

VLOGA OKUŽB PRI RAKU GLAVE IN VRATU

Primož Strojan

UVOD

Nastanek rakov glave in vratu je pogovorno povezan s kajenjem in čezmernim uživanjem alkoholnih pijač. Vloga okužb pri nastanku malignih tumorjev tega področja je manj vpadljiva. Izjema je karcinom nosnega žrela (KNŽ), za katerega je že dolgo znano, da k njegovemu nastanku odločilno prispeva okužba z virusom Epstein-Barr (EBV). V zadnjem obdobju je

kot pomemben etiološki dejavnik razpoznana tudi okužba s humanim papilomskim virusom (HPV), predvsem v skupini tumorjev ustnega dela žrela, ki izrastejo na korenu jezika in v nebnicah. Manj dognana je vzročna povezava med nastankom raznih rakov glave in vratu in drugimi virusi, kot je virus herpes simpleks, ali bakterijami.

VIRUS EPSTEIN-BARR

EBV je človeški herpesvirus, ki ga ima v telesu, navadno do svoje smrti, več kot 90 % odraslih po vsem svetu. Znakov okužbe večinoma ni. Protitelesa proti antigenom EBV so našli v več kot 80 % vzorcev človeških serumov iz ZDA, v vzorcih iz Evrope, Afrike in Azije pa v še večjem deležu (1). V Sloveniji znaša prekuženost z EBV več kot 90 % (2).

Epidemiološke značilnosti okužbe z virusom Epstein-Barr

Primarna okužba z EBV je običajno klinično nema oziroma neprepoznana, še posebej pri otrocih, mlajših od 5 let. Okuženi je dosmrtni prenašalec virusa, ki naseljuje njegov limfatični sistem in velike žleze slinavke (1). Okužbo dokazujejo EBV-specifična protitelesa in jo značilno opredeljuje občasno prehajanje EBV v področje žrela in nosu (3).

Klinična manifestacija okužbe z EBV je posledica porušenega ravnotežja med gostiteljem in virusom. Bolezni, povezane z EBV, so lahko limfocitnega (infekcijska mononukleoza, Hodgkinova bolezen, Burkittov limfom) ali epiteljskega porekla (KNŽ, oralna dlakasta levkoplakija, nediferencirani karcinom želodca). Med posameznimi populacijami se bolezen kaže različno: v zahodnem svetu kot infekcijska mononukleoza, v Afriki kot Burkittov limfom in v Aziji kot KNŽ. Celice vseh omenjenih tumorjev vsebujejo številne kopije

virusnega genoma v episomski obliki ter izražajo latentne gene EBV, ki morda prispevajo k malignemu fenotipu bolezni. Redko pojavljanje EBV-prividnih bolezni zunaj meja tarčne populacije oziroma njihova značilna geografska razporeditev nakazuje vlogo različnih dodatnih dejavnikov v vsaki izmed ogroženih populacij (3).

Zveza med EBV in KNŽ je bila ugotovljena leta 1966 (4). Najmanj 95 % primerov KNŽ je povezanih z okužbo z EBV. Resnost okužbe je odvisna od tipa karcinoma. EBV-genom je bil dokazan pri prav vseh primerih nediferencirane oblike KNŽ, kot jo določa histološka razvrstitev Svetovne zdravstvene organizacije (SZO-tip IIb), ne glede na lokalno stopnjo pogostosti oziroma etnično pripadnost bolnikov. Vzročno zvezo med EBV in KNŽ v skupinah z genetsko pogojenim nagnjenjem dokazuje najdba klonalnih kopij EBV-genoma v preinvazivnih lezijah v NŽ, kar izpostavlja okužbo z EBV kot zgodnji sprožilni dogodek pri razvoju KNŽ. Vloga EBV pri nastanku poroženevajoče oblike KNŽ (SZO-tip I) je manj jasna. Zdi se, da je izražanje virusnih proteinov v diferenciranih celicah, ki tvorijo keratin, zavrtlo. Poleg tega je EBV v teh primerih geografsko opredeljen: v neendemijskih področjih je z EBV okužena le tretjina bolnikov, medtem ko je v endemijskih predelih okužba pravilo (3, 5).

KNŽ žrela je v večjem delu sveta redka bolezen. V Sloveniji se pojavlja posamično: vsako leto zbolijo približno 10 ljudi, kar nas z manj kot 0,5 novimi bolniki letno na 100.000 prebivalcev uvršča med dežele z majhno ogroženostjo (6). Podobno velja za večino evropskih držav oz. ves zahodni svet. V Evropi je verjetnost KNŽ večja med prebivalci južnih držav (Španija, Italija, Francija, balkanske države) kot med tistih s severa. Nasprotno je KNŽ v nekaterih drugih etničnih okoljih zelo resen zdravstveni problem. Skrajni primer je provinca Guandong v jugovzhodnem delu Kitajske in Hongkong, kjer je letna incidenca pri moških 25–30, pri ženskah pa 10–15 primerov na 100.000 oseb. Hudo ogroženi s KNŽ so tudi Eskimi v Grenlandiji (20/100.000), incidenca pa je zmerna v nekaterih delih jugovzhodne Azije (Tajska, Vietnam, Malezija, Filipini), pri Arabcih v severni Afriki in ponekod na Bližnjem vzhodu (v Izraelu pri Židih, rojenih v severni Afriki). Ne glede na rasno pripadnost je incidenca KNŽ pri moških 2-3-krat večja kot pri ženskah (5).

Značilnosti karcinogeneze pri okužbi z Epstein-Barrovim virusom

Nastanek KNŽ je povezan z vsaj tremi dejavniki, katerih delovanje se med seboj prepleta. Genetsko pogojeno nagnjenje (npr. specifičen profil histokompatibilnostnega kompleksa, kopičenje primerov KNŽ v nekaterih družinah, velika incidenca KNŽ pri izseljencih iz južne Kitajske) se morda pod vplivom karcinogenov iz okolja (npr. nitrozaminov in njihovih prekurzorjev, formaldehida, kajenja, lesnega prahu) izrazi s spremembami epitelijskih celic NŽ, ki med drugim omogočajo vstop in vzdrževanje okužbe z EBV.

Napredovanje blagih displastičnih sprememb epitelijskih celic v displazijo hujše stopnje in karcinom je posledica okužbe z EBV in učinkovanja njegovih beljakovinskih produktov (3, 5).

Tumorigenost EBV je povezana z naborom latentnih genov, ki jih virus izraža v celicah KNŽ, tj. latentnim membranskim proteinom (LMP1, LMP2A in LMP2B) in jedrnimi antigeni (EBNA1 in EBNA2; manj pomembni so še EBNA-3A, -3B, -3C in -LP).

Vlogo ključnega onkogenega pri KNŽ ima LMP1, ki je dokazljiv v 80–90 % tumorjev. Ima 6 transmembranskih domen, ki omogočajo pritrditev LMP1 na gostiteljevo membrano, in karboksilni konec z dvema signalnima domenama (CTAR1 in 2 – *C-terminal activating region*), ki aktivirata številne signalne poti. Celico naredi nesmrtno oziroma ji omogoči, da se izogne apoptozi. Pomembna učinka LMP1 sta zvečanje celične mobilnosti, kar zveča metastatični potencial celic in pospešuje napredovanje bolezni, in slabljenje imunskega odziva, ki ga poraja KNŽ (LMP1 ima intrinzične T-celične inhibicijske lastnosti) (7).

Sama okužba z EBV je kritični dogodek v razvoju KNŽ, vendar – kot je bilo že omenjeno –, ni samozadosten: potrebni so še drugi molekularni mehanizmi (7).

Ugotavljanje okužbe z Epstein-Barrovim virusom in njen pomen pri karcinomu nosnega žrela

Sledenje specifičnega protitelesnega odziva na okužbo z EBV ima pomembno mesto v diagnostiki KNŽ, bodisi kot presejalni test v endemskih populacijah bodisi za spremljanje dinamike bolezni. Mogoče ga je uporabiti tudi kot pomoč pri iskanju izvora bolezni pri bolnikih z zasevki v bezgavkah na vratu brez znanega primarnega tumorja. Imunovirološki testi vključujejo določanje titrov IgM-protiteles proti virusnemu kapsidnemu antigenu (VCA – *viral capsid antigen*), IgG proti VCA, zgodnjemu antigenu (EA – *early antigen*) in virusnemu jedrnemu antigenu (EBNA – *EBV nuclear antigen*) ter IgA proti VCA. Protitelesa proti antigenom EBV so pogostejša in v višjih koncentracijah pri bolnikih s histološko neporoženevajočim ali nediferenciranim KNŽ (SZO-tipa IIa in IIb) kot pri bolnikih s poroženevajočim ploščatoceličnim karcinom (SZO-tip I) ali v kontrolnih skupinah zdravih prostovoljcev (2–5).

V zadnjem obdobju je napredek v molekularni tehnologiji omogočil zaznavo tumorskih nukleinskih kislin v krvi, tj. plazemske oziroma serumske DNK EBV, ki jo določajo s kvantitativno metodo verižne reakcije s polimerazo (*real-time quantitative PCR*). Ta je bolj občutljiv in specifičen kazalec za diagnozo in spremljanje bolnikov s KNŽ kot sledenje specifičnega protitelesnega odziva na okužbo z EBV (8). DNK EBV najdejo pri okoli 96 %

bolnikov s KNŽ in le pri 7 % zdravih, pa še pri slednjih v mnogo nižjih koncentracijah. Glede na veliko občutljivost in specifičnost bi bilo mogoče določanje DNK EBV v plazmi uporabiti za presejanje v huje ogroženih populacijah, pa tudi za oceno tumorskega bremena ter za napoved lokalne ponovitve po zaključku radioterapije oziroma sistemskega razsoja bolezni (8, 9).

Možnosti tarčnega zdravljenja okužbe z Epstein-Barrovim virusom

Zaradi novih spoznanj na področju molekularnega dogajanja, povezanega z okužbo z EBV in nastankom KNŽ, se pojavljajo možnosti tarčnega zdravljenja, usmerjenega proti ugotovljenim molekularnim aberacijam (7).

Beljakovina BRD7 sodeluje v več signalnih poteh, ki uravnavajo procese, pomembne za nastanek KNŽ, kot npr. prehod G1/S, celično proliferacijo in medcelične stike. V celicah KNŽ je njeno izražanje zmanjšano; raziskave so usmerjene v zvišanje ravni beljakovine BRD7 v celici.

Izraženost **ciklooksigenaze 2 (COX-2)** je v celicah KNŽ večja, s tem pa zvišana raven prostaciklinov, ki so ključni mediator v procesih, kot so proliferacija, angiogeneza in apoptoza. Z inhibicijo COX-2 so upočasnili rast celičnih linij KNŽ in zvečali učinke radioterapije, ki je temeljno zdravljenje pri tej vrsti raka.

Signalna pot Wnt je preveč aktivna v skoraj vseh primerih KNŽ. Blokirati jo je mogoče bodisi s protitelesi anti-Wnt ali z antagonistami Wnt. Med slednjimi največ obeta WIF-1, katerega izražanje je pri KNŽ zavrto. Možnost za obnovitev ravni WIF-1 v celicah KNŽ ponujata genska terapija z uporabo adenovirusnega vektorja.

HUMANI PAPILOMSKI VIRUSI

Čeprav spada okužba s HPV med skoraj ubikvitarne pri človeku, se rak razvije le pri manjšem delu okuženih ljudi. Poleg karcinoma materničnega vratu je s HPV, predvsem tipom 16 (HPV16), povezan nastanek dela karcinomov ustnega dela žrela, prvenstveno pri nekadilcih in abstinentih. Prvič je bila dokazana DNA HPV16 v invazivnem ploščatoceličnem karcinomu ustnega žrela s hibridizacijo Southern blot leta 1985 (10). Odtlej je bila virusna DNA najdena v tumorjih raznih podpodročij glave in vratu, pri čemer je bila pogostost pridružene okužbe odvisna od anatomskega podpodročja, tehnike dokazovanja virusa in od preučevane populacije.

Epidemiološke značilnosti okužbe s humanimi papilomskimi virusi

O epidemiološkem pomenu okužbe s HPV govorijo podatki ameriškega registra SEER (*Surveillance, epidemiology, and end results*): v obdobju 1973–2001 se je incidenca raka baze jezika oz. nebnic pri belcih, starih med 20 in 44 let, letno večala za 2,1 oz. 3,9 %, medtem ko se je incidenca malignih tumorjev drugih podpodročji manjšala (11). Podoben, 2-3-odstotni letni porast incidence karcinoma nebnic so ugotovili tudi pri ameriških črncih in belcih, mlajših od 60 let (12), pa tudi v 15 evropskih državah, med njimi tudi v Sloveniji (13). Kot glavni razlog za ta epidemiološka gibanja je obveljalo spremenjeno spolno vedenje, sama okužba pa je bila opredeljena kot spolno prenosljiva (14). Tako npr. je menda tveganje za nastanek karcinoma ustnega dela žrela statistično pomembno odvisno od števila spolnih partnerjev v življenju posameznika (≥ 26 vaginalnih oz. ≥ 6 oralnih; razmerje obetov 3,1 oz. 3,4). S ploščatoceličnim karcinomom ustnega dela žrela, povzročeni s HPV, so bolj ogroženi tisti, ki so že preboleli HPV-pozitivnega anogenitalnega raka, možje žensk s karcinomom materničnega vratu (invazivnim ali *in situ*) in ljudje z oslabljeno imunostjo (po transplantaciji, okuženi s HIV) (14).

Glede na rezultate metaanalize 60 raziskav je pogostost okužbe s HPV med bolniki z malignimi tumorji glave in vratu 25,9-odstotna: največja je pri karcinomu ustnega dela žrela – 35,6-odstotna (okuženost tumorjev nekaterih podpodročij, predvsem korena jezika in nebnic, je menda kar 50-odstotna) –, manjša pa pri tumorjih ustne votline in grla (23,5- oz. 24-odstotna). V 90–95 % primerih gre za okužbo s HPV tipa 16 (15).

Klinični pomen okužbe s HPV je dvojen: pomembno opredeljuje občutljivost tumorja za zdravljenje z obsevanjem in kemoterapijo in določa izid zdravljenja ter prognozo bolezni. Vzrok za to so molekularni dogodki v karcinogenezi, sproženi s HPV.

Značilnosti karcinogeneze pri okužbi s humanimi papilomskimi virusi

Glavna značilnost karcinogeneze s HPV, katere nosilci so virusni onkoproteini, je funkcionalna izključitev p53- in pRb-poti, kar odpravlja potrebo po inaktivaciji tumorskih zaviralnih genov p53 in pRb z mutacijo. Integracija DNA HPV v genom gostitelja – tumorskih celic karcinoma materničnega vratu – namreč zavre izražanje glavnega virusnega transkripcijskega in replikacijskega faktorja E2, ki ima vlogo transkripcijskega represorja onkogenov E6 in E7. Onkoproteini, ki jih kodirata gena E6 in E7 onkogenih HPV, se vežejo in razgrajujejo tumorska supresorska proteina p53 in pRb, pri čemer pa gena p53 in pRb delujeta normalno (*wild-type*). Pri večini karci-

nomov materničnega vratu sta torej tumorski supresorski poti p53 in pRb aktivni, a zaradi kontinuirane ekspresije genov E6 in E7 nefunkcionalni (16).

Transkripcija E6/E7 mRNA HPV16 pri raku glave in vratu pa ni nujno odvisna od integracije virusne DNA; virus je v tumorskih celicah lahko pretežno v episomski obliki. Mehanizem, kako virus preživi v tumorskih celicah v tej obliki in v dovolj velikem številu kopij, ni v celoti raziskan. Zdi se, da virusna beljakovina E2 lahko deluje kot sidro, ki veže episomski HPV na celično mitotično vreteno (17).

Ugotavljanje malignih tumorjev glave in vratu, povzročenih s humanimi papilomskimi virusi

Najpomembnejša razlika med HPV-pozitivnimi tumorji in tistimi, ki so posledica učinkovanja kajenja in alkohola, je, da sta v prvih dokazljiva gena p53 in pRb v obliki *wild type* in da imajo nizke ravni beljakovin p53 in pRb. Hkrati je beljakovina pRb kot negativni regulator (na transkripcijski ravni) kinaznega inhibitorja beljakovine p16, s svojo znižano ravno neposredno odgovorna za večje nastajanje p16 (18). V HPV-pozitivnih tumorjih je torej raven beljakovine p16 visoka in je zato lahko nadomestni marker za razpoznavo okužbe s HPV. Za ploščatocelične karcinome glave in vratu, ki so v zvezi s kajenjem/alkoholom, pa sta nasprotno, značilni manjša izraženost beljakovine p16 in mutacija gena p53.

Omenjena zveza je pomembna še toliko bolj, ker zgolj dokaz DNA HPV v tumorskih celicah še ne pomeni, da je virus dejansko vpleten v nastanek raka. Pogoj za slednje je dokaz transkripcijsko aktivne virusne DNA. Torej: biološko in klinično pomembna okužba s HPV je le tista, ki se kaže z DNA HPV16 in hkrati zvišano ravno beljakovine p16. Vse ostale možnosti (HPV16-negativni/p16-negativni ali HPV16-pozitivni/p16-negativni tumorji) so kazalec vzročne nepovezanosti HPV z nastankom tumorja in pomenijo drugačno (slabšo) prognozo (19).

V vsakodnevni praksi sta v rabi dva testa, ki se med seboj dopolnjujeta: hibridizacija *in situ* s sondo za HPV16 (z občutljivostjo, ki omogoča razpoznavo ene kopije do dveh integrirane virusne DNA, in v pozitivnih primerih daje točkasti signal – obarvanje v jedru) in imunohistokemična reakcija na beljakovino p16. Morda se obeta tudi test za določanje DNA HPV16 v plazmi ali protiteles proti beljakovinama E6 in E7 HPV16 v serumu.

Prognoza in zdravljenje pri HPV-pozitivnih tumorjih

V večini raziskav imajo ljudje s HPV-pozitivnimi tumorji občutno ugodnejšo prognozo kot s HPV-negativnimi tumorji: verjetnost za smrt zaradi raka je

pri prvih kar za 60–80 % manjša (13, 18, 19). Prognoza je morda boljša bodisi zato, ker pri HPV-pozitivnih tumorjih ni epiteljskih sprememb, ki so posledica kronične izpostavljenosti karcinogenim dejavnikom in so potencialna mesta vznika novih primarnih tumorjev (t.i. polje karcinizacije), bodisi zato ker so bolj občutljivi za obsevanje. Ta dva razloga je treba dopolniti še z ugotovitvijo, da gen p53 v HPV-pozitivnih tumorjih ni mutiran, tako da je v celicah apoptotični mehanizem nepoškodovan in zmore učinkovito uničevati ionizirajočemu sevanju in kemoterapevtikom izpostavljene celice (14).

Klinične raziskave, katerih izsledki bi pomagali razvrstiti bolnike po HPV-statusu v skupine z bolj in manj intenzivnim terapevtskim režimom, so šele v fazi načrtovanja. Zaenkrat zato vse bolnike – tako s HPV-pozitivnimi kot in HPV-negativnimi tumorji – še vedno zdravimo na osnovi podatkov o anatomskega področju, kjer imajo tumor, ter njegovi razsežnosti (stadij TNM).

Možnosti tarčnega zdravljenja pri okužbah s humanimi papilomskimi virusi

To področje je predmet aktivnih raziskav. Terapevtske vaccine, ki naj bi spodbudile citotoksični odgovor celic T na onkoproteine HPV16, so že v adjuvantni rabi v kontekstu klinične raziskave (20). Za vaccine, usmerjene proti tipoma 16 in 18 HPV (pa tudi 6 ter 11), so že dokazali, da učinkovito preprečujejo okužbo s HPV16 in HPV18 in tudi nastanek pridružene cervikalne neoplazije CIN2/3 (21). Ali učinkovito preprečujejo tudi perzistentno oralno okužbo s HPV, na ljudeh še niso raziskovali, na živalih pa je že bilo dokazano, da imunizacija proti HPV16 učinkovito preprečuje nastanek HPV-pozitivnih lezij v ustih (22).

ZAKLJUČEK

Mehanizem tumorogeneze je zelo zapleten in vključuje aberacije velikega števila genov, izražanje številnih beljakovin in delovanje signalnih poti. Razumevanje teh mehanizmov je pogoj za uspešno identifikacijo napovednih dejavnikov in razvoj učinkovitih tarčnih zdravljenj. Okužbi s EBV in HPV sta vzorčna modela tovrstnih prizadevanj.

LITERATURA

1. Henle W, Henle G. Epidemiologic aspects of Epstein-Barr virus (EBV)-associated diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 354: 326-31.
2. Marin J. Prispevek k poznavanju vloge virusa Epstein-Barr v Sloveniji. *Zdrav Vest* 1990; 59: 405-8.
3. Macsween K, Crawford D. Epstein-Barr virus – recent advances. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 131-40.

4. Old LJ, Boyse EA, Oettgen HF, Oettgen HF, De Harven E, Geering G, et al. Precipitating antibodies in human serum to an antigen present in cultured Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1966; 56: 1699-704.
5. Wei W, Sham J. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 2005; 365: 2041-54.
6. Register raka za Slovenijo. Incidenca raka v Sloveniji 2001. Poročilo št. 48. Ljubljana: Onkološki inštitut; 2008.
7. Chou J, Lin YC, Kim J, You L, Xu Z, He B, et al. Nasopharyngeal carcinoma – review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck* 2008; 30: 946-63.
8. Shao JY, Li YH, Gao HY, Wu QL, Cui NJ, Zhang L, et al. Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 1162–70.
9. Ma BBY, King A, Lo YMD, Yau YY, Zee B, Hui EP et al. Relationship between pretreatment level of plasma Epstein-Barr virus DNA, tumor burden, and metabolic activity in advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 714-20.
10. De Villiers EM, Weidauer H, Otto H, zur Hausen H. Papillomavirus DNA in human tongue carcinomas. *Int J Cancer* 1985; 36: 576-8.
11. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population aged 22-44 years. *Cancer* 2005; 103: 1843-9.
12. Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975–1998. *Oral Oncol* 2002; 38: 610-7.
13. Licitra L, Zigon G, Gatta, G Sánchez MJ, Berrino F. Human papillomavirus in HNSCC: A European epidemiologic perspective. *Hematol Oncol North Am* 2008; 22: 1143-53.
14. 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: 1944-56.
15. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle O, Franceschi S. Human papilloma types in head and neck squamous cell carcinoma worldwide: A systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 467-75.
16. Goodwin EC, DiMaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 12513-8.
17. Van Tine BA, Dao LD, Wu SY, Sonbuchner TM, Lin BY, Zou N, et al. Human papillomavirus (HPV) origin-binding protein associates with mitotic spindles to enable viral DNA partitioning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4030-5.
18. Li Y, Nichols MA, Shay JW, Xiong Y. Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependant kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res* 1994; 54: 6078-82.
19. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer with favourable prognosis. *J Clin Oncol* 2006; 24: 736-47.
20. Hsu KF, Hung CF, Cheng WF, He L, Slater LA, Ling M, et al. Enhancement of suicidal DNA vaccine potency by linking Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 to an antigen. *Gene Ther* 2001; 8: 376-83.
21. 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: 1757-65.
22. Maeda H, Kubo K, Sugita Y, Miyamoto Y, Komatsu S, Takeuchi S, et al. DNA vaccine against hamster oral papillomavirus-associated oral cancer. *J Int Med Res* 2005; 33: 647-53.