原 著

子宮頸部上皮内腫瘍におけるヒトパピロー

マウウイルス感染

—DNA hybridization 法, 酵素抗体法, 組織診, 細胞診について—

大阪大学医学部産婦人科

齊藤 淳子 清水 廣 中澤 愛子 井上 正樹
上田 外幸 谷澤 修

Human papillomavirus (HPV) 感染と組織診, 細胞診との関係を cervical intraepithelial neoplasia, grade III (CIN III) 24 例について, 酵素抗体法 (PAP 法), DNA hybridization 法 (Southern blot 法) を用いて比較検討した。

組織診上では, 18 例 (75%) に koilocytosis を認めた。細胞診では, 7 例に koilocyte, 12 例に, dyskeratocyte, 10 例に 2 核細胞を認めた。酵素抗体法では, 1 例に HPV antigen を認めた。DNA hybridization 法にて検索すると, HPV 16 型 7 例, HPV unknown type 3 例, 計 10 例 (42%) に HPV DNA を認めた。残り 14 例は, HPV 6, 11, 18 型いずれも検出されなかった。

組織診上 koilocytosis を認めた 18 症例のうち, DNA hybridization 法にて, 悪性病変と関連の深い HPV 16 型 6 例, HPV unknown type 3 例を認め, CIN III における koilocyte は悪性度の高い HPV DNA と関連が深いと思われる。

細胞診では, HPV DNA 陽性 10 例中, koilocyte は 4 例 (25%), dyskeratocyte 9 例 (90%), 2 核細胞 7 例 (70%) で, HPV DNA 陰性 14 例のそれぞれ 3 例 (21%), 3 例 (21%), 3 例 (21%) と比較して, dyskeratocyte, 2 核細胞が特に多く, HPV 感染では, koilocyte だけでなく, dyskeratocyte, 2 核細胞についても注意を要すと思われる。

Key words : Uterine cervix—DNA hybridization—HPV—Koilocytosis—PAP. method

I. はじめに

Koilocyte については, 1956 年 Koss によって報告され, dysplasia の一種と考えられていた。その後, 1976

Association of human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia : DNA hybridization, immunocytochemistry, histology and cytology

Junko SAITO, M.D., Masaki INOUE, M.D., Gaiko UEDA, M.D., Osamu TANIZAWA, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka University of Medicine

論文別刷請求先 ☎553 大阪市福島区1の1の50 大阪大学
医学部附属病院産婦人科 齊藤淳子

平成元年3月2日受付

平成元年8月25日受理

年, Meisels ら^{6,7)}は, koilocyte が子宮頸部コンジローマに特有な変化で, 従来の mild dysplasia の多くが, 子宮頸部コンジローマであると報告している。また, koilocyte には多くの場合, 電顕的にウイルス粒子が証明されており¹⁰⁾, 酵素抗体法によっても, ウイルス抗原が証明されている¹⁰⁾。したがって, koilocyte は, human papillomavirus (HPV) 感染の一つの病理形態学的特徴と考えられている。

一方, 分子生物学的方法により, 外陰部コンジローマにはおもに HPV 6, 11 型が検出され⁹⁾, 日本の子宮頸癌には HPV 16, 18 型が約 40% 検出されている^{9,13)}。すなわち, HPV 6, 11 型はおもに良性疾患であるコンジローマと関連し, HPV 16, 18 型は子宮頸癌と関連があると思われる。よって, CIN における koilocytosis が HPV の

どのタイプに関連するかは、CIN と子宮頸癌の関係を知らうで重要である。

本論文では、細胞診、組織診と HPV 感染との関係を知る目的で、これらについて比較検討した。

II. 対象および方法

1. 対 象

1984年7月から1985年8月までに大阪大学産婦人科において、CIN III (子宮頸部高度異形成, 子宮頸部上皮内腫瘍) の診断で、単純子宮全摘術, または子宮頸部円錐切除術を施行した24例を対象とした。

2. 組織診, 細胞診

細胞診は術前子宮頸部擦過細胞をパパニコロー染色し, Meisels らの報告に基づき⁷⁾, koilocyte, dyskeratocyte, 2核細胞の出現の有無について検討した。組織診は術前生検, 術後子宮頸部12分画の組織について, ホルマリン固定後パラフィン切片を作製し, H-E 染色標本を用いて検討した。

3. 酵素抗体法

ホルマリン固定後パラフィン包埋の組織標本を用い, Sternberger の PAP 法に準じて行った。第一抗体に DAKO 社製抗パピローマウイルス抗体 (1:400) を用いた。

4. DNA hybridization 法

術後子宮頸部組織の一部を細片し, 0.01 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA に溶かし, 100 μ g/ml proteinase K, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 μ g/ml RNase を加え, 一昼夜室温に放置する。その後, フェノール, クロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) にて腫瘍 DNA を抽出し, 0.1 mM EDTA 中にて透析する。抽出した DNA 10 μ g を制限酵素 (BamHI または EcoRI) にて切断し, 0.8% アガロースゲルにて電気泳動後, ナイロンフィルター (Pall Ultrafine Filter) に移す。フィルターを 41°C にて, 50% formamide 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% Ficoll, 0.1% bovine serum albumin, 50 μ g/ml denatured herring sperm DNA, 0.1% SDS, 6 $\times$ SSC (SSC: 0.15 M NaCl,

15 mM Na citrate) の溶液に ³²P でラベルした HPV 6, 11, 16, 18 型 DNA (西独の Dr. H. zur Hausen より提供された) と stringent 条件下で洗ひ, オートラジオグラフィにて検出する。Less stringent 条件下では, フィルターを 20% formamide, その他の成分は同じ溶液でハイブリダイゼーションを行い, 6 $\times$ SSC, 0.1% SDS, 0.1% pyrophosphate, 50°C で洗う。

III. 結 果

1. 組織診および細胞診における koilocytosis の出現頻度

組織診にて CIN III 表層に koilocytosis を認めた症例は18例 (CIN with K) (写真1), koilocytosis を認めない症例は6例であった。細胞診では, koilocyte 7例, dyskeratocyte 12例, 2核細胞10例を認めた。組織診と細胞診の比較検討を表1に示している。CIN 6例では, dyskeratocyte 2例, 2核細胞1例を認めた。CIN with K 18例では, koilocyte 7例 (39%), dyskeratocyte 10例 (56%), 2核細胞9例 (50%) で, CIN with K では CIN に比較して, 高率に koilocyte, dyskeratocyte, 2核細胞が認められる。しかし, koilocyte については, CIN with K 18例中7例にしか koilocyte は認められず, 組織変化に比較して細胞診での出現頻度は低いと思われる。

写真1 Koilocytosis をともなった CIN III. 表層, 中層に koilocytosis を認める (H-E 染色, $\times 200$)

表1 Correlation of histology with cytology

Histology	Total	Cytology		
		Koilocyte	Dyskeratocyte	Binucleated cell
CIN	6	0	2 (33%)	1 (17%)
CIN with K	18	7 (39%)	10 (56%)	9 (50%)
Total	24	7	12	10

2. HPV DNA の検出

写真2は HPV 16 型 DNA の検出例 7 例を示している。症例 7, 8, 10, 12, 13, 15, 20 の DNA を Bam HI で切断後, HPV 16 型 DNA とハイブリダイゼーションすると HPV の全長である 7.9 kb のバンドが認められた。写真3は HPV unknown type の検出例を示している。症例 1, 2, 3 の DNA を Bam HI で切断後, HPV 16, 18 型 DNA をプローブとして, less stringent 条件下でハイブリダイゼーションすると, 症例 1, 2 では 5.5 kb のバンドが認められた。これらの DNA は stringent 条件下では HPV 6, 11, 16, 18 型とはハイブリダイゼーションしなかった。対象 24 症例中 14 症例には HPV DNA は全く検出されなかった。

3. 組織学的変化と HPV DNA の関係 (表2)

CIN with K 18 例では, HPV 16 型 6 例 HPV unknown

写真2 CIN IIIにおける HPV 16 DNA の検出。腫瘍 DNA を BamHI にて切断後 P にてラベルした HPV 16 DNA を用いてサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

表2 Correlation of HPV DNA with histology

Histology	Total	HPV-16	HPV unknown type	DNA negative
CIN	6	1 (11%)	0	5
CIN with K	18	6 (33%)	3 (17%)	9 (50%)
Total	24	7	3	14

type 3 例で HPV DNA を検出したものは計 9 例 (50%) であった。CIN 6 例では, HPV 16 型が 1 例 (11%) 検出されたのみであった。

4. 細胞診と HPV DNA の関係 (表3)

HPV DNA を検出した 10 例中, koilocyte は 4 例 (25%), dyskeratocyte 9 例 (90%), 2 核細胞 7 例 (70%) を認めた。HPV DNA 陰性例に比較して, dyskeratocyte, 2 核細胞は高頻度に認められた。

5. 酵素抗体法

24 例中, 1 例にのみ陽性で, koilocytosis の 1 部が染色された (写真4)。他 23 例すべて陰性であった。以上すべての症例の結果を表4に示した。

IV. 考 察

HPV には現在約 60 タイプがクローニングされてお

写真3 CIN IIIにおける HPV unknown type DNA 検出。腫瘍 DNA を BamHI にて切断後, P でラベルした HPV 16, 18 DNA を用いて less stringent 条件下でサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。

表3 Correlation of HPV DNA with cytology

HPV DNA	Total	Cytology		
		Koilocyte	Dyskeratocyte	Binucleated cell
negative	14	3 (21%)	3 (21%)	3 (21%)
HPV DNA positive	10	4 (25%)	9 (90%)	7 (70%)
HPV-16	(7)	(3)	(6)	(4)
HPV unknown type	(3)	(1)	(3)	(3)

り, その中でも特に HPV 16, 18 型は日本の子宮頸癌の約 40% に検出され, *in vitro* の実験系では HPV 16 型の造腫瘍能力が証明されている^{2,12)}. また, 子宮頸部の異形成が進展するほど, HPV 16, 18 型の頻度が高くなることが証明されている¹¹⁾.

臨床的には, 悪性腫瘍と関係の深い HPV 16, 18 型に感染しているか, 良性腫瘍に検出される HPV 6, 11 型に感染しているかが follow up 上問題になる. 現在, 種々の簡便法 (*in situ* hybridization 酵素抗体法など) が開発されつつあるが感度や特異性に問題がある. われわれの施行した酵素抗体法によるウイルスの capsid antigen の検出でも, koilocytosis を伴った CIN 18 例中 1 例に capsid antigen を認めただけで, DNA hybridization 法に比較して, 非常に感度が低い. 一般的に koilocytosis の酵素抗体法陽性率は 46~60% と非常に高いと報告されているが, われわれの検索した CIN III では, ウイルスの maturation が悪い (ウイルス capsid が形成されない) ために, 陽性率が低いと思われる.

そこで, われわれは現在最も特異的な方法である DNA hybridization 法にて HPV DNA を検索し, 細胞

診, 組織診について比較検討した.

組織学的には, Christopher らは, koilocytosis を伴った上皮内腫瘍 22 例中 22 例に HPV 16 型その他の型を含めた HPV DNA を認めている¹⁾. われわれは, CIN with K 18 例中 HPV 16 型 6 例, HPV unknowntype 3 例計 9 例 (50%) に HPV DNA を検出した. HPV 6, 11, 18 型については, CIN III では検出されなかった. これは,

写真 4 PAP 染色陽性例 (×200)

表 4 Histology, Cytology and Hybridization profile of CIN grade III

Case No.	Age	Histology	Koilocyte	Dyskeratocyte	Cytology Condylomatous parabasal cell	Binucleated cell	Class	HPV DNA	HPV antigen (PAP method)
1	36	CIN with K	—	+	—	+	III a	unknown type	—
2	51	CIN with K	—	+	—	+	III b	unknown type	—
3	40	CIN with K	+	+	+	+	III b	unknown type	+
4	43	CIN	—	—	—	—	III a	—	—
5	39	CIN	—	—	—	—	III a	—	—
6	37	CIN with K	—	+	—	—	III a	—	—
7	26	CIN with K	—	+	+	+	III a	16 type	—
8	37	CIN with K	—	+	—	+	III a	16 type	—
9	57	CIN with K	+	+	—	+	III a	—	—
10	63	CIN	—	+	—	—	IV	16 type	—
11	51	CIN	—	—	—	—	III a	—	—
12	47	CIN with K	—	+	—	+	III a	16 type	—
13	47	CIN with K	+	—	—	—	III b	16 type	—
14	47	CIN with K	—	—	—	—	III a	—	—
15	38	CIN with K	+	+	—	+	III a	16 type	—
16	35	CIN with K	+	—	—	+	III b	—	—
17	45	CIN with K	—	—	—	—	III a	—	—
18	37	CIN	—	+	—	+	III b	—	—
19	40	CIN with K	—	—	—	—	III b	—	—
20	38	CIN with K	+	+	—	—	III b	16 type	—
21	50	CIN with K	—	—	—	—	III b	—	—
22	35	CIN with K	+	—	—	—	III a	—	—
23	44	CIN	—	—	—	—	III a	—	—
24	56	CIN with K	—	—	—	—	III a	—	—

CIN with K : Cervical intraepithelial neoplasia with koilocytosis

HPV 6, 11 型は良性 condyloma に多く, HPV 18 型は子宮頸癌に検出される頻度が少ないためと思われる。また, HPV DNA が検出されない症例は 9 例 (50%) ある。その理由として, 第一に HPV 6, 11, 16, 18 型以外の場合で, 現在の HPV DNA では検索できない他のタイプがある, 第二に組織中のウイルスのコピー数が非常に少ない場合が考えられる。

一方, CIN 6 例中, HPV 16 型 1 例 (16%) を検出した。これまでも, koilocytosis を伴わない CIN に HPV DNA が検出されていることも多く報告されており, koilocytosis を示さない HPV 感染の存在も多いと思われる。

細胞診学的には, 本研究における HPV DNA 陽性例では, koilocyte 25%, dyskeratocyte 90% 2 核細胞 70% 検出され, HPV 陰性例に比較して高率に HPV 感染関連細胞が出現している。特に, dyskeratocyte, 2 核細胞の検出率が高く, これらに比して koilocyte の検出率は低い。久保田らも, HPV 感染病巣に認められる症例においては細胞診上 koilocyte の頻度は少なく, dyskeratocyte などの keratosis が主体をしめる場合も認められると報告している⁴⁾。したがって, 細胞診上特に CIN III において, koilocyte のみでなく, dyskeratocyte, 2 核細胞が認められる場合には, 悪性腫瘍と関係の深い HPV 感染に注意して観察することが重要である。

V. 結 語

検索した CIN III 24 例において, koilocytosis は組織学的に 18 例 (75%) にみられ, HPV DNA は, DNA hybridization 法で, HPV 16 型 7 例, HPV unknown type 3 例計 10 例 (41%) に認められた。しかも, HPV DNA 陽性例のほとんどは組織学的に koilocytosis を含んでおり, koilocytosis を伴わないものは 1 例であった。したがって, CIN III の koilocytosis は悪性腫瘍と関係の深い HPV DNA と関連していると思われる。しかし, 細胞診では, HPV DNA 陽性例で, dyskeratocyte と 2 核細胞が特に多く, koilocyte だけでなく, これらの細胞についても注意を要すと思われる。

稿を終えるにあたり, 研究にご協力いただきました大阪大学微生物研究所腫瘍ウイルス学教室 羽倉 明教授, 湯通堂満寿男助教授に深く感謝いたします。

なお, 本論文の要旨は第 27 回日本臨床細胞学会総会シンポジウム (於: 宇都宮) において発表した。

Summary

In an attempt to clarify the relation between cytohistological changes and HPV infection, we analyzed 24 cases of cervical intraepithelial neoplasia, grade III (CIN III) by histological, cytological, immunocytochemical, and the Southern-blot DNA hybridization methods.

Koilocytosis was detected histologically in 18 cases, 6 of which had HPV-16 DNA and 3 unknown type-HPV DNA. HPV-16 DNA was also detected in 1 case without koilocytosis.

Cytologically, koilocytes were found in 7 cases, dyskeratocytes in 12 and binucleated cells in 10. Among 10 of the cases with HPV DNA, however, koilocytes were found in 4, dyskeratocytes in 9, and binucleated cells in 7, while these three type cells were found in 3 cases each of the 14 cases without HPV DNA.

The results of the present study indicate that koilocytosis is an important finding which suggests HPV 16 infection in CIN III, however, dyskeratocytes and binucleated cells are more frequently observed than koilocytes in the cervical smears of HPV DNA-positive cases.

文 献

- 1) Christopher, P.C., et al.: Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions, *J. Virol.*, 54: 675, 1985.
- 2) Kanda, T., et al.: Human papillomavirus type 16 transformation of rat 3Y1 cells, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78: 103, 1987.
- 3) Kurman, R.J., et al.: Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condylomas, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 140: 931, 1981.
- 4) 久保田浩一・他: 子宮頸部ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染の細胞, 組織学的検討, *日臨細胞誌*, 26: 558, 1987.
- 5) Gissmann, L., et al.: Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80: 560~563, 1983.
- 6) Meisels, A., et al.: Condylomatous lesion of the cervix and vagina. 1. Cytologic patterns, *Acta Cytol.*, 20: 505, 1976.
- 7) Meisels, A., et al.: Condylomatous lesion of the cervix cytologic, colposcopic, and histopathologic study, *Acta Cytol.*, 21: 379, 1977.
- 8) Nagai, N., et al.: Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancerous with the in situ hybridiza-

- tion technique, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 6 : 366, 1987.
 - 9) Saito, J., et al. : New human papillomavirus sequences in female genital tumors from Japanese patients, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 78 : 1081, 1987.
 - 10) Sato, S., et al. : Sensitivity of koilocytosis, immunocytochemistry and electron microscopy as compared to DNA hybridization in detecting human papillomavirus in cervical and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia, *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 5 : 297, 1986.
 - 11) Syrjänen, K., et al. : Evolution of human papilloma-virus infections in the uterine cervix during a long-term prospective follow-up, *NLM, Appl. Pathol.*, 5 : 121, 1987.
 - 12) Yasumoto, S., et al. : Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH3T3 cells, *J. Virol.*, 57 : 572, 1986.
 - 13) Yoshikawa, H., et al. : Occurrence of human papilloma virus type 16 and 18 DNA in cervical carcinomas from Japan ; Age of patients and histological type of carcinomas, *Jpn. J. Cancer Res. (Gann)*, 76 : 667, 1985.
-