

原 著

Polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR–RFLP) 法による子宮頸癌関連 Human papillomavirus (HPV) の同定

病理センター、遺伝子診断室（中越遺伝子診断研究会）；臨床検査技師¹⁾、病理医²⁾

長谷川 秀 浩¹⁾、五十嵐 俊 彦²⁾

子宮頸癌関連 HPV の分子生物学的解析法として、ホルマリン固定パラフィン包埋された子宮頸部病変24症例を対象に、Polymerase chain reaction (PCR) 法による HPV-DNA の検出を可能とし、Double catalyzed signal amplification-in situ hybridization (DCSA-ISH) 法との検出結果について比較検討した。さらに増幅された HPV-DNA を各種制限酵素により処理する Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 法により、HPV の型同定を行なった。その結果、HPV type 16 の検出率が DCSA-ISH 法では16.6%であったのに対し、PCR 法では29%と検出感度については PCR 法の方が高いと判断された。また、RFLP 法での型同定では HPV type 16 が7例、type 58 が5例、type 52 b が1例認められ、DCSA-ISH 法で検出不可能な HPV type も高率に確認された。従って、これら検出不可能であった HPV 検出の重要性からも、本法による HPV-DNA の検出と型同定は、より詳細な HPV type の解析が可能であり、婦人科病変の予後や進展を推測するうえでも極めて有用な情報を提供してくれるものと判断された。

キーワード：PCR-RFLP, ヒトパピローマウイルス (HPV), 子宮頸癌, ホルマリン固定パラフィン包埋組織

緒 言

Human papillomavirus (HPV) は、約8000bp の環状二本鎖 DNA をゲノムとして持つ DNA 腫瘍ウイルスで、子宮頸癌組織から分離されて以来、遺伝子型を異にする約100種類の亜型が確認されている。その感染は皮膚や粘膜上皮に生じる良性腫瘍の病因ウイルスであるほか、婦人科領域においては子宮頸部前癌病変とされる子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN) および子宮頸癌の発生に関与していることが知られている。中でも HPV type 16, 18, 31, 33, 35, 52, 58 は high risk group および intermediate risk group に分類されていることから、感染による病変の進行について注意を払わなければならない¹⁾。これら癌関連ウイルスとされる HPV の各タイプは感染後、増殖細胞である基底細胞ないし傍基底細胞の核内に取り込まれ、ウイルス粒子を作らないことから、ウイルスカプシド抗原に対する抗体を用いた免疫染色では、その存在を確認することが不可能であ

る。また、in situ hybridization (ISH) 法では HPV の検出感度は600コピー以上とされることから、増殖細胞の核内にエピゾームとして取り込まれている HPV-DNA の検出は不可能である。検出感度から考えるならば PCR 法を用いることが望ましいものの、通常の病理組織標本から抽出された DNA を検出材料とした場合、標本製作過程における固定液や有機溶媒、熱等の影響により DNA が断片化されていることから、新鮮な組織材料に比べ分子生物学的技法を用いた遺伝子解析には不向きである²⁾⁽³⁾。しかし、病理組織像から考えられる感染症について、証明可能な病理組織標本からの遺伝子解析法の確立が望まれる。我々は HPV 感染について PCR 法と同程度の検出感度を持つとされる Catalyzed Signal Amplification in situ hybridization (CSA-ISH) 法⁴⁾⁽⁵⁾に改良を加え、さらに高感度にした Duple Catalyzed Signal Amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) 法⁶⁾⁽⁷⁾を考案し、HPV high risk group DNA の検出を実施してきた。本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貼り付けた状態で試行できることから、顕微鏡下で組織所見と対比しながら、組織や細胞レベルにおける局在を検索できるという利点がある優れた分子病理学的解析法の一つである。しかし、市販されている HPV high risk group 検出用プローブは Type 16, 18, 31, 33 のみであり、その他のタイプについて検索できないことから子宮頸癌関連 HPV の検出にも限界がある。

今回、我々は子宮頸部病変が認められた病理組織材料から子宮頸癌関連 HPV の分子生物学的検出法の確立を目的に検討をおこなった。すなわち、発癌に最も関係が深いとされる HPV E6 および E7 遺伝子をコードする consensus primer により、PCR 法での HPV high risk group および intermediate risk type の HPV DNA の検出を行ない、DCSA-ISH 法との検出結果について比較し、有用性について検討した。さらに増幅された PCR 反応産物を RFLP 法により型同定を行った。

症例および方法

1：症例

検討材料は2002年に当施設における細胞診検査の結果、要精査を指摘され、その後おこなわれた組織検査の結果、軽度異型成から上皮内癌と診断された17才か

ら81才までの24例のホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた。細胞診検査結果および組織診検査結果については Fig. 1 に示す。

Sample	Age	Cytological diag.	Histological diag.	Fixed days
A	29	Class III a	sever dysplasia	1
B	73	Class IV	moderate dysplasia	1
C	34	Class III a	moderate dysplasia	2
D	35	Class III a	koilocytosis	1
E	17	Class III a	koilocytosis	1
F	22	Class III a	koilocytosis	2
G	42	Class III a	moderate dysplasia	2
H	38	Class III a	koilocytosis	2
I	29	Class III a	CIS	2
J	44	Class III a	cervicitis	1
K	37	Class III a	sever dysplasia	2
L	39	Class III b	moderate dysplasia	2
M	47	Class III a	cervicitis	2
N	32	Class III a	koilocytosis	2
O	31	Class III a	sever dysplasia	4
P	35	Class III b	mild dysplasia	3
Q	62	Class III b	CIS	2
R	50	Class III a	moderate dysplasia	1
S	30	Class III a	sever dysplasia	2
T	29	Class III a	moderate dysplasia	2
U	47	Class III a	mild dysplasia	2
V	49	Class III a	cervicitis	2
W	52	Class III a	mild dysplasia	2
X	81	Class IV	CIS	1

Fig.1 Detection sample of HPV DNA by DCSA-ISH and PCR-RFLP methods.

2 : DNA 抽出

ホルマリン固定パラフィン包埋された子宮頸部組織を10μmの厚さに薄切し、その組織片2枚をマイクロチューブにとり、Takara DXPAT を約0.5ml 添加し、能書に従い得られた抽出液に対し、PCR 阻害物質を除去する目的でDNA抽出液100μl に対し冷プロパノール250μl、3M酢酸ナトリウム液10μl を加えDNAを再度、析出沈降させた後、冷70%エタノールにより2回の洗浄をおこない、ヒートブロックにより乾燥した後、50μl のTE液に溶解した。

3 : プライマー

Seedorf, K 等⁽⁸⁾により解析された HPV type16の塩基配列の中で、Fujinaga 等⁽⁹⁾により設定された子宮頸癌関連 HPV の各タイプを増幅可能な E6 と E7 遺伝子の一部をコードする consensus primer でシーケンスの419-656に該当する遺伝子増幅が行なわれる。プライマーの塩基配列は Forward : 5'-tgg caa aaa ccg ttg tgc cc-3' と Reverse : 5'-gag ctg tcg ctt aat tgc tc-3' であり、この組み合わせにより増幅される231bp-268bpを標的領域とした。尚、本プライマーにより増幅される HPV は type16, 18, 31, 33, 35, 52b, 58 であり、尖圭コンジローマの原因ウイルスとされている type 6, 11 などを含み、現状において DNA シーケンスが確認されている他の HPV とのホモロジーについては否定されている。

4 : PCR 法

DNA サンプル 1 μl で、全量20μl 反応液 (d-DW : 14μl, 10×PCR buffer with 15mM MgCl₂ : 2 μl, 2 mM dNTP : 2 μl, 25pM F primer : 0.5μl, 25pM R primer : 0.5μl, 1 U Ampli Taq Gold) を調整し、DNA 増幅にはプログラムテンプレートコントロールシステム PC 707 (Astec Japan) を使用した。サーマルプログラムは95℃10分の Hot start を行った後、① denature 94℃ 1分、② annealing 55℃ 2分、③ extension 72℃ 2分を40サイクル行った後 Last extension として72℃10分間伸張させた。

5 : 増幅 DNA の検出

PCR 反応液 3 μl を12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動後、エチジウムブロマイド (EtBr) 染色を行い紫外線 (UV) イルミネーターにより増幅産物の確認を行った。

6 : 制限酵素断片長多型 (Polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism : PCR –RFLP) 法による解析

PCR 法での結果、子宮頸癌関連 HPV DNA の存在が確認された症例について、HPV 各タイプの DNA 配列から、それぞれのタイプについて特徴的であると判断される配列を制限酵素により切断し、その電気泳動パターンよりタイピングを行なった。使用した制限酵素と切断された結果、確認されるフラグメントの長さについては Fig. 2 に示すとおりである。また、制限酵素処理の反応液の組成は増幅 HPV-DNA 6 μl について 10×M Universal buffer 2 μl, Enzyme 1 μl, d-H₂O 11μl を加え、37℃ 2時間の反応を行なった。

HPV type	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV35	HPV52b	HPV58
Total length (bp)	238	268	233	244	232	231	244
Enzyme Ava II	157/81	172/96	NC	136/108	NC	NC	NC
Afa I	NC	NC	117/115	NC	NC	NC	NC
Bgl II	NC	NC	NC	NC	NC	176/55	NC
Acc I	NC	NC	NC	NC	NC	NC	126/118
Ava I	NC	NC	NC	NC	186/46	NC	NC

*NC : not confirmed

Fig.2 Restriction fragment size of consensus PCR products.

結 果

PCR 反応液を12.5%ポリアクリルアミドゲルにより電気泳動した結果を Fig. 3 に、その結果、子宮頸癌関連 HPV の存在が確認された PCR 反応産物を RFLP 法により解析した泳動パターンを Fig. 4 に示す。PCR 法および DCSA-ISH 法による子宮頸癌関連 HPV の検出結果を Fig. 5 に示す。PCR-RFLP 法により解析された HPV type についてみると type16 が 7 例、type 58 が 5 例、type52b が 1 例であり、その中で type16 と 58 の複合感染例も 1 例認められた。DCSA-ISH 法で陽性と判断されたものが、検討した症例数の16.6%にあたる4例のみであったのに対し、PCR 法での検出結果は検討した症例の50%にあたる12例から検出された。なお、DCSA-ISH 法により陽性とされた4例のうち3例は PCR-RFLP 法により HPV type16 と判断され

たが、Sample VにおいてDCSA-ISH法で陽性と判断されたもののPCR法ではHPV DNAの増幅が認められなかった。DCSA-ISH法により検出できないタイプを除外し、検出率を比較した場合、PCR法で検出されたtype16の検出率を100%とするとDCSA-ISH法で

のそれは43%となる。また、子宮頸癌関連HPVの感染が認められた症例について、年代別にみると20才代以下で80%、30才代で44%、40才代で50%の感染がみられた。

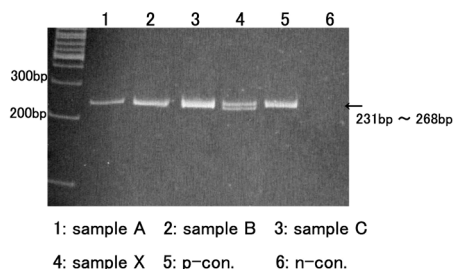


Fig. 3 Amplification of the malignant HPV DNA genes coding for the E 6 and E 7 genes.

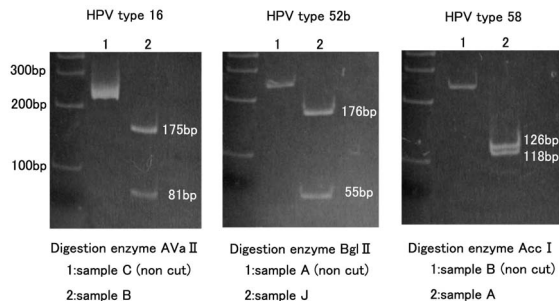


Fig. 4 Restriction fragment patterns of consensus PCR products by PCR-RFLP.

Sample	Age	Cytological diag.	Histological diag.	DCSA-ISH	PCR	Finally confirmed HPV subtype
A	29	Class III a	severe dysplasia	-	+	58
B	73	Class IV	moderate dysplasia	+	+	16
C	34	Class III a	moderate dysplasia	-	+	58
D	35	Class III a	koilocytosis	-	-	
E	17	Class III a	koilocytosis	-	+	58
F	22	Class III a	koilocytosis	-	+	16
G	42	Class III a	moderate dysplasia	+	+	16
H	38	Class III a	koilocytosis	-	-	
I	29	Class III a	CIS	-	+	58
J	44	Class III a	cervicitis	-	+	52b
K	37	Class III a	severe dysplasia	-	+	16
L	39	Class III b	moderate dysplasia	-	-	
M	47	Class III a	cervicitis	-	-	
N	32	Class III a	koilocytosis	-	+	16
O	31	Class III a	sever dysplasia	-	-	
P	35	Class III b	mild dysplasia	-	-	
Q	62	Class III b	CIS	-	-	
R	50	Class III a	moderate dysplasia	-	-	
S	30	Class III a	severe dysplasia	+	+	16
T	29	Class III a	moderate dysplasia	-	-	
U	47	Class III a	mild dysplasia	-	-	
V	49	Class III a	cervicitis	+	-	
W	52	Class III a	mild dysplasia	-	-	
X	81	Class IV	CIS	-	+	16+58

Fig. 5 Analysis results of HPV DNA by DCSA-ISH and PCR-RFLP methods.

考 察

近年の分子生物学的技術の発展により、病理組織診断の補助的手段として、迅速かつ高感度であるPCR法により、細菌やウイルスゲノムが検出され確定診断の一助とされている。10(11)2病理組織標本からの遺伝子検索については生標本と異なり、バイオハザードについて特別な装置は必要とされない事から、通常の検査室で一般の検体と同様に扱える事ができると共に、

過去にさかのぼり情報収集を行う事ができるレトロスペクティブな検索が可能であるという大きな利点がある。しかし、病理組織材料を用いた病原遺伝子の検出についてはホルムアルデヒドの影響により、抽出されるDNAが断裂されている事やPCR阻害物質の混入から、比較的長い領域を増幅するようなプライマーの設定では検出感度および再現性の面において極めて不安定であるとされている。従って、本解析法を用いた場合、増幅領域の短いプライマーを設定するとともにホ

ホルムアルデヒドによる影響を最小限に抑える必要がある。中島(13)はPCR法によるHPV-DNA増幅には200bp程度を増幅するプライマーの設定が望ましいとしているが、我々は固定液を中性ホルマリン(pH6.0)を使用し、固定時間を短期間にすることによりDNAに与えるダメージを最小限に抑え、同時に組織内に存在するさまざまなPCR疎外物質や狭雑物を除去する目的から市販のDNA抽出キットより回収されたDNAテンプレートとを再洗降させ、DNAベレットをバッファーで洗浄することにより、231bp-268bpと通常の病理組織標本からは難しいと考えられる増幅領域について安定したDNA増幅を可能とした。DCSA-ISH法はシングルコピーのHPV-DNAの検出も可能なことからPCR法に匹敵するとされるものの、今回の比較検討した結果において、検出用プローブがHPV type 16, 18, 31, 33だけであり、検出できるHPV typeの数が異なることを考慮してもPCR法の検出感度に及ぶものではなかった。本法は、組織所見が観察できるとして特性ゆえに薄切されるパラフィン切片の厚さは3µmから4µmと通常の染色標本と同様の厚さとなる。従って、その厚さの中に必ずしもHPV-DNAが含まれているとは限らないことから偽陰性と判断される可能性も否定できない。今回検出されたHPV typeはDCSA-ISH法で検出不可能なtype58が5例、type52bが1例含まれていることから、仮にDCSA-ISH法の検出感度がPCR法と同様であると仮定しても、子宮頸癌発生に関連するHPVの50%は検出できないことになる。したがって、これらのtypeも含め検出が可能な方法の導入が望まれる。また、DCSA-ISH法で陽性と判断されながらPCR法でHPV-DNAが増幅してこなかった症例についてはホルムアルデヒドによるDNAの断片化やPCR阻害物質の混入の結果、生じる偽陰性反応であることも否定できないが、DCSA-ISH法の陽性基準は比較的、相対的な部分もあり、厳密には鏡検する人により、多少のパラツキがあることも事実である。また、タイラミドによる増幅反応を繰り返すことにより生じる非特異的なドットを陽性と判断してしまう可能性も否定できない。したがって、陽性基準がDCSA-ISH法に比べ客観的なPCR法では担当者による判断の違いが生じにくく、再現性についても安定しているものと考えられる。一方、HPV感染は性行為感染症として、特に若年層に急速に広がっていることが報告されているが、今回検討した結果においても20才代以下の平均感染率が80%と高率であり、同様の傾向があるものと判断された。HPV感染のスクリーニング検査として有効と考えられる細胞診検査では、その感染が示唆されるparakeratosis, koilocytosis, smudged核など特徴的な所見が認められるものの、厳密にはそれらの所見のみにおいて、HPV感染と断定することはできない。同様にそれらの所見と型別との関連については確立されていない事から所見だけのTypingについても不可能である。しかし、CINから子宮頸癌に進展するリスクが感染しているHPV typeによって異なることから、そのtypeを同定することは、病変の進展予測が可能となり、有用性の高い情報であると考えられる。しかし、その型判定については免疫染色等では解析できない事からPCR法などの分子生物学的手法が不可欠となる。本法はDCSA-ISH法と比較しても、その検出感度は高く、増幅されるHPVは一度に多くのHPV-DNAを増幅できる consen-

sus primerを用いていることから、発癌に関与するといわれているhigh risk type および intermediate risk type のほとんどのHPVが増幅でき、同時に制限酵素による切断パターンから重複感染も含み、その型判定が可能であった。また、これらのバンドの位置はDNAシーケンスから理論的に予想される制限酵素処理におけるバンドの位置と一致するものであり、現状において最も高感度で特異性の優れた方法であると判断される。したがって、本法によるHPV感染と感染タイプの固定の結果は個々の症例に対し、適切な対応が可能となることから、その利用価値は極めて有用であると考えられる。

文 献

1. 川裕之、恩田貴志. 子宮頸癌の遺伝子診断. 医学のあゆみ 1995; 174(5): 499-501.
2. 地勇人、布施川久恵. 腸結核のアプローチ—遺伝子検査による診断—診断の進歩と対策. Medical Practce 1997; 14: 1123-1127.
3. 日本臨床検査技師会. 臨床検査遺伝子・染色体教本 技術操作編 DNAの抽出 東京:近代出版; 1998: 31-33.
4. 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) 1996; 14: 246-249.
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 1998; 184: 691-695.
6. 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 2000; 11(1): 39-41.
7. 長谷川秀浩、五十嵐俊彦. Double catalyzed signal amplification in situ hybridization (DCSA-ISH) 法による HPV high risk group の検出. 新潟県厚生連医誌 2000; 11(1): 35-38.
8. Seedorf, K. et al. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. Virology 1985; 145(1): 181-185.
9. Yukao, F. et al. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using of the polymerase chain reaction. J General viology 1991; 72: 1039-1044.
10. 長谷川秀浩、五十嵐俊彦. PCR (Polymerase chain reaction) 法を用いたホルマリン固定パラフィン包埋組織からの結核菌 DNA の検出. 新潟県厚生連医誌 2000; 10(1): 21-24.
11. 長谷川秀浩、片桐丘亮、五十嵐俊彦. Polymerase chain reaction (PCR) 法による病理組織からの Cytomegalovirus (CMV) DNA の検出. 新潟県厚生連医誌 2003; 12(1): 6-8.
12. 長谷川秀浩、片桐丘亮、五十嵐俊彦. ツツガムシの DNA 診断—病理組織への応用—. 新潟県厚生連医誌 2003; 12(1): 9-12.
13. 中島孝. パピローマウイルス関連腫瘍. 病理と臨床 (臨時増刊号) 1996; 14: 203-207.

英 文 抄 録

Original article

Detection and typing of the malignant subtype of Human papillomavirus (HPV) by polymerase chain reaction-restriction length polymorphism (PCR-RFLP).

Department of Genetic diagnosis (Chu-etsu genetic diagnosis study group), Pathology Center; Clinical technologist 1), Pathologist 2)

Hidehiro Hasegawa 1), Toshihiko Ikarashi 2)

Objective and study design : This study was conducted to establish for an identification and typing of the malignant subtypes HPV DNA (types16, 18, 31, 33, 35, 52b and 58) by PCR-RFLP. We used consensus primer pairs and

amplified malignant HPV DNA. The examined tissues were collected from 24 cases of the routinely-processed paraffin-embedded sections that were fixed by neutral formalin. Those tissue samples were histopathologically diagnosed as having HPV in 2003 in our center. The amplification PCR products were digested with restriction enzymes and HPV subtype diagnosed from digested patterns. Results and Conclusion : The malignant HPV DNA were confirmed in 12 cervical tissues as follow. (HPV type16 was detected in 7 cases, HPV type58 in 5 cases, and HPV type 52b in one case). This method is very useful for a detection and typing of malignant HPV DNA.

Key word : Polymerase chain reaction-restriction length polymorphism (PCR-RFLP), Human papillomavirus (HPV), Cervical cancer, Formalin-fixed paraffin-embedded tissue