

陳 玲瀚 論文（テーシス）内容の要旨

主 論 文 (テーシス)

ヒトパピローマウイルス（HPV）遺伝子型簡易同定 の方法の開発と正常日本人女性における HPV 遺伝 子型感染の分布

陳 玲瀚

Chen L., Watanabe K., Haruyama T., Kobayashi N. Simple and rapid human papillomavirus genotyping method by restriction fragment length polymorphism analysis with two restriction enzymes. *J. Med. Virol.*, 85 (7), 1229-1234 (2013)

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：小林 信之 教授)

[諸 言]

ヒトパピローマウイルス（HPV）はパピローマウイルス科に属する、エンベロープを持たない小型の二本鎖 DNA ウイルスである。これまでに 100 種類以上の遺伝子型が見つかり、がん発症率との相関からさらに high-risk (HR) 型と low-risk (LR) 型に分類されている。HR 型 HPV の持続的な感染は、全世界の女性のがんの中で発症率第 3 位である子宮頸がんの主な原因である。子宮頸がんは、早期発見により防ぐことが可能ながんの 1 つであり、定期的な検査が有効かつ重要である。子宮頸がんの検査はこれまで主として細胞診が行われてきたが、その精度は 60%—80% と必ずしも高いものではなく、近年 HPV 遺伝子検査が導入されるようになり、その精度の高上が計られている。しかしながら、今日までに開発されてきた方法は煩雑で、高コストな上、特定の遺伝子型を個々同定することが出来ないといった問題がある。そのため、簡便、低コストで正確な判別法の開発が求められている。今回の研究では、HPV の型判別のため、2 つの制限酵素を用いる RFLP（制限酵素断片長多型）法を確立し評価した。この方法を用いて、沖縄と長崎で細胞診断を受診した女性が罹患している HPV の遺伝子型に関する疫学的研究を行った。

[対象と方法]

2009 年から 2012 年の間で、CytoRich® Blue 溶液で保存された子宮頸部由来の臨床検体（擦過細胞）を、沖縄の豊見城中央病院（検体総数：1269 個、年齢：16 歳から 87 歳、平均年齢：38.1±10.5 歳）と長崎のボランティア（検体総数：1111 個、年齢：17 歳から 83 歳、平均年齢：31.5±8.5 歳）から集めた。臨床検体からゲノム DNA を抽出し、HPV-DNA を、コンセンサスプライマー-MY09/11 を使って特異的な L1 領域を PCR 増幅することで検出した。β グロビン増幅用のプライマー-PC04/GH20 は内部標準として使用した。HPV の遺伝子型は、その後の *Hpy*CH4V、*Nla*III の 2 種の制限酵素を用いた RFLP 法によって決定した。

[結 果]

はじめに PCR の検出感度を測定したところ、HPV 18 型が 25 コピーまで、HPV 16 型が 3 コピーまで検出可能であった。次に、*HpyCH4V*、*MlaIII* の 2 種の制限酵素を使用し、30 種の HPV 遺伝子型の切断パターンをまとめた、型判別用の「Standard RFLP Panel」を作成した。30 種の遺伝子型には、HR 型の HPV 16/31/39/59 型 (2 bands)、18/33/45/52/56/58/68 型 (3 bands) と、LR 型の HPV 54/85 型 (2 bands)、6/11/44/55/61/69/71/72/81/83/84 型 (3 bands)、53/53a/62/70 型 (4 bands)、66/82 型 (5 bands) がある。ダイレクトシーケンスによって、PCR/RFLP 法による結果の信頼性、有効性を評価した。PCR で陽性とした長崎の検体 202 個のうち、RFLP 法により 189 個 (93.6%) が、ダイレクトシーケンス法により 181 個 (89.6%) が型判別に成功した。両方の方法で共通して、181 個が型判別でき、13 個ができなかった (96.0%の結果が一致)。

この方法を使って、日本の沖縄と長崎における、通常の細胞診断を受診した女性が罹患している HPV の遺伝子型の疫学的研究を行った。沖縄における HPV 陽性検体の割合は 21.5% (273/1269) で、HR 型では、16 型 (19.0%, 16/273) と 52 型 (8.4%, 23/273)、58 型 (8.1%, 22/273) が高頻度に検出された。長崎においては 202 検体 (18.2%, 202/1111) が HPV 陽性と診断された。HR 型では、16 型 (20.3%, 41/202)、58 型 (12.9%, 26/202) および 52 型 (4.0%, 8/202) が頻出であった。日本では、HR 型の 16 型や 52 型、58 型がよく見られるものの、18 型があまりみられないことが確認できた。このデータを、他のグループのデータおよび当研究室の過去のデータと比較すると、日本において 1993 年から 2012 年の 20 年間で HPV 16 型の罹患率が急速に増加していることが分かった。

[考 察]

この研究において、HPV 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68 型の 13 種類の遺伝子型を HR 型とした。HR 型 11 種と LR 型 19 種を含む、高頻出の遺伝子型 30 種について判別可能な「Standard RFLP Panel」を作成した。HR 型のうち 35 型と 51 型は、これらの遺伝子型が感染したサンプルは検出されなかった。だが、理論上は、35 型と 51 型の RFLP パターンを得ることができ、本法による識別は可能である。他の RFLP 法では、13 種の HR 型といくつかの LR を判別するために、同時に最低 4 種の制限酵素を使用する必要があるものの、本法では 2 種の制限酵素のみで識別可能であり、従来法に比べてより簡便に、全ての HR 型と多くの LR 型を判別可能である。

HPV 6/11/16/18 型をターゲットとした 4 価ワクチンの Gardasil、HPV 16/18 型をターゲットとした 2 価ワクチンの Cervarix の 2 種の HPV 予防ワクチンが有用なワクチンとされてきた。しかし、そのような、HPV 予防ワクチンの治療成績評価は、アメリカやヨーロッパ諸国のような、16 型と 18 型が最も流行している国でのみ、有効だと考えられる。他の遺伝子型の方が 16 型や 18 型より流行しているアジア諸国では、当該ワクチンの有効性は限定的だと考えられる。日本も例外ではなく、アメリカやヨーロッパ諸国と、流行している HPV の遺伝子型が異なっている。本研究の結果から、全ての検体の中で 18 型は 2%以下しか見られず、52 型と 58 型が 16 型に次いでよく見られた。アメリカやヨーロッパ諸国の文献で報告されている以上に 52 型と 58 型の流行が拡大していることから、16 型や 18 型をターゲットとするワクチンは、アジア圏内では欧米諸国に比して効果が低い可能性が示唆された。一方で、16 型の罹患率は、日本国内の他の研究と同様に本研究においても、20 年間で 20%程度急速に増加していることが確認できた。このことは、日本の女性に対しても、16 型をターゲットとする現行ワクチンが一定の有効性を示す可能性を示唆しており、ワクチン接種は子宮頸がんの進行を予防する上で重要だろうと考えられる。