 原 著

細胞診標本における PCR-ISH 法と *In situ* PCR 法の検討

——臨床応用のための基礎的検討——

順天堂大学浦安病院検査科¹⁾, 東レ医療システム研究所²⁾喜納 勝成¹⁾ 石 和久¹⁾ 岡崎 哲也¹⁾ 風間 玲子¹⁾古谷津純一¹⁾ 齊藤 啓¹⁾ 鈴木不二彦¹⁾ 中村 春次²⁾

HPV-DNA が組み込まれている培養細胞を用い, 細胞・組織切片上における DNA 検出の増感法である PCR-ISH 法および *In situ* PCR 法の反応条件などにつき基礎的検討を行い以下の結果を得た.

1) PCR の反応条件は, 熱変性 (denature) 90°C 1 分, アニール (anneal) 55°C 2 分, 伸長 (extension) 72°C 3 分の 20 サイクルで最も良好な染色性をしめした.

2) PCR-ISH 法, *In situ* PCR 法いずれも, 細胞診に用いられる 95% エタノール固定細胞材料からの DNA 検出は可能であった.

3) PCR-ISH 法および *In situ* PCR 法にて ISH 法では検出が不可能とされている HPV-DNA 1 コピーの培養細胞 SiHa の核内に陽性像を認めた.

以上よりこれら方法は ISH 法が有する感度が低いという欠点を克服し, かつ, DNA の局在を形態学的に確認できることから臨床細胞診材料を対象にウィルス DNA の検出, さらに, 腫瘍遺伝子などの検出にも十分応用が可能であると考えられる. また, PCR 法の問題点であったコンタミネーションについては, 形態学的にそれを識別できるという点で, DNA 診断の信頼性も高まると考えられた.

Key words : Human papillomavirus (HPV)——Cytology——PCR-ISH——*In situ* PCR

I. 緒 言

Comparison of PCR-ISH and *in situ* PCR in cytodiagnosis specimens—A basic study on these methods and their clinical application—

Katsunari KINA¹⁾, C.T., I.A.C., Kazuhisa ISHI¹⁾, M.D., F.I. A.C., Tetsuya OKAZAKI¹⁾, C.T., I.A.C., Reiko KAZAMA¹⁾, C.T., I.A.C., Junichi KOYATSU¹⁾, C.T., I.A.C., Akira SAITOH¹⁾, M.D., Fujihiko SUZUKI¹⁾, M.D., Haruji NAKAMURA²⁾, Ph. D.

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 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 7 年 8 月 28 日受付

In situ hybridization (ISH) 法は, Gall と Par-due および John らにより開発されたもので, 腫瘍やウィルスなどの特定の遺伝子を組織切片上あるいは細胞標本上で検出する技術であり, 目的の遺伝子が病変部または細胞のどの位置に存在しているかを形態学的に観察することができる^{2,5)}. しかし, ノザン解析, RT-PCR 法に比べて定量性に欠け, さらには Dot blot, Southern blot, PCR 法などよりも感度が低いという欠点を有する.

以前われわれは, HPV-DNA が組み込まれているとされる培養細胞を用い, 臨床細胞診応用のための

ISH法の技術的確立, 特に固定法, 処理法について検討を行い報告した⁷⁾.

今回われわれは, ISH法の感度が低いという欠点を克服するために同様の細胞を用い, 細胞・組織切片上における増感法であるPCR-ISH法および*In situ* PCR法の反応条件などの基礎的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 (type 16) の存在が証明されている培養細胞{CaSki (HPV-DNAコピー数: 500コピー), SiHa (HPV-DNAコピー数: 1コピー)}およびHPV-DNAが存在しない培養細胞HTB (陰性コントロール) を用いた.

培養細胞は, 生理食塩水中に浮遊後, Auto Smear CF-12 D (サクラ精機) を用い, シランコーティングスライドに 10^5 個付着させたものおよび, セルブロックを作製し, 各種検討に用いた. なお, 固定法は, 細胞診材料に用いられる95%エタノール固定を施行した.

2. 方法

1) 検討方法

In situ hybridization法: 以前に報告済みでHPV-DNA検出のために確立されているが, 簡単に述べるとプローブ (probe) は, ニックトランスレーション法で作製したピオチン標識c-DNAプローブでtype 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45と反応するオムニプローブ (東レ) を用い, 図1に示す手順に準じ施行した.

なお, この方法はPCR-ISH法および*In situ* PCR法の基本操作である.

PCR-ISH法: ISH法手順のハイブリダイゼーションを行う前に, PCRによる増幅操作を組み込んだ方法である.

PCRはプライマー (primer) にTaKaRa社のHPV-DNA type 16のE6領域を増幅する目的で作製されたHPV pF (forward primer) とHPV 16 R (reverse primer) を使用し, プログラムサーマルコントローラー PTC-100™ (フナコシ社) にて増幅反応を行った.

増幅操作終了後, 標識プローブ {3'末端にピオチン標識したオリゴヌクレオチド (TaKaRa社)} を用い

1) 95% エタノール固定	
2) 水洗	5分
3) TBS 洗浄	3分×3
4) 切片乾燥	10分
5) probe 滴下	
6) 熱変性処理	5分
7) hybridization	120分
8) TBS (アルブミン加) 洗浄	3分×3
9) detection 液反応	10分
10) TBS 洗浄	3分×3
11) 発色基質液反応 (DAB)	5分
12) 水洗	
13) 後染色 (ヘマトキシリン)	3分
14) 水洗	
15) 脱水	
16) 透徹	
17) 封入	

図1 ISH法操作手順

ハイブリダイゼーションを施行し, ストレプトアビジン (DAKO社) で検出を行い, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色する.

プライマーとプローブの塩基配列および操作手順については, 図2に示す.

In situ PCR法: PCRによるDNAの合成の過程で標識物質を直接結合させながら増幅を繰り返す方法であり, ハイブリダイゼーションは必要としない方法である. すなわちPCR反応液中にジゴキシゲニンを標識したジゴキシゲニン-11-dUTP (BOEHRINGER社) が含まれており, 上記に示すプライマーを用いtype 16のE6領域のDNAが合成される際にジゴキシゲニン-11-dUTPが結合する.

増幅操作終了後はアルカリフォスファターゼ結合抗ジゴキシゲニンで検出を行い, 5-Bromo-4-Chloro-Indolyl-Phosphate (BCIP)/Nitro Blue Tetrazolium (NBT) にて発色する. 操作手順については, 図3に示す.

2) 検討項目

PCR-ISH法 *In situ* PCR法におけるPCR操作の条件設定

① PCRの反応温度: GerardやJosephらが報告している条件を基に熱変性は94°Cを中心に, アニールは55°Cを中心に, 伸長は72°Cを中心にそれぞれ前後1°Cの間隔で5°Cまでの各種染色性につき観察した. なお, 反応時間については, 熱変性, アニール, 伸長を4分と設定した.

② PCRの反応時間: ①の検討にて最良と思われる

1) 95% エタノール固定		
2) 水洗		
3) TBS (0.1 M Tris HCl pH 7.6) 洗浄	10 分	
4) 風乾	5~10 分	
5) PCR reaction (カバーガラスをかける)	20 cycle	
6) アルコール洗浄	3 分×3	
7) 風乾	5~10 分	
8) probe cocktail* ¹ 滴下・カバーガラスをかける		
9) 熱変性処理	5 分	90°C
10) hybridization	120 分	37°C
11) post hybridization* ² 洗浄	3 分×3	45°C
12) TBS 洗浄	5 分	
13) HRP conjugated streptavidin	10 分	
14) TBS 洗浄	5 分	
15) DAB 発色	5~10 分	
16) 後染色 (Hematoxylin)	3 分	
17) 脱水・透徹・封入		
PCR 反応液内容		
・ 10×PCR buffer	3.0 μ l	・ 25 mM MgCl ₂ 4.5 μ l
・ 2.5 mM dNTP 混合液	4.0 μ l	・ 滅菌蒸留水 14.0 μ l
・ Primer 1*	1.0 μ l	・ Taq polymerase 1.0 μ l
・ Primer 2*	1.0 μ l	
* HPV 16 Target Primer		
Primer 1 : 5-AAGGGCGTAACCGAAATCGGT		
Primer 2 : 5-GTTTGCAGCTCTGTGCATA		
* 1 probe cocktail		
・ 10 μ l formamide		* 2 洗浄液
・ 39 μ l sterile water		・ 1× SCC
・ 45 μ l 25% dextran sulfate		・ 0.2% BSA
・ 10 μ l 20× SCC		
・ 1 μ l probe (biotin labeled)		

図 2 PCR-ISH 操作手順

る反応温度条件下で熱変性、アニール、伸長は 4 分を中心、それぞれ前後 1 分の間隔で 3 分までの各種染色性につき観察した。

③ PCR のサイクル数：①、②の検討にて最良と思われる条件下でサイクル数を 10 回、20 回、30 回とし、各種染色性につき観察した。

III. 結 果

1. PCR 反応温度、時間、サイクル数の検討

表 1 に示すごとく反応温度は、熱変性は 90°C、アニールは 55°C、伸長は 72°C で最適であり、いずれもそれより前後、特に温度を上昇させると細胞形態が保持が不可能となった。

反応時間については、熱変性は 1 分、アニールは 2

分、伸長は 3 分で良好な染色性を示した。

サイクル数については、10、20、30 サイクルそれぞれの染色性につき観察したところ 20 サイクルで HPV-DNA 1 コピーの SiHa 細胞核内に良好な染色性が得られ、サイクル数を増すと背景の共染が認められた。

In situ PCR 法、PCR-ISH 法両者の間では同条件下での染色性の違いは認められなかった。

2. 各種培養細胞における HPV-DNA 検出

1) *In situ* hybridization 法

3 種類の培養細胞中、CaSki 細胞核内に比較的均一な点状を示す茶褐色の陽性像 (写真 1) を認めたが、SiHa 細胞核内には HPV-DNA は検出されなかった。また、陰性コントロールの HTB 細胞は陰性であった。

1) 95% エタノール固定	
2) 水洗	
3) TBS (0.1 M Tris HCl pH 7.6) 洗浄	10 分
4) 風乾	5~10 分
5) PCR reaction (カバーガラスをかける)	20 cycle
6) アルコール洗浄	3 分×3
7) blocking solution*	10 分
8) AP conjugated anti-digoxigenin*	30 分
9) TBS 洗浄	3 分×3
10) stining buffer*	3 分
11) BCIP/NBT 発色*	15~60 分
12) 反応停止液*	5 分
13) 後染色 (Nuclear fast red)	5 分
14) 水洗	
15) 封入	
* KREATECH DIGOXIGENIN DETECTION SYSTEM	

PCR 反応液内容

• 10×PCR buffer	3.0 μ l	• Digoxigenin dUTP	1.0 μ l
• 25 mM MgCl ₂	4.5 μ l	• 滅菌蒸留水	14.0 μ l
• 2.5 mM dNTP 混合液	4.0 μ l	• Taq polymerase	1.0 μ l
• Primer 1*	1.0 μ l	• Primer 2*	1.0 μ l

* HPV 16 Target Primer 449 bp

Primer 1 nt 110 : 5-CAGGACCCACAGGAGCGACC

Primer 2 nt 559 : 5-TTACAGCTGGGTTTCTCTAC

図 3 *In situ* PCR 操作手順

表 1 PCR 操作条件

denature	90°C	1 分
anneal	55°C	2 分
extension	72°C	3 分
cycle	20 cycle

写真 2 95% エタノール固定培養細胞 SiHa の核内にびまん性に茶褐色の陽性像を認める (PCR-ISH 法, ×1,000)

写真 1 95% エタノール固定培養細胞 CaSki の核内に比較的小型で均一な点状の陽性像を認める (ISH 法, ×1,000)

2) PCR-ISH 法

3 種類の培養細胞中, CaSki および SiHa 細胞核内に茶褐色の陽性像 (写真 2) を認めた。陰性コントロールの HTB 細胞は陰性であった。

3) *In situ* PCR 法

3 種類の培養細胞中, CaSki および SiHa 細胞核内に黒紫色の陽性像 (写真 3) を認めた。陰性コントロール

写真 3 95% エタノール固定培養細胞 SiHa の核内にびまん性に黒紫色の陽性像を認める (*In situ* PCR 法, $\times 1,000$)

ルの HTB 細胞は陰性であった。

IV. 考 察

分子生物学的手法として Filter hybridization 法, PCR 法, ISH 法などがあるが, 特に形態学的診断に携わる者にとって最も有用と思われるものは ISH 法である。

この方法の有用性は, 先に述べたように細胞形態と比較しながら遺伝子の局在を認識することができ, また, 他の染色を施した標本からも遺伝子検索が可能であるという点にある。

われわれは, 今まで子宮頸癌と HPV の感染について検討してきたが, 特に ISH 法は HPV-DNA の細胞・組織内局在および分布を認識でき, さらに, 子宮頸部の病変部の進行と HPV-DNA type との関連性を解明するための過去の細胞診または組織標本を用いた検索が可能であった。しかし, 一般的に ISH 法は, 感度が悪いとされており, われわれの以前の HPV-DNA 検出結果においても ISH 法は, Southern blot 法陽性例の 55.6% にしか検出されなかった⁴⁾。

両者の検出感度については Southern blot 法の検出域は通常, 細胞 100 個あたり 1 コピーとされており, それに対して ISH 法では, 細胞 1 個あたり 50 コピーとされている。つまり細胞核内に HPV DNA が実在したとしても 50 コピーに満たない場合は, 偽陰性結果をもたらすことになる。すなわち ISH 法は, 陽性所見に対しては信頼性が高いが, 陰性結果の断定は困難である³⁾。

PCR-ISH 法および *In situ* PCR 法は, ISH 法の細

胞を保持した状態で形態学的に DNA を認識するという利点と PCR 法が有する優れた感度を兼ね備えたものであり, 1992 年 Gerard により報告されている。

今回, われわれが検討した PCR-ISH 法および *In situ* PCR 法の基本的操作手順は, Gerard が報告しているものであるが, PCR の反応時間および反応温度について彼らが示した条件(熱変性 94°C 3 分, アニール 55°C 2 分, 伸長 94°C 1 分, 30 サイクル)では, 細胞形態の保持が困難である。また, 固定法の比較検討ではエタノール固定材料を用いた場合増幅した DNA は核外に流出するためホルマリン固定材料に比べ検出率は低下し, これは固定原理に基づくものであると報告しているが, PCR の反応条件に改良を加えたわれわれの方法(熱変性 90°C 1 分, アニール 55°C 2 分, 伸長 72°C 3 分, 20 サイクル)ではエタノール固定材料でも十分検出可能な陽性所見を得ている。さらに, PCR-ISH 法と *In situ* PCR 法の検出感度についてはわれわれの結果からは差が認められず, いずれも HPV DNA が 1 細胞中 1 コピーしか存在しないとされている培養細胞 SiHa の核内から HPV DNA を検出することができ, ISH 法に比し遥かに感度が優れていることが示唆された。

PCR-ISH 法および *In situ* PCR 法のいずれにおいても同一条件下での細胞形態の保持および背景の共染に有意な差は認められなかったが, 操作をする上で最も注意すべき点は, PCR の条件設定である。つまりこれらの方法では熱変性, アニール, 伸長といういずれも高い温度にて反応を繰り返す行うので, 細胞に与えるダメージを考慮しなくてはならない。以上の点から, 反応温度, 時間, 回数についてはプライマーの塩基配列や検出目的に応じさらに基礎的検討を行う必要があると思われる。

従来, 固相 PCR における検体のコンタミネーションは, PCR を解読するうえで偽陽性結果をまねき, その診断の有用性については疑問視することもあった。今回われわれが報告した細胞・組織切片上における増感法である PCR-ISH 法および *In situ* PCR 法における陽性所見は特異的な部位の細胞内に局在するものである。すなわち, HPV-DNA が上皮細胞の核以外, たとえば間葉系細胞などにシグナルを認めた場合, または, 陰性コントロールが陽性反応を示した場合, コンタミネーションと考えられる。

したがってコンタミネーションがあったとしてもそれを形態学的に認識できることから DNA 診断の信頼

性も高いと思われる。

V. 結 語

細胞診材料における ISH 法の確立で、個々の細胞形態が観察でき、かつ、DNA 検出を可能にした。さらに、PCR 法を併用することで検出感度の問題点を克服できたことは、今後の遺伝子学的研究に大きく貢献すると思われる。

今回われわれは、HPV-DNA 検出のための基礎的検討を行ったが、これらの方法は、細胞標本上でその他のウィルス DNA の検出、さらに、oncogene、抑制遺伝子などの検出にも今後十分応用されることが期待される。

Summary

Response conditions of cultured cells incorporating HPV-DNA to PCR-ISH and *in situ* PCR, which are sensitization methods for cell and tissue sections, were investigated, and the following results were obtained.:

- 1) As the response to PCR, the most consistent feature was observed at 20 cycles, which included denaturing at 90°C for one minute, annealing at 55°C for 2 minutes, and extension at 72°C for 3 minutes.
- 2) With each method of PCR-ISH and *in situ* PCR, DNA could be detected in cells fixed in 95% ethanol, as routinely used for cytodiagnosis.
- 3) A positive finding was observed in the nuclei of cultured SiHa cells with one copy of HPV-DNA, detection of which has been believed to be impossible with the ISH method alone, by applying PCR-ISH and *in situ* PCR. Our results suggest that these methods are applicable to the detection of viral

DNA and oncogenes in clinical cytodiagnosis specimens, based on these methods overcoming certain disadvantages, i. e., the low sensitivity of the ISH method. Furthermore, DNA localization could be morphologically confirmed. The reliability of DNA diagnosis was also considered to increase in that contamination, a problem with the PCR method, can be morphologically detected by these methods.

文 献

- 1) Christina, K., Karin, M., Tomas, L., Hans, S. Polymerase Chain Reaction-assisted evaluation of low and high grade squamous intraepithelial lesion cytology and reappraisal of the Bethesda system. *Acta Cytol.* 1994; 38: 681~686.
- 2) Gall, J. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1969; 63: 378~385.
- 3) Gerard, J. PCR *in situ* hybridization, New York: Raven Press, 1994, chapter 5: 169~213.
- 4) 石 和久, 喜納勝成, 川島 徹, 宇津野博, 高田道夫, 中村春次・ほか. *In situ* hybridization 法による人子宫颈癌部パピローマウィルス感染の検出—Southern blot 法による検出率との比較—. *臨床病理* 1989; 37: 1161~1166.
- 5) John, H. RNA-DNA hybrids at cytological levels. *Nature.* 1969; 223: 582~587.
- 6) Joseph, P., Marluce, B., Lisa, B., Thikavarapu, S., Omar, B. Potential of the *in situ* polymerase chain reaction in diagnostic cytology. *Acta Cytol* 1994; 38: 676~680.
- 7) 喜納勝成, 石 和久, 風間玲子, 古谷津純一, 川島 徹, 齊藤 啓・ほか. 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. *日臨細胞誌* 1993; 32: 404~408.