

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591846

研究課題名（和文） ヒトパピローマウイルス検査の臨床応用

研究課題名（英文） Clinical usefulness of human papillomavirus testing

研究代表者

松本 光司（MATSUMOTO KOJI）

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：30302714

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は子宮頸癌の原因ウイルスであるヒトパピローマウイルス（HPV）のウイルスDNA検出検査や抗体検査が、子宮頸部前癌病変患者のフォローアップに有用であるかどうかを検討することである。子宮頸部細胞診軽度異常の患者570名のフォローアップ・データの解析から、子宮頸部からどのHPV型が検出されるか、検出されるHPV型に対する抗体を保有しているかどうか、その後の高度病変への進展リスクを予測する上で役立つことを報告した。

研究成果の概要（英文）：Infections by oncogenic human papillomaviruses (HPVs) are a major risk factor of cervical cancer. To evaluate the clinical usefulness of HPV DNA testing and serology, we analyzed follow-up data of 570 women with low-grade cervical lesions. Our findings suggested that HPV genotyping and antibody assays for women with low-grade cervical abnormalities may be useful for identifying populations at increased or decreased risk of disease progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：産婦人科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・婦人科腫瘍学

キーワード：ヒトパピローマウイルス、子宮頸癌

1. 研究開始当初の背景

PVは子宮頸癌の原因となる発癌ウイルスである。HPVの持続感染が子宮頸癌やその前癌病変発症の原因となることから、海外ではウイルス検出検査の臨床応用が進められつ

つある。ウイルスDNAを直接検出するHPV DNA検査は、ハイリスクHPV検出検査とタイプング検査に大別される。ハイリスクHPV検出検査は頸がんの原因となるハイリスク13-14タイプのいずれかに陽性であるかどうか

かは判定できるが、そのうちのどのタイプに感染しているかは判定できない。しかし、比較的安価でほぼ見逃しなく前癌病変を検出できるため、すでに米国では頸がん検診（細胞診併用）に臨床応用されている。一方、タイプ検査は高価であるが、複数のタイプの混合感染も含めてどのタイプに感染しているか詳細な情報を得ることができ、経時的に検査すれば全く同じタイプの感染が持続しているかどうかを判定できる。しかし、臨床応用するために必要なデータは不足しており、その臨床的意義は確立していない。

HPVはタイプによって頸がんへの進展リスクが異なるので、タイプ検査は前癌病変患者のリスク評価に役立つ可能性がある。WHOの外部組織であるIARCは自身が行ったケース・コントロールスタディ11論文のデータから、HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82の15タイプを子宮頸部発癌のハイリスクタイプと分類し、HPV26, 53, 86で次にリスクが高いと報告した。しかしながら、子宮頸癌から検出されるHPVタイプの分布は地域・民族によって異なっている。我々が報告した日本の主要HPV論文のメタアナリシス(Miura S et al, Int J Cancer 2006;119:2713-5)でも最近の我々の茨城県データ(Onuki M et al, Cancer Sci 2009;100:1312-6)でも、病変別の検出頻度の違いから算出される相対危険度は、頸がんから検出頻度の高い上位7タイプ(16, 18, 31, 33, 35, 52, 58型)ではずば抜けて高く、他のハイリスクタイプと比べても大きな差がみられる。これらのデータは海外のデータとはかなり異なっており、我が国独自のデータが必要であることを示しているが、あくまでも横断的研究の成果であり臨床応用を考える場合には前方視的データの蓄積が必要である。

抗体検査はDNA検査と比べて、過去の感染も含めて感染を検出されることや宿主の免疫応答をうかがい知ることが出来る点で優れている。これまでに我々はHPVの主要キャプシッドタンパクL1に対する抗体の測定系を確立したが(Matsumoto K, J Med Virol 2003;69:441-6)、残念ながら単なるL1抗体の産生は前癌病変の消失・進展に全く関係がなかった(Matsumoto K et al, Cancer Lett 2006;231:309-13)。さらに最近、我々のグループでは中和抗体の測定系を開発した(Ochi H et al, Clin Vaccine Immunol 2008; 15:1536-40)。中和抗体の臨床的意義に関するデータはこれまで海外も含めてほとんどないが、HPV感染を予防できる中和抗体の産生は前癌病変の消失・進展

に関係する可能性がある。

2. 研究の目的

ヒトパピローマウイルス(human papillomavirus、以下HPV)は子宮頸癌の原因ウイルスである。HPVの持続感染が子宮頸癌やその前癌病変発症の原因となることから、海外ではウイルス検査の臨床応用が進められつつある。たとえば、ウイルスDNAを直接検出するHPV DNA検査のなかで、頸がんの原因となるハイリスク13タイプのいずれかに陽性であるかどうかだけを判定できる簡易検査は米国で頸がん検診(細胞診併用)に臨床応用されている。しかしながら、感染している個々のタイプを判別できるHPVタイプ検査や血清中の中和抗体を検出するウイルス抗体検査についてその臨床的意義はいまだ確立していない。

本研究では、「HPVタイプ検査および血清抗体検査の臨床応用を目指し、前癌病変患者の診療におけるこれらの検査の有用性を確立すること」を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 軽度前癌病変患者のフォローアップ

「HPV感染と子宮頸部発がんに関するコホート研究」(文部科学省平成10-16年度特定領域研究)で得られたDNAサンプルと血清サンプルの残りをを用いて、子宮頸部細胞診において軽度の異常(LSIL, low-grade squamous intraepithelial lesion)が見られる患者の経過観察においてHPVジェノタイプ検査・中和抗体検査が有用であるかどうかを検討する。上記のコホート研究(JHACCスタディ; Japan Hpv And Cervical Cancer study)は、多施設共同で行われたLSIL患者700例のフォローアップ・スタディである。現在も長期フォローされているLSIL症例570例を対象とした中間解析(平均フォローアップ期間39.2ヵ月)では362例が自然消失し、46例ではCIN3へ進展した。DNAサンプルや血清サンプルの使用許可をすでにJHACC研究班(班長:吉川裕之 筑波大学教授)より得ている。HPVDNA解析と血清抗体測定は研究プロトコルおよびインフォームドコンセントに含まれており各施設IRBからの承認も得られており倫理的にはなんら問題がない。

①HPVジェノタイプ検査には、当研究室ですでに稼働しているL1コンセンサス・プライマーを用いるPCR-RFLP法を使用した。
②HPV16型の感染性偽ウイルス(PsV)を用いてフォローアップ開始時の血清中和抗体(NAb, neutralizing antibody)を検出した。PsVの感染価を半減させる最大血清希釈倍数をNA抗体価とし、抗体価40倍以上をNAb

陽性と判定した。

(2) がん検診陽性者における HPV ジェノタイプピン検査

子宮頸部細胞診異常を指摘されてコルポ診のために 2 次検診病院（筑波大学附属病院、土浦協同病院、筑波メディカルセンター病院、県立中央病院）を受診した患者を対象に、少なくとも 3 カ所以上からの十分な数の生検を行うとともに HPV タイピング検査（クリニチップ HPV）を行い、その臨床データを解析した。本研究は 4 施設の共同研究として各参加施設の倫理委員会の承認のもとに患者の同意を得て行われた。

① HPV ジェノタイプピン検査には、現在わが国で体外診断薬として承認されているクリニチップ HPV 検査キット（積水メディカル）を使用した。

② 各施設で採取された組織診標本は、筑波大学病理部にて中央診断を行った。

4. 研究成果

(1) 軽度前癌病変患者のフォローアップにおける HPV 検査の有用性の検討

① 高度前癌病変 CIN3 への進展に関するハザード比（ローリスクタイプを 1.00 として比較、CIN グレードや年齢で統計補正）は、病変より検出される HPV のタイプによって大きく異なった；16 型 (11.1, 95%信頼区間: 1.39-88.3)、18 型 (14.1, 0.65-306)、31 型 (24.7, 2.51-243)、33 型 (20.3, 1.78-231)、35 型 (13.7, 0.75-251)、52 型 (11.6, 1.45-93.3)、58 型 (8.85, 1.01-77.6)、他のハイリスク HPV タイプ (4.04, 0.47-34.7)。5 年以内に CIN3 へ進展するリスクは、HPV16/18/31/33/35/52/58 型陽性では 20.5%、その他のハイリスク HPV タイプでは 6.0%、ローリスクタイプでは 1.7%であった（図 1, $P=0.0001$ ）。

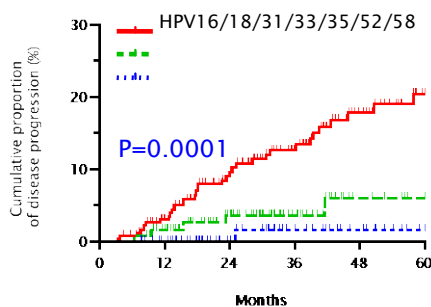


図 1 HPV タイプと CIN3 への進展リスク

これらのデータから、HPV タイピングは、LSIL/CIN1-2 病変の進展リスクの評価に有用であると考えられる。われわれのデータをもとにして、HPV タイピング検査は学会が

イドラインの前癌病変患者の管理指針に取り入れられ、「HPV16/18/31/33/35/45/ 52/58 のいずれかが陽性の場合の進展リスクは高く、それ以外の HPV 陽性例あるいは HPV 陰性例とは分けて管理することが勧められる」（推奨レベル B）と推奨されている（日本産科婦人科学会/日本産婦人科医会 産婦人科診療ガイドライン婦人科外来編 2011, CQ205）。

② HPV16 DNA 陽性の前癌病変患者（子宮頸部細胞診が LSIL かつ組織診が CIN1-2）42 名を 4 ヶ月毎に細胞診とコルポスコピーを用いてフォローした。フォローアップ期間中（平均 48.5 ヶ月）に 24 名で病変の消失が見られ、6 名が CIN3 へ進展した。HPV16 に対する NAb 陽性率は、コントロール血清（HPV16 DNA 陰性 LSIL/CIN1-2: $n=202$ ）と比べて著明に高率であった（59.5% vs. 8.4%; χ^2 test, $P<0.0001$ ）。HPV16 DNA 陽性 LSIL 患者のなかで、2 年以内に病変が自然消失する割合は NAb 陽性者で低く NAb 陽性者で病変が持続しやすい傾向がみられたが、有意差はなかった（51.2% vs. 62.5%; log-rank test, $P=0.24$ ）。一方、CIN3 へ進展した 6 名はすべて NAb 陽性であり、進展リスクには有意差を認めた（図 2, log-rank test, $P=0.03$ ）。抗体価と進展のリスクにはとくに関連が見られなかった。

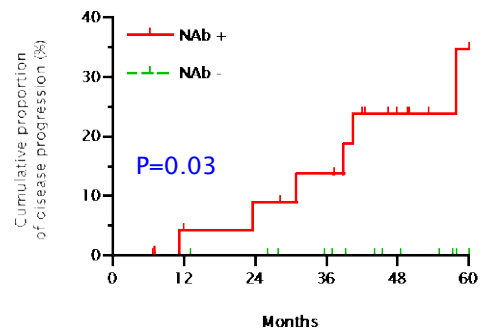


図 2 HPV16 中和抗体と CIN3 への進展リスク

中和抗体はそれまでの持続感染による抗原刺激を反映して産生されると考えられ、LSIL 患者における HPV 血清中和抗体の測定は CIN3 への進展リスクの評価に役立つ可能性がある。

(2) 軽度細胞診異常 (LSIL/ASC-US, $n=178$) において、HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 の 8 タイプ陰性者 ($n=69$) のなかには CIN3 以上の高度病変 (CIN3+) を有する患者はいなかった ($P=0.0004$)。すなわち、HPV タイピング検査は CIN3+ を有しない約 40%

(69/178) の低リスクの集団を区別できたことになる (CIN3+を検出するための感度 100%/特異度 44%/陽性適中率 18%/陰性適中率 100%)。一方、高度細胞診異常 (HSIL/ASC-H, n=173) では、HPV16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, 58 型の 8 タイプ陰性者はわずか 27 症例 (16%, 27/173) しかなく、しかもその中に CIN3+の患者が 10 名も含まれた (CIN3+を検出するための感度 89%/特異度 21%/陽性適中率 55%/陰性適中率 63%)。これらの結果から、HPV タイピング検査はがん検診陽性者の中で、LSIL/ASC-US 患者ではコルポ診を省略して細胞診による経過観察としてもよい低リスクの症例を区別するためのトリアージとして将来利用できる可能性がある。がん検診陽性者の中で、HSIL/ASC-H 患者は HPV タイピング検査の結果によってコルポ診を省略するトリアージは不可能であることがわかった。これらのデータは英文論文として発表の予定で準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Matsumoto K, Yoshikawa H. Human Papillomavirus Infection and Risk for Cervical Cancer in Japan. *J Obstet Gynecol Res* 2013; 39: 7-17. doi: 10.1111/j.1447-0756.2012.01977.x. 査読あり
- (2) Ochi H, Matsumoto K, Kondo K, Oki A, Furuta R, Hirai Y, Yasugi T, Takatsuka N, Maeda H, Mitsuhashi A, Fujii T, Kawana K, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Kanda T, Yoshikawa H for Japan HPV And Cervical Cancer (JHACC) Study Group, Do neutralizing antibody responses generated by human papillomavirus infections favor a better outcome of low-grade cervical lesions? *J Med Virol* 2012; 84: 1128-34. doi: 10.1002/jmv.23258. 査読あり
- (3) Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda

H, Yasugi T, Takatsuka N, Hirai Y, Mitsuhashi A, Fujii T, Iwasaka T, Yaegashi N, Watanabe Y, Nagai Y, Kitagawa T, Yoshikawa H. Predicting the Progression of Cervical Precursor Lesions by Human Papillomavirus Genotyping: A Prospective Cohort Study. *Int J Cancer* 2011; 128: 2898-2910. doi: 10.1002/ijc.25630. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 松本光司, 吉川裕之、要望講演 中央病理診断に基づく臨床研究：子宮頸部「LSIL/CIN1-2 患者の多施設共同コホート研究」、第 51 回日本臨床細胞学会秋期大会、2012 年 11 月 9 日、朱鷺メッセ、新潟
- (2) 松本光司、中村優子、島袋剛二、西出健、永井公洋、佐藤豊実、沖明典、吉川裕之、LSIL・HSIL トリアージのための HPV タイピング検査の有用性、第 64 回日本産科婦人科学術講演会、2012 年 4 月 14 日、神戸ポートピアホテル、神戸
- (3) 松本光司、沖明典、八杉利治、平井康夫、古田玲子、三橋暁、藤井多久磨、岩坂剛、八重樫伸生、渡部洋、長井裕、吉川裕之、ヒトパピローマウイルスのタイプと CIN3 への進展リスク、第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会、2011 年 8 月 29 日、リーガロイヤルホテル大阪、大阪
- (4) 越智寛幸、松本光司、近藤一成、古田玲子、平井康夫、八杉利治、沖明典、吉川裕之、HPV16 に対する血清中和抗体と子宮頸部前癌病変の消失・進展、第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会、2011 年 8 月 29 日、リーガロイヤルホテル大阪、大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 光司 (MATSUMOTO KOJI)
筑波大学・医学医療系・准教授
研究者番号：30302714

(2) 連携研究者

吉川 裕之 (YOSHIKAWA HIROYUKI)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号：40158415