

新規に保険収載された検査法： ヒトパピローマウイルス（HPV）ジェノタイプ判定検査

Human Papillomavirus Genotyping test

ひら い やす お
平 井 康 夫
Yasuo HIRAI

はじめに

ヒトパピローマウイルス（HPV：Human papillomavirus）には 100 種類以上の遺伝子型が存在し、多くのがん発生に關与する。感染した遺伝子型と感染部位により、子宮頸がん、食道がん、肛門がん、直腸がん、口腔がん、咽頭がん、舌がん、コンジローマ、皮膚乳頭腫（いぼ）等、多数の疾患の発症に關与している。中でも子宮頸癌に關しては多くの研究が報告されており、子宮頸癌において高頻度に検出される 13 種類（16 型、18 型、31 型、33 型、35 型、39 型、45 型、51 型、52 型、56 型、58 型、59 型、68 型）の HPV は高リスク HPV に分類される。HPV に感染しても、その多くは自然消失し、何ら症状を引き起こさないことが多い。ところが子宮頸癌発症に關与する前述の 13 種類の高リスク HPV に感染し、しかも何らかの理由によりその感染が遷延した場合に限って、5 年から 10 数年の前癌病変を経て子宮頸癌を發症することが解明された。そのため、子宮頸部に感染する HPV を検出するための種々の HPV 検査が、子宮頸部の前癌病變發見のスクリーニングや、發見された前癌病變の治療方針決定に活用される。

ヒトパピローマウイルス（HPV）ジェノタイプ判定検査は、2011 年 5 月 1 日付けで新規保険適用項目となった。

I. HPV 感染を検出・同定するための HPV-DNA 検査

現在わが国では、いくつかのヒトパピローマウイルス（HPV：human papillomavirus）DNA 検査が外

注検査として利用可能である。HPV-DNA 検査は、ハイリスク HPV 一括（グルーピング）検査（ハイブリッドキャプチャー II（HC2）、アンプリコア HPV など）と HPV ジェノタイプ検査（クリニチップ HPV、MEBGEN HPV など）に大別される。ハイリスク HPV 一括検査は子宮頸癌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子宮頸部の前癌病變である CIN2（中等度異形成）以上の病變を検出できる。ハイリスク HPV 一括（グルーピング）検査は、すでにわが国でも子宮頸がん検診の併用検査や、ボーダーラインの細胞診（ASC-US）症例を生検するための振り分け検査として保険適用されて臨床応用されている。

一方、今回の HPV ジェノタイプ判定検査は高価であるが、HPV 感染の有無だけでなく、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る。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することも可能となる。

II. 保険収載された HPV ジェノタイプ判定検査

前述のようにわが国では、ASC-US に対するハイリスク HPV 一括検査が先行して保険適用となった。今回体外診断用医薬品の製造販売承認を受けていた「クリニチップ HPV」が 2011 年 5 月 1 日付けで HPV ジェノタイプ判定検査として新規保険適用となった。今回の新規保険適用にもなって「診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項に

ついて」が追加された。詳細情報は、以下のとおりであった。(表1参照)

これに引き続き、「MEBGEN HPVキット」は、2013年3月18日付で厚生労働省より体外診断用医薬品としての承認を取得し、2013年4月19日付けで国内二つ目のハイリスク型ヒトパピローマウイルス(HPV)ジェノタイプ判定試薬として保険適用となった。「MEBGEN HPVキット」にかかわる新規保険適用項目の詳細情報は以下のとおりとなった。(表2参照)

Ⅲ. クリニチップ HPV の測定原理

最初に保険適用となった「クリニチップ HPV」は、LAMP法とDNAチップ法により、HCII法に一致した同種の高リスク型HPVのタイピング検査が可能である。子宮頸部細胞から抽出したDNAを試料として、子宮頸癌のハイリスク因子である13タイプのHPVのDNAを各々タイプ特異的に増幅する13種類のプライマーを用いてLAMP増幅法にて増

幅する。増幅産物を13タイプHPV各々に特異的な13種類のプローブが基板上に固定してある電流検出型DNAチップに滴下すると、増幅産物中のHPV-DNAがプローブとハイブリダイゼーションし2本鎖DNAを形成する。次に挿入剤溶液をDNAチップに添加すると2本鎖を形成したDNAプローブに特異的に挿入剤が結合する。これに電圧をかけると、挿入剤が結合した2本鎖DNAプローブに対応する位置の基板に電流が発生し、その強さを測定することにより検体中に存在する13タイプ(16型、18型、31型、33型、35型、39型、45型、51型、52型、56型、58型、59型、68型)のHPV-DNA各々の有無を検出する。この方法は国産技術であるLAMP増幅法と電流検出型DNAチップを用い、HPVタイプ特異的なプライマーおよびプローブを使用しているため、特異度が高く、HCII法と全く同種の高リスク型HPVのタイピングが可能である。クリニチップ HPVは、体外診断薬として最初に承認されたHPVジェノタイプ判定試薬である。(図1参照)

表1 クリニチップ HPVにかかわる新規保険適用項目の詳細情報

<ul style="list-style-type: none"> ●保険適用日：2011年5月1日 ●測定項目：HPV(ヒトパピローマウイルス)ジェノタイプ判定 ●測定方法：LAMP法と電流検出型DNAチップの組合せ ●測定内容：治療方針の決定を目的として、ハイリスク型HPVのそれぞれの有無を確認する ●主な対象：あらかじめ行われた組織診断の結果、CIN1又はCIN2と判定された患者 ●保険点数：2000点 ●区分：D004-2「1」悪性腫瘍遺伝子検査 ●判断料：D026「6」微生物学的検査判断料 150点(月1回に限る) ●【診療報酬の算定方法の一部改正に伴う実施上の留意事項について】 D023 11 HPVジェノタイプ判定 ア HPVジェノタイプ判定は、あらかじめ行われた組織診断の結果、CIN1又はCIN2と判定された患者に対し、治療方針の決定を目的として、ハイリスク型HPVのそれぞれの有無を確認した場合に算定する。 イ 当該検査は、本区分「5」のHPV核酸検出の施設基準を届け出ている保険医療機関のみ算定できる。 ウ 当該検査を算定するに当たっては、あらかじめ行われた組織診断の結果及び組織診断の実施日、及び当該検査によって選択した治療法を診療報酬明細書の摘要欄に記載する。 エ 同一の患者について、当該検査を2回目以降行う場合は、当該検査の前回実施日、及び前回選択した治療(その後通常検診となった場合はその旨)を上記に併せて記載する。
--

表2 「MEBGEN™ HPVキット」にかかわる新規保険適用項目の詳細情報

<ul style="list-style-type: none"> ●測定項目：D023 微生物核酸同定・定量検査 11 HPVジェノタイプ判定 ●測定目的：子宮頸部細胞中の13種高リスクヒトパピローマウイルス(HPV)ゲノムの検出と型判別(高リスクHPV感染診断の補助に使用される。) ●測定方法：PCR-rSSO法(polymerase chain reaction-reverse sequence specific oligonucleotide法) ●保険点数：2000点 ●判断料：D026「6」微生物学的検査判断料 150点(月1回に限る)

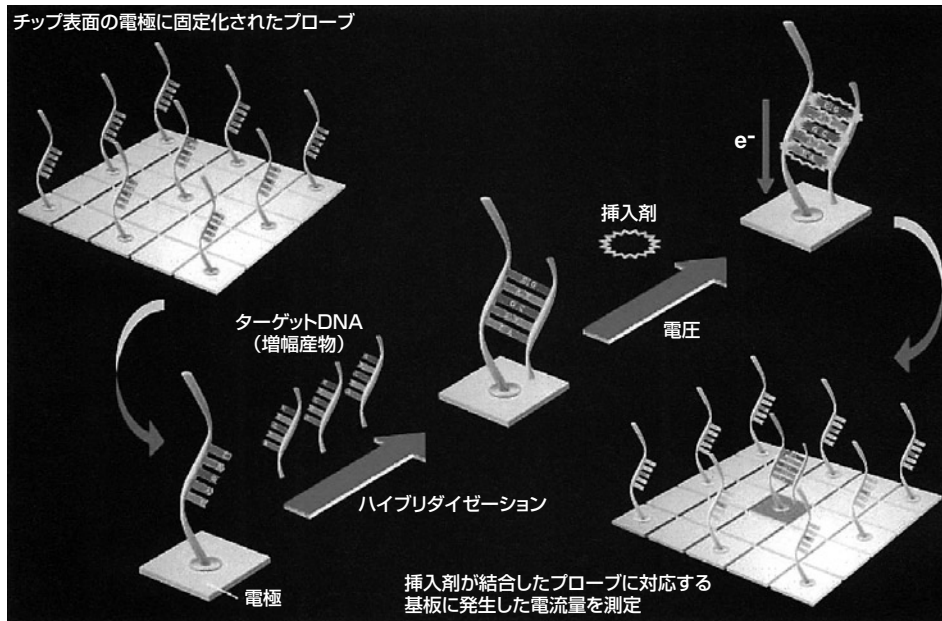


図 1

IV. MEBGEN HPV 診断薬の測定原理

本診断薬は、遺伝子特異的なマルチプレックス PCR と蛍光ビーズによる多項目同時測定が可能な xMAP 技術を組み合わせた、Luminex システムを用いる新規 HPVgenotyping である。既承認体外診断用医薬品であるクリニチップ HPV との比較検討は、液状化検体細胞診検体により実施されている。採取検体より、EX-R&D (MBL) を用いて DNA を抽出し、Luminex 法による HPVgenotyping を実施する。本法は、PCR-reverse Sequence Specific Oligonucleotide probe (PCR-rSSO) を利用する。クリニチップ HPV と同種の 13 種の HPV 型特異的ビオチン標識プライマーを用いて、PCR により HPV-DNA を増幅する。得られた PCR 産物を蛍光ビーズ上の 13 種の型特異的プローブとハイブリダイズさせる。ハイブリダイズした PCR 産物をフィコエリスリン標識ストレプトアビジン (SA-PE) により蛍光標識する。Luminex システムにより、ビーズおよび SA-PE の蛍光を測定し 13 種の HPV-DNA の有無を検出する。

MEVGEN HPV キット (Luminex 法) と既承認体外診断用医薬品クリニチップ HPV との相関試験の結果が不一致であった例について MEBGEN の測定

で使用した DNA を用いて新たに PCR を行い、PCR 産物をクローニングしてシークエンス解析が実施されている。クローニングに用いた PCR プライマーは、Luminex 法で使用しているプライマー配列と同一のものが用いられた。シークエンス解析は、データベースに登録されている情報をもとに設計された L1 または L2 の型特異的プライマーにて PCR を行い、PCR 産物をプラスミドベクターに導入しユニバーサルプライマーを用いて実施された。型判定結果が不一致であった 7 例によるシークエンスの結果は、いずれも MEVGEN HPV キット (Luminex 法) と一致した型が存在することが確認されたという。型判定結果が不一致の原因としては、Luminex 法の検出感度が 1,000 コピー/テストであるのに対し、HCII では 5,000 コピー/テスト、クリニチップは 1,250 コピー/テストとされていることから、感度差に起因したことが最も考えられた。

MEVGEN HPV キット (Luminex 法) の特徴としては、各 HPV 型に対し検出感度が一定である、 β グロビンを同時検出する PCR 産物のコンタミネーション回避仕様となっていることが挙げられ、精度管理面を意識した設計となっている。また、Luminex システムによる検出系はハイスループットで、全自動化にも対応できるため多数検体処理に適している。汎用性も高く、すでに遺伝子をはじめとしてサ

イトカインや抗体等の蛋白質検査にも利用されており、試薬コストの低減も期待できるものとなった。(図2, 3, 4参照)

V. HPV ジェノタイプ判定検査の臨床適用の実際

子宮頸癌発症のリスクは検出される HPV のタイプによって異なるので¹⁾ CIN1/2 患者のフォローアップにおいて HPV タイピング検査の結果はリスク評価に有用と考えられる²⁾。わが国の主要 HPV 論文のメタアナリシス³⁾の結果からは、わが国では浸

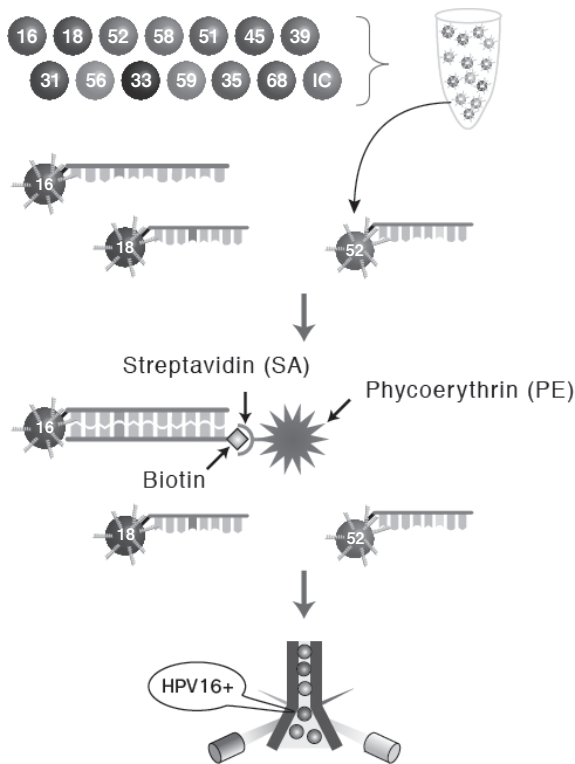


図2 MEBGEN HPV キット 特徴

潤癌からの検出頻度が高い HPV16、18、31、33、35、52、58 の7つのタイプで進展リスクが高いと推定される。わが国の前方視的研究では、横山らが CIN1/2 患者 185 例のフォローアップにおいて HPV 16、18、33、52、58 の5つのタイプ陽性の患者で CIN3 への進展リスクが有意に高かったことを報告している⁴⁾。最近わが国で行われた大規模コホートスタディでは LSIL/CIN1-2 患者 570 例をフォローアップしており、前述のメタアナリシスで特にハイリスクと考えられた7つのタイプ (HPV16、18、31、33、35、52、58) のいずれかが陽性の病変では有意に自然消失しにくく ($P < 0.0001$)、かつ CIN3 へ進展しやすいこと ($P = 0.0001$) が裏付けられている⁵⁾ (図5参照)。CIN3 への進展リスクは、ハイリスク HPV 陰性患者の進展リスクを 1.0 として比較した場合に、HPV16 では 11.1 倍、HPV18 では 14.1 倍、HPV31 では 24.7 倍、HPV33 では 20.3 倍、HPV35

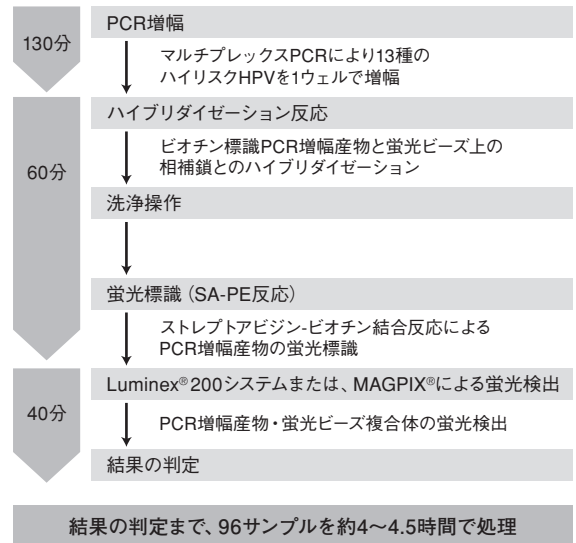


図3 MEBGEN HPV キット 測定フロー

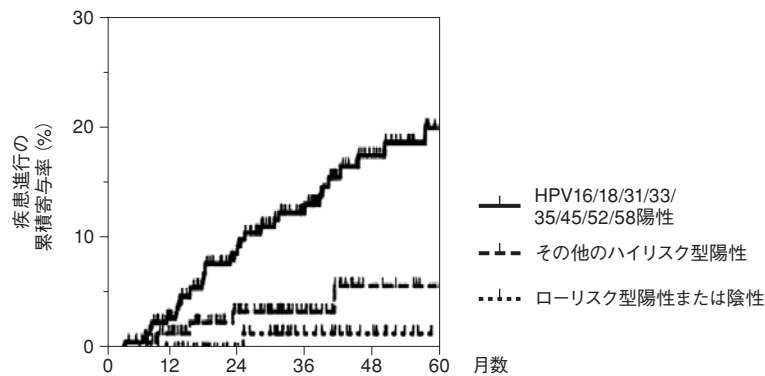


図4 蛍光検出する機械

では13.7倍、HPV52では11.6倍、HPV58では8.9倍高い(このうち、HPV16、31、33、52、58では統計的に有意)が、ほかのハイリスクタイプ(HPV39、51、56、59、68)では4.0倍程度である。CIN2が5年以内にCIN3に進展する可能性はとくにハイリスクの7タイプ陽性では40.5%であるが、それ以外の症例では8.3%しかない。同様に、CIN1が5年以内にCIN3に進展するリスクは7タイプ陽性では16.6%であるが、それ以外の症例では3.3%にすぎない。わが国では頸癌からのHPV45の検出頻度は極めて低い³⁾、海外ではHPV16、HPV18に次いで検出頻度が高いので¹⁾、HPV45もHPV16、18、

31、33、35、52、58と同等に取り扱うべきと考えられる。(図5参照)

これらの結果から、HPVタイピング検査を行った場合には、HPV16、18、31、33、35、45、52、58のいずれかが陽性のCIN1/2患者とそれ以外のCIN1/2患者では区別して管理することが勧められている。図6にHPVタイピング検査を取り入れたCIN1/2の管理指針の一例を示す。中等度異形成であるCIN2を治療の対象とすることは元々許容されているが、特にHPV16、18、31、33、35、45、52、58のいずれかが陽性のCIN2はより治療を考慮してもよいとされる。また、これらの8タイプが陰性の



	リスクのある女性の人数						5年以内にCIN3に進展するリスク (95% 信頼区間)
HPV16/18/31/33/35/45/52/58 陽性	233	212	162	121	75	49	20.5% (14.6–28.4%)
その他のハイリスク型陽性	126	115	85	53	32	23	6.0% (2.3–15.3%)
ローリスク型陽性または陰性	90	84	61	42	31	21	1.7% (0.2–11.4%)

Matsumoto K. *et al.*, *Int J Cancer*. 128. 2898-2910 (2011)

図5

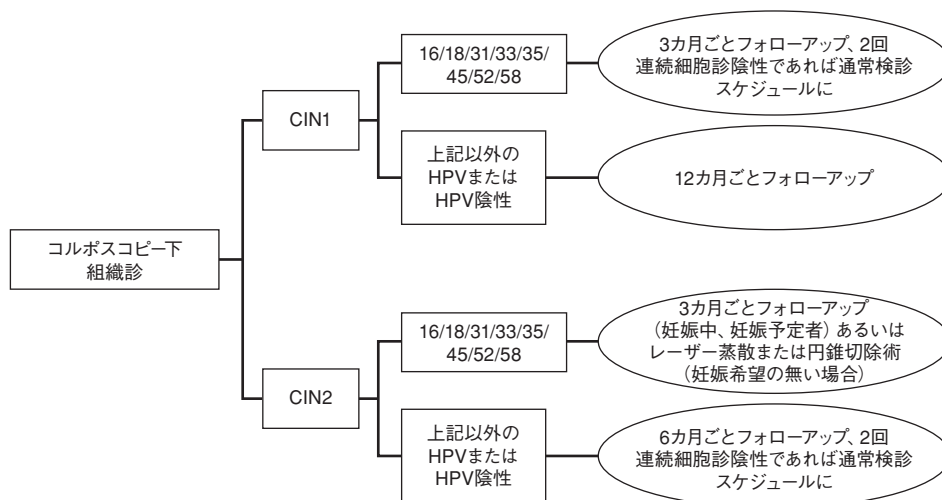


図6

CIN1とCIN2ではそれぞれ12カ月ごと、6カ月ごとのフォローアップとしてもよいとされている。**図6**にHPVタイピング検査結果に基づくCIN症例の暫定的取扱指針をまとめた。

VI. その他のHPV-DNA検査の現状

米国では、2003年に30歳以上の女性に限り頸がん検診に細胞診とハイリスクHPV一括検査を併用することが承認され、ASCCP (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology) からガイドラインが提唱されている。細胞診と比較して、ハイリスクHPV一括検査は病変を検出する感度(病変を持っている女性を陽性として判定する確率)は高い。海外7カ国からのスタディをレビューしたWright TC Jrらの論文⁶⁾をみると、CIN2以上の病変の検出感度は細胞診(mean 69.7%、range 33~94%)と比べて、HPV検査(mean 90.8%、range 82~96%)の方が明らかに高く、スタディによるバラツキも小さい。最近報告された大規模なランダム化比較試験でも同様の結果が示された^{7,8)}。30歳以上の女性に対して細臨診とハイリスクHPV一括検査を併用して両方も陰性の場合、検査した時点でCIN2以上の病変があるのに見逃されている可能性はほとんどないと考えてよい⁹⁾。

2009年に米国ガイドラインでは、HPV16/18陽性と陰性で大きくリスクが異なるため¹⁰⁾、細胞診陰性/ハイリスクHPV一括検査陽性の場合にはCervista HPV16/18検査(サード・ウェイブ社;わが国では診断薬としては未承認)を行ってHPV16/18陽性の場合にはただちにコルポ診を、HPV16/18陰性の場合には12カ月後に細胞診とハイリスクHPV一括検査の両方の再検を行うというリコメンデーションを追加した¹¹⁾。現在わが国ではCervista HPV16/18が未承認で使用できない。したがってこのリコメンデーションを日本で実施するためにも、HPVジェノタイプ判定検査であるクリニチップHPVかMEBGEN HPV検査を施行することの意義がある。

ハイリスクHPV一括検査陽性のASC-USでは、2年以内にCIN2/3と診断されるリスクはLSIL (low-grade squamous intraepithelial neoplasia)と同等(約27%)であることが報告されている¹²⁾。ハイリスクHPV一括検査はCIN治療後のフォローアップにお

いて病変の残存・再発の早期発見に有用であるとする報告がある^{13,14)}。長井らは円錐切除術を行ったCIN3患者58例の前方視的研究を報告している¹³⁾。病変の残存・再発の早期発見の観点でも、HPVジェノタイプ判定検査であるクリニチップHPVやMEBGEN HPV検査を施行することの意義が検討されている。

保険適応となった上記検査以外にも、研究用試薬としてHPV-DNA検査は種々存在する。今後も臨床応用の観点から、信頼性の面、コストの面でさらに選択肢が増えることを期待したい。

おわりに

ヒトパピローマウイルス(HPV)は多くのがん発生に関与することが解明され、中でも子宮頸癌に関しては多くの研究が報告されている。その結果、子宮頸部に感染するHPVを検出するための種々のHPV検査が、子宮頸部の前癌病変発見のためのスクリーニング検査や、発見された前癌病変の治療方針決定に活用されている。ヒトパピローマウイルス(HPV)ジェノタイプ判定検査は、「クリニチップHPV」が2011年5月1日付けで新規保険適用項目となって以来、着実に臨床応用の幅を広げてきた。今回これに加えて「MEBGEN HPV診断薬」が子宮頸部病変に対するHPVジェノタイプ判定検査薬として認可されたことにより、信頼性の面、コストの面でさらに選択肢が増えたことになる。これによりHPVジェノタイプ判定検査の臨床応用の機会がさらに高まることが期待できる。

文 献

- 1) Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, et al.: Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions : a meta-analysis update. *Int J Cancer*. 121 : 621-632, 2007.
- 2) Wheeler CM, Hunt WC, Schiffman M, Castle PE : Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesions Triage Study Group. Human papillomavirus genotypes and the cumulative 2-year risk of cervical Precancer. *J Infect Dis*. 194 : 1291-1299, 2006.
- 3) Miura S, Matsumoto K, Oki A, Satoh T, Tsunoda H, Yasugi T, et al.: Do we need a different strategy for HPV screening and vaccination in East Asia? *Int J Cancer*. 119

- : 2713-2715, 2006.
- 4) Yokoyama M, Iwasaka T, Nagata C, Nozawa S, Sekiya S, Hirai Y, et al.: Prognostic factors associated with the clinical outcome of cervical intraepithelial neoplasia : a cohort study in Japan. *Cancer Lett.* **192** : 171-179, 2003.
 - 5) Matsumoto K, Oki A, Furuta R, Maeda H, Yasugi T, Takatsuka N, et al.: Predicting the Progression of Cervical Precursor Lesions by Human Papillomavirus Genotyping : A Prospective Cohort Study. *Int J Cancer* 2010 (Published on line in advanced of print : 13 October 2010).
 - 6) Wright TC Jr, Schiffman M, Solomon D, Cox JT, Garcia F, Goldie S, et al.: Interim guidance for the use of human papillomavirus DNA testing as an adjunct to cervical cytology for screening. *Obstet Gynecol.* **103** : 304-309, 2004. (Guideline)
 - 7) Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al.: Canadian Cervical Cancer Screening Trial Study Group : Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* **357** : 1579-1588, 2007.
 - 8) Cuzick J, Clavel C, Petry KU, Meijer CJ, Hoyer H, Ratnam S, et al.: Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer.* **119** : 1095-1101, 2006.
 - 9) Kjaer S, Høgdall E, Frederiksen K, Munk C, van den Brule A, Svare E, et al.: The absolute risk of cervical abnormalities in high-risk human papillomavirus-positive, cytologically normal women over a 10-year period. *Cancer Res.* **66** : 10630-10636, 2006.
 - 10) Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al.: The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* **97** : 1072-1079, 2005.
 - 11) American Society for Colposcopy and Cervical Pathology : Clinical Update : HPV Genotyping, 2009. Available at http://www.asccp.org/pdfs/consensus/clinical_update_20090408.pdf
 - 12) Cox JT, Schiffman M, Solomon D : ASCUS-LSIL Triage Study (ALTS) Group : Prospective follow-up suggests similar risk of subsequent cervical intraepithelial neoplasia grade 2 or 3 among women with cervical intraepithelial neoplasia grade 1 or negative colposcopy and directed biopsy. *Am J Obstet Gynecol.* **188** : 1406-1412, 2003.
 - 13) Nagai Y, Maehama T, Asato T, Kanazawa K : Persistence of human papillomavirus infection after therapeutic conization for CIN3 : is it an alarm for disease recurrence? *Gynecol Oncol.* **79** : 294-299, 2000.
 - 14) Arbyn M, Sasieni P, Meijer CJ, Clavel C, Koliopoulos G, Dillner J : Chapter 9 Clinical applications of HPV testing : a summary of meta-analyses. *Vaccine.* **24** : S3/78-89, 2006.