

氏名(本籍)	お ち ひろ ゆき 越 智 寛 幸 (愛媛県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5117 号		
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Neutralizing Antibodies against Human Papillomavirus Types 16, 18, 31, 52, and 58 in Serum Samples from Women in Japan with Low-Grade Cervical Intraepithelial Neoplasia</b> (子宮頸部上皮内腫瘍を有する日本人女性における 16, 18, 31, 52, 58 型ヒトパピローマウイルス血清中和抗体)		
主 査	筑波大学教授	薬学博士	永 田 恭 介
副 査	筑波大学准教授	医学博士	鳥 居 徹
副 査	筑波大学講師	博士(医学)	岡 田 昌 史
副 査	筑波大学助教	博士(医学)	村 田 聡一郎

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

#### (目的)

子宮頸癌および子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)では、ほぼ全ての症例においてヒトパピローマウイルス(HPV)のゲノムが検出される。しかし、HPV感染に対する免疫応答に関する情報は非常に限られている。本研究の目的は、開発した高感度でHPVの型特異的に血清中の感染中和抗体を測定する方法を用いて、我が国のCIN1/2患者血清の中和抗体価を測定し、HPV感染によって誘導される中和抗体価とその変動を明らかにすることである。

#### (対象と方法)

##### (1) 対象

子宮頸部上皮内腫瘍(CIN1/2)を持つ日本人女性217人から、インフォームド・コンセントを得た後、血清と子宮頸部の擦過細胞を採取した。24ヶ月後に2度目の検体を採取した。

##### (2) 方法

ウサギ標準抗体の作製:標準抗原として用いるHPV16, 18, 31, 52, 58型VLP(virus-like particle)をバキュロウイルスとその宿主昆虫細胞を用いた発現システムを用いて作成し、CsCl密度平衡遠心法および非連続シヨ糖密度勾配超遠心分離法によって精製した。得られた抗原をウサギに免疫して、標準抗体を作製した。

中和抗体測定系の作製:HPVが増殖する実用的な培養細胞系は無く、感染性のHPV粒子は手に入らない。そこで、HPVキャプシドに分泌型アルカリフォスファターゼ(SEAP)発現プラスミドをパッケージングさせた感染性偽ウイルス(PVs; pseudo-virions)を作製し、中和抗体の測定に用いた。PVsの感染を半減させる血清の最大希釈率をその血清の中和抗体価とした。

HPV DNA 検出と型判定:子宮頸部の擦過細胞から抽出したDNAを鋳型として、L1遺伝子内の型間で高い相同性を持つ領域の塩基配列を認識するコンセンサスプライマーを用いてPCR法によってHPV DNAを

増幅した。増幅した DNA の制限酵素による切断パターンによって、型判定を行った。

(結果)

(1) ウサギ標準血清の中和活性

ウサギ標準抗体はそれぞれ型特異的に PVs の感染を中和した。各型間の交差反応性は殆ど無く、中和抗体の有無で HPV 感染歴を知ることが可能であると結論できた。

(2) CIN1/CIN2 女性の血清中和活性

中和抗体価 40 以上を抗体陽性とする、137 例 (63%) の血清が陽性を示した。HPV16, 18, 31, 52, 58 型に対する中和抗体は、それぞれ 50 例 (24%), 23 例 (11%), 30 例 (19%), 43 例 (21%), 62 例 (30%) で陽性であった。中和抗体価の大部分は 640 以下であった。

1 種類の HPV 型に対する中和抗体陽性は 84 例 (39%), 2 種類の場合は 35 例 (16%), 3 種類の場合は 17 例 (8%), および 4 種類の場合が 1 例であった。すなわち、24% の患者において 2 種類以上の中和抗体が認められた。

中和抗体陽性例の半数以上で、採血時に採取した擦過細胞試料に HPV DNA が検出されなかった。逆に、HPV DNA が陽性であっても中和抗体が陰性であった例も存在した。また、抗体価は HPV DNA の有無で有意差が無かった。

(3) 24 ヶ月後の血清中和抗体価

大部分の HPV 中和抗体陽性者では抗体価は大きく変動せず、変動幅は 2 倍以内であった。24 ヶ月後に HPV DNA が検出された場合でも、大きな抗体価の上昇は認められなかった。

(結論と考察)

採血時の HPV 増殖の有無と抗体価の変動には相関が認められなかったが、中和抗体は少なくとも 2 年以上は維持されていた。また、HPV 感染者の中和抗体価は極めて低く、HPV に対する免疫応答は極めて弱いことが示された。HPV は基底細胞に潜伏感染し、また感染細胞の分化に伴って起こる増殖も小規模であるという生活環が、高い免疫反応を誘起しない可能性が考えられる。

これまで HPV 感染の有無は、擦過細胞試料中の HPV DNA の有無で判定されてきたことから、HPV 増殖時と試料採取時期が合致しない場合には、潜伏感染があっても非感染状態として扱われてきた。本研究の成果は、ヒト血清中の中和抗体を指標にして HPV 感染歴を含む感染実態を血清疫学の方法で解析できる可能性を示している。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、ヒトパピローマウイルス (HPV) の 16, 18, 31, 52, 58 型のそれぞれの抗原を調製することで、それぞれの型特異的な中和抗体測定法を確立し、子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN1/2) を持つ日本人女性 217 人を対象に、型特異的な中和抗体価を測定し、同時に検体に存在する HPV DNA 有無を検定することで、本血清診断法の優位性を示し、開発された方法が優れた診断法であることを立証するとともに今後の HPV 感染の診断と疫学的な研究に資する方法であることを示しており、価値ある研究と考えられる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。