

主 論 文

Comparison of the Hybrid Capture II Method with a PCR-Based Screening Method Using a Carboxyfluorescein-Labeled Primer for Detecting Human Papillomavirus in Cervicovaginal Liquid-Based Cytology

(子宮頸部液状化細胞診におけるヒトパピローマウイルス検出に対するカルボキシフルオレセイン標識したプライマーを用いた PCR を基にしたスクリーニング法と HC-II 法との比較)

[緒言]

ヒトパピローマウイルス (HPV) は、120 種類以上が同定されている DNA ウイルスであり、非発癌性の低リスク型と発癌性の高リスク型に分類される。

世界中において、子宮頸癌による死亡数は女性の癌としては 2 番目に多い。パパニコロウ検査は、子宮頸部上皮内腫瘍グレード 2 を超える病変 (CIN2+) の検出に対する診断感度は比較的乏しく、わずか 53-65% であると推定される。一方で、HPV-DNA 検査は CIN2+ 病変に対して 90% より高感度であることが報告されている。

ハイブリッドキャプチャーII (HC-II) 分析 (Qiagen) は、HPV-DNA を RNA プローブとハイブリダイズさせ、生成した DNA/RNA ハイブリッドをマイクロプレートに固相化した抗 DNA/RNA 抗体により捕捉し、化学発光により検出する方法である。近年では、PCR も HPV-DNA 検出のためのスクリーニング法として採用されている。加えて、多くの国が液状化細胞診 (LBC) 検体の有用性を承認し始めている。しかし、子宮頸部 LBC 検体を用いた PCR と HC-II 結果が一致するかどうかを評価した研究は少数である。さらに、カルボキシフルオレセイン (FAM) 標識されたプライマーを含む PCR と HC-II に関する HPV-DNA の検出を比較した研究は見られない。

本研究は、FAM 標識したプライマーを含む PCR が、子宮頸部 LBC 検体の HPV-DNA 検出に対して適用可能かどうかを評価するために、HC-II との比較を行った。

[方法]

1. 対象

西条中央病院にて、子宮頸部 LBC 検体を用いたパパニコロウ検査で意義不明な異型扁平上皮細胞 (ASCUS) と診断された 59 例を対象とした。これらは 2018 年の 7 月から 2019 年 1 月の間に収集された。

HC-II は全例、外注会社 (BML) において行われた。HC-II に用いるための綿棒 (妊

婦例：10例) またはブラシ(48例)で採取された検体(58例)は、輸送液チューブに入れて未固定の状態で保存された。子宮頸部LBCからの1例の残余検体はブラシ採取後にBD シュアパス™ コレクションバイアル (Becton, Dickinson and Company) において固定された。HC-II用の採取はASCUS診断の1か月以内に行われた。

2. PCR による HPV の検出

DNAはQIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN)を用いた。サンプルをマイクロチューブに入れ、Proteinase Kを添加して56°Cで1時間インキュベートし、溶液をQIAamp MinElute シリカメンブレンスピンカラムに添加後、Bufferによる洗浄で不純物を除去した。そして、シリカメンブレンに吸着したDNAをRNase(-)、DNase(-)のDWで溶出した。DNA濃度は、Nano Drop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて260nmの吸光度を測定することで求めた。

PCRはTaKaRa Taq™ (Takara Bio)を用いた。高リスク型HPV(16, 18, 31, 33, 35, 52b, 58型)を検出するためのforward primerと低リスク型HPV(6, 11型)を検出するためのforward primerを用いた。カルボキシフルオレセイン(FAM)標識されたconsensus primerは両方のforward primerに挿入された。PCRはサーマルサイクラーを用いて40サイクル繰り返した。

キャピラリー電気泳動はABI PRISM® 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いた。そしてABI PRISM® GeneMapper Software Version 3.0 (Applied Biosystems)にて解析された。HPVのE6とE7を含む領域(228-268bp)をPCR増幅し、そのバンドサイズに一致してピークが検出された場合にHPV-DNA陽性として検体を定義した。

3. 統計解析

一致性を評価するため、カッパ統計量を用いた。解釈は、Landisらによって提唱された基準を参考にした。0.81~1.00「Almost perfect」、0.61~0.80「Substantial」、0.41~0.60「Moderate」、0.21~0.40「Fair」、0.00~0.20「Slight」、<0.00「Poor」の値を定義した。

[結果]

1. 高リスク型HPVの検出結果は96.6%の症例(57/59)で一致した。陽性一致率は77.8%(7/9)、陰性一致率は100%(50/50)であった。
2. カッパ統計値は、0.8557で「ほぼ完全な一致」であった。
3. 低リスク型HPV-DNAは3.4%の症例(2/59)において検出された。

[考察]

我々の結果は、欧州における Tsiodras ら (0.691) や Kulmala ら (0.669) と中央アメリカにおける Peyton ら (0.63) の報告よりも高い一致を示した。我々と Kulmala ら及び Peyton らの報告における HC-II で対象の HPV 亜型は、高リスク型 (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 型) の 13 種類で同一であった。しかし、Tsiodras らによって行われた HC-II は、5 つの低リスク型 HPV (6, 11, 42, 43, 44 型) を含んだ。HC-II において、HPV-DNA は Tsiodras らによって 20.4% (260/1270) と Peyton らによって 12.5% (26/208)、Kulmala らによって 33.7% (509/1511) において検出された。Peyton らの報告における PCR で対象の HPV 亜型は、上述の 13 種以外にも 20 種類が含まれた。我々の PCR においては高リスク型 HPV の 7 種を標的としたが、Tsiodras らは 22 種類、Kulmala らは 12 種類であった。PCR は、Tsiodras らによって 31.3% (397/1270) と Peyton らによって 24.5% (51/208)、Kulmala らによって 36.6% (553/1511) において HPV-DNA を検出した。我々は標的とした HPV 亜型の違いが、PCR と HC-II との一致率に影響を与えたと推定する。

我々の研究において、PCR (16, 18, 31, 33, 35, 52 そして 58) によって HPV 陽性である全ての検体は HC-II においても陽性であるということが発見された。Tsiodras らによる PCR は HC-II と比較して HPV の亜型を追加で 4 種類検出可能であった、そしてさらに 7 種類の型は PCR によってのみ解析可能であった。したがって、我々の結果における高い一致率は、PCR によってのみ検出される HPV 亜型を含まなかったためかもしれない。

我々の研究において、2 例の低リスク型 HPV-DNA (3.4%) を検出した。これは Beyazit らの結果と同等である。低リスク型 HPV は性器疣贅報告例の 90% 以上において確認されている。性器疣贅はコイロサイトーシスのような細胞変化の特徴があるため、HPV 型 6 と 11 を含むプライマーを用いる PCR は、亜型の鑑別において効果的であると考えられる。

[結論]

FAM 標識したプライマーを用いた我々の HPV-PCR からの高リスク型 HPV の検出結果は、HC-II で得られた結果とほとんど完全な一致を示した。これは、我々の HPV-PCR が子宮頸部 LBC で採取された検体に対して適用可能であるということを示唆している。