

ウエスタンブロット法による子宮頸癌患者と 健康人血清中の2型単純ヘルペスウイルス (HSV-2) 抗体の解析とELISA法による抗体価測定

前田由紀子

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

Western Blotting Analysis and ELISA on Serum Antibodies against Herpes Virus Type-2 (HSV-2) among Uterine Cervical Cancer Patients and Healthy Women
Yukiko MAEDA (*Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University*)

Abstract: Antibodies against HSV-2 early antigens (EA) prepared from infected HEp-2 cells were analyzed by the Western blotting method using 20 each individual sera from uterine cervical cancer (CaCx) patients as well as from healthy control women. The number of polypeptide bands reacted with CaCx patients' sera were generally more than that with healthy controls, especially for IgM than IgG-class of antibodies. IgM antibodies against 3 bands with estimated molecular weight of 110k, 74 k, and 64k daltons were more frequently detected among CaCx patients than controls with statistical significance level of 1%. While, IgG antibodies against 100k dalton band were more frequent among CaCx patients than controls with statistical significance level of 5%. The 110k and 64k dalton polypeptides were more abundant in nuclear fraction, while 74k dalton polypeptide was more in the cytoplasm. The EA primarily containing 110k and 64k dalton polypeptides was prepared from nuclear fraction of HSV-2 infected HEp-2 cells after 12 hours of incubation in the presence of cytosine arabinoside (Ara-C) and was used to measure IgG and IgM antibody titers among CaCx patients, other cancer patients as well as healthy controls by the indirect micro ELISA. Antibody titers against HSV-2 virion antigen was also measured and compared by the same procedure. Significant difference was observed between CaCx patients and healthy controls and also between CaCx patients and other cancer patients in their IgM titer distribution against EA at 1% significance level. Percentage of the specimens with IgM titers exceeding the upper limit of healthy controls (360) was 10.8% for CaCx and 1.9% for other cancer patients, while, difference in the IgG titer against EA was observed between CaCx patients and healthy controls at 5% significance level. In contrast, titers

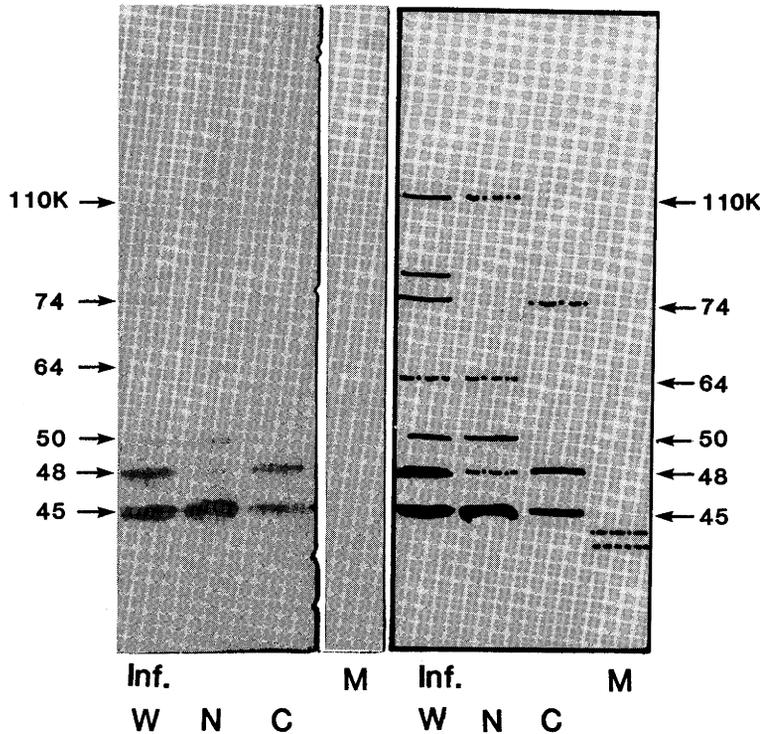


Photo. 2. Localization of several HSV-2 EA polypeptides reacting with CaCx patients' IgM antibodies in HEP-2 cells as shown by the Western blotting pattern on the left and its diagram on the right. Inf: infected cells, M: mock infected cells, W: whole cells, N: nuclear fraction, C: cytoplasmic fraction, Three CaCx patients' sera were pooled and used in the staining.

有意差が認められなかった。

各抗体価間の相関性

ELISAで測定に用いた抗原と測定されたIgG又はIgM抗体の種々の組み合わせに対して子宮頸癌患者と健常人について各人の抗体価の間の相関係数(r)をもとめTable 4に示した。初期抗原に対するIgM抗体価とIgG抗体価の相関は子宮頸癌患者と健常人共に0.56前後とよく似た値を示したが、virionに対する抗体価と初期抗原に対する抗体価の合わせでは子宮頸癌患者と健常人の r 値間に差が認められた。即ち、初期抗原に対するIgG抗体価とvirionに対するIgM抗体価との r 値は子宮頸癌患者で0.625であるが健常人では0.241と低い。同様の傾向はvirionに対するIgM抗体価と初期抗原に対するIgM抗体価の間でも若干認められた。一方、virionに対するIgG

抗体価と初期抗原に対するIgG抗体価との r 値は子宮頸癌患者では0.188と健常人の値0.429よりもかなり低かった。Table 5は上記のELISA抗体価の相関関係の各々の組み合わせに対して求められる回帰直線の切片(A)と勾配(B)を示している。これらの値のうち子宮頸癌患者と健常人の間で2倍以上差のあるのは初期抗原に対するIgGとvirionに対するIgMの回帰直線のB値と、virionに対するIgGと初期抗原に対するIgGの回帰直線のB値である。Table 4に示した様に、両組合せ共、 r 値でも子宮頸癌患者と健常人の間に差を認めている。前者の組み合わせの場合、子宮頸癌患者では初期抗原に対するIgG抗体価が上昇したときvirionに対するIgG抗体価の上昇は少なく、これに対して後者の組み合わせの場合、健常人ではvirionに対するIgG抗体価が上昇したと

吸着後Ara-C(20 μ g/ml)を含む維持液(2%FCSを含むEagle液)を加えた。感染後12時間の感染細胞を集め、PBSで2回洗浄後使用するまで-70 $^{\circ}$ Cに保存した。

ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウエスタンブロット法: 感染細胞をDisruption buffer(0.05M Tris-HCl, pH 7.0, 8.5% Sucrose, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol)で溶解し、100 $^{\circ}$ C, 3分間熱変性後9%不連続ゲル(Laemmli, 1970)を用い20mAの定電流で泳動した。分離されたポリペプチドはニトロセルロース膜に電気泳動で写し取り、免疫酵素染色法により検出した(Towbin *et al.*, 1979; Burnette, 1981; Naser and Miltenburger, 1983)。膜を3%カゼインで45分間不活化後、被検血清(子宮頸癌患者20名, 健常人20名)を反応させた。IgM抗体測定には20倍希釈被検血清, 200倍希釈抗ヒトIgMウサギIgG, 1,000倍希釈HRPO-標識抗ウサギIgGをそれぞれ順に反応させた。IgG抗体測定には100倍希釈被検血清, 1,000倍希釈HRPO-標識抗ヒトIgGを順に反応させた。全ての反応は37 $^{\circ}$ Cで2時間行い各反応間はPBSで5分間3回洗浄した。次いで25 μ g/mlのo-dianisidineと0.02%のH₂O₂を含むPBS中でHRPOの発色反応を行い抗体と反応したバンドを検出した。

ELISA抗原の調整: Virion 抗原はHSV-2感染Vero細胞培養液をポリエチレングリコール沈殿後15%-50%ショ糖密度勾配遠心法で精製したvirionを用いた。初期抗原はHSV-2感染HEp-2細胞にHypotonic buffer(1.6mM MgCl₂, 6mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.0, 1mM dithiothreitol, 0.5% Nonidet P-40)を加え、4 $^{\circ}$ C, 5分間静置後1分間Vortexミキサーかくはんにより細胞を破壊し、480 \times g, 10分間遠心した。上清の細胞質分画を除き、沈殿した核分画をPBSで2回洗浄し超音波破碎後、100,000 \times g, 1時間遠心した上清を採取し、20%飽和硫酸で不溶性のものを除いた後、30%飽和硫酸で沈殿する分画をPBSに透析したものをELISA用初期抗原として用いた。

ELISA法: 微量間接法(Voller *et al.*, 1976)を用い、96穴マイクロプレートに0.05M炭酸重炭酸緩

衝液で希釈した抗原を4 $^{\circ}$ C一夜で反応させて固相化し、ウエスタンブロット法に準じて反応させた。但し、血清はPBS-T(0.05% Tween20と0.02% NaN₃を含むPBS)で希釈し、発色は0.5mg/mlのo-phenylenediamineと0.02%のH₂O₂を含む0.05Mクエン酸リン酸緩衝液で行った。ELISA抗体価は、段階希釈した陽性標準血清の発色と検体の発色反応を比較し計算した(Igarashi *et al.*, 1981; Morita *et al.*, 1982)。

統計処理方法: STAXのプログラムを用いてマイクロコンピュータ処理を行った。

結 果

ウエスタンブロット法により検出される抗原の解析

Photo 1は被検血清のIgM抗体ウエスタンブロット法の染色パターンをしめす。HSV-2感染細胞中には、被検血清と反応する10-30のポリペプチドバンドが認められ、個々の血清が反応するバンドの数と種類にかなりの個体差が有ることがわかった。IgM抗体では多いものでは約30本、IgGでは約20本のバンドが確認できたが発色の弱いバンドはその有無が一定しないので、強く発色するものを分子量の大きいものから順に番号を付け、IgG抗体の場合も同様に処理してFig. 1にまとめた。この図では陽性に反応したバンドを黒ぬりて表しており、IgG抗体よりもIgM抗体が反応するバンドの数が多く、子宮頸癌患者が健常人よりも多くのバンドを認識反応していることが判明した。さらに同一人についてもIgMとIgGでは反応パターンに差があることが認められた。それぞれのバンドについて陽性者数を調べたものをTable 1に示した。IgM抗体ではバンドの5番目(分子量110K), 9番目(分子量74K), 11番目(分子量64K)の出現頻度に患者と健常人の間で統計的有意差が認められた。IgG抗体では、3番目(分子量100K)のみに差が認められた。目的とするポリペプチドの細胞内での局在をIgM抗体に対するウエスタンブロット法で調べたものをPhoto 2に示した。分子量110Kと64Kのポリペプチドは核内に多いのに対して、74Kポリペプチドは細胞質に多く含まれていた。尚、未感染細胞にはこれらのポリペプチドは含まれていなかった。

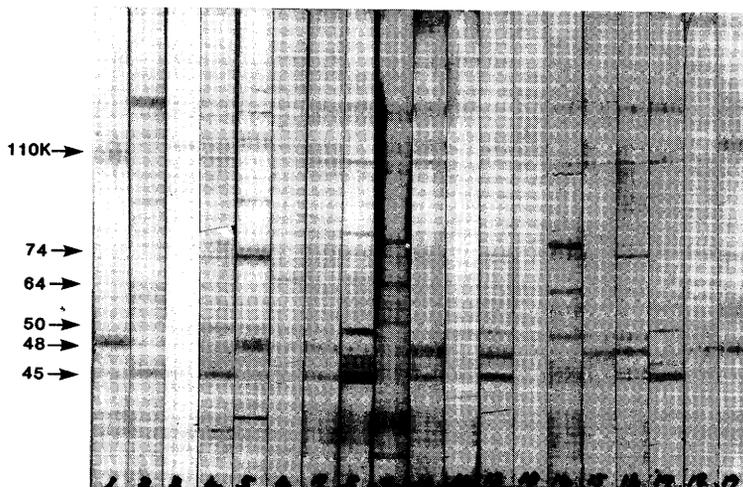


Photo. 1. Patterns of the Western blotting staining of HSV-2 EA by IgM antibodies from CaCx patients.

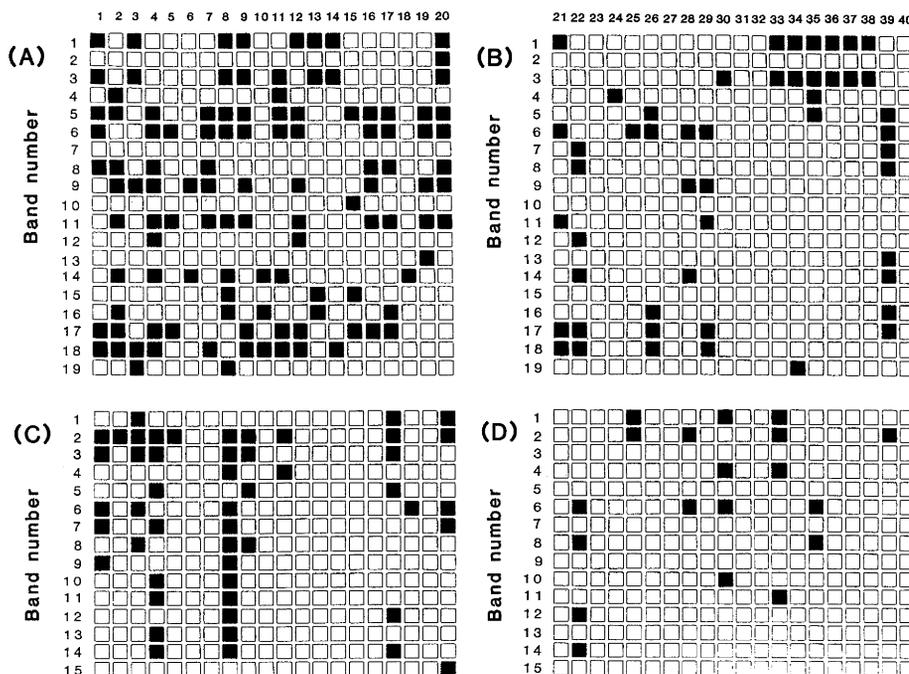


Fig. 1. Western blotting detection of HSV-2 EA polypeptides.
 (A) : reacting with IgM antibodies from CaCx patients sera (lanes 1 to 20)
 (B) : reacting with IgM antibodies from control sera (lanes 21 to 40)
 (C) : reacting with IgG antibodies from CaCx patients sera
 (D) : reacting with IgG antibodies from control sera.

ELISA法による抗体価の測定

Fig. 2 は間接ELISA法による子宮頸癌患者と健常人及びその他の癌患者のHSV-2初期抗原に対するIgMおよびIgG抗体価の頻度分布を, Fig. 3 は virion に対する抗体価の頻度分布をそれぞれ示している. Table 2 はそれぞれのグループの抗体価の幾何平均値 (GMT)と上限及び癌患者で健常人の抗体価の上限を越える値を示す者の数と%を示している. 健常人の初期抗原に対する IgM 抗体価の上限は360であったが, 子宮頸癌患者にはそれ以上を示す者が22名 (子宮頸癌患者の10.8%), 他の癌患者には1名 (1.9%)存在した. 初期抗原に対する IgG 抗体価では子宮頸癌患者の3名 (1.5%)が他のグループの抗体価上限以上の値を示した. 一方, virionに対するIgM抗体価では子宮頸癌患者の6名

(2.9%)が健常人の値を示したが他の癌患者ではそのような者は見られなかった. 又, virionに対するIgG抗体価では子宮頸癌患者の10名 (5.0%)と他の癌患者の2名 (3.7%)が健常人の上限以上の値を示した.

次いで初期抗原及び virion に対する IgM 及び IgG ELISA 抗体価の有意差検定を各グループ間の組み合わせについて行い Table 3 にまとめた. 子宮頸癌患者と健常人の間には初期抗原に対するIgM及びIgG抗体共に危険率1%で有意差があり, virionに対してはIgG抗体のみ危険率5%で有意差が認められた. 子宮頸癌患者と他の癌患者の間には初期抗原に対するIgM抗体価でのみ危険率1%で有意差を認めた. 一方, 他の癌患者と健常人の間では初期抗原及びvirionに対するIgG及びIgM抗体共に

Table 1. Polypeptides of HSV-2 early antigen detected by the Western blotting using Sera from CaCx patients and healthy controls

IgM				IgG			
Band No.	CaCx patient	Healthy control	Molecular weight	Band No.	CaCx patient	Healthy control	Molecular weight
1	8	7		1	3	3	
2	1	0		2	10	4	100 k
3	8	7		3	6	0*	
4	2	2		4	2	2	
5	13	3*	110 k	5	3	0	
6	12	6		6	5	4	75 k
7	0	2		7	4	0	
8	7	2		8	3	2	
9	10	2*	74 k	9	2	0	
10	1	0		10	2	1	
11	11	2*	64 k	11	2	1	
12	2	1		12	2	1	
13	1	1		13	2	0	
14	7	3		14	3	1	
15	3	0		15	2	0	
16	5	2					
17	10	5					
18	10	4					
19	2	1					

Molecular weights of polypeptides were shown only for those combinations with significant difference between CaCx patients and controls at 1% (*) or 3%(*) level.

against virion antigen showed significant difference at 5% level only in IgG antibodies between CaCx patients and healthy controls. Correlation coefficients and equation of linear regression for each combination of antibodies and antigens indicated some difference between CaCx patients and healthy controls in terms of production of HSV-2 EA and virion, or their antigen recognition process. Follow-up studies on 39 postoperative CaCx cases showed that recurrence was observed among 5 of the 11 cases with significant increase in their IgM-ELISA titers against HSV-2 EA. No recurrence was observed among 28 cases with decreasing or constant IgM-ELISA titers during observation period, although 3 of them showed high IgM titers exceeding the upper limit of 360 for healthy controls. Difference between these 2 groups was statistically significant of less than 0.5% level.

Key words: Western blotting, Early antigen, Herpes simplex virus type 2, ELISA

Trop. Med. 28(3), 165-178, September, 1986

緒 言

1970年前後から子宮頸癌と単純ヘルペスウイルス2型(HSV-2)感染との関連が述べられて以来、癌患者と健常人を対象とする血清疫学的調査がなされてきた(Rawls *et al.*, 1977). その結果ある種の初期抗原を癌関連抗原とする報告(Aurelian *et al.*, 1973a, b, 1981; Hollinshead *et al.*, 1976; Gilman *et al.*, 1980; Dressman *et al.*, 1980; Kaufman *et al.*, 1981), 子宮頸部扁平上皮癌細胞内のHSV-2特異的DNAないしはRNAの検出(Frenkel *et al.*, 1972; Eglin *et al.*, 1981; McDougall *et al.*, 1982), 癌組織からHSV-2の分離(Aurelian and Strandberg, 1974)等の報告がなされてきたが, HSV-2と子宮頸癌との関連を否定的とする報告もあり(Notter and Docherty, 1976; Heise *et al.*, 1979; Arsenakis *et al.*, 1980; Arsenakis and May, 1981), 未だ明確な結論を得ていない. そこで著者等はHSV-2及び1型ヘルペスウイルス(HSV-1)感染HEp-2細胞からウイルス特異的初期抗原(EA)を調製しペルオキシダーゼ(HRPO)で標識した後, 直接ELISA法によって子宮頸癌患者血清と健常人血清の抗体価を測定した(Maeda *et al.*, 1986). その結果子宮頸癌患者にはHSV-1及びHSV-2 EAに対するIgM-ELISA抗体価が健常人の抗体価上限よりも高い者が若干存在する事が判明したが, この方法の感度並びに使用

した抗原の純度が低いために明確な結論を得るに至らなかった. そこで今回はウエスタンブロット法により各20名の子宮頸癌患者と健常人血清のHSV-2 EAに対する反応性を解析し, 健常人に比較して子宮頸癌患者血清と反応する特徴的なポリペプチドの有無を調べ, これらのポリペプチドを含む初期抗原をHSV-2感染HEp-2細胞核より調整し, この抗原及びHSV-2 virion抗原を用いた間接ELISA法により, 子宮頸癌患者, 健常人及びその他の癌患者のIgM及びIgG抗体価に有意差があるか否かを検討した.

材料と方法

ウイルス: HSV-2 (Savage株)を用い, 感染価はプラーク法で測定した. 高力価の種ウイルスを得るためにウイルスをVero細胞で増殖後, 超遠心で濃縮し, -70°C に保存した.

細胞: Vero細胞をウイルスの増殖と感染価測定に, HEp-2細胞をウエスタンブロット法及びELISA用初期抗原作製にそれぞれ用いた. 両細胞共 37°C で10%胎児牛血清(FCS)を含むEagle液で培養した.

被検血清: 子宮頸癌患者204名/257血清, 健常人167名/169血清, その他の癌患者54名/65血清を30-80才の女性から得た.

HSV-2感染細胞の作製: HEp-2細胞にHSV-2を感染多重度(moi)20で感染させ, 37°C , 1時間

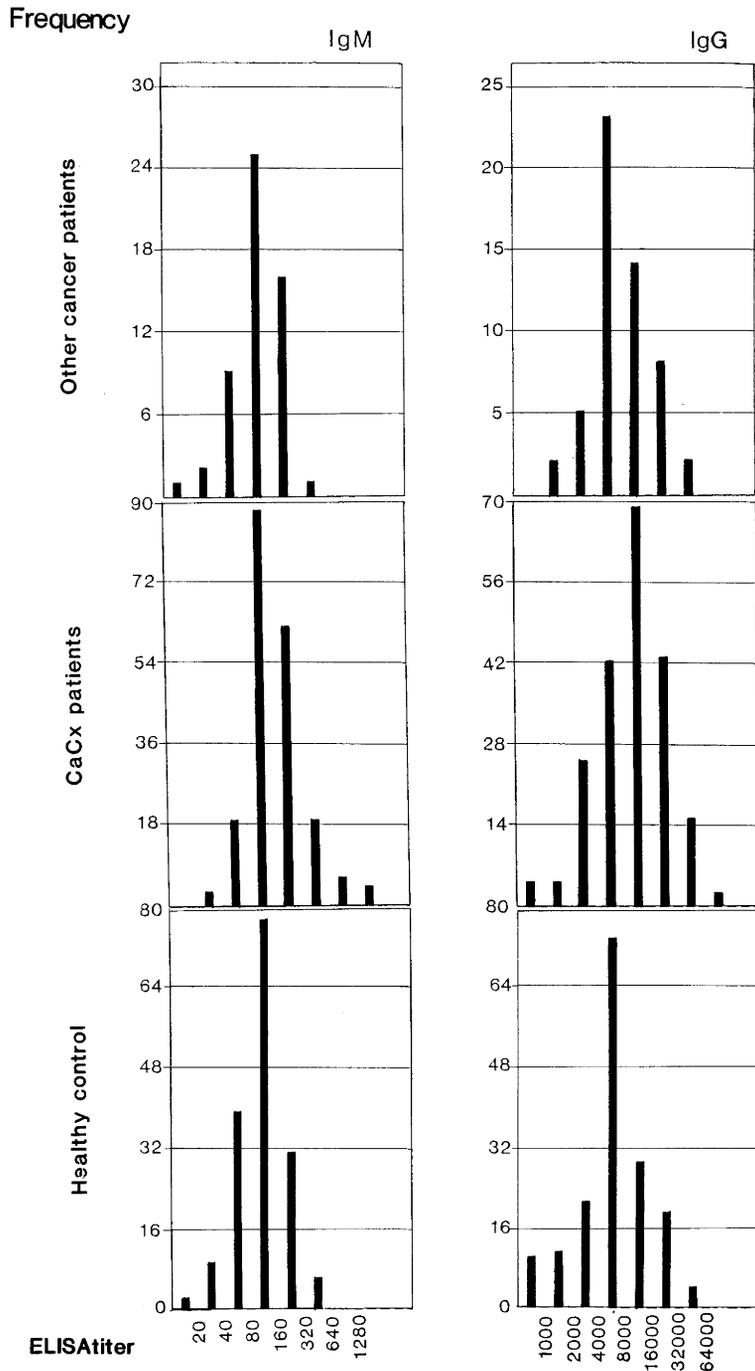


Fig. 2. Distribution of IgM and IgG ELISA titers against HSV-2 EA antigens in sera from CaCx patients, other cancer patients and healthy controls.

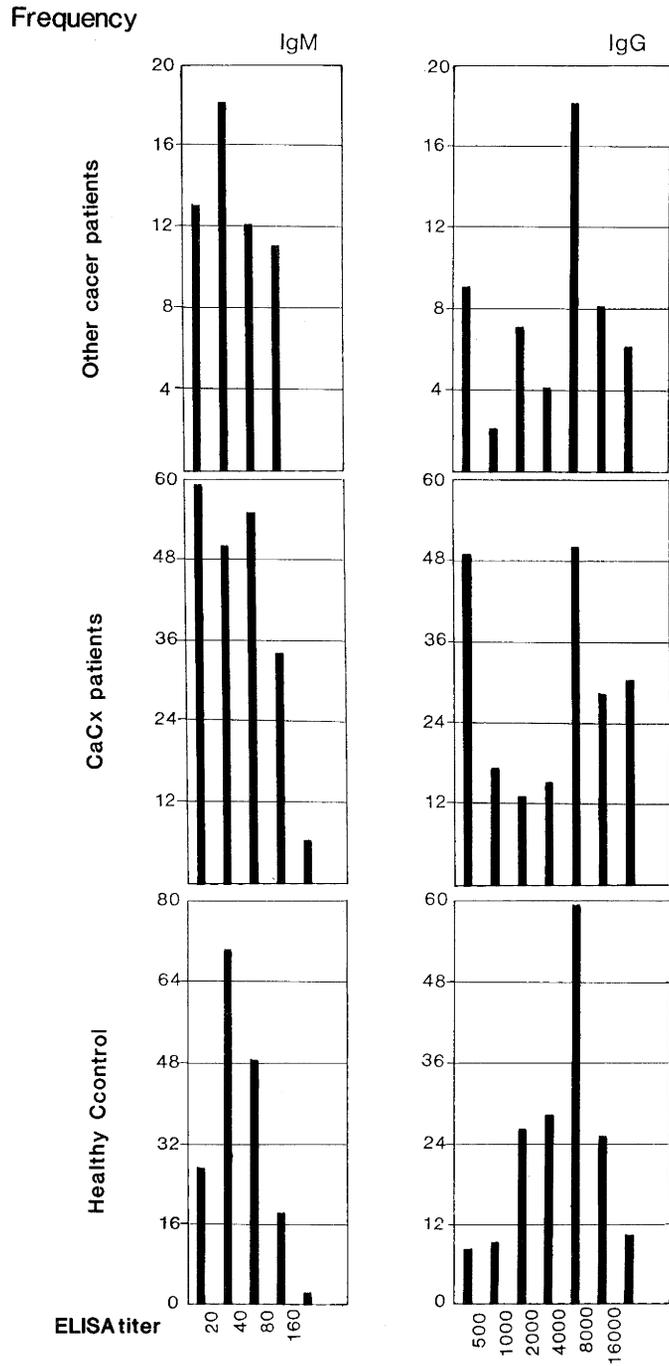


Fig. 3. Distribution of IgM and IgG ELISA titers against HSV-2 virion antigen in sera from CaCx patients, other cancer patients and healthy controls.

Table 2. Geometrical mean titer (GMT) and upper limit of ELISA titers

Immuno globulin	Assay antigen	Specimens		ELISA Titer		Number and (%) over healthy upper limit
		Category	Total number	GMT	upper limit	
IgM	E A	Healthy	164	118	360	22 (10.8) 1 (1.9)
		CaCx	201	224	3000	
		Other Cancer	54	133	394	
IgG		Healthy	167	8580	61236	3 (1.5) 0 (0)
		CaCx	204	13602	80000	
		Other Cancer	54	10713	56558	
IgM	virion	Healthy	165	42	222	6 (2.9) 0 (0)
		CaCx	204	52	560	
		Other Cancer	54	47	148	
IgG		Healthy	165	5961	30239	10 (5.0) 2 (3.7)
		CaCx	202	8672	175124	
		Other Cancer	54	10983	162142	

Table 3. Statistical significance level between ELISA titers

Assay antigen	Immuno globulin	CaCx &		Other cancer
		Healthy	Other cancer	& Healthy
E A	IgM	1 %	1 %	20-30%
	IgG	1 %	5-10%	10-20%
virion	IgM	5-10%	30-40%	40-50%
	IgG	5 %	50-60%	10-20%

Table 4. Correlation coefficient (r) between ELISA titers

X-axis		Y-axis		r-value	
Immuno globulin	Assay antigen	Immuno globulin	Assay antigen	CaCx patients	Healthy control
IgM	virion	IgM	E A	0.434	0.257
IgG	E A	IgM	E A	0.564	0.559
IgG	virion	IgM	E A	0.298	0.320
IgG	E A	IgM	virion	0.625	0.241
IgG	virion	IgM	virion	0.176	0.336
IgG	virion	IgG	E A	0.188	0.429

Table 5. Equation of linear regression line ($Y=A+BX$)

X-axis		Y-axis		CaCx patients		Healthy control	
Immuno globulin	Assay antigen	Immuno globulin	Assay antigen	A	B	A	B
IgM	virion	IgM	E A	1.68	0.34	1.66	0.22
IgG	E A	IgM	E A	0.41	0.45	0.57	0.38
IgG	virion	IgM	E A	1.77	0.13	1.30	0.19
IgG	E A	IgM	virion	1.27	0.07	0.84	0.18
IgG	virion	IgM	virion	1.20	0.10	0.71	0.23
IgG	virion	IgG	E A	3.63	0.99	2.40	0.38

Table 6. Change in IgM-ELISA titer against HSV-2 EA during follow-up studies on operated CaCx patients

IgM-ELISA titer		Number of cases		
Change	limit 360*	Recurrence		Total
		+	-	
Increase	over	3	1	4
	under	2	5	7
Decrease or no change	over	0	3	3
	under	0	25	25
Total		5	34	39

* Upper limit of IgM-ELISA titer against HSV-2 EA for healthy control.

き初期抗原に対するIgG抗体価の上昇が少ない事を示している。これらの結果は子宮頸癌患者と健常人の間にHSV-2のvirion抗原と初期抗原に対するIgG及びIgM抗体反応性に差がある事を示している。

子宮頸癌術後患者のHSV-2初期抗原に対するIgM抗体価

Table 6は子宮頸癌患者の術後追跡調査のできた39例について調査期間中のHSV-2初期抗原に対するIgM ELISA抗体価の変化を示している。抗体価が調査期間中に上昇したものが11例有りその内5例(45%)に子宮頸癌の再発が認められたが、抗体価の上昇を示さなかった28例については健常人の抗体価上限以上の抗体価を示した3例を含め未だ再発は

認められていない。両者間の差は危険率0.5%以下で極めて有意である。

考 察

ウエスタンブロット法による反応パターンをもとに子宮頸癌患者に特異的と考えられるポリペプチドを含むHSV-2初期抗原を用いたELISA法を行った結果、Table 2及びTable 3に示したように子宮頸癌患者は他の癌患者及び健常人と有意に違ったIgM抗体反応を示すという結果を得た。また三者のvirionに対する反応性及びTable 4, 5の結果から考えて、子宮頸癌患者にHSV-2感染既往があるものが多いというのではなくむしろHSV感染の既

往には大きな差はないが、感染後初期抗原が発現し、virion形成に至る過程、或はこれらの抗原の認識過程に子宮頸癌患者と健常人の間で何らかの違いがある可能性が示唆される。この原因として、子宮頸部細胞にHSV-2の初期抗原が多く発現すると癌化につながるのか、癌化した細胞に初期抗原がより多く発現するのか、癌化した細胞にHSVが感染しやすいのか、未だ明らかでないが、初期抗原発現のメカニズムに子宮頸癌患者と他の癌患者或は子宮頸癌患者と健常人の間に差がある可能性も考えられる。

初期抗原に対するIgM ELISA抗体価の頻度分布 (Fig. 2) 及び抗体価の上限 (Table. 2) から初期抗原に対するIgM ELISA抗体価が360を越える例では子宮頸癌の可能性が高く、またTable 6の結果から術後追跡調査中にHSV-2初期抗原に対するIgM抗体価の上昇した場合には子宮頸癌再発の可能性を疑うことも可能ではないかと思われる。

現在、子宮頸癌のスクリーニングはvaginal smearによる細胞診により行われこの方法に勝るものは無いのが現実であるが、血清中になんらかの子宮頸癌に特徴的なマーカーを見つけることが出来れば癌検診の受診率の上昇につながると思われる。現在までいくつかの子宮頸癌関連抗原の報告がなされているが進行癌にならないと健常人との差が明らかでなく早期発見に貢献していない (Levi, 1971; Gall *et al.*, 1973; Chiang *et al.*, 1977; Kato and Torigoe, 1977; Ibrahim *et al.*, 1979; Hainess *et al.*, 1981)。この論文に示した方法は早期癌でも高い抗体価を示すものを見つけれられる事と、抗体価の上昇した例に再発が認められた事から、子宮頸癌の早期発見と術後追跡調査中のマーカーとして用いられる可能性も考えられると思われる。

結 論

ウエスタンブロット法により子宮頸癌患者と健常人各20名の血清のHSV-2感染HEp-2細胞から得

られた初期抗原に対する反応パターンを検討した。子宮頸癌患者の血清は健常人血清に比べてより多くのポリペプチドと反応しており、この傾向はIgG抗体よりもIgM抗体で強く認められた。分子量110K, 74K, 64Kのポリペプチドに対するIgM抗体の反応性は子宮頸癌患者と健常人で有意差があり、IgG抗体では分子量100Kのポリペプチドに対する反応性に両者間で差が認められた。分子量110Kと64Kのポリペプチドは主として核に存在するのに対して、分子量74Kのポリペプチドは主に細胞質に存在した。

HSV-2感染HEp-2細胞をAra-C存在下に12時間培養し、核から分子量110Kと64Kのポリペプチドを含む抗原を調整し、微量間接ELISAにより子宮頸癌患者、健常人、及びその他の癌患者血清のIgG及びIgM抗体価を測定し、virionに対する抗体価の結果と比較した。初期抗原に対するIgM抗体価では子宮頸癌患者と健常人、及び子宮頸癌患者とその他の癌患者との間に危険率1%で有意差を認めた。健常人の抗体価上限である360以上の値を示した者は子宮頸癌患者で22名 (10.8%)、他の癌患者で1名 (1.9%)存在した。初期抗原に対するIgG抗体価では子宮頸癌患者と健常人の間に危険率5%で有意差を認めた。一方、virion抗原に対しては子宮頸癌患者と健常人の間でIgG抗体でのみ危険率5%で有意差を認めた。初期抗原とvirion抗原に対するIgG及びIgM抗体価それぞれの間での相関係数と回帰直線の係数から、子宮頸癌患者と健常人の間にはHSV-2の初期抗原及びvirion形成過程、ないしはそれらを抗原として認識する過程において差のある事が推測された。子宮頸癌患者の術後追跡調査を行った39例について、HSV-2初期抗原に対するIgM ELISA抗体価が上昇した11例中5例に子宮頸癌の再発を認めたのに対して、抗体価が下降ないしは変化しなかった28例には再発は認められず、両群間の差は危険率0.5%以下で有意であった。

謝 辞

この研究の契機を与えていただいた放射線影響研究所前内科副部長鎌石昇太郎博士、子宮頸癌患者血清を分与していただいた長崎大学医学部産婦人科学教室、日本赤十字長崎原爆病院黒氏謙一博士、健康保険諫早病院加瀬泰昭博士、健康人血清を分与していただいた長崎県衛生公害研究所松尾礼三博士、放射線影響研究所に感謝するとともに、本研究の遂行と結果の総括に対し長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門五十嵐 章教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Arsenakis, M. & May, J. T. (1981): Complement-fixing antibody to the AG-4 antigen in herpes simplex virus type 2 infected patients. *Infect. Immun.*, 32, 22-28.
- 2) Arsenakis, M., Georgiou, G. M., Welsh, J. K., Cauchi, M. N. & Nay, J. K. (1980): AG-4 complement-fixing antibodies in cervical cancer and herpes-infected patients using local herpes simplex virus type 2. *Int. J. Cancer*, 25, 67-71.
- 3) Aurelian, L. & Strandberg, J. D. (1974): Biologic comparison of two HSV-2 variants; one an isolate from cervical tumor cells. *Arch. ges. Virusforsch.*, 45, 27-38.
- 4) Aurelian, L., Schuman, B., Marcus, R. L. & Davis, H. J. (1973a): Antibody to HSV-2 induced tumor specific antigen in sera from patients with cervical carcinoma. *Science*, 181, 161-164.
- 5) Aurelian, L., Davis, H. J. & Julian, C. G. (1973b): Herpesvirus type 2 induced tumor specific antigens in cervical carcinoma. *Amer. J. Epidemiol.*, 98, 1-9.
- 6) Aurelian, L., Kessler, I. I., Rosensheim, N. B. & Barbour, G. (1981): Viruses and gynecologic cancer: herpesvirus proten (ICP10/AG4). A cervical tumor antigen that fulfills the criteria for a marker of carcinogenicity. *Cancer*, 48, 455-471.
- 7) Burnette, W. N. (1981): "Western blotting" electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.*, 112, 195-203.
- 8) Chiang, W. T., Alexander, E. R. & Kenny, G. E. (1977): Identification of a tumor-associated antigen in cervical carcinoma by two-dimensional (crossed) immunoelectrophoresis. *J. Nat. Cancer Inst.*, 58, 43-48.
- 9) Dressman, G. R., Sharp, F., MacLean, A. B., Macnab, R. H., Melnick, J. L., Powell, K. L. & Purifoy, D. J. M. (1980): Expression of herpesvirus-induced antigens in human cancer. *Nature (Lond.)*, 283, 591-593.
- 10) Eglin, R. P., Sharp, F., MacLean, A. B., Macnab, J. C. M., Clements, J. B. & Wilkie, N. M. (1981): Detection of RNA complementary to herpes simplex virus DNA in human cervical squamous cell neoplasms. *Cancer Res.*, 41, 3597-3603.
- 11) Frenkel, N., Roizman, B., Cassai, E. & Nahmias, A. (1972): A DNA fragment of herpes simplex 2 and its transcription in human cervical cancer tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 69, 3784-3789.
- 12) Gall, S. A., Walling, J. & Pearl, J. (1973): Demonstration of tumor-associated antigens in human gynecologic malignancies. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 115, 387-393.

- 13) Gilman, S. C., Docherty, J. J., Clarke, A. & Rawls, W. E. (1980): Reaction patterns of herpes simplex virus type 1 and type 2 proteins with sera of patients with uterine cervical carcinoma and matched controls. *Cancer Res.*, 40, 4640-4647.
- 14) Haines, H. G., McCoy, J. P., Hofheinz, D. E., Ng, A. B. P., Nordqvist, S. R. B. & Leif, R. C. (1981): Cervical carcinoma antigens in the diagnosis of human squamous cell carcinoma of the cervix. *J. Natl. Cancer Inst.*, 66, 465-474.
- 15) Heise, E. R., Kucera, L. S., Raben, M. & Homesley, H. (1979): Serological response patterns to herpes virus type 2 early and late antigens in cervical carcinoma patients. *Cancer Res.*, 39, 4022-4026.
- 16) Hollinshead, A. C., Chretien, P. B., Lee, O. B., Tarpley, J. L., Kerney, S. E., Silverman, N. A. & Alexander, J. C. (1976): In vivo and vitro measurements of the relationship of human squamous carcinomas to herpes simplex virus tumor-associated antigens. *Cancer Res.*, 36, 821-828.
- 17) Ibrahim, A. N., Robinson, R. A., Marr, L., Abdelal, A. T. H. & Nahmias, A. J. (1979): Tumor-associated antigens in cervical cancer tissues and in sera from patients with cervical cancer or with head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 63, 319-323.
- 18) Igarashi, A., Bundo, K., Matsuo, S., Makino, Y. & Lin, W. -J. (1981): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. I. basic condition of the assay on human immunoglobulin. *Trop. Med.*, 23, 49-59.
- 19) Kato, H. & Torigoe, T. (1977): Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer*, 40, 1621-1628.
- 20) Kaufman, R. H., Dressman, G. R., Burek, J., Korhonen, M. O., Matson, D. O., Melnick, J. L., Powell, K. L., Purifoy, D. J. M., Courtney, R. J. & Adam, E. (1981): Herpesvirus-induced antigens in squamous-cell carcinoma in situ of vulva. *N. Engl. J. Med.*, 305, 483-488.
- 21) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227, 680-685.
- 22) Levi, M. M. (1971): Antigenicity of ovarian and cervical malignancies with a view toward possible immunodiagnosis. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 109, 689-698.
- 23) Maeda, Y., Makino, Y., Igarashi, A. (1986): Enzyme-linked immunosorbent assay using enzyme-labeled herpes simplex virus type-1 and type-2 antigens for detection of immunoglobulin M and G antibodies in patients with uterine cervical cancer. *Trop. Med.*, in press.
- 24) McDougall, J. K., Crum, C. P., Fenoglio, C. M., Goldstein, L. C. & Galloway, D. A. (1982): Herpesvirus-specific RNA and protein in carcinoma of the uterus cervix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79, 3853-3857.
- 25) Morita, K., Bundo, K. & Igarashi, A. (1982): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. IV. A computer system to calculate ELISA endpoint titer from ELISA-OD at a single dilution of test sera. *Trop. Med.*, 24, 131-137.
- 26) Naser, W. L. & Miltenburger, H. G. (1983): Rapid baculovirus detection, identification, and serological classification by Western blotting-ELISA using monoclonal antibody. *J. gen. Virol.*, 64, 639-647.

- 27) Notter, M. F. D. & Docherty, J. J. (1976): Comparative diagnostic aspects of herpes simplex virus tumor-associated antigens. *J. Natl., Cancer Inst.*, 57, 483-488.
- 28) Rawls, W. E., Bacchetti, S. & Graham, F. L. (1977): Relation of herpes simplex viruses to human malignancies. *Curr. Topics microbiol. Immunol.*, 77, 71-95.
- 29) Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 4350-4354.
- 30) Voller, A., Bidwell, D. E. & Bartlett, A. (1976): Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. WHO.*, 53, 55-65.