

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

1. 研究の背景・目的

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。子宮頸部発癌機構において、HPV感染が重要な働きを示していることは過去20年の研究成果より明らかとなりつつある。ハイリスクHPVの持続感染により、ウイルスE6/E7タンパクが宿主細胞内で発現される。その作用により宿主の細胞周期が攪乱され、さまざまな発癌に関わる遺伝子の発現異常が引き起こされる。疫学的にも、子宮頸癌組織には99.7%のハイリスクHPVが検出できると報告されている。HPVは200種類の型が同定されているが、子宮頸部発癌に関与するハイリスク型HPVは現在14種類ほどが同定されている。HPV型の検出においては、世界においても地域差があることが知られ、欧米では比較的稀なHPV52, 58型が日本を含む東アジアに多いことも報告されている¹。このハイリスク型HPVの同定およびモニタリングは、①世界におけるHPV型の分布を知ること ②感染予防ワクチンの予防効果のモニタリング ③今後ワクチンが普及するにつれ、検出されるHPV型の分布に変化がみられるか否かなどの点で重要となってきた²。

従来、前癌病変および癌組織に感染しているHPV型判定を行う場合、子宮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 型の DNA が検出されることも多く、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、既に診断の得られている子宮頸部腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋組織検体 (FFPE) から、DNA を抽出してウイルス 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 型を同定することにした。この結果を従来から行われている頸部擦過細胞検体から得られた HPV の型判定と比較することで、既存の方法による型判定との違いを検証する。病変部位から検出された HPV の型が真の病変形成に関わった型であり、それ以外の型が擦過細胞から検出されている場合には、病変形成に関与しなかった型と言えそうであるが、その一方で、FFPE サンプルでは DNA の変性や断裂もあり、検出感度が低下するという欠点も存在する。したがって、本研究課題では、本邦において、双方の利点、欠点を補うような方法を提案できるか否かを検討することにした。

2. 研究の対象ならびに方法

患者検体の中で擦過細胞および FFPE が保存されている検体を選別し、HPV 型判定を行う。型判定法についてはクリニチップ法 (C-chip) と PCR-MGP 法を採用する。クリニチップ法は臨床的に広く使われている方法であり、その正当性について論文で科学的に評価され、我が国においては保険収載の検査薬品として使用されている方法である³。この方法は擦過細胞を用いて解析が可能である。PCR-MGP 法は世界保健機構の研究グループが開発した方法であり、世界的に広く使われている方法の一つである⁴。PCR-MGP 法では擦過細胞検体 (C-MGP) と FFPE 検体 (F-MGP) における HPV 型判定の解析を行えることから、合計 3 つの解析結果を照合し、方法の違いによる HPV 型判定の違いを比較した。HPV の型が複数検出される場合には既報の方法による hierarchical attribution 法および proportional attribution 法にて解析した^{5,6}。なお、本研究は施設内倫理委員会の承認を得て行った。

3. 研究結果

1. 3 つの方法では、全体の一致率は 88.5%-92.1%であった。型別一致率は 83.9%-100%であった。
2. CIN2/3 の病変において、HPV16/18 型の寄与する割合は C-chip 法で 52.3% (45/86)、C-MGP

- 法で 54.7%(47/86)、F-MGP 法で 52.3%(45/86)であった。
3. CIN2/3 の病変において、HPV16/18/31/33/45/52/58 型の寄与する割合は C-chip 法で 88.4(76/86)、C-MGP 法で 86.0%(74/86)、F-MGP 法で 83.7%(72/86)であった。
 4. CIN3 の病変において、HPV16/18/31/33/45/52/58 型の寄与する割合は C-chip 法で 96.4(53/55)、C-MGP 法で 89.1%(49/55)、F-MGP 法で 94.5%(52/55)であった。F-MGP 法 C-chip 法、C-MGP 法で分析し、hierarchical attribution 法を用いて統計解析することで、C-chip、C-MGP、H-MGP といった 3 つの手法間に統計学的な有意差がないことが分かった。

4. 考察

HPV ワクチンの効果を調べるためには、適切な HPV 型判定の方法が求められる。PCR 法は感度が高いため、真の病変形成に関わらない HPV 感染も検出する可能性がある。特に子宮頸部擦過細胞を用いた解析では、病変以外の部位からの細胞も採取されるために、その可能性は高い。一方で、FFPE を用いた解析では、顕微鏡で病変と確認された部位から DNA を抽出するため、その可能性は低くなるが DNA の質が低下するために本来病変形成にかかわった HPV 型を見落とす可能性がある。さらに、FFPE からの検体で HPV の重感染が見られた場合、どのように判定するのかが問題となる。既報によれば^{5,6}、母集団において HPV の感染頻度に重み付けをし、病変を形成した HPV 型を推定するという方法がとられている (proportional attribution 法)。さらに、母集団において HPV の感染頻度から、一番頻度の高いものを病変形成にかかわった HPV 型と決めてしまうという方法が採用されている (hierarchical attribution 法)。どちらも、推定により病変形成にかかわった HPV 型を決めていく方法であり、絶対の真理ではないが、他に病変形成にかかわった HPV 型を決定する方法がないために代用されているのが実情である。HPV 感染予防ワクチンの効果を推定するには何らかの方法で HPV 型感染の分布を確定する必要があり、今後もこのような方法が採用されていくと推察された。本邦では、この推定方法によりワクチン効果を調べた報告がないこと、解析に用いる検体の違いや解析手法の違いによる結果の違いについて分析した報告がないことから、本研究課題で分析を行った。

現在、米国では HPV 感染予防のワクチンとして 9 価ワクチンが承認され、実施されつつある。9 価ワクチンには発癌にかかわる 7 種の HPV 型と良性の腫瘍 (いぼ) の発生にかか

わる2種の型の予防が可能である。発癌にかかわる7種のHPVはHPV16/18/31/33/45/52/58型であり、本ワクチンではCIN2/3の83-87%が予防可能である。病変をCIN3に限定すると、89-96%の予防が可能であった。いずれの方法においても検体や解析手法の違いには統計学的な有意差はなかった。言い換えれば、FFPEを用いた解析手法は煩雑なため、擦過細胞を用いたC-chipやC-MGP法が簡便で便利である。今後はこれらの方法でHPVワクチンの効果をモニタリングするのが良いと推察された⁷。なお、本研究内容の成果は文献7にて公表した。

5. 文献

1. Azuma Y, Kusumoto-Matsuo R, Takeuchi F, *et al.* Human papillomavirus genotype distribution in cervical intraepithelial neoplasia grade 2/3 and invasive cervical cancer in Japanese women. *Jpn J Clin Oncol.* 2014; **44**: 910-7.
2. van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol.* 2006; **44**: 3122-9.
3. Satoh T, Matsumoto K, Fujii T, *et al.* Rapid genotyping of carcinogenic human papillomavirus by loop-mediated isothermal amplification using a new automated DNA test (Clinichip HPV). *J Virol Methods.* 2013; **188**: 83-93.
4. 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.* 2009; **47**: 541-6.
5. Insinga RP, Liaw KL, Johnson LG, Madeleine MM. A systematic review of the prevalence and attribution of human papillomavirus types among cervical, vaginal, and vulvar precancers and cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008; **17**: 1611-22.
6. Wentzensen N, Schiffman M, Dunn T, *et al.* Multiple human papillomavirus genotype infections in cervical cancer progression in the study to understand cervical

cancer early endpoints and determinants. *Int J Cancer*. 2009; **125**: 2151-8.

7. Torii Y, Fujii T, Kukimoto I, *et al.* Comparison of methods using paraffin-embedded tissues and exfoliated cervical cells to evaluate human papillomavirus genotype attribution. *Cancer Sci*. 2016; **107**: 1520-26.