

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年10月12日 (12.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/106972 A1

- (51) 国際特許分類:
A61M 1/36 (2006.01) B01J 20/26 (2006.01)
A61M 1/02 (2006.01) B01J 20/28 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/306944 (74) 代理人: 酒井 宏明 (SAKAI, Hiroaki); 〒1006019 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号 霞が関ビルディング 酒井国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (22) 国際出願日: 2006年3月31日 (31.03.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2005-101466 2005年3月31日 (31.03.2005) JP
特願2005-111651 2005年4月8日 (08.04.2005) JP
特願2005-111652 2005年4月8日 (08.04.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 島垣 昌明 (SHIMAGAKI, Masaaki) [JP/JP]; 〒5202101 滋賀県大津市青山5-7-5 Shiga (JP). 山村 泰史 (YAMAMURA, Yasufumi) [JP/JP]; 〒5200842 滋賀県大津市園山2-15-1-565 Shiga (JP). 佐藤 雄久 (SATO, Katsuhisa) [JP/US]; 81001 コロラド州プエブロ マッケンジーロード 1730 Colorado (US). 寺本 和雄 (TERAMOTO, Kazuo) [JP/JP]; 〒5200865 滋賀県大津市南郷2-25-8 Shiga (JP). 大関 岳成 (OOZEKI, Takeshige) [JP/JP]; 〒5200842 滋賀県大津
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ADSORBENT AND COLUMN FOR EXTRACORPOREAL CIRCULATION

(54) 発明の名称: 吸着材および体外循環用カラム

(57) Abstract: It is intended to provide an adsorbent by which cells contained in the blood typified by activated leukocytes such as granulocytes and monocytes and cancer cells can be removed and cytokines promoting the activation of cells remaining therein can be removed and which has a high morphological stability without any fear of pressure loss. Namely, an adsorbent having a Zeta potential of -20 mV or above and being capable of adsorbing granulocytes and monocytes in the blood; an adsorbent for treating cancer being capable of adsorbing an immunosuppressive protein; an adsorbent characterized by having a double-layered structure composed of a net and a non-woven fabric; and a blood circulation column packed with any one of the adsorbents as described above.

(57) 要約: 本発明は、血液中に存在する細胞、顆粒球や単球などの活性化した白血球、ガン細胞をはじめとする細胞を除去できると共に、残存した細胞に対し活性化を促すようなサイトカイン類の除去も可能であり、しかも圧力損失懸念がなく形状安定性の高い吸着材を提供することを課題とする。すなわち、本発明は、ゼータ電位が-20mV以上であって、血液中の顆粒球・単球を吸着する吸着材、免疫抑制性蛋白質を吸着する癌治療用吸着材、ネットと不織布の2層構造を持つことを特徴とする吸着材、並びに前記いずれかの吸着材を充填してなる血液循環カラムを提供するものである。

WO 2006/106972 A1

明 細 書

吸着材および体外循環用カラム

技術分野

- [0001] 本発明は、吸着材及び体外循環用カラムに関し、詳しくは、血液中から白血球、炎症性、免疫抑制性サイトカイン、液性因子を効率よく除去することができ、いわゆる白血球除去療法、免疫賦活療法、癌治療等に好適に用いられる吸着材、および該吸着材を利用した体外循環用カラム等の血液処理カラムに関するものである。

背景技術

- [0002] 血液中には、血球、サイトカインその他液性成分など様々な成分が含まれ、これらの血液成分は体内の免疫のバランス調整において重要な役割を果たしている。
- また、リポ多糖に代表されるエンドトキシンは、血液中で発熱、血圧低下、血管内凝固、ハーゲマン因子の活性化など種々の生物活性を示す因子である。特に臨床の場では、例えば外科手術後に患者血液中に混入し、重篤な敗血症を引き起こすことがある。患者血液中に混入したエンドトキシン、特に重篤な患者の血液に混入したエンドトキシンにより刺激を受けた白血球より癌壊死因子、インターロイキン-1、インターロイキン-6、インターフェロンなどの種々のサイトカインや酸過酸化物が放出されることが知られている。また、これら過剰なサイトカインは生理的悪影響を及ぼすことが知られている。
- [0003] これまでに血液中の様々な成分を除去するカラムが開発されている。例えば白血球除去や顆粒球除去を目的としたカラム(特許文献1, 2)や、サイトカイン吸着を目的としたカラム(特許文献3, 4)、白血球と毒素を同時に吸着することを目的としたカラム(特許文献5, 6)が挙げられるが、血球が情報応答する液性因子を同時に除去するものはなかった。また、ゼータ電位が0mV以上である所定の濾材を主要部とする白血球除去フィルターも報告されているが(特許文献7)、血球除去についての開示にとどまる。従って、これら従来のカラムはいずれも、残存した細胞の正常化が不十分であった。
- [0004] 一方、血液成分のうち特に、潜在型トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベ-

タ(以下、 $TGF-\beta$)、免疫抑制酸性蛋白、インターロイキン-10、腫瘍壊死因子(以下、TNF)、プロスタグランジンE2などの種々の物質や、B細胞、マクロファージ等の細胞は、進行癌患者において異常増殖し、癌特異的キラー細胞の誘導や機能発現を阻害するなど免疫機能を抑制することが報告されている(非特許文献1:藤原大美著、腫瘍免疫学、p89-112、中外医学社、1998年)。よって、特に癌患者を対象としてこれらの免疫抑制物質を除去し患者の免疫力を向上させ、腫瘍の退縮や増殖の抑制を導くための手段の開発も進められている。

[0005] これら免疫抑制物質を効率よく安全に除去するための技術として、 $TGF-\beta$ (特許文献8, 9)、癌胎児性抗原(特許文献10)、免疫抑制酸性蛋白(特許文献11)のそれぞれの吸着を目的とした技術が開示されている。しかし、これらの免疫抑制物質を一つの吸着体で効率よく除去する技術は、いまだ開発されていない。

[0006] 一方、上述のカラムは、通常、カラム内部にそれぞれ目的とする物質を除去・吸着するための濾過材または吸着材(吸着担体)を有し、様々な物質、形状のものが用いられている。例えば、特許文献1では、血球の目詰まり解消のため複数の繊維径からなる繊維を混合した不織布を用いる。しかし、不織布自体の嵩密度が高く、血球除去性の制御が不十分であり、依然として血液循環の際の圧力損失上昇の懸念が問題であった。

また、直径2mm程度の酢酸セルロースビーズからなる吸着担体(特許文献2)においては、圧力損失の懸念はあまりないものの、吸着表面積を大きくすることはできず、吸着担体としては非効率的である。かといって、粒子径を小さくすることは圧力損失増加につながるため、採用し難い。

[0007] 特許文献6には、目づまり防止及び形態保持性維持の観点から、吸着担体の嵩密度を $0.05\sim 0.15\text{g}/\text{cm}^3$ に調整することが開示されているが、この吸着担体は実用性が低く、特に形態安定性が不十分であるという問題点があった。

[0008] 非特許文献1:藤原大美著、腫瘍免疫学、p89-112、中外医学社、1998年

特許文献1:特開昭60-193468号公報

特許文献2:特開平5-168706号公報

特許文献3:特開平10-225515号公報

特許文献4:特開2000-237585号公報

特許文献5:特開2002-113097号公報

特許文献6:特開2002-172163号公報

特許文献7:特開平6-142196号公報

特許文献8:特開2003-339854号公報

特許文献9:特開2004-248950号公報

特許文献10:特開2003-310751号公報

特許文献11:特開2003-111834号公報

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の第1の課題は、顆粒球や単球などの細胞を除去し、かつ残存した細胞に対し、活性化を促すようなサイトカイン類も、残存した液成分中に残らないようにすることにある。このためには、細胞除去と同時に異常に増加するサイトカインをも除去できる機能を吸着体に付与することで、これらの問題点が解決できると考えた。すなわち、本発明は、細胞とサイトカインの同時吸着、同時除去に好適に使用し得る材料を提供すること、およびそれを用いた血液処理カラムを提供することを第1の目的とするものである。

[0010] また、本発明者等は、体液中に存在し、サイトカイン放出の原因となるエンドトキシン、顆粒球や単球表面に付着したエンドトキシンなどの吸着除去、或いはエンドトキシンによる過剰なサイトカインの生産を予防することにより、エンドトキシン含有血液の状態を改善することが重要であるという知見を得た。この知見に基づき、本発明の第1の課題には、(1)体液中のエンドトキシンを直接吸着材に吸着させて直接的に除去すること、および(2)顆粒球或いは単球を吸着させて、顆粒球或いは単球などの白血球成分への付着性のエンドトキシンを間接的に血液中より除去することも含まれる。また、(3)該エンドトキシンに起因するサイトカインをも除去して血液中のサイトカイン濃度の上昇を予防すること、も含まれる。

まとめると、上述した本発明の第1の目的には、顆粒球や単球などの細胞およびサイトカイン類と、エンドトキシンとの両者の吸着および両者の除去に好適に使用し得る

高機能材料、およびそれを用いた高機能血液処理カラムを提供することも含まれる。

[0011] 本発明の第2の課題は、癌細胞増殖に関わる免疫抑制物質を除去することにある。すなわち、本発明は、上述の従来技術の問題点に鑑み、一般的に普及可能であり、体液中から、直接、TGF- β や免疫抑制酸性蛋白などの免疫抑制物質を高い効率で選択的に吸着すると共に体液中の白血球を除去し正常な白血球バランスに近づけることができ、かつ、安全に体外循環できる材料を提供することを第2の目的とする。この第2の目的には、係る免疫抑制物質を吸着する材料を充填した癌治療用のカラムの提供、並びに該カラムを用いた癌の治療を行うことも含まれる。

[0012] 本発明の第3の課題は、血液循環カラムとしての安定した利用性を確保することにある。すなわち、本発明は、上述の従来技術の問題点に鑑み、血液中に存在する細胞、特に顆粒球や単球などの活性化した白血球、ガン細胞などを除き、さらに好ましくは過剰に存在するサイトカインをも除去できる、圧力損失が少ない吸着担体を提供すること、並びに吸着特性を損なうことなく、担体自体の形状安定性を持たせることを第3の目的とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明は、上記第1の目的を達成するために、下記の構成を有する。

(1)ゼータ電位が-20mV以上であって、血液中の顆粒球、単球およびサイトカインを吸着することを特徴とする吸着材。

(2)前記血液分散液からの顆粒球の吸着率が50%以上、かつ単球の吸着率が50%以上であることを特徴とする前記(1)に記載の吸着器。

(3)リンパ球の吸着率が40%以下であることを特徴とする前記(1)または(2)に記載の吸着材。

(4)前記サイトカインがインターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-10(IL-10)、TNF- α 、トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベータ(TGF- β)、血管新生増殖因子(VEGF)および免疫抑制酸性蛋白(IAP)からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする前記(1)~(3)のいずれかに記載の吸着材。

(5)凝固第XIII因子の吸着率が30%以下であることを特徴とする前記(1)~(4)の

いずれかに記載の吸着材。

(6) ゼータ電位が -15mV 以上であって、 $1\text{vol}\%$ 牛胎仔血清(FCS)溶解生理食塩水中で 90% 以上のリポ多糖(LPS)吸着能を有することを特徴とする前記(1)に記載の吸着材。

(7) 水不溶性担体に4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基を結合してなる前記(1)～(6)のいずれかに記載の吸着材。

(8) 形状が繊維、膜、中空糸及びビーズから選ばれることを特徴とする前記(1)～(7)のいずれかに記載の吸着材。

(9) 前記水不溶性担体の形状が繊維状あるいは中空糸形状であって、かつその繊維径が $3\mu\text{m}$ を超えるものであることを特徴とする前記(1)～(8)のいずれかに記載の吸着材。

(10) 繊維径が $4\sim 8\mu\text{m}$ の繊維Aおよび繊維径が $10\sim 50\mu\text{m}$ の繊維Bを含むことを特徴とする前記(9)に記載の吸着材。

(11) 前記繊維Aが繊維径 $4.5\sim 8\mu\text{m}$ の繊維を含むことを特徴とする前記(10)に記載の吸着材。

(12) 前記水不溶性担体の形状がビーズ状であって、かつ材料の表面に径が $3\mu\text{m}$ を超える突起部分を有することを特徴とする前記(1)～(8)のいずれかに記載の吸着材。

(13) 白血球除去療法に用いられることを特徴とする前記(1)～(12)のいずれかに記載の吸着材。

(14) 前記(1)～(13)のいずれかに記載の吸着材を容器に充填してなる血液処理カラム。

(15) 血液を循環させることを特徴とする(14)記載の血液処理カラム。

(16) 白血球除去療法に用いられることを特徴とする(14)または(15)に記載の血液処理カラム。

(17) 生物との体外循環終了時から $150\sim 180$ 時間経過後に、体外循環前に比べ、リンパ球数の増加と顆粒球数の減少を示す前記(14)～(16)のいずれかに記載の血液処理カラム。

[0014] 本発明は、上記第2の目的を達成するために、下記の構成を有する。

(1) 親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体を含む吸着材であって、潜在型トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベータ吸着能、および白血球吸着能を有する癌治療用吸着材。

(2) 前記親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体が、膜、繊維または粒状物であることを特徴とする前記(1)に記載の癌治療用吸着材。

(3) 前記(1)または(2)に記載の癌治療用吸着材を用いた癌治療用体外循環カラム。

[0015] 本発明は、上記第3の目的を達成するために、下記の構成を有する。

(1) 少なくともネットと不織布の2層構造を持つことを特徴とする吸着担体。

(2) 前記ネットが、 100mm^2 中に 10mm^2 以上の空隙を有するネットであることを特徴とする(1)に記載の吸着担体。

(3) 生理活性物質および/または細胞を吸着することを特徴とする(1)に記載の吸着担体。

(4) 前記ネットが単繊維からなることを特徴とする(1)ないし(3)のいずれかに記載の吸着担体。

(5) 嵩密度が $0.02\text{g}/\text{cm}^3$ 以上であることを特徴とする(1)ないし(4)のいずれかに記載の吸着担体。

(6) (1)ないし(5)のいずれかに記載の吸着担体が円筒状容器に納められていることを特徴とする血液処理カラム。

(7) 血液を循環して使用することを特徴とする(6)に記載の血液処理カラム。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、過剰に増殖した顆粒球や単球などの人体に不要な白血球やこれら細胞に対し情報伝達するサイトカインを同時に除去することにより、潰瘍性大腸炎、クローン病、自己免疫疾患などの際の血液処理や治療に有用な吸着材及び血液処理用カラムが提供される。

[0017] また、本発明によれば、過剰に増殖した顆粒球や単球などの人体に不要な白血球や、これら細胞に対し情報伝達するサイトカインを同時に除去し、かつ、白血球を活

性化するLPSを同時に除去することにより、潰瘍性大腸炎、クローン病、自己免疫疾患などの血液処理や治療に有用な吸着材および血液処理用カラムが提供される。

[0018] また、本発明により、体液中から、直接、TGF- β や免疫抑制酸性蛋白などの免疫抑制物質を高い効率で選択的に吸着し、同時に、体液中の白血球を除去することできる癌治療用吸着材及びこれを用いる癌治療用体外循環カラムが提供される。したがって、本発明によれば進行癌の治療または患者の延命およびQOLの向上が可能である。

[0019] さらに、本発明によれば、血液循環時の圧力損失が少なく、形状安定性に優れ、各種血液処理カラムに好適に使用することができる吸着担体(吸着体)が提供される。特に、過剰に存在する人体に不要な白血球やガン細胞などと、サイトカインなどの生理活性物質を同時に除去するのに好適であり、自己免疫疾患、がん、アレルギーなどの血液処理や治療に有用である。またこの材料は、シャーレ、瓶、膜、繊維、中空糸、粒状物またはこれらを用いた組み立て品などの成形品の形で、アフィニティークロマトグラフ用カラム、治療用血液カラム、特に体外循環カラムとして好適に使用することができる。

発明を実施するための最良の形態

[0020] 続いて、本発明についてさらに詳細に説明する。

[0021] 吸着材の基本的な構成としては、水不溶性担体に官能基を固定化したもの、もしくは官能基を固定化した水不溶性担体を基材にコーティング等したものが好ましい。

[0022] 本発明で用いる水不溶性担体としては、水に不溶で、官能基を固定化できるものであれば良く、特に制限されない。生体適合性の観点からは、ポリプロピレンやポリエチレンなどのオレフィン系樹脂が好ましく、ポリアミドやポリエチレンテレフタレートで代表されるポリエステルが好ましい。

[0023] 本発明の吸着材においては、細胞表面にある糖タンパク質上のシアル酸や、リン酸を認知したり、サイトカインなどに結合した糖鎖上のシアル酸やリン酸などを認識する上で、ゼータ電位が高い方が好ましい。通常のポリプロピレンやポリエチレン、ポリエチレンテレフタレートなどの高分子材料は、ゼータ電位としてはマイナスの値を持ち、概ね-30mV程度である。そこで本発明者らは、水不溶性担体に特定の官能基、た

たとえば4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基を固定化することで、ゼータ電位を -20mV 以上に設定したところ、これらの吸着特性が良好であることを見出し、本発明に到達した。さらに、ゼータ電位は -15mV 以上であるとリポ多糖(LPS)に対する吸着特性がいっそう優れるので好ましく、 -10mV 以上になるとより効果が高く、 -2mV 以上がさらに好ましい。

[0024] 本発明では、顆粒球、単球およびサイトカインへの吸着能を有すると同時に、LPSの吸着能をも有することが好ましい。LPSとは、後述するように一般にグラム陰性菌の持つ毒素である。LPSは白血球上のTLR-4などのレセプタータンパク質へ結合し、該タンパク質を活性化することが分かっている。顆粒球、単球およびサイトカインを除去することで、これらに起因する異常状態を軽減できるが、例えば、炎症性部位、潰瘍部位などで進入した菌から発生したLPSが残存すると、患者の状態がせつかく正常状態に近い状態へ移行したにもかかわらず、再度異常状態に陥るおそれがある。本発明の吸着材に、白血球やサイトカインの吸着能と同時にLPSをも除去するための好ましい機構を付与することで、潰瘍性大腸炎、クローン病、自己免疫疾患などの際の効率良い血液処理や治療に有用である。また、かかる多機能的吸着材を用いることで、治療用カラムのコンパクト化を図ることが可能である。

[0025] なお、本発明においてゼータ電位とは、吸着材表面のゼータ電位をいう。表面ゼータ電位は、流動電位測定装置によって、流動電位と液体を流すために加えた圧力及び、液体の比導電率を測定することによって計算より求めることができる。本発明の吸着材は、ゼータ電位が -20mV 以上のものであることが好ましく、 -15mV 以上がより好ましく、 -2mV 以上が特に好ましい。上限については、赤血球の溶血等を防止する観点から 10mV 以下とすることが好ましい。

[0026] 本発明において、水不溶性担体の形状は特に限定されないが、加工性や、血液処理カラムとした時の圧力損失等の点から、繊維、膜、中空糸又はビーズの形状であることが好ましい。もちろん、これらの組み合わせでもかまわない。

[0027] また、本発明における吸着材は、血液中の顆粒球、単球およびサイトカインを吸着する能力を有し、特に、血液からの顆粒球の吸着率が50%以上であり、かつ単球の吸着率が50%以上であることが好ましい。ここで、本発明における吸着率とは、血球

を例に取る場合、吸着材を充填したカラムに血液を1回通過させたときの通過前後の血球量を血球分析装置により測定して、以下の式より求められるものである。カラムの大きさ、形状、血液の通過速度等の条件は、実施例に準じて適宜定めることができる。

$$\text{吸着率(\%)} = [(\text{カラム通過前の血液中の血球量}) - (\text{カラム通過後の血液中の血球量})] / (\text{カラム通過前の血液中の血球量}) \times 100$$

[0028] 尚、本発明の吸着材は、血球を吸着する作用を有するものであるが、更に濾過作用を有するものであっても良い。この場合の上記吸着率の算出対象は、吸着により血液中から除去される血球だけでなく濾過により除去される血球も含まれることになる。

[0029] 顆粒球、単球等の細胞を吸着除去させるためには、本発明の吸着材を水不溶性担体として用いることが好ましく、中でも、繊維、中空糸の繊維径、あるいはビーズ粒子の表面の突起の径(大きさ)等(以下、繊維径等)が $3\mu\text{m}$ を超えることが好ましい。特に、これより径が小さくなると、リンパ球の吸着除去が多くなるため、メモリーセルの除去に繋がりあまり好ましくない。ただし、繊維の径については、リンパ球の吸着除去率を抑制するためには、より好ましい範囲は $4\mu\text{m}$ 以上であり、更に好ましい範囲は $4.5\mu\text{m}$ 以上である。さらに、リンパ球の除去率をより抑え、かつ顆粒球や単球の除去率低下につながらないようにする観点からは、繊維の径を $5\mu\text{m}$ 以上とすることがより好ましいこともある。しかしながら、繊維の径が $8\mu\text{m}$ を超える場合は、顆粒球、単球の除去率が低下傾向を示し、繊維の径が $10\mu\text{m}$ 以上になると顆粒球や単球の除去率が低下してしまうため、好ましくない。実用上の観点からは繊維の径が $20\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

[0030] 一方、上記繊維(繊維Aとする。)に対し、主に血球の除去以外の目的、すなわち、吸着材の強度を一定以上に保つ目的から、より太径の繊維を繊維構造体などとして混合することがある(繊維Bとする。)。かかる繊維Bの径はこの限りではなく、繊維Bの繊維の径としては、 $10\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$ が好ましい。 $10\mu\text{m}$ を下回る場合は、繊維Bの混合の主目的である強度維持の効果を期待できないことがある。 $50\mu\text{m}$ を上回る場合には、繊維Aとの混合が困難となる。

[0031] リンパ球の除去率(本発明の吸着材を利用しての吸着率)は、メモリーセルの低下

につながりにくい理由から40%以下が好ましく、さらに安全性の観点で好ましくは30%以下である。

[0032] 本発明の吸着材としては、上記水不溶性担体に、官能基として4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基を固定化したものが好ましい。4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基を水不溶性担体に固定化するための反応性官能基としては、ハロメチル基、ハロアセチル基、ハロアセトアミドメチル基、ハロゲン化アルキル基などの活性ハロゲン基、エポキシド基、カルボキシル基、イソシアン酸基、チオイソシアン酸基、酸無水物基などをあげることができるが、とりわけ、活性ハロゲン基、中でも、ハロアセチル基は、製造が容易な上に、反応性が適度に高く、4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基の固定化反応が温和な条件で遂行できると共に、この際生じる共有結合が化学的に安定なので好ましい。

[0033] 固定化される官能基としては4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基が好適であり、これらはアンモニア、第1～3級アミノ基がポリマに化学的に結合した状態のものを意味する。さらに、1～3級アミノ基としては、炭素数で言うと、窒素原子1個当たり炭素数18以下であるものが反応率向上のために好ましい。さらに、1～3級アミノ基の中でも、窒素原子1個当たり炭素数3以上18以下、とりわけ、4以上14以下のアルキル基を持つ第3級アミノ基を結合して形成された第4級アンモニウム基を固定化したものが、サイトカイン吸着性の観点で優れている。そのような第3級アミノ基の具体例としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、N、N-ジメチルヘキシルアミン、N、N-ジメチルオクチルアミン、N、N-ジメチルラウリルアミン、N-メチル-N-エチル-ヘキシルアミンなどがあげられる。また、直鎖状アミノ基を有する化合物の例としては、テトラエチレンペンタミン等が挙げられる。

[0034] 本発明における4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基の結合の密度は、水不溶性担体の化学構造および用途により異なるが、少なすぎるとその機能が発現しない傾向にあり、一方、多すぎると、固定化後の担体の物理的強度が悪くなり、吸着材としての機能も下がる傾向にあるので、該密度は水不溶性担体の繰り返し単位あたり0.01～2.0モル、より好ましくは0.1～1.0モルが良い。尚、4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基を固定化させる(4級化)方法としては、ヨウ化カ

リウムを触媒とする反応がよく用いられるが、これに縛られずに公知の方法によることが可能である。

[0035] 本発明の吸着材が吸着するサイトカインは、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-10 (IL-10)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベータ (TGF- β)、血管新生増殖因子 (VEGF) および免疫抑制酸性蛋白 (IAP) からなる群から選ばれる少なくとも1種のサイトカインである。これらは、すべて白血球除去療法の適用対象とすることが考えられている、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性関節リウマチなどの免疫疾患において、その病態への関与が指摘されているサイトカイン等である。

[0036] これら吸着すべきサイトカインの種類によって、固定化する4級アンモニウム塩および/または直鎖状アミノ基を適宜選択すればよい。たとえば、インターロイキン-1 (IL-1)、インターロイキン-6 (IL-6)、トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベータ (TGF- β)、血管新生増殖因子 (VEGF)、免疫抑制酸性蛋白 (IAP) などは、N、N-ジメチルヘキシルアミン、N、N-ジメチルオクチルアミン、N、N-ジメチルラウリルアミンなどを固定化すると吸着性を付与することができる。また、インターロイキン-8 (IL-8)、インターロイキン-10 (IL-10)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α) などは、アミン成分としてテトラエチレンペンタミンを固定化することで吸着性を付与できる。また、複数の種類の官能基を組み合わせることもでき、例えば、4級アンモニウム塩および直鎖状アミノ基の両方を用いることも可能である。複数の種類の官能基を組み合わせるにより、吸着されるサイトカインの種類に幅をもたせることができるため好ましいほか、所望のサイトカイン吸着特性を高めるなどの利点もある。

[0037] 本発明において、これらサイトカインの吸着除去性の評価は、すべて天然型のタンパク質を用い、EIA法(酵素免疫測定法)にて測定したものに基づくものである(条件は、37°Cで2時間振とうし、バッチ吸着させる。)。例えば、IL-6については、実施例に示すバッチ吸着法で測定した吸着率が50%以上であることが好ましい。更には、残存細胞への影響を低減するためには60%以上の吸着率があることが好ましい。例

えば、IL-1については、実施例に示すバッチ吸着法で測定した吸着率が40%以上であることが好ましい。更には、残存細胞への影響を低減するためには50%以上の吸着率があることが好ましい。

- [0038] 前述の通り、吸着材の形状としては特に限定はないが、カラムとして用いる場合には、ビーズ、繊維、中空糸、さらには繊維を編織した編地、織物や不織布等の繊維構造物が好ましい。水不溶性担体がそのみで形態保持できれば単独での使用も可能であるし、形態保持性が低ければ適当な基材にコーティングなどの方法で固定したり、他の吸着材と混合して一つのカラムとして用いることもできる。固定化あるいは混合などの操作は、上記形状に加工する前に行っても良い。
- [0039] 本発明の吸着材においては、形状は特に不織布とすることが好ましい。その場合、不織布の嵩密度は、大きすぎると目づまりしやすく、逆に小さすぎると形態保持性が悪くなるので、 $0.02\text{g}/\text{cm}^3$ 以上が好ましく、中でも $0.02\text{g}/\text{cm}^3$ 以上であることが好ましく、 $0.05\text{g}/\text{cm}^3$ 以上であることがより好ましい。また、上限としては、好ましくは $0.15\text{g}/\text{cm}^3$ 以下であるものが使用される。
- [0040] 本発明において用いられる不織布は、単独繊維から作られるものであってもよいが、特に好ましくは海島型複合繊維から作られる。すなわち、かかる複合繊維を用いて公知の方法によって不織布にしてから、この不織布を、形態保持性を良くするため、および嵩密度を調整するために、ニードルパンチした後、海成分を溶解することによって、容易に製造することができる。
- [0041] 更に、不織布の形態を取る場合には、後述するようなネットとの二層構造とすることができ、特に、ネットを不織布で包み込んだような構造としても良い。このような構造を取ることで、円筒形に巻く等してカラムを形成したときに形態保持性を高めることができる。
- [0042] 水不溶性担体として好ましい素材は、疎水性繊維、すなわち、ポリエチレン、ポリプロピレンなどのポリオレフィンや、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレートなどのポリエステル、テフロンをはじめとするフッ素化ポリマである。このほかにも表面修飾により各種アルキル基を付加して疎水性部位を設けたものを用いることができる。単独で使用可能な4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基を固定

化するポリマとして好適なもの具体例としては、ポリ(p-フェニレンエーテルスルホン)： $-\{(p-C_6H_4)-SO_2-(p-C_6H_4)-O-\}_n$ やユーデル・ポリスルホン： $-\{(p-C_6H_4)-SO_2-(p-C_6H_4)-O-(p-C_6H_4)-C(CH_3)_2-(p-C_6H_4)-O-\}_n$ のほか、 $-\{(p-C_6H_4)-SO_2-(p-C_6H_4)-O-(p-C_6H_4)-O-\}_n$ 、 $-\{(p-C_6H_4)-SO_2-(p-C_6H_4)-SO_2-(p-C_6H_4)-O-\}_n$ 、 $-\{(p-C_6H_4)-SO_2-(p-C_6H_4)-O-(p-C_6H_4)-C(CF_3)_2-(p-C_6H_4)-O-\}_n$ などで代表されるポリスルホン系重合体、ポリエーテルイミド、ポリイミド、ポリアミド、ポリエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリスチレン、アクリルポリマなどで、かつ、アミノ基を共有結合で固定化できる反応性官能基を持つものが使用される。そのなかでも、ポリスルホン系重合体は安定性が高く、また形状保持性が良いので好ましく用いられる。

[0043] 具体的な例としては、前述した反応性官能基を結合させたクロルアセトアミドメチル化ポリスチレン、クロルアセトアミドメチル化したユーデル・ポリスルホン、クロルアセトアミドメチル化したポリエーテルイミドなどが使用される。さらに、これらのポリマは有機溶媒に対し可溶であるものが、成型のしやすさの上から、特に好ましく使用される。

[0044] 本発明の吸着材は、かかる4級アンモニウム塩および/または直鎖状アミノ基を有するポリマ自体、すなわち水不溶性担体自体を繊維、中空糸及びビーズに成形して製造する他、繊維、中空糸及びビーズ、特に生産性の面から好ましくは不織布等の基材に4級アンモニウム塩および/または直鎖状アミノ基を有するポリマをコーティングして製造することもできる。その際に、該ポリマを溶媒、たとえば塩化メチレン、テトラヒドロフラン、N, N-ジメチルホルムアミドなどに溶かし、この溶液に該不織布を浸したのち、該溶媒を蒸発させることにより容易に製造される。

[0045] また、4級アンモニウム塩および/または直鎖状アミノ基を水不溶性担体に固定化する際の反応溶媒としては、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどが好ましく用いられる。

[0046] また、本発明の吸着材および血液処理カラムは、その安全面を考慮して、血液処理した際に血液凝固因子XIII(凝固第XIII因子)の活性が低下しないことが好ましい。特に潰瘍性大腸炎やクローン病患者では血液凝固因子XIIIが低下傾向にあり、本

因子が欠乏することで出血傾向に陥る危険がある。血液凝固因子XIIIの吸着率が30%以下であれば安全に使用できるが、20%以下であることがさらに好適である。かかる吸着率は、実際に処理される血液量(本発明では、血液とは、全血、血漿、血清、腹水、胸水を指す)に対し、用いられる担体量の比を計算し、クエン酸採血した健康者ボランティア血液から調製した血漿を用いて1時間、37°Cでの振盪前後での血液凝固因子XIII活性から求めることができる。血液凝固因子XIII活性は、合成基質法などにより測定することができるが、専門業者に測定を委託することも可能である。

[0047] 本発明の吸着材および血液処理カラムは、1vol%牛胎仔血清(FCS)溶解生理食塩水中で90%以上のリポ多糖(LPS)吸着能を有するものであっても良い。このようにリポ多糖吸着能を持たせることにより、例えば外科手術後に患者血液中に混入したり、炎症性部位・潰瘍性部位などから混入したエンドトキシンによる過剰なサイトカイン生産を予防できるだけでなく、エンドトキシン自体を効率よく吸着でき、エンドキシンの生物活性に由来する発熱、ショック、血管内凝固、リンパ球活性化などに対する予防、治療効果を得ることができる。そのため、エンドキシンの生物活性に由来する発熱、ショック、血液内凝固、リンパ球活性化などに対する予防、治療効果を得ることができ、特に免疫賦活療法において有用な吸着剤となる。更に、顆粒球、単球、サイトカイン吸着能だけでなくリポ多糖吸着能をも兼備させることにより、一つの吸着剤による同時処理が可能となる点でも好ましい。

[0048] リポ多糖とは、リポDの構造を含む分子を意味し、血中に存在するLPSの代表的なものとしては、グラム陰性菌の持つ毒素を挙げるができる。

[0049] エンドトキシンは、血液中に過剰に存在すると、白血球からの癌壊死因子、インターロイキン1、インターロイキン6、インターフェロンなどの種々のサイトカインや酸過酸化物の過剰な放出を引き起こすことが知られている。本発明の吸着材及び血液処理カラムが更に、本発明の吸着材にLPSの吸着能を付与することにより、リンパ球、特にTh1タイプのリンパ球が活性化されることに起因すると推測される、インターフェロンガンマの産生向上効果を得ることもでき、免疫賦活療法において有用である。このようなリンパ球の活性化の詳細なメカニズムは不明ではあるが、吸着されたLPSに処理血液中の血球が接触することに起因するものと推測される。

[0050] LPSの吸着量は和光純薬製のトキシノメーターで測定することができる。1vol%FC S添加生理食塩水中に規定量のLPSを混合し、4時間37°C水浴中でインキュベーションを行った上清中に残存したLPS量を測定し、同様にトキシノメーターにて測定した添加液中のLPSとの差および比から除去量および除去率を求めることができる。除去量は100pg/mg以上が望ましく、更に好ましくは200pg/mg以上である。本発明の体液中の顆粒球および/または単球と、サイトカインとを同時に吸着し、1%FC S溶解生理食塩水中でLPS吸着能を有する能力は、それぞれ別々の吸着材を組み合わせるによっても実現は可能である。この場合、各吸着材を1つにまとめてカラムに充填した形態でも良いし、それぞれを別々のカラムに充填してカセットタイプの形態としても良い。ただし、カセットタイプの場合には、コンパクト性が犠牲になりやすく、一つにまとめた態様の方が便利である。尚、これに限定して考える必要性はなく、必要に応じた形態を適宜選択することが可能である。

[0051] 本発明の血液処理用カラムは、本発明の吸着材をカラム容器に充填することによって製造することができる。カラム容器としては、公知の血液処理用カラムの容器を用いることができる。カラムの構成としては、吸着材を平板状に形成し、これを重ねて充填したカラム、吸着材が円筒形状に巻かれてなる円筒状フィルターが、両端部に血液入口と血液出口とを有する円筒容器に納められているカラム、吸着材が円筒状にまかれてなる中空円筒状フィルターが、その両端部を封止された状態で血液入口と血液出口とを有する円筒状容器に納められており、容器の血液出口は前記中空円筒状フィルターの外周部に通じる部位に、また容器の血液出口は前記中空円筒状フィルターの内周部に通じる部位にそれぞれ設けられているカラムが好ましい。そのなかでも、円筒中空状フィルターを用いたカラムは、血液中の炎症性白血球の大部分が、円筒形状フィルターの外周部の大きな面積の不織布で迅速に除去され、除去されずに残ったわずかな炎症性白血球も、円筒形状フィルターの内周部に到って、その小さな面積の不織布でも十分に除去され、効率的な炎症性白血球除去が可能であるので、最も好ましい。特に本発明の吸着材の形態を不織布とする場合には、癌治療用体外循環カラム調製にあたり、後述するようなネットとの2層構造、好ましくは、ネットを不織布で包み込んだような構造とした状態で円筒状に巻く等することにより形

態保持性を高めることができる。

- [0052] 本発明の血液処理用カラムは、白血球除去療法や免疫賦活療法に用いることができる。また、後述するように本発明の血液処理用カラムを用いて生体との体外循環を行うと、体外循環終了時から150～180時間経過後に、体外循環前に比べ血中の白血球、特に顆粒球数が減少し、リンパ球数が増加する。このことは、本発明の血液処理用カラムが免疫状態を矯正する機能を有することを示唆する。特に、進行癌患者では顆粒球の増加と、リンパ球の減少がみられ、免疫状態は抑制されていることが知られているが、本カラムを用いることで、その状態は正常な状態へと矯正される。この効果は体外循環後長時間続くものではなく、おおむね1週間を過ぎると再び顆粒球増加、リンパ球減少傾向が現れるため、1週間に1回程度の処置が望まれる。
- [0053] 一方、本発明の吸着材は、癌治療に用いることができ、本発明はこのような癌治療用吸着材をも提供するものである。続いて、本発明の癌治療用吸着材についてさらに詳細に説明する。
- [0054] 本発明でいう、免疫機能抑制蛋白質とは哺乳動物の免疫機能を抑制する蛋白質であって血液中に存在するものをいい、例えばTGF- β 、免疫抑制酸性蛋白、インターロイキン-10、TNF- α などを指す。
- [0055] 本発明の吸着材を癌治療用吸着材として用いる場合には、免疫抑制性蛋白質(免疫機能抑制蛋白質)を吸着するものであれば良く、吸着能力が大きいほど体外に出す血液量が少なくて済むので好ましい。癌治療用吸着材及び後述の癌治療用体外循環カラムの吸着能力の目安として、血中のTGF- β である潜在型トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベータ(以下、潜在型TGF- β)が基準物質になる。癌治療用体外循環カラムの吸着能力が潜在型TGF- β として、担癌哺乳動物の体重1キログラム当たり100ng以上であることが望ましく、さらに進行癌では血中濃度が高くなっているので250ng以上であることが望ましい。吸着材1グラム当たりの潜在型TGF- β 平衡吸着量にカラム充填量グラム数を掛けたものがカラムの吸着能力となる。
- [0056] 本発明における潜在型TGF- β 平衡吸着量とは、担癌ラットの血清1mLに癌治療用吸着材30mgを入れ、37°Cで4時間振とうし、上清中のTGF- β 濃度を測定して、吸着前後の濃度差を癌治療用吸着材重量(0.03g)で除することにより求めた値

である。上清中のTGF- β 濃度は、検体血清を酸で前処理して、潜在型TGF- β を遊離型のTGF- β とした後、抗TGF- β 抗体を用いる酵素免疫分析法によって求めることができる。例えば、潜在型TGF- β の場合には、実施例に記したバッチ吸着法の条件で40%以上であることが好ましい。更に、免疫抑制効果への影響を低減するために50%以上の吸着率があることが好ましい。TGF- β 濃度の測定に際しては、市販の分析キットが利用できる。TGF- β としては、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 1. 2、TGF- β 4、TGF- β 5など、配列の違いでスーパーファミリーがあることが知られている。特にこれらのアミノ酸配列の相同性は高く、吸着材に吸着するときの性質は似通っている。TGF- β の性質は基本的にTGF- β 1の性質で代表され、その定量のためには特にTGF- β 1の測定キットが汎用されている。

- [0057] 本発明における担癌哺乳動物とは、ヒト、猿、牛、馬、犬、猫、豚、羊などの陸生哺乳動物で、腫瘍が出来たものを意味する。
- [0058] このような本発明の癌治療用吸着材は、癌治療用体外循環カラムとして利用することができる。本発明の癌治療用体外循環カラムに詰める免疫抑制性蛋白質を吸着する癌治療用吸着材の量が少ないほど、体外に出す血液量が少なくて済むので、好ましいが、少なすぎると吸着能力が下がり効果が無くなるし、多すぎると生体への負担が大きくなる。一般に、安全上、体外循環時に体外の回路に回す血液の適正な量は、輸血のための採血が許される200mL以下なら良いとされている。体重60kgのヒトの全血液量は約4. 6Lであるので、体外に出す血液量が全血液量の4%以下なら許容されるということになる。一方、吸着材をカラムに充填した場合、血液を通すためには空隙率が15%以上必要である。これらの条件から、カラムに詰める免疫抑制性蛋白質を吸着する材料の量は担癌哺乳動物の体重1キログラム当たり0. 05グラム以上、3. 5グラム以下が好ましい。
- [0059] 本発明の癌治療用吸着材および癌治療用体外循環カラムは、血中で増加した顆粒球や単球等の白血球の吸着除去を同時に行うことができる。顆粒球や単球については高い除去性能を持つことが望ましく、インビトロでの除去評価で35%以上が好ましく、50%以上の除去率を持つことがさらに好ましい。特に、顆粒球及び単球の各吸着率が両方とも50%以上であることが好ましい。これら顆粒球や単球を吸着除去さ

せるために、癌治療用吸着材の形態を適宜選択することが好ましい。具体的には癌治療用吸着材の形態を、繊維(複合糸、紡績糸等も含む。また、短繊維でも長繊維でもよい。)、膜、中空糸またはビーズとすることが好ましい。繊維は適宜、繊維構造物(織物、編物、不織布、綿状等)にして使用することができる。中でも不織布の形態を取る場合には、後述するようなネットとの二層構造とすることができ、特に、ネットを不織布で包み込んだような構造を取ることができる。このような構造を取ることにより、円筒形に巻く等してカラムを形成したときに形態保持性を高めることができる。

[0060] 特に、顆粒球や単球の吸着除去能向上のためには、繊維、中空糸の繊維径またはビーズ粒子の表面の突起の径(大きさ)等(繊維径等)が $3\mu\text{m}$ を超えることが好ましい。特にこれより径が小さくなると、リンパ球の吸着除去が多くなるため、メモリーセルの除去に繋がり好ましくない。ただし、繊維の径については、リンパ球の吸着除去率を抑制するためには、 $4\mu\text{m}$ 以上であることが好ましく、更に $4.5\mu\text{m}$ 以上とすることがより好ましい。さらに、リンパ球の除去率をより抑え、顆粒球や単球の除去率低下につながらないようにする観点からは、繊維の径を $5\mu\text{m}$ 以上とすることがより好ましいこともある。しかしながら、繊維の径が $8\mu\text{m}$ を超える場合は、顆粒球、単球の除去率が低下傾向を示し、繊維の径が $10\mu\text{m}$ 以上になると顆粒球や単球の除去率が低下してしまうため、好ましくない。そして $20\mu\text{m}$ 以上となるとさらに低下することから、実用上 $20\mu\text{m}$ 以下であることが好ましい。

[0061] ただし、血球の除去以外の目的で混合した繊維構造体などの径はこの限りではない。例えば、上記繊維(繊維Aとする。)に対し、主に血球の除去以外の目的、すなわち、吸着材の強度を一定以上に保つ目的から、より太径の繊維を繊維構造体などとして混合することがある(繊維Bとする。)が、かかる繊維Bの径はこの限りではなく、繊維Bの繊維の径としては、 $10\mu\text{m}\sim 50\mu\text{m}$ が好ましい。 $10\mu\text{m}$ を下回る場合は、繊維Bの混合の主目的である強度維持の効果を期待できないことがある。 $50\mu\text{m}$ を上回る場合には、繊維Aとの混合が困難となる。

[0062] リンパ球の除去率(本発明の吸着材を利用しての吸着率)は、メモリーセルの低下につながりにくい理由から40%以下とすることが好ましく、さらに安全性の観点で好ましくは30%以下である。特に進行癌や末期癌では、血中のリンパ球数が減少してい

るため、20%以下がさらに好ましい。

- [0063] 本発明の癌治療用体外循環カラムの調製は、本発明の癌治療用吸着材をカラム容器に充填することで達成される。その際の本発明の癌治療用吸着材の形態は、上記の通り、不織布、織物、編物、綿状、中空糸、ビーズ等の形態を採用することができる。容器の形状は特に限定されず、従来から体外循環カラムに使用されているものを採用することができるが、円筒状が一般的である。このような円筒状の容器を利用する場合には、特に本発明の癌治療用吸着材の形態を不織布として、後述するようなネットとの二層構造、好ましくは、ネットを不織布で包み込んだような構造とした状態で、円筒状に巻いたもの等を充填することにより形態保持性を高めることができる。
- [0064] 本発明の癌治療用吸着材は、親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体を含む。親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体の調製は、水不溶性担体と親水性アミンを溶媒中で反応させることにより達成される。
- [0065] 用いる水不溶性担体の具体例としてはポリスチレンで代表されるポリ(芳香族ビニル化合物)、ポリ(p-フェニレンエーテルスルホン)や $-\{(\text{p-C}_6\text{H}_4)-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{p-C}_6\text{H}_4)-\text{O}-(\text{p-C}_6\text{H}_4)-\text{SO}_2-(\text{p-C}_6\text{H}_4)-\text{O}-\}_n-$ (ユーデルポリスルホン)などで代表されるポリスルホン系重合体、ポリエーテルイミド、ポリイミド、ポリアミド、ポリエーテル、ポリフェニレンサルファイドなどで、かつ、親水性アミンを固定化するための反応性官能基を有するものがあげられる。親水性アミンを固定化するための反応性官能基としては、ハロメチル基、ハロアセチル基、ハロアセトアミドメチル基、ハロゲン化アルキル基などの活性ハロゲン基、エポキシイド基、カルボキシル基、イソシアン酸基、チオイソシアン酸基、酸無水物基などをあげることができる。水不溶性重合体のさらに具体的な例としては、クロルアセトアミドメチルポリスチレン、クロルアセトアミドメチル化したユーデル・ポリスルホン、クロルアセトアミドメチル化したポリエーテルイミドなどがあげられる。さらに、これらのポリマは有機溶媒に対し可溶であると、成型しやすい利点がある。
- [0066] 本発明でいう親水性アミン残基とは、単独で水に溶解もしくは水を溶解する親水性アミンがポリマに化学的に結合した状態のものを意味する。さらに、親水性アミン残基を形成する親水性アミンとしては、炭素数で言うと、窒素原子1個当たり炭素数18以

下であるものがこれに相当する。

- [0067] さらに、親水性アミンの中でも、窒素原子1個当たり炭素数3以上18以下、とりわけ、4以上14以下のアルキル基を持つ第3級アミンから得られる第4アンモニウム基を結合したものが優れている。そのような第3級アミンの具体例としては、トリメチルアミン、トリエチルアミン、N、N-ジメチルヘキシルアミン、N、N-ジメチルオクチルアミン、N、N-ジメチラウリルアミン、N-メチル-N-エチルヘキシルアミンなどがあげられる。さらに、親水性アミンを構成するアルキル基が親水性基である水酸基やエーテル基を含むもの、例えば、N、N-ジメチル-6-ヒドロキシヘキシルアミンやN、N-ジメチル-4-メキシブチルアミン等も親水性アミンとして好ましく用いうる。
- [0068] 本発明における親水性アミン残基の結合の密度は、水不溶性重合体の化学構造により異なるが、少なすぎるとその機能が発現しない傾向にあり、一方、多すぎると、固定化後の水不溶重合体の物理的強度が悪くなり、吸着材としての機能も下がる傾向にあるので、該密度は水不溶性重合体の繰り返し単位1モルあたり0.01~2.0モル、より好ましくは0.1~1.0モルが良い。
- [0069] 本発明の癌治療用吸着材の表面積は、吸着材1グラム当たり0.1平方メートル以上であることが好ましく、より好ましくは、0.3平方メートル以上である。ただし無限に大きくはできないので、實際上、限界があり、10平方メートル以下が好ましい。この表面積は水銀ポロシメトリー法で求めることができる。
- [0070] 本発明の癌治療用吸着材は、親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体を膜、繊維、粒状物等の形態に成型するか、あるいは親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体を、膜、繊維、粒状物等の形態を有する基材に被覆せしめるか、あるいは水不溶性重合体の膜、繊維、粒状物等の成型品に親水性アミン残基を結合させるか等により得ることができる。
- [0071] 親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体の成型品の製造には、水不溶性重合体の成型品に親水性アミンの溶液を接触させる不均一系反応の方法と水不溶性重合体の溶液と親水性アミンの溶液を混合して反応させた後、成型する均一系反応の方法とがある。不均一系反応の方法の一例としては、クロルアセトアミドメチル化ポリスルホンの繊維または中空糸などの成型品をジメチルヘキシルアミンやポリアルキ

レンイミン等のイソプロパノール溶液中に浸し、0～100℃の温度で反応させることにより、容易に達成される。均一系反応による方法の一例を述べると、クロルアセトアミドメチル化ポリスルホンの溶液中に対応したポリアミンを加えて、0～100℃の温度で反応させることにより、達成される。その量には特に制限はないが、可溶性のポリマを得るためにはハロアセトアミドメチル基に対し1倍モル以上用いるのが望ましい。とりわけ、ポリアミンの場合は、可溶性の重合体を得るためには親水性アミンを大過剰用いるのが好ましい。

[0072] また、反応溶媒としては、水、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド(DMF)などの極性の高い溶媒の方が反応が速く進む利点がある。不均一系反応では、親水性アミンが溶ける溶媒であれば良く、特に制限はない。均一系で反応させる場合には、水不溶性担体と親水性アミンの両方が溶解する溶媒、具体的にはテトラヒドロフラン、ジメチルスルホキシド、N, N-ジメチルホルムアミド、N, N-ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどが好ましく用いられる。また、成型品を表面処理する方法も可能で、そのためには水、メタノール、エタノールなどの、ポリスルホンを溶かさずに親水性アミンを溶かす溶媒が好ましく用いられる。

[0073] 本発明における親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体をポリエステル繊維、ナイロン繊維、ポリフェニレンサルファイド繊維などの成型品の表面にコーティングすると、簡単且つ安価に表面積の大きな高次の成型品が得られる利点がある。コーティングは、本発明における親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体を塩化メチレンやテトラヒドロフランなどの低沸点溶媒に溶かしたものにナイロンの編み地や織物を浸したのち、溶媒を揮発させることにより容易に達成できる。また、N, N-ジメチルホルムアミドなどの溶媒に溶かしたものを水などのポリマの貧溶媒に入れる湿式コーティング法も利用できる。コーティングされる成型品のポリマはポリアミド、ポリウレタン、ポリイミド、ポリスルホン、ポリ塩化ビニル、ポリエステルなど、本発明における親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体との接着性の良いものであれば何でも良く、その種類には特に制限はないが、ナイロン、ポリエーテルイミドなどのアミド系のポリマが接着性が特に良いので、好ましく用いられる。

- [0074] 上記の成型や基材への被覆において、成型品や基材の形態に採用する繊維として、中空糸を用いることも好ましい。この場合、濾過の機能を具備した吸着材が作れるので、人工透析器として、あるいは、血漿分離器として使用しながら免疫抑制物質および白血球を除去できる利点がある。
- [0075] 本発明の癌治療用体外循環カラムは担癌患者の癌の進行を抑制したり、癌患者のクオリティ・オブ・ライフ(以下、QOL)の向上を図る目的で、癌患者、特に進行癌患者の体外循環治療に用いられる。また、本発明の癌治療用吸着材は、癌切除手術時に出血した血液を返えず際に、免疫抑制性蛋白質を除去しておく目的にも用いることができる。
- [0076] 一方、本発明は上述のような吸着材のうち好ましい形態とされているものをはじめとする不織布をネットと組み合わせてなる吸着材(吸着担体)をも提供するものである。すなわち、本発明は、少なくともネットと不織布の2層構造を有する吸着材(吸着担体)をも提供するものであり、以下に詳細に説明する。
- [0077] 本発明は、前記課題、つまり血液中に過剰に存在する白血球やガン細胞などの細胞と、サイトカインなどの生理活性物質との両方を、同時に高い効率で選択的に吸着除去して、かつ、安全に体外循環できる吸着材について、鋭意検討し、従来技術の吸着材の問題が、大きすぎる嵩密度にあることと、単に嵩密度の小さい不織布を得たとしても、形態保持性を伴わなければ、結局は目づまり等を生じてしまうことに着目し、成し遂げたものである。すなわち、従来技術よりもより嵩密度を小さくし、かつ形状安定性を持たせることに成功した。
- [0078] 生理活性物質としては、上述のサイトカイン以外にも、走化因子、抗体、補体、リンフォカイン、その他液性因子など、生物由来の蛋白質や脂質、糖質、ホルモン類などを含み、特に、構造解析や、パターン解析などのため除去作業、治療目的等のターゲットとして選定された物質は対象となる。その他にも、生体にとって悪影響を及ぼす、細菌、細菌毒素、ウイルスなども生理活性物質として取り扱う。細胞については、主に、血球細胞、癌化細胞などであり、血液やリンパ液、腹水、胸水などの滲出液中に出てくる物を対象とする。研究における培養細胞、酵母、細菌類も対象となる。
- [0079] 本発明における不織布の素材としては、ポリアミド、ポリエステル、ポリアクリロニトリ

ル系ポリマ、ポリエチレン、ポリプロピレンなどの公知のポリマを使用することができる。これらのポリマの単独糸であっても、芯鞘型、海島型またはサイドバイサイド型の複合糸であってもかまわない。なお、繊維の断面形状は円形断面であっても、それ以外の異形断面であってもかまわない。不織布の製造方法としては、公知の不織布の製造方法、例えば湿式法、カーディング法、エアレイ法、スパンボンド法、メルトブロー法等を用いることができる。

[0080] また、かかる不織布を構成する繊維の直径は、目的とする吸着性能を考慮した上で決められるべきものである。たとえば、顆粒球の除去のためには $3\mu\text{m}$ を超えることが好ましく、中でも $4\mu\text{m}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $5\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ のものが使用される。これ以外に、これより太い繊維を同時に混合した不織布とすることもできる。一方、 $0.5\sim 4\mu\text{m}$ の繊維を用いればリンパ球の除去にも好適に使える。さらに、 $0.5\mu\text{m}$ 未満の繊維を用いれば、生理活性物質の除去効率を上げることが可能となる。

[0081] ここで示した直径は、円柱状のもののみ適用されるものではなく、たとえば楕円や矩形、多角形のものにも適用される。最外層を結んでできた図形の面積を求め、その面積に相当する円の直径を求める。たとえば、5つの突起部分が存在する星形を例にとると、その5つの頂点を結ぶ図形を考え、その面積を算出し、対応する円の直径を本発明で言う直径とする。

[0082] また、このような本発明の不織布として好ましい態様は、上述した顆粒球、単球およびサイトカインを吸着する吸着材、および癌治療用吸着材のうち、不織布の形態のものを挙げることができる。

[0083] 本発明において、上述の不織布は、ネットと組み合わせて積層構造を構成することができる。不織布とネットの2層構造でもよいが、不織布の間にネットを挟み込んだ形状、すなわち不織布-ネット-不織布のサンドイッチ構造(3層構造)をとることがより好ましい。もちろん、後述する嵩密度を考慮し、圧力損失に影響のない範囲でさらに多層構造とすることも可能である。

[0084] 本発明におけるネットの素材は、ポリアミド、ポリエステル、ポリアクリロニトリル系ポリマ、ポリエチレン、ポリプロピレンなどの公知のポリマを使用することができる。後述す

るように、不織布と一体化した後に官能基導入のための有機合成反応に供する場合は、用いる溶媒の種類や、反応温度に応じて適宜素材を選択すればよい。特に、生体適合性の面からは、ポリプロピレンが特に好ましい。

- [0085] 複数の繊維が合糸された状態や紡績糸でネット構造が形成されていると、合糸された糸状間等を血液などの被処理媒体が通過することより圧力損失上昇の懸念があるため、ネットは単糸(モノフィラメント)で形成されていることが好ましい。また単糸であれば、1本あたりの機械的な強力も保持しやすい。
- [0086] ネットの構成としては、特に限定されず、結節網、無結節網、ラッシュェル網等を用いることができる。このうち、特にネットを形成する構成材、例えば単糸が交差する部分が接合されているものが、好適に使用できる。このようなネットを用いることにより、単糸など構成材の動きが無く、接合されていないネットと比較して、形態保持性、ハンドリング性の向上した吸着担体を得ることができる。ネットは、構成する単糸どうしが接合していてもよい。接合の方法としては、結節、熱による接着等があるが、熱による接着による方法であると、厚みを制御しやすく、かつ安価に実施であるため好ましい。ネットの空隙(網み目)の形状も特に限定されず、長方形などの四角形、菱形、亀甲形等の各種のものを用いることができる。中でも四角形、特に長方形のものは、不織布を積層したときの強度や、ハンドリング性が向上するため好ましい。さらに、ネットの構成材の不織布に対する位置的な関係を、例えばネットの空隙形状が四角形の場合、不織布の長軸または短軸方向に対し角度90度±10度の方向をなすようにすることにより、不織布を積層したときの強度や、ハンドリング性能がより向上する。
- [0087] ネットを構成する単糸の直径は好ましくは50 μ m以上1mm以下であり、同様にネットの厚みは50 μ m以上1.2mm以下である。これ以上大きな範囲でも可能であるが、単位体積あたりの吸着体そのものの分量を減らすことになり、好ましくはない。
- [0088] ネットを用いることで、不織布に形態保持性を付与することができ、嵩密度が小さくても形態の安定した吸着担体とすることができる。なお、ネット自体が圧力損失に影響を与えるので、ネットはなるべく開孔部が大きい方が望ましい。このためには100m²中に、10mm²以上の空隙を有することが望ましく、特に好ましくは、3mm角程度の開孔部を有すると、形態保持性も良好となり、好適に使用できる。

- [0089] 吸着材の厚みについては限定するものではないが、0.1mm以上10cm以下が取り扱い上、好ましい。例えば、東レ社製の“トレミキシン”（登録商標）のようなラジアルフロータイプのモジュールに組み込む場合は、中心パイプに巻き付けるため、厚みは1cm以下であることが好ましい。これらは、取り扱い法によって決定される。
- [0090] 本発明におけるネットと不織布の2層構造を持つ吸着材の嵩密度は、0.02～0.15g/cm³であることが好ましく、より好ましくは0.05～0.15g/cm³であるものを使用される。嵩密度を大きくすると白血球や細胞などの大きな物質を濾過する能力が向上するが、大きすぎると血液循環時に目づまりしやすくなるため、前記の範囲が好ましい。0.15g/cm³を超えるものはあえて本発明の構成、すなわちネットと不織布の積層構造を取らず不織布だけでも形態安定性は保たれるが、もちろん本発明において0.15g/cm³を超える嵩密度を採用してもかまわない。嵩密度の測定は、例えば以下のようにして行うことができる。吸着体を3cm角の正方形に切断後、1mm厚のポリプロピレン製の板を載せたときの吸着体の厚みを5回測定し、その平均値を厚みとする。この小片の重さを、体積で割ることで嵩密度を求め、これを5サンプルで実施し、平均値を嵩密度とする。
- [0091] 前述の通り、本発明において不織布を用いる場合は、主に不織布部分によって白血球やガン細胞などを吸着及び濾過によって除去することができる。さらに、不織布部分の素材や繊維径を適宜選択することにより、これら白血球やガン細胞などと共にサイトカインなどの生理活性物質をも吸着・除去することが可能である。白血球やガン細胞などと共にサイトカインなどの生理活性物質をも効率よく吸着・除去するには、当該吸着担体に特定の官能基を導入、固定化することが好ましい。吸着担体、特に不織布部分を構成する素材を適宜選択することにより、特定の官能基を導入せずともサイトカインなどの生理活性物質の吸着・除去能を持たせることはできるが、これら官能基の導入によって生理活性物質をより効率的に吸着することができるようになる。
- [0092] 不織布を形成する繊維は、特に好ましくは芯がポリプロピレン、鞘がポリスチレンなどの多芯海島型複合繊維からつくられる。素材の組み合わせは、製糸性が良好であれば、いかなる組み合わせも実現できるが、特に鞘にポリスチレンを用いると鞘構造に官能基導入が行いやすくなるため、特に好ましい。この場合、アミドメチル化法を適

用することで、アミノ基を有する官能基を簡便に導入できる。従来から、環状ペプチド（ポリミキシンB、ポリミキシンS）、ポリエチレンイミン、4級アンモニウム塩などの導入が行われている。その具体例として、アミノ基を持つ環状ペプチド残基、ポリアルキレンイミン残基、ベンジルアミノ基、1級、2級、3級のアルキルアミノ基を使用することができる。そのなかでも、好ましくはアミノ基を持つ環状ペプチド残基、ポリアルキレンイミン残基、さらに好ましくはアミノ基を持つ環状ペプチド残基が、生理活性物質に対する吸着性能が高くてよい。

[0093] より具体的には、アミノ基を持つ環状ペプチドは、2個以上50個以下、より好ましくは4個以上16個以下のアミノ酸からなる環状ペプチドであって、その側鎖に1個以上のアミノ基を持つものであれば良く、特に制限はない。その具体例としては、ポリミキシンB、ポリミキシンE、コリスチン、グラミシジンSあるいはこれらのアルキルあるいはアシル誘導体などを使用することができる。

[0094] また、本発明で言うポリアルキレンイミン残基とは、ポリエチレンイミン、ポリヘキサメチレンイミンおよびポリ(エチレンイミン・デカメチレンイミン)共重合体で代表されるポリアルキレンイミンまたはその窒素原子の一部を、n-ヘキシルブロマイド、n-デカニルブロマイド、n-ステアシルブロマイドなどで代表されるハロゲン化炭化水素の単独または混合物でアルキル化したもの、または、酪酸、バレイン酸、ラウリル酸、ミリスチン酸、レノレイン酸、ステアシル酸などの脂肪酸でアシル化したものを意味する。

[0095] 本発明のネットと不織布の2層構造を持つ吸着材の製造方法としては、予め別々に作成した不織布とネットを、サーマルボンド法、カレンダー法、ニードルパンチ法等の公知のウェブ接着方法で積層構造とする方法がある。また、別の方法として、積層構造にするために、あらかじめ、プレパンチングを施した綿状物を作成し、その間にネットを挟み込んでパンチングして不織布-ネット-不織布のサンドイッチ層構造を有する吸着担体を作る方法があるが、この方法のほうがより簡便であり、好ましい。プレパンチングした綿状物を片面1枚ネット構造に重ね合わせることも可能である。

[0096] 本発明の体外循環用カラムは、前記ネットと不織布の2層構造を持つ吸着材(吸着担体)を容器、特に好ましくは円筒状容器に充填することによって製造することができる。カラムの構成としては、吸着担体を平板状に形成し、これを複数層も重ねて

充填したカラム、吸着担体を芯材に、もしくは芯材なしで円筒形状に巻いて構成した円筒状フィルターが、両端部に血液入口と血液出口とを有する円筒状容器に納められているカラム、吸着担体が円筒状にまかれてなる中空円筒状フィルターが、その両端部を封止された状態で血液入口と血液出口とを有する円筒状容器に納められており、容器の血液出口は前記中空円筒状フィルターの外周部に通じる部位に、また容器の血液出口は前記中空円筒状フィルターの内周部に通じる部位にそれぞれ設けられているカラム等が好ましい。そのなかでも、円筒中空状フィルターを用いたカラムは、血液中の炎症性白血球の大部分が、円筒形状フィルターの外周部の大きな面積の不織布で迅速に除去され、除去されずに残ったわずかな炎症性白血球も、円筒形状フィルターの内周部に到って、その小さな面積の不織布でも十分に除去され、効率的な炎症性白血球除去が可能であるので、最も好ましい。例えば、円筒形状中空フィルターを作製する場合、サンドイッチ構造にした不織布において、ネット単繊維の長手方向が不織布各切断面に対し垂直になるように不織布を作製することにより、簡単に不織布に強い引っ張り強度を持たせることができ、該不織布を芯材に巻く場合においても、ハンドリング性が向上する。

[0097] 以上説明した本発明の各種吸着材は、体外循環カラムなどの血液処理カラムとして利用することができる。体外循環カラムとして利用する場合、カラム容器に充填する吸着材の量、血液の循環速度にもよるが、通常は、1時間から2時間の生体との体外循環実施の後、開始時刻から150～180時間後に、体外循環前に比べ、リンパ球数の増加と顆粒球数の減少を実現させることができる。よって、本発明の吸着材及び血液処理用カラムは、白血球除去療法及び免疫賦活療法において有用である。

実施例

[0098] 以下、実験例により、本発明をさらに具体的に説明する。

[0099] 実施例1及び比較例1 (ゼータ電位の測定)

表面ゼータ電位は、流動電位測定装置(ZP-10B(島津製作所製))によって、流動電位と液体を流すために加えた圧力、及び液体の比導電率を測定することによって計算により求めた。流動液は、1mM KCl水溶液を使用し、pH6±1、温度20±5℃で測定した。

[0100] (サイトカイン吸着評価)

牛胎仔血清にヒト天然型IL-1、IL-6を添加し、それぞれ500pg/mlに調製した。この血清に吸着担体を添加し、37°C2時間で振とうし、上清を採取し、サンプルとした。担体:血清量=30mg:1mlの固液比で統一し、振とう前後のサイトカイン量を求め除去率を測定した。

[0101] [作製例1]

(不織布)

36島の海島複合繊維であって、島が更に芯鞘複合によりなるものを次の成分を用いて、紡糸速度800m/分、延伸倍率3倍の製糸条件で得た。

島の芯成分;ポリプロピレン

島の鞘成分;ポリスチレン90wt%、ポリプロピレン10wt%

海成分;エチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステル

複合比率(重量比);芯:鞘:海=44:44:12

[0102] この繊維85wt%と、直径20 μ mのポリプロピレン15wt%からなるシート状物を作製した後、ニードルパンチすることによって不織布を得た。次に、この不織布を90°C水酸化ナトリウム水溶液で処理して、海成分のエチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステルを溶解することによって、芯鞘繊維の直径が5 μ mで、嵩密度が0.05g/cm³(総目付250g/m²)の不織布を作製した(不織布1)。

[0103] (中間体)

次に、ニトロベンゼン600mLと硫酸390mLの混合液にパラホルムアルデヒド3gを20°Cで溶解した後、0°Cに冷却し、75.9gのN-メチロール- α -クロルアセトアミドを加えて、5°C以下で溶解した。これに5gの上記原糸1を浸し、室温で2時間静置した。その後、繊維を取り出し、大過剰の冷メタノール中に入れ、洗浄した。繊維をメタノールで良く洗った後、水洗し、乾燥して、7.0gの α -クロルアセトアミドメチル化ポリスチレン繊維(中間体A1)を得た。ゼータ電位は-21mVであった。

[0104] (吸着体(吸着材、吸着担体))

N, N-ジメチルオクチルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのDMFに溶かした溶液に5gの中間体A1を浸し、85°Cのバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、1mol/L濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、8.3gのジメチルオクチルアンモニウム化繊維(吸着体A1)を得た。ゼータ電位は-1mVであった。

[0105] また、N, N-ジメチルヘキシルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのDMFに溶かした溶液に5gの中間体A1を浸し、85°Cのバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、1mol/L濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、9.3gのジメチルラウリルアンモニウム化繊維(吸着体A2)を得た。ゼータ電位は1.2mVであった。

[0106] [実施例1]

健常者ボランティアの血液50mlをヘパリン採血し、その中へ、500pg/mlになるようにヒト天然型IL-1、IL-6を溶解し、以下の検討を行った。

[0107] 吸着材A1および吸着材A2をそれぞれ150mgを内容積2mlのカラムに充填し、37°Cで1時間、上記血液25mlを循環した後、血球の組成を自動血液分析器で調べ、また、IL-1、IL-6の量をEIA法にて定量した。循環前後の差から吸着率を算出した。吸着体A1ではリンパ球吸着率19.5%、顆粒球吸着率78%、単球吸着率85%であり、IL-1吸着率、IL-6吸着率、はそれぞれ37%、32%であった。同様に、健常者ボランティア血液を用い作成したクエン酸血漿で、凝固因子XIIIの活性低下を見たところ(株式会社SRLに合成基質法での測定を委託した。以下の凝固因子XIIIの測定においても同様である。)12%であった。吸着材A2では、リンパ球吸着率21%、顆粒球吸着率75%、単球吸着率83%であり、IL-1吸着率、IL-6吸着率はそれぞれ37%、40%であった。同様に、健常者ボランティア血液を用い作成したクエン酸血漿で、凝固因子XIIIの活性低下を見たところ16%であった。

[0108] 別途、サイトカイン吸着評価を行った結果、吸着材A1では吸着率はIL-1、IL-6で、それぞれ56%、88%、吸着材A2では吸着率はIL-1、IL-6でそれぞれ74%、93%であった。

[0109] [比較例1]

中間体A1を用いて、実施例1と同様の試験を行った(血液量は25ml)。リンパ球吸着率は19.5%、顆粒球吸着率は78%、単球吸着率は78%であり、IL-1吸着率、IL-6吸着率は、それぞれ2%、3%であった。同様に、健常者ボランティア血液を用い作成したクエン酸血漿で、凝固因子XIIIの活性低下を見たところ16%であった。別途、サイトカイン吸着評価を行った結果、吸着率はIL-1、IL-6で、それぞれ12%、13%であった。

[0110] 以上の実施例1及び比較例1の結果から明らかなように、ゼータ電位を-20mV以上の吸着材である本発明は、高い効率で血液中の顆粒球および単球を吸着でき、さらにはサイトカインをも同時に高い効率で吸着することができる。

[0111] 実施例2~7

顆粒球・単球の吸着率と繊維径の相関を取るために、ヒト健常者の血液(Ht=43%)を用いて、以下の手順で吸着試験を行った。

[0112] (顆粒球・単球の吸着率の測定と繊維径の相関)

繊維径がそれぞれ、2 μ m、3 μ m、4 μ m、6 μ m、10 μ m、17 μ mのポリエチレンテレフタレートからなる繊維を熔融紡糸して準備し、20mg/mlの固液比になるように健常者ヒト血液中に浸漬し(バッチ吸着試験)、37 $^{\circ}$ Cに保ち、毎分3回の転倒混和を5分間行った。この後繊維を取り除き、浸漬前の全血中、および浸漬後の全血中の顆粒球(好中球の値を代用した)、単球、リンパ球の数をそれぞれシスメックス社製血球計算機(XT1800iv)を用いて測定し、吸着率を測定した。各血球の吸着率(除去率)を表1に示す。

[0113] [表1]

表1 5min除去率平均

	繊維径 (μ m)	好中球 (Av)	リンパ球 (Av)	単球 (Av)
実施例2	2	17.53	2.03	26.20
実施例3	3	25.87	2.34	28.60
実施例4	4	33.03	2.57	44.01
実施例5	6	25.13	1.55	38.39
実施例6	10	32.52	4.48	53.05
実施例7	17	6.05	-0.45	12.76

[0114] (吸着率と繊維径の相関の考察)

顆粒球・単球の吸着率と繊維径の相関を取るために、ヒト健常者の血液(Ht=43%)を用いて、上述のようなバッチ吸着試験を行った。この検討では、カラムでの循環に対し、1/2程度の除去率として得られる。この結果、表1から明らかなように、検討を行ったこの範囲の繊維径ではリンパ球の吸着率は低率でかつあまり変動が無いこと、顆粒球(好中球)・単球の除去率をカラムにおいて50%以上の高率に保てる範囲が繊維径が約3 μ mを超える領域であることがわかった。

[0115] 実施例8~10及び比較例2~4

以下の実施例では、ゼータ電位とリポ多糖吸着能の関係、及びインターフェロンガンマの産生促進効果について調べた。

[0116] (ゼータ電位の測定)

表面ゼータ電位の測定は、上記実施例1と同様の条件で行った。

[0117] (サイトカイン吸着評価)

サイトカイン吸着評価は、牛胎仔血清にヒト天然型IL-1、IL-6を添加し、それぞれ500pg/mlに調製した。この血清に吸着担体を添加し、37°C2時間で振とうし、上清を採取し、サンプルとした。担体:血清量=30mg:1mlの固液比で統一し、振とう前後のサイトカイン量を求め除去率を測定した。定量はEIA法を用い、市販のキット(IL-1:R&D System社製ヒトIL-1 β ELISAキット、IL-6:鎌倉テクノサイエンス製)を用いて行った。

[0118] (インターフェロンガンマ産生評価)

ヒトボランティア血液10mlを用い吸着体を0.3g充填した内容積2mlのポリプロピレン製円筒型カラムに血流速2ml/minで通過させ、吸着体刺激血液を得た。カラム通過有無の血液をそれぞれフィコール密度勾配遠心法でリンパ球分画を分離した。吸着体接触前の血液と接触後8時間後のリンパ球濃縮液を、1~10 μ gのPHA(フィトヘマグルチニン-L:和光純薬製)で刺激し、刺激前後でのインターフェロンガンマの濃度を測った。定量はEIA法を用い市販のキット(ENDOGEN社製ヒトインターフェロンガンマELISAキット)を用いておこなった。(刺激後インターフェロンガンマ濃度/刺激前インターフェロンガンマ濃度)を求め、インターフェロンガンマ産生活性とし

た。

[0119] (血球数の測定)

体液中の血球数の定量、ヘマトクリット値の測定は、シスメックス社XT-1800iVを用いて行った。

[0120] (LPSの測定)

LPSの吸着量は和光純薬製のトキシノメーターで測定した。1vol%FCS添加生理食塩水中に10ng/mlとなるように和光純薬製LPS(カタログ番号:120-04531)を分散させ、300mgの吸着材と4時間、37°Cの条件で水浴中でインキュベーションを行った。上清中に残存したLPS量を測定し、同様にトキシノメーターにて測定した。添加液中のLPSとの差および比から除去量および除去率を求めた。規格値は除去率90%以上、吸着量は100pg/mg以上のLPS吸着能を有することである。

[0121] [作製例2]

(不織布)

36島の海島複合繊維であって、島が更に芯鞘複合によりなるものを次の成分を用いて、紡糸速度800m/分、延伸倍率3倍の製糸条件で得た。

島の芯成分;ポリプロピレン

島の鞘成分;ポリスチレン90wt%、ポリプロピレン10wt%

海成分;エチレンテレフタレート単位を主たる繰返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステル

複合比率;芯:鞘:海=44:44:12(重量比)

[0122] この繊維75wt%と、直径20 μ mのポリプロピレン25wt%からなるシート状物を作製した後、ニードルパンチすることによって不織布を得た。次に、この不織布を90°C水酸化ナトリウム水溶液で処理して海成分のエチレンテレフタレート単位を主たる繰返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステルを溶解することによって、芯鞘繊維の直径が4.5 μ mで、嵩密度が0.03g/cm³(総目付200g/m²)の不織布を作製した(不織布1)。

[0123] (中間体)

次に、ニトロベンゼン600mLと硫酸390mLの混合液にパラホルムアルデヒド3gを

20°Cで溶解した後、0°Cに冷却し、75.9gのN-メチロール- α -クロルアセトアミドを加えて、5°C以下で溶解した。これを20°Cに昇温後直ちに5gの上記原糸1を浸し、室温で2時間静置した。その後、繊維を取り出し、大過剰の冷メタノール中に入れ、洗浄した。繊維をメタノールで良く洗った後、水洗し、乾燥して、7.0gの α -クロルアセトアミドメチル化ポリスチレン繊維(中間体A2)を得た。ゼータ電位は-23mVであった。

[0124] (吸着体)

N, N-ジメチルオクチルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのメタノールに溶かした溶液に5gの中間体A2を浸し、50°Cのバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、1mol/L濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、8.1gのジメチルオクチルアンモニウム化繊維(吸着体A3)を得た。ゼータ電位は-0.3mVであった。

[0125] また、N, N-ジメチルヘキシルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのメタノールに溶かした溶液に5gの中間体A3を浸し、50°Cのバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、1mol/L濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、7.3gのジメチルヘキシルアンモニウム化繊維(吸着体A4)を得た。ゼータ電位は2.2mVであった。

[0126] [実施例8]

健常者ボランティアの血液50mlをヘパリン採血し、その中へ、500pg/mlになるようにヒト天然型IL-1、IL-6を溶解し、以下の検討を行った。

吸着材A3および吸着材A4をそれぞれ150mgを内容積2mlのカラムに充填し、37°Cで1時間上記血液25mlを循環した後、血球の組成を自動血液分析器(シスメックス社製XT-1800iV)で調べ、また、IL-1、IL-6量をEIA法にて定量した。吸着体A3では、リンパ球数14.5%減少、顆粒球72%減少、単球82%減少が見られ、IL-1、IL-6は、それぞれ33%、52%減少していた。吸着体A4では、リンパ球数21%減少、顆粒球75%減少、単球83%減少が見られ、IL-1、IL-6は、それぞれ37%、40%減少していた。

[0127] LPS除去率については、吸着体A3で98%、吸着体A4で97%であった。

別途、サイトカイン吸着評価を行った結果、吸着体A3の除去率はIL-1、IL-6のそれぞれで56%、88%、吸着体A4の除去率はIL-1、IL-6のそれぞれで74%、93%であった。

[0128] [実施例9]

(体外循環治療)

吸着体A3を0.3g、内径1cm、内容積2mLのポリプロピレン製円筒形カラムに充填して、体外循環カラムを調製した。12週令のWKAH:Hkmラット(雄)の背部皮下に4-ジメチルアミノアゾベンゼン誘発肝癌細胞KDH-8{矢野 諭、北海道医誌、68巻5号、654-664(1993)}を 1×10^6 個接種した。癌細胞は100%の確率で生着した。(通常、接種1週間後から腫瘍が大きくなり、接種後5.5週間で死亡する。)体外循環カラムは、体外循環前に1000単位のヘパリンナトリウムを含む生理食塩水で予備洗浄し、さらに500mLの生理食塩水で洗浄して用いた。

[0129] KDH細胞接種2週間後のラットに、体外循環治療を行った。大腿動脈から採血し、体外循環前の顆粒球およびリンパ球の数を自動血液分析器で確認したところ、顆粒球は9300個/ μ L、リンパ球は8100個/ μ Lであった。体外循環カラムを通した後、大腿静脈に返血する回路を作製し、2ml/minの血流で、1時間、体外循環した。体外循環中はヘパリンナトリウム注射液(味の素(株)製)を200U/hの速度で持続注入した。体外循環カラムは体外循環前に1000単位のヘパリンナトリウムを含む生理食塩水で予備洗浄し、さらに500mLの生理食塩水で洗浄して用いた。体外循環実施後、縫合等の処置を行い、160時間後に採血を行い、自動血液分析機により顆粒球およびリンパ球の数を測定したところ、顆粒球は6700個/ μ L、リンパ球は11400個/ μ Lであり、処置前に比べ、リンパ球は増大し、顆粒球は減少していた。このラットをさらに3週間飼育した後、KDH細胞接種2週間後と同じ手技で体外循環を行った。体外循環前の顆粒球およびリンパ球の数を自動血液分析器で確認したところ、顆粒球は28000個/ μ L、リンパ球は7400個/ μ Lであった。体外循環160時間後に採血を行い、自動血液分析機により顆粒球およびリンパ球の数を測定したところ、顆粒球は26700個/ μ L、リンパ球は8400個/ μ Lであり、処置前に比べ、リンパ球は増大し、顆粒球は減少していた。

[0130] [比較例2]

中間体A2を用いて、実施例8と同様の試験を行った(血液量は25ml)。その結果、リンパ球数19.5%減少、顆粒球78%減少、単球78%減少が見られ、IL-1、IL-6、はそれぞれ2%、3%減少していた。LPS除去率については、78%であった。別途、サイトカイン吸着評価を行った結果、除去率はIL-1、IL-6のそれぞれで12%、13%であった。

[0131] [比較例3]

中間体A2を0.3g、内径1cm、内容積2mLのポリプロピレン製円筒形カラムに充填して、実施例8と同じ手法でKDH細胞接種2週間後のラットに、体外循環を実施した。大腿動脈から採血し、体外循環前の顆粒球およびリンパ球の数を自動血液分析器で確認したところ、顆粒球は10300個/ μ L、リンパ球は8400個/ μ Lであった。縫合等の処置を行い、160時間後に採血を行い、自動血液分析機により顆粒球およびリンパ球の数を測定したところ、顆粒球は15200個/ μ L、リンパ球は8100個/ μ Lであり、処置前に比べ、リンパ球は減少し、顆粒球は増大していた。

[0132] [実施例10]

ヒト末梢血を用いて吸着体A4を用いてインターフェロンガンマ産生能の評価を行った。吸着体未処理の場合は、インターフェロンガンマ濃度比が20.4倍であった。これに対し処理時には35.2倍となり、免疫活性が向上していることがわかった。

[0133] [比較例4]

ヒト末梢血を用いて中間体A2を用いてインターフェロンガンマ産生能の評価を行った。吸着体未処理の場合は、インターフェロンガンマ濃度比が20.1倍であった。これに対し処理時には21.2倍となり、免疫活性状態は変化がないことがわかった。

[0134] 実施例11

[作製例3]

(不織布)

36島の海島複合繊維であって、島が更に芯鞘複合によりなるものを次の成分を用いて、紡糸速度800m/分、延伸倍率3倍の製糸条件で得た。

島の芯成分;ポリプロピレン

島の鞘成分;ポリスチレン90wt%、ポリプロピレン10wt%

海成分;エチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステル

複合比率;芯:鞘:海=44:44:12(重量比)

[0135] この繊維50wt%と、直径20 μm のポリプロピレン50wt%からなるシート状物を作製した後、ニードルパンチすることによって不織布を得た。次に、この不織布を90°C水酸化ナトリウム水溶液で処理して海成分のエチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステルの溶解することによって、芯鞘繊維の直径が4.5 μm で、嵩密度が0.03g/cm³(総目付200g/m²)の不織布を作製した(不織布A3)。

[0136] (中間体)

次に、ニトロベンゼン600mLと硫酸390mLの混合液にパラホルムアルデヒド3gを20°Cで溶解した後、0°Cに冷却し、75.9gのN-メチロール- α -クロルアセトアミドを加えて、5°C以下で溶解した。これを20°Cに昇温後直ちに5gの上記原糸1を浸し、室温で2時間静置した。その後、繊維を取り出し、大過剰の冷メタノール中に入れ、洗浄した。繊維をメタノールで良く洗った後、水洗し、乾燥して、6.3gの α -クロルアセトアミドメチル化ポリスチレン繊維(中間体A3)を得た。ゼータ電位は-26mVであった。

[0137] (吸着体)

N,N-ジメチルオクチルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのメタノールに溶かした溶液に5gの中間体A3を浸し、50°Cのバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、1mol/L濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、6.8gのジメチルオクチルアミン4級化繊維(吸着体A3)を得た。ゼータ電位は-12.3mVであった。

[0138] [実施例11]

健常者ボランティアの血液50mlをヘパリン採血し、その中へ、500pg/mlになるようにヒト天然型IL-1、IL-6を溶解し、以下の検討を行った。

前記作製例3で作製した吸着材A3および吸着材A4をそれぞれ150mgを内容積

2mlのカラムに充填し、37°Cで1時間上記血液25mlを循環した後、血球の組成を自動血液分析器(シスメックス社製XT-1800Vi)で調べ、また、IL-1、IL-6量をEIA法にて定量した。その結果、吸着体A3ではリンパ球数10.5%減少、顆粒球61%減少、単球67%減少が見られ、IL-1、IL-6、はそれぞれ24%、38%減少していた。

[0139] LPS除去率については、吸着体A3で90%であった。

別途、サイトカイン吸着評価を行った結果、吸着体A3の除去率はIL-1、IL-6のそれぞれで44%、61%であった。

[0140] 以上の実施例8~11及び比較例2~4の結果から、ゼータ電位が-20mV以上の吸着材である本発明は、高い効率で血液中の顆粒球および単球を吸着でき、さらに-15mV以上であればLPSの吸着やサイトカインをも同時に高い効率で吸着することができることが明らかとなった。体外循環治療後の顆粒球やリンパ球数の変動は、メカニズムはわからないものの、正常状態と考えられる比率へ変化することがわかった。

[0141] 実施例12~15及び比較例5~8

各実施例中の評価方法及び実施手順並びに条件は、以下に従った。

[0142] 1. 血液中の成分の分析

TGF- β 濃度はゼンザイム・テクネ社のヒトTGF- β 1免疫分析キットを使用して求めた。また免疫抑制酸性蛋白の濃度は、三光純薬社製のラットIAPプレートを使用して求めた。アルブミン濃度はアルブミン分析キットであるアルブミンB-テストワークーで求めた。

[0143] 2. 吸着材のTGF- β 平衡吸着能

5匹の担癌ラットの血清を集めて担癌ラット血清30mLを調製した。この血清1mLに吸着材50mgを入れ、37°Cで4時間振とうした。上清中のTGF- β 濃度を測定して、吸着前後の濃度差を吸着材重量(0.05g)で除した値をTGF- β 平衡吸着能とした。

[0144] 3. 吸着材の調製

(水不溶性重合体)

36島の海島複合繊維であって、島が更に芯鞘複合によりなるものを次の成分を用いて、紡糸速度800m/分、延伸倍率3倍の製糸条件で得た。

島の芯成分;ポリプロピレン

島の鞘成分;ポリスチレン90wt%、ポリプロピレン10wt%

海成分;エチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステル

複合比率(重量比);芯:鞘:海=45:45:10

[0145] この繊維85%と、直径 $17\mu\text{m}$ のポリプロピレン15%からなるシート状物を作製した後、ニードルパンチすることによって不織布を得た。次に、この不織布を 95°C 水酸化ナトリウム水溶液で2時間処理して海成分のエチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステルを溶解することによって、芯鞘繊維の直径が $5\mu\text{m}$ で、嵩密度が $0.07\text{g}/\text{cm}^3$ (総目付 $250\text{g}/\text{m}^2$)の不織布を作製した。

[0146] (中間体)

次に、ニトロベンゼン600mLと硫酸390mLの混合液にパラホルムアルデヒド3gを 20°C で溶解した後、 0°C に冷却し、75.9gのN-メチロール- α -クロルアセトアミドを加えて、 5°C 以下で溶解した。これに5gの上記不織布1を浸し、室温で2時間静置した。その後、繊維を取り出し、大過剰の冷メタノール中に入れ、洗浄した。繊維をメタノールで良く洗った後、水洗し、乾燥して、7.0gの α -クロルアセトアミドメチル化ポリスチレン繊維(中間体C1)を得た。

[0147] (吸着体)

N, N-ジメチルオクチルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのDMFに溶かした溶液に5gの中間体C1を浸し、 85°C のバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、 $1\text{mol}/\text{L}$ 濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、8.3gのジメチルオクチルアンモニウム化繊維(吸着体C1)を得た。

[0148] また、N, N-ジメチルヘキシルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのDMFに溶かした溶液に5gの中間体C1を浸し、 85°C のバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、 $1\text{mol}/\text{L}$ 濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥し

て、9. 3gのジメチルラウリルアンモニウム化繊維(吸着体C2)を得た。

[0149] (スルホン化繊維:比較繊維)

また、パラホルムアルデヒド500mgを溶解した硫酸50mLに、5gの不織布1を浸し、95°Cで1時間加熱した後、水洗、1モル/L濃度の食塩水での洗浄、水洗、乾燥を逐次行って、7. 3gのスルホン化繊維(比較吸着体C1)を得た。

[0150] (担癌ラットの調製)

12週令のWKAH:Hkmラット(雄)の背部皮下に4-ジメチルアミノアゾベンゼン誘発肝癌細胞KDH-8{矢野 諭、北海道医誌、68巻5号、654-664(1993)}を 2×10^8 個接種した。癌細胞は100%の確率で生着した。(通常接種1週間後から腫瘍が大きくなり、接種後、5. 5週間で死亡する。)

[0151] (体外循環カラムの作成)

内径1cm内容積2mLのポリプロピレン製円筒形カラムに吸着体C1、吸着体C2、比較吸着体C1または直径25 μ mのポリエチレンテレフタレート繊維からなる不織布をそれぞれ充填して、癌治療用体外循環カラムを調製した。吸着材を各0. 38g充填したものをそれぞれ実施例12(吸着体C1)、実施例13(吸着体C2)、比較例2(比較吸着体C1)、比較例3(直径25 μ mのポリエチレンテレフタレート繊維)とした。同様に吸着材を各0. 18g充填したものをそれぞれ実施例14(吸着体C1)、実施例15(吸着体C2)、比較例4(比較吸着体C1)比較例5(直径25 μ mのポリエチレンテレフタレート繊維)とした。各実施例の吸着材のゼータ電位は、いずれも-20mV以上であった。

[0152] (担癌ラットの調製と体外循環)

癌治療用体外循環カラムは体外循環前に1000単位のヘパリンナトリウムを含む生理食塩水で予備洗浄し、さらに500mLの生理食塩水で洗浄して用いた。

[0153] KDH細胞接種2週間後に2mL/mLの血流で、60分間、体外循環した。大腿動脈から採血し、吸着材カラムを通した後大腿静脈に返血した。体外循環中はヘパリンナトリウム注射液(武田薬品工業(株))を100U/hrの速度で持続注入した。

[0154] 体外循環前と後のラットの血液を採取し、血清中のTGF- β 濃度を測定すると共に、癌細胞接種後の生存日数を観察し表2の結果を得た。

[0155] (インビトロ血球除去評価)

健常者ボランティアから25mLの血液を採取し、直ちに10U/mLのヘパリンを付与し、以下の循環を3時間以内に実施する。血液を37°Cに保ち、2mL/minの流量で、容量2mLのカラム(吸着材を直径1cmに打ち抜き所定量充填)を用いて90min循環し、カラム処理後の血液中の白血球を血球計数装置にて分画し、リンパ球数、顆粒球数(好中球)、単球の除去率を計算する。基準となる除去率は60min時点の値とする。)

[0156] [表2]

表 2

	癌治療用 吸着材充 填量 (g)	ラット 体重 (kg)	血清中 TGF- β 濃度 (ng/ml)	顆粒球 除去率 (%)	単球 除去率 (%)	リンパ球 除去率 (%)	血中潜在 型TGF -β 除去 率 (%)	癌細胞 播種後 寿命 (週)
実施例 12	0.38	0.31	33	78	88	19	61	7.3
実施例 13	0.38	0.32	36	68	84	17	72	8.6
実施例 14	0.18	0.34	35	52	66	12	26	6.7
実施例 15	0.18	0.31	33	52	68	13	39	7.3
比較例 5	0.38	0.33	33	58	59	12	3	4.3
比較例 6	0.38	0.31	34	21	16	11	6	4.7
比較例 7	0.18	0.37	35	44	22	12	3	4.3
比較例 8	0.18	0.32	36	18	14	10	3	4.3

[0157] 実施例12~13はTGF-βの血中濃度が低下しており、比較例に比べ寿命も延びている。実施例12~15と比較例5~8では体外循環後のTGF-βの血中濃度と癌細胞接種後寿命が反比例することが分かる。また、TGF-βの血中濃度の低下は吸着材の使用量に比例して起きることが分かる。比較例ではTGF-βの血中濃度が下がらず、癌細胞接種後寿命も短かった。また、治療しない場合の寿命は5.5週であるので、比較例5~8からTGF-βの吸着能の低いカラムで体外循環すると、かえって寿命が短くなることがわかった。

[0158] 実施例16、17及び比較例9、10

[実施例16]

(吸着担体)

36島の海島複合繊維であって、島が更に芯鞘複合によりなるものを次の成分を用いて、紡糸速度800m/分、延伸倍率3倍の製糸条件で得た。

島の芯成分;ポリプロピレン

島の鞘成分;ポリスチレン90wt%、ポリプロピレン10wt%

海成分;エチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホインフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステル

複合比率(重量比);芯:鞘:海=42:43:15

[0159] この繊維85wt%と、直径20 μ mのポリプロピレン繊維15wt%からなる不織布を作製した後、この不織布2枚で、開孔部が2mm角のポリエステル製ネット(厚み0.4mm、単糸径0.3mm)を間に挟み、不織布の切断面に対して傾きが90度になるようにセットし、ニードルパンチすることによって三層構造の吸着担体を得た。次に、この不織布を90°C水酸化ナトリウム水溶液で処理して海成分のエチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重合成分として5-ナトリウムスルホインフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステルを溶解することによって、芯鞘繊維の直径が5 μ mで、嵩密度が0.02g/cm³(総目付150g/m²)の吸着担体を作製した(吸着担体B1)。一定速度で巻き取ったところ、安定した巻取りが可能であり、同形状の円筒状フィルターが得られた。

[0160] (中間体)

次に、ニトロベンゼン600mLと硫酸390mLの混合液にパラホルムアルデヒド3gを20°Cで溶解した後、0°Cに冷却し、75.9gのN-メチロール- α -クロルアセトアミドを加えて、5°C以下で溶解した。これに5gの上記吸着担体1を浸し、室温で2時間静置した。その後、繊維を取り出し、大過剰の冷メタノール中に入れ、洗浄した。繊維をメタノールで良く洗った後、水洗し、乾燥して、7.0gの α -クロルアセトアミドメチル化ポリスチレン繊維(中間体B1)を得た。

[0161] (官能基を導入した吸着材(吸着担体))

N, N-ジメチルオクチルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのDMFに溶かし

た溶液に5gの上記中間体B1を浸し、85°Cのバス中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、1mol/L濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、8. 3gのジメチルオクチルアンモニウム化繊維(官能基を導入した吸着担体B1)を得た。

[0162] また、これとは別に、N, N-ジメチルラウリルアミン50gとヨウ化カリウム8gを360mLのDMFに溶かした溶液に5gの上記中間体B1を浸し、85°Cの湯浴中で3時間加熱した。繊維をイソプロパノールで洗浄後、1mol/L濃度の食塩水に浸漬した後、水洗し、真空乾燥して、9. 3gのジメチルラウリルアンモニウム化繊維(官能基を導入した吸着担体B2)を得た。

得られた官能基を導入した吸着担体B1およびB2はいずれも、ネットを含むため、変形せず、良好な形状を保った。

[0163] [比較例9]

実施例16で作成した海島複合繊維を、ネットを用いることなくニードルパンチングしたほかは同様にして不織布を作成した。次に、この不織布を90°C水酸化ナトリウム水溶液で処理して海成分のエチレンテレフタレート単位を主たる繰り返し単位とし、共重成分として5-ナトリウムスルホイソフタル酸を3wt%含む共重合ポリエステルを溶解することによって、芯鞘繊維の直径が5 μ mで、嵩密度が0.02g/cm³(総目付150g/m²)の不織布を作製した(不織布B1)。この不織布は横方向への強力が小さく、中間体および吸着体の合成中に、伸びが生じたため、嵩密度を一定に保つことができなかった。

[0164] [実施例17]

健常者ボランティアの血液50mlをヘパリン採血し、その中へ、500pg/mlになるようにヒト天然型インターロイキン-6(以下、IL-6)を溶解し、以下の検討を行った。

[0165] 吸着材(官能基を導入した吸着担体B1)150mgを内容積2mlのカラムに充填し、37°Cで1時間上記血液25mlを循環した後、血球の組成を自動血液分析器で調べ、また、IL-6量をEIA法にて定量した。リンパ球数12.5%減少、顆粒球67%減少が見られ、IL-6も35%減少していた。このとき圧力損失上昇も見られなかった。

[0166] [比較例10]

比較例10で作成した不織布を、実施例17と同様に同量カラムに充填し、残りの25mlの血液を用いて検討を行った。

[0167] このとき圧力損失上昇が45分で起こり、200mmHgを越えたため、中断した。リンパ球数31.5%減少、顆粒球69%減少が見られ、IL-6も35%減少していた。

[0168] [実施例18]

実施例16と同様に不織布を作製する際、開孔部が2mm角のポリエステル製ネット(厚み0.4mm、単糸径0.3mm)を間に挟み、不織布の切断面に対して傾きが110度になるようにセットした。一定速度で巻き取ったところ、不織布の伸びが確認され巻き取り張力が安定しなかった。不織布の厚みも一定ではなく、同形状の円筒状フィルターを得ることができなかった。

[0169] この不織布150mgを内容積2mlのカラムに充填し、37°Cで1時間上記血液25mlを循環した後、血球の組成を自動血液分析器で調べ、また、IL-6量をEIA法にて定量した。その結果、リンパ球数12.5%減少、顆粒球67%減少が見られ、IL-6も35%減少していた。このとき圧力損失上昇も見られなかった。

産業上の利用可能性

[0170] 本発明により、血液中の白血球、炎症性、免疫抑制性サイトカインを効率よく吸着除去し、かつ血液中の有用成分の除去率を低くすることが可能な吸着材が提供される。係る本発明の吸着材は白血球除去療法、免疫賦活療法、癌治療等の各種用途に提供できる。

またこの材料は、シャーレ、瓶、膜、繊維、中空糸、粒状物またはこれらを用いた組み立て品などの成形品の形で、アフィニティークロマトグラフ用カラム、治療用血液カラム、特に体外循環カラムとして好適に使用することができる。

請求の範囲

- [1] ゼータ電位が -20mV 以上であって、血液中の顆粒球、単球およびサイトカインを吸着することを特徴とする吸着材。
- [2] リンパ球の吸着率が40%以下であることを特徴とする請求項1に記載の吸着材。
- [3] 前記サイトカインがインターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-6(IL-6)、インターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-10(IL-10)、TNF- α 、トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベータ(TGF- β)、血管新生増殖因子(VEGF)および免疫抑制酸性蛋白(IAP)からなる群から選ばれる少なくとも1種であることを特徴とする請求項1または2に記載の吸着材。
- [4] 凝固第XIII因子の吸着率が30%以下であることを特徴とする請求項1~3のいずれかに記載の吸着材。
- [5] ゼータ電位が -15mV 以上であって、1vol%牛胎仔血清(FCS)溶解生理食塩水中で90%以上のリポ多糖(LPS)吸着能を有することを特徴とする請求項1~4のいずれかに記載の吸着材。
- [6] 前記吸着材の形状が、繊維、膜、中空糸及びビーズから選ばれる形状であることを特徴とする請求項1~5のいずれかに記載の吸着材。
- [7] 官能基を結合してなる水不溶性担体を含むことを特徴とする請求項1~6のいずれかに記載の吸着材。
- [8] 前記水不溶性担体の形状が、繊維径が $3\mu\text{m}$ を超える繊維あるいは中空糸、及び表面の突起の径が $3\mu\text{m}$ を超えるビーズから選ばれる形状であることを特徴とする請求項7に記載の吸着材。
- [9] 前記水不溶性担体の形状が、繊維径が $4\sim 8\mu\text{m}$ の繊維あるいは中空糸、及びビーズの表面の突起の径が $4\sim 8\mu\text{m}$ のビーズから選ばれる形状であることを特徴とする請求項7に記載の吸着材。
- [10] 前記水不溶性担体の形状が、繊維径が $4.5\sim 8\mu\text{m}$ の繊維あるいは中空糸、及びビーズ粒子の表面の突起の径が $4.5\sim 8\mu\text{m}$ のビーズから選ばれる形状であることを特徴とする請求項7に記載の吸着材。
- [11] 前記水不溶性担体の形状が、繊維径が $10\sim 50\mu\text{m}$ の繊維あるいは中空糸を更に

- 含むことを特徴とする請求項8～10のいずれかに記載の吸着材。
- [12] 水不溶性担体に4級アンモニウム塩および／または直鎖状アミノ基を結合してなる請求項7～11のいずれかに記載の吸着材。
- [13] 4級アンモニウム塩がN、N-ジメチルヘキシルアミン、N、N-ジメチルオクチルアミン、N、N-ジメチルラウリルアミン、テトラエチレンペンタミンから選ばれる少なくとも一つであることを特徴とする請求項11に記載の吸着材。
- [14] 請求項1記載の吸着材であって、親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体を含み、潜在型トランスフォーミング・グロウス・ファクター・ベータ吸着能を有する癌治療用吸着材。
- [15] 顆粒球の吸着率が35%以上、かつ単球の吸着率が35%以上であることを特徴とする請求項14記載の癌治療用吸着材。
- [16] 前記親水性アミン残基を結合した水不溶性重合体が、膜、繊維または粒状物であることを特徴とする請求項14または15記載の癌治療用吸着材。
- [17] 顆粒球の吸着率が50%以上、かつ単球の吸着率が50%以上であることを特徴とする請求項1～16のいずれかに記載の吸着材。
- [18] 少なくともネットと不織布の2層構造を持つことを特徴とする吸着材。
- [19] 少なくともネットと不織布の2層構造を有することを特徴とする請求項1～17のいずれかに記載の吸着材。
- [20] 前記ネットが、 100mm^2 中に、 10mm^2 以上の空隙を有するネットであることを特徴とする請求項18または19に記載の吸着材。
- [21] 前記ネットの空隙形状が、四角形であることを特徴とする請求項18～20のいずれかに記載の吸着材。
- [22] 前記2層構造において、前記ネットの構成材が前記不織布の長軸または短軸方向に対し角度 $90\text{度}\pm 10\text{度}$ の方向をなすことを特徴とする請求項18～21のいずれかに記載の吸着材。
- [23] 生理活性物質および／または細胞を吸着することを特徴とする請求項18～22のいずれかに記載の吸着材。
- [24] 前記ネットが単繊維からなることを特徴とする請求項18～23のいずれかに記載の

吸着材。

- [25] 前記ネットは、その構成材が互いに交差する部分が接合されてなるものであることを特徴とする請求項18～24のいずれかに記載の吸着材。
- [26] 嵩密度が $0.02\text{g}/\text{cm}^3$ 以上であることを特徴とする請求項18～25のいずれかに記載の吸着材。
- [27] 白血球除去療法または免疫賦活療法に用いられることを特徴とする請求項1～26のいずれかに記載の吸着材。
- [28] 請求項1～27のいずれかに記載の吸着材を容器に充填してなる血液処理カラム。
- [29] 請求項1～27のいずれかに記載の吸着材が円筒状容器に納められていることを特徴とする血液処理カラム。
- [30] 血液を循環して使用されるものであることを特徴とする請求項28または29に記載の血液処理カラム。
- [31] 生体との体外循環終了時から150～180時間経過後に、体外循環前に比べ、リンパ球数の増加と顆粒球数の減少を示す請求項28～30のいずれかに記載の血液処理カラム。
- [32] 請求項14～16のいずれかに記載の癌治療用吸着材を用いた癌治療用体外循環カラム。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306944

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61M1/36 (2006.01), A61M1/02 (2006.01), B01J20/26 (2006.01), B01J20/28 (2006.01)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61M1/36, A61M1/02, B01J20/26, B01J20/28		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 6-7429 A (Asahi Medical Co., Ltd.), 18 January, 1994 (18.01.94), Par. Nos. [0006], [0020], [0035], [0042], [0046], [0053] & US 5407581 A1 & EP 561379 A1	1-10, 12, 14-17, 27-32 11, 13, 18-26
Y	JP 2002-172163 A (Toray Industries, Inc.), 18 June, 2002 (18.06.02), Par. No. [0013] (Family: none)	11, 13
Y	WO 2004/052270 A1 (Asahi Kasei Corp.), 24 June, 2004 (24.06.04), Page 30, lines 19 to 20 & EP 1579838 A	18-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 June, 2006 (13.06.06)		Date of mailing of the international search report 18 July, 2006 (18.07.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61M1/36 (2006.01), A61M1/02 (2006.01), B01J20/26 (2006.01), B01J20/28 (2006.01)

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. A61M1/36, A61M1/02, B01J20/26, B01J20/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2006年
 日本国実用新案登録公報 1996-2006年
 日本国登録実用新案公報 1994-2006年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 6-7429 A (旭メディカル株式会社) 1994.01.18, 【0006】 , 【0020】 , 【0035】 , 【0042】 , 【0046】 , 【0053】	1-10, 12, 14-17, 27-32
Y	& US 5407581 A1 & EP 561379 A1	11, 13, 18-26
Y	JP 2002-172163 A (東レ株式会社) 2002.06.18, 【0013】 (ファミリーなし)	11, 13

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 13.06.2006	国際調査報告の発送日 18.07.2006
--------------------------	--------------------------

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 内藤 真徳 電話番号 03-3581-1101 内線 3346	31 3323
---	--	---------

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 2004/052270 A1 (旭化成株式会社) 2004. 06. 24, 第 30 頁第 19-20 行 & EP 1579838 A1	18-26