

感染症発生動向調査におけるヒトパピローマウイルスの検出

長 島 真 美, 貞 升 健 志, 新 開 敬 行, 尾 形 和 恵,
吉 田 靖 子, 矢 野 一 好

Detection of Human Papillomavirus from the Specimens of Sentinels for Infectious Agent Surveillance

Mami NAGASHIMA, Kenji SADAMASU, Takayuki SHINKAI, Kazue OGATA,
Yasuko YOSHIDA and Kazuyoshi YANO

感染症発生動向調査におけるヒトパピローマウイルスの検出

長島真美*, 貞升健志*, 新開敬行*, 尾形和恵*,
吉田靖子*, 矢野一好**

Detection of Human Papillomavirus from the Specimens of Sentinels for Infectious Agent Surveillance

Mami NAGASHIMA*, Kenji SADAMASU*, Takayuki SHINKAI*, Kazue OGATA*,
Yasuko YOSHIDA* and Kazuyoshi YANO**

Keywords : ヒトパピローマウイルス human papillomavirus, マルチプレックス PCR multiplex PCR,
遺伝子解析 sequencing analysis, 低リスク群 HPV low risk HPV, 高リスク群 HPV high risk HPV

はじめに

ヒトパピローマウイルス (Human Papillomavirus : HPV) は、皮膚や粘膜に感染し腫瘍を作る DNA ウイルスとして知られ、子宮頸がんなどの悪性腫瘍の発生にも深く関与している¹⁾。HPV は培養することが困難なウイルスであるため、遺伝子の塩基配列に基づく型別により、現在 100 種類以上の遺伝子型に分類されている¹⁾。中でも、生殖器系に感染する HPV は性器・粘膜型と呼ばれ、40 種類以上の遺伝子型の存在が知られている。子宮頸がん等の発がんに関与する HPV のリスク分類²⁾では、尖圭コンジローマなどの良性病変から検出される低リスク群に 6,11 型など 12 種類が、子宮頸がんなどの悪性病変から検出される高リスク群に 16,18 型など 18 種類の遺伝子型が含まれている。

感染症法において尖圭コンジローマは 5 類感染症に分類され、発生動向を把握すべき性感染症として指定されている³⁾。しかしながら、感染症発生動向調査において報告される尖圭コンジローマの病原体検索や、子宮頸がんに関与する HPV 遺伝子型の疫学調査が、十分に実施されているとはいえない。

これまでに、著者らは PCR 法を用いた HPV 遺伝子の検出および Sequencing 法による遺伝子型別法の検討を報告してきた⁴⁻⁷⁾。前報では、L1 領域中の遺伝子検出箇所を増やし、また同時に 2 箇所の遺伝子領域が検出できる multiplex PCR 法の確立について報告⁸⁾した。今回、この検出系を用い、性感染症定点医療機関から搬入された検体を対象に HPV 検索を行ったので、その結果について報告する。

実験方法

1. 供試材料

2006 年 1 月から 2007 年 6 月に感染症発生動向調査事業の性感染症定点医療機関から当センターに搬入された子宮頸部および膣からの分泌物である帯下拭い 383 件を対象と

した。検査受診者の年齢内訳は、10 代が 16 名、20 代が 222 名、30 代が 105 名、40 代が 17 名、50 代が 9 名、60 代が 1 名、70 代が 1 名および年齢不明が 12 名であった。

2. 供試材料からの DNA 抽出法

帯下を拭った綿棒を滅菌蒸留水 300 μ L 中で振り洗いし、このうちの 150 μ L を SepaGene RV-R (三光純薬) を用いて DNA 抽出を行い、最終産物を蒸留水 30 μ L に再溶解したものを試料とした。

3. 遺伝子検出法

HPV 遺伝子の検出は既報に従い実施した⁸⁾。すなわち、HPV 遺伝子のキャプシド蛋白をコードする L1 領域の遺伝子配列に対する 2 つのプライマーペア-MY09/MY11 および L1C1/L1C2M を用い (表 1)、multiplex-PCR を行った。100 μ M の MY09, MY11, L1C1 および L1C2M の各プライマーを等量混合した後、10 \times Ex Taq Buffer (TaKaRa) 5.0 μ L, 2.5mM dNTP Mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTPC) (TaKaRa) 4.0 μ L, プライマー混合液 1.0 μ L, 5U/ μ L TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) 0.5 μ L, 滅菌蒸留水 29.5 μ L および DNA 抽出液 10 μ L を混合し、[94 $^{\circ}$ C 1 分, 48 $^{\circ}$ C 2 分, 72 $^{\circ}$ C 3 分] のサイクルを 35 回繰り返した。

4. Direct Sequencing 法

HPV 遺伝子が検出された増幅産物を 2.5% 低融点ゲル (NuSieve GTG Agarose : CAMBREX Bio Science) で電気泳動し、紫外線照射下で特異バンドを切り出した。低融点ゲルからの遺伝子抽出は、94 $^{\circ}$ C ヒートブロックを用いて低融点ゲルを溶解後、QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて行い、DNA 液 30 μ L を得た。

* 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

** 東京都健康安全研究センター微生物部

表1. プライマーの塩基配列^{9, 10)}

プライマー	塩基配列	増幅産物
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	450bp
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAAYAATGG-3'	
L1C1	5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT-3'	260bp
L1C2M	5'-TACCCTAAATACCCTATATTG-3'	

Sequencing 反応に用いるプライマーは、450bp の特異バンドが検出された場合には MY09 と MY11 プライマーを、260 bp の特異バンドが検出された場合には L1C1 と L1C2M プライマーを用いた。Sequencing 反応は、BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) 4.0 μL, 5×Buffer (ABI) 2.0 μL, 各プライマー3.2 μM 1.0 μL に、滅菌蒸留水 8.0 μL および DNA 液 5.0 μL を混合し、[94°C15 秒, 50°C15 秒, 60°C4 分] のサイクルを 25 回繰り返した。

Sequencing 反応産物の精製は Centri-Sep Spin Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い、ドライアップ後、Hi-Di Formamide 25 μL に再溶解し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (ABI) を用いて塩基配列を決定した。得られた HPV 遺伝子配列は、遺伝子バンク (NCBI) がインターネットで公開している blastn¹¹⁾ 解析を利用し、NCBI に登録されている HPV 遺伝子の塩基配列と比較することにより決定した。さらに、得られた遺伝子型を Munoz らのリスク分類²⁾ に照らし合わせ、HPV のリスク分類を行った (表 2)。

表2. 遺伝子型による HPV リスク分類²⁾

リスク群	HPV 遺伝子型
低リスク群	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 70, 72, 81, CP6108
高リスク群	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (26, 53, 66) *

* : 高リスク群に入ると考えられている型

結果及び考察

1. リスク群別 HPV 遺伝子検出状況

帯下拭い 383 件から HPV 遺伝子検出を試みたところ、154 件 (40.2%) から HPV 遺伝子が検出された。さらに Direct Sequencing 法により遺伝子型を決定し、リスク分類を試み

た結果 (表 3), 25 件 (6.5%) が 61 型 (9 件), 6 型 (8 件), 81 型 (4 件) などの低リスク群に分類され、95 件 (24.8%) が 16 型 (13 件), 53 型 (13 件), 58 型 (11 件) などの高リスク群に分類され、残りの 34 件 (8.9%) は、どちらの群にも分類できない型であった。

Asato ら¹²⁾ による沖縄県での調査 (1993 年~1998 年) では、細胞診正常女性の HPV 陽性率は 10.2% で、28 種類の遺伝子型が検出され、頻度別には、52, 51, 35 型の順で高く、がん化リスクが特に高いとされる 16, 18 型の頻度は低かったと報告している。この報告と比較すると、今回の結果は、HPV 陽性率は約 4 倍高く、検出頻度が高いのは 16 型および 53 型であったが、この相違点は Asato らは細胞診正常女性を調査対象としているのに対し、著者らは病院受診者としていること、検出用プライマーを 2 領域に設定したこと、また、地域差の関与などによるものと考えられる。

表3. リスク分類別 HPV 検出数

低リスク群		高リスク群		未分類群	
型 (検出数)		型 (検出数)		型 (検出数)	
61	(9)	16	(13)	90	(8)
6	(8)	53	(13)	67	(7)
81	(4)	58	(11)	62	(4)
11	(2)	18	(9)	71	(4)
54	(2)	39	(7)	84	(4)
		51	(7)	91	(2)
		56	(7)	34	(1)
		66	(7)	54	(1)
		33	(5)	89	(1)
		52	(4)	102	(1)
		68	(4)	CP4173	(1)
		82	(4)		
		31	(3)		
		59	(1)		
検出数 (検出率)	25 (6.5%)	95 (24.8%)		34 (8.9%)	

2. 年代別 HPV 遺伝子検出状況

HPV 遺伝子の検出状況は、10 代では 16 件中 9 件 (56.3%)、20 代では 222 件中 96 件 (43.2%)、30 代では 105 件中 34 件 (32.4%)、40 代では 17 件中 4 件 (23.5%)、50 代以上では 11 件中 7 件 (63.6%)、年齢不明では 12 件中 4 件 (33.3%) であった (図 1)。以上の結果から、若い世代では HPV 検出率が高く、10 代をピークとし、40 代まで年代があがるに連れ、HPV 検出率は下がっていた。リスク群別にみると、低リスク群 HPV の検出率は、10 代では 6.3%、20 代では 6.8%、30 代では 8.6% であり、10 代から 30 代の間では年代が上昇するにつれて検出率が増加する

傾向が認められた。40代以上では検出されなかった。一方、高リスク群 HPV の検出率は、10代では50.0%、20代では26.8%、30代では16.2%、40代では17.6%、50代以上では45.5%と、10代および50代以上での検出率が高い傾向が認められた。

Sasagawa ら¹³⁾が行った調査では、北陸地方で妊婦を含め病院を受診した女性のうち、15-19歳の半数以上に、20-24歳の36%に子宮頸部での高リスク群 HPV 感染が認められたと報告しているが、今回、高リスク群 HPV の検出率に関しては、ほぼ同様の結果が得られた。一方、Winer ら¹⁴⁾は、若い女性の追跡調査から、性行為の経験後まもなくして6割以上の女性が HPV に感染し、そのほとんどが高リスク群 HPV であると報告している。高リスク群 HPV の感染は子宮頸がんの原因とされている¹⁵⁾が、HPV 感染の大部分は一過性で、免疫機構により排除されるため^{16, 17)}、高リスク群 HPV 感染だけでは子宮頸がんになるとはいえず、HPV が排除されずに感染が持続した場合には、前がん病変期間を経て子宮がんになる可能性があるといわれている^{18, 19)}。このため、高リスク群 HPV が検出された場合、持続感染しているかどうか追跡調査をすることが重要である。

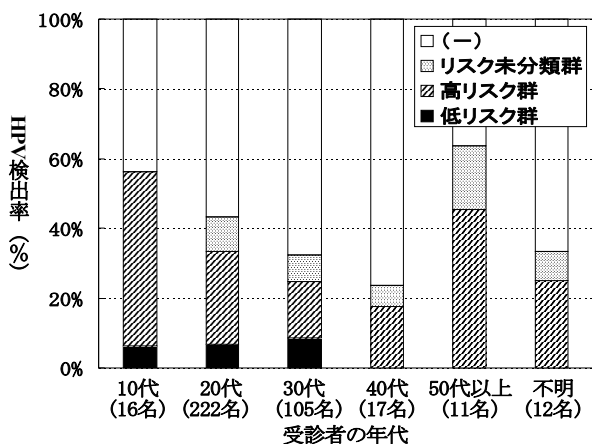


図1. 年代別HPV検出状況

3. 臨床診断別の HPV 遺伝子検出状況

1) 尖圭コンジローマ患者からの HPV 遺伝子検出状況

臨床的に、尖圭コンジローマと診断された患者検体 38 件中、16 件 (42.1%) から HPV 遺伝子が検出された。その内訳は、低リスク群 HPV が 6 件 (15.8%) で、その遺伝子型は 6 型が 4 件、11 型が 1 件および 61 型が 1 件であった。高リスク群 HPV は 9 件 (23.7%) で、その遺伝子型は 16 型 3 件、58 型 3 件、33 型 1 件、52 型 1 件、56 型 1 件で、残りの 1 件 (CP4173 型) はどちらの群にも分類できない型 (2.6%) であった。尖圭コンジローマなどの良性病変から検出される HPV の遺伝子型は低リスク群に分類されているが、尖圭コンジローマと診断された患者検体から検出された HPV の遺伝子型は、低リスク群よりも高リスク群に分類される遺伝子型が多かった。しかしながら、検査対象全

体 (383 件) における HPV の検出率は、低リスク群 6.5%、高リスク群 24.8%であったのに対し、臨床的に尖圭コンジローマと診断された症例における検出率は、低リスク群 15.8%、高リスク群 23.7%で、臨床的に尖圭コンジローマと診断された症例の方が、低リスク群 HPV の検出率が 2.4 倍高かった。

東京都感染症発生動向調査における尖圭コンジローマの患者報告数²⁰⁾は (図 2) 、増加傾向にあり、2007 年も昨年と同程度の報告数が予測される。今後も、都内の性感染症定点医療機関における HPV の侵淫状況を調査し、さらなる実態の解明を図ることが重要である。

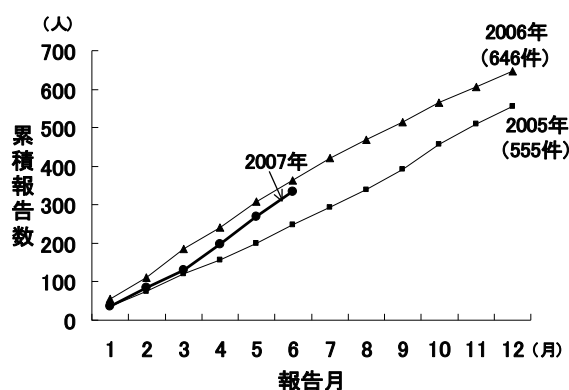


図2. 尖圭コンジローマ報告数 (東京都)

2) 他の性感染症患者からの HPV 遺伝子検出状況

臨床的に、性器ヘルペス感染症や性器クラミジア感染症などの性感染症と診断された患者検体 60 件中、19 件 (31.6%) から HPV 遺伝子が検出された。その内訳は、高リスク群 HPV が 13 件 (21.7%) で、その遺伝子型は 53 型 3 件、18 型 2 件、68 型 2 件、16 型 1 件、31 型 1 件、39 型 1 件、51 型 1 件、52 型 1 件、66 型 1 件で、残りの 6 件 (10.0%) はどちらの群にも分類できない型であった。低リスク群 HPV は検出されなかった。一つの性感染症に感染していると、他の性感染症にも罹患しやすいと言われており、今後とも起因病原体の把握を詳細に行っていく必要がある。

ま と め

1. 都内の性感染症定点医療機関より搬入された帯下拭い 383 件から、multiplex PCR 法による HPV 遺伝子の検出を試みたところ、154 件から HPV 遺伝子が検出され、25 件 (6.5%) が発がん性リスク分類による低リスク群に、95 件 (24.8%) が高リスク群に分類された。
2. 受診者の年代別に HPV 検出率をみると、若い世代での検出率が高かった。リスク群別の検出率をみると、低リスク群では 30 代で、高リスク群では 10 代および 50 代での検出率が高い傾向がみられた。

文 献

- 1) 井上正樹：産婦人科治療，92，848-851，2006。

- 2) Munoz, N., Bosch, F.X., Sanjose, S., *et al.*: *New Engl J Med*, **348**, 518-527, 2003.
- 3) 感染症法研究会：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律，19-56，2004，中央法規，東京。
- 4) 東京都健康局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成 15 年，116，2004.
- 5) 東京都福祉保健局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成 16 年，123，2005.
- 6) 東京都福祉保健局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成 17 年，127，2006.
- 7) 東京都福祉保健局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成 18 年，125，2007.
- 8) 長島真美，貞升健志，新開敬行，他：東京健安研七年报，**57**，65-68，2006.
- 9) Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Alessi, T.Q., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 357-361, 2000.
- 10) Li, J., Gerhard, D.S., Zhang, Z., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5563-5571, 2003.
- 11) NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
- 12) Asato, T., Maehama, T., Nagai, Y., *et al.*: *JID*, **189**, 1829-1832, 2004.
- 13) Sasagawa, T., Yasuda, M., Tani W., *et al.*: *Sex Transm Infect*, **81**, 280-282, 2005.
- 14) Winer R.L., Lee S.K., Hughes J.P., *et al.*: *Am J Epidemiol*, **157**, 218-226, 2003.
- 15) Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., *et al.*: *J Pathol.*, **189**, 12-19, 1999.
- 16) Woodman, C.B.J., Collins, S., Winter, H., *et al.*: *Lancet*, **357**,1831-1836, 2001.
- 17) Ho, G.Y.F., Bierman, R., Beardsley, I., *et al.*: *N Engl J Med*, **338**, 423-428, 1998.
- 18) Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., *et al.*: *Virology*, **337**, 76-84, 2005.
- 19) Kjaer, S.K., van den Brule, A.J.C., Paull, G., *et al.*: *BMJ*, **325**, 572,2002.
- 20) 東京都感染症情報センター：東京都感染症発生動向調査，<http://survey.tokyo-eiken.go.jp/epidinfo/epimenu.do>

上記文献中の URL は，2007 年 8 月 30 日現在のもの
であり，変更または抹消の可能性がある。