喉頭乳頭腫における Human papillomavirus 核酸の検出法

古 田 康¹⁾・高 須 毅¹⁾・佐 藤 信 清¹⁾
福 田 諭¹⁾・犬 山 征 夫¹⁾・長 嶋 和 郎²⁾

Detection of human papillomavirus genomes in laryngeal papillomas

Yasushi Furuta¹⁾, Tsuyoshi Takasu¹⁾, Nobukiyo Sato¹⁾,
Satoshi Fukuda¹⁾, Yukio Inuyama¹⁾ and Kazuo Nagashima²⁾

For detecting human papillomavirus (HPV) genomes in laryngeal papillomas, we examined the applicability of Southern lightTM and ViratypeTM in situ methods, and compared with digoxigenin (DIG)-labeled probe.

We examined 8 cases of paraffin embedded tissues by in situ hybridization (ISH), and 2 cases of fresh frozen tissues by dot blot and Southern blot hybridization.

By ISH with DIG-labeled probe, we could detect HPV type 6 or HPV type 11 in 6 cases (75%). By ISH with Viratype in situ which used biotin(BIO)-labeled probe, we could detect HPV 6/11 in 5 cases (62.5%). Thus, DIG-labeled probe was more sensitive than BIO-labeled one.

By Southern light method which used a direct chemiluminescent substrate (AMPPD), we could detect HPV 11 in the 2 cases examined. Southern light method turned out to be a sensitive and rapid detection system for dot blot and Southern blot hybridization.

Key words : Laryngeal papilloma Human papillomavirus Non-isotopic probe Chemiluminescent substrate In situ hybridization

はじめに

喉頭乳頭腫, 中でも若年性の多発性乳頭腫の病因が, ヒトパピローマウイルス (Human papillomavirus; HPV) の感染によることは周知の事実であり, また近年分子生物学の進歩により, 成人に発生するある種の乳頭腫も HPV の感染によることが明らかになっている^{1, 2)}. 喉頭乳頭腫症例において HPV の感染の有無を調べることは, その病態を把握し, またその効果には一定の見解はみられないものの, 抗ウイルス剤の投与やインターフェロン療法^{3, 4)} の適応を決定する上で役立つものと考えられる.

生検または手術材料中の HPV を検出するために, 我々は非アイソトープ (non-RI) 標識法である, Digoxigenin (DIG) 標識プローブを用いた Southern blot hybridization ならびに in situ hybridization (ISH) 法による核酸検出法の有用性を報告してきた^{5, 6)}. 今回, さらに高感度な non-RI 核酸検出法として開発された, Southern lightTM (Tropix 社)⁷⁾ および最近市販され婦人科領域の HPV 感染の検出に用いられている⁸⁾, Vira typeTM in situ (東レフジバイオニクス社) 法を試み, その有用性を検討したので報告する.

対 象

先に報告⁵⁾した喉頭乳頭腫症例15例のうち, HPV 感染の関与がない成人性単発性の乳頭腫を除き, 若年性多発性症例1例と成人性多発性7例の8例を対象とした. これらのホルマリン固定パラフィン包埋組織と, 若年性1例と成人性1例では生材料による検索も行った.

方 法

DNA プローブ: DIG 標識プローブは HPV 6, 11, 16 型の全ゲノムをランダムプライマー法にて DIG-dUTP を標識し, Biotin (BIO) 標識プローブは市販の ViraType in situ キットの, HPV 6/11 (HPV 6, 11の両者を含んでいる), HPV 16/18 プローブを用いた.

Filter hybridization: 未固定生材料より DNA を抽出し, 1 µg をナイロンフィルター (Hybond N+, Amersham 社) に滴下 (dot) しアルカリ変性後, DIG 標識プローブにて dot blot hybridization を施行した. Prehybridization は 5X SSC (1X SSC: 0.15 M NaCl, 15 mM Na₃ citrate), 2 % blocking reagent (Boehringer Mannheim 社), 0.1% ラウロイルサルコシン, 0.02% SDS (sodium dodecyl sulfate) 溶液で 68°C で 1 時間以上行い, 同溶液に

1) 北海道大学医学部耳鼻咽喉科

2) 北海道大学医学部第二病理

Department of Otolaryngology¹ and Pathology II², Hokkaido University School of Medicine.

プローブを混ぜ hybridization を一晩行った。フィルターの洗浄は、2X SSC, 0.1% SDS 溶液中で室温にて10分間2回行った後、0.1X SSC, 0.1% SDS 溶液中で65°Cにて15分間2回行った。その後、アルカリフォスファターゼ標識抗 digoxigenin 抗体を用いて免疫反応後、Southern light 法によりケミルミネッセンス基質である AMPPD (Tropix 社) を用いて X 線フィルム (Kodak, X-Omat) 上に感光し、現像定着した。また、HPV 11 DNA の希釈系列を作成し、dot blot hybridization により、従来の発色基質 (NBT/BCIP) を用いる方法と Southern light 法の検出感度を比較した。

また、DNA 5 µg を各種の制限酵素にて切断しアガロースゲルにて電気泳動後、ナイロンフィルターにトランスファーし、Southern blot hybridization を同上的方法にて行った。

In situ hybridization: パラフィン切片を用いて、DIG および BIO 標識 HPV DNA プローブによる ISH を施行した。BIO プローブでは、前述⁵⁾した DIG 標識プローブによる ISH と同様に、切片の前処理、hybridization を行った。切片の洗浄は high stringent な条件で行い、一部の症例では ViraType in situ のプロトコル通りの洗浄 (BSA を含む TBS: Tris-buffered saline で37°Cにて3分間3回) も行い比較した。

結 果

臨床病理学的検討 (表1): 若年性の1例は、7才の女児で何度も再発を繰り返している症例である。成人性の7例は1例を除き男性症例で症例3以外は再発がみられた。これらのすべての症例では、HPV 感染に特徴的とみなされる病理組織学的所見の koilocytosis が認められた。

Filter hybridization: Southern light 法による dot blot hybridization により、2症例とも HPV 6, 11に陽性所見を呈した (図1)。さらに Southern blot hybridization により、その制限酵素による切断パターンから2症例とも

表1 多発性喉頭乳頭腫8症例の検討

症例	年齢	性	再発	Koilocytosis	Dot and Southern	ISH DIG	BIO
1. H.T.	7	F	+	+	HPV11	+	+
2. A.T.	56	M	+	+	HPV11	+	+
3. H.K.	77	M	-	+		-	-
4. T.H.	70	M	+	+		+	+
5. S.O.	63	M	+	+		-	-
6. S.H.	59	M	+	+		+	-
7. Y.K.	22	F	+	+		+	+
8. S.O.	70	M	+	+		+	+
計			7/8 (88%)	8/8 (100%)		6/8 (75%)	5/8 (62.5%)

ISH: in situ hybridization

DIG: digoxigenin labeled probe

BIO: biotin labeled probe

に HPV11 と同定された (図2)。Dot blot hybridization による感度の比較では、発色基質を用いた場合は HPV 11 DNA を1pg まで、AMPPD を用いた場合は0.1pg まで検出できた。

In situ hybridization: DIG 標識プローブでは6例 (75%) に HPV 6 または11が証明され、BIO 標識プローブでは8例中5例 (62.5%) において HPV 6/11が検出された。DIG プローブで陽性所見がみられたが、BIO プローブでは明かな陽性所見が得られなかった症例が1例みられた。また、同一切片上での感度を比較してみると、DIG プローブのほうが若干良好な感度を示した (図3)。しかし、DIG プローブでは、症例により background staining が現れる症例がみられたが、BIO プローブではあまりみら

図1 Dot blot hybridization

DIG 標識 HPV 11 DNA プローブを用いて Southern light 法にて検出した。症例1と2において陽性所見がみられた。

HPV 6, HPV11, HPV16: 各 DNA 10pg

U: 子宮頸癌症例 (HPV 16 陽性症例)

図2 Southern blot hybridization (症例1)

DIG 標識 HPV 11 DNA プローブを用いて Southern light 法にて検出した。

1: 制限酵素 BamH I で切断。

2: BamH I + Hind III

3: BamH I + Pst I

図3 In situ hybridization (症例7) A
B
A: DIG 標識 HPV 6 DNA プローブ
B: BIO 標識 HPV 6/11 DNA プローブ

れず良好な染色結果を示した。ViraType in situ の洗浄条件の検討では、プロトコール通りの洗浄では、HPV 6/11陽性症例において、HPV16/18プローブでcross-hybridizationがみられたが、high stringentな洗浄にてこのcross-hybridizationは消失した(図4)。

考 察

HPVは現在まで60種以上のタイプがあることが分子生物学的手法により明かとなり、それぞれ特有の病変を造ることが知られている。例えば、HPV 6, 11型は陰部コンジローマや喉頭乳頭腫など主に良性腫瘍にみられ、一方HPV 16, 18, 31, 33, 35型などは子宮頸癌から高率に検出され、これらのHPVは発癌ウイルスとみなされている。つまり、これら腫瘍組織からウイルスを検出し、その型を決めることは臨床上也重要な意味をもつ。喉頭乳頭腫においては、インターフェロン療法や抗ウイルス剤の使用を決定する一つの目安ともなり、今回の症例ではHPVが検出された症例では全例再発がみられており、慎重な経過観察が必要で

図4 In situ hybridization (症例4) A
B
C
A: BIO 標識 HPV 6/11 DNA プローブ
B: BIO 標識 HPV 16/18 DNA プローブ (Vira Type in situ のプロトコールで洗浄した.)
C: BIO 標識 HPV 16/18 DNA プローブ (high stringentな条件で洗浄した.)
Bではcross-hybridizationがみられる。

ある。

HPVを検出する方法にはいろいろあるが、分子生物学的に核酸レベルで証明する方法が感度もよく、またHPVの型も決定できる。そのため従来より主にアイソトープ(RI)を標識したプローブによる解析が行われており、またスクリーニング用に開発されたキットも市販されその有用性も報告^{9, 10)}されている。しかし、その取扱の煩雑さや法的規制などの種々の欠点が見られるため、最近ではnon-RI標識プローブに置き変わりつつある。現在まで、われ

われは DIG 標識プローブによる核酸検出法を Southern blot hybridization や ISH に応用しその有用性を報告してきた^{5,6)}。今回さらに高感度な検出法として開発された、直接反応性ケミルミネッセンス基質 (AMPPD) を用いる方法⁷⁾を応用してみた。その結果、dot blot による感度の比較では従来の発色基質を用いた方法より感度が良く、比較的短時間 (20-40分) の感光で十分検出可能であり、dot blot や Southern blot hybridization による解析に好都合であった。また、フィルターの再使用は、発色基質を用いた場合には色を落とすのに手間がかかるが、本法では RI プローブの場合と同様の方法でプローブの“はがし”が可能であった。

未固定の組織がない場合には、パラフィン包埋された病理組織切片を用いて ISH 法にてウイルス核酸を検出するが、この場合過去の症例にさかのぼり解析ができる利点がある。今回、前述した DIG 標識プローブによる ISH と、最近 HPV 感染検出キットとして市販され、主に婦人科領域の HPV 検出に用いられている Vira Type in situ を比較検討してみた。後者はビオチン標識プローブにて hybridization 後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンを結合させ、発色基質 (NBT/BIPC) をもちいて検出する方法であり、以前我々が検討した⁶⁾ ABC 法にて DAB を用いて発色させる方法より検出感度が良好であった。結果として、DIG 標識プローブによる ISH に比べ若干検出感度が悪かったが、非特異反応が少なく、また簡便なキットとなっているので、臨床病理検査として十分利用できるものと考えられる。しかし、切片の洗いの条件など、プロトコール通りの方法に若干の変更を加えたほうがよいと思われた。

喉頭乳頭腫では、症例により微量の組織しか採取できないことがあり、このような場合には近年開発された高感度核酸検出法である polymerase chain reaction (PCR) 法¹¹⁾による解析が有用である。本法を用いると Southern blot hybridization や ISH では検出できない少量の DNA でも検出する。現在われわれは、PCR 法と Southern light 法を組み合わせた高感度な non-RI 核酸検出法を検討中である。

ま と め

多発性喉頭乳頭腫症例において HPV 核酸を検索するにあたり、各種 non-RI 検出法を比較検討した。

1. 未固定材料の場合、Southern light 法を用いた dot blot hybridization による検出法が高感度であり短時間で検出可能であった。また Southern blot hybridization による解析にも非常に有用であった。
2. 病理組織切片上で ISH 法にて検出する場合、DIG 標識プローブがビオチン標識された Vira Type in situ 法より若干良好な感度を示した。

付記

pBR 322 にクローニングされた HPV6, 11, 16型 DNA

は Japanese cancer research resources bank を通して、Dr. zur Hausen より供与されたものを使用した。

文 献

- 1) Mounts P, Shah K V & Kashima H : Viral etiology of juvenile- and adult- onset squamous papilloma of the larynx. Proc Natl Acad Sci USA 79 : 5425~5429, 1982.
- 2) Tsutsumi K, Nakajima T, Gotoh M, Shimosato Y, Tsunokawa Y, Terada M, Ebihara S & Ono I : In situ hybridization and immunohistochemical study of human papillomavirus infection in adult laryngeal papillomas. Laryngoscope 99 : 80~85, 1989.
- 3) Ikenberg H, Gissmann L, zur Hausen H et al : Interferon therapy for bronchial papillomatosis controlled by papillomavirus-DNA hybridization. Arch Otolaryngol 111 : 96~98, 1985.
- 4) Steinberg B M, Gallagher T, Stoler M et al : Persistence and expression of human papillomavirus during interferon therapy. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 114 : 27~32, 1988.
- 5) 古田 康, 犬山征夫, 長嶋和郎 : 頭頸部領域の乳頭腫病変とヒトパピローマウイルス-Digoxigenin 標識プローブを用いたウイルス核酸の検出。日耳鼻 92 : 2055~2063, 1989.
- 6) Furuta Y, Shinohara T, Sano K, Meguro M & Nagashima K : In situ hybridisation with digoxigenin-labelled DNA probes for detection of viral genomes. J Clin Pathol 43 : 806~809, 1990.
- 7) Bronstein I & McGrath P : Chemiluminescence lights up Nature 338 : 599~600, 1989.
- 8) 今野 良, 鹿野和男, 佐藤信二ほか : ヒトパピローマウイルス感染と子宮頸癌における危険因子との関連。医学のあゆみ 154 : 209~210, 1990.
- 9) 岩崎秀昭, 稲葉憲之, 白澤 浩ほか : Human Papilloma Virus に対する新しい簡易検出法の基礎的、臨床的検討。産婦人科の世界 40 : 841~846, 1988.
- 10) 渡辺周一, 内藤好宏, 川上登史ほか : 喉頭乳頭腫のウイルス学的検索-Hybridization 法による比較検討。耳鼻臨床 83 : 909~913, 1990.
- 11) Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A & Arnheim N : Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230 : 1350~1354, 1985.

別刷請求先 〒060 札幌市北区北15条西7丁目
北海道大学医学部耳鼻咽喉科学教室

古田 康