

## ヒトパピローマウイルス遺伝子検出法の multiplex 化

長島 真美\*, 貞升 健志\*, 新開 敬行\*,  
吉田 靖子\*, 山田 澄夫\*\*

### Detection of Human Papilloma Virus by Multiplex PCR Assay

Mami NAGASHIMA\*, Kenji SADAMASU\*, Takayuki SHINKAI\*,  
Yasuko YOSHIDA\* and Sumio YAMADA\*\*

**Keywords** : ヒトパピローマウイルス human papilloma virus, マルチプレックス PCR multiplex PCR

#### 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 DNA ウイルスである。皮膚や粘膜に感染し腫瘍を作るウイルスであり、子宮頸癌などの悪性腫瘍の発生にも深く関与していると言われて<sup>1)</sup>。HPV は培養することができないため、遺伝子の塩基配列に基づく型別が行われ、現在 100 種類以上の遺伝子型に分類されている<sup>1)</sup>。生殖器系に感染する HPV は性器・粘膜型と呼ばれ、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 型などが含まれる。

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疾患に指定されている<sup>3)</sup>。我々は性感染症定点医療機関からの依頼により PCR 法による HPV 遺伝子の検出およびシーケンシング法による遺伝子型の型別を行ってきた<sup>4-6)</sup>。その結果、現行の PCR 法では検出困難な遺伝子型が存在する可能性があることが示唆された。そこで、検出可能な HPV 遺伝子型を増やす目的で L1 領域の異なった部分に設定された複数のプライマーを新たに導入し、同時に多種類の遺伝子型が鑑別検出できる PCR 法の multiplex 化に関する検討を行ったので報告する。

#### 材料および方法

##### 1. 供試試料

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、子宮頸部および膣からの分泌物である帯下拭い 66 件を対象とした。

##### 2. 供試試料からの DNA 抽出法

帯下を拭った綿棒を滅菌蒸留水 300  $\mu$ L 中で振り洗いし、

このうちの 150  $\mu$ L を SepaGene RV-R (三光純薬) を用いて遺伝子抽出を行い、最終産物を蒸留水 30  $\mu$ L に再溶解したものを DNA 抽出液とした。

##### 3. HPV 遺伝子陽性 DNA 液の調製

MY09/MY11<sup>7)</sup>プライマーを用いた PCR 法において HPV 遺伝子陽性 (HPV16) 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、 $10^0$  (原液) ~  $10^{-4}$  倍 DNA 液を作製した。

##### 4. single PCR 法

HPV 遺伝子のキャプシド蛋白をコードする L1 領域の遺伝子配列に対する 2 つのプライマーペア MY09/MY11<sup>7)</sup> と L1C1/L1C2M<sup>8)</sup> を用いた (表 1)。10 $\times$ PCR Buffer (アプライドバイオシステムズ: ABI) 5.0  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (ABI) 4.0  $\mu$ L, 100  $\mu$ M プライマー各 0.5  $\mu$ L, 5U AmpliTaq polymerase (ABI) 0.5  $\mu$ L, 滅菌蒸留水 34.5  $\mu$ L, および DNA 抽出液 5.0  $\mu$ L を混合し、反応液を調製した。反応条件は、MY09/MY11<sup>7)</sup> プライマーペアの場合 [94 $^{\circ}$ C 1 分, 55 $^{\circ}$ C 2 分, 72 $^{\circ}$ C 3 分] のサイクルを 35 回繰り返す。また、L1C1/L1C2M<sup>8)</sup> プライマーペアの場合 [94 $^{\circ}$ C 1 分, 48 $^{\circ}$ C 2 分, 72 $^{\circ}$ C 3 分] のサイクルを 35 回繰り返した。2.0%アガロースゲル電気泳動により特異バンド (約 450 bp または約 260 bp) の確認を行った。

##### 5. multiplex PCR 法

MY09, MY11, L1C1 および L1C2M 各プライマーを等量ずつ混合し、プライマー混合液を作製後、前述の試薬組成で PCR 反応を行った。反応条件は、[94 $^{\circ}$ C 1 分, 48 $^{\circ}$ C 2 分, 72 $^{\circ}$ C 3 分] のサイクルを 35 回繰り返した。

##### 6. ダイレクトシーケンス法

\* 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

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

\*\* 東京都健康安全研究センター微生物部

表 1. プライマーの塩基配列<sup>7), 8)</sup>

プライマー	塩基配列	増幅産物
MY09	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	約450bp
MY11	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3'	
L1C1	5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTT-3'	約260bp
L1C2M	5'-TACCCTAAATACCCTATATTG-3'	

HPV 遺伝子塩基配列の決定および HPV 遺伝子型を決定するために HPV 遺伝子が検出された増幅産物を 2.5% 低融点ゲル (NuSieve GTG Agarose : CAMBREX Bio Science) で電気泳動し, 紫外線照射下で特異バンドを切り出した。次いで 94°C ヒートブロックを用いて低融点ゲルを溶解後, QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて遺伝子抽出を行い, DNA 液 30  $\mu$ L を得た。

シーケンス反応に用いるプライマーは, 約 450bp の特異バンドが検出された場合には MY09 と MY11 プライマーを, 約 260 bp の特異バンドが検出された場合には L1C1 と L1C2M プライマーを用いた。BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ABI) 4.0  $\mu$ L, 5 $\times$  Buffer (ABI) 2.0  $\mu$ L, 3.2  $\mu$ M プライマー 1.0  $\mu$ L, 滅菌蒸留水 6.0  $\mu$ L および DNA 液 7.0  $\mu$ L を混合し, [94°C 15 秒, 50°C 15 秒, 60°C 4 分] のサイクルを 25 回繰り返すシーケンス反応を行った。

シーケンス反応産物の精製には Centri-Sep Spin Columns (PRINCETON SEPARATIONS) を用い, ドライアップ後, Template Suppression Reagent (TSR) 25  $\mu$ L に再溶解した。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (ABI) を用いて塩基配列を決定した。HPV 遺伝子の型別は遺伝子バンク (NCBI) がインターネットで公開している blastn<sup>9)</sup> 解析を利用し, 得られた塩基配列と NCBI に登録されている HPV 遺伝子の塩基配列とを比較することにより決定した。得られた遺伝子型を Munoz らのリスク分類<sup>10)</sup> に照らし合わせ, HPV のリスク分類を行った (表 2)。

## 結果及び考察

### 1. single PCR 法による検出感度の比較

それぞれのプライマーによる PCR 法の検出感度を求めるために, HPV 陽性検体の  $10^0$  から  $10^{-4}$  の 10 段階希釈 DNA 液を用いて, single PCR 法を行った。その結果, MY09/MY11 プライマーでは  $10^{-3}$  DNA 液まで, L1C1/L1C2M プライマーでは  $10^{-2}$  DNA 液まで遺伝子増幅され, MY09/MY11 プライマーは L1C1/L1C2M プライマーよりも 10 倍検出感度が高いことが確認された。

### 2. multiplex PCR 法

Gravitt ら<sup>7)</sup> の MY09/MY11 プライマーを用いた PCR 法

表 2. 遺伝子型による HPV リスク分類<sup>10)</sup>

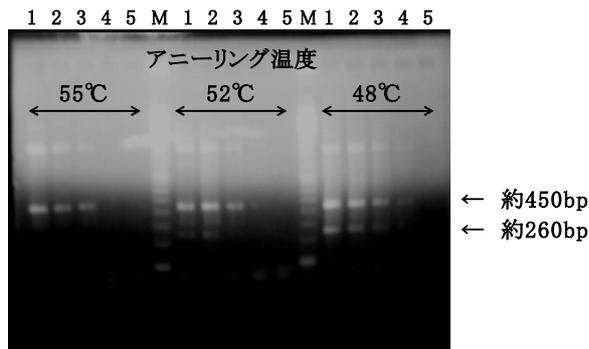
リスク群	HPV 遺伝子型
高リスク群	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51
	52, 56, 58, 59, 68, 73, 82 (26, 53, 66) *
低リスク群	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61
	70, 72, 81, CP6108

\* : 高リスク群に入ると考えられている型

におけるアニーリング温度は 55°C, Li ら<sup>8)</sup> の L1C1/L1C2M プライマーでは 48°C であるため, 両プライマーを用いて multiplex 化するにあたり, 両プライマーの増幅効率を低下させないアニーリング温度の設定を検討し, HPV 陽性検体の 10 段階希釈 DNA 液を用いて, 55°C および 48°C と, その中間温度に相当する 52°C の 3 点のアニーリング温度で PCR 反応を行った。図 1 に示すように, 55°C の場合, MY09/MY11 プライマーによる特異バンド (以下, MY09/MY11 バンド) は  $10^{-2}$  DNA 液まで確認されたが, L1C1/L1C2M プライマーによる特異バンド (以下, L1C1/L1C2M バンド) は確認されなかった。また 52°C では, MY09/MY11 バンドは  $10^{-2}$  DNA 液まで, L1C1/L1C2M バンドは  $10^{-1}$  DNA 液まで確認された。これに対して 48°C の場合, MY09/MY11 バンドは  $10^{-3}$  DNA 液まで, L1C1/L1C2M バンドは  $10^{-2}$  DNA 液まで確認され, single PCR 法と同程度の検出感度であった。これらの結果より, multiplex PCR 法を行う際のアニーリング温度を 48°C に設定した。

### 3. multiplex PCR 法による帯下拭い検体からの HPV 遺伝子の検出と検出遺伝子の遺伝子型

前記の検討結果により確立した multiplex PCR 法の有用性を確認するために, 帯下拭い 66 件からの HPV 遺伝子検出を試みた。その結果, 26 件 (39.4%) から HPV 遺伝子が検出された。さらに, シークエンスにより遺伝子型の決定を試みた結果, MY09/MY11 バンドのみ検出されたのは 7 件で, その遺伝子型は, 16 型 2 件, 31 型 1 件, 52 型 1 件, 58 型 1 件, 71 型 1 件および 81 型 1 件であった。一方, L1C1/L1C2M バンドのみ検出されたのは 8 件で, その遺伝子型は, 51 型 1 件, 56 型 2 件, 58 型 1 件, 67 型 1 件, 82 型 1 件, 84 型 1 件および 90 型 1 件であった。L1C1/L1C2M バンドのみ検出された遺伝子型のうち, 51 型, 56 型, 82 型, 84 型および 90 型は, これまで MY09/MY11 プライマーでは検出されていない遺伝子型であり, L1C1/L1C2M プライマーを導入した効果が示唆された。



lane M : 100bp ladder marker  
 lane 1 : 10<sup>0</sup>HPV-DNA液  
 lane 2 : 10<sup>-1</sup>HPV-DNA液  
 lane 3 : 10<sup>-2</sup>HPV-DNA液  
 lane 4 : 10<sup>-3</sup>HPV-DNA液  
 lane 5 : 10<sup>-4</sup>HPV-DNA液

図1. アニール温度の違いによる検出感度の比較

両方の特異バンドが検出されたのは11件であり、それらのうち、MY09/MY11バンドから得られた遺伝子型とL1C1/L1C2Mバンドから得られた遺伝子型が一致したのは3件(18型1件, 61型2件)であった。残りの8件は両領域の遺伝子型が一致しなかった(表3)。各バンドのblastn解析結果をみると、得られた塩基配列と登録されている塩基配列との一致率は96%~100%であり、各バンドから得られた遺伝子型の結果は、共に確かなものと考えられる。このような場合、どちらの遺伝子型が優位であるのか、あるいは同じ割合で存在するのかについては、現段階では判断できず、定量的な検討の必要性が示唆された。そこで、ここでは検出される領域が長いMY09/MY11領域の結果で最終的な遺伝子型とした。

表3. 検出領域により遺伝子型が異なった例

検体	MY09/MY11バンド		L1C1/L1C2Mバンド	
	遺伝子型	リスク分類	遺伝子型	リスク分類
A	52	高リスク	56	高リスク
B	16	高リスク	90	未分類
C	52	高リスク	59	高リスク
D	58	高リスク	90	未分類
E	66	高リスク	56	高リスク
F	16	高リスク	56	高リスク
G	71	未分類	51	高リスク
H	6	低リスク	67	未分類

このようにして決定された遺伝子型をもとにリスク分類を行うと(表4)、高リスク群に分類されたのは16件(24.2%)で、その遺伝子型は、16型4件, 18型1件, 31型1件, 51型1件, 52型3件, 56型3件および58型3件であった。低リスク群に分類されたのは6型の1件のみ(1.5%)であった。残り9件(61型2件, 67型1件, 71型2件, 81型, 82型, 84型および90型各1件)はどちらの群にも分類できない型(12.1%)であった。Asatoら<sup>11)</sup>による沖縄県での調査(1993年~1998年)では、細胞診正常女性のHPV陽性率は10.2%で、28種類の遺伝子型が検出され、頻度別には、52, 51, 35型の順で高く、がん化リスクが特に高いとされる16, 18型の頻度は低かったと報告されている。それと比較すると、HPV陽性率は約4倍高く、最も検出頻度が高いのは16型(4件)であったが、これは検査対象が子宮がん検診陰性(細胞診正常)者であるのに対し、医療機関受診者が対象であることに起因するものと考えられる。

表4. リスク分類別HPV検出数

高リスク群		低リスク群		未分類群	
型	(検出数)	型	(検出数)	型	(検出数)
16	(4)	6	(1)	61	(2)
18	(1)			67	(1)
31	(1)			71	(2)
51	(1)			81	(1)
52	(3)			82	(1)
56	(3)			84	(1)
58	(3)			90	(1)

現在の検診に用いられているHPV検査法は、細胞診とHPV遺伝子検査法である。細胞診は異形成やがん化している細胞を直接観察するので、特異性の高い検査法である。しかし、検体採取の方法や診断に熟練を要するという側面がある。一方、HPV遺伝子検査法は、異形成や癌化の有無に関わらずHPV遺伝子の検出を行うため、早期発見やfollow-up検査に用いることができるという利点がある。HPV遺伝子検査法として、ハイブリッドキャプチャー法(HC法)とPCR法が開発されている。HC法は高リスク群遺伝子の検出には有用な方法であるが、低リスク群遺伝子の検出および型別はできない。これに対してPCR法は、HPVのコンセンサスプライマーを用いることにより広範囲のHPV遺伝子型を検出することができ<sup>7)</sup>、シーケンシング法による遺伝子型別もできるため、高リスク群および低リスク群両方の検出が可能である。さらに、異なった領域を認識する複数のプライマーを用いたmultiplex PCR法を導入することにより、51, 56, 82, 84 および 90 型が

検出可能となった。また、作業量やコストの削減および検体量の節約という観点からも multiplex PCR 法の導入は有用であると推察される。

高リスク群 HPV の感染は子宮がんの原因とされている<sup>12)</sup>が、HPV 感染の大部分は一過性で、免疫機構により排除されるため<sup>13, 14)</sup>、高リスク群 HPV 感染だけでは子宮頸がんになるとはいえず、HPV が排除されずに感染が持続化した場合には、前がん病変期間を経て子宮がんになる可能性があるといわれている<sup>15, 16)</sup>。その予防のため、定期的に follow-up 検査を行い、高リスク群特定の遺伝子型ウイルスによる持続感染の有無を調べる必要がある。また、尖圭コンジローマなどの良性病変を起こす低リスク群 HPV との鑑別も重要である。

さらに HPV の遺伝子型は増え続けており、これまでリスク分類が確定されていなかった遺伝子型の発がんリスクも明らかになると考えられる。こうした観点からも、遺伝子型が型別できる multiplex PCR 法の開発および改良は、今後とも必要であろう。

#### ま と め

1. HPV 遺伝子検査において PCR 法の multiplex 化を試み、これまでに検出できなかった遺伝子型の検出を可能にした。
2. 都内の性感染症定点医療機関より搬入された帯下拭い 66 件から、multiplex PCR 法による HPV 遺伝子の検出を試みたところ、26 件から HPV 遺伝子が検出され、16 件 (24.2%) が発がん性リスク分類による高リスク群に、1 件 (1.5%) が低リスク群に分類された。

#### 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) 東京都健康局：東京都感染症発生動向調査事業報告書 平成 15 年, 116, 2004.
- 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 16 年, 123, 2005.
- 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 17 年, 127, 2006.
- 7) Gravitt, P.E., Peyton, C.L., Alessi, T.Q., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **38**, 357-361, 2000.
- 8) Li, J., Gerhard, D.S., Zhang, Z., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 5563-5571, 2003.
- 9) NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blastn/>
- 10) Munoz, N., Bosch, F.X., Sanjose, S., *et al.*: *New Engl J Med*, **348**, 518-527, 2003.
- 11) Asato, T., Maehama, T., Nagai, Y., *et al.*: *JID*, **189**, 1829-1832, 2004.
- 12) Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., *et al.*: *J Pathol.*, **189**, 12-19, 1999.
- 13) Woodman, C.B.J., Collins, S., Winter, H., *et al.*: *Lancet*, **357**, 1831-1836, 2001.
- 14) Ho, G.Y.F., Bierman, R., Beardsley, I., *et al.*: *N Engl J Med*, **338**, 423-428, 1998.
- 15) Schiffman, M., Herrero, R., Desalle, R., *et al.*: *Virology*, **337**, 76-84, 2005.
- 16) Kjaer, S.K., van den Brule, A.J.C., Paull, G., *et al.*: *BMJ*, **325**, 572, 2002.