

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650620

研究課題名（和文） 子宮頸癌征圧に向けたワクチン効果測定法の確立と実用化研究

研究課題名（英文） Establishment the methods of the measurement of human papillomavirus (HPV) vaccine efficacy and the study for its practical use on cervical cancer eradication

研究代表者

遠藤 典子（岩田 典子）(ENDO FUMIKO)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：80546630

研究成果の概要（和文）：

現在日本国内で市販されている 2 種類の子宮頸癌予防ワクチンは、いずれも子宮頸癌罹患率を 70%程度減少させるとの試算がある一方で、その効果を客観的に測定する方法が確立されていない。本研究では、これらワクチンにより感染予防可能な高リスク型 HPV である 16/18 型の血清中中和抗体価を測定する独自の系を確立することに成功した。また、この測定法を用いてワクチン接種/未接種検体での小規模臨床研究を行い、ワクチン接種がもたらす HPV16/18 抗体価の上昇を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Two kinds of human papillomavirus (HPV) vaccine currently commercialized in Japan are estimated that they would be able to protect approximately 70% of cervical cancer cases. On the other hand, the method of measurement on these HPV vaccine efficacies had not been established yet. In this study, we developed the original methods on measure the neutralized HPV types of 16 and 18 antibodies in sera, types which are known as the most typical high risk factors of cervical cancer, induced by the vaccination. We also practically evaluated pre-/post- vaccinated sera and found that the levels of antibody are certainly increased by HPV vaccine.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：子宮頸癌、ワクチン、HPV

## 1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は、女性特有の疾患として国内では年間約 15,000 人が発症し、約 3,500 人が死亡しているとの統計がある。近年特に 20

～30 代の若い患者の数が急増しており、深刻な社会問題となっている。子宮頸癌は、ごく初期の段階で発見できれば予後が良いため、定期検診は大変重要であるにも拘わらず、日

本での受診率はわずか 20%にすぎない。

1983 年、Hausen 等によって子宮頸癌はヒトパピローマウイルス (HPV) が原因で発症することが発見された。さらにその後の研究で、100 種類以上同定された HPV の中でも子宮頸癌の原因となるのは約 15 種類の高リスク型 HPV の持続感染であるということが明らかとなった (Bosch, 2002)。高リスク型 HPV 群の中でも特に HPV16/18 型は、子宮頸癌組織から検出される HPV の約 70%を占める (Munoz, 2004)。

2009 年 12 月に本邦で認可となった子宮頸癌予防ワクチンは、HPV16/18 型に対するグラクソ・スミスクライン社の 2 価ワクチン (Cervarix) である。接種は筋注にて 3 回、スケジュールも定められている (0, 1, 6 ヶ月)。また、申請中のワクチンは HPV16/18 型に生殖器疣贅の原因ウイルスである HPV6/11 型を加えたメルク社の 4 価ワクチン (Gardasil) であり、こちらも筋注にて 3 回 (0, 2, 6 ヶ月) 接種となっている。両ワクチンとも重篤な有害事象の報告はなく、接種後 6~7 年は自然感染より数十倍高い抗体価が持続することが製薬会社の試験で確認されている。しかし、これら予防ワクチンにはまだ解決すべき問題も残っている。血清中の中和抗体価を測定する一般的な系が未確立のため、製薬会社の示す接種スケジュールが全ての人にマッチしているかどうか、客観的には判断できない。また、感染予防に効果を発揮する中和抗体価の指標も設けられていないため、どこまで抗体価が上昇すれば良いか、どの程度の期間効果が持続するか、手探りの状態である。

接種を受ける個人に合ったプロトコールの最適化は臨床現場でのニーズも高く、ワクチン効果が安全に、最も有効に発揮されるためには不可欠な課題となっている。

## 2. 研究の目的

2009 年末にわが国でも認可となった子宮頸癌予防ワクチンにより誘導される、血清中の HPV 中和抗体価測定系構築を主な目的とする。子宮頸癌は高リスク型 HPV の持続感染が原因で発症するが、このワクチン接種により子宮頸癌の原因の約 70%を占める HPV16/18 型の感染予防が可能となる。また認可申請中の 4 価ワクチンも同様の発癌型 HPV をターゲットとしており、加えて生殖器疣贅の 75~90%を誘引する HPV6/11 型の感染も予防できる。これらワクチンが普及すれば、子宮頸癌の罹患率は約 70%減少するとの試算がある一方で、現段階ではワクチン効果測定法が確立していない。即ち、血清中にどの程度の中和抗体があれば十分な感染阻害効果が見込めるか、あるいはその効果がどの位の期間保たれるのか、未知のままとなっている。本研究では、

唯一予防が可能な癌のワクチン有効性を明確にし、実用化に向けた検査法の開発を目指す。具体的な達成目標は、

- (1) 簡便な操作で
- (2) 30 分以内に
- (3) 2~4 種類の HPV 型を同時に
- (4) 高い特異性と感度で
- (5) 低侵襲的に得られる検体で

測定可能な系の開発である。

## 3. 研究の方法

子宮頸癌予防ワクチンが最大限に効果を発揮するために有用な、血清中の中和抗体価測定法ならびに測定キットの開発を行う。研究は以下に示す (1)~(5) の順に遂行、実用化に近い成果を挙げ、最終的には基盤技術を企業に導出することを目標とした。

### (1) 抗体および抗原の作製

#### ①抗体

合成した HPV16/18 型 L1 タンパク質をマウス/ウサギに免疫し、それぞれのハイブリドーマ培養上清および腹水/抗血清よりモノクローナル/ポリクローナル抗体を得た。これら抗体は、キット作製時の品質管理目的に使用する予定である。

#### ②抗原

HPV16/18/31/33/51/58 型 L1 遺伝子をバキュロウイルス発現ベクターに組み込み、タンパク質産生を試みた。大腸菌内での組換えバキュロウイルス DNA が作製可能な Bac-to-Bac 発現システムを用い、ポリヘドリンプロモーター制御下で、各 HPV 型の生物学的活性と構造は保持したままでありながら感染性の無いタンパク質の大量発現に取り組んだ。またこの方法とは別に、HPV16/18 型 L1 遺伝子については人工的に合成した各遺伝子を挿入してトランスファーベクターを構築、これにより組換えウイルスを作製してカイコに感染、カイコ体内でタンパク質を発現させるという方法で大量の抗原を得た。

### (2) 簡便で迅速、かつ多項目検出可能な系の確立

前出 3. (1) で作製した抗体および抗原を用い、測定系の構築を行った。取り扱いが簡便、かつ高感度で多項目の測定が可能な応用型 ELISA 法、ならびに新規イムノクロマト法の実用化を目指した。

#### ①プロトコールの検討

将来、病院等の臨床現場で実際に使用することを視野に、極力簡便で迅速に測定できるプロトコールを決定した。特殊な訓練を要しない手技で行え、なおかつバックグラウンドの少ない方法を目指した。また、抗体・抗原濃度、ブロッキング試薬の種類、反応バッフ

ァー中の塩濃度および界面活性剤の種類や濃度などの最適化を図った。非特異的な吸着によるS/N比の改善についても検討した。

#### ②多項目測定技術の開発

まず、現在認可されているワクチンに即したHPV16/18型について、単項目を確実に測定できる技術の確立に取り組んだ。その後、エピトープやクロスリンク等の問題を考慮し、この2項目が同時に測定可能な系の開発を先行して行うこととした。

#### ③高感度技術の検討

バックグラウンドを低減させつつ、90%程度の特異性を保つためにはどのくらいの感度を持たせるべきか、モデル系で詳細に検討した。

#### (3) ヒト検体を用いた検証

確立した測定法に従い、実際にヒト血清による評価を行った。実検体には夾雑物も多く含有するため、モデル系とは大きく異なる場合がある。この段階ではより実用化に近い検証を行った。

#### ①プロトコルの再検討

ヒト検体を用い、3.(2)で概ね決定したプロトコルを再検討した。HPV曝露前のコントロール検体としては、小児科に通院あるいは入院中で、本人および保護者より研究に参加することへの同意を得られた患者の余剰検体を使用した。本研究で使用する目的のみの採血は、小児に対しては行わないよう配慮した。

#### ②サンプル処理法の検討

希釈液の組成と希釈倍率に関し、キャリアタンパクの添加、pH調整、操作手順等を考慮しながら細かく検討した。

#### ③基礎データ収集

本研究で行うのは臨床応用に向けた基礎的な研究であるが、企業に技術を導出する際に必要となるため数十例規模の臨床データを収集した。このデータをもとに陽性/陰性、ならびに偽陽性/偽陰性の診断基準を設定した。

#### (4) 企業との連携による技術改良

本研究で確立した基盤技術を、共同研究先の企業と連携しながら改良した。

#### ①品質管理

試薬や測定キットの保存性テストとして、保管する際の温度や湿度、期間などについて目安を設定した。

#### ②再現性の確認

日間および実験者間での格差は無いか、再現性は保たれているか等の確認を行った。

#### ③その他、企業との折衝

基盤技術を導出するにあたり研究者側、企業側双方から意見をフィードバックし合い、ディスカッションを重ねて改良し、互いの要

望を取り入れたキット試作品を完成させた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 抗体作製

マウスモノクローナルIgG抗体は、ハイブリドーマ培養上清および腹水からという2通りの方法で作製を試みる事となった。培養上清は、スクリーニングにより抗体価の高い2クローンを馴化し無血清化まで進めたが、後にいずれもIgMであることが判明したため中断した。これに代わり、免疫したマウスの腹水を採取、精製する方法に切り替えた。ポリクローナル抗体作製についてはウサギ抗血清を採取済で、精製の後、キット作製時の品質管理のために使用する予定である。

##### (2) 抗原作製

研究開始時は、HPV16/18型以外にも日本人に多い高リスク型HPVである31/33/51/58型L1タンパク質の産生をバキュロウイルス発現系により試みたが、測定に用いるに十分な収量は得られなかった。そこで、市販のワクチンに対応するためHPV16/18型L1タンパク質については別途ウイルスベクターをカイコに感染させる方法を早急に進め、大量発現させた。その他のHPVはバキュロウイルス発現系により再スタートし、33/51型：タンパク質精製まで、31/52型：ウイルス感染まで、58型：バクミド作製まで、が終了している。作製途上のHPVは凍結保存してあり、機会があれば再開可能な状態となっている。

##### (3) ビーズELISA法による測定系構築

当初の段階では一般的な直接法ELISAを試みたが、この方法ではバックグラウンドが非常に高く、抗原ネガティブのサンプルでも反応してしまうため測定には至らなかった。その後、ブロック剤を変更することで若干の改善が見られたものの、安定した測定が困難であることや、キット化するには問題のある試薬を使用せざるを得なかったため方法を切り替えることとした。そこで、開発する上でネックとなっていたバックグラウンドを低減させるために、マグネットビーズを用いるという方法に変更した。基本原理は直接法ELISAと同様であるが、抗原にマグネットビーズを結合させて感作ビーズを作製し、これを測定に使用することで大幅なバックグラウンドの低減に成功した。従来法ELISAより手技が少々煩雑にはなるが、非特異反応は見られなくなった。

研究初年度より作製に取り組んだHPV16/18L1タンパク質は、発現の方法を変更し大量に得られたため、先行してこの2種類の抗体価測定系を構築した。コントロール検体により感度、および精度を十分に検討・調

整した後、HPV曝露前の小児血清(18例)と同一個人のワクチン接種前/後血清(各20例)を実際に測定して検証した。その結果、小児血清とワクチン接種前の血清中 HPV16/18L1抗体価に差異はなかったが、これらと比較してワクチン接種後の血清中の抗体価は有意に上昇していることが確認できた。

#### (4) 高感度化イムノクロマト法の開発

企業との共同で開発を進め、イムノクロマト法でも4.(3)と同様に小児血清(18例)、同一個人のワクチン接種前/後血清(各20例)の測定を行った。テストラインのバンドは、カラーチャートにより8段階の色調を目視で判断できるよう工夫した。この測定結果においても小児血清とワクチン接種前血清に差は無く、ワクチン接種後血清のみでテストラインのバンドが確認できた。また20例のワクチン接種後血清中抗体価測定結果を精査したところ、4.(3)のビーズELISA法で高価が認められた検体ではイムノクロマト法によるバンドのレベルも高く、ELISAで低値を示した検体はイムノクロマトのバンドレベルも低いことが確認できた。

以上、ビーズELISA法は実験室レベルでの最終検討が終了、キット化に向け企業との協議を開始している。イムノクロマト法はプロジェクト開始時から企業との共同開発を行っており、キット仕様も大筋で決定している。これら2種類の測定法により、現在市販されているワクチンに対応したHPV16/18型L1抗体価の上昇を確認するキットは現実的なものとなりつつある。但し現段階ではビーズELISA法、高感度化イムノクロマト法とも単項目測定のみでの開発にとどまっており、HPV16/18L1抗体価の同時測定には至っていない。簡便なキットはワクチン接種医や被接種者からの要望も多く、今後も開発を続けて行く予定である。またHPV16/18L1以外のHPV型についても同様の測定系を完成させ、新たなワクチンが認可された際には、すぐに対応可能な状況にしておくことを目指したい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

1. 遠藤典子、櫻井陽、細川幸生、野村奈美子、橋本麻紗子、清水達哉、芝崎太、川村眞智子、菅沼明彦「子宮頸がん予防ワクチンの効果測定法開発」第8回東京都福祉保健医療学会誌 査読なし 平成24年度版 2012年 pp.30-31

<http://www.fukushihoken.metro.tokyo.jp/>

[学会発表] (計4件)

1. 遠藤典子、櫻井陽、細川幸生、野村奈美子、橋本麻紗子、清水達哉、芝崎太、川村眞智子、菅沼明彦「子宮頸がん予防ワクチンの効果測定法開発」第8回東京都福祉保健医療学会 平成24年12月21日(東京)
2. 遠藤典子、川村眞智子、菅沼明彦、小林行治、小林薫、安藤義将、芝崎太「子宮頸がん予防ワクチンの接種効果測定法の検討(Investigation into the methods of HPV vaccine efficacy measurement)」第35回日本分子生物学会年会 平成24年12月13日(福岡)
3. 遠藤典子、櫻井陽、細川幸生、野村奈美子、橋本麻紗子、清水達哉、田畑務、芝崎太「子宮頸がん予防ワクチンの接種効果測定法の検討(Investigation into the evaluation of HPV vaccine efficacy)」第11回 Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 平成24年9月2日(伊勢)
4. 遠藤(岩田)典子、中野早知栄、森實芳仁、鎌田裕子、芝崎太「バイオマーカー測定による癌の新規診断法開発」第10回 Conference for BioSignal and Medicine (CBSM) 平成23年6月25日(軽井沢)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

遠藤 典子 (岩田典子) (ENDO FUMIKO)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員  
研究者番号：80546630

##### (2) 研究分担者

芝崎 太 (SHIBASAKI FUTOSHI)  
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・参事研究員  
研究者番号：90300954

櫻井 陽 (SAKURAI AKIRA)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員  
研究者番号：40546628

##### (3) 連携研究者

川名 敬 (KAWANA KEI)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：60311627