 原 著

細胞診における HPV DNA 検出のための *In situ* hybridization (ISH) 法

——固定法, 処理法の検討——

順天堂大学浦安病院検査科¹⁾, 東レ基礎研究所²⁾

喜納 勝成¹⁾ 石 和久¹⁾ 風間 玲子¹⁾ 古谷津純一¹⁾

川島 徹¹⁾ 齊藤 啓¹⁾ 中村 春次²⁾

子宮頸部細胞診における HPV DNA の検出を目的とした *in situ* hybridization 法のための固定法, 処理法 (蛋白消化反応の必要性の有無および反応時間の組み合わせ) について検討を行い以下の結果を得た。

1) 通常の組織標本に用いる *in situ* hybridization 法操作手順を用いた場合, 15% 中性緩衝ホルマリン固定が 95% エタノール, アセトン固定に比して染色性は良好である。

2) 95% エタノール固定を用いた場合は, *in situ* hybridization 法操作手順に含まれる蛋白消化反応を省略することで良好な染色結果が得られた。したがって通常の細胞診において特別な固定法を必要としない。

3) Papanicolaou 染色もどし標本からも HPV-DNA 検出が可能である。

以上より今後, 子宮頸部細胞診における Papanicolaou 染色もどし標本からの HPV の retrospective な検索が可能であると考えられる。

Key words : Uterine cervix——Human papillomavirus (HPV)——*In situ* hybridization——Fixation

I. 緒 言

子宮頸部における Human papilloma virus (HPV)

The *in situ* hybridization (ISH) method for detecting HPV in cytodiagnosis —A study of fixation and processing methods—

Katsunari KINA¹⁾, C.T., I.A.C., Kazuhisa ISHI¹⁾, M.D., F.I.A.C., Reiko KAZAMA¹⁾, C.T., I.A.C., Junichi KOYATSU¹⁾, C.T., I.A.C., Toru KAWASHIMA¹⁾, M.T., Akira SAITOH¹⁾, M.D., Haruji NAKAMURA²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Juntendo Urayasu Hospital, Juntendo University, School of Medicine

²⁾TORAY Basic Institute

論文別刷請求先: ☎ 279 千葉県浦安市富岡 2 の 1 の 1 順天堂大学浦安病院検査科 喜納勝成

平成 4 年 8 月 27 日受付

平成 5 年 2 月 19 日受理

感染症の診断法には, 細胞診, 組織診, コルポ診, 電顕, DNA hybridization 法がある。

通常は, 細胞診あるいは組織診によりスクリーニングおよび診断をしている。最近ではこれらに加え DNA hybridization 法を行うのが確定的な診断方法とされている^{2,8)}。

DNA hybridization 法のなかでも *in situ* hybridization (ISH) 法は, 近年非放射性 probe を用いることにより急速に普及し, 特に組織切片上でのウイルス DNA の検出, 局在などをみるのに優れた方法である。しかしこの方法は, 現在では組織に対し用いられており子宮頸部擦過細胞のための ISH 法は, 使われておらず, いまだ方法が確立されていないのが現状である。

今回, われわれは HPV 検出を目的とした細胞診材

1) 固定後, 切片乾燥	風乾	5~10分
2) 蛋白消化反応	37°C	15分
3) TBSにて洗浄		1分
4) 脱水		
5) 風乾		
6) HPV Probe 滴下		
7) カバーガラスをかける		
8) 熱変性処理	90°C	5分
9) hybridization	37°C	12時間
10) TBS (アルブミン加) にて洗浄		
11) detection 液滴下	37°C	20分
12) TBS にて洗浄		
13) 発色基質液反応	37°C	60分
14) 蒸留水にて洗浄		
15) 後染色, 脱水, 透徹, 封入		

図1 *In situ* hybridization 法操作手順

料による ISH 法のための固定法, 処理法 (蛋白消化反応の必要性の有無および反応時間の組み合わせ) について検討を行ったので報告する。

II. 材料および方法

1. 材料

HPV DNA の存在が証明されている培養細胞 {CaSki (400-600 コピー), HeLa (10-50 コピー)}^{1,6)} および当院婦人科受診患者 10 人の子宮頸部より得た擦過細胞を用いた。

2. 方法

培養細胞は生理食塩水中に浮遊後, Auto Smear CF-12 D を用いシランコーティングスライド⁴⁾ に付着させ検討した。

a) 固定液の検討: 培養細胞 (CaSki, HeLa) 付着スライドを用い 1) 15% 中性緩衝ホルマリン, 2) 95% エタノール, 3) アセトン, 3 種類の固定液にそれぞれ 10 分以上固定後 ISH 法 (図 1) を行い比較検討した。

ISH 法は, 市販キット (Vira typeTM 東レ) を用いたパラフィン包埋組織についての標準法である³⁾。また Probe は, ニックトランスレーション法により作製したピオチン標識 c-DNA Probe で type 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 56 と反応する Omni Probe を用いた。なお, 各種検討においてそれぞれ ISH 染色時に plasmid vector pBR 322 に対し特異的な negative control Probe および人ゲノム DNA に対する positive control Probe を用い反応の確認を行った

写真 1 15% 中性緩衝ホルマリン固定, 培養細胞の核内に黒紫色の比較的小型で均一な点状の HPV 陽性像を認める (矢印) (ISH 染色, CaSki, ×1000)

b) ISH 法中の蛋白消化反応の検討: 培養細胞 (CaSki, HeLa) 付着スライドにて 95% エタノールにて 10 分以上固定後, ISH 法操作手順に含まれる 0.2% ペプシン HCl 水溶液による蛋白消化反応時間を ① 省略 (0 分), ② 5 分, ③ 10 分, ④ 15 分, ⑤ 20 分とし, ほかの処理は図 1 のごとく行いそれぞれの染色態度について比較検討を行った。

c) 臨床検体への応用: 当院婦人科受診患者子宮頸部擦過細胞を 95% エタノール固定後, 蛋白消化反応の検討で最適とされた条件下で ISH 法を施行し, HPV DNA の検出を試みた。

95% エタノールは通常 Papanicolaou 染色で用いられるため, この固定液を使用しその他の条件を変更することにより日常検査への応用を検討した。

d) Papanicolaou 染色もどし標本への応用: 培養細胞 (CaSki, HeLa) 付着スライドを 95% エタノール固定し, Papanicolaou 染色後, 0.1 M グリシン塩酸緩衝液に浸し脱色し⁹⁾ ISH 法 (蛋白消化反応時間を省略) を施行し染色態度についての検討を行った。

III. 結 果

a) 固定液の検討: 培養細胞 (CaSki, HeLa) の各種固定液による染色態度は, 15% 中性緩衝ホルマリン固定で HPV 感染細胞核内に比較的に均一な点状を示す黒紫色の陽性像¹⁾ (写真 1) を認めた。両細胞の平均陽性シグナル個数は CaSki で細胞 1 個に対し 4~5 個, HeLa で 1~2 個であった。

95% エタノール固定では, 15% 中性緩衝ホルマリン固定に比し核および胞体内の変性を伴い陽性所見は

写真 2 95% エタノール固定培養細胞では核および胞体内の変性を伴い HPV 陽性所見は不明瞭 (ISH 染色, CaSki, $\times 1000$)

写真 4 95% エタノール固定培養細胞における蛋白消化反応時間 a) 省略 (0 分), b) 10 分, c) 20 分での染色状態を示しており時間を増すごとに核内の変性が進み陽性所見が不明瞭となる (ISH 染色, CaSki, $\times 1000$)

写真 6 squamous cell carcinoma と診断した 95% エタノール固定擦過細胞での HPV 陽性像で腫瘍細胞核内に均一な黒紫色の陽性所見を認める (矢印) (ISH 染色, $\times 1000$)

不明瞭であり, 明らかな陽性像を示す細胞は少なかった (写真 2)。

アセトン固定では, 細胞変性が著しく (写真 3) 判定困難であった。

写真 3 アセトン固定培養細胞では, 細胞変性が著しく判定困難 (ISH 染色, CaSki, $\times 1000$)

写真 5 a : 95% エタノール固定培養細胞における蛋白消化反応省略 ISH 法での陽性像 (矢印)
b : plasmid vector pBR 322 に対し特異的な negative control probe を用いた ISH 法での陰性像 (ISH 染色, HeLa, $\times 1000$)

b) ISH 法中の蛋白消化反応の検討: 95% エタノール固定培養細胞 (CaSki, HeLa) において蛋白消化反応省略が陽性像のコントラストは明瞭であり, 良好な染色性を示し, 両細胞における陽性シグナル個数は, 15% 中性緩衝ホルマリン固定 ISH 法にて検出されたものと同程度であった。それに比し, 蛋白消化反応時間を 5 分, 10 分, 15 分, 20 分と増すごとに核内の変性が進み (写真 4, 5) 判定困難となった。

c) 臨床検体への応用: 子宮頸部より得た 95% エタノール固定擦過細胞 10 例中 1 例に陽性所見が認められ蛋白消化反応を行わないことで最も良い染色性を得た。また Papanicolaou 染色で診断した 10 例のうちわけは class II 8 例, class III a 1 例 (CIN I), class V 1 例 (squamous cell carcinoma) であり, このなかで class III a, class V の 2 例は HPV 感染が, 同時に施行したほかの DNA 診断法で証明されて

写真7 Papanicolaou染色後, 脱色したISH法を施行した培養細胞におけるHPV陽性像で核内に黒紫色の比較的小型で均一な点状のHPV陽性像を認める(矢印)(ISH染色, CaSki, $\times 1000$)

いる。今回、陽性となったのはその内の squamous cell carcinoma (写真6) と診断した1例で、核内に均一な黒紫色の陽性像を認めた。

d) Papanicolaou染色もどし標本への応用: Papanicolaou染色後, 0.1 M グリシン塩酸緩衝液に浸し脱色しISH法(蛋白消化反応時間を省略)を施行した培養細胞(CaSki, HeLa)における染色結果(写真7)は細胞核内に黒紫色の陽性像を認め、これらはコントラストが明瞭であり、良好な染色性を示した。

IV. 考 察

HPVは、現在約60種類以上が知られておりこのうち約16種類程度が子宮頸部に感染するとされている¹⁰⁾。

子宮頸部病変特に子宮頸癌とHPVタイプの関連性についての組織学的検討でISH法は、過去のホルマリン固定のパラフィン包埋材料からでも retrospective な検索が可能であることから多くの施設で用いられ報告がなされている^{2,7)}。しかし細胞レベルでの検討では計良ら⁵⁾が中性緩衝ホルマリン固定細胞材料を対象にISH法を施行しHPV-DNA検出について報告しているが、日常細胞診に用いる95%エタノール固定材料におけるHPV-DNAの検索はいまだ技術的にも確立されていないのが現状である。このことは第一に固定方法に問題があったと思われる。われわれは15%中性緩衝ホルマリン, 95%エタノールおよびアセトンの3種類の固定液を用い比較検討を行った結

果、通常の組織に用いるISH法操作手順に準じた場合15%中性緩衝ホルマリン固定で良好な染色結果を得た。しかし日常細胞診に15%中性緩衝ホルマリンを組み合わせる用いることは、Papanicolaou標本と別に準備しなければならないという問題点がある。

ホルマリン固定はアルデヒド化合物が蛋白質と反応しメチレン架橋を形成するためDNAプローブの浸透性が悪く、したがって反応に際し蛋白質を酵素により消化する必要がある。

これに対しアルコール固定は蛋白質の沈澱凝固作用によるものでプローブの浸透性がよく蛋白質を酵素により消化する必要性はない。それゆえ95%エタノール固定に蛋白消化反応を加えるとDNAの流出および発色基質との非特異反応がおこり染色性が低下すると思われる^{11,12)}。

われわれは95%エタノール固定材料において蛋白消化反応時間による染色態度の比較検討をした結果、蛋白消化反応時間を省略した場合が最も陽性像のコントラストは明瞭であり15%中性緩衝ホルマリン固定材料に劣らぬ良好な染色結果を得た。それに比し、蛋白消化反応時間を延長すると核内の変性が促進され判定が困難となった。

以上の結果より95%エタノール固定材料においても蛋白消化反応を省略することによりHPV-DNA検索は可能であり、また低コピー数のHPV-DNAを有するHeLa細胞においても15%中性緩衝ホルマリン固定ISH法と同程度の陽性結果を示したことは、検出感度にも差はないと思われる。

さらにわれわれはPapanicolaou染色標本に対し当初、塩酸アルコールにて脱色を行いDNA検索を試みたが細胞変性が著しく判定が困難となった。しかし、0.1 M グリシン塩酸緩衝液に浸し脱色後ISH法を施行したところHPV-DNA陽性所見を得ることができた。このことは、今後95%エタノール固定Papanicolaou染色標本においてretrospectiveな検索が可能となると考えられる。

すなわち、今後通常のPapanicolaou染色標本でHPVスクリーニングを行い、細胞学的に感染が疑われた場合にのみ同一標本を用いウイルスDNAの有無の確認を行えばよいと思われる。また同様にほかのウイルス、細菌などの微生物、オンコジンなどの検索も可能と考えられる。

Summary

Using the ISH method with the objective of detecting HPV DNA in cytodiagnosis of the uterine cervix, we studied methods fixation and processing (proteopeptic response and their combinations) and obtained the following results.

1) When ISH operational techniques were used in normal tissue specimens, staining was better with 15% neutral buffered formalin fixation than 95% ethanol, acetone fixation.

2) When 95% ethanol fixation was used, it was possible to omit the proteopeptic reaction included in the ISH operational techniques, and favorable staining results were obtained. This indicates that, during normal cytodiagnosis it is not necessary to prepare a special fixation solution.

3) From Papanicolaou staining with restaining specimens, HPV-DNA positive results were obtained. Given the above results, it is considered possible to conduct retrospective studies of HPV from Papanicolaou staining with restaining specimens in cytodiagnosis of the uterine cervix.

文 献

- 1) Elizabeth, R., et al. : Comparison of ^{35}S and biotin as labels of *in situ* hybridization, The Journal of Histochem Cytochem, 39 : 145~150, 1991.
- 2) 石 和久 : *In situ* hybridization 法による人子宮頸部パピローマウイルス感染の検出, 臨床病理, 37 : 1161~1166, 1989.
- 3) 川島 徹 : *In situ* hybridization 法による HPV 検出法の検討, 病理技術, 41 : 16~18, 1990.
- 4) 川島 徹 : スライドに対する切片接着剤の検討—シランコーティングスライドの使用経験, 病理技術, 41 : 1990.
- 5) 計良恵治 : *In situ* hybridization 法による子宮頸部擦過細胞における HPV-DNA の検出, 日臨細胞誌, 30(4) : 775~776, 1991.
- 6) 喜納勝成 : HPV 検出のための *In situ* hybridization 法における標識物質および発色基質の検討, 病理と臨床, 9(6) : 823~827, 1991.
- 7) Lorincz, A.T., et al. : Cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus from a woman with dysplasia of the uterine cervix, J. Virol., 58 : 225~229, 1986.
- 8) Meisel, A., et al. : Condylomatous lesion of cervix, colposcopic and histopathologic study, Acta Cytol., 21 : 379~390, 1977.
- 9) 長村義之 : 光顕的酵素抗体法染色における特殊技法, 改訂版酵素抗体法, pp 89~101, 学際企画, 1985.
- 10) Richard, K., et al. : Should Family Physicians Test for Human Papillomavirus Infection, The Journal of Family Practice, 32 : 183~188, 1991.
- 11) Stina, M., et al. : An improved *in situ* DNA hybridization protocol for detection of human papillomavirus (HPV) DNA sequences in paraffin-embedded biopsies, J. Virol., 14 : 293~304, 1986.
- 12) 渡辺慶一 : 第 3 章 酵素抗体法の染色手技, 改訂版, 酵素抗体法, pp 80~81, 学際企画, 1985.