

APPLICATION OF DIGOXIGENIN LABELED DNA PROBES TO DETECT HUMAN PAPILLOMAVIRUS GENOMES

Yasushi Furuta, Yukio Inuyama

Department of Otolaryngology, Hokkaido University School of Medicine

Toshiya Shinohara, Kimiaki Sano, Kazuo Nagashima

Department of Pathology, Hokkaido University School of Medicine

To test the applicability of the recently developed non-radioactive DNA labeling method, digoxigenin-ELISA system, to detect human papillomavirus (HPV) genomes, we examined the nasolaryngeal papillomatous lesions and compared the validity with radioisotope method. In total, 43 cases were examined. They were verruca vulgaris of the nasal vestibule (Nr=2), nasal inverted papilloma (Nr=26), and laryngeal papilloma (Nr=15). HPV types examined were type 2, 6, 11, 16 and 18. The sensitivity of digoxigenin (DIG) labeled DNA

probe was almost same as ^{35}S labeled probe in the tests of dot blot hybridization. In Southern blot hybridization, DIG caused low background. Similar level of DNA signal was detected by in situ hybridization by both methods, but non-specific reaction was occasionally found in DIG labeled probes. However, pretreatment of DNase or RNase markedly decreased those non-specific binding.

Thus, DIG labeling method is thought to be applicable to detect nucleic acids instead of radioisotope method.

Digoxigenin 標識プローブを用いた Human Papillomavirus (HPV) 核酸の検出

古田 康 犬山 征夫

北海道大学医学部耳鼻咽喉科学教室

篠原 敏也 佐野 公昭 長嶋 和郎

北海道大学医学部医学科病理学第二講座

はじめに

生検や手術材料中のウイルス核酸を、臨床病理検査として特に in situ hybridization (ISH) にて検出するためには、放射性同位元素 (RI) を標識したプローブの使用は施設が限られ、RI使用による種々の煩雑さを伴うこ

とより、non-RIプローブの使用が望ましい。最近開発された、Digoxigenin (以下DIG) -ELISA法 (Boehringer Mannheim社) は、RIに劣らぬ高感度であることより広く研究に応用されてきているが、実際の臨床症例で in situ hybridization に応用した報告は少な

い。

今回われわれは、この方法を用いて頭頸部領域の乳頭腫病変におけるHPV 感染の有無および type を検索し、さらにRIプローブと比較検討してみた。

対象症例

鼻前庭部尋常性疣贅2例、鼻・副鼻腔 inverted papilloma 26例（この中には癌合併例5例、癌化例2例を含んでいる）、喉頭乳頭腫15例（若年性多発性1例、成人性単発性7例、成人性多発性7例）を対象とした。

方法

1. DNAプローブの作成

pBR322にクローニングされたHPV type 2¹⁾, 6²⁾, 11³⁾, 16⁴⁾, 18⁵⁾, は、Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB) を通して、Dr. Howley ならびに Dr. zur Hausen より供与されたものを使用した。HPV の全ゲノムをランダムプライマー法にて、それぞれ³⁵S-d CTP、digoxigenin d-UTPにて標識した。

2. Dot blot hybridization による感度の比較

HPV-11 DNAを0.1-1000pgの間で10倍量ずつナイトロフィルター (Biodyne, Pall) にdot し、³⁵S、DIG でそれぞれ標識された HPV-11 DNA プローブにて、dot blot hybridization をおこなった。

3. Southern blot hybridization による若年性多発性喉頭乳頭腫におけるHPVの検出

未固定生材料よりDNAを抽出し、5 μgをそれぞれ制限酵素 BamHI, BamHI と Hind III, BamHIとPstIで切断後、Southern blot hybridizationを施行した。

4. In situ hybridization (ISH)

パラフィン切片を用いて³⁵S 標識プローブ、DIG 標識プローブによるin situ hybridization を施行した。DIGの発色反応は非特異反応の有無を確かめながら1-8時

間の間で行った。一部の症例では、切片をDNase (100 μg/ml) またはRNase (100 μg/ml) で室温1時間反応させた後hybridizationさせ、mRNAのみまたはDNAのみの検出も行った。mRNAの検出の場合は、切片の熱変性は省いた。

5. 免疫組織学的検索

pgs-antigenに対する抗体 (DAKO社) を用い、ABC法にて免疫組織染色を施行した。

結果

1. Dot blot hybridizationによる感度の比較 (Fig. 1)

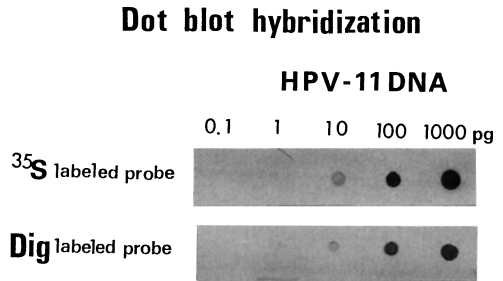


Fig. 1. Dot blot hybridization of HPV-11 DNA with ³⁵S labeled and digoxigenin labeled HPV-11 DNA probes. The spots with 1pg HPV-11 DNA are detected by both probes.

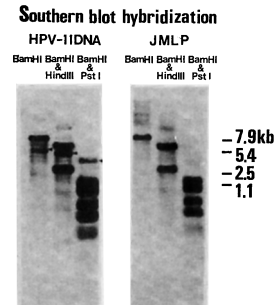
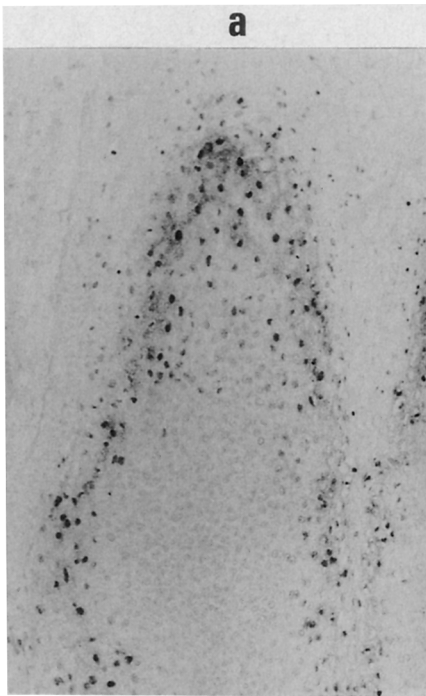
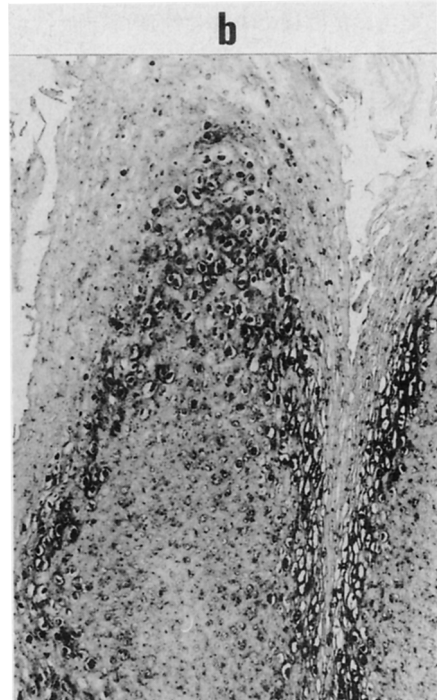


Fig. 2. Southern blot hybridization of HPV-11 DNA and DNA from juvenile multiple laryngeal papilloma with digoxigenin labeled HPV-11 DNA probe after cleavage with BamHI, BamHI and Hind III, BamHI and Pst I. Hybridizations with pBR322 are indicated by the arrows.

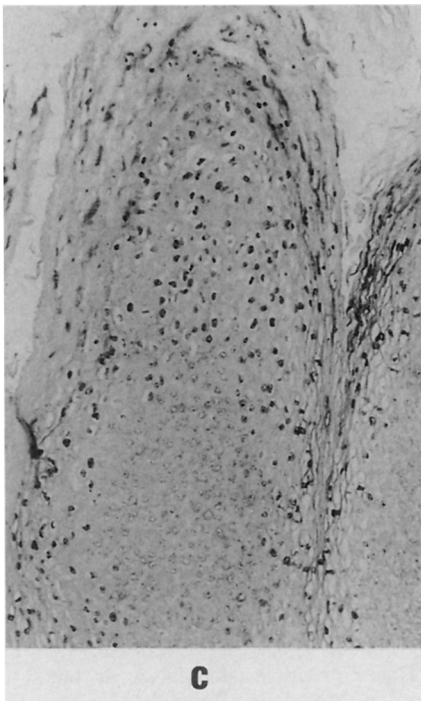
Fig. 3. In situ hybridization (Verruca vulgaris)



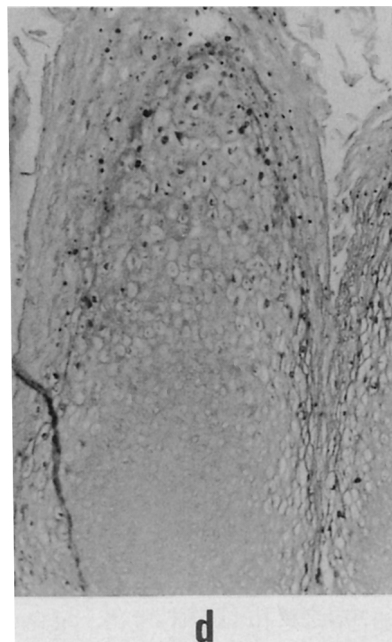
a. ³⁵S labeled HPV-2 DNA probe.



b. Digoxigenin labeled HPV-2 DNA probe. There are strong background stainings.



c. By pretreatment with RNase, background stainings are diminished.



d. By pretreatment with DNase, mRNAs are detected in the superficial layers.

^{35}S 標識プローブでは3日間の感光にて1 pgまで、DIG 標識プローブでは16時間の発色にて同様に1 pgまで検出可能であった。DIG 標識プローブはRIプローブに劣らず高感度であることが示された。

2. Southern blot hybridization (Fig. 2)

若年性多発性喉頭乳頭腫 (JMLP) より抽出したDNAとHPV-11DNAを制限酵素により切断し、DIG標識 HPV-11プローブとSouthern blot hybridizationを施行した結果、同一の切断パターンを呈し、HPV-11が検出同定された。backgroundも低く、解析に問題はなかった。

3. In situ hybridization (ISH) および免疫組織学的検討

a. 鼻前庭部尋常性疣贅

2例とも上皮表層のkoilocytosisを示す細胞の核内にpgs-antigenが証明された。

^{35}S 標識 (Fig. 3-a) およびDIG標識 (Fig. 3-b) HPV-2 DNAプローブによるISHでは、ともに表層部の上皮に強い陽性signalが観察されたが、DIG標識プローブでは非特異反応がやや強くみられた。DNaseまたはRNase処理 (Fig. 3-c,d) により非特異反応は減少し、またDNase処理によるISHでは、表層のkoilocytosisを示す部分でmRNAの検出が可能であった。

b. 鼻・副鼻腔inverted papilloma

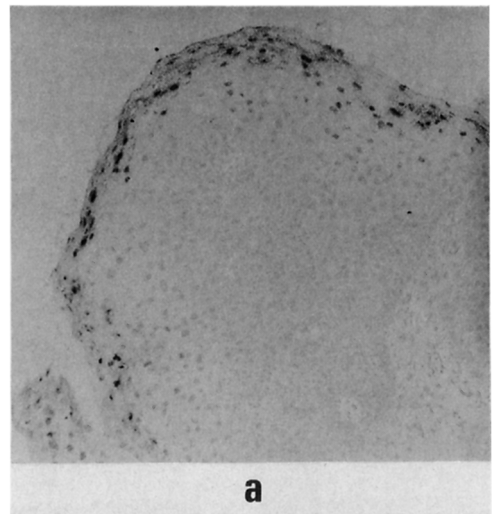
pgs-antigenが検出された症例はみられなかった。ISHでは ^{35}S , DIG 標識プローブともに3例 (12%) の症例でHPV-11が検出された。一方、癌合併例1例 (4%) でHPV-16が ^{35}S 標識プローブにて検出されたが、DIG標識プローブでは明かな陽性所見が得られなかった。

c. 喉頭乳頭腫

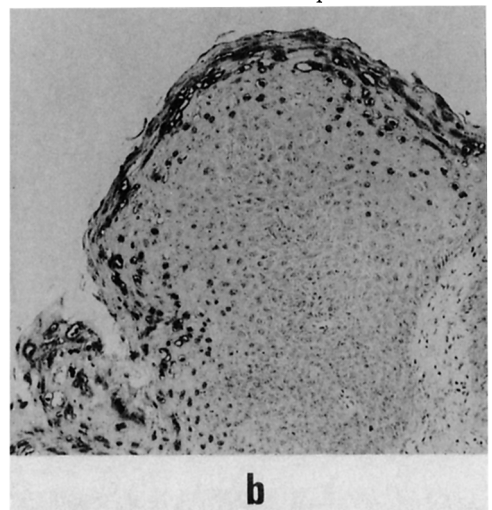
若年性多発性乳頭腫症例では、pgs-antigenは検出されなかった。Southern blotで証明されたHPV-11核酸は、ISHにて表層

の上皮に検出された。成人性単発性乳頭腫7例においては、pgs-antigen, HPV核酸のどちらも検出されなかった。成人性多発性乳頭腫7例では、2例 (29%) にpgs-antigenが検出された。ISHでは ^{35}S 標識、DIG標識プローブともに、3例 (43%) にHPV-6が、2例 (29%) にHPV-11が検出された。(Fig. 4) 2例ではどの type も検出されなかった。

Fig. 4. In situ hybridization (Adult multiple laryngeal papilloma)



a. ^{35}S labeled HPV-6 DNA probe.



b. Digoxigenin labeled DNA probe.

Positive hybridization signals are clearly demonstrated in the superficial layers.

考 察

HPV の同定法としては、免疫組織学的に pgs-antigenを検出する方法が簡便であるが、尋常性疣贅のように高率に pgs-antigenが検出される場合もあるが、喉頭乳頭腫の一部の症例や inverted papillomaのように、タンパクレベルでは検出できない場合もあり、核酸

レベルでウイルスDNAまたはmRNAを検出する方法がより高感度である。またHPV-16などいくつかのtypeが悪性化に重要な役割を果たしていることが明らかになり⁴⁾⁶⁾⁷⁾、HPVのtypingにより悪性化の危険の有無を予測することも重要となってきた。そのためには、生検、手術材料よりウイルス核酸をSouthern

Table 1.. The results of immunohistochemistry and in situ hybridization

	immunohistochemistry (pgs-antigen)	in situ hybridization	
		³⁵ S labeled probe	DIG labeled probe
Verruca vulgaris n=2	2/2 (100%)	2/2 HPV-2 (100%)	2/2 HPV-2 (100%)
Inverted IP papilloma IP+SCC n=26 IP→SCC	0/19 0/5 0/2	3/19 HPV-11 (16%) 1/5 HPV-16 (20%) 0/2	3/19 HPV-11 (16%) 0/5 0/2
Laryngeal JM papilloma AS n=15 AM	0/1 0/7 2/7 (29%)	1/1 HPV-11 0/7 5/7 HPV-6, -11 (71%)	1/1 HPV-11 0/7 5/7 HPV-6, -11 (71%)

IP=inverted papilloma SCC=squamous cell carcinoma

IP+SCC=IP with SCC IP→SCC=IP recurred as SCC

JM=juvenile multiple type AS=adult single type AM=adult multiple type

blot hybridizationやISHにより同定しなければならぬ。

このような検査を日常の臨床検査に応用するためには、従来のRIを標識したプローブの使用は、施設が制限されRI使用の煩雑さがあり、また高価で短期間しか保存できない、検出に時間がかかるなどの欠点がみられnon-RIプローブの使用が望ましい。現在までに、biotin標識法⁸⁾、T-T dimer法⁹⁾など種々のnon-RIによる検出方法の開発がなされてきたが、それぞれ感度や非特異反応、標識法の煩雑さ等一長一短がある。最近開発された、DIG-ELISA法は、その標識の簡便さと感度がすぐれていることより広く研究に応用され始めている。今回のわれわれの検討でも、dot blot hybridizationにおいてはRIに劣らぬ高感度であり、Southern blotにても優れた解像力が証明された。ISHへの応用は現在まで培養細胞を使用した報告¹⁰⁾はあるが、実際の臨床症例で検索した報告は少ない。今回の結果、短期間で結果がわかりまた陽性 signalも鮮明にみられ mRNAの検出も可能であった。検出率 (Table 1) においては、ほぼ RIプローブと同等であり、inverted papilloma例のHPV-16のみDIGプローブでは検出できなかった。しかし、組織によっては非特異反応が強く現れることがあり、発色状態を確かめながら反応時間を調整することが必要であった。このような場合、DNaseまたはRNase処理により核酸への非特異反応が減少することが確認された。

結 語

Digoxigenin標識プローブを用いて頭頸部領域の乳頭腫病変におけるHuman papillomavirus (HPV) の検索を行い、またRI標識プローブと比較検討した結果、非常に高感度でSouthern blot hybridization, ISHに十分応用可能であり、今後さらに広く臨床病理検査等に利用されてくると考えられた。

参 考 文 献

1. Heilman CA, Law MF, Howley PM et al : Cloning of human papilloma virus genomic DNAs and analysis of homologous polynucleotide sequences. *J. Virology* 36 : 395-407, 1980.
2. Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H : Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virology* 40 : 932-935, 1981.
3. Gissmann L, Diehl V, zur Hausen H et al : Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from a laryngeal papilloma. *J. Virology* 44 : 393-400, 1982.
4. Durst M, Gissmann L, zur Hausen H et al : A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80 : 3812-3815, 1983.
5. Boshart M, Gissmann L, zur Hausen H et al : A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO Journal* 3 : 1151-1157, 1984.
6. Abramson AL, Brandsma J, Steinberg B et al : Verrucous carcinoma of the larynx. Possible human papillomavirus etiology. *Arch Otolaryngol* 111 : 709-715, 1985.
7. Syrjänen S, Happonen RP, Virolainen E et al : Detection of human papillomavirus (HPV) structural antigens and DNA types in inverted papillomas and squamous cell carcinomas of the nasal cavities and paranasal sinuses. *Acta. Otolaryngol. (Stockh)* 104 : 334-341, 1987.

8. Langer-Safer PR, Levine M, Ward DC : Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 4381-4385, 1982.
9. Nakane PK, Moriuchi T, Koji T et al : In situ localization of mRNA using thymine-thymine dimerized cDNA. Acta Histochem. Cytochem. 20 : 229-243, 1987.
10. Heiles HBJ, Genersch E, Kessler C et al : In situ hybridization with digoxigenin-labeled DNA of human papillomaviruses (HPV16/18) in HeLa and SiHa cells. BioTechniques 6 : 978-981, 1988.

質 疑 応 答

質問 中井 義明 (大阪市大)

RIとDigoxigenin とは価格的にどちらが安価ですか。

応答 古田 康 (北大)

RIの場合、³⁵Sでは半減期が約2か月で長期間保存できなく、価格も4~5万する。さらに乳剤(これも高価で短期間しか保存できない)、labeling kit等を必要とする。

DIGの場合、kitの価格は5.8万円であるが、一度labelすると長期間保存できるので割安である。