

## HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 6 DNA INFECTION IN ADULT LARYNGEAL PAPILLOMA

Rinya Sugita, Tohru Ogiwara

Katsuhiko Fukamoto, Kouki Nakaigawa

Dept. of Oto-rhinolaryngology, Juntendo Urayasu Hospital, Juntendo University School of Medicine

Kazuhiko Ishi

Dept. of Clinical laboratory, Juntendo Urayasu Hospital, Juntendo University School of Medicine

Tissues from patients with adult-onset type laryngeal papilloma were examined for the presence of human papillomavirus (HPV).

The presence of HPV DNA was determined by in situ hybridization with biotin-

labelled HPV DNA probes and by dot blot hybridization with <sup>32</sup>p-labelled HPV DNA probes.

Two cases of adult-onset type laryngeal papilloma were positive for HPV 6.

## 成人喉頭乳頭腫とヒトパピローマウイルス6型感染

杉田 麟也 荻原 徹  
深本 克彦 中井川 弘毅

順天堂大学医学部附属順天堂浦安病院耳鼻咽喉科

石 和久  
中央検査室

### はじめに

喉頭に発生する良性腫瘍のうちで、喉頭乳頭腫は比較的よく経験する疾患の1つである。その原因については、1923年のUllmann<sup>1)</sup>の古典的に実験以来、きわめて近年まで確固たる証拠がないままにウイルス感染によってひ

きおこされるとされてきた。

近年の遺伝子工学技術の進歩はめざましいものがありウイルスの証明も可能となってきた。現在その同定は臨床材料からhuman papilloma virus (HPV) ゲノムDNAの分離によって行われている。

著者らは, in situ hybridization法Dot blot hybridization法およびSouthern blot hybridization法を使用して成人多発型喉頭乳頭腫の2例の組織中にHPV-DNAを検出することが出来たので報告する。

研究方法

1988年10月から1990年9月末までに当科でラリングマイクروسージャリーあるいは喉頭裁開術下に摘出した喉頭乳頭腫3例である。摘出した組織は固定せずにただちに中検病理部門へ提出した。組織の一部はHE染色による組織診断およびin situ hybridization法に使用, 残りは-80℃に保存しその後Dot blot法を実施した。

In situ hybridizationの手技はTable 1 に示した。このさいのHPV-DNA Probeはビチ

オンで標識してあるものを使用した (Vira Type<sup>TH</sup>® in situ, トーレ)。Probeは陽性コントロール, 陰性コントロール, HPV DNA 6および11型をふくむプローベ, 16型と18型, 31, 33および35型をふくむプローブの5本である (Fig 1)。

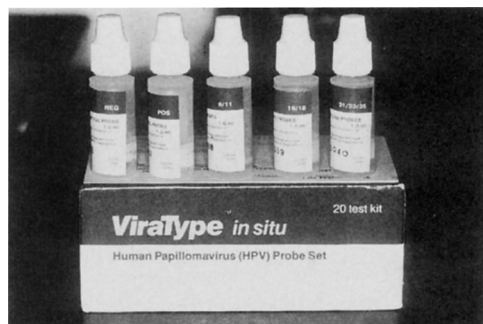


Fig 1 In situ hybridization に使用したプローブ

In situ hybridizationでHPVが陽性の場合, -80℃に保存した標本を使用してSRLにてDot blot hybridizationとSouthern blot hybridizationをおこないHPVのTypeを決定した。Dot blot hybridizationなどの手技をTable 2 に示した。

1 前処理

- a. 切片スライドのベーク
- b. 脱パラフィン
- c. 脱キシレン
- d. 風乾
- e. 消化液反応
- f. TBS洗浄
- g. 脱水
- h. 風乾

2 ハイブリダイゼーション

- a. HPV probe滴下
- b. カバーガラスをかける
- c. heating処理
- d. 湿潤箱にて反応
- e. カバーガラスをはずし, probeを洗う
- f. TBS洗浄

3. 同定

- a. 組織のまわりをふきとる
- b. Detection solution滴下
- c. 湿潤箱にて反応
- d. 基質液反応
- e. 蒸留水洗浄

4. 後処理

- a. 後染 NFR
- b. 蒸留水洗浄
- c. 脱水……透徹……封入

Table 1 In situ hybridization 法

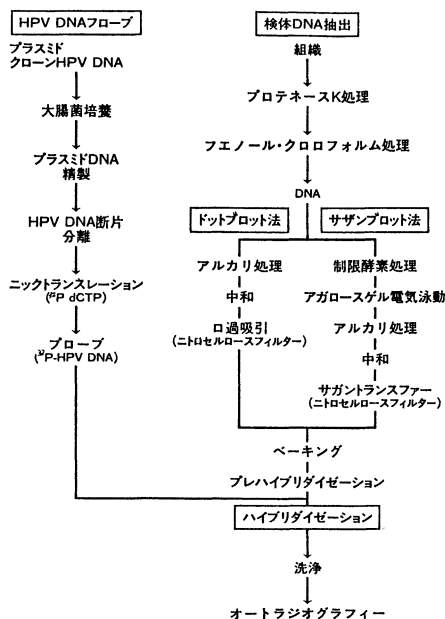


Table 2 DNA Hybrid法の実験行程

### 結 果

症例1は73歳男性，右声帯乳頭腫症例は，

症例	年齢	発症年齢	喫煙有・無	病変部位	治 療	HPV-DNA
A.O	73	73	有	右声帯	1. ラリngoマイクロサージェリー 2. 喉頭鏡開術	陰 性
A.N	56	55	有	両側声帯前交連	ラリngoマイクロサージェリー	陽 性 (6 型)
S.K	24	23	有 18歳より	両側声帯前交連 浸潤性	ラリngoマイクロサージェリー	陽 性 (6 型)

Table 3 HPVを検索した成人喉頭乳頭腫症例多発型の2例でHPV-6型を検出した

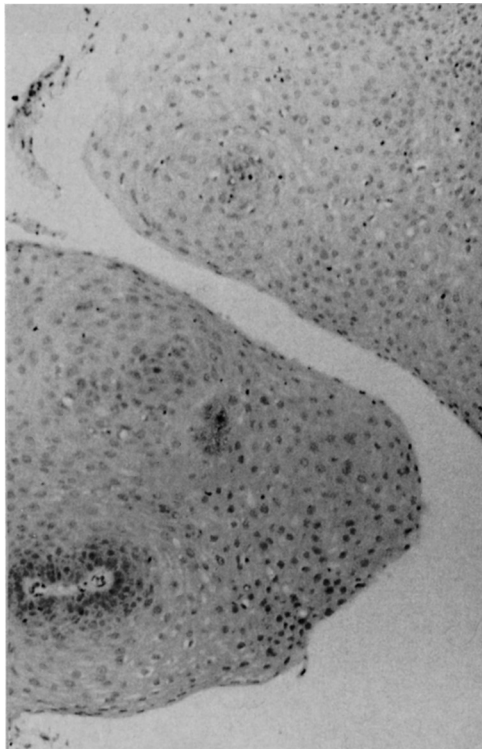
In situ hybridization法にて陰性であった。症例2、3はともに男性で両側声帯と前交連の乳頭腫で，病理学的にkoilocytosisを認め，In situ hybridizationでHPV-DNA 6型又は

11型のシグナル陽性であった。SRLで実験したSouthern blot hybridizationはそれぞれ6型であった。

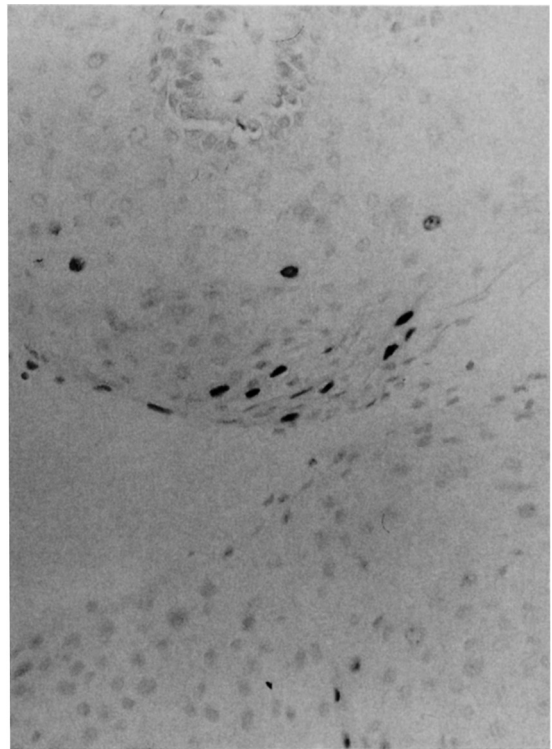
### 考 察

喉頭乳頭腫はjuvenile-onset-typeとadult-onset-typeに分類されている。喉頭乳頭腫の発生は，1歳以下で全体の12~16%，5歳以下で31~51%と5歳以下の子供に発生することが多く，残りの大半が20歳以後の発症である (Fig 4) <sup>2)</sup>。

喉頭乳頭腫がウイルスによる疾患であるという推定は古くからなされており，また尖圭コンジローマを合併した妊婦から，経膈分娩で生まれた子供に発生頻度が高いといわれて



H・E×100



In situ hybridization法×250

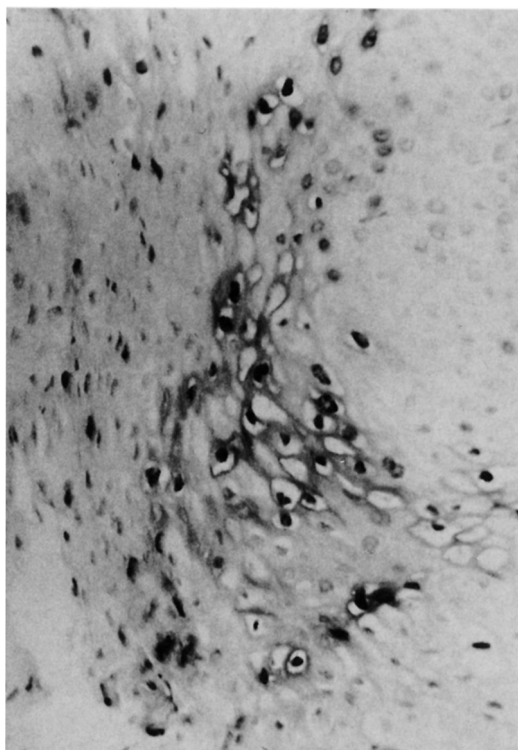
Fig 2. 症例1のH・EとIn situ hybridization法

左図のH・Eでは，肥厚増生した扁平上皮の表層から中層にかけての細胞はkoilocytosisを示す

右図のIn situ hybridization法で，koilocytosisを示す細胞の核内に黒紫色のHPV-DNA陽性像がみられる (type 6/11) .



H・E×100



In situ hybridization法×250

Fig 3. 症例2のH・EとIn situ hybridization法

左図のH・Eでは、表層から中層にかけての細胞はkoilocytosisを示す

右図のIn situ hybridizationでは、koilocytosisを示す細胞の核内に黒紫色のHPV-DNA陽性像がみられる (type 6 / 11) .

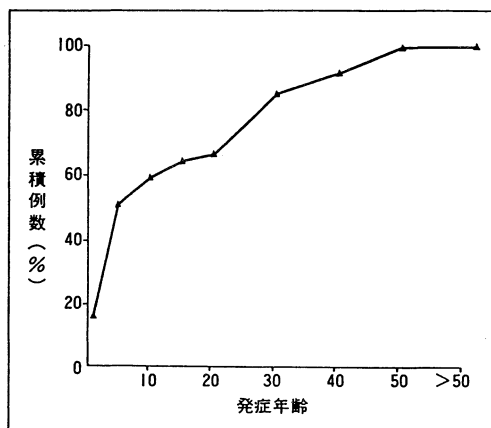


Fig 4 喉頭乳頭腫の年齢別発生累積頻度  
5歳以下と20歳台での発症が多い  
(文献2より引用)

いたが、1973年に組織中のウイルス粒子が証明され<sup>3)</sup>、その後1982年このウイルスが尖圭コンジローマの原因であるHPV-6<sup>4)</sup>、HPV-4<sup>5,6)</sup>であることが判明し、juvenile onset typeの喉頭乳頭腫が、尖圭コンジローマ合併妊娠の産道における、HPVの垂直感染が原因となって発症することが強く示唆されるようになった。

Shah<sup>7)</sup>らのよれば、全妊婦における尖圭コンジローマの罹患率が1.5%であるのに対して、juvenile-onsetの喉頭乳頭腫罹患児109名の母親のうち60名(55%)に、尖圭コンジローマの既往歴があったこと、また今日、米国では帝王切開率が20%におよんでいるのに対し、罹患児109名中、帝王切開例は1例しか存在

しなかったことなどが報告されている。juvenile onset typeの喉頭乳頭腫が尖圭コンジローマ合併妊婦の産道での垂直感染の裏づけとなる成績である。

一方、adult-onset-typeとHPV感染経路は検討中であるが、juvenile-onset-typeと同型のHPVを検出したとする報告も少なくない。すなわち、Mountsら(1982)<sup>4)</sup> Steinberg(1983)ら<sup>8)</sup>はSouthern blottingによってHPVを検出している。わが国でもNakajimaら(1985)<sup>9)</sup>はadult-onset typeの12例中3例にpapilloma virus genus specific common antigenを検出、その3例はいずれも多発型乳頭腫であった。Tsutsumiら(1989)<sup>10)</sup>もin situ hybridization法で多発型の8例中6例にHPV-11型を検出し、単発型は11例中の全例で陰性であった。筆者らはin situ hybridization法、Dot blot法Southern blot法を併用し多発型2例にHPV-6型を検出した。

adult onset typeからもjuvenile onset typeと同じ型のHPVが検出される原因として、adult onset typeも垂直感染により潜伏していたウイルスの活動が、喫煙その他の刺激により促進された結果発症するのではないか、という推察もなされている。筆者らは、20歳台での発症率が高いことにもとづきoral sexによる水平感染の可能性も考えている。

単発型はHPV陰性の報告が少なくないが、未知のHPV型の可能性もある。

ウイルスの検査法として使用されているDNA診断法について述べる。DNA診断法は分子ハイブリダイゼーションの原理に基づいている。すなわち2本鎖DNAは2本の相補的なポリヌクレオチド鎖で構成されているが、加熱処理やPH条件を変えることにより、容易に変性(denature)させることができる。変性すると2本鎖DNAは解離するが可逆的で至的条件下(温度・イオン強度・PH調整)で再結合し安定な2本DNA複合体、すなわ

ちハイブリッドを形成する。この再結合反応は比較的特異的で解離した2本鎖のポレヌクレオチド鎖がお互いに相補的な場合にのみ生ずる。この原理を応用したのが核酸ハイブリダイゼーション技術である。<sup>11)</sup>

感染症に対するDNA診断法は主にDot blot法とIn situ hybridization法であり、このほかSouthern blot法およびNorthern blot法がある。

DNA診断法においてDNAプローブは大量に精製することができ、しかも安定の状態を得られ、モノクローナル抗体を作製するよりも経費が安い。したがってこわれたり変性しやすい蛋白質抗原に比べて核酸ハイブリダイゼーション法を用いれば、かなり分解したゲノム(50ヌクレオチド程度)でも検出可能である。唯一の欠点は、現在アイソトープ標識プローブが広く使用されていることである。しかしこれも今後は、酸素標識のプローブに変わっていくものと思われる。このたび筆者らが使用したIn situ hybridization(Vira type,<sup>®</sup> 東レ)のプローブの標識は酵素のビオチンであり、Dot blot法(Vira pap<sup>®</sup>, トーレ)は<sup>32</sup>Pを使用している。

HPV-DNAの主な測定方法について述べるが、それぞれの長所、短所はTable 4のごとくである<sup>12)</sup>。

	Dot blot法	In situ hybridization法	Southern blot法
利点	1. 測定操作が簡易であり操作時間が短い 2. 少量検体の処理が可能 3. 少量の細胞数または組織で測定可能(10 <sup>3</sup> 以上または1pg DNA)	1. 測定操作が簡易であり操作時間が短い 2. 病理組織像と対比でき局在が明確(特に酸素標識の場合)	1. ウイルスの型別が可能 2. 検出感度がよい
欠点	1. ウイルス型別検査が不可能 2. 組織形態像がみられない	1. 検出感度が低い	1. 測定操作が煩雑で操作に長時間要する 2. 組織形態像がみられない

Table 4 DNA診断法、主な測定法の特徴 (2)より引用

### 1. In situ hybridization法

本法にはいくつかの方法があるが、通常はパラフィンブロックからの組織を用いて標的

DANの検索を行う。したがって検索DNAの組織像を損うことなく、感染細胞の形態的特徴、さらに細胞および組織中での局在を知ることができる。本法の陽性率はDot blot法などと比較すると低く、約50%である。したがって本法で陰性であってもウイルスが存在しないことにはならない。筆者らが使用したvira type<sup>®</sup>は米国で市販されており、本邦では研究用に使用が認められている。このプローブが婦人科領域で使用されているものであり、今後は耳鼻咽喉科向のプローブの種類を増加させる必要がある。

2. Dot blot法：検体DNAを抽出してニトロセルロースフィルター上に固定し、それを標識ハイブリダイゼーションプローブで検出する方法である。この方法は一般に他の測定法にくらべて反応体系がしっかりしている。本法は極めて感度がよく大量のサンプルを迅速にスクリーニングするという利点がある反面、ウイルス属内の特異性を判定するのが困難であるという欠点もある。

3. Southern blot法：ウイルスの型別や血清学的に区別不能なウイルス株間の鑑別の際に用いる。実際には高分子DNAを制限酵素で切断し、電気泳動により分画してからさらに固相マトリックスにトランスファしてDNAプローブとハイブリダイズさせるので感度は高いが迅速性の点で問題である。

#### ま と め

Human papilloma virus (HPV)を検出した成人多発型咽頭腫の2例を報告した。症例はそれぞれ24歳、56歳に発症した男性であった。HPVの測定はIn situ hybridization法 (Vira type<sup>®</sup>, 東レ), Dot blot hybridization法 (Vira pap<sup>®</sup>) およびSouthern blot hybridization法を用いた。Vira typeでは6型と11型が陽性でありSouthern blot法ではHPV-6型を検出した。成人発症型喉頭乳頭腫の成果経路として産道での垂直感染やoral

sexによる水平感染がうたがわれる。

#### 文 献

1. Ullmann E B: On the aetiology of the laryngeal papilloma. *Acta Otolaryngol* 5: 317-334. 1923
2. Morgan A H, Zitsch R P: Recurrent papillomatosis in children. *Ear Nose Throat Journal* 69: 403-410, 1986
3. Boyle W F, et al: Electron microscopic identification of papova virus in laryngeal papilloma. *Laryngoscope* 83: 1102. 1973
4. Mounts P, Shah k, Kashima H: Viral etiology of juvenile and adult-onset squamous papilloma of the larynx. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 5425-5429, 1982
5. Gissman L, Diehl V, Schultz-Coulon H J, et al: Molecular cloning and characterization of HPV-DNA derived from a laryngeal papilloma. *J Virol* 44: 393-400, 1982
6. Gissman L, Wolnik L, Ikenberg H, et al: Human papilloma virus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papilloma and in some cervical cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 560-563, 1983
7. Shah K, et al: Rarity of cesarean delivery in cases of juvenile-onset respiratory papillomatosis. *Obstet Gynecol* 68: 795-799, 1986
8. Steinberg B M, Topp W C, Scheneider P S, et al: Laryngeal papilloma virus infection during clinical remission. *N Engl J Med* 308: 1261-1264, 1983
9. Nakajima T, Tsumuray M, Morinaga

- S, et al : Papillomavirus infection among Japanese ; An immuno-histochemical study for papillomavirus genus-specific antigen in human surface epithelial lesions.  
Jpn J Cancer Rec (Gann) 76 : 508-516, 1985
10. Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M, et al : In situ Hybridization and Immunohistochemical Study of Human Papillomavirus Infection in Adult Laryngeal Papillomas.  
Laryngoscope 99 : 80-85, 1985
11. 高橋豊三 : DNAプローブを用いた感染症の診断法—理論, 方法と利点. 日本臨床1989増刊 (DNA診断) 737-754, 1989
12. 石 和久 他 : ヒトパピローマ ウイルス (HPV). 日本臨床1990増刊 (検査と技術), 18 ; 166-167, 1990

---

#### 質 疑 応 答

質問 雲井健雄 (兵庫医大)

症例1ではHPVは陰性であったとのことですが、その後に照射療法を追加された理由を教えてください。

応答 杉田麟也 (順大浦安)

病理組織学的にlow malignancyとした方がよい症例という結果を得たので照射しました。