

Title	Single-stranded conformational polymorphism法を用いた高感度HPV重感染検出法の開発
Sub Title	
Author	中川, 博之(Nakagawa, Hiroyuki) 野澤, 志朗
Publisher	慶應医学会
Publication year	2005
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.82, No.3 (2005. 9) ,p.T231- T243
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	学位論文
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20050901-0231

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

学位論文

Single-stranded conformational polymorphism 法を用いた
高感度 HPV 重感染検出法の開発

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導：野澤志朗教授)

なか がわ ひろ ゆき
中 川 博 之

(平成 16 年 10 月 19 日受付)

Key Words : human papillomavirus, cervical neoplasia, single-stranded conformational polymorphism

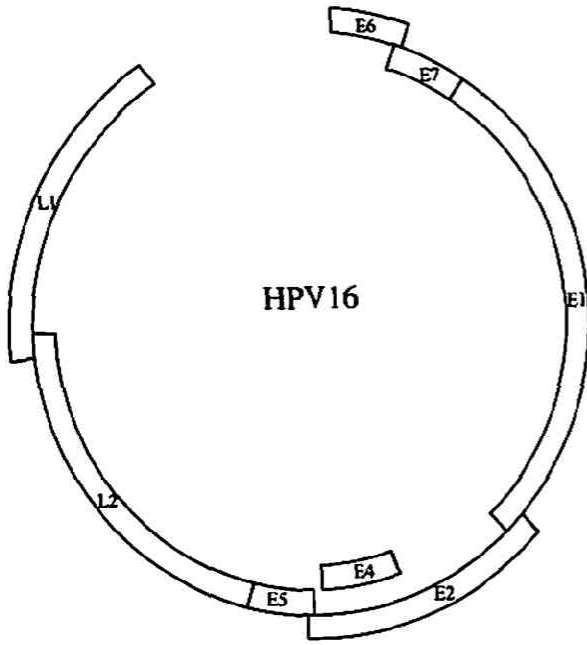
子宮頸癌は、古くからの疫学的検討により、初交年齢が低い、本人あるいは夫の性的パートナーの数が多く、性感染症の既往がある、などの危険因子をもつ女性に多く見られることから、子宮頸部の発癌には性行為によって感染する何らかの因子が関与すると推定されていた。1980年代になり分子生物学的手法が発達するにつれ、異形成あるいは子宮頸癌組織でヒトパピローマウイルス (human papillomavirus) (以下、HPV) が高率に検出されることが報告され、HPV が子宮頸部における発癌因子の一つとして認識されるようになった^{2)~6)}。HPV は、そのゲノムとして約 8000 塩基対の環状 2 本鎖 DNA をもつウイルス (第 1 図) で、皮膚や粘膜の細胞に感染する。ウイルスの遺伝子としては初期遺伝子として E1 から E7 があり、これらはウイルス遺伝子の転写や複製に関与している。一方、後期遺伝子として L1 と L2 があり、ウイルスゲノムを被うカプシドと呼ばれる殻を形成する蛋白質の生成に関与している。HPV には現在 80 種以上の型が報告されており、子宮頸部においては、コンジローマ、異形成、癌などの病変の違いや進行度によって、検出される型に違いがあることが指摘されている⁷⁾。正常粘膜や軽度異形成では検出されるものの、癌ではほとんど検出されない型もあれば、軽度異形成から扁平上皮癌と病変が進行するにつれ高頻度に検出される型もあることから、癌に対するリスクに応じて HPV を分類する試みがなされている^{8)~9)}。癌で検出されるものを high risk 群、癌では検出が稀なものを low

risk 群とする分類法であるが、個々の HPV をどの群に分類するかについては、統一的な見解は現在のところ得られていない。ただし、HPV16 型と 18 型については、high risk 群として取り扱う研究者がほとんどであり、今回の検討でも HPV16 型、18 型、その他の型といった分類を用いている。

high risk 群の中でも、HPV16 型は子宮頸癌において最も高頻度に検出されるため、早くから解析が進められてきた。現在のところ、HPV16 型由来の E6 蛋白質および E7 蛋白質が、それぞれ P53 蛋白質、RB 蛋白質といった癌抑制遺伝子産物を不活化することや、異形成のうち HPV16 型の感染が見られるものは病変が進行あるいは持続しやすいことが指摘されており^{10)~15)}、high risk 群の HPV の感染は子宮頸部発癌において非常に重要なリスクファクターのひとつであるといえる。さらに、近年 HPV に対するワクチンの開発が進められているが、ワクチンの効果は型特異的にのみ見られることが指摘されている^{16)~19)}。それゆえ、高感度に HPV を検出し、正確に型決定することが臨床的にも重要となってきた。

HPV の検出には polymerase chain reaction 法 (以下、PCR 法) を応用した方法が汎用されている。特に L1 領域は HPV 型による差異が少ないため、この領域に共通プライマーを設定し、一回の PCR で未知の型を含め多数の HPV を検出できる L1 PCR 法が広く行われている^{20)~22)}。一方、HPV の型決定には、型特異的なプローブを用いたサザンブロット法、型特異的なプライマー

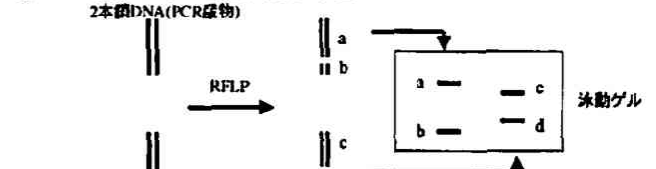
本論文は、Nakagawa H, Sugano K, Fujii T, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S : Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res.* 22(3) : 1655-60, 2002 の一部を含む。



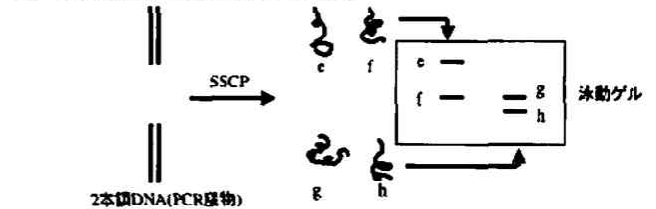
第1図 HPV16型の遺伝子配列

E1~E7は初期遺伝子のORF (open reading frame)で、感染の初期 (Early) に発現し、ウイルスの増殖や複製に関与する。L1~L2は後期遺伝子のORFで、感染の後期 (Late) に発現し、ウイルス粒子の表面蛋白質であるカプシドを構成する。

① RFLP法によるHPV型決定の原理



② SSCP法によるHPV型決定の原理



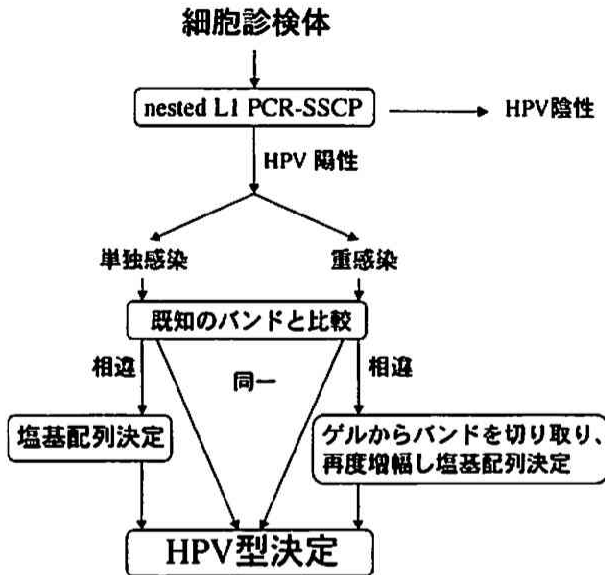
第2図 L1 PCR-RFLP法とnested L1 PCR-SSCP法によるHPV型決定の原理

- ①L1 PCR-RFLP法では、PCR産物を数種類の制限酵素で切断し、その泳動パターンから型決定を行う。
- ②L1 PCR産物はその長さはHPV型に関わらず約250塩基対ではほぼ一定であるが、その塩基配列は異なる。これを非変性ゲル上で1本鎖にすると、その塩基配列により様々な高次構造をとる。この高次構造の違いにより移動度に差がでることをHPVの型決定に応用した。

を用いたPCR法^{24), 25)}、直接塩基配列を決定する方法、ドットプロット法、ハイブリッドキャプチャー法などがある。吉川ら²⁶⁾はL1 PCR産物にたいしてRFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析を行い型決定する方法 (以下、L1 PCR-RFLP法) (第2図①) を報告している。

L1 PCR法を用いると、異形成症例の10~30%にHPVの重感染が認められるとする報告^{27)~30)}がある。HPVの重感染の病的意義については、HPVの単独感染に比して子宮頸癌の発生リスクを低下させるという報告³¹⁾もあるが、HPVの持続感染に関わるとする報告³²⁾や、より高度の異形成へ進行するリスクを高めるとする報告^{27), 30), 33)}もあり、いまだに定説とされるものはない。HPVの重感染の病的意義を検討するためには、重感染を高感度に検出し、かつ正確に型決定することが必要である。そのため、今回我々はPCR-Single-stranded conformational polymorphism法 (以下、PCR-SSCP法) に着目し、L1 PCR法と組み合わせてより高感度にHPVの重感染を検出する方法 (nested L1 PCR-SSCP法) を今回新たに開発した³⁴⁾。PCR-SSCP法は、2本

鎖DNAであるPCR産物を1本鎖に分離し、非変性ゲルを用いて電気泳動することにより、塩基配列の違いを移動度の違いとして検出する方法である^{35), 36)}。この条件下では、1本鎖DNAが塩基配列の違いを反映した高次構造をとることから、一塩基多型などの微細な塩基配列の違いを移動度の違いとして検出できると考えられている。HPV型間でのL1領域における塩基配列の相同性は90%以下であることから、PCR-SSCP法はHPVの重感染があった場合に同時に複数のL1 PCR産物を互いに影響を受けることなく判別が可能だと予想される (第2図②)。今回我々は、PCR-SSCP法の特性を応用し、より高感度にHPVの重感染を検出する方法として、新たにnested L1 PCR-SSCP法を開発し、その感度や検出スペクトラムについて検討した。そして、異形成および子宮頸癌症例の細胞診検体に対してnested L1 PCR-SSCP法を用いてHPVの重感染の頻度について検討した。さらに、異形成95例について本法によるHPV検出・型決定の結果とL1 PCR-RFLP法による結果³⁷⁾とを比較し、nested L1 PCR-SSCP法が優れた方法であることを明かにした。



第3図 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出・型決定の流れ
今回の検討の流れを図示した。

対象と方法

1. 対象および方法

慶應義塾大学病院産婦人科およびその関連施設を受診し、それぞれ informed consent を得た患者 283 例より採取した子宮頸部細胞診検体を対象とした。今回の nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出・型決定の流れを第3図に図示する。

子宮頸癌取扱い規約³⁸⁾に準拠して、それぞれ病理組織診により診断された、正常 64 例、軽度異形成 32 例、中等度異形成 41 例、高度異形成 31 例、上皮内癌 79 例、扁平上皮癌 27 例、腺癌 9 例について検討した。サイトブラシあるいはサイトピックを用いて子宮頸部より細胞を採取し、1 ml のリン酸 buffer を入れたエッペンドルフチューブ内で洗浄し、4℃、7000 回転、5 分間遠心し、ペレットをマイナス 80℃で保存した。DNA の抽出は、通常の sodium dodecyl sulfate-proteinase K 法を用いた。

2. nested L1 PCR

プライマーとして L1C1, L1C2, L1C3 の 3 種を使用した。L1C1 および L1C2 は吉川ら²⁵⁾が報告している。L1C3 (5'-GTT TTC CCT ATT TTT TTT CAG ATG-3') は L1C1 の 7 塩基下流に新たに作成したコンセンサ

L1C1	5'-CGTAAAGCTTTTCCTATTTTTTT-3'	相当する塩基配列番号
L1C1	5'-GTTTTCCTATTTCCTCAGATG-3'	
HPV16	-----A--A-----	5609-5639
HPV18	-----G-----G-----	5585-5615
HPV6	-----A-----TA-----	5761-5791
HPV31	-----G-AT-A-----A-----	5524-5554
HPV33	-----A-----A-----	5566-5596
HPV51	-----A-A-----A-----	5493-5523
HPV52	-----A-----A-----	5615-5645
HPV58	-----A-----G-----	5615-5645

L1C2	3'-GTTATGCTCATAAATCCCAT-5'	
	5'-CAATACAGAGTATTTAGGGTA-3'	
HPV16	-----G-----AA--	5841-5861
HPV18	-----T-----G-----	5817-5836
HPV6	-----C-----A--G-----	5984-6003
HPV31	-----T-G-----T-----	5759-5778
HPV33	-----T-G-T-----C-----	5801-5820
HPV51	-----G-----A-----	5722-5742
HPV52	-----C-----AA-T-----	5857-5876
HPV58	--G--T--G--C-----G-----	5851-5870

第4図 今回使用した L1 共通プライマーと代表的な HPV との比較

コンセンサスプライマーとして使用した L1C1, L1C2, L1C3 の塩基配列を代表的な high risk HPV の L1 領域と比較した。塩基配列の異なる部分のみ表示してある。L1C3 は今回新たに作成した L1 コンセンサスプライマーである。

プライマーである (第4図)。第1回目の PCR はプライマーとして L1C1 と L1C2 を使用し、以下の条件で行った。2.5 μl の DNA 検体に 22.5 μl の PCR 反応液 (その最終濃度は 50 mM の KCl, 10 mM の Tris-HCl pH 8.4, 1.5 mM の MgCl₂, 200 μM の dNTP, 1 μM のプライマーセット, 0.625 unit の Taq DNA polymerase) を加え攪拌し、94℃で5分間を1サイクル; 94℃で1分間, 50℃で1分間, 72℃で1分間を15サイクル; 72℃で7分間を1サイクルとした。第2回目の PCR にはプライマーとして L1C2 と L1C3 を使用し、以下の条件で行った。2.5 μl の第1回目 PCR 産物に 22.5 μl の PCR 反応液 (同上) を加え攪拌し、94℃で5分間を1サイクル; 94℃で1分間, 50℃で1分間, 72℃で1分間を30サイクル; 72℃で7分間を1サイクルとした。増幅産物は 8% polyacrylamide gel 上で電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を行い約 250bp のバンドが確認できたものを HPV 陽性、確認できなかったものを HPV 陰性とした。

3. HPV の型決定

2 μl の増幅産物を 10 μl の SSCP 反応液 (90% の formamide, 20 mM の EDTA, 0.05% の xylene cyanol, 0.05% の bromphenol blue) と混合し、80℃で5分間反応させたのち、10% の polyacrylamide gel (90 mm (高) × 88 mm (幅) × 1 mm (厚), 30 : 1, acrylamide :

bisacrylamide 比, Tris/Glycine buffer (25 mM の Tris, 192 mM の glycine を含む) 上で 200 V, 3 時間泳動した。泳動 buffer として上記 Tris/Glycine buffer を使用した。泳動中は恒温槽を用いて polyacrylamide gel の温度を 18°C に保った。泳動後の gel は、銀染色キット (2D-silverstain, 第一化学, 東京) を用いて染色し、検討した。ほとんどの症例で同時に泳動する既知の HPV 型 (16 型と 51 型, 場合によってはその他の型) と比較することにより nested L1 PCR-SSCP 法のみで型決定が可能であったが、一部の症例では下記のように直接塩基配列を確認することが必要であった。

4. オートシーケンサーによる解析

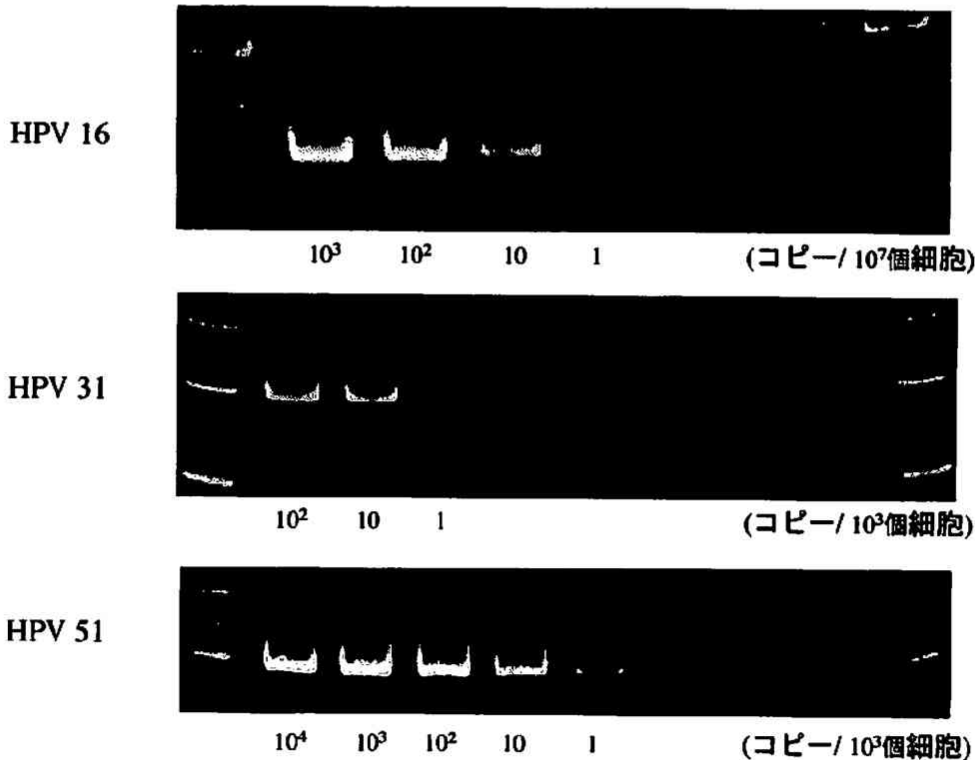
nested L1 PCR-SSCP 法のみでは HPV 型決定が不可能であった症例のうち、単一の HPV による感染の場合は直接 L1 PCR 産物を鋳型として使用した。重感染の場合はゲルよりそれぞれのバンドを切り取り、20 μ l の TE buffer 内でホモジェナイズし、95°C で 5 分間加熱

した後、12000 回転で 10 分間遠心し、上清を前記 nested PCR の第 2 回目の PCR と同様の条件で増幅したものを鋳型として使用した。

解析の直前に PCR product pre-sequencing kit (Amersham LIFE SCIENCE INC., IL) にて PCR 産物を処理し、Bigdye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit™ (PE Applied Biosystems, Inc., CA) を用いてシーケンス反応を行った。オートシーケンサーは、Long-read sequencing capillary™ と POP-6™ sequencing polymer (PE Applied Bio Systems, Inc., CA) を装着した Genetic Analyzer 310™ (PE Applied Biosystems, Inc., CA, USA) を用いた。塩基配列決定用のプライマーとしては上述の LIC3 を用いた。

5. 異形成 73 例の予後の解析

軽度異形成 32 例, 中等度異形成 41 例の合計 73 例のうち、1 年以上経過観察可能で、初回検査時に 1 種類以



第 5 図 nested L1 PCR-SSCP 法の感度

HPV16, 31, 51 各型の PCR 産物 (LIC1, LIC2 により増幅されたもの) を蒸留水を用いて段階的に希釈し、0.1 μ g/ μ l の濃度のヒト genomic DNA に混入したものを用いて nested L1 PCR-SSCP 法の検出感度を検討した。HPV16 型では 10^7 個の細胞あたり 1 コピーまで、HPV 31, 51 の各型では 10^3 個の細胞あたり 1 コピーまで検出された。(Nakagawa H et al: Anticancer Res 22: 1655-1660, 2002 の Figure 1 を許可を得て転載)

上の high risk HPV の感染が認められた 44 例について HPV の重感染の有無と病変の進展、不変、退縮との関連について χ^2 検定を用いて後方視的に検討した。その際、病変の進展とは、軽度あるいは中等度異形成が高度異形成あるいは上皮内癌に進行した場合とした。また、病変の退縮とは、異形成が消失した場合とし、不変とは、病変が軽度あるいは中等度異形成のまま持続している場合とした。なお、今回の検討では過去の報告^{39), 40)}にならない、16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 56, 58 の各型を high risk HPV とした。

6. nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法の比較

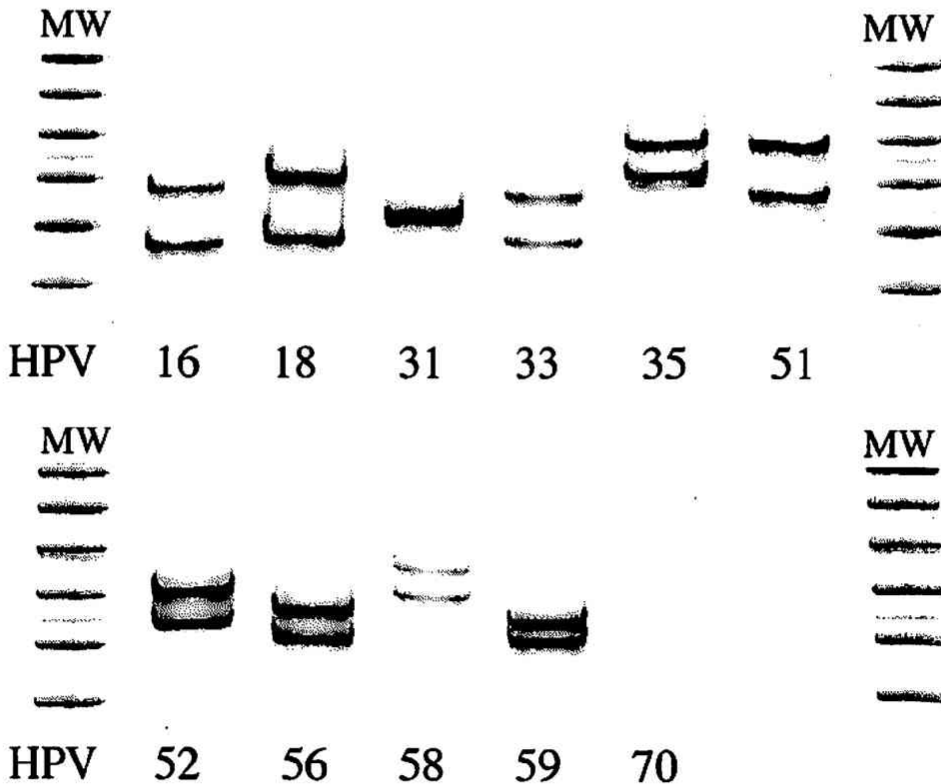
今回検討した異形成 104 例のうち、95 例について本法による HPV 検出・型決定の結果と L1 PCR-RFLP 法による結果³⁶⁾とを比較し、nested L1 PCR-SSCP 法の

特徴について解析した。

結 果

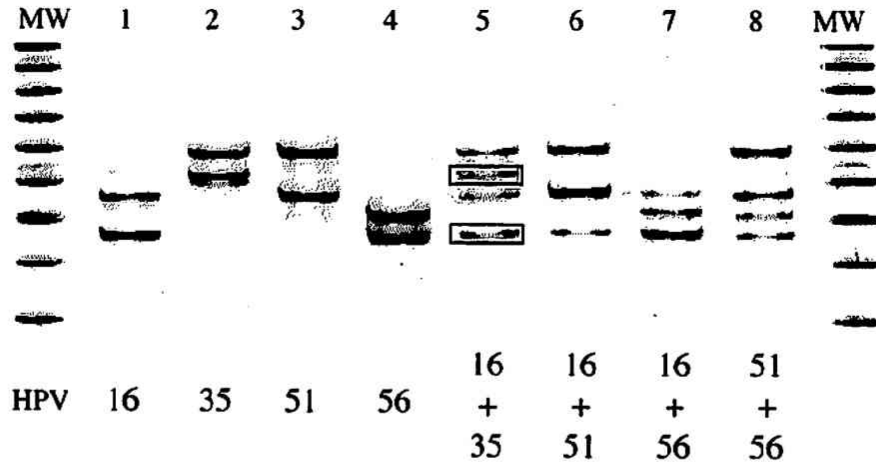
1. nested L1 PCR-SSCP 法の感度

HPV16, 18, 31, 51, 52 各型の PCR 産物 (L1C1, L1C2 により増幅されたもの) を蒸留水を用いて段階的に希釈し、それぞれ 25 μ l の反応液に 0.25 μ g のヒト genomic DNA を混入して nested L1 PCR 法の検出感度を検討したところ、HPV16 型では 10^7 個の細胞あたり 1 コピーまで、HPV31, 51 の各型では 10^3 個の細胞あたり 1 コピーまで検出された (第 5 図)。HPV18, 52 の各型においても 10^3 個の細胞あたり 1 コピーまで検出された。



第 6 図 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出・型決定解析例

オートシーケンサーにより確認された HPV16, 18, 31, 33, 35, 51, 52, 56, 58, 59, 70 型の L1 PCR 産物を nested L1 PCR-SSCP 法にて解析した。これらは子宮頸部の腫瘍性病変において高頻度に検出される HPV 型であるが、nested L1 PCR-SSCP 法により型決定が可能であることが示された。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Figure 2 を許可を得て転載)



第7図 nested L1 PCR-SSCP 法による単独感染と重感染の解析例

HPV16, 35, 51, 56各型による4例の単独感染例 (lanes1-4) と、4例の重感染例 (lanes5-8) の移動度を示す。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Figure 3 を許可を得て転載) それぞれの HPV 型の移動度は、重感染例においても、単独感染例における移動度と同一であった。

重感染例で、SSCP 法のみでは型決定できなかった例については SSCP ゲルよりバンドを図のように切り取って再度増幅しオートシーケンサーにより解析した。

2. nested L1 PCR-SSCP 法による HPV 検出スペクトラムと HPV 重感染検出例

オートシーケンサーにより確認された HPV16, 18, 31, 33, 51, 52, 56, 58, 59, 70 型の L1 PCR 産物を nested L1 PCR-SSCP 法にて解析した (第6図)。これらは子宮頸部の腫瘍性病変において高頻度に検出される HPV 型であるが、nested L1 PCR-SSCP 法により型決定が可能であることが示された。第7図には、4例の重感染例と、それぞれの HPV 単独での移動度を示す。それぞれの HPV 型の移動度は、重感染例においても、単独感染例における移動度と同一であった。

3. nested L1 PCR-SSCP 法による細胞診検体からの HPV DNA 検出・型決定

nested L1 PCR-SSCP 法にて 283 例の子宮頸部細胞診検体 (正常 64 例, 軽度異形成 32 例, 中等度異形成 41 例, 高度異形成 31 例, 上皮内癌 79 例, 扁平上皮癌 27 例, 腺癌 9 例) を解析したところ、22 種類の HPV 型が検出された。これらの PCR 産物の塩基配列を検したところ、22 種類中 18 種類 (6, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 42, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 70 の各 HPV 型) は既に報告されている HPV 型であり、4 種類は未知の HPV 型であった。HPV の陽性率は、

第1表 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV DNA 陽性率 (単独感染あるいは重感染で分類)

病理診断	計	HPV 単独感染	HPV 重感染
正 常	8/64(12.5%)	7(10.9%)	1(1.6%)
軽度異形成	32/32(100%)	19(58.1%)	13(41.9%)
中等度異形成	40/41(97.6%)	26(63.5%)	14(34.1%)
高度異形成	31/31(100%)	21(67.7%)	10(32.3%)
上皮内癌	65/79(82.3%)	57(72.2%)	8(10.1%)
扁平上皮癌	21/27(77.8%)	20(74.1%)	1(3.7%)
腺 癌	5/9(55.6%)	5(55.6%)	0(0%)

*p<0.0001

nested L1 PCR-SSCP 法にて 283 例の子宮頸部細胞診検体 (正常 64 例, 軽度異形成 32 例, 中等度異形成 41 例, 高度異形成 31 例, 上皮内癌 79 例, 扁平上皮癌 27 例, 腺癌 9 例) を解析した結果を第1表, 第2表にまとめた。異形成では、HPV はほとんどの例で検出され、そのうち約 40% に重感染が見られた。上皮内癌, 扁平上皮癌では、約 80% で HPV が検出され、重感染は上皮内癌の 8 例と微小浸潤癌の 1 例を除いて検出されなかった。さらに、腺癌では重感染は検出されなかった。異形成と子宮頸癌の間で HPV の単独感染あるいは重感染について χ^2 検定を施行したところ、有意差 (p<0.0001) をもって異形成で重感染が高率に認められた。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Table 1 を許可を得て転載)

第2表 nested L1 PCR-SSCP 法による HPV DNA 陽性率 (HPV16 型, 18 型, その他の型で分類)

病理診断	計	HPV16	HPV18	その他
正 常	8/64(12.5%)	1(1.6%)	1(1.6%)	6(9.4%)
軽 度 異 形 成	32/32(100%)	2(6.3%)	3(9.4%)	27(84.4%)
中 等 度 異 形 成	40/41(97.6%)	10(24.4%)	3(7.3%)	27(65.9%)
高 度 異 形 成	31/31(100%)	10(32.3%)	2(6.5%)	19(61.3%)
上皮内癌	65/79(82.3%)	35(44.3%)	3(3.8%)	27(34.1%)
扁平 上皮癌	21/27(77.8%)	14(51.9%)	1(3.7%)	6(22.2%)
腺 癌	5/9(55.6%)	0(0%)	5(55.6%)	0(0%)

*p<0.0001

HPV16 型は病変が進行するにともない検出率が高くなった。HPV18 型は異形成および扁平上皮癌では非常にまれ (12/210, 5.7%) で、腺癌で有意 (p<0.0001) に高頻度に認められた (5/9, 55.6%)。HPV16 型, 18 型の感染率とその他の HPV の感染率とを同様に検討したところ、やはり有意差 (p<0.0001) をもって子宮頸癌で HPV16 型, 18 型の感染が多く、異形成でその他の HPV の感染が高率に認められた。(Nakagawa H et al : Anticancer Res 22 : 1655-1660, 2002 の Table 1 を許可を得て転載)

正常 (8/64, 12.5%)、軽度異形成 (32/32, 100%)、中等度異形成 (40/41, 97.6%)、高度異形成 (31/31, 100%)、上皮内癌 (65/79, 82.3%)、扁平上皮癌 (21/27, 77.8%)、腺癌 (6/9, 66.7%) であった。異形成では、HPV はほとんどの例で検出され、そのうち約 40% に重感染が見られた。上皮内癌、扁平上皮癌では、約 80% で HPV が検出され、重感染は上皮内癌の 8 例と微小浸潤癌の 1 例を除いて検出されなかった。さらに、腺癌では重感染は検出されなかった。異形成と子宮頸癌の間で HPV の単独感染あるいは重感染について χ^2 検定を施行したところ、有意差 (p<0.0001) をもって異形成で重感染が高率に認められた (第 1 表)。HPV16 型は、正常 (1/64, 1.6%)、軽度異形成 (2/32, 6.3%) ではほとんど検出されないが、中等度異形成 (10/41, 24.4%)、高度異形成 (10/31, 32.3%)、上皮内癌 (35/79, 44.3%)、扁平上皮癌 (14/27, 51.9%) と病変が進行するにともない検出率が高くなった。HPV18 型は異形成および扁平上皮癌では非常にまれ (12/210, 5.7%) で、腺癌で有意 (p<0.0001) に高頻度に認められた (5/9, 55.6%)。HPV16 型, 18 型の感染率とその他の HPV の感染率とを同様に検討したところ、やはり有意差 (p<0.0001) をもって子宮頸癌で HPV16

型, 18 型の感染が多く、異形成でその他の HPV の感染が高率に認められた (第 2 表)。

4. 重感染と異形成の予後

今回検討した軽度異形成 32 例, 中等度異形成 41 例の合計 73 例のうち 1 年以上経過観察可能で、high risk の HPV が検出されたものは 44 例あり、16 例に重感染が、28 例に単独感染が検出された。重感染と判定されたものの中では、進展したものが 4 例 (4/16, 25.0%)、不変 5 例 (5/16, 31.3%)、退縮 7 例 (7/16, 43.8%) であった。単独感染と判定されたものの中では、進展したものが 5 例 (5/28, 17.9%)、不変 11 例 (11/28, 39.3%)、退縮 12 例 (12/28, 42.9%) であった。 χ^2 検定を用いて検討したが、HPV の重感染あるいは単独感染と予後との関連は認められなかった。

5. nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法の比較

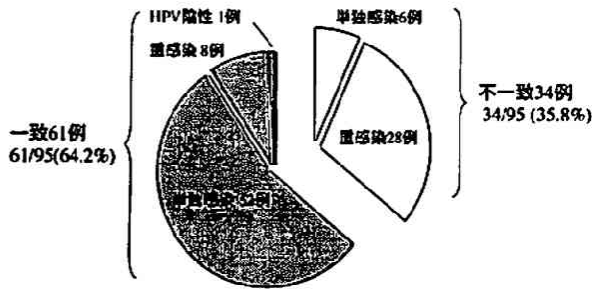
L1 PCR-RFLP 法によると、検討を行った異形成 95 例中 84 例 (88%) で HPV が検出され、9 例 (10.6%) で重感染が認められた。nested L1 PCR-SSCP 法によると、94 例 (99%) で HPV が検出され、36 例 (38.3%) で重感染が認められた (第 3 表)。nested L1 PCR-SSCP 法が HPV の単独感染、重感染の双方ともに、より高感度に検出できることが示された。第 8 図に両法の型決定結果を示す。61 例 (61/95, 64.2%) において結果が一致したが、34 例 (34/95, 35.8%) では結果が相違した。結果が一致した 61 例中、重感染が見られたのは 8 例 (13.1%) で、結果が相違した 34 例中 28

第3表 L1 PCR-RFLP 法と nested L1 PCR-SSCP 法による型決定結果の比較 (異形成 95 例の検討)

	L1 PCR-RFLP 法 ²⁾	nested L1 PCR-SSCP 法
単独感染	75 (78.9%)	58 (61.1%)
重感染*	9 (9.5%)	36 (37.9%)
未検出	11 (11.6%)	1 (1.1%)

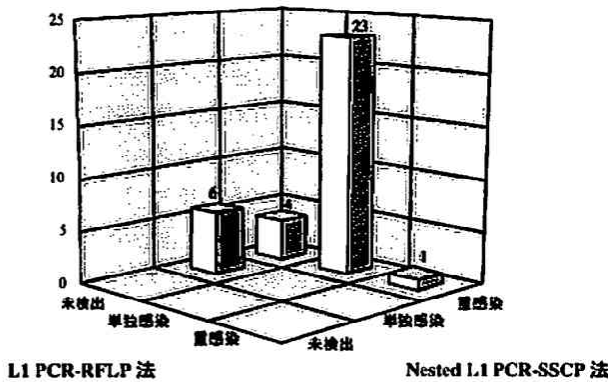
*p<0.0001

今回検討した異形成 104 例のうち、95 例については吉川らが同一検体を用いて L1 PCR-RFLP 法で解析している²⁾。彼らの報告によると、95 例中 84 例 (88%) で HPV が検出され、9 例 (10.6%) で重感染が認められた。我々が nested L1 PCR-SSCP 法を用いて同一の検体を解析したところ、94 例 (99%) で HPV が検出され、36 例 (38.3%) で重感染が認められた。nested L1 PCR-SSCP 法を用いることにより高感度に HPV の重感染を検出できることが示された。



第8図 nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法の型決定結果の比較

61例 (61/95, 64.2%) において結果が一致したが、34例 (34/95, 35.8%) では結果が相違した。結果が一致した61例中重感染が見られたのは8例 (13.1%) で、結果が相違した34例中28例 (82.4%) は重感染例であった。結果が相違したものについて塩基配列から型決定を行ったところ、nested L1 PCR-SSCP 法による結果と一致した。このことから、nested L1 PCR-SSCP 法は L1 PCR-RFLP 法に比較して、特に重感染例で正確に HPV を検出・型決定可能であることが示された。



第9図 Nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法による HPV 型判定結果不一致例 34 例の検討 (その1)

結果不一致例 34 例について、未感染、単独感染、重感染で区分して検討した。不一致例は L1 PCR-RFLP 法で未検出、あるいは単独感染とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法では重感染とされたものが多かった。このことは、nested L1 PCR-SSCP 法の重感染に対する検出感度が高いことを示している。

第4表 nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法による HPV 型判定結果不一致例 34 例の検討 (その2)

HPV 型判定結果	nested L1 PCR-SSCP 法	
	HPV16 陽性	HPV16 陰性
L1 PCR-RFLP 法 ²⁹⁾ HPV16 陽性	2 例	4 例
L1 PCR-RFLP 法 ²⁹⁾ HPV16 陰性	2 例	26 例

HPV16 型は、high risk HPV のなかでも代表的なものであり、HPV16 型に対する特異度は非常に重要である。nested L1 PCR-SSCP 法は重感染を検出する感度が優れているだけでなく、とくに HPV の重感染が見られる場合には HPV16 型に対する特異度も優れている。

例 (82.4%) は重感染例であった。nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法とで結果が相違したものについては、直接塩基配列から型決定を行ったところ、nested L1 PCR-SSCP 法による結果が正しいことが判明した。結果不一致例 34 例について、未検出、単独感染、重感染で区分して検討した (第9図)。10 例は L1 PCR-RFLP 法で未検出とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法によると 6 例は単独感染で、4 例は重感染であった。23 例は L1 PCR-RFLP 法で単独感染とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法では重感染であった。1 例は両法とも重感染であったが、その HPV 型が異なるものであった。さらに、結果不一致例 34 例について、HPV16 型陽性あるいは陰性で区分して検討した (第4表)。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陽性とされた6例中4例は nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陰性であった。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陰性とされた28例中2例は nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陽性であった。

考 察

我々は子宮頸部における HPV 重感染の自然史についてより正確に解析するために、新たな HPV 検出・型決定法として nested L1 PCR-SSCP 法を開発した。SSCP 法は非変性 gel 上で一本鎖 DNA を泳動し、その高次構造による移動度の差を利用し、微細な塩基配列の違いを検出する方法である。しかし、一本鎖 DNA の高次構造は泳動条件、特に温度の違いにより容易に変化するため、SSCP 法による移動度は再現性に乏しいという欠点があった。今回の検討では、恒温槽を利用して泳動中の gel の温度を厳密にコントロールすると同時に既知の HPV 型の L1 PCR 産物をマーカーとして使用することにより

再現性を確保した。

通常の解析では、HPV16型と51型をマーカーとして使用した。この理由として以下の2点がある。

- (1) 子宮頸部の腫瘍性病変で検出される HPV のバンドのほとんどが HPV16 型の下方のバンドと HPV51 型の上方のバンドの間にはいるため比較の対象として適している。
- (2) HPV16 型は、子宮頸癌で最も重要かつ高頻度に検出される型である。

nested L1 PCR-SSCP 法をもちいて合計 283 例の子宮頸部細胞診検体を解析した結果を第 1 表にまとめた。HPV の重感染は正常例では 1 例 (1/64, 1.6%)、異形成においては 37 例 (37/104, 35.6%)、上皮内癌では 8 例 (8/79, 10.1%) に認められたが、浸潤癌では微小浸潤癌の 1 例のみであった (1/36, 2.8%)。従来の報告でも、子宮頸部の細胞診検体を L1 PCR を用いて解析し、異形成症例の約 10~30% に HPV の重感染を認めている^{27)~30)}。しかしながら、これらの報告では、正常例においても約 20~70% に HPV の感染を認めていることから、特異度に問題があるとする意見もある。これに対し、今回我々が確立した nested L1 PCR-SSCP 法では正常例での HPV 陽性率は 12.5% と比較的少ないにも関わらず、異形成例の 35.6% に HPV の重感染を認めている。このことから、nested L1 PCR-SSCP 法は、従来の方法に比較して HPV の重感染を検出するにあたり、感度、特異度ともに優れているといえる。

第 2 表に本法における解析結果を HPV16 型、18 型、あるいはその他の型の感染に分類して検討した結果を示した。浸潤癌では 16 型、18 型以外の HPV の検出率は 16.7% (6/36) と、異形成 (70.2%, 73/104) と比較し非常に低かった。HPV16 型は、異形成が進行するに伴い検出頻度が高くなり、HPV18 型は扁平上皮系の病変ではまれで、腺癌で有意に多く認められた。HPV16 型と 18 型のこういった傾向は、以前から疫学的には報告されている^{41)~44)}が、なぜそういう傾向がみられるのかは現在のところ不明である。

今回の検討では扁平上皮癌 27 例中 6 例 (22.2%)、腺癌 9 例中 4 例 (44.4%) では HPV が検出されなかった。これらは、今回の系で検出されない HPV が関わるためかもしれないし、HPV の関与しない発癌過程が存在するためかもしれない。あるいは、発癌過程において HPV DNA が宿主ゲノム DNA にインテグレートされる際に L1 領域が欠失したために、今回の検討では HPV を検出できなかったとも考えられる。

HPV 重感染の病的意義については未だに定説はない。Davidson ら³²⁾は 1126 人のアラスカ在住女性について検討し、HPV が検出されなかった人に比べ、16 型あるいは 18 型が検出された人は 7.1 倍、16 型、18 型に加えて 31 型、33 型、35 型が重複して検出された人は 14.4 倍高度異形成になるリスクが高かったと報告している。Becker ら²⁷⁾は高度異形成 201 例と正常 337 例について検討し、HPV 重感染例は単独感染あるいは HPV 感染の見られなかった症例に比較して 4.9 倍高度異形成になるリスクが高いと報告している。Sasagawa ら³⁰⁾は正常 1562 例と LSIL (low-grade squamous intraepithelial lesion⁴⁵⁾、軽度および中等度異形成に相当) 145 例、HSIL (high-grade squamous intraepithelial lesion⁴⁶⁾、高度異形成および上皮内癌に相当) 137 例、扁平上皮癌 72 例、腺癌 12 例、コンジローマ 16 例について検討し、正常例に比較して HPV 重感染例のオッズ比が、LSIL では 24 倍、HSIL では 16 倍、扁平上皮癌では 13 倍と有意に高いことから、HPV 重感染がこれらの病変と関連があると報告している。一方、Munoz ら³³⁾は子宮頸部扁平上皮癌 1918 例と正常 1928 例について検討し、子宮頸部扁平上皮癌になるリスクが、HPV の感染が見られない場合と比較して、HPV 単独感染例では 172.6 倍高く、重感染例では 114.9 倍高いことから、HPV 重感染は子宮頸部扁平上皮癌のリスクとはならないと報告している。

今回の検討では、重感染あるいは単独感染と異形成の予後との相関はみられなかった。その理由としては、症例数が少ないことと、そのために HPV16 型の感染が認められた症例が検討を行った軽度および中等度異形成 44 例中 5 例と少なかったことが考えられる。HPV16 型の感染が認められた 5 例中、単独感染例は 3 例で、うち 2 例が進展し、1 例が退縮した。重感染例は 2 例で、うち 1 例は進展し、1 例は不変であった。今後症例を重ねて検討する必要があると思われる。

また、今回確立した nested L1 PCR-SSCP 法は、既存の方法と比較してより高感度かつ正確に HPV の重感染を検出できる方法であるが、本法をもってしても浸潤癌では HPV の重感染が認められなかった。異形成および浸潤癌における HPV の重感染の頻度についての報告は多くないが、Munoz ら³³⁾は浸潤癌 1918 例中 109 例 (5.7%) に HPV の重感染が見られると報告している。Sasagawa ら³⁰⁾は LSIL 145 例中 30 例 (21%)、HSIL 137 例中 21 例 (15%)、扁平上皮癌 72 例中 9 例 (13%)、腺癌 8 例中 1 例 (8%) に HPV の重感染が見られると報告している。彼らの報告と併せて考えると、浸

潤癌でも HPV の重感染は見られるものの、異形成と比較するとその頻度ははるかに低いと考えられる。

子宮頸部における HPV の感染は、ほとんどの場合一時的なものであるが、ごく一部では感染が持続し、細胞の遺伝子の異常が加わるなどして異形成、癌へと病変が進行すると一般に考えられている。この過程における HPV 重感染の意義を考察するにあたり、まず最初の問題点は、重感染は一つの細胞に複数の HPV が感染した状態なのか、あるいは複数の細胞にそれぞれ別々の HPV が感染した状態なのか、という点である。この点に関しては現在のところ明確にはなっていないが、一般には後者の考えが自然だろうと思われる。また、Enomoto ら^{46), 47)}は、X 染色体のメチル化による不活化機構と密接に関わるアンドロゲン受容体遺伝子の多型性を利用してクローナリティ解析を行い、高度異形成、上皮内癌、浸潤癌はモノクローナルな病変であり、中等度異形成はポリクローナルな病変であることを明らかにしている。今回の結果と併せて考えると、重感染が見られる病変はポリクローナルであり、重感染が見られない病変はモノクローナル、すなわち真の腫瘍であるといえるかもしれない。

さらに、Gloria ら³³⁾は 608 人の女性を 6 ヶ月おきに 3 年間追跡したところ、HPV 重感染は 6 ヶ月以上持続する HPV 感染と関連することを報告している。また、Levi ら⁴⁸⁾は HIV (human immunodeficiency virus) 感染者に HPV 重感染が高頻度に見られることを報告している。これらのことから、HPV 重感染は、HPV に対する免疫能が弱いことを示しているのかもしれない。

今回確立した nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法とを、異形成 95 例の同一検体の HPV 検出・型判定を行うことにより比較したところ、nested L1 PCR-SSCP 法がより高感度に重感染を検出できた (第 3 表)。95 例中 34 例で両法の結果は一致せず、とくに結果不一致例では HPV の重感染が多かった (第 8 図)。結果不一致例 34 例について、未検出、単独感染、重感染で区分して検討した (第 9 図)。不一致例は L1 PCR-RFLP 法で未検出、あるいは単独感染とされたが、nested L1 PCR-SSCP 法では重感染とされたものが多かった。このことは、nested L1 PCR-SSCP 法の重感染に対する検出感度が高いことを示している。さらに、結果不一致例 34 例について、HPV16 型陽性あるいは陰性で区分して検討した (第 4 表)。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陽性とされた 6 例中 4 例は nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陰性であった。L1 PCR-RFLP 法で HPV16 型陰性とされた 28 例中 2 例は

nested L1 PCR-SSCP 法では HPV16 型陽性であった。これらの不一致例についても直接塩基配列を決定したが、nested L1 PCR-SSCP 法による結果が正しかった。HPV16 型は、high risk 群のなかでも代表的なものであり、HPV16 型に対する特異度は非常に重要である。このことから、nested L1 PCR-SSCP 法は重感染を検出する感度が優れているだけでなく、とくに重感染が見られる場合は HPV16 型に対する特異度も優れていることが示された。

HPV 重感染の病的意義については前述のように様々なことがいわれているが、今回の検討では異形成の予後との相関はなく、浸潤癌では検出されないことから、HPV 重感染が子宮頸部発癌に重要な役割を果たしているとはいえないかもしれない。しかし、HPV 重感染を正確に検出できない方法では型決定結果の信頼性が低くなることも明らかとなった。すなわち、HPV 重感染を正確に検出できる方法を用いることにより、はじめて正確な HPV 感染の自然史が明らかになるといえる。

現在、ウイルス DNA を含まないカプシド成分からなる virus-like particles (VLP) をワクチンとして用いることにより、HPV の感染を防ぎ、子宮頸癌を予防しようとする試みが始まっている^{49), 50)}。ただし、この VLP で誘導される中和抗体は HPV のそれぞれの型に特異的であり、ある型に対する中和抗体は他の型の感染を予防できない。子宮頸癌は HPV 感染をきっかけとして発症するものであり、ワクチンは今後の子宮頸癌の治療や予防にあたり重要な手段であることは間違いないが、ワクチンを実際に使用するにあたっては子宮頸部発癌に関与する HPV を正しく型決定することがいっそう重要となってくる。

今回確立した nested L1 PCR-SSCP 法は重感染を含めた HPV 感染の検出・型決定法として優れていることが明らかとなった。本法を用いて多数例を検討することにより、重感染を含めた HPV 感染の自然史をより正確に捉えることができると思われる。このことは、将来ワクチンを用いて HPV の感染を予防するにあたりきわめて重要である。

総 括

HPV の重感染をより高感度かつ正確に検出する方法として新たに nested L1 PCR-SSCP 法を確立した。nested L1 PCR-SSCP 法を用いて異形成および子宮頸癌における HPV の単独および重感染について検討した。異形成では約 40% の例に重感染が認められたが、浸潤

癌例では微小浸潤癌の1例を認めるのみであった。また、異形成では HPV16 型、18 型以外の型も高頻度に見られたが、浸潤癌では HPV 陽性例のほとんどが 16 型あるいは 18 型であった。さらに、nested L1 PCR-SSCP 法と L1 PCR-RFLP 法とを比較したところ、nested L1 PCR-SSCP 法がより高感度であり、特に重感染例において nested L1 PCR-SSCP 法が感度、特異度ともに優れていることが示された。本法を用いて多数例を検討することにより、重感染を含めた HPV 感染の自然史が解明できると考えられた。このことは、ワクチンを用いて HPV の感染を予防し、子宮頸癌の罹患を減少させるにあたり、非常に重要である。

稿を終えるに当たり、御指導、御校閲を賜りました慶應義塾大学医学部産婦人科学教室野澤志明教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に際し直接御指導、御助言いただきました栃木県立がんセンター菅野康吉先生、慶應義塾大学産婦人科学教室藤井多久磨先生に深謝いたします。また、本研究に御協力、御助言いただきました慶應義塾大学産婦人科学教室塚崎克己助教授、久布白兼行講師および異形成の細胞診検体の L1 PCR-RFLP 法による HPV 型判定を行っていただきました筑波大学医学部産婦人科学教室吉川裕之教授に厚く感謝いたします。

本研究の一部は、第 94 回日本産科婦人科学会関東連合地方部会総会（前橋、1997）、第 50 回日本産科婦人科学会学術講演会（仙台、1998）、第 2 回産婦人科腫瘍マーカー・遺伝子診断学会（東京、1998）、第 39 回日本臨床細胞学会総会（札幌、1998）、第 36 回日本癌治療学会総会（福岡、1998）、第 51 回日本産科婦人科学会学術講演会（東京、1999）において発表した。

本研究の一部は文部省科研費（症例研究(A)課題番号 10770854）によった。

文 献

- 1) Mori M, Sagae S : Recent progress in epidemiologic research of uterine cancer. *Jpn. J. Cancer Chemother.* 28 : 174-178, 2001
- 2) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H : A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 3812-3815, 1983
- 3) zur Hausen H : papillomaviruses in human cancers. *Mol. Carcinog.* 1 : 147-150, 1988
- 4) van den Brule JCA, Claas HCJ, du Maine M, Melchers

- WJG, Helmerhorst T, Quint WGV, Lindeman J, Meijer CJLM, Walboomers JMM : Use of anticon-tamination primers in the polymerase chain reaction for the detection of human papilloma virus genotypes in cervical scrapes and biopsies. *J. Med. Virol.* 29 : 20-27, 1989
- 5) Schiffman HM, Bauer MH, Hoover NR, Glass GA, Cadell MD, Rush BB, Scott RD, Sherman EM, Kurman JR, Wacholder S, Stanton KC, Manos MM : Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 85 : 958-964, 1993
- 6) Reeves WC, Rawls WE, Brinton LA : Epidemiology of genital papillomaviruses and cervical cancer. *Rev. Infect. Dis.* 11 : 426-439, 1989
- 7) 笹川 寿之：ヒトパピローマウイルス感染症。産科と婦人科。67(11)：1460-1468, 2000
- 8) Lorincz AT, Reid R : Human papillomavirus infection of the cervix : Relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet. Gynecol.* 79 : 328-337, 1992
- 9) Yoshikawa H, Nagata C : Human papilloma virus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br. J. Cancer* 80 : 621-624, 1999
- 10) Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H : Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314 : 111-114, 1985
- 11) Pater MM, Pater A : Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145 : 313-318, 1985
- 12) Fujii T, Tsukazaki K, Kiguchi K, Kubushiro K, Yajima M, Nozawa S : The major E6/E7 transcript of HPV-16 in exfoliated cells from cervical neoplasia patients. *Gynec. Oncol.* 58 : 210-215, 1995
- 13) Dyson N, Howley MP, Munger K, Harlow Ed : The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243 : 934-937, 1989
- 14) Werness AB, Levine JA, Howley MP : Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 protein with p53. *Science* 248 : 76-79, 1990
- 15) Munger K, Phelps CW, Bubb V, Howley MP, Schlegel R : The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63 : 4417-4421, 1989
- 16) Unckell F, Streeck RE, Sapp M : Generation and neutralization of pseudovirions of human papillomavirus type 33. *J. Virol.* 71 : 2934-2939, 1997
- 17) White WI, Wilson SD, Bonnez W, Rose RC, Koenig S, Suzich JA. In vitro infection and type-restricted antibody-mediated neutralization of authentic human

- papillomavirus type 16. *J. Virol.* 72 : 959-964, 1998
- 18) Roden RB, Greenstone HL, Kirnbauer R, et al. In vitro generation and type-specific neutralization of a human papillomavirus type 16 virion pseudotype. *J. Virol.* 70 : 5875-5883, 1996
 - 19) Roden RB, Hubbert NL, Kirnbauer R, Christensen ND, Lowy DR, Schiller JT. Assessment of the serological relatedness of genital human papillomaviruses by hemagglutination inhibition. *J. Virol.* 70 : 3298-3301, 1996
 - 20) Gregoire L, Arella M, Campione-Piccardo J, Lancaster WD : Amplification of human papillomavirus DNA sequences by using conserved primers. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 2660-2665, 1989
 - 21) Manos MM, Ting Y, Wrigth DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM : Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7 : 209-214, 1989
 - 22) van den Brule JCA, Snijders PJF, Gordijn RLJ, Bleker OP, Meijer CJLM, Walboomers JMM : General primer-mediated polymerase chain reaction permits the detection of sequenced and still unsequenced human papillomavirus genotypes in cervical scrapes and carcinomas. *Int. J. Cancer* 45 : 644-649, 1990
 - 23) Snijders JP, van den Brule JCA, Schrijnemakers FJH, Snow G, Meijer JLMC, Walboomers MMJ : The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 71 : 173-181, 1990
 - 24) Shibata DK, Arnheim N, Martin WJ : Detection of human papilloma virus in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 167 : 225-230, 1988
 - 25) Shimada M, Fukushima M, Mukai H, Kato I, Nishikawa A, Fujinaga K : Amplification and specific detection of transforming gene region of human papillomavirus 16, 18 and 33 in cervical carcinoma by means of the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Res.* 81 : 1-5, 1990
 - 26) Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A : Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn. J. Cancer Res.* 82 : 524-531, 1991
 - 27) Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Parmenter CA, Jordan SW, Stidley CA, McPherson RS, Dorin MH : Sexually transmitted disease and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern hispanic and non-hispanic white women. *JAMA* 271 : 1181-1188, 1994
 - 28) Kalantari M, Karlsen F, Johansson B, Sigurjonsson T, Warleby B, Hagmar B : Human papillomavirus findings in relation to cervical intraepithelial neoplasia grade. *Hum. Pathol.* 28 : 899-904, 1997
 - 29) Swan DC, Tucker RA, Tortolero-luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP : Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *J. Clin. Microbiol.* 37 : 1030-1034, 1999
 - 30) Sasagawa T, Basha W, Yamazaki H, Inoue M : High-risk and multiple human papillomavirus infections associated with cervical abnormalities in Japanese women. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 10 : 45-52, 2001
 - 31) Munoz N, Bosch FX, Sanjose S, Herrero R, Castellaque X, Shah KV, Snijders PJF, Meijer CJLM : Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New Engl. J. Med.* 348 : 518-527, 2003
 - 32) Davidson M, Schnitzer PG, Bulkow LR, Parkinson AJ, Schloss ML, Fitzgerald MA, Knight JA, Murphy CM, Kiviat NB, Toomey KE, Reeves WC, Schmid DS, Stamm WE : The prevalence of cervical infection with human papillomaviruses and cervical dysplasia in Alaska native women. *J. Infect. Dis.* 169 : 792-800, 1994
 - 33) Gloria YF Ho, Bierman R, Leah Beardsley NP, Chang CJ, Burk RD : Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *New Engl. J. Med.* 338 : 423-428, 1998
 - 34) Nakagawa H, Sugano K, Fujii T, Kubushiro K, Tsukazaki K, Nozawa S : Frequent detection of human papilloma viruses in cervical dysplasia by PCR single-strand DNA-conformational polymorphism analysis. *Anticancer Res.* 22(3) : 1655-60, 2002
 - 35) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K : Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 2766-2770, 1989
 - 36) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K : Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5 : 874-879, 1989
 - 37) Yoshikawa H, Nagata C, Noda K, Nozawa S, Yajima A, Sekiya S, Sugimori H, Hirai Y, Kanazawa K, Sugase M, Shimizu H, Kawana T : Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical intraepithelial neoplasia in Japan. *Br. J. Cancer* 80 : 621-624, 1999
 - 38) 子宮頸癌取扱い規約 (改訂第2版) 日本産科婦人科学会, 日本病理学会, 日本医学放射線学会編
 - 39) Sasagawa T, Minemoto Y, Basha W, Yamazaki H, Nakamura M, Yoshimoto H, et al. A new PCR-based assay amplifies the E6-E7 genes of most mucosal human papillomaviruses (HPV). *Virus Research* 67 (2) : 127-139, 2000
 - 40) zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer : from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*

- 2(5) : 342-350, 2002
- 41) Cullen AD, Reid R, Campion M, Lorincz AT : Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* 65 : 606-612, 1991
- 42) Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Chitemerere M, Berner A, Hagmar BM : High incidence of human papillomavirus in 146 cervical carcinomas. A study using three different pairs of consensus primers, and detecting viral genomes with putative deletions. *Eur. J. Cancer* 31A : 1511-1516, 1995
- 43) Milde-Langosch K, Schreiber C, Becker G, Loning T, Stegner H : Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction. *Hum. Pathol.* 24 : 590-594, 1993
- 44) Yamanaka Y, Forslund O, Teshima H, Hasumi K, Kitagawa T, Hansson BG : Human papillomavirus DNA in adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma of the uterine cervix detected by polymerase chain reaction (PCR). *Gynec. Oncol.* 53 : 190-195, 1994
- 45) Solomon D, Davey D, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T, Young N : The 2001 Bethesda System. *JAMA.* 287 : 2114-2119, 2002
- 46) Enomoto T, Fujita M, Inoue M, Tanizawa O, Nomura T, Shroyer KR : Analysis of clonality by amplification of short tandem repeats. *Diagn. mol. Pathol.* 3 : 292-297, 1994
- 47) Enomoto T, Haba T, Fujita M, Hamada T, Yoshino K, Nakashima R, Wada H, Kurachi H, Wakasa K, Sakurai M, Murata Y, Shroyer KR : Clonal analysis of high-grade squamous intra-epithelial lesions of the uterine cervix. *Int. J. Cancer.* 73 : 339-344, 1997
- 48) Levi JE, Kleter B, Quint WG, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) infections and high frequency of multiple HPV genotypes in human immunodeficiency virus-infected women in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 9 : 3341-3345, 2002
- 49) Crum CP, Rivera MN. Vaccines for cervical cancer. *The Cancer Journal.* 9(5) : 368-376, 2003
- 50) Roden RB, Ling M, Wu TC. Vaccination to prevent and treat cervical cancer. *Human Pathol.* 35(8) : 971-982, 2004
-