

子宮頸癌関連病変における HPV DNA 局在に 関する分子生物学的検討

—In situ hybridization による解析—

広島大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 藤原 篤教授)

永井 宣隆 木岡 寛雅 重政 和志 藤原 篤

In situ Hybridization Study on the Localization of HPV DNA in the Precancerous Lesions of Uterine Cervix

Nobutaka NAGAI, Hiromasa KIOKA, Kazushi SHIGEMASA
and Atsushi FUJIWARA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima
(Director: Prof. Atsushi Fujiwara)

概要 子宮頸癌組織中に高率に分離、同定されるヒトパピローマウイルス (HPV) DNA の局在をビオチン標識した HPV 6, 11, 16および18型 DNA プローブを用いた in situ hybridization を行ない、子宮頸癌関連病変である異形成について検討し、HPV と子宮頸部の発癌との関連性について考察した。対象は生検で得られた各種異形成 (軽度22例, 中等度33例, 高度31例) 症例と正常な子宮頸部扁平上皮10例のホルマリン固定, パラフィン包埋切片を用い、一部の異形成症例は6ヵ月以上の prospective な追跡調査も行ない、以下の成績を得た。

- 1) 正常子宮頸部扁平上皮では今回、HPV DNA は陰性であった。
- 2) HPV DNA は軽度異形成ではおもに上皮の表層に近い koilocytotic atypia (koilocytosis) を示す細胞の核に、中等度異形成では koilocytosis や一部異型細胞の核に、高度異形成ではおもに異型細胞の核に観察され、上皮のほぼ全層に HPV DNA が検出された症例も認めた。
- 3) HPV 陽性の異形成組織に近接する扁平上皮化生細胞の核にも異型細胞と同じ type の HPV DNA の検出された症例が10例中5例あった。
- 4) 組織別の各 HPV DNA の検出率は HPV 6/11型が異形成の進行とともに減少するのに対し、16型は軽度異形成18.2% (4/22), 中等度異形成36.4% (12/33), 高度異形成61.3% (19/31) と増加した。また、18型については、一定の傾向は認められなかった。
- 5) 6ヵ月以上の prospective な追跡調査でとくに16型 DNA 陽性の異形成で後に上皮内癌など進行した病変の発見された症例を認めた。

以上より子宮頸癌関連病変において、HPV DNA は異型細胞、koilocytosis の核に局在した。HPV DNA の type では追跡調査症例を含めて異形成の進行とともに16型 DNA の検出率が上昇し、16型陽性の異形成症例は子宮頸部の癌化との関連で十分な検索の必要性が示唆された。

Synopsis Human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 have been found closely associated with cervical cancer. In order to investigate the relationship between HPV DNA and cervical precancerous lesions, we examined the formalin fixed specimens obtained from 22 cases of mild dysplasia, 33 cases of moderate dysplasia and 31 cases of severe dysplasia of the uterine cervix for the presence of HPV 6/11, 16 and 18 DNAs by in situ hybridization using the biotinylated HPV DNA probes. We also followed some HPV DNA positive cases of cervical dysplasia for more than 6 months prospectively.

The results of in situ hybridization analysis revealed that HPV DNA was detected in the nuclei of koilocytosis, dysplastic cells and metaplastic cells. HPV 6/11 was positive in 27.3% (6/22) of mild dysplasia and 21.2% (7/33) of moderate dysplasia. On the other hand, HPV 16 positive rate increased with the grade of dysplasia and 36.4% (12/33) of moderate dysplasia, 61.3% (19/31) of severe dysplasia were positive for HPV 16 DNA. Some of the follow-up cases which were positive for HPV 16 DNA were later

found to have carcinoma in situ.

Our results suggest that HPV type 16 might play an important role in cervical carcinogenesis.

Key words: Human papillomavirus • In situ hybridization • Cervical precancerous lesions

緒 言

近年、子宮頸癌組織中に特定のヒトパピローマウィルス (HPV) DNA が高率に検出され、子宮頸癌の発生と HPV 感染との関連性が注目されている。すなわち、西独の zur Hauzen 学派により子宮頸癌組織に HPV 16型や18型 DNA が分離、同定されたのに始まり⁴⁾⁹⁾、現在数種類の子宮頸癌に特有な type の HPV DNA が発見されている。しかも癌組織中の HPV DNA は癌細胞やある種の子宮頸癌培養細胞株 (HeLa, CaSki) の DNA に組み込まれた状態 (integration) で存在しており⁴⁾¹⁷⁾²³⁾、HPV は子宮頸部の発癌機構を解明する上で重要な役割を演じている。

そこで、われわれはとくに子宮頸癌の関連病変である各種異形成の段階における HPV DNA の組織内局在と HPV の type を同定する目的で、ビオチン標識した各種 HPV DNA プローブによる in situ hybridization から検討し、子宮頸癌関連病変における HPV DNA 検出の重要性と発癌との関連性について考察した。

研究対象と研究方法

研究対象は、1983年から1988年の間に広島大学医学部付属病院産婦人科外来を受診し、生検により異形成と診断された婦人86例である。各種異形成は WHO 分類に基づき軽度異形成22例、中等度異形成33例、高度異形成31例で、それぞれホルマリン固定、パラフィン包埋された生検組織切片を使用した。そして一部の異形成症例は6ヵ月から5年間の prospective な追跡調査を行ない、検出された HPV の type と病変の進行の有無との関連性を追求した。また、対照として正常子宮頸部扁平上皮の10例についても同様に検討を行なった。

研究方法は、あらかじめ poly-L-lysine (分子量15万: Sigma) でコーティングしたスライドグラスに各組織の連続切片をのせ、脱パラフィン後、0.1N 塩酸に5分間、1 μ g/ml proteinase K に10分間それぞれ浸漬した後、4% paraformaldehyde

液で30分間再固定した。そして0.25%無水酢酸を含む0.1M Tris・HCl 溶液中で10分間アセチレーションした後、nick translation によりビオチン標識した1 μ g/ml の各 HPV (6/11, 16, 18型) DNA を含む50%formamide 溶液を加え、DNA 変性を行なった後、42℃の stringent condition 下で平均15時間 DNA-DNA in situ hybridization を行なった⁸⁾¹²⁾。その後、2 $\times$ SSC 液で数回洗滌後、1 μ g/ml のストレプトアビジン標識アルカリフォスファターゼを加えて室温で10分間放置し、緩衝液で数回洗滌後、基質の NBT (nitroblue tetrazolium) と BCIP (5-brom-4-chloro-3-indolylphosphate) を加え暗所で約2時間静置した後鏡検した。

なお、今回プローブの選択にあたり、HPV 6型と11型は良性疾患に多いため両者を混合したプローブ6/11型として使用し、子宮頸癌に多い16型、18型と比較検討した。

研究成績

今回対照として検索した正常子宮頸部扁平上皮10例では、HPV DNA の検出された症例は認められなかった。

軽度異形成では、軽い核異型と大小不同を示す異型細胞層が上皮の深層に認められ、表層では核周囲に明瞭な空洞 (halo) を有する koilocytotic atypia (koilocytosis) も観察された。In situ hybridization より軽度異形成症例の HPV DNA は主に koilocytosis を示す細胞の核に観察され、中層に比べ表層に近い細胞の核により強く検出された (写真 1A, B)。

中等度異形成では、HPV DNA は上皮の表層に近い koilocytosis の核と、一部上皮の中層に存在する異型細胞の核にも観察された。そして、HPV DNA は異型細胞に比べ表層に近い koilocytosis の核に強く検出された。HPV の type では6/11型 DNA 陽性例 (写真 2A, B)、16型 DNA 陽性例 (写真 3A, B)、そして18型 DNA 陽性例を認めたが、中等度異形成症例で感染した HPV の type の違

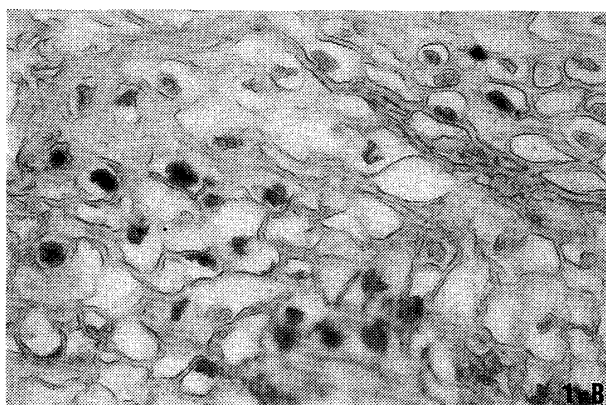
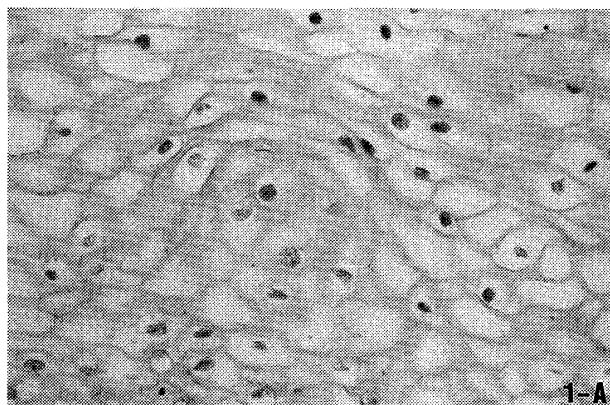


写真 1A, B 軽度異形成. A: H-E 染色. B: In situ hybridization. HPV 6/11型 DNA が koilocytosis の核に認められた (各×200).

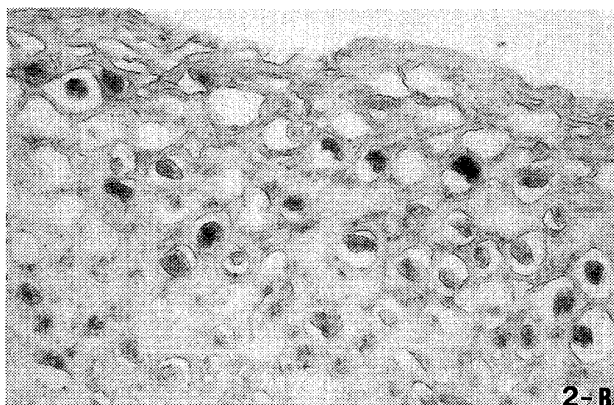
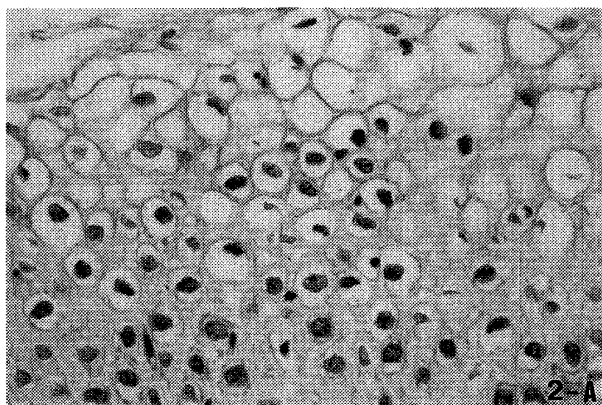


写真 2A, B 中等度異形成. A: H-E 染色. B: In situ hybridization. HPV 6/11型 DNA が koilocytosis, 異型細胞の核に検出された (各×200).

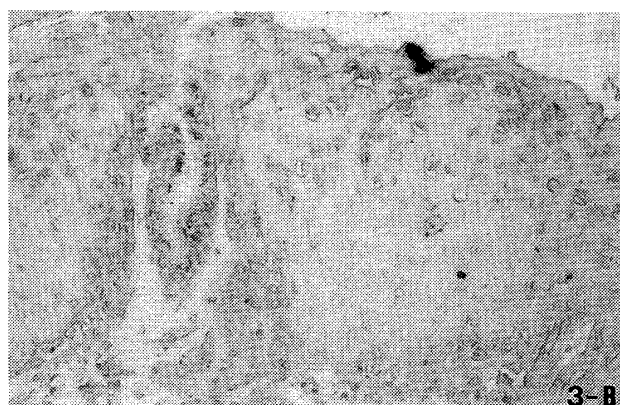
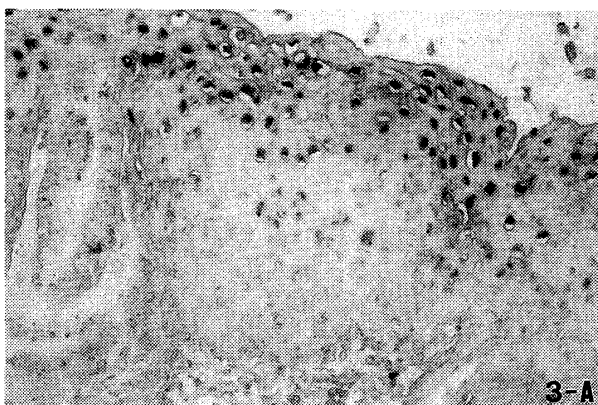


写真 3A, B 中等度異形成. A: In situ hybridization. HPV 16型 DNA が異型細胞, koilocytosis の核に観察された. B: In situ hybridization. HPV 6/11型 DNA は陰性であった (各×100).

いによる明らかな細胞形態の変化, 感染部位の相違は認められなかった。

高度異形成では粗大顆粒状のクロマチンを有

し, 濃染した大小不同の核を持つ未分化な異型細胞が極性を失った状態で上皮の 3 分の 2 以上を占めており, 異常核分裂像も散見された。また, 上

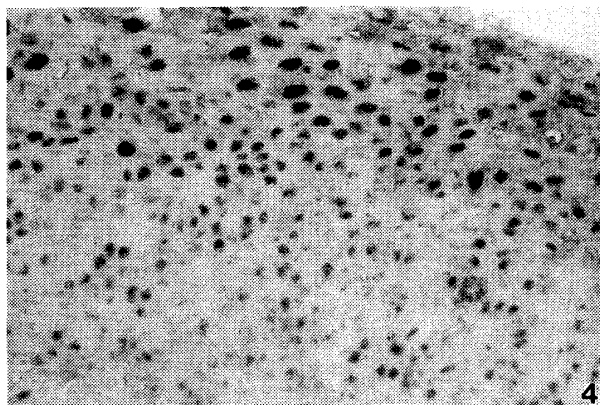


写真4 高度異形成. In situ hybridization. HPV 16型 DNA が上皮のほぼ全層の異型細胞の核に検出された (×200).

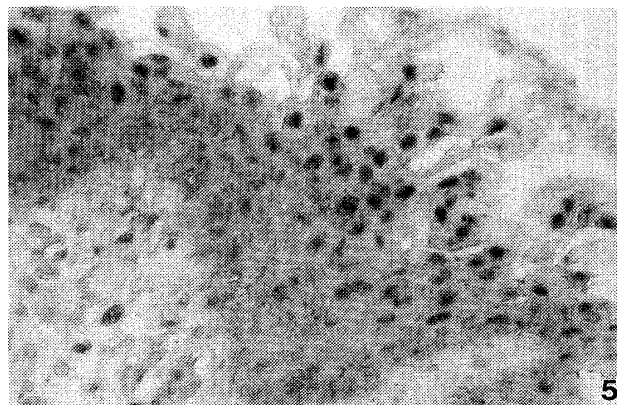


写真5 異形成症例の扁平上皮化生細胞. In situ hybridization. HPV 18型 DNA が化生細胞の核に観察された (×200).

皮の表層には koilocytosis を伴う症例も認めた. 高度異形成症例における HPV DNA の局在は, 異型細胞の核や表層の koilocytosis を示す細胞の核に検出された. また, 高度異形成症例の中には HPV DNA が上皮の中層および深層を含めたほぼ全層の異型細胞に検出されたり, 大型で奇怪な核を有する異型細胞に強く検出された症例も認めた (写真4). そして高度異形成においても HPV DNA は表層に近い異型細胞ほど強く検出された.

また, HPV DNA 陽性の異形成病変に近接した扁平上皮化生細胞の核に異型細胞と同じ type の HPV DNA が検出された症例が10例中5例認められた (写真5).

今回検討した各種異形成における HPV DNA の検出率を調べると表1に示したように軽度異形成で50.0%(11/22), 中等度異形成60.6%(20/33), 高度異形成71.0%(22/31)と異形成の進行とともに HPV DNA の検出率は上昇していた. 次に, 各異形成における HPV type 別の検出率を検討すると, 表2に示したように HPV 6/11型が軽度異形成で27.3%(6/22), 中等度異形成で21.2%(7/33), 高度異形成で9.7%(3/31)と異形成の進行に伴い減少していた. 一方, HPV 16型は軽度異形成で18.2%(4/22)であったのに対し, 中等度異形成で36.4%(12/33), 高度異形成で61.3%(19/31)と, 6/11型とは逆に病変の進行により増加し

表1 子宮頸部異形成における HPV 検出率

組織型	症例数	陽性
軽度異形成	22	11(50.0)
中等度異形成	33	20(60.6)
高度異形成	31	22(71.0)
計	86	

(): パーセント

表2 子宮頸部異形成における HPV DNA type 別検出率

組織型	症例数	HPV		
		6/11	16	18
軽度異形成	22	6(27.3)	4(18.2)	4(18.2)
中等度異形成	33	7(21.2)	12(36.4)	3(9.1)
高度異形成	31	3(9.7)	19(61.3)	7(22.6)
計	86	16	35	14

(): パーセント

混合感染症例を含む

ていた. また, HPV 18型は軽度異形成18.2%(4/22), 中等度異形成9.1%(3/33), 高度異形成22.6%(7/31)と今回の症例では18型検出率と異形成の間に一定の関連性は認められなかった.

次に異形成症例で6月から5年間 prospective に追跡調査を行なった11例を表3に示した. 各症例は初診時細胞診で異常を指摘され, 生検による組織診で異形成と診断されたもので, 以後2カ月ないし3カ月の間隔で細胞診, 組織診で定期

表3 HPV type と各異形成の prospective な追跡調査

症 例	初診時組織診	追跡期間	HPV DNA	最終組織診	治 療
1. H. S.	軽度異形成	8 カ月	6/11	正常頸部上皮	経過観察
2. T. S.	中等度異形成	5 年	16	中等度異形成 (再発)	Laser
3. N. F.	中等度異形成	1 年 10 カ月	16	上皮内癌	手術
4. Y. O.	中等度異形成	7 カ月	16	上皮内癌	手術
5. Y. K.	中等度異形成	9 カ月	16	高度異形成	経過観察
6. C. Y.	中等度異形成	11 カ月	16	正常頸部上皮	経過観察
7. Y. A.	中等度異形成	1 年 9 カ月	16	微小浸潤癌	手術
8. R. A.	中等度異形成	9 カ月	16	上皮内癌	手術
9. K. T.	高度異形成	9 カ月	18	上皮内癌	手術
10. S. K.	高度異形成	8 カ月	16	微小浸潤癌	手術
11. R. H.	高度異形成	11 カ月	18	正常頸部上皮	経過観察

表4 HPV 混合感染症例の検討

組 織 診	症例数	HPV		
		6/11+16	16+18	6/11+16+18
軽度異形成	22	3(13.6)	1(4.5)	0(0)
中等度異形成	33	2(6.1)	0(0)	1(3.0)
高度異形成	31	2(6.5)	5(16.1)	0(0)
計	86	7	6	1

() : パーセント

検診を行ない、6 カ月以上追跡調査した症例である。最初、異形成で後により進行した異形成や上皮内癌が発見された症例は11例中7例あり、7例中6例に16型 DNA、1例に18型 DNA が検出された。そして上皮内癌の発見された症例は全例手術療法を施行した。また、16型陽性の中等度異形成の1例(表3、症例2)では1年7カ月の経過観察後 Laser 療法を行ない、一度異形成は消失したが、1年後の組織検査で再発を認め、再発した組織切片にも同じく16型 DNA が検出され、再び Laser 療法で現在経過を観察している。また、経過観察中病変の消失した症例(regression 群)は3例認められた。

最後に、今回検討した各種異形成症例の中で HPV の混合感染例の結果を表4に示した。異形成と混合感染した HPV type はとくに軽度異形成で6/11型と16型混合感染が13.6%(3/22)、高度異形成で16型と18型混合感染が16.1%(5/31)と他の群に比べてやや高率に認められたが、組織型

との間に一定の相関はみられなかった。

考 察

子宮頸部異形成は、正常扁平上皮と扁平上皮癌の中間に属する病変であり、子宮頸癌の前癌性病変としての生物学的性格を有している。すなわち、現在まで諸家による追跡調査の結果、異形成は病変が悪性へと進行する progression 群、退行消失する regression 群、不変のまま存続する persistence 群の三つの異なつた経過をとることが判明している。Patten¹⁵⁾は異形成症例を9カ月から23カ月間追跡調査し、13.6%に病変の進行を認め、Koss et al.¹¹⁾は軽度および中等度異形成症例を7カ月から10年間調査し、46.0%に progression 群を認めている。また Hall et al.¹⁰⁾は生検による組織診で診断した中等度異形成症例を1年から14年間調査しその18.4%に、Nasiell et al.¹³⁾は細胞診で診断した中等度異形成症例を約78カ月間追跡調査し、その30.0%にそれぞれ progression 群を確認し、Nasiell et al.¹³⁾はとくに生検を行なうことで progression 群が減少したことも報告している。本邦では野田³⁾が軽度異形成691例のうち87%は病変が消失したのに対し、高度異形成846例中89例の10.5%に悪性化を認め、とくに軽度異形成と高度異形成の病変の性状が異なることを指摘している。これらの成績から異形成の10数%から40数%は経過観察中病変の進行する progression 群が認められ、現在子宮頸部異形成は子宮頸癌の関連病変として取り扱われている。

さて、近年遺伝子工学とくに遺伝子クローニングの技術の進歩に伴い、ヒトの特定遺伝子の解析も可能となりつつあるが、1983年、zur Hauzen 学派により Southern blotting 法から子宮頸癌組織中にヒトパピローマウィルス(HPV)16型 DNA が高率に分離、同定され⁹⁾、子宮頸癌と HPV 感染の関連性が指摘された。この報告は分子生物学的解析からウィルスによる発癌性を提示し、子宮頸部の発癌機構を解明する研究分野に新たな方向を与えたものである。われわれは現在、分子生物学的手法の一つである in situ hybridization により前癌性病変の性格を有する各種異形成における HPV DNA の検出と局在分布から、HPV 感染と

発癌との関連性および子宮頸部異型病変の経過判定の指標への応用を検討している。われわれが実施している *in situ hybridization* 法は組織標本上で HPV DNA の細胞内局在と組織内分布の観察が可能である⁸⁾¹²⁾。また、材料もホルマリン固定、パラフィン包埋切片を利用できる点で *retrospective* な検討や他施設からの検体処理にも有用である。また、プローブにビオチン標識プローブを使用した、放射性同位元素に比べ特定施設の必要性がなく操作が安易である。また、検出される DNA も数十コピー以上検出が可能であり¹²⁾、DNA 局在も明瞭であるなどの利点がある。

今回ビオチン標識した各種 HPV DNA プローブを用いた *in situ hybridization* 法の検討から、HPV DNA は10例の正常な子宮頸部では検出されなかつた。しかし、異形成症例で異形成組織に近接する扁平上皮化生細胞の核には異形成と同じ type の HPV DNA を検出する症例を10例中5例認めた。各種異形成では HPV DNA は koilocytosis を示す細胞や異型細胞の核に観察された。HPV DNA 陽性細胞の分布は、軽度異形成では表層に近い koilocytosis に、中等度異形成では koilocytosis と上皮の中層を中心とした異型細胞に、高度異形成では中層から一部基底層近くの異型細胞にそれぞれ認められ、検出された HPV DNA は表層に近い細胞により強く観察された。高度異形成症例で異型上皮のほぼ全層に HPV DNA が検出された結果から、HPV は上皮の全層に感染していることが判明した。しかも表層に近づくにつれて強く検出される事実から、感染した HPV は上皮の成熟 (maturation) に伴いそれ自身複製 (replication) を行ない DNA 量が増加したものと推測された⁸⁾。異型細胞における HPV の存在様式は、*in situ hybridization* では明確には判定できない。しかし、少なくとも表層に近い細胞の核に強く検出された HPV DNA は数百コピーの DNA を観察しており⁸⁾¹²⁾、宿主細胞の DNA に組み込まれた状態 (integration) よりむしろ共存した状態 (episome) のものと推定された。異形成における HPV の存在様式については、Shirasawa et al.¹⁸⁾ が Southern blotting 法より

HPV 16型陽性の異形成の86% (12/14) のものに integration を認めたと報告している。また、今回の検索では感染した HPV DNA の type の違いと感染した細胞形態との間には明らかな相違が観察されなかつた。しかし、異形成が進行するにつれて異常核分裂像も認められ、Crum et al.⁶⁾ は HPV 16型感染と異常核分裂の相関を指摘しており今後の検討が必要と思われた。

つぎに、各異形成における HPV DNA の type 別の検出率を検討してみると、表2に示したように HPV 6/11型が異形成の進行とともに減少するのに対し、HPV 16型は逆に軽度異形成18.2%、中等度異形成36.4%、そして高度異形成61.3%と異形成の進行とともに上昇していた。また、われわれは細胞診を中心とした上皮内癌症例において HPV 16型55.6% (10/18)、18型33.3% (6/18) の検出成績を報告している¹⁾。このようにとくに高度異形成で HPV 16型が高率に確認されたが、Crum et al.⁷⁾ は Southern blot hybridization より cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 病変で HPV 16型 DNA が CIN K (CIN with koilocytotic atypia) で72.7% (16/22)、CIN で33.3% (3/9) 検出している。Pater et al.¹⁴⁾ は spot blot hybridization より HPV 16型 DNA は CIN I で0% (0/13) に対し CIN III では50% (27/54) 認め、16型の oncogenic な性質を推測し、Pratil et al.¹⁶⁾ は高度異形成と上皮内癌15例中14例 (93%) に HPV 16型や18型を検出し、前癌病変における HPV 16型や18型検出率の高いことを指摘している。また、最近では HPV 感染症例の追跡調査もなされており、Syrjänen et al.¹⁹⁾ は246例の CIN 症例を平均20.1カ月間調査し、その21%に progression 群を認めている。そしてこの progression 群の HPV DNA を検索したところ16型感染の45.5% (5/11)、18型感染の27.3% (3/11) にそれぞれ病変の進行が認められ、6型 (0%)、11型 (13.3%) に比べて progression 群の多いことを報告している。Campion et al.⁵⁾ は100例の軽度異形成症例に対し filter *in situ hybridization* を用いて prospective に経過観察を行ない、20カ月の間に高度異形成へと進行した26例中22例 (84.6%)

に HPV 16型 DNA を確認している。また Syrjänen et al.²⁰⁾は細胞診で異常を認め、平均 20.3カ月間経過観察をした婦人64例の生検組織を用いて³⁵S 標識 HPV DNA プローブによる in situ hybridization から検討し、病変の消退する regression 群が HPV 6型, 11型感染例にそれぞれ23.1% (3/13), 45.5% (5/11) 認めたのに対し、16型, 18型感染例は1例もなく、逆に progression 群は16型感染例は80% (4/5) と非常に高く、18型感染例は33.3% (1/3) であつたと報告している。今回、われわれの prospective な追跡調査の成績は表3にみられたように進行した病変が発見された7例中6例に HPV 16型 DNA を検出した。われわれの成績は症例数も少なく、追跡期間も短い点で今後一層の検討が必要であるが、諸家の調査結果より HPV DNA のとくに16型検出例は高率に病変の進行する progression 群が多く、16型感染と発癌との関連性が強く示唆されると考えられた。

このように感染した HPV の type で前癌性病変の経過に差がみられることはたいへん興味深い。最近16型 DNA のとくに初期遺伝子領域 E6/E7が発癌と関連した遺伝子と推測されている。すなわち E6/E7は NIH 3T3細胞を形質転換 (癌化) し、その transformant をヌードマウスに移植すると癌腫を形成したとの報告がある²¹⁾²²⁾。われわれも現在ビオチン標識 RNA プローブを用いて16型, 18型 E6/E7 mRNA 局在を子宮頸癌関連病変を中心に検討しており²⁾、E6/E7 mRNA の局在を認めた症例もあり、今後 HPV の発癌機構の解明や経過判定の指標への応用を試みている。

以上, in situ hybridization より子宮頸癌関連病変における HPV DNA の検出と追跡調査の結果から、とくに16型 DNA と発癌との関連性が示唆された。しかし、今後の課題として16型陽性の軽度および中等度異形成や混合感染例に対しては長期の経過観察が必要であろうし、子宮頸癌と HPV の関連性を追求するには HPV の E6/E7 mRNA 検出に加えて、現在発見されていない別の type の HPV の検索や HPV が感染した宿主細胞の免疫応答なども考慮する必要がある。今後

この分野での一層の検討が必要である。

稿を終えるにあたり、今回各種 HPV DNA を提供していただいた H. zur Hausen, L. Gissman 両博士と、研究に御協力いただきました穂積豊治博士に深甚の謝意を表します。

なお、本稿の要旨の一部は第40回日本産科婦人科学会学術講演会 (大阪, 1988), 第17回日本婦人科病理・コロポスコピー学会シンポジウム「子宮頸癌と HPV」(仙台, 1988) において発表した。

文 献

1. 永井宣隆, 木岡寛雅, 重政和志, 新甲 靖, 藤原 篤: 子宮頸部上皮内癌細胞を中心にヒトパピローマウィルス16型ならびに18型 DNA 局在の検討—In situ ハイブリダイゼーションの細胞診への応用—. 日産婦誌, 40: 1393, 1988.
2. 永井宣隆, 木岡寛雅, 重政和志, 藤原 篤, 穂積豊治: ビオチン標識 RNA プローブを用いた In situ ハイブリダイゼーションによる HPV 16型, 18型初期遺伝子 E₆/E₇mRNA の子宮頸部前癌病変における局在の検討. 日産婦誌, 40: 1455, 1988.
3. 野田起一郎: 子宮頸部上皮の癌化防止に関する研究. 日産婦誌, 27: 735, 1975.
4. Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Heinheinz, A., Scheurlen, W. and zur Hausen, H.: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO. J., 3: 1151, 1984.
5. Campion, M.J., McCance, D.J., Cuzick, J. and Singer, A.: Progressive potential of mild cervical atypia: Prospective cytological, colposcopic and virological study. Lancet, I: 237, 1986.
6. Crum, C.P., Ikenberg, H., Richart, R.M. and Gissmann, L.: Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. N. Engl. J. Med., 310: 880, 1984.
7. Crum, C.P., Mitao, M., Levine, R.U. and Silverstein, S.: Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. J. Virol., 54: 675, 1985.
8. Crum, C.P., Nagai, N., Levine, R.U. and Silverstein, S.: In situ hybridization analysis of HPV 16 DNA sequences in early cervical neoplasia. Am. J. Pathol., 123: 174, 1986.
9. Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H. and zur Hausen, H.: A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80: 3812,

- 1983.
10. Hall, J.E. and Walton, L. : Dysplasia of the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 100 : 662, 1968.
 11. Koss, L.G., Stewart, F.W., Foote, F.W., Jordan, M.J., Bader, G.M. and Day, E. : Some histological aspects of behaviour of epidermoid carcinoma in situ and related lesions of uterine cervix. A long-term prospective study. *Cancer*, 16 : 1160, 1963.
 12. Nagai, N., Nuovo, G., Friedman, D. and Crum, C.P. : Detection of papillomavirus nucleic acids in genital precancers with the in situ hybridization technique. *Int. J. Gynecol. Pathol.*, 6 : 366, 1987.
 13. Nasiell, K., Nasiell, M. and Vačlavinková, V. : Behavior of moderate cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet. Gynecol.*, 61 : 609, 1983.
 14. Pater, M.M., Dunne, J., Hogan, G., Ghatage, P. and Pater, A. : Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in early cervical neoplasia. *Virology*, 155 : 13, 1986.
 15. Patten, S.F. Jr. : Monographs in clinical cytology. Volume 3. Diagnostic Cytology of the Uterine Cervix. Second ed. (ed. G.L. Wied), Basel, Karger, 1978.
 16. Pratil, M.A., Doussal, V.L., Harvey, P., Laval, C., Bertrand, F., Jibard, N., Croissant, O. and Orth, G. : Detection of human papillomavirus in epithelial cells of uterine cervix-frequency of types 16 and 18 HPV. *Chinese Medical Journal*, 99 : 815, 1986.
 17. Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggerburk, B., Stremlan, A. and zur Hausen, H. : Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*, 314 : 111, 1985.
 18. Shirasawa, H., Tomita, Y., Kubota, K., Kasai, T., Sekiya, S., Takamizawa, H. and Shimizu, B. : Detection of human papillomavirus type 16 DNA and evidence for integration into the cell DNA in cervical dysplasia. *J. Gen. Virol.*, 67 : 2011, 1986.
 19. Syrjänen, K., Parkkinen, S., Mantyjärvi, R., Vayrynen, M., Syrjänen, S., Holopainen, H., Saarikoski, S. and Castren, O. : Human papillomavirus (HPV) type as an important determinant of the natural history of HPV infections in uterine cervix. *Eur. J. Epidemiol.*, 1 : 180, 1985.
 20. Syrjänen, S., Syrjänen, K., Mäntyjärvi, R., Parkkinen, S., Vayrynen, M., Saarikoski, S. and Castren, O. : Human papillomavirus (HPV) DNA sequences demonstrated by in situ DNA hybridization in serial paraffin-embedded cervical biopsies. *Arch. Gynecol.*, 239 : 39, 1986.
 21. Tsunokawa, Y., Takebe, N., Kasamatsu, T., Terada, M. and Sugimura, T. : Transforming activity of human papillomavirus type 16 DNA sequences in a cervical cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 83 : 2200, 1986.
 22. Yasumoto, S., Burkhardt, A.L., Doniger, J. and Dipaolo, J.A. : Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virol.*, 57 : 572, 1986.
 23. Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C.C., Schlegel, K. and Howley, P.M. : Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.*, 119 : 361, 1985.

(No. 6489 昭63・11・8 受付)