

再発を繰り返す結膜乳頭腫において ヒト乳頭腫ウイルス 11 型が検出された一例

児玉 俊夫* 鳥山 浩二 廣畑 俊哉
野田遼太郎 北畑 真美 上甲 武志
水野 洋輔** 大城 由美

要 旨

結膜乳頭腫はまれであり、結膜腫瘍の 1.4% を占めるにすぎない。今回我々は腫瘍切除を行うたびに再発した結膜乳頭腫の一例を報告する。

症例は 26 歳男性で左眼の結膜腫瘍のため近医を受診して当科を紹介された。左眼の涙丘から眼瞼結膜および眼球結膜に腫瘍を認めた。結膜腫瘍全体を切除し、病理組織診断は結膜乳頭腫であった。当科への受診は術後 1 回のみで、以後 20 カ月にわたって受診が途絶えていた。左眼の結膜腫瘍が再発したため再び当科で紹介となった。広範囲にわたる結膜乳頭腫を切除して結膜欠損部に対して羊膜移植を行った。約 2 カ月後に移植した羊膜の隣接部に腫瘍が再発したために切除し、切除した試料は免疫組織化学および DNA 検査を行った。

病理組織診断では腫瘍細胞の核腫大や核周囲に空胞がみられる Koilocytosis を認め、ヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の感染が示唆された。免疫組織化学的所見として腫瘍内に HPV 蛋白質の発現は明らかではなかったが、HPV の代替マーカーとして用いられる p16 の発現が認められた。Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism 法により DNA 解析を行ったところ本症例で検出されたウイルスは HPV 11 型と同定された。

はじめに

結膜乳頭腫は結膜の重層扁平上皮からはじまる疣状に隆起した良性腫瘍で、樹枝状に伸びた線維血管性間質が芯となり腫瘍細胞が乳頭状に成長している。結膜腫瘍のうち結膜乳頭腫の発症頻度は欧米人のデータであるが、成人では結膜腫瘍 5,002 例中乳頭腫は 68 例で結膜腫瘍の 1.4% を占めるにとどまり、比較的頻度の低い腫瘍と言える¹⁾。今回我々は腫瘍切除を行うたびに再発した結膜乳頭腫を経験した。その病因を明らかにするために免疫組織化学および遺伝子学的に検討した結膜乳頭腫の一例を報告する。

症 例

症 例：26 歳男性

主 訴：左眼の多発性結膜腫瘤

現病歴：20XX 年 5 月下旬に左眼瞼裂よりはみ出した腫瘤に気づき、近くの眼科を受診したところ左眼の結膜腫瘍を指摘され、紹介されて 6 月上旬当科を受診した。

既往歴：特記事項なし

家族歴：特記事項なし

初診時所見：視力は右眼 0.03 (1.0 × sph - 3.5D)、左眼 0.07 (1.5 × sph - 4.5D = cyl - 0.5D A75°)。眼圧は右眼 17 mmHg、左眼 17 mmHg であった。両

*松山赤十字病院 眼科

**松山赤十字病院 病理診断科

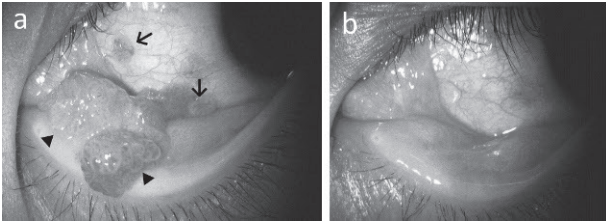


Fig. 1 初診時および1回目手術後の前眼部写真

- 術前 左眼の涙丘部から下眼瞼結膜に連続する腫瘍病変 (▲) と眼球結膜に点在する小腫瘍 (↓) を認める。
- 術後 結膜腫瘍は摘出されている。

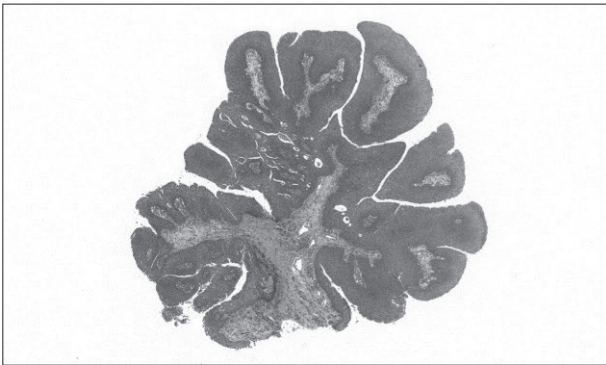


Fig. 2 1回目手術時の摘出腫瘍 (HE 染色) 桑の実状に発育する有茎の腫瘍を認める。

眼瞼皮膚には著変を認めなかったが、左眼瞼結膜、眼球結膜および涙丘に多数の大小さまざまな結膜腫瘍を認めた (Fig. 1a)。両眼の中間透光体および眼底には著変を認めなかった。

治療経過：7月上旬、局所麻酔下で左眼の下眼瞼内側から外側にかけて生じた眼瞼結膜腫瘍を切除し、出血部は電気凝固して止血した。左上眼瞼にも内側から涙丘部に連続した腫瘍を切除したところ、結膜欠損部が大きかったために上方の眼球結膜を剝離して被覆した (Fig. 1b)。摘出腫瘍はホルマリン固定、アルコール脱水、パラフィン包埋を行って薄切切片を作成、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色後、病理組織診断を行った。

病理組織所見：腫瘍は乳頭状に増殖していた。肥厚した重層扁平上皮がみられ、その下に血管性間質を伴っていた。外向性で乳頭状に増殖した腫瘍細胞には核の異型性はみられないために乳頭腫と診断された (Fig. 2)。

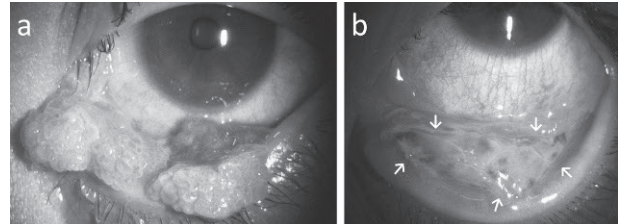


Fig. 3 腫瘍再発時および羊膜移植術後の前眼部写真

- 術前 涙丘部から眼瞼結膜全体に広がり隆起した腫瘍病変を認める。
- 羊膜移植術後 下眼瞼全体の結膜腫瘍を摘出して羊膜を移植した。矢印は移植した羊膜の辺縁を示す。

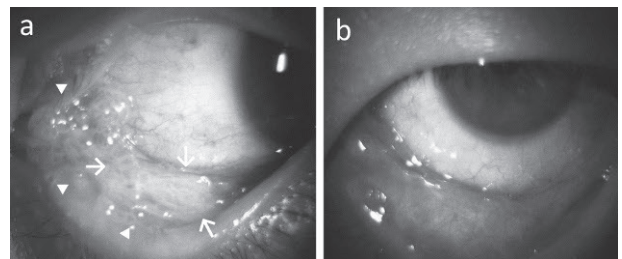


Fig. 4 羊膜移植後の再発と術後の前眼部写真

- 羊膜移植後に再発した腫瘍 再発した腫瘍 (▲) と矢印で示す移植羊膜には腫瘍の再発は認めなかった。
- 術後11日目 結膜腫瘍は摘出されている。

当科への受診は術後の1週間後1回のみでその時点での腫瘍の再発はみられなかったが、以後20ヵ月間受診が途絶えていた。左眼の結膜腫瘍が再発したために再び紹介され、20XX+2年3月上旬当科を受診した。左眼の涙丘部から下眼瞼結膜全体に隆起する腫瘍および球結膜に多発する腫瘍を認めた (Fig. 3a)。4月初旬に左眼の涙丘から下眼瞼結膜および球結膜の腫瘍を一塊として切除し、下眼瞼の広範囲に生じた結膜欠損部に対して羊膜移植を行った (Fig. 3b)。5月下旬の受診時に腫瘍の再発を認めた。下眼瞼結膜欠損部に行った羊膜移植部には再発を認めなかったが、羊膜移植に隣接した結膜および涙丘部の結膜に腫瘍の再発を認めたために (Fig. 4a)、切除した (Fig. 4b)。その後も再発を認めたため7月上旬、7月下旬、9月上旬にも再発腫瘍を切除したが、そのたびに結膜乳頭腫は再発を繰り返している。

5月下旬の再発 (Fig. 4a) では摘出腫瘍より得ら

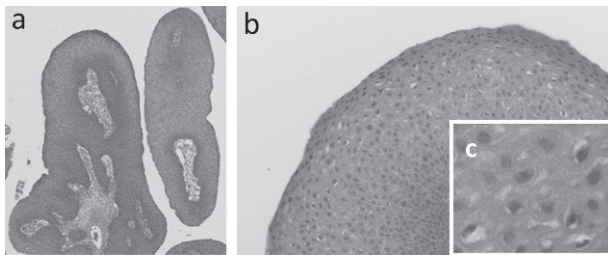


Fig. 5 2回目に再発した腫瘍の病理組織 (HE 染色)

- 乳頭状に再発した腫瘍 (×40)
- Koilocytosis: 重層扁平上皮の表層に核周囲が空胞化している細胞が点在している (×200).
- Koilocytosis を生じた細胞の強拡大 (×400)

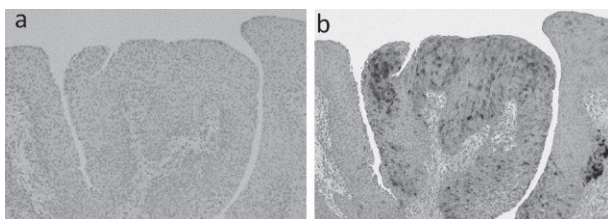


Fig. 6 再発腫瘍における HPV 蛋白質と p16 の局在

- HPV 蛋白の発現は認めなかった。
- 重層扁平上皮細胞層に p16 の局在を認めた。

れた薄切切片を HE 染色と免疫組織化学的検討としてヒトパピローマウイルス (HPV) 蛋白質と p16 蛋白質の発現を検討した。さらに腫瘍から抽出した DNA を用いて腫瘍内に HPV のウイルスゲノムが存在するかどうか遺伝子解析を行った。

病理組織所見: 腫瘍は乳頭状に増殖していた (Fig. 5a) が, 肥厚した重層扁平上皮の表層で腫瘍細胞の核腫大や核周囲に空胞がみられる細胞空胞症 (Koilocytosis) がみられた (Fig. 5b, c)。

免疫組織学的所見: 本症例では腫瘍内には HPV 蛋白質の発現は明らかではなかったが (Fig. 6a), p16 の発現が認められた (Fig. 6b) (株式会社ビー・エム・エルにて施行)。

遺伝子解析: 摘出腫瘍より得られた DNA は Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) 法により摘出腫瘍に HPV のウイルスゲノムが存在しているかどうか検討した。試料の処理まで冷凍保存した腫瘍から抽出された DNA は特異プライマーを用いた

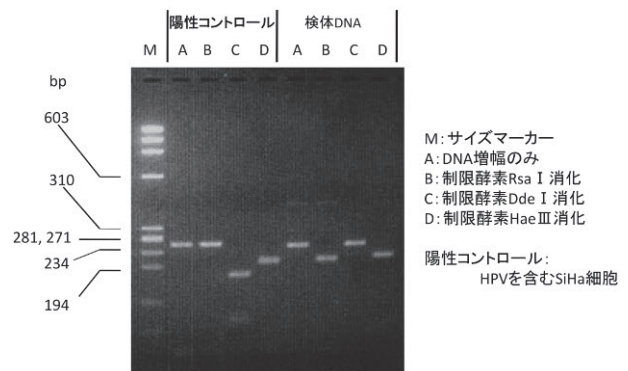


Fig. 7 結膜乳頭腫における HPV 11 のウイルスゲノムの発現

PCR により HPV の目的遺伝子領域を増幅し, 制限酵素を用いて切断した後, 電気泳動によるバンドパターンを既知のデータと比較した。本症例で検出されたウイルスは HPV 11 型と同定された (Fig. 7) (株式会社エスアールエルで施行)。

本症例では HPV 11 型の感染が明らかとなったので, 他の部位に乳頭腫の合併がないかどうか, 本人の同意を得た上で視診にて確認した。全身に疣状病変はなく, 外陰部および肛門周囲に乳頭腫状病変がないことより HPV 11 型の感染は結膜に限定していることが明らかとなった。

考 察

結膜乳頭腫の特徴として好発年齢を検討すると, Kaliki S らの報告では結膜乳頭腫の発症は 21 歳から 60 歳代に多くみられ, 平均年齢は 43 歳と比較的若い年齢層にピークを示している。性別で比較すると男性は女性より 2 倍弱の発症がみられている²⁾。本症例のように結膜乳頭腫は若い男性に多く発症するという特徴があるが, この年齢層は尖圭コンジロームの好発年齢でもある³⁾。尖圭コンジロームは HPV 6 型, 11 型, 16 型が感染することにより, 外陰部や肛門周囲に乳頭状の丘疹が多発する性感染症の一種である³⁾。そのため以前より HPV 感染と結膜乳頭腫の発症との関連性が考えられていた。

尖圭コンジロームの病理組織学的特徴として Koilocytosis があげられる⁴⁾。Koilocytosis とは肥厚した重層扁平上皮層において核腫大や核周囲の空胞化がみられる現象で, HPV が感染した細胞の核に

においてウイルス粒子の複製を行うために空胞が生じるものである。本症例のように再発を繰り返す結膜乳頭腫において Koilocytosis が認められたことは HPV の感染を示唆するものであるが、結膜乳頭腫の病因として HPV の関与があるかどうか、摘出腫瘍を用いて免疫組織化学的および遺伝子学的に検討した。

まず腫瘍組織において HPV 蛋白質が発現しているかどうか調べたが、HPV の感染は証明できなかったために p16 の免疫組織染色を行った。p16 はサイクリン依存性キナーゼインヒビターで細胞周期において中心的役割を果たすががん抑制遺伝子蛋白質である。HPV の初期遺伝子は E1 から E7 までであるが、そのうち E6 蛋白質はがん遺伝子である p53 と結合し、E7 はがん抑制遺伝子である Rb と結合してそれぞれ不活化させると代償的に p16 蛋白質が過剰に発現される⁵⁾⁶⁾。すなわち HPV の感染によって p16 の発現が陽性であれば間接的ではあるが HPV 感染が生じていると考えることができる。そのため HPV 関連中咽頭癌では p16 は HPV 感染の代替マーカーとして用いられている⁵⁾。本報告でも p16 の発現が重層扁平上皮層にみられ、HPV 感染が生じていると考えることができる。さらに腫瘍内における HPV ウイルスゲノムの発現を PCR-RFLP 法により検討したところ、本症例では HPV 11 型ウイルスが感染していることが明らかとなった。

わが国では以前より結膜乳頭腫において HPV の感染がみられるという報告が散見される⁷⁾⁸⁾。Sjö NC によると結膜乳頭腫における HPV ウイルスゲノムの発現率は 106 例中 86 例と 81% をしめ、型別では低リスク型である 6 型は 80 例、11 型は 5 例であった⁹⁾。正常結膜からは HPV のウイルスゲノムは検出されていない⁹⁾。なお、現在子宮頸癌の原因ウイルスと考えられている高リスク型 16, 18 型⁶⁾ が結膜乳頭腫より検出されたという報告は知られていないが、結膜の扁平上皮癌からは HPV 16 型が検出されたという報告がある¹⁰⁾。即ち低リスク型の HPV 感染が結膜乳頭腫の発症の危険因子である可能性は高い。

結膜乳頭腫の治療であるが、治療の原則は手術切除である。再発の頻度として術後の観察期間による

が、Kaliki らは 3% と報告している²⁾一方で、Huang Y-M らは 23% と報告しており、繰り返す結膜乳頭腫の再発は扁平上皮癌を発症すると報告している¹¹⁾。結膜乳頭腫切除においては腫瘍の取り残しを防ぐために正常結膜を含めた拡大切除が必要である¹²⁾が、結膜欠損部が大きくなれば瞼球結膜癒着を生じるために眼球運動障害や眼瞼内反症などを生じることがある。その予防のためには羊膜移植が有効である¹³⁾。羊膜は基底膜と実質を有しているために結膜の代用となるだけでなく、炎症や線維化を抑制するために術後の癒着の防止にも効果があるといわれている¹³⁾。本症例では 2 回目の再発で羊膜移植を併用したが、術後の再発は羊膜の隣接結膜で移植羊膜上には結膜乳頭腫は再発していない。腫瘍切除においては Theotoka D らは手術時における注意点として、腫瘍切除の際はウイルスの散布を最小限にするために 'no-touch' wide resection を勧めている。さらに腫瘍切除時には乳頭腫の上皮細胞を死滅させるために冷凍凝固、それも double-freeze thaw technique を推奨している¹²⁾。

扁平上皮癌など結膜悪性腫瘍では外科的切除後の再発に対して、局所化学療法としてインターフェロン、5-fluorouracil (5-FU)、Mitomycin C (MMC) の点眼投与が用いられてきた。しかしインターフェロンは保険適応外であり、結膜乳頭腫の再発を抑制する効果がないという報告¹⁴⁾があり、その評価は定まっていない。5-FU と MMC は抗がん剤のために適応外使用には病院内の倫理委員会での承認が必要である。さらに点眼時の眼痛をはじめ、薬剤毒性による角膜上皮障害、角膜輪部幹細胞機能不全による角膜混濁など重篤な副作用を伴うために安易には治療に用いることができないという問題がある。

結膜乳頭腫における再発の問題点は再発性呼吸器乳頭腫症の治療においても切実な問題となっている¹⁵⁾。再発性呼吸器乳頭腫症は結膜乳頭腫と同じく低リスク型である HPV 6, 11 型ウイルスが感染して発症する疾患で大半は喉頭乳頭腫症が占めている。外科手術後に喉頭乳頭腫症に対する治療として、最近ではパルス色素レーザーや光線力学療法が導入されてきたがやはり再発頻度は高いといわれている。最近では結膜乳頭腫でも同様に二酸化炭素レー

ザー照射による治療が行われるようになり、再発頻度が低下してきたとの報告もある¹²⁾。子宮頸癌ではその予防効果が示されているHPVワクチンによる結膜乳頭腫の再発予防の実用化やあたらしい治療法の開発が期待される。

文 献

- 1) Shields CL. *et al* : Conjunctival tumors in 5002 cases. Comparative analysis of benign versus malignant counterparts. The 2016 James D. Allen Lecture. *Am J Ophthalmol* **173** : 106-133, 2017.
- 2) Kaliki S. *et al* : Conjunctival papilloma: features and outcomes based on age at initial examination. *JAMA Ophthalmol* **131** : 585-593, 2013.
- 3) Anic GM. *et al* : Incidence and human papillomavirus (HPV) type distribution of genital warts in a multinational cohort of men: The HPV in men study. *J Infect Diseases* **204** : 1886-1892, 2011.
- 4) Krawczyk E. *et al* : Koilocytosis. A cooperative interaction between the human papillomavirus E5 and E6 oncoproteins. *Am J Pathol* **173** : 682-688, 2008.
- 5) El-Naggar AK. *et al* : p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck* **34** : 459-461, 2012.
- 6) 温川恭至ほか：ヒトパピローマウイルスによる発がんの分子機構. *ウイルス* **58** : 141-154, 2008.
- 7) 伊藤由香ほか：*In situ* hybridization法を用いてヒトパピローマウイルスを検出した結膜乳頭腫の再発例. *臨眼* **57** : 29-32, 2003.
- 8) Takamura Y. *et al* : Detection of human papillomavirus in pterygium and conjunctival papilloma by hybrid capture II and PCR assays. *Eye* **22** : 1442-1445, 2008.
- 9) Sjö NC. *et al* : Human papillomavirus in normal conjunctival tissue and in conjunctival papilloma: types and frequencies in a large series. *Br J Ophthalmol* **91** : 1014-1015, 2007.
- 10) Griffin H. *et al* : Human papillomavirus type 16 causes a defined subset of conjunctival *in situ* squamous cell carcinomas. *Mod Pathol* **33** : 74-90, 2020.
- 11) Huang Y-M. *et al* : Conjunctival papilloma: Clinical features, outcome, and factors related to recurrence. *Taiwan J Ophthalmol* **8** : 15-18, 2018.
- 12) Theotoka D. *et al* : Update on diagnosis and management of conjunctival papilloma. *Eye and Vision* **6** : 18-35, 2019.
- 13) Agrawal U. *et al* : Fresh frozen amniotic membrane for conjunctival reconstruction after excision of neoplastic and presumed neoplastic conjunctival lesions. *Eye* **31** : 884-889, 2017.
- 14) Galor A. *et al* : Human papillomavirus infection does not predict response to interferon therapy in ocular surface squamous neoplasia. *Ophthalmology* **122** : 2210-2215, 2015.
- 15) Goon P. *et al* : Recurrent respiratory papillomatosis: An overview of current thinking and treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **265** : 147-151, 2008.

A case of recurrent conjunctival papilloma infected with human papillomavirus type 11

Toshio KODAMA*, Kouji TORIYAMA, Shunnya HIROHATA, Ryotaro NODA,
Mami KITAHATA, Takeshi JOKO, Yosuke MIZUNO** and Yumi OSHIRO

*Department of Ophthalmology, Matsuyama Red Cross Hospital

**Department of Pathology, Matsuyama Red Cross Hospital

Conjunctival papilloma is rare on conjunctival tumors with a rate of occurrence of 1.4%. We present a 26-year-old male who was admitted to a local eye clinic and was diagnosed with left conjunctival tumor. He was then referred to our hospital. He showed an extended papillomatous lesion on left conjunctival caruncle and conjunctiva on tarsus of the lower eyelid. The whole conjunctival tumor was removed, and its pathological diagnosis was conjunctival papilloma. He visited our clinic once after surgery and no more therapy was continued. Twenty months later, he was referred our clinic because of recurrent conjunctival papilloma. The conjunctival lesion required wide excision with tumor-free margins and an amniotic membrane was used to cover the conjunctival defect. Approximately two months later, recurrent tumors were observed adjacent to the transplanted amniotic membrane. The lesions were removed surgically and sent to the laboratory for immunohistochemical and DNA analysis. After the third surgery, two more tumor excisions were required. On pathological finding, koilocytosis which is thought to be human papillomavirus (HPV) infection, with appearance of hyperchromatic nucleus with displaced perinuclear vacuoles was observed. Although immunohistochemical staining of HPV protein was negative, p16 expression as a surrogate marker for HPV was positive. Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism for DNA analysis showed the presence of HPV type 11. According to morphological and genetic findings this case was diagnosed with conjunctival papilloma due to HPV type 11.