

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16727

研究課題名（和文）男性尿路ヒトパピローマウイルス感染の自然史の解明

研究課題名（英文）The natural history of human papillomavirus infection in genitalia and urine of Japanese men

研究代表者

中嶋 一史（Nakashima, Kazufumi）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：70792810

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本検討では、尿検体を用いて男性の尿路HPV感染率をスクリーニングし、その感染部位について検討した。泌尿器科外来を受診した患者845例における総HPVおよび高リスク型HPV検出率はそれぞれ6.2%、3.1%であった。疾患別にみると、尿道炎患者において検出率が最も高かった。一方、尿道炎を除く730例で検討すると尿路性器癌の患者からのHPV検出率が有意に高かった。次に、尿路上皮癌患者135例を対象として、膀胱洗浄尿を用いて調査したところHPV検出率は5.2%であった。頻度は低いものの、男性の尿路にもHPV感染は生じており、尿路上皮癌患者の膀胱にもHPV感染が生じているものと推察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸癌の原因とされているヒトパピローマウイルス（HPV）は、性行為によって男女間を伝播することが知られている。そのためHPVの主な感染部位は外性器とされており、男性の場合、陰茎がHPV感染の好発部位であるとされてきた。本検討では、簡便に採取することができる尿検体を用いて男性の尿路HPV検出率に関する疫学調査を実施し、男性の尿路にもHPV感染が生じていることを確認した。特に尿道炎（性感染症）の症例、尿路上皮癌の症例において尿路HPV感染が生じていることを見出した。

また、膀胱洗浄液を用いて検討することで、HPVが膀胱にも感染している可能性についても言及できた。

研究成果の概要（英文）：The present study investigated HPV prevalence and its natural history in the urinary tract among men. Urine samples were collected for a HPV analysis from 845 patients who attended at urological clinic. Among 803 valid samples, overall HPV and high-risk HPV prevalences were 6.2% and 3.1%, respectively. HPV and HR-HPV prevalences were the highest in men with urethritis, and were significantly higher than those without urethritis. On the other hand, a sub-analysis excluding men with urethritis demonstrated that urogenital cancer was a significant risk factor for HPV detection. In addition, another study was conducted to assess the HPV infection sites by using bladder washes among the patients with bladder carcinoma. HPV prevalence in 135 bladder washes samples was 5.2%.

Although HPV infection do not frequently occurs in urinary tract compared to external genitalia, the present findings confirm that HPV can infect in urinary tract(urinary bladder) in men.

研究分野：尿路性器感染症

キーワード：ヒトパピローマウイルス 尿路感染症 性感染症 膀胱癌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトパピローマウイルス (HPV) は、人に感染して疣を誘発するウイルスであり、現在 100 種類以上の型が同定されている。1989 年、zur Hausen らによって子宮頸癌の原因として HPV16、18 型が発見されて以来、多くの粘膜上皮に感染するタイプ (粘膜型) が分離され、現在は 40 タイプ以上が見つかっている。HPV は、尖圭コンジローマの原因となる低リスク型と、子宮頸癌を誘発する高リスク型に分類される。そのうち、高リスク型 HPV は 15 種類以上同定されており、子宮頸癌及びその前癌病変等の原因として知られている。性的活動のある健常若年女性の 20-60% に HPV 感染が認められると報告されており、また、約 80% の女性が生涯に一度は HPV に感染すると報告されている。そのため、HPV は性行為感染 (Sexually Transmitted Infection; STI) の中で最も多い病原体の 1 つであると考えられている。

一方、パートナーである男性における HPV 感染についても研究されるようになり、男性にも女性と同等に HPV 感染が生じており、その主な感染部位は外性器であると報告されてきた。さらに、近年、子宮頸癌以外の腫瘍 (咽頭癌、陰茎癌、肛門癌など) の発生と HPV 感染との関連性についても示唆され始めてきた。それらの理由から、集団接種効果として HPV のリザーバーである男性に対してもワクチンを接種すべきであろうという考えと男性における子宮頸癌以外の悪性腫瘍の発生予防への期待のもとで、現在、世界 70 カ国以上において HPV6 型、11 型、16 型、18 型に対する 4 価ワクチン (ガーダシル<sup>TM</sup>) の男性への適応が認められるようになり、男性に対する約 3 年程度の短期的な HPV 感染予防効果も報告されるようになった。

男性における HPV 感染は、女性に対する HPV 感染のリザーバーであるという事と、男性にも発癌するリスクがあるという 2 つの意味を持っている。男性における HPV 感染予防ワクチン接種は、腫瘍発生の予防および集団予防接種効果として、男女における HPV 感染自体をさらに減らすことが期待されている。一方、本邦においては、いまだ HPV 感染予防ワクチンは女性のみでしか認可されておらず、その接種率は約 50% 程度にすぎない。本邦においても、たとえ任意接種としてでも男性にワクチンを適応させるためには、男性における HPV の感染のスクリーニング検査が必須である。

女性の HPV 感染に関しては子宮頸部の擦過細胞診及び HPV 検査によるスクリーニングが行われているが、一方男性における HPV 検査が行われていないのが現状である。以前、当教室から子宮頸癌検診で汎用されている液状細胞診用の固定液を用いて、尿検体を保存すると尿中 グロビンの検出率は 97.4 - 97.9% であったと報告し HPV 検査とともに尿細胞診も併用して検査できることを報告した。そこで HPV の感染の有無を尿細胞診で行うことが可能になればより安価で低侵襲のスクリーニング検査が可能になると考えられた。

一般的には、男性における主な HPV の感染部位は外性器 (亀頭、陰茎) であるが、我々は、前述した方法を用いて尿路にも HPV 感染が生じていることを報告してきた。そのため尿路 HPV 感染と尿路悪性腫瘍との関連性について注目しており、尿路 HPV 感染の自然史を解明し、尿路悪性腫瘍との関連性を調べるためには、尿検体を用いることが最も簡便かつ低侵襲であると考えた。現在、男性において尿検体を用いた尿路の HPV 検査に関する疫学調査は国内外を問わずほとんど行われていないため、今回、この手法を用いて男性尿路 HPV 感染に関する疫学調査を行った。

## 2. 研究の目的

女性においては子宮頸部細胞診にて安価な HPV スクリーニングが行われている一方で男性においては HPV スクリーニングが行われていないのが現状である。そこで本研究では、当教室で以前報告した尿路検体を利用した細胞診によるスクリーニング方法を用いることでより安価で簡便な尿路 HPV 感染のスクリーニングが可能になるのではないかと考えた。

各泌尿器科疾患 (尿路性器悪性腫瘍、尿道炎、男性不妊をはじめとする良性疾患) をもつ患者より尿検体を採取し、尿中 HPV 検出率・細胞診を比較検討し、尿路 HPV 感染と尿路悪性腫瘍との関連性について考察するとともに、尿を用いた HPV 検査のスクリーニング法の有用性を検討する。

また、同一患者から定期的 (半年毎程度) に尿検体を採取し、同一の HPV 検査をすることによって尿路 HPV 感染の自然史を解明したい。

さらに、尿路 HPV 感染が陽性の場合、尿路のどの部位に HPV 感染が生じているかについて推定を行う。

## 3. 研究の方法

泌尿器科受診患者から尿検体を採取し、DNA を抽出して Modified GP5+/GP6+ PCR 法にて HPV-DNA の有無について検討した。Modified GP5+/GP6+ PCR 法は、粘膜に感染するほぼすべての HPV が検出可能な高感度 PCR 法である。HPV 陽性検体については、flow-through hybridization を応用した GenoArray Kit を用いて遺伝子型判定を行った。

これは、以前から我々が使用してきた方法で、15種類の高リスク型 HPV、5種類の低リスク型 HPV と1種類のリスク不明型 HPV の合計 21種類の HPV を同時に簡便に検出ができる方法である。

つぎに、同一検体の残りをを用いて、パパニコロウ染色にて尿細胞診を行い、HPV 感染関連細胞異常や異型細胞の有無を調査する。さらに *in situ* hybridization 法を用いて、HPV の感染細胞（尿道の扁平上皮、膀胱の尿路上皮）の特定を試みた。

各種患者背景による尿路 HPV 感染率の違いを見るため、まずは一般泌尿器科外来を受診した患者を対象に調査し、次に尿路上皮癌患者・男性不妊患者・女性患者（子宮頸癌以外の産婦人科疾患）を対象として尿路 HPV 感染の疫学調査を実施した。

以上の検体結果をもとに、各患者の基礎疾患別に HPV 感染率・細胞診異常について比較検討を行った。

#### 4. 研究成果

##### 1) 尿路 HPV 感染のスクリーニング調査として、泌尿器科外来を受診した患者 845 例より尿検体を採取した。

PCR 法を用いて グロビン増幅を確認し、そのうち有効検体は 803 例 (95.0%) であった。従来、尿からは グロビンの採取がしにくく HPV 検査に適さないとされてきたが、十分に有効検体が得られることを再確認した。

有効検体 803 例における HPV および高リスク型 HPV 検出率はそれぞれ 6.2%、3.1% であった。通常、外性器の HPV 感染は、男女ともに若年者に多く、加齢とともに感染率は減少している。しかし男性の尿検体における HPV 検出率に年齢差は認めなかった。

疾患別にみると、「尿道炎」患者における尿路 HPV 検出率が最も高かった (Odds ratio: 4.56,  $p=0.001$ )。「尿道炎」患者は、sexual activity が高い集団もしくは sexual activity が高い女性 (commercial sex workers など) との性行為があった集団であり、HPV 検出率が「尿道炎」患者に最も多いことは予想通りであった。

一方、尿道炎を除く 730 例で検討すると尿路性器癌の患者からの HPV 検出率が有意に高かった (OR=2.844,  $p=0.040$ )。これらの患者において、*in situ* hybridization で HPV-DNA の感染細胞を特定することを試みたが、抗原の不活化の過程で細胞が剥がれてしまい研究期間内には結果を出すに至らなかった。現在も手法の改良を試みている。

##### 2) これをうけ、尿路上皮癌患者を対象に絞り、尿検体を用いた尿路 HPV 感染のスクリーニングを実施した。この検討では膀胱洗浄液と尿検体を用いて、HPV 感染部位の特定を試みた。

尿路上皮癌患者から膀胱洗浄尿 135 検体および自然尿 64 検体を採取した。同一患者から両検体を採取し、調査期間内に結果がでたのは 64 例であった。膀胱洗浄液における HPV および高リスク HPV 検出率は、それぞれ 5.2% (7 検体)、4.4% (6 検体) であった。一方、自然尿検体における HPV および高リスク HPV 検出率は、それぞれ 14.1% (9 検体)、12.5% (8 検体) であった。

同一患者から膀胱洗浄尿および自然尿をともに採取した症例 (64 例) のうち、両者ともに HPV が検出された症例は 1 例のみ (HPV16 陽性) であった。

このことから、膀胱洗浄尿のみから HPV が検出された症例における HPV 感染部位は膀胱、自然尿のみから HPV が検出された症例は、尿道感染であると推定した。尿路の HPV 感染部位としては尿道が最も多いことが考えられた一方で、尿路上皮癌患者の約 5% に膀胱内 HPV 感染が認められたことが分かった。また、HPV の膀胱内感染を調査するためには、膀胱洗浄液を使用することが望ましいことが分かった。

HPV 感染の自然史を調査するために、HPV 陽性例については、膀胱鏡検査の定期 follow up 時に、断続的に尿検体・膀胱洗浄液を採取したが、現時点で研究期間内に実験・解析は終了せず、研究期間終了後に引き続き検討していく予定としている。

##### 3) 次に男性不妊患者を対象とし、自然尿および精液を用いて HPV 検出率を調査した。また、本研究とは別に、非特異的尿道炎や早産・流産の原因の 1 つとされる各種病原体 (mycoplasma 属、ureaplasma 属) 感染の有無についても合わせて調べた。

1年以上の不妊を主訴に受診した男性不妊患者を対象とした無症候性男性不妊患者 77 例における初尿と精液を対象とした。精液検体における HPV 検出率は 6.5% (5 例) であった。一方、尿検体における HPV 検出率は 3.8% (3 例) であった。

Ureaplasma 属の検出率は、精液検体 7.2%、尿検体 14.2% であった。M. hominis の検出率はそれぞれ、3.8%、3.8% であり、M. genitalium の検出率はそれぞれ 5.1%、1.2% であった。

M. hominis, Ureaplasma spp および HPV の精液と対応する尿検体からの検出との間には、完全な一致 (カッパ係数 (K) =1.0) と高い一致 (K=0.673), (K=0.737) を認めた。非無精子症患者 (55 人) において HPV 陽性群は (3/55) は陰性群 (52/55) よりも精子濃度およ

び精子運動率が有意に低かった ( $P=0.0261$ ), ( $P=0.0328$ ). 無症候性男性不妊患者において、無精子症ほど HPV 検出率が高いことが分かった。また、Ureaplasma の感染は精液量に影響を及ぼす可能性が示唆された。

- 4) さらに婦人科疾患 (HPV 感染との関連性が深い子宮頸癌を除く) で手術した女性 24 例を対象として、同一患者より自然尿 (初尿) および導尿検体の 2 種類を採取し、それらの HPV 検出率について比較検討した。

自然尿における HPV 検出率は 33.3% (8 例) であった一方で、導尿検体ではわずか 1 例 (4.2%) であった。尿検体および導尿検体両者から HPV が検出された症例はなかった。現在、50 例ほど検体を採取しており、解析を進めている。

女性の場合、尿検体における HPV 検出率が男性に比べると明らかに高く (研究 1-3 の結果と比較して) 女性の尿中 HPV は外陰部等のコンタミネーションを見ている可能性が考えられ、自然尿検体を用いた場合の結果の解釈には注意を要することが伺えた。また、導尿検体における HPV が膀胱感染を示すかについては今後、*in situ* hybridization 法などを用いて調べる予定としている。

以上から、外性器に比べるとはるかに少ないものの、尿路にも HPV 感染が生じていることが推定された。

また、尿路の感染部位として尿道だけでなく、膀胱も考えられた。特に尿路上皮癌患者における HPV 検出率が高く、今後は尿路上皮癌 (特に膀胱癌) と HPV 感染との関連性に関する検討が望まれる。また、尿路 HPV 感染率 (特に膀胱内感染) に男女差は認めなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kazufumi Nakashima, Kazuyoshi Shigehara, Tadaichi Kitamura, Masayoshi Shimamura, Shohei Kawaguchi, Hiroshi Yaegashi, Koji Izumi, Yoshifumi Kadono, Mikio Namiki, Toshiyuki Sasagawa, Atsushi Mizokami	4. 巻 24
2. 論文標題 Risk factors for Human papillomavirus detection in urine samples from men who attended the urological clinic in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of infection and chemotherapy	6. 最初と最後の頁 713-717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2018.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakamoto J, Shigehara K, Nakashima K, Kawaguchi S, Nakashima T, Shimamura M, Yasuda M5, Kato T, Hasegawa T, Kobori Y, Okada H, Deguchi T, Izumi K, Kadono Y, Mizokami A.	4. 巻 78
2. 論文標題 A. Etiological Role of Human Papillomavirus Infection in the Development of Penile Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 148-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijid.2018.11.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 坂本次郎、重原一慶、中嶋一史、飯島将司、川口昌平、野原隆弘、泉浩二、角野佳史、溝上敦	4. 巻 29
2. 論文標題 経尿道的にホルミウム・ヤグレーザーを用いた治療が奏効した尿道コンジローマの1例	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本性感染症学会誌	6. 最初と最後の頁 123-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24775/jjsti.29.1.123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 重原一慶、中川朋美、坂本次郎、中嶋一史、八重樫洋、川口昌平、中嶋孝夫、島村正喜、北村唯一、溝上敦	4. 巻 30
2. 論文標題 男性における尿検体を用いたHuman Papillomavirus検査の意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本性感染症学会誌	6. 最初と最後の頁 15-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24775/jjsti.0-2019-0003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Yuki, Kawaguchi Shohei, Shigehara Kazuyoshi, Yaegashi Hiroshi, Nakashima Kazufumi, Nakagawa Tomomi, Sakamoto Jiro, Itoda Ichiro, Ueda Mikio, Izumi Kouji, Kadono Yoshifumi, Mizokami Atsushi	4. 巻 26
2. 論文標題 Prevalence of N. gonorrhoeae, C. trachomatis, M. genitalium, M. hominis and Ureaplasma spp. in the anus and urine among Japanese HIV-infected men who have sex with men	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 403 ~ 406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.12.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中川朋美 重原一慶 川口昌平 八重樫洋 飯島将司 中嶋一史 野原隆弘 泉浩二 角野佳史 溝上敦
2. 発表標題 尿路上皮癌患者におけるHPV感染の検討
3. 学会等名 日本性感染症学会 第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 重原一慶、川口昌平、中嶋一史、八重樫 洋、中川朋美、坂本次郎、泉 浩二、北村唯一、島村正喜、溝上 敦
2. 発表標題 男性における尿検体を用いたHPV検査の意義
3. 学会等名 日本性感染症学会 第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口昌平、重原一慶、中嶋一史、八重樫 洋、坂本次郎、中川朋美、井戸田一朗、上田幹夫、中嶋孝夫、溝上 敦
2. 発表標題 日本人男性における尿及び肛門のマイコプラズマ検出率についての検討
3. 学会等名 日本性感染症学会 第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂本次郎、重原一慶、中嶋一史、川口昌平、中嶋孝夫、島村正喜、安田 満、小堀善友、出口 隆、溝上 敦
2. 発表標題 陰茎癌におけるHPV感染の役割と発癌メカニズムについての検討
3. 学会等名 日本性感染症学会 第31回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S Kawaguchi, K Shigehara, K Nakashima, H Yaegashi, J Sakamoto, T Nakagawa, M Iijima, T Nohara, K Izumi, Y Kadono, A Mizokami.
2. 発表標題 Human papillomavirus, mycoplasma and ureaplasma prevalence in the anus among Japanese men who have sex with men.
3. 学会等名 32nd International papillomavirus conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K Nakashima, K Shigehara, T Kitamura, H Yaegashi, M Shimamura, S Kawaguchi, K Izumi, Y Kadono, A Mizokami.
2. 発表標題 Risk factors for human papillomavirus detection in urine of Japanese men.
3. 学会等名 32nd International papillomavirus conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口昌平、重原一慶、大阪康宏、中川朋美、加藤佑樹、坂本次郎、中嶋一史、笹川寿之、溝上 敦
2. 発表標題 女性の初尿検体と導尿検体におけるHPV検出についての検討
3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本次郎、重原一慶、清水恭子、前田新太郎、中川朋美、中嶋一史、川口昌平、泉 浩二、角野佳史、溝上 敦
2. 発表標題 遠位尿道に浸潤したHPV16型を認めた陰茎Bowen病の1例
3. 学会等名 日本性感染症学会 第32回学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考