

## Real-time PCR法を用いたヒトパピローマウイルス6型および11型遺伝子の検出

長島 真美<sup>a</sup>, 新開 敬行<sup>a</sup>, 尾形 和恵<sup>a</sup>, 吉田 勲<sup>a</sup>,  
原田 幸子<sup>a</sup>, 林 志直<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>b</sup>, 甲斐 明美<sup>b</sup>

尖圭コンジローマは主に生殖器や肛門周囲などに生じる良性の疣贅（イボ）で、主としてヒトパピローマウイルス（HPV）6型や11型を原因とする感染症である。本疾患は感染症法において5類感染症に分類され、発生動向を把握すべき疾患に指定されている。これまで都内の性感染症定点医療機関から搬入された検体について、PCR法によるHPV遺伝子の検出およびシーケンス法による遺伝子型の型別を行ってきたが、今までの方法では型別困難な例が存在していた。そこで、高感度にHPV6型およびHPV11型を検出する目的で、real-time PCR法を用いたHPV6型およびHPV11型遺伝子検出法を開発した。real-time PCR法の検出感度は15 copy/tubeで、 $1.5 \times 10^9$  copy/tubeまで定量が可能であり、これまでのPCR法よりも10倍から100倍検出感度が高かった。尖圭コンジローマ部位擦過物等の臨床材料78件について調査したところ、PCR法陰性であった7件からHPV遺伝子が検出され、また、同一検体からHPV6型とHPV11型が検出された検体が4件あった。以上の結果より、今回開発したreal-time PCR法は、高感度かつ迅速なHPV6型およびHPV11型の検出方法として有用であることが示唆された。

**キーワード：**ヒトパピローマウイルス、real-time PCR法、尖圭コンジローマ

### はじめに

ヒトパピローマウイルス（Human Papillomavirus：HPV）は約8,000塩基からなる環状二本鎖のDNAウイルスである。皮膚や粘膜の細胞に感染し腫瘍を作るウイルスで、子宮頸癌などの悪性腫瘍の発生に深く関与していると言われて<sup>1)</sup>。HPVは培養することが困難であるため、遺伝子の塩基配列に基づく型別が行われており、現在100種類以上の遺伝子型に分類されている<sup>1)</sup>。生殖器や肛門周囲等に感染するHPVは性器・粘膜型と呼ばれ、40種類以上の遺伝子型の存在が知られている。さらに、発がん性のリスクにより、尖圭コンジローマなどの良性病変から検出される低リスク群、子宮頸癌などの悪性病変から検出される高リスク群に分類されており<sup>2)</sup>、前者の主要な遺伝子型には6,11型など、後者には16,18型などが挙げられる。

尖圭コンジローマは生殖器や肛門周囲などに生じる良性の疣贅（イボ）で、感染症法において5類感染症に分類され、発生動向を把握すべき疾患に指定されている<sup>3)</sup>。当センターでは性感染症定点医療機関から搬入された検体について、PCR法によるHPV遺伝子の検出およびシーケンス法による遺伝子型の型別を行ってきたが<sup>4,6)</sup>、今までの方法では検出および型別が困難な例が存在していた。そこで、尖圭コンジローマの原因の90%以上を占めるとされるHPV6型およびHPV11型<sup>7-9)</sup>を効率的に検出する目的でreal-time PCR法を用いたHPV6型およびHPV11型遺伝子検出法を開発し、検討を行ったので報告する。

### 材料および方法

#### 1. 供試材料

2011年1月から2012年6月に感染症発生動向調査事業の性感染症定点医療機関から当センターに搬入されたHPV感染症患者から採取された臨床検体78件（尖圭コンジローマ部位の擦過物64件、頸管擦過物／分泌物10件および尖圭コンジローマ切除片4件）を対象とした。

#### 2. 供試材料からのDNA抽出

尖圭コンジローマ部位の擦過物および頸管擦過物／分泌物については、それぞれを拭った綿棒をPBS 300  $\mu$ L中で振り洗いし、このうちの150  $\mu$ LをSepaGene RV-R（エーディア）を用いてDNA抽出を行い、最終産物を滅菌蒸留水30  $\mu$ Lに再溶解したものを試料とした。尖圭コンジローマ切除片については、切除片を細かく裁断し、タンパク質分解液であるSepaGene RV-RのI液中で十分に溶解させた後、同様の操作を行った。

#### 3. HPV遺伝子陽性DNAの調製

MY11/MY09<sup>10)</sup>プライマーを用いたPCR法においてHPV6型およびHPV11型陽性が確認された検体より抽出したDNA抽出液を滅菌蒸留水にて10倍段階希釈し、 $10^{-1}$ 倍から $10^{-7}$ 倍までの10倍段階希釈系列を作製した。HPV6型、HPV11型それぞれ2検体（HPV6型：No.1106012, No.1200932, HPV11型：No.1113120, No.1202049）の10倍段階希釈系列を作製した。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部ウイルス研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

Table 1. Primer Pairs and Fluorogenic Probes used for Real-time PCR and Conventional PCR

	Region	Type	Name	Sequence (5'→3')	Position
Real-time PCR	E2	HPV6	HPV6-F2	ggg CCT AAg CCA CAT Agg AAT	147-167
			HPV6-R2	TCC TTT TgC TTC ggA CAC CTT	207-187
			HPV6-2P	FAM-CAA gTA gTg CCA CCA TT -MGB	169-185
	HPV11	HPV11-F2	CgT ggA CCg TCC ACT AAC AA	724-743	
		HPV11-R2	TgT ACT gTC CAC ggA TCT gAT gT	783-761	
		HPV11-2P	VIC- ACC CTg TgT gTg gCC -MGB	745-759	
Conventional PCR <sup>*1</sup>	L1	common	MY11	gCM CAg ggW CAT AAY AAT gg	937-953
			MY09	CgT CCM ARR ggA WAC TgA TC	1382-1363

\*1: Gravitt, P.E., *et al*<sup>10)</sup>

#### 4. real-time PCR法

Kocjanら<sup>11)</sup>の報告を参考に、E2タンパク質をコードする遺伝子領域にプライマーおよびプローブを設計し、検出に用いた (Table 1.) プライマーおよびプローブの設計には、Primer Express v2.0およびPrimer Express v3.0 (ライフテクノロジー・ジャパン) を用いた。

TaqMan Universal Master Mix (ライフテクノロジー・ジャパン) 25μL, 100 μMプライマー各0.5 μL, 10 μMプローブ1.0 μL, 滅菌蒸留水18 μLおよび抽出DNA (または標準DNA) 5.0 μLを混合し、real-time PCR反応により遺伝子の検出および定量を行った。反応条件は、50°C2分, 95°C10分反応させた後、[95°C1分および57°C1分] のサイクルを45回繰り返した。なお、検出機器としてApplied Biosystems 7900HT FastリアルタイムPCRシステム (ライフテクノロジー・ジャパン) を使用した。

#### 5. real-time PCR法用標準DNAの作製

HPV6型検出系およびHPV11型検出系として、E2タンパク質をコードする遺伝子領域にそれぞれ設計したプライマーおよびプローブの塩基配列を含む合成鎖DNA (各61mer) を作製し、real-time PCR法用の標準DNAとした (ファスマックに合成依頼)。凍結乾燥品をTE溶液 (10mM Tris-HCl pH8.0 ; 1mM EDTA, PH8.0) (ナカライテスク) で溶解後、10倍段階希釈を行い、 $3.0 \times 10^8$  copy/μLから0.3 copy/μLまでの10倍段階希釈系列を作製した。

#### 6. PCR法

HPV遺伝子のL1領域に設定されたMY11/MY09<sup>10)</sup>プライマーを用いて (Table 1.), 既報<sup>12,13)</sup>に従い標的遺伝子の増幅を行った。すなわち、10×Ex Taq Buffer (TAKARA) 5.0 μL, 2.5 mM dNTP Mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 4.0 μL, 100 μMのプライマー各0.25 μL, 5U/μL TaKaRa Ex Taq 0.25 μL, 滅菌蒸留水35.25 μLおよびDNA抽出液5.0 μLを混合し、[94°C1分, 48°C2分, 72°C3分] のサイクルを35回

繰り返した。

#### 7. ダイレクトシーケンス法

既報<sup>12,13)</sup>に従い実施した。すなわちPCR産物を2.5%低融点ゲル (Nusive GTG Agarose : CAMBREX Bio Science) で電気泳動し、特異バンドを切り出した後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて遺伝子精製を行い、DNA液を得た。

シーケンス反応には、PCR反応に用いたプライマーおよびBig Dye Terminator v3.0 Cycle Sequencing試薬 (ライフテクノロジー・ジャパン) を使用し、DNA液5 μLを混合し、[94°C15秒, 50°C15秒, 60°C4分] のサイクルを25回繰り返した。

シーケンス反応産物の精製は、Centri-Sep Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い、ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (ライフテクノロジー・ジャパン) を用いて塩基配列を決定した。さらにNCBIのblast<sup>14)</sup>解析を利用し、登録されているHPVの遺伝子型と得られたHPV遺伝子配列とを比較することにより遺伝子型を決定した。得られた遺伝子型をMunozらのリスク分類<sup>2)</sup>に照らし合わせ、HPVのリスク分類を行った。

#### 8. 標準DNAを用いたreal-time PCR法の検出感度に関する検討

標準DNAとして作製した合成鎖DNAの $3.0 \times 10^8$  copy/μLから0.3 copy/μLまでの10倍段階希釈液を用いてReal-time PCR法によるHPV6型およびHPV11型遺伝子の検出を行い、検出感度をコピー数で求めた。

#### 9. HPV-PCR法陽性検体DNAにおけるreal-time PCR法とPCR法の検出感度についての検討

HPVは培養が困難であるため、PCR法でHPV6型陽性およびHPV11型陽性と判明した検体DNA (4検体) の10倍段階希釈液を供試試料とした。供試試料を各5.0 μLを用いて

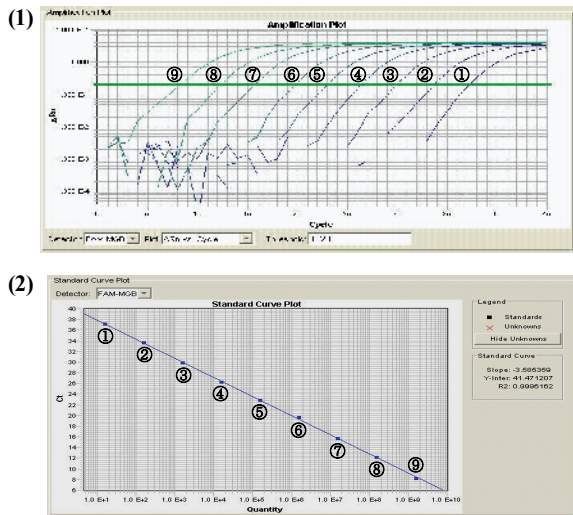


Fig. 1. Establishment of the Standard Curve for HPV6 Quantification by Real-time PCR

(1) Amplification plot of HPV6 standards. Genome concentrations are 15 (①),  $1.5 \times 10^2$  (②),  $1.5 \times 10^3$  (③),  $1.5 \times 10^4$  (④),  $1.5 \times 10^5$  (⑤),  $1.5 \times 10^6$  (⑥),  $1.5 \times 10^7$  (⑦),  $1.5 \times 10^8$  (⑧),  $1.5 \times 10^9$  (⑨) copies/tube from right to left.  
 (2) Standard curve plot of HPV6 standards generated from Ct values of the amplification plot.

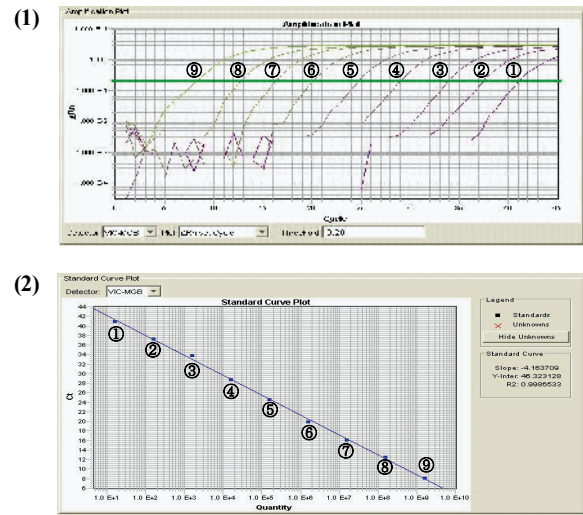


Fig. 2. Establishment of the Standard Curve for HPV11 Quantification by Real-time PCR

(1) Amplification plot of HPV11 standards. Genome concentrations are 15 (①),  $1.5 \times 10^2$  (②),  $1.5 \times 10^3$  (③),  $1.5 \times 10^4$  (④),  $1.5 \times 10^5$  (⑤),  $1.5 \times 10^6$  (⑥),  $1.5 \times 10^7$  (⑦),  $1.5 \times 10^8$  (⑧),  $1.5 \times 10^9$  (⑨) copies/tube from right to left.  
 (2) Standard curve plot of HPV11 standards generated from Ct values of the amplification plot.

real-time PCR法およびPCR法を行い、両法の検出感度を比較した。

結果および考察

1. 標準DNAを用いたreal-time PCR法の検出感度に関する検討

Real-time PCR法の検出感度について、10倍段階希釈した標準DNAを用いて検討した結果、HPV6型検出系およびHPV11型検出系は、いずれも15 copy/tubeから $1.5 \times 10^9$  copy/tubeの範囲において、サイクル数に比例し増幅曲線が得られた (Fig 1-(1), Fig 2-(1))。また、横軸にDNAコピー数、縦軸にPCRサイクル数をとった片対数グラフはどちらも直線を示したことから、HPV6型およびHPV11型の定量が可能であることが判明した (Fig 1-(2), Fig 2-(2))。これらの結果から、検出感度はいずれも15 copy/tubeと推定された。

2. HPV-PCR法陽性検体DNAにおけるreal-time PCR法とPCR法の検出感度についての検討

HPVは培養が困難であるため、PCR法でHPV6型陽性およびHPV11型陽性と判明した検体DNAの10倍段階希釈液を用いて、real-time PCR法とPCR法の検出感度を比較した。その結果、Table 2.に示すように、HPV6型検出系およびHPV11型検出系ともに、今回開発したreal-time PCR法はPCR法に比べ10倍から100倍検出感度が高いことが示された。

3. HPV感染症患者検体におけるHPV遺伝子検査結果

2011年1月から2012年6月に当センターに搬入されたHPV感染症患者から採取された臨床検体78件 (尖圭コンジローマ部位の擦過物64件、頸管擦過物/分泌物10件および尖圭コンジローマ切除片4件) について、real-time PCR法およびPCR法を行い、結果をTable 3.に示した。

PCR法にてHPV6型陽性の25件、HPV11型陽性の25件からreal-time PCR法でそれぞれの型が単独で検出されたが、HPV11型陽性の2件からは、real-time PCR法でHPV6型およびHPV11型があわせて検出された。さらに、HPV16型、HPV81型陽性の検体それぞれからreal-time PCR法でHPV6型が検出された。また、PCR法陰性であった17件のうち、real-time PCR法にてHPV6型が2件、HPV11型が4件単独で検出され、1件はHPV6型およびHPV11型があわせて検出された。これらのDNA量はそれぞれ15.2 copy/tube から $1.35 \times 10^3$  copy/tube の範囲にあり、検体中に含まれるDNA量

Table 2. Comparison between the Sensitivity of Real-time PCR and Conventional PCR Assay in Detecting of HPV DNA

	Maximum 10-fold dilutions			
	HPV6		HPV11	
Sample No.	1106012	1200932	1113120	1202049
Real-time PCR	$10^{-6}$	$10^{-5}$	$10^{-5}$	$10^{-4}$
Conventional PCR	$10^{-5}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$	$10^{-3}$

Table 3. Comparison between the Result of Real-time PCR and Conventional PCR-Sequencing Assay in Detection of HPV DNA

		Conventional PCR-Sequencing Assay												
		Low risk group			High risk group			Other group			not typed	(—)	total	
		HPV 6	HPV 11	HPV 81	HPV 16	HPV 35	HPV 58	HPV 62	HPV 83	HPV 84				
Real-time PCR Assay	HPV6	25	0	1 <sup>*1</sup>	1 <sup>*1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	2	29
	HPV11	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	29
	HPV6,11 double	0	2 <sup>*1</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	4
	(—)	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	10	16
	total	25	27	1	2	1	1	1	1	1	1	1	17	78

\*1: double HPVs detected

が少なく、PCR法より感度の高いreal-time PCR法でのみ検出されたと推察された。

また、同一検体から2種類の遺伝子型が検出された例が4件あった (Table 3.)。PCR法にてHPV11型と型別された2件から、real-time PCR法でHPV6型およびHPV11型が検出され、PCR法にてHPV16型かつreal-time PCR法でHPV6型が検出された例が1件あり、PCR法で81型かつreal-time PCR法でHPV6型が検出された例が1件あった。real-time PCR法で検出された遺伝子型のDNA量は、それぞれ $9.63 \times 10^2$  copy/tubeから $9.39 \times 10^3$  copy/tube の範囲にあり、検体中に含まれるDNA量が少なく、PCR法より感度の高いreal-time PCR法であるがゆえに検出されたと推察された。

Ballら<sup>15)</sup>は、肛門および性器の疣贅について調査したところ、HPVの型が1種類検出されたのは29.0%で、71.0%

は2種類以上検出され、複数の型が検出されたもののうち、高リスク群のHPV16とHPV18があわせて検出されたものが35%であったと報告している。今回の検討においても、検出例は少ないが尖圭コンジローマの検体から低リスク群HPVばかりでなく、HPV16型などの高リスク群HPVも検出されていることから、引き続き調査をしていく必要があると示唆された。

4. 型別困難例の検討

PCR法にて型別が困難であった検体 (No.1014094) のPCR産物の遺伝子配列のエレクトロフェログラムをFig 3-(1)に示した。増幅領域のほとんどの部分で波形が重なり合っており、最大ピークを優位なピークとして読み取ることができず、塩基配列の決定が困難であった。この検体についてreal-time PCR法を行ったところ、HPV6型およびHPV11型が検出され (Fig 3-(2-1),(2-2))、PCR法で少なくとも2つの型が増幅されたために型別が困難になっていたと考えられた。これより、今回開発したreal-time PCR法は、HPV6型およびHPV11型の混合感染の検体についても型別が可能であることが示唆された。

real-time PCR法を用いたHPV6型およびHPV11型の検出法は、PCR法で型別が困難な検体において有効であり、PCR法に比べ短時間で型別を判定することができる。しかし、尖圭コンジローマや疣贅の検体からHPV6,11型以外のHPVも検出されることを考慮すると、広範囲のHPV遺伝子型を検出できるPCR法<sup>10,12,13)</sup>とreal-time PCR法とを併用していくことが重要である。

HPV感染を予防する方法のひとつとして、HPVワクチン接種が挙げられる。日本においてもHPV16,18型を対象とした2価HPVワクチンが2009年10月に、HPV6,11,16,18型を対象とした4価HPVワクチンが2011年7月に承認され、任意接種でHPVワクチンの接種が行われている<sup>16)</sup>。ワクチン接種対象者は「13歳となる日の属する年度の初日から16歳となる日の属する年度の末日までにある女性」<sup>17,18)</sup>とされ、

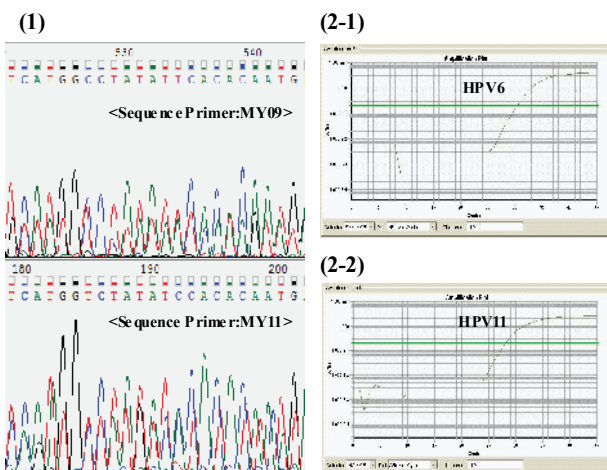


Fig. 3. The Specimen which had difficulty in Typing by the PCR-Sequencing Assay  
 (1) Electropherogram showing mixed nucleotide sequences of HPV L1 region  
 (2-1) Amplification plot of HPV6 detected in the specimen <FAM>  
 (2-2) Amplification plot of HPV11 detected in the specimen <VIC>

ワクチン接種費用に対する公費助成が行われているが、助成対象者や助成金額は自治体により異なっている<sup>19)</sup>。4価ワクチンは、尖圭コンジローマに対しても予防効果が期待されており、4価HPVワクチンを若年女性に接種することにより、接種年代の女性の発症率の他に、男性の発症率も低下することが報告<sup>20)</sup>されている。HPVの感染は、尖圭コンジローマや疣贅を起こすばかりでなく、子宮頸癌や陰茎癌の原因ともなる可能性もある。また、一つの性感染症に感染していると他の性感染症に罹患しやすいとも言われており、今後とも新たな検査法の開発を行うとともに、病原体の詳細な検索を行っていく必要がある。

### ま と め

HPV6型およびHPV11型を効率的に検出する目的で、real-time PCR法を用いたHPV6型およびHPV11型遺伝子検査法を開発した。開発したreal-time PCR法の検出感度は15 copy/tubeで、 $1.5 \times 10^9$  copy/tubeまで定量が可能であった。また既存のPCR法よりも10倍から100倍感度が高かった。尖圭コンジローマ部位擦過物等78件について調査したところ、PCR法陰性であった7件からHPV遺伝子が検出され、また同一検体からHPV6型とHPV11型が検出された検体が4件あった。

今回開発したreal-time PCR法は、高感度かつ迅速なHPV6型およびHPV11型の検出方法として有用であることが示唆された。

### 文 献

- 1) 井上正樹：産婦人科治療，92，848-851，2006.
- 2) Munoz, N., Bosch, F.X., Sanjose, S., *et al.*: *New Engl J Med*, **348**, 518-527, 2003.
- 3) 感染症法研究会：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律，19-56，2004，中央法規，東京.
- 4) 東京都福祉保健局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成21年，144，2010.
- 5) 東京都福祉保健局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成22年，129，2011.
- 6) 東京都福祉保健局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成23年，139，2012.
- 7) Brown, D.R., Schroeder, J.M., Bryan, J.T., *et al.*: *J Clin Microbiol*, **37**, 3316-3322, 1999.
- 8) Aubin, F., Pretet, J.L., Jacquard, A.C., *et al.*: *Clin Infect Dis*, **47**, 610-615, 2008.
- 9) Chan, P.K.S., Luk, A.C.S., Luk, T.N.M., *et al.*: *J Clin Virol*, **44**, 111-114, 2009.
- 10) Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Alessi, T.Q., *et al.*: *J Clin Microbiol*, **38**, 357-361, 2000.
- 11) Kocjan, B.J., Seme, K., Poljak, M.: *J Virol. Methods*, **153**, 245-249, 2008.
- 12) 長島真美，貞升健志，新開敬行，他：東京健安研七周年報，**57**，65-68，2006.
- 13) 長島真美，貞升健志，新開敬行，他：東京健安研七周年報，**58**，63-66，2007.
- 14) NCBI: <http://ncbi.nlm.nih.gov/blstn/> (2012年7月19日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 15) Ball, S.L.R., Winder, D.M., Vaughan, K., *et al.*: *J Med Virol*, **83**, 1345-1350, 2011.
- 16) 厚生労働省：子宮頸がん予防ワクチン，ヒブワクチン，小児用肺炎球菌ワクチン，<http://mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou28/> (2012年7月19日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 17) 厚生労働省：ワクチン接種緊急促進事業実施要領，<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/other/dl/101209i.pdf> (2012年7月19日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 18) 厚生労働省：「子宮頸がん等ワクチン接種緊急促進事業の実施について」の一部改正について，[http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou28/pdf/sesshu\\_youryou.pdf](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou28/pdf/sesshu_youryou.pdf) (2012年7月19日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 19) 子宮頸がん征圧をめざす専門家会議：「子宮頸がん予防HPVワクチン接種の公費助成検討状況」についての自治体アンケート結果報告，[http://www.cczero.pro.jp/dl/rp\\_201002\\_ws\\_wc\\_wc.pdf](http://www.cczero.pro.jp/dl/rp_201002_ws_wc_wc.pdf) (2012年7月19日現在，なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 20) Donovan, B., Franklin, S.K., Guy R., *et al.*: *Lancet Infect Dis*, **11**, 39-44, 2011.

**Detection of Human Papillomavirus Type 6 and Type11 by Real-Time PCR Assay**

Mami NAGASHIMA<sup>a</sup>, Takayuki SHINKAI<sup>a</sup>, Kazue OGATA<sup>a</sup>, Isao YOSHIDA<sup>a</sup>, Sachiko HARADA<sup>a</sup>,  
Yukinao HAYASHI<sup>a</sup>, Kenji SADAMASU<sup>a</sup> and Akemi KAI<sup>a</sup>

Condyloma acuminatum (CA) is a benign wart occurring around the genitals that is mainly caused by infection of human papillomavirus type 6 (HPV6) or 11 (HPV11). Under the Law Concerning Prevention of Infectious Diseases and Medical Care for Patients of Infections (Infectious Diseases Control Law), CA is a category IV infectious disease and it is necessary to report the number of CA patients in Tokyo.

We detected the HPV gene by conventional PCR assay of specimens from patients diagnosed as CA at the sexually transmitted diseases units of fixed-point medical institutions in Tokyo, and distinguished the HPV genotype by sequencing.

To improve the sensitivity of HPV6 and HPV11 detection, we developed a new method for detecting HPV6 and HPV11 using a real-time PCR assay.

The detection limit of this method was 15 copies/tube, and the sensitivity of this method was 10 or 100 times higher than that of the conventional PCR assay and it was possible to determine the quantity of HPV6 and HPV11 from  $15-1.5 \times 10^9$  copies/tube.

We analyzed 78 clinical specimens (mostly CA swabs) using these methods, and were able to detect HPV6 and HPV11 genes in 7 specimens that were conventional PCR assay-negative, and in one case, detected both HPV6 and HPV11 from the same specimen.

These results suggest that this method is useful as a highly sensitive and rapid technique for the distinction of HPV6 and HPV11.

**Keywords:** human papillomaviruses, real-time PCR assay,

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan