

子宮頸癌患者と健常人血清中の単純ヘルペスウイルス 抗体の ELISA 法による抗体価測定、直接法 及び間接法の比較について

前田由紀子

長崎大学熱帯医学研究所ウイルス学部門

Serum Antibodies against Herpes Simplex Virus Type-1 and Type-2 Early Antigens in Patients with Uterine Cervical Cancer and Healthy Women: Comparison of direct and indirect ELISA titers

Yukiko MAEDA (*Department of Virology, Institute of Tropical Medicine, Nagasaki University*)

Abstract: Sera from uterine cervical cancer patients (CaCx patients), healthy control and other cancer patients were examined for their IgG and IgM antibody titers against Herpes simplex virus type-1 (HSV-1) and type-2 (HSV-2) early antigens (EA) by using antibody capture direct enzyme-linked immunosorbent assay (direct-ELISA). IgM and IgG antibody titer distribution against HSV-2 EA were compared among CaCx patients, healthy control and other cancer patients. Significant difference in their IgM antibody titer distribution against HSV-2 EA at 2% significance level was observed between CaCx patients and healthy control and also between CaCx patients and other cancer patients. Percentage of the specimens with IgM titers exceeding the upper limit of healthy controls (13ELISA titer) was 6% for CaCx patients but 0% for other cancer patients. In contrast, difference was not observed in IgM titers against HSV-1 EA and in IgG titers against HSV-1 EA and -2 EA between CaCx patients and healthy control. However, percentage of the specimens with HSV-1 EA IgM titers exceeding the upper limit of healthy controls (11 ELISA titer) was 6% for CaCx patients, 1.9% for other cancer patients.

IgM and IgG antibody titers against HSV-2 EA measured by direct and indirect ELISA methods were compared among CaCx patients, healthy control and other cancer patients. Correlation between direct and indirect ELISA titers was not observed in those three groups. There were 29 (14.8%) CaCx patients with titer exceeding the upper limit of healthy control measured by either direct-or indirect-IgM ELISA. Five CaCx patients showed titers exceeding the upper limit of healthy control by both direct and indirect ELISA, and 4 of them were found in stage 0 of cervical cancer. However, even

Received for Publication, July 9, 1986

長崎大学熱帯医学研究所業績 第1807号

低い有意差であった。HSV-1 に対する IgG 抗体価に関しては何れの組み合わせをみても差は無かった。

直接 ELISA 抗体価の幾何平均値と上限： Table 3 はそれぞれのグループの抗体価の幾何平均値 (GMT) と上限, 及び癌患者のうちで健常人の抗体価上限を超える値を示す者の数と%を示している。健常人の HSV-1 初期抗原に対する IgM 抗体価の上限は11であったが, 子宮頸癌患者にはそれ以上を示すものが12名 (6%), その他の癌患者では, 1名 (1.9%) 存在した。IgG 抗体価では子宮頸癌患者の2名 (1%) が他のグループの上限以上を示した。同様に, HSV-2 初期抗原に対しても健常人の IgM 抗体価の上限は13で子宮頸癌患者にはそれ以上を示すものが12名 (6%) 存在したが, その他の癌患者には認められなかった。また癌患者の中

で, HSV-2 初期抗原に対する IgG 抗体価が健常人の上限を超える者は認められなかった。

健常人の上限以上を示す例での直接及び間接 ELISA 抗体価の相関： HSV-2 の初期抗原に対する IgM 抗体価は直接及び間接 ELISA 法共に子宮頸癌患者と健常人の間に有意差を認めたので, 子宮頸癌患者のうちどちらか一方健常人の上限以上を示す者 (29名/196名) について相関を調べ, Fig. 1 に示した。直接 ELISA 法で13以上を示しかつ間接 ELISA 法でも360以上を示す例が5例, 直接 ELISA 法で13以上を示すが間接 ELISA 法では360以下を示す例が7例, 逆に間接 ELISA 法では360以上を示すが直接 ELISA 法では13以下を示す例が17例認められた。進行期別に見ると0期の癌患者, 6例中4例は直接及び間接 ELISA 抗体価共に健常人の上限以上を示していた。

Table 3. Geometrical mean titer (GMT) and upper limit of direct ELISA titers

Immuno globulin	Assay antigen	Specimens		ELISA		Over healthy limit	
		Category	Total number	GMT	Upper limit	Number	%
IgM	1-EA	healthy	165	5.10	11		
		CaCx pt.	200	9.71	413	12	6
		other ca.pt.	54	5.15	13	1	1.9
	2-EA	healthy	165	5.10	13		
		CaCx pt.	200	9.50	255	12	6
		other ca.pt.	54	5.15	13	0	
IgG	1-EA	healthy	165	15.64	120		
		CaCx pt.	200	14.80	160	2	1
		other ca.pt.	54	15.15	120	0	
	2-EA	healthy	165	12.82	160		
		CaCx pt.	200	15.92	160	0	
		other ca.pt.	54	12.13	60	0	

et al., 1976) を用いた。但し, coating buffer として 0.05M 炭酸重炭酸緩衝液を, 抗原及び抗体の希釈液としては PBS-T(0.05% Tween 20 と 0.02% NaN_3 を含む PBS) を用い, 発色は 0.5mg/ml の *o*-phenylenediamine と 0.02% の H_2O_2 を含む 0.05 M クエン酸リン酸緩衝液で行った。ELISA 抗体価は, 階段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

直接 ELISA と間接 ELISA 法による各抗体価間の相関性: HSV-2 初期抗原に対して 2 種類の ELISA 法で測定された IgG または IgM 抗体に於て, 子宮頸癌患者, 健常人, その他の癌患者について各人の抗体価間の相関係数(r) をもともめ Table 1 に示した。IgG 抗体に於て, 子宮頸癌患者では 0.295, 健常人では 0.110, その他の癌患者で

は 0.172 と低い値を示し, 相関は認められなかった。同様に IgM 抗体でも, 子宮頸癌患者では 0.267, 健常人では -0.031, その他の癌患者では -0.062 と低い値を示し, 直接 ELISA 抗体価と間接 ELISA 抗体価間に相関は認められなかった。

直接 ELISA 抗体価での有意差検定: 次いで HSV-1 及び HSV-2 初期抗原に対する IgM 及び IgG 直接 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 2 にまとめた。子宮頸癌患者と健常人の間には HSV-2 初期抗原に対する IgM 抗体価に危険率 2% で有意差をみとめ, 子宮頸癌患者とその他の癌患者の間にも同様に HSV-2 初期抗原に対する IgM 抗体価に危険率 2% で有意差をみとめた。それに反してその他の癌患者と健常人の間には全く差は認められなかった。また, HSV-2 初期抗原に対する IgG 抗体価でも有意差は認められなかった。HSV-1 に対する抗体価では IgM 抗体価に子宮頸癌患者と健常人, 子宮頸癌患者とその他の癌患者間に危険率 10% で有意差を認められたが HSV-2 と比較すると

Table 1. Correlation Coefficient(r) between direct and indirect ELISA titers against HSV-2 early antigens

X-axis		Y-axis		r -value		
Immuno globulin	ELISA method	Immuno globulin	ELISA method	CaCx pt.	healthy control	other ca. pt.
IgM	direct	IgM	indirect	.267	-.031	-.062
IgG	direct	IgG	indirect	.295	.110	.172

Table 2. Statistical significance level of direct ELISA titers between CaCx patients, other cancer patients and healthy controls

Assay antigen	Immuno globulin	CaCx patients and		other ca. pt. and healthy control
		healthy control	other ca.pt.	
1-EA	IgM	5-10%	5-10%	70-80%
	IgG	70%	>90%	80-90%
2-EA	IgM	1-2%	1-2%	80-90%
	IgG	10-20%	20-30%	80-90%

among those with high level of IgM ELISA titers, correlation between direct and indirect ELISA titers was not observed. These results suggested that antibodies measured by direct and indirect ELISA were raised against different kinds of early antigens. For the practical use, indirect ELISA method was superior to direct method because of the level of the antibody titers, frequency of detecting positives among in CaCx patients and more easy preparation of the antigens.

Key Words: Herpes simplex virus, ELISA, uterine cervical cancer

Trop. Med. 28(3), 157-163, September, 1986

緒 言

単純ヘルペスウイルス2型 (HSV-2) と子宮頸癌との関連が注目されたのは1960年代後半になされた血清疫学的調査 (Naib *et al.*, 1966; Rawls *et al.*, 1969; Nahmias *et al.*, 1970; Adam *et al.*, 1972) に端を発するが、現在でも子宮頸癌と HSV-2 との関連について未だ明確な結論を得ていない。HSV 遺伝子は細胞癌化のきっかけとはなるがそれ以上の癌化過程には必要で無く、癌細胞が癌細胞としての性質を維持するのに、ウイルス遺伝子は働いていないとする、“ヒットエンドラン”方式による細胞の癌化過程の仮説 (Galloway and McDougall, 1983) が発表され、現在 HSV 遺伝子はこのような遺伝子ではないかと考えられている。

著者らは1型ヘルペスウイルス (HSV-1) 及び HSV-2 感染 HEP-2 細胞核から調製した初期抗原 (EA) をペルオキシダーゼ (HRPO) で標識した直接 ELISA 法 (Maeda *et al.*, 1986), 及びウエスタンブロット法解析により得られた子宮頸癌患者に特徴的に反応するポリペプチドを含む初期抗原を調製し、これを抗原とする間接 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 と IgG 抗体価の測定 (Maeda, 1986) を行ない、2型初期抗原に対する IgM 抗体価に於て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。しかし、この両方法の比較を行っておらず、更に直接法で得られた結果の統計処理が不十分であったので、今回は直接 ELISA 法の統計学的処理と、HSV-2 初期抗原に対する IgM 抗体価について、直接 ELISA 法及び間接 ELISA 法を比較し、若干の考察を加えた。

材料と方法

ウイルス: HSV-1 (HF株), HSV-2 (Savage株) を用い、感染価はプラーク法で測定した。

細胞: Vero 細胞をウイルスの増殖と感染価測定に、HEp-2 細胞を初期抗原作製に用いた。両細胞とも37°Cで10%胎児ウシ血清 (FCS) を含む Eagle 液で培養した。

被検血清: 子宮頸癌患者は直接 ELISA 法では200名、間接 ELISA 法では新たに4名を加えた204名、健常人は直接 ELISA 法では165名、間接 ELISA 法では新たに2名を加えた167名、その他の癌患者は両方法ともに54名からの血清を用いた。尚、子宮頸癌進行期分類は国際臨床進行期分類 (FIGO) に従った。

初期抗原の作製: 直接 ELISA 法では、HEp-2 細胞に HSV-1 または HSV-2 を感染多重度 (moi) 5 で感染させ、37°C, 1時間吸着後 Ara-C (20µg/ml) を含む維持液 (2%FCS を含む Eagle 液) を加え、感染後6-7時間の細胞を集め、その核分画を超音波破碎後8,000×g, 10分間遠心し、50%飽和硫酸で沈澱する分画を PBS で透析後 HRPO で標識した (Wilson & Nakane, 1978)。間接 ELISA 法では、HEp-2 細胞に HSV-2 を moi 20 で感染させ、37°C, 1時間吸着後 Ara-C (20µg/ml) を含む同様の維持液を加え、感染後12時間の細胞を集め、その核分画を超音波破碎後100,000×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%飽和硫酸で沈澱する分画を初期抗原とした。

ELISA 法: 直接 ELISA 法は、van Loon 等 (1981, 1983) の抗体捕獲直接 ELISA 法に準じて行った。間接 ELISA 法は微量間接法 (Voller

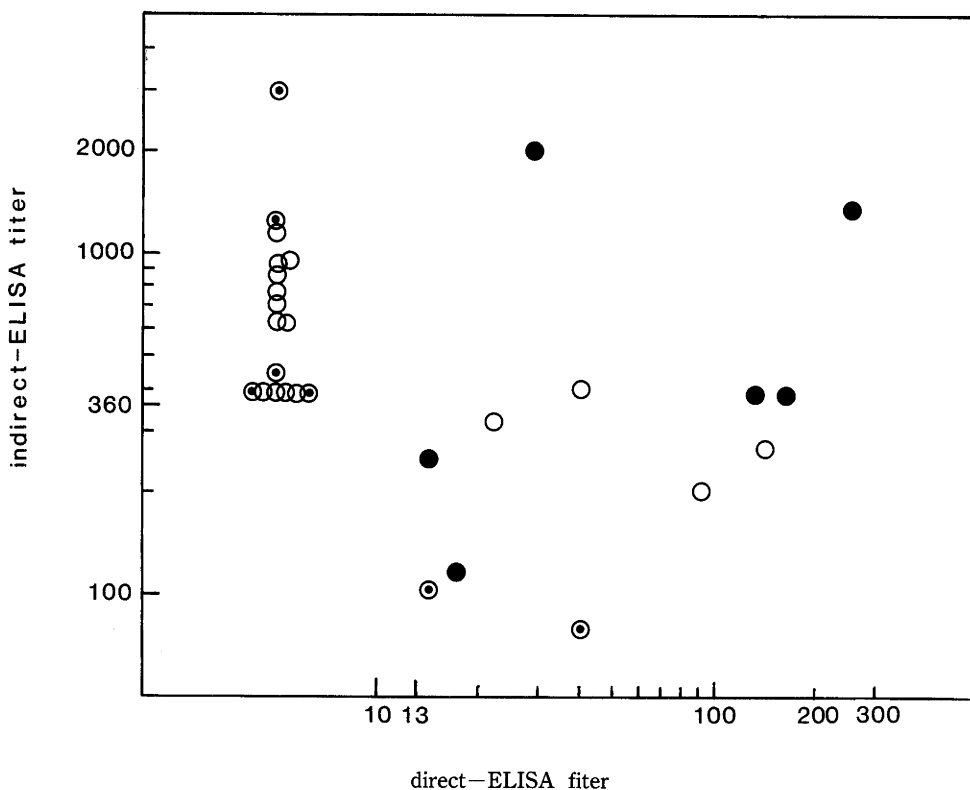


Fig. 1. Comparison of direct and indirect IgM-ELISA titers against HSV-2 EA in CaCx patients with exceeding the upper limit of healthy control.
 ●; stage 0 ⊙; stage I ○; stage II

考 察

直接及び間接 ELISA 法により得られた抗体価間の相関を求めた結果 Table 1 に示したように両方法間には、子宮頸癌患者、健常人及びその他の癌患者何れにも相関は認められなかった。又、Fig. 1 に見られるように、何れか一方にのみ高い抗体価を示す例が29名中24名(82.75%)も認められることより、直接 ELISA 法及び間接 ELISA 法で用いた抗原は、その抗原性に違いが有る事が示唆された。これは初期抗原を調製するに際して、感染細胞を harvest した時間が直接法では感染後6時間なのに対し、間接法では12時間と異なるため細胞内に蓄積された蛋白が異なっている可能性があり、しかも遠心及び飽和硫酸濃度等の条件が両者では異なるため得られた蛋白の性質を異にする事に起因すると考えられる。更に、抗原を HRPO で標識する際に

蛋白の変性がおこった可能性も十分に考えられる。

直接 ELISA 法でも (Table 2 及び Table 3)、子宮頸癌患者の HSV-2 初期抗原に対する IgM 抗体反応は、健常人及びその他の癌患者のそれと比較すると危険率2%で有意の差を示した。しかし、直接および間接法の有用性を HSV-2 に対する IgM-ELISA 抗体価で比較すると間接法がより高感度であった。その理由は直接法では健常人の上限が13で、上限値を越えた子宮頸癌患者数は12名(6%)認められたのに対し、間接法では健常人の上限が360で、上限値を越えた子宮頸癌患者は22名(10.8%)と直接法の結果を上回る為である。また抗原作製の難易度に関しても直接法では抗原を HRPO で標識する必要があり、実用面に於て間接法がより優れていると考えられる。また、用いた方法及び抗原が異なっても同じような結果を得た事により、

HSV-2 は、子宮頸部細胞の癌化に何らか関与している可能性が示唆される。ELISA 抗体価の高い症例については、現在の遺伝子工学の技術を用いて癌組織より HSV 由来の遺伝子を検出する試みも必要であると考えられる。尚、最近子宮頸癌組織にパピローマウイルス (HPV) 16型, 18型の DNA が高頻度で検出されている (川名, 他, 1985)。単に子宮頸癌組織にこれらのウイルスが感染しやすいだけか、或は子宮頸癌の発生に直接関与しているのか、未だ明確な報告はない。HPV 感染により子宮頸部に良性腫瘍が形成される事が知られており、その良性腫瘍は治療目的の X線照射により悪性化する事が報告されている (zur Hauzen, 1982)。HSV-2 感染が X線と同様に cofactor となり、良性腫瘍の悪性化を引き起こす可能性も考えられる。HSV による発癌の機構を考える際には、HSV 感染時に細胞内で合成された蛋白質が細胞 DNA や RNA 合成に対して及ぼす影響、ウイルス DNA が細胞 DNA に直接及ぼす影響、及びその他のウイルスとの相互作用など、様々な因子を考慮する事が必要と考えられる。

結 論

直接 ELISA 法を用いて、HSV-1, HSV-2 初期抗原に対する IgG 及び IgM 抗体価を測定し、子宮頸癌患者、健常人及びその他の癌患者間に差の有るか否かを検討した。HSV-2 初期抗原に対する IgM 抗体価では、子宮頸癌患者と健常人、子宮

頸癌患者とその他の癌患者との間に危険率 2% で有意差を認めた。健常人の IgM 抗体価上限である 13 以上の値を示した例が子宮頸癌患者で 12 名 (6%) 存在したが、その他の癌患者には存在しなかった。一方、HSV-1 初期抗原に対する IgM 抗体価、及び HSV-1, HSV-2 初期抗原に対する IgG 抗体価には有意差は認めなかった。但し、健常人の HSV-1 初期抗原に対する IgM 抗体価上限である 11 以上を示した例が子宮頸癌患者で 12 名 (6%)、その他の癌患者で 1 名 (1.9%) 存在した。

直接 ELISA 法と間接 ELISA 法で得た HSV-2 初期抗原に対する IgM 及び IgG 抗体価の相関を検討した。IgM, IgG 抗体価ともに直接法及び間接法で得られた値の相関は子宮頸癌患者、健常人、その他の癌患者いずれにも認められなかった。子宮頸癌患者中、IgM 抗体価に於て直接または間接法いずれか一方で健常人の上限以上を示した例が 29 名 (14.8%) 存在した。共に上限以上を示すものが 5 名存在しその 4 名は 0 期の癌患者で、一方のみ上限以上を示す者は 24 名存在した。抗体価の高い例においても直接法による抗体価と間接法による抗体価の間に相関は認められなかった。これらの事より直接法と間接法では異なる抗原に対する抗体を測定していたと考えられる。血清中の抗体価、子宮頸癌患者中の陽性検出頻度、及び抗原調製の容易さの点で考えると実用性に於て間接 ELISA 法が優れているといえる。

謝 辞

稿を終わるにあたり、終始ご懇切なるご指導とご校閲を賜りました当部門五十嵐 章教授に深い謝意を表します。

文 献

- 1) Adam, E., Kaufman, R. H., Melnick, J. L., Levy, A. H. & Rawls, W. E. (1972) : Seroepidemiologic studies of Herpesvirus type 2 and carcinoma of the cervix. III. Houston, Texas. Am. J. Epidem. 96, 427-442.
- 2) Galloway, D. A. & McDougall, I. K. (1983): The oncogenic potential of Herpes simplex viruses: Evidence for a "hit-and-run" mechanism. Nature (Lond), 302, 21-24.

- 3) 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.
- 4) 川名 尚, 吉川 裕之, 山本 悦太郎 (1985) : 子宮頸癌とヒトパピローマウイルス. *臨産婦*, 39 (5), 326-327.
- 5) 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.
- 6) Maeda, Y. (1986) : Western blotting analysis and ELISA on serum antibodies against Herpes virus type-2 (HSV-2) among uterine cervical cancer patients and healthy women. *Trop. Med.*, in press.
- 7) 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.
- 8) Naib, Z. M., Nahmias, A. J. & Josey, W. E. (1966) : Cytology and histopathology of cervical herpes simplex infection. *Cancer*, 19, 1026-1031.
- 9) Nahmias, A. F., Josey, W. E., Naib, Z. M., Luce, C. F. & Guest, B. (1970) : Antibodies to Herpes hominis type 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. *Am. J. Epidem.* 91, 547-552.
- 10) Rawls, W. E., Tompkins, W. A. F. & Melnic, J. L. (1969) : The association of herpesvirus type 2 and carcinoma of uterine cervix. *Am. J. Epidem.* 89, 547-554.
- 11) van Loon, A. M., Hessen, F. W. A., van der Logt, J. T. M. & von der Veen, J. (1981) : Direct enzyme-linked immunosorbent assay that uses peroxidase-labeled antigen for determination of immunoglobulin M antibody to cytomegalo virus. *J. Clin. Microbiol.* 13, 416-422.
- 12) van Loon, A. M., van der Logt, J. T. M., Hessen, F. W. A. & van der Veen, J. (1983): Enzyme-linked immunosorbent assay that uses labeled antigen for detection of immunoglobulin M and antibodies in Toxoplasmosis; comparison with indirect immunofluorescence and double-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay *J. Clin. Microbiol.* 17, 997-1004.
- 13) Voller, A., Bidwell, D. E. & Bartlett, A. (1976) : Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. WHO.* 53, 55-56.
- 14) Wilson, M. B. & Nakane, P. K. (1987) : Recent development in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. pp215-224. In Knapp, W., Holubar, K. & Wick, G. (ed.) *Immunofluorescence and related staining techniques.* Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 15) zur Hauzen, H. (1982) : Human genital cancer : Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiating events? *Lancet*, ii, 1370-1372.