

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460459

研究課題名(和文) 子宮頸部細胞浮遊液を活用したHPV持続感染予測と細胞診の検出感度向上に関する研究

研究課題名(英文) Research on prediction of persistent infection of HPV and improvement of sensitivity of cytodiagnosis using cervical scrape cells.

研究代表者

大河戸 光章 (Okodo, Mitsuaki)

杏林大学・保健学部・准教授

研究者番号：10276206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒト乳頭腫ウイルス(HPV)16型の単独感染を正確に検出するために、新しいアッセイ(uniplex E6/E7 PCR assay)を開発しました。このアッセイで子宮頸部擦過細胞を解析した結果、(1)市販の検査法で16型単独感染と判定された症例は、多くは多重感染であったこと、(2)16型単独感染はCIN1において極めて少ないこと、(3)単独感染はCIN2以上の病変であったこと、(4)16型単独感染症例は、HPVがヒトゲノムに組み込まれていました。これらの結果から、HPVの持続感染や病変の進行を予測するためには、単独感染を検出することが重要であると結論づけました。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a new assay (uniplex E6 / E7 PCR assay) to accurately detect single infection of human papilloma virus (HPV) type 16. As a result of analysis of cervical scrape cells in this assay, (1) Most cases were multiple infections in cases where it was determined to be single infection by type 16 by a commercially available examination method, (2) In CIN 1, there were very few HPV type 16 single infection cases, (3) Patients with HPV type 16 single infection were lesions with CIN 2 or higher, (4) In HPV type 16 single infection cases, HPV was integrated in the human genome. From the results of this study, we concluded that it is important to detect single infection with appropriate assay to predict continuous infection of HPV and progression of lesion.

研究分野：細胞診

キーワード：子宮頸部上皮内腫瘍 HPV 持続感染

1. 研究開始当初の背景

13種類(16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68型)のハイリスク型 Human papillomavirus (HPV) (HR13)による持続感染によって子宮頸部上皮内腫瘍(CIN)が形成され、浸潤癌に進行すると考えられている。そのため、現在、細胞診においては意義不明な異型扁平上皮細胞(ASC-US)と判定された女性に対し、上皮内病変(SIL)か否かの判定補助にHR13の有無が検査され、また組織診においては、CIN1、2と判定された患者に対してHR13の型別判定による治療方針や経過観察期間を決定する試みが開始されている。しかしながら、(1) HPVが持続感染するか否かを判定する検査法が確立されていない。また(2) 上皮内病変(SIL)や上皮内腫瘍(CIN)と判定された症例にHPVが存在しない現状がある。

(3) 一次スクリーニングの子宮頸部細胞診の異型細胞検出感度の低さが懸念されていた。

2. 研究の目的

(1) 持続感染予測を目的として、医師によって採取された子宮頸部細胞浮遊液を用い、長期に渡って経過観察した患者に対してHPV感染動態を調査して、SIL形成、持続感染との関連性を調べる。16型陽性患者についてはリアルタイムPCR法を用いてウイルス量およびintegrationを定量してその推移を調べる。

(2) 上皮内病変(SIL)や上皮内腫瘍(CIN)と判定された症例にHPVが存在しない現状があるため、HPV検査による誤陰性を防ぐことを目的として研究を実施する。HR13陰性症例に対し、HRを疑う9種類(26、30、53、66、67、69、70、73、82型)のHPV(HR-susp.9)を検出し、HR-susp.9陽性の症例がCIN2、3に進展するか否かを経過観察する。またHR-susp.9感染症例における細胞像の調査は行われていないため、細胞診標本をスクリーニングして特異な細胞の検出を試み、HR13感染症例との相違点を明らかにする。

(3) NILM・HPV陽性症例の細胞像を精査し、低コストである細胞診検査の異型細胞検出感度の向上を目的として研究を行い、HPV感染細胞を同定する。この研究によって新たな異型を有するHPV感染細胞が明らかとなり、異型細胞の検出感度が高まることが期待される。

3. 研究の方法

(1) HPV量とintegration解析による持続感染予測に関する研究

リアルタイムPCRによるウイルス定量とintegrationの検出を行う。integrationの検出はリアルタイムPCRによるHPVのE2およびE6遺伝子を定量して行う。この方法はintegrationが生ずるとE2のhinge部(nt 3333-3620)が高頻度に欠失することを利用した方法であるが、integrationの検出はE2遺伝子の多型により大きく影響を受けるこ

とが示されている。そのため、我々は全ての検体に対して、E2、E6遺伝子のプローブ反応部位の多型をシーケンスし、多型に応じたプローブを設計し、各遺伝子を定量する。また、HPV複合感染した検体の場合、どの型が病変形成や持続感染に作用するかを調査することは困難である。そのため、我々はHR13およびHR-susp.9をtype specific primerによるPCR法によって検出し、16型単独感染に限定してintegration解析する。またintegrationの混在を排除したcut-off値を設定してPure episomeの判定に重点を置くことで各検体の微量なintegrationの混在を調査する。

(2) 細胞診上皮内病変(SIL)・HR13陰性症例におけるHR-susp.9の検出と細胞所見に関する研究

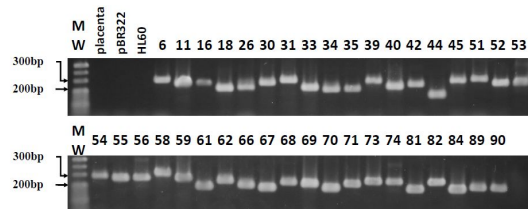
type specific primerによるPCR法を用いてHR13調べ、HR13陰性症例に対し、HR-susp.9を同様のPCR法で検出する。さらに、HR-susp.9感染症例における細胞像の調査は行われていないため、細胞診標本をスクリーニングして、特異的な異型細胞の検出を行い、HR13感染症例との相違点を明らかにする。そしてCIN2、3に進展するかを経過観察する。

(3) 細胞診陰性NILM・HR-HPV陽性症例におけるHR-HPV感染細胞検出に関する研究

子宮頸部細胞浮遊液を用い、NILM判定の女性を選別し、type specific primerによるPCR法を用いてHR13とHR-susp.9の感染を調べる。そしてHPV陽性検体と陰性検体の細胞診標本をスクリーニングして、圧排二核細胞、巨細胞、異常角化細胞等のHPV感染候補細胞を検出する。その後、標本上の標的細胞に対してin-situ PCR法でHPVを検出し、HPV感染細胞を同定する。

4. 研究成果

(1) 発癌リスクの最も高いHPV16型の持続感染を的確に捉えるためには、16型単独感染の症例を収集する必要がある。そのため、多重の多重感染を否定するべく、type specific primerによるPCRアッセイの開発に取り組んだ。当初の予定では、HRを疑う9種類(26、30、53、66、67、69、70、73、82型)だけをスクリーニングすれば十分と考えていたが、(2)の研究でSILやCINと判定された症例においてHPVが存在しない状況を確認したため、さらに17種類(6、11、34、40、42、44、54、55、61、62、71、74、81、84、85、89、90型)を追加し、高感度、HPV型別感度が均等なtype specific primerによるuniplex E6/E7 PCRアッセイを完成させた(Fig.1)。



我々は、本アッセイによる解析によって、市販の検査法で単独感染と判定された多くの症例が多重感染であったことを示した。さらに CIN1, 2, 3 と浸潤癌の 100% に 39 種類のいずれかの HPV が存在することを証明した (Fig 2)。

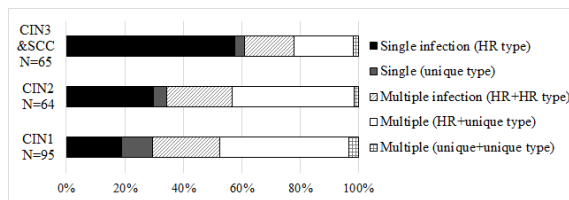


Fig.2

本アッセイによる HPV 検出によってこれまでの結果や定説を飛躍的に書き換える可能性があり、HPV の感染状態を明らかにするだけでなく、交絡因子となる HPV 型が明らかな症例を用いることができるようになった。

この解析によって、明らかになった新しい事実は、保険適応の HPV 検査で 16 型単独感染と判定された症例は、ほとんどが他の型混在した多重感染していたこと、また 16 型単独感染は CIN1 においては極めて少ないこと。さらに 単独感染は CIN2 以上の病変がほとんどを占めていること。16 型単独感染のほとんどの症例はヒトゲノムに integration していたことである。

これらの事実によって確実に単独感染を検出することが、HPV 感染の持続や病変の進展に大きく関与する可能性が明らかになった。

(2) 細胞診陰性 NILM・HR-HPV 陽性症例における HR-HPV 感染細胞検出に関する研究において、カンジダ存在下の反応性細胞変化を示す NILM 標本に多々散見される二核細胞を圧排陰性・陽性に分類して解析を行った。115 例の陽性 NILM の子宮頸部スワブを用いた結果、二核細胞の HPV 検出率は 29.6%、圧排陽性二核細胞の HPV の感度、特異度はそれぞれ 91.2%、82.7% であった ( $p < 0.001$ )。in situ PCR assay による HPV 陽性率は、圧排陽性二核細胞 68.7%、圧排陰性 8.3% で圧排と HPV との間に統計学的に有意な関係が認められた ( $p < 0.001$ )。NILM において観察される二核細胞のうち、圧排陽性の二核細胞は炎症性変化による細胞変化ではなく、HPV 感染に起因した変化である可能性があることが明らかになった。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Okodo M, Okayama K, Teruya K, Sasagawa T.

Uniplex E6/ E7 PCR method detecting E6 or E7 genes in 39 human papillomavirus types. J Med Virol, <査読あり> 90: 981-988,

2018.

2. Okodo M, Okayama K, Fukui T, Shiina N, Caniz T, Yabusaki H, Fujii M.

Significance of compression in binucleation while differentiating reactive cellular changes between human papillomavirus and Candida Infections. Asian Pac J Cancer Prev <査読あり> 18:2507-2511, 2017.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 大河戸光章: HPV E6・E7 遺伝子領域をターゲットとした型特異的プライマーによる uniplex PCR アッセイ: 第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会, 福岡, 平成 29 年 11 月 18 日

2. 岡山香里: 細胞検査士要望教育シンポジウム: 婦人科細胞診における in situ PCR 法: 第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会, 福岡, 平成 29 年 11 月 19 日

3. 坂本人一: 日本における高リスク HPV 型の同定と検診への応用の可能性: 第 58 回日本臨床細胞学会春期大会, 大阪, 平成 29 年 5 月 27 日

4. 大河戸光章: 子宮頸部におけるユニークハイリスク型 HPV の感染経過: 第 7 回日本感染症学会北陸支部学術講演会, 金沢, 平成 28 年 12 月 5 日

5. 大河戸光章: 子宮頸部および肛門管細胞診における HPV 感染: 第 33 回埼玉県細胞検査士会学術集会, 埼玉, 平成 28 年 3 月 5 日

6. 大河戸光章: 子宮頸部上皮内腫瘍においてハイリスクが疑われるマイナー HPV の検出状況: 第 56 回日本臨床細胞学会総会 春期大会, 島根, 平成 27 年 5 月 27 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大河戸 光章 (OKODO, Mitsuaki)

杏林大学・保健学部・准教授

研究者番号：10276206

### (2) 研究分担者

岡山 香里 (OKAYAMA, Kaori)

群馬パース大学・保健科学部・講師

研究者番号：10780116

(平成28年度より研究分担者)

藤井 雅彦 (FUJII, Masahiko)

杏林大学・保健学部・教授

研究者番号：50108065

(平成27年度まで研究分担者)

### (3) 研究協力者

小田 瑞恵 (ODA, Mizue)

こころとからだの元気プラザ

藤井 雅彦 (FUJII, Masahiko)

こころとからだの元気プラザ