

# ヒトパピローマウイルス感染症

# ヒトパピローマウイルス感染症

## 目 次

1. ヒトパピローマウイルス感染症の概説
  - 1-1. 子宮頸癌
  - 1-2. 尖圭コンジローマ
2. ヒトパピローマウイルス感染症の検査に関する注意事項
3. 検査材料の採取・輸送
4. 検査方法
  - 4-1. 細胞検体からの DNA 抽出
  - 4-2. PGMY-PCR 法による HPV DNA の増幅
  - 4-3. HPV DNA のシーケンス解析
  - 4-4. リバースブロッティング法による遺伝子型タイピング
5. ヒトパピローマウイルス感染症の診断基準
  - 5-1. 子宮頸癌
  - 5-2. 尖圭コンジローマ
6. 引用文献
7. 検査の相談窓口
8. 執筆者一覧

## 1. ヒトパピローマウイルス感染症の概説

### 1-1. 子宮頸癌

ほぼ全ての子宮頸癌はヒトパピローマウイルス (Human Papillomavirus : HPV) の感染によって引き起こされる。100 以上の HPV の遺伝子型のうち、生殖器粘膜に感染する 40 以上の型が知られており、そのうち子宮頸癌の発症に関わる高リスク型 HPV として少なくとも 15 の型が知られている (表 1)。なかでも HPV16 は全世界の子宮頸癌の約 50%から検出されている。

表 1 HPV 遺伝子型の分類

| 悪性度分類  | HPV 遺伝子型                                     |
|--------|--|
| 高リスク群  | 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73、82 |
| 中間リスク群 | 26、53、66                                     |
| 低リスク群  | 6、11、40、42、43、44、54、61、70、72、81、89           |

出典：日本性感染症学会誌「性感染症 診断・治療ガイドライン 2006」

HPV は性行為を介して感染する性感染症ウイルスで、生殖器の微小な傷から基底細胞に侵入して、潜伏感染を確立する。感染細胞が分化するとウイルス増殖が起こり、コイロサイトと呼ばれる HPV 感染に特徴的な異形細胞を生じる。このような細胞を含む増殖性病変を、子宮頸部上皮内腫瘍 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) と呼び、病変の進行度に応じて CIN1, 2, 3 とグレード分けされる。一方、CIN 病変が進行し、子宮頸部移行帯の細胞で感染が持続すると、HPV DNA が細胞 DNA に組み込まれることで、HPV の癌蛋白質である E6 と E7 の作用により異常に増殖する細胞が生まれる。このような細胞に、他の細胞遺伝子の変異が積み重なることで、感染から 10-15 年後に浸潤癌が発生すると考えられている。

近年、HPV に対する感染予防ワクチンが開発され、全世界で導入されている。HPV ワクチンには、二価ワクチンと四価ワクチンがあり、両者とも組換え DNA 技術を用いて HPV の L1 キャプシド蛋白質を発現させ、ウイルス様粒子 (virus-like particles: VLP) に再構成したものを抗原として用いている。VLP にはウイルス DNA は含まれていないので、ワクチン自体には感染性はない。またワクチンは感

染予防を目的とするもので、既感染者から HPV を排除する効果は認められない。二価ワクチンは製品名「サーバリックス」(グラクソ・スミスクライン社)で、HPV16/18 の感染を予防する。四価ワクチンは製品名「ガーダシル」(MSD 社)で、HPV6/11/16/18 の感染を予防する。両ワクチンとも性交渉開始前の女子を接種対象としており、高リスク型 HPV16/18 の感染を予防することで、将来の子宮頸癌の発生を防ぐことが期待されている。

## 1-2. 尖圭コンジローマ

尖圭コンジローマは、粘膜型 HPV のうちの低リスク型 HPV の感染により、性器周辺に生じる良性の疣贅(イボ)である。尖圭コンジローマから検出される低リスク型 HPV には、HPV6 や HPV11 など 12 の型が知られている(表 1)。

尖圭コンジローマの臨床的特徴として、乳頭状、鶏冠状、花キャベツ(カリフラワー)状等と形容される先の尖った乳頭状の腫瘤が集まったイボ状の小腫瘍が性器周辺部に多発する。男性では、亀頭、冠状溝、包皮、女性では、大小陰唇、膣前庭、膣、子宮頸部、また男女の肛門周囲や外尿道口に好発する。男性同性愛者や commercial sex worker (CSW) を中心に口腔内に病変がみられることもある。

妊婦が尖圭コンジローマに感染している場合、分娩時に産道で胎児が感染する可能性がある。潜伏期間は 3 週から 8 ヶ月(平均 2.8 ヶ月)と報告されており、感染機会の特定は困難であるとされている。

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。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はいまだ十分になされていない。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こともあり、尖圭コンジローマの病原体検索は極めて重要である。

四価ワクチン「ガーダシル」は HPV6/11 の感染を予防することで、尖圭コンジローマの予防が可能である。

## 2. ヒトパピローマウイルス感染症の検査に関する注意事項

臨床検体から HPV を分離できる細胞や、HPV に対する血清学的診断法がないため、HPV 感染を確定診断する唯一の方法は、検体中の HPV DNA の検出である。HPV

DNA の検出には研究領域では、PCR 法、サザンブロット法、ドットブロット法、in situ ハイブリダイゼーション法が用いられる。PCR法は感度・特異性が高く、最もよく用いられる。in situ ハイブリダイゼーション法は、組織中での HPV DNA の局在を知ることができるが、感度・特異性が低い欠点がある。また子宮頸部からの細胞採取では、HPV が潜伏する基底細胞を確実に採取することが出来ないため、HPV DNA が検出されなくても HPV 感染を完全には否定できないことを、留意する必要がある。

臨床現場での HPV DNA 検査のための体外診断用医薬品として、現在我が国で認可されている市販キットに、ハイブリッドキャプチャー法 (Digene) とアンプリコア法 (Roche) がある。ハイブリッドキャプチャー法は米国 FDA で承認を受け、世界の多くの国で使用されている。ただし、これらは 13 種類の高リスク型 HPV をまとめて検出するもので、個々の HPV 遺伝子型の判定 (HPV タイピング) は出来ない。

HPV タイピングには、PCR/シークエンシング法、PCR/制限酵素消化断片多型法、PCR/リバーブロットハイブリダイゼーション法 (PCR/RBH 法) などがあり、PCR/RBH 法を用いた市販キットとしてリニアアレイ法 (Roche) がある。PCR/RBH 法は HPV 複合感染を高感度に検出できるが、PCR/シークエンシング法と PCR/制限酵素消化断片多型法は複合感染の判定が難しい。

これらの HPV DNA 検査・タイピングは、厳密な実験室設備と試薬管理を必要とするため、地方衛生研究所での一般的な診断法としては使用されていない。通常は臨床検査会社が受託する形で実施されている。我が国では ASC-US を対象にした高リスク型 HPV をまとめて診断する HPV DNA 検査が、平成 22 年度の診療報酬改定において保険収載されたが、その実施は施設基準を満たした医療機関に限られる。また、クリニチップ HPV 法 (積水メディカル) はハイブリッドキャプチャー法と同じ 13 種類の高リスク型 HPV を同定する HPV タイピングであり、平成 23 年 5 月から CIN1/2 に限定して保険適用となっている。

### 3. 検査材料の採取・輸送

通常、CIN や子宮頸癌組織の子宮頸部擦過細胞を HPV 検査に用いる。プラスチック製のブラシ (Cervex Blush Combi 等) を用いて、子宮頸部および頸管部の細胞を採取し、固定液中に懸濁させる。固定液としては液状細胞診に用いられ

る Thinprep、SurePath などが適当である。採取した細胞懸濁液は室温で二週間安定であり、常温輸送が可能である。なお細胞採取に綿棒を用いる場合は、これらの固定液は細胞回収には不適當であり、通常の PBS 等に細胞を懸濁させる。また病理診断が確定したホルマリン固定パラフィン切片も、HPV 検査に用いることが可能である。その場合、検体間のコンタミネーションを防ぐために、切片の切り出し用のブレードは検体間で取り替える必要がある。

## 4. 検査マニュアル

### 4-1. 細胞検体からの DNA 抽出

細胞懸濁液 (10 mL) のうちの 200  $\mu$ L から、QIAamp DNA Blood Mini Kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出する (溶出液 100  $\mu$ L を使用)。またホルマリン固定パラフィン切片の場合は、2-3 枚の切片から QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (キアゲン) を用いて DNA を抽出する (溶出液 50  $\mu$ L を使用)。

### 4-2. PGMY-PCR 法による HPV DNA の増幅

- ①. PGMY プライマーと AmpliTaq Gold DNA polymerase (アプライドバイオシステムズ) を用いて、HPV ゲノム内で比較的保存された L1 領域を PCR 増幅する。(PGMY11 及び 09 はそれぞれ 5 及び 13 個のプライマーの混合物を示す。)

(反応液の組成)

| Reagent           | Stock        | Final            | Volume        |
|-------------------|--------------|------------------|---------------|
| PCR II buffer     | 10 x         | 1 x              | 5 $\mu$ L     |
| MgCl <sub>2</sub> | 25 mM        | 3 mM             | 6 $\mu$ L     |
| dNTP              | 2 mM         | 0.2 mM           | 5 $\mu$ L     |
| PGMY11            | 1 $\mu$ M    | 80 nM            | 4 $\mu$ L     |
| PGMY09            | 1 $\mu$ M    | 80 nM            | 4 $\mu$ L     |
| HLAdQ-F           | 1 $\mu$ M    | 20 nM            | 1 $\mu$ L     |
| HLAdQ-R           | 1 $\mu$ M    | 20 nM            | 1 $\mu$ L     |
| AmpliTaq Gold     | 5 U/ $\mu$ L | 0.025 U/ $\mu$ L | 0.25 $\mu$ L  |
| dH <sub>2</sub> O |              |                  | 18.75 $\mu$ L |

|     |  |       |            |
|-----|--|-------|------------|
| DNA |  |       | 5 $\mu$ L  |
|     |  | Total | 50 $\mu$ L |

| PGMY 及び HLA プライマー配列         |                      |
|-----------------------------|----------------------|
| <b>Biotin at the 5' end</b> |                      |
| Name                        | Sequence [5' to 3']  |
| PGMY11-A                    | GCACAGGGACATAACAATGG |
| PGMY11-B                    | GCGCAGGGCCACAATAATGG |
| PGMY11-C                    | GCACAGGGACATAATAATGG |
| PGMY11-D                    | GCCCAGGGCCACAACAATGG |
| PGMY11-E                    | GCTCAGGGTTTAAACAATGG |
| HLAdQ-F                     | GTGGTGTAACCTTGTACCA  |
| <b>Unlabeled primers</b>    |                      |
| Name                        | Sequence [5' to 3']  |
| PGMY09-F                    | CGTCCCAAAGGAAACTGATC |
| PGMY09-G                    | CGACCTAAAGGAAACTGATC |
| PGMY09-H                    | CGTCCAAAAGGAAACTGATC |
| PGMY09-I                    | GCCAAGGGGAAACTGATC   |
| PGMY09-J                    | CGTCCCAAAGGATACTGATC |
| PGMY09-K                    | CGTCCAAGGGGATACTGATC |
| PGMY09-L                    | CGACCTAAAGGGAATTGATC |
| PGMY09-M                    | CGACCTAGTGGAAATTGATC |
| PGMY09-N                    | CGACCAAGGGGATATTGATC |
| PGMY09-P                    | GCCCAACGGAAACTGATC   |
| PGMY09-Q                    | CGACCCAAGGGAAACTGGTC |
| PGMY09-R                    | CGTCCTAAAGGAAACTGGTC |
| HMB01                       | GCGACCCAATGCAAATTGGT |
| HLAdQ-R                     | GGTAGCAGCGGTAGAGTT   |

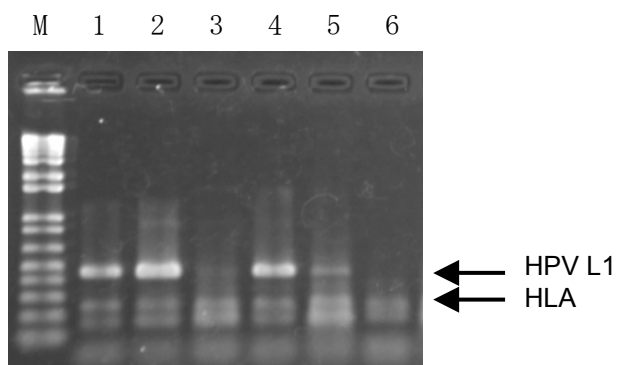
(PCR 反応条件)

95°C, 9 min

(95°C, 30 sec; 55°C, 1 min 30 sec; 72°C, 2 min) x 45 cycles

72°C, 5 min

- ②. 反応終了後、10  $\mu$ L の反応液に 1  $\mu$ L の 10x loading Dye (タカラ) を加え、1.5%アガロースゲル電気泳動により解析する。
- ③. HPV 陽性検体では約 450 bp の増幅産物が検出される。細胞 DNA の増幅産物として約 230 bp の HLA DNA が検出される。下図では検体 1, 2, 4, 5 が HPV 陽性である。



4-3. HPV DNA のシーケンス解析

- ①. Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (プロメガ) を用いて、HPV 増幅産物 (残りの 40  $\mu$ L) を精製する (溶出液 35  $\mu$ L を使用)。
- ②. PGMY11 プライマー (5 個のプライマーの混合物) を用いてシーケンス反応を行う。なおシーケンス解析では、ビオチン化されていない PGMY11 プライマーを用いることも可能である。

(反応液の組成)

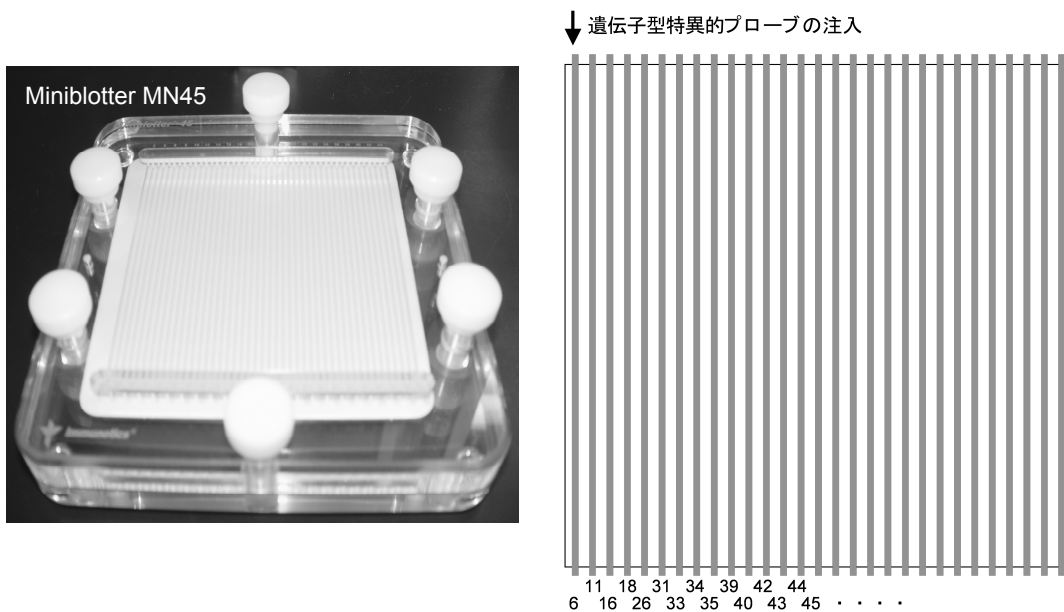
| Reagent       | Stock     | Final | Volume     |
|---------------|-----------|-------|------------|
| PCR product   |           |       | 12 $\mu$ L |
| PGMY11 primer | 2 $\mu$ M |       | 2 $\mu$ L  |
| BigDye v3.1   |           |       | 4 $\mu$ L  |
| 5 x buffer    |           |       | 2 $\mu$ L  |
|               |           | Total | 20 $\mu$ L |



- ③. DNA シークエンサー (ABI3730x1 等) にて配列を解析する。
- ④. 得られた塩基配列を NCBI Blast 検索にかけて、HPV 遺伝子型を決定する。

#### 4-4. リバースブロットティング法による遺伝子型タイピング

本タイピング法は、世界保健機関 (WHO) が構築したHPVラボラトリーネットワークのヨーロッパ拠点ラボで開発され、十分な感度と特異性を持つことが示された推奨方法であり、その手順の詳細はHuman papillomavirus laboratory manual (First edition, 2009) を参照のこと。



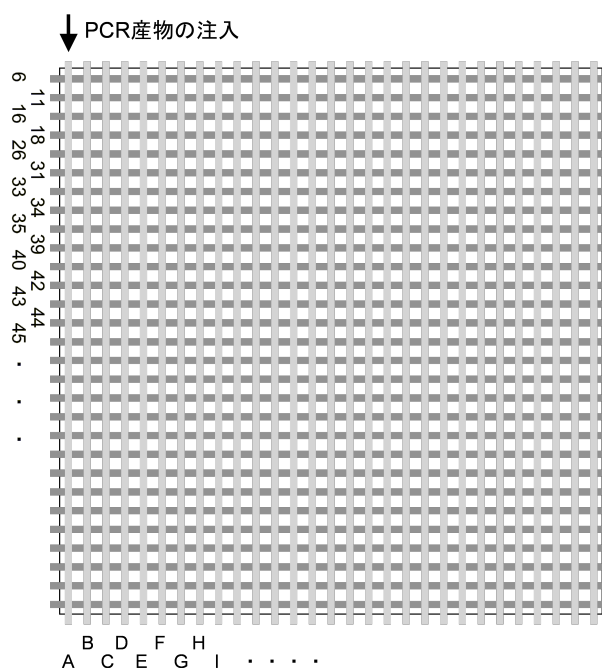
- ①. 前処理したナイロン膜 (Biodyne C: Pall corporation) をミニブロッター (Miniblotter MN45: Immunetics) にセットし、HPV遺伝子型特異的プローブ、及び、HLAプローブを各ラインに注入、固定化する。各プローブは線状に固定化される。プローブを固定化したナイロン膜は、20-30回は再利用可能である。

| HPV 及び HLA プローブ配列      |                     |
|------------------------|---------------------|
| Amine C6 at the 5' end |                     |
| Name                   | Sequence [5' to 3'] |
|                        |                     |

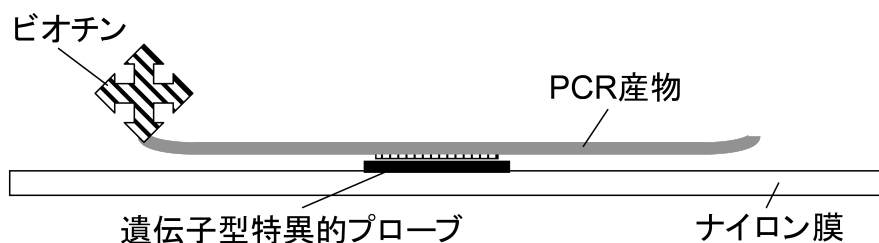
|            |                         |
|------------|-------------------------|
| HPV06_RHP  | TGGAAGATGTAGTTACGGATG   |
| HPV11_RHP  | GCAGATTTAGACACAGATGCA   |
| HPV16_RHP  | GATATGGCAGCACATAATGAC   |
| HPV18_RHP  | CCAGGTACAGGAGACTGTGTA   |
| HPV26_RHP  | TACGCTGACAGGTAGTAGCAG   |
| HPV31_RHP  | AGTATCACTGTTTGCAATTGC   |
| HPV33_RHP  | TGTCACTAGTTACTTGTGTGC   |
| HPV34_RHP  | GCAGTTGTACTTGTGGATTGT   |
| HPV35_RHP  | AGAAGACACAGCAGAACACAC   |
| HPV39_RHP  | GTAGAAGGTATGGAAGACTCT   |
| HPV40_RHP  | ATAGCCTTGTTGGTAAGGAAC   |
| HPV42_RHP  | TGTATCACCAGATGTTGCAGT   |
| HPV43_RHP  | ACAGTAGGGTCAGTAGAGGCA   |
| HPV44_RHP  | TAGTATATGTAGACGGAGGGG   |
| HPV45_RHP  | GTACTIONGGCACAGGATTTTGT |
| HPV51_RHP  | TTACTTGGAGTAAATGTTGGG   |
| HPV52_RHP  | CTTCCTTTAGGTGGTGTGTT    |
| HPV53_RHP  | AGACATAGACTGTGTGGTTGC   |
| HPV54_RHP  | TTATTAAAGCTATCCTGCGTG   |
| HPV55_RHP  | GATGGAGACTGAGTTGTAGCA   |
| HPV56_RHP  | TTTCGTGCATCATATTTACTT   |
| HPV57a_RHP | TACAGTGGCACACAAAGAGAC   |
| HPV57b_RHP | TTCTGTGTTTACAGTGGCACA   |
| HPV58_RHP  | CTTCCTTAGTTACTTCAGTGC   |
| HPV59a_RHP | AGTAGAGCACACACAGAAAGA   |
| HPV59b_RHP | AGTAGAAGCACACACAGAAAG   |
| HPV66_RHP  | AGTTAATGTGCTTTTAGCTGC   |
| HPV68_RHP  | CTGATTGCAGATAGCGGTATG   |
| HPV69_RHP  | GTTTAAAAGTGGCAGATGCAG   |
| HPV70_RHP  | CTATATACAGCAGGTATGGCC   |
| HPV 82_RHP | TGCAACAGATTGAGTAACAGC   |
| HPV 83_RHP | AGAGGCTGTGTATTCATTAGC   |

|            |                       |
|------------|-----------------------|
| HPV 84_RHP | ATTCTGATTCGGTGTGGTAG  |
| HPV 73_RHP | GGCATACGTTGTAGTAGAGCT |
| HLADQ_RHP  | CTCRTCTCCATCAAATTCATG |

②. ナイロン膜を 90° 回転させ、再びミニブロッターにセットする。4-2 で得られた PCR 増幅産物 (5-15  $\mu$ L) を熱変性後、各チャンネルに注入する。



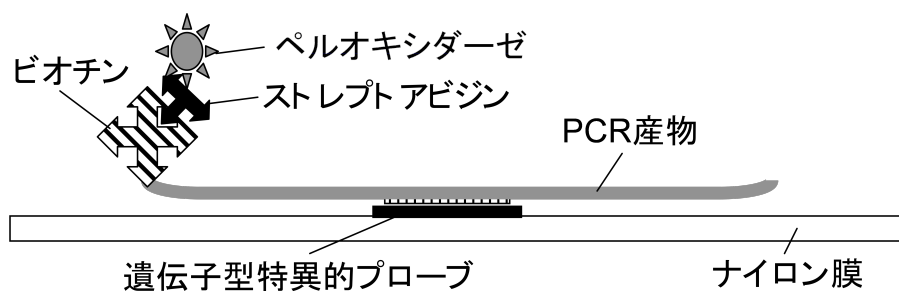
③. ミニブロッターごと 50 °C で 1.5 時間インキュベートし、ハイブリダーゼーションを行う。なお PGMY11 プライマーの 5' 末端がビオチン化されているため、PCR 産物はビオチンで標識されている。



④. ミニブロッターからナイロン膜を取り外し、洗浄バッファー (2 X SSPE、

0.5% SDS) で 50°C、10 min、2 回洗浄する。

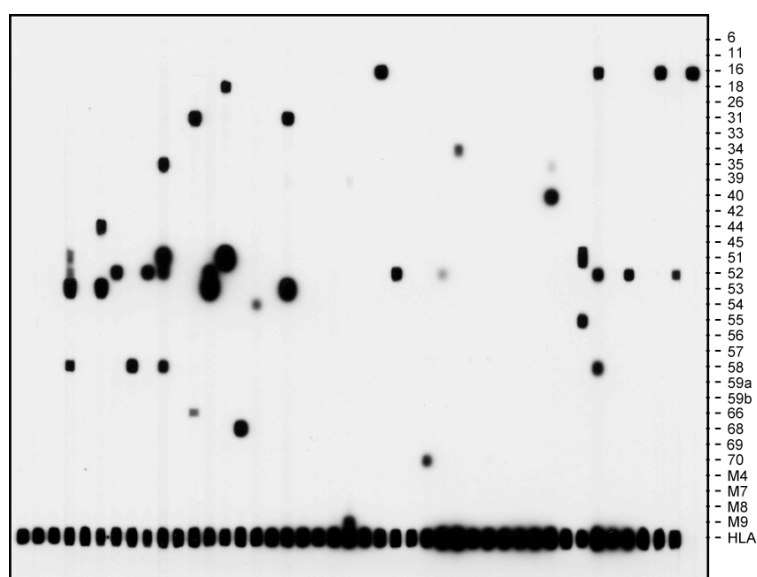
⑤. ハイブリッドバッグ内で、洗浄バッファーで希釈したストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ (GE ヘルスケア) と 42°C、45 min インキュベートし、ナイロン膜上のビオチンとストレプトアビジン-ペルオキシダーゼの複合体を形成させる。



⑤. 洗浄バッファー (2 X SSPE、0.5% SDS) で 42°C、10 min、2 回洗浄する。

⑥. 2 X SSPE で、室温、5 min、2 回洗浄する。

⑦. ナイロン膜上のペルオキシダーゼを、核酸用ECL検出システム (GEヘルスケア) を用いて、X線フィルムまたは、CCDカメラ検出器 (アトー、Light-Capture AE-6972等) で検出し、各サンプルのHPV遺伝子型を判定する。



## 5. ヒトパピローマウイルス感染症の診断基準

### 5-1. 子宮頸癌

子宮頸癌検診では、子宮頸部から採取された擦過細胞中の、異常な細胞の有無を検査する。子宮頸部の移行帯を含む領域から採取した細胞を、スライドグラス上に塗抹・固定し、顕微鏡観察を行う。2005年に子宮頸癌検診の対象年齢が30歳以上から20歳以上に引き下げられ、厚生労働省では子宮頸癌の早期発見のために2年に一度の検診を推奨している。一方、近年米国・英国では塗抹細胞診に代わり、プラスチック製のはけを用いて子宮腔部と頸管部の細胞を一括して採取し、固定液中に回収した後、装置を用いて均一で単層の細胞標本を作製する液状処理細胞診が取り入れられている。細胞診で異常細胞が認められた場合、コルポスコープ（腔部拡大鏡）を用いた精密検査が行われる。コルポスコープで子宮頸部粘膜表面を拡大して、病変部位を細かく観察する。また疑わしい部位から組織を採取し、組織標本を作成して病理観察を行い、病変部位の病理診断を下す。

### 5-2. 尖圭コンジローマ

特徴的な臨床症状のため、尖圭コンジローマの診断は視診により行われているが、HPV感染を確定する方法として、検体中のHPV DNAの検出が挙げられる。患部の生検材料や病変部の擦過物が検体として用いられるが、子宮頸癌など子宮頸部の感染が疑われる場合には、子宮頸部の擦過物や帯下検体（子宮内分泌物）からの検出も可能である。

尖圭コンジローマの治療には、外科的治療法と薬物療法があり、外科的治療には、局所麻酔後の単純切除、炭酸ガスレーザー蒸散、高周波電気メスによる焼灼や液体窒素凍結療法がある。また、薬物療法としては、平成19年12月に保険適用の治療薬（ベセルナクリーム）が発売されている。

## 6. 引用文献

Unger, E. R., Dillner, J. & Zhou, T. (2009) HUMAN PAPILLOMAVIRUS LABORATORY MANUAL, 1st edition. WHO.

[http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO\\_IVB\\_10.12\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_IVB_10.12_eng.pdf)

## 7. 検査の相談窓口

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

室長 柊元 巖

E-mail: [ikuki@nih.go.jp](mailto:ikuki@nih.go.jp)

## 8. 執筆者一覧

国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター

室長 柊元 巖

主任研究官 森 清一郎

東京都健康安全研究センター 微生物部 ウイルス研究科

主任研究員 長島 真美