

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640096

研究課題名（和文）子宮頸癌予防ワクチンの高感度効果測定法の確立と臨床応用

研究課題名（英文）Establishment and clinical application of the high sensitive effect assay of the HPV vaccine

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・生体分子先端研究分野・研究員

研究者番号：80546630

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：子宮頸癌発症の原因は、高リスク型HPV（ヒトパピローマウイルス）への長期感染であり、中でもHPV16/18型が70%を占めるとされている。子宮頸癌予防ワクチンは世界中で広く普及しているが、これまで、その効果を客観的に評価する方法は確立していなかった。本研究では、ワクチン接種によるHPV16/18型の血中中和抗体価の変動を迅速、かつ簡便に測定する方法を開発した。まず、非特異反応を低減するためにマグネットビーズを用いたELISA法を確立し、次に、血清1滴を15分で判定可能な簡易イムノクロマト法を構築した。数百人規模の小規模臨床研究の結果から、両方法の結果の一致をみることに成功した。

研究成果の概要（英文）：The cause of the cervical cancer onset is long-term infection to high risk type HPV (human papillomavirus), and it is said that, above all, a HPV16/18 type occupies 70%. The cervical cancer prevention vaccine spread widely all over the world, but did not establish the method to evaluate the effect objectively until now. In this study, we developed the method to measure a change of blood neutralization antibody titer of the HPV16/18 type with the vaccination in quickness and simpleness and easiness. At first we established the ELISA method using magnetic beads to reduce non-specific reaction and built the simple immunochromatography method which could judge one drop of serum next in 15 minutes. We succeeded in watching the agreement of the result of both methods from the result of the small clinical study of several hundred scales.

研究分野：分子生物学

キーワード：子宮頸癌 ワクチン HPV

1. 研究開始当初の背景

日本では毎年約9,800人の女性が子宮頸癌を発症し(地域がん登録全国推計値2008年)、約2,700人が死亡している(人口動態統計2011年)。子宮頸癌の危険因子はHPV(ヒトパピローマウイルス)であると既に解明されている(Zur Hausen, 1983)が、HPVは主に性交渉で感染するため、感染は決して稀ではなく、80%もの女性が一生に一度はHPVに感染しているとの報告もある。しかし多くの場合、感染は一過性で、ウイルスは免疫力により自然に消滅する。子宮頸癌に関与するのは、約200種類の型が同定されたHPVの中でも特に15種類の、高リスク型に分類されるHPVに持続感染したケースである(Bosch, 2002)。国内で承認済の子宮頸癌予防ワクチンは、高リスク型HPVである16型、18型に対して予防効果を持つ2価ワクチン(サーバリックス)と、HPV16/18型に加えて尖圭コンジローマの原因となる6型、11型に対する4価ワクチン(ガーダシル)の2種類がある。製薬会社の資料には、接種後約9年間は自然感染の数十倍高い効果が維持できるとあるが、この効果を客観的に評価する方法は存在しない。即ち、どの程度の抗体価で感染予防効果が見込まれ、それがどの位の期間維持するか、第三者による報告はされていない。また製薬会社による解析は前癌状態が抑制されるか否かの臨床評価が基本であるため、実際に血中の抗体がどの程度の割合で膣分泌物中に滲出し感染阻止に効果を発揮するのか、詳細な解析は行われていない。

2. 研究の目的

子宮頸癌の発症は、高リスク型HPVの長期感染が原因であると解明され、日本で

もHPV16/18型、ならびにHPV6,11,16,18型に対するワクチンが普及した。しかし近年、副反応の報道や、厚生労働省による「一時的に当該ワクチン接種の推奨を控える」方針の発表等、混乱が続いている。その大きな要因として、ワクチンの効果を客観的に測定する系が確立していない点が挙げられる。本研究では独自に開発した血中抗体価測定法を発展させ、膣分泌物検体でも測定可能なレベルまでの高感度化を目指す。さらにこの方法で数百例の検体を測定し、今まで詳細な解析が行われていなかった血中と膣分泌物中抗体価の相関を明らかにする。結果をもとに抗体価のカットオフ値を設け、臨床応用可能なワクチン有効性の判断基準を示すキットを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

現在市販されている子宮頸癌予防ワクチンの大きな問題は、ワクチン接種により誘導される抗体価を検出する一般的な方法が確立していない点にある。そこで本研究では、これまで存在しなかった高感度HPV抗体価測定法を開発することとした。これを用い、ワクチン接種/未接種被験者の血中および膣分泌物中のHPV抗体価を詳細に解析すれば、抗体が血液中から生殖器粘膜に滲出する時期や割合等も明らかになり、感染防御に効果を発揮する抗体価の基準を設定することが可能となる。HPV抗体価測定法の構築については臨床の現場からの要望も多くあり、システムが確立されれば高い有用性が見込まれる。測定法は、独自に開発した2通りの方法をベースに発展させる。

MUSTag ビーズ高感度測定法

既存の方法は、抗原に磁気ビーズを

結合させた direct ELISA 法を基本としているが、新規測定法ではこれを sandwich ELISA 法に切り替える。その後、当研究室で開発した高感度同時多項目測定(MUSTag)法を応用する。MUSTag 法とは、抗原抗体反応を利用したバイオマーカー検出法で、抗体を特定の長さ・配列の oligo DNA(100~600mer)で標識し、PCRにより標識 DNA を増幅、検出する方法である。PCRにより定量性を維持したまま抗原抗体反応のシグナルを増幅させ、非常に高い検出感度が再現良く得られる。また異なる長さ・配列の DNA を標識するため、抗体中の複数の抗原を同時に定量することが可能である。

簡易蛍光イムノクロマト法

これまでに開発済みのイムノクロマト法は、ストリップに血清検体とバッファーを滴下し、目視で判定できる仕様であるが、膣分泌物を測定するには感度が低い。そこで今回は、インフルエンザウイルス検出用として開発された蛍光イムノクロマト法を応用する。この方法は、市販の製品と比較して 100 倍程度の高感度化を実現しており、抗体価の低い膣分泌物の測定にも応用可能である。

4 . 研究成果

本研究では、これまで確立していなかった HPV16 型、18 型の血中抗体価を迅速かつ簡便に測定する方法を開発した。まず ELISA 法により、高感度でありながら非特異反応を低減するためマグネットビーズを用いる等の工夫をしながら系を確立した。さらなる高感度化のため、ベースを direct ELISA 法から sandwich ELISA 法へと試みたが、残念ながら sandwich ELISA 法ベースの系の確立は出来なかった。この方法を用いて数百例の実検体を測定し、十分に条件検討や再現性の確認を行

った後、次はイムノクロマト法での測定法開発に挑んだ。当初予定していた蛍光イムノクロマト法までは構築出来なかったが、血清 1 滴を用い、わずか 15 分という短時間で HPV16 型あるいは 18 型抗体価を定性的に評価する方法を開発することに成功した。このイムノクロマト法においても数百例の実検体による検討を行い、その結果は先の ELISA 法と一致することが確認出来ている。また、今回開発したイムノクロマト法は、企業との協力によりキット化が進められている。これまでは、ワクチンを接種しても抗体価がどの程度上昇するのか、あるいはワクチンの効果はいつまで持続するのか等、調べることが出来なかったが、このキットが普及すれば、やがてこれらの問題も解決することが見込まれる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

著者: Fumiko Endo, Tsutomu Tabata, Daichi Sadato, Machiko Kawamura, Noriyuki Ando, Keisuke Oboki, Masako Ukaji, Kaoru Kobayashi, Yukuharu Kobayashi, Tomoaki Ikeda and Futoshi Shibasaki

論文標題: Development of Simple and Quick Immunochromatography Method for Detection of anti-HPV-16/-18 Antibodies

雑誌名: PLoS One

査読: 有

巻: 12

発行年: 2017 年

頁: なし

DOI: 10.1371/journal.pone.0171314

[学会発表] (計 2 件)

発表者: 遠藤典子、田畑務、川村眞智子、

芝崎太

発表標題：Development of the simple and easy immunochromatographic method for detecting the serum HPV-16/-18 antibodies
学会等名：第74回 日本癌学会学術総会
発表年月日：2015年10月8日
発表場所：名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

発表者：遠藤典子、田畑務、川村眞智子、芝崎太

発表標題：Development of the method of HPV vaccine efficacy measurement
学会等名：第73回 日本癌学会学術総会
発表年月日：2014年9月25日
発表場所：パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遠藤 典子 (ENDO, Fumiko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・
生体分子先端研究分野・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・分野長
研究者番号：90300954

(3) 連携研究者

田畑 務 (TABATA, Tsutomu)
三重大学大学院・医学系研究科・准教授
研究者番号：40252358

川村 眞智子(KAWAMURA, Machiko)

埼玉県立がんセンター・血液内科・副
部長

研究者番号:80450592