原 著

閉経後患者の HPV 感染診断における抱合型エストロゲン (プレマリン) 投与の臨床的意義

癌研究会附属病院婦人科¹⁾, 同 細胞診断部²⁾

己斐 澄子¹⁾ 手島 英雄¹⁾ 南 敦子²⁾ 片瀬 功芳¹⁾
 山脇 孝晴¹⁾ 星 利良²⁾ 藤本 郁野¹⁾ 山内 一弘¹⁾
 荷見 勝彦¹⁾ 都竹 正文²⁾

閉経後の患者で、細胞診で老人性変化が主体で一部に HPV 感染を疑う所見を認めたが、十分な HPV 感染細胞所見を示さなかった 8 症例にエストロゲン (プレマリン) 負荷を施行した。抱合型エストロゲン、プレマリン 1.25 mg を 2 週間経口投与した。投与前は少数の koilocyte や parakeratocyte を認めただけであったが、投与後は、炎症性背景が消失し、parakeratosis 100% (8/8), koilocytosis 75% (6/8), smudged 様濃染核 75% (6/8), giant cell 50% (4/8), multinucleation 62.5% (5/8) の率で HPV 感染に特徴的な細胞所見が出現した。

HPV-DNA は、Southern blot 法で 5 例を検索し、100% (5/5) 陽性であった。ISH (*in situ* hybridization) 法で他の 3 例を検索し、33% (1/3) が HPV-DNA 陽性であった。

エストロゲン投与は、老人性膣炎と悪性細胞を鑑別するだけでなく、老人性膣炎での HPV 感染診断に有用であった。老人性変化、老人性膣炎症例で HPV 感染を示唆する細胞が出現している場合、エストロゲン (プレマリン) 投与により、さらに HPV 感染細胞所見が明瞭となることがわかった。

Key words: HPV — Cytology — Senile colpitis — Estrogen proliferation test — Premarin

I. はじめに

The conjugated estrogens (premarin) administration can induce the cytological manifestation of human papillomavirus infection in postmenopausal women

Sumiko KOI¹⁾, M.D. Hideo TESHIMA¹⁾, M.D., F.I.A.C., Atsuko MINAMI²⁾, C.T., I.A.C., Katsuyoshi KATASE¹⁾, M.D., Takaharu YAMAWAKI¹⁾, M.D., Lira HOSHI²⁾, C.T., I.A.C., Ikuno FUJIMOTO¹⁾, M.D., F.I.A.C., Kazuhiro YAMAUCHI¹⁾, M.D., F.I.A.C., Katsuhiko HASUMI¹⁾, M.D., Masafumi TSUZUKU²⁾, C.T., C.F.I.A.C.

¹⁾Department of Gynecology, ²⁾Department of Diagnostic Cytology, Cancer Institute Hospital

論文別刷請求先 ☎ 170 東京都豊島区上池袋 1 の 37 の 1 癌研究会附属病院婦人科 己斐澄子

平成 6 年 7 月 15 日受付

平成 6 年 9 月 9 日受理

老人性変化、老人性膣炎はときとして、細胞診で悪性細胞とまぎらわしい所見を呈することがあり、その際にエストロゲン負荷が有用であることはよく知られている¹⁾。

閉経後の患者の細胞診で HPV (Human Papillomavirus) 感染を疑うが、当科の HPV 感染診断基準 (表 1) を満たさない 8 症例に、エストロゲン投与 (プレマリン) を施行し、HPV 感染細胞所見を明らかにすることが可能か検討した。

表1 HPV感染細胞所見

主要所見
Parakeratosis (Dyskeratosis を区別しない)
Koilocytosis
Smudge 様濃染核
Giant cell
副所見
Multinucleation
Amphophilia
オレンジG好染表層細胞?
Condylomatous parabasal cell?

II. 対象と方法

対象は8例の閉経後婦人である。エストロゲン投与施行前の細胞診断で、老人性変化を主体に異型細胞、少数の parakeratocyte もしくは koilocytocyte を伴う症例であった。

1. 細胞診判定

当科で用いている HPV 感染細胞所見を表1に示した。各所見の定義は、古田ら²⁾の報告にあるので省略する。parakeratosis, koilocytosis, smudged 様濃染, giant cell などの主所見4項目と副所見である multinucleation を加えた5項目について検討した。

2. エストロゲン投与

抱合型エストロゲン製剤 Premarin 1.25 mg を2週間経口投与した。プレマリン投与終了後2週間以内に、V:後陰円蓋吸引スミア(スポイト), C:頸部表面擦過スミア(綿棒), E:頸管内膜擦過スミア(ブラシ)を採取し細胞診断を行った。また同時に、全例にコルボスコピーを施行し、5例に組織診を行った。

3. HPV-DNA の検索

5例で擦過細胞をプロテネースK処理、フェノール-クロロフォルムでDNAを抽出し、Southern blot法でHPV-DNAのタイピングを行った。HPVタイプのスクリーニングは、HPV-16型DNAをプローブとして、Low stringent conditionでのPst Iのcleavage patternでタイプを判定した。タイプの確定には、HPV-16型または58型DNAをプローブとして、stringent conditionでSouthern blot法を施行し判定した。

ほかの3例は、エストロゲン投与時にDNAが採取されていなかったため、同時期の病理組織標本を用いてISH (*In situ* hybridization) 法を施行し、HPV-

DNAの有無を検討した。ISH法はViraType™ *in situ* (日本販売; 東レ フジバイオニクス) のキットを使用し、以下の3グループ6/11, 16/18, 31/33/35型のDNAについて検索した。ISH法の詳細は、計良ら³⁾の報告があるのでここでは省略する。

III. 結 果

全症例の詳細は、表2に示した。年齢は54歳から72歳で、平均60.6歳であった。閉経後年数は、3年から29年で、平均年数は12.4年であった。症例1と症例6では、2回プレマリン投与を施行した。投与間隔は、おのおの6ヵ月と4ヵ月であった。

1. エストロゲン投与後の細胞像

プレマリン投与後、全例で炎症性背景が消失した。扁平上皮異形成細胞の程度も、症例2, 症例3, 症例5でみられるように、プレマリン投与後判定可能になった症例もあった。

プレマリン投与後、全例においてHPV感染と診断しうる細胞が出現した。当科で用いているHPV感染診断基準(表1)の主要細胞所見の出現頻度でみると、parakeratosis 100% (8/8), koilocytosis 75% (6/8), smudged 様濃染核 75% (6/8), giant cell 50% (4/8)であった。副所見である multinucleation の出現率は、62.5% (5/8)であった。

2. 組織診とコルボスコピー所見

プレマリン投与開始直前および終了直後に施行した組織診の結果を表2に示した。5症例のうち、3例が異形成、2例が慢性炎症であった。全例に koilocytosis が認められ、組織学的にもHPV感染を伴っていた。

プレマリン投与の前後で、コルボスコピー所見に変化のあった症例は、2例であった。症例1は子宮腔部に flat condyloma を、症例8は子宮腔部に white lesion をプレマリン投与後に認めた。

3. HPV-DNA のタイプ

Southern blot法では、全例(5/5)にHPV-DNAが証明された。HPV-16型が4例、HPV-58型が1例に検出された。

ISH法は3例に施行した。この症例はSouthern blot法は施行していない。6/11型が1例に検出された。症例7と8は6/11, 16/18, 31/33/35型の3グループのタイプは陰性であった。

表 2 検討症例

No. 年齢	施行前 class : 所見	エストロゲン投与後細胞診						組織診	HPV-DNA	
		class : 所見	Parakera.	Koilo.	Smudged.	Giant.	Multinuc.		SB 法	ISH 法
1. 54	Ⅲ : 扁平上皮異型細胞 Parakeratosis	Ⅲ : 異形成 HPV 感染	+	+	-	+	+	N.D.	16	N.D.
	Ⅱ : 老人性変化	Ⅲ : HPV 感染	+	+	-	-	+	N.D.		
2. 60	Ⅲ : 扁平上皮異型細胞 Koilocytosis	Ⅲa : 軽度異形成 HPV 感染	+	+	+	+	-	慢性頸管炎 Koilo ⊕	16	N.D.
3. 68	Ⅱ : 扁平上皮異型細胞 Parakeratosis	Ⅲa : 中等度異形成 HPV 感染	+	-	+	-	+	N.D.	16	N.D.
4. 56	Ⅲ : 扁平上皮異型細胞	Ⅲ : 異形成 HPV 感染	+	+	+	-	+	軽度異形成 Koilo ⊕	16	N.D.
5. 60	Ⅱ : 老人性変化	Ⅲa : 軽度異形成 HPV 感染	+	-	+	+	+	N.D.	58	N.D.
	Ⅱ : 老人性変化	Ⅲa : 同上	+	-	+	+	+	N.D.		N.D.
6. 59	Ⅱ : 老人性頸管炎 Parakeratosis	Ⅲ : 異形成 HPV 感染	+	+	+	-	-	慢性頸管炎 Koilo ⊕	N.D.	6/11
7. 56	Ⅱ : 老人性変化	Ⅲ : 異形成 HPV 感染	+	+	+	-	-	中等度異形成 Koilo ⊕	N.D.	(-)
8. 72	Ⅱ : 軽度核肥大	Ⅲ : 異形成 HPV 感染	+	+	+	+	+	軽度異形成 Koilo ⊕	N.D.	(-)

Parakera. : Parakeratosis, Koilo. : Koilocytosis, Smudged. : Smudged nucleus, Giant. : Giant cell, Multinuc. : Multinucleation, SB 法 : Southern blot 法, ISH 法 : *In situ* hybridization 法, N.D. : Not done

IV. 考 察

1. エストロゲン (プレマリン) 投与

エストロゲン投与と細胞診の関係は1943年にPapanicolaouが⁴⁾提唱して以来、種々の形で試みられており、エストロゲン投与は閉経後婦人の細胞判定困難例の鑑別診断に有用な手段である。エストロゲン投与、すなわちproliferation testとして、Keeblerら¹⁾は以下の4方法を提示している。1) 1 mg Diethylstilbestrol (以下DES) を連日5日間経口投与し、投与終了後2日目に細胞診再検。2) 3.75 mg の抱合型エストロゲン (プレマリン) を連日5日間投与後2日目に細胞診再検。3) 0.5 mg のDES腔坐薬を3日間投与し5日目に細胞診再検。または0.01% DES軟膏を1日投与後2~3日目に再検。4) 20 mg の持続性エストロゲン剤筋注後7日目に細胞診再検。現在は安全性を考慮し、プレマリン投与が好ましく、その有効期間は15日から6ヵ月とされている。著者らは三輪ら⁵⁾の効果判定方法を用いた。細胞診の再検期間は、三輪らは投与終了後3日目としたが、今回は終了後2日目から14日目の間に施行した。この再検期間は、前述のプレマリンの最短有効期間の15日以内であっ

た。

2. HPV-DNA の検出率について

プレマリン投与後、8症例中5例がSouthern blot法でHPV陽性となり、1例がISH法でHPV陽性となった。

Southern blot法でHPV陽性の症例は、16型が80% (4/5)、58型が20% (1/5) であった。これら全例は、当科のHPV外来でfollow up中の症例で、現在までの観察期間は3年から7年である。HPV 16型はhigh risk type, HPV 58型はmoderate risk typeであるが、5例ともCIS以上のprogressionは示さず、プレマリン投与による悪性化はなかった。

ISH法でHPV陰性となった2例(症例7と8)については、プレマリン投与後の細胞所見でHPV感染が推察されること、組織診でもkoilocytosisがみられることより、臨床的にはHPV関連症例であることが示唆される。Vira Type™ *in situ* 法は、検出感度が約50コピー/cellとSouthern blot法に比べ感度が低く、またキットにないタイプは検出し難いHPV検出方法である。よってISH法単独で検索した症例7と8が、HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 35型のいずれかであってもコピー数が低いか、上記以外のキットにないタイプのHPVの症例である場合には、HPV-

DNA陰性と判定される。このような可能性を考慮すると、症例7と8において、細胞診と組織診ではHPV感染を示すが、HPV-DNAは陰性であったことに問題はないと考えられる。

プレマリン投与後にHPV感染所見が明瞭になったのは、検討症例数は少ないが、low risk (HPV 6/11), moderate risk (HPV 58), high risk (HPV 16)のすべてのリスク群のHPVであった。これらのタイプ間にHPV感染細胞所見の違いは認めなかった。

3. エストロゲン投与後の細胞所見

今回われわれは、閉経後の老人性変化が主体で、少数のparakeratocyteまたは少数のkoilocyteしか示さず、十分なHPV感染細胞所見を示さず判定に苦慮した8症例にエストロゲン（プレマリン）投与を施行し、全例で明らかなHPV感染所見を認めた。

parakeratosisは、古田ら²⁾の報告でも100% (72/72)出現したHPV感染所見で、HPV感染に必ず随伴する細胞所見とされている。今回の検討でも、100% (8/8)にみられた。koilocytosisは75% (6/8)にみられ、古田らの報告の60% (43/72)と同様な傾向にあった。smudged様濃染核は75% (6/8)に出現し、古田らの報告の60% (43/72)と同様な傾向であった。手島ら³⁾は、電子顕微鏡でsmudged nucleusにウイルス粒子を認めており、HPV感染の有力な根拠となる細胞である。giant cellは50% (4/8)に出現し、古田らの報告21% (15/72)に比べ、その出現率はやや高かった。giant cellは閉経婦人に出現しやすい傾向があるように思われるが、今後症例数を加えて検討したい。multinucleationは62.5% (5/8)で古田らの63% (45/72)と同様であった。

Meiselsら⁷⁾はdyskeratosis (parakeratosis)とkoilocytosisをHPV感染細胞所見としているが、当科ではparakeratosis, koilocytosis, smudged nucleus, giant cellをHPV感染細胞診断の主要所見として用いており、今回の8症例はプレマリン投与後に容易に診断した。

4. エストロゲン（プレマリン）の効果

エストロゲン投与が、正常の扁平上皮の成熟や分化に関与すると最初に示唆したのは、Papanicolaouら⁴⁾であった。悪性細胞は、正常細胞と異なって、エストロゲンに反応しないとされている。今回の観察では、エストロゲン投与後に表層細胞にみられるparakeratocyte、中・表層細胞にみられるkoilocyte、

smudged nucleusが出現し、エストロゲンがHPV感染所見を明らかにする作用があると考えられた。その機序として、Bedellら⁸⁾のraft cultureの報告がある。彼らはHPV-31型のサブタイプが感染している子宮頸部のmild dysplasiaのcell lineの観察から、HPV感染細胞は旁基底細胞では細胞の腫大程度の所見しかなく、表層ではkoilocyteが出現し、HPVゲノムの増幅を伴っていた。そして細胞の分化により、HPVゲノムの複製や増幅が進行するとしている。koilocyteはHPVゲノムが増幅した結果の細胞の変性像であるので、彼らの観察結果を要約すると、細胞の分化がHPVゲノムの増殖を起こし、そのHPV増殖の結果が中層および表層でHPV感染細胞とされているkoilocyteなどの細胞変化として認識されることが考えられる。よって、閉経婦人の旁基底細胞主体の状態では、HPV感染があってもその細胞所見は不明瞭であるが、抱合型エストロゲン（プレマリン）により扁平上皮の成熟や分化が生じて、中・表層細胞が主体となってHPV感染所見が明らかになったと推察された。

5. 閉経後婦人におけるHPV感染

西村ら⁹⁾の報告によると、細胞診でclass I, IIを示した50歳以上の婦人でHPV-DNA陽性率は1.3% (1/77)であった。

閉経後の婦人におけるHPV感染の実態は、閉経前の婦人に比して報告は少ないが、今回の検討結果からも、閉経婦人にHPV感染が存在することが示唆された。抱合型エストロゲン（プレマリン）は、細胞診で所見が得られ難い閉経婦人のHPV感染を診断するために有用と考えられた。

Summary

We encounter interpretive difficulties with atrophic cell patterns in postmenopausal women because of the possible presence of malignant tumor cells derived from squamous cell carcinoma.

Recently the relationship between human papillomavirus (HPV) and cervical carcinoma has been discussed. Cytodiagnostic criteria for HPV infection have been established and parakeratosis (dyskeratosis), koilocytosis, smudged nuclei, giant cells. Multinucleation are regarded as cytologic evidence of HPV infection.

Occasionally we encounter the atrophic cell pattern with a few parakeratocytes and koilocytes intermingled. The

proliferation test was performed in these patients, the conjugated estrogen was administered to 8 patients as an oral a dose of Premarin, 1.25 mg daily for 2 weeks with repeat smears after completion of the test.

The cytologic manifestations of HPV infection after the test were parakeratosis in 100% (8/8), koilocytosis in 75% (6/8), smudged nuclei in 75% (6/8), giant cells in 50% (4/8) and multinucleation in 62.5% (5/8) with a clean background.

HPVs were detected by the Southern blot hybridization method in 5 patients, HPV 16 DNA was positive in 4 patients and HPV 58 DNA in 1. HPV 6/11 was detected in 1 case of 3 patients by the *in situ* hybridization method.

The administration of estrogen (Premarin) allows differentiation not only of malignant cells but of HPV infection from the epithelial atrophic pattern of squamous origin.

文 献

- 1) Keebler, C.M.: The proliferation test: An aide in differential cytodiagnosis, Compendium on diagnostic cytology 6th edition, pp. 132~138, T.O.C., Chicago, 1988.
- 2) 古田則行・他: ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染細胞所見の検討—細胞診による HPV 感染推定のために—, 日臨細胞誌, 29: 493~499, 1990.
- 3) 計良恵治・他: 子宮頸部生検組織における *in situ* hybridization 法によるヒトパピローマウイルス DNA の検出と型同定: Southern blot hybridization 法との比較, 日臨細胞誌, 30: 1055~1062, 1991.
- 4) Papanicolaou, G.N., et al.: Diagnosis of uterine cervix by the vaginal smear, Harvard university press, Cambridge, 1943.
- 5) 三輪治子・他: Estrogen 投与による腔スミア中の細胞変化, 日臨細胞誌, 20: 85~89, 1981.
- 6) 手島英雄・他: 細胞診 HPV 感染細胞における HPV 粒子の電顕的観察, 日臨細胞誌, 30: 131~132, 1991.
- 7) Meisels, A., et al.: Human papillomavirus-induced change, Cytopathology of the uterine cervix, pp. 73~117, ASCP press, Chicago, 1990.
- 8) Bedell M, A., et al.: Amplification of human papillomavirus genomes *in vitro* is dependent on epithelial differentiation, J. Virol., 65: 2254~2260, 1991.
- 9) 西村公弘・他: human papilloma virus の感染状況と cervical intraepithelial neoplasma の関連性について, Oncol Chemoth, 10: 56~62, 1994.

写真説明

- 写真 1 a: 症例 3 のプレマリン投与前の細胞像。老人性変化か異形成細胞か判定困難な細胞集塊 (Pap. 染色, $\times 40$)
 b: 症例 3 のプレマリン投与後の細胞像, dysplasia で parakeratocyte と multinucleation を伴っていた (Pap. 染色, $\times 40$)
- 写真 2 a: 症例 4 のプレマリン投与前細胞像, PBT の核肥大と smudged 様濃染核に類似した核所見がみられ, 一部に koilocyte 様細胞を認めた (Pap. 染色, $\times 40$)
 b: 症例 2 のプレマリン投与後の細胞像, mild dysplasia で koilocyte, multinucleation を伴っていた (Pap. 染色, $\times 40$)
- 写真 3 a: 症例 6 のプレマリン投与前の細胞像。老人性炎症に少数の parakeratocyte がみられた (Pap. 染色, $\times 40$)
 b: 症例 6 のプレマリン投与後の細胞像, smudged 様濃染核と parakeratocyte が出現した (Pap. 染色, $\times 40$)
- 写真 4 a: 症例 6 の組織像, 子宮腔部の扁平上皮に異型はなく, koilocyte が中表層にみられた (H-E 染色, $\times 20$)
 b: 症例 6 の ISH 法, HPV 6/11 型陽性で, koilocyte の核が染色された (ISH 法, $\times 20$)

写真 1

写真 2

写真 3

写真 4