

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4840774号
(P4840774)

(45) 発行日 平成23年12月21日(2011.12.21)

(24) 登録日 平成23年10月14日(2011.10.14)

(51) Int.Cl. F I
A 6 1 K 39/23 (2006.01) A 6 1 K 39/23
A 6 1 P 31/12 (2006.01) A 6 1 P 31/12
A 6 1 P 35/00 (2006.01) A 6 1 P 35/00

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2006-535846 (P2006-535846)	(73) 特許権者	000000044 旭硝子株式会社 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成17年9月9日(2005.9.9)	(73) 特許権者	504160781 国立大学法人金沢大学 石川県金沢市角間町ヌ7番地
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/016638	(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
(87) 国際公開番号	W02006/028214	(74) 代理人	100124453 弁理士 資延 由利子
(87) 国際公開日	平成18年3月16日(2006.3.16)	(72) 発明者	笹川 寿之 石川県金沢市角間町ヌ7番地 国立大学法人金沢大学内
審査請求日	平成20年8月18日(2008.8.18)		
(31) 優先権主張番号	特願2004-263580 (P2004-263580)		
(32) 優先日	平成16年9月10日(2004.9.10)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 経口投与ワクチン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

非病原性分裂酵母宿主にヒトパピローマウイルスの抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養して得られる、発現した前記タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体、からなる経口投与用ヒトパピローマウイルスワクチンであって、該ワクチンが凍結乾燥菌体であることを特徴とするワクチン。

【請求項2】

非病原性分裂酵母宿主が、シゾサッカロミセス ポンベ(Schizosaccharomyces pombe)である、請求項1に記載のワクチン。

【請求項3】

ヒトパピローマウイルスがヒトパピローマウイルスタイプ16(HPV16)である、請求項1または2に記載のワクチン。

【請求項4】

ヒトパピローマウイルスの抗原タンパク質をコードする遺伝子が、ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質をコードする遺伝子である、請求項1、2または3に記載のワクチン。

【請求項5】

ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質がL1タンパク質である、請求項4に記載のワクチン。

【請求項6】

ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質が、ヒトパピローマウイルスタイプ16のL1タンパク質(HPV16-L1)である、請求項4または5に記載のワクチン。

【請求項7】

菌体内に蓄積されたタンパク質が、該タンパク質から構成されたウイルス様粒子を形成している、請求項4, 5または6に記載のワクチン。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトパピローマウイルス (human papilloma virus:以下単に「HPV」という場合もある。)に有効な経口ワクチンに関する。

10

【背景技術】

【0002】

HPVは、小型でエンベロープを有さない二十面体DNAウイルスである。そのウイルスゲノムのオープンリーディングフレーム(ORF)はE1~E7ならびにL1およびL2と称され、この場合の「E」は初期を意味し、「L」は後期を意味する。L1およびL2は、ウイルスキャプシドタンパク質をコードする。初期(E)遺伝子は、ウイルス複製および細胞トランスフォーメーションなどの機能に関連している。L1タンパク質は主要なキャプシドタンパク質であり、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定した場合、55~60kDaの分子量を有する。L2タンパク質は副次的なキャプシドタンパク質であり、同様に55~60kDaの推定分子量および75~100kDaの見掛け分子量を有する。

20

【0003】

先進国では、子宮頸癌による死亡率が近年減少してきたが、子宮頸癌は世界の女性たちの主な悪性腫瘍による死因の第5位であり、その発生率は第2位である。性行為によって伝達されるHPVのある特定のタイプが、子宮頸癌の最も重要なリスク要因である。最近の報告において、初めて性交を行った若い女性たちの30~50%の子宮頸部にHPVが感染していることが示されている。驚くべきことに、子宮頸部のHPV感染のほとんどは、癌を誘発する可能性のあるハイリスクタイプである。HPVタイプ16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 67 及び 68と、もしかするといくつかの他のタイプがハイリスクタイプであると考えられる。

若い女性たちの驚くほど高いHPV感染の流行は、子宮頸癌と戦うためにHPV感染症を防ぐことに向けられた教育及び社会の健康プログラムが十分効果的でないことを示唆している。特に、低開発国の女性や子宮がん検診をうけない若い女性において、子宮頸癌の発生を防止するためにハイリスクタイプHPV感染を防御することは優先すべきである。現在行われている細胞学的スクリーニング(子宮がん検診)と癌発生後に行われる治療は、経費効果から考えて最も良い選択とはいえないであろう。ハイリスクタイプHPVに対する予防ワクチンの全国的な使用によって、子宮頸癌の発生率を著しく減らすことが可能となる。HPV16のワクチン単独でも子宮頸癌を半減できるという試算がある。

30

【0004】

HPVワクチン開発では、昆虫細胞システムにおいて高いレベルでHPV16 L1 タンパク質が生産され、ウイルス様粒子のアセンブリ(以下単に「VLPs」という場合もある。)が導かれたことが報告されている(非特許文献1)。また、この昆虫細胞システムでHPV16-VLPsを合成することに成功したことも報告されている(非特許文献2)。

40

その後我々は分裂酵母シゾサッカロミセス ポンベ(Schizosaccharomyces pombe, 以下単に「S. pombe」という場合もある。)において、HPV6及びHPV16から誘導されたVLPsを生産することに成功した(非特許文献3)。分裂酵母からのVLPsの産生は、昆虫細胞システムからの産生よりも少ないが、分裂酵母を使用した発現システムは大規模なウイルス様粒子(以下単に「VLP」という場合もある。)を生産することができ、人への使用も安全である点で有利である。

【0005】

KoutskyらはHPV16-VLPワクチンの非経口的(注射)投与により、女性たちのHPV16感染

50

を100%防ぐことができたことを最初に報告した(非特許文献4)。

残念ながら、注射用HPV16-VLPワクチンの産生及び保存は、高等技術及び特別な設備を必要とするので高価である。また、効果を維持するために必要とされるワクチンの繰返し注射投与は実施に限界があり、また、訓練された医療スタッフ数に限りがある低開発国では実行不可能である。さらに、VLPの注射投与では、粘膜免疫において主要な役割を演じる分泌型IgAの誘導性に乏しいと報告された(非特許文献5)。粘膜関連リンパ組織(muco sa-associated lymphoid tissue :MALT)は、呼吸器及び消化器の器官系に存在する免疫組織であるが、その部位を免疫することによってHPVなど膣や子宮の粘膜上皮に感染するウイルスに対する感染を予防できる可能性がある。Balmelliらは、HPV16-VLPの鼻内投与によって、HPV16を中和する粘膜抗体を膣内に誘導することに成功した(非特許文献6)

10

しかしながら、鼻内投与用ワクチンは、比較的大量の精製HPV-VLP製剤を必要とする点で注射ワクチンと同様の問題点を有する。そこで、経口投与用ヒトパピローマウイルスワクチン(以下単に「経口HPVワクチン」という場合もある。)によって消化器官に関連するリンパ組織(gut-associated lymphoid tissue: GALT)を刺激し、強い膣粘膜免疫を誘導する試みがなされた。2つのグループがタバコ及びジャガイモから各々HPV11(非特許文献7)及びHPV16(非特許文献8)のL1遺伝子を発現させ、経口HPVワクチンを生産した。

【0006】

HPVのウイルス様粒子(HPV-VLP)の精製方法が特許文献1に、HPVのワクチン製剤としてパキユロウイルス発現系を用いたものが特許文献2~4に、昆虫細胞発現系を用いたものが特許文献5に開示されている。また、HPVに関する免疫療法用の核酸ワクチンについても開示されている(特許文献6)。

20

さらに、有効成分が非ワクチン原性の治療用送達系として微生物を使用したものが開示されている(特許文献7)。

【特許文献1】特表2003-520188号公報

【特許文献2】特表2001-519161号公報

【特許文献3】特表2002-516291号公報

【特許文献4】特表2002-510976号公報

【特許文献5】特開2004-269号公報

30

【特許文献6】特開2004-121263号公報

【特許文献7】特表平10-506791号公報

【非特許文献1】Rose RC, et al. J Virol. 1993; 67: 1936-44.

【非特許文献2】Kirnbauer R, et al. J Virol. 1993; 67: 6929-36.9

【非特許文献3】Sasagawa T, et al. Virology. 1995; 206: 126-35.

【非特許文献4】Koutsky LA, et al. N Engl J Med. 2002; 347: 1645-51.

【非特許文献5】Hagensee ME, et al. Virology 1995; 206: 174-82.

【非特許文献6】Balmelli C, et al. J Virol 1998; 72: 8220-9.

【非特許文献7】Warzecha H, et al. J Virol. 2003; 77: 8702-11.

【非特許文献8】Biemelt S, et al. J Virol. 2003; 77: 9211-20.

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の課題は、HPVに有効であり、低価格で大量に供給可能な経口HPVワクチンを提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、前述の課題を解決すべく研究を進めた結果、HPV関連タンパク質を発現した遺伝子組換え分裂酵母がワクチンとして使用可能か否かを検討し、本発明を完成した。

【0009】

50

すなわち本発明は、以下の要旨を有する。

- 1．非病原性分裂酵母宿主にHPVの抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養して得られる、発現した前記タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体、からなる経口HPVワクチン。
- 2．非病原性分裂酵母宿主が、*S. pombe*である、前項1に記載のワクチン。
- 3．ヒトパピローマウイルスがヒトパピローマウイルスタイプ16（HPV16）である、前項1または2に記載のワクチン。
- 4．ヒトパピローマウイルスの抗原タンパク質をコードする遺伝子が、ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質をコードする遺伝子である、前項1、2または3に記載のワクチン。
- 5．ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質がL1タンパク質である、前項4に記載のワクチン。
- 6．ヒトパピローマウイルスキャプシドタンパク質が、ヒトパピローマウイルスタイプ16のL1タンパク質（HPV16-L1）である、前項4または5に記載のワクチン。
- 7．菌体内に蓄積されたタンパク質が、該タンパク質から構成されたウイルス様粒子を形成している、前項4、5または6に記載のワクチン。
- 8．ワクチンが凍結乾燥菌体からなる前項1～7のいずれかに記載のワクチン。

【発明の効果】

【0010】

本発明の経口HPVワクチン、特に経口HPV16ワクチンの投与及びHPV-VLPの経鼻投与により、マウスにおいて血清IgG、腔IgG及び腔IgAの誘導が認められた。誘導された全ての抗体は、HPV-VLP抗原に対する強い反応性が認められた。これにより、この経口HPV16ワクチンはHPV16に対する予防ワクチンとして有用であることが示唆される。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】凍結乾燥酵母の胃における消化の程度を示す図である。（実験例1）

【図1B】凍結乾燥酵母の腹腔における消化の程度を示す図である。（実験例1）

【図1C】凍結乾燥酵母の腸における消化の程度を示す図である。（実験例1）

【図2】各HPV16ワクチン投与における各種抗体の誘導を示す図である。（実験例2）

【図3】各HPV16ワクチン投与後にHPV16-VLPを鼻内投与したときの各種抗体の誘導を示す図である。（実験例3）

【図4】各HPV16ワクチンの投与及びHPV16-VLPの鼻内投与後に誘導された抗体の性状を示す図である（実験例5）。

【図5】各HPV16ワクチンの投与及びHPV16-VLPの鼻内投与後に誘導された抗体の性状を示す図である（実験例5）。

【符号の説明】

【0012】

変性HPV16-L1抗原に対する反応（図4及び図5）

HPV16-VLP抗原に対する反応（図4及び図5）

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明は、HPVの抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体を培養して得られる発現した前記タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体を経口HPVワクチンとして提供するものである。

本発明において、HPVの抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入した形質転換体の宿主は、非病原性分裂酵母であり、より具体的には分裂酵母*S. pombe*である。

【0014】

本発明の「HPVの抗原タンパク質」は、特にHPVウイルスキャプシドタンパク質をいい、より好適にはL1をいう。本発明のHPVは、好適には子宮頸癌に対してハイリスクタイプのHPVであり、より具体的にはHPV16である。

本発明のS. pombeを宿主とするHPVの抗原タンパク質をコードする遺伝子を導入するための誘導発現ベクターは、外来遺伝子を導入して構築され、S. pombeに適用可能であれば良く特に限定されない。例えば特開平7-163373又は特開平11-192094に記載のマルチクローニングベクター等を使用することができる。例えば、チアミン抑制プロモーター支配下でHPV16-L1遺伝子を導入したベクターを用いると、該遺伝子組換技術によりウイルス様断片を合成することができる（非特許文献3）。得られたウイルス様断片が55kDaのL1タンパク質を含むことは、例えばウェスタンブロット法により確認することができる。

【0015】

本発明の「HPVの抗原タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体」は、非病原性分裂酵母にHPVの抗原タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体であればよく、特に限定されない。具体的には、上記の形質転換体（以下、「遺伝子組換S. pombe」という。）で発現したHPVの抗原タンパク質を菌体内に蓄積させるために、遺伝子組換S. pombeを適用可能な公知の培地及び条件、好適にはYPD培地を用いて、23~37℃で、6~192時間培養することができる。経口投与のために、上記培養後、遺伝子組換S. pombeを含む培養液を、適当な条件で遠心分離し、沈殿画分を収集して得ることができる。遠心分離は、0~50rpmで、1~60分間、加速度500~30000gの条件で行うことができる。

【0016】

上記遠心分離して収集した遺伝子組換S. pombeを、酵母ペレットといい、本発明の「HPVの抗原タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体」として使用することができる。また、該酵母ペレットは、必要に応じて凍結乾燥処理などの適当な処理を施すことができ、このような処理が施されたものについても本発明の「HPVの抗原タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体」ということができる。凍結乾燥処理は、通常S. pombe細胞を凍結乾燥させる条件であればよく、特に限定されないが、例えば最大棚温度-20℃で一晩の間処理することができる。本発明の経口HPVワクチンは、このようにして得られたHPVの抗原タンパク質を菌体内に蓄積した形質転換体を含む。

【0017】

経口免疫は、他の予防接種経路と比べていくつかの利点を示す。例えば、経口ワクチンはより容易に投与され、ワクチン受容者には受け入れられやすい。また経口ワクチンは、注射用に製剤化されたワクチンに比べ、有効成分の純度が低くてもよく、従って製造コストも低く抑えることができる。

【0018】

本発明の経口HPVワクチンを製剤として使用する場合には、医薬上許容しうる担体、希釈剤、アジュバント及び/又は緩衝液などの一以上の付加成分を包含することができる。また、本発明の経口HPVワクチンは、いわゆる食品等に含ませて使用することもできる。アジュバントとして、公知のものを使用することができるが、例えば大腸菌から誘導された粘膜アジュバントLT(R192G)を使用することができる。

【0019】

本発明の経口HPVワクチンは、酵母（湿重量）で一回当たり10~500mg/kg、好ましくは20~200mg/kgの間より選択して投与することができる。また、HPV16-L1タンパク質量で換算すると、0.05~5mg/kg、好ましくは0.1~2mg/kgの間より選択して投与することができる。該経口HPVワクチンは、単回投与してもよいし複数回投与してもよい。

本発明の経口HPVワクチンはHPV16に対する予防ワクチンとして有用であることが示唆される。さらに、本発明の経口HPVワクチンは、従来公知の注射用HPVワクチン及び/又は鼻粘膜投与用HPVワクチンの通常の使用方法に加えて本発明の経口HPVワクチンを組み合わせることもできる。例えば、従来公知のワクチンと併用して使用する「併用ワクチン」としての使用も可能である。また、一旦誘導された抗体価を維持するための「追加ワクチン」として使用することもできる。

【実施例】

【0020】

以下に、本発明の実施例と比較例について説明するが、本実施例は本発明の再現を補助

10

20

30

40

50

する目的でその一実施態様を示すものであって、本実施例から本発明の限界や制限事項は示唆されない。

【0021】

(実施例1) HPV16-L1タンパク質発現遺伝子組換え *S. pombe* 菌株の構築

非特許文献3の方法に従い、遺伝子組換え *S. pombe* を作成した。L1遺伝子の発現量を増加させるため、新しいベクターpTL2M(特開平7-163373)にHPV16-L1遺伝子(B27;野生型HPV16)を導入した。該遺伝子組換え *S. pombe* を2LのYPD培地で培養し、HPV16-L1タンパク質を発現させた。ウェスタンブロット法により、該遺伝子組換え *S. pombe* (pTL2-HPV16-L1)は55kDaのL1タンパク質を高いレベルで発現したことを確認した。得られたタンパク質を電子顕微鏡で観察した結果、ウイルス様粒子を形成していることが確認された。

10

なお、酵母菌体あたりの全タンパク質発現量は、酵母の湿重量あたり約10%であり、凍結乾燥酵母の重量に対しては約50%である。また、発現した全タンパク質に対するL1タンパク質の量は5~10%である。

【0022】

(実施例2) ワクチンのための不活化凍結乾燥酵母製剤

遺伝子組換え *S. pombe* を2LのYPD培地で培養後、4℃で10分間2000g遠心分離し収集した。遠心分離後得られたペレットをリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、150mg湿重量/mlとなるようPBSに再懸濁した。再懸濁した *S. pombe* は最大棚温度 -20℃で一晩凍結乾燥した。凍結乾燥した遺伝子組換え *S. pombe* を後述する実験で、経口ワクチンとして供するためプラスチックチューブ内で密閉し、使用まで4℃で保存した。該経口ワクチンを、便宜上「HPV16-L1酵母」という。

20

凍結乾燥して得られたHPV16-L1酵母を経口ワクチンとして使用するにあたり、該HPV16-L1酵母を不活化するために10倍量以上の容量の70%エタノール溶液に再懸濁し、4℃で30分間加温し、その後濾別乾燥して使用した。なお、経口投与する他の凍結乾燥 *S. pombe* も、使用するにあたり同様のエタノール処理を行って使用した。さらに、後記凍結乾燥していない「新鮮生酵母」も、経口投与にあたり同様のエタノール処理を行って使用した。

【0023】

(実施例3) マウス消化器官での酵母の消化検討用ワクチン

実施例1の方法と同様に、赤の蛍光発光タンパク質(RFP)を発現可能な遺伝子組換え *S. pombe* を作成した。該遺伝子組換え *S. pombe* を上記と同様の方法により培養し、上記2種のタンパク質を発現させた。培養後、4℃で10分間2000g遠心分離し、酵母ペレットを収集した。

30

【0024】

(実施例4) アジュバント

Curr Top Microbiol Immunol 1999; 236: 215-36に記載の方法で提供された大腸菌(*Escherichia coli*)の熱不安定な毒素LT(R192G)を粘膜アジュバントとして用いた。粉末状のアジュバントをPBSで懸濁し、使用まで-30℃で保存した。

【0025】

(比較例1) 鼻内免疫用HPV16-VLPの精製

実施例1で得たpTL2-HPV16-L1発現遺伝子組換え *S. pombe* から、改良法による塩化セシウム勾配(CsCl)超遠心分離法(Giga-Hama Y, et al. Biotechnology (N Y). 1994; 12: 400-4.)により、HPV16-VLPタンパク質を精製した。

40

4℃で5分間2000g遠心分離後、細胞を50mMのカリウムリン酸塩緩衝液[20mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む50mMのKH₂PO₄(pH6.5)]に再懸濁し、氷冷した。再遠心分離後、酵母ペレットを10mlのKCC緩衝液[5mg/mlのNovozymeを含む20mMのKPO₄(pH6.5), 800mMのKCl, 0.1mMのCaCl₂, 1.5mMのMgCl₂]に再懸濁し、32℃で30分間加温し、酵母の細胞壁を消化した後、60Wで1分間超音波処理を行った。4℃で10分間7000g遠心分離し、細胞抽出物を回収した。ペレットを0.5%の界面活性剤(NP-40)を含むVLP緩衝液(10mMのHEPES, 10mMのKCl(pH7.0))10mlで再懸濁し、上述の如く穏やかに超音波処理した。

【0026】

50

収集した上清を40%のシュクロース(sucrose)を含むVLP緩衝液に重層し、そしてBeckman SW28ロータ(Beckman Coulter社製)を用い、4 で2時間27000g遠心分離した。ペレットをVLP緩衝液で再懸濁した。27% (wt/wt) CsClで平衡させたVLP緩衝液内でSW28ロータを用い、4 で20時間27000g遠心分離した。適当な分画をVLP緩衝液で1.29g/mlの密度に希釈し、SW28ロータを用い、4 で2.5時間27000g遠心分離した。

ペレットはVLP緩衝液で再懸濁し、-30 で保存した。

HPV16-VLPタンパク質のアセンブリについて、構造的に独自のエピトープを有する2種のHPV16-モノクローナル抗体、Camvir-5及びCamvir-6 (Cambridg大学のMargaret Stanley氏より供給受け)を用いて酵素固相免疫測定法(ELISA)により確認した。

該HPV16-VLPタンパク質は鼻内免疫のために用いた。該経鼻ワクチンを、便宜上「HPV16-VLP」という。

【0027】

(実験例1) マウス消化器官での酵母の消化

生後9週の4匹のBALB/cのマウスを12時間絶食させ、実施例3で得た蛍光発光タンパク質(RFP)を発現した新鮮生又は凍結乾燥した酵母20mg(湿重量)を、1時間間隔で6回投与した。最終投与後、マウスを解剖して酵母の消化を調べた。マウスの消化器官を裁断し、スライドグラス上に標本を得た。各スライド上の蛍光性の酵母細胞をAxiovert S-100顕微鏡(Carl Zeiss社製、ドイツ)を用いて観察し、フジ3CCDカメラ(フジフィルム社製)で撮影した。

その結果、新鮮生酵母細胞は、多くの部分の消化管で見られ、便で排泄されたことから消化されなかったと考えられた。

それと対照的に、凍結乾燥酵母細胞は胃(図1A)又は空腸(図1B)では分解されなかったが、酵母細胞の数が回腸から大腸間で減少し、直腸では極めて少数しか認められなかった(図1C)。このことは、凍結乾燥酵母細胞は腸内の消化器官依存性リンパ組織(GALT)の存在する小腸部位で分解消化されたことを示唆する。

【0028】

(実験例2) 経口ワクチン「HPV16-L1酵母」の抗体産生能

生後9週のメスBALB/cマウスを用いた。12時間絶食させたのち、全マウスにPBSに懸濁した凍結乾燥酵母を与えた。その後、表1に示す6つのグループに分け、下記のワクチン投与を4週間間隔で行い、各マウスの抗体産生能を調べた。グループ1を陰性コントロールとし、グループ2を陽性コントロールとした。投与量は湿重量である。

【表1】

	マウス ID	ワクチン	投与量	アジュバント	投与経路
グループ1	No. 1-3	天然型酵母	50mg	-	経口
グループ2	No. 4-6	精製HPV16-L1	5 µg	10 µg	経鼻
グループ3	No. 7-9	HPV16-L1酵母	50mg	-	経口
グループ4	No. 10-12	HPV16-L1酵母	50mg	10 µg	経口
グループ5	No. 13-18	HPV16-L1酵母	150mg	-	経口
グループ6	No. 19-24	HPV16-L1酵母	150mg	10 µg	経口

【0029】

各ワクチンによる免疫後に、各マウスから血清検体及び腔検体を得た。血清検体はマウスの尾から採血したものより得、腔検体は腔を100 µlのPBSでマイクロピペットを用いて洗浄して得た。抗体生産に対するマウスの発情周期の影響を避けるために、腔検体は5日の間隔をおいて2度収集し、2つの検体を混合し、分析に供した。検体は最初の経口免疫の数日前及び免疫後4週間に収集した。全ての検体は繰返しの凍結溶解を避けるために分

10

20

30

40

50

注し、使用するまで-30 で保存した。

3種の免疫後に、HPV16特異抗体(IgG及びIgA)のレベルをELISAによって評価した(図2)。

【0030】

1) ELISA

Roseの方法(J Virol. 1993; 67: 1936-44., J Gen Virol 1994; 75: 2445-9.)により昆虫細胞から得られた精製HPV16-VLPタンパク質をHPV16-VLP抗原としてELISAに使用した。

IgG及びIgA検出のため、各々HPV16-VLP抗原を100ng及び300ng ELISA用プレート(NUNC Immunoplate Maxisorp; Nalgene Nunc International社製)にコーティングし、PBS中で4で一晩置いた。

コーティングしたプレートをPBST(PBS、0.1%Tween-20)で一回洗浄し、ブロッキング緩衝液(3%アルブミン、0.5%FCSを含むPBST)とともに室温(RT; 20-24)に1時間置いた。続けて行う全ての洗浄はPBSTで行った。

抗体反応において、1µlの血清検体又は20µlの腔検体を反作用緩衝液(1.5%ウシアルブミン、0.25% FCSを含むPBST)と混合し、ELISAプレートに加え室温で3時間加温した。

3回洗浄後、ビオチン化抗マウスIgA又はIgG抗体(反作用緩衝液でIgAは1:1500、IgGは1:1000に希釈)をプレートに加え、室温に1時間置いた。

3回洗浄後、PBSTで1:5000に希釈した100µlのストレプトアビジン-ホースラディッシュコンジュゲート(DAKO社製、ドイツ)をプレートに加え、30分加温した。

3回洗浄後、ABT [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma社製)の1つの錠剤を含む50mMのクエン酸緩衝液(pH5.0; 0.0075%の過酸化水素)100µlをプレートに加えた。室温で1時間発色させた後、自動化プレートリーダー(Iems Reader MS; Labsystems社製)を用いて波長405/540nmで濁度(OD)を測定した。

540nmでのOD値から405nmのOD値を引いて最終的なOD値を算出した。

【0031】

2) 評価法

ELISAにより得られた、血清中のIgA及びIgG抗体価のカットオフ値は、10匹の非免疫マウスから得られた血清及び腔検体の平均OD値に標準偏差値x 2.5を加えたものとした。ELISAは各検体について2回以上繰返し、その平均OD値を評価した。陽性及び陰性コントロールを各2セット各実験に含め、アッセイ間のバラツキを監視して行った。

【0032】

陽性コントロールのマウスすべてについて高いOD値をしめす血清IgG、腔IgG及び腔IgAが認められたが、血清IgAの応答は認められなかった。

最終的に、18匹のマウス中2匹のマウス(11%)(グループ3でのNo.7とグループ5でのNo.14)が2回目の免疫後に、各々弱い一過性の血清IgG 応答を認めた(図2A)。それとは対照的に、腔IgG又はIgA 反応は、経口ワクチン投与を行ったマウスのいずれも観察されなかった(図2B及びC)。

【0033】

(実験例3) 精製HPV16-VLPの鼻内投与による高められた免疫応答

陽性コントロール、陰性コントロール及びHPV16-L1酵母を経口投与したすべてのマウスについて、最終免疫12週間後に微量のHPV16-VLPを1µgブースターとして鼻内に投与した。

その結果を表2及び図3に示した。

10

20

30

40

【表 2】

抗体を誘発したマウスの血清IgG及び 腔IgA抗体価

マウス ID No.	ワクチン投与経路 1-3回目/4回目	抗原及び投与量			抗体価(希釈)	
		酵母	HPV16VLP	アジュバント	血清 IgG	腔 IgA
No.1	経口/経鼻	Wt ^a 50mg	1 µg		0	0
No.2	経口/経鼻	Wt 50mg	1 µg		0	0
No.4	経鼻/経鼻	0	5 µg+1 µg	10 µg	6400	1600
No.5	経鼻/経鼻	0	5 µg+1 µg	10 µg	25600	3200
No.6	経鼻/経鼻	0	5 µg+1 µg	10 µg	NA	NA
No.7	経口/経鼻	HPV16 ^b 50mg	1 µg	-	NA ^c	0
No.8	経口/経鼻	HPV16 50mg	1 µg	-	3200	NA
No.9	経口/経鼻	HPV16 50mg	1 µg	-	1600	NA
No.10	経口/経鼻	HPV16 50mg	1 µg	10 µg	NA	0
No.11	経口/経鼻	HPV16 50mg	1 µg	10 µg	1600	400
No.12	経口/経鼻	HPV16 50mg	1 µg	10 µg	1600	800
No.13	経口/経鼻	HPV16 150mg	1 µg	-	1600	NA
No.15	経口/経鼻	HPV16 150mg	1 µg	-	1600	800
No.17	経口/経鼻	HPV16 150mg	1 µg	-	3200	NA
No.19	経口/経鼻	HPV16 150mg	1 µg	10 µg	1600	100
No.21	経口/経鼻	HPV16 150mg	1 µg	10 µg	NA	100
No.22	経口/経鼻	HPV16 150mg	1 µg	10 µg	3200	800

a. 野生型酵母, b HPV16-L1酵母, c. 検出せず(Not applicable)

【 0 0 3 4 】

3匹の全陽性コントロール(100%)及び経口ワクチン投与されたマウスの9匹(50%)に、4週後に血清IgGの陽性反応が認められたが、陰性コントロールには認められなかった(図3A)。腔IgGに関しては、3匹の全陽性コントロール(100%)及び経口ワクチン投与されたマウスの6匹(33%)が陽性を示し、陰性コントロールのいずれもが陽性ではなかった(図3B)。腔IgAに関しては、3匹の全陽性コントロール(100%)及び経口ワクチン投与されたマウスの7匹(39%)が陽性を示し、陰性コントロールのいずれもが陽性ではなかった(図3C)。

【 0 0 3 5 】

微量のHPV16-VLPによる経鼻ブースター後も、酵母のみを経口投与された陰性コントロールからは免疫抗体は引き出されなかったのに対し、HPV16-L1酵母を経口で与えられたマウスは陽性の免疫抗体反応を示した。それは経口ワクチン投与によってすでにHPV16に特異的な免疫応答が認識されていた可能であることを示唆する。

【 0 0 3 6 】

(実験例4) HPV16-L1酵母の経口投与投与量及びアジュバントによる免疫応答の効果

HPV16-L1酵母を低量投与(50mg)又は高量投与(150mg)されたマウス間では、抗体の陽性率の差は認められなかった。

HPV16-L1酵母を経口投与されたマウスにおいて、抗体応答を増強させるため粘膜アジュバントLT(R192G)を共投与した。アジュバントを投与されたマウスには重大な副作用は認められなかった。アジュバントあり及びアジュバントなしのグループでHPV16-L1酵母を経口投与されたグループの間に血清IgG応答における差は観察されなかった。一方、アジュバントありのグループは、なしのグループに比べて、腔IgGは2倍、腔IgAは2.5倍陽性率が上昇した。しかし、統計上の有為差はみられなかった。アジュバントを加えたHPV16-L1酵母経口投与マウスでは、腔IgAのOD値は、アジュバントなしでHPV16-L1酵母を経口投与したマウスのOD値よりやや高い傾向を示した(P=0.085; Mann-Whitney test)。若干のア

10

20

30

40

50

ジュバント効果が示唆された。

【 0 0 3 7 】

(実験例 5) 経口及び経鼻によるワクチン投与により誘導された抗体の性状

HPV16-VLP又は変性HPV16-L1タンパク質でコートしたELISAによる抗体の反応性の差について調べた。

HPV16-VLPを含む重炭酸塩緩衝液(IgG用100ng及びIgA用300ng)を10分間煮沸し、ELISAの変性HPV16-L1抗原タンパク質として使用した。HPV16-VLP抗原又は変性HPV16-L1抗原に対する反応性をOD値で比較した。また、血清及び腔洗浄液を連続的に希釈し、免疫抗体力価を決定した。

先の研究では、HPV-VLPsの立体構造エピトープを認識できる抗体は、ウイルスに対する中和能を有することが報告されている。そこでHPV16-VLP抗原に対する反応性が、変性HPV16-L1抗原によるよりも強い抗体が誘導されたかどうかについて調べた。

10

【 0 0 3 8 】

HPV16-VLPにより経鼻ワクチン投与をされた2匹のマウス(No.4とNo.6)については、最初の経鼻的免疫においては変性HPV16-L1抗原に強く反応した。しかし、2回目の投与以降に誘導された血清IgG抗体は、HPV16-VLP抗原により強く反応した(図4A)。これは、2回目の免疫後にHPV16に対して非特異的な反応から特異的な反応への血清転換(seroconversion)の結果と考えられる(図4A)。

【 0 0 3 9 】

HPV16-L1酵母を経口投与されたマウスについて、経鼻ブースター免疫(No.12及びNo.22)の後、HPV16-VLP抗原に対してより強い応答が引き出された(図4B)。

20

それと対照的に、HPV16-L1酵母を経口投与され、一時的に陽性を示した2匹のマウスについては、ブースティング後最終的には陰性となり、1匹のマウス(No.7)は変性HPV16-L1抗原に対してより強く反応し、他のマウス(No.14)は、実験のタイムコース全体を通して両タイプのHPV16-VLP抗原に対して同等の反応を示した(図4B)。

【 0 0 4 0 】

HPV16-L1酵母を経口投与されたマウスの腔検体について、6匹について腔IgG抗体の誘導が認められ(図5A)、7匹について腔IgA抗体が認められた(図5B)。これらすべての抗体はHPV16-VLP抗原に対してより強力に反応した。

【 0 0 4 1 】

30

HPV16-L1酵母経口ワクチンが、血清IgGと同様にHPV16特異的腔IgA及びIgG抗体を誘導することが示めされた。凍結乾燥HPV16-L1酵母の経口投与単独では抗HPV16抗体を誘導できなかったが、その経口投与後に経鼻ルートで微量のHPV16-VLPを追加投与すると、血清IgG、腔IgG及び腔IgAがそれぞれ50%、33%及び39%のマウスで誘導された。一方、陰性コントロールマウスでは、同様の経鼻的ブースティングによっても抗HPV16抗体は誘導されなかった。経鼻的に投与されたHPV16-VLPによって、おそらくHPV16を認識したメモリーB細胞が活性化され、抗体産生が増強されたと考えられる。また、その際に誘発された全ての抗体は、変性HPV16-L1抗原よりもHPV16-VLP抗原により強く反応した。このことは、これらの抗体はHPV16抗原の立体構造エピトープを認識することを意味し、中和能を有する可能性を示唆する。

40

【 産業上の利用可能性 】

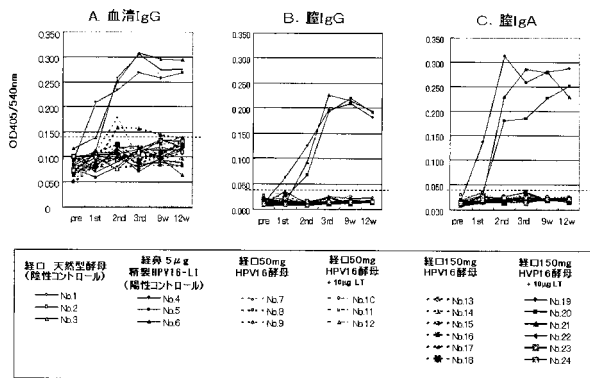
【 0 0 4 2 】

上記説明のように、本発明のHPV16-L1酵母経口ワクチンは中和抗体を誘導し、ワクチンとしての機能を発揮しうることが確認された。このことから、経鼻ワクチン単独又は注射用ワクチン単独の使用に比べ、患者の苦痛を軽減可能なワクチンを提供することができた。また、この経口ワクチンは、精製処理を必要としないので、低価格で大量のワクチンを提供することも可能となる。本ワクチンの利用法は様々であり、抗体のない人にHPV16抗体を誘導することが一番の目的であるが、一旦誘導された抗体価を維持するための追加ワクチンとしても利用できる。

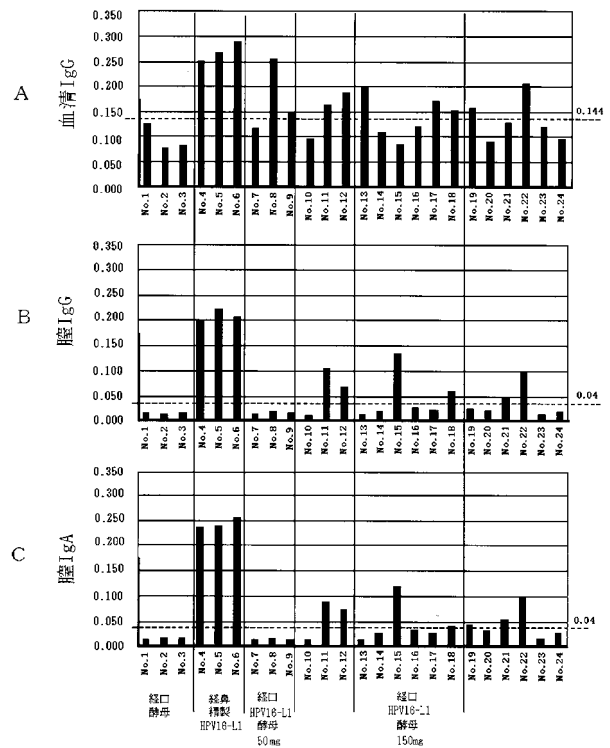
50

なお、2004年09月10日に出願された日本特許出願2004-263580号の明細書、特許請求の範囲、図面及び要約書の全内容をここに引用し、本発明の明細書の開示として、取り入れるものである。

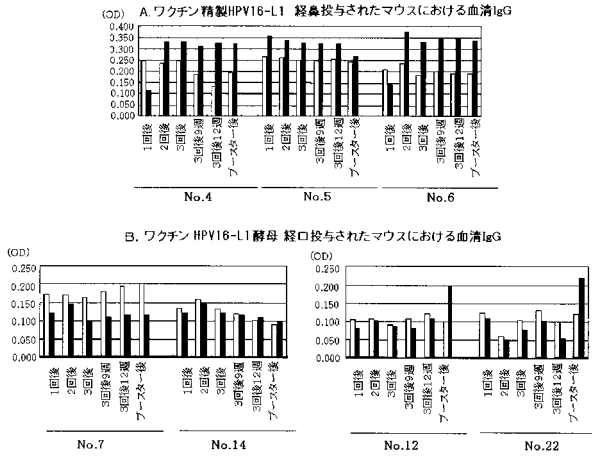
【図2】



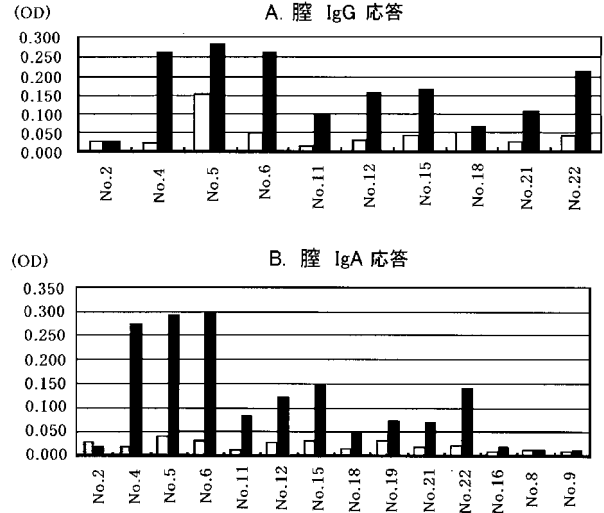
【図3】



【 図 4 】



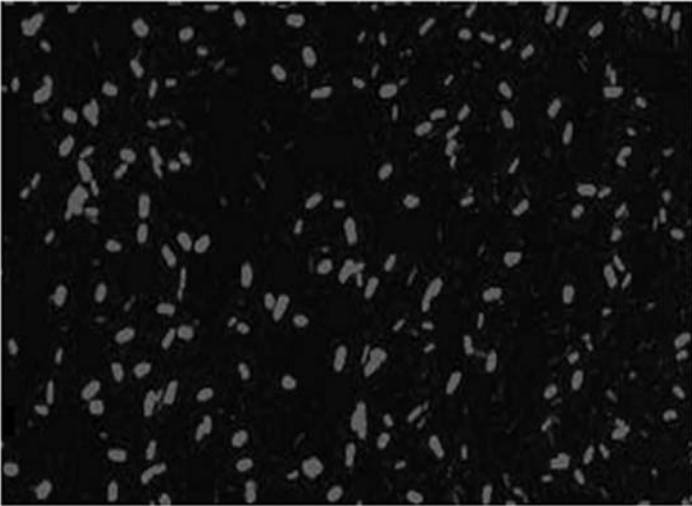
【 図 5 】



【 図 1 A 】



【図 1 B】



【図 1 C】



フロントページの続き

- (72)発明者 東田 英毅
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1 1 5 0 番地 旭硝子株式会社内
- (72)発明者 浜 祐子
神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1 1 5 0 番地 旭硝子株式会社内

審査官 松波 由美子

- (56)参考文献 Journal of Virology , 2 0 0 3 年 , Vol.77, No.16 , p.8702-8711
FEMS Immunology and Medical Microbiology , 2 0 0 3 年 , Vol.38 , p.231-239
Virology , 1 9 9 5 年 , Vol.206 , p.126-135

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
- A61K 39/23
 - A61P 31/12
 - A61P 35/00
 - CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)