In situ hybridization 法による陰茎癌でのヒト パピローマウイルス (HPV) DNA の検討

東京大学医学部附属病院分院泌尿器科¹⁾,

東京大学医学部泌尿器科学教室²⁾

森山 信男¹⁾ 長瀬 泰¹⁾ 植木 哲雄²⁾ 保坂 義雄²⁾
東原 英二²⁾ 村橋 勲¹⁾ 阿曾 佳郎²⁾

IN SITU HYBRIDIZATION STUDY OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS FROM THE PENILE CANCER

Nobuo Moriyama¹⁾, Yasushi Nagase¹⁾, Tetsuo Ueki²⁾, Yoshio Hosaka²⁾,
Eiji Higashihara²⁾, Isao Murahashi¹⁾ and Yoshio Aso²⁾

1) Department of Urology, Branch Hospital, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

2) Department of Urology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo

The histochemical detection of human papillomavirus (HPV) was performed using the technique of in situ hybridization from the formalin fixed paraffin embedded specimens of penile carcinoma and condyroma acuminatum. One of 19 penile cancer cases (5.3%) revealed the positive staining on the nuclei of the tumors for HPV type 16/18. However, the positive nuclei were scattered and localized in small part of the tumor which showed no koilocytosis. On the contrary, 11 of 12 condyloma acuminata cases (91.7%) showed positive staining on the nuclei of the tumors for HPV type 6/11, also 5 of the 11 cases (45.5%) revealed cross reaction for other type of HPV. The HPV types 6/11, 16/18 and 31/33/35 may be unrelated to the pathogenesis of the Japanese penile carcinoma. However, further study is necessary to evaluate that the number of HPV-DNA copy in our cases is too small, or the other type of HPV is responsibility.

Key words: in situ hybridization, human papillomavirus, penile cancer

要旨: 19例の陰茎癌症例ならびに12例の尖圭コンジローム症例のパラフィンブロックを用いて, human papillomavirus (HPV) の組織化学的局在を In situ hybridization 法 (キット) で検討した。陰茎癌での陽性例は1例のみ (5.3%) で, type は16/18型であった。陽性腫瘍細胞は, Koilocytosis を示さず, 限局した部位でかつ散見的に認められた。一方, 尖圭コンジロームでは11例 (91.7%) が6/11型で陽性であった。その局在は主に koilocyte の核であった。しかしこのうち5例が他の type との交叉反応を示した。以上より, 今回我々の検討した日本人陰茎癌では HPV 6/11型, 16/18型, 31/33/35型の関与は少ないと思われた。しかし, 1細胞当たりの HPV-DNA のコピー数が少ない可能性や, まだクローニングされていない他の papillomavirus の関与については今後の検討が必要であろう。

キーワード: In situ hybridization, ヒトパピローマウイルス, 陰茎癌

緒 言

尖圭コンジロームは, 疫学的研究からも性行為感染症 (Sexually transmitted disease) であることが認められており¹⁾, 分子生物学的にも Gissman らによって, ヒトパピローマウイルス (HPV) 6 型 DNA が抽出された²⁾。また子宮頸癌ではその病因として HPV の

関与が論じられている³⁾。一方, 陰茎癌ではその病因は主に恥垢の機械的・科学的刺激または恥垢自体の発癌作用などであるといわれている⁴⁾が, HPV の検出も報告されている⁵⁾⁻⁸⁾。HPV の同定には DNA hybridization 法が最も信頼性が高く, molecular cloning 法の確立により HPV は現在まで約60種類のサブタイプが

同定されている⁹⁾。これに伴って組織学的局在も数種のプローベを用いた in situ hybridization 法が確立され¹⁰⁾、主に婦人科領域で研究されている¹¹⁾¹²⁾。我々はこの in situ hybridization のキットを用いて陰茎癌ならびに尖圭コンジロームにおける HPV の陽性頻度ならびに局在を検討したので報告する。

対象ならびに方法

対象は1976年から1989年までの東京大学医学部泌尿器科学教室ならびに同附属病院分院泌尿器科の症例のうちブロックを入手出来た陰茎癌19例と尖圭コンジローム12例である。年齢の平均±標準偏差は陰茎癌：65.3±11.3歳（45歳から82歳）、尖圭コンジローム：32.9±11.4歳（21歳から52歳）である。材料はホルマリン固定のパラフィン包埋標本を用いた。

染色方法は表1に要約するが、5μmの連続切片を作成し、3-aminopropyltriethoxysilane (AES) を塗布したスライドガラスに貼付し、H. E. 染色とキットによる in situ hybridization 法（Vira type™，トーレ・フジ、バイオニクス社）を行った。このキットの HPV プローベはニックトランスレーション法によりピオチン標識した HPV 6/11型、16/18型、31/33/35型の3種の DNA である。また陽性コントロールはヒトゲノム DNA に対するプローブであり、陰性コントロールはプラスミドベクター pBR 322 に対するプローブである。核染色は nuclear fast red で行った。

結 果

陰茎癌

19例の陰茎癌の手術標本を検討した。隣接する正常表皮部分は HPV 6/11型、HPV 16/18型、HPV 31/33/35型の3種とも全て陰性であった。腫瘍部では1例（5.3%）で HPV 16/18型のみが陽性であった。以下その例について報告する。

症例

E.N. 82歳。

1980年2月亀頭部左側に小腫瘤を認めるも放置、同年11月両側単径リンパ節腫大を認める。1981年6月東京大学医学部附属病院分院泌尿器科を受診。陰茎腫瘍は亀頭部左側にみられ、最大径4.5cmであった。左右単径リンパ節は腫大し、それぞれ、直径約6cmであった。同年7月6日陰茎部分基底部切除ならびに両側単径リンパ節摘出術を施行した。

組織学的には中分化型の扁平上皮癌で、左側単径リンパ節に転移を認めた。in situ hybridization では HPV 16/18型のプローブでのみ陽性であった。すなわ

表1 In situ hybridization の手順

1) 切片の準備	
キシレン	5分×2
100%エタノール	5分×2
自然乾燥	5—10分
分解試薬 ¹⁾ で37°C; 15分 incubation	
95%エタノール	1分
100%エタノール	1分
自然乾燥	5分
1) Hybridization	
プローブをスライド上の組織に滴下	
カバーガラスで組織を被う	
スライドを100±2°Cで5分加熱	
37度で2時間 Hybridization	
Buffer ²⁾ でカバーガラスを洗い落とす	
Buffer ²⁾ で洗浄	3分×3
3) 検出	
Strept-avidin ALP complex を組織に滴下し、37°C; 20分 incubation	
Buffer ³⁾ で洗浄	3分×3
基質溶液 ⁴⁾ で37°C 60分 incubation	
蒸留水で洗浄	3分×3
4) 核染、脱水、マウント、検鏡	
Nuclear Fast Red で5分室温で核染	
蒸留水で洗浄	
95%エタノール	1分
100%エタノール	1分
キシレン	
permanent mounting medium でマウント	
1: 蒸留水190ml+2N 塩酸10ml+蛋白分解酵素400mg	
2: Bovine serum albumin 加 Tris-buffered saline	
3: Tris-buffered saline	
4: 5-bromo-4-chlore-3-indolylphosphate (0.75ml)+Nitroblue tetrazolium (0.75ml)+TBS 150ml	

ちブルーの陽性染色所見が腫瘍細胞の細胞核、特に核膜ならびにクロマチン顆粒に一致してみられた。陽性細胞は腫瘍の比較的辺縁部分で、かつ構造異型が少ない部分に散見された。陽性細胞は典型的な koilocyte では無かったが、一部の陽性細胞は核の周囲がやや空胞化していた(図1, 2)。浸潤性に深部に増殖している大部分の腫瘍細胞ならびに正常皮膚の部分は陰性であった。

尖圭コンジローム

12例の尖圭コンジロームの手術標本を検討した。12例中11例（91.7%）が陽性であった。うち6例は HPV 6/11型のみ陽性であった。陽性細胞は主に表層近くの koilocyte に認められた。また5例では HPV 6/11型が強陽性で、かつ16/18型、31/33/35型陽性であった。しかしながら、6/11型に比較して染色程度や陽性核の頻度は減少していた。1例は全て陰性であった(表2, 図3)。

図1 ×360, (a) 腫瘍の辺縁部位の H.E., 一部空胞状の細胞が散見される, (b) 同部位の HPV 16/18型プローブを用いた in situ hybridization, 腫瘍細胞核に一致して陽性所見がある. 陽性細胞は典型的な koilocyte ではない.

図2 ×360, (a) 腫瘍のやや深部の H.E., 空胞状の細胞が目立つ, (b) 同部位の HPV 16/18型プローブを用いた in situ hybridization, 陽性細胞の空胞化は少ない.

考 察

陰茎癌における HPV の検討を in situ hybridization を用いて免疫組織細胞化学的に検討した. またこのキットの有用性を調べる意味もあわせて, 尖圭コンジロームでの成績を検討した. in situ hybridization 法は Southern blot 法に比較して感度が悪く, HPV を検出するには 1 細胞当たり少なくとも 20 コピーの HPV-DNA の存在が必要とされる¹³⁾. しかし組織内の局在をみることが出来るので, 極めて有力な手段である. また最近 in situ hybridization のキットが入手出来るようになり, 主に婦人科領域で尖圭コンジロームや子宮頸癌での局在や頻度が検討されている¹¹⁾¹²⁾. DNA 配列は, 種々の HPV 型の間で相同性 (homology) を有する. 今回のキットは比較的緩い基準 (stringency) を用いており, 密接に関連する HPV 型ではある程度の交叉反応が生じる. 尖圭コンジロームの結果では 5 例が 6/11 型に強陽性, 他の 2 つの型でもそれより弱い, 陽性の所見を呈した. これらの症例はおそらく 6/11 型感染で, 他の 2 つの型に対する所

表2 尖圭コンジローム症例

症例	年齢	HPV-DNA プローベ型		
		6/11	16/18	31/33/35
1. M. G.	28	+	—	—
2. T. N.	39	+	—	—
3. M. S.	24	+	+	+
4. I. T.	50	+	—	—
5. T. M.	22	+	+	+
6. H. A.	28	+	+	+
7. H. N.	23	+	—	—
8. T. I.	52	+	—	—
9. K. S.	21	+	+	+
10. K. O.	51	—	—	—
11. H. W.	26	+	+	+
12. T. K.	31	+	—	—

+: 強陽性 上皮細胞核が強く染まり, 細胞膜や胞体も一部染まる(陽性核数は考慮せず).
+: 陽 性 上皮細胞核のみが染まる(陽性核数やその程度は考慮せず).
—: 陰 性 上皮細胞核は全く染まらない.

図3 ×180, 尖圭コンジローム症例5, (a) HPV 6/11型, (b) HPV 16/18型, (c) HPV 31/33/35型のプローブを用いた in situ hybridization, HPV 6/11型で主に koilocyte の核が強く染まっている, また細胞膜や一部胞体も陽性である, 他の型でもより淡い核が陽性である。

見は交叉反応と考えられる。もちろん過染色など操作上の問題も考慮しなければならないし、多種の HPV に感染していることも完全には否定できない。以上、若干の問題はあるが、今回用いたキットは HPV の検

出ならびに局在の検討には有効であった。

陰茎癌の病因としては恥垢による化学的・機械的刺激あるいは恥垢自体の発癌性も考えられる⁴⁾。しかしながら HPV も陰茎癌から検出され、発癌と関連があると考えられる^{3)5)~8)}。Gissmann ら³⁾の集計によれば陰茎癌 (12例) では、HPV 16型が25% (3例), 18型が8% (1例), その他の HPV が33% (4例) の陽性率であった。また McCance ら⁵⁾はブラジルの陰茎癌症例53例中 HPV 16型を26例 (49%), HPV 18型を5例 (9%)に見いだしている。しかし、Villa ら⁶⁾は同じくブラジルの陰茎癌18例中7例 (39%)に HPV-DNA を認めているが、16型は存在しなかったと述べている。またバリ島ヒンズー教徒の陰茎癌症例では23例中15例 (65%)が、抗 HPV ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学的方法で陽性であった⁷⁾。さらに kiyabu ら⁸⁾は polymerase chain reaction によるホルマリン固定のパラフィン切片より5例中2例に18型を見いだしている。一方子宮頸癌では HPV の検出率は16型で49%, 18型で14.8%といわれ³⁾, in situ hybridization でも25%の報告がある¹²⁾。上記の報告からすると我々の陰茎癌症例の HPV 陽性率はやや低いと思われるが、陰茎癌で同方法を用いた論文を見いだせなかった為、比較的検討は行っていない。子宮頸癌や陰茎癌では HPV の陽性率や陽性型に地理的要因や人種的要因が影響しており^{3)5)~7)}, あるいは日本人症例では頻度が低いのかも知れない。

なお我々の陰茎癌症例の陽性細胞は典型的な koilocytosis を示さなかった。一般に HPV 感染の細胞は koilocytosis を示す事が知られているが、それ以外の細胞でも HPV 陽性の細胞が知られている¹⁴⁾ので、その点は矛盾しないと思われる。

以上より、測定キットによる再現性の問題は残るが、今回検討した日本人陰茎癌症例の病因として、HPV 6/11型, 16/18型, 31/33/35型の関与は少ないと考えられる。この説は、1) 男性性器の尖圭コンジロームが悪性化することは極めて稀であり¹¹⁾, 文献上、陰茎癌に移行した症例は数10例である¹⁶⁾, 2) 尖圭コンジロームの場合はほとんどが HPV 6, 11型の感染によるものであり、極少数に HPV 16型が検出されているに過ぎない¹⁷⁾, などの点からも示唆される。しかしながら、今回検索した標本で1細胞当たりの HPV-DNA のコピー数が少ない可能性や、まだクローニングされていない型による HPV の感染も充分考えられるので今後の検討を待ちたい。

文 献

- 1) Chuang, T.-Y. and Madison, W.I.: Condylomata acuminata (genital warts). An epidemiologic view. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 16, 376—384, 1987.
- 2) Gissmann, L. and zur Hauzen, H.: Partial characterization of viral DNA from human genital wart (condylomata acuminata). *Int. J. Cancer*, 25, 605—609, 1980.
- 3) Gissmann, L. and Schneider, A.: Human Papillomavirus DNA in Preneoplastic and Neoplastic Genital Lesions. *Viral Etiology of Cervical Cancer*, p. 217—224, Cold Spring Harbor Laboratory, U.S.A., 1986.
- 4) Pratt-Thomas, H.R., Heins, H.C., Latham, E., Dennis, E.J. and Iver, E.A.: The carcinogenic effect of human smegma. —An experimental study. *Cancer*, 9, 671—689, 1956.
- 5) McCance, D.J., Kalache, A., Ashdown, K., Andrade, L., Menezes, F., Smith, P. and Doll, R.: Human papillomavirus types 16 and 18 in carcinomas of the penis from Brazil. *Int. J. Cancer*, 37, 55—59, 1986.
- 6) Villa, L.L. and Lopes, A.: Human papillomavirus DNA sequences in penile carcinomas in Brazil. *Int. J. Cancer*, 37, 853—855, 1986.
- 7) Boon, M.E., Susanti, I., Tasche, M.J.A., and Kok, L.P.: Human papillomavirus (HPV) —Associated male and female genital carcinomas in a Hindu population. The male as vector and victim. *Cancer*, 64, 559—565, 1989.
- 8) Kiyabu, M.T., Shibata, D., Arnheim, N., Martin, W.J. and Fitzgibbons, P.L.: Detection of human papillomavirus in formalin-fixed, invasive squamous carcinomas using the polymerase chain reaction. *Am. J. Surg. Pathol.*, 13, 221—224, 1989.
- 9) 新村真人, 本田まりこ: ビオチン化プローブを用いた in situ hybridization, *組織細胞化学*1989, 174—181, 学際企画, 東京, 1989.
- 10) Lewis, F.A., Griffiths, S., Dunncliff, R., Wells, M., Dudding, N. and Bird, C.C.: Sensitive in situ hybridization technique using biotin-streptavidin-polyalkaline phosphatase complex. *J. Clin. Pathol.*, 40, 163—166, 1987.
- 11) Burns, J., Graham, A.K., Frank, C., Fleming, K. A., Evans, M.F. and McGee, J.O.D.: Detection of low copy human papillomavirus DNA and mRNA routine paraffin sections of cervix by nonisotopic in situ hybridization. *J. Clin. Pathol.*, 40, 858—864, 1987.
- 12) 石 和久, 喜納勝成, 川島 徹, 霜多 広, 宇津野博, 高田道夫: 子宮頸部病変における HPV-DNA 局在の In situ hybridization 法による解析. *臨床病理*, 37, 1284—1288, 1989.
- 13) Walboomers, J.M.M., Melchers, W.J.G., Mulink, H., Meijer, C.J.L.M., Struyk, A., Quint, W. G.J., Van-Der-Noordaa, J., and Ter-Schegget, J.: Sensitivity of in situ detection with biotinylated probes of human papilloma virus type 16 DNA in frozen tissue sections of squamous cell carcinomas of the cervix. *Am. J. Pathol.*, 131, 587—594, 1988.
- 14) 久保田浩一, 山崎 健, 河西一九三, 岩崎秀昭, 武田 敏, 高見沢祐吉, 山本まゆみ, 森山裕子, 石川明: 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, 15—22, 1987.
- 15) Kovi, J., Tillman, R.L. and Lee, S.M., Malignant transformation of condyloma acuminatum —A light microscopic and ultrastructural study. *Am. J. Clin. Pathol.*, 61, 702—710, 1974.
- 16) Boxer, R.J. and Skinner, D.G.: Condyloma acuminatum and squamous cell carcinoma. *Urology*, 9, 72—78, 1977.
- 17) 石田 卓, 石地尚興, 本田まり子, 新村真人: 尖圭コンジロームのヒト乳頭腫ウイルス型分類と臨床. 組織学的検討. *日皮会誌*, 98, 899—912, 1988.

(1990年7月6日受理)