成人喉頭乳頭腫ウイルスのDNA診断

杉田 麟也・荻原 徹・深本 克彦
中井川弘毅・石 和久*

DNA Evaluation for Human Papilloma Virus Infection in Adult Laryngeal Papilloma

Rinya Sugita, Tohru Ogiwara, Katsuhiko Fukamoto,
Kouki Nakaigawa and Kazuhisa Ishi
(Juntendo Urayasu Hospital, Juntendo University School of Medicine)

Tissues from patients with adult-onset type laryngeal papilloma were examined for the presence of human papillomavirus (HPV).

The presence of HPV DNA was determined by in situ hybridization with biotin-labelled HPV DNA probes and by dot blot hybridization with ³²P-labelled HPV DNA probes.

Two cases of adult-onset type multiple laryngeal papilloma were positive for HPV-6, but a case of single laryngeal papilloma was negative for HPV.

Key words: laryngeal papilloma, human papilloma virus, in situ hybridization, dot blot hybridization, Southern blot hybridization

はじめに

ヒトパピローマウイルス (human papilloma virus : HPV) はヒトの粘膜や皮膚の上皮に発生する良性の腫瘍から分離されるウイルスである。HPV感染は婦人科領域での研究が進んでおり、良性腫瘍ばかりでなく子宮頸癌組織に存在することが明らかになっている。

HPVと耳鼻咽喉科領域疾患との関連については5, 6歳までの発症が半数を占める若年性喉頭乳頭腫の場合に尖圭コンジローマを有する母体の産道での垂直感染であることが知られている。他方、成人発症型喉頭乳頭腫からHPVを検出したという報告も若干みられるが、現在

のところ感染経路の解明が不十分である。

著者らは、このたび成人型乳頭腫例からHPVを検出したので報告し、若干の考察を加える。

対 象

昭和59年5月中旬から平成2年4月末までに順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院耳鼻咽喉科で手術を実施した喉頭乳頭腫患者のうち、組織診断で典型的な乳頭腫の像を呈した3例である。

研究方法

手術的に摘出した標本にHE染色をおこなひ、乳頭腫の所見が得られた症例にDNA

hybridization 法を実施した. すなわち, in situ hybridization 法 (Vira type®, 東レ) を当院で, 同時に dot blot hybridization 法 (Vira pap®, 東レ) および Southern blot hybridization 法を SRL 社で実施した. in situ hybridization 法, dot blot hybridization および Southern blot hybridization 法の手技は表 1, 表 2 に示したごとくである. 用いた DNA プローブのタイプは 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35 である¹⁾.

結 果

HPV の感染の有無を検討した 3 例は表 3 のごとくである. 症例 1 は 73 歳の男性で 72 歳の頃

表 1 in situ hybridization 法
Vira type® は HPV-6, 11 型をふくむプロ
ローブ, 16 と 18 型, 31, 33 と 35 型をふくむ
プロローブからなる.

-
1. 前処理
 - a. 切片スライドのベーク
 - b. 脱パラフィン
 - c. 脱キシレン
 - d. 風乾
 - e. 消化液反応
 - f. TBS 洗浄
 - g. 脱水
 - h. 風乾
 2. ハイブリダイゼーション
 - a. HPV probe 滴下
 - b. カバーガラスをかける
 - c. heating 処理
 - d. 湿潤箱にて反応
 - e. カバーガラスをはずし、probe を洗う
 - f. TBS 洗浄
 3. 同定
 - a. 組織のまわりをふきとる
 - b. Detection solution 滴下
 - c. 湿潤箱にて反応
 - d. 基質液反応
 - e. 蒸留水洗浄
 4. 後処理
 - a. 後染 NFR
 - b. 蒸留水洗浄
 - c. 脱水…透徹…封入

から嗄声を自覚し徐々に増強してきた. 腫瘍は右声帯に局限した樹針状の白色乳頭腫で成人単発型であった. 腫瘍を顕微鏡下喉頭微細手術で切除したが, 短期間に再発したので喉頭截開術にて摘出した. in situ hybridization 法による HPV 検索は陰性であった.

症例 2, 3 は両側声帯と前交連の乳頭腫でいずれも男性であって, 成人多発型であった. 病理組織学的に koilocytosis を認め (図 1), in situ hybridization 法でいずれも HPV-DNA 6 型と 11 型のシグナル陽性であった (図 2). SRL で実施した dot blot hybridization 法ではいずれも陽性で, また Southern blot 法ではそれぞれ 6 型が陽性であった.

考 察

喉頭乳頭腫は, 発症年齢や臨床像の相違によって 4 つに分類できる. 若年性多発型, 若年性単発型, 成人多発型および成人単発型である. 若年性喉頭乳頭腫は生後 6 カ月から 4, 5 歳の間に発症する例が 31~51% と多く, 成人型との発症年齢の境は 20 歳とされている²⁾.

若年性はそのほとんどが多発性, 再発性で難治性であり, この若年性多発型乳頭腫の発症に HPV の感染が大きな役割を担う. すなわち, 性交為感染で生じた尖圭コンジローマを有する母体の産道での垂直感染が原因である. その根拠として尖圭コンジローマから分離される HPV が 6 型, 11 型であり^{3,4)}, 若年性多発型喉頭乳頭腫から検出した HPV も同じ型であること, 帝王切開で出産した子供には喉頭乳頭腫は明らかに少ないこと^{5,6)}, などである.

HPV の研究は 1980 年代に入って進歩した. Mounts ら (1982)³⁾ は初めて若年および成人喉頭乳頭腫の両方に Southern blot 法によって HPV-DNA を, また Steinberg ら (1983)⁷⁾ も若年, 成人型に Southern blot 法で HPV-DNA を検出した.

本邦でも Nakajima ら (1985)⁸⁾ は成人型 12 例中 3 例に papillomavirus genus specific common antigen を検出, その 3 例は多発型乳頭腫

表 2 DNA hybrid 法の実験行程

表 3 HPV を検索した成人喉頭乳頭腫症例
多発型の 2 例で、HPV-6 型を検出した。

症 例	年齢 性別	発症 年齢	喫煙有無	病変部位	治 療	HPV-DNA
1. A.O.	73 男性	73	有り	右声帯	1. ラリngoマイクro サージュリー 2. 喉頭截開術	陰性
2. A.N.	56 男性	55	有り	両側声帯 前交連	ラリngoマイクro サージュリー	陽性 (6 型)
3. S.K.	24 男性	23	有り 18歳より	両側声帯 前交連 浸潤性	ラリngoマイクro サージュリー	陽性 (6 型)

HE 染色 ×100

in situ hybridization

図 1 症例 2 の HE と in situ hybridization 法

左図の HE では、肥厚増生した扁平上皮の表層から中層にかけて細胞は koilocytosis (矢印) を示す。

右図の in situ hybridization 法で、koilocytosis を示す細胞の核内に黒紫色 (矢印) の HPV-DNA の陽性像がみられる (type 6/11)。Southern blot 法は 6 型であった。

HE 染色 ×100

in situ hybridization

図 2 症例 3 の HE と in situ hybridization 法

左図の HE では表層から中層にかけての細胞は koilocytosis を示す (矢印)。

右図の in situ hybridization では koilocytosis を示す細胞の核内に黒紫色 (矢印) の HPV-DNA 陽性像がみられる (type 6/11)。Southern blot 法では 6 型であった。

であった。大谷地ら(1988)⁹⁾は小児喉頭乳頭腫2例から Southern blot 法により HPV-2 型を、Tsutsumi ら(1989)¹⁰⁾は成人多発型乳頭腫8例中6例で HPV-11 型を検出しているが、単発型は11例すべてが HPV-DNA 陰性であった。古田ら(1989)¹¹⁾は著者らと同様に in situ hybridization 法を用い成人多発型の7例中5例(71%)で HPV-6, 11型を検出している。

著者らは成人多発型2例中2例でキットを用いての in situ hybridization 法で HPV-6 型または11型DNAシグナルを検出、さらに Southern blot hybridization 法で6型であることを確認している。6型は尖圭コンジローマから検出されている HPV-DNA と同型であり、成人多発型乳頭腫も産道感染あるいは青年期の口腔性交による感染を考えさせる結果である。成人多発型乳頭腫が出産時の産道感染であれば、垂直感染して潜伏していたウイルスの活動が喫煙その他の刺激により促進され発症するのではないかという推察もおこなわれている¹²⁾。

DNAの診断法について述べる。感染症に対する DNA 診断法はウイルスのみならず、肺炎マイコプラズマ、結核菌などの診断にも用いら

れるようになっている。主に dot blot 法と in situ hybridization 法であり、このほかに Southern blot 法および Northern blot 法とがある。

DNA 診断法において DNA プローブは大量に精製することができ、またかなり分解したゲノム(50ヌクレオチド程度)でも検出可能である。唯一の欠点は、現在アイソトープ標識プローブが広く使用されていることであるが、今後は酵素標識のプローブに変わっていくものと思われる。このたび著者が使用したキットの in situ hybridization 法のプローブ標識はビオチンという酵素であり、dot blot 法は ³²P を使用している。

主な測定法の長所、短所は表4のごとくである。

1) in situ hybridization 法

本法にはいくつかの方法があるが、通常はパラフィンブロックからの組織を用いて標的 DNA の検索を行う。したがって検索 DNA の組織像を損うことなく、感染細胞の形態的特徴、さらに細胞および組織中での局在を知ることが出来る。本法の陽性率は dot blot 法と比較すると低く約半分である。われわれが使用した Vira type[®](東レ)法は米国で市販されている

表4 DNA 診断法、主な測定法の特徴
(石 和久, 他: 1990¹⁾より転載)

	dot blot法	in situ hybridization 法	Southern blot法
利点	1. 測定操作が簡易であり 操作時間が短い 2. 多量検体の処理が可能 3. 少量の細胞数または 組織で測定可能 (10 ⁵ 以上または1pgDNA)	1. 測定操作が簡易であり 操作時間が短い 2. 病理組織像と対比でき 局在が明確 (特に酵素標識の場合)	1. ウィルスの型別が可能 2. 検出感度がよい
欠点	1. ウィルス型別検索が 不可能 2. 組織形態像がみられない	1. 検出感度が低い	1. 測定操作が煩雑で 操作に長時間要する 2. 組織形態像が みられない

が本邦では研究用である。Vira type のプローブは婦人科領域で使用されているもので、6 型、11 型をふくむプローブ、16 と 18 型、31、33 と 35 型をふくむプローブである。今後は耳鼻咽喉科用にプローブの種類を増加させる必要がある。

2) dot blot 法

極めて感度が良く大量のサンプルを迅速にスクリーニングするという利点がある反面、ウイルス属内の特異性を判定するのが困難であるという欠点もある。さらにアイソトープを使用するので設備の問題もある。

3) Southern blot 法

ウイルスの型別や血清学的に区別不能なウイルス株間の鑑別の際に用いる。実際には高分子 DNA を制限酵素で切断し、電気泳動により分画してからさらに固相マトリックスにトランスフェして DNA プローブとハイブリダイズさせるので精度は高いが迅速性の点で問題がある。

ま と め

1. 成人単発型喉頭乳頭腫 1 例、成人多発型喉頭乳頭腫 2 例について、キットによる in situ hybridization 法 (Vira type®, 東レ), dot blot hybridization 法 (Vira pap®, 東レ) および Southern blot hybridization 法を用いてヒトパピローマウイルス感染を検討した。

2. 単発型は HPV-DNA 陰性であったが、多発型の 2 例は in situ hybridization 法で HPV-6、11 型のシグナル陽性、dot blot hybridization 法陽性で、Southern blot hybridization 法で HPV-6 型を確認した。

3. 感染経路として出産時の産道での垂直感染、あるいは成人後の口腔性器接触による感染が考えられた。

4. in situ hybridization 法は測定操作が簡易で操作時間が短く、病理組織像と対比できウイルスの局在部位が明確である。Vira pap 法はキットで使いやすいが、プローブの種類を耳鼻科用に増加する必要がある。

稿を終えるにあたり御指導、御校閲をいただいた市川銀一郎教授に感謝致します。

文 献

- 1) 石 和久, 霜多 広, 川島 徹: STD の臨床検査 — 最近の進歩 —. *Current Laboratory Medicine* **8** : 58~62, 1990.
- 2) Morgan AH and Zitsch RP : Recurrent respiratory papillomatosis in children ; a retrospective study of management and complications. *Ear Nose and Throat J* **65** : 403~410, 1986.
- 3) Mounts P, Shah K and Kashima H : Viral etiology of juvenile and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci USA* **79** : 5425~5429, 1982.
- 4) Gissmann L, Wolnik L, Ikenberg H, et al : Human papilloma virus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **80** : 560~563, 1983.
- 5) Shah K : Rarity of cesarean delivery in cases of juvenile-onset respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* **68** : 795~799, 1986.
- 6) Quick CA : Relationship between condylomata and laryngeal papillomata. *Ann Otol* **89** : 467~471, 1980.
- 7) Steinberg BM, Topp WC, Schneider PS, et al : Laryngeal papilloma virus infection during clinical remission. *N Engl J Med* **308** : 1261~1264, 1983.
- 8) Nakajima T, Tsumuraya M, Morinaga S, et al : Papillomavirus infection among Japanese ; an immunohistochemical study for papillomavirus genus-specific antigen in human surface epithelial lesions. *Jpn J Cancer Res (GANN)* **76** : 508~516, 1985.
- 9) 大谷地直樹, 三浦 功, 矢原三十美, 他 : Human papilloma virus (HPV) を検出した小児喉頭乳頭腫の 2 例. *日気食会報* **39** : 239~240, 1988.
- 10) Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M, et al : In situ hybridization and immunohistochemical study of human papillomavirus infection in adult laryngeal papillomas. *Laryngoscope* **99** : 80~85, 1989.
- 11) 古田 康, 犬山征夫, 長嶋和郎 : 乳頭部領域の

乳頭腫病変とヒトパピローマウィルス —Digoxygenin 標識プローブを用いたウィルス核酸の検出—. 日耳鼻 92 : 2055~2063, 1989.

- 12) Mounts P and Shahk V : Respiratory papillomatosis ; etiological relation to genital tract papillomatosis. Prog Med Viral 29 : 90~114, 1984.

原稿受付 : 平成 3 年 1 月 19 日
原稿採扱 : 平成 3 年 4 月 3 日 急載
別刷請求先 : 杉田麟也
〒279 浦安市富岡2-1-1
順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院
耳鼻咽喉科