

Polymerase Chain Reaction 法による子宮頸部擦過細胞における HPV16型, 18型 DNA 検出

—HPV 検出キット Vira Pap™法との比較検討—

広島大学医学部産科婦人科学教室

太田 さなえ 永井 宣隆 藤本 英夫
木岡 寛雅 藤原 篤

Amplified DNA Detection of HPV Types 16 and 18 DNA in Cervical Scrapes by Polymerase Chain Reaction

Sanae OHTA, Nobutaka NAGAI, Hideo FUJIMOTO,

Hiromasa KIOKA and Atsushi FUJIWARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima

概要 子宮頸部各種病変43例(慢性頸管炎12例, 軽度異形成7例, 中等度異形成3例, 高度異形成3例, 上皮内癌11例, 浸潤癌7例)の擦過細胞より得たDNAを用いて, Polymerase Chain Reaction (PCR) 法より, HPV16型, 18型初期遺伝子 E7領域の増幅検出を行った。一方, 同一症例に対し, HPV 簡易検出キット Vira Pap™ (dot blot) 法も併用し, 以下の成績を得た。

1) PCR 法による検索では, HPV16型, 18型 DNA が検出されたものは43例中25例 (58.1%) であった。組織型との比較においては, 異型性が強くなるにつれて検出率の上昇を認め, 上皮内癌では11例中9例, 浸潤癌では7例全例に HPV DNA が検出された。

HPV16型と18型のタイプ別では, 16型陽性が16例 (37.2%), 18型陽性が8例 (18.6%), 16型, 18型ともに陽性が1例 (2.3%) で, 16型の陽性率のほうが高かった。

2) HPV 検出キット Vira Pap™ (dot blot) 法による検索では, 43例中25例 (58.1%) に HPV DNA が検出された。そして, HPV DNA が陰性であった18例に対し PCR 法を行った結果, 1例に16型, 4例に18型, 1例に16型及び18型が検出され, PCR 法において HPV16型と18型のより高い検出率が得られた。

3) PCR 法により慢性頸管炎12例中1例 (8.3%) に18型 DNA が検出され, HPV 感染症例の中で異常所見を示さない症例の存在が確認された。

以上, PCR 法による子宮頸部擦過細胞を用いた HPV16型, 18型初期遺伝子 E7領域の DNA 検出から, 子宮頸癌と HPV 感染との関連性がより強く示唆された。

また, PCR 法は微量な DNA を検出でき, 比較的短時間で多数の検体処理が可能であることから, 今後マスキングを含めた HPV 感染の DNA 診断への応用が期待された。

Synopsis Cervical scrapes from 43 patients (12 with chronic cervicitis, 13 with dysplasia, 11 with carcinoma in situ and 7 with invasive carcinoma) were examined by the polymerase chain reaction (PCR), to detect the amplified E7 gene of the HPV types 16 and 18 DNA sequence. HPV types 16 and/or 18 DNA were detected in 25 of 43 cases by the PCR (type 16 in 16, type 18 in 8, and both types 16 and 18 in 1). In comparison with the results for histological grades, the positive rate significantly increased as the grade of cervical dysplasia became higher. All cases were also examined with a HPV detection kit, the "Vira Pap™" which contains ³²P-labeled mixed RNA probes complimentary to HPV types 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 DNA. Six of 18 cases in which HPV DNA were not detected by the Vira Pap™ were positive for HPV types 16 and/or 18, so that the PCR was a highly sensitive method compared to the Vira Pap™. The PCR has some advantages: 1. it requires only a small amount of specimens and 2. paraffin-embedded sections can also be used. We suggest that the PCR is a useful method for the screening and for retrospective investigation of HPV infection.

Key words: Human papillomavirus • Cervical neoplasia • Polymerase chain reaction

緒 言

子宮頸癌の発生との関連が指摘されている Human papillomavirus (HPV) 感染は, 1980年に zur Hausen et al. により分子生物学的手技を用いた HPV DNA の検出がなされて以来⁶⁾, 飛躍的にその実態が明らかにされつつある。

HPV 感染の DNA 診断は, これまで Southern blot hybridization 法などを中心になされたが, 近年, 蛍光反応などを利用した酵素抗体法の開発などに伴い, HPV DNA の検出が高感度な非放射性物質標識プローブを使つて臨床応用されるようになってきた。

新しい DNA 診断法の一つである Polymerase Chain Reaction (以下 PCR) 法は, 微量な DNA から目的とする領域を増幅することによつて検出感度を上げる方法で, 1985年に Saiki et al. が開発した⁹⁾。その後, 耐熱性 Taq DNA polymerase の発見に伴つて DNA の増幅が半自動化され⁹⁾, 現在各科領域での DNA 診断に応用されつつある。

今回我々は, 慢性頸管炎12例を含む子宮頸部各種病変43例の擦過細胞から得た DNA より, 子宮頸癌との関連が指摘されている HPV16型, 18型 E7領域を PCR 法を用いて増幅し, HPV DNA の検出を試みた。更に, 同時に施行した HPV 簡易検出キット Vira PapTM法による検出結果との比較を行い, また, 一部の症例については in situ hybridization 法による検討も加え, HPV と子宮頸部病変の関連性を調べたので報告する。

研究対象と研究方法

対象は, 1989年 4 月より11月までの間に広島大学産婦人科外来を受診した婦人43例 (慢性頸管炎12例, 軽度異形成 7 例, 中等度異形成 3 例, 高度異形成 3 例, 上皮内癌11例, 浸潤癌 7 例)とした。

症例の年齢は20歳から72歳までで, 平均年齢は43.5歳であつた。

方法は, PCR 法及び Vira PapTM法は43例全例に施行し, コルボスコピー下で異常のあつた症例については同時に採取した組織診標本のパラフィン切片を用いて, in situ hybridization 法による検

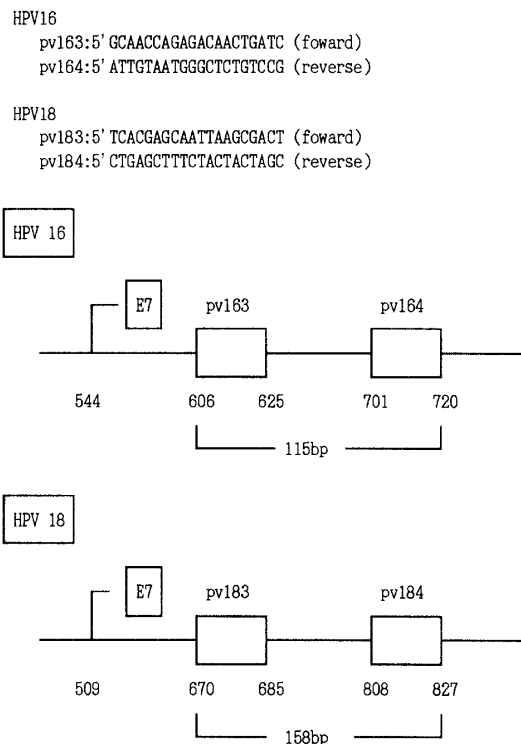


図1 HPV16型, 18型の primer と増幅位置

討も行つた。以下に各 HPV DNA 検出法を示した。

1. PCR 法

子宮頸部を綿棒にて 5 ~ 6 回擦過, 採取して得た細胞を一旦 PBS buffer 内で攪拌した後エタノール沈澱法によつて DNA を抽出した。得られた DNA 1.0 μ g に対し, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 0.01%gelatin, それぞれ200 mM の dATP, dGTP, dCTP, dTTP と, 100ng の primer を加え合計50 μ l の反応液とした。また陰性コントロールとして DNA を含まない滅菌蒸留水を使用し, contamination のないことを確認した。

また, primer は図1に示すように, HPV16型, 18型の初期遺伝子 E7領域を含む20塩基の合成オリゴヌクレオチド (forward, reverse) であり, 増幅される E7領域は16型が115bp, 18型が158bp の DNA である。

そして PCR 法は, 図2に示すように反応液を 94 $^{\circ}$ C 10分間 denature した後, thermostable Taq

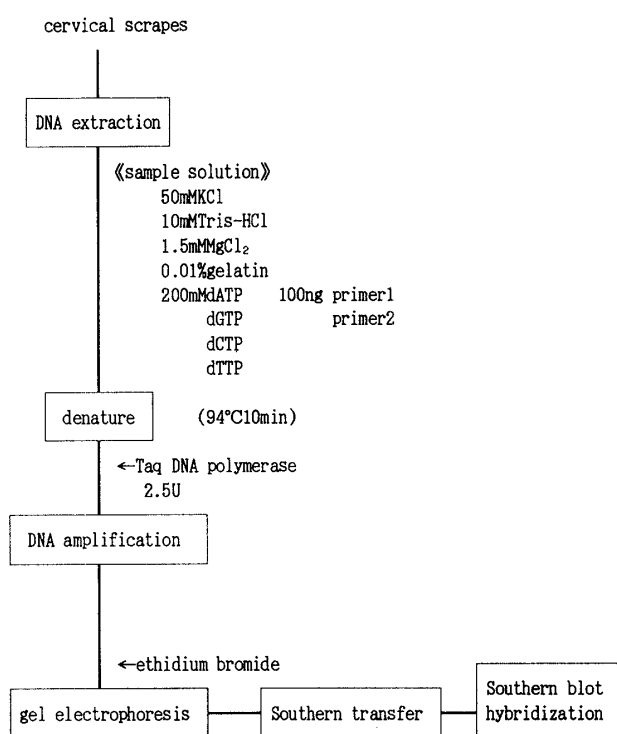


図2 PCR法の概要

DNA polymerase (Takara) 2.5U を加え, Cetus 社の DNA amplification system より行つた. 増幅の条件は, denature 94°C 1 分, primer との annealing 60°C 2 分, DNA extension 72°C 2 分30 秒とし, これを平均30回繰り返すことによつて DNA の増幅を行つた.

また, HPV DNA の検出は, 3%アガロースゲルで電気泳動後 ethidium bromide による発色反応より行い, HPV の型の確認には16型に CaSki 細胞 (ATCC, CRL1550) を, 18型に HeLa 細胞 (ATCC, CCL22, HeLa S3) をそれぞれ用いた (写真1). 更に, 増幅された HPV DNA は, E7領域を含む16型, 18型 DNA プローブによる Southern blot hybridization 法より判定した. ハイブリダイゼーションは, 50%ホルムアミド溶液で, 65°C の stringent 条件下にて平均12時間行い, 洗浄は65°C で $2 \times \text{SSC}$ 30分 2 回, $0.2 \times \text{SSC}$ 1 時間 2 回ずつ行つた.

なお, PCR 法による検出感度は, HPV16型 DNA の希釈系列の実験から 10^{-3}pg 以上可能であつた (写真2).

2. Vira Pap™ (dot blot) 法

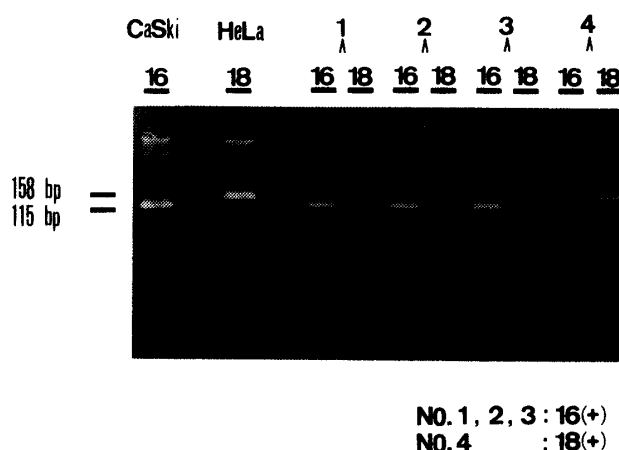


写真1 電気泳動像

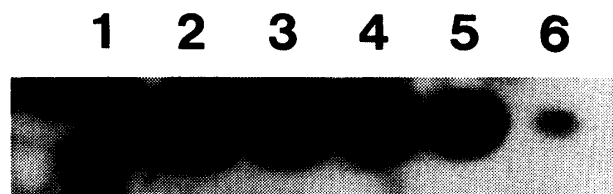


写真2 PCR法による検出感度

PCR 法により HPV16型 DNA の増幅後, Southern blot hybridization 法で確認. その結果, 10^{-3}pg 以上の HPV DNA の検出が可能であつた. (1: 10^2pg , 2: 10pg , 3: 1pg , 4: 10^{-1}pg , 5: 10^{-2}pg , 6: 10^{-3}pg)

Vira Pap™法は, 子宮頸部をキット専用綿棒にて擦過し, 得られた細胞をコレクションチューブに採取した.

コレクションチューブには, 保存液として1M 塩酸グアニジン, 10mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 0.05%アジ化ナトリウム (合計1.0ml) が含まれている. また, ハイブリダイゼーションには, HPV6, 11, 16, 18, 31, 33, 35型 DNA と相補的で ^{32}P 標識された RNA 混合プローブを用いた. HPV DNA の検出は, 表1に示す手順に従つて行い, ナイロンメンブレンにスポットし, プレハイブリダイゼーション, ハイブリダイゼーションを行つた後洗浄し, オートラジオグラフィー施行後, 写真3に示すごとく X 線フィルムにトレースされるものを陽性とした.

なお, 陽性コントロールとして Vira Pap™キットに含まれる HeLa 細胞 10^5 個を陽性, 2×10^4 個を弱陽性とし, 陰性コントロールとして同じく

表1 Vira Pap™法による HPV DNA の検出

- 1) コレクションチューブに検体試薬（プロテアーゼ）を加える
- 2) 37℃, 1時間加温（細胞破壊）
- 3) 検体希釈液を加える（DNA 変性）
- 4) ナイロンメンブレンにスポットする
- 5) 60℃, 30分間プレハイブリダイゼーション
- 6) 60℃, 2時間ハイブリダイゼーション（6, 11, 16, 18, 31, 33, 35型 RNA 混合プローブを含む）
- 7) 3回洗浄
- 8) RNase を加え, 37℃, 15分間インキュベーション
- 9) 5回洗浄
- 10) メンブレンを乾燥後, X線フィルムに重ね増感紙ではさみ, カセットに入れる
- 11) -70℃で感光する

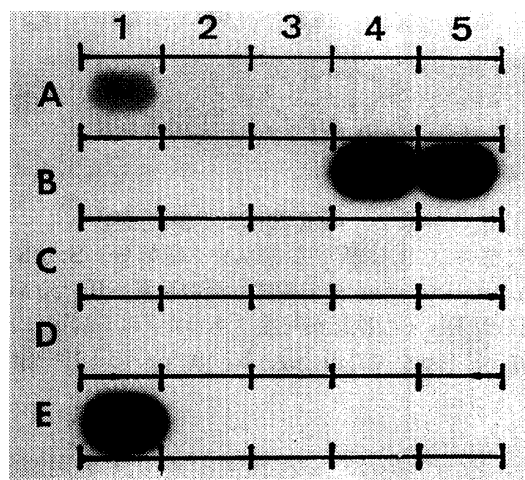


写真3 Vira Pap™ (dot blot) 法による HPV DNA の検出結果

A-1: 陽性コントロール (HeLa 細胞 10^5 個), B-1: 弱陽性コントロール (HeLa 細胞 2×10^4 個), C-1: 陰性コントロール (HTB-31細胞)

キットに含まれる HTB-31細胞を使用した。

3. In situ hybridization 法

擦過細胞採取時にコルポスコピー下に観察し、異常所見を認めた場合は組織の生検を行い、HE染色後鏡検した。

そして、Vira Pap™法陽性で PCR 法陰性例や、Vira Pap™法が陰性であった症例については、採取した生検組織のパラフィン切片に対して、ビオチン標識した HPV6, 11, 16, 18, 52b 型 DNA プローブを用いた in situ hybridization 法を、表2の手順に従って行い、HPV DNA の検出を行つ

表2 In situ hybridization 法による HPV DNA の検出

- 1) 脱パラフィン後, 0.1N 塩酸室温15分間浸漬
- 2) 1μg/ml proteinase K 室温15分間処理
- 3) 再固定: 4%パラホルムアルデヒド室温30分間
- 4) アセチレーション: 0.25%無水酢酸, 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 室温10分間
- 5) ハイブリダイゼーション: ビオチン標識プローブ 1 μg/ml, 50%ホルムアミド溶液42℃15時間
- 6) 洗浄: $2 \times \text{SSC}$ 55℃10分間 2回
 $0.2 \times \text{SSC}$ 55℃10分間 2回
- 7) 1 μg/ml ストレプトアビジン・アルカリフォスファターゼ室温10分間反応
- 8) 基質 (NBT・BCIP) 加え, 暗所で反応

NBT: nitro-blue tetrazolium

BCIP: 5-bromo-4-chloro-iodylphosphate

た。

成 績

1. PCR 法による HPV DNA の検出結果

PCR 法を行うにあたり、擦過細胞から得られた DNA 量は、0.7μg~39.65μg で、平均9.24μg であり、50μl 反応液に平均1.0μg 加えた。

PCR 法による HPV 16型又は18型 DNA の陽性率は表3に示すように、43例中25例 (58.1%) であつた。HPV タイプ別では、16型陽性が16例 (37.2%), 18型陽性が8例 (18.6%), また16型, 18型ともに陽性が1例 (2.3%) で、16型陽性率のほうが高かつた。

組織型別の陽性率は、慢性頸管炎 (chronic cervicitis) においては12例中1例 (8.3%) に、軽度異形成 (mild dysplasia) では7例中3例 (42.9%) に、中等度異形成 (moderate dysplasia) では3例中2例 (66.7%), 高度異形成 (severe dysplasia) では3例全例 (100%) に、上皮内癌 (CIS) では11例中9例 (81.8%) に、浸潤癌 (invasive carcinoma) では7例全例 (100.0%) に HPV DNA が検出された。今回の検討では、病変の進行につれて HPV 陽性率が上昇する傾向を認め、特に高度異形成以上の症例について高い検出率が得られた。

2. Vira Pap™法と PCR 法の比較

Vira Pap™法による HPV DNA の検出率は43例中25例 (58.1%) であつた。これらを陽性例25例と陰性例18例に分けて PCR 法による検出結果

表3 PCR法によるHPV DNAの検出結果

histology	case	HPV DNA TYPE			
		16	18	16 & 18	total
chr. cervicitis	12	0 (00.0)	1 (8.3)	0 (00.0)	1 (8.3)
mild dysplasia	7	1 (14.3)	2 (28.6)	0 (00.0)	3 (42.9)
moderate dysplasia	3	1 (33.3)	1 (33.3)	0 (00.0)	2 (66.7)
severe dysplasia	3	2 (66.7)	1 (33.3)	0 (00.0)	3 (100)
carcinoma in situ	11	8 (72.7)	1 (9.1)	0 (00.0)	9 (81.8)
invasive carcinoma	7	4 (57.1)	2 (28.6)	1 (14.3)	7 (100)
total	43	16 (37.2)	8 (18.6)	1 (2.3)	25 (58.1)

() = %

表4 Vira Pap™法陽性例における検出結果

histology	Vira Pap™ positive case	HPV DNA TYPE by PCR			
		16	18	16 & 18	negative
chr. cervicitis	3	0	0	0	3*
mild dysplasia	3	0	1	0	2**
moderate dysplasia	3	1	1	0	1**
severe dysplasia	2	1	1	0	0
carcinoma in situ	8	8	0	0	0
invasive carcinoma	6	4	2	0	0
total	25	14	5	0	6

* : 2 cases...6/11 (+) by in situ hybridization

1 case... 16 (+) by in situ hybridization

** : 6/11 (+) by in situ hybridization

と比較を行つた。その結果、表4に示すように、Vira Pap™法陽性25例中16型が14例、18型が5例にそれぞれ検出されたが、残りの6例にはPCR法によつてはHPV DNAは検出されなかつた。そこで、HPV DNAが検出されなかつた6例に対し、in situ hybridization法により検討した結果、5例に6/11型DNAが検出されたが、他の1例には16型DNAが検出された。

一方、Vira Pap™法陰性18例に対し、PCR法もしくはin situ hybridization法により検討した成績を表5に示した。この結果、PCR法により1例に16型、4例に18型、1例に16型及び18型が検出され、Vira Pap™法に比較して、PCR法において高い検出率が得られた。

また、両者ともに陰性であつた症例のうち1例(mild dysplasia)に52b型DNAが検出された。

表5 Vira Pap™法陰性例における検出結果

histology	case	HPV DNA TYPE	
		PCR	in situ hybridization
chr. cervicitis	M. H	18	—
	K. Y	—	—
	T. H	—	—
	Y. M	—	—
	S. I	—	N.D.
	A. M	—	N.D.
	H. S	—	N.D.
	H. S	—	N.D.
	K. N	—	N.D.
mild dysplasia	M. K	18	18
	T. S	18	—
	N. Y	—	52
	T. T	—	—
severe dysplasia	H. A	16	—
carcinoma in situ	S. K	18	—
	Y. K	—	—
	M. O	—	—
invasive carcinoma	A. O	16 & 18	—

N.D. : not done

考 察

HPV感染のDNA診断は、これまでSouthern blot hybridization法、dot blot hybridization法、in situ hybridization法などを用いて検討されてきたが、当初プローブにラジオアイソトープを使用することで、限られた研究室レベルの診断にとどまっていた。しかし、ビオチン標識プローブによるin situ hybridization法などのように非放射性物質による標識法が開発されたことにより臨床応用が進められた¹⁾⁷⁾。また、今回我々が使用したVira Pap™法など、HPV感染のスクリーニングを目的としたキットも開発され³⁾、操作の点においてかなり簡便化されつつある。

PCR法は1985年にSaiki et al. によつて染色体異常の出生前診断に対して行われたのが始まりである⁹⁾。現在PCR法によるHPV DNA検出に際しては、おもにE6、E7領域を増幅するprimerが用いられている²⁾⁴⁾¹⁰⁾。今回我々がPCR法のprimerとして用いたE7領域は、宿主遺伝子にたえずintegrateされており¹²⁾、しかも16型E7蛋白は癌抑制遺伝子である網膜芽細胞腫(RB)遺伝子

と complex を形成することでも知られる領域である⁵⁾。

さて, PCR 法の操作に関しては, 当初 DNA の extension に際し熱に弱い Klenow enzyme を用いたため, 1 サイクルごとに enzyme を加えなければならず, 検出に際し多大な労力と時間を要した。しかし, 耐熱性 Taq DNA polymerase の開発により⁸⁾, 高温下でも酵素が失活せず, これによつて denature, annealing, extension の繰り返しの反応が半自動化され, 飛躍的に本法が簡便化される要因となつた。この結果, DNA amplification system (Cetus 社) より増幅し, アガロースゲルによる電気泳動で検出を行つた場合, 約 4 時間での HPV DNA 診断が可能で, 従来の hybridization 法に比較して, 短時間で結果が得られるようになった。

DNA の検出感度については, Southern blot hybridization 法で最低 0.1 copy/cell, dot blot hybridization (Vira PapTM) 法で 1 copy/cell あれば検出可能といわれている。また, in situ hybridization 法については, 用いるプローブにより検出感度にかなりの幅があるが, digoxigenin 標識プローブを用いた場合 1 copy/cell, ³H 標識の場合 5 copy/cell, 我々の用いたビオチン標識プローブで 10~20 copy/cell と, プローブ作成法や標識物質の改良によつて他の手技に劣らぬ検出感度が得られるようになった。これに対し PCR 法では, cycle を n 回繰り返すことによつて 2ⁿ 倍の DNA に増幅され, 理論的には最低 10⁻⁵ copy/cell の検出が可能とされており, 我々の検出結果では, 10⁻³ pg DNA の検出感度であつた。

従来, 子宮頸部病変における HPV DNA の検出では, 浸潤癌組織における copy 数の減少が問題となつていたが, 今回 PCR 法による HPV16 型, 18 型 DNA の検出結果では, severe dysplasia で 100%, CIS で 81.8%, invasive carcinoma でも全例と進行した病変での検出率が上昇し, 子宮頸癌発生と HPV 感染との関連性がより強く示唆され, 今後 PCR 法の HPV 感染検索への応用が期待された。

また, HPV 簡易検出キット Vira PapTM法との

比較では, PCR 法により Vira PapTM法陰性 18 例のうち 6 例 (16 型 1 例, 18 型 4 例, 16 型, 18 型 1 例) に HPV DNA の存在が認められ, 検出感度においても Vira PapTM法に優ることが確認された。一方, Vira PapTM法陽性で PCR 法陰性であつた症例のうち 5 例については 16 型, 18 型以外のタイプの 6/11 型の存在が in situ hybridization 法によつて確認された。他の 1 例については 16 型陽性症例であり, これは PCR 法にあつて採取された DNA が少量すぎたことが推測され, 十分な擦過細胞が得られなかつたことが原因と考えられた。

さて, HPV 感染と発癌との関連を考えるうえで, 慢性頸管炎など子宮頸部上皮に明らかな病変を認めない症例における HPV 感染の把握も必要であり, HPV DNA の検出率も 0.6% から 84%¹¹⁾¹³⁾ と報告者によつて差がみられる。特に PCR 法は DNA を増幅して検出するため, 各症例間や実験操作中における contamination に充分気を付ける必要がある。我々はその対策として必ず DNA を含まない control をつくり, しかも各実験器具は各症例, 各試験ごとに交換している。

今回の検討でも, 組織学的検索が可能であつた慢性頸管炎症例 12 例のうち 1 例に 18 型 HPV が検出され, HPV 感染例のうち異常所見を示さない症例の存在が認められた。そこで, 組織学的に異常のない症例における HPV 感染の十分な検索とともに, これら HPV 陽性症例についての経過観察などの対応策が今後必要と思われた。

以上, PCR 法による HPV16 型, 18 型 DNA の検出は, 検出感度に優れ, 短時間での多検体処理も可能であり, マスクリーニングを含めた HPV 感染検索への応用が期待された。そして, 今後更に症例数を重ね, HPV と子宮頸癌との関連性を検討していく考えである。

なお, 本稿の要旨の一部は第 42 回日本産科婦人科学会学術講演会 (東京, 1990) において発表した。そして, HPV6, 11, 16, 18 型 DNA は, zur Hausen, Gissmann 両博士, 52b 型 DNA は東北大学矢嶋 元先生の御好意により提供していただいた。また, 本研究の一部は, 文部省科学研究費 (No. 01579833) の援助によつた。

文 献

1. 永井宣隆, 木岡寛雅, 重政和志, 藤原 篤: 子宮頸癌関連病変における HPV DNA 局在に関する分子生物学的検討—In situ hybridization による解析—. 日産婦誌, 41: 313, 1989.
2. 永井宣隆, 太田さなえ, 藤本英夫, 谷本博利, 木岡寛雅, 藤原 篤: Polymerase Chain Reaction による HPV 16 型, 18 型初期遺伝子 E7 領域の増幅検出法に関する検討. 日産婦誌, 42: 635, 1990.
3. 太田さなえ, 永井宣隆, 谷本博利, 藤本英夫, 木岡寛雅, 藤井恒夫, 藤原 篤: HPV DNA 簡易検出キット Vira Pap™法による子宮頸部 HPV 感染の検索. 日産婦中四会誌, 138: 207, 1990.
4. Dallas, P.B., Flanagan, J.L., Nightingale, B.N. and Morris, B.J.: Polymerase chain reaction for fast, nonradioactive detection of high- and low-risk papillomavirus types in routine cervical specimens and in biopsies. J. Med. Virology, 27: 105, 1989.
5. Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. and Harlow, E.: The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. Science, 243: 934, 1989.
6. Gissmann, L. and zur Hausen, H.: Partial characterization of viral DNA from human genital warts. In: J. Cancer, 25: 605, 1980.
7. Nagai, N., Nuovo, G., Friedman, D.C. and Crue, C.P.: Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancers with the in situ hybridization technique. Int. J. Gynecol. Pathol., 6: 366, 1987.
8. Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239: 487, 1988.
9. Saiki, R.K., Scharf, F., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 230: 1350, 1985.
10. Shibata, D., Fu, Y.S., Gupta, J.W., Shah, K.V., Arnheim, N. and Martin, W.J.: Detection of human papillomavirus in normal and dysplastic tissue by the polymerase chain reaction. Lab. Invest., 59: 555, 1988.
11. Tidy, J.A., Parry, G.C.N., Ward, P., Coleman, D.V., Peto, J., Malcolm, A.D.B. and Farrel, P. J.: High rate of HPV 16 infection in cytologically normal cervixes. Lancet, 25: 434, 1989.
12. Wilczynski, S.P., Pearlman, L. and Walker, J.: Identification of HPV 16 early genes retained in cervical carcinoma. Virology, 166: 624, 1988.
13. Young, L.S., Bevan, I.S., Johnson, M.A., Blomfield, P.I., Bromidge, T. and Woodmann, C.B.J.: The polymerase chain reaction: A new epidemiological tool for investigating cervical human papillomavirus infection. Br. Med. J., 298: 14, 1989.

(No. 6996 平 3・5・11 受付)