

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22592034

研究課題名（和文）口腔前癌病変と扁平上皮癌の細胞診断およびHPV検査システムの構築

研究課題名（英文）Establishment of cytological diagnosis and HPV detection system of oral squamous cell carcinoma and precancerous lesion

研究代表者

岸野 万伸 (KISHINO MITSUNOBU)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60346161

研究成果の概要（和文）：

扁平上皮癌あるいは前癌病変が疑われる症例の細胞診の依頼は約100件あり、細胞診断を行った結果、陽性例はすべて扁平上皮癌であり、陰性例はすべて良性病変であった。また、そのうち50例についてDNAを抽出しHPVの検出を行ったが、陽性症例はなかった。

また、細胞二重免疫染色の有用性を確認するために、p53, p16二重染色を行った。p53陽性例はすべて扁平上皮癌で、扁平上皮癌以外の症例はすべて陰性であったが、検出感度は30%と低かった。p16に関しては感度・特異度ともに有意な結果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：

The cytological diagnoses for about 100 cases of suspected squamous cell carcinomas or precancerous lesions were almost all correct. All of positive cases were squamous cell carcinomas, and negative cases were benign lesions. HPV-DNA was not detected in 50 cases of these lesions. Immunohistochemical double staining method was used for detecting p53 protein and p16 protein in cytological smears. The sensitivity of p53 positivity for detection of cancer cells was 30%, and its specificity was 100%. The sensitivity and specificity of p16 protein were not significant.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：扁平上皮癌、前癌病変、HPV、細胞診、免疫染色

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の発生において、タバコとアルコールが重要なリスクファクターであることが知られているが、近年では、口腔から咽頭に

かけて発生する扁平上皮癌（SCC）で、HPVも原因の一つであるといわれており、性行為の関与と若年者での増加傾向が報告されている。

一方、ほとんどの子宮頸部の上皮内腫瘍 (CIN) および SCC では HPV 感染がみられ、なかでも高度異形成 (CINIII) から SCC ではウイルス DNA の組み込みが起こっている。発癌に関与する高リスク型 HPV (HRHPV) の同定には、擦過材料を用いた Hybrid Capture 法や PCR 法、*in situ* hybridization 法が用いられており、その他には免疫組織化学的に p16 蛋白を同定する方法もある。p16 は細胞周期の制御において中心的な役割を果たす癌抑制遺伝子で、pRB によってネガティブフィードバックを受けており、HPV 感染によって HPV-E7 が pRB の不活化あるいは変異をおこし、p16 の過剰発現が起こる。子宮頸部病変では、この検出法は非常に特異性・感度ともに高く、high grade CIN や SCC の指標となっている。

口腔 SCC では、主に PCR 法を用いた HPV-DNA の検出が行われているが、これまでの報告では陽性率は 1.0~89.5% と大きな開きがあり、正確な HPV 感染率や発癌との関連については、未だ明らかにはされていない。

細胞診に関しても、子宮頸部について診断基準はある程度完成されているが、同じ扁平上皮である口腔病変にその診断基準は当てはまらない。口腔の前癌病変や扁平上皮癌では、子宮頸部病変とは異なり表層分化型のものが大部分で、HPV 感染を示唆する典型的なコイロサイトーシスの像も観察されず、また一定の診断基準が定まっていないため、診断は困難である。

これまでの研究成果としては、「口腔前癌病変と扁平上皮癌における HPV 感染に関する検討」という内容で、これまで日本口腔科学会学術集会 (第 62 回・平成 20 年：優秀ポスター賞受賞)、日本病理学会総会 (第 97 回・平成 20 年)、日本臨床口腔病理学会総会 (第 19 回・平成 20 年と、第 20 回・平成 21 年：優秀ポスター賞受賞) において発表してきた。本研究の連携研究者である森井氏に協力いただき、子宮頸部病変を HPV 感染陽性の指標として、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、PCR 法による HPV-DNA の検出と、クラボウの協力により HPV typing (GeneSQUARE®) を試みた。その結果、子宮頸部の CIN において HPV は 95% (18/19)、SCC では 100% (10/10) 検出され、これらの方法が HPV 感染の検出に有用であることが示された。一方、口腔では、同様の方法で前癌病変の 26% (15/57)、SCC の 18% (9/50) に HPV が検出され、子宮頸部病変に比較して感染率が低いことが示された。また、p16 免疫染色の結果、HPV が検出された 24 例のうち 6 例が p16 陽性であり、これらの症例においては HPV 感染が癌化に関与する可能性が推察された。

上記の結果から、口腔癌でも少なからず HPV 感染があることが確認されたが、発癌と

の関連については、疑われるものの明確にはされていない。その要因としては、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用することによる DNA の断片化と、それにより検査法が限定されることが挙げられる。一方、細胞診に関しては、口腔病変は直視できることから、普及率はまだまだ低く、口腔癌検診も一部の地域でしか行われていないのが現状であり、口腔細胞診の診断基準の確立と細胞診検査の普及に貢献することは、私たち数少ない細胞診専門歯科医の責務であると考えている。また、細胞診で得られた検体の利用範囲は広く、HPV に関する様々な検出法に用いることができ、さらに詳細に HPV と口腔癌との関連について明らかにすることができると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、子宮頸部病変の解析をもとに口腔病変における HPV 感染を同定する方法を検討した結果から、細胞診にもそれを応用し、細胞診および HPV 検出システムを構築することを目的とする。

具体的には、まず、生検ないしは摘出予定の口腔白板症と扁平上皮癌について、擦過材料を採取して液状細胞診を行い、組織標本で得られた診断をもとに細胞学的特徴を捉え、細胞診の診断基準の確立を目指す。また、残った液状検体を用いて以下の方法で HPV 検出を行う。(1) consensus primer を用いた PCR 法による HPV-DNA の検出、(2) Genotyping 法 (GeneSQUARE®: クラボウ) による HPV-DNA の検出と型判定、(3) HPV-DNA が検出された場合は *in situ* hybridization 法による HPV-DNA の局在を調べる、(4) p16 免疫染色の 4 通りの方法で、HPV の感染率、型判定、HPV-DNA 組み込みの有無等について検討し、発癌との関連について調べ、細胞診および HPV 検出システムの構築を行う。

口腔癌における HPV 感染については、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用したこれまでの研究ではほぼ明らかにされたが、発癌との関連は依然不明確である。本研究では、細胞診システムを確立させるとともに、細胞診の検体を用いて HPV について詳細に検討することにより、口腔病変における HPV と発癌の関連についても明確にでき、これにより口腔癌の予防や口腔癌検診の普及に貢献できるものと期待している。

3. 研究の方法

研究計画の初年度から次年度にかけては、大阪大学歯学部附属病院にて、生検ないしは手術を行う口腔白板症と扁平上皮癌の症例について同時に細胞診を行い、組織像との比較検討により特徴的な細胞所見をピックアップする。また、残りの液状検体を用いて、

p16 免疫染色と PCR 法による HPV-DNA の検出・型判定、HPV-DNA が検出されれば *in situ* hybridization 法による HPV-DNA 局在を調べ、データの処理と統計学的解析を行う。この結果をもとに細胞診の診断基準と HPV 検査システムの概略を構築する。最終年度には細胞診の診断基準を確立し、そして口腔病変における HPV 感染率と癌化との関連について明確にし、口腔病変における細胞診断と HPV 検査の意義について報告する。

(1) 口腔扁平上皮癌と白板症の細胞診

① 検体の採取

大阪大学歯学部附属病院第 1 口腔外科にて、生検ないしは手術を施行する白板症と扁平上皮癌の症例について、検体採取用ブラシを使って病変部を擦過し、固定液に浸漬する。50 例以上を目標として行う。

② 標本作製・鏡検

液状検体の一部を用いてパパニコロウ染色標本作製し、細胞所見（採取量、細胞の種類、核所見、角化細胞所見等）について調べ、組織像との比較検討を行う。対照となる子宮頸部病変の標本提供、指導については連携研究者である森井氏に依頼する。免疫染色用、*in situ* hybridization 用標本も準備しておく。

(2) HPV 検出

① consensus primer による HPV-DNA PCR 残りの液状検体から DNA を抽出し、大部分の HPV に共通する L1 region DNA に対する consensus primer (GP5+/GP6+) を用いて PCR を行い、HPV-DNA を検出する。

② HPV typing 法 (GeneSQUARE® : クラボウ) 23 種類の HPV に対する multiplex primer で PCR を行った後蛍光標識し、各 HPV に対するプローブのついたマイクロアレイにアプライしてハイブリダイゼーションを行い、蛍光強度を測定する方法。

③ *in situ* hybridization (ISH)

上記①②のいずれかの方法で HPV が検出された場合、HPV に対する DNA プローブを用いて *in situ* hybridization を行う。本法は、他の方法に比較して感度が低く、また高リスク HPV が組み込まれた形で存在しているとコピー数が少なくなるため、GenPoint™ System (Dako) 等を使用して検出感度を上げる必要がある。

④ p16 免疫染色

子宮頸癌では HPV のサロゲートマーカーとして利用されている抗 p16 抗体 (E6H4, MTM laboratories) を用いて免疫染色を行い、発現強度・パターンについて解析を行う。また、抗 p53 抗体も併用して二重免疫染色を行う。

4. 研究成果

(1) 口腔細胞診

今年度までに、研究分担者が所属する診療

科から、扁平上皮癌あるいは前癌病変が疑われる症例の細胞診の依頼は約 100 件であった。ブラシを用いた擦過材料からパパニコロウ染色標本作製し細胞診断を行った結果、口腔扁平上皮癌の正診率は 90.5% と高い水準がえられ、残りの 9.5% も癌の診断には至らなかったものの異型上皮が認められた。また、細胞診で陰性の結果であった症例は、すべて炎症等の良性病変であった。

口腔粘膜細胞診の診断基準の確立に向けて、前向きな成果が上げられたと考える。

(2) HPV 検出

上記の口腔細胞診を行った症例のうち 50 例について、ブラシに付着した残りの検体から DNA を抽出し、コンセンサスプライマーを用いた PCR 法と HPV typing 法によりヒトパピローマウイルスの検出を行った。HPV については、コンセンサスプライマーを用いた PCR 法でも HPV typing 法においても陽性症例はなかった。

以前の HPV 感染率に関する報告では陽性率は 1.0~89.5% と大きな開きがあり、正確な HPV 感染率や発癌との関連については明らかではなかった。しかし最近では、咽頭癌では HPV の関与が認められるが、口腔癌では関与が乏しいという報告が多くなってきており、今回の結果においてもそれを支持する形となった。

(3) 免疫染色

発癌に関連する蛋白の発現をみるために、また、細胞二重免疫染色の有用性を確認するために、免疫染色可能な細胞診標本があり組織診断が確定している 32 症例について p16 と p53 の二重染色を行った。p53 陽性例はすべて扁平上皮癌で、扁平上皮癌以外の症例はすべて陰性であったが、検出感度は 30% と低かった。p16 に関しては感度・特異度ともに有意な結果は得られなかった。

細胞診標本は多数作製することができないため、多重免疫染色を行うことで細胞診断の補助となる結果を期待したが、良い結果が得られず今後の課題となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① The prevalence of human papillomavirus in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in comparison to cervical lesions used as a positive control. Ishibashi M, Kishino M, Sato S, Morii E, Ogawa Y, Aozasa K, Kogo M, Toyosawa S. Int J Clin Oncol, 16(6):646-53, 2011 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 岸野万伸. フォーラム「口腔扁平上皮癌の細胞診」口腔扁平上皮癌および前癌病変における HPV の関与について. 第 5 1 回日本臨床細胞学会秋期大会・学術大会. 2012 年 11 月 10 日. 新潟市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸野 万伸 (KISHINO MITSUNOBU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60346161

(2) 研究分担者

大倉 正也 (OKURA MASAYA)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：10281130

(3) 連携研究者

森井 英一 (MORII EIICHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10283772