原 著

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染が原因と思われる

aggressive papilloma および上皮内癌の1例

—分子生物学的研究—

大西 祐一^{1,2} 森田 章介² 濱本 和彦²
杉立 光史¹ 中嶋 正博² 覚道 健治²

抄録: ヒトパピローマウイルス (HPV) は DNA 塩基配列の違いにより 70 型以上に分類されており、なかでも HPV16 と 18 は主に子宮頸癌で高頻度に検出されるため高リスク型と考えられている。今回われわれは、高リスク型 HPV 感染が原因と考えられた、同一患者の口腔粘膜に発生した aggressive papilloma および上皮内癌の1例を経験したので報告する。

分子生物学的検索を行うため両者のパラフィン包埋切片より DNA を抽出し、高リスク型を増幅するコンセンサスプライマーを合成し PCR ならびにサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、aggressive papilloma および上皮内癌の両標本ともに高リスク型 HPV が検出された。このことから本症例の発症に高リスク型 HPV 感染が関与していることが示唆された。

キーワード: ヒトパピローマウイルス, aggressive papilloma, 上皮内癌

緒 言

ヒトパピローマウイルス (以下 HPV と略す) は DNA 塩基配列の違いにより 70 型以上に分類されており、なかでも HPV16 と 18 は主に子宮頸癌で高頻度に検出されるため高リスク型と考えられている。今回われわれは、高リスク型 HPV 感染が関与したと思われる、同一患者の口腔内に発生した aggressive papilloma および上皮内癌の1例を経験したので報告する。

症 例

患 者: 57 歳, 男性。

主 訴: 右側口底部の腫脹。

既往歴・家族歴: 特記事項なし。

現病歴: 1994 年 9 月より右側口底前方部の腫瘍を自覚していたが、無痛性のため放置していた。同年 12 月頃より徐々に増大してきたため 1995 年 3 月に某歯科を受診したところ、精査依頼にて 5 月 11 日に大阪歯科大学附属病院口腔外科第 2 科を紹介され受診した。

現 症:

口腔外所見: 特記すべき所見は認められなかった。

口腔内所見: 右側口底粘膜前方部に約 8×5 mm の境界明瞭で、表面が一部白色を示す弾性軟の腫瘍を認めた (Fig. 1)。周囲に硬結はなかった。

臨床診断: 乳頭腫の疑い。

処置および経過: 1995 年 5 月 17 日、局所麻酔下に切除生検を施行した。病理組織学的には上皮は外向性、乳頭状に増殖し、また核分裂像が多数認められ、Aggressive Papilloma と診断された (Fig. 2)。要経過観察であった。

Fig. 1 Intraoral view at the initial visit.

Lesion in the right floor of the mouth was found (arrow). Several oval areas of white plaque were distributed haphazardly in this lesion.

¹ 大阪赤十字病院歯科口腔外科 (主任: 松本喜雄部長)

² 大阪歯科大学口腔外科学第二講座 (主任: 覚道健治教授)

〔受付: 10 月 5 日, 1998, 受理: 11 月 9 日, 1998〕

A

B

Fig. 2 Photomicrograph of the initial lesion (Hematoxylin and eosin stain, magnification A : $\times 40$, B : $\times 80$).

Fig. 3 Intraoral view at the second visit.
White lesion was found on the frenulum linguae (arrow).

Fig. 4 Photomicrograph of the white lesion (Hematoxylin and eosin stain, magnification $\times 40$). The epithelial cells had numerous nuclear hyperchromatism and increased number of mitotic figures.

が、患者の都合により一時経過観察が途絶えていた。しかし、1996年11月に舌小帯附着部の白色病変に気付いたため11月22日に再来院した。その時の所見としては、舌下小丘より約10 mm上方の舌小帯に約3×5 mmの表面顆粒状で白色の腫瘤を認めた (Fig. 3)。硬さは弾性硬で周囲に硬結は触知されなかった。乳頭腫の臨床診断にて11月29日に局所麻酔下で腫瘍を周囲健常部とともに切除した。病理組織学的には上皮全層にわたり異型性の強い細胞や多数の核分裂像が認められ、上皮内癌と診断された (Fig. 4)。

分子生物学的検索

腫瘍における HPV 感染を検討するため切除標本を用い、HPV DNA の有無を polymerase chain reaction (PCR) 法およびサザンハイブリダイゼーションにて判定した。すなわち Aggressive Papilloma および上皮内癌のパラフィン包埋切片より DNA を抽出し、高リスク型の HPV DNA を増幅するコンセンサスプライマーを合成し、PCR 法を行った。

方 法

1) PCR 法: DNA の抽出は Shibata ら¹⁾の方法に従った。その後高リスク型として 16 型, 18 型, 31 型, 33 型, 52 型および 58 型を増幅するコンセンサスプライマーを合成した²⁾ (Fig. 5)。

鋳型 DNA は上述した Shibata らの方法にて抽出した DNA を, また陽性対照として HeLa 細胞から抽出した DNA を, さらに陰性対照として A431 細胞から抽出した DNA を用いた。反応液は TaKaRa-Taq を用い, 10×PCR-buffer 10 μl, dNTP-Mixture (2.5 mM) 8 μl, Primer 各 2.5 μl, TaKaRa-Taq (5 U/μl) 0.5 μl および試料 DNA 1 μl に滅菌蒸留水を加え, 全量が 100 μl になるように調整した。反応液に流動パラフィンを重ねし, Thermal-cycler (model Tp 2000: TaKaRa Co, Ltd) を用い 94℃ 30 秒, 55℃ 2 分, 72℃ 2 分を 1 サイクルとし, 30 サイクルの条件で PCR を行った。クロロホルムで処理した反応液 5 μl を, 3% アガロースゲル (Agarose) にて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色し, PCR 反応による増幅を確認した。

2) サザンハイブリダイゼーション: 上記の電気泳動後

のゲルをニトロセルロースフィルター (Nitroplus) に転写し, HPV18 型のプローブ DNA を TaKaRa Bcabel-Labeling Kit を用いて RI 標識した。そして 65℃, 2 時間ハイブリダイゼーションを行い, フィルターを 2×SSC, 0.5×SSC (0.15 M 塩化ナトリウムと 0.015 M クエン酸ナトリウムの水溶液を 1×溶液とする。) 溶液にて洗浄乾燥後, フジバイオイメージアナライザー (BAS 2000, Fuji Photo Film Co. Ltd.) にて放射性活性を検出した。

結 果

両者とも高リスク型 HPV のバンドが認められた。さらに HPV18 をプローブにしたサザンハイブリダイゼーションの結果, 陽性対照, Aggressive Papilloma および上皮内癌ではほぼ同程度の発現がみられた (Fig. 6)。

考 察

1983 年 Syrjänen ら³⁾により HPV が口腔粘膜の異形成上皮の原因となることが示唆されて以来, 主に口腔扁平上皮癌の発生とのかかわりについて研究が進められてきた。HPV には現在 70 種類以上の型が存在するが⁴⁾, それぞれの型により特異的な部位に良性あるいは悪性腫瘍を形成す

Fig. 5 Sequence comparison of synthesized primers with various HPV types.

The 5' end is on the left side of each sequence, which is the complementary strand of the consensus sequence. For each HPV type, only the nucleotides mismatched with the consensus are shown and homologous nucleotides are expressed by -. The percent homology of each HPV type with the consensus is shown as well as the corresponding base positions.

Fig. 6 A: Detection of high risk type HPV in PCR with the consensus primers for the E6 and E7 region (m: ϕ ×17-Hae III marker, P: HeLa cells; positive control for HPV18, 1: aggressive papilloma, 2: carcinoma in situ, N: A431 cells, negative control)
B: Autoradiograph of Southern blot showing hybridization of ³²P-labeled HPV18 DNA.

ることが知られている。そのうち6型および11型は良性の尖圭コンジローマや喉頭乳頭腫で検出され⁵⁻⁷⁾、16型、18型は子宮頸癌、喉頭癌など悪性腫瘍から検出されている^{8,9)}。

これまで HPV 感染の診断は細胞診、病理組織検査および免疫病理組織検査が主流であり、特に koilocytotic atypia の存在が HPV と密接な関係のある組織像として報告されている^{10,11)}。しかし、HPV 感染が生じた際、これらの検査法を用いても必ずしもこの組織像を観察できるとはかぎらない。またこれらの診断法では HPV の型の同定もできない。一方、ハイブリダイゼーション法および PCR 法などの分子生物学的診断法では、ウイルス粒子の発現に関係なく、微量試料より高感度に HPV DNA を検出できるため不顕性感染も判定できる利点がある。なかでも PCR 法を用いると、新鮮材料のみならず、今回のようなパラフィン包埋切片も用いることができる¹²⁾。一般にホルマリン固定後のパラフィン包埋切片より抽出した DNA は短く断片化しており、サザンハイブリダイゼーシ

ン法を用いることはできないが、約 200 bp 程度の DNA を増幅するようなプライマーを設定することにより今回のように PCR 法が可能となる。

HPV 感染は皮膚や粘膜の接触を介しての感染によると考えられている。また垂直感染も想定されているが¹³⁾いずれの経路をとるにしてもウイルスが皮膚や粘膜の上皮欠損部より侵入し、基底細胞に生着することにより感染が成立すると考えられている。今回 PCR 法を用いウイルス DNA の検出を行ったところ、両者とも高リスク型の HPV DNA が検出された。そして HPV18 をプローブにしたサザンハイブリダイゼーションの結果両者とも同程度の発現がみられた。また発現部位も舌小帯と口底前方部で接触可能な範囲であるため、本例の Aggressive Papilloma および上皮内癌の発症に HPV18 感染が関与している可能性が示唆された。

結 論

今回われわれは、高リスク型 HPV 感染が関与していると思われた、同一患者の口腔内に発生した Aggressive Papilloma および上皮内癌の1例を経験したので報告した。

PCR 法および HPV18 をプローブにしたサザンハイブリダイゼーションの結果、今回の Aggressive Papilloma および上皮内癌の発症に HPV18 感染が関与している可能性が示唆された。

本論文の要旨は、第7回日本口腔粘膜学会総会(1997年6月7日、宇都宮市)において発表した。

本研究の一部は平成9年度山崎歯学振興財団学術研究助成金課題番号 C 97-01 によった。

文 献

- 1) Shibata DK, Arnheim N and Martin WJ: Detection of human papilloma viral DNA in paraffin-embedded tissue using the polymerase chain reaction. *J Exp Med* 167: 225-230, 1988.
- 2) Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa M, et al.: Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 72: 1039-1044, 1991.
- 3) Syrjänen KJ, Syrjänen SM, Lamberg M, et al.: Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 12: 418-424, 1983.
- 4) De Villiers E M: Human pathogenic papillomavirus types: An update. *Curr Topics Microbiol Immunol* 186: 1-12, 1994.
- 5) Eversole LR, Laipis PJ, Merrel P, et al.: Demonstration of human papillomavirus DNA in oral condyloma acuminatum. *J Oral Pathol* 16: 266-272,

- 1987.
- 6) 渡辺周一, 内藤好宏, 川上登史, 他: 喉頭乳頭腫のウイルス学的検索—Hybridization 法による比較検討—. 耳鼻臨床 83 : 909-913, 1990.
 - 7) 仲野公一: 頭頸部領域の乳頭腫におけるヒトパピローマウイルス (HPV) 感染の特徴—臨床像別の HPV 検出率と型特異性について. 日耳鼻 97 : 1381-1392, 1994.
 - 8) Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al.: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc Natl Acad Sci USA 80 : 3812-3825, 1983.
 - 9) Kiyabu MT, Shibata DK, Arnheim N, et al.: Detection of human papillomavirus in formaline-fixed, invasive squamous carcinoma using the polymerase chain reaction. Am J surg Pathol 13 : 221-224, 1984.
 - 10) Shokri-Tabizadeh S, Koss G, Molnar J, et al.: Association of human papillomavirus with neoplastic processes in the genital tract of four women with impaired immunity. Gynecol Oncol 12 : S120-S140, 1981.
 - 11) Dyson JL, Walker PG, Singer A: Human papillomavirus infection of the uterine cervix: histological appearances in 28 cases identified by immunohistochemical techniques. J Clin Pathol 37 : 126-130, 1984.
 - 12) Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, et al.: Detection and typing of multiple genital human papillomavirus by DNA amplification with consensus primers. Jpn J Cancer Res 82 : 524-531, 1991.
 - 13) Quich CA, Faras A, Kryzek R: The etiology of laryngeal papillomatosis. Laryngoscope 88 : 1789-1795, 1978.

別刷請求先: 大西祐一 〒543-8555 大阪市天王寺区
筆ヶ崎町 5-53
大阪赤十字病院歯科口腔外科

**A Case of Aggressive Papilloma and Carcinoma in Situ on the
Oral Mucosa Caused by Human Papillomavirus
—Molecular Biological Study—**

**Yuichi OHNISHI^{1,2)}, Shosuke MORITA²⁾, Kazuhiko HAMAMOTO²⁾,
Mitsuchika SUGITATSU¹⁾, Masahiro NAKAJIMA²⁾ and Kenji KAKUDO²⁾**

¹⁾*Department of Dentistry and Maxillofacial Surgery,
Osaka Red Cross Hospital
(Chief : Yoshio MATSUMOTO)*

²⁾*Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
Osaka Dental University
(Chief : Prof. Kenji KAKUDO)*

J. Jpn. Oral Muc. Membr. 4 : 109~114, 1998

Abstract : More than 70 human papillomavirus (HPV) species have been isolated, and some of them are closely associated with benign or malignant human epithelial tumors. Specific types of HPV, especially HPV types 16 and 18, have been studied as a possible etiologic agent of cervical cancers. We report a case of aggressive papilloma and carcinoma in situ associated with high risk type HPV. DNA was extracted from paraffin-embedded tissue of aggressive papilloma and carcinoma in situ. PCR and Southern hybridization were used for the detection of HPV with consensus primers. High risk type HPV was detected in both aggressive papilloma and carcinoma in situ. These results indicate that the occurrence of aggressive papilloma and carcinoma in situ is associated with high risk type HPV.

Key words : human papillomavirus, aggressive papilloma, carcinoma in situ

Reprint requests to Yuichi OHNISHI, Department of Dentistry and Maxillofacial Surgery, Osaka Red Cross Hospital, 5-53, Fudegasaki machi, Tennouji-ku, Osaka 543-8555, Japan.

[Received October 5, 1998 : Accepted November 9, 1998]