

厚生労働科学研究費補助金  
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業  
ワクチンの品質確保のための国家検定に関する研究

分担研究報告書

HPV ワクチンの in vitro 力価試験に用いるウイルス様粒子の内部標準品の作成

研究分担者 柗元 巖 国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター 室長

研究要旨：ヒトパピローマウイルス感染予防ワクチン（HPV ワクチン）は、遺伝子組換え技術を使って作成したウイルス様粒子（Virus-like particle: VLP）をワクチン抗原として用いている。その製造の品質管理では、各メーカーが開発した酵素免疫測定法（ELISA）による in vitro 力価試験が用いられており、国家検定においてもメーカーから試験方法と試薬を導入して試験を実施している。その際、VLP の内部標準品もメーカーから提供を受けていることから、試験の成立を独自にモニターすることを目的に、感染研で独自の VLP 内部標準品を作成することを試みた。その結果、8 種類の HPV（HPV16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 58）の VLP を調製することに成功した。作成した HPV16/18 VLP は ELISA にて、それぞれの HPV 型の国際標準血清と特異的に反応した。得られた VLP は、HPV ワクチン検定における in vitro 力価試験の in house 内部標準品として有用であると考えられた。

#### A. 研究目的

ヒトパピローマウイルス（HPV）に対する感染予防ワクチン（HPV ワクチン）は、酵母や昆虫細胞・バキュロウイルスのタンパク質発現系を用いて作成したウイルス様粒子（Virus-like particle: VLP）を抗原として含む遺伝子組換えワクチンである。これまでに、HPV16/18 に対する 2 価ワクチン（サーバリックス、GSK 株式会社）、HPV6/11/16/18 に対する 4 価ワクチン（ガーダシル、MSD 株式会社）が世界で販売されている。さらに HPV6/11/16/18/31/33/45/52/58 に対する 9 価ワクチン（MSD 株式会社）が、2014 年には米国で、2015 年にはカナダ、欧州、オーストラリアで承認されている。

HPV ワクチンの品質管理における力価

試験として、酵素免疫測定法（ELISA）による in vitro 力価試験が各メーカーで開発され、用いられている。これらの試験は、HPV 型特異的な抗体を用いて VLP を捕捉するサンドイッチ ELISA という原理は共通しているものの、メーカー間で用いる試薬等や試験手順の詳細が異なり、試験方法の標準化はなされていない。また試験では力価として VLP の絶対含量ではなく、各メーカーが製造する参照ワクチン（product-specific reference）に対する相対含量（相対力価）を測定する。国家検定での in vitro 力価試験では、各メーカーからそれぞれの試験方法をそのまま感染研に導入して、試験を実施しているため、正確に VLP 含量を測定できているかを確認するための物差しとなる VLP 標準品を確立

して、適宜使用することが重要と考えられる。これまでに WHO が制定する国際標準品が存在しないことから、本研究では独自に VLP をヒト培養細胞で発現させ精製して、in house VLP 標準品の候補品を作成することを目的とした。

## B. 材料と方法

8種類の HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 58) の L1/L2 キャプシドタンパク質の細胞での発現プラスミドを作成した。HEK293FT 細胞にこれらのプラスミドを FuGENE HD (Roche) を用いて導入して、3日間培養を行った。細胞をセルスクレイパーで回収し、PBS で洗浄後、抽出液 (0.35% Brij 58 in DPBS, 使用時に Benzonase を添加) に懸濁して、37°C で一晩インキュベートしてタンパク質の抽出を行った。終濃度 730 mM になるよう NaCl を添加して、4°C で 10 分インキュベートした後、10,000 x g, 4°C で 10 分間、遠心分離して上清画分を得た。この上清を、27%/33%/39% OptiPrep 溶液の不連続密度勾配液に重層して、ベックマン超遠心機ローター SW55Ti を用いて 50,000 rpm, 16°C で 3.5 時間、遠心分離した。チューブの底に 22G の注射針で穴をあけてフラクショネーションを行い、10% SDS-PAGE にて VLP が含まれるフラクションを同定した。SDS-PAGE で BSA のバンドとの比較から、VLP 濃度を推定した。

HPV16/18 VLP の品質を評価するために、VLP を抗原に用いた ELISA を行って、HPV16 および HPV18 の国際標準血清 (HPV16, 05/134; HPV18, 10/140) およびワクチン接種者血清との反応性を調べた。VLP を PBS で希釈し、その 20ng を 96 穴プ

レートの各ウェルに分注して、4°C で一晩放置してプレートに固層化した。プレートを PBS/0.1% Tween 20 (PBST) で洗浄後、5% スキムミルク/PBST を各ウェルに加えて、室温で 2 時間インキュベートした。プレートを PBST で洗浄後、希釈した血清を各ウェルに加えて、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBST で洗浄後、HRP 標識 2 次抗体を加えて、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを PBST で洗浄後、基質溶液 (o-フェニレンジアミン/過酸化水素) を加えて、室温で 10 分後に 450nm の吸光度を測定した。

## C. 研究結果

HEK293FT 細胞に HPV の L1/L2 発現プラスミドを導入して、細胞抽出液から超遠心分離精製することで、8種類の HPV の VLP を調製した。得られた VLP 画分を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析したところ、分子量 55 kDa の L1 タンパク質を含む高純度の VLP が得られていることが示された (図 1)。収量は HPV16 VLP が最も多く (約 2 mg)、HPV18 VLP が最も少なかった (約 160 µg)。

得られた HPV16 と HPV18 の VLP について、HPV 型特異的抗体との反応性を ELISA にて調べたところ、HPV16 および HPV18 の国際標準血清と特異的に反応することが示された (図 2)。またこれらの HPV16/18 VLP は、ワクチン接種者の血清に含まれる抗 HPV16/18 抗体と高感度に反応した。

## D. 考察

HPV ワクチンの検定試験では、メーカーが確立した in vitro 力価試験を感染研に

技術移転して実施しており、市販されていない特殊な試薬（参照ワクチン、HPV型特異的抗体）は全てメーカーから提供を受けている。そのため試験が適正に実施されているかを確認するために、濃度が決定されている VLP 内部標準品を試験品と同時に試験することが重要であるが、現在はこの内部標準品もメーカーから提供を受けている状況にある。今回、感染研で作成した HPV16/18 の VLP は、検定試験において試験の成立をモニターするための in house 内部標準品として有用であると考えられた。

また近い将来、国内承認が予想される 9 価ワクチンに含まれる HPV 型のうち、6 種類の VLP (HPV16, 18, 31, 33, 52, 58)

を作成することが出来た。今後はこれらの VLP と HPV 型特異的抗体との結合特異性を検討する必要がある。

#### **E. 結語**

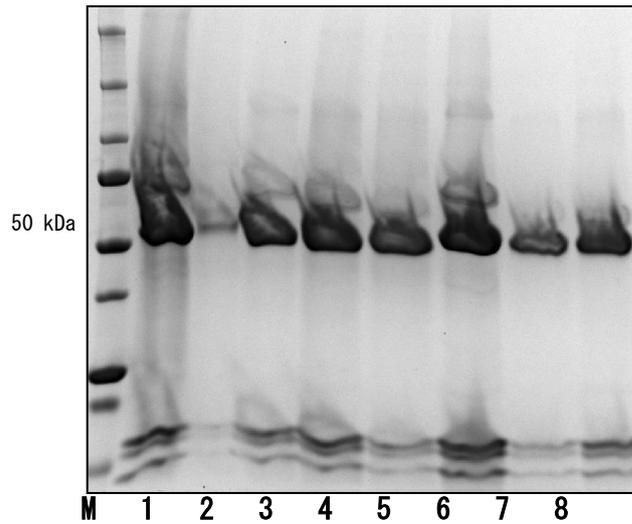
感染研内で 8 種類の HPV (HPV16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 58) の VLP を新たに作成した。これらは HPV ワクチン検定 (in vitro 力価試験) での in house 内部標準品として有用である。

#### **F. 研究発表**

なし

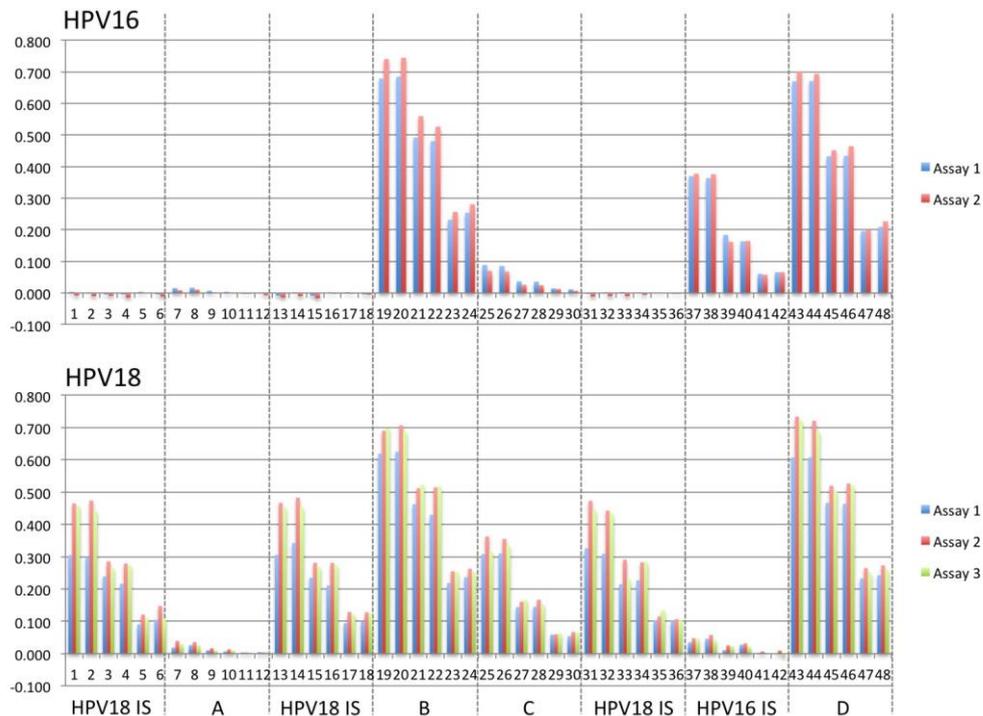
#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし



**図1 HPVウイルス様粒子のSDS-PAGE解析**

VLP画分 10  $\mu$ L を4-15% SDS-PAGE で分離後、GelCode 試薬にて染色。M, 分子量マーカー（上から 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15 kDa）；レーン 1, HPV16；レーン 2, HPV18；レーン 3, HPV31；レーン 4, HPV33；レーン 5, HPV35；レーン 6, HPV51；レーン 7, HPV52；レーン 8, HPV58.



**図2 HPV16/18 VLP の HPV 型特異的抗体との反応性**

HPV16 IS, HPV16 国際標準血清；HPV18 IS, HPV18 国際標準血清；A, HPV 非感染者の血清；B, HPV ワクチン接種者の血清；C, HPV18 感染者の血清；D, HPV ワクチン接種者の血清.