

## ヒトパピローマウイルス感染症

三石 剛

日本医科大学大学院医学研究科皮膚粘膜病態学

## Human Papillomaviruses Infection

Tsuyoshi Mitsuishi

Department of Pathophysiology of Mucocutaneous Disorders, Graduate School of Medicine, Nippon Medical School

**Abstract**

Human papillomaviruses (HPVs) represent a family of diverse DNA viruses consisting of more than 100 types and have been extensively studied as an etiological factor in benign and malignant tumors. In malignant epithelial lesions, the mechanism by which two E6 and E7 proteins of the high risk HPV types, HPV 16 and 18 interact with cellular factors in deregulating the normal growth of the cells, has been well described by many authors. The E6 and E7 proteins are consistently expressed in HPV-associated malignant tumor and E6 binding to the p53 gene mediated by the E6-associated protein ligase turned out to be important. In contrast important function of E7 was demonstrated by its binding to pRb and Rb-related proteins. The bindings under phosphorylation of these proteins was degraded by ubiquitination and transcription factors of the E2F regulated cell proliferation. Overall HPV 16 DNA is able to induced modifications in the host cells and immortalizing epithelial cells by stimulating human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein. High risk E6 proteins directly interacts with c-myc and c-myc/E6 complex activates hTERT protein expression.

The various methods for detection or cloning of HPV DNA are summarized in this manuscript. PCR method has been become an established technique for detecting a large number of HPV DNAs. In particular PCR-RFLP is a simple and useful method for identifying the specific HPV types. However many modifications of the methods have been developed. Recently clinical trials are being conducted to test the preventive efficacy of HPV vaccines, directed against HPV 16 and 18 in Japan. In the future the therapeutic efficacy of HPV vaccines are required to prevent cervical cancer and other HPV associated cutaneous carcinomas.

(日本医科大学医学会雑誌 2007; 3: 170-178)

**Key words:** human papillomaviruses, E6, E7, telomerase, cloning, therapy

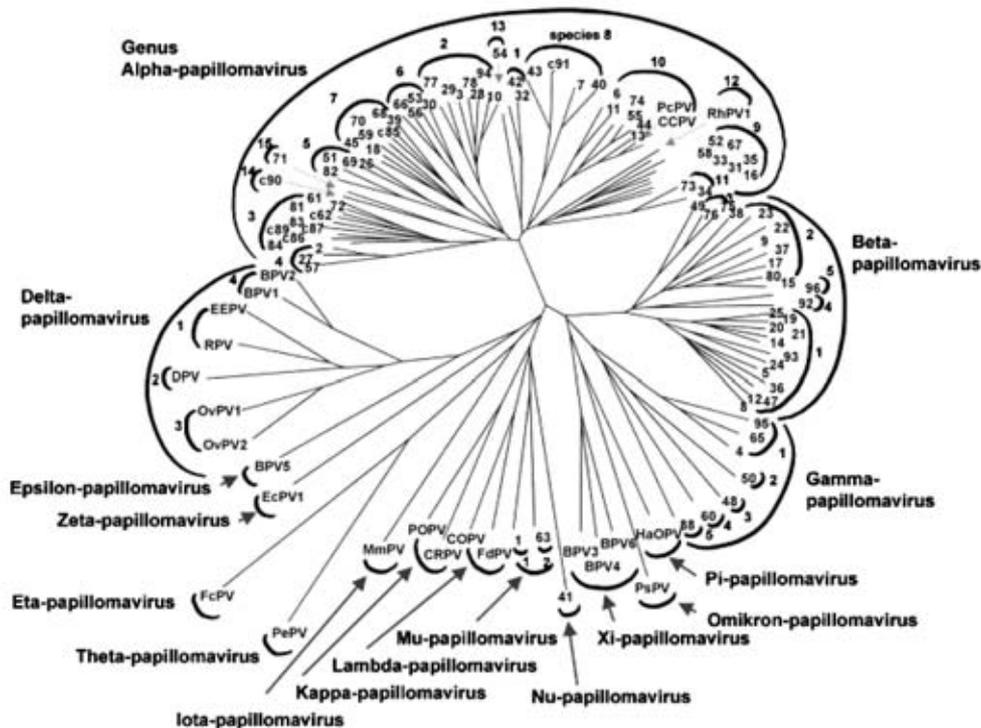


図1 乳頭腫ウイルスの系統樹

はじめに

ヒトパピローマウイルス (HPV) はヒトに感染する代表的なウイルスであり表皮および粘膜上皮の細胞, 特に幹細胞を標的とする。HPV には多くの遺伝子型が存在し, 現在では 100 種類以上にもなる。HPV はエンベロープに欠けるため, 血清を用いての分類が不可能である。したがって実際には病変部の組織から HPV DNA を抽出し, open reading frame (ORF) の L1 領域の塩基配列を解析し, 既知の HPV 遺伝子と比較して L1 領域の塩基配列の相同性が 90% を超えるときは既知あるいは亜型の HPV 遺伝子であり, 90% 未満の時には新しい遺伝子型と判定される<sup>1)</sup>。HPV は遺伝子型によって臓器または部位親和性が異なるため婦人科, 耳鼻科領域の粘膜型と皮膚科領域の皮膚型に大別される。その皮膚型の中では疣贅状表皮発育異常症の皮疹から分離される型が多く存在している。また種々のウイルス性疣贅において近年の検討から HPV1, 2, 3, 4, 7, 10, 27, 28, 29, 57, 60, 63, 65, 77, 78, 88, 95 などがクローニングされそれぞれの型の臨床像と病理組織像がある程度対応することが知られている。すなわち HPV1 はミルメシア, HPV2/27/57 は尋常性疣贅, HPV3/10/28/29/77/78/

94 は扁平疣贅, HPV4/60/63/65/88/95 は細胞質内封入体を形成し, 時にメラニン沈着を伴う封入体疣贅または色素性疣贅の原因となる。粘膜型 HPV においては発癌に関与する遺伝子型の存在が多いことから, HPV はハイリスク, ローリスク型にも分類される (図 1)。本稿では HPV 感染症の基礎と臨床について概説したい。

ウイルス粒子とゲノム構造

ウイルス粒子は直径約 50~55 nm で, エンベロープをもたず正 20 面体の球状を呈する (図 2)。内部に存在する HPV DNA は約 8,000 塩基対の環状 2 本鎖 DNA からなり, ウイルス遺伝子が 2 本鎖 DNA の 1 本鎖上にコードされている。ORF にはウイルス感染初期に発現する初期遺伝子 E1~E7 と後期に発現する遺伝子 L1, L2 が存在する。さらに L1 の 3'末端側から E6 の 5'末端側にかけて遺伝子発現調節領域 long control region (LCR) が存在する。L1, L2 はウイルス粒子を構成する capsid 蛋白をコードし, E1 は DNA の複製に関与し, E2 は E1 遺伝子とともに DNA 複製蛋白質として機能する。E3 はウシパピローマウイルス (BPV) 1 などで発現が認められているがその働きは不明である。E4 は HPV1 型の感染による疣贅組織

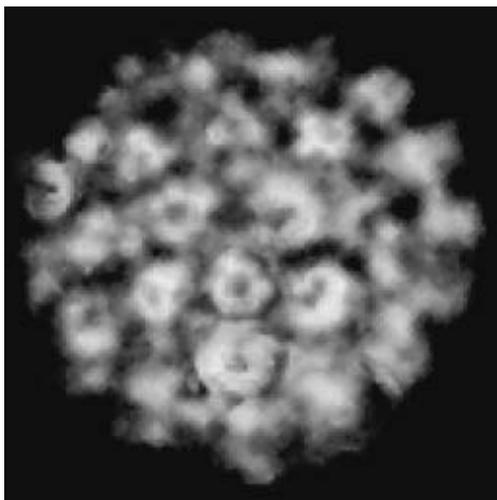


図2 正20面体の球状を呈するウイルス粒子

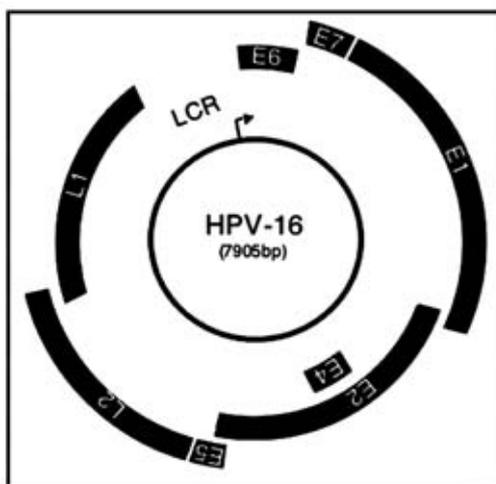


図3 ヒト乳頭腫ウイルスのゲノム構造

内より確認されている。ケラチンの安定性を破壊し、ウイルス粒子の成熟に関与するものと考えられている。E5は感染細胞の形質転換に関与する。発癌に関与するE6、E7は感染細胞を形質転換させる遺伝子であり、それぞれ癌抑制遺伝子 p53、pRB と結合されていることが明らかにされている<sup>2</sup> (図3)。

### HPV と発癌

HPV の発癌機構においては主として HPV16、18 型において検討されており、これらハイリスク HPV の癌遺伝子 E6、E7 は多くの細胞蛋白と結合し、細胞増殖・癌化に関わっていることが解明されている。ハイリスク HPV E6 は癌抑制遺伝子 p53 と直接結合せず E6-AP 複合体と結合し、ユビキリンリガーゼを形成

し、p53 をユビキチン化して分解させ、インヒビターとしての機能を失活させ細胞の形質転換を促している<sup>3</sup>。一方、ハイリスク HPV E7 は高率に pRB と結合する。pRB は主に細胞周期の G1 期から S 期への移行を制御する機能を持っている<sup>4</sup>。G1 期の終末で pRB は cyclin D/CDK4 の働きによってリン酸化され、E2F を放出する。E2F は細胞分裂を促進させる蛋白の転写活性化を有するため、結果的に細胞分裂を促進させる<sup>5</sup>。一方、ローリスク HPV E6 は p53 との結合能は低いものの、p53 蛋白の分解は起こらないとされている<sup>3</sup>。またローリスク HPV E7 と pRB との結合能はハイリスク HPV E7 と比べかなり低く、CKII によりリン酸化されにくいことが解明されている<sup>5</sup>。

### HPV とテロメラーゼ

婦人科領域においてハイリスク HPV が宿主へ持続感染し、上皮内癌を発生したとしても進行癌に移行する率は数%と考えられ、数年から 10 数年で自然消退するケースは少なくないと考えられている<sup>6</sup>。その理由としてハイリスク HPV 遺伝子によって上皮細胞が癌化するには、何代にも及ぶ細胞分裂が必要であることと、宿主の HPV に対する免疫応答が寄与していることがあげられている。細胞分裂には有限性と無限性に大別され、それらは老化と不死化に置き換えられる。細胞の形質転換にはその前段階として細胞の不死化がみられる。細胞が不死化能を有するにはテロメラーゼというテロメア伸長酵素の活性が重要な役割を担っている<sup>7</sup>。テロメラーゼは触媒サブユニットである human telomerase reverse transcriptase (hTERT) と Hsp90、p23、TAH、TEP1、mTOR、S6K らの付属蛋白および RNA の複合体から成り立つ酵素である<sup>8</sup>。テロメラーゼ内の hTERT の転写開始部位のプロモーターには c-myc 結合サイトの E-box、SP1 結合サイトの GC-box があり、c-myc は SP1 と相互的に hTERT をプロモートする<sup>9</sup>。HPV ではテロメラーゼの解析は主として HPV16 において行われている。すなわち HPV の oncogene である E6 は c-myc を介して hTERT に働き、テロメラーゼ活性化を促すことが知られている。その際に E6 は c-myc と相互的に作用するのではなく、c-myc との複合体を形成し hTERT の発現増強を促している<sup>10</sup> (図4)。また hTERT には MZF-2、WT-1 などのインヒビターが存在し、転写因子の拮抗作用でハイリスク群とローリスク群とでは hTERT の活性が異なっている<sup>9,10</sup>。一方、正常上皮細胞では通常テロメラーゼ活性がないことが知られてい

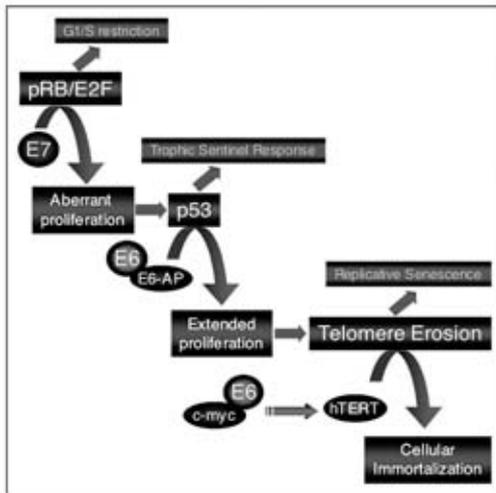


図4 ハイリスクHPVによる細胞の発癌過程と不死化

る。これらの細胞に発現ベクターを用いて E6, E7, hTERT 遺伝子を導入すると、導入していない細胞と比較し細胞分裂に明らかな差が認められた報告がある<sup>11</sup>。これらの結果から HPV 感染細胞の不死化には E6, E7 だけではなく hTERT の存在が必須であることが明らかにされている。

### HPV と皮膚悪性疾患

#### (1) 疣贅状表皮発育異常症 (EV)

EV は小児期より全身に疣贅様皮疹が多発し、30 歳前後より主として日光露出部に皮膚悪性腫瘍の発生を高頻度に見られる疾患であり、その発症に劣性遺伝的背景に基づく細胞性免疫の低下が関与していると考えられている (図 5a)。EV の良性皮疹の病理組織像は有棘細胞層中に大型で胞体の明るい、澄明細胞塊がみられるのが特徴的所見であり (図 5b)、これらの皮疹からは通常の疣贅とは異なる HPV DNA が 10 数種類検出されている。一方、本症では日光露出部に 1/3 程度に有棘細胞癌が生じ、HPV5, 8 型が主に検出される。その他、まれに HPV14, 17, 20, 47 型が検出される。紫外線と HPV が発癌の重要なリスクファクターと考えられている<sup>12</sup>。

#### (2) Bowen 病, Bowenoid papulosis (BP), 紅色肥厚症

Bowen 病は臨床的に多くが単発性であるが、まれに多発性病変もみられる。病理組織学的には上皮内癌の形態を呈する。多発性病変の原因として古くから砒素の関与が疑われ、侵入経路としては砒素鉱山などの職業に従事、薬剤(サルバルサン, フォーレル水など)、

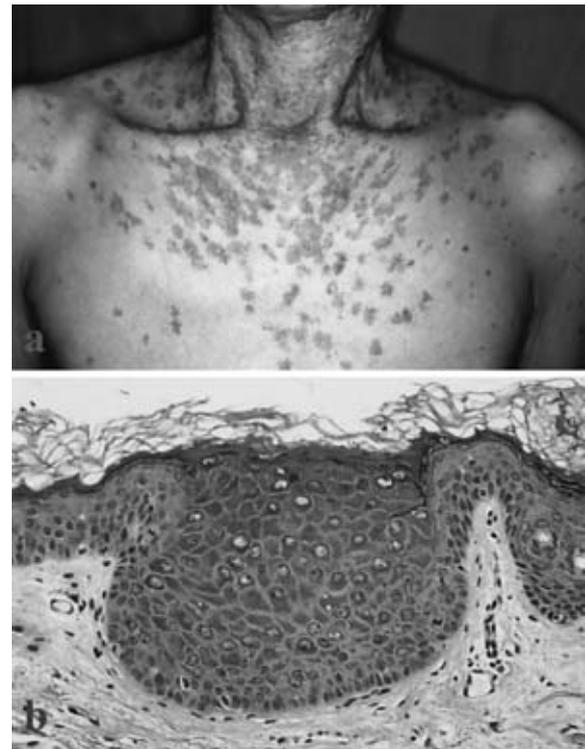


図5 疣贅状表皮発育異常症の臨床・病理組織像

環境汚染などが考えられている。したがって砒素摂取歴の詳細な問診や砒素の定量解析は原因を探索するにあたって重要な手がかりと成り得る。また Bowen 病は HPV の関与が近年検討され、多くの追試報告がされており、外陰部、指の Bowen 病には HPV の関与が病因的意義として重要である<sup>13-17</sup>。Bowen 病における HPV の検出率は外陰部と手指発症例に非常に高く、検出される HPV は 16 型をはじめとする粘膜型のハイリスク群にほぼ限られている (図 6)。感染経路は手指と外陰部ないし膣粘膜の接触によるものと考えられている。一方、BP は外陰部や肛門部の皮膚・粘膜に散在あるいは集簇して生じる褐色から黒色調の多発性色素斑ないし表面平滑な丘疹である。病理組織学的には Bowen 病様の異型を認める。20~30 歳代の性活動の盛んな年代に好発し、病変から HPV16 型の検出率が高い。紅色肥厚症は陰茎亀頭部に生じ、ビロード状の光沢局面を呈する。組織像は Bowen 病と同様の像を示す<sup>18</sup>。

#### (3) Verrucous carcinoma (VC)

VC は皮膚・粘膜に生じ緩徐に発育する有棘細胞癌の low grade な腫瘍と考えられており、陰部に生じた場合は Buschke-Löwenstein tumor, 口腔に見られる場合には oral florid papillomatosis, 足に生じた場合

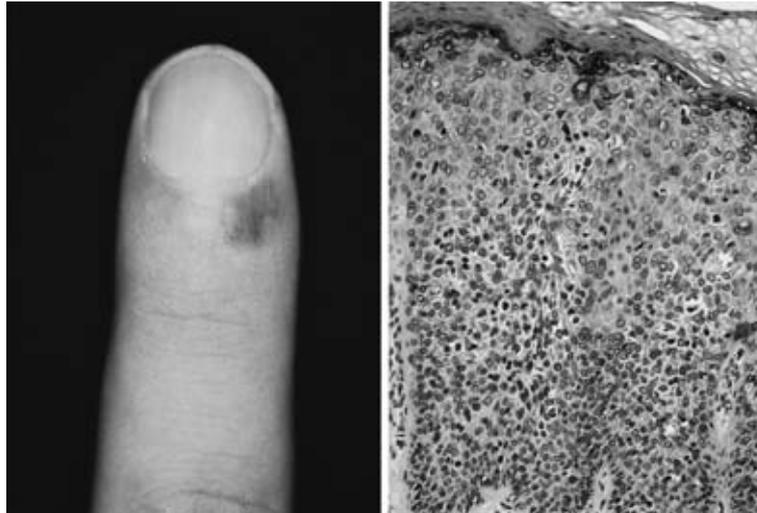


図6 指の色素性 Bowen 病の臨床・病理組織像

には epithelioma cuniculatum, その他の皮膚に生じた場合に papillomatosis cutis carcinoides と呼称される。われわれの検討から VC の病変から複数の HPV 感染が認められた<sup>19</sup>。再発を繰り返しやすいのは正常口唇部にも HPV が潜伏感染している可能性が考えられる。Buschke-Löwenstein tumor は HPV6, 11 型の感染によるもので良性の経過をたどり尖圭コンジローマの I 型と考えられているが、時折, HPV16, 18 型の混合感染を認める。

## HPV 遺伝子の解析

### (1) PCR-RFLP

通常, 凍結組織より全 DNA をフェノール/クロロホルム・イソアミルアルコールによる古典的 DNA 抽出法を筆者は行っている。最近, パラフィン切片からキットを用いての DNA 回収率も上がっている。PCR を施行するには標的とする HPV の型つまり, i) 皮膚型, ii) 粘膜型, iii) EV 症型を特異的に増幅するプライマーを選択する必要がある。これまで LC<sup>20</sup>, MY<sup>21</sup> CP<sup>22</sup>, HD (F10/B5, F12/B5, F22/B11)<sup>23</sup>らが HPV 遺伝子を増幅するプライマーとして主として用いられている。また PCR 産物を種々の制限酵素で切断し, その切断パターンから型決定を行う PCR-RFLP は遺伝子塩基配列を解析する必要がない簡便さがある (図 7)。しかし新しい型と考えられる HPV については PCR-RFLP は不適切であり, 直接塩基配列を解析しなければならない。

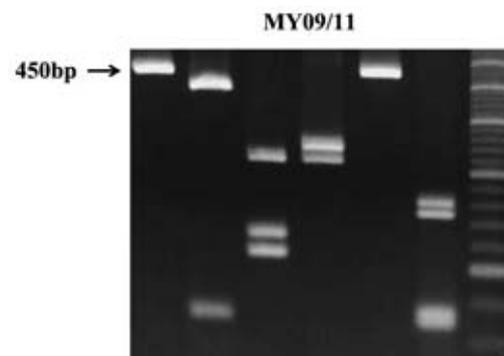


図7 PCR-RFLP (MY09/11 プライマーで増幅後, 各制限酵素で切断)

### (2) *In situ* hybridization 法

古くから筆者らはビオチン標識 HPV DNA を probe として用いて ISH 法を行っていた。ISH 法で重要なのは, 標的とする遺伝子型である。つまり皮膚型, EV 症型, 粘膜型のすべてを検出できる probe を使用するのが望ましい。筆者らは以前に HPV DNA のクローンを樹立者から頂き, プラスミドから HPV DNA を切り離し, 精製して probe を作成していた。ハイブリダイゼーションの条件は low stringency の場合 42°C で 14 時間, high stringency の場合には 58°C で 14 時間行い, alkaline phosphatase 標識 streptavidin との複合体を形成させ BCIP/NBT 溶液で発色させ, 洗浄後メチルブルーで染色させる方法を用いてきた。核内に強いシグナルの発現がみられれば陽性所見としてみなされる (図 8)。

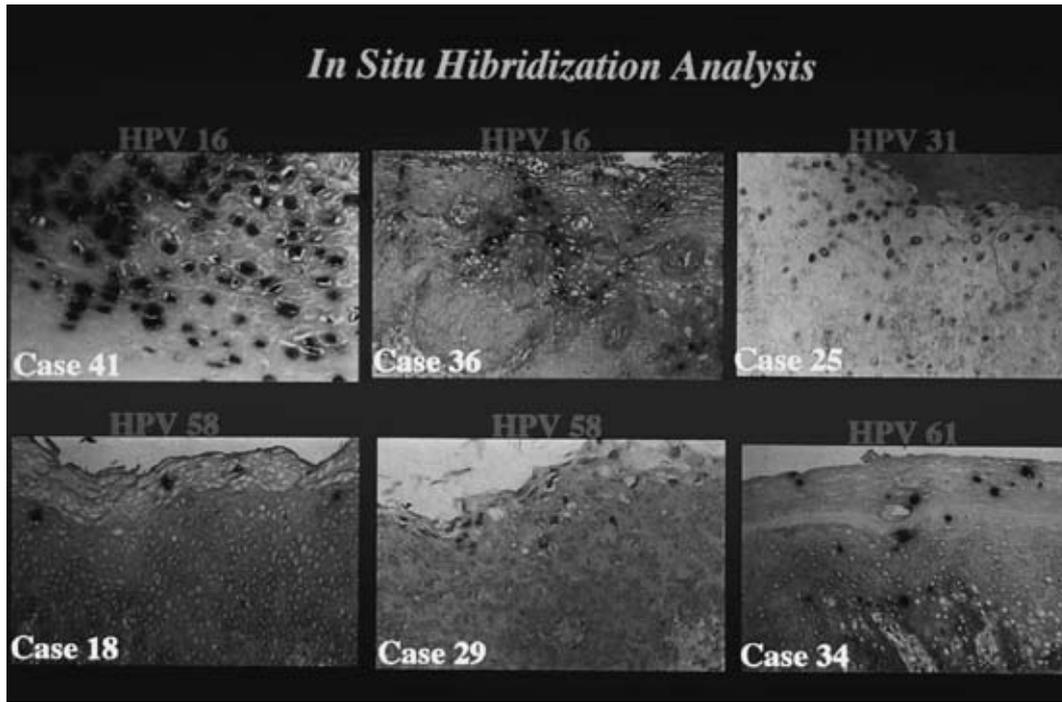


図8 *In situ* hybridization 法による解析

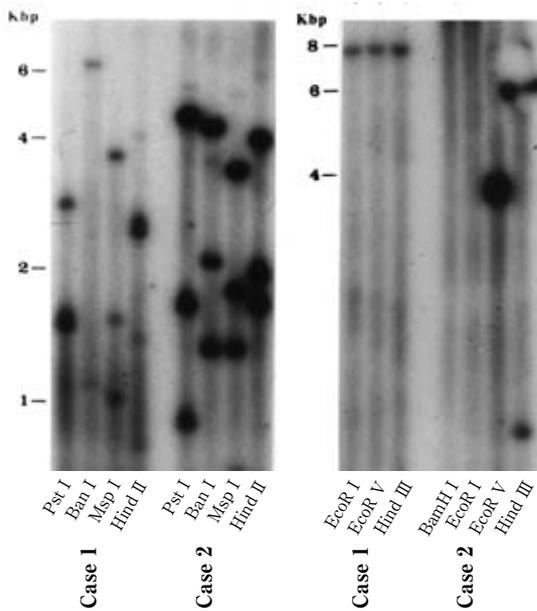


図9 Southern blot 法による解析

**(3) Southern blot 法**

HPV の遺伝子解析では古典的手技として現在も用いられている。Southern blot 法の最大の利点はバクテリアの混入があっても false positive にはならない点であり信頼度はかなり高いと考えられる。PCR-RFLP と同様にいくつかの制限酵素で DNA を切断しゲルに泳動しナイロンメンブランに Southern

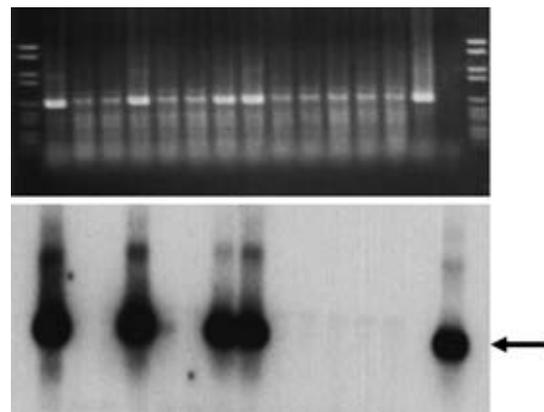


図10 PCR-Southern blot 法 (矢印が HPV 遺伝子)

transfer し、 $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP で標識した probe (HPV 全 DNA を使用) でハイブリダイゼーションさせるとほとんどの既知の型を正確に同定できる<sup>24</sup> (図9)。Southern blot 法の欠点は感度が低いため、サンプルによってウイルスコピー数が高くなければ false negative の結果となることがある。近年、Shamaninnらは PCR-Southern blot 法を行い、新しい技術法として注目されていた<sup>25</sup>。すなわち PCR で増幅された産物や目に見えないバンドであったとしても HPV 特異的か否かを検索するためゲルをナイロンメンブランに Southern transfer し PCR 産物の鎖長のほぼ中央の塩基配列に共通の oligonucleotide を作成し  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP で

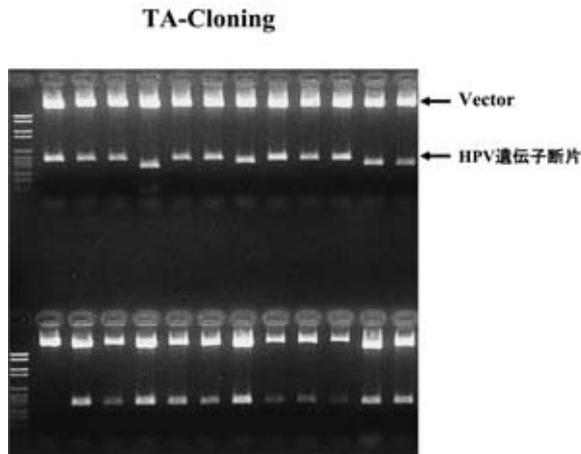


図 11 TA-cloning による HPV 遺伝子の断片検出

標識させハイブリダイゼーションさせると、真の HPV か否かが解明できる (図 10)。

#### (4) ハイブリッドキャプチャー法

DNA の増幅を行わず、シグナル増幅技術を用いた高感度 DNA 診断法である。長鎖の RNA プロブを用いて、生成した DNA/RNA ハイブリッドを特異抗体を用いて免疫学的に検出する。Digene 社 (Digene Corp, Silver Spring, MD) から kit を入手できる。

HPV の場合にはハイリスク群とローリスク群に大別できるが、型特異的とは言えず雑な検出法といわざるを得ない。

#### HPV 遺伝子のクローニング

HPV は血清診断ができるほど、*in vitro* で大量に増殖させることは困難である。そのため現状ではウイルスゲノムのクローニングをいまだに行っていることは従来より変わりはない。クローニングは通常、標的とする DNA 断片をファージやプラスミドベクターに組み込み、大腸菌などの宿主の中で増殖させ、大量の DNA 断片を得ることができる。その中で TA-cloning は Taq DNA ポリメラーゼの特性を用いて PCR 産物を精製後、vector に組み込む方法である。すなわち Taq DNA ポリメラーゼはターミナルトランスフェラーゼとしての活性を有し、増幅した PCR 産物の DNA 3'末端に A (アデニン) を付加する機能をもつ。3'末端に T (チミン) を有する人工ベクターを用いて PCR 産物とベクターが ligation できるようになる。この人工ベクターは市販のキットで入手できる。この方法では増幅された PCR 産物から複数の HPV 遺伝

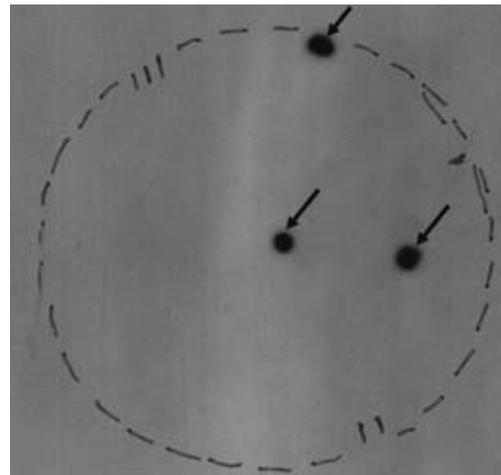


図 12a プラークハイブリダイゼーション法による陽性所見

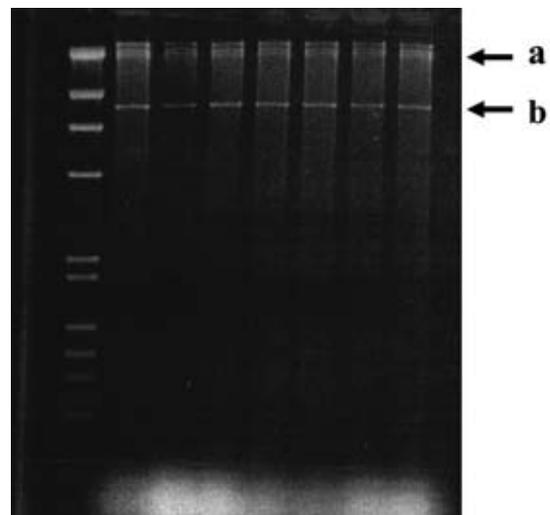


図 12b λファージによる HPV 全シーケンスのクローニング (矢印が各々 a:λファージ, b: HPV 遺伝子)

子を確認することが可能であり、直接シーケンス法とは全く異なってくる。重複感染の理由として、一つの感染細胞に HPV が重複感染している可能性と一つの病変内に複数の病変が存在し、異なる種類の HPV が混在している可能性が考えられる。また PCR 産物はできるだけ新鮮で鎖長は 600 bp 以下が望ましい<sup>25</sup> (図 11)。クローニングで重要なのは、標的とする DNA 断片の鎖長である。つまり HPV 遺伝子は約 8kb であるため pBR322, pUC18 らの人工プラスミドベクターに組み込むことはできるが、10~20 kb ぐらいの鎖長の長い DNA 断片だとプラスミドベクターに組み入れることは困難であり、その場合には λファージ由来ベクターらを用いる。しかしファージの欠点は大腸菌

の中に入れることは比較的容易であるが、取り出すのにプラスミドベクターと比較し効率が悪い。

一般に HPV 全 DNA をクローニングする場合には、まず DNA を一本鎖にする制限酵素を見つけることである。通常 BamHI や EcoRI らの酵素で全 DNA を切断しゲルに電気泳動させ、約 8 KB あたりのゲルを切りだし精製する。一本鎖 DNA を作成したあとは、入ファージ由来ベクターに組み込み大腸菌に感染後入ファージが大量に産出され、シャーレ寒天培地にまくとプラークが生じる。このプラーク内にはファージと標的とする DNA が組み込まれている。しかしすべてのプラーク内に標的とする DNA が組み込まれているわけではないため、プラークハイブリダイゼーションが必要となる (図 12a)。その後陽性のプラークを用い制限酵素で切断後、ファージと組み込まれた DNA を確認する (図 12b)。約 8 kb のバンドが検出されるとクローニングに成功したと考えられる。その後、プライマーをいくつも作成しオートシーケンサーを用いて全 DNA の塩基配列を解析する。

### HPV 感染症の治療

HPV 関連皮膚悪性疾患においては切除可能な場合、ほとんどが外科的治療を第一選択とする。最近子宮頸癌に対して HPV 予防ワクチンの開発が確立し、本邦においても治験の段階に至った。一方、ウイルス性疣贅の治療法は大別して、1) 外科的治療法、2) 外用療法、3) 免疫療法、4) 局中療法、5) その他まれな治療法がある。どれも確立された治療法とはいえず、発症部位、個数、大きさなど臨床症状の程度と患者に治療法の希望を聞き、医師は治療法を選択するのが望ましいと思われる<sup>26-29</sup>。しかし保険診療の範囲でウイルス性疣贅の治療を行っていることから、現在のところ、液体窒素凍結療法やスピール膏貼付が主たる治療法となっている。最近、液体窒素凍結療法においてスプレー法が取り入れられ、綿球法と比較し、簡便で冷却効果が短時間でみられるようになった。現状では液体窒素凍結療法のみでの治療では多発性・難治性のイボにはかなりの期間を要し、患者によっては苦痛を伴い、医療機関を変えることは少なくない。古くからイボは暗示療法をはじめとするプラセボ効果といった心理的アプローチによって治癒することが知られている。実際、非科学的に一齐にイボが消退する現象がみられる。しかし、前述した治療法によって、イボが徐々に消失していくことは暗示療法による効果とはいえず、保険適応の取れた液体窒素凍結療法の繰り返し治

療、電気乾固は痛みを伴うことは必須であり、瘢痕などの有害事象も生じることがある。したがって患者の希望する痛みのない早く治癒する方法の選択は患者にとって有益となりうる。だが同じ治療を 3 カ月行っても全く効果がないと判断したら別の方法を取り入れることが望ましいであろう。

### おわりに

HPV の研究は急速に発展している。その背景として旧西ドイツの zur Hausen 博士らのグループが子宮頸癌の組織から HPV16DNA を分離し、クローニングに成功したことであろう。続いて子宮頸癌の組織から HPV18DNA がクローニングされた。やがて子宮頸癌の細胞株である HeLa 細胞に HPV18DNA が存在することがわかった。その後 HPV は発癌能がテーマとなり今日まで研究者が注目する領域に至った。さらに近年 HPV16/18 に対する予防ワクチンが開発され、わが国でも治験の段階にまできた。今後の展望としては、治療ワクチンの開発と HPV 感染による悪性腫瘍の撲滅があげられる。

### 文 献

1. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004; 324: 17-27.
2. zur Hausen H: Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1288: F55-78.
3. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM: The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 1993; 75: 495-505.
4. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989; 243: 934-937.
5. Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P: Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 6537-6546.
6. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, Miller S, Canjura-Clayton KL, Farhat S, Broering JM, Darragh TM: Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet* 2004; 364: 1678-1683.
7. Kiyono T, Foster SA, Koop JL, McDougall JK, Galloway DA, Klingelutz AJ: Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 1998; 396: 84-88.
8. Kawauchi K, Ihjima K, Yamada O: IL-2 increases human telomerase reverse transcriptase activity transcriptionally and posttranslationally through phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt, heat shock

- protein 90, and mammalian target of rapamycin in transformed NK cells. *J Immunol* 2005; 174: 5261-5269.
9. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R: Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8211-8216.
  10. Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K: Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004; 78: 11451-11460.
  11. Kyo S, Nakamura M, Kiyono T, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Yatabe N, Inoue M: Successful immortalization of endometrial glandular cells with normal structural and functional characteristics. *Am J Pathol* 2003; 163: 2259-2269.
  12. Hayashi J, Matsui C, Mitsuishi T, Kawashima M, Morohashi M: Treatment of localized epidermodysplasia verruciformis with tacalcitol ointment. *Int J Dermatol* 2002; 41: 817-820.
  13. Mitsuishi T, Kawana S, Kato T, Kawashima M: Human papillomavirus infection in actinic keratosis and Bowen's disease: comparative study with expression of cell-cycle regulatory proteins p21 (Waf1/Cip1), p53, PCNA, Ki-67, and Bcl-2 in positive and negative lesions. *Hum Pathol* 2003; 34: 886-892.
  14. Ota M, Kawashima M, Mitsuishi T: Multiple Bowen's disease of the fingers. *Eur J Dermatol* 2002; 12: 275-277.
  15. Mitsuishi T, Kawashima M, Sata T: Human papillomavirus associated Bowen's disease of the foot: unique clinical features mimicking a common wart. *Eur J Dermatol* 2001; 11: 463-465.
  16. Mitsuishi T, Kawashima M, Matsukura T, Sata T: Human papillomavirus type 58 in Bowen's disease of the elbow. *Br J Dermatol* 2001; 144: 384-386.
  17. Mitsuishi T, Sata T, Matsukura T, Iwasaki T, Kawashima M: The presence of mucosal human papillomavirus in Bowen's disease of the hands. *Cancer* 1997; 79: 1911-1917.
  18. Mitsuishi T, Sata T, Iwasaki T, Matsukura T, Manaka I, Nogita T, Ohara K, Kawashima M: The detection of human papillomavirus 16 DNA in erythroplasia of Queyrat invading the urethra. *Br J Dermatol* 1998; 138: 188-189.
  19. Mitsuishi T, Ohara K, Kawashima M, Kobayashi S, Kawana S: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences in verrucous carcinoma of the lip: genomic and therapeutic approaches. *Cancer Lett* 2005; 222: 139-143.
  20. Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A: Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 1991; 82: 524-531.
  21. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM: The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989; 7: 209-214.
  22. Berkhout RJM, Tieben LM, Smits HL, Bowves Bavinck JN, Vermeer BJ, ter Schegget J: Nested PCR approach for detection and typing of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomavirus types in cutaneous cancer from renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 690-695.
  23. Shamanin V, zur Hausen H, Laverigne D, Proby CM, Leigh IM, Neumann C, Hamm H, Goos M, Haustein UF, Jung EG, Plewig G, Wolff H, de Villiers EM: Human papillomavirus infections in nonmelanoma skin cancers from renal transplant recipients and nonimmunosuppressed patients. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 802-811.
  24. Matsukura T, Sugase M: Identification of genital human papillomaviruses in cervical biopsy specimens: segregation of specific virus types in specific clinicopathologic lesions. *Int J Cancer* 1995; 61: 13-22.
  25. 三石 剛, de Villiers E-M: 皮膚悪性腫瘍におけるヒト乳頭腫ウイルス (HPV) の関与 —新しい型の HPV 遺伝子の検出—. *日皮会誌* 2000; 110: 711.
  26. Mitsuishi T, Iida K, Kawana S: Cimetidine treatment for viral warts enhances IL-2 and IFN-gamma expression but not IL-18 expression in lesional skin. *Eur J Dermatol* 2003; 13: 445-448.
  27. 三石 剛: ウイルス性疣贅の治療 —現状と将来の展望—. *日皮会誌* 2006; 116: 2110-2114.
  28. 三石 剛: イボの痛くない治し方. 疾患 II. 皮膚科診療のコツと落とし穴. 西岡 清編集, 2006; pp 83-85. 中山書店 東京.
  29. 三石 剛: いぼ診療 up date いぼの内服療法. *Monthly Book Derma* 2005; 97: 53-61.

(受付: 2007年4月11日)

(受理: 2007年6月27日)