

原 著

## 改良Catalyzed signal amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) 法による潜在的HPV感染細胞からのDNAの検出

長谷川 秀 浩\* 五十嵐 俊 彦\*

潜在的HPV感染細胞の分子病理学的解析法として、高感度シグナル増幅法であるCatalyzed Signal Amplification in situ hybridization (CSA-ISH) 法に改良を加えたDouble Catalyzed Signal Amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) 法を考案し、子宮頸癌培養細胞であるSiHa細胞を用いてHPV type 16の検出感度について検討を行った。SiHa細胞でのHPV type 16のシングルコピーDNAの検出は、CSA-ISH法において約14%であったのに対し、DCSA-ISH法を用いた結果では、約50%と高い検出率を示した。また他のHPV感染が原因とされる症例について、HPV type 16のプロープを用いて本法を施行した結果、陽性シグナルは全く検出されなかった。したがって、本法を用いての潜在的HPV DNAの検出と型別の同定は、極めて高感度であるとともに、特異性の高い方法であると判断され、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：DCSA-ISH法、CSA-ISH法、PCR法、HPV DNA

### 緒 言

病理診断において、特殊染色や免疫組織化学染色、電子顕微鏡技術は確定診断を導き出すため、有用かつ必須な手技とされてきた。同時に近年、分子生物学手法の進歩により、数多くの病原体遺伝子がクローニングされ、ISH法、PCR法をはじめ、さまざまな分子病理学的解析法が確立されつつあり、新たな病理診断法の一助として、導入が検討されはじめている。様々な手技の中でISH法は、通常の染色と同様に、パラフィン切片をスライドガラスに張り付けた状態で施行できるため、顕微鏡下において、組織所見と対比しながら、組織や細胞レベルにおける特定の遺伝子の発現や局在を検索できるという利点がある細胞局の特異性を生かした、優れた分子病理学解析法の一つである。したがって、細胞内の潜在的なウイルス感染等の解析において有用性の高い方法として期待されており、検出高感度の改善について、さまざまな検討がなされている。<sup>1)2)</sup>中でも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) 法やターゲットを増幅するPolymelase Chain Reaction in situ (PCR-in situ) 法を用いることにより、通常のISH法では検出できなかった。シングルコピーDNAの検出が可能であると報告されている。<sup>3)4)5)</sup>しかし、PCR in situ法では、固定液として使用されているホルマリンにより、DNAの断裂が著しく、その設定条件を厳密に行わない限り、その至適条件の設定は容易でないとされており、未だ検討の段階である。一方、CSA-ISH法については検出感度が高く、条件設定が比較的容易なことからルーチンの病理診断法として導入されつつある。今回、我々は、ビオチン標識タイラミドを用いたシグナル増幅法であるCSA-ISH法に改良を加えた変法について検討を行った。すなわち、ビオチン標識タイラミドによる増幅操作を繰り返すこと

により、さらに陽性シグナルを増強させ、高感度としたDouble Catalyzed Signal Amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) 法を考案し、潜在的HPV感染におけるDNAの検出感度についてCSA-ISH法と比較検討を行った。

### 材料および方法

#### A：材 料

検討に用いたサンプルは、子宮頸癌培養細胞であるSiHa細胞：HPV 16、1~2コピー (DAKO・EN35530) と当施設において、尖圭コンジロームと診断された、会陰部切除材料のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた。それぞれを3 μmの厚さに薄切後、MSAコート付きスライドガラス (松波S 9444) にのせ60°Cで一晩伸展・乾燥した。

#### B：方 法

DNAプロープはHPV wide spectrum：HPV 16, HPV 18 (1 μg/ml, Tm=20°C) を使用した。DCSA-ISH法は、図1に示すようにプロープの浸透性を高めるため、加熱によって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プロープを滴下し、熱変性後、37°C一晩ハイブリダイゼーションを行った。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プをGen Point™ (DAKO) を用いてHRP標識ストレプトアビシンにより検出し、ビオチンタイラミド溶液で反応させ、シグナルの増幅を行った。その後、再びビオチンをHRP標識ストレプトアビシンにより検出し、ビオチンタイラミドによる増幅処理を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シンにより検出し、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、鏡検を行った。また、CSA-ISH法については、図1の二次増幅である手技ステップI・Jを除いたDCSA-ISH

\*〒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

- A: 脱パラフィン  
 1) キシレン 2分×3回  
 2) 100%アルコール  
 3) d-H<sub>2</sub>O 1分×3回
- B: DNAの露出  
 1) 90℃, 10mM クエン酸緩衝液・0.1%NP-40 中にて50分間加熱処理  
 2) 常温にて20分間放置  
 3) d-H<sub>2</sub>O 1分×3回  
 4) 0.002mg/ml プロテナーゼK / TBSによる20分間の蛋白分解処理  
 5) d-H<sub>2</sub>O 1分×3回
- C: 内因性ペルオキシダーゼの除去  
 1) 0.03%過酸化水素水/メタノール処理: 常温にて20分間  
 2) d-H<sub>2</sub>O 1分×3回
- D: 風乾  
 1) 100%アルコール: 1分  
 2) ドライヤーの冷風にて風乾  
 3) タコペンにより標本面を固む
- E: DNA 露出とプローブのハイブリダイズ  
 1) HPV wide spectrum HPV 16, HPV 18 (Tm=20, 1 μg/ml) を滴下し、カバーガラスをかける  
 2) DNAの変性: 92℃, 5分  
 3) 湿潤箱中にて37℃, 一晚ハイブリダイズ
- F: 洗浄  
 1) TBST 中にてカバーガラスをはずす  
 2) 0.1% SCC (55℃, 20分) にて洗浄  
 3) 0.01% SCC (55℃, 20分) にて洗浄  
 4) TBST 3分×3回
- G: プローブの検出  
 1) HRP 標識ストレプトアビジン (×1000) によるビオチンの検出: 15分  
 2) TBST 3分×3回
- H: ビオチン標識チアラミドの反応  
 1) ビオチン標識チアラミド溶液: 15分  
 2) TBST 3分×3回
- I: ビオチンの検出  
 1) HRP 標識ストレプトアビジン (×2000) によるビオチンの検出: 15分  
 2) TBST 3分×3回
- J: ビオチン標識チアラミドの反応  
 1) ビオチン標識チアラミド溶液: 15分  
 2) TBST 3分×3回
- K: ビオチンの検出  
 1) HRP 標識ストレプトアビジン (×2000) によるビオチンの検出: 15分  
 2) TBST 3分×3回
- L: DAB 発色  
 1) DAB 発色試薬調製後, 1~2分発色  
 2) TBST  
 3) 流水水洗
- M: 後染色および封入  
 1) ヘマトキシリンによる核染色: 1分  
 2) 脱水, 透徹, 封入

図1. DCSA-ISH法プロトコール

法と同様である。標本作製後、400倍顕微鏡下において、任意に選択した10ポイントについて100μm×100μm中の細胞総数と陽性シグナルが確認された細胞数の算定を行い、その結果を百分率換算し、陽性率を算出した。

結 果

SiHa細胞でのDCSA-ISH法を用いたHPV type 16 DNAの検出結果を図2. CSA-ISH法を用いた検結果を図3. に示す。両方法において、HPV type 16のシングルコピーDNAの検出は可能であったが、その検出率をみると、DCSA-ISH法では計測した10ポイントの細胞総数793個のうち陽性シグナルが認められたものが397個であり、その陽性率は50.0%であった。同様に、CSA-ISH法では、754個の細胞総数のうち陽性シグナルが認められたものが108個であり、その陽性率は14.2%と、DCSA-ISH法のそれに比べると、極めて低率であった。また双方の陽性シグナルは、図2. および図3. で示したように、DCSA-ISH法はCSA-ISH法のそれと比較すると、大きく明瞭であり、顕微鏡下において容易に判断できた。一方、尖圭コンジローマの症例を用いたHPV type 16 DNAの検出は、両方法において、その陽性シグナルは認められなかった。

考 察

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組織切片を用いて、HPV type 16の検出法について検討を行った。通常のISH法に比べ、検出感度が高いとされているCSA-ISH法とチアラミドによる陽性シグナルの増幅を繰り返したDCSA-ISH法の比較の結果、その検出率は、DCSA-ISH法の方が良好と判断された。また、その原因ウイルスがHPV type 16であることが確認されている尖圭コンジローマの症例に対して、HPV type 16を認識するDNAプローブを用い、本法を施行した結果、陽性シグナルは認められなかった。したがって、陽性シグナルの増幅を繰り返すことによる非特異的反応の出現などの弊害は生じないと判断され、型同定について特異的であり、かつ高感度にHPV DNAの検出が可能であると考えられた。HPVの感染は組織所見によりkoilocytosisを確認することで、その感染を推定できるが、病変の進行や予後予測するうえでは、その感染の有無と同時に型の同定が必

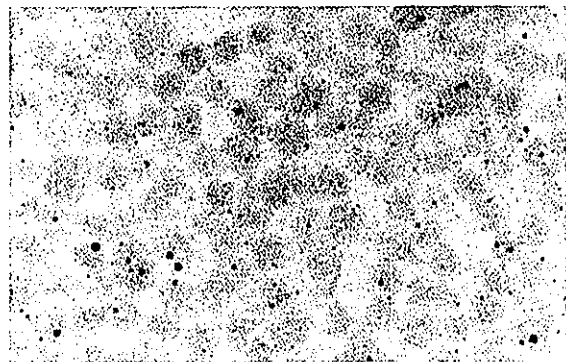


図2. DCSA-ISH法

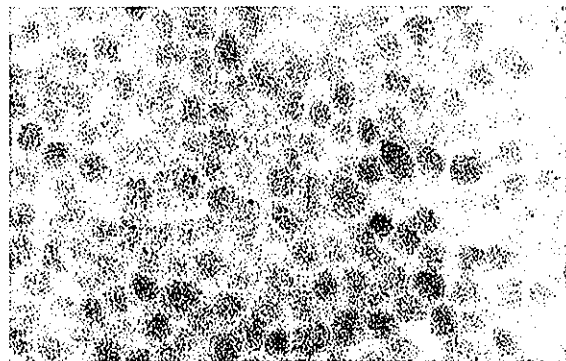


図3. CSA-ISH法

要不可欠である。HPVウイルスの中で、子宮頸癌の発生関与していると考えられhigh risk groupに区別されているHPV type 16, type 18, type 31, type 33等は、感染細胞内でウイルス粒子を作らず、宿主細胞の核にDNAを取り込まれた状態で存在する。したがって、通常のISH法や、免疫組織化学染色では、型の同定以前に、その存在を確認することさえ困難である。しかし本法を用いる事により、そのような潜在的HPV感染である核内に取り込まれたHPV DNAの検出および型の同定が可能であると判断され、本法によって提供される情報により、臨床側の適切な対応が期待できることから、その利用価値は極めて有用であるものと考えられる。

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, 園部 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) 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.

Original article

## Identification of integrated human papilloma virus DNA (HPV-DNA) by the improved Catalyzed signal amplification in situ hybridization method (CSA-ISH)

Hidehiro Hasegawa\* and Toshihiko Ikarashi\*

We established the improved method in CSA-ISH to identify the cryptic HPV-DNA integrated in host-DNA. Specimens were SiHa cell which had single copy of HPV subtype 16. While routine CSA-ISH procedure showed 14% of positivity, our new method of double CSA-ISH(DCSA-ISH) improved it to 50%. Their specificity was, furthermore, confirmed by negative staining in cells infected by other subtype HPV. Our method was more reliable for the confirmation of HPV infection.

Key Word : DCSA-ISH method, CSA-ISH method, PCR, HPV DNA

---

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