

2018年3月15 日(土)
中央合同庁舎第5号館 専用第22会議室
HTLV-1 対策推進協議会

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構研究費
新興・再興感染症制御プロジェクト

臨床応用を目指した抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンによるHTLV-1感染予防法の開発と安全性に関する研究

水上 拓郎

**国立感染症研究所
血液・安全性研究部**

研究目的

HTLV-1総合対策(2011年)において
発症予防・治療・感染防止での対策が講じられた。



輸血感染

水平感染

母子感染の予防



断乳しても3~5%の母子感染が発生
現状では感染予防薬が存在しない



抗HTLV-1ヒト免疫グロブリン製剤の開発

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 (*in vitro*)



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(日本赤十字中央血液研究所)
田所憲治先生(日本赤十字中央血液研究所)

30種類の
HTLV-1陽性
献血血液



高力価HTLV-IGを用いたIn vitro系を用いた感染防止実験

HTLV-1
感染細胞



HTLV-1
非感染細胞



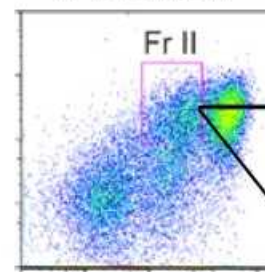
高力価IG
通常IG



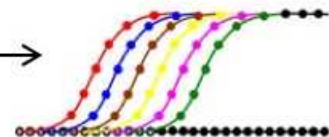
60日



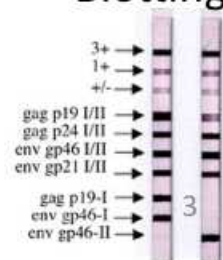
FACS解析



核酸増幅試験



Western
Blotting



MT-2

+

Jurkat細胞



プロウイルス量

SLB-1

+

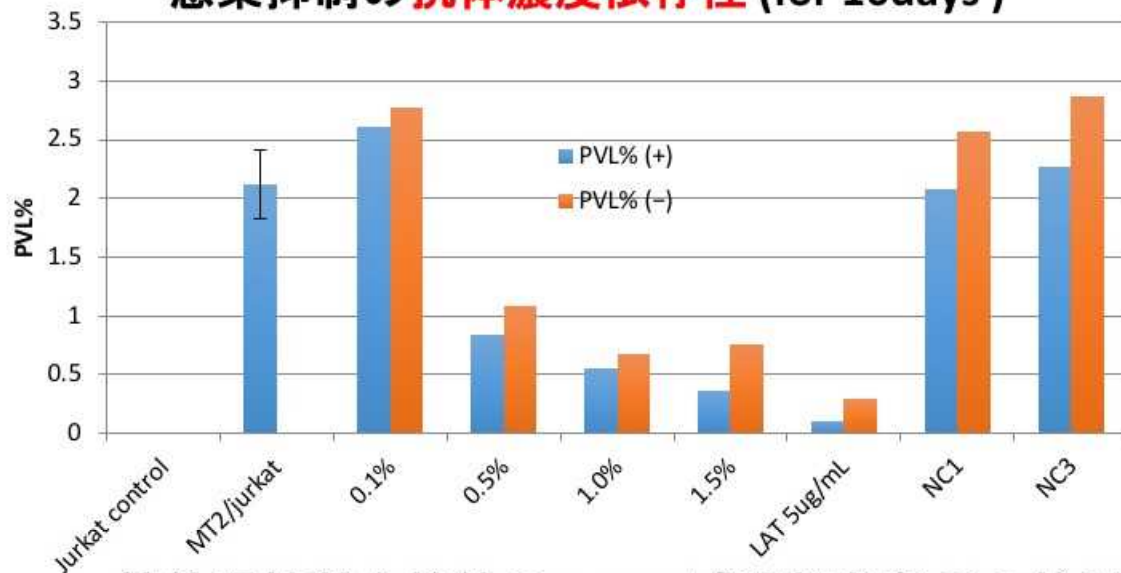
Jurkat細胞



シンシチウム形成

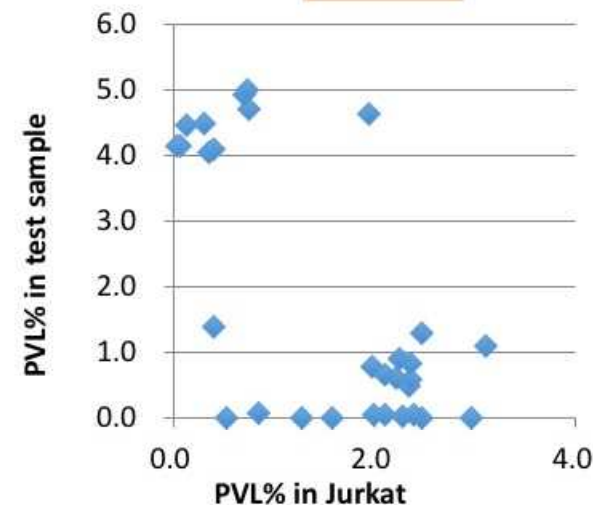
HTLV-1陽性血漿の感染阻害効果 (*in vitro*モデル-1)

感染抑制の抗体濃度依存性 (for 10days)



PVLとの相関ある

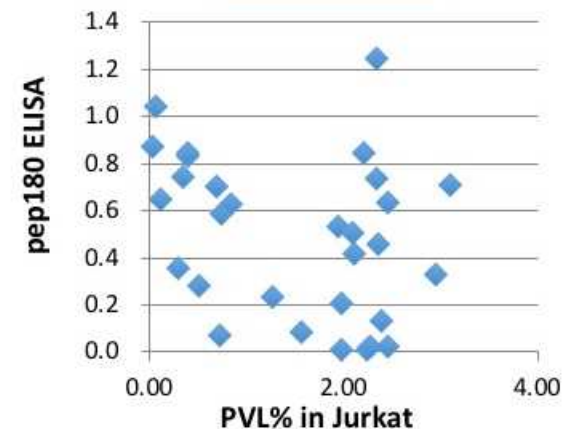
PVL%



抗体陽性献血検体の*in vitro*感染抑制効果の検討

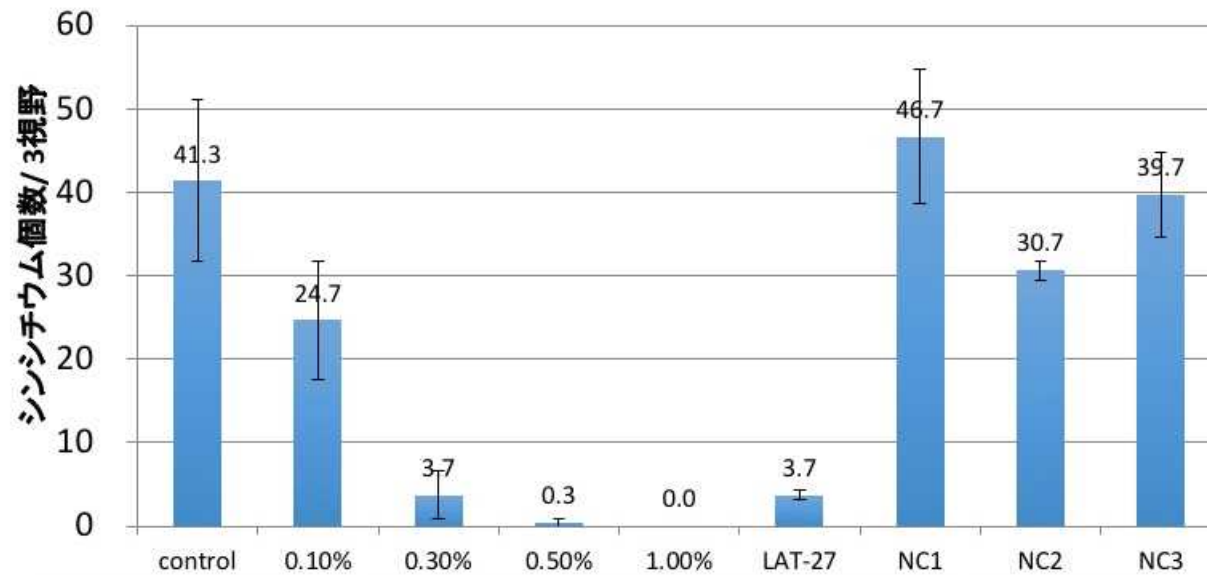


pep180

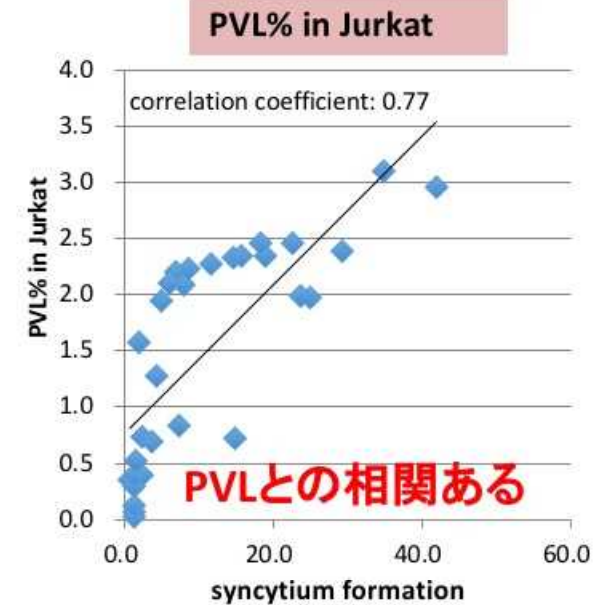


HTLV-1陽性血漿の感染阻害効果 (*in vitro*モデル-2)

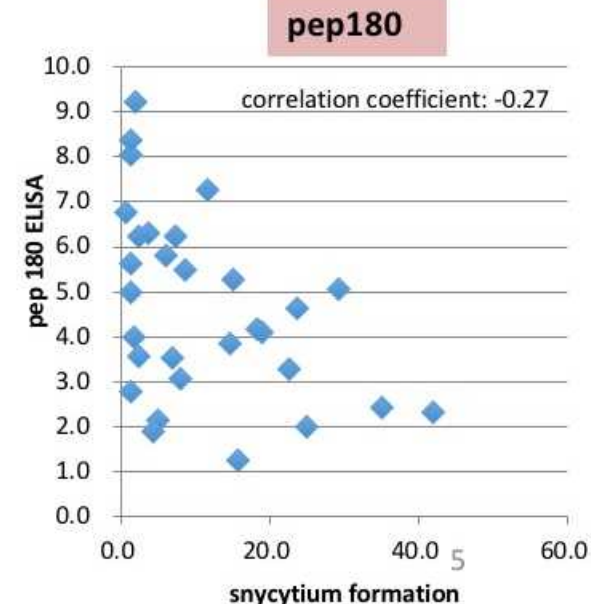
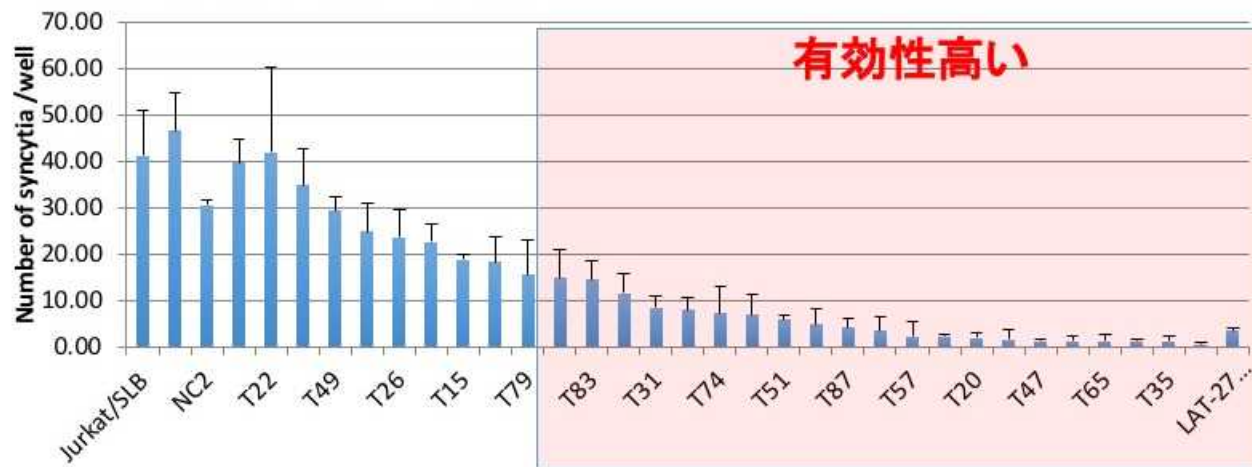
シンシチウム形成抑制効果における抗体濃度依存性



スクリーニング条件としては抗体濃度が0.3%が最適であると考えられた

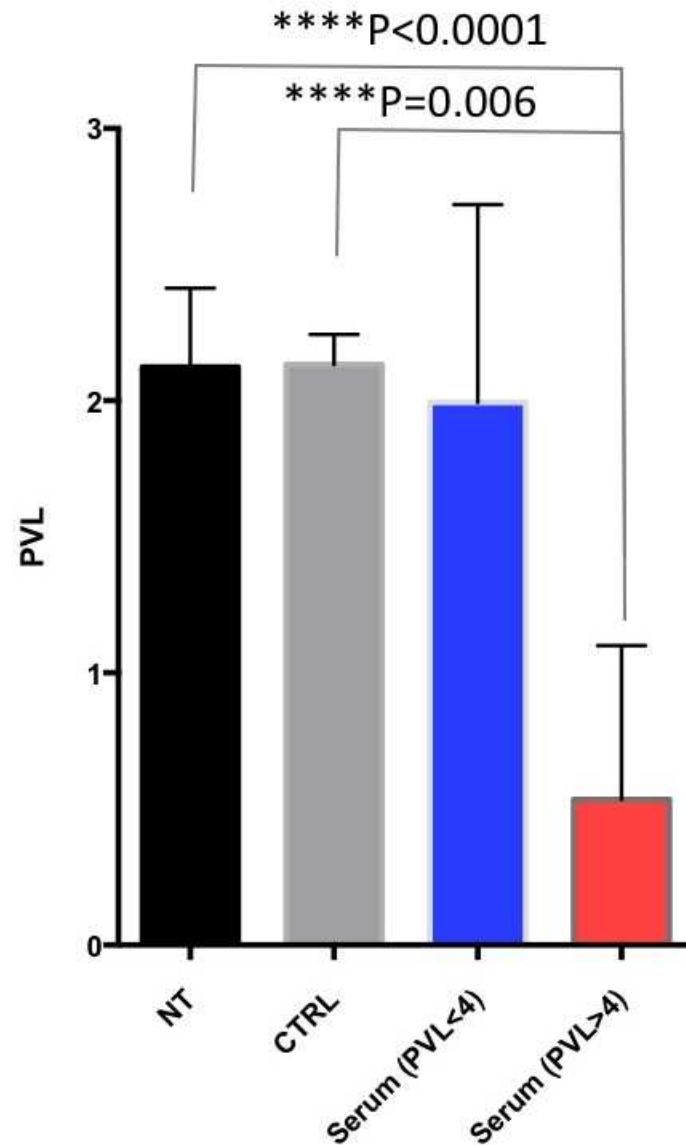


抗体陽性献血検体のシンシチウム形成抑制効果

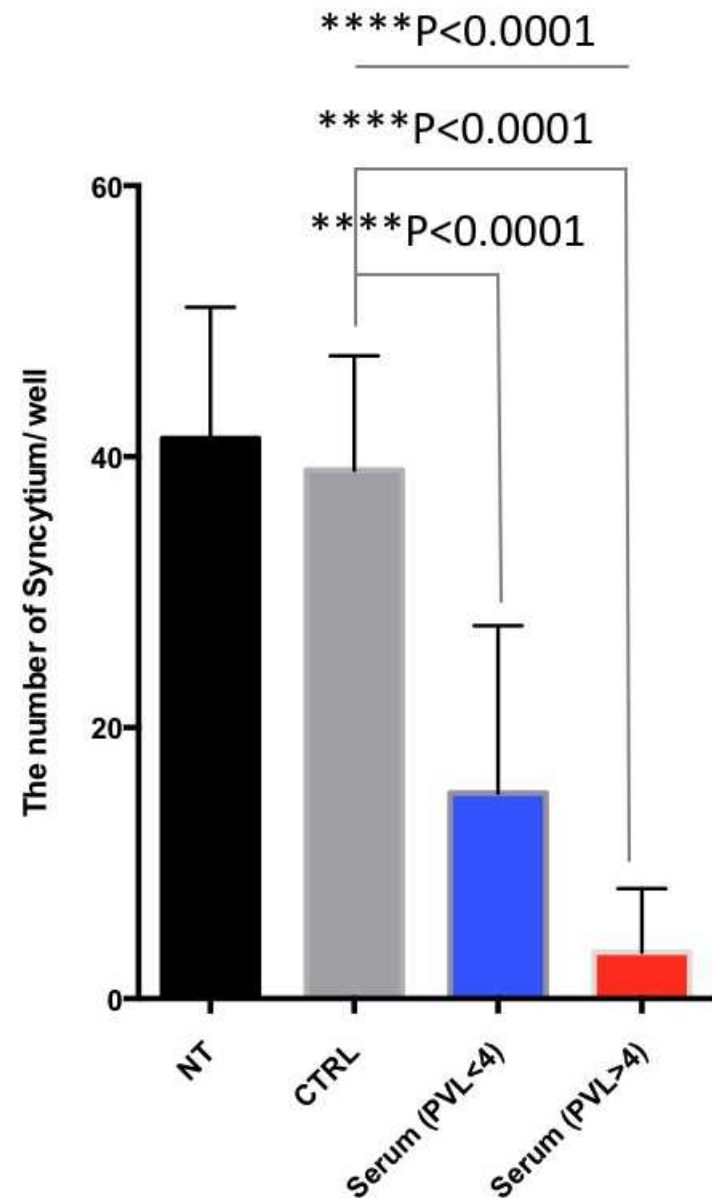


HTLV-1陽性血漿の感染阻害結果 (*in vitro*モデル1&2)

PVL

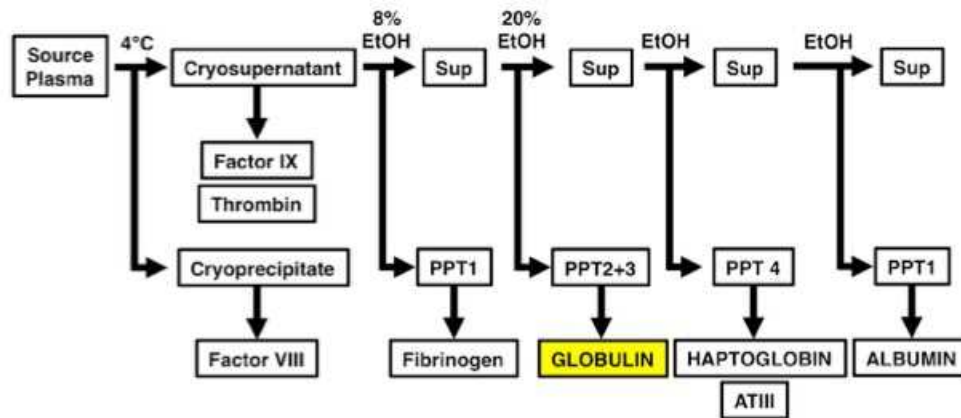


Syncytium



HTLV-1陽性血漿からのグロブリンの精製

COHN-OBCLEY COLD ETHANOL FRACTIONATION



副作用の原因となる重合物の除去

[25%の場合]

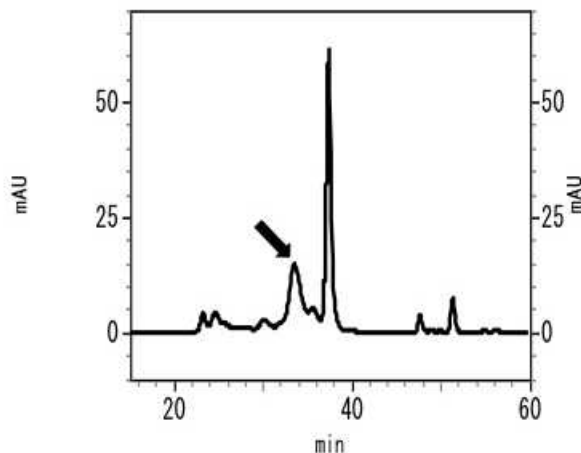
Plasma
↓
(8%EtOH, pH7.47 (22.5°C))
↓
SI
↓
(25%EtOH, pH 6.73(22.4°C))
↓
PII+III
↓
(20%EtOH, pH6.66(20.5°C))
↓
PII+III-W (17%EtOH, pH5.48(22.0°C))
↓
SIII

精製効率 37.4%
グロブリン含量 97.3%

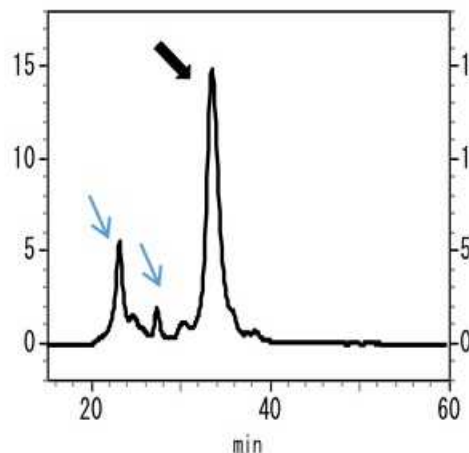


カラム: G3000SWXL 2本
流速: 0.5ml/min
Buffer: 0.05% NaN₃, 0.1M NaSO₄,
1/7.5M Phosphate buffer (pH7.0)

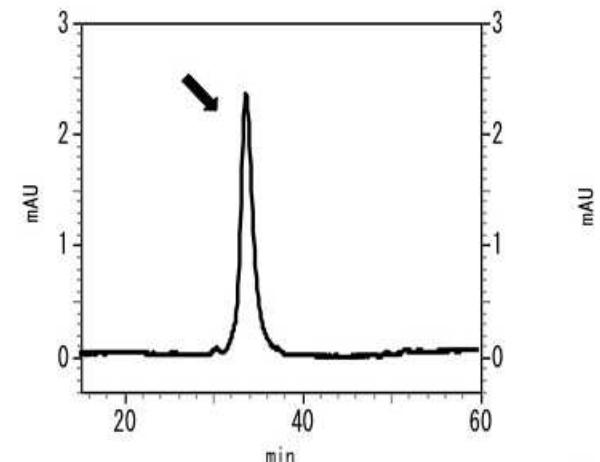
血漿



P II + III



SIIIグロブリン分画

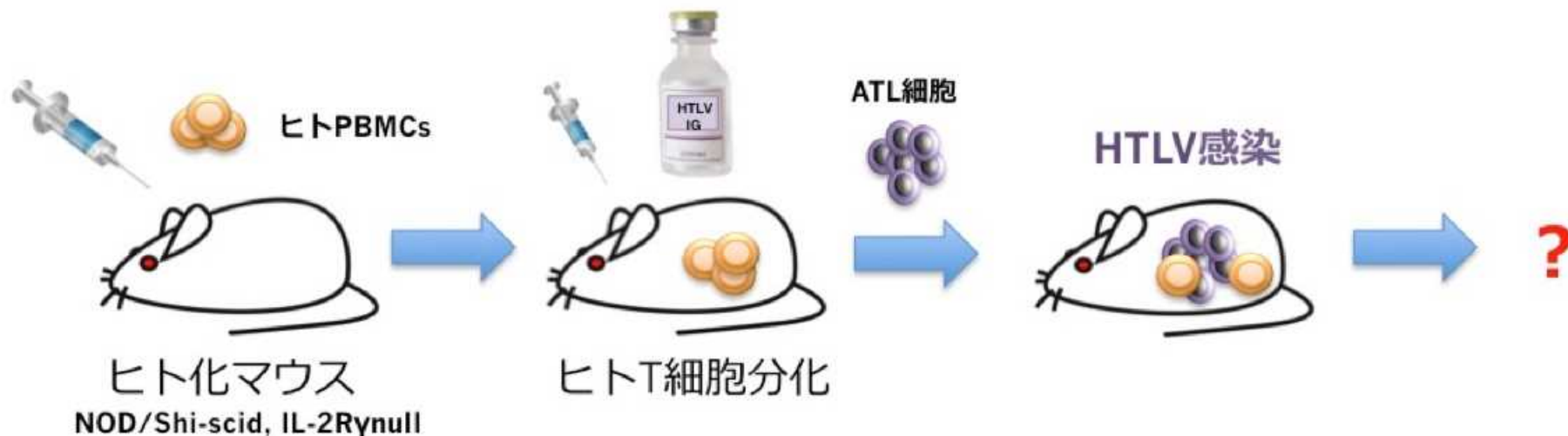


実験レベルとしては良質の免疫グロブリンの製造に成功した

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-2 (*in vivo*)

ヒト化マウスを用いた高力価HTLV-IGの有効性の検討

HTLV-IG 感染前投与

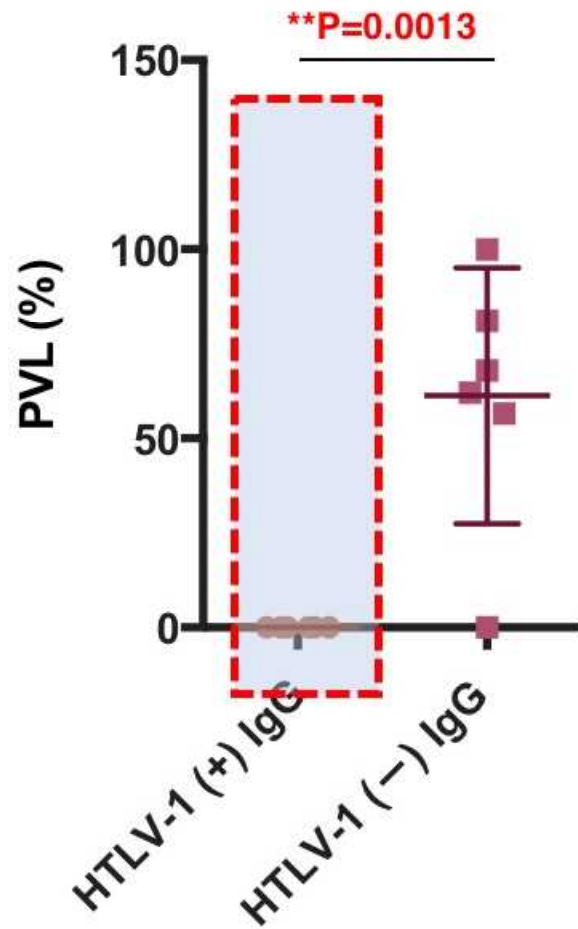


HTLV-IG 感染後投与

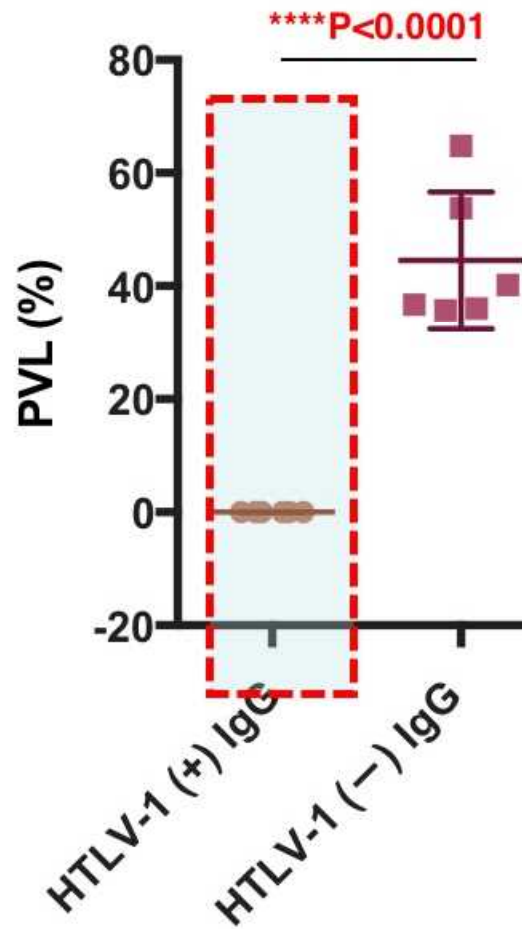


In vivo HTLV-1感染モデルにおける HTLV-IG 有効性の検討 (Day 11)

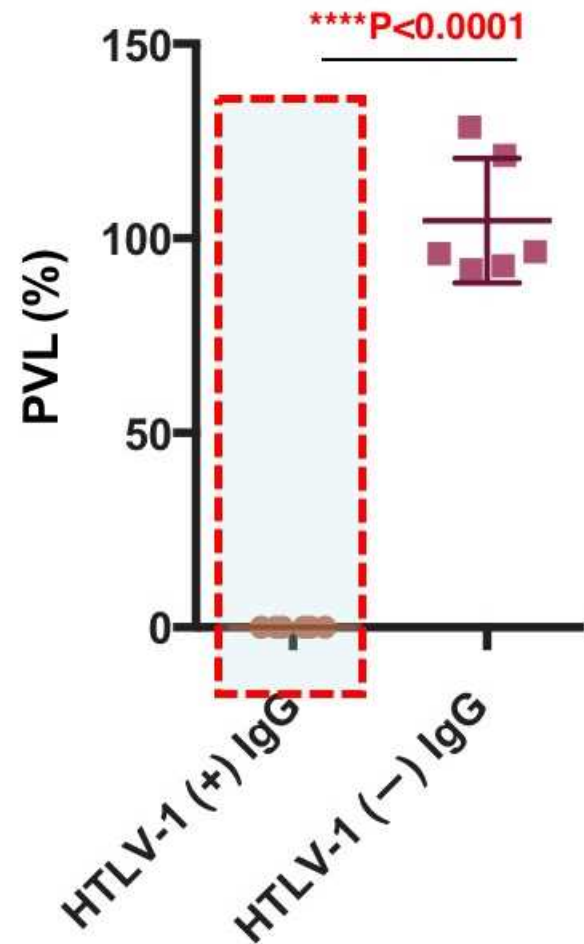
末梢血



脾臓

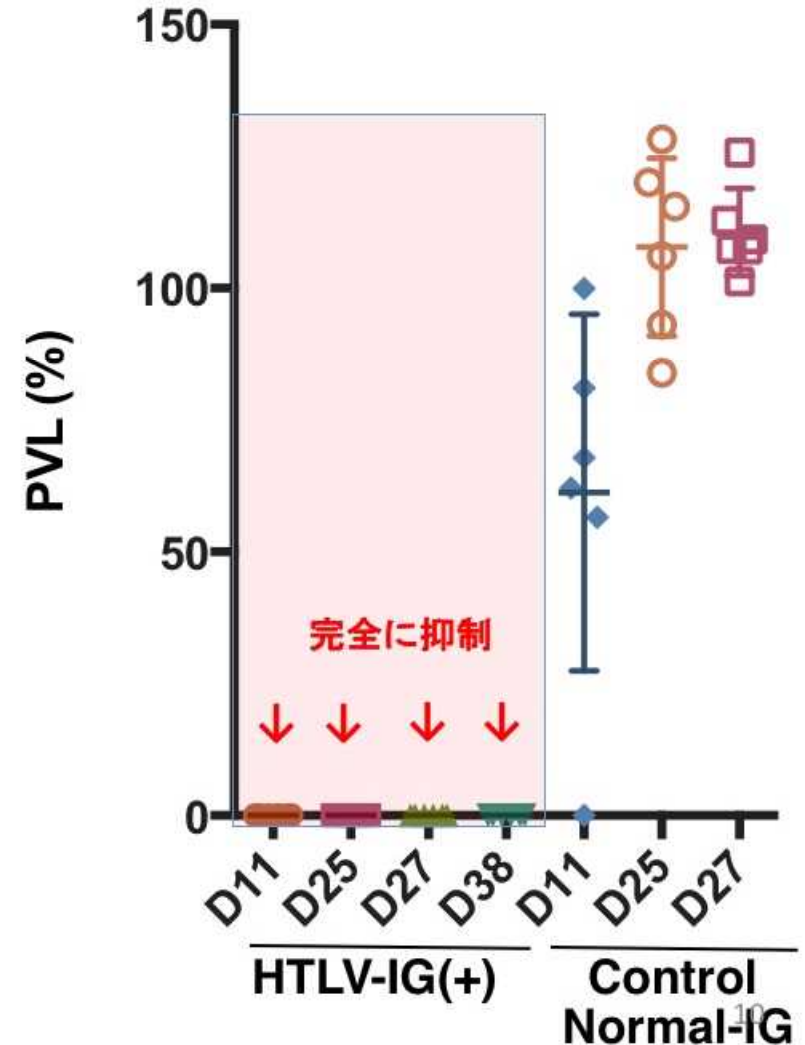
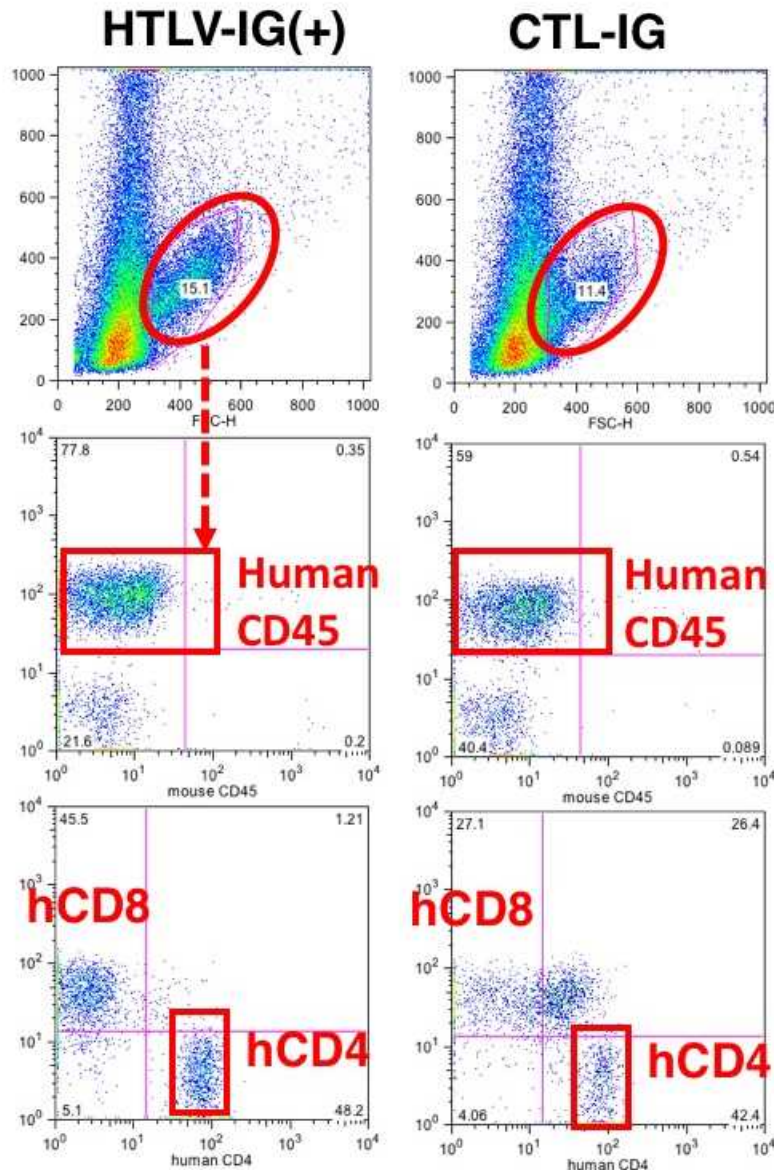


腹腔内



In vivo HTLV-1感染モデルにおける HTLV-1 IgGの**感染前**投与の有効性の検討 (**Day 38**)

末梢血



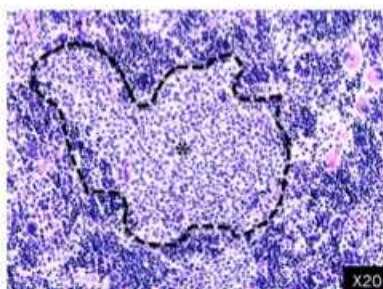
脾臓におけるHTLV-1感染細胞の挙動

PAS-H

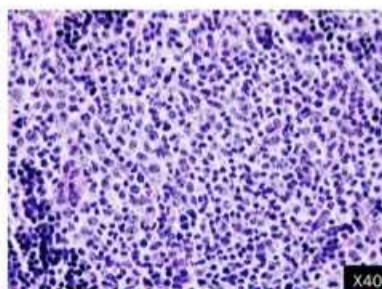
CD4

Ki67

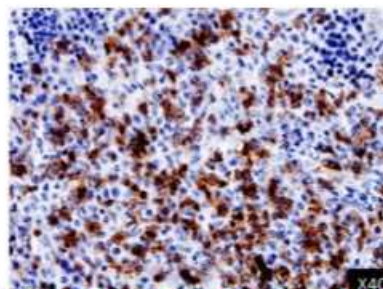
HTLV-IG



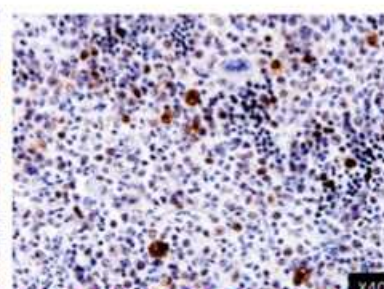
X20



X40



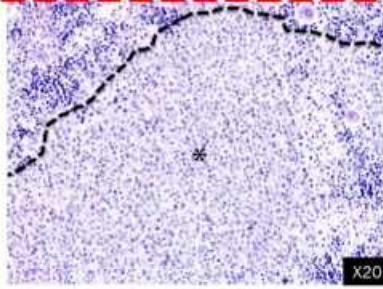
X40



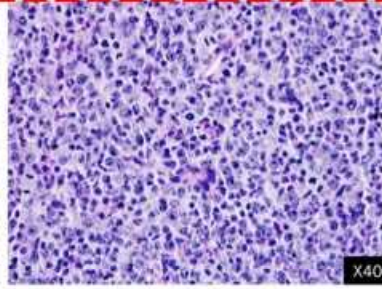
X40

感染

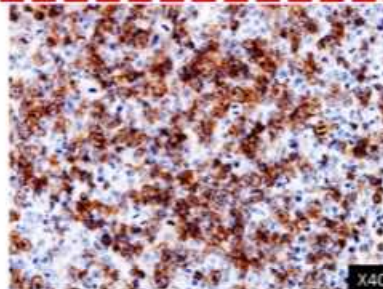
Control-IG



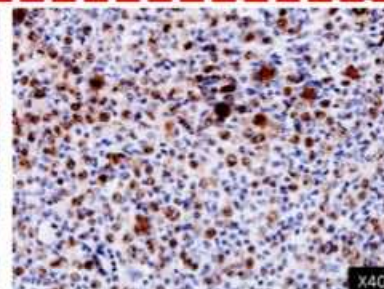
X20



X40



X40



X40

活性化
マーカー

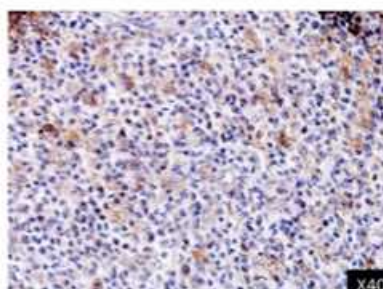
CCR4

IL-2R α

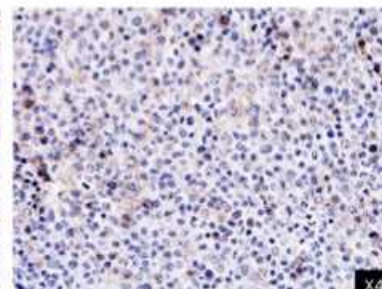
CD30

Perforin

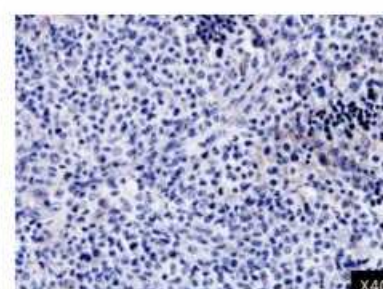
HTLV-IG



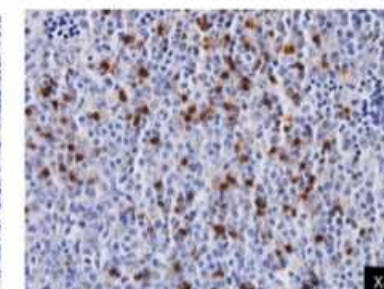
X40



X40



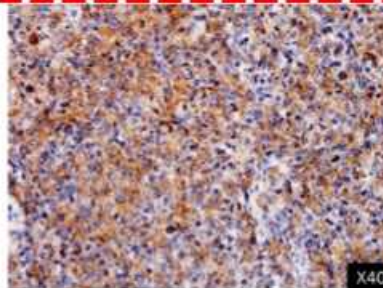
X40



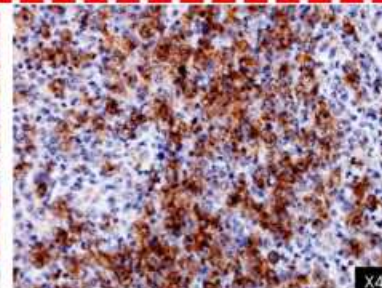
X40

感染

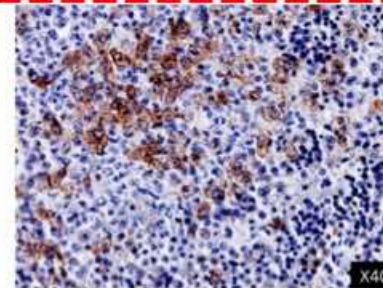
Control-IG



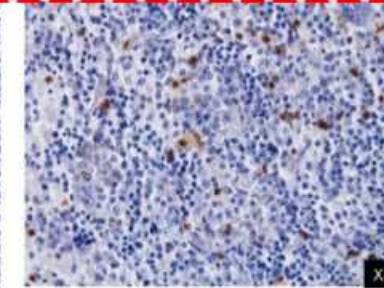
X40



X40



X40



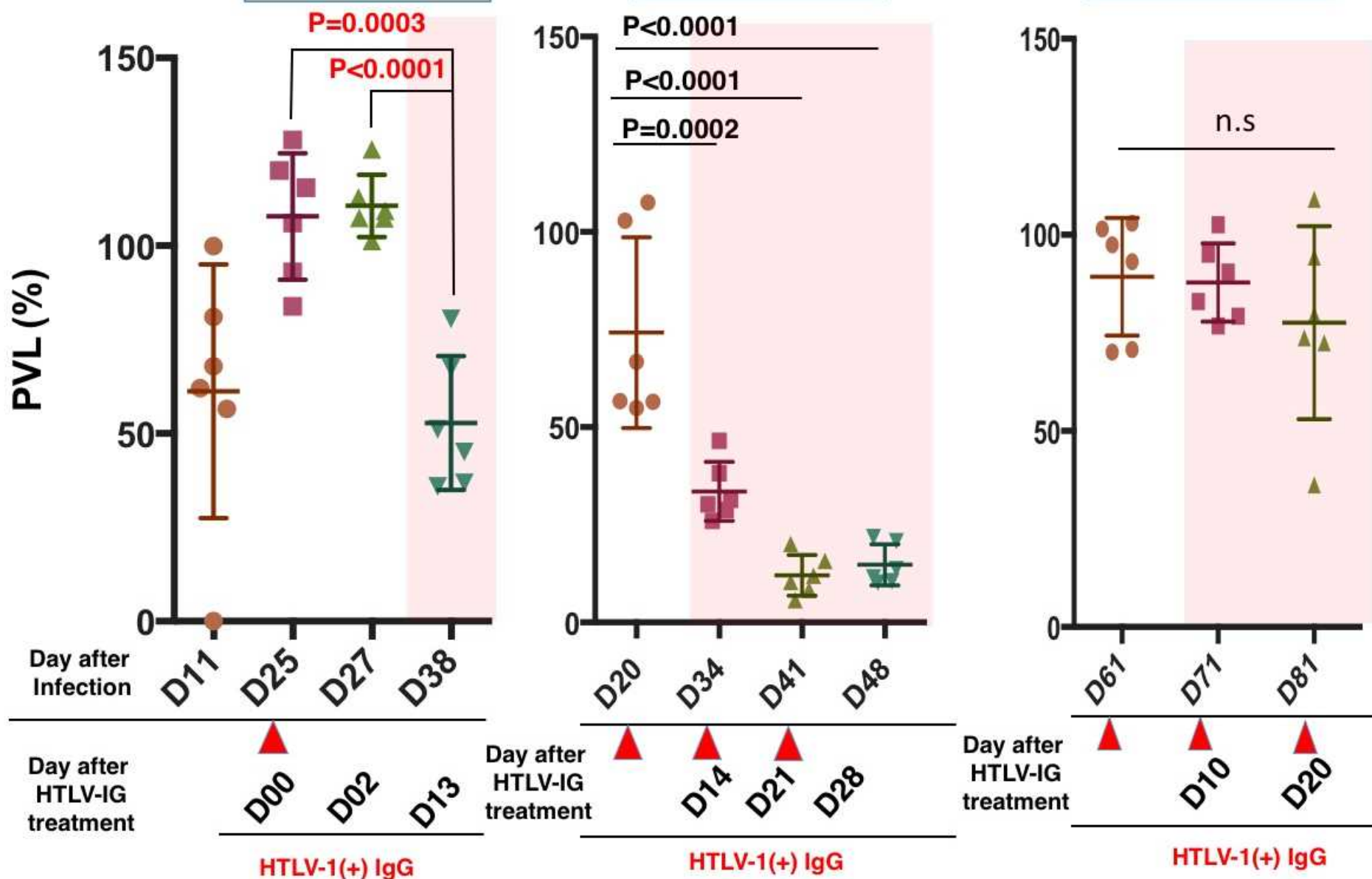
X40

In vivo HTLV-1感染モデルにおける HTLV-IG 感染後投与の有効性の検討

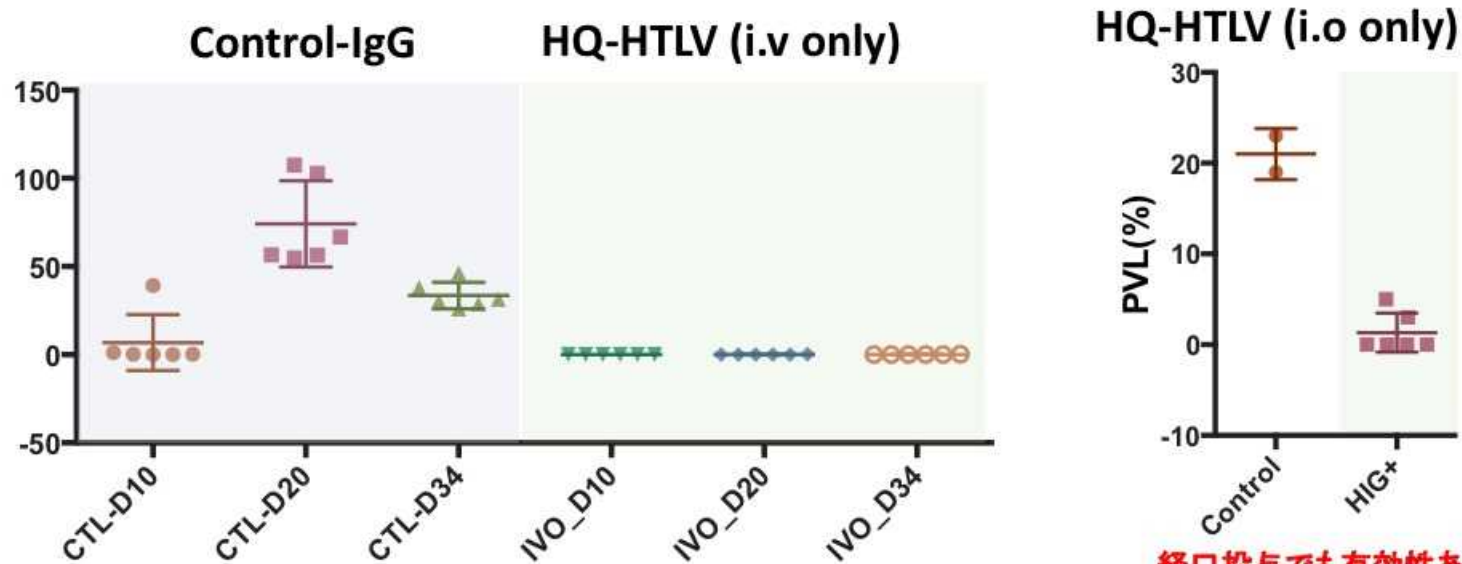
Day 25 (1shot)

Day 20 (3shot)

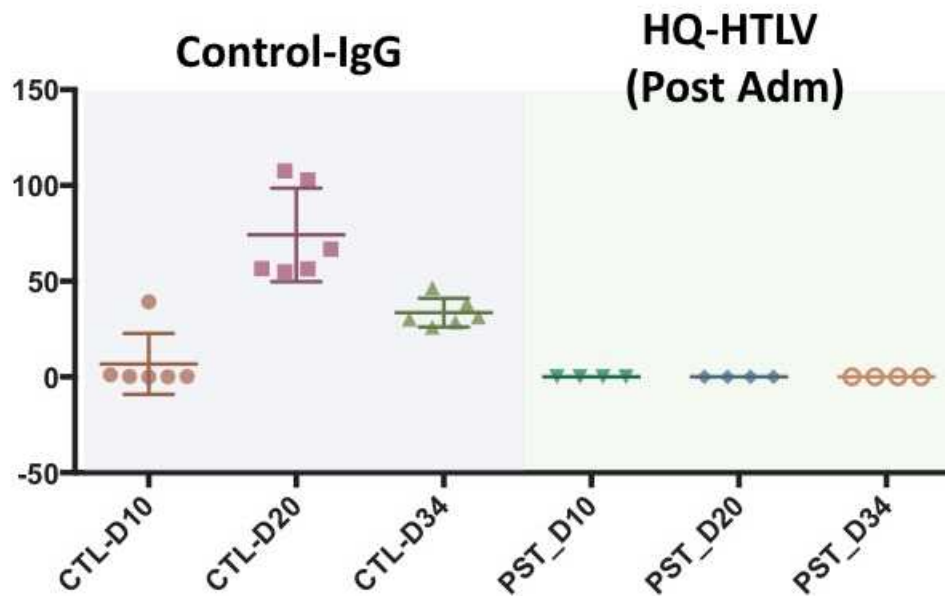
Day 60 (3shot)



接種法によるHTLV-IGの有効性の検討 (改良)



接種時期によるHTLV-IGの有効性の検討 (改良)



D0 (6hrs後)
で接種

感染血液由来の免疫グロブリン

CMV

CMV胎内感染に対し、CMV高力価免疫グロブリン胎児腹腔内投与による治療

HBV

母体がHBs抗原(+)の場合、新生児に抗HBs人免疫グロブリン (筋注, 静注) とHBワクチンの皮下注で予防効果を上げている。
針刺し事故後のB型肝炎感染予防 (高HBs抗体価血漿より製造)

麻しん、ポリオ、HAV

麻疹、ポリオ、A型肝炎の予防および症状の軽減 (人免疫グロブリン)

破傷風

破傷風の発症予防、発症後の症状軽減

ボツリヌス

幼児ボツリヌス症の治療 (高抗毒素価血漿より製造)

WNV

回復者血漿を用いたグロブリン製剤の開発
にむけた臨床試験を実施している

Ebola

生物由来原料基準、血漿分画製剤総則で規定されている
血液によって伝播される病原体が製造過程において不活化又は除去されることが確認され、
その旨が当該血漿分画性製剤の製造販売承認書に記載されいることが必要

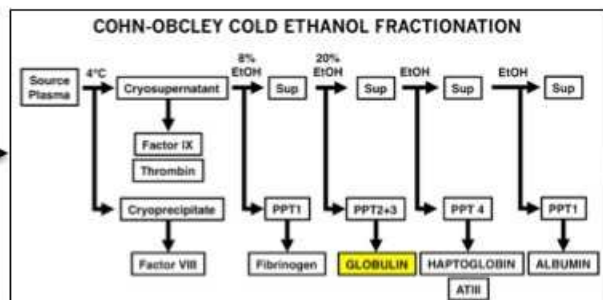
ウイルス安全性に関する課題

1. ウイルス安全性の高い製剤を作成するための技術開発及び安全性を確認する最先端の試験法(*in vitro*, *in vivo*, 核酸検査)の開発。

PVL 4 以上

免疫グロブリン精製

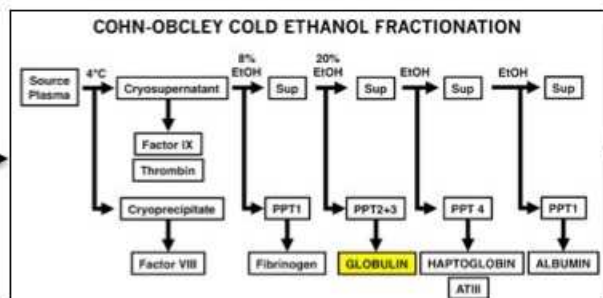
不活化工程

高感度
NAT検査*in vitro*
長期安全性HTLV-1
非感染細胞*in vivo*
長期安全性ヒト化
マウス大量の感染細胞
のスパイク

PVL100以上

免疫グロブリン精製

不活化工程

高感度
NAT検査*in vitro*
長期安全性HTLV-1
非感染細胞*in vivo*
長期安全性ヒト化
マウス

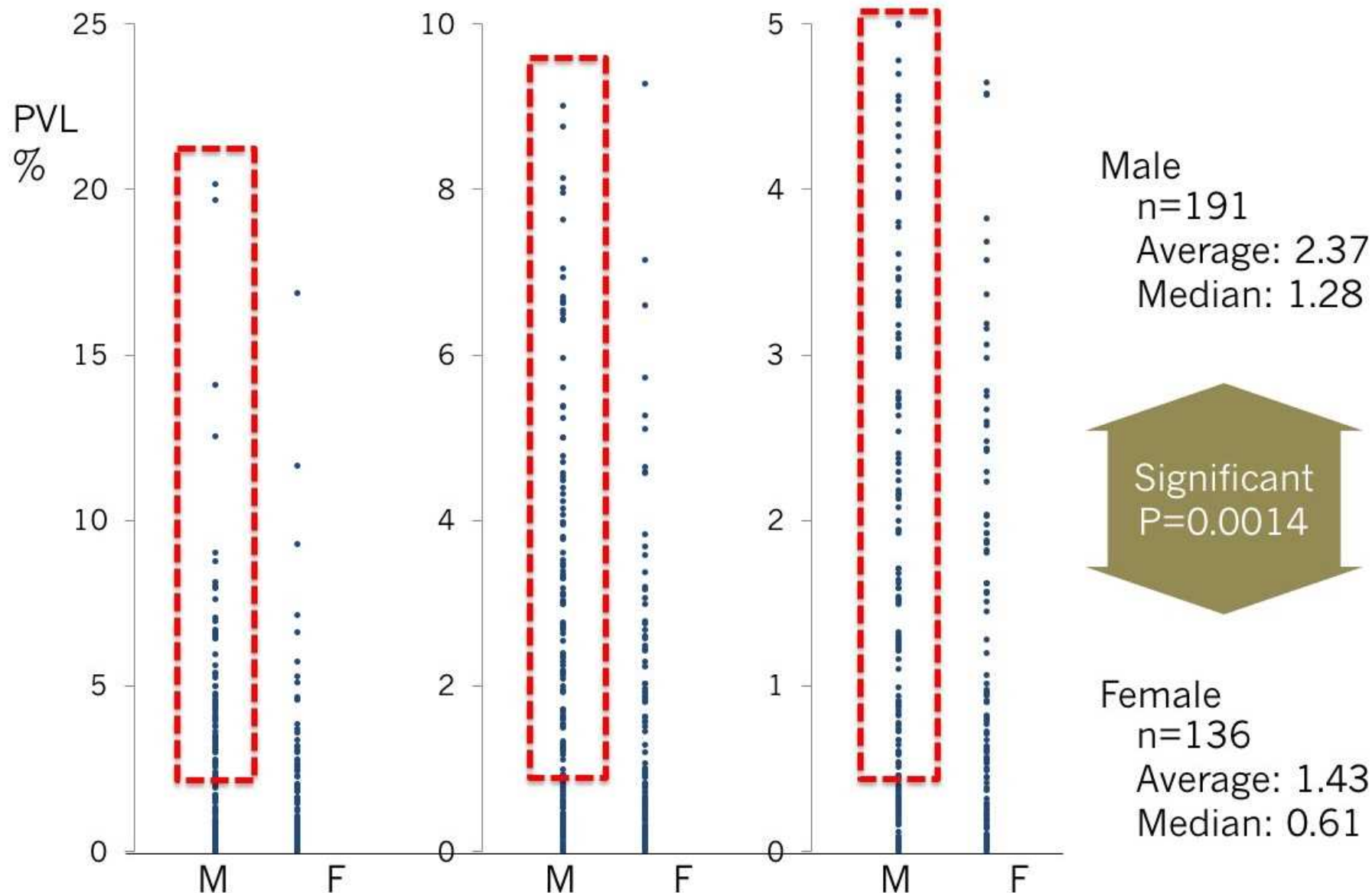
製造過程におけるウイルスクリアランスを指標に安全性マージンを設定し、
HTLV-1陽性献血血液の原料基準を策定する

原料血漿に関する研究

2. 日本赤十字社との共同研究により実際の**HTLV-1陽性血液**の**パターン解析・性状解析**と原料血漿基準の検討



実際の抗体陽性者のPVL等を鑑みて、**HTLV-1陽性献血血液の原料基準を策定**する



女性より男性の方がPVLが高いことがわかった

血液センターでの作業（案）

献血血液を通常CLEIAでスクリーニング

血漿数に余裕がある場合

- 全血検体を保管
- **HTLV-1抗体COI> 10.0の血漿を区分保管**
(通常、検査不合格血液はday 2に廃棄する)
- COI>10.0となった全血検体の血球部分からヒトDNAを抽出、**HTLV-1のPVLを測定**する
- **PVL> 1%または> 2%の血漿を確保**する
- **男性由来血漿を優先**する

血漿数が少ない場合

- COI> 10.0の血漿を確保する



コーン分画

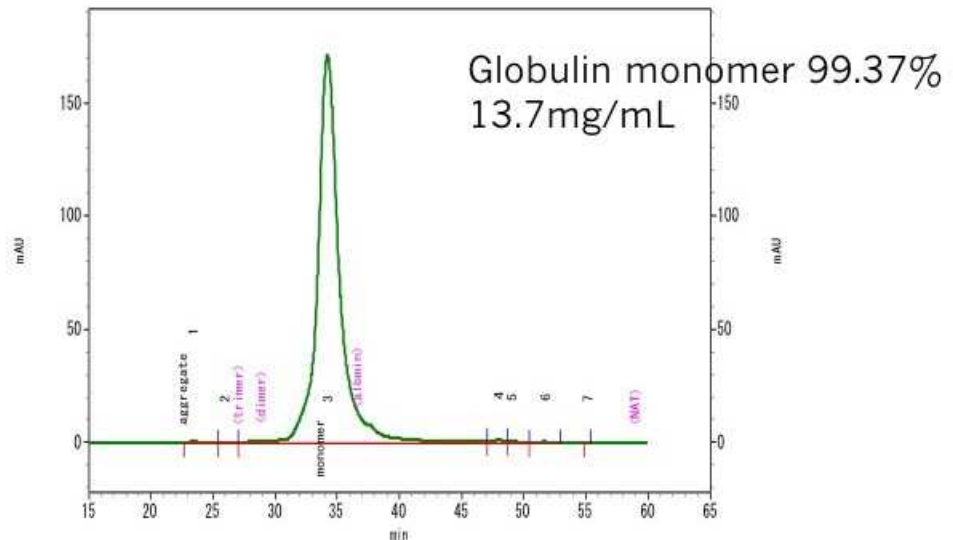
↓
バッファー交換、濃縮

投与量(筋注)

1.8g	/50kg	(ヒト)
720 ug	/20g	(マウス)
36mg	/1kg	(ニホンサル 子)
360mg	/10kg	(ニホンサル 母)

投与量(静注)

700mg	/50kg	(ヒト)
280 ug	/20g	(マウス)
14 mg	/1kg	(ニホンサル 子)
140 mg	/10kg	(ニホンサル 母)



富山大学 産婦人科 齋藤 滋 教授



1. 抗体価が低い妊婦における（児への）介入、補助治療
 - ✓ 長期母乳のために1歳までに3～4週に1回打つということだろうが、**本当に感染防御できるだろうか。**
2. 長期母乳授乳 に関して
 - ✓ 本当に効くということが分かれば長期母乳を希望する方に投与するということはあるだろうが、**臨床試験が考えにくい。RCTは難しい。**
3. 非母乳経路での感染防止に関して
 - ✓ 防ぐ方法があるとすれば使いたいというに決まっている。
 - ✓ ヒト臨床試験で有効性を示そうと思ったら最低100人は要するだろう。果たして集まるのか？抗体価が高ければ本当にHTLV-1を押さえられるのか？**ネズミのデータだけで妊婦さんに打つのか？**妊婦さんには抗体あるのにさらにグロブリンを打つことで防げるのか？という考え方もある。
 - ✓ どのような前臨床データがあれば臨床試験を考えるのか？**少なくともマウスのデータだけでは臨床試験にはいけない。少なくともサルの子母感染（30%）を完全に防げたとして、初めてヒトをどうしようかという話になるのではよね。**

長崎大学 小児科 森内 浩幸 教授



1. 抗体価が低い妊婦における（児への）介入、補助治療
 - ✓ 赤ちゃんにポリクローナル（ほかのワクチン接種に影響を及ぼす、モノクローナルならいいけど）の抗体を打ったとしたら生後2か月から始まる**ワクチンデビューの後で結構ややこしい。**製剤そのものの安全性だけではなく、ワクチン投与が狂うことによる影響を考える必要あり。
3. 非母乳経路での感染防止 に関して
 - ✓ **母子感染（3%）のメカニズムがまだよくわかっていない、**経胎盤感染、経産道感染を防ぐのにどのような抗体が有効なのか不明
 - ✓ ATL細胞を注射して、抗体を打って感染が防げたとしてもそれだけではわからない。血中でのことは見ているが、**経胎盤的なものをどう** **こうという話とは別で、そういうモデルを作らない限りわからない。**有効性が期待できますというところまでも来ていない。

東京大学医科学研究所附属病院血液腫瘍内科 牧山純也助教



[仮説] 断乳を行なった母親にHTLV-IGを投与することで、胎児のHTLV-1感染を0%にすることができる。

- | | |
|------------------------|---------------------------|
| • P 断乳を行なった母親 | • 有意水準 (α) 0.05 |
| • I HTLV-IG接種を行なった母親 | • 検出力 ($1-\beta$) 0.80 |
| • C HTLV-IG接種を行わなかった母親 | • I群 胎児の感染率 0% (奏効率 100%) |
| • O 胎児のHTLV-1感染率 | • C群 胎児の感染率 3% (奏効率97%) |
| | • 解析ソフト EZR |

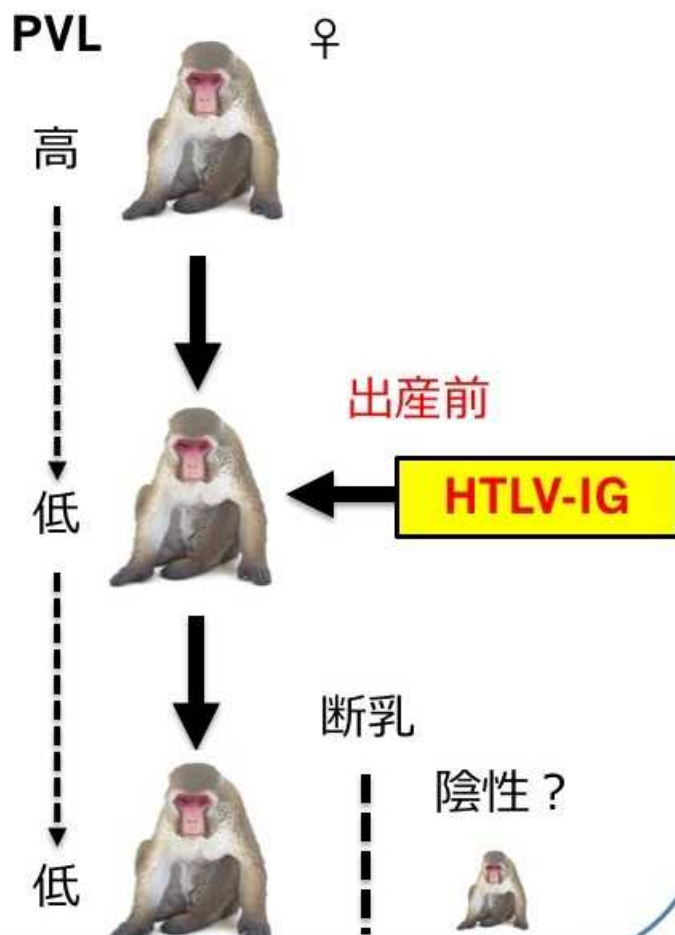
- (1) Single stageで試験を行おうとすると**99例**が必要であり、有効例が98例以下だった場合には治療は棄却
- (2) Optimal法の場合、第一段階に**35例**、第二段階に**64例** (合計99例) が必要



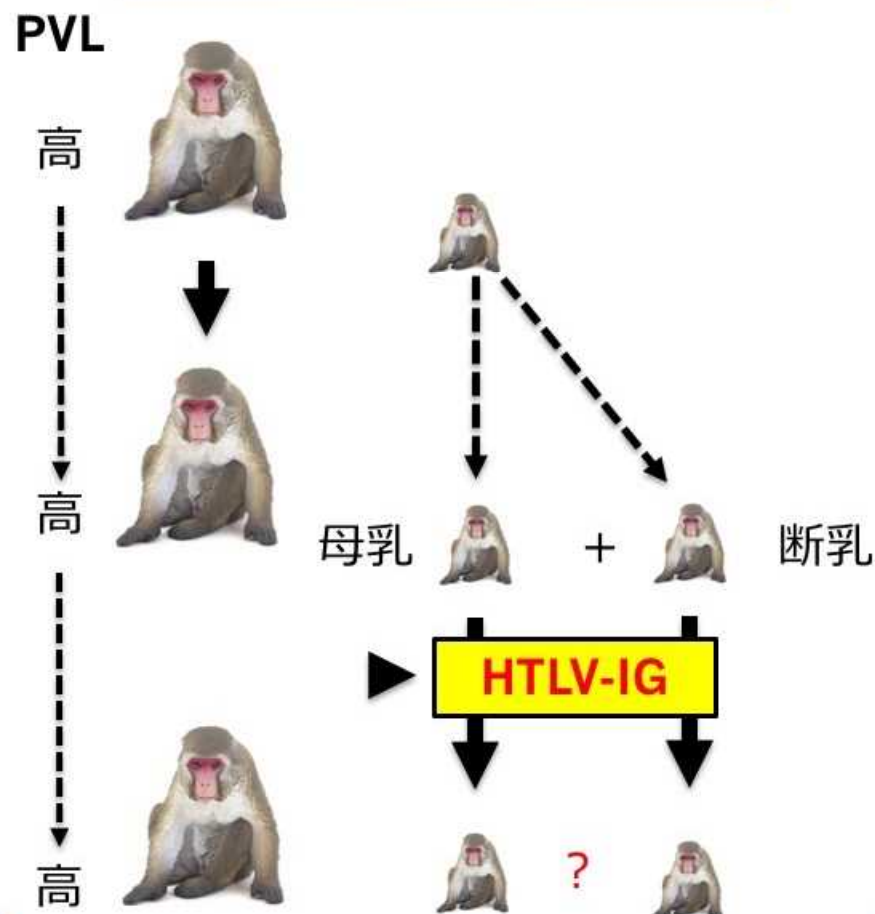
サルを用いた有効性・安全性の検討

霊長類を用いた有効性・安全性の確認、また母子感染予防を含めた感染防御能及び安全性を明らかにすることが必要。

抗HTLV-IGによる 母子感染の抑制-1

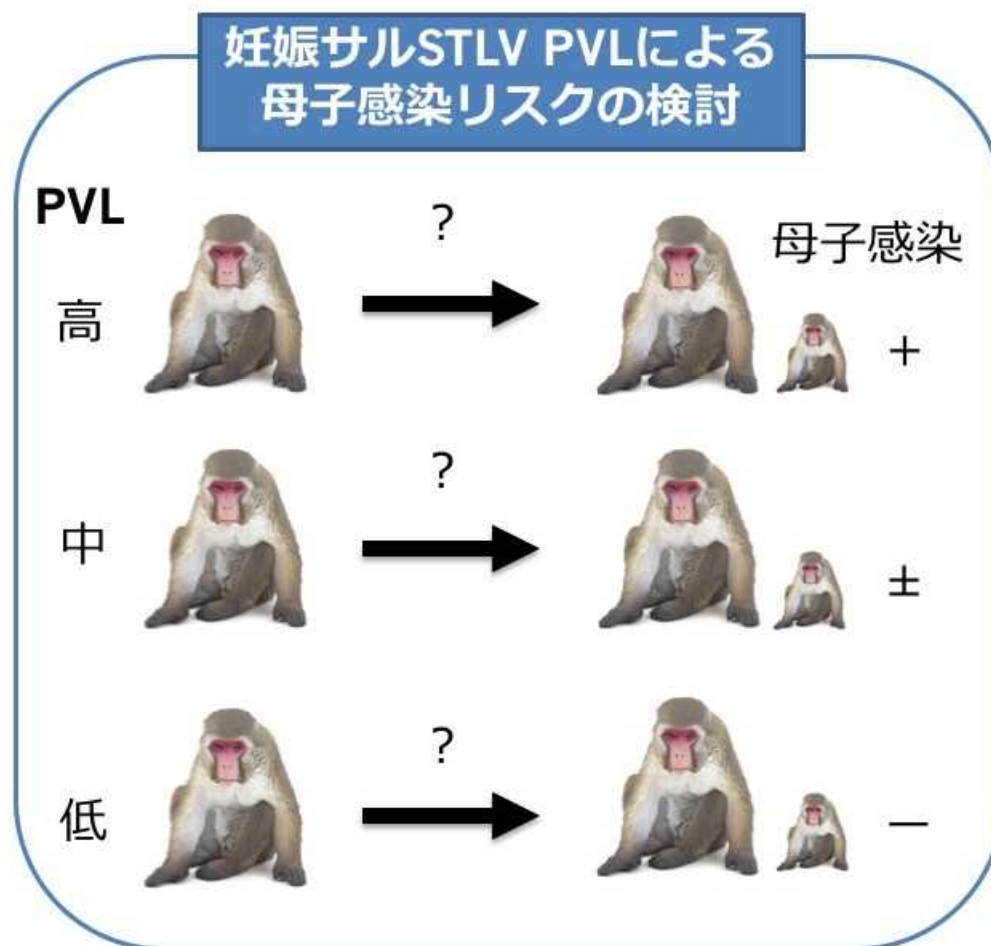


抗HTLV-IGによる 母子感染の抑制-2



サルを用いた有効性・安全性の検討

霊長類を用いた有効性・安全性の確認、また母子感染予防を含めた感染防御能及び安全性を明らかにすることが必要。



移行抗体の減衰時期・接種プロトコールの設定の基礎情報の獲得

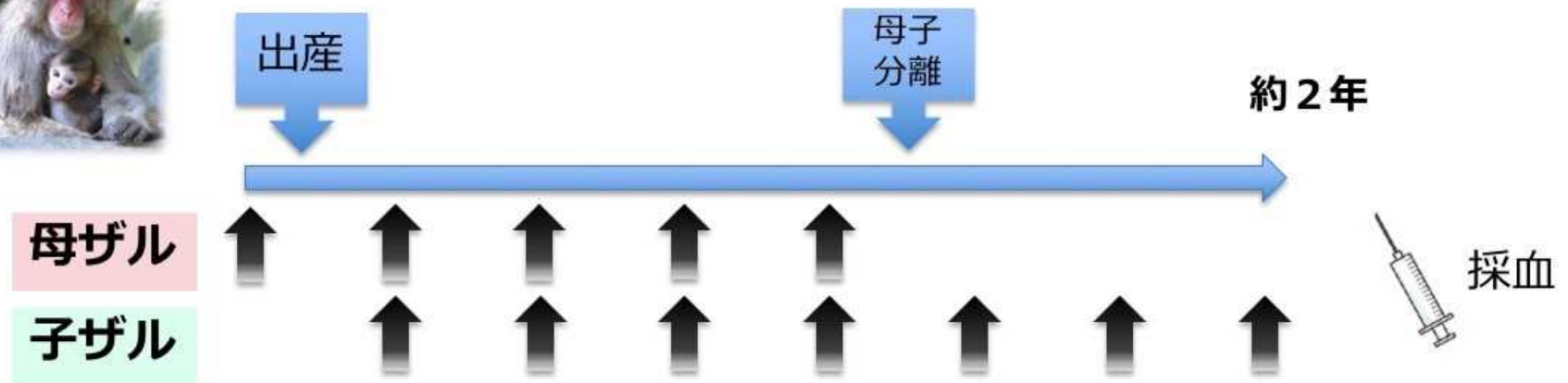
ニホンザルにおけるSTLV-1疫学調査結果

	Minoh	Hagachi	Takahama	Arashiyama	Wakasa	total
number of samples (male/female)	98(32/66)	38(9/29)	58(25/33)	62(18/44)	45(19/26)	301(103/198)
mean age	5.7	4.5	4.2	6.5	5.0	5.5
STLV-1 prevalence						
positive	70	23	36	35	36	200
negative	28	15	22	27	9	101
positivity (%)	71	61	62	56	80	66

京都大学霊長類研究所
リサーチリソースステーション(RRS)



STLV-1母子感染に関する検討



採血プロトコル

- STLV陽性母ザル：出産前、出産後3カ月おき（約1年間）
- 子ザル：出生後3カ月おき（約2年間）
- 出産後1年で母子分離、母ザルは次の出産の準備へ、子ザルは通常は同年齢のグループ飼育へ
- H28-29: 4ペア、H29-30: 6ペアのフォローアップ

結 論

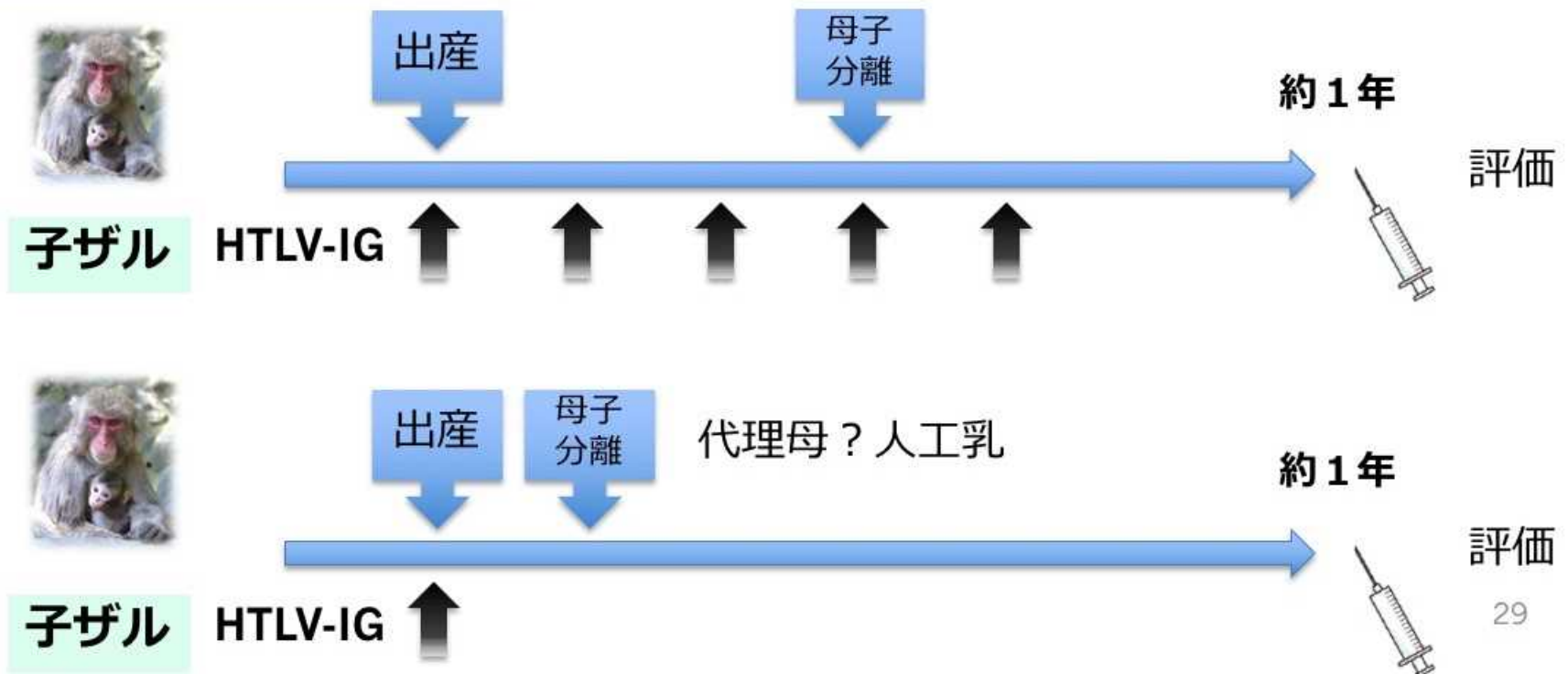
1. **母子感染率は約30%**でありHTLV-1母子感染率と比べてやや高い。子ザルの抗体価・PVLともに2歳ごろまで上昇し、以後プラトーとなる傾向が見られた。
2. 母子ザルの経過観察において、**出産に伴い抗体価・PVLともに顕著に上昇する傾向**が見られた。特にPVLの上昇は出産6カ月以降も持続していた。また、**子ザルでは生後3-5カ月ごろに渡って移行抗体が検出**された。
3. 0歳齢→4歳齢で陽転し潜伏感染を疑うケースが見られた。従って、**母子感染予防**の評価判定には**1-2年程度の長期経過観察を要する**と考えられた。
4. **モデル**：移行抗体減衰後の約3ヶ月より月1回接種し、1年後にPVLで有効性を判定

森内浩幸先生および斎藤滋先生とのヒト臨床に向けたプロトコール検証

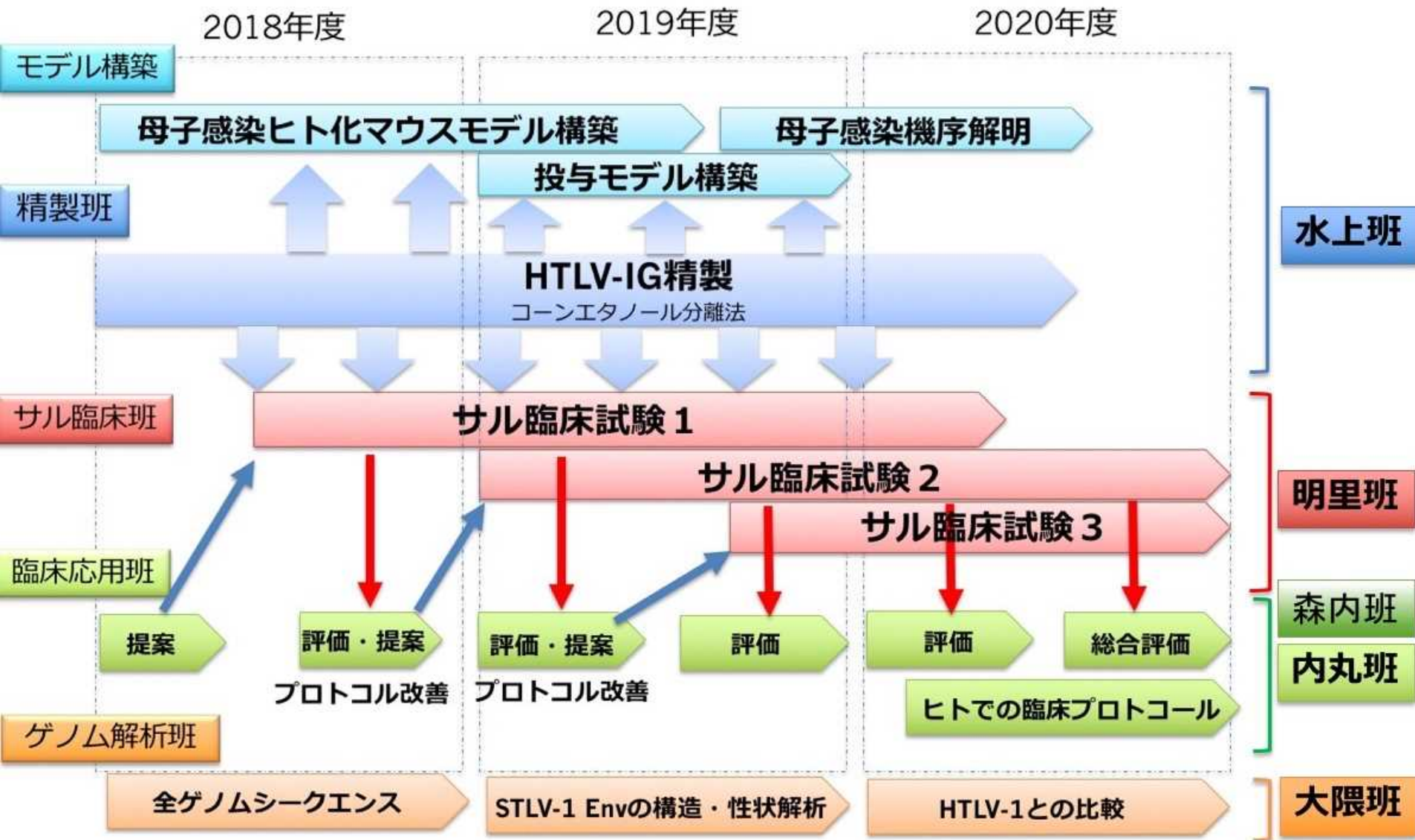
母子感染の何を標的にするかを明確化する

- 母乳を飲んでも良いという結論は出すべきではない
- 胎盤感染は胎盤移行抗体があるのに加え，実証が難しい。
- **経産道感染のみを標的として絞る**
- 実際，経産道感染がどの程度発生しているか不明だが，**出生時の1shotで済むので効果があればやる価値**があるし，やりたい人は多いはず。**新生児へのストレスも極めて少ない**。**リクルートしやすい**

検討：ニホンザルの投与実験



抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンによる HTLV-1感染・発症予防法の開発に関する研究



ヒトでの臨床へ向けた最終安全性・有効性の検討に関する研究とプロトコル確立

妊婦スクリーニングのあり方について

妊婦の感染症スクリーニングは、無症候で感染している病原体が児に感染し障害をもたらすことを予防するために行われる。症状がないので、臨床検査によって妊婦の感染を知ることになる。全妊婦のスクリーニングが正当化されるには以下の条件が必要である。

HTLV-1

- | | |
|--|---|
| ① 検査結果により 母子感染のリスクが判断 できる | ○ |
| ② 検査結果に基づいて 母子感染を予防, または減らすこと ができる 対策が確立 している。 | ○ |
| ③ 感染妊婦の カウンセリングの方法が確立 している | ○ |
| ④ 公的な費用を用いるならば, 費用対効果が良い 。 | ○ |

このような観点から見ると, **現在行われている感染症の妊婦スクリーニングは必ずしも全ては正当化されない**であろう。



HBVは現在の所, 母子感染予防の成功例の一つ
HTLV-1もHTLV-IGとVaccineができれば, 国内より根絶可能か？

Acknowledgement

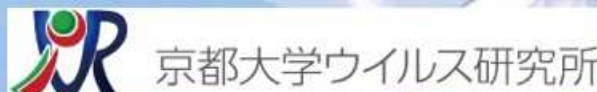


国立感染症研究所
血液・安全性研究部

水上 拓郎
野島 清子
栗林 和華子
佐々木 永太
平舘 裕希
古畑 啓子
倉光 球
手塚 健太
佐藤 結子
松岡 佐保子
***大隈 和**
浜口 功
山口 一成



日本赤十字中央血液研究所
蕎麦田理英子先生
松本千恵子先生
***佐竹正博先生**
田所憲治先生



京都大学霊長類研究所/ウイルス再生研
***明里宏文先生**
松岡雅雄先生



東京大学医科学研究所
附属病院血液腫瘍内科
***内丸薫先生**

長崎大学大学院医歯薬
学総合研究科 & 熱帯医
学・グローバルヘルス研
究科 小児科学分野
森内 浩幸先生

富山大学
産科婦人科学教室
齋藤 滋先生



平成27年度 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構研究費
新興・再興感染症制御プロジェクト
「臨床応用を目指した抗HTLV-1ヒト免疫グロブリンによるHTLV-1
感染予防法の開発と安全性に関する研究」