喉頭乳頭腫の臨床－HPV感染とワクチン治療－

牧 山 清・松 崎 洋 海・平 井 良 治

Laryngeal Papilloma in Clinical Practice: Human Papillomavirus Infection and Vaccine Treatment

Kiyoshi Makiyama, Hiroumi Matsuzaki and Ryoji Hirai

With the exception of a few cases that become cancerous, laryngeal papilloma is fundamentally a benign disease. At the same time, however, it is also a refractory disease that causes very serious impairments in respiratory and phonatory functions. Human papillomavirus (HPV), a cause of these papillomas, infects not only the site of the tumor, but also the surrounding laryngeal mucosa. Thus, recurrent laryngeal papillomatosis (RLP) is both a neoplastic disease and an infectious disease.

HPV-DNA tests for various laryngeal diseases were performed to investigate whether there was HPV infection of the larynx. All patients with non-neoplastic diseases were negative for HPV. In vocal cord leukoplakia and laryngeal cancer, HPV-31 was detected in 2 of 68 patients, but all others were negative. With papilloma, on the other hand, HPV-6/11 was detected at a high rate.

Treatment for laryngeal papilloma requires surgery for the tumor and treatment for the infection. Efforts are made to use low invasive surgery that does not leave postoperative scarring. Adjuvant therapy for RLP includes cidofovir, HPV vaccination, herbal medicine, and bevacizumab. In our hospital, combination therapy with HPV quadrivalent vaccine and surgery began in 2012, and it has been able to inhibit recurrences in 70% of cases of RLP. With this treatment method, anti-HPV antibodies are induced in the laryngeal mucus with vaccination, inhibiting re-infection with HPV. RLP treatments that aim for a complete cure with elimination of HPV from the larynx and resection of the tumor should be considered.

Keywords : recurrent respiratory papillomatosis, HPV-6/11, HPV antibody, Ho:YAG Laser, Gardasil®

1. 喉頭疾患とHPV感染

喉頭乳頭腫は喉頭粘膜の表面に乳頭状の腫瘍が発生する疾患である(図1)。従来は乳児期から発症する若年型はhuman papillomavirus (HPV)感染で発症し、成人発症型では非ウイルス性が多いと言われていた。しかし、我々の先行研究では成人型の7割からHPV-DNAが検出され、成人でもウイルス性の割合が高かった。また、再発性喉頭乳頭腫(recurrent laryngeal papillomatosis, RLP)は全例がHPV陽性であった¹⁾。喉頭へのHPV感染の有無を検討するために、声帯ポリープや声帯嚢胞などの非腫瘍性疾患44例、声帯白板症や上皮内癌の29例、喉頭癌35例、喉頭乳頭腫36例に対してHPV-DNA検査を施行した²⁾。HPV-DNA検査はLiquid-phase hybridization法^{3,4)}とPCR法⁵⁾で行った。前者はHigh-risk群(HPV-DNA types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68)とLow-risk群(6, 11, 42, 43, 44)を群別に検出することができ、喉頭粘液中のHPV-DNA検査に用いた。後者はHPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52, 58のタイピング検査であり、腫瘍組織あるいは喉頭粘膜のHPV-DNA検査に用いた。

非腫瘍性疾患では全例がHPV-DNA陰性であった。声帯白板症の1例と喉頭癌の1例ではHigh-risk群のHPV-31が陽性であったが他の例では組織中High-risk群は陰性で

図1 再発性喉頭乳頭腫の術中写真

あった。一方、乳頭腫での喉頭粘液中HPV陽性率は61%と高率であり、腫瘍組織からはLow-risk群のHPV-6が51.6%、HPV-11が6.5%の例で検出された²⁾。子宮頸部細胞診で異常がない10歳代から60歳代の女性群を対象に年代別HPV感染率を調査した研究がある⁶⁾。10歳代が最も高くHPV陽性率は3割を超える。その後年齢を重ねるに従い陽性率が低下し、40歳から50歳代では1割程度に低下する。しかし、その後再び増加し60歳代の陽性率は2割を超える。子宮頸部ではHPV-16/51/18などのハイリスクタイプが64.9%、HPV-6/11他のローリスクタイプが16.1%検出された。すなわち子宮頸部では健常者でも様々なタイプのHPVに感染しているが、腫瘍やがん罹患していない咽頭・喉頭疾患例ではHPV感染はなかった。咽頭乳頭腫も一部を除けばHPV陰性であった⁷⁾。一方喉頭乳頭腫は高率にHPV6/11が陽性であった。これらのHPV-DNA検査結果からは子宮頸部、咽頭、喉頭のHPV感染には性的接触による感染以外の要素も関与していると考えられる。

2. HPV潜在感染

RLPは術前と同じ部位に再発することが多い。その原因の一つが周囲の非腫瘍粘膜にHPVが潜在感染していることである(図2)。HPVは喉頭粘膜基底細胞に感染しており粘膜表面の粘液内にHPV-DNAを放出する。放出された喉頭粘液中HPV-DNAが手術による粘膜欠損部位に再感染し、乳頭腫が再発すると推測される。このことはRLPの治療では乳頭腫に対する治療に加えてHPV潜在感染に対する治療が重要であることを示唆している。

3. 低侵襲手術

RLPは再発を繰り返す為に複数回の手術が必要になる。術部粘膜の瘢痕化や癒着により重大な機能障害を来すことも稀ではない。瘢痕化や癒着を避けるためには粘膜表層に限局した手術が要求される。

我々の施設ではホルミウムヤグレーザー(Holmium: yttrium- aluminum-garnet, Ho:YAG)を用いて粘膜表面のみを蒸散している。使用している機器はVersa Pulse®

図2 HPV6/11のプロブを用いたCSA in situ hybridization法
腫瘍粘膜(A)に加えて非腫瘍部の粘膜(B)からもHPV-DNAが検出された。

図3 鶏肉層構造モデルを用いたホルミウムヤグレーザー蒸散実験。ファイバー先端と粘膜の間を5mm空けて1W (0.2j×5p)で3秒間照射した。表皮表層の離断や変性を認めたが皮筋、深部筋層の変性は認めなかった。

Select™である。鶏肉層構造モデルを作成し蒸散実験を行った結果では、1Wの出力で粘膜表面から2～5mmの間隔を開けて数秒間レーザー照射することで粘膜表面のみが蒸散できることを確認した(図3)。Versa Pulse® Select™では喉頭微細手術用レーザー鉗子孔や喉頭ファイバースコープの処置チャンネルを通したLaser Fiberで照射する。Fiber外径は450μmmから750μmmと細く繊細な先端操作が可能である。CO₂ Surgical Laserを用いる場合でも粘膜表面を炙るように蒸散することで同様の手術効果が得られる。

4. 補助療法

手術のみでは再発を制御できない例が多いために、様々な補助療法が試みられてきた。表1は主な補助療法の一覧である。

表1 手術の補助療法として使用されている、あるいは期待されている薬剤

HPV に対する薬剤

1. Cidofovir
2. Peginterferon alfa
3. HPV vaccination

腫瘍細胞に対する薬剤

4. Indol-3-Carbinol
5. 漢方薬（薏苡仁、補中益気湯）
6. Bevacizumab

4-1. Cidofovir

サイトメガロウイルス治療薬である。基礎研究でHPV感染性細胞へのapoptosis効果が確認されている⁸⁾。多くの臨床報告がありCR率は56.25%から82.3%と高い⁹⁾。ただ、国内外でRLPに対する適応はない。

4-2. Peginterferon alfa

体内での半減期を延長させるためにインターフェロンのタンパク分子にポリエチレングリコール(PEG: polyethylene glycol)を結合した薬剤である。6歳の重症気道乳頭腫例にPeginterferon alfa 1 μg/kg/weekを皮下注射したところPRを得たという報告がある¹⁰⁾。国内での使用報告はない。

4-3. HPV vaccination

国内ではHPV-6/11/16/18の4価不活化ワクチンであるGardasil®が9歳以上の女性に認可されている。国外の多くの国ではすでに数年前からHPV-6/11/16/18/31/33/45/52/58の9価ワクチンが流通している。前述したようにRLPはHPV-6/11による感染であり4価ワクチンで対応できる。我々の施設では2011年より予防ワクチンであるGardasil®を用いた再発抑制研究を行っているの

後述する。

4-4. Indol-3-Carbinol

インドール-3-カルビノールはアブラナ科植物野菜に含まれる成分であり、エストロゲン代謝を促進することで細胞増殖抑制効果がある。海外では性ホルモン依存性がんの予防目的のサプリメントとして発売されている。再発性気道乳頭腫(recurrent respiratory papillomatosis, RRP) 33人を対象にした4年を超える長期成績の報告では、33%の例では腫瘍は残存するも追加手術が不要であった。また30%の例では腫瘍増殖抑制効果が得られた¹¹⁾。このサプリメントは国内でも安価に手に入ることもあり他の治療法と併用される場合が多い。

4-5. 漢方薬

薏苡仁(ヨクイニン)にはT cellやB cellの活性化作用やNK細胞や細胞障害性T cellを活性化するなどの効果があり、補中益気湯(ホチュウエッキトウ)はNK cellの活性化やIFN-γ産生を誘導し腫瘍・感染細胞への障害があるとされている。Okubo¹²⁾らは20人のRRP患者に漢方薬を使用し、経過が追えた12例で薬剤使用前後の比較を行った。漢方薬使用後では有意な手術回数減少効果や腫瘍減量効果があったと報告した。漢方薬は国内の多くの施設でRLP例に投与されている。

4-6. Bevacizumab

ベバシズマブ(Avastin® アバスチン®)は血管内皮増殖因子(VEGF)を阻害することで腫瘍細胞の血管新生を抑制する。RRP患者の腫瘍細胞を用いた研究でもその効果が確認されている¹³⁾。臨床効果についても報告があり、8歳から56歳のRRP患者5例に投与したところ4例ではその後の介入が不要であった¹⁴⁾。また、小児のRRP患者8例での研究では全例でPRを認めた¹⁵⁾。多施設での臨床試験では10歳から86歳RRP患者8例の中で7例はPR、1例はCRであった¹⁶⁾。このように治療効果は期待できるが、抗がん剤を適応外の乳頭腫に使用することは倫理的にも経済的にも困難である。

5. HPV予防ワクチンを用いた腫瘍再発抑制効果

2006年にHPV4価(HPV-6/11/16/18)ワクチンであるGardasil®がEUや北米で承認され接種が開始された。2年後の2008年にドイツの国内雑誌に興味ある症例が報告された。2歳のRLPにGardasil®を接種したところ再発が抑制され、その後10か月間は手術を必要としなかった¹⁷⁾。その翌年にはやはりドイツで9回もの手術を繰り返していた67歳男性RLP例にGardasil®を接種したところ腫瘍増殖が治まったことが報告された¹⁸⁾。これらの症例報告からGardasil®を接種することで、すでに発症しているRLPの再発を抑制できる可能性が示唆された。

5-1. HPV予防ワクチン治療の目的

RRPの多くの例で血清HPV抗体が陰性であり¹⁹⁾、再発しなかった例では血清HPV抗体価が有意に高値であっ

表2 性別年代別のGardasil®接種後HPV抗体価

性別	年齢 (症例数)	HPV抗体価平均値 (mMU/mL)			
		HPV-6	HPV-11	HPV-16	HPV-18
女性 ²²⁾	24-34 (n=792)	444	601	2345	399
女性 ²²⁾	35-45 (n=823)	398	514	2134	326
男性 ²³⁾	16-24 (n=1092)	448	628	2404	402
男性 ²⁴⁾	32-74 (n=12)	597.3	687.8	3167.1	504.2

た²⁰⁾。喉頭粘液中に抗体が存在することで周囲粘膜に潜伏感染しているHPV-DNAが手術後の粘膜欠損部に再感染することを阻止できるという推論が成り立つ。我々はHPV予防ワクチンであるGardasil®を接種し喉頭粘膜にHPV抗体を誘導した状態で再手術を行えばRLPの再発が抑制できるという仮説を立てた。

5-2. Gardasil®接種後の獲得抗体

Gardasil®接種後の子宮頸部粘液と血清のHPV抗体価を検討した研究では両者の間に有意の関係があった²¹⁾。すなわち、局所粘液中にHPV抗体が誘導されているか否かは血清抗体価値の高低で推測することができる。Gardasil®接種により、女性では若年者から中年までの年代で血清抗体価が上昇する²²⁾。男性でも若年者においては、女性同様に抗体価が上昇することが報告されている²³⁾。しかし、中年期以降の男性に対してGardasil®接種を施行し、血清抗体価の変化を検証した研究はなかった。

HPV陽性の男性RLP12例を対象にGardasil®接種後の血清HPV抗体価の検討を行った²⁴⁾。年齢は32歳から74歳、平均47.9歳であった。いずれの症例も複数回の手術歴があった。全例が我々の施設で手術を受け、手術検体からHPV-DNAが検出された。Gardasil®接種後の血清HPV抗体価研究^{22, 23)}と同様の方法で血清抗体価を測定した。測定方法はCompetitive Luminex-based Immunoassay²⁵⁾であった。

Gardasil®接種直前と初回接種7か月後の血清抗体価を比較した。注射前のHPV-6抗体価は13と21mMU/mLが各1例いたが、他はすべて最小限界値である11mMU/mL以下であった。HPV-11抗体価は1例が9mMU/mLであったが他はすべて最小限界値である8mMU/mL以下であった。接種後は全症例でHPV-6/11/16/18の抗体価が有意に上昇した²⁴⁾。Gardasil®接種前の血清抗体価は極めて低値であった。これは過去の報告^{22, 23)}と一致した。HPV感染ではHPV-DNAが抗原として認識されにくく、感染が粘膜局所に留まるために血清抗体価が低いことが報告されている²⁶⁾。我々の研究から26歳以降の男性においても抗体

価が上昇することが明らかになり、その値は女性群²²⁾や若年男性群²³⁾の抗体価と同じレベルであった(表2)。

5-3. Gardasil®接種後のHPV-DNA陰性化

Gardasil®接種を施行し抗体測定を行った12症例中1例は癌化し放射線治療を施行した。残りの11例についてGardasil®接種後12ヶ月の段階での喉頭粘膜中HPV-DNAについて検討したところ11例中8例で陰性化した²⁷⁾。その後Gardasil®接種症例は40例を超えたが、12ヶ月から69ヶ月間経過を追えた16例を対象にHPV-DNA陰性化について再度検討した²⁸⁾。16例中12例(75%)でHPV-DNA検査が陰性化した。Pintoら²⁹⁾は中年男性を対象にHPVワクチン接種後の唾液中HPV抗体を測定し、IgG抗体を検出したことを報告した。Schwartzら²¹⁾やPintoら²⁹⁾の報告から、ワクチン接種により生成されたHPV抗体は体液中に漏出すると推測できる。本検討でワクチン接種後にHPV-DNA検査が陰性化した例が多かったことから、喉頭粘液中にも抗体が存在する可能性が高い。

5-4. Gardasil®接種による再発抑制効果

Gardasil®接種中あるいは接種後に腫瘍切除術を施行した症例の乳頭腫再発率を検討した²⁸⁾。接種終了1年後の腫瘍消失率は10/16例(62.5%)であった。再発した6例中5例に対して再度手術を施行したところ1例ではその後の再発を認めなかった。16例中14例では36ヶ月以上経過を追えたが、11/14例では腫瘍再発はなかった。

6. 最後に

RLPは腫瘍性疾患であるが、感染性疾患でもある。腫瘍に対しては発声・呼吸・嚥下機能を温存する非侵襲的な手術を行うべきである。また、再発抑制のためには抗ウイルス治療を併用する必要がある。HPVワクチン他の効果が期待できる抗ウイルス治療を国内でも使用できる環境整備が求められる。

利益相反に該当する事項はない。

参 考 文 献

- 1) Makiyama K, Hirai R, Matsuzaki H et al. Assessment of human papilloma virus infection in adult laryngeal papilloma using a screening test. *J Voice* 27 : 230-235, 2013.
- 2) Matsuzaki H, Makiyama K, Suzuki H et al : Human papillomavirus infection status of various laryngeal diseases in Japan : A comprehensive study. *J Voice* 31 : 504. e35-504. e40, 2017.
- 3) Walboomers JM, Helmerhorst TJ et al : Relation of human papillomavirus status to cervical lesions and consequences for cervical-cancer screening : a prospective study. *Lancet* 354 : 20-25, 1999.
- 4) Clavel C, Masure M, Bory JP : Human papillomavirus testing in primary screening for the detection of high-grade cervical lesions : a study of 7932 women. *Br J Cancer* 84 : 1616-1623, 2001.
- 5) Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K et al : Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 82 : 524-531, 1991.
- 6) Onuki M, Matsumoto K, Satoh T et al : Human papillomavirus infections among Japanese women : age-related prevalence and type-specific risk for cervical cancer. *Cancer Sci.* 100 : 1312-1316, 2009.
- 7) Hirai R, Makiyama K, Higuti Y et al : Pharyngeal squamous cell papilloma in adult Japanese : comparison with laryngeal papilloma in clinical manifestations and HPV infection. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 269 : 2271-2276, 2012.
- 8) Andrei G, Snoeck R, Schols D et al : Induction of apoptosis by cidofovir in human papillomavirus (HPV) -positive cells. *Oncol Res* 12 : 397-408, 2000.
- 9) Fusconi M, Grasso M, Greco A et al : Recurrent respiratory papillomatosis by HPV: review of the literature and update on the use of cidofovir. *Acta Otolaryngol Ital* 34 : 375-381, 2014.
- 10) Maunsell R, Bellomo-Brandão MA : Pegylated interferon for treating severe recurrent respiratory papillomatosis in a child : case report. *Sao Paulo Med J* 136 : 376-381, 2017.
- 11) Rosen CA, Bryson PC : Indole-3-carbinol for recurrent respiratory papillomatosis : long-term results. *J.Voice* 18 : 248-253, 2004
- 12) Okubo K, Saito K, Fukuda H et al. Traditional Chinese medicine for treatment of laryngeal papillomatosis. *J Alternat Complement Med* 16 : 427-433, 2010.
- 13) Rahbar R, Vargas SO, Folkman J et al : Role of vascular endothelial growth factor-A in recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 114 : 289-295, 2005.
- 14) Mohr M, Schliemann C, Biermann C et al : Rapid response to systemic bevacizumab therapy in recurrent respiratory papillomatosis. *Oncol Lett* 8 : 1912-1918, 2014.
- 15) Sidell DR, Nassar M, Cotton RT et al. High-dose sublesional bevacizumab (avastin) for pediatric recurrent respiratory papillomatosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 123 : 214-215, 2014.
- 16) Best SR, Mohr M, Zur KB et al : Systemic bevacizumab for recurrent respiratory papillomatosis : A national survey. *Laryngoscope* 127 : 2225-2229, 2017.
- 17) Förster G, Boltze C, Seidel J : Juvenile laryngeal papillomatosis-immunisation with the polyvalent vaccine Gardasil. *Laryngo Rhino Otologie* 87 : 796-799, 2008.
- 18) Pawlita M, Gissmann L : Recurrent respiratory papillomatosis : Indication for HPV vaccination?. *Dtsch Med Wochenschr* 134 Suppl 2 : S100-102, 2009.
- 19) Maloney EM, Unger ER, Tucker RA et al : Longitudinal measures of human papillomavirus 6 and 11 viral loads and antibody response in children with recurrent respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132 : 711-715, 2006.
- 20) Chen BB, Zhao KN, Liu XS et al : The Detection and significance of human papilloma virus 11 b virus like particles and its serum antibody in juvenile larynx papilloma. *Zhonghua Er Bi Yan Hou* 38 : 417-420, 2003.
- 21) Schwarz TF, Spaczynski M, Schneider A et al : Immunogenicity and tolerability of an HPV-16/18 AS04-adjuvanted prophylactic cervical cancer vaccine in women aged 15-55 years. *Vaccine* 27 : 581-587, 2009.
- 22) Muñoz N, Manalastas R Jr, Pitisuttithum P et al : Safety, immunogenicity, and efficacy of quadrivalent human pPapillomavirus (types 6, 11, 16, 18) recombinant vaccine in women aged 24-45 years : a randomised, double-blind trial. *Lancet* 373 : 1949-1957, 2009.
- 23) Hillman RJ, Giuliano AR, Palefsky JM et al : Immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus (type 6/11/16/18) vaccine in males 16 to 26 years old. *Clin vaccine immunol* 19 : 261-267, 2012.
- 24) Makiyama K, Hirai R, Matsuzaki H : Gardasil® vaccination for recurrent laryngeal papillomatosis in adult men-First report : Changes in HPV antibody titer, *J Voice* 31 : 104-106, 2017.

- 25) Dias D, Van Doren J, Schlottmann S et al : Optimization and validation of a multiplexed luminex assay to quantify antibodies to neutralizing epitopes on human papillomaviruses 6, 11, 16, and 18. Clin Diagn Lab Immunol 12 : 959-969, 2005.
- 26) Fausch SC, Fahey LM, Da Silva DM et al : Human papillomavirus can escape immune recognition through langerhans cell phosphoinositide 3-kinase activation. J Immunol 174 : 7172-7178, 2005.
- 27) Hirai R, Makiyama K, Matsuzaki H et al : Gardasil vaccination for recurrent laryngeal papillomatosis in adult men. Second report : Negative conversion of HPV in laryngeal secretions. J Voice 2017 Aug 30. pii : S0892-1997 30139-X.doi : 10.1016/j.jvoice. 2017. 07.017.
- 28) Matsuzaki H, Makiyama K, Hirai R et al : Multi-year effect of human papillomavirus vaccination on recurrent respiratory papillomatosis. Laryngoscope. 2019 Apr 8. doi : 10.1002/lary.27993.
- 29) Pinto LA, Kemp TJ, Torres BN et al : Quadrivalent human pPapillomavirus (HPV) vaccine induces HPV-specific antibodies in the oral cavity : Results from the mid-adult male vaccine trial. J Infect Dis 214 : 1276-1283, 2016.

別刷請求先 〒101-8309 東京都千代田区神田駿河台1-6
日本大学病院耳鼻咽喉科 牧山 清