

陰上皮内腫瘍の臨床的および
ウイルス学的検討

菅生元麿

腔上皮内腫瘍の臨床的および
ウイルス学的検討

菅生元康

目次

1. はじめに
2. 研究方法
 - (1) 対象症例
 - (2) 追跡調査
 - (3) 病理組織学および免疫組織学的診断
 - (4) HPV DNAの検出と型判定
 - (5) 未同定HPVのクローニング
3. 研究成績
 - (1) VAINの臨床的病理学的検討
 - 1) 臨床的事項および病型分類
 - 2) コルポスコープ所見
 - 3) 腔病変の局在
 - 4) 組織所見
 - 5) 免疫組織染色所見
 - 6) 追跡調査結果
 - (2) HPV DNAの解析
 - 1) HPVの検出頻度、種類および未同定HPV型のクローニング
 - 2) 合併頸癌・CINのHPV検出結果との対比
 - 3) HPV検出による追跡調査
4. 考察
 - (1) VAINの臨床的病理学的検討
 - 1) 臨床的事項および病型分類
 - 2) コルポスコープ診断と病変の局在
 - 3) 病理組織学的所見
 - 4) 追跡調査結果
 - (2) HPV DNAの同定
 - 1) VAINに検出されるHPV型
 - 2) 新たなHPV型の発見
5. まとめ
6. 文献
7. 図・表一覧
8. 図・表

1. はじめに

婦人科で扱う悪性腫瘍の代表的疾患である子宮頸癌は疫学的観点から性感染症 (sexually transmitted diseases, STD) がその発生に関与しているものと古くから考えられていた^{1, 3)}。ウイルス学的には1960年代後半に性器ヘルペスの原因ウイルスである単純疱疹ウイルス (herpes simplex virus, HSV) 2型と子宮頸癌との関連性が注目され、血清疫学を中心に多くの研究が行われた^{4, 5)}。一方、1976年にそれまで全く認識されていなかったヒトパピローマウイルス (human papillomavirus, HPV) 感染の細胞変化が子宮頸癌の前癌病変である子宮頸部上皮内腫瘍 (cervical intraepithelial neoplasia: CIN) の細胞内に存在するということをカナダの細胞病理学者である Meisels らが初めて指摘した⁶⁾。それらは免疫組織化学や電子顕微鏡によるウイルス粒子の確認などの方法により順次裏付けられていったが^{7, 8)}、1983年以後、ドイツの zur Hausen を中心とした研究グループにより子宮頸癌の組織内から HPV DNA が相次いでクローニングされるにおよび^{9, 10)}、HSV に代わり HPV が子宮頸癌の病因として一躍注目を集め多くの研究が開始されることとなった。現在では大多数の CIN や子宮頸癌組織 から HPV DNA が検出され、それらの発生に HPV が深く関与していることは多くの研究者により広く認められるに至っている。

HPV と STD との関連性については性器に発生する疣贅疾患である尖圭コンジローマがウイルス性 STD であろうと推論した1954年の米国軍医の Barrett らの疫学研究が最初で¹¹⁾、それは尖圭コンジローマ組織内におけるパピローマウイルス粒子の電子顕微鏡による観察というイギリスの性病学者である Oriel らの研究に引き継がれた¹²⁾。そして前出のドイツの研究グループの一員である

de Villiers らがHPV6型を尖圭コンジローマ組織内からクローニングすることに1981年に成功しHPVがSTDである尖圭コンジローマの原因ウイルスであることが確定した¹³⁾。その後尖圭コンジローマを含めて子宮頸癌やその前癌病変から見出されたHPVは口腔粘膜や肛門周囲粘膜などの例外を除いて、もっぱら性器皮膚・粘膜に同定されることから性器型HPVとして一括されるようになり、その感染様式は原則とし性行為感染が主体と考えられるようになった¹⁴⁾。

子宮頸癌と同様の自然史を持つと考えられている陰癌については¹⁵⁻¹⁸⁾、その前癌病変である陰上皮内腫瘍 (vaginal intraepithelial neoplasia, VAIN)を含めてその病因の解明を目的とした研究は現在まで極めて少ない。それは陰癌が女性性器癌に占める割合が2%前後と希で、まとまった症例が集めにくいことや¹⁹⁾、以前から子宮頸癌の発生母地と考えられていた腺扁平上皮境界 (squamo-columnar junction) のような部位が陰にはないことからVAINを含めた陰腫瘍の発生が少ないものとの考え方が支配的であったためと思われる²⁰⁾。特にVAINについては本邦でVAINに関するまとまった報告は全く見あたらず国際的に検索しても決して多いとはいえない。しかし私は子宮頸癌およびCINとHPVとの関連性を研究する過程で、VAINについては必ずしも少なくはないのではないかという疑問をもった²¹⁾。

子宮頸癌やCINを診断する場合には子宮癌検診として子宮腔部細胞診検査が先行して行われることが通例であり、細胞診異常を主訴として患者が二次検診のために来院する。多くの症例では二次検診の結果としてCINなどの子宮頸部異常が診断されることになるが、しばしば子宮癌検診の細胞異常が認められるにも関わらず子宮頸部に陰拡大鏡 (コルポスコープ) による観察を併用しても異常が認められない症例に遭遇することがある。私はそのような患者について陰壁

をコルポスコープを用いて注意深い観察を行うことにより子宮頸部のコルポスコープ異常所見と同様の白色上皮 (acetowhite epithelium, W) や赤点斑 (punctuation, P)^{22,23)}などが認められる症例があることに気がついた。そのために子宮頸部とは別に腔壁上部擦過細胞診の採取もルチーンに行うようにした。その結果、すでに子宮全摘手術がなされており子宮頸部がない患者の腔細胞異常例はもとより、CINが存在する場合でも腔壁にも異常所見のある症例が確認された。それらの組織を病理学的に診断したところ子宮頸部と同様の上皮内腫瘍病変と、HPV感染の組織学的特徴とされる koilocytotic atypia⁶⁾ を大多数の症例が伴っていた²¹⁾。

それらの経験を基にして私はVAIN患者を出来るだけ多く診断し、それら症例からの臨床情報の収集に努めた。さらに症例の腔病変部から採取した生検組織を用いて病理学およびウイルス学的研究を行った。その結果、従来臨床的にほとんど認識されていなかったVAINの病態や病因として多種類のHPV感染が関連することなどを明らかにすることができた。

2. 研究方法

(1) 対象症例

VAIN 病変は①婦人科悪性腫瘍や良性腫瘍で子宮全摘手術を受けた患者のうち腔細胞診の結果からVAINが疑われた症例、②子宮腔部細胞診で上皮内腫瘍が疑われたものの子宮頸部のコルボスコブ診（コルボ診）で特に異常所見が認められなかった症例、③子宮頸部と腔壁細胞診の分別収集例で腔細胞診検体に上皮内腫瘍細胞がより多く含まれている症例、の3者について重点的にコルボスコブを用いた腔壁の観察を行い診断した。VAINのコルボ診は5%酢酸水溶液で十分に腔壁を湿潤させ、出来るだけ大きな腔鏡を用いて時間をかけて行った。子宮腔部が観察の障害になるときは長挿子や酢酸加工用の綿棒で子宮頸部を動かしながら腔円蓋部を観察した。コルボ診によって腔壁に子宮頸部におけるCINの所見と同様の白色上皮、赤点斑、モザイク (mosaic) の所見があった場合にはコルボスコブ下狙い生検を行い組織診断を行った上でVAINの診断を確定することとした。白色上皮所見は扁平型白色上皮 (Wf) と微小乳頭型白色上皮 (WP) に亜分類した。なお本研究では組織診断と組織内のウイルス診断の両者を行うために病変の直径がおおむね5mm・10mm以上（複数ある場合には合計）ある症例を対象症例とし、微小な病変のため両者の解析が不可能であった症例は対象症例から除外した。

以上のような診断法により1990年1月から1995年12月までに長野赤十字病院産婦人科の外来患者の中で71例が本研究の対象症例となった。

(2) 追跡調査

VAIN診断症例は患者の同意を得たうえで最低1年以上出来る限り長く経過を観察することにした。患者の診察間隔は3ヶ月から6ヶ月とし観察方法は細胞診およびコルポ診を併用し、もし病変が確認された場合にはコルポスコープ下狙い生検により組織を採取し病理診断およびHPV診断を行うことを原則とした。病変の変化は消退、存続、進行に分類した。消退は細胞診およびコルポ診で異常が認められなくなった場合、存続は細胞診・組織診またはコルポ診で異常が認められ異型度が同等程度の場合(VAIN I、IIがそれぞれVAIN II、IIIに変化した、またはその逆も存続とした)、進行はVAIN IがVAIN IIIに変化した、またはVAINが浸潤癌になった場合とした。なお患者の都合などにより途中で経過観察が不可能となった症例は、最終診察時の細胞診およびコルポ診、または組織診の結果がVAIN以上であった場合は存続例か進行例、異常所見が認められない場合は消退例に、それぞれ含めることとした。明らかな進行例と診断された時には観察を終了し、速やかにレーザー蒸散法、腔内照射(アフターローディング)、陰壁切除、広汎性子宮全摘術などの治療に移行することとした。

(3) 病理組織学および免疫組織学的診断

採取された材料は生食内で眼科用クーバーによりそれぞれを2分割し、その一方は組織診断と免疫組織診断用とするために10%中性ホルマリン液で固定した。他の組織はHPVDNA検索用として速やかに -80°C 以下でdeep freezerに凍結保存した。

VAIN分類はCINに準じて行い²⁴⁾、VAIN Iは軽度異形成、

VAIN II は中等度異形成、VAIN III は高度異形成および上皮内癌とした。また koilocytotic atypia が上皮上層に存在するものの基底細胞・傍基底細胞層の細胞異型が弱い非隆起病変 (flat lesions) は VAIN I に分類した。なお koilocytosis が組織異型の主体である乳頭状隆起病変 (exophytic papillary lesions) は尖圭コンジローマとして今回の研究対象からは除外した²⁵⁾。

ホルマリン固定パラフィン切片は組織診断用のヘマトキシリン・エオジン染色のほか抗HPV抗体を用いた免疫組織化学染色によるHPV抗原の組織内同定を行った。用いた抗体は岩崎らが足底疣贅 (myrmecia) から精製したHPV1粒子を抗原として開発した抗HPVモノクローナル抗体を用いABC法によって行った²¹⁾。免疫染色は薄切標本を脱パラフィン後、過酸化水素-メタノールで内因性ペルオキシダーゼを阻止し抗HPVモノクローナル抗体 (一次抗体) を4℃でover nightで反応させ、その後ビオチン化抗マウスIgG抗体 (二次抗体) とアビジン・ビオチン溶液をおのおの反応させたのち diaminobenzidine (DAB)・H₂O₂ 溶液を用いて発色させた。核染色にはメチルグリーンまたはヘマトキシリンを用いた。

(4) HPV DNA の検出と型判定

凍結生検標本から抽出したDNAを検体として松倉と私が開発し1995年に報告した3種類の制限酵素処理を特徴とするプロットハイブリダイゼーション法であるPBM-58法によって行った²⁶⁾。すなわち抽出DNA (0.1-0.5 μg) をあらかじめ制限酵素 PstI, BanI, MspI でそれぞれ処理し、それらを1%アガロースゲル内で電気泳動を行う。電気泳動後ニトロセルロースフィルターにDNAをサザントランスファーし、フィルター上で³²P標識のHPV58D

NAとハイブリダイゼーションする。ハイブリダイゼーションの条件はlow stringent condition ($T_m = -40^\circ\text{C}$, 20% formamide)で行い、ハイブリダイゼーション後X線フィルムに感光させた。型判定はオートラジオグラフィ像の3種類の制限酵素のそれぞれの切断パターンを既知のHPV型のものと同様に照合して診断した。本法をPBM-58法と称することとした(表1-2、図1-2)。

(5) 未同定HPVDNAのクローニング

PBM-58法でHPV58型とハイブリダイズする約8 kilobase(kb)の長さのDNAで、しかも既知のHPV型と異なるオートラジオグラフィ切断パターンを示すDNAについては1990年に松倉と私が子宮頸部浸潤癌(大細胞非角化型扁平上皮癌)からHPV58型のクローニングを行った際の方法に則ってクローニングを行った²⁷⁾。まず検体DNAを種々の制限酵素で処理し環状二本鎖DNAを一カ所で切断する制限酵素を特定する。特定されたら、その酵素処理されたDNAをアガロース電気泳動して約8kbのDNAを回収し、あらかじめ同じ酵素で処理したプラスミドDNAとライゲースにより連結する。連結DNAを細菌に導入し抗生物質を含むアガープレートで培養しコロニーを形成させプラスミドDNAを分離精製する。精製されたプラスミドDNAを種々の制限酵素で処理し、ハイブリダイゼーションによって検体と同一の切断パターンを示すプラスミドクローンを選出し、塩基配列の決定する。新たなHPV型か否かは国際HPV分類委員会(Heidelberg, Germany)に照会した。

3. 研究成績

(1) VAINの臨床的病理学的検討

1) 臨床的事項および病型分類

71例の年齢構成は17才から69才までで平均43才であった。10代2例、20代17例、30代11例、40代13例、50代17例、60代11例と20代から60代まで比較的均等に分布した(表3)。71名のVAIN症例を子宮の存在と子宮頸部病変の有無から3群に分類することができた(表3-4)。A群は陰病変の診断時点ですでに子宮全摘術を受けており子宮頸部が存在しなかった15例(子宮全摘既往例)で、子宮全摘術の適応は子宮頸部浸潤癌6例(そのうち3例は術後放射線照射を受けている)、CIN III(上皮内癌)2例、子宮内膜癌3例、および子宮筋腫4例であった。B群はCINを合併した12例(CIN合併例)でそのうち8例はVAINと同時にCINが存在し、3例は以前にCINと診断されVAIN診断時点にはCINが消失しており、1例はCINIの経過観察例で途中からVAINを合併した。C群はVAIN診断時点で子宮頸部は正常でCINの既往もなくVAINのみが存在した患者で44例(de novo例)と最も多かった。A、B、C群の症例の平均年齢はそれぞれ49才、34才、43才であり統計学的にはA、B群間にのみ有意差があり(Tukey型多重比較、 $0.01 < P < 0.05$) B群のほうが若かった。なおB群のうちの2例はSLEのためプレドニンを継続して内服していた。またB群の2例とC群の1例は妊娠を合併していた。

2) コルポスコープ所見

5%酢酸加工によるコルポスコープで最も多い所見は扁平型白色上皮(Wf)で34例(48%)で、26例(37%)は微小乳頭型白色上

皮(WP)、11例(15%)は赤点斑所見(P)を示した(表5、図3-5)。一方、子宮頸部異常で白色上皮、赤点斑とともにしばしば観察されるモザイクが今回の症例の中には1例も存在しなかった点と、CINではしばしば見られるWP、Wf、Pの併存が見られずすべて単一の所見であったことが特徴的であった。

3) 腔病変の局在

すべての症例で病変部が腔の上1/3に存在し13例については中1/3にも及んでいた(表5)。71例中26例は観察した限り病変は単発であったが、残りの45例は2カ所以上の病変が存在し最大10カ所までで平均2.5カ所であった。

4) 組織所見

病理組織学的には71例中53例(75%)がVAIN I、15例(21%)がVAIN II、残りの3例(4%)がVAIN IIIであった(表4-5)。VAIN IIIはすべてC群にみられたがこの群の例数が多かったためと思われる。VAIN Iの53例のうち31例(58%)はkoilocytosisが顕著であるものの基底細胞の増殖はほとんどないか軽度であった。

5) 免疫組織染色所見

免疫染色結果ではHPV抗原が陽性であったのは71例中59例(83%)であった。免疫染色では上皮上層のkoilocytotic atypiaを示す細胞の核のみが染色され同部位にHPV抗原が発現しておりウイルス粒子が産生されているものと推定された(表4-5、図3-10)。抗原陽性率は組織の異型度が上昇するほど低下する(VAIN I: 92%、VAIN II: 60%、VAIN III: 33%)傾向にあった。

6) 追跡調査結果

71症例中56例については1年から6年まで(平均3.8年)経過を観察することが出来た(表6)。56例中2例についてはそれぞれ1年後に1例はCINを、1例が外陰尖圭コンジローマを発症した(いずれ

もC群)。56例中43例(77%)は細胞診およびコロポ診上異常所見が認められなくなり消退例と判断した。43例のうち33例は初診後12ヶ月以内に消退したが、10例は31ヶ月から50ヶ月(平均39ヶ月)病変が存続したのちに消退した。存続例は13例(VAIN I; 11例、VIAN II; 2例)で、観察期間は16ヶ月から72ヶ月まで平均46ヶ月であった。特にSLEのためにプレドニンを内服している2症例では病変の消退傾向が全く認められなかった。なお本研究期間中に進行例は1例も存在しなかった。

(2) HPV DNAの解析

1) HPVの検出頻度、種類および未同定HPV型のクローニング

71例すべての病変部組織からPBM-58法により単一のHPV DNAが同定された(表7)。また当初、未同定であったHPV DNAが少なくとも7種類以上存在するものと思われた。それらDNAをクローニングしHPV国際分類委員会に照会したところ、そのうちのクローンX-478(症例30)、X-548(症例3)、X-590(症例35)、X-600(症例5)、X-783(症例7)、X-1043(症例54)、X-987(症例2)はいずれも既知のHPVとは異なる新しいHPV型と認定され、それぞれHPV59、61、62、64、67、69、71型と命名された。これらの症例の背景、組織像、HPV抗原検出を図に示した(図4-10)。さらにそれら以外にも複数の未同定のHPV型(HPV-X)が存在するものと推定された。HPV型としては既知の15型(HPV16、18、30、31、35、40、42、43、51、52、53、54、56、58、66型)を含めて22型が検出された。比較的多く検出されたHPV型としては16型(7例)、58型(6例)、51型(5例)、62型(5例)、67型(5例)などであっ

た。また16型、51型、58型、64型、67型などは異型の程度の高い病変に検出される傾向にあった。一方、42型、59型、62型は異型の弱いVAIN Iにのみ検出された。

2) 合併頸癌・CINのHPV検出結果との対比

A群の子宮頸部浸潤癌既往例6例のうち5例の頸癌検体と、CIN合併7例の組織が凍結保存されておりPBM-58法で解析することが可能であった。その結果、頸癌5例中3例とCIN7例中6例(1例がA群、4例がB群でそのうち2例は同時合併、2例はCIN既往、残りの1例がC群でVAIN診断後にCIN発生)でPBM-58法によりHPVDNAが同定された。それらと各々のVAINに検出されたHPV型との組み合わせは頸部浸潤癌既往例では癌とVAINに存在するHPV型が全て異なっていた(表8)。一方、CIN合併例では6例中5例は同一のHPV型(16型、56型、31型、58型、59型)であったがA群の1例が異なりCINがHPV16型、VAINがHPV-Xであった。

3) HPV検出による追跡調査

経過観察症例のなかで2回以上凍結組織検体が採取されPBM-58法によりHPV解析が可能であった症例が10例あった。10例中5例は一連の検査で同一のHPV型が検出されたが5例については初診時と再診時の検査において異なったHPV型が検出された(表9)。

4. 考察

(1) VAINの臨床的病理学的検討

1) 臨床的事項および病型分類

VAINは現在までに報告されている文献では、一般的にCINに比べて希で比較的高齢者に発生しCINや子宮頸癌などを同時または異時性に合併することが多いとされていた^{17,18,28,31)}。しかし本研究では17才から69才までで年齢的にほぼ均一に分布し、平均年齢が43才と比較的若い患者が多いこと、子宮頸部がある症例でもCINが認められずVAINのみが存在する例が主体であること、および組織異型度の低い症例が多数を占めていることを明らかにした。

現在までの報告のなかで対象症例数の最も多いのはAudet-Lapointeらのカナダからの報告で76例(23-75才、平均50.2才)であるが、それらの症例を集めるのに15年間(1971年-1986年)を要している³⁰⁾。ただしAudet-Lapointeらの症例には手術後の摘出標本から偶然発見されたVAINの術後病理診断例が10例含まれている。それらを除くと66例になり婦人科医が診断したVAINの報告例数としては本研究のものが最も多い。そのほか、Petrilli |アメリカ、41例(19才-70才、平均47才)、1973年-1978年までの5年間²⁸⁾、Aho |フィンランド、23例(19才-78才、平均41才)、1965年-1981年までの16年間³¹⁾、Lenehan |カナダ、59例(23才-72才、平均49才)、1971年-1984年までの13年間¹⁸⁾、Ruiz-Moreno |メキシコ、14例(21才-75才、平均52.2才)、1978年-1985年までの7年間²⁹⁾というように一定の症例数を集めるのにかなり長期間かかっている。これらに対し私は6年間に71例を集積し、さらに本研究期間後もVAIN例の経験を重ねている。

私が比較的短い期間に71例のVAİN症例を集めることができた最大の理由は細胞診の診断とコルポ診の不一致例に注目して症例の診断を進めたことによる。さらに不一致例が存在することを認識してから、下部女性性器の細胞診断を行う際に、子宮頸管、squamo-columnar junction を含む子宮腔部、および腔壁上部の3カ所からそれぞれ擦過細胞検体を採取するようにした。その結果、VAİN例の診断が増加し、かつ腔病変単独例（本研究のC群）を多数見出すことになった。本来腔細胞のホルモン変化の観察から出発した女性性器細胞診が Papanicolaou による子宮頸癌診断への応用により臨床的に極めて重要な診断手段となったが³²⁾、結果として子宮頸部細胞診の方が重要視され腔細胞診の診断意義が薄れることとなった。しかしVAİNを含めた腔腫瘍病変の診断にとっては腔から直接擦過細胞検体を採取することは決して無意味なことではなく腔細胞診はホルモン細胞診のみという概念は修正されるべきであると考えられる。事実われわれが腔塗抹細胞診をルーチン化したことによりVAİN例の診断例数が増加したことは本研究の重要な成果の一つと思われる。

子宮全摘術後のVAİN例（A群）は欧米からの報告例の中で多数を占めている。また子宮全摘術そのものが腔腫瘍のリスクファクターになるのではないかという議論が盛んに行われている^{20, 33, 36)}。子宮頸部のない症例から採取された腔細胞診で扁平上皮の細胞異常があれば腔壁の観察が充分行われ病変が発見される可能性が高まるのは当然のことで、子宮全摘手術が腔腫瘍のリスクとなるのというよりは腔腫瘍病変が子宮頸部が存在する症例に比べ発見されやすいために見かけ上のリスクが上昇するだけなのではないかと考えられる。なお本研究における病型分類ではB群がA群に較べ有意に若い症例が多かったが、これはもっぱらA群に高年齢者の頻度が高い子

宮の悪性腫瘍術後患者が集中したためと考えられた。

欧米の報告例を検討すると胎生期に投与された非ステロイド合成エストロゲン剤である diethylstilbestrol, DES が誘発した vaginal adenosis に伴う VAIN 例が議論の対象となることがある²⁷⁾。私は DES に伴う adenosis の症例を経験しておらず、本研究対象症例のなかにも vaginal adenosis を合併する VAIN 例はなかった。vaginal adenosis では頸癌や異形成上皮が好発する squamo-columnar junction とそこを中心とした変換帯が本来あるべき子宮頸部から腔壁に延長して存在するために VAIN ができやすいものと考えられている²⁸⁾。

2) コルポスコープ診断と病変の局在

コルポ診の際に病変部を一時的に白濁させるために用いる酢酸水溶液は従来日本を含めて3%溶液が使用されることが多かった²²⁾、Schneider らが用いている5%溶液のほうが私の経験からも白色上皮の染色性が良いことからルチーンに5%酢酸水を用いることにした²³⁾。最も多い症例を報告している Auder-Lapointe らも5%酢酸を推奨しており少なくとも腔病変では5%酢酸加工が望ましいものと考えられる³⁰⁾。一方、日本ではほとんど用いられることはないが、欧米ではコルポ診にヨード染色 (Schiller test) を併用することが多く通常はルゴール液 (複方ヨードグリセリン) が用いられている^{22, 23)}。その利点は異常上皮の境界が鮮明に表記されることで生検の際に有用である。ただしヨード染色を行うと酢酸加工時のような微細な血管像の観察が困難となり、それが日本であまり用いられない理由と考えられる。

病変の存在部位は諸家の報告とほぼ同様の傾向があり腔上部1/3に集中していた。また本研究の症例の63% (71例中45例) が病変が2個以上であり VAIN が multifocal な傾向を示すというこれまでの報告と同じ結果となった^{28-31, 33, 34)}。これらの性質は VAIN

の原因がウイルス（HPV）感染と考えれば理解できる。すなわち子宮頸部を中心とした膺上部がウイルスにとって易感染領域であり、また膺病変が複数あることは感染成立部位が複数存在するということであり接触感染するウイルスにとっては合理性のあることである。

コルポスコープ所見では白色上皮が特徴的所見であった。白色上皮は扁平型白色上皮と微小乳頭型白色上皮とに亜分類されているが本研究の症例では扁平型が48%に対して微小乳頭型が37%であった。微小乳頭型白色上皮はRoyらがspiked condylomaと呼んだコルポスコープ所見と同じものと考えられる³⁹⁾。Royらは当初spiked condylomaは尖圭コンジローマの初期像と捉えたためにコンジローマという名称を用いたようであるが、その後HPV型の多様性が認識されるにつれて尖圭コンジローマとは別の病変と考えるようになった³⁹⁾。文献のなかにspiked condylomaの組織像として用いられている写真はpapillomatosisが目立つ異形成上皮で上皮の上層から中層にかけてkoilocytosisが顕著に認められ現在ではVAIN (with koilocytosis)と組織診断される病変と考えられる。そのほかの症例では赤点斑が15%認められたがモザイク例は1例もなかった。PettrilliらもVAIN Iでは白色上皮主体でVAIN IIとIIIでは赤点斑の所見が加わるもののモザイクは認められなかったと報告しており²⁸⁾、モザイクは子宮頸部にしろ膺にしろ変換帯の存在する部位を中心に出現するコルポスコープ所見と考えられた³⁸⁾。なお今回の研究ではコルポスコープ所見とVAINの組織異型度との間の相関関係は認められなかった。

3) 病理組織学的所見

本研究の症例のうち74%がVAIN Iが占めたが、ほかのVAIN報告例ではWoodmanらの4%からAudet-Lapointeらの51%までとばらつきがあるもののむしろ少なく、VAIN II, IIIの割合のほうが多

い^{18, 28-31, 33})。本研究では上皮内病変のgradingの際に koilocytotic atypia があるものの粘膜下層の増殖が顕著でない組織型でも VAIN I に含めたが、それは近年の上皮内病変の grading に関する国際的な合意に沿ったものと考えているためである⁴⁰⁻⁴²)。koilocytotic atypia のみ著明な上皮は、CIN と HPV との関係が指摘されはじめた時期に flat condyloma と呼ばれ CIN とは区別しようとする試みがあった^{6, 39})。しかし CIN の大多数例から HPV DNA が検出されることが明らかとなり次第に区別する意義がなくなった^{26, 43-45})。本研究で引用した VAIN 報告文献は合意が形成される以前に公表されたものが多いため、それらの報告例のなかにいわゆる flat condyloma が含まれておらず VAIN I 症例が少ないという可能性はある。なお尖圭コンジローマも koilocytotic atypia の所見が組織学的特徴であるが基底細胞の異型が乏しいこと、乳頭状増殖が顕著であることなど肉眼所見を含めて上皮内腫瘍とは異なる病態を示す。われわれの以前の研究で外陰、陰および子宮頸部で臨床病理学的に尖圭コンジローマと診断した病変からはもっぱら HPV 6 型か 11 型が検出され、尖圭コンジローマは CIN や VAIN などの上皮内腫瘍病変とはウイルス学的にも区別しうる疣贅疾患と考えられた²⁵)。

免疫染色の結果 83% の症例で HPV 抗原が検出された。VAIN 例で HPV 抗原検出を行った報告はないので比較できないが CIN では Kurman らの抗 bovine papillomavirus 1 型 (BPV-1) ポリクローナル抗体を一次抗体として用いた報告がある⁸)。それによると CIN 322 例中 89 例 (28%) が陽性となり軽度・中等度・高度異形成および上皮内癌の陽性率はそれぞれ 43%、15%、17%、10% であった。ただし、高度異形成と上皮内癌については併存する軽度および中等度異形成が染色され異型の強い部分では HPV 抗原が同定されない。異形成の HPV 免疫染色で異型が強くなるほど染色されにくくなる

という傾向は本研究の結果と類似する。本研究の免疫染色で用いた一次抗体はわれわれの研究グループが共同で開発した抗HPV-1モノクローナル抗体でKurmanらが用いた抗BPV-1抗体と同じくパピローマウイルスの種特異抗原を認識する抗体である。ただし両抗体について同一の臨床検体を用いたわれわれの比較検討結果では抗HPV-1抗体を用いたほうが陽性率が35%高かった²¹⁾。その結果を加味したとしてもCINに比べてVAINのほうがHPV抗原陽性率が高いことは明らかである。症例数が限られているものの、われわれは現在までに抗原陽性VAIN例の電子顕微鏡による観察でウイルス粒子が確認された例を4例(HPV16、31、58、66型)経験しており、HPV抗原陽性病変部はウイルス産生性感染(productive infection)またはlytic infectionの場であるものと思われる。以上のHPV抗原検出結果から、VAINの大多数は病変部で多様なHPV型のウイルス粒子を産生している可能性が高く、それらは一方では前癌病変としての性格を持ち、他方ではウイルス産生の場としてHPVの性行為感染における重要なreservoirとして機能しているものと考えられた。

4) 追跡調査結果

VAIN症例の追跡調査成績では研究期間中明らかな進行例はなかった。一方77%の症例は病変が消退したが、本研究の診断の際に生検を行うことを原則としていたためそれが消退の理由として考えられる。本研究では厳密にはVAINのnatural historyを観察したことにはならないが、それを考慮しても自然消退傾向が強い病変と思われる。したがってVAIN症例を診断した場合には直ちに治療を行うよりは、まず病変の消退を期待してしばらく生検を繰り返して経過を観察したほうが良いと考えられる。ただし膣のkolposcopeによる観察は特に子宮頸部がある患者では困難なことが多く熟練が必要

で、陰擦過細胞診を併用して慎重におこなうべきである。事実、Ahoらは本研究と同様の方法（コルポスコープ診で病変が認められたら生検する）で24例を3-15年間追跡し18例（78%）は消退したがVAIN I,II 18例中1例とVAIN III 5例中1例が浸潤癌に進行したと述べており進行する危険が全くないとはいえない³¹⁾。特に本研究対象患者のなかでSLE合併症例の2例は陰病変の消退傾向が認められず現在でも注意深い観察を続けている。これらの症例からは患者の免疫力と病変の存続には強い相関があるものと思われた。

(2) HPV DNAの同定

1) VAINに検出されるHPV型

PBM-58法によるVAINからのHPV検出結果から全ての症例から単一の型のHPVが検出された。しかもHPV型の種類が極めて多様であり多数未同定HPV型が含まれていた。

VAINからのHPV DNA検出に関する報告はCINにくらべて極めて少ない^{37,46,47)}。Okagakiらはサザンブロット法により10例のVAIN例についてHPV1型から6型までをプローブとして用い6型が10例、3型が7例、2型が6例、1型・5型が各1例づつhigh stringency conditionで検出されたと述べている⁴⁶⁾。HPV1型から4型は皮膚型HPVで、HPV5型は疣贅状表皮発育異常症患者からもっぱら検出される¹⁴⁾。現在それらHPV型が性器病変から検出されることはないとの認識が一般的である。一方、HPV6型は尖圭コンジローマからクローニングされた型でありわれわれの研究を含めて尖圭コンジローマ特有のHPVと考えられている^{25,26)}。Okagakiらの研究の報告年は1983年でHPV16型以降の性器型HPVがクローニングされる以前のことであり、このような結果がでたのもやむ

を得ないことなのかもしれない。Bornstein らはDESが誘発した vaginal adenosis 例の VAIN II の5例につき in situ hybridization 法によるHPVの検出を行い4例が6型、1例が16型と述べている³⁷⁾。腔であれ子宮頸部であれ中等度異形成の過半数にHPV6型が同定されることは考えにくく^{27,44,45)}、in situ hybridization 法によるHPV同定の限界を示した結果と思われる。Nuovo らはkoilocytotic atypia を示す腔病変22例中14例(64%)がHPV6,11,16型をプローブとしたサザンプロット法でHPVDNAが検出されたとしている(ただしHPV型は明らかにしていない)⁴⁷⁾。文献的にはこれ以外の報告は見あたらずHPV型の多様性の認識に基づいたVAINとHPVとの関連性の研究は本研究が最初と思われる。

本研究により臨床病理学的にVAIN と診断した症例の病変部組織からサザンプロット法(PBM-58法)により全ての症例からHPVDNAを検出することができた。同じ方法によるCIN例の検討結果はすでに報告したが、検出率は220例中211例(96%)で24種類の性器型HPVを同定した²⁶⁾。本研究の結果とは多様な種類のHPV型がほぼ100%検出されたことに関しては類似しておりCINとVAINはいずれも多種類の性器型HPVの感染に起因する上皮内病変と結論づけられる。一方、2つの研究結果の相違点は組織異型度とHPV型との相関で、CINでは組織異型度が増すほど、そこから同定されるHPV型は限定されCIN III からは、ほとんどHPV16型および系統樹解析⁴⁸⁾によりHPV16型と近縁関係にあるとされるHPV31、33、35、52、58、67型(HPV16型グループ)が検出された。またCIN症例全体からみてもHPV16グループが症例の2/3を占めた。一方、VAINではHPV16型にややそのような傾向が認められるものの、他型はほぼ均等に分布した。本研究ではVAIN III が3例と少なくこの結果だけで腔病変の異型度とHPV

V型の分布の関係を論ずるのは困難である。しかし少なくともHPV 16型グループは子宮頸部に、より感染しやすいということだけは2つの研究結果の比較から推測できる。

本研究の症例ではHPV 40、53、61、64、71型は腔から検出されたが子宮頸部からは現在までわれわれの症例では検出されていない。一方、HPV 33型、39型、68型は子宮頸部のみに検出されている。腔や子宮頸部に特異的に感染するHPVが存在するか否かは現時点では明らかでなく今後の症例の蓄積を待ちたい。

子宮頸癌術後に出現したVAIN例で検査可能であった3例ではいずれも子宮頸癌とVAINから異なった型のHPVが検出された。また経過観察例でも存続例と考えられていた症例のなかに初回と2回目異なる種類のHPVが検出された例があった。このことは臨床病理学的には再発や存続と考えられる病変でもウイルス学的には新たに発生した病変と診断される場合があるということである。この点からも病変部のウイルス学的診断は临床上重要な情報を提供しうるものと思われ速やかなHPVの臨床診断法の開発が望まれる。

2) 新たなHPV型の発見

本研究で最も大きな成果と考えられるのはそれまで未同定であったHPV型を7種類も発見したことである。われわれは本研究以前にHPV 58型を子宮頸癌からクローニングしたが²⁷⁾、それ以後クローニングしたHPV型はすべて腔病変からということになった。一方本研究以外に腔病変からクローニングしたHPV型の報告は皆無である¹⁴⁾。ただしHPV 53型は報告によると臨床のおよび細胞学的に異常を認めない妊婦の子宮頸部スワブ検体からクローニングしたとされている¹⁹⁾。しかし、この妊婦の腔にVAINが存在した可能性のあることは、本研究の検体でHPV 53型が腔にのみ3例認められていることから充分考えられる。VAINは一般臨床の場では

見逃されやすいが、今まで腫瘍からのHPV型の発見が全くなかったこともこのことを物語っているものと思われる。

近年遺伝子増幅法である polymerase chain reaction (PCR) 法がHPV検査の主流になっており、増幅遺伝子産物の解析により、さらに複数の未同定のHPV型の存在が推定されている^{45,50)}。われわれも8種類のほかに未同定のHPVDNAと考えられるクローンをさらに2種類得ており現在その塩基配列の決定を行っている。したがって今後も腫瘍や子宮頸部に存在する、いわゆる性器型HPVの種類が増加するものと思われる。子宮頸癌の発癌研究やCIN, VAINなどの臨床診断においては多くの種類のHPVが性器に存在するということを考慮する必要がある。

以上の研究結果からVAINは以前に考えられていたよりは多い疾患で、しかも極めて多様な性器型HPVの感染に起因する腫瘍上皮内病変であるとの結論に達した。HPVは性器癌の発癌を解明するうえで重要な手がかりを与えているものと思われる。その手がかりを見逃さないために臨床医には臨床所見を正確に観察して記録し分析することが求められている。それらの地道な努力がヒト癌の解明にとって大きな力となるものと私は確信している。

5. まとめ

本研究によりVAINについて以下の結果を得た。

(1) 臨床的病理学的検討

- 1) 71例の腔上皮内腫瘍(VAIN)をA群(子宮全摘既往例)15例、B群(CIN合併例)12例、C群(de novo 例)44例の3群に分類した。年齢分布ではA・B間にのみ有意差がありB群が若かった。
- 2) 病変の数は平均2.5個でmultifocalな傾向があった。
また全ての症例で腔上部1/3に病変が存在したが13例(18%)で腔壁中1/3まで病変がおよんでいた。
- 3) コルポスコープ所見は34例(48%)が扁平型白色上皮、26例(37%)が微小乳頭型白色上皮、11例(15%)が赤点斑であった。モザイク所見はみられなかった。
- 4) 組織分類ではVAIN I 53例(75%)、VAIN II 15例(21%)、VAIN III 3例(4%)でVAIN I例が多数を占めた。
- 5) 59例(83%)の症例で免疫組織学的にHPV抗原が検出された。
- 6) 経過観察56例中例43例(77%)は病変が消退し、残りの13例(23%)は存続し、進行例はなかった。

(2) ウイルス学的事項

- 1) 71例全ての病変から単一のHPVが検出された。HPV型の種類は22種類同定された。
- 2) 本研究で新たなHPV型が7種類(HPV59、61、62、64、67、69、71型)発見された。
- 3) 腔壁には多くの種類のHPVが感染し、性器型HPVのreservoirの場と考えられた。

6. 引用文献

- 1) Christopherson WM, Parker JE. Relation of cervical cancer to early marriage and childbearing. *N Engl J Med* 273; 235-239, 1965.
- 2) Rotkin ID. A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res* 33; 1353-1367, 1973.
- 3) Kessler II. Venereal factors in human cervical cancer. *Cancer* 39; 1912-1917, 1977.
- 4) Rawls WE, Tompkin WAF, Figueroa ME, Melnick JL. Herpes type 2: association with carcinoma of the cervix. *Science* 161; 1255-1256, 1968.
- 5) Nahmias AJ, Josey WE, Naib ZM, Luce CF, Guest BA. Antibodies to herpesvirus hominis type 1 and 2 in humans. *Amer J Epid* 91; 547-552, 1970.
- 6) Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic pattern. *Acta Cytol* 20; 505-509, 1976.
- 7) Casas-Cordero M, Morin C, Roy M, Fortier M, Meisels A. Origin of the koilocyte in condyloma of the human cervix. *Acta Cytol* 25; 383-392, 1981.
- 8) Kurman RJ, Jenson AB, Lancaster AW. Papillomavirus infection of the cervix. II. Relationship to intraepithelial neoplasia based on the presence of specific viral structural protein. *Am J Surg Pathol* 7; 39-52, 1983.
- 9) Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci USA* 80; 3812-3815, 1983.
- 10) Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J* 3; 1151-1157, 1984.
- 11) Barrett TJ, Silbar JD. Genital warts - a venereal disease. *JAMA* 154;

333-334, 1954.

12) Oriol JD, Almeida JD. Demonstration of virus particles in human genital warts. *Brit J Vener Dis* 46; 37-42, 1970.

13) de Villiers E-M, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol* 40; 932-935, 1981.

14) de Villiers E-M. Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J Virol* 63; 4898-4903, 1989.

15) Hummer WK, Mussey HD, Decker DG, Dockerty MB. Carcinoma in situ of the vagina. *Am J Obstet Gynecol* 108; 1109-1116, 1970.

16) Oliver JA. Severe dysplasia and carcinoma in situ of the vagina. *Am J Obstet Gynecol* 134; 133-137, 1979.

17) Woodruff JD. Carcinoma in situ of the vagina. *Clin Obstet Gynecol* 24; 485-501, 1981.

18) Lenehan PM, Meffe F, Lickerish GM. Vaginal intraepithelial neoplasia: biologic aspects and management. *Obstet Gynecol* 68; 333-337, 1986.

19) Murad TM, Durant JR, Maddox WA, Dowling EA. The pathologic behavior of primary vaginal carcinoma and its relationship to cervical cancer. *Cancer* 35; 787-794, 1975.

20) Schneider A, de Villiers E-M, Schneider V. Multifocal squamous neoplasia of the female genital tract: significance of human papillomavirus infection of the vagina after hysterectomy. *Obstet Gynecol* 70; 294-298, 1987.

21) Iwasaki T, Sata T, Sugase M, Sato Y, Kurata T, Suzuki K, Ohmoto H, Iwamoto S, Matsukura T. Detection of capsid antigen of human papillomavirus (HPV) in benign lesions of female genital tract using anti-HPV monoclonal antibody. *J Pathol* 168; 293-300, 1992.

22) Barrasso R, Coupez F, Inesco M, de Brux J. Human papillomaviruses

and cervical intraepithelial neoplasia: the role of colposcopy. *Gynecol Oncol* 27; 197-207, 1987.

23) Schneider A, Sterzik K, Buck G, de Villiers E-M. Colposcopy is superior to cytology for the detection of early genital human papillomavirus infection. *Obstet Gynecol* 71; 236- 241, 1988.

24) Buckley CH, Butler EB, Fox H. Cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Pathol* 35; 1-13, 1981.

25) Sugase M, Moriyama S, Matsukura T. Human papillomavirus in exophytic condylomatous lesions on different female genital regions. *J Med Virol* 34; 1-6, 1991.

26) Matsukura T, Sugase M. Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int J Cancer* 61; 13-22, 1995.

27) Matsukura T, Sugase M. Molecular cloning of a novel human papillomavirus (type 58) from an invasive cervical carcinoma. *Virology* 177; 833-836, 1990.

28) Petrilli ES, Townsend DE, Morrow CP, Nakao CY. Vaginal intraepithelial neoplasia: Biological aspects and treatment with topical 5-fluorouracil and the carbon dioxide laser. *Am J Obstet Gynecol* 138; 321-328, 1980.

29) Ruiz-Moreno JA, Garcia-Gomez R, Vargas-Solano A, Alonso P. Vaginal intraepithelial neoplasia. Report of 14 cases. *Int J Gynecol Obstet* 25; 359-362, 1987.

30) Audet-Lapointe P, Body G, Vauclair R, Drouin P, Ayoub J. Vaginal intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol* 36; 232-239, 1990.

31) Aho A, Vesterinen E, Meyer B, Pulora E, Paavonen J. Natural

history of vaginal intraepithelial neoplasia. *Cancer* 68; 195-197, 1991.

32) Papanicolaou GN. Diagnostic value of exfoliated cells from cancerous tissues. *JAMA* 131; 372-378, 1946.

33) Woodman CBJ, Jordan JA, Wade-Evans T. The management of vaginal intraepithelial neoplasia after hysterectomy. *Brit J Obstet Gynecol* 91; 707-711, 1984.

34) Ferris DG, Messing MJ, Crosby JH. Vaginal intraepithelial neoplasia III detected after hysterectomy for benign conditions. *J Fam Pract* 40; 81-85, 1995.

35) Herman JM, Homesley HD, Dignan MB. Is hysterectomy a risk factor for vaginal cancer? *JAMA* 256; 601-603, 1986.

36) Pearce KF, Haefner HK, Sarwar SF, Nolan TE. Cytopathological findings on vaginal Papanicolaou smears after hysterectomy for benign gynecologic disease. *N Engl J Med* 335; 1559-1562, 1996.

37) Borinstein J, Kaufman RH, Adam E, Adler-Storthz K. Human papillomavirus associated with vaginal intraepithelial neoplasia in women exposed to diethylstilbestrol in utero. *Obstet Gynecol* 70; 75-80, 1987.

38) Staffl A, Mattingly RF. Vaginal adenosis: A precancerous lesion? *Am J Obstet Gynecol* 120; 666-669, 1974.

39) Roy M, Meisels A, Fortin M, Morin C, Casas-Cordero M. Vaginal condylomata: A human papillomavirus infection. *Clin Obstet Gynecol* 24; 461-483, 1981.

40) National Cancer Institute Workshop. The 1988 Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytological diagnosis. *JAMA* 262; 931-934, 1989.

41) Kurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E. editors. *Tumors of the cervix,*

vagina, and vulva: Atlas of tumor pathology. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, 1990.

42) Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson EJ. editors. World Health Organization - Histological typing of female genital tract tumors. second edition, Springer-Verlag, New York, 1994.

43) Lorincz A, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* 79; 328-337, 1992.

44) Bergeron C, Barasso R, Beaudenon S, Flamant P, Croissant O, Orth G. Human papillomaviruses associated with cervical intraepithelial neoplasia. Great diversity and distinct distribution in low- and high-grade lesions. *Am J Surg Pathol* 16; 641-649, 1992.

45) Lungu O, Sun XW, Felix J, Richart M, Silverstein S, Wright TC. Relationship of human papillomavirus type to grade of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA* 267; 2493-2496, 1992.

46) Okagaki T, Twiggs LB, Zachow KR, Clark BA, Ostrow R, Faras AJ. Identification of human papillomavirus DNA in cervical and vaginal intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2; 153-159, 1983.

47) Nuovo GJ, Blanco JS, Silverstein SJ, Crum CP. Histologic correlations of papillomavirus infection of the vagina. *Obstet Gynecol* 72; 770-774, 1988.

48) Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard H-U. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 69; 3074-3083, 1995.

49) Gallahan DG, Müller M, Schneider A, Delius H, Kahn T, de Villiers E-M, Gissmann L. Human papillomavirus type 53. *J Virol* 63;

4911-4912, 1989.

50) Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a world wide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87; 796-802, 1995.

7. 図・表一覧

- 表1 性器HPV型の制限酵素による切断長 (1)
表2 性器HPV型の制限酵素による切断長 (2)
表3 VAIN 71例の臨床データ
表4 VAIN 71例の臨床病理学的所見
表5 VAIN 71例の臨床病理学的所見および同定されたHPV型
表6 VAIN 71例の経過観察結果
表7 VAIN 71例から検出されたHPV型
表8 VAIN と合併症のHPV検出結果
表9 経過観察症例におけるHPV型の変化

- 図1 PBM-58法による性器HPV型のPstIパターン
図2 新たにクローニングしたHPV7型のPBM-58法による同定
図3 腔上皮内腫瘍 (vagina intraepithelial neoplasia, VAIN) の臨床像
図4 HPV59型をクローニングした病変と病理像
図5 HPV61型をクローニングした病変と病理像
図6 HPV62型をクローニングした病変と病理像
図7 HPV64型をクローニングした病変と病理像
図8 HPV67型をクローニングした病変と病理像
図9 HPV69型をクローニングした病変と病理像
図10 HPV71型をクローニングした病変と病理像

表1 性器HPV型の制限酵素 (PstI, BstI, MspI) による切断片長 (1)

	HPV	6	11	16	18	30	31	33	35	39	40	42	43	44	45	51
<i>Enzyme</i>																
PstI-A		5325	1774	2817	6337	5706	2832	4605	3403	3317	3241	2571	2232	2335	5426	2903
B		1496	1594	1776	555	2146	1627	2011	1796	1270	2098	1767	1906	1834	2432	2434
C		1081	1503	1549	457		1552	1173	1687	1049	1215	1174	1857	1659		1325
D			1042	1063	441		1112	120	546	951	838	1167	1014	1084		1141
E			791	483	67		477		447	688	517	795	921	921		
F			759	216			216			588		443	45			
G			435				96									
H			33													
<hr/>																
BstI-A		3908	4417	3407	2578	1669	6256	5052	4104	3258	2787	3679	4729	3793	3528	4947
B		2918	1585	1935	2003	1664	1139	1497	1125	775	2474	2721	2673	2521	2031	1759
C		878	1082	1619	1438	1315	517	832	947	773	998	837	573	996	936	883
D		198	577	514	833	1196		528	590	677	555	680		523	517	136
E			270	429	517	553			393	656	537				508	83
F					438	520			351	492	185				329	
G					41	364			324	447	157				9	
H					9	310			45	297	113					
<hr/>																
MspI-A		3313	4709	2794	4350	2423	3657	3404	3232	2577	3061	3283	1436	2854	3011	4363
B		3252	1339	2586	1912	2249	1606	2587	2711	1995	2691	2157	1425	1692	2906	1526
C		1337	1331	1881	1595	841	1197	1508	1486	1834	976	1742	1350	950	842	1200
D			552	444		693	1020	387	450	1326	529	642	1342	914	802	558
E				199		580	432	23		101	284	93	1097	501	170	161
F						548					179		987	443	111	
G						518					126		338	377	16	
H											52			97		
<hr/>																
Total		7902	7931	7904	7857	7852	7912	7909	7879	7833	7909	7917	7975	7833	7858	7808

表2 性器HPV型の制限酵素 (PstI, BstI, MspI) による切断片長 (2)

	HPV	52	53	54	55	56	58	59	61	62	64	66	67	69	71
Enzyme															
PstI-A		2765	3856	2418	2335	7409	4544	3891	5742	2.5(kb)	3.0(kb)	7173	4921	2.7(kb)	2.9(kb)
B		2239	2061	2176	1837	333	1726	3862	2107	1.7	2.0	435	2344	2.5	1.1
C		928	1467	2049	1837	102	918	143	140	1.5	1.2	150	531	1.3	1.1
D		906	433	676	921		300			1.4	0.5	66		0.7	0.9
E		632	39	286	882		216			0.6	0.4			0.3	0.5
F		409		154			120				0.2				0.5
G		63									0.2				0.3
H															0.3
<hr/>															
BstI-A		3349	3277	3952	3782	4514	4268	3235	2327	4.5(kb)	1.9(kb)	4914	3680	2.7(kb)	2.2(kb)
B		1667	2129	1696	2521	2241	2166	2490	1242	0.9	1.6	1926	1822	2.3	2.0
C		1065	1667	1062	1569	686	1390	1499	953	0.9	1.5	514	890	1.3	1.6
D		916	511	501		403		672	951	0.8	1.3	272	634	0.8	0.9
E		502	261	412				259	788	0.5	1.2	198	522	0.5	0.5
F		443	11	136					649				215		0.3
G									623				33		0.3
H									589						
<hr/>															
MspI-A		2020	2219	3578	3397	3272	3402	7273	2006	3.4(kb)	4.0(kb)	5564	3118	2.5(kb)	3.7(kb)
B		1615	1775	1430	2433	2418	1866	623	1086	0.8	3	2017	2469	2.1	2.0
C		1457	1448	1097	755	1393	1405		1031	0.8	0.7	179	965	1.1	0.6
D		793	850	1023	667	697	653		878	0.5		64	430	0.8	0.5
E		559	839	631	570	64	473		450	0.5			315	0.8	0.4
F		547	419				25		323	0.5			199	0.1	0.4
G		315	266						323	0.4					0.2
H		228	40						305	0.4					
<hr/>															
Total		7942	7856	7759	7822	7844	7824	7896	7989	7.7(kb)	7.7(kb)	7824	7801	7.7(kb)	8.0(kb)

註；塩基配列が決定していない型は kilobase (kb) で表示した。

表3 VAIN 71 例の臨床データと病型

症例番号	年齢	経産歴	既往歴・合併症	病型	症例番号	年齢	経産歴	既往歴・合併症	病型
1	47	3-2	頸癌で子宮全摘後	A	37	65	2-1		C
2	55	1-1	体癌で子宮全摘後	A	38	63	4-2		C
3	52	4-2	頸癌で子宮全摘後 (術後照射)	A	39	22	0-0		C
4	40	2-2	子宮筋腫で子宮全摘後	A	40	38	1-1		C
5	41	2-2	子宮筋腫で子宮全摘後	A	41	30	0-0		C
6	63	4-3	頸癌で子宮全摘後	A	42	39	2-2	1年後 CIN 発生	C
7	31	2-2	CIN で子宮全摘後	A	43	60	3-2		C
8	45	3-3	体癌で子宮全摘後	A	44	54	4-2		C
9	52	4-3	CIN で子宮全摘後	A	45	47	1-1		C
10	59	3-2	頸癌で子宮全摘後	A	46	54	3-3		C
11	40	4-2	頸癌で子宮全摘後 (術後照射)	A	47	44	3-3		C
12	40	2-0	頸癌で子宮全摘後 (術後照射)	A	48	22	2-0		C
13	48	4-2	子宮筋腫で子宮全摘後	A	49	27	2-0		C
14	52	3-2	子宮筋腫で子宮全摘後	A	50	61	2-2		C
15	66	2-2	体癌で子宮全摘後	A	51	28	0-0		C
16	66	5-3	CIN 既往	B	52	59	0-0		C
17	43	5-3	CIN 既往・合併、SLE 合併	B	53	24	0-0		C
18	38	1-0	CIN 既往、SLE 合併	B	54	30	0-0		C
19	17	0-0	CIN 合併	B	55	63	5-3	慢性胆管炎 (尿尿不明)	C
20	36	4-3	CIN 合併	B	56	20	0-0		C
21	19	1-0	CIN、妊娠合併	B	57	27	0-0		C
22	23	0-0	CIN 合併	B	58	25	0-0		C
23	30	0-0	CIN、妊娠合併	B	59	52	5-4		C
24	22	1-0	CIN 合併	B	60	39	0-0		C
25	22	0-0	CIN 合併	B	61	68	3-3		C
26	45	5-1	CIN 合併	B	62	53	5-3		C
27	51	2-2	CIN 既往	B	63	55	2-2		C
28	62	4-3		C	64	51	4-3		C
29	26	1-1		C	65	53	4-2		C
30	36	2-2		C	66	42	2-0		C
31	55	2-2		C	67	69	5-2		C
32	52	0-0		C	68	45	1-1		C
33	26	0-0		C	69	56	4-3		C
34	27	0-0	妊娠合併	C	70	21	0-0	1年後尖圭コンジローマ	C
35	22	0-0		C	71	27	1-0		C
36	36	0-0		C					

表4 VAIN71例の臨床病理学的所見

グループ分類	症例数	年齢分布 (平均)	組織分類	例数	HPV抗原陽性	HPVDNA陽性
A	15	31 - 66 (49)	I	11	10	11
			II	4	2	4
			III	0	0	0
B	12	17 - 66 (34)	I	10	10	10
			II	2	2	2
			III	0	0	0
C	44	20 - 69 (43)	I	32	29	32
			II	9	5	9
			III	3	1	3
計	71	17 - 69 (43)	I	53	49	53
			II	15	9	15
			III	3	1	3
計				71	59 (83%)	71 (100%)

表5 VAIN 71 例の臨床病理学的所見およびHPV型

症例番号	組織型	HPV検出	HPV型	病変存在部位	病変数	コルネオ病変	症例番号	組織型	HPV検出	HPV型	病変存在部位	病変数	コルネオ病変
1	I	+	51	膈上部1/3	1	WP	37	I	+	61	膈上部-中部	2	Wf
2	I	+	71	膈上部1/3	1	P	38	II	-	58	膈上部1/3	1	Wf
3	I	+	61	膈上部1/3	2	WP	39	I	+	64	膈上部1/3	3	WP
4	I	+	31	膈上部1/3	2	WP	40	I	+	66	膈上部1/3	10	Wf
5	II	+	64	膈上部1/3	2	WP	41	I	+	42	膈上部1/3	3	WP
6	I	+	53	膈上部1/3	1	Wf	42	I	+	16	膈上部1/3	3	P
7	I	+	67	膈上部1/3	1	WP	43	I	+	31	膈上部1/3	5	Wf
8	II	-	16	膈上部1/3	1	Wf	44	III	-	16	膈上部1/3	4	Wf
9	I	+	X	膈上部1/3	4	Wf	45	I	-	56	膈上部1/3	1	Wf
10	I	+	X	膈上部1/3	3	Wf	46	III	-	16	膈上部1/3	2	Wf
11	I	-	53	膈上部1/3	1	Wf	47	III	+	51	膈上部-中部	2	WP
12	II	-	64	膈上部1/3	4	WP	48	I	+	58	膈上部-中部	3	WP
13	I	+	62	膈上部1/3	1	P	49	I	+	62	膈上部1/3	1	WP
14	I	+	54	膈上部1/3	4	Wf	50	I	+	16	膈上部1/3	4	WP
15	II	+	35	膈上部1/3	1	P	51	I	+	42	膈上部1/3	4	Wf
16	I	+	42	膈上部1/3	2	P	52	I	+	18	膈上部1/3	2	Wf
17	I	+	31	膈上部1/3	3	Wf	53	I	+	64	膈上部1/3	2	Wf
18	I	+	56	膈上部1/3	1	WP	54	I	+	69	膈上部1/3	3	Wf
19	I	+	59	膈上部1/3	4	Wf	55	II	+	X	膈上部1/3	1	Wf
20	I	+	67	膈上部1/3	2	WP	56	I	+	59	膈上部1/3	1	WP
21	I	+	52	膈上部-中部	3	WP	57	II	+	58	膈上部1/3	1	WP
22	I	+	59	膈上部1/3	3	Wf	58	I	+	54	膈上部-中部	1	Wf
23	I	+	51	膈上部1/3	1	WP	59	II	-	56	膈上部1/3	2	Wf
24	I	+	58	膈上部1/3	3	Wf	60	I	+	62	膈上部1/3	1	P
25	I	+	58	膈上部-中部	2	WP	61	I	+	51	膈上部-中部	3	Wf
26	II	+	67	膈上部1/3	1	Wf	62	I	+	16	膈上部1/3	1	WP
27	II	+	53	膈上部1/3	3	P	63	II	+	40	膈上部-中部	1	Wf
28	I	-	16	膈上部-中部	7	Wf	64	I	+	67	膈上部1/3	4	Wf
29	I	+	52	膈上部1/3	4	P	65	II	-	58	膈上部1/3	1	P
30	I	+	59	膈上部-中部	4	WP	66	II	+	53	膈上部1/3	1	WP
31	I	+	52	膈上部-中部	3	WP	67	II	-	43	膈上部1/3	2	WP
32	I	+	42	膈上部-中部	2	P	68	I	+	66	膈上部1/3	3	Wf
33	I	+	56	膈上部1/3	4	WP	69	I	-	X	膈上部1/3	1	P
34	I	+	51	膈上部1/3	1	WP	70	I	+	30	膈上部-中部	7	Wf
35	I	+	62	膈上部1/3	3	Wf	71	II	+	67	膈上部1/3	3	WP
36	I	+	62	膈上部1/3	1	Wf							

註：I: VAIN I, II: VAIN II, III: VAIN III

Wf: 扁平型白色上皮 WP: 微小乳頭型白色上皮 P: 赤点斑

表 6 VAIN 71 例の経過観察結果

症例番号	病変の消長	観察期間 (年)	存続期間 (月)	症例番号	病変の消長	観察期間 (年)	存続期間 (月)
1	followなし			37	消失	3	<5
2	存続	5	56	38	存続	6	72
3	消失 (持続後)	6	31	39	消失	4	<4
4	followなし			40	存続	1	16
5	存続	3	37	41	消失	6	<12
6	消失	6	<3	42	消失 (持続後)	6	49
7	消失	6	<12	43	消失 (持続後)	6	34
8	消失	5	5<10	44	消失 (持続後)	6	50
9	消失	4	6<10	45	消失 (持続後)	6	42
10	消失	5	<4	46	followなし		
11	消失	4	<4	47	消失 (持続後)	6	42
12	消失	2	<12	48	followなし		
13	消失	3	<5	49	消失	6	6<12
14	消失	1	<8	50	消失	2	5<12
15	消失	2	8<12	51	消失	6	<12
16	消失	2	<4	52	存続	6	65
17	存続	6	72	53	followなし		
18	存続	6	72	54	followなし		
19	followなし			55	followなし		
20	消失	1	2<12	56	followなし		
21	存続	2	23	57	消失	5	<4
22	消失	5	3<12	58	followなし		
23	消失	2	<10	59	followなし		
24	消失	1	2<6	60	消失	1	<12
25	消失	2	3<12	61	消失	4	<12
26	followなし			62	消失	2	<12
27	消失 (持続後)	3	31	63	followなし		
28	消失 (持続後)	6	35	64	存続	3	37
29	存続	5	56	65	消失 (持続後)	4	36
30	消失	1	<3	66	消失	2	<12
31	存続	4	43	67	消失	2	8<12
32	followなし			68	消失	3	<5
33	消失 (持続後)	6	38	69	存続	3	27
34	消失	6	<4	70	存続	3	27
35	消失	2	<6	71	followなし		
36	消失	5	<12				

表7 VAIN71例から検出されたHPV型

	VAIN I	VAIN II	VAIN III	計
HPV 16	4	1	2	7
18	1			1
30	1			1
31	3			3
35		1		1
40		1		1
42	4			4
43	1			1
51	4		1	5
52	3			3
53	2	2		4
54	2			2
56	3	1		4
58	3	3		6
59	4			4
61	2			2
62	5			5
64	2	2		4
66	2			2
67	3	2		5
69	1			1
71	1			1
X	3	1		4
計	53	15	3	71

表8 VAINと合併症のHPV検出結果

症例	VAINのHPV型	合併症の種類	合併症のHPV型
3	61	頸部扁平上皮癌	16
6	53	頸部扁平上皮癌	58
9	X	CIN III	16
10	X	頸部扁平上皮癌	検出されず
11	53	頸部扁平上皮癌	検出されず
12	64	頸部扁平上皮癌	16
17	31	CIN I	31
18	56	CIN I	56
19	59	CIN I	59
24	58	CIN I	58
42	16	CIN II	16

表9 経過観察症例におけるHPV型の変化

患者番号	初診時HPV型	初診時病理	再検時HPV型	再検時病理	再検間隔(月)
2	71	VAIN I	71	VAIN I	14
3	61	VAIN I	61	VAIN I	31
5	64	VAIN II	71	VAIN II	24
18	56	VAIN I	54	VAIN I	36
38	58	VAIN II	58	VAIN III	21
39	64	VAIN I	52	VAIN I	4
40	66	VAIN I	66	VAIN I	12
42	16	VAIN I	61	VAIN I	27
43	31	VAIN I	58	VAIN I	34
44	16	VAIN III	16	VAIN III	18

Pst I

6 7 11 13 16 18 26 30 31 32 33 34 35 39 40 42 43 44 45 51 52 53 54 55 56 58 59 61 62 64 66 67 68 69 70 71 72 73 74

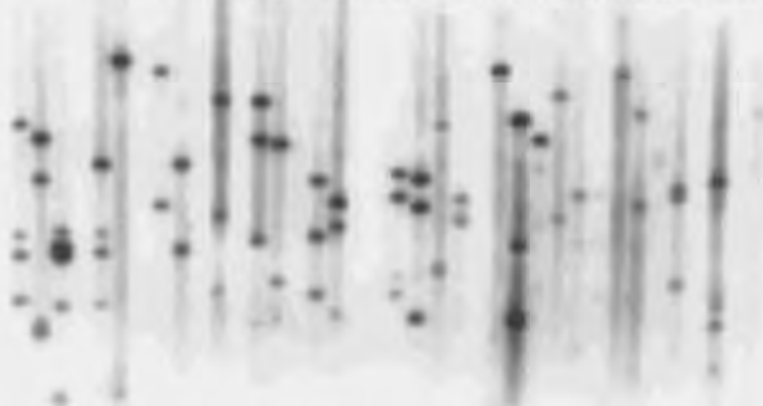


図1 PBM-58法による性器HPV型の*Pst*I パターン

low stringent condition ($T_m = -40^\circ\text{C}$) でHPV58型をプローブとして用いたサザンブロット法によるオートラジオグラフィー像で、性器型HPVの*Pst*I 切断パターンを示す。*Pst*IではHPV56型は7.4kilobase (kb), 0.3kb, 0.1kb、66型は7.3kb, 0.4kbに切断される。またHPV30型と61型はいずれも5.7kb, 2.1kb に分かれ²⁶⁾、それらをオートラジオグラフィー像で区別することはできない。

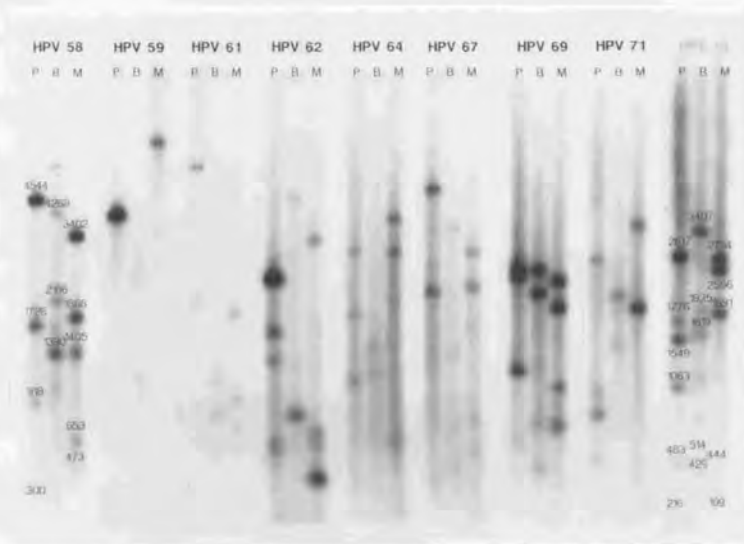


図2 新たにクローニングしたHPV7型のPBM-58 法による同定

新たなHPV型 (HPV59、61、62、64、67、69、71) の制限酵素PstI, BanI, MspI 切断パターンの差。PBM法では3種類の切断パターンを参照してHPV型を同定する。

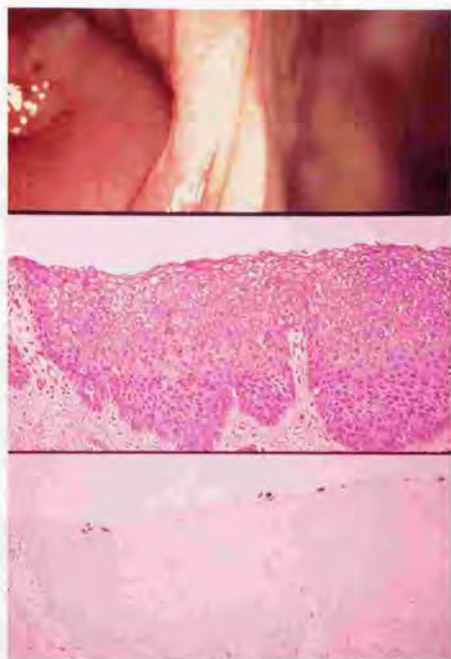


図3 膾上皮内腫瘍 (vagina intraepithelial neoplasia, VAIN) の臨床像

症例25 22才、未婚。帯下感で受診、膾細胞異常からVAIN病変を診断。

- 写真上段； コルポスコープ像（5%酢酸加工）。
境界鮮明な白色上皮でそのなかに微小血管のループが多数認められる赤点斑（P）の所見である。
- 中段； 組織像（hematoxylin-eosin, HE 染色 x50）。
VAIN Iで上層のkoilocytotic atypia が著明である。
- 下段； 免疫染色像（ABC 法、x50）。
koilocytosis を示す上皮細胞の一部の核が染色されている。

この病変部からはわれわれが子宮頸癌からクローニングしたHPV58型が検出された²⁷⁾。

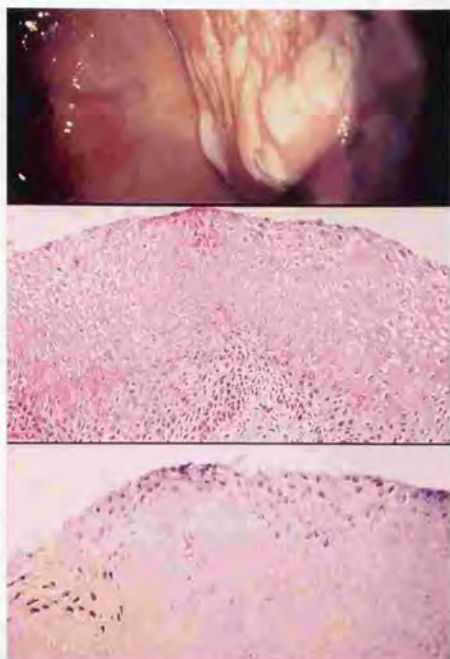


図4 HPV59型をクローニングした病変と病理像

症例30 36才、2回経産婦。子宮筋腫の術前検査で発見。

- 写真上段； コルポスコープ所見（5%酢酸加工）。
multifocal に境界鮮明な白色上皮が存在し、やや周辺部より膨隆している。そのなかに多数の微細突起がある微小乳頭型（WP）の所見である。
- 中段； 組織像（HE染色、x50）。
VAIN I でkoilocytosis と上皮の肥厚が目立つ。
- 下段； 免疫染色像（ABC法、x50）。
表層上皮の核が多数染色されている。

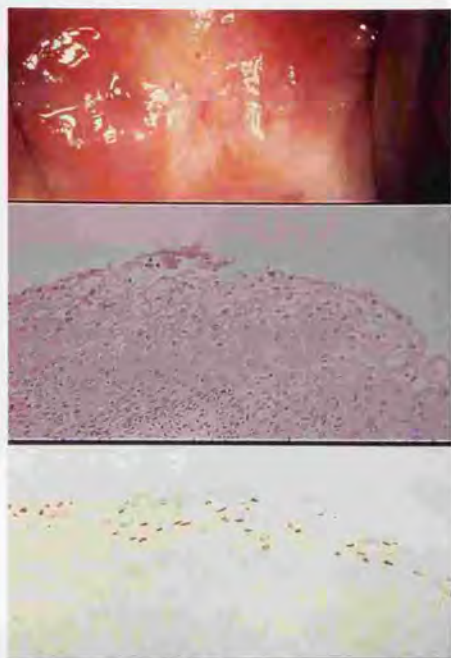


図5 HPV61型をクローニングした病変と病理像

症例3 52才、2回経産婦。子宮頸癌術1年後に診断。頸癌からはHPV16型が同定された。

写真上段； コルポスコプ所見（5%酢酸加工）。

腔断端部に比較的薄い白色上皮（W）が認められる。上皮の肥厚は目立たない。

中段； 組織像（HE染色、x50）。

koilocytosisが主体で傍基底細胞層の軽度異型と増殖がある（VAIN I）。

下段； 免疫染色像（ABC法、x50）。

koilocytotic cell の核が多数染色陽性である。

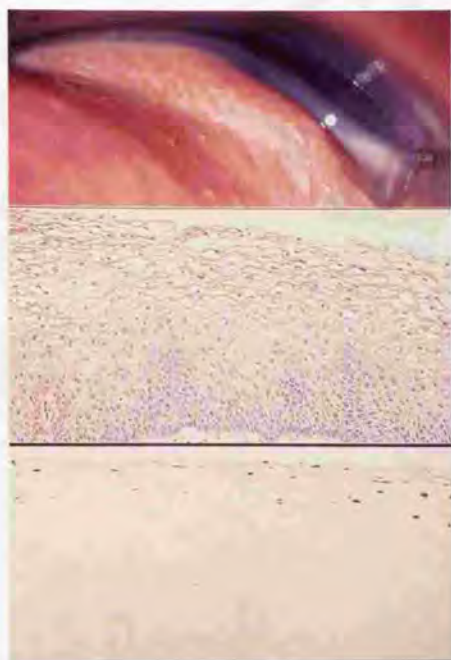


図6 HPV62型をクローニングした病変と病理像

症例35 22才、未婚。帯下感で受診、陰細胞診の異常から診断。

- 写真上段； コルポスコープ所見（5%酢酸加工），
前腔円蓋部に比較的薄い白色上皮所見がありそのなかに
微細突起がある微小乳頭型である。
- 中段； 組織所見（HE 染色、x 50），
異型のほとんど見られない傍基底細胞の増殖と上皮上層の
koilocytosis 所見がある。上皮の肥厚は軽度である
（VAIN I）。
- 下段； 免疫染色所見（ABC 法、x 50），
上層上皮の核が多数染色陽性である。

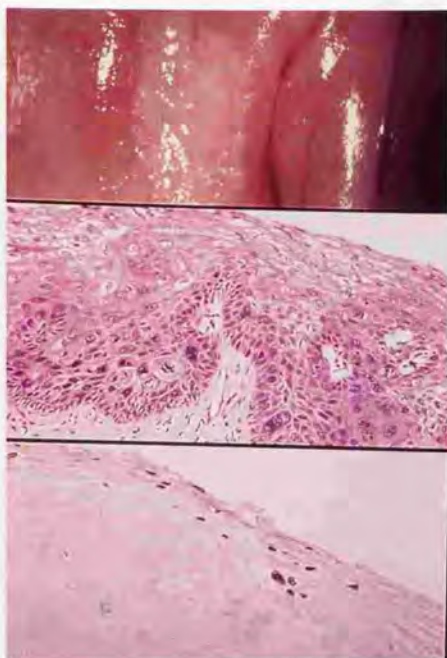


図7 HPV64型をクローニングした病変と病理像

症例5 45才、2回経産婦。子宮筋腫術後不正出血で初診。
細胞診異常から診断。

- 写真上段； コルポスコープ所見（5%酢酸加工）。
腫断端部に境界鮮明な広い白色上皮が存在する。
- 中段； 組織所見（HE染色、x66）。
上皮の肥厚・増殖があり基底層を中心に核異型性、多型性の著明な
大型細胞があり核分裂像もある（VAIN II）。
- 下段； 免疫染色像（ABC法、x66）。
大型核を含めて上層細胞の核の一部が染色陽性。

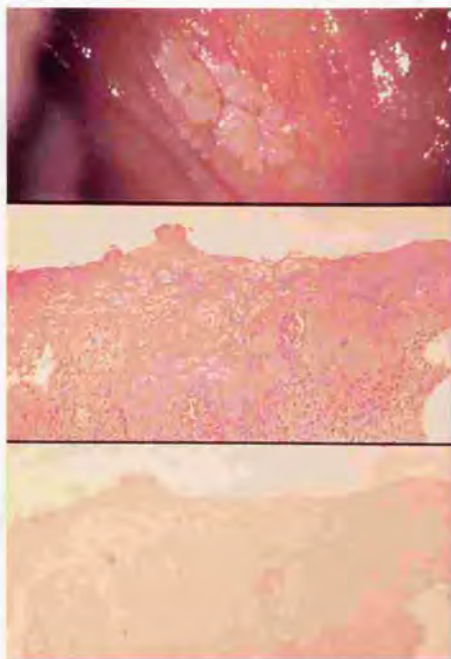


図8 HPV67型をクローニングした病変と病理像

症例7 31才、2回経産婦。5年前にCIN III (上皮内癌) で単純子宮全摘術を受けた。フォローアップ外来でVAINと診断。

- 写真上段： コルポスコープ所見 (5%酢酸加工)。
 陰壁上部に境界鮮明な白色上皮が存在した。
- 中段： 組織所見 (HE染色、x 33)。
 傍基底細胞層の軽度の増殖をともなう koilocytotic atypia (VAIN I)。
- 下段： 免疫染色像 (ABC法、x 33)。
 koilocytosis を示す細胞の核が染色されているが、陽性核は比較的少数である。

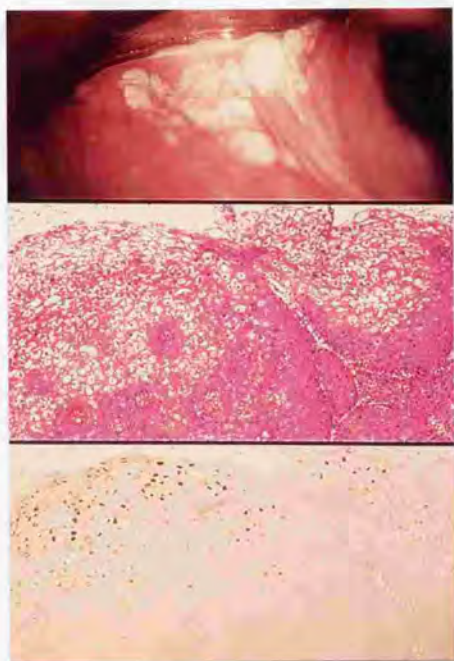


図9 HPV69型をクローニングした病変と病理像

症例71 30才、未婚。膣炎で受診、膣細胞診異常から診断。

- 写真上段； コルポスコープ所見（5%酢酸加工）。
 やや膨隆した白色上皮のなかに微細乳頭状突起が多数存在する
 微小乳頭型所見。
- 中段； 組織所見（HE染色、x33）。
 koilocytosisと上皮の肥厚・増殖が顕著に認められる(VAIN I)。
- 下段； 免疫染色像（ABC法、x33）。
 koilocytosisを示す上層から中層細胞の核が多数染色されている。

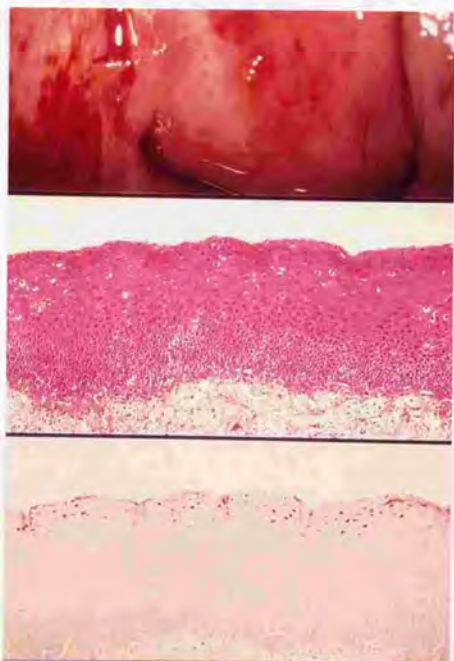


図10 HPV71型をクローニングした病変と病理像

症例2 55才、1回経産婦。4年前に子宮体癌で子宮全摘術を受け、フォローアップ中にVAINを診断した。

- 写真上段； コルポスコープ所見（5%酢酸加工）。
陰断端部に比較的薄い白色上皮がある。
- 中段； 組織所見（HE染色、x33）。
基底・傍基底細胞層の増殖とkoilocytosis所見があり上皮の肥厚は目立たない(VAIN I)。
- 下段； 免疫染色像（ABC法、x33）。
上皮上層の細胞核が多数染色陽性である。

