

3. がん対策における子宮頸がん早期発見と ワクチン接種に向けての調査研究

－HPV 感染状況とアンケート意識調査から－

○村山 力則 （秋田県健康環境センター）

【 目 的 】

現在我が国では毎年約 10,000 人が子宮頸がんと診断されており、そのうち毎年約 2,500 人が死亡している。さらに近年 20 歳代、30 歳代の若年者の子宮頸がん患者の顕著な増加がみられており、その対策が喫緊の課題となっている。子宮頸がんは進行が遅いことから、比較的早期に発見することで子宮切除を防ぐことで妊娠も可能あることから、特に若年層における子宮頸がん検診の重要性は増している。

子宮頸がん予防ワクチンを推奨している WHO（世界保健機関）の勧告では、子宮頸がん検診は必ず受けるべきだと明記されており、子宮頸がんの一次予防がワクチン、二次予防が子宮頸がん検診となっている⁽¹⁾。2009 年、日本においても 2 価ワクチンが 2011 年には 4 価ワクチンが日本において発売され、2010 年からは期間限定ではあるが公費補助によるワクチン接種が可能となった。子宮頸がんをほぼ 100% 予防するためには、子宮頸がん検診をあわせて受けることが必要であるが、ワクチンによる子宮頸がんの 70% は予防可能と推定されている⁽²⁾。一方、子宮頸がん検診については子宮頸がん検診の無料クーポン券などの政策で受診率 50% を目指しているが、日本での子宮頸がん検診受診率は 20% 程度となっており、世界の先進国と比較しても極めて低い状況である。また秋田県においての子宮頸がん受診率は、全国平均よりは若干高いが、平成 19 年度秋田県の子宮頸がん検診受診率は 27.7% と、乳がん検診とともに、他のがん検診より受診率が低く受診率の向上が課題となっている。

また、子宮頸がん発症原因の 99% はヒトパピローマウイルス（以下 HPV）による感染であることから、HPV 感染を制御することは子宮頸がんの発症を抑制することに繋がると考えられる。現在、各都道府県では子宮頸がん と HPV の調査研究が行われているが、秋田県においては HPV 感染調査や子宮頸がんに対する県民の意識調査は行われておらず、子宮頸がん対策へのフォローアップが充分ではない。

そこで本研究は県民へのアンケート調査の解析により、県民への啓発・普及活動に期待できるとともに子宮頸がんの検診率の向上や、自治体によるワクチン公費補助についての基礎資料とすることを目標するとともに、子宮頸がん検診の検査において PCR による HPV-DNA 法の条件検討を行い検診結果の精度向上を試みることを試みた。

【 方 法 】

1)アンケート調査

アンケート調査はインターネットによる Web アンケートをおこなった。調査委託先として株式会社マクロミルに調査を依頼し、回答モニターに登録している秋田県在住の女性約 2,500 人にアンケートを送付した。実施期間は 2011 年 8 月 9 日から 2011 年 8 月 15 日の間であり、子宮頸がんに関する基礎知識を質問事項とした。回答数は 1,030 人からの回答があった。クロス集計はマクロミルより配布されている統計解析ソフト「Quick-CROSS3 plus」を用いた。集計結果の数値を、小数点以下第 2 位で四捨五入しているため、各回答の合計が 100%に一致しないことがある。また複数回答の設問については、回答比率の合計は、100%を超える。

2)HPV-DNA 法

検体は秋田県健康環境センターにて保存されている子宮頸部細胞を用い、QIAamp MinElute Media Kit (Qiagen) を用いて DNA を精製後、最終量 50 μ L で溶出を行った。PCR 反応は TaKaRa Ex Taq (TAKARA BIO)、もしくは 2 \times GoTaq Green Master Mix (promega) 使用し、バッファー等は添付されているものを使用し、マニュアルどおりの濃度で行った。使用した primer は MY プライマーセット(MY09 および MY11)⁽³⁾、MY プライマーを改良した PGMY プライマーセット(PGMY09 および PGMY11)⁽⁴⁾、GP5/GP6+プライマー(GP5+および GP6+)⁽⁵⁾セットを使用した。これらのプライマーは HPV の L1 遺伝子を標的増幅するコンセンサスプライマーであり、GP5+/GP6+プライマーは L1 遺伝子の MY および PGMY プライマーの内側に設定されている。PCR により HPV が陽性だった場合、MY および PGMY プライマーで約 450bp の DNA 断片が増幅され、GP5+/GP6+プライマーでは約 140 bp の DNA 断片が増幅される。

【 結果および考察 】

1)アンケート調査

アンケートを集計した結果、約 2,500 人の調査モニターのうち、1,030 名から回答があり、回収率は約 41.2%であった。その内訳は 20 代 17.4%、30 代 36.7%、40 代 27.9%、50 代 14.8%、60 代以上 3.2%で、うち既婚者 66%、未婚 34%であった。現在まで 1 度も検診を受けたことのない女性は 268 人 (26.4%)であり、年代別で 20 代が 50.8%、30 代が 25.9%、40 代が 16.7%、40 代が 16.7%、50 代が 16.3%、60 代以上 18.2%となっていた(図 1)。また子宮頸がんに関する知識については全体で「予防にはワクチンが有効である」が 67.0%、「20~30 歳に急増している」が 54.4%と 50%を超えていたが、その他の回答は 50%を下回っており、「禁煙が有効である」という回答は最も低くかった。20 代では「この中に知っているものはない」と、一つも知らないと回答した女性が 17.3%と他の年代よりも有意差が、30 代では「20~30 歳に急増している」という回答が他の年代よりも有意差があり、「早期であればほぼ 100%

治る」という回答は、年齢の増加とともに回答率が高かった（表 1）。また子宮頸がん検診受診者は未受診者よりも全ての設問で回答率が高く（表 2）、このことから子宮がん検診を受診しない女性ほど、受診したことのある女性より知識または関心が低いことがわかり、子宮がん検診の受診率低下に関与することが示唆された。

今回日本でも登場した HPV ワクチンは、子宮頸がんの発生を根本的に予防する（一次予防）ワクチンとして大きな期待を集めている。当面は多くの一般の女性にとって、HPV ワクチンを接種した人もしない人も共通に、子宮頸がんを予防する最も確実に信頼できる手段は子宮頸がん検診であることに変わりないが、ワクチンの接種は始まったばかりであり 10 年後、20 年後でないと正確なワクチンの効果はわからないが、現在からワクチン接種率や検診受診率の向上に努めるため、引き続き啓発していく必要があると思われる。

2)HPV 遺伝子増幅条件の検討（図 2,3）

検体より抽出した DNA を、文献で報告のある MY プライマー法、PGMY プライマー法、GP5+/GP6+プライマー法などのプライマー検討、PCR 反応条件、Taq ポリメラーゼの検討について行った。検体より抽出された No.1 から No.8 の DNA について、MY プライマー、PGMY プライマー、GP5+/GP6+プライマーを用い熱変性 95°C(60 秒)、アニーリング 55°C(60 秒)、伸長反応 72°C(60 秒)の 40 サイクルで PCR を行った(GP5+/GP6+プライマーはアニーリング 40°C)。3 組のプライマーセットではいずれも No.4 と No.7 から HPV が検出され、プライマーセットによる差は見られなかった。そこで PCR 反応のサイクル条件を検討するため、増幅が困難な場合に用いられる Touch-down PCR を試みた。その結果、GP5+/GP6+プライマーによる Touch-down PCR において NO.5 を除く、すべての検体で HPV 陽性となった。PGMY プライマー法では No.4 と No.7 の増幅効率の上昇と、No.6 と No.8 のわずかな感度上昇があったのみであった。しかしながら Touch-down PCR 法は PCR 反応の時間の長さ、アニーリング温度を 1 サイクルごとに 0.5°C 減少させることによる PCR 装置の制限、および再現性などで効率が悪かったため、PGMY プライマーセットおよび GP5+/GP6+プライマーセットによる Semi-nest PCR 法を検討した。

Semi-nest PCR 法は一对のプライマー、およびその一方の内側にあるプライマー 1 本の計 3 本を利用し、1st PCR でテンプレート DNA を増幅し、2nd PCR で外側と内側を増幅する方法であり、今回は PGMY プライマーと GP5+/GP6+プライマーセットの一方である PG6+プライマーの計 3 本を利用した。プライマー濃度は 25 pmol の PGMY11 プライマー、GP6+プライマー、および 6.25 pmol の PGMY09 プライマーを加え、50µl の反応溶液で Semi-nest PCR を行った。また PCR の条件は 95°C 3 分の denature 後、95°C(30 秒)、53°C(30 秒)、72°C(30 秒)を 10 サイクル行い、引き続き 95°C(30 秒)、40°C(30 秒)、and 72°C(30 秒)を 40 サイクル行い最終伸長反応を 72°C で 5 分行った。電気泳動の結果、No.5 を除くすべての検体で目的となる 190bp の DNA 断片（図 2）が検出され、Touch-down PCR 法よりも増幅効率が上昇していた。Semi-nest PCR 法は PCR 反応終了まで約 3 時間であり、装置による制

限もないことから、迅速性および汎用性の点で多い有効であることが判明した。

また TaKaRa Ex Taq の代わりに 2×GoTaq Green Master Mix (promega)を用い、プライマー濃度はそのまま、1×濃度になるように反応溶液 50 μl で PCR 行い、電気泳動にて確認したところ、検出バンドが TaKaRa Ex Taq よりも濃く現れ、さらに増幅効率が上昇していた。このことは TaKaRa Ex Taq が増幅エラーを修正する 3'→5' エキソヌクレアーゼ活性を有しているため、GoTaq よりも増幅効率が低いためと思われる。

子宮がん検診の精度管理に関しては細胞診での評価が、従来のクラス分類より HPV 感染の考えを取り入れたベセスダシステムが導入されている。さらに細胞診異常が疑われる場合には子宮頸部細胞の HPV 検査、前がん病変に関しては HPV ジェノタイプング検査が保険適用となっている。しかしながら HPV 遺伝子検査は子宮がん検診においては未だに導入されておらず、国や自治体の子宮頸がんに対する対策はまだ始まったばかりである。また子宮頸がん検診の検査精度の向上は、子宮頸がんの早期発見のためのエビデンスにつながるものと期待される。

【参考文献】

- 1) Human papillomavirus vaccines WHO Position Paper in WHO: WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, NO. 15, 10 APRIL 2009.
- 2) 今野 良: HPV ワクチンとは—子宮頸がんの予防効果, 思春期学, 28 (1) :127-134, 2010
- 3) Evander M, et. al., Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol.* 1992 30(4):987-92.
- 4) Gravitt PE, et. al., Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000 38(1):357-61.
- 5) Husnjak K, et. al., Comparison of five different polymerase chain reaction methods for detection of human papillomavirus in cervical cell specimens. *J Virol Methods.* 2000 88(2):125-34.

【図表】

図 1: アンケート調査からの子宮頸がん検診未受診者の年齢階級割合

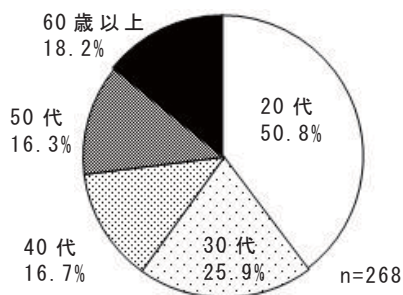


表 2: 子宮頸がん予防知識における検診経験者および未受診者状況

	はい (n=762)	いいえ (n=268)		全体
20~30歳に急増している	58.0	44.0	**	54.4
ヒトパピローマウイルスが関与している	46.6	22.8	**	40.4
予防にはコンドームが有効である	26.1	21.6		25.0
禁煙が有効である	4.9	3.0		4.4
早期であればほぼ100%治る	46.7	27.2	**	41.7
予防にはワクチンが有効である	71.4	54.5	**	67.0
この中に知っているものはない	7.5	18.7	**	10.4

** p<0.01 (t 検定)

表 1:子宮頸がん検診に関連した予防知識等のアンケート調査結果

	20歳代 (n=179)	30歳代 (n=378)	40歳代 (n=287)	50歳代 (n=153)	60才以上 (n=33)	全体
	a	b	c	d	e	
20~30歳に急増している	52.5 _d	66.1 _{ACDE}	47.0	43.1	45.5	54.4
ヒトパピローマウイルスが関与している	33.0	46.0 _{AdE}	40.8 _{ae}	37.9	24.2	40.4
予防にはコンドームが有効である	27.4 _d	27.2 _D	24.7	19.0	15.2	25.0
禁煙が有効である	5.0	5.3	3.5	3.3	3.0	4.4
早期であればほぼ100%治る	20.1	37.8 _A	44.3 _{Ab}	64.7 _{ABC}	72.7 _{ABC}	41.7
予防にはワクチンが有効である	52.5	69.3 _A	71.4 _A	71.2 _A	60.6	67.0
この中に知っているものはない	17.3 _{BCD}	9.3	9.8	5.9	12.1	10.4

注) 各回答のアルファベットは a~e の年代に題して、大文字は A, B, C, D, E は 99%の有意差、小文字 a, b, c, d, e は 95%有意差を示す。(t 検定)

図 2:HPV DNA 検査に用いたプライマーの概要

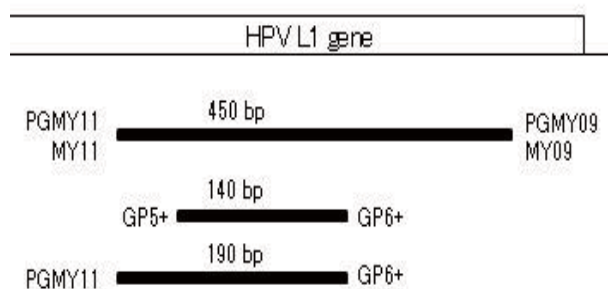


図 3:種々の PCR 法による HPV 検出感度の比較

	MY, PGMY, GP5+/6+ プライマー法	GP5+/6+ プライマー法 touch-down PCR	Semi-nest PCR法
No.1	—	+	++
No.2	—	+	++
No.3	—	+	++
No.4	++	+	++
No.5	—	—	—
No.6	±	+	++
No.7	++	+	++
No.8	±	+	++

【 経費使途明細 】

品名	数量	単価	小計
TaKaRa Ex Taq	2個	27,000	54,000
PCR用 合成プライマー	20本	2,000	40,000
アンケート調査 委託費	-	-	150,000
0.2 ml PCRチューブ	1袋	16,000	16,000
ピペットチップ	3袋	10,000	30,000
1.5 ml エッペンドルフチューブ	2袋	5,000	10,000
合計			300,000