

子宮頸がん検診における受診率および検査精度の向上に関する研究（平成 23～24 年度）

ヒトパピローマウイルスの検出法における検査精度の向上について

村山力則 田中貴子 齊藤志保子

子宮頸がんは、ヒトパピローマウイルス（以下 HPV と記載）に感染することに起因しており、子宮頸がん検診では、より正確な判定のため細胞診と HPV 遺伝子検査の併用が検討され始めている。本研究では、HPV 遺伝子検査の精度向上を図るため、HPV 遺伝子検査法の改良を行い、液状化細胞診法（以下液状化法と記載）により採取した婦人科受診者の検体を用いて、ハイリスク型 HPV の検出を行うとともに、細胞診において従来法と液状化法の判定について比較検討した。その結果 90 検体中 HPV 遺伝子陽性は 68 検体であり、そのうち 48 検体からはハイリスク型 HPV 遺伝子が確認された。検出されたハイリスク型は 52 型が多く、ワクチン対象の 18 型は少数であった。また、細胞診において従来法と液状化法には明らかな差はみられなかったが、液状化法と改良した HPV 遺伝子検査法を組み合わせることにより、子宮頸がんを早期発見する可能性が高くなると考えられた。

1. はじめに

現在我が国では毎年約 10,000 人が子宮頸がんと診断されており、そのうち約 2,500 人が死亡している。子宮頸がんは、HPV に感染することに起因しており、約 100 種ある HPV のうち、子宮頸がんを引き起こすリスクの高い HPV はハイリスク型と言われ十数種が知られている（表 1）。

子宮頸がんの検査診断には婦人科細胞診が行われており、近年ベセスダシステム（図 1）により検査結果を判定することとなった¹⁾。このシステムの導入により細胞診結果に HPV 感染が考慮されるようになり、更に正確な判定のため HPV 遺伝子検査の併用も始まっている。ハイリスク型 HPV 感染が認められた場合、検診間隔を短くするなどの対応により子宮頸がんの早期発見に繋がるものと考えられる。

婦人科細胞診では、採取した細胞を直接スライドグラスに塗抹する従来法がほとんどであるが、近年、海外では細胞を固定液に保存する液状化法の導入が進んでいる。液状化法の利点は細胞の回収性が高いこと、細胞の乾燥や重なりが少ないため、均一な標本が作製できることから、施設間における標準化が可能で、残液を HPV 遺伝子検査に使用することができる。そのため日本においても近年、婦人科細胞診における液状化法が普及しつつある。

このようなことから、本研究では、液状化法

により婦人科受診者から採取した細胞を利用し、子宮頸がん検査の精度向上を図るため、PCR 法による HPV 遺伝子検査法の検討・改良を行い、その改良法を用いて婦人科受診者の HPV 感染状況について検査を行った。更に細胞診における従来法と液状化法の結果について比較を行った。

表 1 ハイリスク型 HPV と
そのオッズ比

HPV geno- type	オッズ比 (95%信頼区間)
HPV(-)	1
16	435 (275-679)
18	248 (138-446)
30	-
31	124 (54-286)
33	374 (47-2986)
35	74 (26-207)
39	-
45	198 (92-426)
51	67 (20-221)
52	200 (68-590)
56	45 (14-145)
58	115 (45-293)
59	419 (54-3243)
66	-

※Munoz ら(2003)より引用

“-”は遺伝子配列による系統樹によりハイリスク型に分類

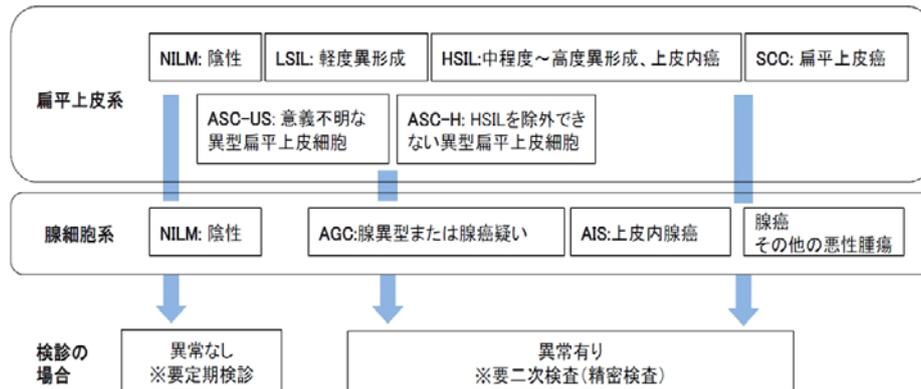


図1 ベセスダシステムにおける細胞診分類

2. 方法

2.1 対象検体

県内医療機関の協力により、婦人科外来受診者から子宮頸部スワブをサーベックスブラシにより採取し、液状化細胞診用の保存液の入った容器（SurePath:BD）に保存した90検体を対象とした。

2.2 HPV 遺伝子検査

1検体につき約10mlある保存液のうち、5mlからQIAamp DNA Mini Kit（Qiagen）により核酸を抽出し、最終的に50 μ lの抽出DNA溶液を得た。

PCR法によりHPV感染の有無を確認し、その増幅断片からのDNAシーケンスでHPVの型判定をした。更に14種のハイリスク型HPVをPCR法により判定した。HPV感染有無の検出にはGravittら²⁾の方法を改良したPGMY11, GP6+, GP5+法を利用し、各HPV L1遺伝子に存在する共通配列を標的とした。DNAシーケンスは上記PGMY11プライマーにM13配列を付加させ、解読した塩基配列を相同検索しHPVの遺伝子型を同定した。

また、ハイリスク型のHPV型判定は100 μ lのGoTaqプレミックス、10 μ lの抽出DNA溶液、50 μ lの滅菌蒸留水を混和したマスターミックスを作製し、0.2mlの8連PCRチューブに8 μ lずつ分取した。そしてHPV遺伝子型に特異的な配列に設計したプライマーセット（表2）溶液を5pmol/mlに調整し、終濃度1pmol/mlになるように2 μ l加え、スピンドウン後PCRを行った。PCR終了後、3%アガロースによる電気泳動で目的サイズのDNAが増幅されているかを確

認後、ハイリスクHPVの型判定を行った。

2.3 液状化細胞診検査

HPV遺伝子検査に用いた残液（約5ml）を専門検査機関に依頼し、液状化細胞診検査を行った。なお、従来法の細胞診検査結果は検体採取機関より提供を受けた。

3. 結果

3.1 HPV 遺伝子検査の結果

PGMY11, GP6+, GP5+法によるHPVの検出は90検体中68検体（75.5%）が陽性であり、そのうちDNAシーケンスによって型別が判明したものは38検体と少なかった。このことは各HPV型の共通配列であるL1遺伝子をPCR増幅の標的としたため、異なるHPV型重複感染の場合、PCRで増幅されるものの、DNAシーケンスでは塩基配列を読み込めなかったと推測された。加えてコピー数の多いHPV型が増幅され、リスクの高いハイリスク型を見落とししまった可能性が疑われた。

そこでさらに、ハイリスク型のHPV14遺伝子型を個別に検出するプライマーを使用し検査を行った（表2）。その結果、68検体中、46検体からハイリスク型HPVが検出され、うち33検体が単感染、10検体が二重感染、2検体が三重感染、1検体が四重感染であった。検出HPV遺伝子型別に見ると、延べ62件検出され、中でもHPV52型が15件、HPV16型が13件と多数を占めていた。また細胞診で前がん段階を示すHSILと判定された14検体中12検体（85.7%）から延べ16件のハイリスク型HPV遺伝子が検出された。

表2 本研究で使用したハイリスク型 HPV に特異的なプライマーの配列 (Nishiwaki ら³⁾の方法を一部改変)

genotype	F or R ^a	Primer sequence (5'→3')	bp	size
16	F	CGCACAAAACGTGCATCGGCTACC	24	217
	R	TGGGAGGCCCTTGTCCCAATGGA	23	
18	F	AACAGTCCATTAGGGGACGGCTGGA	26	187
	R	TGCCGCCATGTTCGCCATTIG	21	
30	F	ACGCAGACGAAAACGGCCCTCTGCT	25	249
	R	GGCCTAGCAGGGGATGCGTCCACAA	25	
31	F	GCGGTCCAAACGCTCTACAAAACGCA	28	360
	R	GCAGGGGCACCAACATCAACAATTCC	27	
33	F	ACACAGAGGCAGCCCGGCATTGTTT	26	139
	R	CACGGGTTTGACGACGATCAACA	24	
35	F	CCATAACATCGGTGGACGGTGGACAG	27	434
	R	CCATTACATCCCGTCCCTCCCTTC	27	
39	F	CCGACGGAGTGTCCCTGGACCATCTT	27	229
	R	CCAGCGTTTTTGGTTCCTTACCCCGT	28	
45	F	TGTTGGACATCACACCTACCGTGGGA	25	205
	R	TCCGTACCTGACCCAGAAGATGCAA	25	
51	F	CAACTAGCAACGGCGATGGACTIG	23	299
	R	CTGCTTCGCGGGCTGACTAGAA	22	
52	F	GGTGTGGTGCTGGTGCTTTTGCTA	25	517
	R	CAGTTACAGGGGACGAAATGGTGA	25	
56	F	TGTTGTTTTCCGCCATTTGTACATGC	32	330
	R	TGGCCTACATAGTATTCTGCAAGCC	32	
58	F	ACCACCGAGGCCACCAACAACGAAA	27	128
	R	CGTGGTCTACTGTCCACGGCGCAGTC	27	
59	F	CCGAGCAAGACACCTAAGACAGCAAC	27	169
	R	TCCGAGTCGGAGTCAAGTAATTGCT	25	
66	F	GCGGGCGGCTCCTACCTCTTCCTCTT	27	277
	R	CCACCTAACCTGACACACTGCCCA	29	
IC ^b	F	TTATCCCGAGTCCCGCAGGCCTTTCT	26	99
	R	TGGCTTGGCCCAACTTCCATCA	23	
EC ^c	F	CGTGGATGTCCATGAAGGATGAAGG	25	758
	R	GTTCGGGAACAGCGGGGATT	22	

a) F, forward primer R, reverse primer; b) IC, internal control; c) EC, external control

正常を示すNILMでは19検体中4検体(21.0%)から延べ5件,LSILでは21検体中14検体(66.6%)から延べ19件,ASC-USでは32検体中14検体(43.8%)から延べ18件のハイリスク型HPVが検出された。HSIL以外の判定となった検体でもLSIL,ASC-USにおいてはハイリスク型HPVが多く検出され,少数ながらNILMでもハイリスク型HPVが検出された(表3)。

表3 液状化細胞診結果とハイリスク型HPVの検出数

HPV genotype	細胞診による分類						計
	NILM (n=19)	LSIL (n=21)	HSIL (n=14)	ASC-US (n=32)	ASC-H (n=2)	AGC (n=2)	
16	2	3	5	2		1	13
18				2	1	1	4
30			1				1
31	1		2				3
33			1				1
35		1					1
39	1	1		2			4
45							0
51	1	2	4	2			9
52		6	2	6	1		15
56		2					2
58		1	1	3			5
59							0
66		3		1	1	1	6
計	5	19	16	18	3	3	64

※重複感染の事例があるため,合計数は一致しない

また検体提供医療機関が外部にハイリスクHPV型判定を依頼した11検体の検査結果と本研究における改良検査法によるハイリスク型HPV検索結果を比較したところ,7検体が一致し,外部検査では単感染と判定された3検体が重複感染であることが判明した。しかしながら本検査における検査で1検体が検出不能であった(表4)。

表4 ハイリスクHPV型別判定の検査結果比較について

検体No.	検出されたハイリスクHPVの遺伝子型	
	外部検査機関	本研究
12	52	52
16	35, 52	35, 52
17	52	52
22	16	16
27	52	52
28	51	51, 16
32	16	16, 66
37	16	16
40	52	52
42	51	30, 51
43	39	-

3.2 婦人科細胞診における従来法と液状化法の結果の比較について

ベセスダシステムではASC-US及びASC-Hは特定の階級に属さないため,従来法と液状化法の比較にはNILM,LSIL,HSILと判定された26検体を比較した。従来法と液状化法で一致したのは計15検体であり,液状化法で判定された事例のうち従来法よりリスクが高く判定されたのは3検体,低かったものは8検体であった(表5)。

表5 婦人科細胞診における従来法と液状化法の結果比較について

		従来法		
		NILM (n=4)	LSIL (n=11)	HSIL (n=11)
液状化法	NILM (n=6)	1	4	1
	LSIL (n=12)	2	7	3
	HSIL (n=8)	1	-	7

4. 考察

県内の婦人科外来受診者から液状化法により採取した検体について、改良検査法によりハイリスク型 HPV 感染を調査したところ、HPV52型が最も多く検出され、子宮頸がんワクチンの対象となっている HPV18 型は少数であった。細胞診の判定が LSIL や ASC-US であった検体においても、ハイリスク型 HPV 感染が多く確認された。細胞診の検査法については、従来法と液状化法の判定結果は液状化法が従来法よりも低い判定傾向にあり、どちらの方法でも NILM が HSIL となっている事例が1件ずつあったことから、どちらの方法が特に優れているという確証はなかった。しかしながら液状化法では細胞診の均一な標本の作製が容易であり、残液を HPV 遺伝子検査用検体として使用可能であることから、液状化法は検体採取法として有用であると思われる。また細胞診に加えて HPV 遺伝子検査を併用することにより、ハイリスク型感染者を迅速に明らかにすることは、子宮頸がんの早期発見に寄与するものと思われ、今後は HPV 遺伝子検査の併用を更に推進していく必要があると思われる。

参考文献

- 1) Solomon D, Nayar R (編) 平井康夫 (監修), ベネスダシステム 2001 アトラス, Springer Japan 2007
- 2) Gravitt PE *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. J Clin. Microbiol. 2000, **38**, 357-361.
- 3) Nishiwaki *et al.* genotyping of Human Papillomaviruses by a Novel One-Step Typing Method with Multiplex PCR and Clinical Applications. J Clin. Microbiol. 2008, **46**, 1161-1168.