

201420057A

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  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 水上 拓郎

平成 27 年(2015 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  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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 26 年度 総括研究報告書

研究代表者 水上 拓郎

平成 27 年(2015 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, 蕎麦田理恵子, 野島清子	
II.	研究成果の刊行に関する一覧表.....	P.57
III.	研究成果の刊行物・別刷.....	P.61

## I. 総括研究報告

総括研究報告書

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	山口 一成	国立感染症研究所	血液・安全性研究部	
研究分担者	佐竹 正博	日本赤十字中央血液研究所	副所長	
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	蕎麦田 理英子	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。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チ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・あるいはシンシチ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、その有効性をヒト化マウスを用いて検討した。その結果、PVL4 以上の陽性血漿から製造された抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンを投与したマウスは何れも観察期間内 (感染後 25 日迄) HTLV-1 感染細胞の出現を認めず、HTLV-1 感染を完全に阻止している事が明らかとなった。今後は、PVL4 以下の検体から製造された HTLV-IG などを用い、有効性を確認し、原料血漿基準案を策定するとともに、安全性についてより詳細に評価する必要があると考える。

A. 研究目的

成人T細胞白血病 (ATL) はヒトT細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) の感染によって起こる

末梢性 T 細胞の腫瘍性疾患である。一般的に、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と考えられている。感染のルートとしては輸血・性交渉・母子感染が考えられるが、輸血は既にスクリーニングが実際され対策が講じられている事からも、現在では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ている。感染が確認された妊婦については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。その結果、HTLV-1 の流行地であった長崎県では、1950 年には約 6%であったキャリア率は 2010 年には 0.06%まで減少した。しかし一方で近年の疫学的研究結果から、HTLV-1 の感染が、九州以外の都市部では寧ろ増加傾向にあることが明らかとなった。また驚く事に母子感染対策として、完全人工栄養法を選択しても、約 3%の HTLV-1 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と共に、母子感染予防法の開発、治療薬の開発が望まれて来た。

ウイルスの新生児感染が問題となった B 型肝炎ウイルス (HBV) 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) や B 型肝炎ワクチンが開発され、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。HBV 感染予防と同様に HTLV-1 抗体陽性血漿由来のグロブリン製剤を用いること HTLV-1 感染防止が可能であると考えられ、三好らの研究からも HTLV-1 陽性血漿から精製した抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリン (HTLV-IG) が、ウサギモデルにおいて母子感染を抑制する事が明らかとなっている。

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) の開発し、その有効性を再検討すると

共に、2) *in vitro* の HTLV-1 感染モデルを構築し、HTLV-IG の有効性を検討すると共に、より有効な抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリン製剤を作る為に必要な原料血漿基準となりうるような指標を探す事を目的とした。さらに有効性が確認された場合は *in vitro* モデルのみならず、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い、*in vitro* スクリーニングで得られた原料血漿基準を検証する事を目的とした。

## 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、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、低コピーのものなど様々な検体を提供していただき、更に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する目的で各種抗原 (p24 (gag: capsid), gp46-21 (env), pep180 (env)) の ELISA 解析と western blot 解析 (p19, p24, p53, gp46) を行い、約 30 検体の性状解析・評価を行った [佐竹・田所班]。

### 2. *in vitro* スクリーニング系の開発

これらの陽性血漿の有効性を検討する為に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、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, TL-Om1) にマイトマイシン C 処理 (50ug/mL) 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

のウイルス感染価を評価する。特に、プロウイルス量 (PVL)を用いた評価に関しては MT-2 と Jurkat 細胞を用いることで評価可能であることが明らかとなったのでそれを用いた。また機能アッセイとして、HTLV-1 感染に依って引き起こされるシンシチウム形成を応用し、SLB-1 と Jurkat 細胞の培養系を用いた。この二つの系で 30 種の HTLV-1 陽性血漿の添加実験を行い、感染抑制能を評価する一次スクリーニングを実施する。更に、感染防御能の高かった検体をしらべ、どのようなパラメーターが有効だったかを検証する。

### 3. 実験室レベル準拠 HTLV-IG の製造

HTLV-1 抗体陰性血漿は、献血血液の研究開発等での使用に係る申請を行い、承認後に日本赤十字社より譲渡されたものを使用した。

HTLV-1 抗体陽性検体は日本赤十字社より譲渡された。CLEIA 法および、IF 法にて陽性を確認したものを使用した。

#### コーンのエタノール分画溶離液

血漿 20~40mL を 4°C でゆっくり融解し、4°C、16000xg で 25 分間遠心し、沈殿上清に分画した。脱クリオ画分を低温下で攪拌しながら pH 調整用酢酸緩衝液 pH4.0 を添加して調整し、検体の一部を採取して室温で pH7.5 付近となるよう調整した。次に -3°C で攪拌しながら、最終濃度が 8% となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加し 15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を -1°C、10,000xg で 15 分間遠心し、上清を回収した。8% エタノール上清画分を低温化で攪拌しながら、pH が 6.75 付近になるように調整し、-5°C で攪拌しながら最終濃度が 25% となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加した後、15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を -1°C、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿のグロブリン分画を得た。沈殿容量の 20 倍量のリン酸緩衝液 pH 6.25 で懸濁し、-5°C で攪拌しながら、最終濃度が 20% と

なるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加し 15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を -5°C、10,000xg で 15 分間遠心し、沈殿を回収した。沈殿容量の 20 倍量のリン酸緩衝液 pH 6.25 で懸濁し、-6°C で攪拌しながら、最終濃度が 17% となるように約 15uL/秒の速度でエタノールを添加し 15 分間反応させた。エタノール処理後の溶液を -5°C、10,000xg で 15 分間遠心し、上清を回収した。尚、Cohn のエタノール分画は、**Biologicals** (1994) 22,13-19 に準じて行った。

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.

#### 回収率および精製度の確認

高速液体クロマトグラフ装置を用いて、サイズ排除クロマト蔵フラフィー (G3000SWXL : ゲルろ過カラム (東ソー)) により分析を行った。回収率は、原料として用いた血漿および最終精製品を G3000SWXL カラムで分析した際の、グロブリンピークの面積値を用いて算出した。精製度は、最終精製品全体のピーク面積の総和に対する、グロブリンモノマーピークの面積%を用いて算出した。

### 4. ヒト化マウスの作成

HTLV-IG の in vivo の有効性を明らかにする目的で、超免疫不全マウスである NOG マウス (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic) にヒト PBMC を移植し、ヒト化マウスを作成する。また、移植後の抹消血中の human CD45, human CD4, human CD8 の割合をフローサイトメトリー (JSAN, Baybioscience 社) で調べ、ヒト細胞の定着を確認する [水上班]。また、長期感染モデルを構築する為に、NOJ マウス (NOD/ Scid/Jak3) にヒト CD34 細胞を intrahepatic に移植し、造血を

再構築させた後に HTLV-1 を感染させるモデルを構築する[大隈・浜口班]。

#### 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 PBMC 移植 3 日後に、マイトマイシン C 処理 (MMC, 50ug/mL) した MT-2 細胞を腹腔内移植し、感染させる。MMC 処理 MT-2 による感染後 10 日前後の抹消血、腹腔内洗浄液、脾臓細胞を分離し、白血球数、human CD45, mouse CD45, human CD4, human CD8 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、腹腔内細胞、脾臓の genomic DNA を抽出し、HTLV-1 の感染の有無を確認する。また、脾臓・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 4-6um の切片を作成し、Hematoxylin- Eosin 染色、PAS-Hematoxylin 染色を行い、病理所見を明らかにすると共に、免疫組織化学を行い、T 細胞 (CD3, CD4, CD8, Ki-67, CCR4, CD25, CD30), B 細胞 (CD20, CD79a) などの各種免疫組織化学染色を行い、各種細胞の動態を明らかにする。

### C. 研究結果

#### 1. HTLV-1 陽性血漿の性状解析

日本赤十字社が実施した HTLV-1 スクリーニングで陽性となった検体中から、感染ウイルス量 (PVL) の値からウイルス量の高値のもの(4以上)と、中間値のもの(0.49-1.39)、さらにそれよりも低値のもの(0.01以下)の3つの群に分類した。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 などへの反応性を検討し、サンプルの性状を明らかにした。

#### 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 (MMC, 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、MT-2 に関しては、特に容量依存性が高く、再現性共に優れていたため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 HTLV-1 感染後にシンシチウム (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た。そこで、今後は感染細胞として 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 [図 1]。

#### 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

2 で明らかとなった様に、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。抗体の添加には感染細胞と非感染細胞を(1) 共培養後に添加する方法と、感染細胞に事前に混和して共培養する方法があるが、同じ検体を用いて検討した結果、何れの方法でも抑制率に差はなかったため、本実験系ではより直接的な影響を確認する為に細胞混和後に血漿を添加処理する方法を用いた。また、添加量に関しては当初 1% の未精製の血漿を用いたが、この場合、何れの検体



も高い抑制率を示し、ロット差を評価する事が難しいので、1.5%, 1%, 0.5%, 0.1%で濃度をふり、至適条件を再検討した。その結果、0.5%添加によって、検体間差が確認できる事が明らかとなった。そこで、MMC 処理した MT-2 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。そこで、それぞれの検体の特性と感染抑制率に関し、各種パラメーターの相関を調べた結果、感染抑制能は PVL 値と非常に良く相関することが明らかとなった [図 2]。

#### 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シンシチウムの形成抑制を指標に、検体の評価を行った。条件設定の為に血漿濃度を振って実験を行うと、0.3%の濃度で検体間の違いが明確に出来る事が明らかとなった。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。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、各種パラメーターとの相関を調べた結果、感染抑制能と PVL との間で非常に良く相関することが明らかとなった[図 3]。

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。更に日本赤十字社献血由来、HTLV-1 抗体陽性血漿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 の力価が高い血漿の感染抑制効果が高いことが明らかとなった。また、シンシチウム形成を抑制する系を立ち上げ、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、同様に PVL%が高く、env, gag の力価が

高い血漿の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。特に PVL 4 以上の検体の抑制効果は統計学的にも有意であったので、これを仮の原料血漿基準とした [図 4]。

#### 4. 抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンの製造

血液製剤メーカーが実際に原料血漿から免疫グロブリン製剤を製造する際に用いるコーンの血漿エタノール分画法に準じて、実験室レベルのコーンエタノール分画法を構築した[図 5]。

ヒト血漿を原料にして (図 5 左下、血漿中の黒矢印がグロブリン) にして、グロブリンを精製した (図 5 右下)。グロブリン粗精製分画である PII+III には、グロブリン凝集体が確認されたが、17%エタノール分画によりこれを除く事が出来た。最終製品の精製率は 97%以上であった。精製効率は約 37%であった。

#### 5. ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染系の構築

次に、PVL 4 以上の検体が有意に感染を抑制する *in vitro* の結果を *in vivo* で確認する目的で、まず超免疫不全マウスである NOG マウス (NOD. Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Sug/Jic) にヒト PBMCs を移植し、11 日目、25 日目の抹消血中の human CD45, mouse CD45 細胞、CD4 細胞、CD8 細胞の割合をフローサイトメトリー (JSAN, Bay Bioscience 社) で調べ、ヒト化マウスを構築した。その結果、何れも高い割合でヒト CD45 細胞及び CD4 陽性の T 細胞の定着が認められたため、この系を HTLV-1 感染に用いる事とした。

感染実験としては、MMC 処理 (50ug/mL) をした MT-2 細胞をヒト PBMC 移植後 3 日目に移植し

て行った。移植後 11 日目、25 日目の末梢血中のウイルスを定量 PCR 法にて比較した。コントロール群には HTLV-1 陰性血漿より精製したヒト免疫グロブリン (Ccontrol-IG) を、検体投与群 (HTLV-IG) には PVL4 以上の血漿より分離・精製した抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンを投与した。投与法は抑制能を検討する為、感染の 5 日前、感染当日、感染後 5 日目に行った。

まず HTLV-IG、Ccontrol-IG 接種による NOG マウスの体重変化や血液学的な変化は認められなかった。また、ヒト CD45 細胞、CD4 細胞の定着率にも変化は認められなかった。感染モデルにおいては Control-IG を投与した個体では白血球数の増加傾向、血小板の有意な増加が接種後 11 日目に認められた。接種後 11 日目に、腹腔内細胞、脾臓細胞、末梢血を回収したが、Control-IG 投与群では増加傾向が認められるものの細胞数に有意差は認められなかった一方、ヒト CD45 細胞中の CD4 細胞は増加傾向にあった。HTLV-IG 接種群、Control-IG 接種群何れにおいてもヒト CD45 細胞、CD4 細胞の定着割合に変化は認められなかった[図 6-9]。

次に、回収した各細胞を Lymphoprep した後、単核球のみを分離精製し、genomic DNA を精製し、HTLV-1 の定量 PCR を行うと、Control-IG 投与群では接種後 11 日目において末梢血で 50%程度、脾臓で 40%前後、腹腔内細胞ではほぼ 100%の HTLV-1 感染が認められたが、HTLV-IG 接種群では何れの個体も感染が完全に抑制されて PVL はほぼ 0%となった[図 10]。この状態では、MMC 処理によって死んでいない細胞等の混入が 100%否定できないので MMC 処理及び未処理 MT-2 の細胞表面抗原がヒト CD45 陰性ヒト CD4 陽性であることを利用し、FACS でヒト CD45 細胞のみをソートし、genomic DNA を精製して再度定量 PCR を行った結果、同様の結果が得られ、HTLV-IG 投与群ではヒト血液細胞での感染が全く確認されなかった [図 11]。そこで、更に継続して経過観察をし、接種後 25 日目における末梢

血の PVL を検査した。その結果、HTLV-IG 投与群では何れのマウス個体からも HTLV-1 感染は認められなかった [図 12]。一方、Control-IG 投与群では PVL 値が 100 前後で安定した。

接種後 11 日目に、Control-IG 及び HTLV-IG 投与群より 3 匹個体を選び、各種組織を採材し、病理学的変化を解析した。

その結果、脾臓において、Control-IG 投与群では、リンパ球の浸潤・増加が認められたが、HTLV-IG 投与群では、脾臓内の浸潤は抑えられている傾向が認められた [図 13]。更に免疫組織化学染色を実施した結果、CD3 陽性細胞は Control IG 投与群では同様に増加傾向が認められ、HTLV-IG 投与群では抑制されている傾向が認められた [図 14]。同様の事は、CD4 [図 15], Ki-67 [図 16]でも認められたが、CD8 陽性細胞の局在等に関しては差が小さかった [図 17]。また、驚く事に、CCR4 [図 18], CD25 [図 19], CD30 [図 20] 陽性細胞は HTLV-IG 投与群ではその発現上昇が殆ど抑えられているにも関わらず、Control-IG 投与群では何れも発現上昇が認められた。一方、T 細胞とは異なり、B 細胞の挙動に関しては、CD20 [図 21], CD79a [図 22] の免疫組織化学染色を実施した結果、HTLV-IG 投与群で増加し、Control-IG 投与群で減少傾向が認められた。これらは今後、FACS 等で定量的に検討する必要がある。

次に、肝臓に於ける各種細胞の分布を検討した。肝臓では Control-IG 投与群ではリンパ球の浸潤が血管周囲、類洞周囲に多数認められるが、HTLV-IG 投与群ではそのような浸潤は僅かであった [図 23]。

CD3 陽性細胞は Control IG 投与群で増加傾向が認められ、HTLV-IG 投与群では抑制されている傾向が認められた[図 24]。同様の事は、CD4 [図 25], Ki-67[図 26]でも認められたが、CD8 陽性細胞の浸潤・増加には差がなかった [図 27]。また、驚く事に、CCR4 [図 28], CD25 [図 29], CD30 [図 30] 陽性細胞は HTLV-IG ではその発現上昇が殆ど抑えられているにも関わらず、Control IG 投与

群では何れも発現上昇が認められた。一方、T細胞とは異なり、CD20 陽性細胞 [図 31]、CD79a 陽性 B 細胞系列 [図 32] に関しては組織学的解析の結果、脾臓とは異なり大きな差は認められなかった。

次に肺に於ける各種細胞の分布を検討した。肺では Control-IG 投与群ではリンパ球の浸潤が血管周囲、肺動脈周囲に多数認められるが、HTLV-IG 投与群ではそのような浸潤は僅かであった [図 33]。

CD3 陽性細胞は Control IG 投与群で増加傾向が認められ、HTLV-IG 投与群では抑制されている傾向が認められた [図 34]。同様の事は、CD4 [図 35]、Ki-67 [図 36] でも認められたが、CD8 は差がない様に思われた [図 37]。また、驚く事に、CCR4 [図 38]、CD25 [図 39]、CD30 [図 40] 陽性細胞は HTLV-IG ではその発現上昇が殆ど抑えられているにも関わらず、Control IG 投与群では何れも発現上昇が認められた。一方、T 細胞とは異なり、CD20 陽性細胞 [図 41]、CD79a 陽性細胞 [図 42] に関しては組織学的解析の結果、肝臓と同様に大きな差は認められなかった。

以上をまとめると、HTLV-IG は、HTLV-1 の感染を抑制し、T 細胞における CD25 や ki67、CD30 や CCR4 などの発現上昇を抑え、感染細胞の各組織への浸潤を抑えている事が明らかとなった [図 43]。

#### 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, MT-2 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、非感染細胞として 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 MT-2 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 と 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。

そこで、PVL4 以上の検体を用いてグロブリンの精製を行った。我々が精製したグロブリンは 97%以上がグロブリンモノマーであり、凝集体を含まないため、アナフィラキシーショックを引き起こす可能性が低い。よって、ヒト化マウスを用いた動物実験系では、筋肉内、腹腔内、静脈内のいずれの投与ルートでも抗体の投与が可能であった。精製効率は約 37%であり、これは実際の血液製剤メーカーの精製効率と同程度であった。

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 NOG マウスを用いて、ヒト PBMC を移植し、ヒト化した後、MMC 処理後の MT-2 を感染させ、HTLV-1 感染モデルにおいて抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリン (HTLV-IG) の投与で感染が抑制できるかどうかを検討した。

その結果、Control-IG 群では感染が認められ、抹消血中に CD3, CD4, CD25, CCR4, CD25, CD30 陽性の HTLV-1 感染細胞と思われる細胞が存在し、また各種組織 (肺・肝臓・脾臓) へ浸潤している一方で、HTLV-IG 投与群では、ほぼ 100% 感染を抑制し、CD25, CCR4, CD25, CD30 の発現上昇も殆ど抑えられていた。更に、CD3, CD4 細胞の浸潤も抑えられており、HTLV-IG 投与によって、感染抑制とともに、それに伴う炎症反応も抑えられている事が示唆された。

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 *in vitro* で示すと共に、近年開発され、医薬品開発の有望なモデルマウスである「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 HTLV-1 感染予防を確認できた。ヒトへの外挿がより可能となっ

たといえる。

HTLV-1 抗体陽性血漿は日本で入手が可能で、高品質の HTLV-IG は日本発で開発・製造することが可能である。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) が併せて成功すれば、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。また、本研究課題では、PVL4 以上の検体が実際に感染を抑制する事を明らかにしたが、条件外の検体については検討していない。最終的な原料血漿基準を構築するには更に多くの検体を

## 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 と非常に良く関連することが明らかとなった。予備的スクリーニングの結果、PVL 4 以上の検体を用いて抗 HTLV-1 ヒト免疫グロブリンを精製した結果、製品レベルの免疫グロブリンの製造に成功した。これらを用いて、ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染系でその有効性を検討した結果、HTLV-IG が HTLV-1 感染を抑制し、感染細胞の各種組織への浸潤をも抑制する事が明らかとなった。よって、HTLV-IG が感染予防薬として有効である事が明らかとなった。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Kuramitsu M, **Okuma K**, Yamagishi M, Yamochi T, Firouzi S, Momose H, **Mizukami T**, Takizawa K, Araki K, Sugamura K, Yamaguchi K, Watanabe T, **Hamaguchi I**. Identification of TL-Om1, an adult T-cell leukemia (ATL) cell line, as reference material for quantitative PCR for human T-lymphotropic virus 1. *J Clin Microbiol*. 2015; 53: 587-96.
2. **Satake M**, Yamada Y, Atogami S, Yamaguchi K. The incidence of adult T-cell leukemia/lymphoma among human T-lymphotropic virus type 1 carriers in Japan. *Leuk Lymphoma*. 2015; 21:1-7.
3. **Mizukami T**, Momose H, Kuramitsu M, Takizawa K, Araki K, Furuhashi K, Ishii KJ, **Hamaguchi I**, Yamaguchi K. System vaccinology for the evaluation of influenza vaccine safety by multiplex gene detection of novel biomarkers in a preclinical study and batch release test. *PLoS One*. 2014; 9: e101835.
4. Kasama Y, **Mizukami T**, Kusunoki H, Peveling-Oberhag J, Nishito Y, Ozawa M, Kohara M, Mizuochi 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; 9: e91373.
5. 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

αIIbβ3 activation. *Transfusion*. 2014; 54: 1808-1816.

6. **Satake M.** Risk of transfusion-transmitted infection in Japan. *Rinsho Ketsueki*. 2014; 55: 2152-2161. (In Japanese)

7. **Sobata R,** Shinohara N, **Matsumoto C,** Uchida S, Igarashi S, Hino S, **Satake M, Tadokoro K.** First report of human immunodeficiency virus transmission via a blood donation that tested negative by 20-minipool nucleic acid amplification in Japan. *Transfusion*. 2014; 54: 2361-2362

8. Owada T, Kaneko M, **Matsumoto C, Sobata R,** Igarashi M, Suzuki K, Matsubayashi K, Mio K, Uchida S, **Satake M, Tadokoro K.** Establishment of culture systems for Genotypes 3 and 4 hepatitis E virus (HEV) obtained from human blood and application of HEV inactivation using a pathogen reduction technology system. *Transfusion*. 2014; 54: 2820-2827

9. Abe T, Shimada E, Takanashi M, Takamura T, Motoji K, Okazaki H, **Satake M, Tadokoro K.** Antibody against immunoglobulin E contained in blood components as causative factor for anaphylactic transfusion reactions. *Transfusion*. 2014; 54: 1953-1960

## 2. 学会発表

1. 栗林和華子, **水上拓郎,** 滝澤和也, 倉光球, 浅田善久, 岩間厚志, 松岡雅雄, **浜口功.** 成人 T 細胞白血病 (ATL)モデルマウスである HBZ トランスジェニックマウスにおける癌幹細胞の同定の試み. 京都 T 細胞カンファレ

ンス(KTCC) 2014 年 5 月 京都

2. **水上拓郎,** 百瀬 暖佳, 倉光 球, 滝澤 和也, 斎藤 益満, 古畑 啓子, 荒木 久美子, 石井 健, **浜口 功.** トキシコゲノミクスを応用した新規ワクチンアジュバント添加・インフルエンザワクチンの安全性試験法の開発. 第 41 回 日本毒性学会 2014 年 7 月 神戸

3. **大隈和,** 日吉真照, 滝澤和也, 斎藤益満, **浜口功.** CCR4 リガンド TARc を用いた新規抗 HTLV-1 分指標的治療薬の開発. 第 1 回 HTLV-1 学会 2014 年 8 月 東京

4. 栗林 和華子, **水上拓郎,** 滝澤和也, 倉光球, 浅田善久, 岩間厚志, 松岡雅雄, **浜口功.** HTLV-1 モデルマウスである HBZ-Tg マウスにおける癌幹細胞の同定と機能解析. 第 1 回 HTLV-1 学会 2014 年 8 月 東京

5. **蕎麦田理英子,** 松本千恵子, 内田茂治, 鈴木雅治, **佐竹正博, 田所憲治.** 輸血による HTLV-1 感染を引き起こすプロウイルス量の推測: 現行の輸血用血液製剤における HTLV-1 感染リスクの検証 第 1 回 HTLV-1 学会 2014 年 8 月 東京

6. **佐竹 正博,** 相良康子, 岩永雅子, **浜口功.** 献血者のデータから明らかになった HTLV-1 水平感染の実態. 第 1 回 HTLV-1 学会 2014 年 8 月 東京

7. **水上拓郎,** 滝澤 和也, 平松 竜司, 倉光 球, 百瀬 暖佳, 山口 一成, **浜口 功.** 造血組織における新たな一過性ニッチ細胞(TNCs)の同定とその多様な機能. 第 157 回 日本獣医学会 2014 年 9 月 札幌

8. Wakako Kuribayashi, **Takuo Mizukami,**

Kazuya Takizawa, Madoka Kuramitsu, Iwama Atsushi, Yoshihisa Asada, Masao Matsuoka, Isao Hamaguchi. Identification of cancer stem cells in an HBZ transgenic mouse model of ATL 第76回 日本血液学会 2014年10月大阪

9. **Takuo Mizukami.** System Vaccinology Enables to Evaluate the Safety of the Influenza Vaccine and the Adjuvant with a Multiplex Gene Detection System of Novel Biomarkers in the Pre-Clinical Study and Lot Release Test. Keystone symposia, 2014年10月11日 Seattle

#### 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 1

# 培養細胞を用いた *in vitro* 感染モデルの作成

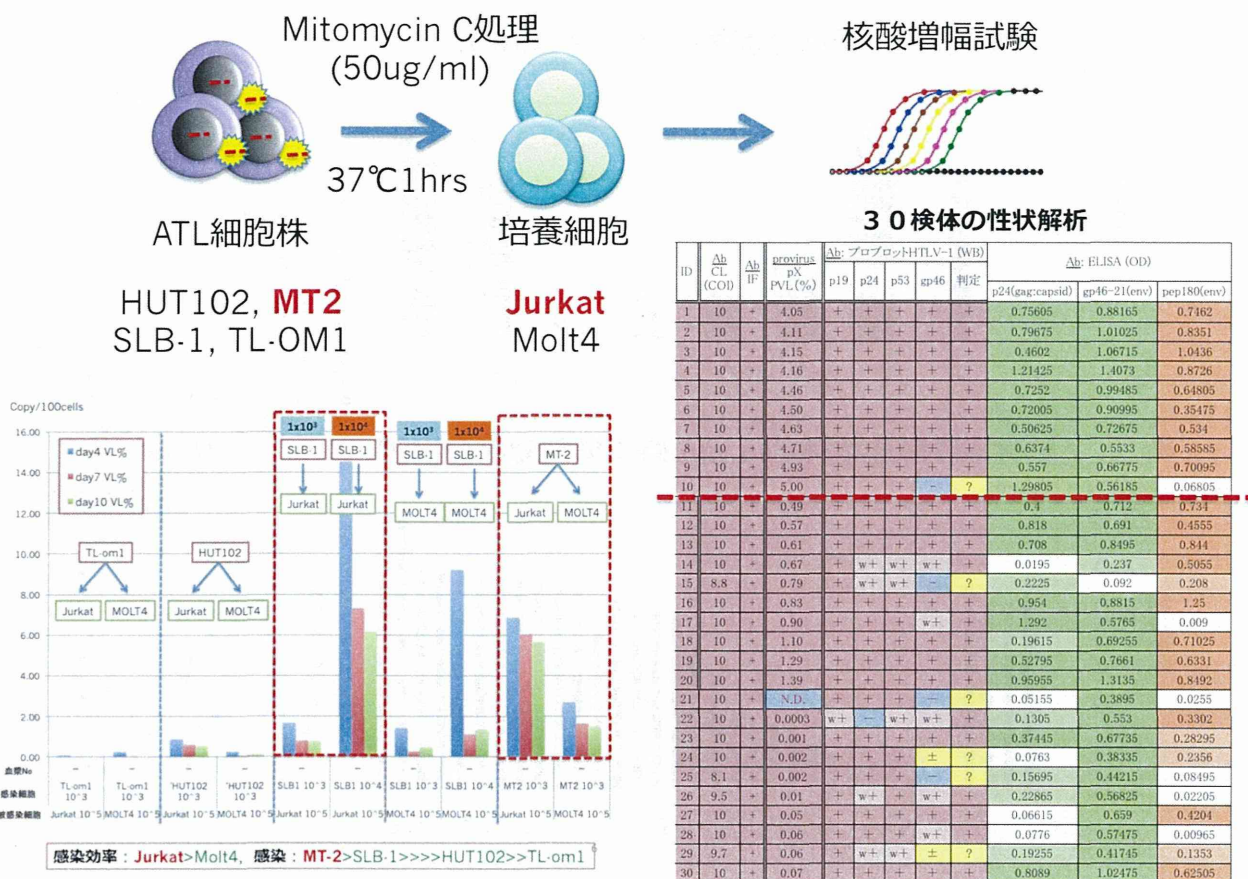


図 1: 培養細胞を用いた *in vitro* 感染モデルの作成 1。HTLV-1 感染細胞である HUT102, MT2, SLB-1, TL-OM1 をマイトマイシン C 処理し、その後、非感染系細胞である Jurkat 細胞や Molt 4 細胞と共培養し、ウイルス感染を模す *in vitro* 感染系を構築する。本研究課題の予備実験で用いた日本赤十字社の HTLV-1 陽性血漿のリスト。

図2

HTLV-1陽性血漿の感染阻害効果 (*in vitro*モデル-1)

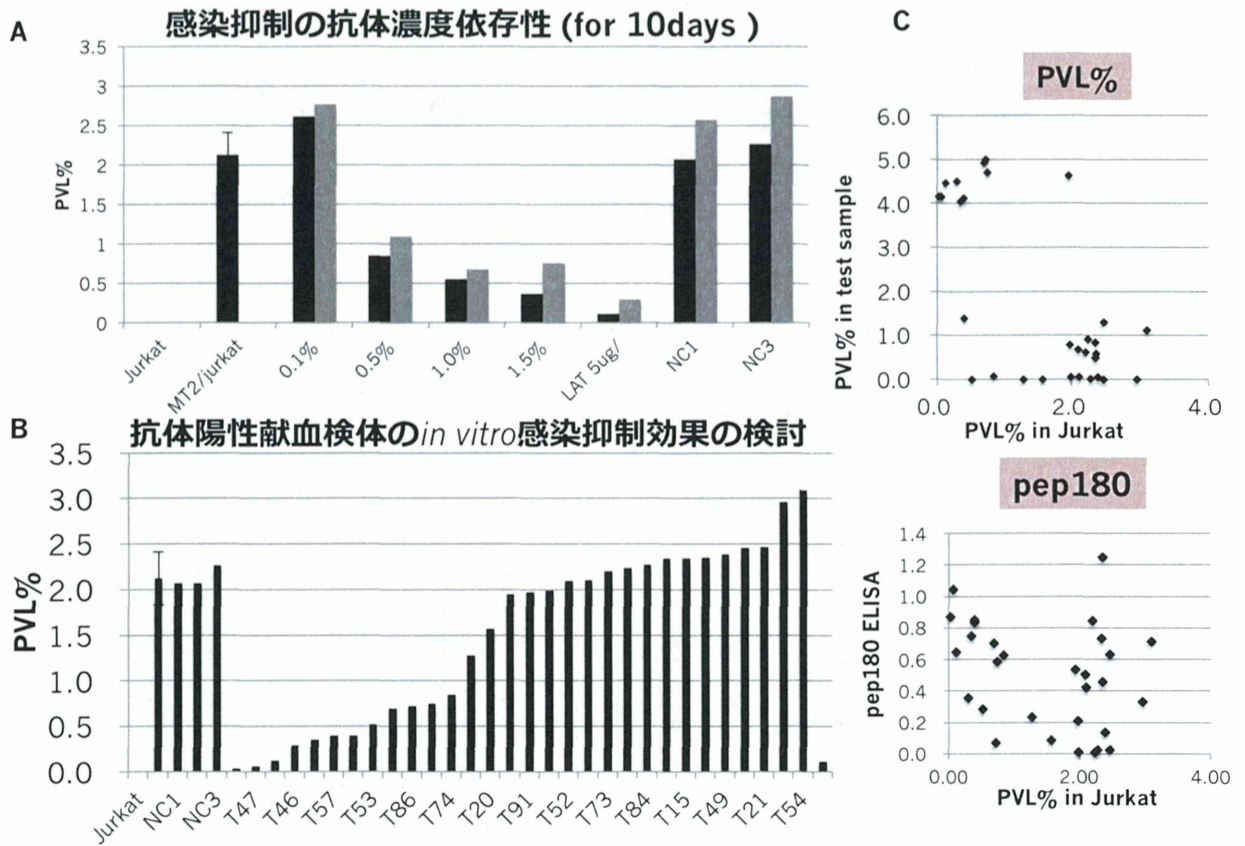


図 2：培養細胞を用いた *in vitro* 感染モデルの作成 2。A) 感染抑制の濃度依存性の検討. 0.5%が最適濃度であることが明らかとなった B) 抗体陽性献血検体の *in vitro* 感染抑制効果の検討 C) 各種パラメーターとの相関関係



図3

### HTLV-1陽性血漿の感染阻害効果 (*in vitro*モデル-2)

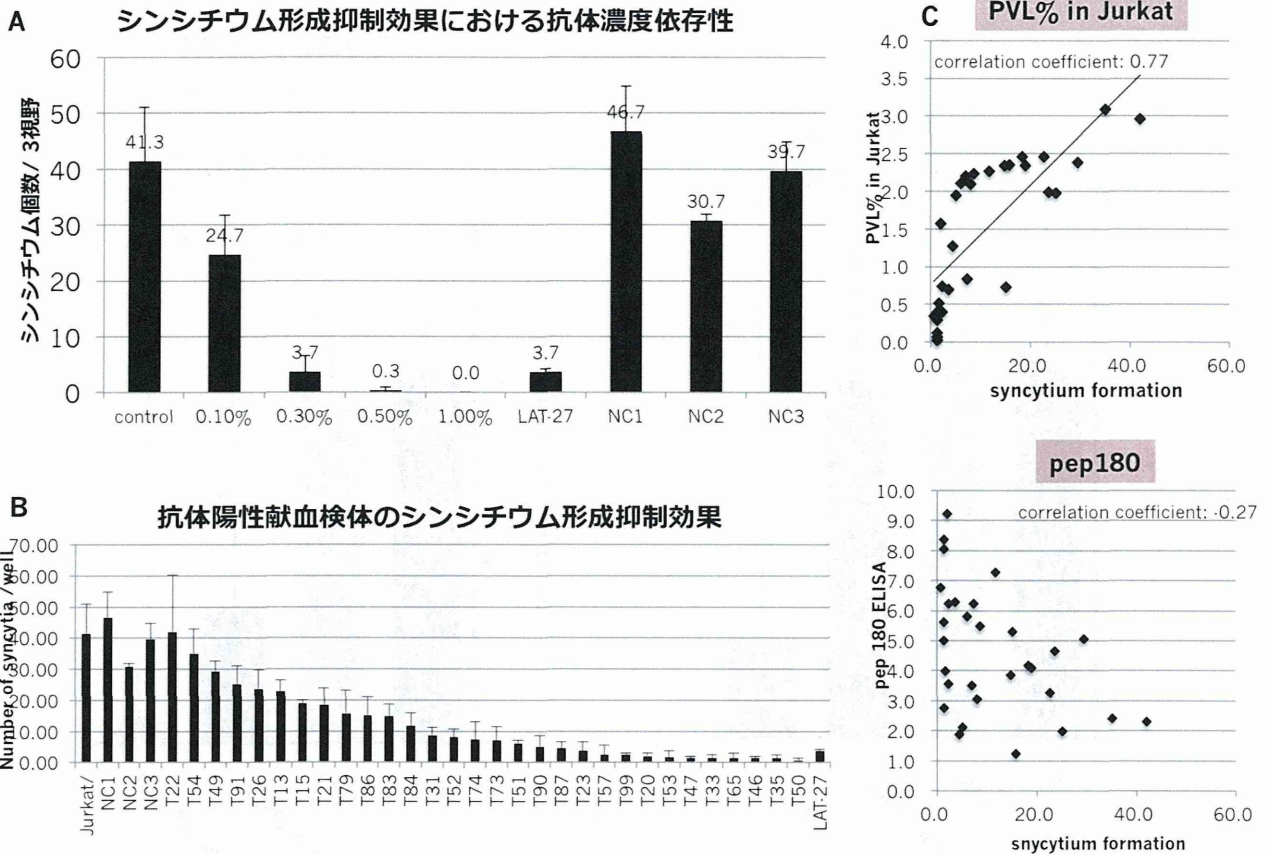
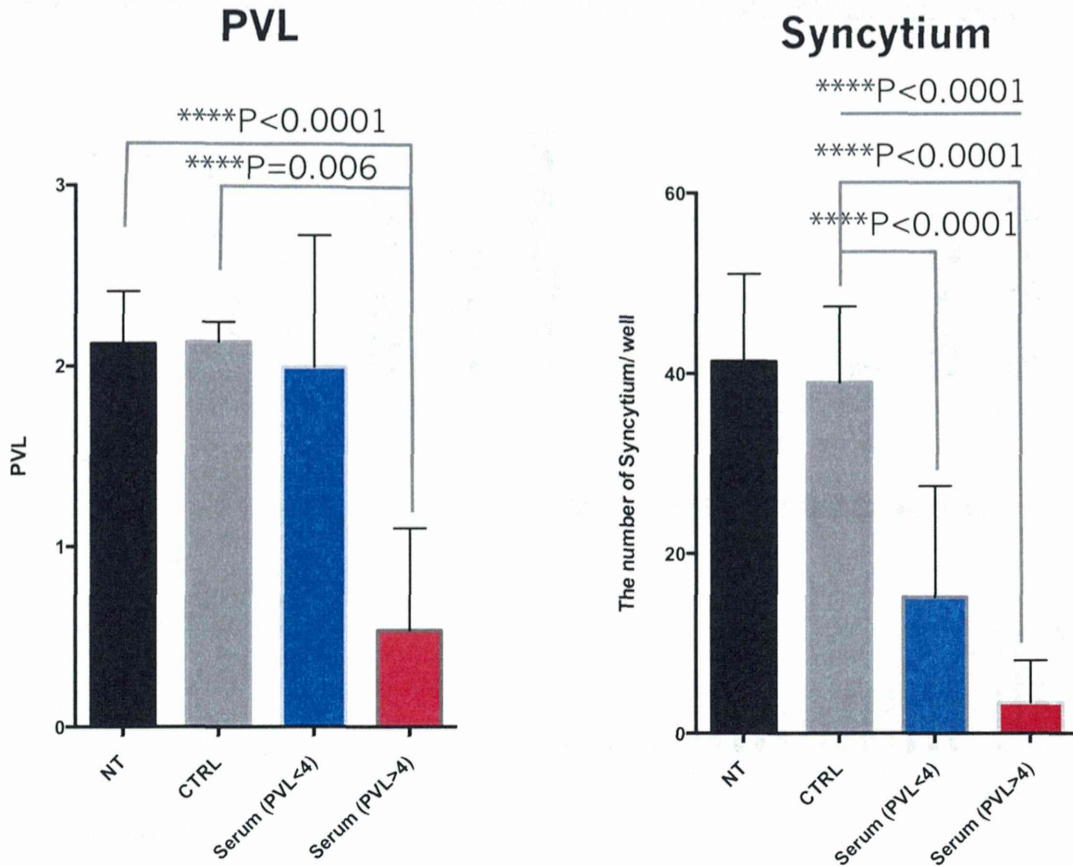


図3: A) 抗体によるシンシチウムの抑制。Jurkat細胞とSLB-1を共培養するとシンシチウムが形成される。この時、抗体陽性血漿を添加するとシンシチウムの形成は抑制される。シンシチウム形成抑制効果におけるA) 抗体濃度依存性の検討を行った。B) 抗体陽性献血検体のシンシチウム形成抑制効果 C) 各種パラメーターとの相関関係。

**図4** HTLV-1陽性血漿の感染阻害効果 (*in vitro*モデル1&2)



**図 4** : HTLV-1 陽性血漿の感染阻害効果。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 左) 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 右) 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

図 5

## HTLV-1陽性血漿からのグロブリンの精製

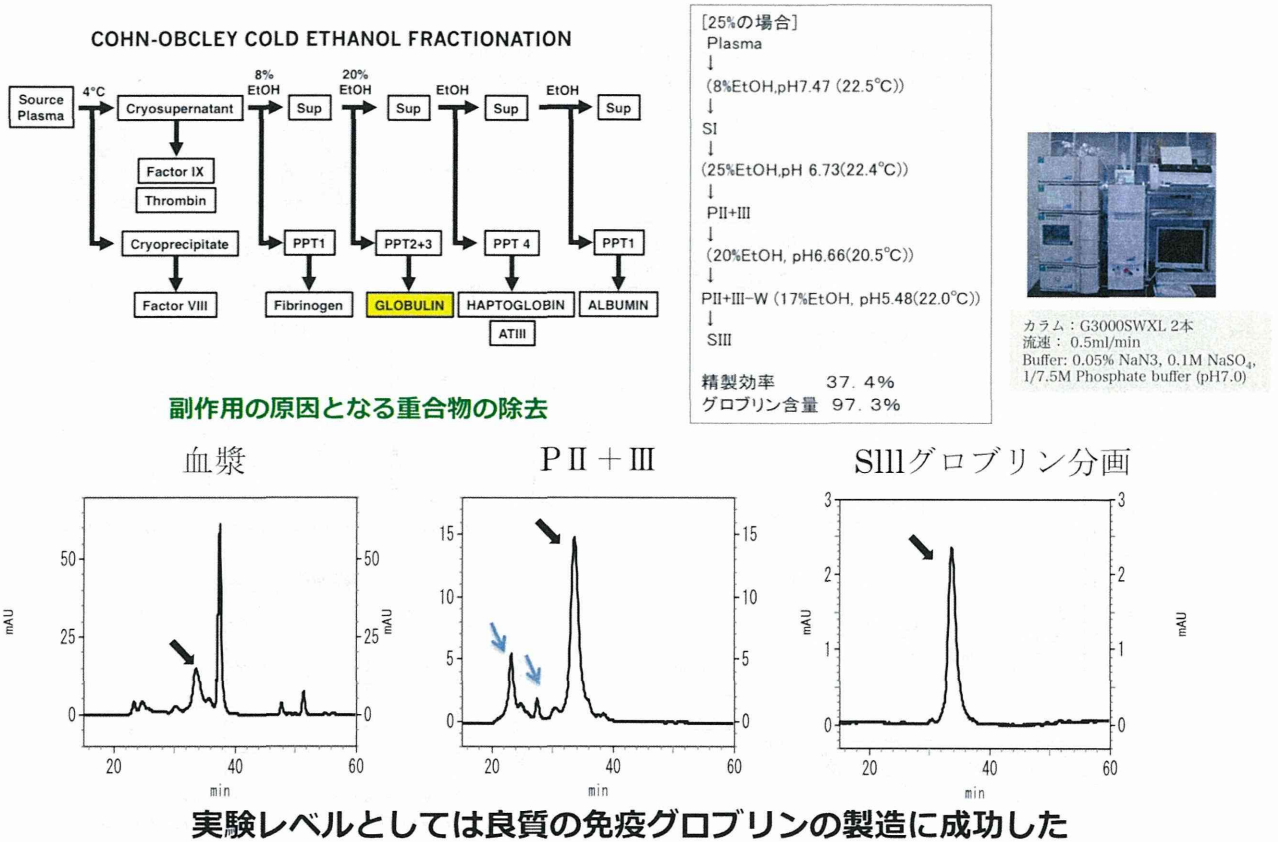


図 5 : 血漿からのグロブリンの精製。精製の方法は Louie RE *et al.*,1994 に従い行った。その結果、副作用の芸院となる重合物の除去に成功し、グロブリン含有率 97.3%のサンプルを精製することに成功した。参考文献 : Louie RE, Galloway CJ, Dumas ML, Wong MF, Mitra G. Inactivation of hepatitis C virus in low pH intravenous immunoglobulin. *Biologicals*. 1994; 22: 13-19.

図 6

## 抗体投与NOGマウスにおけるT細胞の再構築

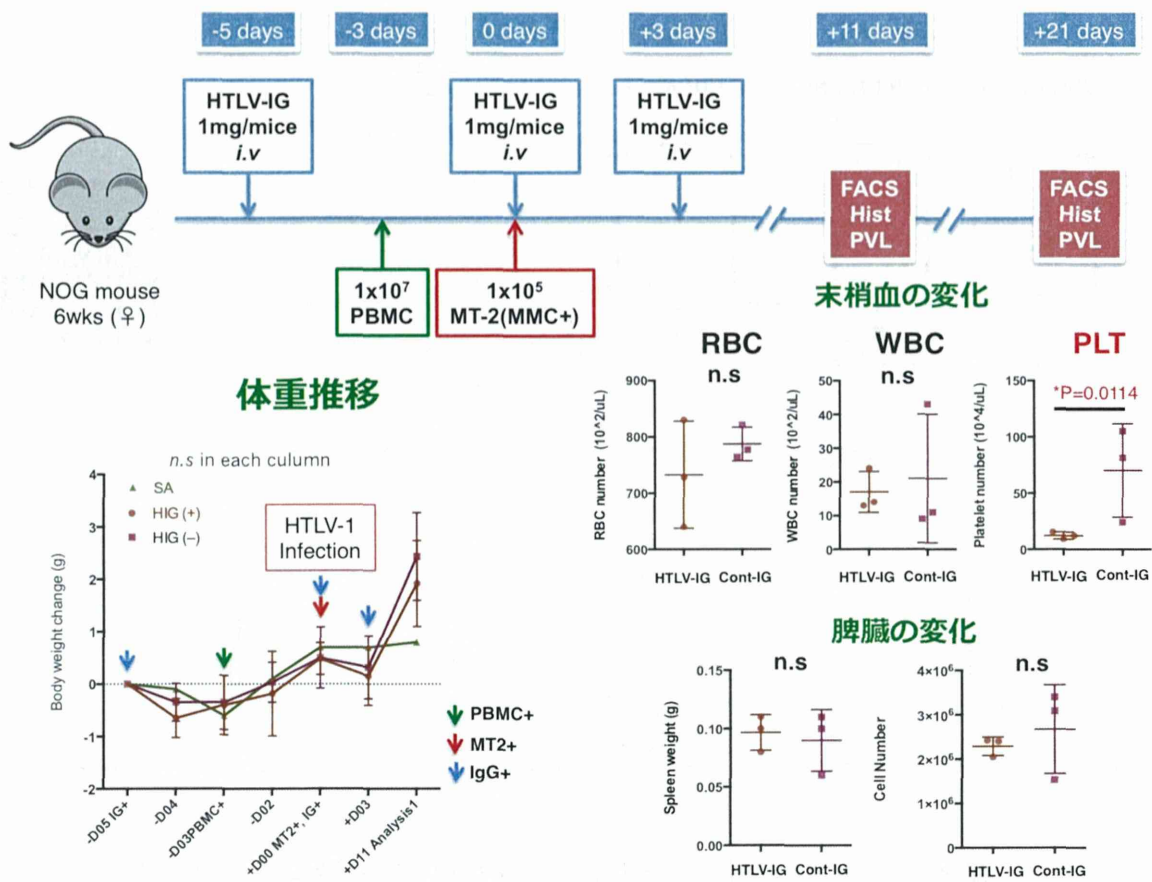


図 6: ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染実験及び HTLV-IG の有効性の検討。HTLV-1 感染 5 日前より Control-IG 及び HTLV-IG を投与した。感染 3 日前にヒト PBMC を移植し、MT-2 細胞を移植することで、HTLV-1 を感染させた。感染時とともに更に 3 日後にも Control-IG 及び HTLV-IG を投与した。HTLV-1 感染 11 日目までの体重推移を示す。何れも有意な差は認められていない。末梢血、脾臓細胞の血液学的解析を行った結果、Control-IG 投与群では PLT (血小板値) の有意な増加が認められたが、白血球数などは有意差を認めなかった。ただし、全体的に Control-IG 投与群で増加傾向にあった。