshinaga-Matsumoto M, Ohtsuru I, Ichinose K, Onodera H, Yoshida M, Shibuya N. Cytapheresis with a filter for selective removal of CD4+ T cells in

experimental autoimmune encephalomyelitis.

Multiple Sclerosis 2003;9 : 579-584

③ Matsuo H, Goto H, Kambara C, Fukudome T, Mizota T, Onodera H, Yoshida M, shibuya N. Selective adsorption of human CD4+ T cells. Ther Apher Dial 2004;8:194-196.

□頭発表

① Matsuo H, Goto H, Onodera H, Yoshida M, Shibuya N. Cytapheresis with a filter for selective removal of CD4+ T cells. 10th Meeting of the World Apheresis Association 2004, 5, 5-8 (Miami Beach)

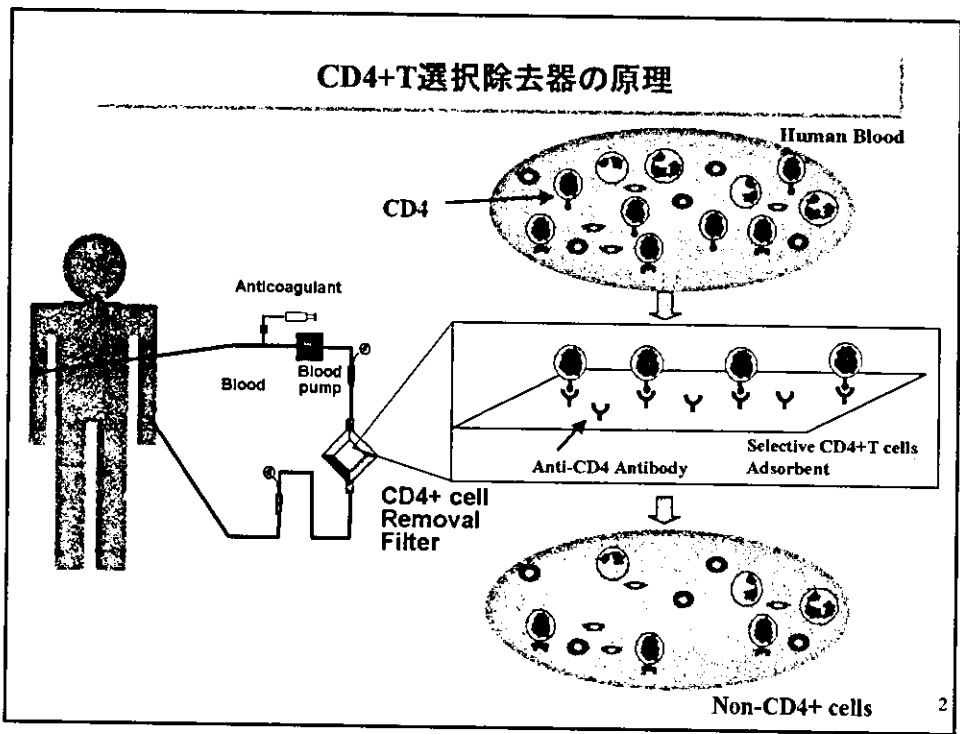
G. 知的所有権の出願・取得状況

該当なし。

資料 1

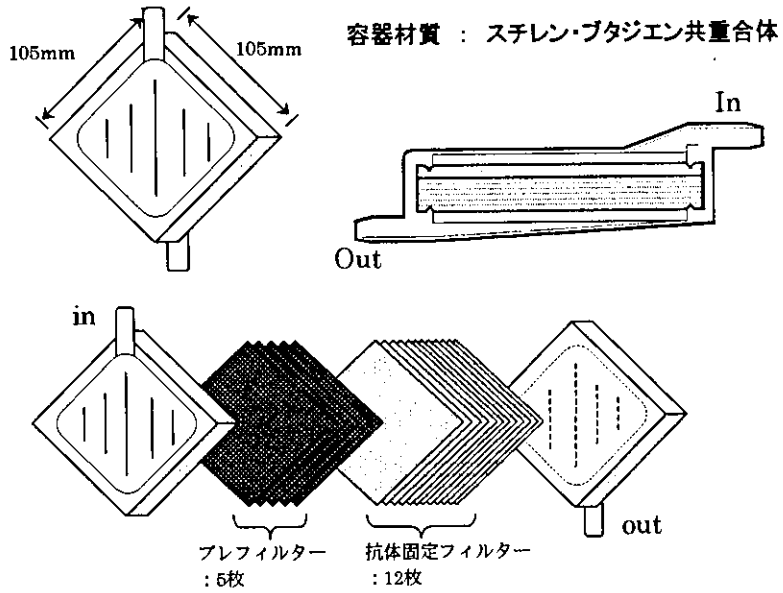
# CD4選択除去器(CD4-0312)の概要

1

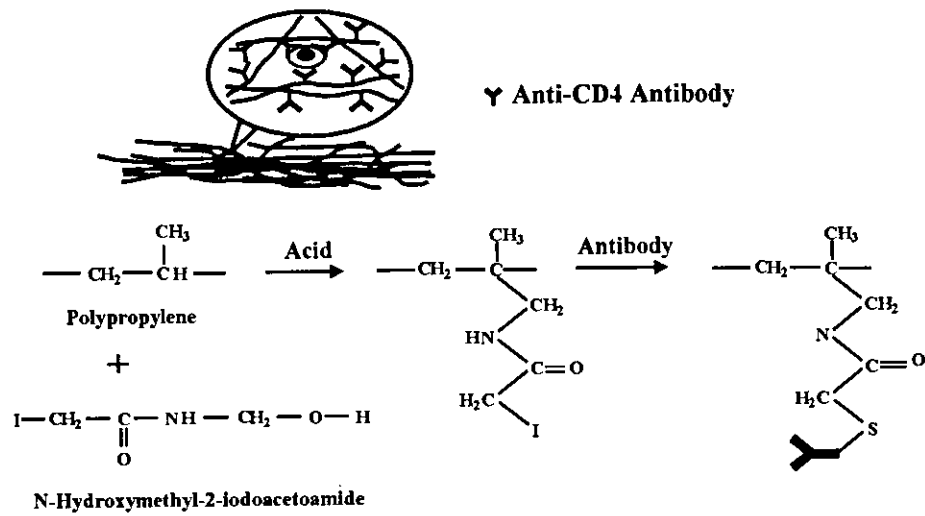




### CD4-0312の形状、構造、及び寸法



### 抗体固定フィルター反応スキーム



## CD4-0312の使用原材料

部材名	材質・製品当たりの量	
容器	材質	スチレンブタジエン共重合体 1セット (in側, out側)
キャップ	材質	シリコン栓 2個
プレフィルター	材質	ポリエステル 繊維径: 10~40 μm 重量: 1.0g~1.5g
抗ヒトCD4モノクローナル抗体固定フィルター	不織布材質  活性基抗体  ブロッキング剤	ポリプロピレン 繊維径: 3.0~4.0 μm 重量: 7.5~10.9g N-hydroxymethyl-2-iodoacetamide: 1.0~2.0 μg サブクラス: マウスIgG1 κ (イムノテック) クローン: 13B8.2 (ヒト活性化Tで免疫したBALB/cのマウス脾細胞由来) 抗体固定量: 7.5~12.5mg Tween20 (東京化成)
充填液	10mMアスコルビン酸/PBS(-)水溶液 アスコルビン酸: 日本薬局方アスコルビン酸注射液 VC注 (医薬品: 日本医薬品工業) 分子量 176.12 ダルベッコPBS(-) (ナカライテスク) エンドキシンフリーグレード (エンドキシン0.24EU/mL以下, マイコプラズマ: 陰性, 無菌試験: 合格)	

5

## CD4-0312の安全性試験(1)

□製品安全性試験

1) 生物学的安全性試験

試験ロット: 臨床研究用ロット (203YABG・2046XBG) を含む2ロット各n=1で実施。  
(感作性試験(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安全性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	3羽の体温上昇0.6℃以上の試験動物が無く、かつ3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
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
急性毒性試験	注射後5日間観察で異常または死亡例を認めない	合格
細胞毒性試験	細胞毒性強度の陽性対照材料との比較 (本試験では新鮮培養地のコロニー形成数を50%阻害する試験濃度が、陽性材料ZnCl <sub>2</sub> よりも低い時に合格とする)	合格
感作性試験 (Adjuvant and Patch Test)	皮膚感作性の有無	合格

2) その他安全性試験

試験ロット: 臨床研究用ロット (203YABG・2046XBG) を含む2ロット各n=1で実施。

試験基準: 「吸着型血液浄化器品質基準」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 粒径25 μm以上: 0.01個/mL以下	合格

6

## CD4-0312の安全性試験(2)

□部材安全性試験

試験ロット：臨床研究用ロット(203YABG・2046X8G)に使用した不織布、容器にて実施  
 試験基準：「吸着型血液浄化器品質基準」に準じた。

試験項目	基準	判定
溶出物試験		
・外観	殆ど無色透明で、目視により異物を認めない	合格
・泡立ち	泡は3分間以内に殆ど消失する	合格
・pH	Blankとの差が1.5以下である	合格
・亜鉛	吸光度がBlankの吸光度以下である	合格
・過マンガン酸カリウム還元性物質	Blankとの差が1.0以下である	合格
・蒸発残留物	Blankとの差が1.0mg以下である	合格
・紫外吸収スペクトル	吸光度は0.1以下である	合格
・重金屬	比較液以下	合格

7

## CD4-0312の安全性試験(3)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」に準じた。

※試験委託先：「Charles River Laboratories」

厚生労働省推奨試験	実施試験項目	評価項目	結果	判定
レトロウイルス試験 1)電子顕微鏡観察 2)感染性試験 3)逆転写酵素活性試験	1)同左 2)・ミンク由来細胞を用いた S <sub>+</sub> ル-アッセイ ・XCブランクアッセイ 3)RT/Dual Template試験	1)電子顕微鏡によるウイルス様形態 2)感染性細胞を用いた感染性レトロウイルス有無 3)非感染性レトロウイルスの有無	1)ウイルス無し 2.3)実施中	合格 9月中旬 結果予定
In vitro試験	同左	ヒト、サル、マウスの細胞を用いたウイルスの存在有無	ウイルス無し	合格
In vivo試験	同左	細胞毒性・血球吸着等の感染兆候の無いウイルスの存在有無	ウイルス無し	合格
抗体産生(MAP)試験	同左 (Virus種は下記3種類追加) ・Mouse parvovirus ・Rodent Parvovirus Non-structural Protein 1 ・Prospect Hill Virus	マウス由来の19種類のウイルスの存在 ・Sendai virus ・Pneumonia virus of mice ・Mouse hepatitis virus ・Minute virus of mice ・Mouse parvovirus ・Mouse poliovirus ・Bovirus Type3 ・Rodent Parvovirus Non-structural Protein 1 ・Epicotic diarrhoea of infant mice ・Mouse pneumonitis virus ・Ectromella ・Polyoma virus ・Mouse adenovirus ・Lymphocytic choriomeningitis virus ・Mouse cytomegalovirus ・Mouse thymic virus ・Hantaan virus ・Prospect Hill Virus ・Lactate dehydrogenase virus	ウイルス無し	合格

8

## CD4-0312の安全性試験(4)その他の試験結果

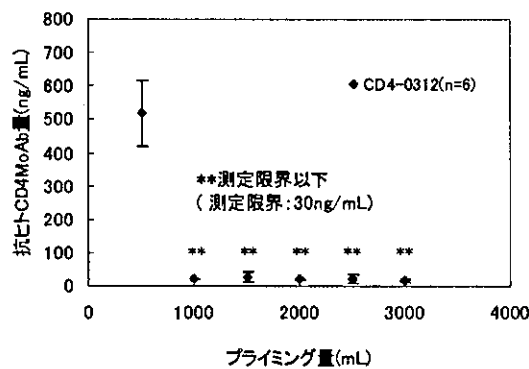
厚生労働省推奨試験	実施試験項目	評価項目	結果	判定
-	BSAウイルス混入試験	牛由来の9種類のウイルスの存在 ・Infectious Bovine Rhinotracheitis Virus ・Parainfluenza 3 ・Bovine Viral Diarrhea Virus, non-cytopathic NY-1 strain ・Bovine Adenovirus 3 ・Bovine Parvovirus ・Reovirus Type3 ・Rabies Virus ・Bluetongue Virus Type 17 ・Bovine Respiratory Syncytial Virus	ウイルス無し	合格
-	マイコプラズマ否定試験	マイコプラズマのコロニー形成有無	コロニー形成無し	合格

※試験委託先：「Charles River Laboratories」

9

## プライミングにおける抗体流出量の測定

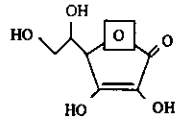
プライミング液：5%ブドウ糖注射液1L+生食2L  
 プライミング量：3L  
 流速：50ml/min  
 抗体定量法：サンドイッチ法(検出限界30ng/mL)



●プライミング液中の抗体流出量は約0.31mg/カラム(固定量の4.2%)であった。  
 しかし、1000mL以降は検出限界以下であった。

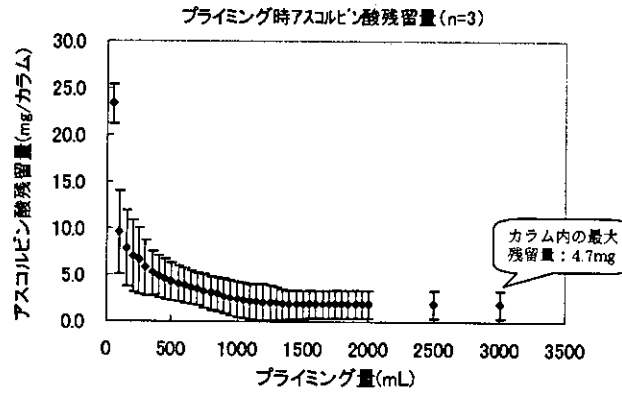
10

## アスコルビン酸の残留量測定結果



アスコルビン酸  
Mw: 176.12

ビタミンC欠乏症治療の注射液  
通常成人: 50~2000 mg/day  
皮下, 筋肉内または静脈内注射投与



残留量 = カラム内アスコルビン酸量 - プライミング液中アスコルビン酸量

●プライミング後カラム内に残留するアスコルビン酸の量は、  
最大4.7mgと十分に許容できる範囲であることが確認できた。

11

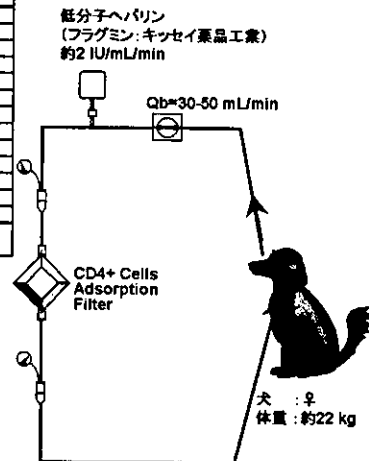
## 犬体外循環複数回施行での安全性確認

□施行条件

	ヒト(参考)	犬	
		1回目	2回目
施行日	-	2004/4/13	2004/4/21
実験犬	-	成犬 ♀	-
体重	60kg	22.4kg	21.8kg
体液量	4.8L	1.9L	1.8L
プライミング	-	5%ブドウ糖液 1L + 生理食塩液 2L 流速: 50 mL/min	
抗凝薬期	-	ヘパリン: 400IU/10ml フィード: 低分子ヘパリン 400IU/L 濃液 低分子ヘパリン 400IU/L 希0.5L フィード: 1500-2000IU/hr	
血液処理量	3000mL	1000mL	1200mL
処理量/体液量比	0.65	0.53	0.66
血液流速	-	30~50mL/min	
採血部位	-	中静脈	頸静脈
麻酔 (ベンゾピルピドールナトリウム)	-	24mg/kg	24mg/kg

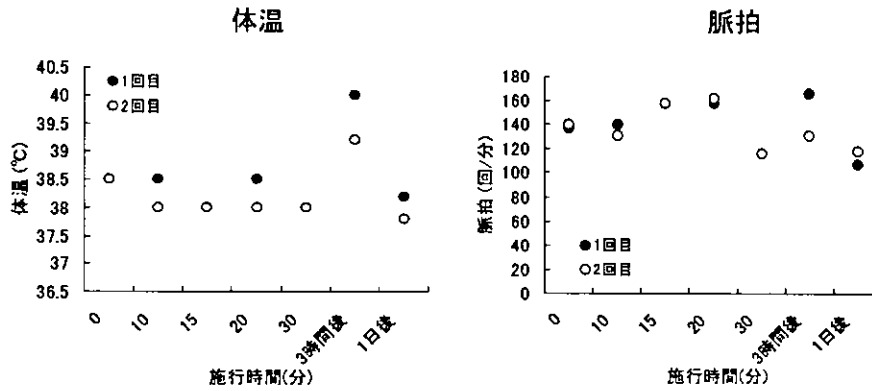
□測定項目

- ・体温
- ・脈拍
- ・呼吸数
- ・血圧
- ・発赤等のアレルギー症状の観察



12

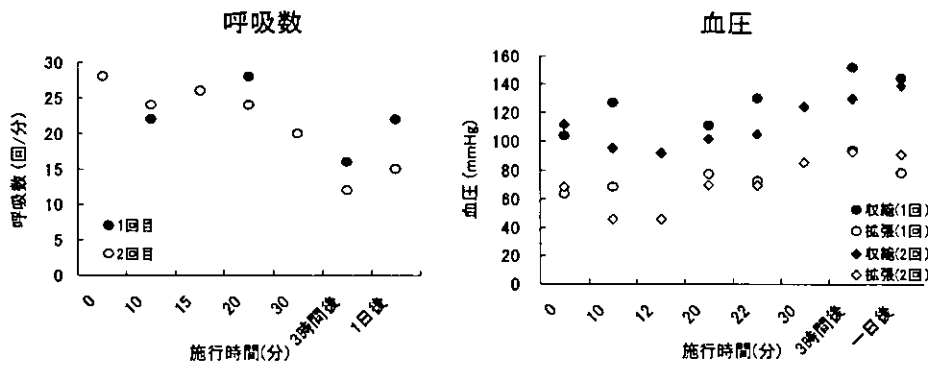
## 測定結果(1)



- 体温—**
- 施行中の体温上昇は認められなかった。
  - 施行終了3時間後の体温上昇は体外循環による放熱がないこと、麻酔下での呼吸数低下により放熱できないことによるものと考えられる。
  - 施行1日後には正常値に戻った。
- 脈拍—**
- 施行中、施行後に大きな変動は認められなかった。

13

## 測定結果(2)



- 呼吸数—**
- 施行終了3時間後の呼吸数低下は、深麻酔下による影響と考えられる。
- アレルギ—症状—**
- 複数回施行による発赤等のアレルギ—反応は認められなかった。
- 血圧—**
- 施行中の緩やかな上昇は生食フィードによる体液増加、また終了後の上昇は生食返血による体液増加に起因するものと考えられる。
  - ショック症状に見られる急激な血圧低下は認められなかった。

14

## 発熱性試験

□目的:ウサギ血漿にてCD4-0312の濾材を抽出し、抽出した血漿をウサギに投与して発熱しないことを確認する。

□試験方法:臨床品の濾材とウサギ血漿を接触抽出し、それをウサギ3羽(日本白色種)の耳静脈に10ml/kg投与し、1h毎に3hまで体温を測定する(第十四改正日本薬局方・発熱性物質試験法に準拠する)

□試験条件:抽出効率の高い血漿にて抽出した。(水系の約3倍)

	CD4-0312
濾材量	3.3 g
血漿量	50 mL*
抽出温度	37℃
抽出時間	15 min

\*抽出血漿を生理食塩液にて2倍希釈した検体を投与

□判定方法

- ・一検体につき3羽を用い、注射後の体温上昇が0.6℃以上の試験動物が無く、かつ3羽の合計体温上昇が1.4℃以下の場合陰性と判定する。
- ・体温上昇0.6℃以上の試験動物が2羽以上の場合陽性と判定する。
- ・体温上昇0.6℃以上の試験動物が1羽の場合追試験を行う。追試験では試験動物を5羽用い、体温上昇0.6℃以上の試験動物が2羽以上の場合陽性と判定する。

15

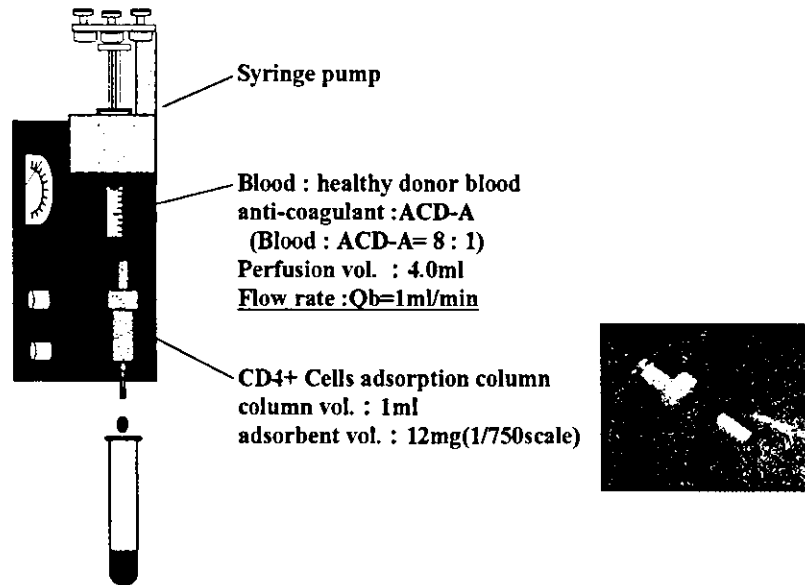
## 発熱性試験結果

検体	体温上昇(℃)			3羽合計(℃)	判定
	n=1	n=2	n=3		
血漿のみ (Blank)	0.24	0.45	0.33	1.02	陰性
CD4-0312 (臨床品)	0.10	0.05	0.08	0.23	陰性

●CD4-0312濾材の血漿抽出液からの発熱性物質は認められず、安全であることを確認できた。

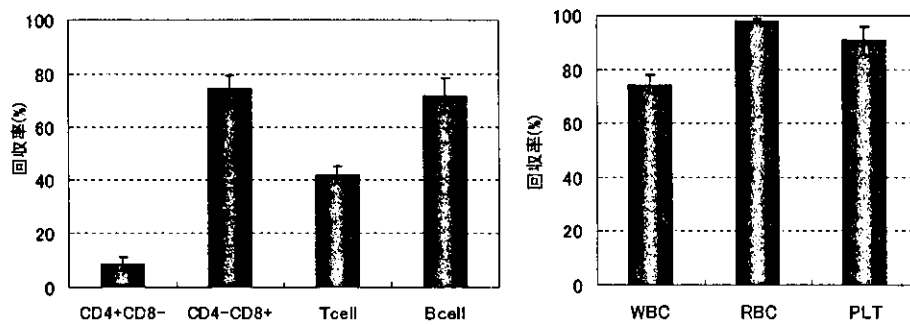
16

## In vitro 血液性能評価方法



17

## 性能結果 (in vitro ミニスケール評価 n=4)



評価カラム : 研究用用具ロット(203YABG)の1/750スケール(n=4)  
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)

18



## 保存後の安全性試験(4°C×8ヶ月保存)

□製品安全性試験  
 生物学的安全性試験  
 試験ロット：臨床研究用ロット(203YABG)の4°C×8ヶ月保存品。

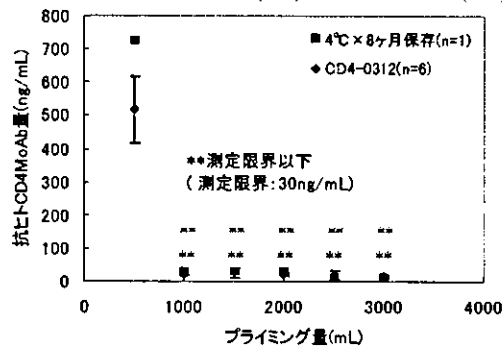
試験基準：「医療用具の生物学的安全性試験のガイドライン」に準じ実施した。

試験項目	基準	判定
発熱性試験	三羽の体温上昇0.6°C以上の試験動物が無く、かつ三羽の合計体温上昇が1.4°C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
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
急性毒性試験	注射後5日間観察で異常または死亡例を認めない	合格

19

## 保存後のプライミング液中抗体流出量の測定

プライミング液：5%ブドウ糖注射液1L+生食2L  
 プライミング量：3L  
 流速：50ml/min  
 抗体定量法：サンドイッチ法(検出限界30ng/mL)  
 カラム：臨床品カラム  
 保存ゼロ(n=6)、4°C×8ヶ月保存(n=1)

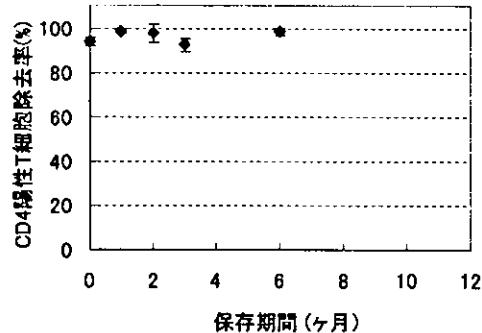


- 保存ゼロのプライミング液中の抗体総流出量は約0.31mg/カラム(4.2%)であり、4°C×8ヶ月保存では0.44mg/カラム(5.8%)であった。
- 保存に影響なく、1000mL以降は検出限界以下であった。

20

## 抗CD4モノクローナル抗体固定濾材の 4°C保存後性能試験結果

実験条件  
 カラム:ミニカラム(1/750スケール)  
 血液 :4.0ml(ACD-A:血液=1:8)  
 流速 :1.0ml/min  
 n数 :n=3



•4°C×6ヶ月保存までCD4陽性T細胞除去性能が安定していることを確認できた。(継続実施中)

21

## まとめ

### □安全性

- 濾材を充填したカラム(CD4-0312)は、医療用具のガイドライン及び吸着型血液浄化器基準を満たした。
- 原料抗体はウイルス否定試験によりウイルス混入の可能性を否定できた。
- プライミング液中のマウス抗ヒトCD4モノクローナル抗体流出量は、カラム当たり約0.31mgであった。この流出は、1Lのプライミング操作によって検出限界(30ng/mL)以下にまで下げることができた。
- プライミング後にカラムに残留するアスコルビン酸量は、最大4.7mg/カラムであり、十分許容できる範囲であることが確認できた。
- 犬体外循環試験にて、ショック症状等は認められず複数回施行での安全性を確認できた。
- CD4-0312濾材の血漿抽出液から発熱性物質は認められず安全であることを確認できた。

### □性能

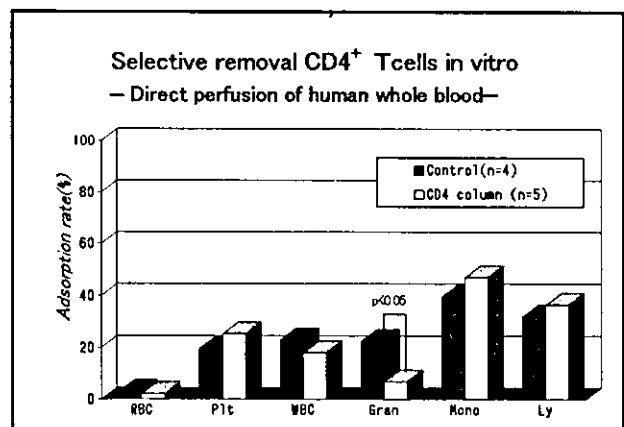
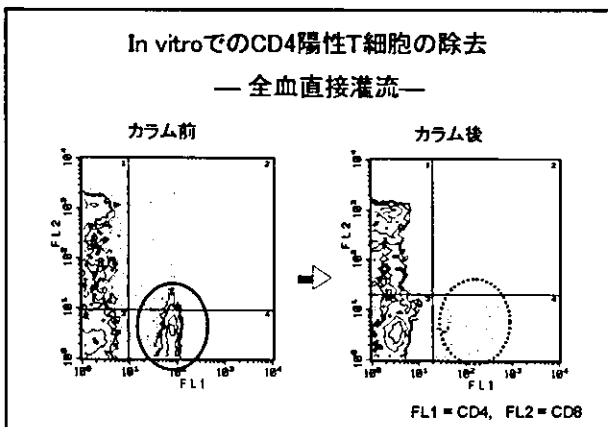
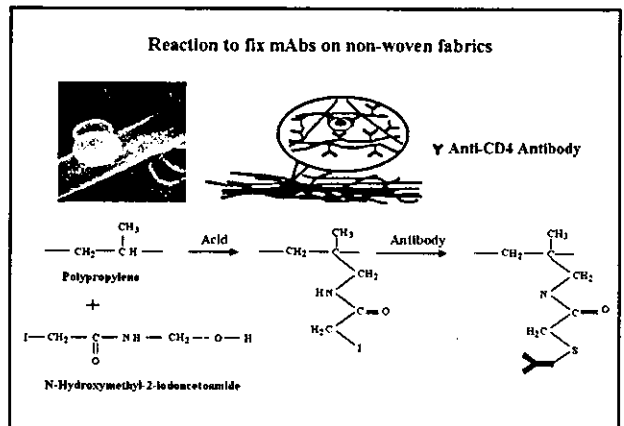
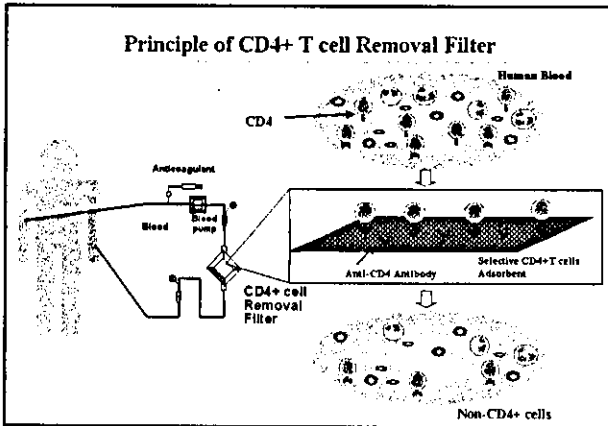
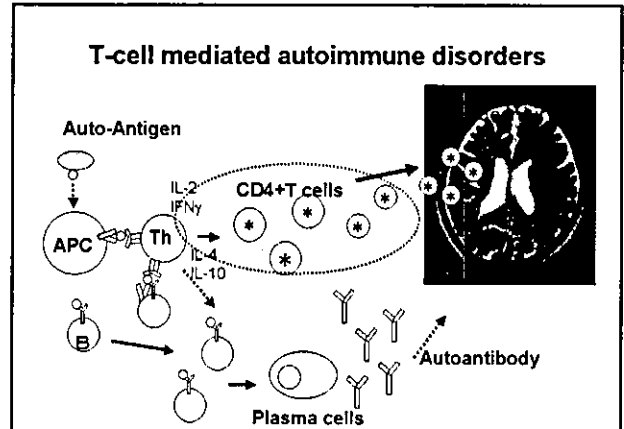
- 健康人ドナー末梢血を用いたin vitro評価において、CD4-0312のミニカラムがCD4陽性T細胞の選択的除去性能を有することを確認した。

### □保存安定性

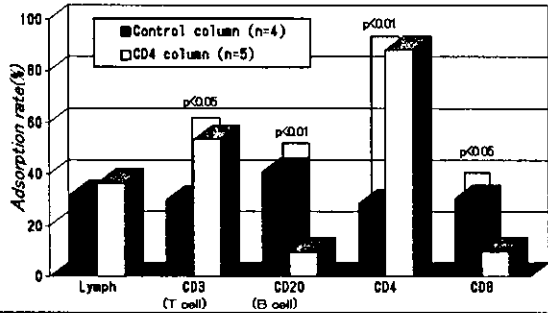
- 4°C×8ヶ月保存品においても医療用具のガイドライン(生物学的安全性試験)の基準を満たした。
- 4°C×8ヶ月保存品のプライミング液中のマウス抗ヒトCD4モノクローナル抗体流出量は、カラム当たり約0.44mgであった。この流出量は、1Lのプライミング操作によって検出限界(30ng/mL)以下にまで下げることができた。
- 4°C×6ヶ月までCD4陽性T細胞の除去性能が安定に維持されていた。
- 今後も保存品の安全性試験、性能試験を継続実施していく予定である。

22

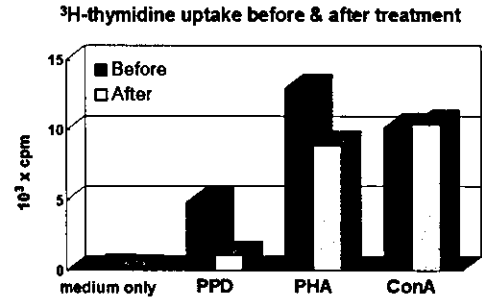
資料 2



**Selective removal CD4<sup>+</sup> T cells in vitro**  
 - Direct perfusion of human whole blood -



**Selective Removal CD4<sup>+</sup> T cells in vitro**  
 - Study with PPD specific CD4<sup>+</sup> T cell line -



*Thrombosis, Apheresis and Dialysis*  
 © 1993 Blackwell Publishing, Inc.  
 U 204 International Society for Apheresis

**Selective Adsorption of Human CD4<sup>+</sup> T Cells**

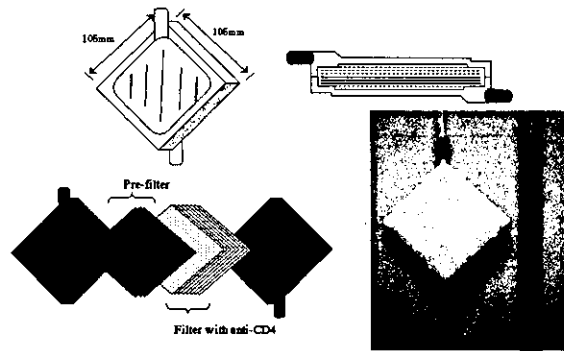
Hidenori Matsuo,<sup>1,2</sup> Hirofumi Goto,<sup>1,2</sup> Chiaki Kambara,<sup>1,2</sup> Takayasu Fukudome,<sup>1,2</sup>  
 Takamitsu Mizota,<sup>3</sup> Hirokazu Onodera,<sup>3</sup> Makoto Yoshida,<sup>3</sup> and Noritoshi Shibuya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Clinical Research and <sup>2</sup>Department of Neurology, Kawatana National Hospital, Nagasaki and  
<sup>3</sup>Research and Development Laboratory 3, Asahi Medical Co. Ltd, Oita, Japan

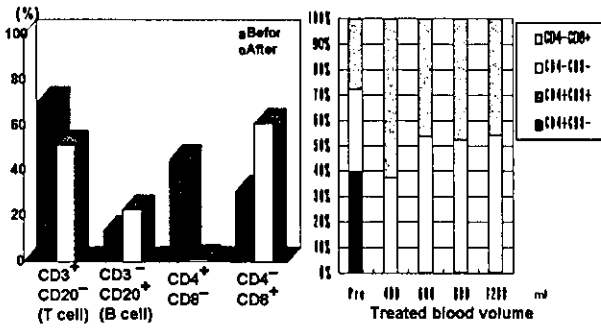
**Abstract:** The pathogenesis of most autoimmune diseases directly involves CD4<sup>+</sup> helper T cells. To remove CD4<sup>+</sup> T cells selectively from the circulation, we designed a new column in which an anti-CD4 monoclonal antibody was immobilized on the activated substance. Nearly 90% of CD4<sup>+</sup> T cells were selectively adsorbed from whole blood

with a single passage through the column in vitro, resulting in depletion of the antigen-specific T cell responses. We conclude that this new column would be potentially useful for treatment of T cell-mediated autoimmune diseases.  
**Key Words:** Cytopheresis, CD4<sup>+</sup> helper T cell, Immunotherapy.

**Structure of the CD4 Removal Filter**



**Selective removal CD4<sup>+</sup> T cells in vitro**  
 ヒト全血灌流による性能の評価



**CD4<sup>+</sup> T細胞吸着率の経時的変化**

