



Association between human papillomavirus particle production and the severity of recurrent respiratory papillomatosis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-11-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山田, 智史 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000040

博士（医学）山田 智史

論文題目

Association between human papillomavirus particle production and the severity of recurrent respiratory papillomatosis

（ヒトパピローマウイルス粒子産生と再発性呼吸器乳頭腫症の重症度との関連性）

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

再発性呼吸器乳頭腫症（RRP）は、ヒトパピローマウイルス（HPV）タイプ 6 や 11 が関与することが多い良性腫瘍である。重症度は幅広く、1 回の手術で寛解が得られる症例から数百回の手術でも寛解が得られない症例、悪性転化する症例を認める。寛解期の喉頭粘膜から HPV DNA が検出されることから、HPV の持続感染が主病態と考えられている。しかし、HPV の持続感染に着目し重症度を評価する研究は少なく、臨床所見に基づいて重症度を評価する Derkay スコアや HPV タイプ 11 の検出有無により論じられることが多い。

ナノスーツ法は、高真空条件を必要とする電界放出型走査電子顕微鏡（FE-SEM）で、生きたショウジョウバエの幼虫を観察できることに着想を得たバイオミメティックスである。光電子相関顕微鏡（CLEM）法は、光学顕微鏡と電子顕微鏡で同一視野を観察する手法である。ナノスーツ法を組み合わせたナノスーツ-CLEM 法により、簡便に立体構造を維持したまま FE-SEM 観察が可能である。

本研究では、ナノスーツ-CLEM 法を用いて HPV 粒子形成過程の可視化を試みた。

さらに、HPV 粒子産生と疾患の重症度の関連を明らかにすることを目的とした。

〔患者ならびに方法〕

2005 年 9 月から 2021 年 6 月の期間で、男性 25 例、女性 4 例の患者から手術毎に得た 68 検体を対象とした。本研究は、浜松医科大学の臨床研究倫理委員会の承認（承認番号：19-222）を得ており、ヘルシンキ宣言に準拠している。すべての患者から書面により同意を得た。PCR 法にて HPV が検出された症例は、ダイレクトシーケンス解析により HPV タイプを決定した。HPV のウイルス負荷量、HPV の組み込み割合をリアルタイム PCR により測定した。免疫組織化学染色（IHC）を p16、Ki-67（MIB-1）、HPV のカプシドタンパク質である HPV-L1、HPV の粒子形成や放出に関与する HPV-E4 に対し行った。HPV-E4 に対しては RNA-*in situ* hybridization での検討も行った。IHC で HPV-L1 陽性部位に対して、ナノスーツ-CLEM 法及び透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて検討を行った。

[結果]

HPV は 19 例で検出され、HPV タイプ 6 は 12 例、HPV タイプ 11 は 7 例であった。HPV 陽性例と HPV 陰性例の手術回数は、それぞれ 3.78 回 ($n = 55/68$ 、範囲：1～16)、1.30 回 ($n = 13/68$ 、範囲：1～3) であり、HPV 陽性例は優位に手術回数が多かった ($p = 0.02$)。一方、HPV タイプ 6 とタイプ 11 では手術回数に差は認めなかった ($p = 0.67$)。

典型的な HPV 陽性 RRP の HE 標本では、腫瘍表層に核濃縮および細胞質の空胞化を呈する、コイロサイトーシスを認めた。HPV-L1 と HPV-E4 は腫瘍表層に相関して発現していた。中咽頭癌で HPV 関与のサロゲートマーカーとなる p16 は、淡く散在性に陽性を示した。p16 の染色強度を immunoreactive score (IRS) で評価すると、HPV 陽性例は陰性例に比べ優位に染色性が高いが ($p < 0.01$)、HPV タイプ 6 と 11 では差を認めなかった ($p = 0.87$)。

ナノスーツ-CLEM 法を用い、FE-SEM で HPV-L1 IHC 陽性部位を 10 万倍で観察を行うと、核内に 50-60 nm の微小粒子が充満していた。TEM でも同一部位を観察すると、同様に核内に 50-60 nm の微小粒子の充満を認めた。さらに、ナノスーツ-CLEM 法で HPV 粒子形成過程を調べた。HPV 粒子は腫瘍の最表層付近で急速に形成される様子が観察された。一方、HPV 陰性例では微小粒子は認めなかった。

L1 IHC 陽性例は、手術間隔が短く ($p < 0.01$)、手術回数が多く ($p = 0.04$) 重症例であった。一方で、p16 IHC、HPV のウイルス負荷量、HPV の組み込み割合は、MIB-1 index や Derkay スコア等の重症度評価因子と相関しなかった。

[考察]

HPV は 50-60 nm の DNA ウイルスである。HPV のカプシドタンパク質である HPV-L1 IHC 陽性部位を FE-SEM および TEM で観察を行うと、50-60 nm の微小粒子が充満していた。さらに、HPV-L1 は粒子形成や放出に関与する HPV-E4 と相関して発現を認めた。一方で、HPV-L1 IHC 陰性部には粒子構造を認めなかった。従って、HPV-L1 IHC 陽性部の微小粒子は HPV 粒子であると判断した。病理組織標本上で RRP の HPV 粒子形成はこれまで報告はない。本研究は、HPV 粒子は腫瘍表層で急激に形成される可能性や、RRP の病態が HPV 粒子の持続感染である可能性を示した。

RRP の重症度は、Derkay スコアや検出される HPV タイプ 11 の検出の有無で論じられることが多い。しかし、Derkay スコアは腫瘍の大きさの評価等で主観的な要素が加わるため、評価者により判断が異なる可能性がある。本研究では、HPV タイプ 6 とタイプ 11 では手術回数に差は無く、HPV 粒子産生を意味する HPV-L1 IHC 陽性例は、有意に手術間隔が短く、手術回数が多いという結果であった。免疫染色による客観的な重症度評価が可能であることが示唆された。

[結論]

RRP における HPV 粒子形成を初めて可視化した。HPV 粒子産生は重症度と関連していた。RRP の重症度評価には、HPV-L1 IHC が有用である可能性がある。