

速 報

子宮頸部扁平上皮癌および高度異形成における HPV 16 E7 protein の免疫組織学的検出

東北大学医学部産婦人科学教室

今野 良 牧野 浩充 伊藤 潔
佐藤 信二 矢嶋 聡

Immunohistochemical Study on HPV 16 E7 Product in Severe Dysplasia and Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix

Ryo KONNO, Hiromitsu MAKINO, Kiyoshi ITO,

Shinji SATO and Akira YAJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

Key words: Cervical carcinoma • Dysplasia • HPV 16 E7 • Immunohistochemistry

緒 言

ヒトパピローマウイルス(HPV)のE6, E7 open reading frame は子宮頸癌組織中で欠損することなく存在するといわれとくに重要な領域とされている。一方、発ガン過程を探るうえでは、DNA 自体の存在に加えて遺伝子産物の検討が重要な意味をもつ²⁾。そこで、子宮頸部扁平上皮癌および高度異形成上皮組織における HPV 16 E7 protein の免疫組織学的方法による検出を試みた。さらに、HPV DNA を in situ hybridization (以下 ISH) により検出した結果と比較した。

対象ならびに方法

対象は東北大学医学部附属病院産婦人科で手術を行った38例のホルマリン固定パラフィン包埋標本で、内訳は、高度異形成上皮4例、上皮内癌12例、微小浸潤癌15例、浸潤癌7例。

1. HPV 16 E7 protein の免疫組織染色

抗 HPV 16 E7モノクローナル抗体 (Triton Bioscience Inc.) を用いて、図1に示した通常の酵素抗体ABC法の手順に従って HPV 16 E7 protein を免疫組織染色した。判定は、DAB 発色が間質部分に認められず、上皮部分にのみ明らかに認められる場合を陽性とした。

2. ISH

ISH は、ViraType in situ (トーレ・フジ バイオニクス) を使用して行った¹⁾。

成 績

ISH による HPV DNA の検出、HPV 16 E7モノクローナル抗体による免疫組織染色の結果を表

1. 脱パラフィン
2. 100%エタノール
3. 0.3% H_2O_2 加メタノール
4. 水和 (90%, 80%, 70%, 50%エタノール)
5. PBS で洗浄
6. 5%正常ウマ血清
7. 1次抗体 (抗 HPV16 E7モノクローナル抗体, マウス IgG, TBI, 2倍希釈)
8. PBS で洗浄
9. 2次抗体 (ビオチン化抗マウス IgG ウマ血清)
10. PBS で洗浄
11. ABC 試薬 (Vectastatin) と反応
12. PBS で洗浄
13. 0.05% H_2O_2 加 DAB により発色
14. 水洗
15. 核染

図1 免疫組織染色—酵素抗体ABC法

1にまとめた。ISH では、6/11は検出されず、16/18と31/33/35が全体の63.2% (24/38) に検出された。HPV 16 E7 protein の免疫組織染色陽性は2例のみであった。この症例は、2例とも ISH で HPV 16/18で最も強い陽性を呈し、別に行つた PCR (polymerase chain reaction) 法により、HPV 16陽性を確認した高度異形成例であった。HPV 16 E7免疫組織染色の陽性例を写真1に示す。DAB による発色は異型のある扁平上皮部分にのみ認められ、隣接する頸管腺や間質には認められない。HPV 16 E7産物の局在は中層から表層細胞層に強い傾向があり、細胞内では、主として細胞質に一部は核内に染色が認められた。

表1 in situ hybridization による HPV DNA および免疫組織染色による HPV 16 E7 protein の検出

症例	組織診断	HPV DNA ISH*	HPV 16 E7 protein
1	高度異形成	16/18	+
2	"	16/18	+
3	"	—	—
4	"	—	—
5	上皮内癌	16/18	—
6	"	16/18	—
7	"	16/18	—
8	"	16/18	—
9	"	16/18	—
10	"	31/33/35	—
11	"	31/33/35	—
12	"	31/33/35	—
13	"	31/33/35	—
14	"	—	—
15	"	—	—
16	"	—	—
17	微小浸潤癌	16/18	—
18	"	16/18	—
19	"	16/18	—
20	"	16/18	—
21	"	31/33/35	—
22	"	31/33/35	—
23	"	31/33/35	—
24	"	31/33/35	—
25	"	31/33/35	—
26	"	—	—
27	"	—	—
28	"	—	—
29	"	—	—
30	"	—	—
31	"	—	—
32	浸潤癌	16/18	—
33	"	16/18	—
34	"	31/33/35	—
35	"	31/33/35	—
36	"	—	—
37	"	—	—
38	"	—	—

ISH*: in situ hybridization HPV6/11, 16/18, 31/33/35

考 察

以上の結果から、高度異形成で HPV DNA が多く存在する例では、HPV 16 E7産物の産生が活発であり、固定条件が良好とはいえないパラフィン包埋組織においても検出可能であることが示唆された。すなわち、浸潤癌では HPV DNA は、ヒトゲノミック DNA に組み込まれているためそのコピー数も産生蛋白も少なく検出され難いが、高

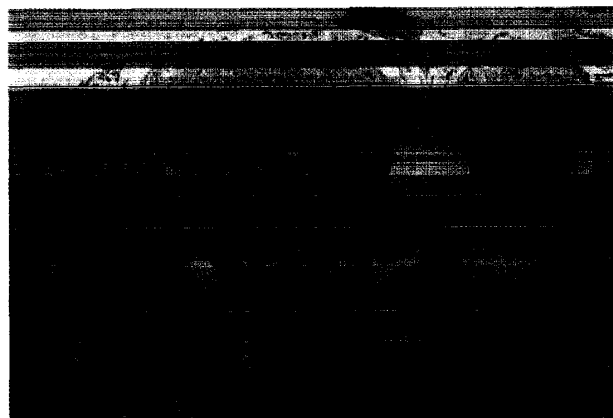


写真1 高度異形成症例の HPV 16 E7モノクローナル抗体による免疫組織染色。(×200)

度異形成で episomal に存在する HPV DNA は replication が活発で、その発現 (mRNA) や産物 (蛋白) 量も多いものと推測される。また、HPV 16 E7 protein は、主に核内に局在すると考えられるが^{3)~5)}、今回の検討で細胞質に認められた原因は固定または包埋による redistribution と思われる今後さらに検討したい。

文 献

1. 今野 良, 遠藤 敦, 鹿野和男, 千葉英俊, 堀口正之, 佐藤信二, 矢嶋 聰, 田勢 享: in situ hybridization による子宮頸癌, 子宮頸部異形成およびコンジローマにおける HPV DNA の検出, 産と婦, (投稿中).
2. Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K. and Harlow, E.: The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retionoblastoma gene product. Science, 243: 934, 1989.
3. Sato, H., Watanabe, S., Furuno, A. and Yoshiike, K.: Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in Escherichia coli and monkey COS-1 cells: Immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. Virology, 170: 311, 1989.
4. Seedorf, K., Oltersdorf, T., Krammer, G. and Roweckamp, W.: Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. EMBO., 6: 139, 1987.
5. Smotokin, D. and Wettstein, F.O.: The major human papillomavirus protein in cervical cancer is a cytoplasmic phosphoprotein. J. Virology, 61: 1686, 1987.

(No. 6905 平2・11・6受付)