咽頭における高リスク型HPVの感染と中咽頭癌バイオマーカーとしての意義

福島県立医科大学医学部 耳鼻咽喉科学講座
教授　室野 重之

（共同研究者）
金沢大学医薬保健研究域医学系耳鼻咽喉科 頭頸部外科学　教授　吉崎 智一
金沢大学附属病院耳鼻咽喉科 頭頸部外科　医員　吉田 博

はじめに

子宮頸癌の原因はヒトパピローマウイルス（human papillomavirus, HPV）であることは周知であるが、中咽頭癌の一部にもHPV感染が関与していることが最近明らかになってきた[1,2]。米国では中咽頭癌におけるHPV陽性率は、1980年代の16％から2000年代初頭には72％まで著増しており、これは、オーラルセックスなど性交渉の多様化に起因すると言われている[3,4]。また、年間の患者数も、古典的なHPV関連癌である子宮頸癌は、2010年の８千人弱から2020年には６千人程度へ減少すると予想されているのに対し、中咽頭癌患者数は、2010年の１万人弱から2030年には１万６千人へと著増すると予想されており、今やHPV関連癌といえば中咽頭癌と言っても過言ではない。本邦では、2008年～2010年に行われた多施設共同研究により約50％であることが判明した。米国の動向を考慮すると、本邦においても今後HPV関連中咽頭癌が増加することは想像に難くない。

咽頭におけるHPV感染の現況は、性感染症外来患者やセックスワーカーなどの特殊な層を対象とした報告が大半である。本研究は、いわゆる癌年齢の健常人における咽頭HPV感染の状態を把握することを目的とする。

中咽頭癌がHPV関連であるか否かのコンセンサスは、HPV感染のサロゲートマ―カーであるp16に対する免疫組織化学染色であり、これは臨床病理においてほぼルーティン化されている。一方、バイオマーカーの視点からは、中咽頭癌の病勢を反映するバイオマーカーの検討はほとんど報告がない。本研究では、中咽頭癌患者において、うがい液や口蓋扁桃の擦過などの簡便に侵襲なく得られる検体中にHPVを検出することのバイオマーカーとしての意義を検証することも併せて目的とする。

対象と方法

中咽頭癌19例を含め、金沢大学附属病院耳鼻咽喉科・頭頸部外科において治療を行った耳鼻咽喉科疾患110例を対象とした。未成年者は除外した。十分な説明のうえ書面による

同意を取得できた患者を対象とし、治療開始前に、咽頭うがい液（以後うがい液）および口蓋扁桃擦過検体（以後扁桃擦過）を採取した。前者は、20mLの生理食塩水を用いて約20秒間うがいをした後に遠心し、沈渣を専用の液状細胞診保存液に保存した。後者は、擦過したブラシを専用の液状細胞診保存液に保存した。これらの検体からDNAを抽出し、すでに有用性の報告のあるGP5+/GP6+プライマーを用いたPCRによりHPV DNAを検出した。この際、36サイクルの１度のPCRと、それに続けて同一プライマーを用いて20サイクルの２度目のPCR（auto-nested PCR）を行い、検出能を比較した。HPVが検出された検体ではジェノタイプの同定も試みた。また、中咽頭癌症例では、組織におけるHPV検出のサロゲートマーカーとされるp16免疫染色も行い、うがい液および扁桃擦過の結果とも対比した。

結　果

１．HPV検出の方法

陽性対照を用いた検討では、GP5+/GP6+プライマーを用いたauto-nested PCRにより、HPV DNAの検出能が向上した(図１)。

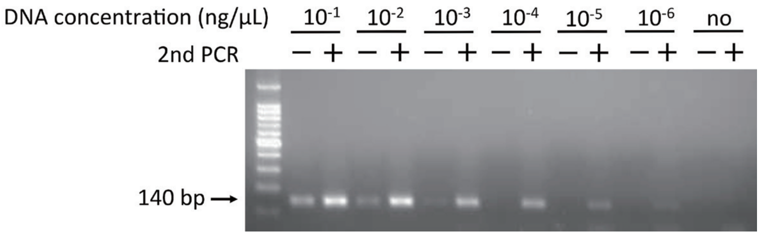

図1

２．対象者の詳細

上気道癌が66例（男性56例女性10例）で平均年齢は65.3歳であった。内訳は、中咽頭癌19例（男性15例女性４例）、喉頭癌15例（男性15例女性０例）、下咽頭癌13例（男性13例女性０例）、口腔癌９例（男性７例女性２例）、上咽頭癌７例（男性５例女性２例）、その他３例（男性１例女性２例）で、中咽頭癌の平均年齢は65.3歳、非中咽頭上気道癌の平均年齢も65.3歳であった。

非癌疾患は44例（男性18例女性26例）で平均年齢は54.5歳であった。内訳は、鼻副鼻腔疾患15例（男性３例女性12例）、甲状腺腫瘍８例（男性２例女性６例）、良性喉頭疾患７例（男性６例女性１例）、唾液腺腫瘍３例（男性１例女性２例）、その他４例（男性１例女性３例）であった。

３．咽頭うがい液および口蓋扁桃擦過検体におけるHPVの検出

中咽頭癌におけるHPV検出は、うがい液では9/19例（47.4%）、扁桃擦過では10/19例（52.6%）であった。非中咽頭上気道癌においては、うがい液では8/47例（17.0%）、扁桃擦過では4/47例（8.5%）であった。非癌疾患においては、うがい液では7/44例（15.9%）、扁桃擦過では4/44例（9.1%）であった。

４．中咽頭癌での咽頭うがい液および口蓋扁桃擦過検体におけるHPVの検出

中咽頭癌19例におけるp16に対する免疫染色では、p16陽性は12例、p16陰性は7例であった。

両群間に、年齢、性別、喫煙歴、T stage、N stage、亜部位（口蓋扁桃もしくは舌根部）に関して有意差を認めなかった。

p16陽性例におけるHPV検出は、うがい液では9/19例(47.4%)、扁桃擦過では10/19例(52.6%)であるのに対し、p16陰性例では、うがい液では0/7例(0.0%)、扁桃擦過でも0/7例(0.0%)であった。中咽頭癌において、p16免疫染色に対するうがい液でのHPV検出の感度は75%、特異度は100%、扁桃擦過でのHPV検出の感度は83%、特異度は100%であった。

図２に代表的な結果を示す。p16陽性のCase 1ではうがい液（OR)、扁桃擦過（Swab）ともに１度目のPCRでHPVを検出するが、p16陽性のCase 2ではOR、Swabともに１度目のPCRではHPVは検出されず、２度目のPCRにより検出されている。p16陰性のCase 3ではOR、Swabともに２度目のPCRにてもHPVは検出されていない。

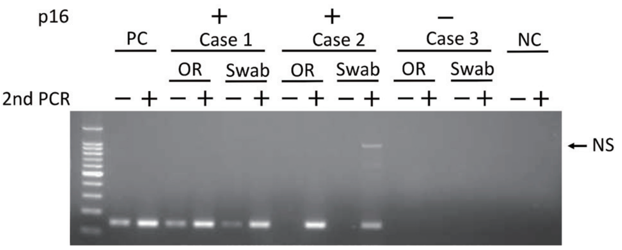

図2

５．中咽頭癌でのうがい液中HPV検出の治療前後での比較

p16陽性で治療前にうがい液中にHPVを検出した９例のうち８例において、治療後（5～15か月、平均9.6か月）に再検したところ、１例においてのみ陽性であり、残り７例は陰性であった。８例はいずれも再検時点では臨床的に明らかな残存腫瘍を認めなかった。

６．HPV検出例におけるジェノタイピング

HPVが陽性であったうがい液と扁桃擦過の計40検体においてHPVのジェノタイピングを施行したところ、14例（35%）においてジェノタイプの同定が可能であった。p16陽性中咽頭癌ではうがい液4/9例、扁桃擦過4/10例においてHPV16を検出した。扁桃擦過では１例にHPV58を検出した。非中咽頭上気道癌では、うがい液1/7例、扁桃擦過1/5例においてHPV16を検出した。非癌疾患では、うがい液1/7例、扁桃擦過2/3例においてHPV16を検出した。いずれも高リスク型HPVの単一サブタイプの感染で、複数感染は認めなかった。

考　察

米国では、健常人のHPV感染率は、5.7～8.3%と報告されている[2)]一方で、今回の研究では、非がん患者のうがい液中HPV陽性率は15.9%と過去の報告と比較し高い結果であった。PCRを２回行うことで、検出率が上昇したことがその要因として推測され、Remmerbacheらによって報告されたauto-nested GP5+/GP6+ PCRの有用性[5)]に裏付けられる結果である。したがって、auto-nested PCRはウイルス量が少ない検体の場合に有用であると考えられた。また、HPV関連中咽頭癌におけるうがい液中HPV陽性率は39 ～ 54%との報告だが[6)]、今回の研究では75%と高い陽性率であり、この点からもauto-nested PCRの有用性が支持される。

HPV陽性中咽頭癌のうち、うがい液中HPVが陰性であった3例中2例においては、亜部位が舌根部であり粘膜下病変であった。HPV陽性中咽頭癌において亜部位に関して検討すると、うがい液中のHPV陽性率は口蓋扁桃が8/9例（89%）、舌根部が1/3例（33%）であった。以上より、うがい液では舌根部病変より口蓋扁桃病変の方がよりHPVが検出されやすいことが示された。Wangらも同様に、舌根部病変（24%）よりも口蓋扁桃病変（67%）の方がより検出率が高かったと報告している[7]。

今回の研究では、うがい液と扁桃擦過検体のHPV検出の一致率は、中咽頭癌では94.7%、非中咽頭上気道癌では85.1%、非癌疾患では79.5%と高く、また、p16免疫染色結果との比較では、うがい液の感度、特異度はそれぞれ75%（9/12）、100%（7/7）、扁桃擦過の感度、特異度はそれぞれ83.3%(10/12)、100%(7/7)であった。非侵襲的なうがい液という方法は、HPV検出において、扁桃擦過に劣らず有用であることが示された。

最後に、興味深いことに、治療前にうがい液中にHPVを認めた中咽頭癌8例において、治療後には7例で検出不可であった。評価時点では全例再発を認めておらず、うがい液中HPVはHPV関連中咽頭癌の病勢を反映する可能性がある。Rettigらは、治療後のうがい液中HPV DNAの存在が、無増悪生存率、全生存率の低下と関連していると報告しており[8]、本研究においても長期的な観察を続けていく予定である。なお、本報告の内容は現在英文誌に投稿中である。

要　約

GP5+/GP6+プライマーを用いたauto-nested PCRにより、咽頭うがい液および口蓋扁桃擦過検体中のHPV DNAの検出感度が高まることを見いだした。この方法を用いた検討により、非癌疾患患者（本研究ではセックスワーカーなどHPV感染の高リスクにない健常人の代替とした）における咽頭のHPV感染は、従来報告されてきた5～10%よりも高く15%程度であることが示唆された。また、HPV陽性中咽頭癌では、うがい液中に高率にHPV DNAを検出することができ、診断において有用であるのみならず、治療後のうがい液中HPV DNAは病勢を反映する可能性があり、バイオマーカーとして有用であると思われた。

文　献

1. Chaiwongkot A, Pientong C, Ekalaksananan T, et al. Evaluation of primers and PCR performance on HPV DNA screening in normal and low grade abnormal cervical cells. Asian Pac J Cancer Prev 8:279-282,2007.
2. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, et al. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. JAMA 307:693-703,2012.
3. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal

cancer incidence in the United States. J Clin Oncol 29:4294-4301,2011.

4. Edelstein ZR, Schwartz SM, Hawes S, et al. Rates and determinants of oral human papillomavirus (HPV) infection in young men. Sex Transm Dis 39:860-867,2012.
5. Remmerbach TW, Brinckmann UG, Hemprich A, et al. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. J Clin Virol 30:302-308,2004.
6. Dang J, Feng Q, Eaton K, Jang H, Kiviat NB. Detection of HPV in oral rinse samples from OPSCC and non-OPSCC patients. BMC Oral Health 215:126,2015.
7. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, et al. Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. Sci Transl Med 7:293ra104,2015.
8. Rettig EM, Wentz A, Posner MR, et al. Prognostic implication of persistent human papillomavirus type 16 DNA detection in oral rinses for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinoma. JAMA Oncol 1:907-915,2015.