

## 腫瘍形成に関わるヒトパピローマウイルスの関与

藤田保健衛生大学病院

産婦人科 講座教授 藤井多久磨

藤田保健衛生大学病院

産婦人科 助教 鳥居 裕

### 諸言

我が国では子宮頸癌は毎年約1万人が罹患し3,500名が死亡するという頻度の比較的多い癌である。最近では癌発生の若年化が認められ、妊孕能温存の見地からも注目を集めている。子宮頸癌は予防可能な癌とされるが、癌検診受診率は欧米と比較して高くなく、ヒトパピローマウイルス(HPV)感染予防ワクチンは定期接種化されたものの、副反応の報告が相次ぎ、その普及はあまり期待されない状況にある。女性の生涯では50-80%はHPVに感染するといわれ、現在のところHPV感染は避けられない。学術的には、HPV感染後の腫瘍形成のメカニズムを解明することが重要であり、そのためにはHPV感染のライフサイクルを明らかにしなければならない。本研究計画は子宮頸部腫瘍の未だ解明されていない研究を推進し、HPVのライフサイクルおよびその他の発癌因子を解明するとともに、それらを利用した新しい診断方法や予防などの臨床応用に展開するための基礎的な情報を収集し解析することにある。

従来より、前がん病変および癌組織に感染しているHPV型判定を行う場合、頸部擦過細胞を検体として利用することが実地臨床の現場では行われている。しかしながら、患者の子宮頸部擦過細胞検体から採取されたDNAには病変を形成していない一過性のHPV感染も検出されてしまうため、結果として複数のハイリスクHPVのDNA型が検出されることも多く、結果として病変形成に関わった真のHPV型の同定が困難である。そこで、狙い組織診にて採取されたホルマリン固定組織標本検体(FFPE)からDNAを抽出し、ウイルスDNAの塩基配列を決定することで、病変と関連のあるハイリスクHPV型を同定することを試みた。この結果を従来から臨床の現場で行われている頸部擦過細胞検体から得られたHPVの型判

定法と比較することで、既存の方法による型判定の方法との違いを明らかにする。

## 方法

子宮頸部上皮内異常病変と生検組織で診断されている患者のFFPEサンプルからDNAを抽出し、ハイリスク HPV 型を MGP—PCR 法 (F-MGP) にて同定した<sup>(1)</sup>。同一患者から採取されている子宮頸部擦過細胞より抽出された DNA を鋳型として HPV 型を MGP—PCR 法 (M-MGP) とクリニチップ法(C-chip)で同定した<sup>(2)</sup>。ここでのハイリスク HPV 型は HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 とした。HPV6,11 型は MGP—PCR 法にて検出が可能であるが、一般にハイリスク型ではないので、今回の検討事項から除外した。

## 結果

CIN1-3 の病変において C-chip, C-MGP, F-MGP ではそれぞれ 13 種類のリスク HPV が検出可能であった。C-chip 法では 6 6 型、C-MGP 法では 5 9 型、F-MGP 法では 4 5 型が検出されていなかった (Table 1)。単独感染 (single infection) と重感染 (multiple infection) を分類したのが table 2 である。HPV16, 18, 31, 52 型は単独・重感染の両者にみられるが、その他の型は単感染として検出されず、重感染においてのみ観察されている。とくに、F-MGP 法は頻度が高く検出される型に限定されており、比較的稀に検出される HPV45, 56, 59, 66, 68 の検出例はなかった。

Table 1. Validation for detection of HPV genotyping in patients with cervicitis, CIN1-3

Genotype		6	11	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68
Methods	C-Chip(N=190)	-	-	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	○
	C-MGP(N=190)	○	×	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○
	F-MGP(N=97)	○	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○	○	○	○	○	○

footnotes: C-Chip, cervical exfoliated cells by Clinichip® HPV test; C-MGP, cervical exfoliated cells by PCR with MGP primers; F-MGP, FFPE tissues by PCR with MGP primers. ○, identified. ×, not identified. -, not applicable

Thirteen high risk HPVs (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 and 68) were detected by Clinichip® HPV test

Fourteen high risk HPVs(,16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 and 68) and two low risk HPVs(6 and 11) were detected with PCR with MGP primers.

Table 2. Detection pattern of HPV genotyping in CIN2/3  
CIN2/3(N=87)

		6	11	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68	
C-Chip	single infection	-	-	○	○	○	○				○	○		○			-	
	multiple infection	-	-	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○			-	○
C-MGP	single infection			○	○	○	○				○	○		○				
	multiple infection	○		○	○	○		○	○	○	○	○	○	○			○	○
F-MGP	single infection			○	○	○	○				○	○		○				
	multiple infection	○		○	○	○			○		○	○	○				○	

  

		6	11	16	18	31	33	35	39	45	51	52	56	58	59	66	68	
C-Chip	single infection	-	-	○	○	○						○					-	
	multiple infection	-	-	○	○	○	○		○	○	○	○	○	○			-	○
C-MGP	single infection			○	○	○					○	○		○				
	multiple infection	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			○	○
F-MGP	single infection			○	○	○					○	○		○				
	multiple infection	○		○	○	○			○		○	○	○					

footnotes: C-Chip, cervical exfoliated cells by Clinichip® HPV test; C-MGP, cervical exfoliated cells by PCR with MGP primers; F-MGP, FFPE tissues by PCR with MGP primers. ○, identified. space, not identified. -, not applicable

Thirteen high risk HPV (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59 and 68) were detected by Clinichip® HPV test

Fourteen high risk HPV (16,18,31,33,35,39,45,51,52,56,58,59,66 and 68) and two low risk HPV (6 and 11) were detected with PCR with MGP primers.

### 結論および考察

HPV 型判定にあたり、材料と方法により検出される型が異なることがわかった。病変を組織学的に確認できる FFPE を用いた方法が最も型判定において信頼される方法とされるが、ホルマリン固定により、その DNA の質の劣化に起因して HPV 型検出頻度が下がることが危惧される。一方、擦過細胞を用いた DNA では病変とは関連のない一過性感染の HPV を検出している可能性がある。HPV ワクチンの効率を解析するうえで、HPV 型判定法は極めて重要であるが、その方法により HPV ワクチン効率の評価が変わる可能性が示唆された。

文献

- 1 Soderlund-Strand A, Carlson J, Dillner J. Modified general primer PCR system for sensitive detection of multiple types of oncogenic human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 47: 541-6, 2009
- 2 Iwata T, Fujii T, Morii K, Saito M, Sugiyama J, Nishio H, Morisada T, Tanaka K, Yaguchi T, Kawakami Y, Aoki D. Cytokine profile in cervical mucosa of Japanese patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Oncol.* 20: 126-33, 2015