

原 著

当院における ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) 症例からの HPV (Human papillomavirus) type の検出状況 —子宮頸部癌予防への HPV タイピングの必要性について—

長岡中央総合病院、病理部；臨床検査技師¹⁾、病理医²⁾

大瀧 直也¹⁾、長谷川秀浩¹⁾、戸田 誠二¹⁾、片桐 丘充¹⁾、小杉 久良¹⁾、
大橋 珠紀¹⁾、竹日 健太¹⁾、石澤 重一¹⁾、五十嵐俊彦²⁾

目的：子宮頸部細胞診検査で ASC-US と判定された症例から PCR-RFLP 法 (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) によるタイピングで検出された HPV type の状況についてまとめたので報告する。

方法：2011年1月から2012年12月に当院にて子宮頸部細胞診検査を行なった7555件のうち ASC-US と判定された125症例を対象とし、PCR法により HPV-DNA の存在を確認し、その後 PCR-RFLP 法にてタイピングを行なった。

結果：ASC-US125症例のうち HPV 陽性は62例、HPV 陰性は63例であった。そのうち high risk group が検出されたのは52件であった。type 別にみると type58が19例、type16が16例、type18が10例、type31が6例、type52が5例、type39が3例、type33が2例、type35が2例、type56が1例であった。年代別の HPV 検出率は、10代が75%、20代では76%、30代では50%、40代では60%、50代では22%、60代では58%、70代では43%であった。また、年代別の high risk group の検出率は、10代では50%、20代では61%、30代では32%、40代では44%、50代では11%、60代では42%、70代では43%であった。

結論：ASC-US125症例の約半数が HPV 陽性であり、そのうち high risk group が42%を占めた。HPV 検出率、high risk group 検出率共に若い世代では高く、20代をピークとし50代以上からは低くなっていった。また、type 別の検出率では type 58が15%と一番多く、次に type16が13%、type 18が8%と続いた。HPV ワクチンの対象とされている type16, 18は合わせても20%程度であった。HPV の分布には地域偏在性があり、現行の2価および4価の HPV 予防ワクチンでは子宮頸癌全体の20~70%しか予防できないことが確認できた。子宮頸癌の予防には従来の子宮頸部細胞診検査および子宮頸がん検診の重要性は変わらず、HPV 検査および HPV タイピングにより的確な follow up が望めると共に今後、予防ワクチンの効果を確認するためにも HPV

タイピングの必要性は高くなると考える。

キーワード：子宮頸部細胞診検査、ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance)、HPV (Human papillomavirus) タイピング、PCR-RFLP 法 (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism)、HPV 予防ワクチン

結 言

ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus: HPV) は尖形コンジローマや子宮頸部前癌病変とされる子宮頸部上皮内腫瘍 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) および子宮頸癌の発生に深く関与している DNA ウイルスである。HPV は現在100種類以上が知られているが¹⁾、尖形コンジローマなどの良性病変から検出される Low risk group (主に type6, 11) と癌と関連する high risk group (主に type16, 18, 31, 33, 35, 39, 52, 58) に分類されている^{2), 3)}。

子宮頸部細胞診の判定方法であるベセスダシステム2001では子宮頸部病変を HPV 感染による一連の変化と捉え、病変の進行により軽度扁平上皮内病変 (low-grade squamous intraepithelial Lesion: LSIL) と高度扁平上皮内病変 (high-grade squamous intraepithelial Lesion: HSIL) に分類される。LSIL は HPV による細胞変化と CIN1 が相当し、HSIL には CIN2 及び CIN3 が相当する⁴⁾。また、ベセスダシステム2001には SIL のグレーゾーンともいえる異型扁平上皮細胞 (atypical squamous cell: ASC) が設けられており、ASC-US (undetermined significance, LSIL を否定できない) と ASC-H (HSIL を否定できない) に分けられる。子宮頸部細胞診検査単独で ASC-US と判定された場合、HPV 検査もしくは細胞診やコルポスコピー検査による6ヶ月ごとの追跡とされている⁵⁾。

今回、我々は子宮頸部細胞診検査で ASC-US と判定され、その後 HPV 検査の依頼があった症例を PCR 法にて HPV-DNA の存在を確認し、その後 PCR-RFLP

法によりタイピングされた HPV type の検出状況についてまとめたので報告する。

症例および方法

1: 症例

2011年1月から2012年12月に当院を受診し子宮頸部細胞診検査(Liquid based cytology: LBC法による)を行った7555件のうち ASC-US と判定され、臨床より HPV 検査の依頼があった125症例を対象とした。

2: DNA 抽出

子宮頸部細胞診検査に使用した検体採取バイアル(BD シュアパスバイアル)内の残液1mlを1.5ml用サンプルチューブに採取し、遠心分離(12000rpm, 10min)。得られた沈査を10mM PBSで洗浄し遠心分離(12000rpm, 10min)する。上清を捨て得られた沈査に10mg/ml proteaseK 100 μ lと10%SDS 10 μ lを加え56 $^{\circ}$ C 2時間にて蛋白分解を行った後フェノール・クロロホルム法でDNAを抽出した。

3: プライマー

HPVのDNA増幅に用いたプライマーおよびPCR法による増幅条件、PCR-RFLP法による HPV タイピングについては長谷川等^{6), 8)}のバラフィン包埋組織から HPV 解析行った方法に準じた。

sense pU-1M:5'-TGT CAA A AA CCG TTG TGT CC-3'

pU-1M-L:5'-TGT CAA AAA CCG TTG TGT CCA GAA GAA AA-3'

anti-sense pU-2R:5'-GAG CTG TCG CTT AAT TGC TC-3'

pU2R-N:5'-TCT GAG TCG CTT AAT TGC TC-3'

これらのプライマーにより増幅される HPV-DNA は HPV の DNA シーケンスから231bp-271bp の DNA のフラグメントである。なお、本プライマーにより増幅される HPV は type16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58であり、子宮頸癌との関連性が低いとされている type6, 11など low risk group に属する HPV をはじめ、他のウイルスやヒト DNA とのホモロジーについては否定されている。

4: PCR 法

PCR 反応液は21 μ l (d-DW: 14 μ l, 10 \times PCR buffer with 15mM MgCl₂: 2 μ l, 2mM dNTP: 2 μ l, 25pM pU-1M: 0.5 μ l, 25pM pU-1M-L: 0.5 μ l, 25pM pU-2R: 0.5 μ l, 25pM pU-2R-N: 0.5 μ l, 1U Ampli Taq Gold, DNA サンプル 1 μ l) に調整し、PCR のサーマルプログラムは95 $^{\circ}$ C 10分の hot start を行った後、① denature94 $^{\circ}$ C 1分、② annealing55 $^{\circ}$ C 2分、③ extension72 $^{\circ}$ C 2分を40サイクル行った後 Last extension として72 $^{\circ}$ C 10分伸張させる。

5: 制限酵素断片長多型 (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism: PCR-RFLP) 法による解析

PCR法での結果から、子宮頸癌関連 HPV-DNA の存在が確認された症例については、HPV 各タイプの DNA の配列からそれぞれのタイプについて特徴的であると判断される配列を制限酵素により切断し、その電気泳動パターンによりタイピングを行っ

た。使用した制限酵素と切断された結果、確認されるフラグメントの長さについては表.1に示す。また、制限酵素処理の反応液の組成は増幅 HPV-DNA 6 μ lについて10 \times M Universal buffer2 μ l, Enzyme1 μ l, d-H₂O 11 μ lを加え、37 $^{\circ}$ C 2時間反応させる。

結 果

ASC-US と判定された125症例のうち HPV 陽性は62例 (49.6%)、HPV 陰性は63例 (50.4%)であった(図1)。HPV 陽性例のうち high risk group が検出されたのは52例であり、ASC-US125症例の42% (52/125)であった。また、検討した症例の中には異なる type による多重感染症例が19例あり、HPV 陽性例の31%を占めるものであった。尚、多重感染症例の感染状況は、異なる2種類の type が検出された症例が13例、3種類の type が検出された症例が5例、4種類の type が検出された症例が1例であった。HPV 陽性症例62例から検出された HPV の総数は high risk group に属するものは64例、low risk group に属するものが23例であった。

type 別にみると high risk group では type16が16例 (13%)、type18が10例 (8%)、type31が6例 (5%)、type33が2例 (2%)、type35が2例 (2%)、type39が3例 (2%)、type52が5例 (4%)、type56が1例 (1%)、type58が19例 (15%)であり、low risk group は23例 (18%)であった(図2)。

年代別の HPV 検出率は、10代が75% (3/4)、20代では76% (39/51)、30代では50% (17/34)、40代では60% (15/25)、50代では22% (4/18)、60代では58% (7/12)、70代では43% (3/7)であった(図3)。また、年代別の high risk group の検出率は、10代では50% (2/4)、20代では61% (31/51)、30代では32% (11/34)、40代では44% (11/25)、50代では11% (2/18)、60代では42% (5/12)、70代では43% (3/7)であった(表1)。

考 察

HPV は子宮頸癌の95%以上からウイルス遺伝子が検出され、子宮頸癌のリスク因子である事が知られながらも子宮頸癌の診断には細胞診、コルポスコピー診、組織診の段階を経て確定されており、いずれも形態学的変化を以って現状の状況を確認しているにすぎない。細胞診では日母分類に変わりベセスダシステム2001が導入されたが、通常のスクリーニングにおいては HPV の感染を完全には補足し得なかったが、米国 FDA が2004年に子宮頸癌検診に細胞診とともに HPV 検査を併せて行うことを承認したのをきっかけとして、本邦においても分子生物学的検出法の導入が望まれ広がりをみせはじめています。

今回、ASC-US125症例の約半数が HPV 陽性であり、そのうちの42%に high risk group の感染がみられた。逆にいえば ASC-US の約60%は陰性化したと考える事ができその結果は、ASC-US の60~70%は自然消失する⁷⁾との報告に一致する。ASC-US と判定する場合、LSIL を疑うが異型細胞が少ない、異型に乏しい、背景に非腫瘍性病変や炎症・変性による細胞変化、乾燥による核腫大、その他の人工的要因を伴う場

合が多い。旧判定方法である日母分類ではこのような場合 Class II と判定される事が多いと思われる。また細胞学的分類ではなく ASC-US における high risk group の陽性率と当施設にて検討した病変別の high risk group の陽性率⁸⁾についても比較したところ、CIN1~CIN3では陽性率が60~80%であるのに対し、ASC-USでは40%程度と低く、high risk group の陽性率の比較からも ASC-US という判定には CIN 以外にも腫瘍に無関係な変化が含まれていることを示唆するものであった。細胞診のみで陰性か SIL かを分類することは完全には不可能である事からあえて不確定、グレーゾーンの判定であるが、ASC-US という判定を用いることによって HPV 検査という選択肢をつくり、その結果により的確な follow up が望めるようになると思われるならば極めて有効な判定方法であると思われる。

当院における HPV 検査の結果については、HPV 検出率、high risk group 検出率共に若い世代では高く、20代をピークとし50代以上からは低くなっていった。また、low risk group の検出率についても同様の結果であり、70代では検出されなかった。HPV 陽性例における type 別の検出率では type 58が15%と一番多く、次に type 16が13%、type 18が8%と続いた。HPV ワクチンの対象とされている type16, 18については20%程度の予防効果しか望めないと判断せざるを得ない結果であった。当施設では以前、Class III a 以上と判定され病理検査に提出された生検材料での HPV を調査したが、結果は一番多く検出されたのは type 31であったが、次いで type 58も多く検出されており実際、type 16, 18については合わせても30%程度の検出結果であった⁸⁾。また、同様に子宮頸部扁平上皮癌294例を southern blot 法で調べたところ type 16, 18は32%に過ぎなかったとも報告されている⁹⁾。これは、日本では正常から子宮頸癌に至るいずれの病変においても type 16に次いで多く検出されるのは type 52, 58と報告されており、type 52, 58が多い傾向は東アジア地域に共通しており HPV の分布には地域偏在性があるとの報告と一致する結果が得られた。また、アジアだけ他の地域に比べ type 16, 18が少ないとの報告もある¹⁰⁾。

今回の結果では type 16, 18は20%程度であったが、本邦においては type 16, 18を原因とする子宮頸癌は32~70%^{11), 12)}と報告にばらつきがみられ日本国内においても地域偏在性が示唆された。今回の検討結果も含め我々が行った結果⁸⁾から現行の2価および4価の HPV 予防ワクチンでは予防できる子宮頸癌は期待される程の効果は望めないとした山川等¹¹⁾の報告に概ね一致するものであった。2009年から日本でも HPV 予防ワクチンの接種が始まったが、今後も子宮頸癌を予防するためには、従来の子宮頸部細胞診検査、HPV 検査および子宮頸がん検診の重要性は変わらないと考える。また感染している type により子宮頸癌が発症するリスクが異なるとされており、type 16が検出された場合には、HPV が検出されない場合の434倍、type 18が検出された場合は248倍とされている¹³⁾。このように type によりリスクが異なるとされている事から感染している HPV の type にあった的確な follow up 行っていくために HPV タイピングは重要であり、また今後の HPV ワクチンの予防効果を確認するためにもその必要性が高くなると考える。

文 献

1. 井上正樹. 産婦治療 2006; 92. 848-851.
2. 井上正樹. HPV 感染と子宮頸がん-子宮頸がん検診に HPV-DNA 検査の導入. 産婦治療 2006; 93. 628-632.
3. 小西郁生, 塩原茂樹. 頸癌の自然史と再発予知における HPV typing の意義. 産婦産 2000; 54. 748-75.
4. 植田正嗣, 田路英作, 野田定. 子宮頸癌の発生・進展と HPV 感染. 臨床検査 2007; 51. 811-812.
5. 「子宮がん検診と HPV」に関する検討委員会 (編集・執筆). 子宮頸がん検診とヒトパピローマウイルス Questions & Answers 集. 東京: 日本臨床細胞診断学推進協会; 2009; 15-16頁.
6. 長谷川秀浩, 五十嵐俊彦. PCR-RFLP 法による子宮頸癌関連 HPV の同定. 厚生連医誌 2004; 13. 25-29.
7. Sellors J. Natural History of HPV, AOGIN (AOGIN, Asian Oceania research organization on Genital Infections & Neoplasia) 2nd Biennial Conference, September 8-10, 2006, Philippine. Home-page <http://www.aogin.com/pages.../SELLORS-HPV-Natural-History.pdf>
8. 長谷川秀浩. 子宮頸部病変からの HPV-DNA の検出と型別同定. 平成21年度東北臨床検査技師会・(社)新潟県臨床検査技師会合同生物化学分析部内遺伝子分野研修会; 2009.
9. Matsukura T, Sugase M. Human papillomavirus genomes in spumavirus cell carcinomas of the uterine cervix Virology 2004; 324. 439-449.
10. Clifford GM et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide. a meta-analysis. Br J Cancer. 2003; 88. 63-73.
11. 山川洋光, 今野良, 鈴木光明. HPV 感染の関与する子宮頸部の臨床と疫学. 臨床検査 2007; 51. 823-829.
12. Miura S et al. Do we need a different strategy for HPV screening and vaccination in East Asia? Int J Cancer 2006; 119. 2713-2715.
13. Bosch FX et al. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. J Natl Cancer Inst Monogr. 2003; 31. 3-13.

英 文 抄 録

Original article

Analysis of HPV (Human papillomavirus) subtypes from ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) cases in our hospital -to disclose the need of the HPV subtyping to prevent cervical carcinoma-

Nagaoka Central General Hospital, Department of pathology; Laboratory technologist¹⁾, Pathologist²⁾

Naoya Ohtaki¹⁾, Hidehiro Hasegawa¹⁾, Seiji Toda¹⁾, Takamitsu Katagiri¹⁾, Hisayoshi Kosugi¹⁾, Tamaki Ohhashi¹⁾, Kenta Takehi¹⁾, Shigekazu Ishizawa¹⁾, Toshihiko Ikarashi²⁾

当院における ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance) 症例からの HPV (Human papillomavirus) type の検出状況
—子宮頸部癌予防への HPV タイピングの必要性について—

Purpose : The significance of HPV subtyping analysis for ASC-US in cytology was under consideration. We examined HPV-positivity and subtyping by the PCR - RFLP method from ASC-US specimens and reported.

Study design: We intended for 125 cases judged to be ASC-US among 7,555 cases that received an uterine cervical cytological examination in our hospital in December, 2012 from January, 2011. These cases were confirmed their presence of the HPV-DNA by PCR, and typed by the PCR - RFLP method subsequently.

Results : Among ASC-US 125 cases, 62 cases were positive HPV and 52 cases showed high risk group of HPV. The distribution of HPV subtypes was as follows : type 58, 19 cases ; type 16, 16 cases ; type 18, 10 cases ; type 31, 6 cases ; type 52, 5 cases ; type 39, 3 cases ; type 33, 2 cases ; type 35, 2 cases ; type 56, 1 case. The generation detection rate of HPV was as follows : the teens, 75% ; the 20s, 76, the 30s, 50% ; the 40s, 60% ; the 50s, 22% ; the 60s, 58% ; the 70s, 43%. Also, the rate of detection of high risk group according to the generation was as follows : the teens, 50% ; the 20s, 61% ; the 30s, 32% ; the 40s, 44% ; the 50s, 11% ; the 60s,

42% ; the 70s, 43%.

Conclusions : HPV was positive in about half of the ASC-US 125 cases, and high risk group of HPV accounted for 42%. HPV positive rate was higher in younger generations and lowered from the fifties. HPV type 58 was the highest subtype at the rate of detection (15%), and followed type 16 (13%) and type 18 (8%). Both type 16 and 18 targeted for the HPV vaccine were 20% in the detection rate. Distribution of the HPV subtypes was regarded as the regional difference, which prevented only 20 or 70% of the whole cervical cancer by these current values and the tetravalent HPV prevention vaccine. It is still important to perform the conventional cervical cytology with HPV typing to prevent cervical cancer, and HPV subtyping analysis was expected to analyze the efficiency of HPV vaccine.

Key words : uterine cervical cytological examination, ASC-US (atypical squamous cells of undetermined significance), HPV typing (Human papillomavirus typing), PCR - RFLP method (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method), HPV prevention vaccine

表. 1 制限酵素により切断される HPV-DNA のフラグメントの長さ

HPV	増幅全鎖長	制限酵素			
		Afa I + Vpa k II B I	Bgl II	Acc I	BmeT110 I
16	238	157/81	—	—	—
18	268	172/96	—	—	—
31	233	119/114	—	—	—
33	244	136/108	—	—	—
35	232	—	—	—	177/55
39	271	104/100/51/16	—	—	—
45	271	100/93/78	—	—	—
51	246	110/85/51	—	—	—
52	231	—	176/55	—	—
56	250	86/84/80	—	—	—
58	244	—	—	126/118	—

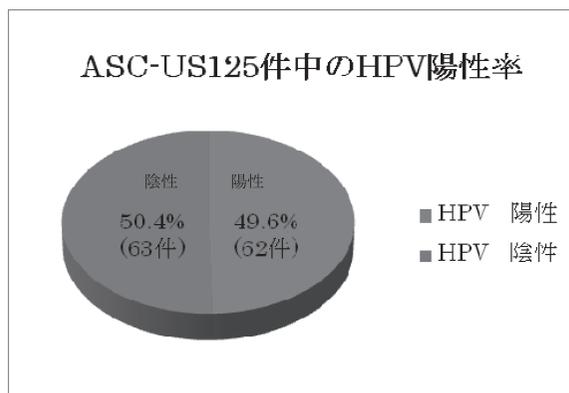


図. 1 ASC-US125件中の HPV 陽性率

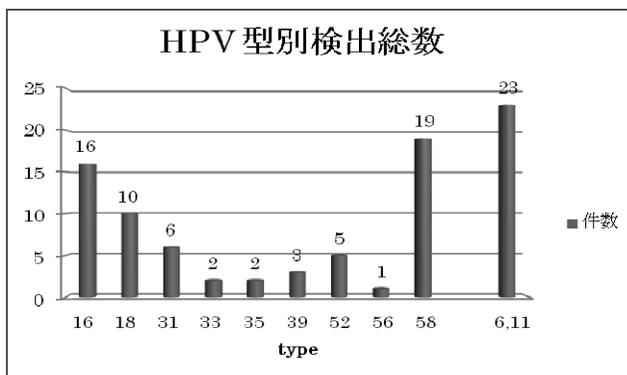


図. 2 HPV type 別の検出件数

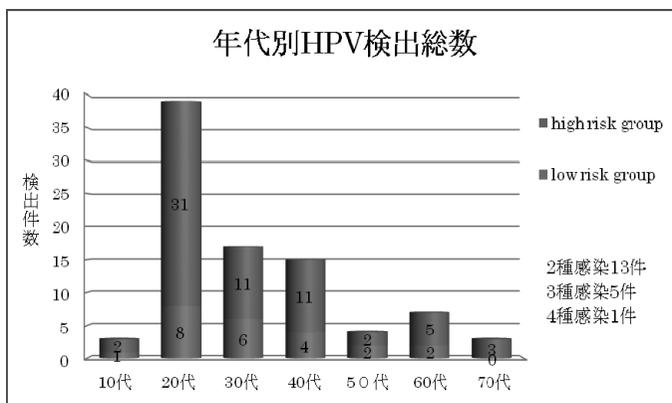


図. 3 年代別の HPV 検出総数

表. 2 年代別の high risk group の検出率

年齢	10代	20代	30代	40代	50代	60代	70代
陽性/症例数	2/4	31/51	11/34	11/25	2/18	5/12	3/7
陽性率	50%	61%	32%	44%	11%	42%	43%

(2013/02/11受付)