

201318070A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンによる HTLV-1 の革新的  
感染予防モデルの開発とその有効性の検討

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 水上 拓郎

平成 26 年(2014 年) 3 月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンによる HTLV-1 の革新的  
感染予防モデルの開発とその有効性の検討

平成 25 年度 総括研究報告書

研究代表者 水上 拓郎

平成 26 年(2014 年) 3 月

## 目 次

- I. 総括研究報告書……………P. 1  
抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンによる HTLV-1 の革新的感染予防モデルの開発  
とその有効性の検討 水上拓郎、浜口功、大隈和、山口一成、佐竹正博、田所憲  
治、松本千恵子、野島清子
  
- II. 研究成果の刊行に関する一覧……………P. 29
  
- III. 研究成果の刊行物・別刷……………P. 33

## I. 総括研究報告

## 抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンによる HTLV-1 の 革新的感染予防モデルの開発とその有効性の検討

研究代表者	水上 拓郎	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	室長
研究分担者	浜口 功	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	部長
研究分担者	大隈 和	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	室長
研究分担者	佐竹 正博	日本赤十字西東京都血液センター		所長
研究分担者	田所 憲治	日本赤十字中央血液研究所		所長
研究協力者	松本 千恵子	日本赤十字中央血液研究所		
研究協力者	野島 清子	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	研究員

成人T細胞白血病はヒトT細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) の感染によって引き起こされる末梢性 T 細胞の腫瘍性疾患である。現在、母子感染を予防する事が HTLV-1 の感染防止及び蔓延防止の最も有効な手段であると考えられ、人工栄養あるいは短期母乳との併用による感染予防策が講じられている。しかし完全人工栄養法を選択しても約 3% の母子感染が発生している事から、新たな感染予防方法の研究・開発が望まれてきた。日本赤十字血液センターでは高感度な CLEIA 法を用い、HTLV-1 抗体検査を実施している。HTLV-1 陽性血漿におけるウサギ感染モデルでの感染抑制効果など研究成果からも、HBV と同様に HTLV-1 抗体陽性血漿由来のグロブリンを用いることで HTLV-1 感染防止が可能であると示唆される。そこで本研究課題においては、日本赤十字社の協力を得て、抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリン (HTLV-IG) の開発を目的とし、*in vitro* での HTLV-IG 感染予防能について検討した。まず、感染細胞として MT-2, SLB-1 を用い、マイトマイシン C 処理後に非感染細胞である Jurkat 細胞と共培養する事で、感染モデルを構築し標準化することに成功した。また本感染系に陽性血漿を 1% 添加した結果、有意に感染を阻止する事が可能である事が明らかとなった。そこで、日本赤十字社にある HTLV-1 陽性血漿を用いて、*in vitro* のスクリーニングを行った結果、Proviral load (PVL) が 4 以上の検体で有意に感染を阻害する事が明らかとなった。更に、SLB-1 と Jurkat 細胞の共培養によるシンシウム形成の阻害に関しても同様の結果が得られた。日本赤十字社にある陽性血漿 30 例について、PVL, Western blotting, ELISA を行い、その特性を明確にし、感染阻害・あるいはシンシウム形成阻害効果に関するパラメーターとの相関を調べたが、PVL がもっとも高い相関を示した。次に、ヒト化マウスにおける阻害効果を調べる目的で、NOG マウス、NOJ マウスを用いたヒト化マウスの作成を行い、マイトマイシン C 処理した MT-2 細胞を感染させる事で、HTLV-1 感染モデルの作出に成功した。更に、高力価 IG の精製に成功した。今後は、ヒト化マウスにおいて HTLV-1IGs の有効性を検討する。

### A. 研究目的

成人T細胞白血病はヒトT細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) の感染によって引き起こされる末梢性 T 細胞の腫瘍性疾患である [図 1]。HTLV-1 は T 細胞に感染し、T 細胞同士の接触によって感染・伝達し、感染細胞が増殖する。現在、母子感染を予防する事が HTLV-1 の感染防止及び蔓延防

止の最も有効な手段であると考えられ、人工栄養あるいは短期母乳との併用による感染予防策が講じられている。HTLV-1 感染率の比較的高い流行地である長崎県では、1950 年には約 6% であったキャリア率は 2010 年では 0.06% まで減少したが、近年の研究結果から、HTLV-1 の感染が、九州以外の都市部では増加傾向にあることが分かった。母子感染対策として、完全人工栄養法を選

扱しても、約3%の母子感染が発生している事が明らかとなり、母乳感染以外の感染経路が疑われている。そのような状況を鑑み、2011年に発症予防、治療、感染防止の3つの柱を中心とした、HTLV-1総合対策が講じられた【図2】。その中で、新たな感染を予防する方法の研究・開発が望まれてきた。

ウイルスの新生児感染が問題となったB型肝炎においては、出生児母子感染を予防する目的で、抗HBsヒト免疫グロブリン(HBIG)が開発され、出生児のHBVへの感染防止が可能となった。一方、HTLV-1に関しては日本赤十字血液センターでは、昭和61年以降、全ての献血血液に対し、PA法によるHTLV-1検査を実施し、更に近年はより高感度なCLEIA法を用い、HTLV-1抗体検査を実施している。HTLV-1陽性血漿におけるウサギ感染モデルでの感染抑制効果など研究成果からも、HBVと同様にHTLV-1抗体陽性血漿由来のグロブリン製剤を用いることでHTLV-1感染防止が可能であると示唆される。

そこで本研究課題においては、1)日本赤十字社の協力を得て、抗HTLV-1ヒト免疫グロブリン(HTLV-IG)の開発をすることとした。また、2)in vitroのHTLV-1感染系を構築し、HTLV-IGの有効性を検討する【図3】。有効性が確認された場合は、3)ヒト化マウスを用いた感染モデルの開発と、HTLV-IGの有効性の検討を行う。また、ヒト臨床試験に応用する事を目指し、HTLV-IGの用法・容量等の性状の設定と、ウイルス安全性について日本赤十字社と共同で検討する。また、可能であれば乳幼児モデル、母乳感染モデルを構築し、同様のモデルで感染が予防できるか、検討する。

## B.研究方法

### 1. 抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンの開発

当初の計画では、まずHTLV-1陽性血漿より抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンを実験室レベルで製造し、実験に供する予定であったが、第1回班会

議の結果、まず陽性血漿の絞り込みを行い、免疫グロブリンに精製する前の血漿レベルで、一次スクリーニングを行う事とした。そこで日本赤十字社が持つHTLV-1陽性血漿の中から、感染ウイルス量(PVL)の高い血漿、中間のもの、低コピーのもの3つのグレードに分け、さらに各種抗原(p24(gag: capsid), gp46-21(env), pep180(env))ELISA結果とwestern blotの結果(p19, p24, p53, gp46)を加味した様々な陽性血漿サンプルを約30検体準備した【図4】。これらの陽性血漿に含まれる中和抗体のエピトープを同時に検討した。

### 2. in vitroスクリーニング系の開発

そこで、これらの陽性血漿を用いてハイスループトなin vitroスクリーニング系を開発する目的で、HTLV-1感染細胞株を用いた感染モデルを構築することを検討した。既存のHTLV-1感染細胞株(MT-2, SLB-1, HUT102)にマイトマイシンC処理を行い、非感染細胞であるJurkat細胞と様々な比率で混合し、一定期間培養する事で、Jurkat細胞へのウイルス感染を検討する。特に、ウイルス感染ではMT-2とJurkat細胞、シンシチウム形成に関してはSLB-1とJurkat細胞の培養系を確立する。また、確立したモデルにおいて30種のHTLV-1陽性血漿の添加実験を行い、中和活性の有無について一次スクリーニングを実施する。スクリーニングで感染防御能が高かった血漿よりグロブリン製剤を作成し、平成26年度の実験に用いる。また、その効果のメカニズムの解明、PBMCを用いた確認を行う。

### 3. ヒト化マウスの作成

超免疫不全マウスであるNOGマウス(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1 Sug/Jic)およびNOJマウス(NOD/SCID/JAK3null)にヒト臍帯血由来CD34陽性細胞をintra-Hepatic, Intra-Bone Marrow, Intravenous Transplantation法で移植し、

1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月後の抹消血中の human CD45, CD19, CD3, CD4, CD8, CD25 の割合をフローサイトメトリー(JSAN, Baybioscience 社) で調べ、ヒト化マウスを作成する。

#### 4. ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染モデルの構築

ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染系を構築する目的で、ヒト化して三ヶ月後の NOG マウスに、マイトマイシン C 処理した MT2 細胞を腹腔内移植し、感染を誘導する。移植後 1～3ヶ月の抹消血を確認し、白血球数、human CD45, CD19, CD3, CD4, CD8, CD25 の割合を調べ、ヒト化マウスへの HTLV-1 感染を確認するとともに、抹消血、Spleen の genomic DNA を抽出し、HTLV-1 の感染を確認する。また、脾臓・骨髄、リンパ節・肺、肝臓などの組織を採材し、4%PFA/PBS で固定した後、常法に従って免疫組織化学を行い、各種細胞の動態を明らかにする。

### C. 研究結果

#### 1. 抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンの開発に向けた HTLV-1 陽性血漿の特性の解析

日本赤十字社が持つ HTLV-1 陽性血漿の中から、感染ウイルス量 (PVL) の値からウイルス量の高いもの(4以上)と、中間のもの (0.49-1.39)、さらにそれよりも低いもの(0.01 以下)のものと3つの群に分類した [図 4]。さらにそれらの中和エピトープを詳細に解析し、Peptide ELISA を行い、p24, gp46, pep180 などへの結合性を検討した。

#### 2. *in vitro* スクリーニング系の開発と標準化

そこで、これらの陽性血漿を用いてハイスループットな *in vitro* スクリーニング系を開発する目的で、細胞株を用いた感染実験モデルを構築する

ことを検討した。既存の HTLV-1 感染細胞株 (MT-2, SLB-1, HUT102, TL-om1)にマイトマイシン C 処理 (50ug/mL)を 37°Cで 1時間行い、非感染細胞である Jurkat 細胞及び MOLT4 細胞を様々な比率で混合し、一定期間培養する事で、非感染細胞へのウイルス感染能を検討した。

その結果、TL-Om1 では一切の感染性を示さなかったが、HUT102,SLB-1, MT-2 細胞を用いる事でウイルス感染が確認された [図 4]。さらに感染後 4日目、7日目、8日目と評価する期間を変えると、感染 4日目において再現性が高く感染価を評価できる事が明らかとなった。また、感染細胞数を  $1 \times 10^3$  から 104 と増加させても、TL-om1 の感染性は変化せず、その他の株では感染細胞数依存的に PVL が増加した。その中で MT-2 に関しては、特に容量依存性が高いので、本スクリーニングに有効であると考えられた。一方、SLB-1 は合胞体を形成するので、感染抑制の機能的側面の指標として有効であると考えられた。本試験法の標準化によって感染予防薬の開発にも応用可能と考えられる。そこで、今後はこの感染細胞として MT-2 及び SLB-1、非感染細胞として Jurkat 細胞を用い、30 種の HTLV-1 陽性血漿の添加実験を行い、中和活性の有無について一次スクリーニングを実施することとした。

#### 3. 抗体陽性血漿を用いた感染抑制能の検討

##### ウイルス価を指標としたスクリーニング

次に、感染細胞として MT-2 及び SLB-1、非感染細胞として Jurkat 細胞を用い、30 種の HTLV-1 陽性血漿の添加実験を行い、中和活性の有無について一次スクリーニングを実施した。抗体の添加には共培養後に添加する方法と、MMC 処理をした細胞に添加して共培養する方法があるが、本実験系ではより直接的に影響を検討する為に、MMC 処理後に処理する方法を用いた。まず、平成 24 年度の研究から、1%の未精製の血漿を用いた場合、どの検体も有意に感染を抑制した事から、

1.5%, 1%, 0.5%, 0.1%の濃度をふり、至適条件を検討した。その結果、0.5%添加によって、検体間差が見やすい事が明らかとなった [図 5 A]。また、10 日間の培養中の Passage 毎に血漿を添加することが、感染抑制に働くかを検討した所、継代時の添加は、その後の感染に大きな影響を与えない事が明らかとなった[図 5 A]。そこで、MMC 処理した MT2 細胞と Jurkat 細胞に 30 検体を 0.5%の濃度で添加し、10 日後の PVL をリアルタイム PCR で測定した。その結果、0.5%の添加の範囲で有意に感染を阻止した検体とそうではない検体が明らかとなった [図 5 B]。そこで、それぞれの検体の特性と感染抑制率に関し、相関を調べた結果、PVL と非常に良く相関することが明らかとなった [図 5 C、図 8 A]。

#### 機能アッセイを指標としたスクリーニング

次に、SLB-1 と Jurkat 細胞の共培養感染系を用いた、検体の評価を行った。SLB-1 と Jurkat 細胞の共培養によって、シンシチウムが形成されることが以前から報告されているが、本研究課題でも、同様の結果が得られた[図 6]。更に、T65 の検体を 1%の濃度で添加すると、シンシチウム形成が有意に減少する事が明らかとなった。そこで、本感染系を、機能アッセイの一つとして評価基準に入れる事とした。MT-2 細胞と同様に、添加検体の濃度について検討を行った所、0.3%の濃度で検体間の違いが明確か出来る事が明らかとなった [図 7 A]。そこで、SLB-1 細胞と Jurkat 細胞に 30 検体を 0.3%の濃度で添加し、24 時間後のシンシチウムの数を顕微鏡にて計測した。その結果、0.3%の添加の範囲で有意にシンシチウム形成を阻止した検体とそうではない検体が明らかとなった [図 7 B]。そこで、それぞれの検体の特性とシンシチウム形成阻害率に関し、相関を調べた結果、PVL と非常に良く相関することが明らかとなった [図 7 C、図 8 B]。

以上の結果より、我々は HTLV-1 感染細胞株を

用いて HTLV-1 感染系を構築した。更に日赤献血由来、HTLV-1 抗体陽性血清でスクリーニングを行った結果、抗体陽性献血者の PVL%が高く、env, gag の力価が高い抗体が感染抑制効果が高かった。また、シンシチウム形成を抑制する系を立ち上げた。30 種類の HTLV-1 陽性血漿を用いてスクリーニングを行った結果、PVL%が高く、env, gag の力価が高い抗体がシンシチウム形成抑制効果が高かった。よって、高力価グロブリン製剤作製の候補検体は、無症候性キャリアのうち、PVL%が高い検体を候補とするのがよいことが明らかとなった [図 9]。

#### 4. HTLV-1IgG 精製に向けた Large Scale 生産可能な検体の確認

上記の結果から PVL%が高い検体を候補とするのがよいことが明らかとなったので、次に、HTLV-1IgG 精製を目指して、大量のバックが存在している検体から、再度 30 検体を選別し、それぞれの特性を各種抗原 (p24 (gag: capsid), gp46-21(env), pep180(env)) ELISA 結果と western blot の結果(p19, p24, p53, gp46), PVL で分類した [図 10]。それらの検体に関し、再度、同様の実験を行った結果、上記のウイルス価・機能アッセイを指標としたスクリーニングと同様に、PVL と非常に良く相関することが明らかとなった [図 11]。そこで、血漿からのグロブリンの精製を試みた。精製の方法は Louie RE *et al.*, 1994 に従い行った。その結果、副作用の芸院となる重合物の除去に成功し、グロブリン含有率 97.3%のサンプルを精製することに成功した [図 12]。

参考文献 : Louie RE, Galloway CJ, Dumas ML, Wong MF, Mitra G. Inactivation of hepatitis C virus in low pH intravenous immunoglobulin. *Biologicals*. 1994; 22: 13-19.

#### 5. ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染系の構

## 築

次に、in vitro の結果を in vivo で確認する目的 [図 13] で、超免疫不全マウスである NOG マウス (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic) および NOJ マウス (NOD/SCID/JAK3null) にヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を intra-Hepatic, Intra-Bone Marrow, Intravenous Transplantation 法で移植し、1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月後の抹消血中の human CD45, CD19, CD3, CD4, CD8, CD25 の割合をフローサイトメトリー(JSAN, BayBioscience 社) で調べ、ヒト化マウスを作成した。その結果、出生3日までの NOJ マウスにヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞を intra-Hepatic Transplantation 法で移植した場合、非常に高い割合でヒト化に成功し、一部の個体では、T 細胞が 30%前後まで増えた個体も出現した [図 14]。そこで、これらのヒト化した NOJ マウスに MMC 処理をした MT-2 を腹腔内に移植し、移植後 1 2 週のマウスの病理解剖を行った。その結果、抹消血中に ATL 細胞と考えられる CD4 陽性 CD25 陽性細胞の増加が移植したマウス全てで認められ [図 15A]、細胞数の増加が認められた [図 15B]。また、すべての個体で HTLV-1 の感染が認められた [図 15C]。MMC 処理 MT2 を移植したマウスでは、巨脾が認められた [図 16A, B]。また肝臓への浸潤も肉眼レベルで確認できた。そこで各種組織を最材し、human CD3 抗体を用いて、ATL 細胞の浸潤を確認した結果、脾臓、骨髄、リンパ節、肺、肝臓で多数の ATL 細胞と思われる CD3 陽性細胞が集簇していることが明らかとなった [図 16C]。骨髄では骨梁の融解が認められ、血清中の Ca 濃度が高い事も確認され、HTLV-1 感染により高カルシウム血症が起こっている事が示唆された。更に、現在、最適条件を検討中だが、CD3 陽性細胞の一部で Tax の発現が認められた。

## D. 考察

本研究課題において、HTLV-1 感染系の構築及びその標準化に成功した。HUT102, TL-om1, SLB-1, MT2 を用いて実験を行った結果、SLB-1, MT-2 が高効率に感染をすることが明らかとなった。また、被感染細胞として Molt4, Jurkat などを検討したが、Jurkat への感染効率がより良い事が明らかとなり、SLB-1 や MT2 を感染細胞として、Jurkat を被感染細胞として用いる系が感染抑制効果の検証に有効であることが明らかとなった。

更に、30 種類の HTLV-1 陽性血漿を用いて予備的スクリーニングを行った結果、MT-2 および Jurkat 系では PVL4 以上の陽性血漿で有意な感染阻害が認められた。また、シンシチウム形成を阻害するモデルである SLB-1-Jurkat の共培養系でも、PVL4 以上の陽性血漿で有意なシンシチウム形成阻害が認められた。

また、高力価グロブリンの精製を視野に入れて、容量の大きいバックを再度 30 検体選別し、同様の実験を行った結果、ウイルス価・機能アッセイを指標としたスクリーニングと同様に、PVL と非常に良く相関することが明らかとなった。次に原料血漿より、グロブリン製剤の作成を検討した。精製の方法は\*に従い行った。その結果、副作用の芸院となる重合物の除去に成功し、グロブリン含有率 97.3%のサンプルを精製することに成功した。そこで、これらの製剤の有効性を検討するため、超免疫マウスである NOJ マウス、NOG マウスを用いて、ヒト化した後、MMC 処理後の MT-2 を感染させ、HTLV-1 感染モデルが作成できるか検討した。

その結果、抹消血中に ATL 細胞と考えられる CD4 陽性 CD25 陽性細胞の増加が移植したマウス全てで認められ、細胞数の増加が認められた。また、すべての個体で HTLV-1 の感染が認められた。ATL 細胞の浸潤を確認した結果、脾臓、骨髄、リンパ節、肺、肝臓で多数の ATL 細胞と思われる CD3 陽性細胞が集簇していることが明らかとなった。骨髄では骨梁の融解が認められ、血清中の Ca 濃度が高い事も確認され、HTLV-1 感染により

高カルシウム血症が起こっている事が示唆された。

現在、精製した高力価免疫グロブリンの投与実験を計画し [図 17]、接種ルート、回数、時期、間隔の検討を開始している。

本研究課題によって、HTLV1 感染について、HTLV-IG の感染阻止に関する有効性を示すと共に、ヒト化マウスを用いる事で、ヒト細胞の実際の生体内での感染予防を確認でき、ヒトへの外挿が可能となる。また、HTLV-1 抗体陽性血漿は日本でしか入手できないため、高品質の HTLV-IG は日本発で開発・製造可能。世界的には数千万人のキャリアがおり、世界的な規模での利用が期待されている。また、HTLV ワクチン (H23 年度 厚生労働科学研究費 長谷川秀樹主任研究者) が成功すれば、HTLV-IG とワクチンの組み合わせで HBV の母子感染予防のような感染予防策が期待される。更に、貴重な献血血液の有効利用に繋がると確信している [図 18]。また、平成 26 年度は、計画書には記載していなかったが、母子感染抑制が可能か? HTLV-1 母子感染モデルの構築とその有効性の検討を実施したいと考えている。

## E. 結論

本研究課題において、HTLV-1 感染系の構築及びその標準化に成功した。更に、30 種類の HTLV-1 陽性血漿を用いて予備的スクリーニングを行った結果、感染抑制効果は PVL と非常に良く相関することが明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kasama Y, **Mizukami T**, Kusunoki H,

Peveling-Oberhag J, Nishito Y, Ozawa M, Kohara M, Mizuuchi T, Tsukiyama-Kohara K. B-cell-intrinsic Hepatitis C virus expression leads to B-cell-lymphomagenesis and induction of NF- $\kappa$ B signalling. *Plos one*, 2014 Accepted.

2) Tsukasaki K, Imaizumi Y, Tokura Y, Ohshima K, Kawai K, Utsunomiya A, Amano M, Watanabe T, Nakamura S, Iwatsuki K, Kamihira S, **Yamaguchi K**, Shimoyama M. Meeting report on the possible proposal of an extranodal primary cutaneous variant in the lymphoma type of adult T-cell leukemia-lymphoma. *J Dermatol*. 2014; 41: 26-28.

3) Terada C, Mori J, Okazaki H, **Satake M**, **Tadokoro K**. Effects of riboflavin and ultraviolet light treatment on platelet thrombus formation on collagen via integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 activation. *Transfusion*. 2014 Feb 8.

4) Takizawa K\*, Nakashima T\*, **Mizukami T\***, Kuramitsu M, Endoh D, Kawauchi S, Sasaki K, Momose H, Kiba Y, Mizutani T, Furuta RA, Yamaguchi K, Hamaguchi I. Degenerate polymerase chain reaction strategy with DNA microarray for detection of multiple and various subtypes of virus during blood screening. *Transfusion*. 2013; 53: 2545-55.  
\*Equally contributed

5) Odaka C, Kato H, Otsubo H, Takamoto S, Okada Y, Taneichi M, Okuma K, Sagawa K, Hoshi Y, Tasaki T, Fujii Y, Yonemura Y, Iwao N, Tanaka A, Okazaki H, Momose SY, Kitazawa J, Mori H, Matsushita A, Nomura H, Yasoshima H, Ohkusa Y, Yamaguchi K,

**Hamaguchi I.** Online reporting system for transfusion-related adverse events to enhance recipient haemovigilance in Japan: a pilot study. *Transfus Apher Sci.* 2013; 48: 95-102.

6) Krayukhina E, Uchiyama S, Nojima K, Okada Y, **Hamaguchi I**, Fukui K. Aggregation analysis of pharmaceutical human immunoglobulin preparations using size-exclusion chromatography and analytical ultracentrifugation sedimentation velocity. *J Biosci Bioeng.* 2013;115:104-10.

7) Ohsugi T, Wakamiya M, Morikawa S, Matsuura K, Kumar JM, Kumasaka T, **Yamaguchi K.** Invasion of histiocytic sarcoma into the spinal cord of HTLV-1 tax transgenic mice with HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis-like disease. *Oncol Res.* 2013; 20: 403-410.

8) Asanuma S, Yamagishi M, Kawanami K, Nakano K, Sato-Otsubo A, Muto S, Sanada M, Yamochi T, Kobayashi S, Utsunomiya A, Iwanaga M, **Yamaguchi K**, Uchimaru K, Ogawa S, Watanabe T. Adult T-cell leukemia cells are characterized by abnormalities of Helios expression that promote T cell growth. *Cancer Sci.* 2013; 104: 1097-106.

9) Furui Y, Satake M, Hoshi Y, Uchida S, Suzuki K, Tadokoro K. Cytomegalovirus (CMV) seroprevalence in Japanese blood donors and high detection frequency of CMV DNA in elderly donors. *Transfusion.* 2013; 53: 2190-2197.

10) Saito F, Shimazu T, Miyamoto J,

Maemura T, **Satake M.** Interstitial fluid shifts to plasma compartment during blood donation. *Transfusion.* 2013.

11) Taira R, **Satake M**, Momose S, Hino S, Suzuki Y, Murokawa H, Uchida S, Tadokoro K. Residual risk of transfusion-transmitted hepatitis B virus (HBV) infection caused by blood components derived from donors with occult HBV infection in Japan. *Transfusion.* 2013; 53: 1393-404.

## 2. 学会発表

1) [Oral Session] **Takuo Mizukami**, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Wakako Kuribayashi, Ryuji Hiramatsu, Haruka Momose, Jumpei Yamazaki, William W. Hall, Hideki Hasegawa, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi. The Role Of Osteoclasts In The Developing Leukemic Stem Cell Niche In A Mouse Model Of Adult T-Cell Leukemia, **18th Congress of the European Hematology Association.** Stockholm, 16 June, 2013

2) [招待講演] **水上 拓郎**, ワクチンの安全性について 第 139 回レギュラトリーサイエンスエキスパート研修会：ワクチン接種後のデータ収集とその活用について－現状と期待－ 2013 年 7 月 9 日 日本薬学会長井記念館

3) [口演] 野島清子、**水上拓郎**、倉光 球、大隈 和、松本千恵子、蕎麦田理英子、佐竹正博、田所憲治、山口一成、浜口功. 抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンによる in vitro の HTLV-1 感染抑制効果とその有効性の検討 第 6 回 HTLV-1 研究会 2013 年 8 月 23 日 東京大学

医科学研究所

4) [口演] 栗林和華子, 水上拓郎、滝澤和也、倉光球、百瀬暖佳、菅田謙治、浅田善久、松岡雅雄、濱口功. 新たな ATL マウスモデルである HBZ トランスジェニックマウスにおける ATL がん幹細胞同定の試み. 第 6 回 HTLV-1 研究会 2013 年 8 月 23 日 東京大学医科学研究所

5) [招待講演] 水上 拓郎. トランスジェニックマウスを用いた「感染症とがん」のクロストーク 第 156 回 日本獣医学会 獣医解剖サテライトフォーラム、岐阜、2013 年 9 月 18 日

6) [口演] 水上拓郎、滝澤和也、栗林和華子、平松竜司、倉光球、山崎淳平、William Hall, 長谷川秀樹、山口一成、濱口功. 成人 T 細胞白血病マウスモデルを用いた癌幹細胞ニッチ形成における破骨細胞の機能解析と破骨細胞を標的とした治療法の開発. 第 156 回 日本獣医学会、岐阜、2013 年 9 月 19 日

7) [口演] 水上拓郎、滝澤和也、栗林和華子、平松竜司、倉光球、山崎淳平、William Hall, 長谷川秀樹、山口一成、濱口功. The role of osteoclast in the leukemic stem cell niche using a mouse model of adult T cell leukemia. 第 75 回日本血液学会、札幌、2013 年 10 月 11 日

8) K Nojima, T Mizukami, R Sobata, C Matsumoto, M Kuramitsu, K Okuma, M Satake, K Tadokoro, K Yamaguchi, I Hamaguchi. Development of an Effective Prevention Method for T-cell Lymphotropic Virus Type I (HTLV-1) Infection Using HTLV-1 Sero- Positive Serum in vitro, *The*

*AABB Annual Meeting & CTTXPO 2013*, Colorado, 12-15 October, 2013 (米国輸血学会)

9) Wakako Kuribayashi, Takuo Mizukami, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi. Identification of cancer stem cell candidates in ATL mouse model of HBZ transgenic mice. *72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association*, Yokohama, 2013 10/3-5

10) [Poster Session] Takuo Mizukami\*, Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Wakako Kuribayashi, Ryuji Hiramatsu, Haruka Momose, Jumpei Yamazaki, William W. Hall, Hideki Hasegawa, Kazunari Yamaguchi, Isao Hamaguchi. The Osteoclast Targeting Therapy In Bone Metastasis For a Mouse Model Of Adult T Cell Leukemia. *American Society of Hematology meeting*, 9 December, 2013, Ernest N. Morial Convention Center, New Orleans.

#### H.知的所有権の取得状況（予定を含む）

①特許取得  
特になし

②実用新案登録  
特になし

③その他  
特になし

図01

# 成人T細胞白血病(ATL)

## 定義

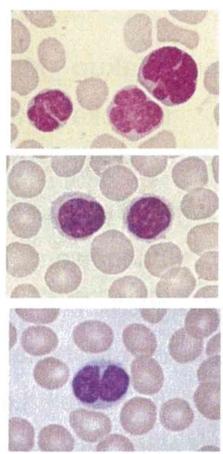
HTLV-1感染Tリンパ球が腫瘍化し、クローン性に増殖した事によって発症する疾患

## 臨床疫学的特徴

- 疫学：西南日本に多い
- 発症：家族内発症  
平均発症年齢60歳
- 感染：母乳感染・性感染・輸血
- 予後は極めて不良



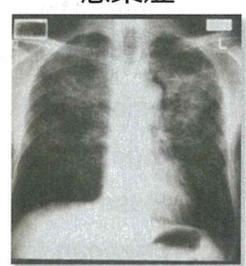
ATL細胞



リンパ節腫大



感染症



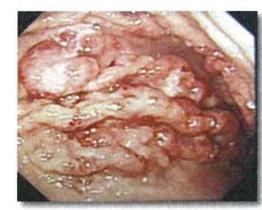
皮膚の発疹



骨溶解



胃への浸潤



脳への浸潤

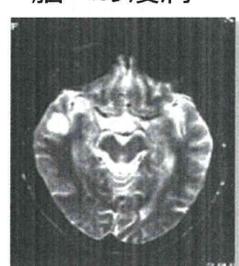


図1：成人T細胞白血病の定義 HTLV-1感染T細胞リンパ球が腫瘍化し、クローン性に増殖することによって発症する疾患で、西南日本に多い。主に感染経路は母子感染であると考えられる。

## HTLV-1総合対策 [2011年度]

発症予防

キャリア全員がATLにはならない（5%前後が発症）なので、ATL発症高危険群を同定し、**発症介入**を行う（HTLV-1総合対策2011）

治療

ATL治療法の開発（IFN/AZT治療等）、同種造血幹細胞治療  
新規治療法（CCR4抗体）、ワクチン

感染防止

輸血感染

献血者スクリーニング（抗体検査）の導入により完全阻止

性感染

水平感染の可能性が高いが、詳細は不明（避妊具）

母子感染の防止



母乳から人工乳へ

全国一律妊婦抗体検査（2010年11月より）

感染率は20%

しかし**断乳しても3%感染する！**



**新しい革新的感染予防法の開発が必要！**



図2：HTLV-1 総合対策 2011年に厚生労働科学研究費によってHTLVに関する総合対策が講じられた。過去のデータからも、母乳から人工乳に移行しても3%程度の感染が認められることから他の経路の感染があることが示唆されており、新しい感染予防法の開発が必要であると考えられる。

図03

# 抗HTLV-1ヒト免疫グロブリン によるHTLV-1感染予防法の開発-1



日本赤十字社  
Japanese Red Cross Society

## 抗体陽性血漿より抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンの製造

高力価HTLV-IG HTLV-IG

佐竹正博先生（西東京日本赤十字血液センター）  
田所憲治先生（日本赤十字中央血液研究所）

\*ロット差があるので幾つかのロットを作成



NIID  
国立感染症研究所

## 高力価HTLV-IGを用いたIn vitro系を用いた感染防止実験

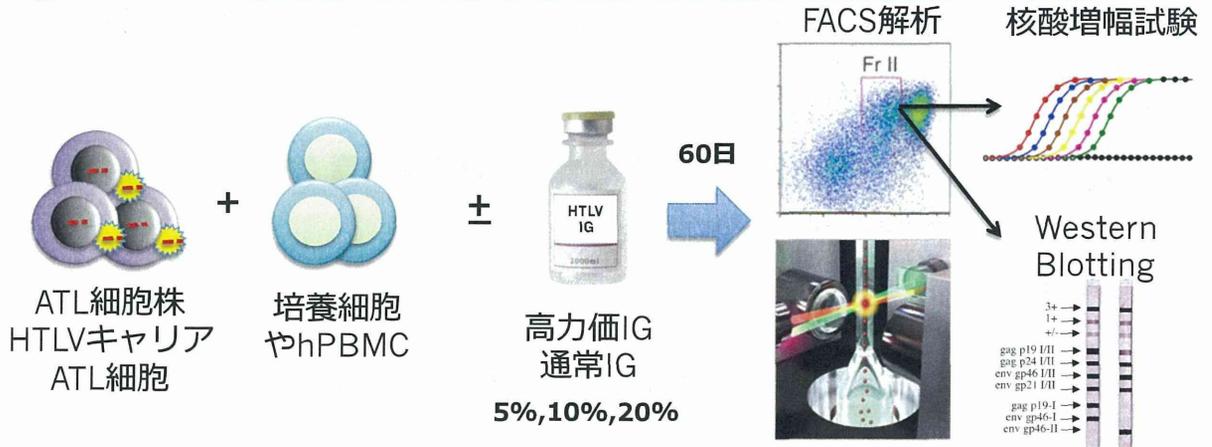


図3：抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンによるHTLV-1感染予防法の開発 感染予防ツールとして、免疫グロブリンに着目し、in vitro 感染系を構築し、有効性を検討する。

図 0 4

## 培養細胞を用いた *in vitro* 感染モデルの作成

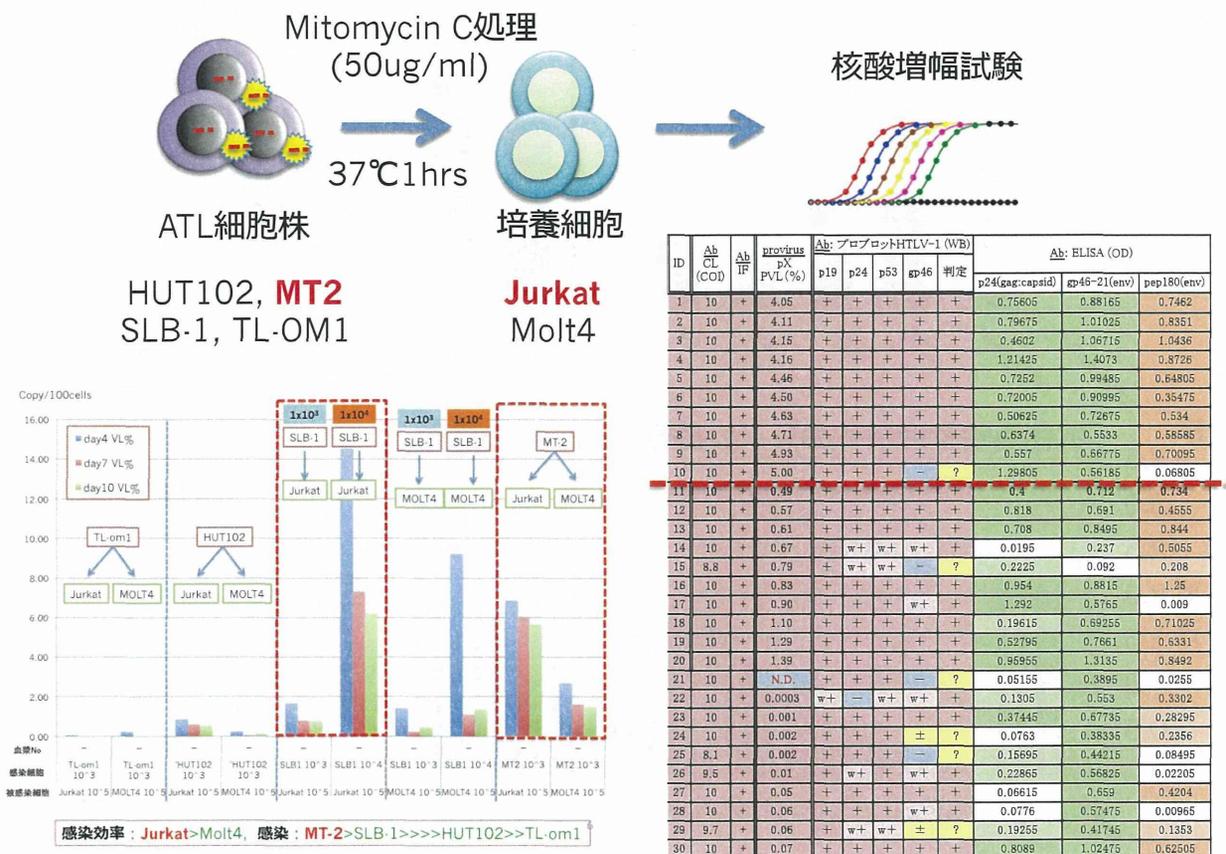


図 4 : 培養細胞を用いた *in vitro* 感染モデルの作成 1 HTLV-1 感染細胞である HUT102, MT2, SLB-1, TL-OM1 をマイトマイシン C 処理をし、その後、非感染系細胞である Jurkat 細胞や Molt 4 細胞と共培養し、ウイルス感染を模す *in vitro* 感染系を構築する。本研究課題の予備実験で用いた日本赤十字社の HTLV-1 陽性血漿のリスト。

図 05

感染抑制の抗体濃度依存性 (for 10days)

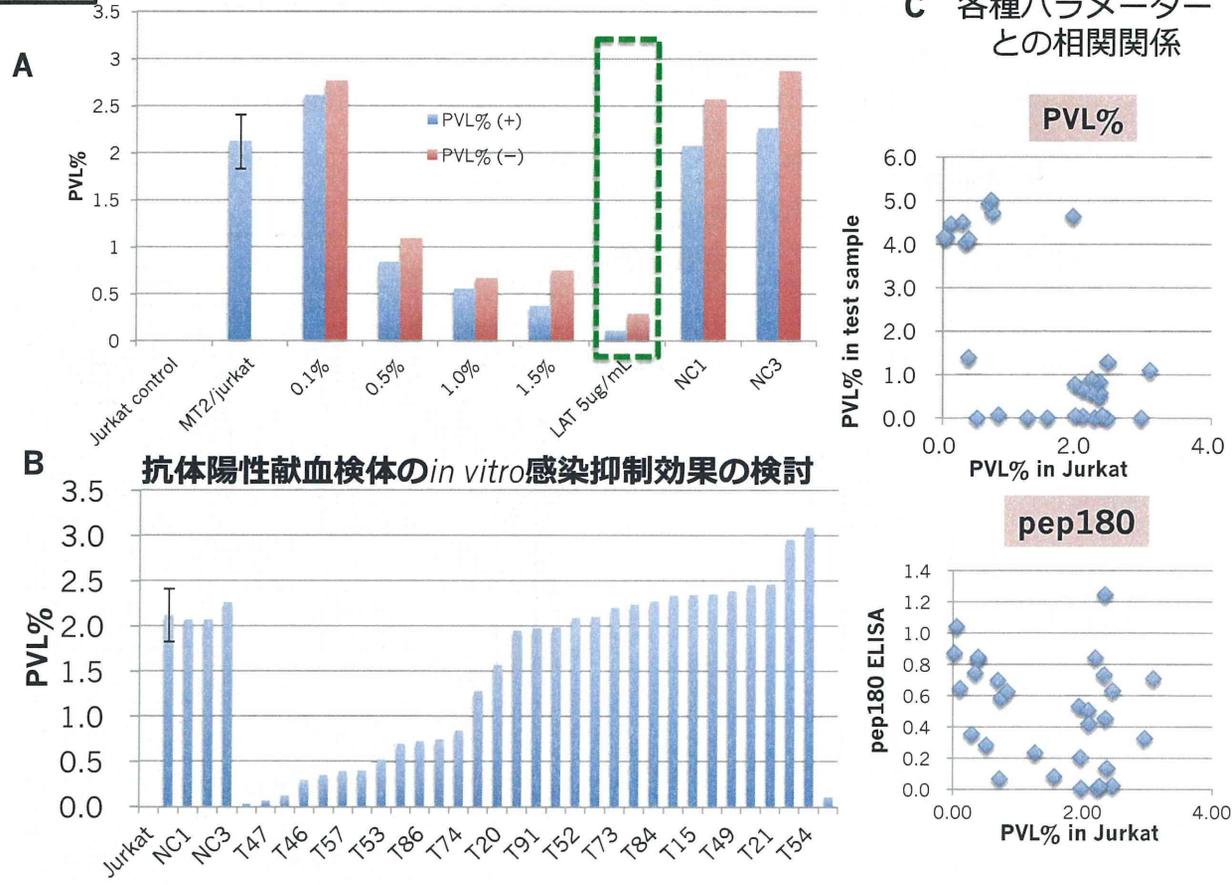


図 5 : 培養細胞を用いた *in vitro* 感染モデルの作成 2 A) 感染抑制の濃度依存性の検討 0.5%が最適濃度であることが明らかとなった B) 抗体陽性献血検体の *in vitro* 感染抑制効果の検討 C) 各種パラメーターとの相関関係

図06

## 抗体によるSyncytiumの抑制

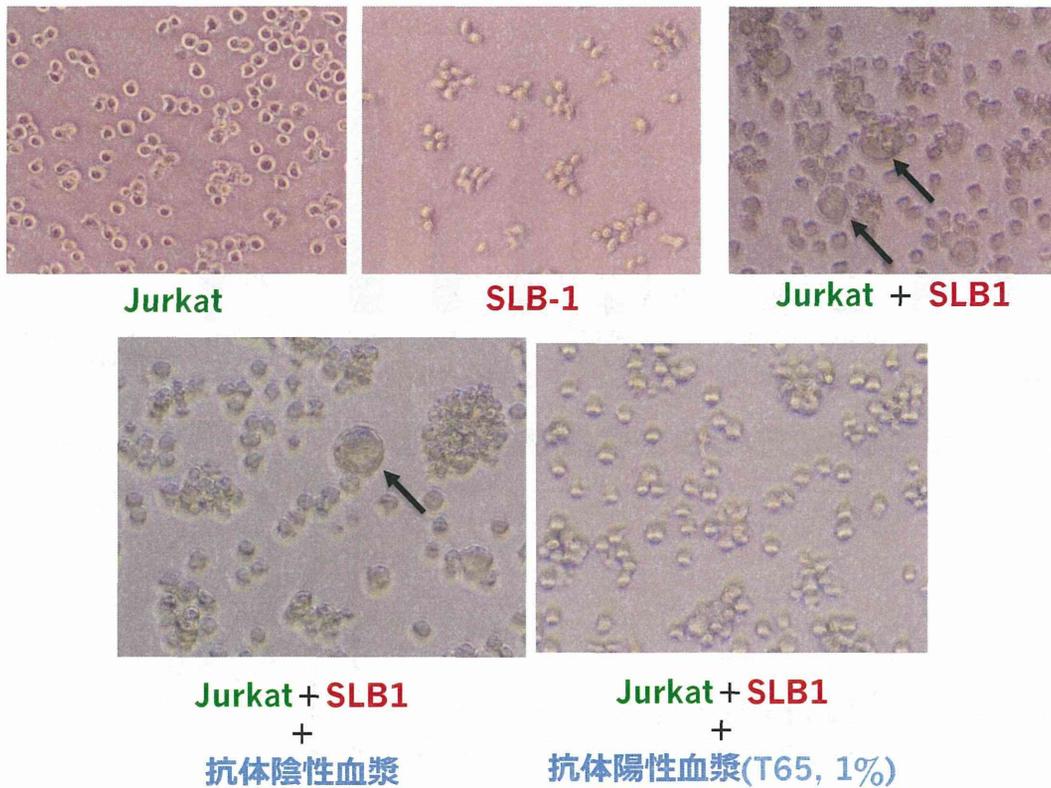


図6：抗体による Syncytium の抑制 Jurkat 細胞と SLB-1 を共培養するとシンシチウムが形成される。この時、抗体陽性血漿を添加するとシンシチウムの形成は抑制される。

図 07

### シンシチウム形成抑制効果における抗体濃度依存性(T23)

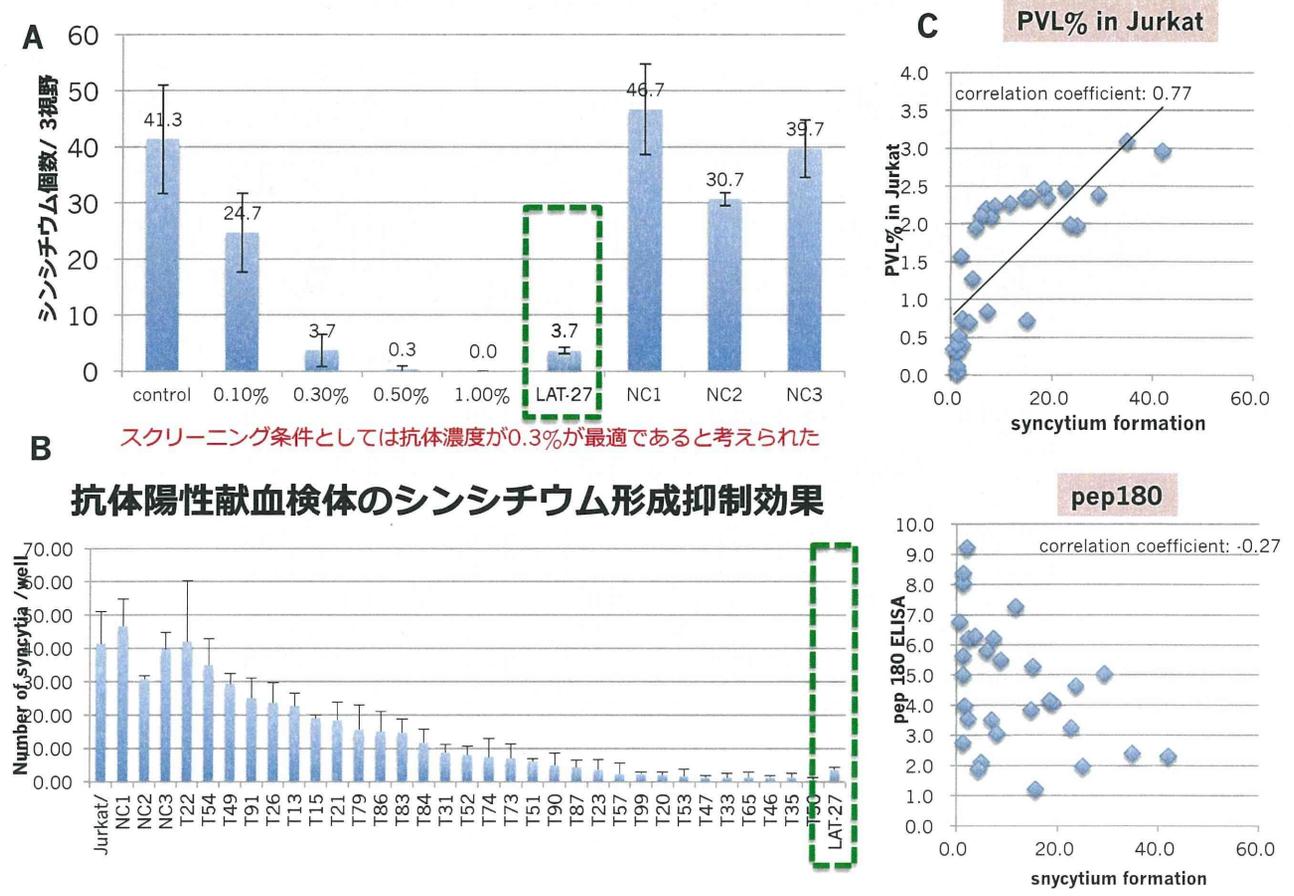


図 7 : A) シンシチウム形成抑制効果における抗体濃度依存性 (T23) B)抗体陽性献血検体のシンシチウム形成抑制効果 C) 各種パラメーターとの相関関係

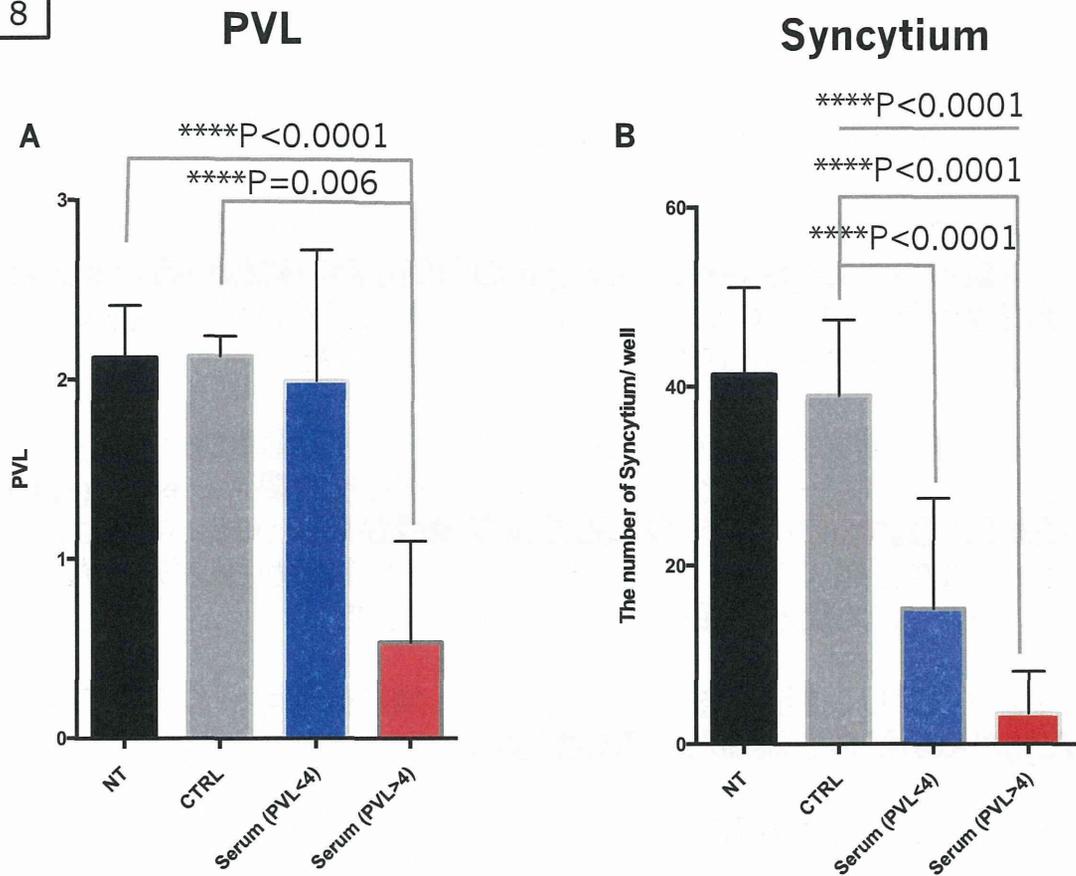


図 8 : PVL が 4 % 以上のサンプルはウイルス感染価・シンシチウム形成を有意に阻害する A) MT-2 と Jurkat 細胞の共培養によるウイルス感染阻害実験結果 B) SLB-1 と Jurkat 細胞の共培養によるシンシチウム形成阻害実験結果