

原 著

Double catalyzed signal amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) 法によるHPV high risk group の検出

長谷川 秀 浩* 五十嵐 俊 彦*

HPV high risk groupのウイルスDNAの分子病理学的解析法としてDouble Catalyzed Signal Amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) 法を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋された子宮頸部病変組織23症例を対象にHPV DNAの検出を行った。その結果、DCSA-ISH法では82%にHPV high risk groupのDNAの陽性所見が認められ、従来のISH法での陽性率18%と比較すると極めて高い検出率であった。病変進行度のグレード別に検討した場合、異形性病変例では76%、CIS病変例では83%に陽性所見が認められた。これはPCR法と同様の検出感度を持つものであり、同時に固定液によるDNAの損傷が影響しなかったことから、再現性に優れているとともに特異性が高い方法であると判断された。したがって、本法を用いたHPV DNA検出は、今後のHPV感染症に対し、予後や進行を推測するうえで極めて重要な情報を提供してくれるものと考えられた。

キーワード：ISH法、CSA-ISH法、PCR法、HPV DNA

緒 言

ヒトパピローマウイルス (HPV) は70種を越える亜型が確認されており、その一部は皮膚や粘膜に生じる良性腫瘍の発生病因因子である他、婦人科領域においては子宮頸部の大部分の病変からHPVが検出されている。特に子宮頸癌の場合、その病変部よりHPV type 16, 18, 31, 35が高頻度に検出されるため、子宮頸癌の発生に関与していると考えられ、これらを high risk group とし区別している。したがって、病変部から検出されるHPVの型別を同定することは、病気の予後や進行を推測するうえで重要な意味を有するはずである。通常 high risk group に属する癌原性ウイルスは、増殖細胞である基底細胞ないし傍基底細胞の核酸に組み込まれておりウイルス粒子を作らないため、ウイルスカプセルに対する免疫染色等では、その陽性像を確認することができない。しかし近年、分子生物学の発展により、さまざまなDNAが単離され、病理診断においても遺伝子レベルでの検索が行われつつある。HPV DNAの検出についても、Polymerase chain reaction (PCR) 法、Southern blot hybridization (SBH) 法、In situ hybridization (ISH) 法などによる検出が検討されているが、¹⁾²⁾⁶⁾一般にホルマリン固定パラフィン包埋材料から抽出されたDNAはホルムアルデヒドの影響により、短く断片化されておりSBH法での検出は不可能である。またPCR法での検出では、プライマーを短く設定しなければならないという、その至適条件の設定は容易でないとされており、その型別の同定には各亜型に対するプライマーを個々に設定するか、もしくはHPV DNAの共通部分を認識するプライマーを用いて増幅後、PCR増幅産物を制限酵素で処理しなければならない煩雑さがある。今回、我々は、タイラミンの特性を利用しシグナルを増幅することをISH法に応用したCatalyzed Signal Amplification in situ hybridization (CSA-ISH) 法³⁾⁴⁾⁵⁾にさらに改良を加え高感度にしたDuble Catalyzed Signal Amplification in situ

hybridization (DCSA-ISH) 法⁷⁾を確立し、核内に取り込まれたHPV high risk groupのウイルスDNAの検出について、その有効性を比較検討した。

材料および方法

A：材料

本施設において1999年から2000年の間に子宮頸部の細胞診検査で要精査を指摘され、組織検査の結果、軽度異形成症例から上皮内癌と診断された症例の中から、細胞異型の各段階が含まれるように抽出した23例 (23才から72才、平均43.6才) のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた (Fig. 1)。それぞれを3 μ mの厚さに薄切後、MASコート付きスライドガラス (松波 S 9444) にのせ伸展、60℃にて一晩乾燥した。

B：方法

DNAプローブはHPV wide spectrum：HPV 16, HPV 18

Sample	age	Cytological diagnosis	Histological diagnosis	Fixed days
A	41	Class II	Koilocytosis	2
B	50	Class III a	No malignancy	3
C	50	Class III a	Koilocytosis	4
D	41	Class III a	"	4
E	23	Class III a	Mild dysplasia	3
F	15	Class III a	"	2
G	37	Class III a	"	3
H	26	Class III a	"	3
I	51	Class III a	Moderate dysplasia	2
J	53	Class III a	"	3
K	35	Class III a	"	3
L	23	Class III a	"	3
M	24	Class III a	"	3
N	36	Class III a	"	5
O	30	Class III a	Severe dysplasia	3
P	76	Class V	"	2
Q	32	Class III b	"	4
R	64	Class III a	CIS susp.	2
S	54	Class III a	CIS	4
T	72	Class III b	"	2
U	43	Class III a	"	6
V	38	Class III b	"	2
W	59	Class V	"	3

Fig 1. Detection samples of the HPV DNA by DCSA-ISH and ISH methods.

*〒940-0864 新潟県長岡市川崎1丁目2520番地1 厚生連病理センター

(DAKO) と HPV wide spectrum : HPV 31, HPV 33 (DAKO) を等量混合し、HPV high risk group プローブ (0.5 μg/ml, Tm-20) として使用した。DCSA-ISH法はプローブの浸透性を高めるため、加熱によりホルマリン固定により生じた架橋構造をはずした後、HPV DNAを蛋白分解酵素により露出させた。つづいて切片にビオチン化DNAプローブを滴下し、熱変性後、37℃で一晩ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーションにより HPV DNAに結合しているビオチン標識されたプローブをGen Point™ (DAKO) を用いてHRP標識ストレプトアビジンで検出し、ビオチンタイラミド溶液で反応させシグナルの増幅をおこなった。その後、再びビオチンをHRP標識ストレプトアビジンにより検出し、ビオチンタイラミドによる増幅処理を都合2回繰り返すことにより、陽性シグナルをさらに増強させた。ビオチンタイラミドにより増幅された HPV DNAをHRP標識ストレプトアビジンにより検出し、過酸化水素存在下でDABと反応させ発色、ヘマトキシリンにより核染を施し封入後、鏡顕を行った。また、ISH法については成書⁹⁾に従った。なお、陽性コントロールは子宮頸癌培養細胞であるSiHa細胞のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用い、陰性コントロールは尖圭コンジローマのホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた。

結 果

DCSA-ISH法およびISH法を用いた HPV high risk group のウイルスDNAの検出結果をFig. 2に示す。ISH法により HPV high risk groupのウイルスDNAが検出できたのが、表層細胞内で HPV が多量に複製され感染初期と判断される4例のみであり、他の症例については、その存在を確認する事ができなかった。しかし、DCSA-ISH法を用いた結果ではISH法で陽性と認められた4例を含め検討を行った23例中、19例に HPV 陽性の所見を認めることができた。これらの中には基底細胞の核内にエピソードの状態に取り込まれていた HPV のウイルスDNAもドット状にシグナルとして明瞭に確認することができた (Fig. 3)。検討された23例において、年齢および異形性病変のグレードによる陽性率に著しい有意差は認められなかった。また、細胞診検査により Class IIIa 以上に診断された22症例のうち約82%にあたる18症例に HPV high risk group のウイルスDNAが確認され、従来のISH法での18%と比較すると高い検出率を示した。組織採取時からホルマリン固定されていた時間は2日から6日であったが、固定時間による HPV high risk group のウイルスDNAの検出に有意差は認められなかった。一方、陰性コントロールとして用いた尖圭コンジローマの症例では陽性シグナルは検出されなかった。

考 察

HPVの感染は、その組織所見より Koilocytosis を確認することにより、その感染を推定できるが、病気の進行や予後を予測するうえでは、その感染の有無と同時に、その同定が必要不可欠である。中でも、子宮頸癌の発生原因とされている HPV high risk group などの腫瘍原性 HPV は、宿主細胞の DNA に組み込まれた状態で存在する。しかし、そのコピー数は極めて少ないため、検出感度が600コピー以上とされているISH法では、型別の同定以前に、その存在を確認することさえも不可能であると考えられる。今回の検討の結果、ISH法での陽性率は18%と低く、その陽性像は、いずれも最表部の錯角化を示す細胞内で認められた。これは HPV が基底細胞や傍基底細胞などの増殖細胞内に、そのDNAが取り込まれる以前の段階であり、感染初期を示す状態であると判断される。したがって、それ以降の段階においてISH法での HPV の検出は、厳密には不可能であると考えられた。しかし、DCSA-ISH法を用いて検討した結果、細胞診検査において Class IIIa 以上に判断された22症例のうち82%にあたる18症例から HPV high risk group のウイルスDNAが検出された。病変の段階別に検討すると異形性病変例では76%、CIS病変例では83%の検出率であった。これはPCR法を用いた HPV DNA の検出の結果、前癌病変とされる異形性病変で70%以上、浸潤癌で約80%以上の症例では、HPV type 16, 18, 33のDNAが証明できたと Simada 等⁹⁾により報告されているが、本法を用いた検出感度も、ほぼ同様の結果を示したことから、本法はPCR法と同様の高い検出感度を持つものと考えられる。迅速で、かつ高感度の診断方法としてPCR法が普及しつつあるが、当施設はその性格上、提出材料が通常のホルマリン固定材料であるため、ホルムアルデヒドの影響により、DNAは断片化されている。したがって、PCR法での検出はプライマーを検討し、その増幅領域を短く設定しない限り、感度および再現性の面で不安定である。しかし、本法による HPV DNA の検出は固定液の影響がなく、

Sampla	age	Cytological diagnosis	Histological diagnosis	Fixed days	DCSA-ISH	ISH
A	41	Class II	Koilocytosis	2	+	-
B	50	Class IIIa	No malignancy	3	+	-
C	50	Class IIIa	Koilocytosis	4	+	-
D	41	Class IIIa	"	4	+	-
E	23	Class IIIa	Mild dysplasia	3	+	-
F	15	Class IIIa	"	2	+	-
G	37	Class IIIa	"	3	+	-
H	26	Class IIIa	"	3	+	-
I	51	Class IIIa	Moderate dysplasia	2	+	+
J	53	Class IIIa	"	3	-	-
K	35	Class IIIa	"	3	+	-
L	23	Class IIIa	"	3	+	-
M	24	Class IIIa	"	3	+	-
N	36	Class IIIa	"	5	+	-
O	30	Class IIIa	Severe dysplasia	3	+	+
P	78	Class V	"	2	-	-
Q	32	Class IIIb	"	4	+	-
R	64	Class IIIa	CIS susp.	2	-	-
S	54	Class IIIa	CIS	4	+	+
T	72	Class IIIb	"	2	+	-
U	43	Class IIIa	"	6	+	-
V	38	Class IIIb	"	2	+	-
W	59	Class V	"	3	+	+

Fig 2. The detection results of HPV DNA by DCSA-ISH and ISH methods.



Fig 3. HPV DNA was detected by DCSA-ISH method.

異種核酸であるため特異性が高く、安定で解析しやすい方法であると判断され、その利用価値は極めて有用であると考えられる。

参考文献

- 1) 鈴木美和子、佐多徹太郎、他：パラフィン切片におけるヒトパピローマウイルス遺伝子型の同定—in situ hybridization法の検討。病理と臨床、13：1039-1042、1995。
- 2) 吾妻美子、園 宏、他：HPV DNAsの分子組織学的検出。病理と臨床（臨時増刊号）、14：285-288、1996。
- 3) 谷 洋一：ターゲット増幅法（PCR in situ法）と新しいシグナル増幅法（B-T CSA法）の病理学への応用。病理と臨床（臨時増刊号）、14：246-249、1996。
- 4) Harold M.J. et. al.: A novel in situ hybridization signal amplification method based on the deposition of biotinylated tyramine. J Histochem cytochem. 43：347-352, 1995。
- 5) 橋詰 薫、谷 洋一：Catalyzed signal amplification (CSA) 法のin situ hybridizationへの応用。医学のあゆみ、184：691-695、1998。
- 6) 中川俊介、吉川裕之：ヒトパピローマウイルス。DNA診断法、金原出版、東京、1995、pp961-962。
- 7) 長谷川秀浩、五十嵐俊彦：改良Catalyzed signal amplification in situ hybridization (CSA-ISH) 法による潜在的HPV感染細胞からのDNAの検出。新潟県厚生連医誌、投稿中。
- 8) 堤 寛：DNA in situ hybridizationの基本的技法。病理と臨床（臨時増刊号）、18：233-235、2000。
- 9) Simada, M., Fukusima, M., Mukai, H. et al.: Amplification and specific detection of transforming gene region of human papillomavirus 16, 18 and 33 in cervical carcinoma by means of the polymerase chain reaction. Jpn J Cancer Res 1990, 81:1-5。

Original article

Detection of HPV high risk group by Double catalyzed signal amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) method.

Hidehiro Hasegawa* and Toshihiko Ikarashi*

Abstract

We established the improved method in Double Catalyzed Signal Amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) to identify the DNA of HPV high risk group. Tissue samples were collected from 23 case, in our center, who had been pathologically diagnosed as having HPV. The positivity of the DNA of HPV high risk group was seen in 82% in DCSA-ISH method. The result was an extremely higher detection rate compared with 18% in the pervious ISH method. We examined the result in terms of the stage of atypism. The positivity was seen in 83% in carcinoma in situ and 76% in dysplasia. This result has the detection sensitivity similar to PCR method. Simultaneously this method is excellent in the retrieval antigenity from that the damage of the DNA by formalin fixation. Therefore, the DNA detection of HPV by DCSA-ISH was considered as the most reliable prediction of the progress HPV infection.

key words : In situ hybridization (ISH), Catalyzed signal amplification in situ hybridization (CSA-ISH), Polymerase chain reaction (PCR), HPV DNA

*Kouseiren Byouri Center
Kawasaki 2520-1, Nagaoka, Niigata 940-0864