

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

Anuudari Erkhembaatar

論文題目

義歯性エプーリス過形成上皮におけるヒトパピロー
マウイルスの感染について

I. 緒言

ヒトパピローマウイルス (HPV) の感染は子宮頸癌およびその前癌病変の最大のリスクファクターである。口腔領域においては、扁平上皮癌や上皮内癌などの悪性病変および白板症、口腔乳頭腫、尋常性疣贅、扁平苔癬、巢状上皮性過形成などの良性病変に、HPV が関与していることが報告されている。

これまでゲノム配列の相同性に基づき約 120 種類以上の遺伝子型が見つかっており、がんとの関連が示される高リスク型 (HR-HPV) と、尖形コンジローマ等の良性病変形成にとどまる低リスク型 (LR-HPV) とに大別されている。特に HR-HPV-16、18、33 は口腔粘膜の悪性病変である扁平上皮癌から多く検出され、LR-HPV-6 と 11 は良性病変の白板症や口腔乳頭腫から多く検出されている。

中高年者の口腔粘膜では義歯の装着が、義歯性エプーリス、義歯性口内炎、フラビーガム、乳頭状過形成などの口腔粘膜疾患の発生に関連しているとの報告がある。これは、義歯装着に伴う口腔内の清掃状態の悪化、義歯による機械的・化学的刺激、義歯床を介したカンジダ感染の他、HPV 感染も要因の一つとして考えられている。そこで、義歯装着の有無が HPV の口腔領域の感染にどのように関与しているのかを検索した結果、義歯装着者の方が未装着者よりも HPV 感染率が高いことが報告された。また最近になり、HPV 感染の口腔領域のリザーバーとして歯肉接合上皮が注目されている。

絶えず義歯より慢性刺激を受けている義歯性エプーリスの過形成上皮では、上皮に創傷が生じやすく HPV 感染の機会が増すことが考えられる。そこで、本実験では、義歯性エプーリスの過形成上皮における HPV 感染の検索を行い、口腔粘膜における HPV のリザーバーとなっている可能性について考えた。また、その過形成上皮の細胞増殖能についても検索した。

II. 対象および方法

1. サンプル

実験には、愛知学院大学歯学部附属病院でエプーリスと診断された 118 症例の生検および手術摘出による歯肉粘膜のホルマリン固定パラフィン包埋サンプルを使用した。男性 49 症例、女性 69 症例であり、66% (78/118) が義歯性エプーリスで、34.0% (40/118) は義歯を装着していない患者のエプーリスであった。

また、正常な歯肉粘膜 12 症例のサンプルを対照として用いた。

2. DNA 抽出

エプーリスと正常歯肉の連続した 6 μ m 切片を作製し、1 枚に HE 染色を施してエプーリスの過形成上皮および正常歯肉上皮を確認し、その後 5 枚の切片を DNA 抽出に使用した。

すべてのサンプルについて抽出した DNA の確認のため、 β -globin gene を PCR 法にて増幅して確認した。

3. PCR 解析

HPV 感染の分析には、高感度の HPV DNA の L1 領域を増幅する PCR 法を用いた。第一段階として、コンセンサスプライマー GP5/6 と GP5+/6+ を用いて HPV 感染のスクリーニングを行った。ここで陽性となったサンプルには、HPV 型特異的 PCR 法を用い、口腔粘膜疾患において多く検出されている LR-HPV-6、11 および HR-HPV-16、18、33 を検索した。

なお、HPV 型特異的 PCR 産物はダイレクトシーケンスを行い、HPV の型を確認した。

4. 病理組織学的・免疫組織化学的検索

PCR 検索で陽性となったサンプルの組織上での HPV タンパクを確認するために、抗 HPV マウスモノクローナル抗体を用いて検索を行った。また、対照の正常歯肉も同様に検索した。

5. *in situ* ハイブリダイゼーション

PCR 検索で陽性となったサンプルの組織上で HPV DNA を確認するために、HPV-6、11、16、18、30、31、33、35、45、51、52 を検出する Biotinylated DNA Probe を用いて検索した。また、対照の正常歯肉も同様に行った。

6. HPV-16 陽性義歯性エプーリスの細胞増殖能の免疫組織化学的検索

PCR による検索で HPV-16 陽性となった義歯性エプーリス (陽性群) と、陰性であった義歯性エプーリス (陰性群)、および義歯を装着していない患者からの HPV 陰性エプーリス (対照群) の過形成上皮の細胞増殖能を、免

疫組織化学的に検索した。抗 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体を使用して、陽性群と陰性群および対照群の各 10 症例を染色した。また、1 症例において任意の 5 ヶ所における上皮細胞 1,000 細胞あたりの陽性細胞数を確認した。

7. 統計学的解析

統計学的解析には、フィッシャーの直接確率検定法ならびに、一元配置分散分析とそれに続く多重比較を用いた。危険率は $p < 0.05$ をもって有意とした。

III. 結果

1. エプーリス過形成上皮の HPV 解析

本研究の結果、コンセンサス PCR における HPV 陽性率は、全サンプルの 16.9% (20/118) であった。性別で見た HPV 陽性率は、男性 14.3% (7/49)、女性 18.8% (13/69) であり、有意差は認められなかった。義歯性エプーリスの HPV 陽性率は 23.1% (18/78) で、義歯を装着していない患者のエプーリスでは 5.0% (2/40) であり、フィッシャーの直接確率検定を行ったところ両者の間には有意な差が認められた ($p < 0.05$)。対照群の正常歯肉では、すべての症例で HPV 感染はみられなかった。

HPV のタイプ別でみると、義歯性エプーリスでは HPV-11 が 38.9% (7/18)、HPV-16 が 66.7% (12/18)、HPV-18 が 5.6% (1/18) であった。義歯を装着

していない患者のエプーリスでは HPV-16 と HPV-18 が各々 1 症例ずつ認められた。陽性率の最も高かったタイプは HPV-16 であった。

病理組織学的には、義歯性エプーリスおよび義歯を装着していない患者からのエプーリス共に、上皮に過剰角化、棘細胞増殖、上皮突起の延長が認められた。免疫組織化学的検索では、HPV 陽性の義歯性エプーリスおよび義歯を装着していない患者からのエプーリス共に、上皮の細胞核に抗 HPV 抗体陽性像が認められた。また、*in situ* ハイブリダイゼーションでは、HPV 陽性の義歯性エプーリスおよび義歯を装着していない患者のエプーリス共に、上皮全層にわたり上皮の細胞核に陽性像がみられた。

2. HPV-16 陽性義歯性エプーリスの細胞増殖能

HPV-16 陽性義歯性エプーリス (陽性群) の上皮では、基底細胞層から上部の棘細胞層まで、多くの細胞核に PCNA 陽性像が認められた。HPV 陰性であった義歯性エプーリス (陰性群) では、陽性群と比較して PCNA 陽性像は少なく基底細胞層付近にみられた。また、対照群では、陰性群と同様な所見を示し、その数は少なかった。1,000 細胞あたりの PCNA 陽性細胞数は、陽性群では 113.3 ± 4.4 、陰性群では 57.3 ± 2.2 、対照群では 46.9 ± 4.7 となり、一元配置分散分析とそれに続く多重比較を行ったところ、各群の間で有意な差が認められ ($p < 0.01$)、陽性群では陰性群や対照群に比べ、陽性細胞数は多かった。

IV. 考察

本実験の結果は、義歯装着者の方が HPV 感染率が高い結果であり、前述したように、口腔内清掃の不良や義歯による慢性的な口腔粘膜への機械的刺激・化学的刺激などが HPV 感染率上昇の要因として考えられた。

また、義歯装着者の口腔粘膜では、悪性型である HPV-16 が多く検出され、義歯の装着が口腔粘膜疾患に関与していることが推測されると報告されている。本実験の結果も、義歯性エプーリスにおいて HR-HPV である HPV-16 が最も感染率が高かった。

HPV は、上皮の基底細胞に感染すると考えられている。このためには、皮膚や粘膜に外傷などが生じて角化層が破れ、そこからウイルス粒子が侵入し基底細胞層に至る必要がある。義歯装着と HPV 感染の関連において、この HPV 感染の特異性を考えると、義歯と口腔粘膜との摩擦や不適合義歯の辺縁の刺激によって口腔粘膜上皮が損傷されやすいために、義歯装着者では未装着者に比べて口腔粘膜に HPV が侵入・感染する機会が多くなることが推測される。さらに、義歯性エプーリスにおいては、通常の口腔粘膜より外方に増殖したエプーリスを覆う過形成上皮が、多くの慢性の刺激と炎症を被るため、角化層の破壊に伴う HPV の侵入が起き易くなり、基底細胞に感染する機会が増すことが容易に予想される。

PCNA は DNA 複製に関与し、盛んに増殖している細胞の核に多く発現することが知られている。本研究において、HPV-16 陽性群では、陰性群や対照

群に比べ有意に PCNA 陽性率が高い結果となった。これは、義歯性エプーリスの過形成上皮は正常上皮よりも増殖能が高く、中でも HPV-16 感染を起している過形成上皮が最も増殖能が高いことを意味し、HPV-16 の持続感染を起こすための適度な増殖刺激が感染細胞に加わっていることを示唆している。

本実験から、絶えず義歯より慢性刺激を受けている義歯性エプーリスの過形成上皮は、HPV-16 等の高リスク型 HPV 感染が起きやすく、義歯性エプーリスの過形成上皮が HPV 感染のリザーバーとして、口腔領域および中咽頭の HPV 関連疾患、特に扁平上皮癌等の発生に関与している可能性が考えられた。

V. 結論

義歯性エプーリス過形成上皮における HPV 感染と細胞増殖能を検索したところ、口腔および中咽頭の HPV 関連疾患の発生に関与するリザーバーである可能性が考えられた。