原 著

Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法による 腔スミアパパニコロウ脱色標本からの ヒトパピローマウイルス抗原の検索

国立循環器病センター臨床検査部病理¹⁾, 国立大阪南病院研究検査科病理²⁾,

阪大微生物病研究会臨床検査部病理³⁾, 済生会滋賀県病院中検病理⁴⁾

岩 信造¹⁾ 田原 義孝¹⁾ 由谷 親夫¹⁾ 植田 初江¹⁾

増田 一吉²⁾ 市田起代子³⁾ 小林 忠男⁴⁾

細胞診断学的に human papilloma virus (HPV) の感染を疑った 14 例と, HPV 感染所見がみられない 2 例の腔スミアパパニコロウ脱色標本から HPV 抗原を検索する目的で, avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法による免疫細胞学的観察を行った. HPV の感染を疑った 14 例中 11 例に HPV の抗原が koilocyte の核に認められた. 残りの 3 例と非感染例 2 例には HPV 抗原が陰性であった. koilocyte への HPV 抗原陽性率は 0% から 57.2% までの差が認められた.

以上のごとく, 腔スミアパパニコロウ脱色標本からも HPV 抗原の検出が可能であり, HPV 感染の診断に有用である.

Key words : HPV antigen—Condyloma—Immunocytochemistry—Koilocytotic atypia—ABC method

I. はじめに

Condyloma accuminata (genital warts) は human papilloma virus (HPV) により発症することが知られ, このウイルスは性的接触により感染することが古くから知られている. condyloma accuminata の細胞形態の特徴的な変化として koilocytosis, dyskeratocytes, binucleation などの出現が多く, 研究者により報告されており^{1,3,7,13,14,18~20)}, 組織学的には flat condyloma, papil-

loma, そして inverted condyloma に分類がなされている. 最近では子宮頸部の condyloma と子宮頸癌との因果関係が報告されている^{2,17,19,20)}. HPV 抗原の検索には凍結切片による蛍光抗体法やパラフィン切片による peroxidase-antiperoxidase (PAP) 法により証明されている¹⁰⁾. また, PAP 法による HPV 抗原の証明にはパラフィン切片や細胞診材料にも応用されている^{6,15,21,24)}. しかし, Hsu ら⁸⁾により開発された, avidin-biotin-peroxidase complex 法は PAP 法に比べて感度や特異性の点から優れており, 多くのキットが市販されている.

Detection of human papilloma virus antigen in Papanicolaou-stained cervical smears by an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method

Nobuzo IWA, C.T., I.A.C., Yoshitaka TABARU, C.T., I.A.C., Chikao YUTANI, M.D., Hatue UEDA, M.D.

Department of Clinical Laboratory, National Cardiovascular Center

Kazuyoshi MASUDA, C.T., I.A.C.

Department of Research Laboratory, National Osaka Minami Hospital

Kiyoko ICHIDA, C.T., I.A.C.

Department of Clinical Laboratory, Research Foundation for Microbial Disease of Osaka University

Tadao KOBAYASHI, C.T., C.F. I.A.C.

Cytopathology, Saiseikai Shiga Hospital

論文別刷請求先 ☎565 吹田市藤白台5の7の1 国立循環器病センター臨床検査部 岩 信造

昭和62年3月16日受付

昭和62年8月28日受理

Table 1 ABC staining method for HPV

- 1) Fix with spray fixative.
- 2) Bathe in 3% hydrogen peroxidase in methanol for 30 minutes to block endogeneous peroxidase activity.
- 3) Rinse in tap water for 5 minutes and wash in 0.01M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.6 for 5 minutes.
- 4) Bathe in normal goat serum for 20 minutes.
- 5) Add drops of anti-HPV antibody (primary antibody, Kyowa Medix, Inc., Tokyo, Japan) for 20 minutes.
- 6) Wash with three changes of PBS, 5 minutes each.
- 7) Add drops of biotinylated antibody solution for 20 minutes.
- 8) Wash with three changes of PBS, 5 minutes each.
- 9) Add drops of ABC reagent for 20 minutes.
- 10) Wash with three changes of PBS, 5 minutes each.
- 11) Add drops of 3-amino-9-ethylcarbazole for 5 minutes.
- 12) Rinse with tap water for 5 minutes.
- 13) Counter stain with hematoxylin for 1 minute.
- 14) Rinse with tap water for 5 minutes.
- 15) Mount with glycerol gelatin.

The staining reaction was done in a moist chamber at room temperature.

Table 2 Cytology of HPV infection with ABC staining method in cervicovaginal smears

Case	Age	Cytologic impression for HPV	Cytologic findings				HPV antigen
			Koilocyte dyskeratocyte		nuclear		
					bi	multi	
1	58	Positive	±	+	+	+	+
2	49	Positive	+	+	+	+	+
3	42	Positive	+	+	+	—	—
4	25	Positive	+	+	+	—	+
5	47	Positive	+	+	+	—	+
6	69	Positive	±	+	+	+	+
7	31	Positive	+	+	+	—	+
8	30	Positive	+	+	+	—	+
9	31	Positive	+	+	+	+	—
10	49	Positive	+	+	+	+	—
11	27	Positive	+	+	+	+	+
12	28	Positive	+	+	+	—	+
13	31	Positive	+	+	+	—	+
14	35	Positive	+	+	+	—	+
15	47	Negative	—	—	—	—	—
16	35	Negative	—	—	—	—	—

1) ABC : Avidin-biotin-peroxidase complex

2) Cytologic findings are shown as presence (+) or absence (—)

3) Immunological results are shown as positive (+) or negative (—)

今回、著者らは市販のABCキットを用い、HPV抗原の検索を目的に細胞診材料につき検討を行った。

II. 材料と方法

細胞診材料にて condyloma の感染所見が認められた

14例と、対照として感染所見が認められなかった2例につき、avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法により HPV 抗原を観察した。HPV の感染所見を認めた患者の年齢は25歳から69歳までであり、平均年齢は39.4歳である。パパニコロウ染色標本における HPV 感染細胞の判定基準は Meisels ら¹⁹⁾によった。すなわち, koilo-

写真 1 2核の koilocytotic atypia (Pap. 染色, $\times 1,000$)

写真 2 koilocytotic atypia の核に HPV 抗原陽性を示す (ABC 法, $\times 1,000$)

cytosis, perinuclear halo, multinucleation などである。パパニコロウ染色標本中に koilocytosis の出現した材料をキシレンに浸し、カバーガラスをはがし、1% 塩酸アルコールで脱色後、ABC 法を実施した。

酵素抗体法：パパニコロウ染色標本からの ABC 法は Vectastain (Vector 社, 米国)、一次抗体は PAP KIT の papilloma virus primary antibody (DAKO 社, 米国) を使用した。ABC 法の手順は Table 1 に示す方法で反応を行った。反応終了後は再びカバーガラスをはがし、エチルアルコールで脱色し、再びパパニコロウ染色を行い保存した。

III. 結 果

細胞診における HPV 感染所見と ABC 法による HPV 抗原の検討成績は Table 2 に示すように、パパニコロウ染色標本では koilocytosis が出現し、これらの感染細胞

写真 3 N/C 比が高く, hyperchromatic な atypical condyloma 細胞 (Pap. 染色, $\times 1,000$)

写真 4 atypical condyloma 細胞の核に HPV 抗原陽性を示す (ABC 法, $\times 1,000$)

には核濃縮や核内クロマチンの不明瞭な dyskeratotic cells が出現し、特に, koilocytosis を伴った 2 核細胞が高頻度に出現した (写真 1)。なかには多核細胞も出現した。ABC 法で酵素抗体を行うと 14 例中 11 例に HPV 抗原陽性が認められた。しかし、ほかの 3 例は koilocytosis の所見があったにもかかわらず HPV 抗原は陰性であった。HPV 抗原は主として perinuclear halo をもった koilocyte の核に認めた (写真 2)。dyskeratotic cells に HPV 抗原は認めなかった。Table 2 の症例 1 と 6 には明らかな koilocytosis がみられない atypical condyloma 細胞が出現し、核クロマチンは粗大顆粒状で、核内構造は不明瞭であった (写真 3)。これらの細胞の核も HPV 抗原陽性を示した (写真 4)。ABC 法で染色を行い, koilocytosis を認めた細胞を 50 個数え, HPV 抗原陽性率を求めると 0% から 57.2% までの差が認められた。

IV. 考 察

臨床上, condyloma は外陰部に発症した場合は容易に診断, 治療が可能であるが, 子宮頸部の場合, 特に flat condyloma は肉眼的には診断不可能な場合がある。しかも, これらの病変は細胞診や病理組織学的には dysplasia の病変とよく類似しており, 通常は dysplasia とみなされやすい^{1, 15, 18, 20}。ウイルス感染材料を含め, 外科材料にも酵素抗体法が導入されている現在, 子宮頸部組織のみならず, 細胞診材料にも応用され, condyloma の病変に HPV の抗原が証明され, HPV と子宮頸部癌との関係が注目されるようになった^{6, 15, 24}。1987年に Brigati ら²⁾は肺に感染したアデノウイルスのパラフィン切片中に in situ hybridization の技術を応用し, ウイルス DNA を細胞診材料でも証明されるようになった²³。McDougall ら¹⁶⁾は in situ hybridization の技術を用い, HPV DNA を腫瘍組織中に検出している。これらの成績は子宮頸部において HPV 感染が initiator-promoter の因果関係があることを示唆している。われわれの研究において, koilocyte や dyskeratotic cells, multinucleation といった condyloma に特徴的な細胞所見を確認することができた。しかしながら, 3例については HPV の感染所見を認めたにもかかわらず, HPV 抗原は陰性であった。このことは HPV の maturation の時期によって HPV の capsid に対する抗原性の表現状態が異なるためと考えられる。また, Morin と Meisels ら²⁰⁾は dyskeratotic cells にも HPV 粒子を証明しており, 酵素抗体法ではこれらの細胞には HPV 抗原は証明し得なかった。このことは, HPV 抗原性の量的あるいは質的な保有にも関係しているかもしれない。また, HPV 抗原が固定から染色, さらに塩酸アルコールによる脱色に至る過程の技術的なことにより失活してしまったのかは不明である。本研究の成績からも koilocyte の HPV 抗原の陽性率は 0% から 57.2% までの差が認められたことからもうかがえる。しかしながら, herpes virus^{9, 12)} や chlamidia²²⁾ の感染のパパニコロウ脱色標本からも抗原の証明がなされており, ルーチンのパパニコロウ染色標本から HPV 抗原を確認することにより, HPV と子宮頸癌との関連性についての研究が可能と思われる。さらに, in situ hybridization の併用により, HPV の DNA を証明していくことも大きな課題と考えられる。

Meisels ら¹⁷⁾, 久保田ら¹⁴⁾の報告にもあるように明らかな koilocytosis を伴わず, クロマチンが不明瞭で粗大顆粒状を示し, なかには多核巨細胞もみられ, dysplasia

の細胞によく類似する atypical condyloma が確認されている。本研究でも 2 例の atypical condyloma 細胞の核に HPV 抗原陽性を認めた。このような細胞に対しても酵素抗体法を用い, HPV 抗原を確認し, 追跡することも HPV と子宮頸癌との関係を解明するのに役立つものと思われる。

本論文の要旨は第 27 回日本臨床細胞学会総会にて発表した。

Summary

Destained-cervical smears from 14 patients with condylomatous atypia are demonstrated by means of an avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method with antisera to human papillomavirus (HPV) to demonstrate the presence of HPV antigen.

The staining for HPV antigen was present in 11 cases of cellular samples with condylomatous atypia while 3 cases of condylomatous atypia and 2 cases of non-infected cellular samples failed to show HPV antigen. Specific antigen for HPV was intensely presented in the nuclei of cells having a single or binucleated koilocytotic cells. The percentages of HPV antigen in koilocytes were ranged 0% to 57.2%.

The immunocytochemical technique of HPV antigen provides further confirmation to the HPV etiology of cervical condylomatous lesions.

文 献

- 1) Boon, M.E. and Fox, C.: Simultaneous condyloma acuminatum and dysplasia of the cervix, *Acta Cytol.*, 25: 393~399, 1981.
- 2) Brigati, D.J., et al.: Detection of viral genomes in cultured cells and paraffin-embedded tissue sections using biotin-labeled hybridization probes, *Virology*, 126: 32~50, 1983.
- 3) Casas-Cordero, M., et al.: Origin of the koilocyte in condylomata of the human cervix, *Ultrastructural study*, *Acta Cytol.*, 25: 383~392, 1981.
- 4) 千綿教夫・他: 集検コルポ診により発見された子宮頸部 condyloma acuminatum 3 例の細胞診断学的検討, *日臨細胞誌*, 22: 243~249, 1983.
- 5) Crum, C.P., et al.: Human papilloma virus type 16 and early cervical neoplasia, *N. Engl. J. Med.*, 310: 880~885, 1984.
- 6) Deligeorgi-Politi, H., et al.: Immunocytochemical localization of human papilloma virus and cytomorphologic

- correlation of smears and biopsies of cervical flat condyloma, *Diag. Cytopathol.*, 2 : 320~325, 1986.
- 7) Hills, E. and Lavery, C.R. : Electron microscopic detection of papilloma virus particles in selected koilocytotic cells in a routine cervical smears, *Acta Cytol.*, 23 : 53~56, 1979.
 - 8) Hsu, S.H., et al. : Using of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) and in immunoperoxidase technique, A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, 29 : 577~580, 1981.
 - 9) Iwa, N., et al. : Immunoperoxidase staining for the detection of herpes simplex virus antigen in cervicovaginal smears, *Acta Cytol.*, 29 : 705~707, 1985.
 - 10) Jenson, A.B., et al. : Immunological relations from different species, *J. Natl. Cancer Inst.*, 64 : 495, 1980.
 - 11) 河西十九三・他 : 子宮頸部前癌病変における koilocytotic atypia の細胞, 組織学的検討, *日臨細胞誌*, 25 : 53~59, 1986.
 - 12) Kobayashi, T.K., et al. : Application of immunoperoxidase staining in the cytodagnosis of herpes simplex keratitis, *Diag. Cytopathol.*, 1 : 317~321, 1985.
 - 13) Koss, L.G. and Durfee, G.R. : Cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 63 : 1235~1261, 1956.
 - 14) 久保田浩一・他 : 子宮頸部ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染細胞, 組織学的検討, *日臨細胞誌*, 26 : 15~22, 1987.
 - 15) Kurman, R.J., et al. : Immunoperoxidase localization of papillomavirus antigens in cervical dysplasia and vulvar condyloma, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 140 : 931~935, 1981.
 - 16) McDougall, J.R., et al. : Detection of viral DNA and RNA by in situ hybridization, *J. Histochem. Cytochem.*, 34 : 33~38, 1986.
 - 17) Meisels, A., et al. : Human papillomavirus infection of the cervix, The atypical condyloma, *Acta Cytol.*, 25 : 7~16, 1981.
 - 18) Meisels, A., et al. : Condylomatous lesions of the cervix and vagina, I. Cytologic patterns, *Acta Cytol.*, 20 : 505~509, 1976.
 - 19) Meisels, A., et al. : Condylomatous lesions of cervix, II. Cytologic colposcopic and histopathologic study, *Acta Cytol.*, 21 : 379~390, 1977.
 - 20) Morin, C. and Meisels, A. : Human papilloma virus infection of the uterin cervix, *Acta Cytol.*, 24 : 82~83, 1980.
 - 21) Morin, C., et al. : Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique, *J. Nat. Cancer Inst.*, 66 : 831~835, 1981.
 - 22) Shiina, Y. : Cytomorphologic and immunocytochemical studies of chlamydia infections in cervical smears, *Acta Cytol.*, 29 : 683~691, 1985.
 - 23) Wagner, D., et al. : Identification of human papilloma virus in cervical swabs by deoxyribonucleic acid in situ hybridization, *Obstet. Gynecol.*, 64 : 767~772, 1981.
 - 24) Woodruff, J.D., et al. : Immunologic identification of papilloma virus antigen in condyloma tissues from the female genital tract, *Obstet. Gynecol.*, 56 : 727~732, 1980.
-