

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-530949

(P2007-530949A)

(43) 公表日 平成19年11月1日(2007.11.1)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 88 頁)

(21) 出願番号	特願2007-505150 (P2007-505150)	(71) 出願人	506322466
(86) (22) 出願日	平成17年3月23日 (2005.3.23)		トライパス イメージング インク
(85) 翻訳文提出日	平成18年11月16日 (2006.11.16)		アメリカ国 エヌシー27215 パーリ
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/009740		ントン プランテーションドライブ 78
(87) 国際公開番号	W02005/095964		O
(87) 国際公開日	平成17年10月13日 (2005.10.13)	(74) 代理人	100107984
(31) 優先権主張番号	60/556,495		弁理士 廣田 雅紀
(32) 優先日	平成16年3月24日 (2004.3.24)	(72) 発明者	フィッシャー ティモシー ジェイ.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ国 エヌシー27613 ラレイ
			スワロウテイルレイン 6609
		(72) 発明者	マリノウスキー ダグラス ピー.
			アメリカ国 エヌシー27278 ヒルズ
			ボロウ ディモックスミルロード 100
			5

最終頁に続く

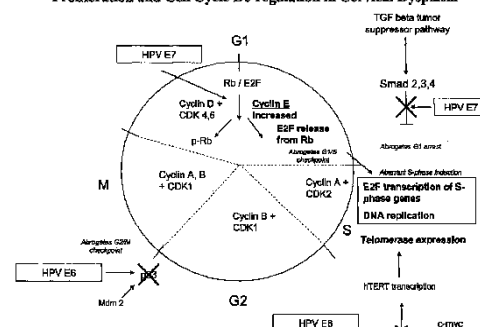
(54) 【発明の名称】 子宮頸部疾患を検出するための方法及び組成物

(57) 【要約】

患者の試料において高悪性度子宮頸部疾患を同定するための方法及び組成物を提供する。本発明の方法は、人体試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、バイオマーカーは高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される。特定の特許請求の範囲では、人体試料は頸部スメア又は頸部細胞単層である。本発明のバイオマーカーには、細胞周期の調節、シグナル伝達、DNAの複製及び転写に關与する遺伝子並びにタンパク質が含まれる。具体的な特許請求の範囲では、バイオマーカーはS期遺伝子である。本発明の一部の態様では、目的バイオマーカーの過剰発現は、バイオマーカーに特異的な抗体を用いてタンパク質レベルで、又は核酸ハイブリダイゼーション技術を用いて核酸レベルで検出する。さらに、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

【選択図】 図1

Proliferation and Cell Cycle De-regulation in Cervical Dysplasia



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者において高悪性度子宮頸部疾患を診断する方法であって、患者由来の人体試料中の少なくとも 1 つの核バイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、前記核バイオマーカーの過剰発現の検出により高悪性度子宮頸部疾患を示す試料が特異的に同定される方法。

【請求項 2】

バイオマーカーの過剰発現の検出により、高悪性度子宮頸部疾患を示す試料が、良性増殖、初期 H P V 感染症、又は軽い異形成を示す試料から識別される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

高悪性度子宮頸部疾患の診断方法が形態学的解析又は H P V 感染症の状態の決定とは独立している、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

過剰発現の検出が、少なくとも 1 つの抗体を用いてバイオマーカータンパク質の発現を検出することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

免疫細胞化学を行うことを含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

核バイオマーカーの過剰発現が核酸レベルで検出される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 7】

過剰発現の検出が定量的 R T - P C R を行うことを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

試料が液体系調製物中に懸濁状態の頸部細胞を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

試料が頸部組織試料を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

高悪性度子宮頸部疾患の診断方法の感度が少なくとも 90 % である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

高悪性度子宮頸部疾患の診断方法の陽性適中率が少なくとも 40 % である、請求項 10 に記載の方法。

30

【請求項 12】

高悪性度子宮頸部疾患の診断方法の特異性が少なくとも 85 % である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

患者が異常な P a p スメア結果を有することを受けて行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

一般患者集団において高悪性度子宮頸部疾患の一次スクリーニングとして行う、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 15】

形態学的解析と併せて行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

患者において高悪性度子宮頸部疾患を診断する方法であって、患者由来の人体試料中の少なくとも 2 つのバイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、前記バイオマーカーの過剰発現の検出により高悪性度子宮頸部疾患を示す試料が特異的に同定される方法。

【請求項 17】

患者において高悪性度子宮頸部疾患を診断する方法であって、

a) 前記患者から人体試料を得ること；

b) 前記試料を、高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される核バイオマ-

50

カータンパク質と特異的に結合する少なくとも１つの抗体と接触させること；及び、
 c) 前記抗体と前記核バイオマーカータンパク質との結合を検出すること
 を含む方法。

【請求項 18】

免疫細胞化学を行うことを含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

手動で行う、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

自動的に行う、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

試料が頸部細胞を含む、請求項 17 に記載の方法。

10

【請求項 22】

試料が頸部細胞単層を含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

高悪性度子宮頸部疾患の診断方法の感度が少なくとも 90% である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 24】

高悪性度子宮頸部疾患の診断方法の特異性が少なくとも 85% である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 25】

患者が異常な P a p スメア結果を有することを受けて行う、請求項 17 に記載の方法。

20

【請求項 26】

一般患者集団において高悪性度子宮頸部疾患の一次スクリーニングとして行う、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 27】

核バイオマーカーが H P V 誘発性の細胞周期の混乱及び S 期誘発の活性化に關与する遺伝子である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 28】

核バイオマーカーが M C M 2、M C M 6、M C M 7、p 1 4 A R F、p 2 1^{w a f 1}、T o p o 2 A、及びサイクリン E からなる群から選択される、請求項 27 に記載の方法。

30

【請求項 29】

核バイオマーカーが M C M タンパク質である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

バイオマーカーが E 2 f 転写因子によって誘導される遺伝子である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 31】

バイオマーカーが S p - 1 転写因子によって誘導される遺伝子である、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 32】

バイオマーカーが S 期遺伝子である、請求項 17 に記載の方法。

40

【請求項 33】

バイオマーカーが細胞周期の調節に關与する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 34】

バイオマーカーが D N A の複製及び転写に關与する、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 35】

試料のパパニコロー (P a p) 染色をさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 36】

患者において高悪性度子宮頸部疾患を診断する方法であって、

a) 前記患者から人体試料を得ること；

b) 前記試料を、それぞれが高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される明

50

確に異なるバイオマーカータンパク質と特異的に結合する少なくとも2つの抗体と接触させること；及び、

c) 前記抗体と前記バイオマーカータンパク質との結合を検出することを含む方法。

【請求項37】

バイオマーカーがMCM2、MCM6、MCM7、p14ARF、p21^{waf1}、Toppo2A、及びサイクリンEからなる群から選択される、請求項36に記載の方法。

【請求項38】

バイオマーカーの少なくとも1つがMCMタンパク質である、請求項37に記載の方法。

10

【請求項39】

少なくとも3つの抗体を試料と接触させ、第1及び第2の抗体がMCM2と特異的に結合し、第3の抗体がToppo2Aと特異的に結合する、請求項37に記載の方法。

【請求項40】

抗体を試料と、個別の抗体試薬として逐次的に接触させる、請求項36に記載の方法。

【請求項41】

抗体を試料と、抗体カクテルとして同時に接触させる、請求項37に記載の方法。

【請求項42】

抗体のそれぞれを試料の一部分を含む別々の顕微鏡スライドと接触させる、請求項36に記載の方法。

20

【請求項43】

患者において高悪性度子宮頸部疾患を診断する方法であって、

a) 前記患者から人体試料を得ること；

b) 前記試料を、高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現されるバイオマーカータンパク質と特異的に結合する少なくとも1つの抗体と接触させること；

c) 前記抗体と前記バイオマーカータンパク質との結合を検出すること；及び、

d) パパニコロー(Pap)染色を用いて試料を染色すること

を含む方法。

【請求項44】

患者が異常なPapスメア結果を有することを受けて行う、請求項43に記載の方法。

30

【請求項45】

一般患者集団において高悪性度子宮頸部疾患の一次スクリーニングとして行う、請求項43に記載の方法。

【請求項46】

患者由来の人体試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、バイオマーカーの過剰発現が異常なS期誘発を示す、高悪性度子宮頸部疾患の診断方法。

【請求項47】

患者由来の人体試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、バイオマーカーの過剰発現が発癌性のHPVのE6及びHPVのE7の能動転写を示す、高悪性度子宮頸部疾患の診断方法。

40

【請求項48】

患者由来の人体試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、バイオマーカーの過剰発現が発癌性のHPVのE6及びHPVのE7の過剰発現を示す、高悪性度子宮頸部疾患の診断方法。

【請求項49】

高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される核バイオマーカータンパク質と特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含むキット。

【請求項50】

核バイオマーカーがMCM2、MCM6、MCM7、p14ARF、p21^{waf1}、

50

T o p o 2 A、及びサイクリン E からなる群から選択される、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 51】

核バイオマーカーが M C M タンパク質である、請求項 50 に記載のキット。

【請求項 52】

ペルオキシダーゼ遮断剤、タンパク質遮断剤、バイオマーカータンパク質との抗体結合を検出するための化学薬品、対比染色剤、青味剤、及び使用説明書をさらに含む、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 53】

抗体結合を検出するための化学薬品が色素原及び標識したポリマーに結合した二次抗体を含み、色素原が 3', 3'-ジアミノベンジジンを含み、標識したポリマーがデキストランポリマーに結合した西洋ワサビペルオキシダーゼを含む、請求項 52 に記載のキット。 10

【請求項 54】

前記対比染色剤がヘマトキシリンを含む、請求項 52 に記載のキット。

【請求項 55】

青味剤がトリス緩衝生理食塩水、pH 7.4、Tween-20、及びアジ化ナトリウムを含む溶液を含む、請求項 52 に記載のキット。

【請求項 56】

陽性対照試料をさらに含む、請求項 52 に記載のキット。 20

【請求項 57】

陽性対照試料が S i H a 細胞を含む、請求項 56 に記載のキット。

【請求項 58】

P a p 染色用の試薬をさらに含む、請求項 49 に記載のキット。

【請求項 59】

P a p 染色用の試薬が E A 50 及び O r a n g e G を含む、請求項 58 に記載のキット。

【請求項 60】

少なくとも 2 つの抗体を含むキットで、抗体のそれぞれが高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される明確に異なるバイオマーカータンパク質と特異的に結合するキット。 30

【請求項 61】

少なくとも 2 つの抗体を別々の試薬として提供する、請求項 60 に記載のキット。

【請求項 62】

少なくとも 2 つの抗体をカクテルとして提供する、請求項 60 に記載のキット。

【請求項 63】

抗体の少なくとも 1 つが M C M タンパク質と特異的に結合する、請求項 60 に記載のキット。

【請求項 64】

キットが少なくとも 3 つの抗体を含み、キット中の第 1 及び第 2 の抗体が M C M 2 と特異的に結合し、第 3 の抗体が T o p o 2 A と特異的に結合する、請求項 60 に記載のキット。 40

【請求項 65】

ペルオキシダーゼ遮断剤、タンパク質遮断剤、バイオマーカータンパク質との抗体結合を検出するための化学薬品、対比染色剤、青味剤、及び使用説明書をさらに含む、請求項 64 に記載のキット。

【請求項 66】

少なくとも 1 つの抗体及び P a p 染色用の試薬を含むキットで、抗体が高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現されるバイオマーカータンパク質と特異的に結合し、P a p 染色用の試薬が E A 50 及び O r a n g e G を含むキット。 50

【請求項 67】

高悪性度子宮頸部疾患を診断するための、請求項 52 に記載のキットの使用方法。

【請求項 68】

高悪性度子宮頸部疾患の診断における、請求項 65 に記載のキットの使用方法。

【請求項 69】

高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される核バイオマーカーをコードしている少なくとも 1 つの核酸分子の過剰発現を検出することを含み、核バイオマーカーが MCM2、MCM6、MCM7、p14ARF、p21^{waf1}、Topo2A、及びサイクリン E からなる群から選択される、患者において高悪性度子宮頸部疾患を診断する方法であって、

10

(a) 患者から人体試料を得ること；

(b) 試料から核酸物質を単離すること；

(c) 前記核酸物質を、核バイオマーカーに特異的な少なくとも 1 対のオリゴヌクレオチドプライマー及び熱安定性 DNA ポリメラーゼと、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) による増幅に適した条件下で混合すること；

d) PCR を行うこと；並びに、

e) PCR 増幅産物を検出すること

を含む方法。

【請求項 70】

PCR を行うことが RT-PCR を行うことを含む、請求項 69 に記載の方法。

20

【請求項 71】

試料が液体系調製物中に懸濁状態の頸部細胞を含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 72】

試料が頸部組織試料を含む、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 73】

核バイオマーカーが MCM タンパク質である、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 74】

患者が異常な Pap スメア結果を有することを受けて行う、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 75】

一般患者集団において高悪性度子宮頸部疾患の一次スクリーニングとして行う、請求項 69 に記載の方法。

30

【請求項 76】

患者由来の人体試料中の少なくとも 2 つのバイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、バイオマーカーの過剰発現の検出により高悪性度子宮頸部疾患を示す試料が特異的に同定され、バイオマーカーの過剰発現が核酸レベルで検出される、高悪性度子宮頸部疾患の診断方法。

【請求項 77】

過剰発現の検出が RT-PCR を行うことを含む、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 78】

高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される核バイオマーカーに特異的な少なくとも 1 対のオリゴヌクレオチドプライマーを含むキット。

40

【請求項 79】

少なくとも 2 対のオリゴヌクレオチドプライマーを含むキットで、オリゴヌクレオチドプライマーのそれぞれの対が高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現されるバイオマーカーに特異的であるキット。

【請求項 80】

患者において高悪性度子宮頸部疾患診断するための、請求項 79 に記載のキットの使用方法。

【請求項 81】

0.05% ~ 5% のラウレス - 13 - カルボン酸ナトリウムを含むスライド前処理緩衝

50

液。

【請求項 8 2】

0.1%～1%のラウレス-13-カルボン酸ナトリウムを含む、請求項 8 1 に記載のスライド前処理緩衝液。

【請求項 8 3】

0.5%のラウレス-13-カルボン酸ナトリウムを含む、請求項 8 2 に記載のスライド前処理緩衝液。

【請求項 8 4】

0.05～5%のラウレス-13-カルボン酸ナトリウムを含む組成物を試料に施用することを含む、免疫細胞化学的アッセイで用いる試料の調製方法。

10

【請求項 8 5】

組成物が 0.1%～1%のラウレス-13-カルボン酸ナトリウムを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】

組成物が 0.5%のラウレス-13-カルボン酸ナトリウムを含む、請求項 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

組成物を 1 時間未満の間試料に施用する、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 8】

試料を加熱することをさらに含む、請求項 8 4 に記載の方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、高悪性度子宮頸部疾患 (high-grade cervical disease) を検出するための方法及び組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

子宮頸部癌は女性で 2 番目に一般的な新生物であり、女性の癌全体の約 12% を占め、毎年約 250,000 件の死亡を引き起こしている。Baldwin et al. (2003) Nature Reviews Cancer 3:1-10。集団スクリーニングプログラムが利用可能でない多くの発展途上国では、この臨床的問題はさらに重大である。このような国において、子宮頸癌は女性の癌死亡の第 1 位である。

30

【0003】

子宮頸癌の症例の大多数が扁平細胞癌を示すが、腺癌も見られる。子宮頸癌は、明確に定義された、形態学的に識別することができる非侵襲性の上皮内期を介して進化するので、集団スクリーニングによって予防することができる。Williams et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14932-14937。正常細胞がどのように形質転換されるのかは理解されていないが、正常な重層上皮から頸部上皮内新形成 (CIN、cervical intraepithelial neoplasia) を介して侵襲性の癌へと組織病理学的に変化していく連続範囲の概念は、長年の間広く受け入れられてきた。子宮頸癌の前駆型は異形成であり、当分野では CIN 又は扁平上皮内病変 (SIL、squamous intraepithelial lesion) としても知られている。扁平上皮内の異常は、3 段 (CIN) 又は 2 段 (Bethesda) のシステムを用いることによって分類し得る。システムの下では、CIN I 及び HPV 感染症に対応する低悪性度扁平上皮内病変 (LSIL、low-grade squamous intraepithelial lesion) は、一般に、侵襲性の疾患へと進行するリスクが比較的低い増殖性 HPV 感染症を示す。3 段システムにおいて CIN II 及び CIN III に対応する高悪性度扁平上皮内病変 (HSIL、high-grade squamous intraepithelial lesion) は、LSIL より高い子宮頸癌へと進行するリスクを示すが、LSIL 及び HSIL はどちらも悪性疾患の潜在的な前駆型としてみなされる。患者の試料は、このシステムの下では ASCUS (意義不明の非定型扁平細胞、atypical squamous cells of unknown significance) 又は AGUS (意義不明の非定

40

50

型腺細胞、atypical glandular cells of unknown significance)として分類され得る。

【0004】

子宮頸癌と16、18、及び31型などの高リスク型ヒトパピローマウイルス（HPV）による感染症との強力な関連性が確立されている。実際、大量の疫学的及び分子生物学的な証拠により、HPV感染症が子宮頸癌における原因因子として確立されている。さらに、HPVは高悪性度子宮頸部疾患の症例の85%以上で見ついている。しかし、HPV感染症は非常に一般的であり、30歳を超える女性の5～15%で起こっている可能性があるが、HPV陽性の女性の少数のみしか一生のうちに高悪性度子宮頸部疾患又は癌を発生しない。HPVの単独での存在は感染症だけの指標であり、高悪性度子宮頸部疾患の指標ではないので、HPV感染症を単独で試験することで多くの偽陽性が生じる。例えば、Wright et al. (2004) Obstet. Gynecol. 103:304-309を参照されたい。

10

【0005】

現在の文献は、HPVは子宮-子宮頸部の下にある組織内の基底幹細胞に感染することを示唆している。細胞の重層頸部上皮への遊走を伴う、幹細胞から成熟ケラチノサイトへの分化は、HPVウイルスの複製及び細胞の再感染に関連している。このウイルス複製プロセスの間には、細胞周期の調節解除、能動増殖、DNA複製、転写活性化及びゲノム不安定化を含めたいくつかの細胞変化が起こる（Crum (2000) Modern Pathology 13:243-251; Middleton et al. (2003) J. Virol. 77:10186-10201; Pett et al. (2004) Cancer Res. 64:1359-1368）。

【0006】

ほとんどのHPV感染症は一過性の性質であり、ウイルス感染症は12カ月の期間内に自然に消散される。HPVの1つ又は複数の発癌性の亜型による持続性の感染症を発生した個体では、HPV感染症に罹患していない患者と比較して新形成を発生するリスクがある。頸部新形成の発生におけるHPVの重要性を考慮すると、HPVの臨床検出は、頸部新形成を発生するリスクにある患者を同定する重要な診断ツールとなっている。HPVに基づいた子宮頸部疾患のスクリーニングの臨床的な有用性は、その陰性適中率にある。正常なPapスミアの履歴と組み合わせたHPV陰性結果は、疾患がない状態であること及びその後1～3年間頸部新形成の発生のリスクが低いことの優れた指標である。しかし、陽性HPV結果は子宮頸部疾患に診断的ではなく、むしろ感染症を示す。HPV感染症の大多数は一過性であり、12カ月の期間内に自発的に消散されるが、高リスクのHPVウイルス亜型による持続性の感染症は、頸部新形成を発生するリスクがより高いことを示す。HPV試験を補うために、頸部新形成に関連する分子マーカーの同定が子宮頸部疾患の診断において臨床的特異性を向上させることが期待されている。

20

30

【0007】

パバニコロー染色頸部スミア（Papスミア）の細胞診断検査が、子宮頸癌を検出するための現在一般に好まれる方法である。Pap試験とは、60年間実質的に変化のないままである主観的方法である。しかし、その性能に関していくつかの懸案事項が存在する。1回のPap試験の報告されている感度（疾患が陽性であるもののうち、試験によって陽性であるものの割合）は低く、広いばらつきが見られる（30～87%）。1回のPap試験の特異性（疾患が陰性であるもののうち、試験によって陰性であるものの割合）は、スクリーニング集団中86%と低い場合があり、根底にある高悪性度疾患を決定するためのASCUS PLUS集団においてそれよりも相当低い。Baldwin et al.、上記を参照されたい。LSIL又はCINIとして特徴づけられたPapスミアの有意なパーセンテージが、実際には高悪性度病変に関して陽性である。さらに、Papスミアの10%までがASCUS（意義不明の非定型扁平細胞）として分類される、即ち、正常、中等度若しくは重篤な病変、又は腫瘍として明確な分類を行うことが不可能である。しかし、経験によりこのASCUS集団の10%までが高悪性度病変に罹患していることが示され、これらは結果的に見落とされる。例えば、Manos et al. (1999) JAMA 281:1605-1610を参照されたい。

40

【0008】

50

- 【非特許文献 1】Baldwin et al. (2003) Nature Reviews Cancer 3:1-10
【非特許文献 2】Williams et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:14932-14937
【非特許文献 3】Wright et al. (2004) Obstet. Gynecol. 103:304-309
【非特許文献 4】Crum (2000) Modern Pathology 13:243-251
【非特許文献 5】Middleton et al. (2003) J. Virol. 77:10186-10201
【非特許文献 6】Pett et al. (2004) Cancer Res. 64:1359-1368
【非特許文献 7】Manos et al. (1999) JAMA 281:1605-1610

【0009】

したがって、従来の P a p スメア及び高リスク H P V 感染症の分子学的試験とは独立して、又はそれと協力して働く、高悪性度子宮頸部疾患の診断方法が必要である。このような方法では、P a p 染色によって L S I L 又は C I N I と分類されたが実際には高悪性度病変に関して陽性である場合（即ち「偽陰性」）を含めたすべての患者集団において存在する高悪性度子宮頸部疾患を特異的に同定することができるべきである。したがって、当分野において、高悪性度子宮頸部疾患を検出することができる、且つ高悪性度疾患を初期 H P V 感染症及び軽い異形成などの臨床的疾患とみなされない状態から区別することができる、特異的な信頼性のある診断方法が必要である。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0010】

高悪性度子宮頸部疾患を診断するための組成物及び方法を提供する。本発明の方法は、人体試料中の少なくとも 1 つのバイオマーカー、特に核バイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、前記バイオマーカーの過剰発現の検出は、高悪性度子宮頸部疾患を示す試料を特異的に同定することを含む。本方法は、高悪性度子宮頸部疾患を示す試料を、良性増殖、初期 H P V 感染症、又は軽い異形成を示す試料から識別する。したがって、本方法は、高悪性度頸部の病状において選択的に過剰発現されるが、正常細胞又は臨床的疾患の指標でない細胞中では過剰発現されないバイオマーカーの検出に依存する。

20

【0011】

本発明のバイオマーカーとは、H P V 誘発性の細胞周期機能不全及び S 期の誘発を司る特定の遺伝子の活性化の結果生じるものを含めた、高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現されるタンパク質及び / 又は遺伝子である。特に興味深いバイオマーカーには、その過剰発現が H P V 誘発性の細胞周期機能不全並びにそれに続く転写因子 S P - 1 及び E 2 F の活性化の結果起こる、S 期遺伝子が含まれる。本発明のバイオマーカー遺伝子又はタンパク質の過剰発現の検出により、中等度から重篤な異形成及び子宮頸癌などの高悪性度疾患を示す試料を、正常細胞又は臨床的疾患の指標でない細胞（例えば、初期の H P V 感染症が存在しない異形成及び軽い異形成）から区別することが可能となる。

30

【0012】

バイオマーカーの過剰発現は、タンパク質又は核酸レベルで評価することができる。一部の実施形態では、頸部細胞診断試料中のバイオマーカータンパク質の過剰発現を検出するために抗体を利用する免疫細胞化学的技術を提供する。本発明のこの態様では、特定の目的バイオマーカーに向けられた少なくとも 1 つの抗体を用いる。また、過剰発現は、例えばハイブリダイゼーション及び R T - P C R を含めた、核酸に基づいた技術によって検出することもできる。さらに、本発明の方法を実施するための試薬を含むキットを提供する。

40

【0013】

また、本発明の方法は、形態学的特徴又は H P V 感染症の状態を解析する従来の婦人科的診断技術と組み合わせることもできる。したがって、例えば、本明細書中に提示する免疫細胞化学的方法は、従来方法からのすべての形態学的情報が保存されるように、P a p 試験と組み合わせることができる。このようにして、高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現されるバイオマーカーの検出により、P a p 試験の高い偽陰性率を下げることができ、また、集団自動スクリーニングが容易になり得る。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、高悪性度子宮頸部疾患を同定又は診断するための組成物及び方法を提供する。この方法は、高悪性度子宮頸部疾患（例えば中等度から重篤な異形成及び子宮頸癌）において選択的に過剰発現される特異的バイオマーカーの過剰発現を検出することを含む。即ち、本発明のバイオマーカーは、HPVに感染した細胞と、前悪性、悪性、又は明らかに癌性であるHPVに感染した細胞とを識別する能力を有する。高悪性度子宮頸部疾患の診断方法は、患者由来の組織又は体液試料において、高悪性度子宮頸部疾患を示す少なくとも1つのバイオマーカーの過剰発現を検出することを含む。特定の実施形態では、抗体及び免疫細胞化学的技術を用いて目的バイオマーカーの発現を検出する。さらに、本発明の方法を実施するためのキットを提供する。

10

【0015】

「高悪性度子宮頸部疾患を診断すること (diagnosing high-grade cervical disease)」とは、例えば、子宮頸部疾患の存在を診断又は検出すること、疾患の進行を監視すること、及び高悪性度子宮頸部疾患を示す細胞若しくは試料を同定又は検出することを含むことを意図する。高悪性度子宮頸部疾患を診断、検出、及び同定する、なる用語は、本明細書中で互換性があるように用いられる。「高悪性度子宮頸部疾患 (high-grade cervical disease)」とは、膣頸管検査によって前悪性病理、悪性病理、中等度から重篤な異形成、及び子宮頸癌と分類された状態を意図する。根底にある高悪性度子宮頸部疾患には、CINII、CINIII、HSIL、in situ癌腫、腺癌、及び癌 (FIGOステージI ~ IV) の組織学的同定が含まれる。

20

【0016】

上述のように、正常、CINI、又はASCUSと分類されたPapスメアを示す患者のうち、有意なパーセンテージが実際には高悪性度子宮頸部疾患の病変的特徴を有する。したがって、本発明の方法は、このような「偽陰性」患者を含めたすべての患者集団において高悪性度子宮頸部疾患を同定することを可能にし、また、患者の試料中の稀な異常細胞の検出を容易にする。診断は細胞形態学及びHPV感染症の状態とは独立して行うことができるが、本発明の方法は、従来の診断技術、例えばPap試験、高リスク型HPVの分子試験などと併せて用いることもできる。

【0017】

HPVの型は、子宮頸癌及び前癌性の病変とのその関連性に基づいて高リスク及び低リスクの分類に分けられている。低リスク型HPVには6、11、42、43、44型が含まれ、子宮頸癌のリスクの増加に関連づけられていない。対照的に、16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68型を含めた高リスク型HPVは、子宮頸癌及び扁平上皮内病変に強く関連づけられている。例えば、Wright et al. (2004) Obstet. Gynecol. 103:304-309を参照されたい。実際、99%を超える子宮頸癌が高リスクHPV感染症に関連している。持続性の高リスクHPV感染症は、HPV遺伝子E2、E6、及びE7の作用を介して頸部細胞において細胞周期並びに有糸分裂性チェックポイントの混乱をもたらす。具体的には、HPVのE7は、サイクリンEの増加、及びそれに続く網膜芽細胞腫 (Rb、retinoblastoma) タンパク質からの転写因子E2fの放出を引き起こす。その後、放出されたE2f転写因子がトポイソメラーゼIIα (Topo2A)、MCMタンパク質、サイクリンE1及びE2、並びにp14arfを含めた様々なS期遺伝子の転写を始動し、その結果、細胞周期の制御の損失がもたらされる。HPVのE2はさらに、Sp-1転写因子を活性化させることによってp21^{waf-1}などのS期遺伝子の過剰発現を刺激する。持続性のHPV感染症によって引き起こされる細胞周期の混乱 (cell cycle disruption) は、その後中等度又は重篤な異形成へと進行し、一部の例では最終的に子宮頸癌まで進行し得る軽い頸部異形成を引き起こす場合がある。「子宮頸癌」とは、頸部組織若しくは頸部細胞に関連する任意の癌又は癌性病変を意図する。

30

40

【0018】

50

頸部ケラチノサイト内のHPV感染症は、細胞周期内の活性を混乱させるいくつかの変化をもたらす。高リスクのHPV亜型のE6及びE7腫瘍性タンパク質は、増殖及び感染したケラチノサイトの新生物性形質転換の増加に関連するいくつかの細胞プロセスに関連づけられている。E6タンパク質は、2つの重大なプロセスに関連づけられている。1つ目は、ユビキチン媒介のタンパク質分解によるp53腫瘍抑制タンパク質の分解である。機能的なp53を取り除くことにより、DNA複製及び有糸分裂に入る前にDNA修復を司る主要な細胞周期チェックポイントが排除される (Duensing and Munger (2003) *Prog Cell Cycle Res.* 5:383-391)。さらに、E6はc-mycタンパク質と相互作用することが示されており、hTERT遺伝子の直接の転写活性化及びそれに続くテロメラーゼの発現を司っている (McMurray and McCance (2003) *J Virol.* 77:9852-9861; Veldman et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100: 8211-8216)。テロメラーゼの活性化は、複製する染色体上のテロメア長の維持を司る癌の生物学における主要なステップであり、この酵素は細胞の不死化中に染色体が機能的に無傷であることを保証する。

【0019】

HPV腫瘍性タンパク質E7は、2つの独立した機構によって細胞増殖に貢献することが知られている。1つ目は、E7とSmadタンパク質 (Smad2、3及び4) との直接相互作用によってG1期での細胞周期を停止させ、したがってDNAに結合するその能力を阻害することを司っている、TGF-β腫瘍抑制経路の失活である (Lee et al. (2002) *J Biol Chem.* 277:38557-38564)。同様に、E7は、Rb腫瘍抑制タンパク質と特異的に相互作用することが知られている。細胞周期のG1期内では、RbがE2F転写因子と複合体形成し、E2Fが遺伝子の転写を活性化させることを妨げる。G1/S境界では、E2F転写因子の放出とともにRbタンパク質がリン酸化され、したがってE2F遺伝子の転写及び細胞周期のS期への移行が開始される。HPVのE7腫瘍性タンパク質は、Rbと直接結合してE2Fを複合体から追放することによってこの制御機構を廃止させる。その結果、正常な細胞周期の制御とは独立した、E2Fに駆動される遺伝子の転写が生じる (Duensing and Munger (2003) *Prog Cell Cycle Res.* 5:383-391; Duensing and Munger (2004) *Int J Cancer* 109:157-162; Clarke and Chetty (2001) *Gynecol Oncol.* 82:238-246)。このE2Fの放出は遺伝子の転写を細胞周期の制御から切り離し、その結果、DNA合成及び細胞増殖を司るS期遺伝子の転写の延長並びに異常がもたらされる。さらに、E6及びE7の合わせた作用は、中心体の異常及びそれに続く頸部新形成におけるゲノム不安定化に貢献することが示されている (Duensing and Munger (2004) *Int J Cancer* 109:157-162)。

【0020】

特定の機構に限定することを意図しないが、一部の実施形態では、高悪性度子宮頸部疾患の分子挙動は、HPVの発癌性の株による感染症の結果として、通常では細胞周期のS期中にのみ発現される明確に区別される遺伝子の過剰発現として特徴づけることができる。それに続く非制御の遺伝子転写の活性化及び異常なS期誘発は、E2F-1転写因子経路に媒介される。この挙動は高悪性度子宮頸部疾患を示すと考えられ、発癌性のHPV感染症と頸部新形成の分子挙動との間の関連を提供する。分子診断的アッセイ様式におけるこれら頸部新形成の分子バイオマーカーの使用は、子宮頸部疾患の検出を改善させることができ、感度及び特異性が現在の方法を越えて改善されている。一般に、図1～4及びその全体で本明細書中に参考として組み込まれているMalinowski (2005) *BioTechniques* 38:1-8 (印刷中) を参照されたい。したがって、特定の実施形態では、高悪性度子宮頸部疾患の診断方法は、バイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、本明細書に記載のように、バイオマーカーの過剰発現は異常なS期誘発を示す。さらに他の実施形態では、この方法は、バイオマーカーの過剰発現を検出することを含み、バイオマーカーの過剰発現は、HPVのE6遺伝子及びHPVのE7遺伝子の能動転写 (active transcription) 又は過剰発現を示す。

【0021】

異形成は従来、細胞並びに核の大きさ、形状、及び染色特徴の変化を伴った、形態学的

観点から上皮細胞の正常な配向性の損失として定義されていた。異形成は細胞異常の度合（即ち、軽度、中等度、重篤な）に従って格付けされ、C I Nなどの前悪性異形成状態の同定によって証明されるように、正常組織から新形成への進行の中間段階であると広く認められている。本発明の方法は、高悪性度子宮頸部疾患に特異的なバイオマーカーの過剰発現に基づいた中等度から重篤な異形成及び子宮頸癌（即ちC I N II状態以上）を含めた、高悪性度子宮頸部疾患の同定を可能にする。

【0022】

本明細書中に開示する方法は、P A P スメア及び／又はH P V感染症の試験と比較して優れた高悪性度子宮頸部疾患の検出を提供する。本発明の特定の態様では、本方法の感度及び特異性は、従来のP a p スメアに等しい、又はそれを超える。本明細書中で用いる「特異性」とは、本発明の方法が、腔頸管検査によってN I Lであると確認された試料（即ち真陰性）を正確に同定することができるレベルをいう。即ち、特異性とは、疾患が陰性であるもののうち、試験によって陰性であるものの割合である。臨床研究では、特異性は、真陰性の数を真陰性と偽陽性との和で割ることによって計算する。「感度」とは、高悪性度子宮頸部疾患に関して陽性であると腔頸管検査によって確認された試料（即ち真陽性）を正確に同定できるレベルを意図する。したがって、感度とは、疾患が陽性であるもののうち、試験によって陽性であるものの割合である。感度は、臨床研究では、真陽性の数を真陽性と偽陰性との和で割ることによって計算する。以下の実施例1～3を参照されたい。一部の実施形態では、開示した高悪性度子宮頸部疾患の検出方法の感度は、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%以上である。さらに、本方法の特異性は、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%以上である。

10

20

【0023】

用語「陽性適中率(positive predictive value)」又は「P P V」とは、本発明の方法を用いて陽性を分類された患者に限定した場合に、患者が高悪性度子宮頸部疾患に罹患している確率をいう。P P Vは、臨床研究では、真陽性の数を真陽性と偽陽性との和で割ることによって計算する。一部の実施形態では、本発明の高悪性度子宮頸部疾患の診断方法のP P Vは少なくとも約40%である一方で、少なくとも約90%、より詳細には少なくとも約95%の感度が保たれる。試験の「陰性適中率(negative predictive value)」又は「N P V」とは、試験で陰性であったすべての患者に限定した場合に、患者が疾患に罹患していない確率をいう。N P Vは、臨床研究では、真陰性の数を真陰性と偽陰性との和で割ることによって計算する。

30

【0024】

本発明のバイオマーカーには、遺伝子及びタンパク質、並びにその変異体及び断片が含まれる。このようなバイオマーカーには、バイオマーカーをコードしている核酸配列の全体若しくは部分配列、又はそのような配列の相補体を含むD N Aが含まれる。また、バイオマーカー核酸には、目的核酸の任意のものの全体又は部分配列を含むR N Aが含まれる。バイオマーカータンパク質とは、本発明のD N Aバイオマーカーによってコードされている、又はそれに対応するタンパク質である。バイオマーカータンパク質は、バイオマーカータンパク質又はポリペプチドの任意のもののアミノ酸配列の全体又は部分配列を含む。

40

【0025】

「バイオマーカー」とは、組織又は細胞におけるその発現レベルが、正常又は健康な細胞若しくは組織の発現レベルと比較して変化している、任意の遺伝子或いはタンパク質である。本発明のバイオマーカーは、根底にある高悪性度子宮頸部疾患に選択的である。「高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される」とは、目的バイオマーカーが、高悪性度子宮頸部疾患において過剰発現されるが、L S I L、C I N I、異形成がまったく存在しないH P Vに感染した試料、未熟な異形成細胞、及び臨床的疾患であるとみなさ

50

れない他の状態と分類された状態において過剰発現されないことを意図する。したがって、本発明のバイオマーカーの検出により、根底にある高悪性度子宮頸部疾患を示す試料を、良性増殖、初期HPV感染症、又は軽い異形成を示す試料から区別することが可能となる。「初期HPV感染症」とは、頸部異形成まで進行していないHPV感染症を意図する。本明細書中で使用する「軽い異形成」とは、高悪性度病変が存在しないLSIL及びCINIを意図する。また、本発明の方法は、高悪性度疾患を示す細胞を、正常細胞、未熟な異形成細胞、及び臨床的疾患の指標でない他の細胞から識別する。このようにして、本発明の方法により、従来のPap試験によって正常、CINI、LSIL、又はASCUSと誤分類症例（即ち「偽陰性」）においても、高悪性度子宮頸部疾患の正確な同定が可能となる。一部の実施形態では、高悪性度子宮頸部疾患の診断方法は、異常な又は非定型のPapスメアを反映して行う。即ち、本発明の方法は、異常な又は非定型のPapスメア結果を有する患者に応えて行い得る。本発明の他の態様では、この方法は、従来のPap試験が現在行われているのと同様に、女性の一般集団における高悪性度子宮頸部疾患の一次スクリーニング試験として行う。

10

【0026】

本発明のバイオマーカーには、本明細書中に上記で定義した、高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現される任意の遺伝子又はタンパク質が含まれる。このようなバイオマーカーは、前悪性、悪性、又は明らかに癌性である、細胞診断用の細胞懸濁液内の細胞を同定する能力を有する。本発明のバイオマーカーは、CINI状態以上の細胞を検出するが、根底にある高悪性度疾患が存在しないCINI及びHPVに感染した細胞を検出ししない。特に興味深いバイオマーカーには、細胞周期の調節、細胞周期HPVによる混乱、DNAの複製及び転写、シグナル伝達に關与する遺伝子並びにタンパク質が含まれる。一部の実施形態では、バイオマーカーは、その発現がE2f転写因子又はSp-1転写因子によって刺激される遺伝子を含めたS期遺伝子である。核バイオマーカーを用いて、本発明の特定の態様を実施し得る。「核バイオマーカー」とは、主に細胞の核内で発現されるバイオマーカーを意図する。核バイオマーカーは、より低い度合で細胞の他の部分でも発現され得る。高悪性度子宮頸部疾患を示す任意のバイオマーカーを本発明で用い得るが、特定の実施形態では、バイオマーカー、特に核バイオマーカーは、MCM2、MCM6、MCM7、p21^{waf1}、トポイソメラーゼIIα (Topo2A)、p14^{arf}、及びサイクリンEからなる群から選択される。最も具体的には、バイオマーカーはMCMタンパク質を含み得る。

20

30

【0027】

ミニ染色体保持 (MCM、minichromosome maintenance) タンパク質は、真核のDNA複製において重要な役割を果たす。ミニ染色体保持 (MCM) タンパク質は、前複製複合体をDNA上に載せること及び複製DNA鎖の新規合成中に二重鎖DNAの巻き戻しを補助するためのヘリカーゼとして機能することで、DNA複製の初期段階において機能する。MCMタンパク質のそれぞれが、その高度に保存された中心ドメイン中にDNA依存性ATPaseモチーフを有する。MCMタンパク質のレベルは、一般に、正常細胞が細胞周期のG0期からG1/S期へと進むにつれて、変動的な様式で増加する。G0期では、MCM2及びMCM5タンパク質はMCM7及びMCM3タンパク質よりもはるかに少ない。MCM6はMCM2、MCM4、及びMCM7と複合体を形成し、これはヒストンH3に結合する。さらに、MCM4、MCM6、及びMCM7の部分複合体はヘリカーゼ活性を有し、これはMCM6のATP結合活性及びMCM4のDNA結合活性によって媒介される。例えば、すべてその全体で本明細書中に参考として組み込まれている、Freeman et al. (1999) Clin. Cancer Res. 5:2121-2132; Lei et al. (2001) J. Cell Sci. 114:1447-1454; Ishimi et al. (2003) Eur. J. Biochem. 270:1089-1101を参照されたい。

40

【0028】

初期の出版物は、MCMタンパク質、具体的にはMCM-5が、子宮頸部疾患 (Williams et al. (1998) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95:14932-14937) 及び他の癌 (Freeman et al. (1999) Clin Cancer Res. 5:2121-2132) の検出に有用であることを示している。

50

出版された文献は、M C M - 5 に対する抗体が頸部新生細胞を検出する能力を有することを示している。高悪性度子宮頸部疾患を検出する特異性は、M C M - 5 について実証されていない (Williams et al. (1998) Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95:14932-14937)。M C M - 5 の発現の検出は高悪性度子宮頸部疾患に限定されておらず、高リスク H P V による感染ののちに細胞周期に再度入った、同定された低悪性度異形成及び増殖性細胞でも検出されている。M C M - 5 に対する抗体を用いた頸部新形成の検出を図 4 に示す。M C M - 5 に加えて、M C M - 2 及び M C M - 7 を含めた M C M ファミリーの他のメンバーが、組織試料中の頸部新形成を検出するための潜在的に有用なマーカーであることが示されている (Freeman et al. (1999) Clin Cancer Res. 5:2121-2132; Brake et al. (2003) Cancer Res. 63:8173-8180)。最近の結果により、M C M - 7 が免疫化学的様式を用いた高悪性度子宮頸部疾患を検出するための特異的マーカーであると考えられることが示されている (Brake et al. (2003) Cancer Res. 63:8173-8180; Malinowski et al. (2004) Acta Cytol. 43:696)。

10

【 0 0 2 9 】

トポイソメラーゼ II α (T o p o 2 a) は DNA 複製に関与する重要な核酵素であり、癌の治療に用いられる多くの抗癌薬の標的である。T o p o 2 a の発現の低下は、いくつかの化学療法剤に対する主な耐性機構である。このタンパク質の発現範囲の顕著な変動が多く異なる腫瘍において注目されている。T o p o 2 a は、増殖細胞中で優勢であり、M 期中に特異的部位におけるリン酸化によって修飾され、これは有糸分裂性染色体の凝結及び分離に重要である。

20

【 0 0 3 0 】

p 2 1 とは、染色体 6 p 上の W A F 1 / C i p 1 遺伝子によってコードされているタンパク質である。この遺伝子は、いくつかのサイクリン / サイクリン依存性キナーゼ複合体の活性を阻害すること、及び細胞周期の進行を遮断することが示されている。p 2 1^{w a f 1} の発現は p 5 3 の細胞周期停止機能を媒介する。p 2 1 は p 5 3 のいくつかの増殖調節機能を媒介すると考えられるので、その発現は、p 5 3 の蓄積よりも正確に p 5 3 の機能状態を反映し得る。さらに、p 2 1^{w a f 1} は、増殖細胞核抗原 (P C N A、proliferating cell nuclear antigen) の作用を遮断することによって DNA 複製を阻害することができる。

30

【 0 0 3 1 】

サイクリン E とは c d k - 2 の調節性サブユニットであり、哺乳動物の細胞周期中に G 1 / S の移行を制御する。サイクリン E の複数のアイソフォームが腫瘍中でのみ発現され、正常組織中では発現されず、これはサイクリン E の転写後調節を示唆している。i n v i t r o 解析により、サイクリン E のこれら切断された変異体アイソフォームがヒストン H 1 をリン酸化することができることが示された。サイクリン E タンパク質中の変化は、様々な癌における予後不良の指標として関連づけられている。

【 0 0 3 2 】

上記バイオマーカーについて詳述にしたが、高悪性度頸部の病状 (例えば、C I N I I、C I N I I I、及び子宮頸癌) において過剰発現される任意のバイオマーカーを本発明の実施に用い得る。他の目的バイオマーカーには、G 1 / S 期の境界又は S 期に特異的な、細胞周期に調節される遺伝子が含まれる。このような遺伝子には、それだけには限定されないが、ヘリカーゼ (D D X 1 1)、ウラシル DNA グリコラーゼ (U N G、uracil DNA glycolase)、E 2 F 5、サイクリン E 1 (C C N E 1)、サイクリン E 2 (C C N E 2)、C D C 2 5 A、C D C 4 5 L、C D C 6、p 2 1 W A F - 1 (C D K N 1 A)、C D K N 3、E 2 F 1、M C M 2、M C M 6、N P A T、P C N A、ステムループ B P (S L B P、stem loop BP)、B R C A 1、B R C A 2、C C N G 2、C D K N 2 C、ジヒドロ葉酸還元酵素 (D H F R、dihydrofolate reductase)、ヒストン H 1、ヒストン H 2 A、ヒストン H 2 B、ヒストン H 3、ヒストン H 4、M S H 2、N A S P、リボヌクレオチドレダクターゼ M 1 (R R M 1、ribonucleotide reductase M1)、リボヌクレオチドレダクターゼ M 2 (R R M 2、ribonucleotide reductase M2)、チミジン合成酵素 (T Y M

40

50

S、thymidine synthase)、複製因子C4(RFC4、replication factor C4)、RAD51、クロマチン因子1A(CHAF1A、chromatin Factor 1A)、クロマチン因子1B(CHAF1B、chromatin Fator 1B)、トポイソメラーゼIII(TOP3A、topoisomerase III)、ORC1、プライマーゼ2A(PRIM2A、primase 2A)、CDC27、プライマーゼ1(PRIM1、primase 1)、フラップ構造エンドヌクレアーゼ(FEN1、flap structure endonuclease)、ファンコーニ貧血相補群A(FNACA、fanconi anemia comp. grp A)、PKMYT1、及び複製タンパク質A2(RPA2、replication protein A2)が含まれる。例えば、その全体で本明細書中に参考として組み込まれている、Whitfield et al. (2002) Mol. Biol. Cell 13:1977-2000を参照されたい。

他の目的S期遺伝子には、サイクリン依存性キナーゼ2(CDK2、cyclin-dependent kinase 2)、MCM3、MCM4、MCM5、DNAポリメラーゼI α (DNA POL1、DNA polymerase I alpha)、DNAリガーゼ1、B-Myb、DNAメチルトランスフェラーゼ(DNAMET、DNA methyl transferase)、ペリセントリン(PER、pericentrin)、KIF4、DP-1、ID-3、RAN結合タンパク質(RANBP1、RAN binding protein)、ギャップジャンクション α 6(GJA6、gap junction alpha 6)、アミノレブリン酸デヒドラターゼ(ALDH、aminolevulinate dehydratase)、ヒストン2AZ(H2A.Z、histone 2AZ)、スベルミン合成酵素(SpmS、spermine synthase)、プロリフェリン2、リンパ球活性化タンパク質、ホスホリパーゼA2(PLA2、phospholipase A2)、及びL6抗原(L6、L6 antigen)が含まれる。例えば、本明細書中に参考として組み込まれている、Nevins et al. (2001) Mol. Cell. Biol. 21:4689-4699を参照されたい。

10

20

【0033】

本発明の一部の態様では、バイオマーカーはE2f転写因子によって誘導される遺伝子を含む。このような遺伝子には、それだけには限定されないが、チミジル酸合成酵素、チミジンキナーゼ1、リボヌクレオチドレダクターゼM1、リボヌクレオチドレダクターゼM2、CDK2、サイクリンE、MCM3、MCM7、PCNA、DNAプライマーゼ小サブユニット、トポイソメラーゼIIA(Topo2A、topoisomerase IIA)、DNAリガーゼ1、フラップエンドヌクレアーゼ1、RAD51、CDC2、サイクリンA2、サイクリンB1、サイクリンB2、KI-67、KIFC1、FIN16、BUB1、インポーチン α -2、HMG2、zesteのエンハンサー、STK-1、ヒストンステムループBP、Rb、P18-INK4C、アネキシンVIII、c-Myb、CDC25A、サイクリンD3、サイクリンE1、デオキシシトシンキナーゼ、DP-1、エンドセリン変換酵素、エノラーゼ2、P18INK4C、リボヌクレオチドレダクターゼ、及びウラシルDNAグリコラーゼ2が含まれる。例えば、Nevins et al.、上記；Muller et al. (2000) Genes and Dev. 15:267-285を参照されたい。特定の実施形態では、目的バイオマーカーは、例えば、サイクリンE2、Ki-67、p57KIP2、RANBPM、及び複製タンパク質A1などの、細胞周期の調節並びにDNA複製に関与するE2f転写因子によって誘導される遺伝子である。APAF1、Bcl-2、カスパーゼ3、MAP3キナーゼ5、及びTNF受容体関連因子を含めた一部のE2f誘導性の目的遺伝子は、アポトーシスに関与している。他のE2f誘導性の遺伝子は転写の調節に関与しており、例えば、ash2様、ポリホメオチック2(polyhomeotic 2)、胚体外胚葉タンパク質、zesteのエンハンサー、hairy/splitのエンハンサー、ホメオボックスA10、ホメオボックスA7、ホメオボックスA9、ホメオドメインTF1、前B細胞白血病FT3、YY1 TF、POUDメインTF、TAFII130、TBP因子172、塩基性TF3、プロモドメイン/ジンクフィンガー、SWI/SNF、ID4、TEA-4、NFATC1、NFATC3、BT、CNC-1、MAF、MAFF、MAFG、コア結合タンパク質、E74様因子4、c-FOS、JUNB、ジンクフィンガーDNA BP、及びCb p/p300トランス活性化因子が含まれる。シグナル伝達に関与するE2f誘導性の遺伝子も潜在的な目的バイオマーカーであり、TGF β 、フォリスタチン、骨形態発生タンパク質2、BMP受容体1A型、frizzled相同体1、WNT10B、スフ

30

40

50

インゴシンキナーゼ 1、二重特異性ホスファターゼ 7、二重特異性 (Y) ホスファターゼ、FGF 受容体 3、タンパク質チロシンホスファターゼ、二重特異性 (Y) ホスファターゼ D6655、インスリン受容体、成熟 T 細胞増殖 1、FGF 受容体 2、TGF α 、CD42 エフェクタータンパク質 3、Met、CD58、CD83、TACC1、及び TEAD4 が含まれる。

【0034】

本発明の方法は高悪性度子宮頸部疾患を検出するために患者の試料中に少なくとも 1 つのバイオマーカーを検出することを要するが、2、3、4、5、6、7、8、9、10 個又はそれ以上のバイオマーカーを用いて本発明を実施し得る。人体試料中における複数のバイオマーカーの検出を用いて高悪性度子宮頸部疾患の事例を同定し得ることが理解されよう。したがって、一部の実施形態では、2 つ以上のバイオマーカー、より好ましくは、2 つ以上の補完的バイオマーカーを用いる。「補完的 (complementary)」とは、人体試料中のバイオマーカーの組合せを検出した結果、高悪性度子宮頸部疾患の同定が、1 つのバイオマーカーのみを用いた場合に同定されるよりも高いパーセンテージの事例で成功することを意図する。したがって、一部の例では、少なくとも 2 つのバイオマーカーを用いることによって高悪性度子宮頸部疾患のより正確な決定を行うことができる。したがって、少なくとも 2 つのバイオマーカーを用いた場合、明確に異なるバイオマーカータンパク質に向けられた少なくとも 2 つの抗体を用いて、本明細書中に開示した免疫細胞化学的方法を実施する。抗体は、同時、即ちともに人体試料と接触させ得る。本発明の特定の態様では、MCM2 及び Topo2A の過剰発現は 3 つの抗体を用いて検出し、この抗体のうち 2 つは MCM2 に特異的であり、3 つ目の抗体は Topo2A に特異的である。

【0035】

特定の実施形態では、本発明の診断方法は、患者から頸部試料を採取すること、試料を目的バイオマーカーに特異的な少なくとも 1 つの抗体と接触させること、及び抗体結合を検出することを含む。抗体結合の検出によって決定されるように本発明のバイオマーカーの過剰発現を示す試料は、高悪性度子宮頸部疾患に関して陽性であるとみなされる。特定の実施形態では、人体試料は頸部細胞単層である。本発明の一部の態様では、頸部細胞単層をスライドガラス上で提供する。

【0036】

「人体試料 (body sample)」とは、バイオマーカーの発現を検出することができる細胞、組織、又は体液の任意のサンプリングを意図する。このような人体試料の例には、それだけには限定されないが血液、リンパ液、尿、婦人科系体液、生検、及びスミアが含まれる。人体試料は、例えば領域の搔爬若しくはスワブによる技術又は針を用いて体液を吸引することによる技術を含めた様々な技術によって、患者から得ることができる。様々な人体試料を採取する方法は当分野で周知である。特定の実施形態では、人体試料は、懸濁状態、特に液体系調製物中に懸濁状態の頸部組織試料又は頸部細胞としての頸部細胞を含む。一実施形態では、頸部試料は、例えば、SurePath (登録商標) (TriPath Imaging, Inc. 社製) 又は ThinPrep (登録商標) 調製物 (CYTYC, Inc. 社製) などの液体系細胞診断標本の調製指針に従って採取する。拡大して観察するために、人体試料をスライドガラスに移してもよい。標本を保存し、検査を容易にするために、固定液及び染色液をスライド上で細胞に施用し得る。一実施形態では、本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第 5,346,831 号に記載のように、頸部試料を採取及び加工して単層試料を提供する。

【0037】

単層方法は、陽イオンで帯電させた基質上に細胞診断物質の単層を生成する方法に関する。この方法は、一定の密度勾配にわたって遠心分離を行うことによって細胞診断物質を分離するステップと、細胞診断物質の固まったペレットを生成するステップと、細胞診断物質のペレットを混合するステップと、所定体積のアリコートを混合したペレットから取り出すステップと、アリコート及び所定体積の水を、陽イオンで帯電させた基質に取り外し可能に固定した沈降容器中で堆積させるステップと、重力下で細胞診断物質を基質上に

沈降させるステップと、細胞診断物質の沈降後に、沈降容器から水を除去するステップとを含む。自動解析には、沈降容器を基質から外し得る。解離は、シリンジ処理、トリプシン処理、超音波処理、振盪、ボルテックス攪拌などの当分野で知られている任意の方法によるものであるか、又は、その内容が本明細書中に参考として組み込まれている同時係属米国特許第5,316,814号に記載の装置を用いることによるものであり得る。一部の実施形態では、頸部細胞単層を含むスライドは、PrepStain(商標)スライドプロセッサ(TriPath Imaging, Inc.社製)を用いて、SurePath(商標)(TriPath Imaging, Inc.社製)試料から調製する。

【0038】

バイオマーカーを同定又は検出するための当分野で利用可能な任意の方法が、本明細書中に包含される。本発明のバイオマーカーの過剰発現は、核酸レベル又はタンパク質レベルで検出することができる。過剰発現を決定するために、検査する人体試料を、健康な人由来の対応する人体試料と比較し得る。即ち、「正常な」発現レベルとは、高悪性度子宮頸部疾患に罹患していないヒト対象又は患者の頸部細胞中におけるバイオマーカーの発現レベルである。このような試料は標準化した形態で存在することができる。一部の実施形態では、特に人体試料が頸部細胞単層を含む場合は、バイオマーカーの過剰発現の決定に人体試料と健康な人由来の対応する人体試料との比較を要さない。この場合、単一の患者由来の頸部細胞単層は、存在する50,000個の正常細胞あたり1~2個の異常細胞の少ない数のみ含み得る。その本発明のバイオマーカーの過剰発現によって同定される、このような異常細胞の検出により、健康な人由来の対応する人体試料と比較する必要性が排除される。

【0039】

本発明のバイオマーカーの検出方法は、バイオマーカーの量又は存在を核酸レベル若しくはタンパク質レベルのいずれかで決定する任意の方法を含む。このような方法は当分野で周知であり、それだけには限定されないが、ウエスタンブロット、ノーザンブロット、サザンブロット、ELISA、免疫沈降、免疫蛍光、フローサイトメトリー、免疫細胞化学、核酸ハイブリダイゼーション技術、核酸逆転写方法、及び核酸増幅方法が含まれる。特定の実施形態では、バイオマーカーの過剰発現は、例えば特異的バイオマーカータンパク質に向けられた抗体を用いて、タンパク質レベルで検出される。これらの抗体は、ウエスタンブロット、ELISA、免疫沈降、又は免疫細胞化学的技術などの様々な方法で用いることができる。同様に、形態学的情報及び免疫細胞化学的情報が得られるように、頸部スメアの免疫染色を従来のPap染色方法と組み合わせることができる。このようにして、バイオマーカーの検出によりPapスメア試験の高い偽陰性率を下げることができ、また、集団自動スクリーニングが容易になり得る。

【0040】

一実施形態では、バイオマーカータンパク質に特異的な抗体を利用して人体試料中のバイオマーカータンパク質の過剰発現を検出する。この方法は、患者から人体試料を得ること、人体試料を、高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現されるバイオマーカーに向けられた、少なくとも1つの抗体と接触させること、及び抗体結合を検出して、バイオマーカーが患者の試料中で過剰発現されているかどうかを決定することを含む。本発明の好ましい態様は、高悪性度子宮頸部疾患を診断するための免疫細胞化学的技術を提供する。具体的には、本方法は、患者の試料中の、高悪性度子宮頸部疾患に特異的なバイオマーカーの抗体染色を含む。当業者は、本明細書中で以下に記載の免疫細胞化学的方法を手動で、又は、例えばAutostainer Universal Staining System(Dako社製)若しくはBiocare Nemesis Autostainer(Biocare社製)を用いて、自動的な様式で行い得ることを理解されよう。頸部試料の抗体染色の1つのプロトコル(即ち免疫細胞化学)を実施例1に提供する。

【0041】

好ましい免疫細胞化学的方法では、患者の頸部試料を例えばSurePath(商標)採取バイアル(TriPath Imaging, Inc.社製)などの液体培地中に採取する。PrepStain(商標)シ

ステム (TriPath Imaging, Inc.社製) などの自動プロセッサを用いて細胞を液体培地から採取し、さらなる解析のためにそれらをスライドガラス上に薄層として堆積させる。スライド標本は固定若しくは未固定であり得、解析し調製後すぐに解析するか、又はのちに解析するために保存し得る。一部の実施形態では、調製したスライドを最短で 24 時間、95% のエタノール中で保存する。或いは、他の実施形態では、下に記述するようにスライドを前処理緩衝液中で保存する。

【0042】

バイオマーカー抗原の抗体結合へのアクセシビリティを可能にするために、試料を改変する必要がある可能性がある。免疫細胞化学的方法の特定の態様では、スライドを前処理緩衝液、例えば SureSlide (登録商標) 調製緩衝液 (TriPath Imaging, Inc.社製) に移し、抗原のアクセシビリティを増大するために任意選択で加熱する。前処理緩衝液中での試料の加熱により、細胞の脂質二重層が迅速に破壊され、抗原 (即ちバイオマーカータンパク質) の抗体結合におけるアクセシビリティが増す。前処理緩衝液は、ポリマー、洗剤、又は、例えばエチルオキシ化した陰イオン性若しくは非イオン性の界面活性剤、アルカノエート若しくはアルコキシレート若しくはさらにこのような界面活性剤の混合物などの非イオン性若しくは陰イオン性の界面活性剤、或いは、さらには胆汁酸塩の使用を含み得る。特定の実施形態では、前処理緩衝液は、約 183 kD の分子量を有するナトリウムアルカノエートと混合した約 370 kD の分子量を有するアルコキシレート (本明細書中で以降 RAM と呼ぶ) などの非イオン性又は陰イオン性の洗剤を含む。特定の実施形態では、前処理緩衝液は 1% の RAM を含む。一部の実施形態では、前処理緩衝液は、上記で指示したように、スライド保存緩衝液としても用い得る。別の実施形態では、0.1% ~ 1% のデオキシコール酸、ナトリウム塩、一水和物の溶液を、保存緩衝液及び前処理緩衝液のどちらとしても用いる。本発明のさらに別の実施形態では、ラウレス - 13 - カルボン酸ナトリウム (例えば Sandopan LS) 又は及びエトキシ化した陰イオン性複合体又はさらにはアルキルアリアルエトキシレートカルボン酸の溶液を、保存及び前処理緩衝液に用いることができる。本発明の特定の態様では、スライド前処理緩衝液は 0.05% ~ 5% のラウレス - 13 - カルボン酸ナトリウム、具体的には 0.1% ~ 1% のラウレス - 13 - カルボン酸ナトリウム、より具体的には 0.5% のラウレス - 13 - カルボン酸ナトリウムを含む。一実施形態では、スライドを、前処理及び染色工程の前に 72 時間まで緩衝液中で保存することができる。本発明の前処理緩衝液は、例えば免疫細胞化学的方法又は免疫組織化学的方法などの免疫アッセイにおいて、抗体結合に対するアクセシビリティを増大する方法で用い得る。実施例 14 を参照されたい。用語「前処理緩衝液 (pretreatment buffer)」及び「調製緩衝液 (preparation buffer)」は本明細書中で互換性があるように使用され、特に抗体結合に対する抗原のアクセシビリティを増大させることによって免疫染色用に細胞診断試料又は組織学的試料を調製するために用いる緩衝液をいう。

【0043】

当分野で知られている抗原の回収方法を含めた、抗体結合に対するアクセシビリティを増大する任意の方法を本発明の実施において用い得る。例えば、その全体で本明細書中に参考として組み込まれている、Bibbo et al. (2002) Acta. Cytol. 46:25-29; Saqi et al. (2003) Diagn. Cytopathol. 27:365-370; Bibbo et al. (2003) Anal. Quant. Cytol. Histol. 25:8-11 を参照されたい。一部の実施形態では、抗原の回収は、スライドを 95% のエタノール中に少なくとも 24 時間保存すること、スライドを 95 に予熱した 1 × Target Retrieval Solution、pH 6.0 (DAKO社製 S1699) / dH₂O 浴に浸す、及びスライドをスチーマーに 25 分間入れることを含む。以下の実施例 2 を参照されたい。

【0044】

抗原のアクセシビリティを増大するための前処理又は抗原の回収ののち、適切な遮断剤、例えば過酸化水素などのペルオキシダーゼ遮断剤を用いて試料を遮断する。一部の実施形態では、抗体の非特異的結合を防ぐためにタンパク質遮断剤を用いて試料を遮断する。タンパク質遮断剤は、例えば精製カゼインを含み得る。その後、目的バイオマーカーに向けられた抗体、特にモノクローナル抗体を、試料とともにインキュベーションする。上述

のように、当業者は、場合によっては患者の試料中で複数のバイオマーカーを検出することによって高悪性度子宮頸部疾患のより正確な診断が得られ得ることを理解されよう。したがって、特定の実施形態では、2つの明確に異なるバイオマーカーに向けられた少なくとも2つの抗体を用いて高悪性度子宮頸部疾患を検出する。複数の抗体を用いる場合、これらの抗体は、個別の抗体試薬として逐次的に、又は抗体カクテルとして同時に、単一の試料に加え得る。以下の実施例3を参照されたい。或いは、それぞれの個別の抗体を同一の患者由来の別々の試料に加え、その結果生じるデータをプールし得る。特定の実施形態では、抗体カクテルは少なくとも3つの抗体を含み、2つの抗体がM C M 2と特異的に結合し、3つ目の抗体はT o p o 2 Aと特異的に結合する。

【0045】

抗体結合を検出するための技術は当分野で周知である。目的バイオマーカーへの抗体結合は、抗体結合のレベルに対応し、したがってバイオマーカータンパク質の発現レベルに対応する、検出可能なシグナルを生じる化学試薬を使用することによって検出し得る。本発明の免疫細胞化学的方法の1つでは、標識したポリマーにとコンジュゲートした二次抗体を使用することによって抗体結合を検出する。標識したポリマーの例には、それだけには限定されないが、ポリマー-酵素コンジュゲートが含まれる。このような複合体中の酵素は、典型的には、抗原-抗体の結合部位で色素原の堆積を触媒するために用いられ、その結果、目的バイオマーカーの発現レベルに対応する細胞染色が生じる。特に興味深い酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ(H R P、horseradish peroxidase)及びアルカリホスファターゼ(A P、alkaline phosphatase)が含まれる。本発明を実施するために、例えばDako社製Envision+システム及びBiocare Medical社製Mach 3システムなどの市販の抗体検出システムを用い得る。

【0046】

本発明の1つの具体的な免疫細胞化学的方法では、バイオマーカーへの抗体結合は、二次抗体とコンジュゲートしたH R P標識ポリマーを使用することによって検出する。また、抗体結合は、マウスモノクローナル抗体に結合するマウスプローブ試薬、及びマウスプローブ試薬に結合する、ポリマーとコンジュゲートしたH R Pを使用することによって検出することができる。スライドを、色素原3,3'-ジアミノベンジジン(D A B、3,3'-diaminobenzidine)を用いて抗体結合について染色し、その後、ヘマトキシリン及び任意選択で水酸化アンモニウム又はT B S / Tween-20などの青味剤(bluing agent)を用いて対比染色を行う。本発明の一部の態様では、細胞染色(即ちバイオマーカーの過剰発現)を評価し、且つ高悪性度子宮頸部疾患が存在するかどうかを決定するために、細胞検査技師及び/又は病理学者によってスライドを顕微鏡検査する。或いは、試料を自動顕微鏡観察によって、又は陽性染色細胞の同定を容易にするコンピュータソフトウェアの支援を用いて人手によって検査し得る。

【0047】

用語「抗体」及び「複数の抗体」とは、単鎖抗体、キメラ、ヒト化抗体などの抗体の天然に存在する型及び組換え抗体、多特異性抗体、並びに前述のものすべての断片及び誘導体を広く包含し、断片及び誘導体は少なくとも1つの抗原結合部位を有する。抗体の誘導体は、抗体とコンジュゲートしたタンパク質又は化学薬品部分を含み得る。

【0048】

「抗体」及び「免疫グロブリン」(I g、immunoglobulin)とは、同じ構造的等張を有する糖タンパク質である。抗体は抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンには抗体及び抗原特異性を欠く他の抗体様分子のどちらも含まれる。後者の種類のポリペプチドは、例えば、リンパ系によって低いレベルで、且つ骨髓腫によってより高いレベルで産生される。

【0049】

用語「抗体」とは、最も広義に用いられ、完全に構築された抗体、抗原に結合することができる抗体断片(例えばF a b'、F'(a b)₂、F v、単鎖抗体、二重特異性抗体)、及び前述のものを含む組換えペプチドにわたる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

本明細書中で用いる用語「モノクローナル抗体」とは、実質的に同種の抗体の集団から得た抗体ことをいい、即ち、集団を構成する個々の抗体は、少量存在し得る潜在的な自然に存在する突然変異以外は同一である。

【 0 0 5 1 】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分、好ましくはインタクトな抗体の抗原結合領域又は可変領域を含む。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F (a b') 2、及びF v断片；二重特異性抗体；直鎖抗体 (Zapata et al. (1995) Protein Eng. 8(10):1057-1062) ；単鎖抗体分子；並びに抗体断片から形成された多特異性抗体が含まれる。抗体のパパイン消化により、それぞれが単一の抗原結合部位を有する、「F a b」断片と呼ば

10

【 0 0 5 2 】

「F v」とは、完全な抗原認識部位及び結合部位を含む最小の抗体断片である。2鎖のF v種では、この領域は、1本の重鎖及び1本の軽鎖の可変ドメインの、密な非共有結合の二量体からなる。単鎖F v種では、1本の重鎖及び1本の軽鎖の可変ドメインは、軽鎖と重鎖とが、2鎖のF v種に類似の「二量体」構造で結合できるように、柔軟なペプチドリンカーによって共有結合されていることができる。それぞれの可変ドメインの3つのC D Rが相互作用してV_H - V_L二量体の表面上の抗原 - 結合部位を定義するのは、この立

20

【 0 0 5 3 】

また、F a b断片も、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1定常ドメイン (C_H 1) を含む。F a b断片は、抗体のヒンジ領域からの1つ又は複数のシステインを含めた、重鎖C_H 1ドメインのカルボキシ末端における数残基の付加によって、F a b'断片と異なる。定常ドメインのシステイン残基 (又は複数のシステイン残基) が遊離チオール基を有するF a b'の本明細書中の命名は、F a b' - S Hである。F (a b') 2抗体断片は、最初、間にヒンジのシステインを有するF a b'断片の対として産生された。

30

【 0 0 5 4 】

ポリクローナル抗体は、バイオマーカータンパク質免疫原を用いて適切な対象 (例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、又は他の哺乳動物) の免疫化を行うことによって調製することができる。免疫化された対象における抗体価は、固定したバイオマーカータンパク質を使用した酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A、enzyme linked immunosorbent assay) などを用いて、標準の技術によって経時的に監視することができる。免疫化後の適切な時点、例えば抗体価が最も高い時に、抗体産生細胞を対象から得て、最初にKohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497に記載されたハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術 (Kozbor et al. (1983) Immunol. Today 4:72)、E B V - ハイブリドーマ

40

【 0 0 5 5 】

モノクローナル抗体分泌ハイブリドーマを調製する代わりに、バイオマーカータンパク

50

質を用いて組換えコンピナトリアル免疫グロブリンライブラリ（例えば抗体ファージディスプレイライブラリ）のスクリーニングを行い、それによりバイオマーカータンパク質に結合する免疫グロブリンライブラリメンバーを単離することによって、モノクローナル抗体を同定及び単離することができる。ファージディスプレイライブラリを作製及びスクリーニングするためのキットは市販されている（例えば、Pharmacia社製Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01；及びStratagene社製SurfZAP 9 Phage Display Kit、カタログ番号240612）。さらに、抗体ディスプレイライブラリの作製及びスクリーニングにおける使用に特に受け入れられる方法並びに方法の例は、例えば、米国特許第5,223,409号；PCT公開WO92/18619号；WO91/17271号；WO92/20791号；WO92/15679号；第93/01288号；WO92/01047号；第92/09690号；及び第90/02809号；Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85；Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281；Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725-734に見つかる。

10

20

30

40

50

【0056】

抗体結合の検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングさせることによって容易にすることができる。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光性物質、生物発光物質、及び放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが含まれ；適切な補欠分子族の複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが含まれ；適切な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミン、フルオレセイン、塩化ダンシル又はフィコエリスリンが含まれ；発光性物質の例にはルミノールが含まれ；生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが含まれ；適切な放射性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、又は ^3H が含まれる。

【0057】

本発明の免疫細胞化学的方法において抗体染色を検出することに関して、当分野には、生体試料中の複数の分子種（例えばバイオマーカータンパク質）の量を定量的に決定するための、映像顕微鏡観察及びソフトウェアによる方法も存在し、存在する各分子種は特異的な色を有する代表的な色素マーカーによって示される。このような方法は、当分野で比色分析方法としても知られている。このような方法では、特定の目的バイオマーカーの存在を視覚的に示すために、映像顕微鏡観察を用いて染色後の生体試料の画像を提供する。本明細書中に参考として組み込まれているMarcelpoil et al.の米国特許出願第09/957,446号及びMarcelpoil et al.の米国特許出願第10/057,729号に開示されているものなどの、このような方法の一部は、画像処理システム及び関連するソフトウェアを使用して、画像処理システム及び関連するソフトウェアによって決定される色素マーカーのそれぞれ光学密度又は透過率の値によって示される、代表的な色素マーカーの存在に基づいて、存在するそれぞれの分子種の相対量を決定することを開示している。これらの技術は、構成色部分に「分解した」単一の映像画像を用いた、染色した生体試料中のそれぞれの分子種の相対量の定量的な決定を提供する。

【0058】

本発明を実施するために用いた抗体は、目的バイオマーカータンパク質に対して高い特異性を有するように選択する。抗体を作製する方法及び適切な抗体を選択する方法は当分野で知られている。例えば、その全体で本明細書中に参考として組み込まれている、Cellis, ed. (印刷中) Cell Biology & Laboratory Handbook, 3rd edition (Academic Press, New York)を参照されたい。一部の実施形態では、特異的バイオマーカータンパク質に向けられた市販の抗体を、本発明の実施に用い得る。本発明の抗体は、組織学的試料ではなく、細胞診断の望ましい染色に基づいて選択し得る。即ち、特定の実施形態では、抗体は、最終的な試料の種類（即ち細胞診断調製物）を念頭において、且つ結合特異性について

選択する。

【0059】

本発明の一部の態様では、目的特異的バイオマーカーに向けられた抗体は、複数ステップのスクリーニング工程によって選択及び精製する。特定の実施形態では、ポリドーマをスクリーニングして、所望の特異性及び感度の特色を有する、バイオマーカーに特異的な抗体を同定する。本明細書中で使用する「ポリドーマ」とは、複数のハイブリドーマをいう。本発明のポリドーマは、典型的にはマルチウェル組織培養プレート中に提供する。最初の抗体スクリーニングステップでは、複数の正常（即ちCINなし）、CINIII、扁平細胞癌、及び腺癌の試料を含む腫瘍組織マイクロアレイを作製する。複数の組織のアレイを単一のスライド上に作製するための方法及びChemicon社製（登録商標）Advanced Tissue Arrayerなどの装置は、当分野で知られている。例えば、米国特許第4,820,504号を参照されたい。ポリドーマを含む各ウェルからの無希釈の上清で、標準の免疫組織化学的技術を用いて陽性染色についてアッセイを行う。この最初のスクリーニングステップでは、バックグラウンド、即ち非特異的結合は基本的に無視する。陽性結果を生じるポリドーマを選択し、抗体スクリーニングの第2ステージに用いる。

【0060】

第2のスクリーニングステップでは、陽性ポリドーマを限界希釈工程に供する。その結果生じるスクリーニングされていない抗体は、標準の免疫組織化学的技術を用いて、CINIII又は子宮頸癌試料の陽性染色についてアッセイを行う。この段階では、バックグラウンド染色は関係があり、異常細胞（即ちCINIII及び癌細胞）に関してのみ陽性に染色される候補ポリドーマだけをさらなる解析用に選択する。

【0061】

正常及びCINI試料を、高悪性度子宮頸部疾患を示すもの（即ちCINII以上）から識別することができる抗体を同定するために、疾患パネル組織マイクロアレイを作製する。この組織マイクロアレイは、典型的には複数のCINなし、CINI、CINII、CINIII、扁平細胞癌、及び腺癌の試料を含む。標準の免疫組織化学的技術を用いて、高悪性度子宮頸部疾患を示す試料のみ（即ちCINIIの試料以上）の特異的な陽性染色について、候補ポリドーマのアッセイを行う。陽性結果及び最小限のバックグラウンド染色を生じるポリドーマをさらなる解析用に選択する。

【0062】

個別の候補モノクローナル抗体を選択するために、陽性染色培養物は個別のクローンとして調製する。個別のクローンを単離する方法は、当分野で周知である。本明細書中で上述した腫瘍及び疾患パネル組織マイクロアレイを用いて、未精製の抗体を含む各クローンからの上清を、CINII、CINIII、扁平細胞癌、及び腺癌の試料の特異的な染色についてアッセイを行う。高悪性度子宮頸部疾患試料（即ちCINII以上）、他の細胞種（即ち正常及びCINI試料）の最小限の染色、及び僅かなバックグラウンドの陽性染色を示す候補抗体を、精製及びさらなる解析用に選択する。親和性吸着クロマトグラフィーによって抗体を精製する方法は当分野で周知である。

【0063】

高悪性度子宮頸部疾患試料の最大の特異的な染色及び最小限のバックグラウンド、即ち頸部細胞診断試料中の非特異的な染色を示す抗体を同定するために、上記の免疫組織化学に基づいたスクリーニング工程で単離及び精製した候補抗体を、本発明の免疫細胞化学的技術を用いてアッセイする。免疫細胞化学を行う例示的なプロトコルを実施例1及び2に提供する。

【0064】

具体的には、精製した目的抗体を用いて、統計的に有意な数のNIL（即ち侵襲性の病変なし）、ASCUS、LSIL、HSIL又は癌性の患者の頸部細胞診断試料のアッセイを行う。試料を本明細書中に記載の免疫細胞化学によって解析し、特定のバイオマーカーにおける陽性抗体染色に基づいて、高悪性度子宮頸部疾患に対して陽性、陰性、又は確定不能として分類する。各抗体について感度、特異性、陽性適中率、及び陰性適中率を計

算する。頸部細胞診断試料中で高悪性度子宮頸部疾患の最大の特異的染色を示し、最小限のバックグラウンド（即ち最大の信号対雑音比）を示す抗体を本発明用を選択する。

【0065】

適切な抗体の同定は、信号対雑音比の増加及びアッセイの臨床的有用性の増加をもたらす。用いるアッセイ様式及び試料の型は、適切な抗体の選択に重大な要素である。バイオマーカーに向けられた多くの抗体は、免疫細胞化学の様式において細胞診断調製物でも、又は免疫組織化学の様式においてホルマリンで固定したパラフィン包埋の試料でも、望ましい信号対雑音比を生じない。さらに、免疫組織化学の様式において最大の信号対雑音比を生じるバイオマーカー抗体は、免疫細胞化学のアッセイではうまく作動しない可能性がある。例えば、免疫細胞化学の様式において所望の染色レベルを生じる抗体は、免疫組織化学のアッセイにおいては適切な染色レベルを生じない可能性がある（データ示さず）。同様に、免疫組織化学のアッセイにおいて許容される信号対雑音比を生じる抗体は、免疫細胞化学試料の過剰染色を示す可能性がある（データ示さず）。したがって、抗体の選択にはアッセイ様式及び用いる最終的な試料の型の早期考慮が必要である。

10

【0066】

細胞診断系のアッセイ（即ち免疫細胞化学）は、組織の構造が免疫細胞化学の様式における染色の解釈を補助するために利用可能でないという範囲では、組織系のアッセイ（即ち免疫組織化学）とは異なる。例えば、Claudin1に向けられた抗体を用いて、軽い異形成又は扁平細胞癌に罹患している患者由来の試料で行った免疫組織化学のアッセイでは、結果により、Claudin1は軽い異形成試料の病変中で発現されたが（即ち薄茶色の染色）、癌の病変中で顕著に過剰発現された（即ち濃茶色の染色）が示された（図12）。同じClaudin1抗体を用いて免疫細胞化学のアッセイ様式で得られた結果は確定不能であった（図13）。異常細胞は、Claudin1抗体を用いて免疫組織化学のアッセイにおいて容易に検出可能であるが、本発明の免疫細胞化学のアッセイにおいてClaudin1の染色によって得られた結果は解釈がより困難であった。したがって、免疫組織化学の様式において適切なバイオマーカーは免疫細胞化学のアッセイにおいては適切でない可能性があり、したがって、本発明の好ましい実施形態に含まれない。

20

【0067】

さらに、細胞内におけるバイオマーカーの位置も、免疫細胞化学のアッセイにおける重要な検討事項である。核、細胞質、又は膜の染色パターンを示すバイオマーカーは形態学的に確認することができ、免疫組織化学的方法に適切である。しかし、細胞質及び膜の染色は、免疫細胞化学のアッセイにおける子宮頸部疾患の重大な形態学的特徴（例えば核対細胞質の比）の同定を困難にする。図15を参照されたい。対照的に、核中で発現され、核染色パターンを示すバイオマーカーは抗体染色の検出を容易にし、また、形態学的解析も可能にする。図15を参照されたい。したがって、一部の好ましい実施形態では、核中で選択的に発現されるバイオマーカーのみの本発明の免疫細胞化学のアッセイで用いる。

30

【0068】

当業者は、特定の抗体の信号対雑音比を最大にするために、抗体価及び検出の化学の最適化が必要であることを理解されよう。本発明のバイオマーカーに対する特異的結合を最大にし、非特異的結合（又は「バックグラウンド」）を最小にする抗体濃度を決定する。特定の実施形態では、頸部細胞診断調製物中で用いる適切な抗体価は、まず、ホルマリンで固定したパラフィン包埋の正常組織試料及び高悪性度子宮頸部疾患組織試料に対して様々な抗体希釈率を試験することによって決定する。最適な抗体濃度及び検出の化学の条件は、まず、ホルマリンで固定したパラフィン包埋の頸部組織試料について決定する。抗体価及び検出条件を最適化するためのアッセイの設計は標準的であり、十分に当業者の日常的な能力の範囲内にある。固定した組織試料の最適条件が決定された後に、同じ条件下でそれぞれの抗体を頸部細胞診断調製物に用いる。一部の抗体は、細胞診断試料中のバックグラウンド染色を低減する且つ/又は染色の特異性及び感度を増大するために、さらなる最適化を要する。

40

【0069】

50

さらに、当業者は、本発明の方法を実施するために用いる特定の抗体の濃度は、結合時間、バイオマーカータンパク質に対する抗体の特異性のレベル、及び人体試料の調製方法などの要素に応じて変化することを理解されよう。さらに、複数の抗体を用いた場合は、抗体を試料に施用する順序に応じて、即ち、カクテルとして同時に又は個別の抗体試薬として逐次的に施用することに応じて、所要の濃度が影響を受け得る。さらに、所望の信号対雑音比を生じるために、目的バイオマーカーへの抗体結合を可視化するために用いる検出の化学も最適化しなければならない。

【0070】

他の実施形態では、目的バイオマーカーの発現を核酸レベルで検出する。発現を評価するための核酸に基づいた技術は当分野で周知であり、例えば、人体試料中のバイオマーカー mRNA のレベルを決定することが含まれる。多くの発現検出方法では単離した RNA を用いる。mRNA の単離の選択に対抗しない任意の RNA 単離技術を、頸部細胞由来の RNA の精製に利用することができる（例えば、Ausubel et al., ed., (1987-1999) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York)を参照されたい）。さらに、例えば、Chomczynskiの単一ステップの RNA 単離工程（1989、米国特許第4,843,155号）などの当業者に周知の技術を用いて、多数の組織試料を容易に処理することができる。

【0071】

用語「プローブ」とは、具体的に意図する標的生体分子、例えばヌクレオチド転写物又はバイオマーカーによってコードされている若しくはそれに対応するタンパク質に選択的に結合する能力を有する任意の分子をいう。プローブは当業者によって合成するか、又は適切な生物学的調製物から誘導することができる。プローブは、標識するために具体的に設計し得る。プローブとして利用することができる分子の例には、それだけには限定されないが、RNA、DNA、タンパク質、抗体、及び有機分子が含まれる。

【0072】

単離した mRNA は、それだけには限定されないが、サザン若しくはノーザン分析、ポリメラーゼ連鎖反応分析及びプローブアレイを含めたハイブリダイゼーション又は増幅アッセイで用いることができる。mRNA レベルを検出する一方法は、単離した mRNA を、検出する遺伝子によってコードされている mRNA にハイブリダイズすることができる核酸分子（プローブ）と接触させることを含む。核酸プローブは、例えば、完全長の cDNA、又は、長さが少なくとも7、15、30、50、100、250若しくは500個のヌクレオチドであり、且つストリンジェントな条件下で mRNA 若しくは本発明のバイオマーカーをコードしているゲノム DNA に特異的にハイブリダイズするために十分なオリゴヌクレオチドなどの、その一部分であることができる。mRNA とプローブとのハイブリダイゼーションは、議題のバイオマーカーが発現されていることを示す。

【0073】

一実施形態では、例えば単離した mRNA をアガロースゲルに流し、mRNA をゲルからニトロセルロースなどの膜へと移すことによって、mRNA を固体表面上に固定してプローブと接触させる。代替実施形態では、例えばAffymetrix社製遺伝子チップアレイ中で、プローブを固体表面上に固定して mRNA をプローブと接触させる。当業者は、本発明のバイオマーカーによってコードされている mRNA のレベルの検出で用いる既知の mRNA 検出方法を容易に適応することができる。

【0074】

試料中のバイオマーカー mRNA のレベルを決定するための代替方法は、例えば、RT-PCR（実験の実施形態はMullis、1987、米国特許第4,683,202号に記載）、リガーゼ連鎖反応（Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189-193）、自立的配列複製（Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878）、転写増幅システム（Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177）、Q-βレプリカーゼ（Lizardi et al. (1988) Bio/Technology 6:1197）、ローリングサークル複製（Lizardi et al., 米国特許第5,854,033号）又は任意の他の核酸増

幅方法による核酸増幅工程、次いで、当業者に周知の技術を用いた増幅分子の検出を含む。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少ない数しか存在しない場合に、そのような分子の検出に特に有用である。本発明の特定の態様では、バイオマーカーの発現を定量的蛍光発生的 R T - P C R (即ち TaqMan (登録商標) システム) によって評価する。このような方法では、典型的には、目的バイオマーカーに特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの対を利用する。既知の配列に特異的なオリゴヌクレオチドプライマーの設計方法は当分野で周知である。

【 0 0 7 5 】

R N A のバイオマーカー発現レベルは、膜プロット (ノーザン、サザン、ドット等のハイブリダイゼーション解析で用いるものなど) 、或いはマイクロウェル、試料管、ゲル、ビーズ又は繊維 (若しくは結合した核酸を含む任意の固体担体) を用いて監視し得る。本明細書中に参考として組み込まれている、米国特許第 5 , 7 7 0 , 7 2 2 号、第 5 , 8 7 4 , 2 1 9 号、第 5 , 7 4 4 , 3 0 5 号、第 5 , 6 7 7 , 1 9 5 号及び第 5 , 4 4 5 , 9 3 4 号を参照されたい。また、バイオマーカーの発現の検出は、溶液中の核酸プローブの使用も含み得る。

10

【 0 0 7 6 】

本発明の一実施形態では、マイクロアレイを用いてバイオマーカーの発現を検出する。様々な実験間の再現性により、マイクロアレイはこの目的に特によく適している。D N A マイクロアレイは、多数の遺伝子の発現レベルを同時に測定する一方法を提供する。それぞれのアレイが、固体担体に付着した捕捉プローブの再現可能なパターンからなる。標識した R N A 又は D N A がアレイ上の相補的プローブにハイブリダイズし、その後、レーザー走査によって検出される。アレイ上のそれぞれのプローブのハイブリダイゼーション強度を決定し、相対遺伝子発現レベルを表す定量的な値に変換する。本明細書中に参考として組み込まれている、米国特許第 6 , 0 4 0 , 1 3 8 号、第 5 , 8 0 0 , 9 9 2 号及び第 6 , 0 2 0 , 1 3 5 号、第 6 , 0 3 3 , 8 6 0 号、及び第 6 , 3 4 4 , 3 1 6 号を参照されたい。試料中の多数の R N A の遺伝子発現プロファイルを決定するためには、高密度のオリゴヌクレオチドアレイが特に有用である。

20

【 0 0 7 7 】

機械的合成方法を用いてこのようなアレイを合成する技術は、例えば、すべての目的においてその全体で本明細書中に参考として組み込まれている米国特許第 5 , 3 8 4 , 2 6 1 号に記載されている。平面的なアレイ表面が好ましいが、アレイは事実上任意の形状の表面、又はさらには複数の表面上に作製し得る。アレイは、ビーズ、ゲル、高分子表面、光ファイバーなどの繊維、ガラス若しくは任意の他の適切な基材上のペプチド又は核酸であり得る。それぞれがすべての目的においてその全体で本明細書中に組み込まれている、米国特許第 5 , 7 7 0 , 3 5 8 号、第 5 , 7 8 9 , 1 6 2 号、第 5 , 7 0 8 , 1 5 3 号、第 6 , 0 4 0 , 1 9 3 号及び第 5 , 8 0 0 , 9 9 2 号を参照されたい。アレイは、診断又は包括的な装置の他の操作を可能にする様式でパッケージングし得る。例えば、本明細書中に参考として組み込まれている、米国特許第 5 , 8 5 6 , 1 7 4 号及び第 5 , 9 2 2 , 5 9 1 号を参照されたい。

30

【 0 0 7 8 】

一手法では、試料から単離した全 m R N A を標識した c R N A に変換し、その後、オリゴヌクレオチドアレイにハイブリダイズさせる。各試料を別々のアレイにハイブリダイズさせる。アレイ上及び試料中に存在する適切な対照を参照することによって、相対転写レベルを計算し得る。

40

【 0 0 7 9 】

本発明の方法を実施するためのキットをさらに提供する。「キット」とは、本発明のバイオマーカーの発現を特異的に検出するための少なくとも 1 つの試薬、例えば、抗体、核酸プローブなどを含む、任意の製造物 (例えばパッケージ又は容器) を意図する。キットを、本発明の方法を行うための単位として推進、流通、又は販売し得る。さらに、キットは、キット及びその使用方法を説明するパッケージ挿入物を含み得る。

50

【0080】

特定の実施形態では、本発明の免疫細胞化学的方法を実施するためのキットを提供する。このようなキットは、以下の実施例に記述するように、手動及び自動の免疫細胞化学的技術（例えば細胞染色）のどちらにも適合性がある。これらのキットは、目的バイオマーカーに向けられた少なくとも1つの抗体、バイオマーカーへの抗体結合を検出するための化学薬品、対比染色剤、及び、任意選択で、陽性染色細胞の同定を容易にするための青味剤を含む。抗原-抗体結合を検出する任意の化学薬品を本発明の実施で用い得る。一部の実施形態では、検出化学薬品は、二次抗体とコンジュゲートした標識したポリマーを含む。例えば、抗原-抗体結合部位で色素源の堆積を触媒する酵素とコンジュゲートした二次抗体を提供し得る。このような酵素及び抗体結合の検出にそれらを用いる技術は、当分野

10

で周知である。一実施形態では、キットは、HRP標識ポリマーとコンジュゲートした二次抗体を含む。コンジュゲートした酵素に適合性のある色素原（例えば、HRP標識二次抗体の場合はDAB）及び非特異的な染色を遮断するための過酸化水素などの溶液をさらに提供し得る。他の実施形態では、マウスモノクローナル抗体に結合するマウスプローブ試薬を用いて、次いで、マウスプローブ試薬に結合する、HRPとコンジュゲートしたデキストランポリマーを加えることによって、バイオマーカータンパク質への抗体結合を検出する。このような検出試薬は、例えばBiocare Medical社から市販されている。

【0081】

本発明のキットは、ペルオキシダーゼ遮断剤（例えば過酸化水素）、タンパク質遮断剤（例えば精製カゼイン）、及び対比染色剤（例えばヘマトキシリン）をさらに含み得る。

20

陽性染色細胞の検出を用いるために、キット中に青味剤（例えば水酸化アンモニウム又はTBS、pH7.4、Tween-20及びアジ化ナトリウムを含む）をさらに提供し得る。

【0082】

別の実施形態では、本発明の免疫細胞化学的キットは、少なくとも2つの明確に異なるバイオマーカーの発現を特異的に検出するための、少なくとも2つの試薬、例えば抗体をさらに含む。それぞれの抗体は、個別の試薬として、又は異なる目的バイオマーカーに向けられた抗体すべてを含む抗体カクテルとして、キット中に提供し得る。さらに、キットの試薬の任意のもの又はすべてを、密封容器などの外部環境からそれを保護する容器中で、提供し得る。本発明の方法を実施するための例示的なキットを以下の実施例8に記載する。

30

【0083】

活性並びに本発明に従って用いた試薬の正しい使用を確認するために、陽性及び/又は陰性対照をキットに含め得る。対照には、目的バイオマーカーの存在に関して陽性又は陰性のいずれかであることが知られている、組織切片、スライドガラス上に固定した細胞などの試料が含まれ得る。特定の実施形態では、陽性対照はSiHa細胞を含む。これは、高三倍体であり、HPV-16感染症に関して陽性であり、したがって、高悪性度頸部の病状におけるバイオマーカーの過剰発現に関して陽性対照として役割を果たす、ヒト頸部扁平上皮癌細胞系である。SiHa対照細胞は、本発明のキット中に調製したスライド又はスライドの調製に適合性のある細胞懸濁液として提供し得る。対照の設計及び使用は標準的であり、十分に当業者の日常的な能力の範囲内にある。

40

【0084】

他の実施形態では、バイオマーカーの過剰発現を核酸レベルで検出することを含む、高悪性度の頸部を同定するためのキットをさらに提供する。このようなキットは、例えば、バイオマーカー核酸若しくはその断片と特異的に結合する少なくとも1つの核酸プローブを含む。特定の実施形態では、キットは、明確に異なるバイオマーカー核酸とハイブリダイズする少なくとも2つの核酸プローブを含む。

【0085】

一部の実施形態では、本発明の方法は、形態学的特徴を解析する従来の細胞診断技術と組み合わせて用いることができる。例えば、従来方法からのすべての形態学的情報が保存されるように、本発明の免疫細胞化学的な技術を従来のPap染色と組み合わせることが

50

できる。このようにして、バイオマーカーの検出により P a p スメア試験の高い偽陰性率を下げることができ、また、集団自動スクリーニングが容易になり得る。特定の実施形態では、本明細書中に上記で開示した免疫細胞化学的方法を、実施例 6 ~ 7 で以下に記述するように、単一の方法で従来の P a p 染色と組み合わせる。免疫細胞化学及び P a p 染色の複合方法により、高悪性度子宮頸部疾患において選択的に過剰発現されるバイオマーカー及び細胞形態学をどちらも単一の試料（例えば頸部細胞単層を含む顕微鏡スライド）中で可視化することが可能となる。免疫細胞化学及び P a p 染色の複合方法は、特に従来の P a p 試験によって正常、L S I L、又は A S C U S と誤分類された症例において、高悪性度子宮頸部疾患のより正確な同定及び診断を可能にし得る。バイオマーカーの過剰発現及び細胞形態学をどちらも単一の方法内で解析することは、子宮頸癌の一次スクリーニング方法として P a p スメアに置き換えることができる可能性がある。

10

【 0 0 8 6 】

当業者は、免疫細胞化学出力（例えば色素原の染色）と P a p 染色との間で十分な対比が得られるように、この複合方法の染色パラメータ（例えば、インキュベーション時間、洗浄条件、色素原 / 染色剤の濃度など）を最適化する必要があることを理解されよう。染色パラメータを最適化するためのアッセイの設計は標準的であり、十分に当業者の日常的な能力の範囲内にある。また、免疫細胞化学及び P a p 染色の複合方法を行うためのキットも本発明によって包含される。このようなキットは、本明細書中に上述するように、免疫細胞化学に必要な試薬、並びに従来の P a p 染色用の試薬、特に EA50 及び Orange G を含む。

20

【 0 0 8 7 】

当業者は、本発明の方法の任意の若しくはすべてのステップを、人手によって実行する、又は自動的な様式で行うことができることを理解されよう。したがって、人体試料の調製、試料の染色、及びバイオマーカーの発現の検出のステップは自動であり得る。

【 0 0 8 8 】

以下の実施例は例示目的で提供し、限定するものではない。

【 実施例 1 】

【 0 0 8 9 】

免疫細胞化学を用いたバイオマーカーの過剰発現の検出
スライドの調製及び前処理

30

患者の頸部試料を採取し、SurePath（商標）採取バイアル（TriPath Imaging, Inc.社製）に入れた。頸部細胞を液体培地から採取し、PrepStain（商標）スライドプロセッサシステム（TriPath Imaging, Inc.社製）を用いてスライドガラス上に薄層として堆積させた。調製したスライドをすぐに前処理緩衝液（1%の R A M）に移し、45 分間 95 で加熱した。スライドを室温まで冷却し、T B S（トリス緩衝生理食塩水、tris buffered saline）で3回すすいだ（1回のすすぎあたり2分間）。

【 0 0 9 0 】

手動免疫細胞化学

非特異的なバックグラウンド染色を防ぐために、染色手順中にスライドを乾燥させない。さらに、非特異的な染色を遮断するために、過酸化水素をスライドに5分間施用し、次いで T B S ですすいだ。M C M 6 に向けられた抗体をスライドに1時間室温で施用した。M C M 6 抗体とともにインキュベーションを行ったのち、スライドを T B S で3回、1回の洗浄あたり2分間洗浄した。Dako社製 Envision+H R P 標識ポリマー二次抗体をスライドに30分間室温で施用し、次いで T B S ですすいだ。H R P 基質色素原 D A B を10分間施用し、その後、スライドを5分間水ですすいだ。それぞれのスライドでヘマトキシリンを用いて対比染色を行い、その後、透明になるまで水ですすいだ。対比染色ののち、スライドを水酸化アンモニウムに10秒間浸し、その後、水で1分間すすいだ。

40

【 0 0 9 1 】

スライドを95%のエタノールに1分間浸し、その後無水エタノールにさらに1分間浸すことによって、試料を脱水した。キシレンで3回、1回のすすぎあたり1分間すすぐこ

50

とによって、スライドを清澄にした。その後、永久封入剤を用いてスライドにカバーガラスを乗せ、35℃で乾燥するまでインキュベーションを行った。明視野顕微鏡を用いて陽性染色細胞を可視化した。

【0092】

自動免疫細胞化学

Dako社製Autostainer Universal Staining Systemを製造者の指示書に従ってプログラムし、上述の手動免疫細胞化学に必要な染色試薬及び対比染色試薬を機械に載せた。調製した前処理したスライドをAutostainerに載せ、プログラムを実行した。実行の終わりにスライドを取り出し、水で5分間すすいだ。スライドを脱水し、清澄にし、カバーガラスを乗せ、上述のように解析した。

10

【実施例2】

【0093】

臨床的試料中のバイオマーカーの検出

様々な診断を示している約180個の患者の頸部細胞診断試料を採取した。これらの患者において癌細胞若しくは高悪性度疾患を示す病変が存在すること又は存在しないことは、膣頸管検査によって事前に確認した。以下の表は、この研究で解析したそれぞれの診断群内の試料数、及び膣頸管検査の所見の説明（例えば高悪性度病変が存在すること又は存在しないこと）を示す。

【0094】

表1：解析した標本

診断	計数	説明
NIL	72	HPV陰性
ASC-US	26	26個が病変なし 0個が病変又は高リスクHPVに罹患
LSIL	48	42個が高悪性度病変に関して陰性 6個が高悪性度病変に関して陽性
HSIL	25	
癌	10	扁平細胞癌及び腺癌

20

30

【0095】

試料は、高悪性度子宮頸部疾患を同定するために免疫細胞化学的方法によって解析した。6個の目的バイオマーカーの過剰発現を検出するために抗体、即ちMCM2、MCM6、MCM7、p21^{waf1}、サイクリンE、及びTopo2Aを用いた。アッセイ対照にはMCM2、MCM6、MCM7、p21^{waf1}、サイクリンE、Topo2Aが含まれ、マウスIgG陰性をSiHa細胞系で実行した。また、試料を従来のPap染色技術によっても解析した。

【0096】

スライドの調製

各試料を保管庫から取り出し、室温にした。6mlのTriPath社製CytoRich（登録商標）保存料を各バイアルに加え、バイアルをボルテックス攪拌した。試料をTriPath社製PrepMate（登録商標）自動プロセッサで処理し、バイアル中に残った流体をすべて遠心管に移した。試料を2分間200×gで遠心分離し、上清を吸引した。その後、試料を10分間800×gで遠心分離し、上清を傾瀉した。試料管をTriPath社製PrepStain（登録商標）システムに載せ、システムソフトウェア（バージョン1.1；Transfer Only）を実行した。患者の試料それぞれについて8個のスライドを調製し、Pap染色及び免疫細胞化学的方法で用いる前に、95%のエタノール中で少なくとも24時間且つ2週間未満、保存した。

40

50

【 0 0 9 7 】

P a p 染色方法

調製したスライドを 9 5 % のエタノールで 3 0 秒間インキュベーションし、その後、水でさらに 3 0 秒間すすいだ。ヘマトキシリンをスライドに 6 分間施用した。スライドを水で 1 分間、酸性水で 2 秒間、及び水で 3 0 秒間すすいだ。青味剤（水酸化アンモニウム）を 3 0 秒間施用し、スライドをまず水で、その後 9 5 % のエタノールで、それぞれ 3 0 秒間ずつすすいだ。EA 50 及び Orange G（Autocyte（登録商標））を 6 分間施用した。スライドを 9 5 % のエタノールで 2 回、1 0 0 % のエタノールで 3 回、及びキシレンで 3 回、1 回のすすぎあたり 3 0 秒間すすいだ。

【 0 0 9 8 】

その後、Acrytol 封入剤を用いてスライドにカバーガラスを乗せ、3 5 で乾燥するまでインキュベーションを行った。試料は病理学者が明視野顕微鏡を用いることによって検査した。

10

【 0 0 9 9 】

免疫細胞化学的方法

調製したスライドを 9 5 % のエタノールから取り出し、脱イオン水で約 1 分間すすいだ。スライドを 9 5 に予熱した 1 × Target Retrieval Solution p H 6 . 0（DAKO 社製 S1699）/ d H 2 O 浴に入れ、スチーマーに 2 5 分間入れた。試料を 2 0 分間室温で冷却させ、脱イオン水でよくすすぎ、T B S に入れた。本質的に実施例 1「自動免疫細胞化学」に上述したように、前処理したスライドをバイオマーカーの発現について染色した。M C M 2（1：2 0 0）、M C M 7（1：2 5）、p 2 1 w a f 1（1：1 0 0）、及びサイルシン E（1：1 0 0）に向けられた市販の抗体を指示したように希釈し、バイオマーカーの発現を検出するために用いた。実施例 4 に記載のポリドーマスクリーニングによって同定した、精製した M C M 6 抗体を 1：6 0 0 0 の希釈率で用いた。

20

【 0 1 0 0 】

スライドの解釈

それぞれのスライドは細胞検査技師及び病理学者がスクリーニング並びに検査した。試料は、以下のパラメータに従って、高悪性度子宮頸部疾患に対して陽性、陰性、又は確定不能として分類した：

- ・ 非細胞性の人工産物及び茶色に染色された炎症細胞（D A B）は無視した。
- ・ 成熟した正常に見える扁平細胞及び正常に見える腺細胞は、D A B で染色した場合に陽性として計数しなかった。
- ・ 扁平異形成細胞は異常細胞とともに陽性とみなした。
- ・ 1 . 5 未満の染色強度は陰性とみなした。
- ・ 相異した結果はスライドの検査を合わせることによって解決した。

30

【 0 1 0 1 】

免疫細胞化学的結果を、膣頸管検査によって事前に得た結果と比較した。その後、それぞれのスライドに真陽性（T P）、真陰性（T N）、偽陽性（F P）、偽陰性（F N）、又は確定不能の最終結果を与えた。各バイオマーカーの感度、特異性、陽性適中率、及び陰性適中率を計算した。

40

【 0 1 0 2 】

結果

各バイオマーカーの結果を以下に要約する。

【 0 1 0 3 】

表 2 : MCM 2

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	71	1	72
ASC-US (病変なし)	0	0	0	25	1	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	7	0	31	4	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	7	0	1	0	2	10
	34	7	5	127	8	181

感度 0.8718

特異性 0.9478

PPV 0.8293

NPV 0.9621

10

【 0 1 0 4 】

表 3 : MCM 6

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	22	1	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	14	0	24	4	42
LSIL (HSIL)	3	0	2	0	1	6
HSIL	22	0	0	0	3	25
癌	10	0	0	0	0	10
	35	17	2	114	13	181

感度 0.9459

特異性 0.8702

PPV 0.6731

NPV 0.9828

20

30

【 0 1 0 5 】

表 4 : MCM 7

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	12	0	28	2	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	14	3	116	11	181

感度 0.9250

特異性 0.8923

PPV 0.7255

NPV 0.9748

40

50

【 0 1 0 6 】

表 5 : サイクリン E

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	72	0	72
ASC-US (病変なし)	0	0	0	26	0	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	3	0	35	4	42
LSIL (HSIL)	2	0	4	0	0	6
HSIL	15	0	4	0	6	25
癌	7	0	2	0	1	10
	24	3	10	133	11	181

感度 0.7059

特異性 0.9779

PPV 0.8889

NPV 0.9301

【 0 1 0 7 】

表 6 : p 2 1^{waf1}

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	61	9	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	22	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	12	0	23	7	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	21	0	1	0	3	25
癌	7	0	2	0	1	10
	31	15	6	106	23	181

感度 0.8378

特異性 0.8760

PPV 0.6739

NPV 0.9464

【 0 1 0 8 】

10

20

30

表7：TOPO2A

	TP	FP	FN	TN	確定不能	合計
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	24	1	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	4	0	27	11	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	21	0	1	0	3	25
癌	9	0	0	0	1	10
	33	5	4	119	20	181

感度 0.8919

特異性 0.9597

PPV 0.8684

NPV 0.9675

10

【0109】

本発明の免疫細胞化学的方法を用いて、約180件の症例を、高悪性度子宮頸部疾患の存在について解析した。その数のうち、MCMバイオマーカーが4%～7%の範囲の確定不能率を生じた。さらに、MCM2は95%の特異性及び87%の感度を示した。MCM6及びMCM7バイオマーカーは、匹敵する95%及び93%の感度の結果をそれぞれ生じた。これら2つのバイオマーカーの特異性は87%～89%の範囲であった。

20

【0110】

サイクリンEが最も高い特異性値98%を生じた。確定不能率は6%であったが、感度は71%しかなかった。p21^{waf1}の確定不能率は試験したすべてのマーカーの中で最も高く、13%であった。p21^{waf1}は84%の感度及び88%の特異性を生じた。バイオマーカーTopo2Aでは96%の特異性が観察された。Topo2Aの確定不能率11%であり、感度は89%であった。

【実施例3】

30

【0111】

抗体カクテルを用いた臨床的試料中のバイオマーカーの検出

高悪性度子宮頸部疾患を同定するために、約180個の膣頸管検査で確認した頸部細胞診断試料を免疫細胞化学的方法によって解析した。各試料を複数の目的バイオマーカーの発現について解析した。具体的には、MCM2、MCM6、MCM7、p21^{waf1}、サイクリンE、及びTopo2Aに向けられた抗体の様々な組合せを、高悪性度子宮頸部疾患を検出するその能力について解析した。これらの試料は、実施例2に記載の免疫細胞化学的方法及びスライド解釈指針を用いて、複数の目的バイオマーカーの発現について評価した。

【0112】

40

免疫細胞化学的結果を、膣頸管検査によって事前に得た結果と比較した。その後、それぞれのスライドに真陽性(TP)、真陰性(TN)、偽陽性(FP)、偽陰性(FN)、又は確定不能の最終結果を与えた。各バイオマーカーの感度、特異性、陽性適中率、及び陰性適中率を計算した。

【0113】

結果

各バイオマーカーの結果を以下に要約する。

【0114】

表 8 : MCM 2 及び MCM 7

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	66	6	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	25	4	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	15	3	111	14	181

感度 0.9268

特異性 0.8810

PPV 0.7170

NPV 0.9737

10

【 0 1 1 5 】

表 9 : MCM 6 及び MCM 7

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	65	7	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	16	0	23	3	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	2	109	13	181

感度 0.9500

特異性 0.8516

PPV 0.6667

NPV 0.9820

20

30

【 0 1 1 6 】

表 10 : MCM 7 及び TOPO 2 A

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	12	0	29	1	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	20	0	2	0	3	25
癌	8	0	0	0	2	10
	32	14	4	114	17	181

感度 0.8889

特異性 0.8906

PPV 0.6957

NPV 0.9661

40

50

【 0 1 1 7 】

表 1 1 : MCM7 及びサイクリンE

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	12	0	28	2	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	14	3	116	10	181

感度 0.9268

特異性 0.8923

PPV 0.7308

NPV 0.9748

10

【 0 1 1 8 】

表 1 2 : MCM7 及びp21waf1

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	20	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	14	0	21	7	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	19	3	98	24	181

感度 0.9250

特異性 0.8376

PPV 0.6607

NPV 0.9703

20

30

【 0 1 1 9 】

表 1 3 : MCM 2 及び MCM 6

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	17	0	21	4	42
LSIL (HSIL)	3	0	2	0	1	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	37	20	2	109	13	181

感度 0.9487

特異性 0.8450

PPV 0.6491

NPV 0.9820

【 0 1 2 0 】

表 1 4 : MCM 2 及び TOPOIIA

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	23	2	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	8	4	18	12	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	9	7	108	20	181

感度 0.8409

特異性 0.9231

PPV 0.8043

NPV 0.9391

【 0 1 2 1 】

10

20

30

表 1 5 : MCM2 及びサイクリン E

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	71	1	72
ASC-US (病変なし)	0	0	0	25	1	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	9	0	27	6	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	8	0	2	0	0	10
	35	9	6	123	8	181

感度 0.8537

特異性 0.9318

PPV 0.7955

NPV 0.9535

10

【 0 1 2 2 】

表 1 6 : MCM2 及び p 2 1 w a f 1

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	60	10	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	21	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	1	0	0	10
	36	16	5	102	22	181

感度 0.8780

特異性 0.8644

PPV 0.6923

NPV 0.9533

20

30

【 0 1 2 3 】

表 17 : T O P O 2 A 及びサイクリン E

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	24	1	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	5	0	27	10	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	2	25
癌	9	0	0	0	1	10
	34	6	4	119	18	181

感度 0.8947

特異性 0.9520

PPV 0.8500

NPV 0.9675

10

【 0 1 2 4 】

表 18 : T O P O 2 A 及び p 2 1 w a f 1

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	58	12	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	19	10	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	17	3	98	25	181

感度 0.9268

特異性 0.8522

PPV 0.6909

NPV 0.9703

20

30

【 0 1 2 5 】

表 19 : p 2 1 w a f 1 及びサイクリン E

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	61	9	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	22	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	12	0	23	7	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	2	25
癌	8	0	1	0	1	10
	33	15	5	106	22	181

感度 0.8684

特異性 0.8760

PPV 0.6875

NPV 0.9550

40

50

【 0 1 2 6 】

表 2 0 : MCM 2、MCM 6、及びMCM 7

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	20	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	17	0	21	4	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	20	2	105	16	181

感度 0.9500

特異性 0.8400

PPV 0.6552

NPV 0.9813

10

【 0 1 2 7 】

表 2 1 : MCM 2、MCM 7、及びTOPO2 A

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	15	2	104	21	181

感度 0.9512

特異性 0.8739

PPV 0.7222

NPV 0.9811

20

30

【 0 1 2 8 】

表 2 2 : MCM 6、MCM 7、及び T O P O 2 A

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	16	0	20	6	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	104	17	181

感度 0.9512

特異性 0.8455

PPV 0.6724

NPV 0.9811

10

【 0 1 2 9 】

表 2 3 : MCM 6、MCM 7、及びサイクリン E

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	65	7	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	21	2	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	16	0	23	3	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	2	109	13	181

感度 0.9500

特異性 0.8516

PPV 0.6667

NPV 0.9820

20

30

【 0 1 3 0 】

表 2 4 : MCM 2、MCM 7、及びサイクリン E

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	66	6	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	25	4	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	15	3	111	14	181

感度 0.9268

特異性 0.8810

PPV 0.7170

NPV 0.9737

40

50

【 0 1 3 1 】

表 2 5 : MCM 2、MCM 7、及び p 2 1 w a f 1

	TP	FP	FN	TN	能 確定不	合計
NIL	0	2	0	56	14	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	18	5	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	14	0	20	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	94	27	181

感度 0.9268

特異性 0.8319

PPV 0.6667

NPV 0.9691

10

【 0 1 3 2 】

表 2 6 : MCM 2、TOPOIIA及びサイクリンE

	TP	FP	FN	TN	能 確定不	合計
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	23	2	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	9	0	22	11	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	10	3	112	19	181

20

感度	0.9250
特異性	0.9180
PPV	0.7872
NPV	0.9739

30

【 0 1 3 3 】

表 2 7 : MCM 2、サイクリンE及びp 2 1 w a f 1

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	60	10	72
ASC-US (病変なし)	0	1	0	21	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	1	0	0	10
	36	16	5	102	22	181

10

感度	0.8780
特異性	0.8644
PPV	0.6923
NPV	0.9533

【 0 1 3 4 】

表 2 8 : MCM 2、TOPOIIA及びp 2 1 w a f 1

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	18	11	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	17	3	95	28	181

20

感度	0.9268
特異性	0.8482
PPV	0.6909
NPV	0.9694

30

【 0 1 3 5 】

表 29 : MCM7、TOPO2A、及びサイクリンE

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	21	3	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	12	0	23	7	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	14	2	108	18	181

感度 0.9512

特異性 0.8852

PPV 0.7358

NPV 0.9818

10

【 0 1 3 6 】

表 30 : MCM7、p21waf1、及びサイクリンE

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	19	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	14	0	21	7	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	97	24	181

感度 0.9268

特異性 0.8362

PPV 0.6667

NPV 0.9700

20

30

【 0 1 3 7 】

表 31 : MCM7、p21waf1、及びTOPO2A

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	54	16	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	19	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	14	0	18	10	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	91	30	181

感度 0.9512

特異性 0.8273

PPV 0.6724

NPV 0.9785

40

50

【 0 1 3 8 】

表 3 2 : MCM 2、MCM 7、サイクリン E、及び p 2 1 w a f 1

	TP	FP	FN	TN	確定不能	合計
NIL	0	2	0	56	14	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	18	5	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	14	0	20	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	94	27	181

感度 0.9268

特異性 0.8319

PPV 0.6667

NPV 0.9691

10

【 0 1 3 9 】

表 3 3 : MCM 2、MCM 7、サイクリン E 及び T O P O I I A

	TP	FP	FN	TN	確定不能	合計
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US (病変なし)	0	2	0	20	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	15	2	104	21	181

感度 0.9512

特異性 0.8739

PPV 0.7222

NPV 0.9811

20

30

【 0 1 4 0 】

表 3 4 : MCM 2、MCM 7、サイクリン E、p 2 1 w a f 1、及び TOP

O 2 A

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	53	17	72
ASC-US (病変なし)	0	3	0	18	5	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	14	0	18	10	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	89	32	181

感度 0.9512

特異性 0.8241

PPV 0.6724

NPV 0.9780

10

【 0 1 4 1 】

表 3 5 : MCM 2、MCM 6、MCM 7、TOPO 2 A、サイクリン E、

及び p 2 1 w a f 1

	TP	FP	FN	TN	確定不 能	合計
NIL	0	2	0	52	18	72
ASC-US (病変なし)	0	4	0	18	4	26
ASC-US (病変)	0	0	0	0	0	0
LSIL (HSILなし)	0	18	0	16	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	24	2	86	30	181

感度 0.9512

特異性 0.7818

PPV 0.6190

NPV 0.9773

20

30

【 0 1 4 2 】

上述のように、28種の抗体カクテルについてデータを蓄積した。バイオマーカーの発現は、2、3、4、5個、又はさらには6個の目的バイオマーカーすべてに向けられた抗体を含むカクテルを用いて解析した。28種のうち21種の抗体カクテルが92%を超える感度を示した。28種のうち4種のカクテルが90%を超える特異性を生じ、最も低い値は78%であった。最も高い値は、MCM 2、TOPO 2 A及びサイクリン Eの組合せで得られた。このカクテルは、93%の感度及び92%の特異性を与えた。少なくとも3つのバイオマーカーの組合せにより90%を超える感度が与えられるはずであると考えられる。アッセイの調節により、アッセイの感度及び特異性がさらに増加することが理解されよう。

40

【 実施例 4 】

【 0 1 4 3 】

抗体カクテルを用いたバイオマーカーの発現の検出

サイクリン E、MCM 2、MCM 6、MCM 7、p 2 1 w a f 1、及び TOPO 2 a に向けられた抗体の様々な組合せを用いて抗体カクテルを調製した。各カクテルの組成を以

50

下の表に記載する。

【 0 1 4 4 】

表 3 6 : 抗体カクテルの組成

カクテルのID	バイオマーカー
カクテル1	サイクリンE、MCM2、MCM7
カクテル2	サイクリンE、MCM6、MCM7
カクテル3	サイクリンE、MCM7、p21waf1
カクテル4	サイクリンE、MCM7、TOPO2a
カクテル5	MCM2、MCM7、p21waf1
カクテル6	MCM6、MCM7、p21waf1
カクテル7	MCM7、p21waf1、TOPO2a
カクテル8	MCM2、MCM7、TOPO2a
カクテル9	MCM6、MCM7、TOPO2a
カクテル10	MCM2、MCM6、MCM7
カクテル11	サイクリンE、MCM2、MCM6、MCM7、p21waf1、TOPO2a
カクテル12	サイクリンE、MCM2、MCM7、p21waf1
カクテル13	MCM2及びMCM7
カクテル14	MCM7及びp21waf1
カクテル15	MCM7及びサイクリンE
カクテル16	MCM2及びp21waf1
カクテル17	サイクリンE及びp21waf1
カクテル18	MCM2及びサイクリンE
カクテル19	MCM7及びTOPO2a
カクテル20	MCM2及びTOPO2a
カクテル21	サイクリンE及びTOPO2a
カクテル22	p21waf1及びTOPO2a

10

20

30

【 0 1 4 5 】

H S I L の症例 (H S I L プール) 及び N I L の症例 (N I L プール) をプールすることによって、2組の頸部細胞診断標本を調製した。その後、それぞれの抗体カクテルを H S I L プール及び N I L プールで試験した。また、バイオマーカー抗体も対照として個別に試験した。実施例 2 に記載のようにスライドの調製及び自動免疫細胞化学を実施した。

【 0 1 4 6 】

スライドは細胞検査技師及び病理学者がスクリーニング並びに検査した。高悪性度子宮頸部疾患を示す細胞の特異的染色、腺細胞の染色、細菌の交差反応性、及び細胞染色の位置は、すべてスクリーニング工程の間に記録した変数である。

【 0 1 4 7 】

免疫細胞化学的結果により、単一のバイオマーカーの検出で得られた結果と比較した場合に、バイオマーカー抗体カクテルで、H S I L プールにおいて高悪性度子宮頸部疾患を示す細胞の染色の増加が示された。さらに、カクテル中の抗体数を 2 から 3、4 又は 6 に増加した場合に、バックグラウンドに有意な増加はない。さらに、N I L プールで試験した場合に、様々な抗体カクテルはバックグラウンド染色の増加を示さなかった。

40

【 実施例 5 】

【 0 1 4 8 】

免疫細胞化学を用いた頸部試料中のバイオマーカーの過剰発現の検出
スライドの調製及び前処理

患者の頸部試料を実施例 1 に上述したように採取した。頸部細胞単層を含むスライドは

50

、AutoPrep（登録商標）システムによって、「prepのみ」モードを用いて調製した。調製したスライドはすぐに、最短1時間且つ最長72時間の間1×SureSlide（登録商標）前処理緩衝液（脱イオン水H₂O中の0.5%のラウレス-13-カルボン酸ナトリウム（Sandopan LS））中に入れた。前処理したスライドを、予熱なしで95℃のスチーマーに45分間入れた。スライドをスチーマーから取り出し、室温で20分間冷却し、その後、脱イオン水でよくすすいだ。スライドをTBS-T（TBS/Tween-20）で2回、1回のすすぎあたり2分間すすいだ。スライドを軽くたたいて過剰の緩衝液を除去し湿気のあるチャンバに入れた。下に記述するように、スライドを手動又は自動の免疫細胞化学に供した。

【0149】

10

手動免疫細胞化学

200μlのペルオキシダーゼ遮断剤（0.03%の過酸化水素）を、それぞれのスライドに、細胞堆積領域を覆うように5分間施用した。その後、スライドをTBS-Tで3回、1回のすすぎあたり2分間すすいだ。過剰の緩衝液を取り除き、スライドを湿気のあるチャンバに入れた。200μlのタンパク質遮断剤（精製カゼイン及び界面活性剤）をそれぞれのスライドに施用し、5分間インキュベーションを行った。過剰のタンパク質遮断剤を取り除いたあと、スライドを湿気のあるチャンバに入れた。

【0150】

MCM2に向けられた2つのマウス抗ヒト抗体（0.39mg/mLのクローン27C5.6、1:800の希釈率；0.918mg/mLのクローン26H6.19、1:10,000の希釈率）及び3つ目のTopo2Aに特異的なマウス抗ヒト抗体（100μg/mLのクローンSWT3D1、1:10,000の希釈率）を含む200μlの一次モノクローナル抗体カクテルを、それぞれのスライドに、細胞堆積領域を完全に覆うように施用した。スライドを30分間インキュベーションし、その後、TBS-Tで3回、1回のすすぎあたり2分間すすいだ。過剰の緩衝液を取り除き、スライドを湿気のあるチャンバに戻した。マウスモノクローナル抗体に結合する200μlのマウスプローブ試薬を上記のように20分間施用した。スライドをTBS-Tで3回、1回のすすぎあたり2分間すすいだ。過剰の緩衝液を取り除き、スライドを湿気のあるチャンバに再度入れた。

20

【0151】

HRPとコンジュゲートしたデキストランポリマー及びマウスプローブ試薬に結合する二次ヤギ抗マウス抗体を含む200μlのポリマー試薬を上記のように20分間施用し、その後、スライドをTBS-Tで3回、1回のすすぎあたり2分間すすいだ。過剰の緩衝液を取り除いたあと、スライドを湿気のあるチャンバに戻した。200μlのDAB基質-クロムゲン溶液を上記のように5分間施用した。スライドを脱イオン水で5分間すすぎ、その後、TBS-Tで2分間、緩衝液を1回交換してすすいだ。過剰の緩衝液を取り除き、前述と同様にスライドを湿気のあるチャンバに入れた。200μlのヘマトキシリンを1分間加え、次いで脱イオン水で3回、1回のすすぎあたり2分間すすいだ。過剰の脱イオン水を取り除き、スライドを湿気のあるチャンバに入れた。200μlの青味剤（即ち、TBS、tween-20でpH7.4及びアジ化ナトリウム）をそれぞれのスライドに1分間施用した。その後、スライドを、TBS-Tを1回交換して、且つ脱イオン水を1回交換して、2分間すすいだ。その後、スライドを脱水し、清澄にし、カバーガラスを乗せ、実施例1及び2に記載のように解析した。

30

40

【0152】

自動免疫細胞化学

自動染色機は、以下の一連のステップを含むように製造者の指示書に従ってプログラミングした：

- 緩衝液を用いた2回のすすぎ（TBS-T）
- 5分間のペルオキシダーゼ遮断
- 緩衝液を用いた2回のすすぎ（TBS-T）
- 5分間のタンパク質遮断、ブLOW（blow）

50

- e . 一次抗体カクテルを用いた 30 分間のインキュベーション
- f . 緩衝液を用いた 3 回のすすぎ (T B S T)
- g . マウスブロープ試薬を 20 分間
- h . 緩衝液を用いた 3 回のすすぎ (T B S T)
- i . ポリマー - H R P を 20 分間
- j . 緩衝液を用いた 3 回のすすぎ (T B S T)
- k . D A B (1 m l の緩衝液に 1 滴のクロマゲン) を 5 分間
- l . H ₂ O を用いた 3 回のすすぎ
- m . 緩衝液を用いた 2 回のすすぎ (T B S T)
- n . メイヤー (Mayer's) ヘマトキシリンを 1 分間
- o . H ₂ O を用いた 3 回のすすぎ
- p . 青味剤を 1 分間
- q . 緩衝液を用いた 1 回のすすぎ (T B S T)
- r . H ₂ O を用いた 1 回のすすぎ

10

【 0 1 5 3 】

必要な染色試薬及び対比染色試薬を機械に載せた。調製した前処理したスライドを自動染色機に載せ、上記プログラムを実行した。実行の終わりにスライドを取り出し、水道水で手短にすすいだ。スライドを脱水し、清澄にし、カバーガラスを乗せ、実施例 1 及び 2 に記載のように解析した。

20

【 0 1 5 4 】

表 3 7 : N I L の症例 (n = 4 5)

Papの結果		
NIL	その他	不十分
44	1(ASC-US)	0

ICCの結果		
陽性	陰性	不十分
0	44	1

30

【 0 1 5 5 】

表 3 8 : H S I L の症例 (n = 4 5)

Papの結果		
HSIL	その他	不十分
45	0	0

ICCの結果		
陽性	陰性	不十分
45	0	0

40

【 0 1 5 6 】

試験した 45 件の N I L の症例のうち、P a p 染色したスライドの検査により 1 件の A S C - U S の症例が明らかとなった。N I L 試料の免疫細胞化学 (I C C 、 immunocytochemistry) の結果は陰性であり、1 件の症例が評価に不十分であるとみなされた。H S I L の症例に関しては、45 件の症例のそれぞれが P a p 染色したスライドの検査に基づいて高悪性度子宮頸部疾患であると確認された。さらに、45 件の H S I L の症例は I C C アッセイにおいても陽性であった。陰性対照、即ち S i H a 細胞系対照に施用したユニバーサルマウス I g G 対照は、I C C アッセイにおいて陰性結果を生じた。陽性対照、即ち S i H a 細胞系対照に施用した一次抗体カクテルは、I C C アッセイにおいて陽性結果を生じた。

50

【実施例 6】

【0157】

免疫細胞化学及び P a p 染色の複合手順

患者の頸部試料を実施例 1 に上述したように採取した。頸部細胞単層を含むスライドを調製し、実施例 5 で指示したように前処理した。前処理したそれぞれのスライドを自動免疫細胞化学及び P a p 染色に供し、これにより、バイオマーカーの過剰発現及び細胞形態学をどちらも単一のスライドで可視化することが可能となった。

【0158】

自動免疫細胞化学

実施例 5 に上述したように、それぞれのスライドで自動免疫細胞化学を行った。染色プログラム終わりにスライドを自動染色機から取り出し、水道水で 3 ～ 5 分間すすいだ。その後、下に記述するように従来の P a p 染色方法に従ってそれぞれのスライドを染色した。

【0159】

P a p 染色方法

自動免疫細胞化学ののち、P a p 染色を用いてそれぞれのスライドをさらに染色した。まず、スライドを 95 % のエタノールで 30 秒間すすいだ。EA50 及び Orange G をスライドの半数に 3 分間施用し、残りのスライドに 6 分間施用した。その後、すべてのスライドを 95 % のエタノールで 2 回、100 % のエタノールで 3 回、及びキシレンで 3 回、1 回のすすぎあたり 30 秒間すすいだ。永久封入剤を用いてスライドにカバーガラスを乗せ、実施例 1 及び 2 に上述のように解析した。

【0160】

結果

5 件の N I L 及び 5 件の H S I L の症例のパネルのそれぞれを、P a p 染色方法において EA50 及び Orange G を用いた 3 分間又は 6 分間の染色に供した。結果では、3 分間及び 6 分間の染色プロトコルの間に最小限の差異しか示されなかった。3 分間の P a p 染色に供したスライドは、わずかに弱い染色を示した。さらに、P a p 対比染色では I C C 陽性染色 H S I L 細胞が容易に観察された。

【実施例 7】

【0161】

免疫細胞化学及び P a p 染色の複合手順 (P a p 染色の最適化)

免疫細胞化学的方法の色素原 (即ち D A B) 染色と P a p 染色のレベルとの間のを最大限にするために、実施例 6 に概要を示した免疫細胞化学及び P a p 染色の複合手順を改変して P a p 染色のパラメータを最適化した。

【0162】

スライドを調製し、前処理し、実施例 6 に上述したように自動免疫細胞化学に供した。その後、以下の改変を含む本質的に実施例 6 に記載の従来の P a p 染色を用いて、スライドを染色した。ハリス (Harris) 配合物及びマイヤーズ (Myers) 配合物を用いてヘマトキシリンを試験した。EA / Orange G を 3 分間又は 6 分間施用した。さらに、EA / Orange G を加えたあとに 95 % のエタノールを 3 回交換した。

【0163】

免疫細胞化学的染色に基づいてスライドを陽性、陰性、又は不十分と決定した。さらに、受信する (incoming) P a p 診断と比較するために、スライドを形態学的に評価した。

【0164】

10

20

30

40

結果

表 3 9 : 免疫細胞化学及び P a p 染色の複合方法の結果

受信するPap診断	ICCの結果	コメント
NIL n=7	陰性	すべての症例がNILと確認された。
LSIL n=6	陰性	6例のうち5例のLSILの症例がスライド上にLSIL細胞を有さなかった。これらの症例はNIL又はASC-USであった。
HSIL n=6	陽性	すべての症例がHSILと確認された。
癌 n=4	陽性	すべての症例が扁平細胞癌であった。

10

【 0 1 6 5 】

ICC及びPap染色の複合手順により、形態学的解析及びバイオマーカーの過剰発現の評価がどちらも可能となった。本方法をさらに最適化するためにはさらなる実験が必要であろう。

20

【 実施例 8 】

【 0 1 6 6 】

頸部試料中のバイオマーカーの過剰発現を検出するための免疫細胞化学的キット

I . 手順の原理

イムノサイトケミカル試験キットは、ルーチンのように調製した単層頸部標本の3ステップの免疫細胞化学的染色手順を完了するために必要な試薬を含む。モノクローナル抗体カクテルとともにインキュベーションを行ったのち、このキットでは、デキストラン技術に基づいたすぐに使用できる可視化試薬を用いる。この試薬は、二次ヤギ抗マウス抗体分子及びデキストランポリマー主鎖に連結した西洋ワサビペルオキシダーゼ分子からなる。続けて加えた色素原の酵素変換の結果、抗原（又は複数の抗原）の部位において可視反応生成物の形成がもたらされる。その後、ヘマトキシリンを用いて標本の対比染色を行い、青味剤を施用し、スライドにカバーガラスを乗せた。結果は光学顕微鏡を用いて解釈した。目的細胞が茶色に染色された場合に、頸部の高悪性度を示す陽性結果が得られる。

30

【 0 1 6 7 】

自動画像処理装置を用いて潜在的に陽性な細胞のギャラリーを作成し得る。その後、ギャラリーを検査して陽性結果又は陰性結果を決定することができる。

【 0 1 6 8 】

免疫細胞化学的試験のキットは、手動及び自動の染色のどちらにも適用可能である。

【 0 1 6 9 】

II . 提供する試薬

調製物1個あたり200 μ Lのすぐに使用できるマウスモノクローナルカクテルを用いて75個の単層調製物に十分な以下の材料を、免疫細胞化学的試験のキットに含めた：

40

【 0 1 7 0 】

表 4 0 : 免疫細胞化学的キットの構成成分

バイアル 番号	量	説明
1a	1×15 mL	ペルオキシダーゼ遮断剤:緩衝過酸化水素+安定化剤及び専用の構成成分
1b	1×15 mL	タンパク質遮断剤:精製カゼイン+保存料及び界面活性剤を含む改変PBS中のタンパク質の専用の組合せ
2	1×15 mL	マウス抗ヒト抗体カクテル:Tween 20を含むトリス緩衝溶液、pH 7.4中で供給する、すぐに使用できるモノクローナル抗体カクテル。0.39 mg/mLのMCM2 mAbクローン27 C5.6 (1:800の希釈率)、0.918mg/mLのMCM2 mAbクローン26H6.19 (1:10,000の希釈率)、100 µg/mLのTopo2a mAbクローンSWT3D1 (1:10,000の希釈率)、安定化タンパク質及び抗微生物剤を含む。
3a	1×15 mL	マウスプローブ試薬:マウスモノクローナル抗体に結合する
3b	1×15 mL	ポリマー試薬:マウスプローブ試薬に結合する、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートしたポリマー
4a	1×18 mL	DAB基質緩衝液:DAB色素原の調製に用いる基質緩衝液
4b	1×1 mL	DAB色素原:3,3'-ジアミノベンジジン色素原溶液
5	1×18 mL	ヘマトキシリン対比染色剤:水性メイヤーヘマトキシリン
6	1×18 mL	青味剤:Tween 20及び0.09%のNaN ₃ を含むトリス緩衝生理食塩水、pH 7.4

10

20

【 0 1 7 1 】

免疫細胞化学的方法を行うために必要であるがキット中で提供しなかった材料及び試薬は、以下のとおりである:

- ・ 吸収性拭取り材
- ・ S i H a 細胞系 (TriPath Imaging, Inc.社製)
- ・ 脱イオン水又は蒸留水
- ・ エタノール (9 5 % 及び 1 0 0 %)
- ・ ガラス製カバーガラス
- ・ 手袋
- ・ 湿気のあるチャンバ
- ・ 光学顕微鏡 (1 0 × 、 2 0 × 、 4 0 × 対物)
- ・ 封入剤
- ・ ピペット及びピペットチップ (2 0 µ l 、 2 0 0 µ l 及び 1 0 0 0 µ l の体積を届けることができる)
- ・ SureSlide調製緩衝液 (TriPath Imaging, Inc.社製) - 前処理緩衝液 (脱イオン水 H₂O 中の 0 . 5 % のラウレス - 1 3 - カルボン酸ナトリウム (Sandopan LS))
- ・ 染色用のビン又は槽
- ・ タイマー (1 ~ 6 0 分間隔が可能)
- ・ トリス緩衝生理食塩水 (T B S)
- ・ Tween 20
- ・ ユニバーサルマウス I g G 陰性対照
- ・ ボルテックス器
- ・ キシレン又はキシレン代用物
- ・ スチーマー / 水浴

30

40

【 0 1 7 2 】

50

III. 使用説明書

標本の調製

頸部試料の調製には以下のステップに従った：

- ・ 残存標本からのスライドの調製には、SurePath PrepStainシステム（商標）の操作指示書を参考にされたい。

- ・ SurePath（商標）バイアル中で 8 mL の SurePath（商標）保存液を残存試料（約 2 mL）に加える。希釈された試料を、標準技術を用いて PrepMate（商標）で、且つ GYN バージョン 1.1、スライドの調製を用いて PrepStain（商標）で処理する。

- ・ 調製したスライドをすぐに前処理緩衝液中に、免疫染色の前に最短 1 時間且つ最長 72 時間入れる。

- ・ 最適なキットの性能のために、エピトープの回収を用いなければならない。この手順は、調製したスライドを前処理緩衝液中に最短 1 時間、室温浸すこと、次いでスライドを前処理緩衝液中で 95℃ まで加熱することを含む。スライドを 95℃ で 15 分間保ち、室温で 20 分間冷却させた。所要の温度を維持できるキャリブレーションした水浴又は野菜スチーマーの使用が推奨される。標高の高い場所に位置する研究所では、所要の温度を維持するための最良の方法を決定すべきである。染色手順は、エピトープの回収及び冷却のあとすぐに開始する。記載した手順からの逸脱は結果に影響を与え得る。

10

【0173】

試薬の調製

染色の前に以下の試薬を調製した：

20

0.05% の Tween 20 を含む トリス緩衝生理食塩水（TBS-T、Tris Buffered Saline with 0.05% Tween 20）

- ・ 製造者の明細事項に従って TBS を調製する。
- ・ 最終濃度 0.05% まで Tween 20 を加える。
- ・ 1 週間以内に用いる場合は室温で保存する。
- ・ 未使用の溶液は 2～8℃ で 3 カ月間保存し得る。
- ・ 溶液は無色透明である。希釈した溶液の外見が濁っている場合は廃棄する。

【0174】

基質 - 色素原溶液（DAB）（5 個のスライドに十分な体積）

30

- ・ 1 mL の DAB 緩衝基質を試験管に移す。
- ・ 1 滴（20～30 μ L）の DAB + 色素原を加える。よく混合し、ピペットを用いてスライドに施用する。
- ・ 基質 - 色素原溶液は毎日新鮮なものを調製する。
- ・ 溶液中に沈殿物が発生する場合はどれも染色の品質に影響を与えない。

【0175】

IV. 染色プロトコル（室温、20～25℃で行った）

頸部細胞診断試料の免疫染色のために以下のステップを行った：

染色手順の注記

- ・ 使用者はこれらの指示を注意して読み、使用前にすべての構成成分を熟知すべきである。

40

- ・ すべての試薬は免疫染色前に室温（20～25℃）に平衡化した。すべてのインキュベーションは室温で行った。

- ・ 染色手順中にスライドを乾燥させない。乾燥した細胞調製物は非特異的な染色の増加を示し得る。気流に触れるスライドを覆う。長期のインキュベーションには、スライドを湿気のあるチャンバに入れるべきである。

【0176】

エピトープの回収

- ・ 調製したスライドを前処理緩衝液中に最短 1 時間且つ最長 72 時間入れる。
- ・ 15 分間 95℃ でインキュベーションを行う。
- ・ コプリンピン全体をスライドとともに水浴又はスチーマーから取り出し、スライド

50

を緩衝液中で20分間冷却させる。

- ・ スライドをd i H 2 Oですすぎ、T B S T 浴に移す。

【0177】

ペルオキシダーゼ遮断

- ・ 軽くたたいて過剰の緩衝液を除去する。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。
- ・ 200 μ L のペルオキシダーゼ遮断剤を施用して細胞堆積領域を覆う。
- ・ 5分間（ $\pm$ 1分）インキュベーションを行う。
- ・ スライドをT B S T で、3回交換して、2分間ずつすすぐ。

10

【0178】

タンパク質遮断

- ・ 軽くたたいて過剰の緩衝液を除去する。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。
- ・ 200 μ L のタンパク質遮断を施用して細胞堆積領域を完全に覆う。
- ・ 5分間（ $\pm$ 1分）インキュベーションを行う。
- ・ スライドをすすがない。

【0179】

一次抗体カクテル

- ・ 軽くたたいて過剰のタンパク質遮断を除去する。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。
- ・ 200 μ L の一次抗体カクテルを施用する（細胞堆積領域を完全に覆うため。
- ・ 30分間室温でインキュベーションを行う。
- ・ 洗浄ボトルを用いてそれぞれのスライドを個別にT B S T ですすぐ（流れを直接細胞堆積領域上に集中させない）。スライドをスライドラックに乗せる。
- ・ スライドをT B S T で、3回交換して、2分間ずつすすぐ。

20

【0180】

検出の化学

- ・ 軽くたたいて過剰の緩衝液を除去する。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。
- ・ 200 μ L のマウスプローブを施用して細胞堆積領域を完全に覆う。
- ・ 20分間（ $\pm$ 1分）インキュベーションを行う。
- ・ スライドをT B S T で、3回交換して、2分間ずつすすぐ。
- ・ 軽くたたいて過剰の緩衝液を除去する。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。

30

- ・ 200 μ L のポリマーを施用して細胞堆積領域を覆う。
- ・ 20分間（ $\pm$ 1分）インキュベーションを行う。
- ・ スライドをT B S T 浴で、3回交換して、2分間ずつすすぐ。
- ・ 軽くたたいて過剰の緩衝液を除去する。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。
- ・ 200 μ L のD A B 使用液を施用して細胞堆積領域を完全に覆う。
- ・ 5分間（ $\pm$ 1分）インキュベーションを行う。
- ・ スライドを5分間、d i H 2 O で5分間すすぐ。

40

【0181】

対比染色

50

- ・ スライドを T B S T で、1 回交換して 2 分間すすぐ。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。
- ・ 2 0 0 μ L のヘマトキシリンを施用して細胞堆積領域を完全に覆う。
- ・ 1 分間（ $\pm$ 1 0 秒）インキュベーションを行う。
- ・ スライドを 3 分間、ランニング H 2 O ですすぐ。
- ・ スライドを準備した湿性チャンバ（水で湿らせたペーパータオル又はガーゼで満たした）に入れる。
- ・ 2 0 0 μ L の青味剤を 1 分間（ $\pm$ 1 0 秒）施用することによってスライドを青色にする。
- ・ ランニング水を用いた 1 分間のすすぎを繰り返す。

10

【 0 1 8 2 】

封入

- ・ スライドを 9 5 % のエタノールに浸す（1 分間又は 2 5 回漬ける）。
- ・ スライドを無水アルコールに浸す（4 回交換、1 分間ずつ又は 2 5 回ずつ漬ける）。

- ・ キシレンで清澄にする（3 回交換、1 分間ずつ又は 2 5 回ずつ漬ける）。
- ・ ガラス製カバーガラスを用いて、非水性の永久封入剤でスライドガラスを覆う。

【 0 1 8 3 】

V . 品質管理

20

本実施例中に記載の免疫細胞化学的キットを用いる際に以下の品質管理上の問題点を考慮した：

【 0 1 8 4 】

結果のばらつきは、多くの場合標本の取扱いの違い及び試験手順の変更に由来する。さらなる情報には、N C C L S の免疫細胞化学の品質保証に提案された品質管理指針を参考にされたい。

【 0 1 8 5 】

対照細胞系は TriPath Imaging, Inc. 社から入手可能である。各バイアルは、臨床標本と同様に処理する子宮頸癌細胞系を含む。それぞれの染色手順において 2 つのスライドを染色すべきである。対照スライド細胞系の評価は染色の実行の妥当性を示す。

30

【 0 1 8 6 】

VI . 染色の解釈

対照スライド：

すべての試薬が適切に機能したかどうかを確認するために、最初に免疫細胞化学的試験のキットを用いて染色した対照スライドを検査した。細胞核中に茶色の（3 , 3 ' - ジアミノベンジジン四塩酸塩、D A B）反応生成物が存在することが、陽性反応の指標であった。

【 0 1 8 7 】

患者標本：

スライドの評価は、細胞検査技師又は病理学者が光学顕微鏡を用いることによって行った。細胞は、光学顕微鏡から導いた画像ギャラリー中に保存して手動で又は電子的に検査した。

40

【 0 1 8 8 】

様々な診断を示している約 1 6 1 0 個の頸部試料を採取した。以下の表は、従来の P a p 染色又は生検によって決定した、それぞれの診断群内で免疫細胞化学的キットを用いて解析した試料数を示す。

【 0 1 8 9 】

表 4 1 : それぞれの診断群内の患者標本 (P a p 染色)

細胞診断の結果	数	%
NIL	671	41.7%
LSIL	395	24.53%
ASCUS	349	21.68%
HSIL	150	9.32%
ASC-H	38	2.36%
AGUS	6	0.37%
SCC	1	0.06%
合計	1610	

10

【 0 1 9 0 】

表 4 2 : それぞれの診断群内の患者標本 (生検)

生検の結果	数	%
NIL	968	60.20%
CIN1	369	22.95%
CIN2	140	8.71%
CIN3	131	8.15%
見当たらず	2	
合計	1610	

20

【 0 1 9 1 】

スライドのスコアガイド

本実施例中に記載の免疫細胞化学的方法によって解析したすべてのスライドのスコア決定は、以下の手順に従った：

【 0 1 9 2 】

ステップ 1 : 妥当な標本であるか？

The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (second edition)には、「妥当な液体系調製物は、推定で最低少なくとも 5 0 0 0 個のよく可視化された / よく保存された扁平細胞を有するべきである」と記載されている。すべてのスライドを評価する際に、この同じ基準を適用した。しかし、ルーチン P a p 調製物と同様、陽性の分子反応を示す異常細胞を有する任意の標本は、本質的に、評価に十分であった。このステップへの答えが「はい」である場合は、細胞検査技師は次のステップに進んだ。答えが「いいえ」であった場合、結果は評価に不十分であった。

30

【 0 1 9 3 】

ステップ 2 : 中程度から強く茶色の核染色が上皮細胞中に存在するか？

本実施例の免疫細胞化学的キット（例えばSureDetect検出化学キット）で用いた検出用化学薬品は、C I N 2に関連する異形成核を茶色のクロマゲン、D A Bで染色する。このステップで「はい」と答えるために、試料を、容易に可視化される茶色染色について解析した。茶色が僅かな量のみ、即ち「紅潮」のみ見られる場合は、これは陽性であると保証するには不十分であった。茶色の核染色が見られなかった場合は、陰性の試験結果であるとみなされた。妥当な茶色染色が存在した場合は、解析を次のステップへと進めた。

40

【 0 1 9 4 】

ステップ 3 : これは茶色の核染色を有する扁平（又は腺性）細胞であり、細胞 A S C (A G C) であるか？

The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (2nd Ed.) (「T B S」)に概要を示した一部の形態学的基準を用いて、茶色の核を含む扁平細胞が A S C (非定型

50

扁平細胞 I) であるかどうかを決定した。これには、A S C - U S、A S C - H、L S I L、H S I L、及び癌が含まれるであろう。細胞の外見が腺性である場合は、細胞が A G C (非定型腺細胞) であるかを決定するための T B S の基準が適用された。これには、子宮頸管内 A G C、子宮内膜 A G C、A I S、及び腺癌が含まれるであろう。細胞が A S C (又は A G C) であるとみなされた場合、これは陽性の試験結果をもたらすであろう。問題の細胞が N I L M (上皮内病変又は悪性疾患に関して陰性、negative for intra epithelial lesion or malignancy) で一貫している場合は、これは陰性の試験結果となるであろう。

【 0 1 9 5 】

VII . 結果

従来の P a p 染色方法によって最初は N I L と分類された 2 7 件の症例が、免疫細胞化学試験において陽性に染色された。これら 2 7 件の症例のうち、有資格の病理学者による検査によって 7 件が H S I L、1 0 件が A S C - H、3 件が A S C - U S、3 件が確定不能と分類された。7 件の H S I L の症例は高悪性度子宮頸部疾患とみなされる。これら 2 7 件の症例はイモサイトケミストリーアッセイによって陽性免疫染色と同定され、P a p 染色によって N I L と誤分類された患者を同定するための、本明細書中に開示した方法の価値が示された。

【 0 1 9 6 】

生検の結果はすべての N I L 標本では得られなかった。本実施例中に記載した免疫細胞化学的方法の感度及び陽性適中率 (P P V) の推定は、「ゴールドスタンダード」生検の結果との比較に基づいて計算した。単一の生検はゴールドスタンダードとして限度がある。I C C アッセイの P P V は、患者を連続して監視すること、又はループ電気外科的切除手順若しくは円錐生検などのより攻撃的な外科的エンドポイントを利用することによって改善される。単一の生検は、疾患の偽陰性結果が少なくとも 3 1 % であることが知られている。Elit et al. (2004) J. Lower Genital Tract Disease 8(3):181-187を参照されたい。

【 0 1 9 7 】

表 4 3 : 生検の結果に基づいた I C C 試験の推定の感度及び陽性適中率

	ASC-H	ASCUS	LSIL	HSIL	≥ASCUS
感度	76.5% (52.7%, 90.4%)	92.6% (76.6%, 97.9%)	97.7% (92.1%, 99.4%)	98.5% (94.6%, 99.6%)	96.2% (93.1%, 97.9%)
PPV	59.1% (38.7%, 76.7%)	26.0% (18.3%, 35.6%)	31.0% (25.9%, 36.7%)	90.1% (84.1%, 94.0%)	46.9% (42.8%, 51.2%)

* (9 5 % の信頼区間)

【 0 1 9 8 】

また、免疫細胞化学的方法の感度及び P P V を従来の P a p 染色で得られたものとも比較した。P a p 染色の 2 つの臨床的エンドポイント (即ち L S I L 及び H S I L) を用いた。ここでも、すべての計算の標準は生検の結果であった。

【 0 1 9 9 】

表 4 4 : P a p 試験及び免疫細胞化学的方法の比較

	≥LSIL (Pap試験で)	≥HSIL (Pap試験で)	≥ASCUS (ICCで)
感度	76.5% (52.7%, 90.4%)*	92.6% (76.6%, 97.9%)	97.7% (92.1%, 99.4%)
PPV	59.1% (38.7%, 76.7%)	26.0% (18.3%, 35.6%)	31.0% (25.9%, 36.7%)

* (9 5 % の信頼区間)

【0200】

表42に示す結果は、免疫細胞化学的方法によって、高いPPVを維持したままでより多くの高悪性度子宮頸部疾患試料が検出されたことを示している。

【0201】

本研究では、免疫細胞化学的キットを用いて14個の偽陰性が存在していた。14個の患者試料のうちの13個でHPV試験を実施した。偽陰性患者の1つでは利用可能な試料が残っていなかった。

【0202】

NucleoSpin(登録商標)組織DNAキット(BD Clontech社製、カタログ番号635967)を用いて、ゲノムDNAを頸部細胞診断試料から単離した。品質管理の目的で、ハウスキーピング遺伝子である β -グロビンのPCR解析を行った。 10

【0203】

検出感度を向上させるために、MY09/11プライマー組を用いた従来のL1 PCR並びにMY09/11及びGP5⁺/6⁺プライマー組を用いたネステッドPCRの両方によって、当分野に記載のHPVのL1の遺伝子増幅を行った。存在するHPVの型を同定するために、L1単位複製配列のDNA配列決定をさらに行った。

【0204】

高品質のゲノムDNAが13個の臨床的細胞診断試料のうち10個から単離された。3個の試料が、 β -グロビンPCR解析によって示される低品質のゲノムDNAを有していた。HPVのDNAは、従来のL1 PCR(MY09/11プライマーを用いる)並びにネステッドL1 PCR(MY09/11及びGP5⁺/6⁺プライマーを用いる)を 20
どちらも用いて、13個のうち10個の試料で検出不可能又は陰性のどちらかであった。HPVが高悪性度子宮頸部疾患に関して陽性であることを考慮すると(>92%の感度)、このデータは、偽陰性試料の大多数でサンプリングエラーが起こったことを示す。

【実施例9】

【0205】

MCM6抗体選択

ポリドーマのスクリーニング

マルチウェル組織培養プレート中に提供されたポリドーマのスクリーニングを行って、所望の感度及び特異性の特色を有する、MCM6バイオマーカーに特異的な抗体を同定した。単一のスライド上に複数の正常(即ちCINなし)、CINIII、扁平細胞癌、及び 30
腺癌の試料を含む組織マイクロアレイを作製した。ポリドーマを含む各ウェルからの無希釈の上清で、組織マイクロアレイの陽性染色についてアッセイを行った。バックグラウンド、即ち非特異的結合は、この段階では基本的に無視した。試験した35個のポリドーマのうち11個が陽性染色結果を生じ、さらなる解析のためにそれを選択した。

【0206】

選択されたポリドーマの特異性を決定するために、ポリドーマの上清から得られた染色パターンを、市販のMCM6抗体(BD Transduction Laboratories社製)を用いて得られたものと比較した。ポリドーマの上清で得られた染色パターンは、市販のMCM6抗体で 40
観察されたものよりも特異的であると考えられる(図17)。

【0207】

その後、11個の選択されたポリドーマを限界希釈工程に供した。選択されたポリドーマの上清から生じた30個の限界希釈物を用いて、複数の正常(即ちCINなし)、CINIII、扁平細胞癌、及び腺癌の試料を含む組織マイクロアレイの陽性染色についてアッセイを行った。異常な及び癌性の頸部組織試料の陽性染色に基づいて2つの限界希釈クローン、即ち9D4.3及び9D4.4を最も良好な上清として選択した。その後、これらのクローンの様々な希釈率を、NIL、LSIL、HSIL組織及びプールした液体系細胞診断試料に対するその反応性について試験した。1:100の希釈率のクローン9D4.3が最大の信号対雑音比を生じ、さらなる特徴づけを行うために選択した。

【0208】

M C M 6、クローン 9 D 4 . 3 の特徴づけ

クローン 9 D 4 . 3 のさらなる特徴づけを行うために、クローンを用いて、以下の診断分類、即ち N I L (7)、L S I L (1 0)、H S I L (1 8)、及び子宮頸癌 (5) から選択された 4 0 個の液体系細胞診断試料の陽性染色についてアッセイを行った。4 0 個の試料のそれぞれについて、PrepStain (商標) スライドプロセッサ (TriPath Imaging, Inc. 社製) を用いてスライドを調製した。試料 1 個あたり 2 つのスライドを、それぞれ M C M 2 抗体 (Dako 社製) 及びクローン 9 D 4 . 3 で染色した。残りのスライドは P a p 染色用又は陰性対照として用いた。

【 0 2 0 9 】

スライドを調製するために、各試料を 2 分間 $200 \times g$ で遠心分離してペレットを形成し、上清を傾瀉した。2 mL の脱イオン水を各試料に加え、試料をボルテックス攪拌し、その後、5 分間 $600 \times g$ で遠心分離した。上清を傾瀉したあと、さらに $700 \mu L$ のトリス緩衝水を加えた。最後に、試料を PrepStain (商標) スライドプロセッサ (TriPath Imaging, Inc. 社製)、バージョン 1 . 1 に載せ、Transfer Only プログラムを実行した。

10

【 0 2 1 0 】

すべてのスライドを、95% の E T O H 中で、調製後少なくとも 2 4 時間且つ 3 日未満維持した。M C M 2 の抗原の回収は、スライドを 95% に予熱した $1 \times$ Target Retrieval Solution、p H 6 . 0 (DAKO 社製 S1699) / d H 2 O 浴中で、スチーマー内に 2 5 分間入れることによって達成した。M C M 6 では、スライドを 95% に予熱した $1 \times$ トリス p H 9 . 5 緩衝液 (Biocare 社製) / d H 2 O 浴中で、スチーマー内に 2 5 分間入れることによって、抗原のアクセシビリティを達成した。スチーマー処理後、すべてのスライドを室温で 2 0 分間冷却した。

20

【 0 2 1 1 】

スライドは、実施例 1、「自動免疫細胞化学」に記載の DAKO 社製 Universal Autostainer を用いた免疫細胞化学によって染色した。診断分類を形態学的に決定するために、熟練の細胞検査技師によってスライドのスクリーニング及び評価を行った。試料を、マーカー染色強度 (0 ~ 3)、陽性染色細胞のパーセンテージ、及びマーカー染色位置 (核、細胞質、膜、又は組合せ) について評価した。細胞染色の強度に 0 ~ 3 のスコアを与えた。スコア 1 . 5 の細胞を計数した。成熟した正常に見える扁平細胞及び正常に見える腺細胞は、茶色に染色された場合に陽性として計数しなかった。しかし、扁平異形成細胞は、異常細胞とともに陽性として計数した。その後、免疫細胞化学のスライドに T N (真陰性)、F N (偽陰性)、T P (真陽性)、又は F P (偽陽性) を指定した。

30

【 0 2 1 2 】

表 4 5 : クローン 9 D 4 . 3 (M C M 6)

	TP	FP	FN	TN	確定不能	合計		
NIL	0	0	0	1	0	1	感度	0.9655
LSIL	0	1	0	9	0	10	特異性	0.9091
HSIL	23	0	1	0	0	24	PPP	0.9655
癌	5	0	0	0	0	5	NPP	0.9091
	28	1	1	10	0	40		

40

【 0 2 1 3 】

表 4 6 : M C M 2

	TP	FP	FN	TN	確定不能	合計		
NIL	0	0	0	1	0	1	感度	0.9310
LSIL	0	1	0	9	0	10	特異性	0.9091
HSIL	23	0	1	0	0	24	PPP	0.9643
癌	4	0	1	0	0	5	NPP	0.8333
	27	1	2	10	0	40		

用いた計算

感度 = $TP / (TP + FN)$

10

特異性 = $TN / (FP + TN)$

陽性適中力 (PPP、Positive Predictive Power) = $TP / (TP + FP)$

陰性適中力 (NPP、Negative Predictive Power) = $TN / (FN + TN)$

【 0 2 1 4 】

クローン 9 D 4 . 3 の感度及び特異性は、市販の M C M 2 抗体を用いて得られたものと匹敵していた。1 件の N I L の症例はどちらの抗体に関しても陰性であった。10 件のうち 9 件の L S I L 症例がクローン 9 D 4 . 3 及び市販の M C M 2 抗体で陰性であった。24 件のうち 23 件の H S I L の症例がクローン 9 D 4 . 3 及び市販の M C M 2 抗体で陽性であった。子宮頸癌試料では、5 個のうち 5 個がクローン 9 D 4 . 3 で陽性であり、5 個のうち 4 個が M C M 2 抗体で陽性であった。

20

【 0 2 1 5 】

M C M 6、クローン 9 D 4 . 3 の精製

その感度、特異性、及び核染色パターンの提示のため、クローン 9 D 4 . 3 をさらなる解析用に精製した。精製した抗体は、標準の方法に従って、Streamline rProteinA (Amersham Biosciences社製) 親和性吸着クロマトグラフィーを用いて得られた。その後、結果として生じた抗体溶液を、1 : 500 ~ 1 : 6000 の様々な希釈率の H S I L 液体系頸部細胞診断プールに対する反応性について試験した。1 : 6000 の力価までシグナルが明白であった。

【 実施例 10 】

【 0 2 1 6 】

30

臨床的組織試料中のバイオマーカーのリアルタイム P C R 検出

ABI Prism社製 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems社) を用いて TaqMan (登録商標) リアルタイム P C R を行った。本研究の標的頸部バイオマーカー (即ち、M C M 7、p 2 1^{W a f 1}、p 1 4^{A R F} / p 1 6、サイクリン E 1、及びサイクリン E 2) を特異的に増幅するために、プライマー及びプローブを Primer Express (商標) プログラム、バージョン 1.5 (Applied Biosystems社) の支援により設計した。プライマー及びプローブの配列情報を以下に示す：

【 0 2 1 7 】

M C M 7 :

プライマー名 : MCM7_T1T3-F

40

配列 : CTCTGAGCCCGCCAAGC (配列番号 2 5)

プライマー名 : MCM7_T1T3-R

配列 : TGTAAGAACTTCTTAACCTTTTCCTTCTCTA (配列番号 2 6)

プローブ名 : MCM7_T1T3 - プローブ

配列 : CCCTCGGCAGCGATGGCACT (配列番号 2 7)

プライマー名 : MCM7_T2T4-F

配列 : GAGGAATCCCGAGCTGTGAA (配列番号 2 8)

プライマー名 : MCM7_T2T4-R

配列 : CCCGCTCCCGCCAT (配列番号 2 9)

プローブ名 : MCM7_T2T4 - プローブ

50

配列：CCCATGTGCTTCTTTGTTTACTAAGAGCGGAA (配列番号 3 0)

プライマー名：MCM7_T2-F

配列：GTCCGAAGCCCCCAGAA (配列番号 3 1)

プライマー名：MCM7_T2-R

配列：CCCGACAGAGACCACTCACA (配列番号 3 2)

プローブ名：MCM7_T2 - プローブ

配列：CAGTACCCTGCTGAACTCATGCGCA (配列番号 3 3)

プライマー名：MCM7_T3T4-F

配列：CGCTACGCGAAGCTCTTTG (配列番号 3 4)

プライマー名：MCM7_T3T4-R

10

配列：CCTTTGTTTGCCATTGTTCTCTAA (配列番号 3 5)

プローブ名：MCM7_T3T4 - プローブ

配列：TGCCGTACAAGAGCTGCTGCCTCA (配列番号 3 6)

【 0 2 1 8 】

p 2 1 ^{w a f 1} :

プライマー名：p21T1T2-F

配列：CAAACGCCGGCTGATCTT (配列番号 3 7)

プライマー名：p21T1T2-R

配列：CCAGGACTGCAGGCTTCCT (配列番号 3 8)

プローブ名：p21T1T2 - プローブ

20

配列：CAAGAGGAAGCCCTAATCCGCCCA (配列番号 3 9)

プライマー名：p21T2-F

配列：GAGCGGCGGCAGACAA (配列番号 4 0)

プライマー名：p21T2-R

配列：CCGCGAACACGCATCCT (配列番号 4 1)

プローブ名：p21T2 - プローブ

配列：CCCAGAGCCGAGCCAAGCGTG (配列番号 4 2)

プライマー名：p21T3-F

配列：TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA (配列番号 4 3)

プライマー名：p21T3-R

30

配列：TCCAGTCTGGCCAACAGAGTT (配列番号 4 4)

プローブ名：p21T3 - プローブ

配列：CGGCGGCAGACCAGCATGAC (配列番号 4 5)

【 0 2 1 9 】

p 1 4 ^{A R F} / p 1 6 :

プライマー名：p16T4-F

配列：GCC CTC GTG CTG ATG CTA CT (配列番号 4 6)

プライマー名：p16T4-R

配列：TCA TCA TGA CCT GGT CTT CTA GGA (配列番号 4 7)

プローブ名：p16T4 - プローブ

40

配列：AGC GTC TAG GGC AGC AGC CGC (配列番号 4 8)

プライマー名：p16T1-F

配列：TGCCCAACGCACCGA (配列番号 4 9)

プライマー名：p16T1-R

配列：GGGCGCTGCCCATCA (配列番号 5 0)

プローブ名：p16T1 - プローブ

配列：TCGGAGGCCGATCCAGGTCATG (配列番号 5 1)

プライマー名：p16T2-F

配列：AAGCTTCCTTTCCGTCATGC (配列番号 5 2)

プライマー名：p16T2-R

50

配列：CATGACCTGCCAGAGAGAACAG (配列番号 5 3)

プローブ名：p16T2 - プローブ

配列：CCCCACCCCTGGCTCTGACCA (配列番号 5 4)

プライマー名：p16T3-F

配列：GGAAACCAAGGAAGAGGAATGAG (配列番号 5 5)

プライマー名：p16T3-R

配列：TGTTCCCCCTTCAGATCTTCT (配列番号 5 6)

プローブ名：p16T3 - プローブ

配列：ACGCGCGTACAGATCTCTCGAATGCT (配列番号 5 7)

プライマー名：p16Universal-F

10

配列：CACGCCCTAAGCGCACAT (配列番号 5 8)

プライマー名：p16Universal-R

配列：CCTAGTTCACAAAATGCTTGTCATG (配列番号 5 9)

プローブ名：p16Universal - プローブ

配列：TTTCTTGCGAGCCTCGCAGCCTC (配列番号 6 0)

【 0 2 2 0 】

サイクリン E 1 :

プライマー名：CCNE1T1T2-F

配列：AAAGAAGATGATGACCGGGTTTAC (配列番号 6 1)

プライマー名：CCNE1T1T2-R

20

配列：GAGCCTCTGGATGGTGCAA (配列番号 6 2)

プローブ名：CCNE1T1T2-P

配列：CAAACCTCAACGTGCAAGCCTCGGA (配列番号 6 3)

プライマー名：CCNE1T1-F

配列：TCCGCCGCGGACAA (配列番号 6 4)

プライマー名：CCNE1T1-R

配列：CATGGTGTCCCGCTCCTT (配列番号 6 5)

プローブ名：CCNE1T1 - プローブ

配列：ACCCTGGCCTCAGGCCGGAG (配列番号 6 6)

【 0 2 2 1 】

30

サイクリン E 2

プライマー名：CCNE2T1T2-F

配列：GGAATTGTTGGCCACCTGTATT (配列番号 6 7)

プライマー名：CCNE2T1T2-R

配列：CTGGAGAAATCACTTGTTCTATTTCT (配列番号 6 8)

TaqMan プローブ名：CCNE2T1T2-P

配列：CAGTCCTTGCATTATCATTGAAACACCTCACA (配列番号 6 9)

プライマー名：CCNE2T1T3-F

配列：TCAACTCATTGGAATTACCTCATTATTC (配列番号 7 0)

プライマー名：CCNE2T1T3-R

40

配列：ACCATCAGTGACGTAAGCAAATC (配列番号 7 1)

TaqMan プローブ名：CCNE2T1T3-P

配列：CCAAACTTGAGGAAATCTATGCTCCTAACTCCA (配列番号 7 2)

プライマー名：CCNE2T2-F

配列：TTTTGAAGTTCTGCATTCTGACTTG (配列番号 7 3)

プライマー名：CCNE2T2-R

配列：ACCATCAGTGACGTAAGCAAGATAA (配列番号 7 4)

TaqMan プローブ名：CCNE2T2-P

配列：AACCACAGATGAGGTCCATACTTCTAGACTGGCT (配列番号 7 5)

【 0 2 2 2 】

50

プローブの 5' 塩基を蛍光色素 FAM (6 - カルボキシフルオレセイン) で、且つ 3' 塩基を消光色素 TAMRA (6 - カルボキシテトラメチルローダミン) で標識した。単位複製配列の大きさは約 100 bp であった。18S リボソーム RNA を内在コントロールとして利用した。18S rRNA プローブを蛍光色素 VIC (商標) で標識した。事前に開発された 18S rRNA プライマー/プローブ混合物を Applied Biosystems 社から購入した。正常 (N、normal) 又は癌性 (T、cancerous) の頸部組織から抽出した 5 µg の全 RNA を、High-Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems 社) を用いてランダムな六量体を有する一本鎖 cDNA の形態へと定量的に変換した。以下の反応試薬を調製した:

プライマー/プローブの 20 × マスター混合物 (200 µl 中)

180 µM の順方向プライマー 20 µl

180 µM の逆方向プライマー 20 µl

100 µM の TaqMan プローブ 10 µl

H₂O 150 µl

最終反応混合物 (25 µl / ウェル)

プライマー/プローブの 20 × マスター混合物 1.25 µl

2 × TaqMan Universal PCR Master Mix (P / N : 4304437) 12.5 µl

cDNA 鋳型 5.0 µl

H₂O 6.25 µl

【0223】

20 × TaqMan Universal PCR Master Mix は Applied Biosystems 社から購入した。全体的積 25 µl 中の最終的なプライマー及びプローブの濃度は、それぞれ 0.9 µM 及び 0.25 µM であった。10 ng の全 RNA を各ウェルに入れた。増幅条件は、50 で 2 分間、95 で 10 分間、並びに 95 で 15 秒間及び 60 で 60 秒間の 2 ステップのサイクルを、合計 40 サイクルであった。少なくとも 3 つの非鋳型対照反応混合物をそれぞれの実行に含めた。すべての実験は 3 つ組で行った。

【0224】

各反応の終わりに、記録された蛍光強度を以下の計算に用いた。R_n⁺ とは、すべての構成成分を含む反応の R_n 値である。R_n⁻ とは、未反応の試料の R_n 値である (基底値又は NTC で検出された値)。ΔR_n とは、R_n⁺ と R_n⁻ との差であり、PCR によって生じたシグナルの大きさを示す。本研究では、既知の量の標準物質を用いないが、選択した任意の参照値 (例えば 18S rRNA) に対する標的配列の相対量を比較する、比較 C_T 方法を用いた。TaqMan (登録商標) Human Endogenous Control Plate プロトコルを用いて、生データをリアルタイム PCR データ分析用に変換した。

【0225】

結果

各バイオマーカー及び特異的プライマーを用いて得られた結果を以下に表形式で記載する。正常な頸部組織試料 (即ち NIL) で得られた結果を N と示し、子宮頸癌組織で得られた結果を T と示した。

【0226】

10

20

30

40

表 4 7 : MCM 7 TaqMan (登録商標) の結果

試料	T2	T5	T1T3	T2T4	T3T4
CV01-T	4	0.04	29.9	4.5	1.4
CV03-T	5.7	0.02	36.8	6.1	2.6
CV05-T	4.13	0.08	17.3	1.35	3.68
CV07-T	2.6	0.06	18.77	0.88	3.27
CV09-T	4.96	0.08	15.01	3.69	3.22
CV11-T	5.9	0.01	7.37	3.08	1.75
CV13-T	6.74	0.04	19.74	4.55	4.11
CV15-T	3.04	0.05	3.65	3.43	1.25
CV17-T	5.21	0.02	20.07	2.74	1.56
CV19-T	3.34	0.09	21.17	2.88	6
CV21-T	6.7	0.08	10.64	4.75	4.59
CV23-T	7.08	0.33	32.17	5.6	4.25
CV25-T	4.87	0.03	18.11	4.58	4.51
CV27-T	4.24	0.03	36.25	4.6	2.82
平均	4.89	0.07	20.50	3.77	3.22
中央値	4.89	0.05	19.74	3.77	3.22
STD	1.32	0.07	9.46	1.39	1.32
CV02-N	2.5	0.02	10.6	2.6	1.1
CV04-N	4.6	0.02	7.1	4.8	2.4
CV06-N	1.75	0.01	2.14	1.36	2.63
CV08-N	1.35	0.01	4.8	1.71	1.54
CV10-N	5.6	0.03	5.07	5.12	1.85
CV12-N	5.68	0.02	7.34	3.19	2.29
CV16-N	4.35	0.08	3.72	2.75	1.78
CV18-N	3.98	0.01	4.74	3.63	1.7
CV20-N	2.03	0.03	5.42	1.4	2.78
CV22-N	2.66	0.02	4.33	2.26	2.42
CV24-N	4.88	0.09	9.03	1.53	2.77
CV28-N	2.71	0.01	10.38	1.36	1.7
平均	3.51	0.03	6.22	2.64	2.08
中央値	3.51	0.02	5.42	2.60	2.08
STD	1.40	0.03	2.48	1.21	0.50

10

20

30

表 48 : p 2 1^{wa f 1}TaqMan (登録商標) の結果

患者	T1T2	T2	T3
Pt01-T	23.33	0.06	0.00
Pt02-T	14.66	0.01	0.00
Pt03-T	11.86	0.00	0.00
Pt04-T	27.04	0.01	0.00
Pt05-T	14.72	0.00	0.00
Pt06-T	22.84	0.01	0.00
Pt07-T	14.04	0.00	0.00
Pt08-T	31.93	0.01	0.01
Pt09-T	35.02	0.00	0.00
Pt10-T	13.2	0.00	0.00
Pt11-T	24.87	0.01	0.00
Pt12-T	10.85	0.00	0.00
Pt13-T	36.51	0.02	0.01
Pt14-T	12.72	0.00	0.00
Pt15-T	10.64	0.00	0.00
Pt16-T	22.58	0.04	0.00
Pt17-T	39.64	0.14	0.04
Pt01-N	4.57	0.03	0.00
Pt02-N	5.57	0.00	0.00
Pt03-N	3.54	0.00	0.00
Pt04-N	8.18	0.00	0.00
Pt05-N	5.4	0.10	0.00
Pt06-N	11.01	0.00	0.00
Pt08-N	10.39	0.00	0.00
Pt09-N	9.11	0.00	0.00
Pt10-N	4.41	0.00	0.00
Pt11-N	8.64	0.00	0.00
Pt12-N	3.03	0.00	0.00
Pt14-N	3.55	0.00	0.00
Pt15-N	2.42	0.01	0.00
Pt17-N	11.46	0.05	0.01
Tの平均	21.5559		
Nの平均	6.52		
標準T検定=	7.3E-06		

10

20

30

40

表 4 9 : p 1 4^{ARF/p 1 6}TaqMan (登録商標) の結果

患者	T1	T2	T3	T4	ユニバーサル
Pt01-T	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2
Pt02-T	16.3	11.2	5.1	21.7	36.5
Pt03-T	16.5	6.2	3.1	15.1	29.6
Pt04-T	10.1	2.8	2.6	13.2	27.7
Pt05-T	12.7	3.6	2.1	11.3	23.1
Pt01-N	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Pt02-N	2.5	2.6	1.6	2.7	6.8
Pt04-N	2.6	0.6	0.8	2.4	5.8
Pt05-N	2.1	0.8	0.7	4.1	4.6
Tの平均	11.2	4.8	2.6	12.3	23.4
Nの平均	1.8	1.0	0.8	2.3	4.3

【 0 2 2 9 】

表 5 0 : サイクリン E 1 TaqMan (登録商標) の結果

患者	T1T2癌 のM	癌のSD	T1T2 正常のM	正常 のSD	T1癌 のM	癌のSD	T1正常 のM	正常 のSD
Pt01	12.19	0.12	4.11	0.13	1.34	0.04	0.5	0.03
Pt02	16.72	0.21	4.44	0.34	1.35	0.02	0.47	0.05
Pt03	11.45	0.41	2.81	0.13	1.17	0.01	0.06	0.02
Pt04	21.33	0.45	5.33	0.09	0.76	0.1	0.23	0.01
Pt05	11.17	0.25	3.68	0.15	0.95	0.05	0.15	0.03
Pt06	21.65	0.24	3.11	0.22	0.89	0.03	0.13	0.02
Pt07	23.26	0.54	0	0	0.75	0.06	0	0.01
Pt08	8.37	0.24	3.1	0.01	0.12	0.01	0.13	0.02
Pt09	17.74	0.43	2.17	0.08	0.73	0.02	0.09	0.01
Pt10	18.51	0.29	4.56	0.17	1.37	0.03	0.41	0.04
Pt11	10.58	0.52	3.92	0.12	0.57	0.01	0.23	0.03
Pt12	33.67	0.58	7.87	0.1	0.78	0.01	0.28	0.05
Pt13	36.9	0.41	0	0	1.05	0.04	0	0
Pt14	31.01	0.29	6.01	0.26	1.68	0.05	0.24	0.03
Pt15	7.35	0.23	1.24	0.09	0.34	0.08	0.08	0.02
Pt16	12.71	0.61	3.72	0	1.1	0.06	0.07	0.01
Pt17	12.13	0.21	11.46	0.15	0.34	0.07	0.05	0.01
Pt18	14.22	0.14	5.94	0.06	0.73	0.08	0.26	0.04
Pt19	12.69	0.81	3.52	0.02	0.41	0.04	0.24	0.02
Pt20	16.56	0.16	6.1	0.12	0.17	0.02	0.06	0
Pt21	11.63	0.23	3.01	0.06	0.54	0.04	0.23	0.01
Pt22	17.39	0.34	2.36	0.02	0.47	0.02	0.24	0.05
Pt23	16.56	0.16	2.1	0.02	0.18	0.03	0.09	0.01
Pt24	22.23	0.33	4.06	0.28	1.9	0.17	0.52	0.01
Pt25	13.98	0.48	3.72	0.05	0.54	0.04	0.23	0.01
Pt26	22.71	0.76	4.48	0.07	0.47	0.02	0.24	0.05
Pt27	16.17	0.4	5.64	0.3	0.18	0	0.12	0.01
Pt28	12.6	0.56	3.8	0.06	0.29	0.03	0.05	0
Pt29	13.69	0.34	3.1	0.18	0.29	0.03	0.11	0
Pt30	17.69	0.61	4.3	0.11	0.36	0.01	0.03	0
Pt31	20.46	0.3	3.91	0.21	0.47	0.03	0.08	0
Pt32	18.38	0.18	3.16	0.06	0.42	0.02	0.17	0.01
Pt33	21.1	0.62	4.52	0.33	1.07	0.05	0.24	0.01
Pt34	21.5	1.37	4.56	0.13	0.24	0.01	0.11	0.01
平均	17.54		4.26		0.68		0.20	
T/N	4.1							
t検定 P=	7.80E-1 4							

10

20

30

40

【 0 2 3 0 】

表 5 1 : サイクリン E 2 TaqMan (登録商標) の結果

患者	T1T2	T1T2の 標準偏差	T1T3	T1T3の 標準偏差	T2	T2の 標準偏差
Pt01-T	13.17	1.02	16.11	0.39	0.01	0.00
Pt02-T	13.42	0.3	18.12	2.21	0.15	0.02
Pt03-T	13.64	0.50	17.40	2.16	0.05	0.01
Pt04-T	19.37	1.41	24.26	1.01	0.01	0.00
Pt05-T	10.59	1.1	14.71	1.58	0.17	0.02
Pt06-T	7.96	0.91	9.32	0.51	0.06	0.01
Pt07-T	14.1	1.73	16.92	0.84	0.54	0.06
Pt08-T	8.11	0.67	9.50	0.66	0.34	0.07
Pt09-T	13.04	0.72	18.27	0.99	0.02	0.00
Pt10-T	19.56	2.29	23.42	0.00	0.02	0.01
Pt11-T	16.8	1.57	18.71	2.15	0.08	0.01
Pt12-T	16.05	0.85	18.81	0.74	0.91	0.01
Pt13-T	14.91	0.87	18.51	1.59	0.61	0.16
Pt14-T	14.89	0.32	20.49	0.86	0.42	0.03
Pt15-T	12.44	0.47	15.26	1.00	0.68	0.18
Pt16-T	11.54	1.58	13.13	0.75	1.02	0.14
Pt17-T	6.78	0.47	7.91	0.45	0.85	0.10
Pt01-N	4.89	0.21	5.94	0.53	0.00	0.00
Pt02-N	6.32	0.47	8.91	0.61	0.13	0.00
Pt03-N	4.8	0.31	5.89	0.30	0.04	0.00
Pt04-N	13.28	0.74	15.28	1.37	0.01	0.00
Pt05-N	6.51	1.2	9.04	0.82	0.16	0.02
Pt06-N	4.96	0.83	6.41	0.84	0.05	0.01
Pt08-N	6.48	0.73	6.82	0.60	0.07	0.02
Pt09-N	3.74	0.48	4.63	0.66	0.03	0.01
Pt10-N	10.32	0.93	11.31	0.89	0.02	0.00
Pt11-N	10.34	0.26	13.90	0.53	0.04	0.04
Pt12-N	13.81	1.69	16.60	1.45	0.24	0.07
Pt14-N	6.92	0.63	9.07	0.95	0.14	0.03
Pt15-N	4.8	0.73	8.55	1.40	0.10	0.03
Pt17-N	5.33	0.2	5.78	0.27	0.23	0.07
Tの平均	13.32		16.52		0.35	
Nの平均	7.32		9.15		0.09	
標準T検定	4.16E-05		3.31742E-05		0.008813	

10

20

30

40

【実施例 1 1】

【0 2 3 1】

臨床的組織試料中のバイオマーカーのリアルタイムPCR検出

子宮頸癌組織試料（例えば腺癌、扁平細胞癌）及び正常な頸部組織試料を用いて、実施例 9 に記載のようにTaqMan（登録商標）リアルタイムPCRを行った。本研究の標的頸部バイオマーカー（即ち、MCM2、MCM6、MCM7、及びTopo2A）を特異的に増幅するために、プライマー及びプローブをPrimer Express（商標）プログラム、バージョン 1.5（Applied Biosystems社）の支援により設計した。プライマー及びプローブの配列情報を以下に示す：

【0 2 3 2】

50

TaqManプライマー

M C M 2 :

プライマー名 : MCM2-F

配列 : 5' - GGAGGTGGTACTGGCCATGTA - 3' (配列番号 8 0)

プライマー名 : MCM2-R

配列 : 5' - GGGAGATGCGGACATGGAT - 3' (配列番号 8 1)

TaqManプローブ名 : MCM2-P

配列 : 5' - CCAAGTACGACCGCATCACCAACCA - 3' (配列番号 8 2)

【 0 2 3 3 】

M C M 6 :

プライマー名 : MCM6-F

配列 : 5' - CATTCCAAGACCTGCCTACCA - 3' (配列番号 8 3)

プライマー名 : MCM6-R

配列 : 5' - ATGCGAGTGAGCAAACCAATT - 3' (配列番号 8 4)

TaqManプローブ名 : MCM6-P

配列 : 5' - ACACAAGATTCGAGAGCTCACCTCATCCA - 3' (配列番号 8 5)

【 0 2 3 4 】

M C M 7 :

プライマー名 : MCM7_T1T3-F

配列 : CTCTGAGCCCGCCAAGC (配列番号 2 5)

プライマー名 : MCM7_T1T3-R

配列 : TGTAAGAAGCTTTAACCCTTTCTTCTCTA (配列番号 2 6)

プローブ名 : MCM7_T1T3 - プローブ

配列 : CCCTCGGCAGCGATGGCACT (配列番号 2 7)

プライマー名 : MCM7_T2T4-F

配列 : GAGGAATCCCGAGCTGTGAA (配列番号 2 8)

プライマー名 : MCM7_T2T4-R

配列 : CCCGCTCCCGCCAT (配列番号 2 9)

プローブ名 : MCM7_T2T4 - プローブ

配列 : CCCATGTGCTTCTTTGTTTACTAAGAGCGGAA (配列番号 3 0)

プライマー名 : MCM7_T2-F

配列 : GTCCGAAGCCCCCAGAA (配列番号 3 1)

プライマー名 : MCM7_T2-R

配列 : CCCGACAGAGACCACTCACA (配列番号 3 2)

プローブ名 : MCM7_T2 - プローブ

配列 : CAGTACCCTGCTGAACTCATGCGCA (配列番号 3 3)

プライマー名 : MCM7_T3T4-F

配列 : CGCTACGCGAAGCTCTTTG (配列番号 3 4)

プライマー名 : MCM7_T3T4-R

配列 : CCTTTGTTTGCCATTGTTCTCTAA (配列番号 3 5)

プローブ名 : MCM7_T3T4 - プローブ

配列 : TGCCGTACAAGAGCTGCTGCCTCA (配列番号 3 6)

【 0 2 3 5 】

T O P O 2 A :

プライマー名 : TOP2A_F

配列 : 5' - GGCTACATGGTGGCAAGGA - 3' (配列番号 8 6)

プライマー名 : TOP2A_R

配列 : 5' - TGGAAATAACAATCGAGCCAAAG - 3' (配列番号 8 7)

TaqManプローブ名 : TOP2A_P

配列 : 5' - TGCTAGTCCACGATACATCTTTACAATGCTCAGC - 3' (配列番号 8 8)

10

20

30

40

50

【 0 2 3 6 】

結果

各バイオマーカーを用いて得られた結果を以下に表形式で記載する。また、データを以下に要約する。

【 0 2 3 7 】

表 5 2 : 瞬間冷凍した子宮頸癌組織試料

患者	TPO ID	病理学的診断	HPV型	MCM2 TaqM	MCM6 TaqMan	MCM7 TaqM	TOP2A TaqM
Pt01	CV-001	扁平細胞癌	HPV16	8.93	11.31	29.9	23.76
Pt02	CV-003	腺癌	HPV18	10.94	14.29	36.8	25.28
Pt03	CV-005	腺癌	HPV18	17.67	13.84	17.3	23.18
Pt04	CV-007	扁平細胞癌	HPV16	23.61	13.3	18.77	23.26
Pt05	CV-009	扁平細胞癌	HPV16	9.3	11.26	15.01	20.33
Pt06	CV-011	扁平細胞癌	HPV16	13.86	11.58	7.37	8.37
Pt07	CV-013	腺癌	HPV18	27.03	16.32	19.74	34.29
Pt08	CV-015	扁平細胞癌	HPV16、HPV18、+	8.28	8.16	3.65	8.57
Pt09	CV-017	扁平細胞癌	HPV18	12.61	13.56	20.07	11.31
Pt10	CV-019	扁平細胞癌	HPV18	31.88	23.38	21.17	27.48
Pt11	CV-021	扁平細胞癌	HPV16	11.27	14.76	10.64	12.73
Pt12	CV-023	扁平細胞癌	HPV16	11.39	11.29	32.17	21.11
Pt13	CV-025	扁平細胞癌	HPV16	23.88	18.98	18.11	27.96
Pt14	CV-027	扁平細胞癌	HPV18、HPV16、+	12.26	15.53	36.25	26.63
Pt15	CV-029	扁平細胞癌	HPV16	6.56	7.92	9.64	7.81
Pt16	CV-031	扁平細胞癌	HPV73	28.12	12.21	27.3	21.4
Pt17	CV-033	扁平細胞癌	HPV16	8.76	7.59	14.37	12.42
Pt18	CV-035	扁平細胞癌	HPV16	21.4	12.65	23.63	27.57
Pt19	CV-037	扁平細胞癌	HPV18	12.59	13.06	14.37	9.24
Pt20	CV-039	腺扁平細胞癌	HPV16、HPV18、+	7.24	8.17	16.97	15.13
Pt21	CV-041	扁平細胞癌	HPV16	9.61	11.84	13.88	11.92
Pt22	CV-043	扁平細胞癌	HPV16	21.57	13.21	18.31	24.19
Pt23	CV-045	扁平細胞癌	HPV16	21.19	13.18	18.76	19.97
Pt24	CV-047	扁平細胞癌	HPV18	24.61	19.09	20.19	28.14
Pt25	CV-049	扁平細胞癌	HPV18	11.43	10.2	13.70	10.55
Pt26	CV-051	扁平細胞癌	HPV16	24.25	20.54	23.26	33.26
Pt27	CV-053	扁平細胞癌	HPV45	26.74	21.34	20.96	20.34
Pt28	CV-055	扁平細胞癌	HPV16、HPV18、+	12.65	12	14.42	12.17
Pt29	CV-057	扁平細胞癌	HPV16	16	14.72	25.46	22.16
Pt30	CV-059	扁平細胞癌	HPV16、HPV18、+	22.55	17.87	15.30	25.54
Pt31	CV-061	扁平細胞癌	HPV16	24.08	21.88	23.11	25.28
Pt32	CV-063	扁平細胞癌	HPV18、HPV16、+	24.16	12.55	21.63	22.39
Pt33	CV-065	扁平細胞癌	HPV16	26.63	16.05	27.56	28.84
Pt34	CV-067	扁平細胞癌	HPV16	19.61	23.28	19.03	25.57

【 0 2 3 8 】

表 5 3 : 隣接正常組織試料

患者	TPO ID	HPV型	MCM2 TaqM	MCM6 TaqMan	MCM7 TaqM	TOP2A TaqM
Pt01	CV-002	陰性	3.04	4.4	10.6	10.52
Pt02	CV-004	陰性	6.26	6.28	7.1	9.06
Pt03	CV-006	HPV18	2.06	2.53	2.14	3.86
Pt04	CV-008	陰性	3.14	4.15	4.8	8.03
Pt05	CV-010	陰性	2.2	3.45	5.07	6.91
Pt06	CV-012	陰性	2.06	2.29	7.34	6.82
Pt07	CV-014	陰性	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt08	CV-016	陰性	2.55	3.13	3.72	2.02
Pt09	CV-018	陰性	2.09	3.09	4.74	1.24
Pt10	CV-020	陰性	8.15	6.76	5.42	10.41
Pt11	CV-022	陰性	4.53	5.34	4.33	6.64
Pt12	CV-024	陰性	1.94	2.45	9.03	6.13
Pt13	CV-026	陰性	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt14	CV-028	陰性	2.62	2.95	10.38	5.3
Pt15	CV-030	陰性	1.14	1.28	2.06	1.54
Pt16	CV-032	陰性	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt17	CV-034	陰性	1.24	1.91	1.32	0.42
Pt18	CV-036	陰性	3.4	1.89	4.01	4.32
Pt19	CV-038	陰性	3.48	4.98	5.60	7.92
Pt20	CV-040	陰性	1.84	3.28	3.73	1.38
Pt21	CV-042	陰性	1.53	3.3	4.77	1.01
Pt22	CV-044	陰性	2.65	4.03	2.74	2.59
Pt23	CV-046	陰性	3.09	3.53	5.90	3.42
Pt24	CV-048	HPV18	2.57	5.19	3.82	5.32
Pt25	CV-050	陰性	5.84	4.64	7.78	9.14
Pt26	CV-052	陰性	5.11	5.22	5.37	5.13
Pt27	CV-054	陰性	2.91	3.29	5.10	0.76
Pt28	CV-056	陰性	4.14	3.74	5.54	4.15
Pt29	CV-058	HPV16	2.83	4.98	10.13	7.57
Pt30	CV-060	陰性	6.41	5	5.39	10.05
Pt31	CV-062	陰性	5.72	4.93	9.29	9.95
Pt32	CV-064	陰性	8.06	5.41	7.64	9
Pt33	CV-066	陰性	9.93	7.94	10.78	9.95
Pt34	CV-068	陰性	2.36	6.39	5.73	1.81

10

20

30

40

結果の要約

表 5 4 : 腫瘍対隣接正常組織

マーカー	腫瘍 (M±SD)	正常組織 (M±SD)	R	P
MCM2	17.43±7.34	3.71±2.21	4.70	<0.0001
MCM6	14.32±4.32	4.12±1.56	3.48	<0.0001
MCM7	19.38±6.94	5.85±2.59	3.31	<0.0001
TOP2A	20.53±7.54	5.56±3.33	3.69	<0.0001

M : 平均 ; S D : 標準偏差 ; R : 腫瘍の平均対正常組織の比 ; P : t 検定の P 値。

10

【 0 2 4 0 】

表 5 5 : H P V - 1 6 対 H P V - 1 8

マーカー	腫瘍のHPV型	症例数	腫瘍 (M±SD)	正常組織 (M±SD)
MCM2	16	18	16.77±6.78	3.29±2.13
	18	8	17.23±8.16	3.99±2.40
	16+18	6	14.52±7.18	4.27±2.47
MCM6	16	18	14.19±4.44	3.97±1.75
	18	8	14.24±4.10	4.35±1.54
	16+18	6	12.38±3.89	3.92±1.04
MCM7	16	18	19.39±6.94	6.07±2.98
	18	8	17.23±4.16	5.07±1.91
	16+18	6	18.04±7.71	6.07±2.56
TOP2A	16	18	20.92±7.38	5.46±3.26
	18	8	19.78±9.52	6.19±3.33
	16+18	6	18.41±7.49	5.32±3.57

20

【 0 2 4 1 】

表 5 6 : 扁平細胞癌対腺癌

マーカー	組織病理学	症例数	腫瘍(M±SD)	正常組織(M±SD)
MCM2	SCC	30	17.66±7.28	3.74±2.23
	AC	4	15.72±8.69	3.39±2.49
MCM6	SCC	30	14.48±4.44	4.13±1.55
	AC	4	13.16±3.49	4.03±1.98
MCM7	SCC	30	19.27±7.25	6.01±2.58
	AC	4	20.20±4.57	4.32±2.53
TOP2A	SCC	30	20.01±7.47	5.65±3.34
	AC	4	21.47±7.87	4.77±3.92

40

S C C : 扁平細胞癌 ; A C : 腺癌。

【 実施例 1 2 】

【 0 2 4 2 】

頸部及び乳癌細胞中のバイオマーカーのリアルタイム P C R 検出

頸部並びに乳癌細胞系中の M C M 2、M C M 6 及び M C M 7 の発現レベルを検出するために TaqMan (登録商標) リアルタイム P C R を行った。

50

【 0 2 4 3 】

実験の設計及びプロトコル

SiHa、Caski及びHeLaの3つのヒト子宮頸癌細胞系並びにMCF-7、SK-BR3及びCAMAの3つのヒト乳癌細胞系をATCCから購入し、本実験で用いた。RNeasy(登録商標)Protect Miniキット(Qiagen社製、カリフォルニア州Valencia)によって新しく培養した細胞から全細胞RNAを抽出し、High-Capacity cDNA Archive Kit(Applied Biosystems社、P/N: 4322171)を用いてランダムな六量体を有する一本鎖cDNAの形態へと変換した。TaqMan(登録商標)Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems, Inc.社製、カリフォルニア州Foster City)を用いて、ABI Prism社製(登録商標)7700 Sequence Detection SystemでリアルタイムPCRを行った。

10

【 0 2 4 4 】

ABI社製Primer Express(商標)プログラム、v1.5を用いて、MCM2、MCM6及びMCM7を特異的に増幅するためのプライマー並びにプローブを設計した。MCM7は4つの転写変異体を含み、転写変異体1(T1、参照配列NM_005916)及び転写変異体2(T2、参照配列NM_182776)がNCBI Entrezヌクレオチドデータベース中で同定された。NCBIのModel MakerのESTアセンブリによって解析すると、変異体T3及びT4は5'末端付近に代替エクソンを有する。プライマー及びプローブは、それぞれ具体的に変異体T1及びT3、T2及びT4、T2、並びにT3及びT4を検出するために、T1T3、T2T4、T2並びにT3T4として設計した。プライマー及びプローブの配列は上記実施例10及び11に示した。

20

【 0 2 4 5 】

プローブの5'塩基を蛍光色素FAM(6-カルボキシフルオレセイン)で、且つ3'塩基を消光色素TAMRA(6-カルボキシテトラメチルローダミン)で標識した。18SリボソームRNAを内在コントロールとして利用した。18S rRNAプローブを蛍光色素VIC(商標)で標識した。事前に開発された18S rRNAプライマー/プローブ混合物をApplied Biosystems社から購入した。10ngのcDNAを、それぞれ0.9µM及び0.25µMのプライマー及びプローブを全体積25µl中に含む反応混合物に施用した。増幅条件は、50℃で2分間、95℃で10分間、並びに95℃で15秒間及び60℃で60秒間の2ステップのサイクルを、合計40サイクルであった。少なくとも3つの非鋳型対照反応混合物をそれぞれの実行に含めた。すべての実験は2つ組で行った。18S内在コントロールに対する標的遺伝子の発現レベルを計算するために相対的定量方法を用い、ABI社の使用者の手引きに従ってそのCT値に基づいて行った(P/N4303859)。

30

【 0 2 4 6 】

結果

各バイオマーカーで得られた結果を以下に表形式で記載する。

【 0 2 4 7 】

表57：頸部及び乳癌細胞系のバイオマーカーの発現

	SiHa	Caski	HeLa	MCF7	SK-BR3	CAMA
MCM2	21.4	5.01	8.79	18.84	7.65	17.32
MCM6	12.34	5.77	6.46	12.6	5.44	13.14
MCM7	20.53	17.27	8.31	26.91	30.38	25.36

40

【 0 2 4 8 】

結論

頸部HeLa細胞系はMCM2、MCM6及びMCM7のバイオマーカーの発現レベルが低いことが示された。頸部SiHa、乳房MCM7、及びCAMAの細胞系はすべて、MCM2、MCM6及びMCM7バイオマーカーの過剰発現を示した。頸部Caski及び乳房SK-BR3の細胞系はMCM7の過剰発現を示したが、MCM2及びMCM6に

50

関しては発現が低かった。

【実施例 13】

【0249】

一過性のHPV16のE6/E7遺伝子形質移入による293細胞中の頸部バイオマーカーの発現の誘発

TaqMan(登録商標)リアルタイムPCRアッセイを用いて、HEK293細胞系の系における頸部バイオマーカーの発現と高リスクHPV癌遺伝子の転写との関連を調査した。

【0250】

実験の設計及びプロトコル

テトラサイクリン調節性の発現系(T-Rex System、Invitrogen, Inc社製)を本実験に
適応させた。HPV16のE2、E6又はE7タンパク質を発現するT-Rexベクターを構
築した。突然変異体E2、E6又はE7遺伝子を含むベクターを陰性対照として利用した
。その後、T-Rexの293細胞にHPVプラスミドを形質移入し、テトラサイクリンによ
って4時間、24時間及び72時間、HPV遺伝子の発現を活性化させた。RNeasy(登録
商標)Protect Miniキット(Qiagen社製、カリフォルニア州Valencia)によって形質移入
した細胞から全細胞RNAを抽出し、High-Capacity cDNA Archive Kit(Applied Biosys
tems社、P/N: 4322171)を用いてランダムな六量体を有する一本鎖cDNAの
形態へと変換した。TaqMan(登録商標)Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems
, Inc.社製、カリフォルニア州Foster City)を用いて、ABI Prism社製(登録商標)7700
Sequence Detection SystemでリアルタイムPCRを行った。

10

20

【0251】

ABI社製Primer Express(商標)プログラム、v1.5を用いて、MCM2、MCM6
、MCM7、TOP2A、サイクリンE1、p21、p14、HPV16のE2、E6及
びE7を特異的に増幅するためのプライマー並びにプローブを設計した。MCM7は4つ
の転写変異体を含み、転写変異体1(T1、参照配列NM_005916)及び転写変異
体2(T2、参照配列NM_182776)がNCBI Entrezヌクレオチドデータベース中
で同定された。NCBIのModel MakerのESTアセンブリによって解析すると、変異体T3
及びT4は5'末端付近に代替エクソンを有する。プライマー及びプローブは、それぞれ
具体的に変異体T1及びT3、T2及びT4、T2、並びにT3及びT4を検出するため
に、T1T3、T2T4、T2並びにT3T4として設計した。プライマー及びプローブ
の配列は実施例10及び11に示した。

30

【0252】

プローブの5'塩基を蛍光色素FAM(6-カルボキシフルオレセイン)で、且つ3'
塩基を消光色素TAMRA(6-カルボキシテトラメチルローダミン)で標識した。18
SリボソームRNAを内在コントロールとして利用した。18S rRNAプローブを蛍
光色素VIC(商標)で標識した。事前に開発された18S rRNAプライマー/プロ
ーブ混合物をApplied Biosystems社から購入した。10ngのcDNAを、それぞれ0.
9µM及び0.25µMのプライマー及びプローブを全体積25µl中に含む反応混合物
に施用した。増幅条件は、50℃で2分間、95℃で10分間、並びに95℃で15秒間
及び60℃で60秒間の2ステップのサイクルを、合計40サイクルであった。少なくと
も3つの非鋳型対照反応混合物をそれぞれの実行に含めた。すべての実験は2つ組で行っ
た。18S内在コントロールに対する標的遺伝子の発現レベルを計算するために相対的定
量方法を用い、ABI社の使用者の手引きに従ってそのCT値に基づいて行った(P/N4
303859)。

40

【0253】

結果

T-Rexの293細胞中でのHPV16のE2、E6及びE7遺伝子の発現は、形質移入
の時間経過を通して増加することが観察された。T-Rexの293細胞中でのTopo2A
、MCM2、MCM6、MCM7及びサイクリンEのmRNA発現は、HPV16のE6
又はE7遺伝子によって、形質移入後4時間から72時間までに顕著に誘発された。しか

50

し、p 2 1 及び p 1 4 では H P V 遺伝子の形質移入後に発現レベルの上昇は検出されなかった。E 6 又は E 7 の発現は E 2 遺伝子の同時形質移入によって抑制されないと考えられる。これは、E 6 又は E 7 の発現が天然の H P V プロモーターではなく外部 C M V プロモーターに完全によって駆動されていたからである。後者は本モデルシステム中に存在しない。

【 0 2 5 4 】

表 5 8 : T o p o 2 A

形質移入	0時間	0時間 のSD	4時間	4時間 のSD	24時間	24時間 のSD	72時間	72時間 のSD
293-H16E2	6.91	0.07	5.22	0.13	5.68	0.14	6.61	0.36
293-H16E6	6.91	0.07	11.31	0.22	18.13	0.89	17.39	0.85
293-H16E7	6.91	0.07	20.33	0.9	28.94	0.71	35.02	1.03
293- H16dE7	6.91	0.07	6.43	0.35	8.18	0.64	7.39	0.18
293-LacZ	6.91	0.07	7.4	0.07	7.36	0.22	7.25	0.67

10

【 0 2 5 5 】

表 5 9 : M C M 2

形質移入	0時間	0時間 のSD	4時間	4時間 のSD	24時間	24時間 のSD	72時間	72時間 のSD
293-H16E 2	4.79	0.23	5.25	0.36	5.24	0.31	4.44	0.3
293-H16E 6	4.79	0.23	6.04	0.21	9.38	0.37	12.08	0.18
293-H16E 7	4.79	0.23	10.81	0.16	12.29	0.36	16.34	0.8
293- H16dE7	4.79	0.23	5.72	0.36	4.98	0.27	5.03	0.39
293-LacZ	4.79	0.23	5.67	0.61	5.68	0.47	5.98	0.79

20

30

【 0 2 5 6 】

表 6 0 : M C M 6

形質移入	0時間	0時間 のSD	4時間	4時間 のSD	24時間	24時間 のSD	72時間	72時間 のSD
293-H16E 2	3.62	0.2	3.5	0.22	4.72	0	4.44	0.26
293-H16E 6	3.62	0.2	4.74	0.07	9.03	0.04	9.68	0.43
293-H16E 7	3.62	0.2	7.7	0.04	13.5	0.33	14.03	0.41
293- H16dE7	3.62	0.2	5.23	0.28	4.6	0.32	4.73	0.37
293-LacZ	3.62	0.2	4.77	0.12	4.66	0.14	5.34	0.39

40

【 0 2 5 7 】

表 6 1 : MCM 7

形質移入	0時間	0時間 のSD	4時間	4時間 のSD	24時間	24時間 のSD	72時間	72時間 のSD
293-H16E 2	4.2	0.04	6.3	0.28	5.3	0.18	5.8	0.31
293-H16E 6	4.2	0.04	4.99	0.05	9.55	0.23	15.24	0.3
293-H16E 7	4.2	0.04	10.11	0.84	14.23	0.84	21.18	0.31
293- H16dE7	4.2	0.04	3.65	0.3	6.06	0.3	4.64	0.07
293-LacZ	4.2	0.04	5.74	0.45	5.31	0.55	5.66	0.17

10

【 0 2 5 8 】

表 6 2 : サイクリン E 1

形質移入	0時間	0時間 のSD	4時間	4時間 のSD	24時間	24時間 のSD	72時間	72時間 のSD
293-H16E 2	6.02	0.00	5.06	0.10	5.03	0.35	5.72	0.31
293-H16E 6	6.02	0.00	9.19	0.18	8.95	0.79	9.38	0.18
293-H16E 7	6.02	0.00	12.91	0.38	17.63	0.17	17.32	0.25
293- H16dE7	6.02	0.00	5.45	0.24	6.87	0.20	5.11	0.08
293-LacZ	6.02	0.00	5.72	0.31	6.28	0.37	5.65	0.64

20

【 0 2 5 9 】

表 6 3 : p 2 1

形質移入	0時間	0時間 のSD	4時間	4時間 のSD	24時間	24時間 のSD	72時間	72時間 のSD
293-H16E 2	4.76	0.19	4.05	0.30	5.19	0.61	4.92	0.60
293-H16E 6	4.76	0.19	5.56	0.19	5.60	0.08	7.21	0.07
293-H16E 7	4.76	0.19	7.52	0.29	5.22	0.13	6.45	0.13
293- H16dE7	4.76	0.19	4.38	0.26	5.60	0.66	5.10	0.05
293-LacZ	4.76	0.19	3.86	0.00	4.53	0.27	5.37	0.29

30

40

【 0 2 6 0 】

表 6 4 : p 1 4

形質移入	0時間		4時間		24時間		72時間	
	0時間	のSD	4時間	のSD	24時間	のSD	72時間	のSD
293-H16E2	4.78	0.30	4.44	0.09	5.04	0.44	5.04	0.07
293-H16E6	4.78	0.30	4.77	0.12	5.48	0.13	4.52	0.11
293-H16E7	4.78	0.30	6.38	0.62	5.60	0.25	6.43	0.35
293-H167	4.78	0.30	5.08	0.12	5.53	0.35	5.10	0.15
293-LacZ	4.78	0.30	4.54	0.40	4.68	0.16	5.76	0.25

【 0 2 6 1 】

10

表 6 5 : H P V 1 6 E 2

	E2	E6	E7	dE2	dE6	dE7	E2 +E6	E2 +E7	dE2 +E6	dE2 +E7	LacZ	偽 似
4時間	130.22	0	0	110.7	0	0	95.34	36.6	3.94	12.86	0	0
24時間	162.12	0	0	111.41	0	0	118.17	90.19	19.77	7.7	0	0
72時間	251.55	0	0	141.57	0	0	162.54	128.41	32.94	9.89	0	0

【 0 2 6 2 】

20

表 6 6 : H P V 1 6 E 6

	E2	E6	E7	dE2 2	dE6 7	dE7	E2 +E6	E2 +E7	dE2 +E6	dE2 +E7	Lac Z	偽 似
4時間	0	205	0	0	219.8 7	0	128.4 1	0	199.65	0	0	0
24時間	0	329.6 7	0	0	225.9 6	0	158.3 1	0	188.03	0	0	0
72時間	0	757.2 6	0	0	315.2 2	0	392	0	271.55	0	0	0

【 0 2 6 3 】

30

表 6 7 : H P V 1 6 E 7

	E 2	E 6	E7	dE 2	dE 6	dE7	E2 +E 6	E2 +E7	dE2 +E 6	dE2 +E7	Lac Z	偽 似
4時間	0	0	330.7 6	0	0	165.4 8	0	120.65	0	201.19	0	0
24時間	0	0	1514. 6	0	0	239.6 3	0	857.89	0	600.57	0	0
72時間	0	0	2806. 8	0	0	355.9	0	1444.2 5	0	809.11	0	0

40

【 実施例 1 4 】

【 0 2 6 4 】

スライド前処理緩衝液を用いて免疫細胞化学的方法及び免疫組織化学的方法において抗原のアクセシビリティを増加させる方法

標本の選択及び試薬の説明

バイオマーカーの過剰発現を検出するために、同一患者由来の細胞診断標本と組織学的標本との対を免疫アッセイに供した。A S C U S (3)、L S I L (6)、及びH S I L (5)と分類された患者由来のパラフィンブロック組織試料及びSurePath(登録商標)細

50

胞診断標本を解析した。用いた試薬は、抗体カクテル（細胞診断用）、改変抗体カクテル（組織学用）、検出試薬、対比染色剤、及びSureSlide（登録商標）調製緩衝液 10 ×（前処理緩衝液）であった。

【0265】

細胞診断用スライドの調製及び自動免疫細胞化学

免疫細胞化学では、スライドの調製及び前処理を実施例 5 で指示したように実施した。その後、各細胞診断標本で、1 点を除いては実施例 5 に記載のように自動免疫細胞化学を行った。本実験では、一次抗体カクテル（1：10，000 の MCM2 クローン 26H6・19、1：800 の MCM2 クローン 27C5・6、1：1000 の TOPOLIA クローン SWT3D1）のインキュベーションを 30 分間に短縮した。

10

【0266】

組織学用スライドの調製及び自動免疫組織化学

それぞれの症例について、4 ミクロンの切片を切り出して、終夜又は 70 の強制通風炉中で 20 分間乾燥させた。キシレンで 5 分間ずつ、3 回交換して切片の脱パラフィン化を行った。その後、無水アルコールで 5 分間ずつ、スライド清澄にした。スライドを水に入れ、十分にすすいだ。スライドを予熱した 1 × SureSlide 調製緩衝液の溶液に移し、スチーマー中で 25 分間、インキュベーションを行った。スライドをスチーマーから取り出し、室温で 20 分間冷却した。緩衝液が完全に交換されるまでスライドをゆっくりと水ですすいだ。TBST のすすぎを 2 回交換して 2 分間ずつ行った。

【0267】

2 点を除いては免疫細胞化学について実施例 5 に記載のように、自動免疫組織化学を実施した。本実験では、一次抗体カクテルのインキュベーションを 30 分間に短縮した。さらに、一次抗体カクテルを以下の希釈率に改変した（1：4，000 の MCM2 クローン 26H6・19、1：200 の MCM2 クローン 27C5・6、1：400 の TOPOLIA クローン SWT3D1）。

20

【0268】

結果

RUO 試薬を用いて、組織学的標本及び細胞診断標本のいずれについても予測された染色パターンが観察された。具体的には、SureSlide（登録商標）調製緩衝液、検出試薬及び対比染色試薬を用いて、組織学的標本並びに細胞診断標本のどちらにおいても免疫染色を行う能力の実証が成功した。

30

【0269】

表 68 : バイオマーカーヌクレオチド及びアミノ酸配列情報

バイオマーカー名	ヌクレオチド配列		アミノ酸配列	
	アクセッション番号	配列識別子	アクセッション番号	配列識別子
サイクリンE1 (アイソフォーム1)	NM_001238	配列番号1	NP_001229	配列番号2
サイクリンE1 (アイソフォーム2)	NM_057182	配列番号3	NP_476530	配列番号4
サイクリンE2 (アイソフォーム1)	NM_057749)	配列番号5	NP_477097	配列番号6
サイクリンE2 (アイソフォーム2)	NM_057735	配列番号7	NP_477083	配列番号8
サイクリンE2 (アイソフォーム3)	NM_004702	配列番号9	NP_004693	配列番号10
MCM2	NM_004526	配列番号11	NP_0045417	配列番号12
MCM6	NM_005915	配列番号89	NP_005906	配列番号90
MCM7 (アイソフォーム1)	NM_005916	配列番号13	NP_005907	配列番号14
MCM7 (アイソフォーム2)	NM_182776	配列番号15	NP_877577	配列番号16
p21/waf1 (変異体1)	NM_000389	配列番号17	NP_000380	配列番号18
p21/waf1 (変異体2)	NM_078467	配列番号19	NP_510867	配列番号20
p14ARF	NM_058195	配列番号21	NP_478102	配列番号22
Topo2a	NM_001067	配列番号23	NP_0010568	配列番号24

10

20

【 0 2 7 0 】

上記の説明及び実施例に鑑みて、当業者は、本発明の方法により、従来の実施と比較して年齢に無関係に高悪性度子宮頸部疾患の優れた検出が可能となることを理解されよう。本発明の方法は、以下に記述するように具体的に使用し得る：

30

- ・ 30歳を超える女性では、試験はHPV陽性結果を反映して、又はASCUS + 細胞診断結果を反映して行い得る。
- ・ 30歳未満の女性では、試験は高悪性度子宮頸部疾患を検出するための細胞診断と組み合わせて用い得る。
- ・ 30歳を超える女性では、試験は高悪性度子宮頸部疾患を検出するための細胞診断と組み合わせて用い得る。
- ・ 30歳未満の女性では、試験は高悪性度子宮頸部疾患を検出するための一次スクリーニングとして用い得る。
- ・ 30歳を超える女性では、試験は高悪性度子宮頸部疾患を検出するための一次スクリーニングとして用い得る。
- ・ 試験は30歳未満の女性においてPapスメアの代わりであり得る。
- ・ 最終的には、試験は年齢に無関係にPapスメアの代わりであり得る。

40

【 0 2 7 1 】

本発明の実施から派生する他の潜在的な利点には以下が含まれる：

- ・ NIL / HPV陽性結果を有する30歳以上の女性における組織学的な高悪性度異常の検出。
- ・ DNA + Pap試験に陽性である30歳を超える女性において高悪性度子宮頸部疾患を検出する優れた特異性。
- ・ 年齢に無関係に、ASC-US、ASC-H、及びLSILの分類内の女性におけ

50

る高悪性度子宮頸部疾患の優れた検出性。

- ・ H S I L 分類内において高悪性度頸部を検出する優れた特異性。
- ・ 30歳未満の女性において、細胞診断系の診断と併せて高悪性度子宮頸部疾患が検出されること。
- ・ 年齢に無関係に、細胞診断系の診断と併せて高悪性度子宮頸部疾患が検出されること。
- ・ 30歳未満の女性において、一次スクリーニングとして高悪性度子宮頸部疾患を検出する特異性が向上すること。
- ・ 年齢に無関係に、一次スクリーニングとして高悪性度子宮頸部疾患を検出する特異性が向上すること。
- ・ 子宮頸部疾患の同定及びH P V感染症と高悪性度頸部疾患との区別。
- ・ 手動の解釈又は自動顕微鏡観察による支援解釈を用いて許容されるアッセイ性能が確立できる。

10

【0272】

本明細書中で言及したすべての出版物及び特許出願は、本発明が関する分野の技術者のレベルを示す。すべての出版物及び特許出願は、個々のそれぞれの出版物又は特許出願を具体的且つ個別に参考として組み込んだ場合と同じように、本明細書中に参考として組み込まれている。

【0273】

前述の発明は、理解の明確化のために例示及び実施例によってある程度詳述したが、添付の実施形態の範囲内で特定の変更及び改変を実施し得ることは明らかであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0274】

【図1】頸部異形成における増殖及び細胞周期の調節解除を示す模式的概要図である。細胞周期の変化及び増殖制御により、頸部新形成に欠陥が生じる。H P V感染症並びにE 6及びE 7腫瘍性タンパク質の過剰発現により、細胞周期及び増殖制御に一連の変化が生じる。H P VのE 6腫瘍性タンパク質はG 1 / S及びG 2 / Mの境界における細胞周期チェックポイントを廃止させ、それに続いて体細胞突然変異を有するD N Aが複製される。E 7は、S期への加速を促進し、D N A複製に必要なS期遺伝子の発現が延長される（異常なS期誘発）。同様に、E 6は、テロメラーゼの発現を促進して、増殖及び細胞の不死化の間に染色体テロメアの完全性の持続を保証する。最後に、E 7は、T G F - β シグナル伝達経路を廃止させ、また、G 1停止及び増殖制御のこの制御機構を廃止させる。

30

【図2】頸部新形成における異常なS期誘発を示す模式図である。細胞周期の制御及び増殖に対するH P Vタンパク質の効果には、とりわけ、p 5 3及びR b腫瘍抑制経路の不活性化、E 2 F - 1転写の活性化、S期遺伝子M C M - 2、M C M - 6、M C M - 7、T O P 2 A及びサイクリンE 1の誘導が含まれる。さらに、E 2は、S p - 1転写因子と相互作用してp 2 1 - w a f - 1の遺伝子発現を活性化する。

【図3】細胞周期の異常なS期における細胞増殖に対するフィードバックループを示す模式図である。S期におけるサイクリンE及びC D K 2の過剰発現の結果、S期遺伝子の誘導を可能にする独立した機構が生じる。

40

【図4】異常なS期誘発におけるc - m y cの役割を示す模式図である。c - m y cは、細胞増殖における重要な転写活性化因子である。c - m y cをコードしている遺伝子は染色体上に位置する。これは、この遺伝子領域の対応する増幅に関してH P V 1 8の組込みが記載されているのと同じ部位である。c - m y c遺伝子の増幅はコードされたタンパク質の過剰発現をもたらし、c - m y cレベルの増加は非依存的にS期遺伝子の転写に貢献して細胞増殖をさらに促進するであろう。

【図5】M C M 7転写変異体に向けられたTaqMan（登録商標）プライマーを示す模式図である。

【図6】軽い異形成に罹患した患者及び扁平細胞癌に罹患した患者のI H Cアッセイにおける、C l a u d i n 1に向けられた抗体の分染パターンを例示する図である。

50

【図7】IHC及びICC様式におけるClaudin1に向けられた抗体の染色パターンを例示する図である。正常細胞並びにCINIII及びHSILの指標となる細胞を示す。

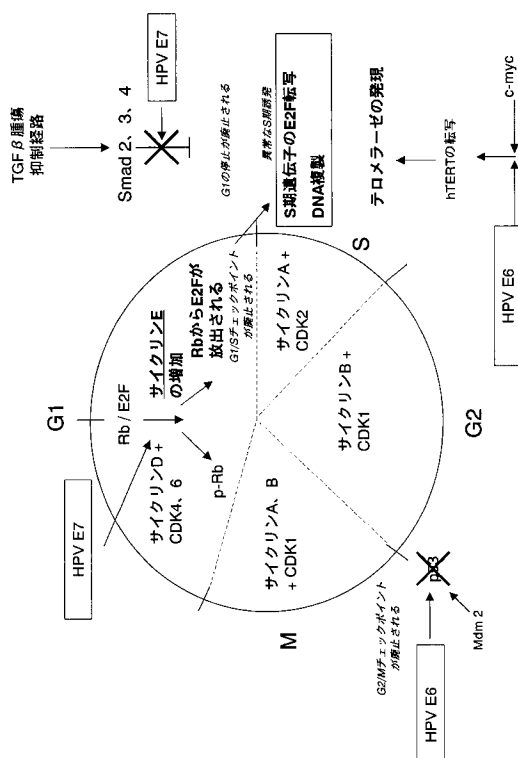
【図8】核バイオマーカー（即ちMCM2）を用いて得られた核染色パターン及び細胞質バイオマーカー（p16）を用いて得られた細胞質染色パターンを例示する図である。結果は、高悪性度子宮頸部疾患の患者試料の免疫細胞化学（ICC）アッセイから得たものである。

【図9】高悪性度子宮頸部疾患に罹患した患者由来の頸部組織上のMCM6に向けられた2つの異なる抗体を用いた免疫組織化学的（IHC、immunohistochemistry）アッセイにおける、望ましい抗体染色及び望ましくない抗体染色を例示する図である。

10

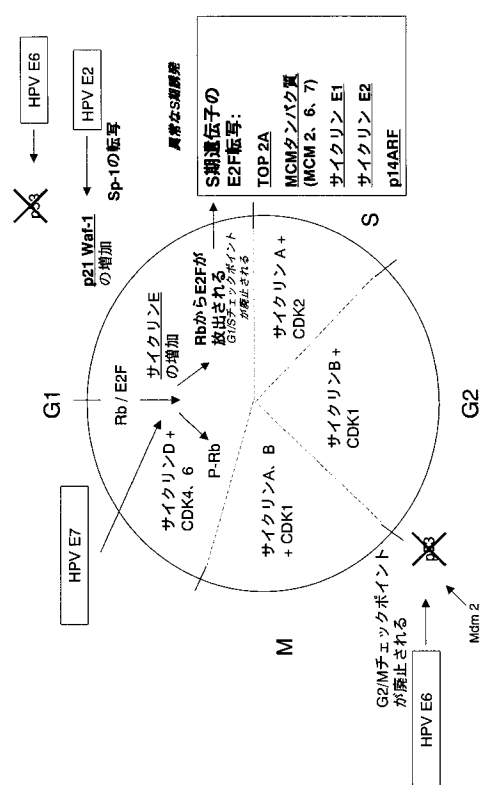
【図1】

頸部異形成における増殖及び細胞周期の調節解除



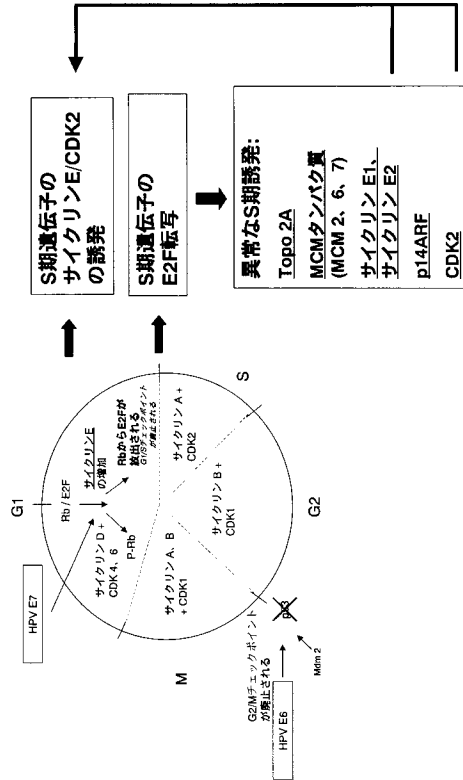
【図2】

頸部新形成における異常なS期誘発



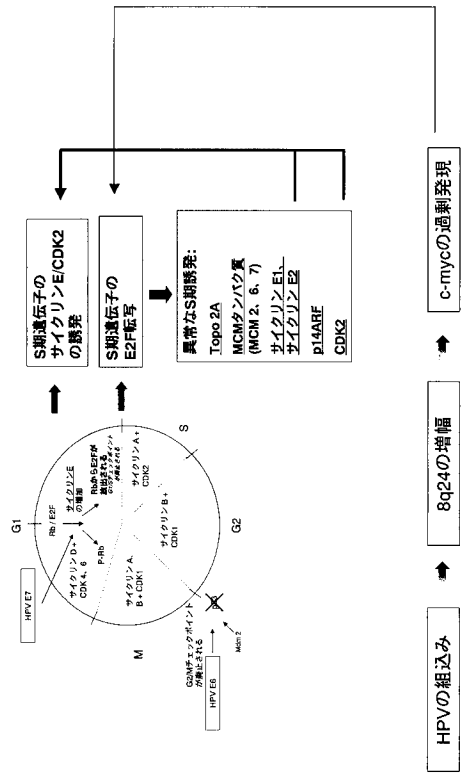
【 図 3 】

頸部新形成における異常なS期誘発



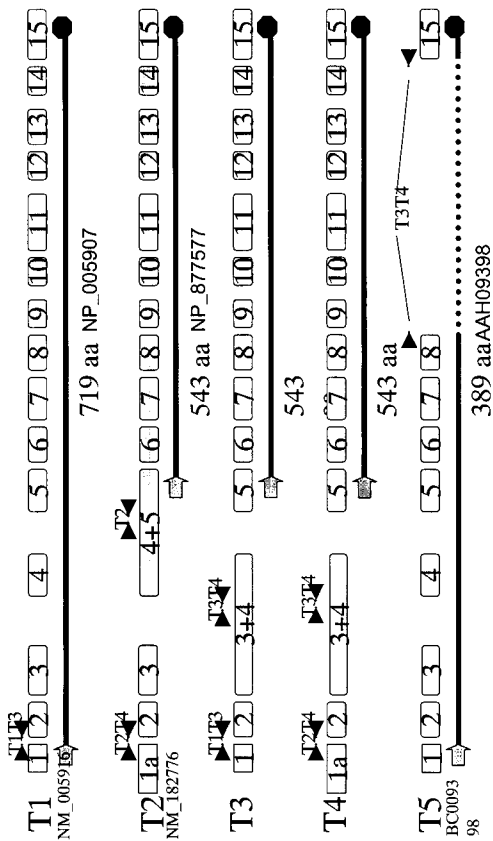
【 図 4 】

頸部新形成における異常なS期誘発



【 図 5 】

MCM 7 転写変異体 : TaqManプライマー



⇒ ORF開始; ● ORF停止; ▶ 順方向プライマー; ◀ 逆方向プライマー;

【 図 6 】

頸部組織試料 (IHC) 中でのClaudin I の発現

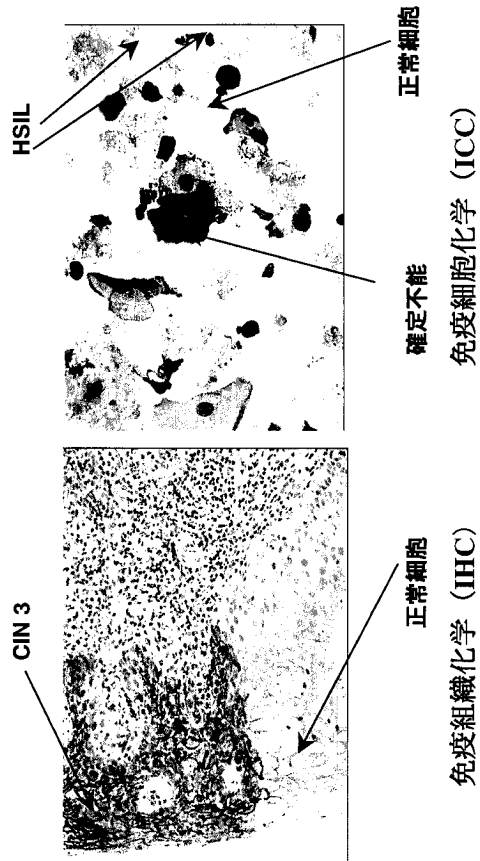


軽い異形成

扁平細胞癌

【 図 7 】

組織 (IHC) 及び細胞診断 (ICC) 試料中のClaudin I発現



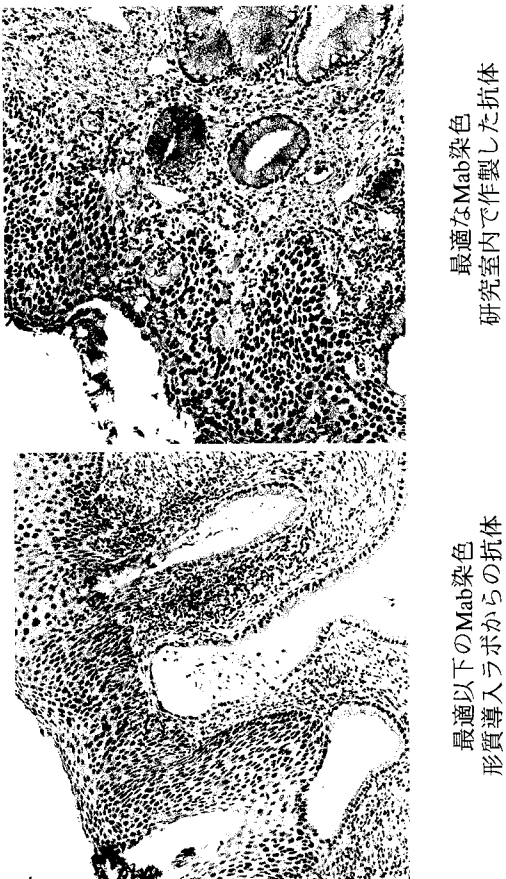
【 図 8 】

高悪性度子宮頸部疾患試料を用いたICCアッセイ



【 図 9 】

異なるMCM6抗体を用いた頸部組織試料 (IHC) 中の分染パターン



【配列表】

2007530949000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: : Application No PC, 052605/009740	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/574 C12Q1/68 C07K16/18 G01N33/53	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12Q C07K	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	BALDWIN P ET AL: "TRANSLATIONAL APPROACHES TO IMPROVING CERVICAL SCREENING" NATURE REVIEWS. CANCER, NATUR PUBLISHING GROUP, LONDON, GB, vol. 3, March 2003 (2003-03), pages 217-226, XP002316388 ISSN: 1474-175X page 221, column 3, paragraph 5; page 223, column 1, paragraph 3; figure 2 -/--
☒ Further documents are listed in the continuation of box C.	
☒ Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "B" document member of the same patent family	
Date of the actual completion of the international search 15 September 2005	Date of mailing of the international search report 02 JAN 2006
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Lonnoy, O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter	Application No
	PC1/US2005/009740

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	-& WILLIAMS G H ET AL: "Improved cervical smear assessment using antibodies against proteins that regulate DNA replication" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 95, no. 25, December 1998 (1998-12), pages 14932-14937, XP002261029 ISSN: 0027-8424	
X	WO 2004/013632 A (MTM LABORATORIES AG; RIDDER, RUEDIGER; REICHERT, ANJA; TRUNK-GEHMACHER) 12 February 2004 (2004-02-12) claims 33,34; table 7	1-5, 8-15, 17-34, 46-57,67
X	WO 02/101075 A (MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC; SCHLEGEL, ROBERT; CHEN, YAN; ZHAO, XU) 19 December 2002 (2002-12-19) page 13, line 4; claim 4	1-15, 17-34, 46-57, 67, 69-75,78

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/009740

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-80

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-80

Methods for diagnosing high grade cervical disease, comprising detecting overexpression of at least one biomarker.

2. claims: 81-88

Slide pretreatment buffer comprising 0.05% to 5% sodium laureth-13-carboxylate, and method for preparing a sample using said buffer.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

Inter	Application No
PCT/JP2005/009740	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004013632 A	12-02-2004	AT 261126 T AU 2003262554 A1 CA 2487048 A1 CN 1675550 A DE 60200248 D1 DE 60200248 T2 DK 1388734 T3 EP 1388734 A1 ES 2215957 T3 JP 2005534313 T US 2004023288 A1	15-03-2004 23-02-2004 12-02-2004 28-09-2005 22-04-2004 27-01-2005 03-05-2004 11-02-2004 16-10-2004 17-11-2005 05-02-2004
WO 02101075 A	19-12-2002	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 テイラー アドリアン ジェイ .

アメリカ国 エヌシー 2 7 7 1 3 ダーラム スプレディングオークコート 1 1

(72)発明者 パーカー マーガレット アール .

アメリカ国 エヌシー 2 7 6 1 5 ラレイ レインウォーターロード 7 1 1 6

F ターム(参考) 4B024 AA11 CA09 CA12 CA20 HA11 HA13 HA14

4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ08 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR35 QR40

QR42 QR48 QR55 QR56 QR62 QS16 QS25 QS33 QS34 QS36

QX01 QX02

专利名称(译)	用于检测宫颈疾病的方法和组合物		
公开(公告)号	JP2007530949A	公开(公告)日	2007-11-01
申请号	JP2007505150	申请日	2005-03-23
申请(专利权)人(译)	TRIPATH Imejingu墨		
[标]发明人	フィッシャーティモシージェイ マリノウスキーダグラスピー テイラーアドリアンジェイ パーカーマーガレットアール		
发明人	フィッシャー ティモシー ジェイ. マリノウスキー ダグラス ピー. テイラー アドリアン ジェイ. パーカー マーガレット アール.		
IPC分类号	G01N33/574 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 C12N15/09 C07K16/18 C07K16/30 C12P19/34 C12Q1/70 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57411 C07K16/3069 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G01N33/6875 G01N2333/025		
FI分类号	G01N33/574.ZNA.A C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.Y C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/HA11 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR56 4B063/QR62 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX01 4B063/QX02		
优先权	60/556495 2004-03-24 US		
其他公开文献	JP4545189B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于鉴定患者样品中的高度子宫颈疾病的方法和组合物。本发明的方法包括检测体样品中至少一种生物标志物的过表达，其中生物标志物在高级别宫颈疾病中选择性过表达。在特定的权利要求中，身体样品是子宫颈涂片或单层宫颈细胞。本发明的生物标志物包括参与细胞周期调节，信号转导和DNA复制和转录的基因和蛋白质。在特定的权利要求中，生物标志物是S期基因。在本发明的一些方面，使用生物标志物特异性抗体在蛋白质水平检测感兴趣的生物标志物的过表达，或使用核酸杂交技术在核酸水平检测过表达。进一步提供了用于实施本发明方法的试剂盒。

