

総説

神経疾患に対する白血球系細胞除去療法：選択的に病因となるリンパ球を除去する試み

松尾 秀徳^{*1}・後藤 公文^{*1}・近藤 誉之^{*1}・吉田 一^{*2}・小野寺博和^{*2}
安武 幹智^{*2}・澁谷 統壽^{*1}

^{*1}国立病院機構 長崎神経医療センター, ^{*2}旭化成メディカル 第二開発研究室

Cytapheresis for Treatment of Neurological Diseases: Approaches to Remove Pathogenic Lymphocytes

Hidenori Matsuo^{*1}, Hirofumi Goto^{*1}, Takayuki Kondo^{*1}, Makoto Yoshida^{*2}, Kazuhiro Onodera^{*2}, Mikitomo Yasutake^{*2} and Noritoshi Shibuya^{*1}

^{*1}National Hospital Organization Nagasaki Medical Center of Neurology, ^{*2}Research and Development Laboratory 2, Asahi-Kasei Medical Co., Ltd.

Summary Antigen-specific CD 4⁺ T cells play a central role in the pathogenesis of T cell-mediated autoimmune diseases, such as multiple sclerosis (MS). To investigate the depletion of CD 4⁺ T cells from the systemic circulation as an effective strategy for the treatment of MS, we performed extracorporeal CD 4⁺ T cell adsorption, using a filter to which anti-CD 4⁺ antibody is immobilized as a ligand, in adoptively transferred experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Rats treated with a CD 4⁺ T cell removal filter exhibited milder clinical signs of EAE and earlier recovery than those receiving sham treatment. Moreover, the thymic cells from EAE rats treated with the CD 4 removal filter exhibited a suppressed proliferative response to myelin basic protein. These results suggest that depletion of CD 4⁺ T cells from the systemic circulation by extracorporeal treatment is a potentially useful strategy for treatment of T cell-mediated autoimmune disorders. Targeting other surface molecule, we can remove particular immune cells more selectively.

Key words: cytapheresis, CD 4⁺ T cell, T cell-mediated autoimmune disease, multiple sclerosis

1. はじめに

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、臨床的に用いられている治療手段は、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である。MSでは中枢 (脳・脊髄) 抗原特異的 CD 4⁺ 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されている。われわれは、この病因となる CD 4⁺ T細胞を *ex vivo* で除去し

免疫調節を行う体外循環システムの開発を行ってきた (図1)¹⁻⁸⁾。本稿では、選択的 CD 4⁺ T細胞除去器の開発の状況とさらに選択的に病因となるリンパ球を除去するためのアプローチについて概説する。

2. CD 4⁺ T細胞選択除去器の開発

2.1 治療器の開発および試作

汎用のプラスチック特に不織布として実績のあるポリプロピレン不織布に抗体を固定する技術を開発し、抗 CD 4 抗体固定カラムを試作した。この技術を用いてミニスケールおよびヒト臨床スケールの治療器を試作し、安全性の検討を行った。

リガンドとして抗ヒト CD 4 IgG 1 抗体 (mouse IgG, clone: 13 B 8.2, Coulter 社) を用いた。抗ヒト CD 4 IgG 1 抗体を溶解した PBS 溶液に活性化不織布を浸漬して室温で固定化反応を行った。反応後の残

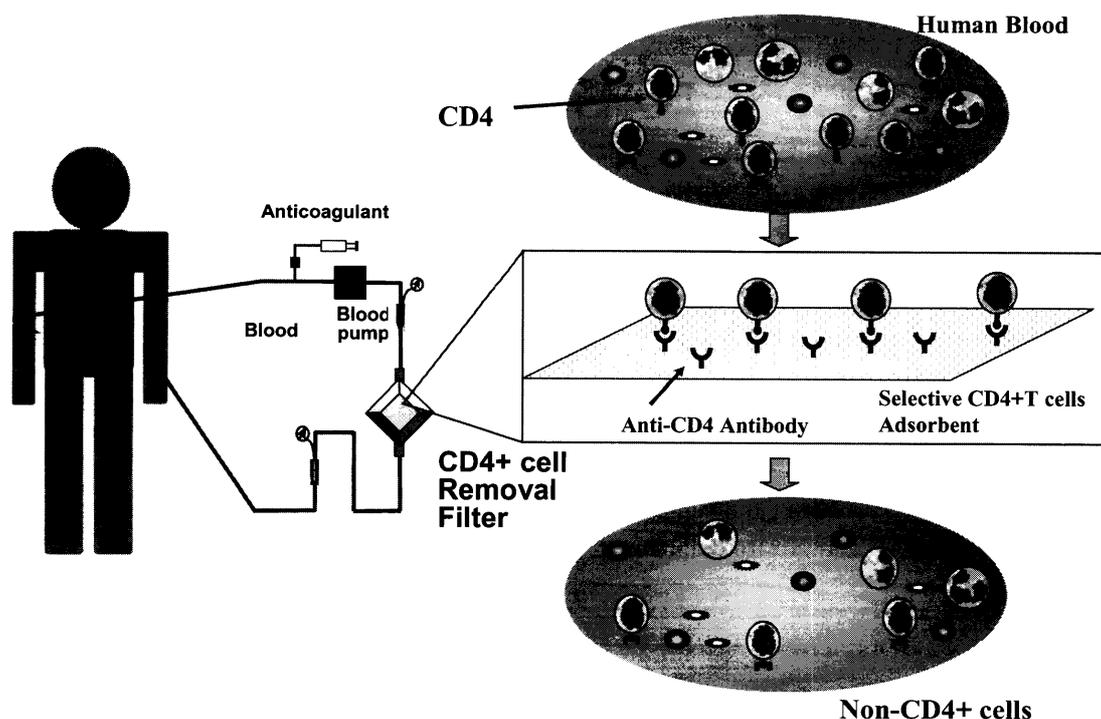


図1 選択的 CD4⁺ T細胞除去の体外循環システム

存活性基を Tween 20 (東京化成) でブロッキングして、モノクローナル抗体固定除去材を得た。モノクローナル抗体固定除去材を内径 68 mm, 容量 1 ml のカラムに充填し、キトサンを 1% 含む PBS 溶液を充填してミニスケールカラムとした。ミニスケールカラムは γ 線を 25 kGy 照射して滅菌した。健常人より採取した末梢血液に抗凝固剤として ACD-A を加えて (血液: ACD-A=8:1) 検体とした。ミニスケールカラムに流速 1 ml/分 で PBS 溶液 10 ml を流してプライミングを行った後、プライミング液を空気で押し出した。健常人より採取した末梢血液に抗凝固剤として ACD-A を加えて (血液: ACD-A=8:1)、これを処理検体とした。処理検体 5 ml を流速 1 ml/min で、シリ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 (Sysmex 社) にて求め、血小板の回収率を求めた。さらに、蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー分析より、リンパ球分画を CD4 および CD8 の 2 カラーで分析し、CD4⁺ 細胞除去率 (%) および CD4⁺ 細胞回収率 (%) を求めた。

結果: CD4⁺ 細胞除去率は $90.6\% \pm 3.6\%$ (mean \pm SD, $n=50$) であり、高い除去率を有することが確認できた。CD4⁺ 細胞回収率は、 $86.4\% \pm$

7.8% (mean \pm SD, $n=50$) であることを確認した (図2)。また、上記ポリプロピレン濾材での各細胞の回収率について評価した結果、白血球回収率: $70.1\% \pm 6.6\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、赤血球回収率: $97.8\% \pm 2.4\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、血小板回収率: $93.2\% \pm 9.0\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、リンパ球回収率: $55.8\% \pm 10.0\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、顆粒球回収率: $84.8\% \pm 15.7\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、単球回収率: $46.8\% \pm 17.2\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、B細胞回収率: $68.3\% \pm 10.3\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、T細胞回収率: $59.4\% \pm 12.7\%$ (mean \pm SD, $n=50$)、CD8⁺ 回収率: $79.8\% \pm 14.1\%$ (mean \pm SD, $n=50$) であった。

2.2 ラット体外循環用カラムの調製と体外循環に伴う *in vivo* での新たな免疫反応の検討

体外循環に伴い吸着材として用いた抗体に対する免疫反応の有無を検討するために、Lewis ラットで CD4⁺ T細胞除去カラムを用いて体外循環を 1 回または 2 回行い、体外循環後 3~4 週で採血し、リガンドに対する抗体が生じるかについて検討した。

カラム: モノクローナル抗体固定除去材を、21.5 mm 角に切断し、容量 2.5 ml のカラムに充填し、ラット体外循環用のカラムとした。1%キトサン 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 25 kGy を照射し滅菌を行っ

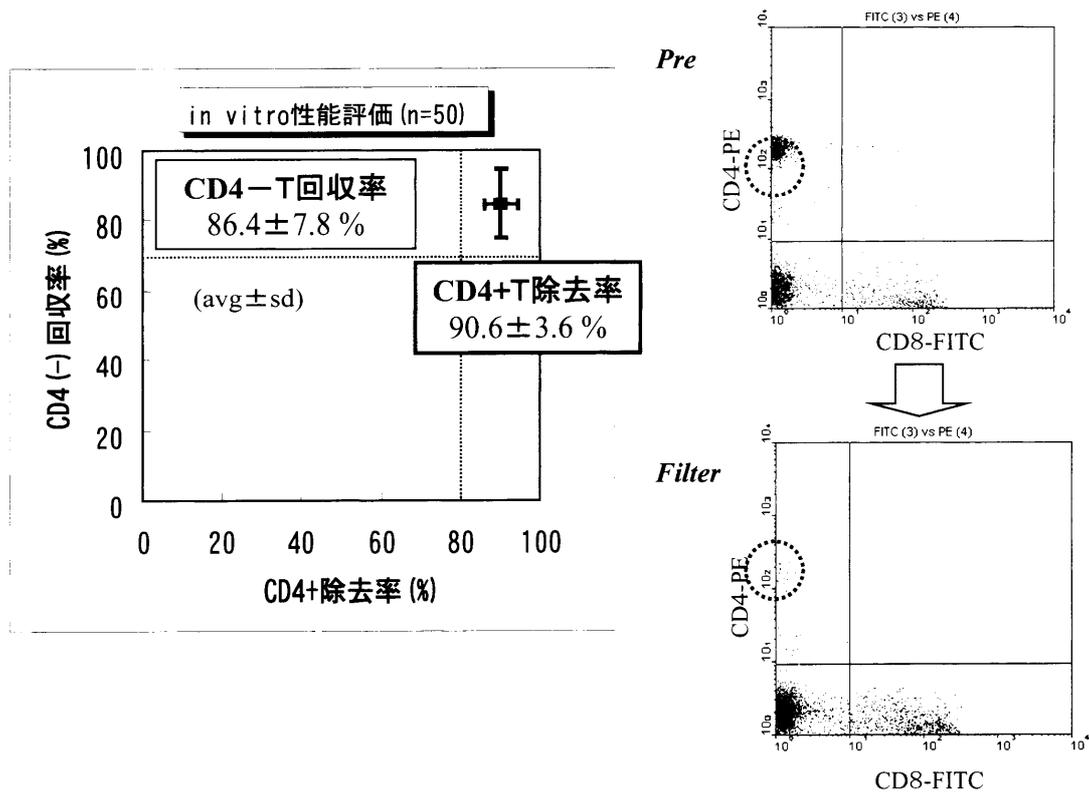


図2 *in vitro* でのカラムの性能評価：CD4⁺細胞除去率およびCD4⁻細胞回収率

た。

抗リガンド (マウス IgG) 抗体の測定：カラムのリガンドとして用いた IgG モノクローナル抗体 (マウス IgG 1, clone: W 3/25, Cedarlane 社) を抗原として Lewis ラットを 2~3 回免疫し、オクタロニー法で抗体の出現を確認し、positive control 用血清とした。96 穴 ELISA プレートに抗原であるマウス IgG を 200 ng/well の濃度で入れ、室温で乾燥、1%-BSA-PBS でブロック後、200 倍希釈したラット血清を添加し 4°C で一晩反応させた。1%-BSA-PBS で 5 回洗浄後、200 倍希釈した IgG 抗体 (Goat anti-rat IgG H+L 鎖) を 200 μl/well ずつ入れ室温で 3 時間反応させた後、洗浄と発色反応を行い吸光度を測定した。吸光度は 5 well の平均値を用いた。

結果：CD4⁺T 細胞除去カラムを用いた体外循環後 3~4 週のラット血清中における抗リガンド (マウス IgG) 抗体の測定では、1 回治療後および 2 回治療後ともに抗リガンド抗体は検出できなかった (表 1, 2)。これまでに、固定化した抗 CD4 モノクローナル抗体は全血フロー系でテストしてもカラムから遊離しないことを報告してきたが、実験動物で体外循環による血液成分とリガンドとして用いた抗体の接触によりリガンド (マウス IgG) に対する抗体が出現する可能

表 1 CD4⁺T 細胞除去器で体外循環を 1 回のみ行ったラット血中の抗マウス IgG 抗体 (405 nm での吸光度)

	治療後 4 週	判定
治療後ラット 血清①	0.493	-
血清②	0.527	-
血清③	0.685	-
Positive control	1.062	+
Cut off value (mean+3 SD)	0.694 (0.394+0.3)	

性は少ないことが示された。

2.3 CD4 陽性 T 細胞除去の臨床的意義の評価

T 細胞介在性の免疫性神経疾患である多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) ラットを用いた体外循環治療実験で、疾患モデルの重症度の変化や回復の速度などを治療効果判定に取り入れて評価した^{2,7)}。

① カラムの設計

抗ラット CD4-IgG モノクローナル抗体 (マウス IgG 1, clone: W 3/25, Cedarlane 社製) を活性化担体 (不織布) に固定し、膜濾過圧を軽減するために断面積を広くし、カラムの厚みを少なくしたミニカラムを作成した。

② 動物モデルの作成

合成 guinea pig myelin basic protein (MBP) の

表2 CD4⁺T細胞除去器で繰り返し体外循環を行ったラット血中の抗マウスIgG抗体(405 nmでの吸光度)

	3週	4週	判定(3週/4週)
治療後ラット ①	0.150	0.205	-/-
②	0.080	0.128	-/-
③	0.096	0.204	-/-
対照群ラット ①	0.162	0.232	-/-
②	0.228	0.283	-/-
③	0.271	0.338	-/-
Positive control	0.670	0.670	+/+
Cut off value (mean+3SD)	0.426 (0.258+0.168)	0.426	

アミノ酸残基68~82からなる peptide 100 µg/animal を抗原とし complete Freund's adjuvant とともに後肢足底部皮下に免疫し能動的 EAE を誘導した²⁾。

また, whole guinea pig MBP を抗原とし complete Freund's adjuvant とともに Lewis ラット (6週齢, 雌) の後肢足底部皮下に免疫した。免疫後11日目に所属リンパ節を摘出し, リンパ球浮遊液を作成した。このリンパ球浮遊液を MBP 20 µg/ml とともに72時間培養し, 反応した T 細胞芽球を比重遠心法で分離し, T 細胞増殖因子の存在下で増殖させ, さらに抗原と抗原提示細胞 (マイトマイシン処理した正常 Lewis ラット胸腺細胞) で再刺激と増殖を繰り返すことで MBP 特異的 T 細胞ライン (CD4⁺>95%) を作成した。T 細胞ライン 2~3×10⁶ を正常 Lewis ラット (12週齢, 雌) に経静脈的に注入 (passive transfer) し受動的 EAE を誘導した⁷⁾。

③ ラット CD4⁺T 細胞除去カラムによる能動的 EAE ラットの体外循環治療

免疫後5日目に1回のみ, または3日目と5日目の2回, エーテル麻酔下にラット尾動脈から末梢血を導出し, 1 ml/min の流速で, CD4⁺T 細胞除去カラムまたはコントロールカラムで30 ml を処理し, 尾静脈へ返血した。経時的体重測定と臨床症状 (6段階の臨床スコア) で評価した。

④ ラット CD4⁺T 細胞除去カラムによる受動的 EAE ラットの体外循環治療

passive transfer 直後に, エーテル麻酔下にラット尾動脈から末梢血を導出し全血フロー系で, 1 ml/min の flow rate で, CD4⁺T 細胞除去カラムまたはコントロールカラムで30 ml を処理し, 尾静脈へ返血した。

臨床症状と体重の変化の観察: 臨床症状は6段階の臨床スコアで評価した。

⑤ 循環血中の CD4⁺T 細胞除去の胸腺内に浸潤

した MBP 特異的 T 細胞数への影響の検討

受動的 EAE では病因となる MBP 特異的 T 細胞は passive transfer 後, 脳と胸腺に同じように分布することが知られている^{9,10)}。そこで, 体外循環治療により病因となる CD4⁺T 細胞が標的臓器に浸潤することを防ぐことができているかを評価するために, 標的臓器である脳・脊髄の代わりに胸腺を用いて, 胸腺内に浸潤した MBP 特異的 T 細胞の MBP への反応を定量化した。6匹のラットに MBP 特異的 T 細胞ライン (2×10⁶) を passive transfer し, passive transfer 直後に3匹を CD4⁺T 細胞除去カラムで, 3匹はコントロールカラムで治療した。passive transfer 後6日目に, それぞれの群の胸腺を摘出し, 胸腺細胞浮遊液を作成し MBP への反応をリンパ球幼若化反応とその培養上清中のサイトカインの測定により検討した⁷⁾。

結果:

① ラット CD4⁺T 細胞除去カラムによる能動的 EAE ラットの体外循環治療

6匹のラットについて, 免疫後5日目に2匹を CD4⁺T 細胞除去カラムで, 2匹はコントロールカラムで治療した。6匹全てのラットが免疫後11日目に発症し, 臨床スコアにも差はなかった。免疫後3日目と6日目の2回治療した場合も EAE の発症は抑制できず, 臨床スコアにも有意差は見出せなかった。

② ラット CD4⁺T 細胞除去カラムによる受動的 EAE ラットの体外循環治療

実験1: 軽症 EAE での治療実験

8匹のラットに MBP 特異的 T 細胞ライン (3×10⁶) を passive transfer し, passive transfer 直後に4匹を CD4⁺T 細胞除去カラムで, 4匹はコントロールカラム (sham 治療群) で治療した。sham 治療群では4匹中4匹, CD4⁺T 細胞除去カラム治療群では4匹中3匹が発症した。臨床スコアでは CD4⁺T

細胞除去カラム治療群の方がやや軽症である傾向が認められた ($p < 0.05$, The Two-way Repeated Measures ANOVA).

実験 2: 重症 EAE での治療実験

10 匹のラットに百日咳菌を追加接種して誘導した MBP 特異的 T 細胞ライン (2×10^6) を passive transfer し, passive transfer 直後に 5 匹を CD 4⁺ T 細胞除去カラムで, 5 匹はコントロールカラムで治療した. 10 匹全てのラットが passive transfer 後 4 日目に発症したが, 臨床スコアでは CD 4⁺ T 細胞除去カラム治療群の方がやや軽症である傾向が認められ, passive transfer 後 7, 8 日目では有意 ($p < 0.05$, The Two-way Repeated Measures ANOVA) に軽症化し, 回復が早いことが示唆された (図 3).

実験 3: 胸腺内に浸潤した MBP 特異的 T 細胞の定量化

6 匹のラットに MBP 特異的 T 細胞ライン (2×10^6) を passive transfer し, passive transfer 直後に 3 匹を CD 4⁺ T 細胞除去カラムで, 3 匹はコントロールカラムで治療した. passive transfer 後 6 日目に, それぞれの群の胸腺を摘出し, 胸腺細胞浮遊液を作成し MBP への反応をリンパ球幼若化反応とその培養上清中のサイトカインの測定により検討した. CD 4⁺ T 細胞カラム治療群では胸腺細胞浮遊液の MBP へのリンパ球幼若化反応はコントロールカラム治療群に比して明らかに抑制されており, IFN γ の産生も抑えられていた.

多発性硬化症では臨床症状の増悪時には循環血中に特定の T 細胞が増加しているとの報告がある¹¹⁾. こ

のような病態は, 今回用いた受動的 EAE と類似した病態であり, 循環血中に増加した病因となる T 細胞を効率的に除去できれば疾患の軽症化と回復の促進が期待できる. 実際に免疫性神経疾患を治療する際には, 循環している自己反応性 CD 4⁺ T 細胞を除去することで疾患の進行を防ぎ, 免疫異常の回復を促進することが可能となるものと期待される.

2.4 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 60 ml のカラムに充填し, 臨床スケールカラムを作成した (図 4). 1% キトサン 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 25 kGy を照射し滅菌を行った.

ウシ血液を用いた臨床スケールカラムの評価:

ウシ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. 臨床スケールカラムに流速 50 ml/min で生理食塩液を 3 L 流し, プライミングを行った. 処理検体 4.5 L を流速 50 ml/min で灌流した. 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. 赤血球数, 血小板数はマイクロセルカウンター (Sysmex 社) にて求め, それぞれの回収率を求めた. また, カラム前後の圧力を測定し, カラム圧損を求めた.

結果: 総赤血球回収率 $98.6\% \pm 0.3\%$ (mean \pm SD, $n=2$) および総血小板回収率 $98.8\% \pm 5.6\%$ (mean \pm SD, $n=2$), 総白血球回収率 $89.4\% \pm 4.2\%$ (mean \pm SD, $n=2$) といずれも高い回収率であった. 白血球の回収率は, 初期 1 L までは 70% 台であった

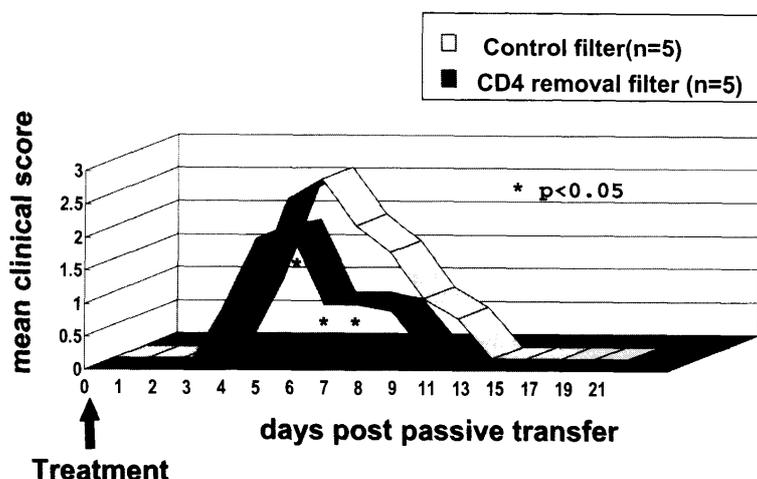


図 3 ラット CD 4⁺ T 細胞除去カラムによる受動的 EAE ラットの体外循環治療

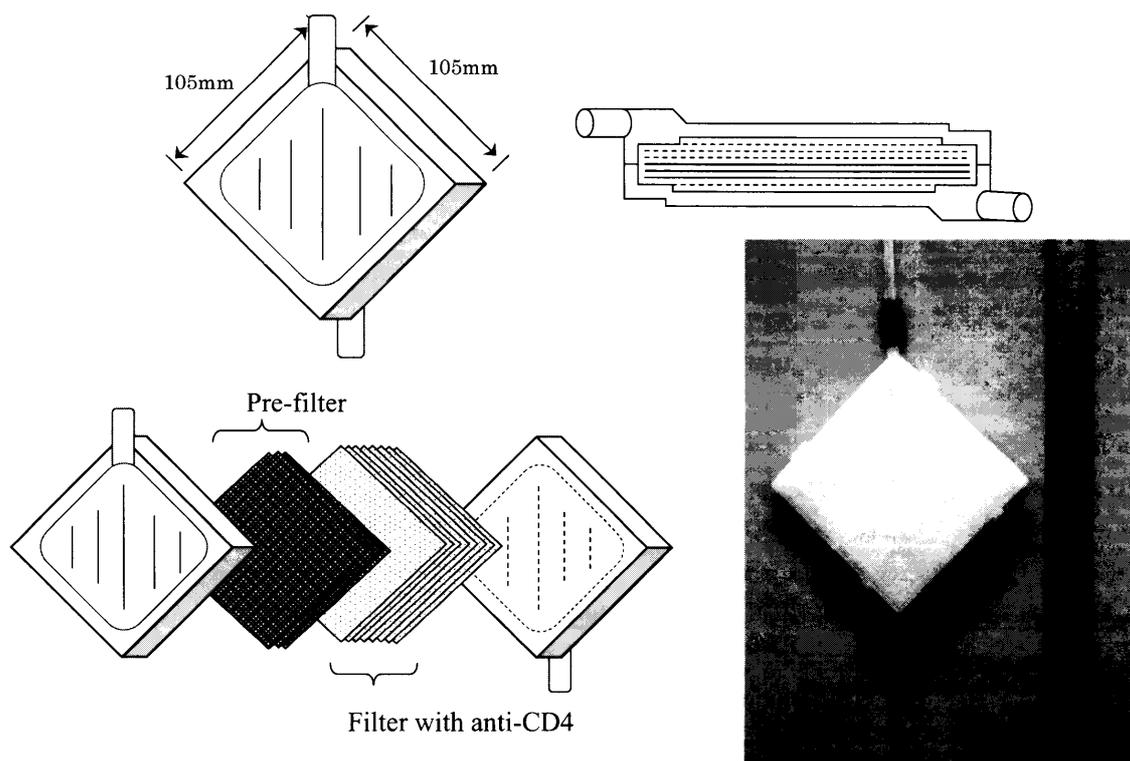


図4 ヒト臨床用 CD4⁺T細胞除去器の構造

が、2 L 以上では約 90% 以上の回収率であった。また、カラム圧損は、最大 15 mmHg であり、圧上昇なく安定していることを確認した。

2.5 臨床試用に向けたヒト CD4⁺細胞除去カラムの灌流実験と性能評価

ヒトへの臨床試用に向けて臨床スケールカラム（前述）を試作し、ボランティアより得た A 型新鮮血液を混合して 1.2~1.5 L とし、灌流実験を行い吸着性能について検討した。

① 灌流速度の影響についての検討

1.2~1.5 L の全血を流速 30 または 50 ml/min で灌流し、カラム前後の圧力を測定した。

② 抗凝固剤の影響についての検討

抗凝固剤として ACD-A および低分子ヘパリンを用いて検討した。

③ カラムの吸着性能の評価

経時的に、カラム処理前後の血液をサンプリングし、白血球数、赤血球数、血小板数を測定した。さらに、フローサイトメトリーを用いて、リンパ球の表面マーカーの検索を行い、CD 3, CD 20, CD 4, CD 8, CD 25, HLA-DR の各抗原陽性細胞の比率の変化について検討した。

結果：灌流実験では、流速 30 ml/min, 50 ml/min のいずれでもカラム圧損は、最大 15 mmHg であり、

圧上昇なく安定していることを確認した。特に、抗凝固剤が ACD-A 液の場合は圧損は 10 mmHg 以下であった。

白血球の回収率は流速 30 ml/min, 抗凝固剤 ACD-A 液の条件下では 65.0%, 流速 50 ml/min, ACD-A 液の条件では 51%, 流速 50 ml/min, 低分子ヘパリンの条件下では 27.1% であった。赤血球回収率は流速 30 ml/min, 抗凝固剤 ACD-A 液の条件下では 116.0%, 流速 50 ml/min, ACD-A 液の条件では 99.3%, 流速 50 ml/min, 低分子ヘパリンの条件下では 75.7% であった。また、血小板回収率は流速 30 ml/min, 抗凝固剤 ACD-A 液の条件下では 78.3%, 流速 50 ml/min, ACD-A 液の条件では 99.2%, 流速 50 ml/min, 低分子ヘパリンの条件下では 14.9% であった。リンパ球の表面マーカーの検索では CD4⁺T 細胞の除去率はいずれの灌流条件でも 99% 以上で、1.5 L までの処理では吸着率の減少はほとんど認められなかった（図 5）。また、カラムの処理によるリンパ球の活性化マーカー（CD 25, HLA-DR の発現率）の変化はなかった。

2.6 臨床スケールカラムの医療用具および医療材料の基礎的な生物学的安全性の確認

治療器 10 本を作成し、医療用具の生物学的ガイドラインに従い、安全性試験を実施した。発熱性試験、

CD4陽性 T細胞吸着率の経時的変化

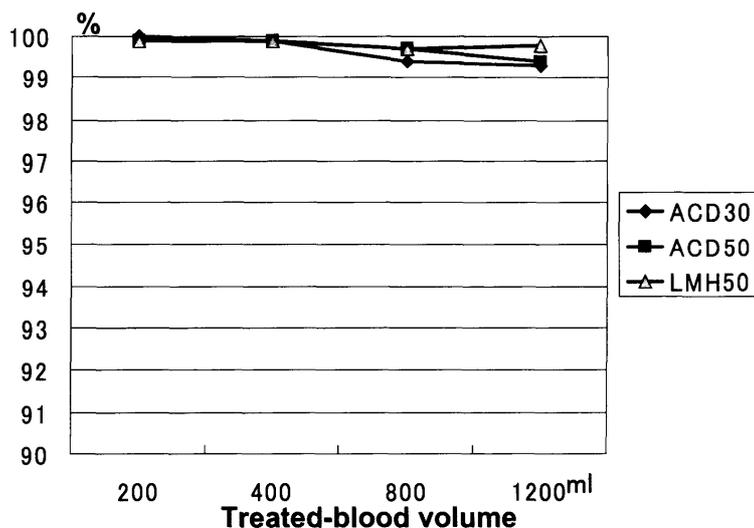


図5 ヒト血液での灌流実験時の CD4+ T細胞除去率の経時的変化

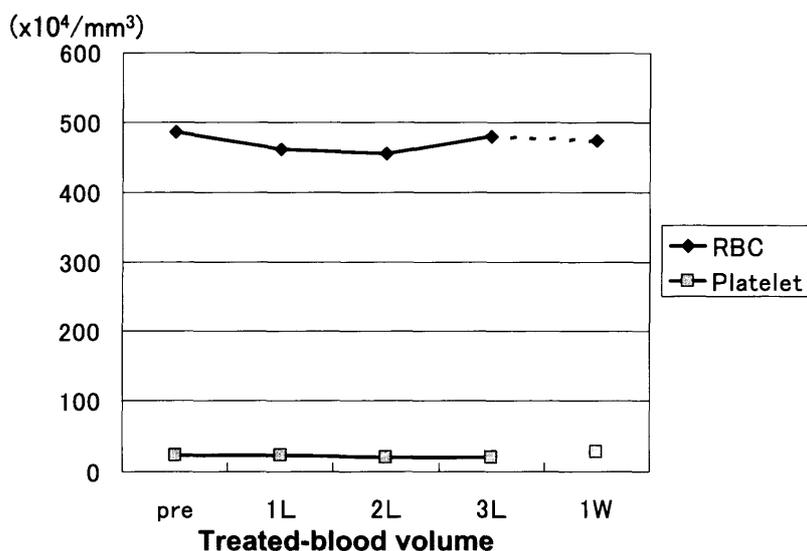


図6 健康人における CD4+ T細胞除去体外循環試験時の赤血球および血小板数の経時的変化

急性全身毒性試験，血液適合性試験，皮内反応試験，皮膚感作性試験を実施した結果，いずれも基準を満たし，各試験において特に異常を認めなかった。

また，細胞毒性試験を実施した結果，弱から中程度の毒性が認められた。ただし，これは充填液の残留によるものと推測された。

原材料として用いる抗体のウイルス否定試験を実施し，実施した全ての項目でウイルス存在は否定された。加えて，治療器での無菌試験を実施し，細菌および真菌の検出なく，作成した除去器のウイルスに関する安全性が確認された。

医療用具および医療材料の基礎的な生物学的試験の

ガイドラインに基づいた生物学的安全性試験の結果では，細胞毒性試験で弱から中程度の細胞毒性が確認された点を除き，臨床スケールカラムの安全上の問題点は特に認めず，臨床への応用の可能性が示唆された。さらに，原材料として用いる抗体のウイルス否定試験を実施し，評価した全ての項目でウイルスの存在が否定された。これより，滅菌後の治療器においてもウイルス混在の危険性は低いことが示された。

2.7 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 1,000 ml，生理的食塩水 2,000 ml でプライミングした。イヌ（雄，体重 22.8 kg）の頸部シャントに脱血

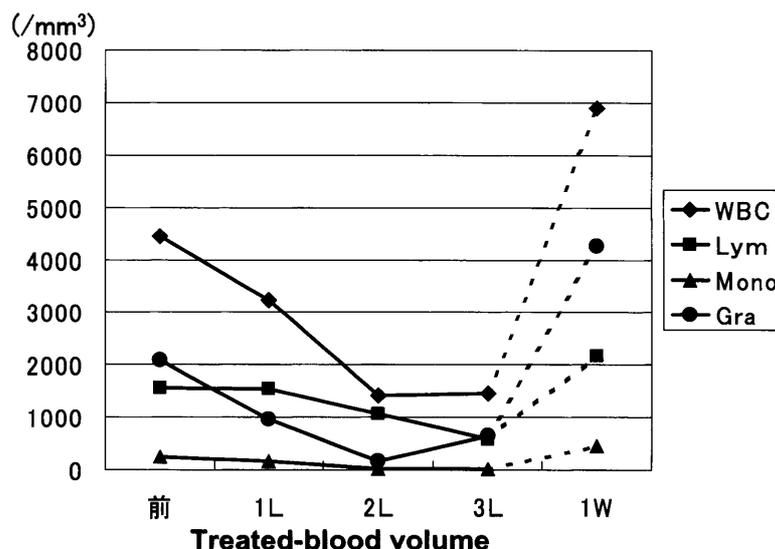


図7 健常人における CD4⁺T 細胞除去体外循環試験時の白血球各分画の経時的変化

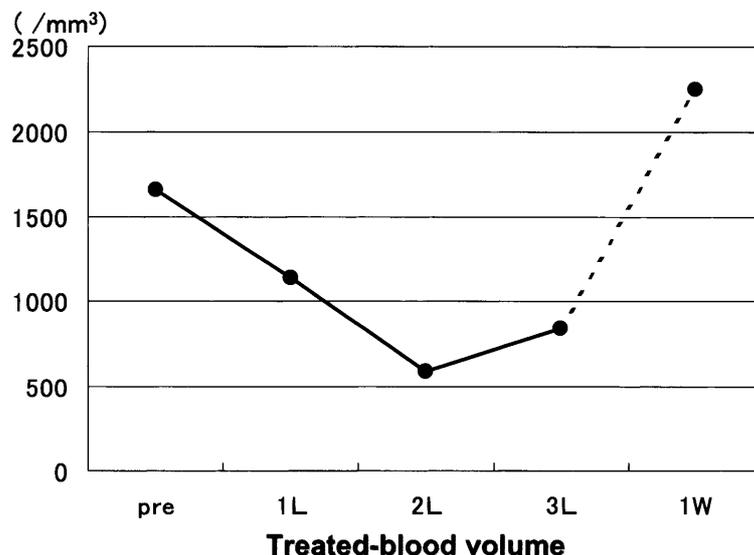


図8 健常人における CD4⁺T 細胞除去体外循環試験時の CD4⁺T 細胞数の経時的変化

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。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なく、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。

2.8 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 3 L、

CD4⁺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。

健常人を対象とした体外循環試験では、全血 3 L の体外循環処理が施行できた。カラムの直後では CD4⁺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⁺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（図 6, 7, 8）。

3. 選択的疾患惹起性 T 細胞除去に向けてのアプローチ

CD4⁺T 細胞除去器の開発の過程で、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報告され¹²⁾, 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た。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 CD 4⁺ T 細胞が増殖しており、また、そのような T 細胞表面に発現する T 細胞レセプター (TCR) はある程度限られているとの報告がある¹¹⁾。したがって、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。ヒトでは主要組織適合性抗原の違いなどにより TCR の使用頻度は個体差が出てくる可能性が高いが、疾患惹起性 T 細胞の TCR が明らかになれば、その TCR を標的とした Tailor-made な免疫療法が可能となる。

その一つの試みとして、ヒト TCR V β 5.2 および V β 8 を標的とした吸着材の開発を行った。活性化不織布に、リガンドとして抗ヒト TCR V β 5.2 モノクローナル抗体 (mouse IgG 1, clone: 36213, Immunotech 社) と抗ヒト TCR V β 8 モノクローナル抗体 (mouse IgG 1, clone: 56 C 5.2, Immunotech 社) 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、モノクローナル抗体固定吸着材を作成した。モノクローナル抗体固定吸着材を、内径 6.8 mm, 容量 1 ml のカラムに充填し、抗体の滅菌保護剤を充填し、約 25 kGy の γ 線照射滅菌を行った。

健常人より採取した末梢血液を検体とし、2-1 のミニスケールカラム評価と同様の方法で、細胞の回収率を求めた。さらに、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 CD 4 および TCR V β 5.2, CD 4 および TCR V β 8 の 2 カラーで分析し、TCR V β 5.2+T 細胞および TCR V β 8+T 細胞の吸着率 (%) およびその他の細胞回収率 (%) を求めた。

結果：フローサイトメトリー分析により、カラム処理前後の血液細胞における TCR V β 5.2+細胞と TCR V β 8+細胞の T 細胞中の存在比率 (%) について測定を行った。TCR V β 5.2+T 細胞では、カラム処理前後での細胞存在比率 (%) は各々 0.58 \pm 0.13%, 0.33 \pm 0.11% であり、カラム処理による吸着率は 55.1 \pm 8.3% (mean \pm SD, $n=6$) であった。

また、TCRV β 8+T 細胞に関しては、カラム処理前後での細胞存在比率 (%) は各々 1.40 \pm 0.92%,

0.70 \pm 0.56% であり、カラム処理による吸着率は 59.3 \pm 8.8% ($n=4$) であった。

その他の細胞の回収率 (%) は、抗ヒト TCR V β 5.2 固定カラムでは、赤血球回収率 99.4 \pm 1.7%, 血小板回収率 82.6 \pm 17.4% ($n=6$) であった。同じく TCR V β 8 固定カラムでは、赤血球回収率 97.6 \pm 1.8%, 血小板回収率 96.0 \pm 3.2% ($n=4$) であった。

疾患惹起性細胞として、TCR V β 5.2+T 細胞および TCR V β 8+T 細胞を想定し選択的吸着を試みた。これらの細胞の循環血中での頻度は極めて少ないが、約 60% の吸着率であった。その他の細胞の非特異的吸着はほとんどなく、選択的吸着が可能と考えられた。今後、さらに効率的な選択的吸着を目指すには、濾材物性とリガンドの探索が必要と考えられる。

4. お わ り に

T 細胞介在性の免疫性神経疾患を治療するために、病因となる自己反応性 T 細胞をより選択的に除去する試みを紹介した。選択的 CD 4⁺ T 細胞除去療法は臨床応用が可能なレベルに到達した。さらに、この技術を応用することで種々の免疫担当細胞を循環血中より選択的に減少させることが可能で、体外循環による免疫調節もより現実的となってきた。

本研究は創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業および厚生労働科学研究費補助金 こころの健康科学研究事業の助成を受けて実施された。

文 献

- 1) 澁谷統寿, 一瀬克浩, 大津留 泉, 他: 免疫性神経疾患に対するアフエーシス療法の開発と評価: 選択的 CD 4⁺ T 細胞除去カラムの開発. *人工臓器* **25**: 165-168, 1996
- 2) Matsuo H, Ichinose K, Ohtsuru I, et al: Treatment of experimental allergic encephalomyelitis by selective removal of CD 4⁺ T cells. *Ther Apher* **1**: 165-168, 1997
- 3) 松尾秀徳, 一瀬克浩, 後藤公文, 他: 選択的 CD 4 陽性 T 細胞吸着カラムの開発. *医工学治療* **10**: 143-147, 1998
- 4) Onodera H, Suematsu J, Yoshida M, et al: A new device for selective removal of CD 4⁺ T cells. *Ther Apher* **2**: 37-42, 1998
- 5) 澁谷統寿, 松尾秀徳: 特集/リンパ球除去療法—総論. *神経内科* **49**: 493-498, 1998
- 6) Onodera H, Ninomiya K, Yoshida M, et al: Development of a device for selective removal of CD 4⁺ T cells. *Ther Apher Dial* **7**: 329-333, 2003
- 7) Nakane S, Matsuo H, Goto H, et al: Cytapheresis with a filter for selective removal of CD 4⁺ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Multiple Sclerosis* **9**: 579-584, 2003

- 8) Matsuo H, Goto H, Kambara C, et al: Selective adsorption of human CD4+ T cells. *Ther Apher Dial* **8**: 194-196, 2004
- 9) Naparstek Y, Holoshitz J, Eisenstein S, et al: Effector T lymphocyte line cells migrate to the thymus and persist there. *Nature* **300**: 262-264, 1982
- 10) Naparstek Y, Ben-Nun A, Holoshitz J, et al: T lymphocyte lines producing or vaccinating against autoimmune encephalomyelitis (EAE). Functional activation induces peanut agglutinin receptors and accumulation in the brain and thymus of line cells. *Eur J Immunol* **13**: 418-423, 1983
- 11) Illes Z, Kondo T, Yokoyama K, et al: Identification of autoimmune T cells among in vivo expanded CD25+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* **162**: 1811-1817, 1999
- 12) Sakaguchi S: Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* **22**: 531-536, 2004