

〈特集：新しいテクノロジー・イムノアッセイ〉

日本初。PCR法によるハイリスク型HPV検出キット 『アンプリコア® HPV』

渡邊 佳代子、三宅 一義

The first IVD kit using PCR for detection of High-risk HPV 『Amplicor® HPV』

Kayoko Watanabe and Kazuyoshi Miyake

Summary A causal link between human papillomavirus (HPV) infection and cervical cancer has been well confirmed.

In Japan, the 'Bethesda System 2001', which was established based on the fact that HPV causes cervical cancer, was introduced for the classification of gynecological PAP smear tests in April 2009. In that system, an HPV DNA test was recommended for ASC-US triage cases.

In April 2010, reimbursements for HPV-DNA tests were approved by the government in ASC-US cases. Currently, HPV DNA tests have become increasingly important not only in routine diagnoses but also in the screening of cervical cancer.

The PCR-based assay, Roche Amplicor® HPV, is a test used to detect HR-HPV (high-risk HPV genotypes) (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, and 68). Capture probe sequences are located in polymorphic regions of L1 bound by these primers. An additional primer pair targets the human β globin gene (268 bp amplicon) to provide a control for cell adequacy, extraction, and amplification. All genotypes were detected at a 100% positivity rate at 480 copies/ml.

Key words: Amplicor, HPV, PCR, Cervical cancer

I. はじめに

子宮頸がんの発症には、ヒトパピローマウイルス (human papilloma virus, HPV) 感染によって起こることがHarald zur Hausen (ハラルド・ツァ・ハウゼン) 博士らによって明らかとなって

きた¹⁾。わが国でも2009年4月よりベセスダシステム2001準拠が細胞診報告様式に導入された背景には、HPV感染を考慮した分類を取り入れるためでもある²⁾。また、2010年診療報酬改訂に伴い、HPV核酸同定検査も保険収載された。本稿ではロシュ・ダイアグノスティックス株式会社

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
IVD事業本部 製品学術部門 遺伝子検査部
STD・オンコロジーグループ
〒105-0014 東京都港区芝2-6-1

STD・Oncology, Molecular Diagnostics, Portfolio & Life Cycle Management, In Vitro Diagnostics
Roche Diagnostics K.K.,
6-1, Shiba 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-0014, Japan

が開発したPCR (polymerase chain reaction) 法では日本初の体外診断用医薬品であるハイリスク型HPV検出キット『アンプリコア® HPV』について解説する。

II. 測定原理

アンプリコア® HPVは、PCR法により、ヒトパピローマウイルスゲノムのうち、多型の存在するL1領域の159～167 bpをターゲットに核酸増幅を行う。その後、13種類の子宮頸がんハイリスク型HPV (ジェノタイプ16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)³⁾に特異的なDNAプローブを用いた核酸ハイブリダイゼーション法により、ハイリスク型HPV DNAを検出する。また、本キットでは、ステップ1：婦人科細胞診用固定液から専用のキットを用いてDNAを抽出、ステップ2：HPV遺伝子とβグロビン遺伝子(インターナルコントロール)を増幅、ステップ3：増幅産物とハイリスク型13種類のHPV型に特異的なDNAプローブをハイブリダイゼーション、ステップ4：吸光度による検出、以上の4ステップから構成される(図1)。各ステップの詳細は以下のとおりである。

ステップ1：婦人科細胞診用固定液250μlより、アンプリリユート® リキッドメディア抽出試薬セットを用いてあるいは、500μlより、アンプリコアHPV用検体処理試薬セット「SOL-HPV」を用いてDNAを抽出する。

ステップ2：抽出DNAをテンプレートとして、HPV L1領域のビオチン化プライマーによりPCRで増幅する。本キットでは、上流領域に5種類、下流領域に7種類のプライマーが用意され、マスターミックス溶液にあらかじめ調整されている。1本のチューブ内で13種類のHPV

を特異的に増幅する。遺伝子増幅は、Gold 96-well GeneAmp® PCR System 9700 (ABI社)を用いる。

ステップ3：ビオチン標識されたHPV-DNAの増幅産物(アンプリコン)をハイリスク型13種類のHPV型に特異的なDNAプローブを固相化したウェル上でハイブリダイゼーションさせる。

ステップ4：ペルオキシダーゼ標識アビジンを添加してDNAプローブに結合したアンプリコンのビオチンを結合させる。最後にTMB (tetramethyl benzidine)を加え、過酸化水素存在下でHRPと反応することにより波長450 nmでの吸光度を測定する。

III. 結果判定

HPV (-)コントロールの吸光度が0.2未満で、HPV (+)コントロールの吸光度が1.0以上であることを確認した上で検体の吸光度を判定する。HPV<0.20かつβグロビン≥0.20の場合、ハイリスク型HPVDNA陰性、HPV<0.20かつβグロビン<0.20の場合、判定保留、HPV≥0.20の場合βグロビン吸光度には関係なくハイリスク型HPVDNA陽性と判定する(表1)。

IV. 精度管理⁴⁾

PCR法は微量の検体から迅速に標的とする遺伝子領域の増幅が実施できるが、検体処理や試薬調整のステップにおいて、検体間のクロスコンタミネーションや増幅産物のキャリーオーバーコンタミネーションを起こさないよう十分な注意が必要である。また阻害物質の混入などは増幅不良を引き起こす可能性もある。コンタミネーションや増幅不良のトラブルは偽陽性や偽

表1 測定結果の判定

HPV	βグロビン	判定
<0.20	≥0.20	13種類のハイリスク型HPVDNA 陰性
<0.20	<0.20	判定保留 検体中に阻害物質が存在したか、十分な細胞量が採取されていない可能性が考えられます
≥0.20	吸光度関係なし	13種類のハイリスク型HPVDNA 陽性

陰性の原因となるため検査結果に影響を及ぼす。本キットでは、これら偽陽性や偽陰性を防止するため、dUTPとアンペレース® (UNG：ウラシルNグリコシラーゼ) を用いたキャリアオーバーコンタミネーションの防止システムの採用と、細胞由来のβグロビン遺伝子を同時増幅することにより偽陰性を確認できる工夫が施されている。dUTPとアンペレース®は増幅過程で用いるマスターミックス試薬に含まれ、持ち込まれた

遺伝子増幅産物を分解し、キャリアオーバーコンタミネーションによる偽陽性を防止する。

偽陰性の防止策は、ヒト細胞由来のβグロビンをインターナルコントロールとして用いることで、細胞量が不十分な不適切検体の確認やPCR反応の阻害などの有無を確認できる。これら精度管理システムをもつことで、日常検査としての有用性を高めると考えられる (図2)。



図1 アンプリコアHPVキットの測定原理

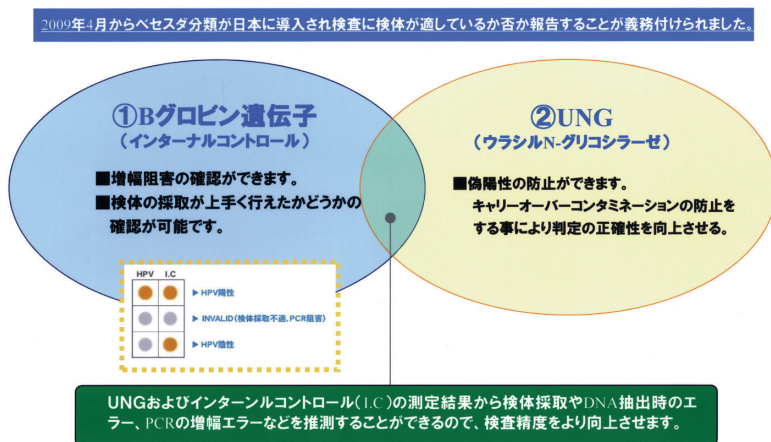


図2 精度管理システム

V. 性能

すべてのハイリスク型HPVが検出できる最小検出感度は、480コピー/mL（表2）である。

特異性の確認としては、子宮頸部に存在する可能性のある79種類の微生物とローリスク型HPV（6, 11, 26, 40, 42, 43s, 44, 53, 54, 55B, 57, 64, 66, 67, 70）において交差反応は認められなかった。

他法（ハイブリットキャプチャー法：QIAGEN）との相関性試験成績は一致率85.2%（242/284）（表3）であった。

VI. おわりに

子宮頸がんの発症には、HPVの感染が関与していることが明らかにされ、細胞診の結果、ベセスタ分類上ASC-US（意義不明異型扁平上皮）と判定された患者に対し保険適応がされた。また、2009年末には日本でもHPV予防ワクチンも承認された。今後さらにいっそう臨床現場においてHPV検査が注目されていくと考えられる。

表2 最低検出感度

ハイリスク型HPV13種類の検出感度

Genotype	検出感度 (copies/mL)
16	100
18	100
31	240
33	100
35	100
39	100
45	100
51	100
52	240
56	100
58	240
59	240
68	100

*すべてのタイプにおける感度100%は480copies/mL

表3 アンプリコアHPVとHC IIとの相関

		HC II	
		陽性	陰性
アンプリコアHPV	陽性	92	28 ^{*2}
	陰性	14 ^{*1}	150
一致率		85.2% (242/284)	

*1 14例をアンプリコアアレイ（HPV）ジェノタイプングキットで再検したところ9例がハイリスク型ではない型と判定された。

*2 28例をアンプリコアアレイ（HPV）ジェノタイプングキットで再検したところ21例が陽性と判定された。

参考文献

- Gissmann L, zur Hausen H: Partial characterization of viral DNA from human genital warts(condyloma Acuminata). Int J Cancer, 25: 605-609, 1980.
- ベセスタシステム2001準拠子宮頸部細胞診報告様式の理解のために. (社)日産婦医会編, 12, 2008.

- Davies P, Kornegay J, Iftner T: Current methods of testing for human papilloma virus. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 15: 677-700, 2001.
- Longo, M.C. et al.: Use of uracil DNA glycosylase to control carryover contamination in polymerase chain reactions. Gene, 93: 125-128, 1990.