

AS04-증강 인유두종바이러스  
백신에 의한 타액에서의 IgA 면역  
반응

연세대학교 대학원

의 학 과

정 용 욱

AS04-증강 인유두종바이러스  
백신에 의한 타액에서의 IgA 면역  
반응

지도교수 김 영 태

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2009 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

정 용 욱

# 정용욱 의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2009 년 12 월

## 감사의 글

이제 새로운 첫 발걸음을 내디디려 합니다. 이 한 걸음을 내딛기 위해서 정말 많은 분의 격려와 도움이 있었습니다. 먼저 연구의 계획에서 논문의 완성에 이르기까지 각별한 노고와 관심으로 지도해 주신 김영태 교수님께 감사를 드립니다. 의과대학 시절부터 선생님께서 제게 주신 많은 가르침과 선배로서, 교수님으로서의 실천은 제가 평생 따라야 할 모범으로 기억될 것입니다. 학문과 삶에 대한 진심 어린 가르침도 잊지 않고 마음 깊이 새기겠습니다. 또한, 본 논문이 있기까지 많은 조언과 지도를 해주신 미생물학 교실 신전수 교수님과 안과학 교실 서경률 교수님께도 진심으로 감사드립니다. 처음 하는 실험이 잘 되도록 바쁜 시간을 쪼개서 많은 도움을 준 강명화 연구원에게도 고마운 마음을 전합니다. 산부인과 의사로서 현재의 자리에 설 수 있게 해 주신 산부인과학 교실의 모든 교수님께도 다시 한 번 감사 드립니다. 마지막으로 언제나 저에게 든든한 지원자가 되어 주시는 양가 부모님과 바쁜 병원 생활에도 두 아들을 열심히 키우고 또한 저에게 큰 힘이 되어주는 사랑하는 아내 정미, 그리고 저에게 가장 큰 보물인 두 아들 성현이와 헌재에게 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

## <차례>

국문요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법.....	5
1. 연구대상.....	5
2. AS04-증강 HPV-16/18 백신 접종과 표본 채취.....	6
3. 구강 점막 세포에서 HPV DNA PCR.....	7
가. DNA 추출 .....	7
나. Polymerase chain reaction.....	7
4. HPV-16/18 VLP L1 항체에 대한 ELISA.....	9
가. 타액에서 HPV-16/18 VLP L1 IgA .....	9
나. 혈청에서 HPV-16/18 VLP L1 IgG .....	9
5. 통계학적 분석.....	10
III. 결과 .....	11
1. 연구대상.....	11
2. PCR을 이용한 구강 점막 세포에서 HPV DNA 분석.....	11
3. 타액에서 HPV-16/18 VLP L1 IgA 측정.....	12
가. HPV-16 VLP L1 IgA.....	12
나. HPV-18 VLP L1 IgA.....	14
다. 타액 내 HPV-16/18 VLP L1 IgA의 항체반응 양성률.....	16
4. 혈청에서 HPV-16/18 VLP L1 IgG의 측정.....	17
가. HPV-16 VLP L1 IgG .....	17
나. HPV-18 VLP L1 IgG .....	17
IV. 고찰.....	18
V. 결론 .....	23
참고문헌.....	25
영문요약.....	29

## 그림 차례

- 그림 1. Nested PCR을 이용한 구강세포 내에서 HPV-16/18 DNA 분석 ..... 12
- 그림 2. 실험군과 대조군 간의 HPV-16 VLP L1 IgA 차이 .. 13
- 그림 3. 백신 접종 전과 후의 타액에서 HPV-16 VLP L1 IgA의 변화 ..... 14
- 그림 4. 실험군과 대조군 간의 HPV-18 VLP L1 IgA 차이 ..... 15
- 그림 5. 백신 접종 전과 후의 타액에서 HPV-18 VLP L1 IgA의 변화 ..... 16

## 표 차례

- 표 1. Oligonucleotide primers의 염기배열 ..... 8
- 표 2. 실험군에 따른 타액 내 HPV-16/18 VLP IgA의 항체반응 양성률 ..... 17

## 국문 요약

### AS04-증강 인유두종바이러스 백신에 의한 타액에서의 IgA 면역 반응

**목적:** 인유두종바이러스(HPV)-16/18은 자궁경부암의 중요한 원인으로 최근 이들에 대한 예방백신이 개발되어 임상에서 이용되고 있다. 자궁경부암 외에도 HPV-16/18은 두경부암에서도 중요한 원인 가운데 하나로 알려졌으나 현재 사용하고 있는 백신의 두경부암과 관련된 연구는 미진한 실정이다. 이에 본 연구는 AS04-증강 HPV-16/18 백신에 의해 유도되는 타액에서 IgA 면역 반응을 조사하여 이 백신이 경구 HPV 감염에 미치는 영향을 알아보고자 실시하였다.

**방법:** 세브란스 병원에 내원하여 본 연구에 동의한 36명의 여성을 대상으로 무작위 이중맹검방법으로 진행되었다. 36명의 여성 가운데 8명은 실험계획서 위반으로 중도 탈락하였으며 22명은 실험군으로 백신을 접종받았고 6명은 대조군으로 위약을 삼각근에 접종받았다. 예방접종은 0, 1, 6개월 3차례 투여하였으며, 접종 시작 전과 접종을 모두 마친 뒤 1개월 후에 타액, 혈청, 구강 점막 세포를 채취하였다. 경구 HPV 감염을 배제하기 위해 구강 점막 세포에서 HPV-16/18에 대한 nested PCR을 실시하였고 백신 접종 후 HPV-16/18 IgG의 혈청전환 확인과 타액에서 HPV-16/18 IgA 측정은 ELISA를 이용하여 실시하였다.

**결과:** 구강 점막 세포에서 시행한 HPV DNA에 대한 nested PCR 검사 결과 28명 모두에서 경구 HPV 감염은 확인되지 않았다. 실험군은 모두 백신 접종 후 HPV-16/18에 대한 혈청전환이 확인되었고 타액에서 HPV-16/18 VLP IgA가 각각 27.3% (6/22), 45.4% (10/22)에서 관찰되었다. 대조군에서는 위약 접종 후 혈청전환이 확인된 예가 없었으며 그리고 대조군의 타액에서 위약 접종 후 HPV-16/18 VLP IgA의 의미 있는 증가 역시 관찰되지 않았다. 접종 전에 채취한 타액의 HPV-16/18 VLP IgA는 실험군과 대조군에서 차이가 없었으나, 백신 접종 후에 채취한 타액은 두 군 간에 의미 있는 차이가

있었다.

**결론:** 이번 연구를 통해 AS04-증강 HPV-16/18 백신이 타액에서 HPV-16/18 VLP IgA의 분비를 증가시킨다는 것을 입증하였고, 이러한 연구 결과는 자궁경부에서 HPV 감염 예방뿐만 아니라 두경부 감염 예방에 있어 AS04-증강 HPV 백신의 역할을 연구하는 데 이바지할 것이다.

---

핵심 되는 말: 인유두종바이러스, 백신, 면역글로불린 A, AS04

AS04-증강 인유두종바이러스 백신에 의한 타액에서의 IgA  
면역 반응

<지도교수 김영태>

연세대학교 대학원 의학과

정 용 욱

I. 서론

인유두종바이러스(human papillomavirus, HPV)는 Papillomaviridae과(family), *papillomavirus*속(genus)의 비피막형 이중나선 DNA 바이러스로 생식기 접촉과 같은 경로를 통해 상피세포에 감염되며, 감염된 세포에서 세포 증식을 유발한다. HPV의 감염은 일반적으로 숙주의 전신면역체계에 노출되지 않고 감염된 상피세포에 국한되기 때문에 전신 감염을 유발하지 않는다. HPV의 이런 특징은 다른 바이러스의 감염기전과는 구별되는 것으로 이런 성질 때문에 HPV에 감염된 과거력이 있는 환자에서 재감염이 가능해지고 자궁경부에는 지속감염을 유발하여 자궁경부상피내종양과 침윤성 자궁경부암을 일으키게 된다.<sup>1</sup>

HPV는 약 100여 가지의 다양한 아형으로 구분할 수 있다. 하지만, 이들 모두가 침윤성 자궁경부암의 발병과 관련 있는 것은 아니며 이들 가운데 약 40여 가지 정도가 생식기 감염과 관련 있는 것으로 여겨지고 있다. 그중에서도 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56 그리고 58형 등을 자궁경부암 발생에 있어 고위

험 형으로 분류하고 있다.<sup>2</sup> 특히, 16과 18형은 전 세계적으로 약 70%에서 자궁경부암의 원인으로 보고하고 있으며, 자궁경부암 예방을 위한 백신개발 연구에 있어서도 16과 18형이 그 주된 목표가 되고 있다.<sup>3</sup>

HPV는 자궁경부암 외에도 다양한 종류의 두경부암에서 발암 물질로 알려졌으며, 특히 인두에서 발생하는 편평상피암의 경우에서는 많은 역학적, 분자생물학적 연구들이 암의 발병에 있어서 HPV가 중요한 역할을 한다고 증명하고 있다.<sup>4-6</sup> 이런 사실들에 기초하여 HPV와 연관되어 발생하는 모든 암 가운데 두경부암에서 HPV의 질병 부담이 자궁경부암에 이어 두 번째를 차지하는 것으로 생각하고 있고<sup>7</sup>, 자궁경부암의 예방을 위한 HPV 백신 접종이 폭넓게 시행되게 됨에 따라 두경부암의 예방에 있어서 HPV 백신의 역할에 대한 관심 역시 증가하고 있다. 그러나 지금까지 대부분의 백신관련 임상연구는 여성의 항문 생식기에서 HPV 감염을 예방하는 데 있어서 백신의 효과를 입증하는데 집중됐다. 그리고 상용화된 HPV 백신이 HPV의 경구 감염을 예방할 수 있는지에 대한 연구도 전혀 없는 실정이다.

최근에 두 종류의 HPV 백신을 개발하여 임상에서 사용하고 있다. 자궁경부암의 고위험 형인 HPV-16/18형과 생식기 사마귀를 일으키는 HPV-6/11형을 모두 포함하는 4가 백신인 가다실® (Merck Co., Inc., Whitehouse station, NJ, USA)과 HPV 16과 18형에 대한 항원만을 포함하는 2가 백신인 서바릭스™ (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Belgium)가 그것이다. 이번 실험에서는 이 가운데 서바릭스™를 이용하여 연구를 진행하였다. 서바릭스™는 aluminum hydroxide와

immunostimulant인 MPL (3-O-desacyl-4'-monomphosphoryl lipid A)을 결합한 AS04를 면역증강제로 사용하고 있다. MPL은 그람 음성균인 *Salmonella minnesota* R595 strain 세포벽의 비독성 형태로 백신에 의한 면역반응을 강화시키는 작용을 하는 것으로 알려졌으며 특히 수지상세포(dendritic cell)의 활성화를 통한 선천성 면역반응(innate immune mechanism)을 통해 이런 작용을 나타내는 것으로 보고하고 있다.<sup>8</sup> AS04 adjuvant system은 B형 간염 바이러스(HBV) 백신에도 사용하고 있으며 AS04를 이용한 HBV 백신은 aluminum salt만을 adjuvant system으로 이용한 기존의 백신에 비해 보다 강력하고 오랫동안 지속되는 면역 반응을 일으키는 것으로 보고하고 있다.<sup>9</sup> HPV 백신인 서바릭스<sup>TM</sup> 역시 aluminum salt만을 이용한 백신과 비교했을 때, 접종 후 3.5년의 관찰 기간에 지속적으로 높은 항체가를 유지하고, HPV-16/18 VLP L1 specific memory B cell 또한 증가하는 것으로 보고되었다.<sup>10</sup>

따라서 본 연구에서는 AS04-증강 HPV-16/18 virus-like particle (VLP) 백신을 접종받은 여성의 타액에서 점막 면역에서 중요한 역할을 하는 IgA를 측정함으로써, AS04-증강 HPV 백신이 HPV의 경구 감염을 예방하는 데 도움을 줄 수 있는지를 밝히고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 연구대상

본 연구는 2007년 6월부터 2007년 7월 사이에 연세의료원 세브란스 병원을 방문한 건강한 여성을 대상으로 연구를 시행하였

으며, 만 15-25세 여성, 임신하지 않은 것으로 진단되고 HPV-16/18에 대한 자궁경부 감염의 증거가 없고 자궁경부상 피내종양의 병력이 없으며 이전에 성교의 경험이 없고 본 연구 기간에 성관계의 계획이 없는 여성 그리고 연구 참여 전에 서면으로 본 연구에 동의한 여성을 적임기준(eligibility criteria)으로 하였으며 총 36명의 여성이 본 연구에 참여하였다. 환자 혹은 미성년자의 경우는 보호자의 동의 하에 이들에게서 채취한 타액, 구강 점막 세포 및 혈액을 이용하여 연구를 실시하였다. 연구는 이중맹검방법으로 진행하였고 연구에 참여한 대상자에게 2:1의 비율로 백신과 위약을 투여하였다. 그러나 적임기준에 합당하더라도 악성 종양, 만성 감염, 신장 질환, 당뇨나 자가면역질환과 같은 만성 질환의 병력이 있는 여성, 3개월 이내에 면역글로블린이나 혈액제제를 투여받은 여성, 라텍스에 과민반응이나 알레르기 질환의 병력이 있는 여성은 본 연구에서 제외하였다.

## 2. AS04-증강 HPV-16/18 백신 접종과 표본 채취

36명의 대상 가운데 24명의 환자는 AS04-증강 2가 HPV 백신을 어깨의 삼각근에 접종하였고 나머지 12명의 환자에게는 aluminum hydroxide를 위약으로 접종하였다. 백신 및 위약은 1회 0.5 ml 용량으로 0, 1, 6개월의 일정으로 투여하였고 혈액, 구강 점막 세포, 타액을 각각 백신 및 위약의 최초 접종 직전과 마지막 접종 뒤 1개월 후에 채취하였다. 구강 점막 세포는 인후 면봉 법으로 채취하였으며 타액은 환자의 구강으로부터 1 ml 주사기를 이용하여 1 ml를 흡인하였다. 얻어진 구강 점막 세포는 DNA의 추출을 위해 phosphate-buffered saline (PBS)에

4°C에서 보관하였고 얻어진 타액은 10,000 x g에서 20분 동안 원심분리 하여 protease inhibitor를 첨가하여 -40°C에서 실험 때까지 보관하였다. 모든 표본은 2번 검사하였으며 모든 대상에서 구강 점막의 HPV DNA와 타액 내에 HPV-16/18에 대한 IgA를 조사하였다.

### 3. 구강 점막 세포에서 HPV DNA PCR

#### 가. DNA 추출

PBS에 보관된 검사대상물을 13,000 x g로 원심 분리한 뒤 상층액을 제거하고 guanidine thiocyanate가 포함된 lysis buffer (120 mg Guanidium thiocyanate, 0.1 M Tris-HCl [pH 6.4] 100 ml, 0.2 M EDTA [pH 8.0] 22 ml, Triton X-100 2.6 ml) 800  $\mu$ l를 주입하여 100°C에서 20분간 열탕 하였다. 열탕 후 silica 분말 40  $\mu$ l를 주입하여 세포에서 분리된 DNA와 잘 흡착되도록 상온에 10분간 방치하였다. 이들 silica-DNA가 흡착된 검체를 다시 한번 guanidine thiocyanate가 포함된 lysis buffer와 800  $\mu$ l의 70% ethanol을 첨가해 2회 세척하였다. 이후 acetone을 주입하여 1회 세척 후 65°C에서 검사대상물을 건조한 후 50  $\mu$ l의 증류수를 주입하여 밀봉 후 온도를 가하여 DNA를 silica 분말에서 용해했다.

#### 나. Polymerase chain reaction

표본(용해질의 부분표본과 정제된 DNA)은 ethium bromide로 염색된 0.8%의 agarose gel에서 전기영동을 하였다. 각각의 반응에는 2  $\mu$ l의 template DNA, 2 $\mu$ l (10 pmole)의 primer, 4  $\mu$ l

(10 mM)의 dNTP, 0.1  $\mu$ l (0.2 unit)의 Taq polymerase, 5  $\mu$ l 10 x buffer와 34.9  $\mu$ l의 증류수가 포함된 반응 용액을 만들어 사용하였다. Nested PCR을 위해서 2번의 PCR cycling을 시행하였다. HPV 16과 18의 E6 region에 상보적인 oligonucleotide primer를 outer와 inner primer로 이용하였으며 outer primer는 consensus primer, inner primer는 type specific primer였다 (표 1). 첫 번째 cycling 시에는 outer primer를 이용하여 3분간 95°C에서 1주기 시행 후에, 94°C에서 1분, 50°C에서 1.5분, 72°C에서 2분을 35주기 시행하였고 추가로 72°C에서 5분을 1주기 시행하였다. 두 번째 PCR cycling은 첫 번째 PCR을 통해 얻어진 1  $\mu$ l의 PCR product와 HPV 16과 18의 inner primer를 사용해 차례대로 시행하였다. 두 번째 cycling procedure의 주기와 온도는 95°C에서 3분 1주기 후에 94°C에서 1분, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분을 30주기 시행하였고 추가로 72°C에서 5분 1주기를 시행하였다. 증류수를 음성 대조군으로 자궁경부 HPV-16/18 감염이 진단된 환자의 자궁경부 세척액을 양성 대조군으로 이용하였다.

표 1. Oligonucleotide primers의 염기배열

Primer	HPV type	Sequence (5'-3')	Exon	Size (bp)
Consensus		+ ACCGAAAACGGTTGAACCGAAAACGGT -AATAATGTCTATATTCACTAATT	E6	307
Type specific	16	+ ATGTTTCAGGACCCACAGGA -CCTCACGTTCGAGTAAGTGT	E6	124
	18	+ ATGGCGCGCTTTGAGGATCC -GCATGCGGTATACTGTCTCT	E6	188

#### 4. HPV-16/18 VLP L1 항체에 대한 ELISA

##### 가. 타액에서 HPV-16/18 VLP L1 IgA

재조합 HPV-16/18 VLP L1 단백질은 *Saccharomyces cerevisiae* expression system을 이용하여 생산 및 정제하였다. 상기의 정제된 표본을 이용하여 각 well 당 50 ng/ml의 농도로 HPV VLP L1 protein을 4°C에서 하루 동안 ELISA plates에 coating 하였고 washing buffer (PBS-T; 0.05% Tween-20 in PBS)를 이용하여 plate를 5회 세척하였다. 세척이 끝난 plate를 blocking buffer (3% BSA in PBS)를 이용하여 실온에서 두 시간 동안 blocking하고 다시 washing buffer로 5회 세척하였다. 준비된 타액 표본을 100  $\mu$ l의 부피로 각각 PBS에 1/10의 비율로 희석하여 plate에 넣고 한 시간 동안 37°C 항온기에서 반응시킨 다음 다시 5회 세척 후 goat anti-human IgA immunoglobulin (peroxidase conjugated, Sigma, U.S.A.)을 1:5000의 비율로 희석하여 plate에 넣고 15분 동안 37°C incubator에서 반응시키고 492 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 오차를 줄이기 위해 표본마다 2번 반복하여 실험을 시행하여 그 평균값을 실험결과로 정하였다. 또한, 모든 대상군의 백신 혹은 위약 투약 전 채취한 타액의 (평균 흡광도 + 2 X 표준편차)를 HPV-16/18 VLP-L1 IgA 항체의 양성기준값으로 정의하였다.

##### 나. 혈청에서 HPV-16/18 VLP L1 IgG

백신을 접종받은 대상에서 혈청 내 항체생성을 확인하기 위해 혈청에서 HPV-16/18 VLP L1 IgG를 측정하였다. 혈청에서의

HPV-16/18에 대한 정량은 HPV-16/18 VLP를 항원으로 이용하여 ELISA를 시행하였다. 재조합 HPV-16/18 단백질은 baculovirus system을 이용하여 생산 및 정제하였으며 실험은 GlaxoSmithKline Inc.에서 진행하였고 자세한 실험 방법은 이전의 연구방법을 참고하였으며 항체의 양성기준 값은 anti-HPV-16 IgG가 8 ELISA units (EU)/ml, anti-HPV-18 IgG가 7 EU/ml를 이용하였다.<sup>11</sup> 연구에 참여한 환자들의 항체가 (EU)는 이들의 표준 곡선과 곡선의 최소 점근선 (A), 곡선의 최대 점근선 (B), 곡선의 중앙점 (C), 곡선의 기울기 (D) 등 4개의 매개 변수를 이용해서  $A + \{(B-A)/[1 + (C/\text{흡광도})^D]\}$ 의 공식을 이용해 결정했으며, 양성 기준값인 8 EU/ml과 7 EU/ml은 medimmune study (MICP-057과 MICP-058)에 참여한 두 군의 HPV 음성인 사람들로부터 얻은 geometric mean titer의 표준 편차 3배 이상으로 정의하였다.

## 5. 통계학적 분석

실험군과 대조군 간의 HPV-16 VLP L1 IgA 농도의 차이는 스튜던트 t 검정을 사용하여 통계학적 유의성을 분석하였으며, 각 개체 별 백신 접종 전과 후의 IgA 농도 차이 비교에는 대응표본 t 검정과 Wilcoxon 부호순위 검정을 이용하였다. IgA 항체 양성률의 비교는 Fisher의 정확 검정을 사용하였다. 통계분석을 위해서 SPSS for windows (version 12.0)를 사용하였고 통계학적 유의성은 P 값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

### III. 결과

#### 1. 연구 대상

연구 기간에 총 36명의 여성이 본 연구에 동의하였다. 그러나 이 가운데 2명은 타액표본 채취에 실패하였고 3명은 실험 중간에 실험 동의를 철회하였다. 1명은 실험 중간에 추적관찰이 되지 않았고 1명은 실험 기간에 개에게 물려 면역글로불린을 투여받아 본 연구에서 제외되었으며 실험기간에 자궁경부상피내종양 3기로 진단받은 환자 한 명도 실험에서 제외하였다. 이상의 8명의 여성을 제외한 28명의 여성을 대상으로 본 연구를 진행하였다.

#### 2. PCR을 이용한 구강 점막 세포에서 HPV DNA 분석

구강에 HPV-16/18의 감염 여부를 확인하기 위하여 구강 세포에서 채취한 DNA에서 HPV -16/18에 대한 nested PCR 결과 28명 전원에서 HPV-16/18에 대한 DNA는 검출되지 않았다 (그림 1).

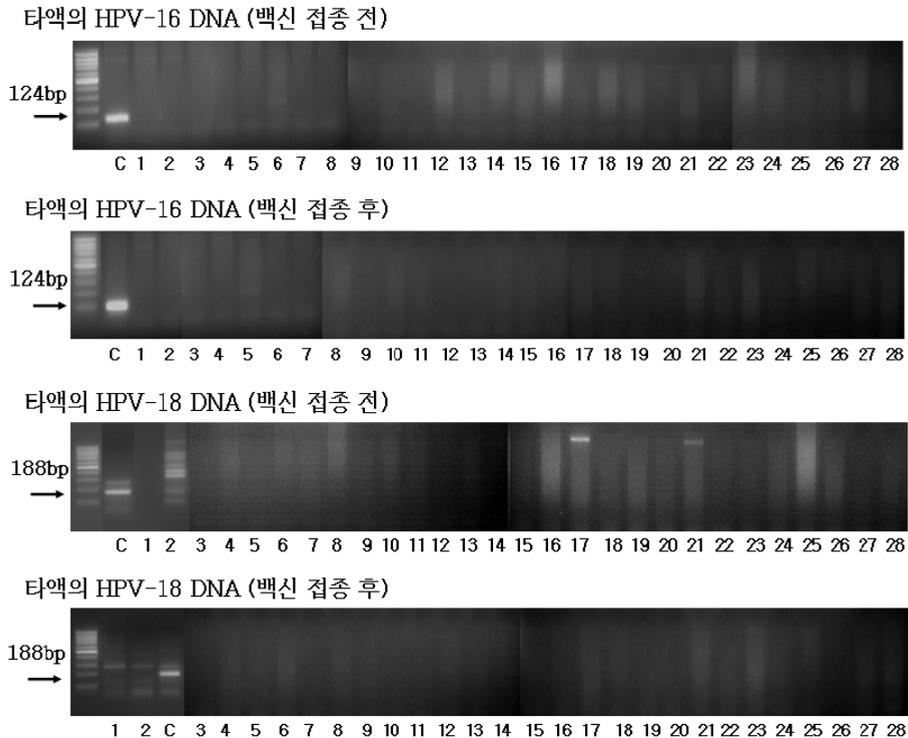


그림 1. Nested PCR을 이용한 구강세포 내에서 HPV-16/18 DNA 분석. (C) 양성대조군.

### 3. 타액에서 HPV-16/18 VLP L1 IgA 측정

#### 가. HPV-16 VLP L1 IgA

백신 접종 전에 채취한 타액에 대한 HPV-16 VLP L1에 대한 IgA의 검사 값은 실험군에서  $0.0717 \pm 0.0660$ 이었고 대조군에서  $0.0724 \pm 0.0825$ 로 두 군 간에 통계학적으로 유의한 차이는 없었다 ( $P = 0.981$ ) (그림 2A). 그러나, 백신 접종이 완료 후 1개월 뒤에 채취한 타액의 IgA는 실험군에서  $0.1551 \pm 0.0827$ , 대조군에서  $0.0771 \pm 0.0681$ 로 실험군에서 증가하였다 ( $P = 0.044$ )(그림 2B).

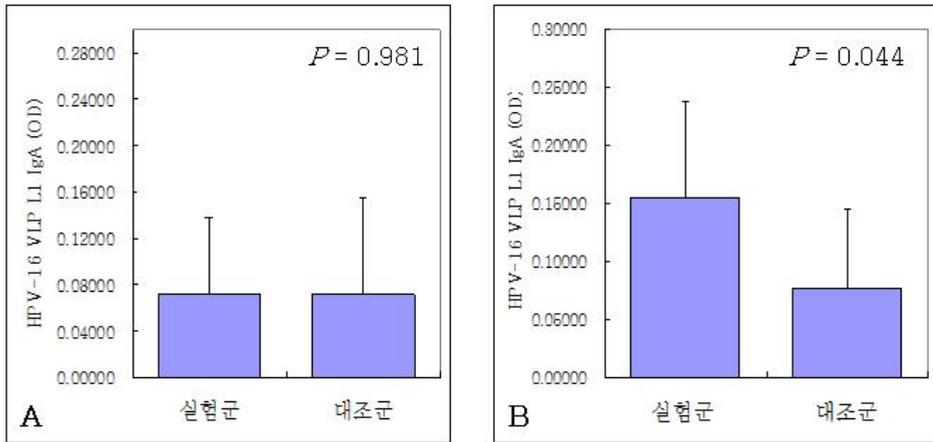


그림 2. 실험군과 대조군 간의 HPV-16 VLP L1 IgA 차이. (A) 백신 접종 전의 실험군과 대조군 간의 IgA 차이; (B) 백신 접종 후의 실험군과 대조군 간의 IgA 차이.

대응표본 t 검정을 이용하여 대조군에서 개인별 백신 접종 전과 후의 타액 내 IgA 농도를 비교한 결과, 백신 접종 전과 후의 IgA는 차이가 없었다 ( $0.0724 \pm 0.0825$  vs.  $0.0771 \pm 0.0681$ ,  $P = 0.682$ ) (그림 3A). 실험군에서는 백신 접종 전의 IgA가  $0.0717 \pm 0.0660$ 이었으나, 백신 접종 후의 IgA는  $0.1551 \pm 0.0827$ 로 백신 접종 후에 IgA의 증가를 확인하였다 ( $P < 0.001$ ) (그림 3B).

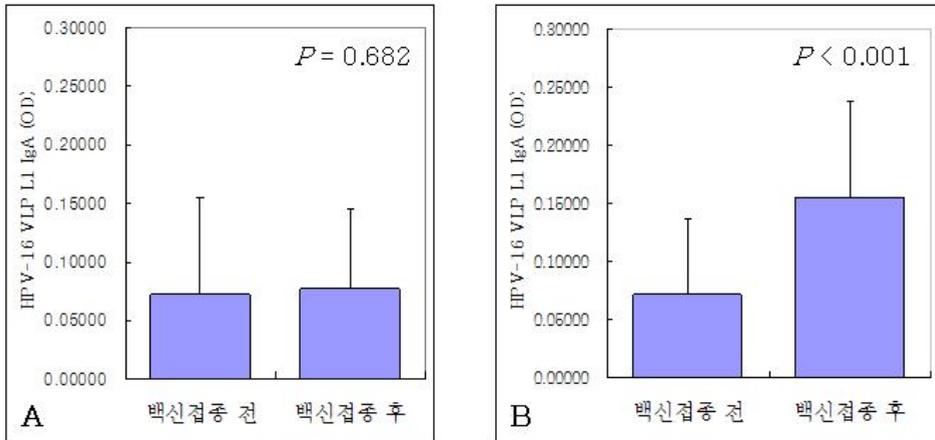


그림 3. 백신 접종 전과 후의 타액에서 HPV-16 VLP L1 IgA의 변화. (A) 대조군에서 백신 접종에 따른 타액에서 IgA의 변화; (B) 실험군에서 백신 접종에 따른 타액에서 IgA의 변화.

#### 나. HPV-18 VLP L1 IgA

실험군에서 백신 접종 전 채취한 타액의 HPV-18 VLP L1 IgA는  $0.0373 \pm 0.0403$ , 대조군에서 검사 값은  $0.0518 \pm 0.0496$ 이었으며 두 군 간에  $P$  값은 0.461로 통계적으로 차이가 없었다 (그림 4A). 백신 접종 후 실험군에서 IgA는  $0.1410 \pm 0.1055$ , 대조군에서는  $0.0542 \pm 0.0357$ 로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ( $P = 0.003$ ) (그림 4B).

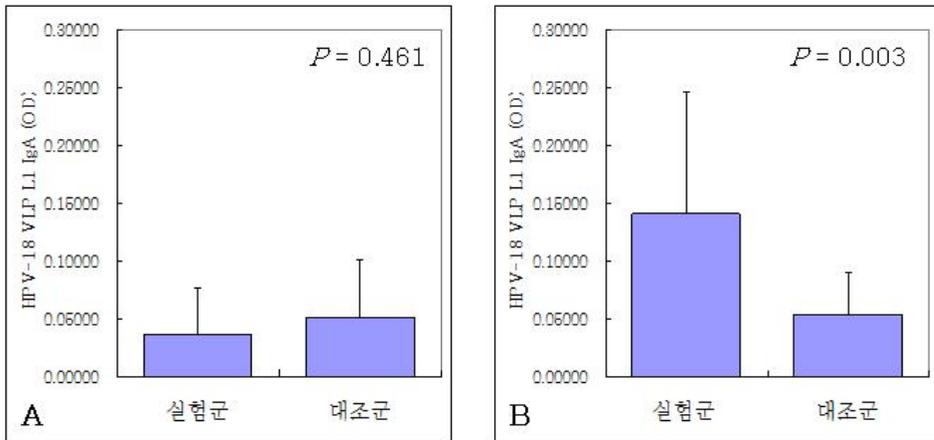


그림 4. 실험군과 대조군 간의 HPV-18 VLP L1 IgA 차이. (A) 백신 접종 전의 실험군과 대조군 간의 IgA 차이; (B) 백신 접종 후의 실험군과 대조군 간의 IgA 차이.

대응표본 t 검정으로 각 군에서 백신 접종에 따른 IgA를 비교한 결과, 대조군에서는 백신 접종 전이  $0.0518 \pm 0.0496$ , 백신 접종 후가  $0.0542 \pm 0.0357$ 로 두 군간에 유의한 차이가 없었다 ( $P = 0.820$ ). 실험군에서는 백신 접종 전이  $0.0373 \pm 0.0403$ , 백신 접종 후가  $0.1410 \pm 0.1055$ ,  $P$ 값이 0.001 미만으로 백신 접종에 의해 IgA가 증가함을 확인하였다.

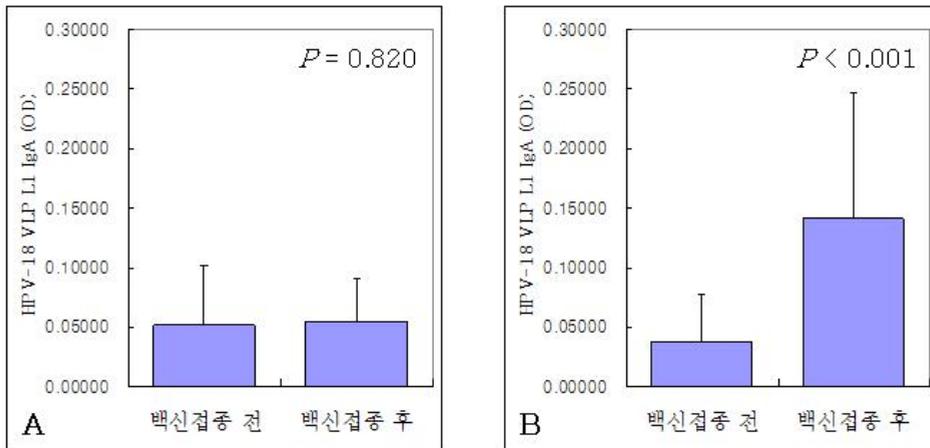


그림 5. 백신 접종 전과 후의 타액에서 HPV-18 VLP L1 IgA의 변화. (A) 대조군에서 백신 접종에 따른 타액에서 IgA의 변화; (B) 실험군에서 백신 접종에 따른 타액에서 IgA의 변화.

#### 다. 타액 내 HPV-16/18 VLP L1 IgA의 항체 반응 양성률

앞에서 정의에 따른 HPV-16 VLP L1 IgA의 항체 양성기준값은 0.1242이었다. 이를 기준으로 했을 때 AS04-증강 HPV 백신 접종 환자에서 타액 내 IgA의 항체반응 양성률은 27.3% (6/22)였으며 위약 접종 군에서는 0% (0/6)로 실험군에서 높은 항체반응 양성률을 보였으나 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다 ( $P = 0.289$ ) (표 2). HPV-18 VLP L1 IgA의 항체 양성기준값은 0.2082였으며 실험군에서 항체반응 양성률은 45.4% (10/22), 대조군에서는 0% (0/22)로 두 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 있었다 ( $P = 0.049$ ) (표 2).

표 2. 실험군에 따른 타액 내 HPV-16/18 VLP IgA의 항체반응 양성률

		Vaccine 군 N = 22 (%)	Placebo 군 N = 6 (%)	P value
HPV-16 IgA	Positive	6 (27.3)	0 (0)	0.289
	Negative	16 (72.7)	6 (100)	
HPV-18 IgA	Positive	10 (45.4)	0 (0)	0.049
	Negative	12 (54.6)	6 (100)	

#### 4. 혈청에서 HPV-16/18 VLP L1 IgG의 측정

##### 가. HPV-16 VLP L1 IgG

28명의 여성 가운데 3명의 여성에서 백신 투여 전 혈청에서 HPV-16 VLP IgG의 양성 소견을 보였으며 이들 중 2명은 실험군, 1명은 대조군이였다. 실험군 2명의 접종 전 IgG는 각각 14 EU/ml 과 34 EU/ml이었으며 이들은 백신 접종 후 6229 EU/ml 과 4452 EU/ml로 IgG가 매우 증가하였으며 위약을 접종받은 1명은 투약 전 88 EU/ml에서 투약 후 40 EU/ml로 오히려 IgG가 감소하였다. 또한, 이들 3명 모두 접종 전 채취한 타액에서 HPV-16 VLP IgA는 음성이였다. 28명의 여성 가운데 백신을 접종받은 22명의 여성은 접종 후 모두 혈청 내 IgG의 양전을 확인하였다. 위약을 접종받은 6명 가운데 위약 투약 전에 IgG가 음성이었던 5명은 접종 후에도 모두 IgG가 음성이였다.

##### 나. HPV-18 VLP L1 IgG

28명의 여성 가운데 2명의 여성에서 백신 투여 전 혈청에서

HPV-18 VLP IgG의 양성 소견을 보였으며 이들 2명은 모두 실험군이었다. 실험군 2명의 접종 전 IgG는 각각 12 EU/ml 과 15 EU/ml이었으며 이들은 백신 접종 후 8020 EU/ml 과 2735 EU/ml로 IgG가 증가하였다. 이들의 백신 접종 전 타액 내의 HPV-18 VLP IgA는 모두 음성이었다. 백신을 접종받은 여성은 접종 후 모두 혈청 내 IgG가 양성 소견을 보였고 위약을 접종 받은 환자는 모두 음성 소견을 보였다.

#### IV. 고찰

타액의 IgA는 구강 점막의 상피 세포에 침입하는 병원체에 대항하는 숙주의 1차 방어기제로 작용하여 구강의 바이러스 감염을 막는 데 중요한 역할을 한다. 타액 내 IgA의 바이러스 중화와 관련된 정확한 기전을 규명하기 위해서는 아직도 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각하나, 지금까지 밝혀진 바로는 IgA가 비리온(virion)에 결합하여 바이러스가 상피세포 내부로 침투하는 것을 차단하는 것으로 생각하고 있다.<sup>12</sup>

IgA와 다양한 바이러스 감염과 관련된 연구들을 살펴보면, Bukawa 등<sup>13</sup>은 경구면역(oral immunization)에 의해 유도되는 IgA가 인체면역 결핍 바이러스(Human immunodeficiency virus)의 감염을 중화시킬 수 있다는 것을 증명하였고 Renegar 등<sup>14</sup>도 인플루엔자 바이러스에 대한 IgA 면역반응을 유발한 쥐를 이용한 *in vivo* 연구에서 IgA가 이들 바이러스의 감염을 예방한다는 사실을 증명하였다. HPV 경구 감염과 이에 의해 분비되는 IgA와 관련된 연구로, Balmelli 등은 타액과 생식기 분비물에서 pseudotype HPV-16에 대한 IgG의 중화 효과가 IgA에 의

해 증가하는 현상을 관찰하였다.<sup>15</sup> 또한 Goncalves 등은 인도에서 HPV DNA가 검출된 여성이 그렇지 않은 여성에 비해 경구 IgA의 농도가 매우 낮다는 결과를 제시하였고 이 결과를 바탕으로 저자들은 IgA가 HPV의 구강 점막 침입을 예방할 수 있다고 추론하였다.<sup>16</sup> 하지만, 이 외에 아직 HPV 경구 감염에 있어 IgA 면역 반응에 대한 보고는 매우 드문 실정이다.

자궁 경부 HPV의 감염과 경구 IgA의 면역 반응에 대한 연구에 있어서는 Marais 등이 남아프리카의 자궁경부상피내종양 혹은 자궁경부암 환자들 가운데 자궁 경부에서 HPV-16 DNA가 음성을 보인 환자의 50%에서 타액에서 anti-VLP 16 IgA가 검출되었으며 HPV-16 DNA가 양성을 보인 환자는 60.7% (17/28)에서 타액에서도 anti-VLP 16 IgA가 검출된다고 보고하였다.<sup>17</sup> Marais 등은 이후에 건강한 여성과 자궁경부상피내종양 환자에서 타액의 anti-VLP 16 IgA를 비교하였고, 건강한 여성에서 26.1%, 자궁경부상피내종양 환자에서 68.2%로 자궁경부상피내종양 환자에서 의미 있게 높은 anti-VLP 16 IgA 검출률을 입증하였다.<sup>18</sup> Passmore 등도 자궁경부상피내종양 환자의 경관 점액에서는 HPV-16 IgA가 41.7%에서 양성 소견을 보인 반면, 타액에서는 이보다 높은 61.2%의 환자가 항체 양성 소견을 보인다고 보고 하였다.<sup>19</sup>

이처럼 경구감염이 아닌 자궁경부의 감염에도 타액에서 IgA가 검출되는 이유는, 외부 항원을 처음 접한 점막 조직에서 생성된 작동 세포(effector cell)나 면역기억 세포(memory cell) 등이 혈류를 따라 이동해 다니다가 다른 점막 조직에서 IgA를 분비하는 형질 세포(plasma cell)로 분화하게 되는 secretory

immune response의 특징 때문으로 생각된다. 이런 특징 때문에 외부 항원에 대한 secretory immune response는 항원에 최초로 노출된 점막뿐만 아니라 다른 부위의 점막 조직에도 면역 반응을 일으키게 된다.<sup>20-21</sup> 이러한 결과를 종합하면 자궁경부의 HPV 감염이 타액에서의 IgA 분비에도 영향을 미칠 것으로 생각한다.

본 연구에서 AS04-증강 2가 HPV 백신을 접종한 대상자의 타액에서 HPV-16 VLP L1 IgA는 27.3%, HPV-18 VLP L1 IgA는 45.4%에서 IgA 검사양성률을 보였으며, 대조군과 비교해서 백신 접종을 시행 받은 군의 항체가 2.2-2.6배 증가하였다. 이러한 결과에 근거하여 AS04-증강 2가 HPV 백신이 구강 내에서 HPV-16/18 IgA의 분비를 증가시킬 것으로 생각한다. AS04는 MPL과 aluminum salt를 결합시킨 면역증강제로 이 가운데 MPL은 항원 전달 세포(antigen presenting cell)의 toll like receptor-4에 결합하여 NF- $\kappa$ B pathway를 통해 자연 면역 반응을 활성화 시키는 한편, TNF- $\alpha$ 와 IL-6 등의 proinflammatory cytokines의 분비를 증가시켜 적응 면역 반응도 유발한다.<sup>22-24</sup> Giannini 등<sup>10</sup>은 aluminum salt만을 adjuvant로 사용했을 때보다 MPL을 첨가한 AS04를 adjuvant로 사용했을 때, 백신에 의한 memory B cell 면역 반응이 증가하고 오랫동안 지속한다고 보고하였고, Oh 등<sup>25</sup>은 강한 면역증강제로 인한 면역글로불린의 class switching 현상을 관찰하였다. 이상을 종합해 볼 때, 본 연구결과에서 관찰된 근주한 백신에 의한 점막 면역 반응은, MPL이 체내에서 강한 면역 반응을 유발하고 이 과정에서 memory B cell의 class switching이 일어나게 된

것으로 설명할 수 있을 것이다.

실험군의 타액에서 HPV-16 VLP L1 IgA의 양성률은 대조군과 차이가 없었고 실험군의 HPV-18 VLP L1 IgA 만이 대조군과 차이를 보였다. HPV 종류에 따라 HPV-16/18 IgA 항체 양성률에 차이가 생긴 이유로 HPV-16/18에 대한 AS04-증강 백신의 효용성 차이를 고려할 수 있다. Giannini 등은 AS04 혹은 aluminum salt를 면역 증강제로 사용하여 HPV-16/18의 예방 접종을 실시했을 때 AS04에 의해 HPV-16/18 모두 체액 면역 반응이 증가하는 것을 증명하였으며, 연구 결과에서 AS04를 사용했을 때와 aluminum salt를 사용했을 때의 접종 후 1년에서 4년까지의 HPV-16/18의 상대적인 항체가는 HPV-16의 경우보다 HPV-18의 경우에서 더 높은 것을 확인할 수 있다 (ratio AS04/aluminum salt: 1.52-2.63 vs. 2.12-3.13).<sup>10</sup> 그리고, 2가 백신인 가다실<sup>®</sup>과 4가 백신인 서바릭스<sup>™</sup>의 면역원성을 비교한 연구에서 항체의 절대값은 두 백신 모두 HPV-18보다 HPV-16에서 높았으나, 백신 간에 항체가를 비교한 경우에는 HPV-18에서 AS04를 면역 증강제로 사용한 서바릭스<sup>™</sup> 접종군의 항체가가 가다실<sup>®</sup> 접종군의 항체가보다 더 높은 소견을 보였다.<sup>26</sup> 그러나 이에 대한 정확한 기전은 아직 밝혀진 것이 없으며 면역 증강제가 HPV type에 따른 백신의 효용성에 영향을 미치는 기전에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것이다.

본 연구는 AS04-증강 HPV-16/18 VLP 백신을 접종받은 여성의 타액에서 점막 면역에서 중요한 역할을 하는 IgA를 측정함으로써, AS04-증강 HPV 백신이 HPV의 경구 감염을 예방하는데 도움이 될 수 있는지를 밝히는데 그 목적이 있다. 그러나 이

를 증명하는 데 있어 본 연구는 몇 가지 한계를 가지고 있다. 먼저 본 연구는 타액 내에서 주로 이합체 혹은 중합체 형태로 존재하는 secretory IgA가 아닌 전체 IgA를 측정하였다. 단량체 (monomer) 형태의 IgA는 세포의 수용체 매개 분비방법이 아닌 세포 주위의 통합성(integrity)이 깨진 부위를 통해서도 침샘에서 구강 내로 분비될 수 있다. 따라서 더욱 정확한 실험을 위해서는 IgA가 아닌 sIgA를 측정하는 것이 확고한 결론을 내리는데 도움이 될 것이다. 다만, 실제 타액 내 존재하는 IgA 가운데 10% 미만의 소량만이 단량체로 존재하고 90% 이상은 secretory form인 중합체 형태로 존재한다는 것을 고려한다면 본 연구에서 측정된 IgA 대부분이 sIgA라고 추론해도 무리는 없을 것으로 생각한다.<sup>12</sup> 두 번째로는 작은 표본 수를 들 수 있다. 본 연구의 초기에 36명의 여성이 참여하였으나 실제 분석이 가능했던 대상은 28건에 불과했고 이러한 적은 표본 수가 본 연구의 단점이라고 할 수 있다. 그리고 실제로 HPV-16 VLP IgA의 경우에는 실험에서 양전된 대상자의 비율이 실험군과 대조군에서 27.3%와 0%로 차이를 보였는데도 불구하고 통계학적 의미는 없었다. 이런 결과에는 적은 표본 수도 영향을 미쳤을 것으로 생각하며 이를 보완하기 위해서는 더 많은 대상을 포함하는 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

이와 같은 한계에도 본 연구는 AS04-증강 HPV 2가 백신을 접종받은 여성에서 타액 내의 IgA의 증가를 증명한 최초의 연구로 이를 바탕으로 AS04-증강 HPV 2가 백신 접종을 통해 경구 HPV 감염 예방과 관련된 연구를 진행할 수 있는 토대를 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

앞으로 HPV 예방백신이 실제로 HPV의 경구 감염을 예방할 수 있는지에 대한 임상연구와 AS04-증강 2가 HPV 백신이 혈청 내 항체의 증가 외에도 다양한 부위의 점막에서 점막 면역 반응에 미치는 영향에 관한 연구, adjuvant의 종류에 따른 HPV 백신이 점막 면역 반응에 미치는 차이에 대한 연구 등이 필요할 것으로 생각하며 이러한 연구 들을 통해 궁극적으로는 HPV와 관련된 많은 질환을 예방할 수 있는 백신 개발에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.

## V. 결론

HPV-16/18은 자궁경부암 및 두경부암과 같은 악성 종양의 발병에 있어 중요한 발암 물질로 보고되고 있다. 특히 암의 치료에서 조기진단의 중요성은 이미 잘 알려진 사실이며 이보다 더 중요한 것이 암의 예방임을 고려할 때, HPV-16/18 감염을 예방할 수 있는 백신의 등장은 이들 암의 발생률을 낮추고 인류의 삶의 질을 높이는 데 이바지할 수 있을 것으로 생각한다.

하지만, 지금까지 시판되고 있는 2종의 백신이 HPV의 경구 감염에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 전혀 없는 실정이다. 본 연구에서는 이들 백신 가운데 강력한 면역증강제인 MPL을 이용한 AS04-증강 HPV-16/18 백신을 이용하여, 자궁경부의 HPV 감염을 예방하기 위해 개발된 상기 백신이 경구 감염도 예방할 수 있는지에 대한 실마리를 얻고자 하였다.

본 실험에서 백신을 접종받은 모든 여성에서 백신 접종 후 혈청 항체의 양전을 확인할 수 있었으며, 이들 백신을 접종받은 여성에서 HPV-16 VLP에 대해서는 27.3%, HPV-18 VLP에 대

해서는 45.4%의 여성에서 타액 내 IgA의 양전을 확인할 수 있었다. 근주 백신은 침습성과 점막 면역에 대한 약한 면역원성이 단점으로 지적되고 있으며 이를 극복하기 위한 백신의 다양한 투여방법들이 연구되고 있다. 점막을 통한 백신의 투여는 점막 면역 반응을 극대화 시키고 비침습적인 투약 방법을 통해 더 많은 사람들이 고통 없이 백신을 접할 수 있다는 장점 때문에 많은 연구자들이 활발히 연구하고 있다. 하지만, 아직 이들 백신의 상용화가 이루어지지 않은 지금, 이번 연구는 AS04-증강 HPV 백신이 근주 방법을 통해 접종하지만, 구강 점막에서 IgA 면역 반응을 일으킬 수 있음을 증명했으며, 이를 통해 경구 HPV 감염 예방과 관련된 연구를 진행하는 데 초석이 될 수 있을 것이다.

## 참고문헌

1. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, et al. Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(18):1365-71.
2. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003;348(6):518-27.
3. Clifford G, Franceschi S, Diaz M, Munoz N, Villa LL. Chapter 3: HPV type-distribution in women with and without cervical neoplastic diseases. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/26-34.
4. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356(19):1944-56.
5. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):467-75.
6. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2001;344(15):1125-31.
7. Ryerson AB, Peters ES, Coughlin SS, Chen VW, Gillison ML, Reichman ME, et al. Burden of potentially human papillomavirus-associated cancers of the oropharynx and oral cavity in the US, 1998-2003. *Cancer* 2008;113(10 Suppl):2901-9.
8. Ulrich JT, Myers KR. Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol* 1995;6:495-524.
9. Ambrosch F, Wiedermann G, Kundi M, Leroux-Roels G,

- Desombere I, Garcon N, et al. A hepatitis B vaccine formulated with a novel adjuvant system. *Vaccine* 2000;18(20):2095-101.
10. Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 2006;24(33-34):5937-49.
  11. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuid A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet* 2004;364(9447):1757-65.
  12. Brandtzaeg P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann N Y Acad Sci* 2007;1098:288-311.
  13. Bukawa H, Sekigawa K, Hamajima K, Fukushima J, Yamada Y, Kiyono H, et al. Neutralization of HIV-1 by secretory IgA induced by oral immunization with a new macromolecular multicomponent peptide vaccine candidate. *Nat Med* 1995;1(7):681-5.
  14. Renegar KB, Small PA. Passive transfer of local immunity to influenza virus infection by IgA antibody. *J Immunol* 1991;146(6):1972-8.
  15. Balmelli C, Roden R, Potts A, Schiller J, De Grandi P, Nardelli-Haeffliger D. Nasal immunization of mice with human papillomavirus type 16 virus-like particles elicits neutralizing antibodies in mucosal secretions. *J Virol* 1998;72(10):8220-9.
  16. Gonçalves AK, Giraldo P, Barros-Mazon S, Gondo ML, Amaral RL, Jacyntho C. Secretory immunoglobulin A in saliva of women with oral and genital HPV infection. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2006;124(2):227-31.
  17. Marais DJ, Best JM, Rose RC, Keating P, Soeters R,

- Denny L, et al. Oral antibodies to human papillomavirus type 16 in women with cervical neoplasia. *J Med Virol* 2001;65(1):149-54.
18. Marais DJ, Sampson C, Jeftha A, Dhaya D, Passmore JA, Denny L, et al. More men than women make mucosal IgA antibodies to Human papillomavirus type 16 (HPV-16) and HPV-18: a study of oral HPV and oral HPV antibodies in a normal healthy population. *BMC Infect Dis* 2006;6:95.
  19. Passmore JA, Marais DJ, Sampson C, Allan B, Parker N, Milner M, et al. Cervicovaginal, oral, and serum IgG and IgA responses to human papillomavirus type 16 in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Med Virol* 2007;79(9):1375-80.
  20. Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions. *J Clin Immunol* 1987;7(4):265-76.
  21. Kraehenbuhl JP, Neutra MR. Molecular and cellular basis of immune protection of mucosal surfaces. *Physiol Rev* 1992;72(4):853-79.
  22. Evans JT, Cluff CW, Johnson DA, Lacy MJ, Persing DH, Baldrige JR. Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529. *Expert Rev Vaccines* 2003;2(2):219-29.
  23. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5(10):987-95.
  24. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+ CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 2003;299(5609):1033-6.
  25. Oh YK, Sohn T, Park JS, Kang MJ, Choi HG, Kim JA, et al. Enhanced mucosal and systemic immunogenicity of human papillomavirus-like particles encapsidating interleukin-2 gene adjuvant. *Virology* 2004;328(2):266-73.
  26. Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A,

Edwards RP, Zepp F, et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix() and Gardasil((R)) human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. Hum Vaccin 2009;5(10):705-19.

## Abstract

IgA immune response in saliva induced by AS04-adjuvant  
HPV-16/18 vaccine

Yong Wook Jung

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Young Tae Kim)

**Purpose:** This study was performed to evaluate IgA secretion in saliva induced by AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine.

**Materials and Methods:** This study was designed as double blind, randomized, placebo-controlled manner. Thirty six subjects with written informed consent were enrolled in this study. However, 8 subjects were excluded because of protocol violation. Twenty-two subjects received AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine and the others were injected with aluminum hydroxide placebo. The vaccine or placebo was administered intramuscularly on a 0, 1, 6 month schedule. Subjects' saliva, serum and oral mucosal cells were collected before initiation of vaccination and 1 month after completion. To determine oral infection by HPV-16/18, nested PCR for HPV-16/18 E6 was performed with mucosal cells of subjects. The level of HPV-16/18 VLP specific IgA in saliva was determined by ELISA. HPV-16/18 IgG level was also evaluated using ELISA to identify HPV-16/18

seroconversion.

**Results:** All subjects had no evidence of oral infection by HPV-16/18. All subjects in study group showed seropositivity for HPV-16/18 after vaccination. There was no subject in control group who showed HPV 16/18 seroconversion due to placebo injection. In addition, all subjects in control group had no IgA immune response for HPV 16/18 in saliva. In study group, IgA for HPV 16 and 18 were detected in 27.3% (6/22) and 45.4% (10/22), respectively. There was no difference in HPV-16/18 VLP IgA level which was examined with obtained saliva at pre-injection. However, HPV-16/18 VLP IgA level measured from saliva at post-injection was significantly higher in study group than that in control group.

**Conclusions:** This study indicates that AS04 adjuvanted HPV-16/18 vaccination induces HPV-16/18 specific IgA secretion in saliva. It might contribute to examining the role of AS04-adjuvanted HPV-16/18 vaccine in preventing not only HPV infection of uterine cervix, but oropharyngeal HPV infection.

-----  
Key Words : Human papillomavirus; vaccine; immunoglobulin A; AS04