

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 207509

(P2003 - 207509A)

(43)公開日 平成15年7月25日(2003.7.25)

(51)Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	D 4 B 0 6 3
			M
			Y
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 49数)

(21)出願番号 特願2001 - 384300(P2001 - 384300)

(22)出願日 平成13年12月18日(2001.12.18)

特許法第30条第1項適用申請有り 2001年6月20日 配布の「プログラム&アブストラクト」に発表

(71)出願人 591003013

エフ・ホフマン - ラ ロシュ アーゲー

F . HOFFMANN - LA ROC

HE AKTIENGESSELLSCH

AFT

スイス・シーエイチ - 4070バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ124

(72)発明者 ゲルハルト ライエンデッカー

ドイツ連邦共和国 ダルムシュタット 64

287 ディーブルガーシュトラッセ 209

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 月経血からの子宮内膜症の診断

(57)【要約】

【課題】子宮内膜症の分野の臨床診断の常套手法において、一般に受け入れられるか、または広範に使用される手段を提供すること。

【解決手段】(a) 月経血の試料を得る工程

(b) 該試料中の基底細胞を測定する工程または(c) 該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物を測定する工程および(d) (b) または(c) における測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程を含む、子宮内膜症の診断方法、ならびに(a) 月経血の試料を得る工程

(b) 該試料中の基底細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物の量を測定する工程、(c) 該試料中の子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物の量を測定する工程、(d) (b) の(c) に対する相対量を評価する工程および(e) 該相対量(d) を子宮内膜症と関連させる工程を含む、子宮内膜症の診断方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (a) 月経血の試料を得る工程 (b) 該試料中の基底細胞を測定する工程または (c) 該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物を測定する工程および (d) (b) または (c) における測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程を含む、子宮内膜症の診断方法。

【請求項2】 該遺伝子産物がポリペプチドである、請求項1記載の方法。

【請求項3】 基底細胞が免疫組織学により測定される、請求項1記載の方法。

【請求項4】 該遺伝子産物が、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体および p 4 5 0 アロマターゼからなる群より選ばれる、請求項2記載の方法。

【請求項5】 該ポリペプチドがイムノアッセイで測定される、請求項2記載の方法。

【請求項6】 該イムノアッセイがサンドイッチイムノアッセイである、請求項5記載の方法。

【請求項7】 該遺伝子産物が mRNA である、請求項1記載の方法。

【請求項8】 (a) 月経血の試料を得る工程 (b) 該試料中の基底細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物の量を測定する工程、 (c) 該試料中の子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物の量を測定する工程、 (d) (b) の (c) に対する相対量を評価する工程および (e) 該相対量 (d) を子宮内膜症と関連させる工程を含む、子宮内膜症の診断方法。

【請求項9】 該子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物が、細胞骨格のタンパク質および 1 7 β H S D - I I 型からなる群より選ばれる、請求項8記載の方法。

【請求項10】 該子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物が 1 7 β H S D - I I 型である、請求項9記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は子宮内膜症の診断方法に関する。該方法は、月経血の試料を得る工程、該試料中の基底細胞を測定する工程または該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物を測定する工程と該測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程とを含む。

【0002】

【従来の技術】子宮内膜症は、子宮外（異所性）部位での子宮内膜細胞の成長を特徴とする、一般的で痛みを伴う疾患である。子宮内膜組織の異所性の移植および成長は、腹壁の腹膜上、および主に下腹部の腸、卵巣およびファローピウス管を含む種々の器官の外表面で見られる（ピガノ(Vigano), P.ら、Fertil Steril 56 (1991) 89 4-9）。

【0003】子宮内膜症の原因および病因に関する様々

な説が提唱され、現在、対応する科学文献において考察されている。

【0004】第1の仮説では、子宮内膜症を自己免疫疾患とみなす。この説は、多くの患者の血清において「自己抗原」に対する抗体が見られるという所見に基づく。いくつかの診断の作業は、子宮内膜症患者由来の血清に見られる自己抗体の検出および測定に基づくものである（国際公開第01/79864号パンフレット）。

【0005】子宮内膜症の病因に関する第2の仮説は、いわゆる「異所性移植説」 Sampson (Sampson), J. A., Am. J. Obstet. Gynaecol. 14 (1927) 422-429であるが、第3の仮説は、子宮内膜症を子宮内膜組織の「化生」により説明している（マイヤー (Meyer), R., Zbl. Gynaek. 43 (1919) 745-750）。いくつかの報告は、異常な免疫機能と関連しているかもしれない逆行性月経が、異所性子宮内膜病変の確立にある役割を果たし得ることを示唆している（イシムラ (Ishimura), T. およびマスザキ (Masuzaki), H., Am J Obstet Gynecol 165 (1991) 210-4）。

【0006】最近、子宮内膜症および腺筋症が、重要な原因因子である子宮の蠕動および蠕動亢進を伴う同じ疾患過程の異型であることがわかった。腺筋症は、慢性的な子宮の蠕動および蠕動亢進により引き起こされる基底子宮内膜の子宮筋層裂開への浸潤により生じ得ること、および腺筋症の筋肉成分が浸潤性子宮内膜支質の化生から続発的に生じうることが提案された（クンツ (Kunz), G.ら、Hum Reprod 15(2000) 76-82）。さらに、子宮内膜症が、増殖および浸潤性成長の可能性がより高い、子宮内膜細胞の剥離から生じ得ること、および該剥離子宮内膜細胞の腹腔内への子宮蠕動亢進（この場合、該剥離子宮内膜細胞は腹腔表面上に移植される）による経卵管 (transutal) 輸送の増大により生じうることが示唆された（ライエンデッカー (Leyendecker), G. ら、Hum Reprod 11 (1996) 1542-51; ライエンデッカー (Leyendecker), G. ら、Hum Reprod Update 4 (1998) 752-62; ライエンデッカー (Leyendecker), G., Hum Reprod 15 (2000) 4-7）。

【0007】子宮内膜組織は、体循環血系 (body blood system) により維持されており、これと関連している。理論的には、その「真の」病因とは独立して、この疾患の存在 (entity) を示す血中マーカー分子を検出することにより、血液から子宮内膜症を診断しうる。いくつかのアプローチが、血液または組織試料からのマーカー分子の検出に基づいて子宮内膜症を診断するための診断手順に関する特許文献により知られている。例えば、国際公開第99/63116号パンフレットには、子宮内膜組織におけるプロチモシン (prothymosin) のアップレギュレーションが記載されており、特に血液または子宮内膜症の生検試料からの子宮内膜症の診断におけるプロチモシンの使用のためのアプローチが記載されている。

【0008】しかしながら、これまで、生化学的または免疫学的マーカーは、子宮内膜症の分野においてかかるツールが必要に迫られているにもかかわらず、一般に受け入れられておらず、臨床診断の常套手法において広範に使用されてもいないようである。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、子宮内膜症の分野の臨床診断の常套手法において、一般に受け入れられるか、または広範に使用される手段を提供することである。

【0010】

【課題を解決するための手段】当該技術分野で知られた試みにおいて、血液または血液成分が子宮内膜症の診断に主に使用されるが、今や驚くべくことに、子宮内膜症を月経血の分析により診断しうることがわかった。

【0011】月経周期の正常な結果として剥落する子宮内膜組織はかなりの量があるが、今や、子宮内膜の特定の層、いわゆる「第Ⅴ基底子宮内膜領域」に由来する遺伝子産物の検出が可能であることが確立された。その断片は、子宮内膜病変のない女性の月経血には見られないか、または稀に見られるだけだが、子宮内膜症を患う女性の月経血試料中には頻繁に見られる。

【0012】したがって、第一態様では、本発明は、月経血の試料を得る工程と、該試料中の基底子宮内膜の細胞を測定する工程または該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物を測定する工程と、該測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程とを含む子宮内膜症の診断方法に関する。

【0013】好ましくは、かかる基底細胞から検出される遺伝子産物は、mRNAまたはポリペプチドである。かかるポリペプチドは、例えば免疫組織学により、またはイムノアッセイの補助により容易に検出される。

【0014】さらに好ましい態様では、本発明は、月経血の試料を得る工程、該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物の量を測定する工程、該試料中の子宮内膜の機能層の細胞の遺伝子産物の量を測定する工程、基底子宮内膜に典型的な遺伝子産物の子宮内膜の機能層の遺伝子産物に対する相対量を評価する工程および該相対量を子宮内膜症と関連させる工程を含む子宮内膜症の診断方法に関する。

【0015】すなわち、本発明の要旨は、下記：

〔1〕 (a) 月経血の試料を得る工程 (b) 該試料中の基底細胞を測定する工程または (c) 該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物を測定する工程および (d) (b) または (c) における測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程を含む、子宮内膜症の診断方法、〔2〕 該遺伝子産物がポリペプチドである、〔1〕記載の方法、〔3〕 基底細胞が免疫組織学により測定される、〔1〕記載の方法、

〔4〕 該遺伝子産物が、エストロゲン受容体、プロゲ

ステロン受容体およびp450アロマターゼからなる群より選ばれる、〔2〕記載の方法、〔5〕 該ポリペプチドがイムノアッセイで測定される、〔2〕記載の方法、〔6〕 該イムノアッセイがサンドイッチイムノアッセイである、〔5〕記載の方法、〔7〕 該遺伝子産物がmRNAである、〔1〕記載の方法、〔8〕

(a) 月経血の試料を得る工程 (b) 該試料中の基底細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物の量を測定する工程、(c) 該試料中の子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物の量を測定する工程、(d) (b) の (c) に対する相対量を評価する工程および (e) 該相対量 (d) を子宮内膜症と関連させる工程を含む、子宮内膜症の診断方法、〔9〕 該子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物が、細胞骨格のタンパク質および17βHSD - II型からなる群より選ばれる、〔8〕記載の方法、ならびに〔10〕 該子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物が17βHSD - II型である、〔9〕記載の方法、である。

【0016】

【発明の実施の態様】本発明の方法および本発明より達成される進歩を十分に理解および評価するため、女性の子宮内に含まれる種々の組織、その系統発生的起源ならびに月経周期の過程におけるその性質および変化について、ある程度詳細に記載することが必要である。

【0017】子宮は、内側の原子宮(archimetra)および外側の新子宮(neometra)の2つの異なる器官から構成される(ノエ(Noe), M. ら, Hum Reprod 14 (1999) 190-7、特に、その中の図5)。子宮内膜の上皮細胞、子宮内膜支質、および子宮内膜下(subendometrial)、子宮筋層(原子宮筋層(archimyometrium)または機能層領域子宮筋層)は、系統発生的にかなり古い組織であり、したがって原子宮膜(archimetrium)とよばれる。子宮筋層に加え、血管層および血管上層に代表される系統発生的に後からの筋層の獲得は、胎生条件下での分娩に必要とされる力に関連するようである。

【0018】系統発生的または個体発生的には、原子宮、すなわち子宮内膜 - 子宮内膜下ユニットは、子宮の最も古い部分を構成し(したがって、その名称が原子宮)、子宮内膜上皮および子宮内膜支質ならびに主に筋線維の環状配列を有する、その下の子宮筋層の血管下層から構成される。子宮内膜および子宮内膜下子宮筋層は、ともに周期性パターンのステロイドホルモン受容体発現を示すが、子宮筋層の他の2層、主に筋線維の縦方向配列を有する外側の血管上層および短筋束の三次元網目構造からなる血管層(ベルテ(Werth), R. およびグラスデュー(Grusdew), W., Arch. Gynaekol. 55 (1898) 325-409; ウェッツスไตน์(Wetzstein, R., Arch. Gynecol. 202 (1965) 1-13) は、むしろ、周期を通じて継続的なエストロゲン受容体(ER)およびプロゲステロン受容体(PR)の両方の高発現を示す(ノエ(Noe) ら、

上記)。原子宮のみが中腎傍起源であり、一方、外側層の新子宮は、非ミューラー(Muellerian)起源(ベルテ(Werth)およびグラスデュー(Grusdew)、上記)である。血管下層と血管層との間には、2層の筋線維が混じっている点で十分な構造的接触がある(ベルテ(Werth)およびグラスデュー(Grusdew)、上記)。この移行領域(TZ)は、血管層の内部の約4分の1(quart)を構成し、中程度の周期性パターンのステロイド受容体発現を示す(ノエ(Noe)ら、上記)。

【0019】機能層(functionalis)は、月経周期中に最も変化する子宮内膜組織である。月経周期の前半では、機能層は、エストラジオールの影響下で増殖し、排卵後のプロゲステロンの上昇に伴って、分泌性子宮内膜に変換され、非妊娠周期の最後に剥落する。機能層は、2層(第Ⅰ機能層領域および第Ⅱ機能層領域)からなる。第Ⅱ層は機能層と基底層の間の中間層である。基底第Ⅴ子宮内膜領域は、腺の底部の最も内部の子宮内膜層である。それは、分泌性への変換を受けず、通常、月経中に剥落せず、周期の最後で最も活性であり、子宮内膜の再形成の可能性を有する。4層はすべて、上皮および支質から構成される(パジクラ(Padykula), H.A.ら、Biol Reprod 40 (1989) 681-90; オクリッツ(Okulicz), W.C.ら、Biol Reprod 49 (1993) 24-32)。

【0020】子宮内膜の第Ⅴ層は、「基底子宮内膜」とも呼ばれる。本発明の語義(sense)において、「基底細胞」または「基底層細胞」または「基底子宮内膜の細胞」とは、子宮内膜の第Ⅴ層の細胞をいう。

【0021】本発明によれば、「機能層」の「機能層細胞」は、子宮内膜の第Ⅰ層および第Ⅱ層に含まれる細胞である。

【0022】分泌期の最後および月経の開始時、有糸分裂活性、したがって増殖活性は、霊長類の子宮内膜の基底第Ⅴ領域にのみ存在するが、すべての機能層および基底第Ⅱ領域有糸分裂休止においては普通に存在する(パジクラ(Padykula)ら、上記; オクリッツ(Okulicz)ら、上記)。さらに、支質周囲の(peristromal)平滑筋細胞は、すべての表面腹腔子宮内膜病変に存在すること、およびそれらは、剥落して移植された子宮内膜の支質化生から生じ得ることが示されており(アナフ(Anaf), V.ら、Hum Reprod 15 (2000) 767-71)、これは、主要形態学的成分、すなわち、子宮内膜上皮、子宮内膜支質および平滑筋組織に関して、子宮内膜症と腺筋症との間に主要な違いがないことを示す。

【0023】驚いたことに、腺筋症および子宮内膜症は基底子宮内膜の移動により生じること - 腺筋症は子宮筋層壁への基底層の直接浸潤により生じ、子宮内膜症は月経中の第Ⅴ基底層領域の断片の剥離およびその腹腔内への移植後に生じることがわかった。さらに驚いたことに、月経血からの子宮内膜症の診断が、基底細胞または基底細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物の特異

的検出に基づいて可能であることを示し得る。

【0024】第一態様では、本発明は、月経血の試料を得る工程と、該試料中の基底細胞を測定する工程または該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物を測定する工程と、該測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程とを含む子宮内膜症の診断方法に関する。

【0025】さらに好ましい態様において、本発明は、月経血の試料を得る工程、該試料中の基底細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物を測定する工程および該測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程を含む子宮内膜症の診断方法に関する。

【0026】先に論じたように、子宮内膜症の病因に関していくつかの説および一貫しない専門用語が当該技術分野において存在する。

【0027】本発明の語義において、「子宮内膜症」とは、文献において子宮内膜症および腺筋症として知られる局面の両方を包含することを意図する。

【0028】上述のように、本発明の方法は、月経血の試料に基づく。本発明の語義において「月経血」とは、月経中に腔出血から種々の手段により回収しうる赤血球含有体液をいう。好ましい態様では、月経血を膣円蓋後部から直接回収する。月経血を回収する他の方法は、パッドおよびタンポンなどの吸収材の使用ならびにその適切な抽出である。また、設定した時間(timed)の試料に由来する月経血を評価すること、すなわち出血開始後の同日に採取した試料を比較することが好ましい。

【0029】本発明は、「基底細胞に典型的」である「遺伝子産物」(特にmRNAまたはポリペプチド)を利用する。

【0030】当業者は、常套的手段により、遺伝子産物が、第Ⅴ層に典型的(すなわち、機能層の細胞と比較して有意に高レベルで第Ⅴ層に見られる)か否かを容易に評価することができ、または特異的である(第Ⅴ層に存在し、機能層の細胞において検出可能なレベルの同じ遺伝子産物が本質的にない)とみなすことができる。また、「典型的」および「特異的」に評価するための定量的な常套手法をいつでも使用し(at hand)、必要と思われる場合に使用しうる。

【0031】本発明の語義において、遺伝子産物は、他の子宮内膜層の細胞と比較して基底細胞中における遺伝子産物が少なくとも2倍またはそれより多いか、または多くて半分またはそれより少ない量で見られる場合、典型的または基底子宮内膜のマーカー分子であるとみなされる。より好ましくは、該遺伝子産物の量は、機能層の細胞と比較して少なくとも5倍、またはさらにより好ましくは少なくとも10倍増加している。

【0032】最も簡単には、mRNAまたはポリペプチドの両方のレベルを、放射性標識された検出分子の補助によりそれぞれ評価し、それらのレベルを機能層の細胞

に結合した放射活性を子宮内膜の第ⅠⅤレベルの細胞と比較して定量することにより、評価する。

【0033】遺伝子産物の発現パターンの差が明白であるほど、この遺伝子産物は、より容易に基底細胞の検出において使用される。

【0034】したがって、子宮内膜の第ⅠⅡ機能層の細胞と比較して基底細胞において10倍高いレベルで見られる遺伝子産物を、本発明の方法に使用することが好ましい。基底細胞に特異的な遺伝子産物がさらに好ましい。

【0035】「特異的」という用語は、1つの要素に対して反応性があり、かつ特異性を評価する別の要素には本質的に反応性がないことを意味する。本発明において、マーカーは、月経中に子宮内膜の基底細胞には存在するが、機能層の細胞には本質的に存在しない場合、基底細胞に対して特異的であるとみなされる。しかしながら、非常に低い反応性（機能層/第ⅠⅤ層が<1%）は、特異的という用語の使用から除外されず、第ⅠⅤ層の細胞と比較すると機能層の子宮内膜細胞でかかる低レベルで見られる遺伝子産物は、それでもなお基底細胞特異的であるとみなされる。好ましくは、使用されるマーカーは、特異的マーカーであり、最も好ましくは、このマーカーは、基底細胞にのみ見られ、子宮内膜の機能層の細胞には本質的に見られない特異的マーカーである。

【0036】当業者が理解しているように、生化学的方法または免疫学的方法に基づく疾患の診断は常に100%感度と100%特異性の二律背反事象の妥協である。これは、腫瘍マーカーの分野で特にわかる。本発明の状況は、非常に類似している。本発明の手順により、今や、月経血の試料由来の基底細胞の測定値または基底細胞に典型的な遺伝子産物の測定値を子宮内膜症と関連させることが可能である。

【0037】これらの細胞またはこれらの遺伝子産物が多量に見られるほど、患者は子宮内膜症を患いやすい。

【0038】好ましい態様では、測定される遺伝子産物はポリペプチドである。以下の定義を本文脈に適用するものとする。

【0039】「診断的」とは、病理学的症状の存在または性質を同定することを意味する。諸診断方法は、特異性および感度においてそれぞれ異なる。特定の診断方法は、症状の確定診断を提供しないことがあるが、該方法が診断を補助する陽性表示を提供すれば十分である。

【0040】「被検量」とは、被検体試料中の分析物の量をいい、次いで、これを、値の相対比較が指定疾患の診断のための参照値を提供するような、試料中の分析物の正常量（例えば、健常個体のもの）と比較する。検出方法に応じて、被検量は分析物の量の測定値でありうるが量である必要はない。被検量はまた、プラスまたはマイナススコアなどの相対値であり得、試料中の分析物の有無を示す量も含む。

【0041】「正常量」とは、健康または病状の欠如を示す、生物学的試料中の分析物の量または範囲をいう。

【0042】「診断量」とは、特定の疾患の診断と一致する、生物学的試料中の分析物の絶対量または基準量をいう。

【0043】「ポリペプチド」とは、ペプチド結合を介して連結されたアミノ酸残基、その関連する天然の構造的変種および合成非天然類似体から構成される高分子ならびに該高分子の関連する天然の構造的変種およびその合成非天然類似体をいう。合成ポリペプチドは、例えば自動ポリペプチド合成装置を用いて合成されうる。

【0044】「親和剤」とは、分析物を吸着することができる任意の物質をいう。これには、陰イオン交換物質、金属キレート化剤、抗体、タンパク質リガンドおよびポリヌクレオチドが含まれるが、これらに限定されない。

【0045】「抗体」とは、エпитープ（例えば抗原）と特異的に結合し、認識する、イムノグロブリン遺伝子もしくはイムノグロブリン遺伝子群によって実質的にコードされるポリペプチドリガンドまたはそのフラグメントをいう。わかっているイムノグロブリン遺伝子には、 κ および λ 軽鎖定常領域遺伝子、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ および μ 重鎖定常領域遺伝子、およびミリアド(myriad)イムノグロブリン可変領域遺伝子が含まれる。抗体は、例えば、そのままのイムノグロブリンとして、または種々のペプチダーゼでの消化により生じた、十分に特性付けされたいくつかのフラグメント群として存在する。これには、例えば、Fab'およびF(ab')₂フラグメントが含まれる。本明細書で使用する「抗体」という用語はまた、抗体全体の修飾により作製された抗体断片、または組換えDNA方法論を用いて新規に合成された抗体断片のいずれかを含む。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体およびヒト化抗体が含まれる。

【0046】リガンドまたは受容体（例えば抗体）は、該リガンドまたは受容体が、不均一系化合物群の試料中において分析物の存在が決定される結合反応において機能するとき、分析対象化合物と「特異的に結合するか、または「特異的に免疫反応性である」。したがって、設計されたアッセイ（例えばイムノアッセイ）条件下では、リガンドまたは受容体は特定の分析対象物と優先的に結合するが、試料中に存在する他の化合物とは有意な量で結合しない。

【0047】「イムノアッセイ」とは、分析対象物に特異的に結合する抗体と試料を接触させる工程および抗体と分析対象物との結合を検出する工程を含む、試料中の分析対象物の検出方法をいう。特定のタンパク質と特異的免疫反応性である抗体を選択するのに種々のイムノアッセイ形式を使用しうる。例えば、タンパク質と特異的免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために

は固相 E L I S A イムノアッセイを常套的に使用する。特異的免疫反応性を決定するために使用しうるイムノアッセイの形式および条件の記載については、"Antibodies, A Laboratory Manual" (1988), Cold Spring Harbor Publications, New York におけるハーロー(Harlow)およびレーン(Lane)を参照のこと。

【0048】「検出すること」とは、試料中の分析物の存在、非存在または量を調べることをいい、試料中の分析対象物の量または試料中の細胞あたりの分析対象物の量を定量することを含む。

【0049】「検出可能部位」または「標識」とは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的または化学的手段により検出可能な組成物をいう。例えば、有用な標識には、³²P、³⁵S、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素（例えば、E L I S A に通常使用されるもの）、ビオチン - ストレプトアビジン、ジオキシゲニン(dioxigenin)、ハプテン、および抗血清またはモノクローナル抗体が得られうるタンパク質、または標的に相補的な配列を有する核酸分子が含まれる。検出可能部位は、しばしば、放射活性シグナル、発色シグナルまたは蛍光シグナルなどの、試料中の結合した検出可能部位の量を定量するのに使用しうる測定可能なシグナルを生成する。

【0050】検出可能部位は、直接または間接的に検出可能でありうる。間接検出は、該検出可能部位への第2の直接または間接検出可能部位の結合を含む。例えば、検出可能部位は、それぞれ、ストレプトアビジンの結合パートナーまたは対応する抗ハプテン抗体である、ビオチンまたはハプテン（例えば、ジゴキシニンまたはジゴキシゲニン）などの、結合パートナーのリガンドでありうる。結合パートナーは、それ自身が直接検出可能であり得、例えば、抗体は、それ自体が蛍光分子で標識されたものでありうる。結合パートナーはまた、間接的に検出可能な、例えば二次抗体でありうる。

【0051】「リンカー」とは、共有結合的にまたはイオン結合、ファン・デル・ワールスカしくは水素結合を介してのいずれかにより2個の別の分子を連結する分子をいう。リンカーは、特定の結合パートナーに標識を結合するのにしばしば使用される。

【0052】ポリペプチドを検出する方法は、数多くあり、例えば、質量分析、クロマトグラフィー手順および種々の免疫学的方法が含まれる。免疫学的方法の中で、特に、いわゆるイムノアッセイ、免疫組織学的方法およびアフィニティー捕捉質量分析を挙げるべきである。

【0053】基底子宮内膜細胞由来のマーカー分子を検出するのに使用される本発明のイムノアッセイでは、先に定義した少なくとも1種の抗体試薬を使用する。多くの異なる免疫学的方法が好適であり、当業者はかかるアッセイを計画し、実施するために必要なすべての情報を、"Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990) Amsterdam, Elsevier におけるティッセン(Tijs 50

sen) などの関連テキスト書籍に見出すだろう。

【0054】典型的には、特異的抗体試薬を直接または間接的に、膜（例えば、ニトロセルロース）、マイクロタイタープレート（例えば、PVC、ポリプロピレンまたはポリスチレン製）、試験管（ガラスまたはマイクロタイタープレートで記載したプラスチック材料）、計量棒（試験管を製造するのと同じ材料で製造）、または通常ラテックスもしくはポリスチレン系の粒子材料などの固体支持体にコートする。

10 【0055】直接コーティングのため、文字通り、抗体を固相に直接吸着させる。しかしながら、これは、多くの場合、抗体が結果として変性し、かなり低密度しか達成されず、個々の抗体試薬のそれぞれについてコーティング条件を最適化しなければならないため、不都合であることが示されている。

【0056】したがって、最近開発されたイムノアッセイの多くは、固相への抗体の間接コーティングに基づくものである。このコーティングは、分析対象物非依存性結合ペアの使用を介する。かかる分析対象物非依存性結合ペアの周知の例は、ビオチン/ストレプトアビジン系またはジゴキシニン - 抗ジゴキシニン系である。かかる方法の詳細は、特に米国特許第5,858,803号明細書および米国特許第5,362,655号明細書に記載されている。

【0057】常套的な適用のために、ストレプトアビジンでプレコートした固相を使用すること、およびアッセイ系の分析対象物特異的成分（例えば、抗体）を、ビオチニル化された形態のかかる固相に間接的に結合させることが好ましい。

30 【0058】それぞれ競合型アッセイおよびサンドイッチ型アッセイと一般的によばれる2種類のアッセイ条件(setups)が分析対象物検出手順において常套的に使用される。それぞれの方法の違いは、例えば競合型アッセイを実施するための文献からわかる。一様式において、検出対象の分析対象物を標識し、試験対象の試料中に含まれる分析対象物と競合させる。被検試料中に存在する分析対象物が多いほど、かかる競合型アッセイにおいて見出されるシグナルは少ない。

【0059】サンドイッチ型アッセイを使用する場合、かかるサンドイッチの両側を、試験中の分析対象物との特異的結合パートナーにより形成し、好ましくは両方とも抗体である。互いにそれぞれの分析対象物への結合を妨害しない適切な抗体試薬を選択する。かかる抗体を、固相への結合またはシグナル生成を可能にするように修飾する。かかるサンドイッチ型アッセイにおいて、生成されるシグナルは、試料中に存在する分析対象物の量に正比例する。

【0060】さらに好ましい態様では、本発明の診断方法は、検出が免疫組織化学により行なわれることを特徴とする。上述のイムノアッセイ手順では、月経血試料中

に含まれる細胞を可溶化し、免疫組織化学的手順のために月経血試料を、ホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝生理食塩水中に直接移す。月経血中に含まれる細胞および組織断片を月経血中で混合し、固定し、標準の手順により定着させ、包埋し、ここから切り出した切片を免疫組織化学において検査する。かかる免疫組織化学的手順を実施するためのいくつかの具体例が実施例の項に記載されている。

【0061】免疫組織化学では、検査者は、いくつかの基準、例えば、組織形態学および染色強度をいつでも利用する。病理学の当業者は、利用可能な該基準に基づいて、分析した試料が基底細胞を含むか否かを容易に知ることができる。かかる染色手順のため、基底細胞に典型的な、すなわち、より強い基底細胞の染色をもたらすポリペプチドが、かかる細胞の陽性診断にとって適当である。

【0062】また、月経血に含まれる該細胞および組織断片を処理して個々の細胞を組織断片から遊離する。かかる単一細胞は、標準の手順により容易に染色することができ、蛍光活性化セル・ソーターにより容易に解析することができる。

【0063】生検材料由来の試料（子宮摘出術により採取）に関して免疫組織化学を用いると、出血時、ヒト子宮内膜の第Ⅴ層基底細胞のみが、有意な量のエストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、特にプロゲステロン受容体アイソフォームAおよびアロマターゼp450を含むことがわかっている。月経時、これらのマーカーは基底子宮内膜の細胞内に限られており、該細胞に特異的である。したがって、好ましい態様では、検出されるポリペプチドは、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、プロゲステロン受容体A型およびp450アロマターゼからなる群より選ばれる。p450アロマターゼに対する染色が最も強く、プロゲステロン受容体A型は子宮内膜の基底細胞のみで見られ、子宮内膜の他の層には見られないため、プロゲステロン受容体A型またはp450アロマターゼのいずれかを選択することが好ましい。最も好ましくはp450アロマターゼの検出である。

【0064】さらなる態様では、「遺伝子産物」は、mRNAである。もちろん、診断手順において、対応するcDNAを使用してもよい。以下の定義を適用するものとする。

【0065】本明細書で使用される「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」および「ポリヌクレオチド配列」とは、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドおよびそのフラグメントもしくは部分、ならびに一本鎖もしくは二本鎖であってもよいセンスまたはアンチセンス鎖を示してもよいゲノム由来または合成由来のDNAまたはRNAをいう。

【0066】本明細書で用いられる用語「オリゴヌクレ

オチド」および「オリゴマー」という用語は、プローブまたはアンプリマー(amplimer)として使用されうる、少なくとも約10～約60ヌクレオチド、好ましくは15～約30ヌクレオチド、より好ましくは20～約25ヌクレオチドの核酸配列をいう。

【0067】本明細書で用いられる用語「相補的」または「相補性」とは、配列「5'-ACTG-3'」に相補的な塩基により関連付けられる「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」（これらは、ヌクレオチドの配列を指す置き換え可能な用語）に関して用いられる。相補性は、「部分的」または「全体的」でありうる。「部分的」相補性は、1個以上の核酸塩基が塩基対合形成ルールにマッチしない場合である。核酸間の「全体的」または「完全な」相補性は、どの核酸塩基も塩基対合形成ルールの下で別の塩基とマッチしている場合である。核酸鎖間の相補性の度合は、核酸鎖間のハイブリダイゼーションの効率および強度に対して著しい効果を有する。このことは、増幅反応、および核酸間の結合に依存する検出方法において特に重要である。

【0068】本明細書で用いられる用語「ハイブリダイゼーション」とは、塩基対合形成を介して核酸鎖が相補鎖と接触してハイブリダイゼーション複合体を形成することによる任意の方法を用いる相補的核酸対合形成に関して用いられる。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション強度（すなわち、核酸間の会合の強さ）は、核酸間の相補性の度合、関与する条件のストリンジェンシー、形成されるハイブリッドの T_m および核酸内のG:C比などの因子により影響を受ける。

【0069】本明細書で用いられる用語「試料鑄型」とは、目的の標的配列の存在を分析する試料に由来する核酸をいう。これに対し、「バックグラウンド鑄型」は、試料中に存在するかもしれないし、存在しないかもしれない試料鑄型以外の核酸に関して用いられる。バックグラウンド鑄型は、不注意(inadvertent) によることが最も多い。それは、持込みの結果でありえ、あるいは試料から精製により除去することを意図した核酸夾雑物の存在によるものであり得る。例えば、検出対象以外の生物体由来の核酸が、被検試料中にバックグラウンドとして存在しうる。

【0070】「増幅」は、核酸配列の追加的コピーの作製と定義され、一般に、当該技術分野で周知のポリメラーゼ連鎖反応技術を用いて行なわれる("PCR Primer, a Laboratory Manual" (1995), C. W. ディーフェンバッハ(Dieffenbach) および G. S. ドベクスラー(Dveksler) 編, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.)。本明細書で用いられる用語「ポリメラーゼ連鎖反応」(「PCR」)とは、クローニングも精製も行なわずに、ゲノムDNAの混合物中の標的配列のセグメントの濃度を上げるための方法が記載された、参照により本明細書に取り込まれるK. B. ミュリス(Mullis)の米国特許

第 4, 683, 195 号明細書および米国特許第 4, 683, 202 号明細書の方法をいう。所望の標的配列の増幅セグメントの長さは、2 個のオリゴヌクレオチドプライマーの互いに対する相対位置により決定され、したがって、この長さは、制御可能なパラメータである。プロセスの反復性局面により、該方法は、「ポリメラーゼ連鎖反応」(以下、「PCR」)とよばれる。標的配列の所望の増幅セグメントは、混合物中で主たる配列(濃度の点で)となるため、それらは「PCR 増幅された」といわれる。

【0071】PCR により、ゲノム DNA の特定の標的配列の単一コピーをいくつかの異なる方法論(例えば、標識プローブを用いるハイブリダイゼーション、ビオチニル化プライマーの取り込み後、アビジン-酵素コンジュゲートでの検出、³²P-標識した dCTP または dATP などのデオキシヌクレオチド三リン酸の増幅セグメントへの取り込み)により検出可能なレベルまで増幅することが可能である。ゲノム DNA に加え、任意のオリゴヌクレオチド配列を、適切なプライマー分子の組を用いて増幅することができる。特に、PCR プロセスそのものにより作製された増幅セグメントは、それ自身が後続の PCR 増幅のための効率的な鋳型となる。

【0072】用語「逆転写ポリメラーゼ連鎖反応」および「RT-PCR」とは、RNA 配列を逆転写して cDNA 配列の混合物を作製した後、クローニングも精製も行わずに、該混合物中の転写された cDNA 配列の所望のセグメントの濃度を上げるための方法をいう。典型的には、メッセンジャー RNA (mRNA) を単一のプライマー(例えば、オリゴ-dT プライマー)を用いて逆転写した後、転写された DNA の所望のセグメントを 2 種のプライマーを用いて PCR 増幅する。

【0073】本明細書で用いられる用語「プライマー」とは、核酸鎖に相補的なプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下(すなわち、ヌクレオチド、および DNA ポリメラーゼなどの誘導剤の存在下、適切な温度および pH)に置かれると、合成の起点の機能を果たすことができる、精製された制限消化物のような天然の、または合成により作製されたオリゴヌクレオチドをいう。プライマーは、増幅の最大効率のために好ましくは一本鎖であるが、代替的に二本鎖であってもよい。二本鎖の場合、伸長産物の調製に使用する前に、プライマーを最初に処理して両鎖を分離する。好ましくは、プライマーは、オリゴデオキシリボヌクレオチドである。プライマーは、誘導剤の存在下で伸長産物の合成をみだすのに十分長くなければならない。プライマーの正確な長さは、温度、プライマー源および方法の使用を含む多くの因子に依存する。

【0074】本明細書で用いられる用語「プローブ」とは、目的の別のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズすることができる、精製された制限消化物のような天然

の、または合成、組換えもしくは PCR 増幅により作製されたオリゴヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチドの配列)をいう。プローブは、一本鎖でも二本鎖でもよい。プローブは、特定の遺伝子配列の検出、同定および単離に有用である。本発明に使用される任意のプローブは、限定されている酵素系、蛍光系、放射活性系および発光系などの任意の検出系において検出可能であるために、任意の「レポーター分子」で標識することが想定される。

10 【0075】本明細書で用いられる用語「コード領域」とは、構造遺伝子に関して用いられるときは、mRNA 分子の翻訳の結果生じるポリペプチドに見られるアミノ酸をコードするヌクレオチド配列をいう。コード領域は、真核生物では、5' 側が、開始メチオニンをコードするヌクレオチドトリプレット「ATG」と結合しており、3' 側が、停止コドン(すなわち、TAA、TAG、TGA)を指定する 3 つのトリプレットの 1 つと結合している。

【0076】本明細書で用いられる用語「構造遺伝子」または「構造ヌクレオチド配列」とは、他の遺伝子の発現を制御しない、RNA またはタンパク質をコードする DNA 配列をいう。これに対し、「調節遺伝子」または「調節配列」は、他の遺伝子の発現を制御する産物(例えば、転写因子)をコードする遺伝子である。

【0077】本明細書で用いられる用語「遺伝子」とは、構造遺伝子のコード領域を含有するデオキシリボヌクレオチド配列を意味する。「遺伝子」は、該遺伝子が完全長の mRNA の長さに対応するように 5' および 3' 末端の両方でコード領域に隣接して位置する非翻訳配列も含んでもよい。コード領域の 5' に位置し、かつ mRNA 上に存在する配列を 5' 非翻訳配列という。コード領域の 3' 側または下流に位置し、かつ mRNA 上に存在する配列を 3' 非翻訳配列と称される。「遺伝子」という用語は、cDNA およびゲノム形態の遺伝子の両方を包含する。遺伝子のゲノム形態またはクローンは、「イントロン」または「介在領域」または「介在配列」とよばれる非コード配列を間に有するコード領域を含む。イントロンは、ヘテロ核 RNA (hnRNA) に転写される遺伝子のセグメントであり、イントロンは、エンハンサーなどの調節成分を含んでもよい。イントロンは、核または一次転写物から除去または「スプライス除去」される。したがって、イントロンは、メッセンジャー RNA (mRNA) 転写物には存在しない。mRNA は、翻訳中に機能し、生じるポリペプチドのアミノ酸の配列または順序を指定する。

【0078】本発明の好ましい様式では、基底細胞において典型的に発現される遺伝子の mRNA レベルを評価する。最も好ましくは、子宮内膜上皮の細胞と比べると第 I 層細胞において特異的に発現される遺伝子に対応する mRNA を評価する。

【0079】好ましくは、基底細胞のmRNAは、エストロゲン受容体(ER)、プロゲステロン受容体A型(PR-A)またはアロマターゼp450をコードする遺伝子の転写物である。プロゲステロン受容体A型およびアロマターゼp450のmRNAが最も好ましい。

【0080】かかるmRNA測定は、標準的および常套の手順により行なわれ、かかる方法は、増幅系アッセイを、シグナル増幅、ハイブリダイゼーション系アッセイおよび増幅-ハイブリダイゼーションアッセイの組み合わせとともに、またはそれらなしで用いて基底細胞のmRNAまたはcDNAのマーカー遺伝子の発現を検出および/または定量する工程を含む。

【0081】ポリヌクレオチドアッセイは、好ましくは、生物学的試料から単離された核酸の試料を用いて行なわれる。

【0082】ポリヌクレオチド(例えば、ゲノムDNA、RNAまたはcDNA)は、当業者に周知のいくつかの方法のいずれかにより試料から単離されてもよい。核酸を単離するための方法は、当業者に周知であり、例えば、ティッセン(Tijssen), P., Hybridization with nucleic acid probes Part I; Theory and nucleic acid preparation in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol" (1993); 国際公開第99/63116号パンフレット第19頁; "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Pressにおけるサンプブルック(Sambrook), J.ら; "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley社におけるオースベル(Ausubel), F.らに記載されている。

【0083】一態様では、本発明のアッセイは、基底細胞に典型的な遺伝子産物(例えば、mRNAまたはcDNA、以下「標的」ともいう)の検出のための増幅系アッセイである。増幅系アッセイにおいて、ポリヌクレオチド標的の全体または部分を増幅し、次いで増幅産物を直接または間接的に検出する。これには、プローブとのハイブリダイゼーション、ゲル上の適切な大きさの産物の検出、または質量分析、例えば増幅産物の少なくとも部分の配列の決定による増幅産物の検出が含まれる。鋳型の機能を果たすための基礎となる遺伝子産物がない場合、(例えば、期待される大きさの)増幅産物は生成されないか、または増幅が非特異的で典型的には単一の増幅産物がない。これに対し、基礎となる遺伝子または遺伝子産物が存在する場合、標的配列が増幅され、基礎となる遺伝子またはmRNAの存在および/または量の表示が提供される。標的増幅系アッセイは当業者に周知である。

【0084】基底細胞に典型的な遺伝子産物を検出するためのプライマーおよびプローブは、当業者により子宮内膜の第IV層に典型的な様式で発現する遺伝子の配列と関連させることにより設計および作製されるのである

う。好適なプライマーおよびプローブは、標的核酸とハイブリダイズするために、基底細胞に典型的な遺伝子産物と十分相補的である。プライマーは、通常、約10~約100塩基、典型的には約12~約50塩基であり、基底細胞に典型的な遺伝子産物の全体または部分を増幅してもよい。

【0085】一態様では、基底細胞に典型的な遺伝子産物は、ポリメラーゼ連鎖反応(あらゆる変形例、例えば逆転写PCR、Sunrise Amplification System (Oncor, Inc, Gaithersburg MD)および当該技術分野で公知の数多くの他の方法を含む)を用いて増幅および検出される。例示的な一態様では、PCR増幅を、核酸試料(例えば、mRNAの逆転写により得られたcDNA)、100μMの各dNTP(dATP、dCTP、dGTPおよびdTTP; Pharmacia LKB Biotechnology, NJ)、1又は複数のmRNA特異的PCRプライマー、1単位/Taqポリメラーゼ(Perkin Elmer, Norwalk CT)、1×PCRバッファー(50mM KCl、10mM トリス、pH8.3、室温、1.5mM MgCl₂、0.01%ゼラチン)を含む50μlの溶液中、94で45秒、55で45秒および72で90秒を約30回サイクルでの増幅工程により行なう。

【0086】しかしながら、理解されるように、任意の特定の反応のためのPCR増幅を最適化するために数多くの変形を行なってもよい。他の適当な標的増幅方法には、リガーゼ連鎖反応(LCR; 例えば、ウー(Wu), D. Y. およびウォレス(Wallace), R. B., Genomics 4 (1989) 560-9; ランデグレン(Landegren), Uら、Science 241 (1988) 1077-80; バラニー(Barany), F., Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) 189-93; およびバリナー(Barringer), K. J.ら、Gene 89 (1990) 117-22)、鎖置換増幅(SDA; 例えば、ウォーカー(Walker), G. T.ら、Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 392-6)、転写増幅(例えば、クー(Kwoh), D. Y. ら、Proc Natl Acad Sci U S A 86 (1989) 1173-7)、自家持続配列複製(self-sustained sequence replication) (3SR; 例えば、フェイ(Fahy), E.ら、PCR Methods Appl 1 (1991) 25-33; グアテリ(Guatelli), J. C. ら、Proc Natl Acad Sci U S A 87 (1990) 1874-8)、核酸配列系増幅(NASBA、Cangene, Mississauga, Ontario; 例えば、コンプトン(Compton), J., Nature 350 (1991) 91-2)、転写系増幅システム(TAS)、および自家持続配列複製システム(SSR)が含まれる。

【0087】PCRの有用な変形例の1つは、ジゴキシゲニンdUTPがPCR産物に組み込まれるPCR ELISA(例えば、Boehringer Mannheim カタログ番号1636111)である。PCR反応混合物を変性させ、PCR産物の内部配列とアニーリングするように設計したピオチン標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。ストレプトアビジンをコートしたプレートに

ハイブリダイゼーション産物を固定化し、抗ジゴキシゲン抗体を用いて検出する。当業者にインビトロ増幅法の指示を与えるのに十分な技術の例は、PCR Technology; Principles and Applications for DNA Amplification (1992)、H.アーリッチ(Erlich)編、Freemann Press New York; PCR protocols; A guide to Methods and Applications (1990)、イニス(Innis)、ゲルフアンド(Gelfand)、スニスキー(Snisky)およびホワイト(White)編、Academic Press、サンディエゴ、に見出される。

【0088】増幅産物を、例えばゲル電気泳動により決定される大きさにより、ビーズ、膜、スライドもしくはチップなどの固体支持体上に固定化された標的核酸とのハイブリダイゼーションにより、シーケンシングにより、例えばPCR-ELISAにより免疫学的に、蛍光、りん光もしくは放射活性シグナルの検出により、または周知の他の様々な手段のいずれかにより直接解析しうる。例示的な検出方法の例は、フルオレセインと結合させたヘアピンループを増やした(augment)プライマーと、該プライマーが折りたたまれずに標的と結合し、複製が起こったときのみに蛍光を発するようなクエンチング剤として機能する安息香酸誘導体とを用いる。

【0089】また、標的配列の増幅により生じるシグナルを増加させるための公知の方法を使用しうる。増幅された標的の検出能を増大させるための方法には、分枝DNAシグナル増幅(例えば、米国特許第5,124,246号明細書;ウルデア(Urdea), M. S., Biotechnology (NY) 12 (1994) 926-8); チラミド(tyramide)シグナル増幅(TSA)システム(DuPont); 触媒性シグナル増幅(CSA; Dako); Q Beta Replicase Systems (チャギ(Tyagi), S.ら、Proc Natl Acad Sci USA 93 (1996) 5395-400)などのシグナル増幅システムが含まれる。

【0090】当業者であれば、どのような増幅方法を使用しようとも、定量が望まれる場合は、当該技術分野で公知の様々な定量法を使用しうることを理解するだろう。定量的PCRの詳細なプロトコルは、PCR protocols: A guide to Methods and Applications (1990)、イニス(Innis)、ゲルフアンド(Gelfand)、スニスキー(Snisky)およびホワイト(White)編、Academic Press、サンディエゴ、およびオースベット(Ausubet)ら、上記(第15章)および"PCR STRATEGIES" (1995) 84-108, I. e. al.編、Academic Press、ニューヨークのディアコ(Diaco), R., Practical Considerations for the Design of Quantitative PCR Assays、ならびに米国特許第5,629,154号明細書に見出される。

【0091】核酸ハイブリダイゼーション技術を用いた特定のDNAおよびRNAの測定のための様々な方法が当業者に知られている(サンプルック(Sambrook)ら、上述)。

【0092】ハイブリダイゼーション系アッセイとは、

プローブ核酸が標的核酸とハイブリダイズするアッセイをいう。核酸ハイブリダイゼーションにおける使用のための核酸プローブ配列を選択するための方法は、サンプルック(Sambrook)ら、上述に記述されており、基底細胞に典型的または好ましくは特異的な任意の適切な遺伝子の遺伝子配列に基づいて行なう。いくつかの形式では、標的およびプローブの少なくとも一方が固定化されている。固定化された核酸は、DNA、RNAまたは別のオリゴヌクレオチドもしくはポリヌクレオチドでありえ、天然または非天然のヌクレオチド、ヌクレオチド類似体もしくは骨格を含み得る。かかるアッセイは、サザンブロット、ノーザンブロット、ドットブロットおよびスロットブロット、高密度ポリヌクレオチドアレイもしくは高密度オリゴヌクレオチドアレイ(例えば、Genechips(登録商標) Affymetrix)、計量棒、ピン、チップまたはビーズを含むいくつかの形式のいずれかであってもよい。これらの技術のすべては当該技術分野において周知であり、商品として入手可能な多くの診断用キットの基礎となっている。ハイブリダイゼーション技術は、"Nucleic Acid Hybridization, A practical approach" (1985)、ヘイムズ(Hames)編; ゴール(Gall), J. G. およびパーデュー(Pardue), M. L., Proc Natl Acad Sci USA 63 (1969) 378-83); ジョン(John), H. A. ら、Nature 223 (1969) 582-7に概略的に記載されている。

【0093】一般的な形式の1つは、標的核酸を相補的な標識プローブとハイブリダイズさせる直接ハイブリダイゼーションである。典型的には、標識した核酸をハイブリダイゼーションに用い、該標識が検出可能なシグナルを提供する。標的mRNAの存在、非存在または量を評価するための方法の1つは、試料由来のRNAのノーザン移動および標識した標的核酸のハイブリダイゼーションを実施することである。他の一般的なハイブリダイゼーション形式には、サンドイッチアッセイおよび競合または置換アッセイが含まれる。サンドイッチアッセイは、核酸配列を検出または単離するための商業的に有用なハイブリダイゼーションアッセイである。かかるアッセイは、共有結合により固体支持体に固定化した「捕捉」核酸および標識した「シグナル」核酸を溶液中で用いる。生物学的試料または臨床試料は標的核酸を提供する。「捕捉」核酸および「シグナル」核酸プローブは、標的核酸とハイブリダイズして「サンドイッチ」ハイブリダイゼーション複合体を形成する。標的核酸の非存在下では、シグナル核酸は、捕捉核酸とハイブリダイズしない。

【0094】本発明はまた、標的核酸とハイブリダイズしうる、固定化されたオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドのアレイを用いて基底細胞に典型的な遺伝子産物のプローブ系ハイブリダイゼーションアッセイを提供する。高密度のオリゴヌクレオチドアレイまたはポリヌクレオチドアレイは、標的核酸(例えば、エストロゲ

ン受容体、プロゲステロン受容体 A 型またはアロマトーゼ p 450 の mRNA) の存在および特性 (例えば、配列) を効率的に検出するための手段を提供する。インサイチュー合成のためにフォトリソグラフィ技術を用い、規定の配列に相補的な何千ものオリゴヌクレオチドを表面上の規定の位置に含有してなるアレイを作製するための技術は公知である (例えば、米国特許第 5, 578, 832 号明細書; 米国特許第 5, 556, 752 号明細書; 米国特許第 5, 510, 270 号明細書; フォダー (Fodor), S. P. ら、Science 251 (1991) 767-73; ピアーズ (Pease), A. C. ら、Proc Natl Acad Sci U S A 91 (1994) 5022-6); およびロックハート (Lockhart), D. J. ら、Nat Biotechnol 14 (1996) 1675-80) または規定のオリゴヌクレオチドの迅速な合成および被覆 (deposition) のための他の方法 (ブランチャード (Blanchard), A. P. ら、Biosensors & Bioelectronics 11 (1996) 687-690 を参照のこと)。これらの方法を使用する場合、既知配列のオリゴヌクレオチド (例えば、20 量体) を、誘導体スライドガラスなどの表面上で直接合成することができる。通常、作製するアレイは、過剰 (redundant) で、検出対象の基底細胞に典型的な遺伝子に対応するポリヌクレオチドに特異的な数種のオリゴヌクレオチドプローブをチップ上に有する。

【0095】基底細胞に典型的なタンパク質をコードする遺伝子の発現を検出するための代替的な手段はインサイチュー・ハイブリダイゼーションである。インサイチュー・ハイブリダイゼーションアッセイは周知であり、アンジェラー (Angerer), L. M. ら、Methods Enzymol 152 (1987) 649-61 およびオースベル (Ausubel) ら、上記に概略的に記載されている。インサイチュー・ハイブリダイゼーションアッセイにおいて、細胞試料または組織試料を固体支持体に、典型的には透過性 (permeabilized) 状態で、典型的にはスライドガラス上に固定する。次いで、細胞をハイブリダイゼーション溶液と適度な室温で接触させ、標的 mRNA に完全にまたは実質的に相補的な標識核酸プローブ (例えば、³²S-標識リボプローブ、蛍光標識プローブ) のアニーリングを可能にする。遊離のプローブを、洗浄および/またはヌクレアーゼ消化により除去し、結合したプローブを、オートラジオグラフィまたは当該技術分野で公知の適切な画像形成技術によりスライド上で直接可視化する。

【0096】ポリヌクレオチドアッセイの別の態様において、増幅、ハイブリダイゼーションまたは他のアッセイを行なう前に核酸 (例えば、全 RNA または poly A⁺ RNA) を生物学的試料から単離する必要はない。これらの態様は、RNA が測定対象である場合、単離および取り扱い中に mRNA の損失の可能性を低減するため、一定の利点を有する。例えば、上記で定義した PCR および RT-PCR などの多くの増幅技術は、透過性化した細胞 (組織学的試料および FACS 解析)、全溶

解細胞またはある種の細胞抽出物などの粗細胞画分を用いて行いうる。好ましくは、必要により標的核酸 (例えば、mRNA) の完全性を保存するための工程 (例えば、RNA アーゼインヒビターの添加) を行なう。増幅およびハイブリダイゼーションアッセイはまた、固定および包埋した後の月経血液細胞の試料由来の薄片組織切片 (この試料の調製方法は実施例 1 に詳細に記載) において本発明によりインサイチューで行うことができるが、同様に当該技術分野で公知の PCR、RT-PCR または LCR 増幅法を、例えば、ポリメラーゼまたはリガーゼ、1 つまたは複数のプライマーおよび (デオキシ) リボヌクレオシド三リン酸 (ポリメラーゼを用いる場合) ならびに逆転写酵素およびプライマー (転写対象が RNA で検出対象が cDNA の場合) を用い、固定、透過性化またはマイクロインジェクトした細胞上において行ない、標的 RNA を増幅してもよい。この方法は、蛍光標識 dNTP、プライマーまたは他の成分を顕微鏡と組み合わせて使用するとき、しばしば有用である。その診断上の有用性に関して、インサイチュー PCR により得られる結果は免疫組織化学により得られるものと類似する。

【0097】また、診断の感度および/または特異性をさらに向上させるため、およびこのようにして月経血の試料で測定した値を子宮内膜症とさらに良好にに関連させるために、基底細胞の 2 ~ 5 個のマーカー遺伝子産物を測定することは本発明の好ましい態様である。

【0098】よりさらなる診断の改善は、基底細胞に典型的な遺伝子産物の測定値を「機能層の細胞由来の」遺伝子産物に対して「正規化」した場合になされ得る。かかる遺伝子産物は、月経周期全体を通して比較的一定量で子宮内膜の機能層の細胞に存在するか、またはかかる遺伝子産物は、月経中、少なくとも比較的一定である。かかる遺伝子産物は、例えば、ハウスキーピング遺伝子などの当該技術分野で公知の遺伝子から選ばれる遺伝子から誘導される。典型的なハウスキーピング遺伝子は細胞骨格のタンパク質をコードする遺伝子である。

【0099】好ましい態様において、本発明では、インタクトな基底細胞の存在を必要としない方法を記載する。むしろ、本子宮内膜症の診断方法は、月経血の試料を得る工程、該試料中の基底子宮内膜の細胞に典型的な少なくとも 1 種の遺伝子産物を測定する工程および該測定値を子宮内膜症の診断と関連させる工程を含む。かかる測定を行なうために、細胞構成成分から遺伝子産物を遊離させるための適切な手段により月経血試料を処理することが好ましい。その結果、目的の遺伝子産物が可溶性で容易に利用可能な (accessible) 形態で得られる。好ましい様式では、試料を適切なインキュベーションバッファーで希釈する。かかるインキュベーションバッファーは当業者に周知である。免疫アッセイの場合、適切なバッファーを選択し、タンパク質を遊離および/また

は可溶化する目的、および免疫学的結合を可能にし、したがって、標的タンパク質と用いた免疫学的結合パートナーとの免疫学的複合体の形成を可能にする目的の両方の目的に役立てる。

【0100】さらに好ましい態様では、本発明は、月経血の試料を得る工程、該試料中の基底細胞に典型的な少なくとも1種の遺伝子産物の量を測定する工程、該試料中の子宮内膜の機能層の細胞由来の遺伝子産物の量を測定する工程、基底細胞に典型的な遺伝子産物の機能層の細胞由来の遺伝子産物に対する相対量を評価する工程および該相対量を子宮内膜症と関連させる工程を含む子宮内膜症の診断方法に関する。

【0101】特に月経時に機能層の細胞に典型的な遺伝子産物は、例えば、17βHSD-I型(HSD=ヒドロステロイドデヒドロゲナーゼ)である。

【0102】好ましくは、基底細胞に典型的な遺伝子産物について測定した1つまたは複数の遺伝子産物レベルを、細胞骨格タンパク質または17βHSD-I型をコードする遺伝子の遺伝子産物レベルに対して相対的に示す。最も好ましい17βHSDは、基底細胞に典型的または特異的な遺伝子産物を正規化し、したがって、例えば、サンプリングの様式もしくは時間または出血の強さにより誘導される変動を是正するために使用される。

【0103】最も好ましくは、基底細胞に特異的な遺伝子産物は、子宮内膜の機能層由来の細胞のハウスキープ遺伝子に対して正規化される。

【0104】

【実施例】以下の実施例および参考文献は、本発明の理解を補助するために提供され、本発明の真の範囲は添付の請求の範囲に記載される。本発明の趣旨を逸脱することなく、記載された手順において変更を行うことが理解される。

表1

月経周期の期 (日)	子宮内膜症の女性の子宮				腺筋症の病変				子宮内膜症の病変				健常対照の子宮			
	子宮内膜		子宮筋層		上皮/支質		PMC		上皮/支質		PMC		子宮内膜		子宮筋層	
初期増殖期 (4-7)	10 (15)		10		10 (15)		10		8 (9)		8		4 (5)		4	
中期増殖期 (8-11)	6 (5)		6		6 (5)		6		9 (9)		9		2 (2)		2	
後期増殖期 (12-14)	5 (8)	8	4		3 (8)	7	3		5 (5)	13	3		2 (1)	4	2	
初期分泌期 (15-18)	4 (5)		4		4 (5)		4		3 (3)		3		3 (2)		3	
中期分泌期 (19-23)	6 (8)		6		6 (8)		6		5 (4)		2		3 (4)		3	
後期分泌期 (24-28)	6 (6)	10	5		5 (6)	9	5		5 (5)	10	3		3 (5)	5	3	
月経期 (1-3)	3 (4)		3		3 (4)		3									
合計	40 (51)	1 (8)	38		37 (51)	16	37		35 (35)	23	28		17 (19)	9	17	

*【0105】実施例1：組織および月経血の免疫組織学的試料

1.1 組織試料

種々の理由で子宮摘出術を受けた70人の閉経前女性(年齢24~55歳)から非妊娠状態の子宮を得た。これらの女性のうち、51例(年齢26~55歳、平均42歳)は子宮内膜症および/または腺筋症を患っていた。残りの19例の女性(年齢24~49歳、平均36歳)の子宮では、子宮内膜および子宮筋層に病状はなく、側腹切開術時においてこれらの女性に子宮内膜症の兆候はなかった。すべての女性は規則的な月経周期を有し、少なくとも6ヵ月間はホルモン療法歴はなかった。月経周期のそれぞれの期は、通常の組織学的日数計算法("Atlas der Histopathologie des Endometriums" (1984), Springer 社、ベルリン、ハイデルベルグ、ニューヨーク、東京)のダレンバッハ(Dallenbach) - ヘルウェッグ(Hellweg), G. およびポウルセン(Poulsen), H.)に従って最後の月経周期を組織学的所見と関連させることにより明確に(ensure)した。

【0106】また、少なくとも6ヵ月間はホルモン療法を受けていない正常な月経周期を有する閉経前女性(年齢25~51歳、平均35歳)の腹腔鏡検査または側腹切開術により、総数35の子宮内膜症の病変を入手した。これらの試料を、壁側腹膜、腸腹膜、子宮腹膜、膀胱腹膜(n=25)、卵巣子宮内膜腫(n=6)および直腸膈中隔(n=4)などの種々の腹腔内および腹腔外病変からそれぞれ切除した。すべての場合において、月経周期の正確な期がわかった。表Iは、起源、月経の期および実施した免疫組織化学のそれぞれに関する組織試料の数のまとめ(compilation)である。

【0107】

【表1】

【0108】子宮摘出術の試料および切除した子宮内膜 50 症の病変を4%緩衝化ホルムアルデヒド(pH7.1)

で24時間固定した。

【0109】正中線において子宮体の矢状方向に向いた部分を、底部領域から、および子宮腔から漿膜までの全子宮壁を含む前壁および後壁から取り出した。卵管峡部を起点として卵管の壁内道に沿って（子宮内膜表面に対してオルソゴナルに）子宮体の片半分を少なくとも7つのスライスに切り分け、腺筋症および漿膜下子宮内膜のそれぞれの病変を同定した。

【0110】子宮組織切片および切除した子宮内膜症の病変をパラフィンに包埋した。

【0111】1.2 月経血試料

健常女性19例（年齢25～37歳、平均33歳）および子宮内膜症の女性24例（年齢25～42歳、平均33歳）から総数43の月経血試料を集めた。本試験のこの部分に含めた女性はすべて腹腔鏡検査を受け、子宮内膜症の場合、病期分類を American Society for Reproductive Medicine の改訂AFS分類に従って実施した（第1、第2、第3および第4病期の患者は、それぞれ13例、5例、3例および3例であった）。すべての女性は、規則的な月経周期を有し、少なくとも6ヵ月間はホルモン療歴はなかった。彼女らは、前日の夜間に生理用ナプキンを使用しただけの月経第2日目の午前中に本研究室に来所した。すべての女性において、およそ1mlの月経血を膣円蓋後部から、固定用に2mlの4%緩衝ホルムアルデヒド（pH7.1）を予め満たしたシリンジ内に吸引した。

【0112】パラフィンに包埋する前に、月経血試料をNaCl溶液で洗浄し、赤血球を除去した。

【0113】月経血試料由来の子宮内膜断片の一連の4つの連続的な切片を、エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）、プロゲステロン受容体アイソフォームB（PR-B）およびp450アロマターゼのそれぞれの発現に関して染色された断片の有無について調べた。個々のマーカーの各々に対する評価は、1つのマーカーあたり1つだけの月経血試料切片の検査に基づいて行なった。

【0114】1.3 免疫染色

全ての免疫組織化学的手順は、自動スライド染色装置（Ventana NexES IHC Staining System; Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA）を用いて行なった。パラフィン包埋切片（厚み3μm）を、脱パラフィンおよび再水和の前にスライドに載せた。

【0115】エストロゲン受容体（ER）、プロゲステロン受容体（PR）およびプロゲステロン受容体アイソフォームB（PR-B）電子レンジを40分間200Wで用いることにより抗体のアンマスキングを行なった（Tris-EDTAクエン酸バッファー、pH7.8）。次いで、切片をVentana NexES IHC Staining Systemに移した。受容体染色のため、以下の抗体：完全長α型エストロゲン受容体分子に相当する原核生物組換えタンパ

ク質に対して生成した抗エストロゲン受容体マウスモノクローナル抗体（Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK）を希釈度1:10で；ヒトプロゲステロン受容体上の予測される高抗原性部位に相当する合成ペプチドに対して生成し、既知の両タイプの核プロゲステロン受容体（PR-AおよびPR-B；ビビル（Viville）, B.ら、Hum Reprod 12（1997）815-22）に結合する抗プロゲステロン受容体マウスモノクローナル抗体（Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK）を希釈度1:10で；プロゲステロン受容体アイソフォームB（PR-B）に対して生成した抗プロゲステロン受容体アイソフォームBマウスモノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA）を希釈度1:5で使用した。PR-Bの免疫組織化学において、増幅キット（Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA）を染色の増強のために使用した。Basic DAB Detection Kitを含む自動染色手順を、ヘマトキシリン対比染色および水洗により終了させた。次いで、スライドを脱水し、配置した。

【0116】受容体陽性乳癌腫の切片を陽性対照として使用した。受容体陽性乳癌腫の切片を用い、陰性対照を、一次抗体およびいくつかのエストロゲン受容体陰性組織（例えば、扁桃および非婦人科学的癌腫由来）とのインキュベーションを行わずに同じ自動化手順により作製した。

【0117】P450アロマターゼ（P450A）

抗体のアンマスキング、続いてヘマトキシリンでの対比染色で終了させる自動染色手順は、Basic Alkaline Phosphatase Red Detection Kitを用いた以外は同様とした。染色は、ヒト胎盤シトクロムP450を認識する一次ウサギ抗アロマターゼシトクロムP-450ポリクローナル抗体を、Ventana 抗体希釈液（Hauptman-Woodward Medical Research Inst., Inc., Buffalo, New York）中での希釈度1:1000で用いて行なった。グラフ卵胞を含む正常卵巣組織の切片を陽性対照として使用した。いくつかのP450A陰性組織（例えば、扁桃および非婦人科学的癌腫由来）を陰性対照として用いた。

【0118】アクチン

抗体のアンマスキングをプロテアーゼ溶液（Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA）を用いて行なった（perfume）後、P450Aで記載したのと同じ染色手順を行なった。一次抗筋肉アクチン抗体（クローンHUC-1-1）は、Ventana Medical Systems Inc.から予め希釈された形態で提供され、上記PRで記載のようにして染色を行なった。

【0119】特異的アクチン免疫染色を用いて子宮内膜症および腺筋症の病変における支質周囲の平滑筋細胞を同定し、それによりERおよびPR染色の評価を容易にした。

【0120】1.4 染色強度の評価

エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)

特異的核染色の結果を、半定量法を用いて評価した。免疫反応性のスコア (IRS) を以下の式: $IRS = \sum P_i (i+1)$ (式中、 $i = 1, 2$ または 3 であり、 P_i は、各強度における染色細胞の割合) を用い、レッセイ (Lessey), B. A. ら、J Clin Endocrinol Metab 67 (1988) 334-40に記載の方法に従って算出した。染色強度は、0 = 染色なし、1 = 弱い染色、2 = 中程度の染色、3 = 強い染色のそれぞれで評価した。

【0121】以下の組織: 第I領域に相当する機能層および第IV領域に相当する最下基底層の子宮内膜の上皮と支質、子宮内膜症および腺筋症の病変の上皮と支質、新子宮の血管層に相当する外側筋層、原子宮 (血管下層)、子宮内膜症および腺筋症の病変の支質周囲の筋組織を別々にカウントした(count out)。子宮組織に関して少なくとも20ヶ所の強染色領域(high power field)を、子宮内膜症の病変に関して少なくとも5ヶ所の強染色領域を無作為に選択して評価した。1つの子宮領域あたりの陽性染色細胞の免疫反応性のスコアを、計測し、すべての強染色領域の値の相加平均をとることにより*

*決定した。一連の試験において、IRSのすべての範囲においてアッセイ間のばらつきが10%を超えなかった点で、本方法には高い再現性があった。

【0122】閉経前女性の個々の子宮試料および子宮内膜症の病変から得られたデータを、上記の月経周期の期に従って群分けした。

【0123】p450アロマターゼ (p450A) およびプロゲステロン受容体アイソフォームB (PRB) 半定量法を用い、4段階評価: 0 = 染色なし、1 = 弱い染色、2 = 中程度の染色、3 = 強い染色のそれぞれに基づいて特異的染色の結果を得た。評価は、正常位置(eutopic) および異所性の子宮内膜に限り、上述の場合と同数の強染色領域を使用した。

【0124】統計解析

非対データについてはスチューデントのt検定、およびフィッシャー検定を用いて統計解析を行なった。p < 0.05の場合を有意とした。

【0125】1.5 結果

【0126】

【表2】

表III					
パラメータ	健常対照		子宮内膜症		有意差 (フィッシャー検定)
	陽性/n	%	陽性/n	%	
ER (上皮および支質)	2/19	10	18/24	75	p<0.00005
PR (上皮)	0/19	0	8/24	33	p<0.005
PR (支質)	2/19	10	14/24	58	p<0.000005
PRB (上皮および支質)	0/19	0	0/24	0	有意差なし
P450アロマターゼ (上皮および支質)	2/19	10	20/24	83	p<0.000005

【0127】表IIから、特にエストロゲン受容体およびp450アロマターゼが、月経血試料中の基底細胞の存在を子宮内膜症と相関させるための重要なマーカーであることが容易に明かとなる。

【0128】実施例2: 膣血試料のイムノアッセイ

2.1 月経血試料

子宮内膜症の女性および子宮内膜症でない女性由来の月経血の試料を、前日の夜間に生理用ナプキンを使用しただけの月経第2日目の午前中に集めた。すべての女性からおよそ1mlの月経血を膣円蓋後部から、2mlのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.4) を予め満たしたシリンジ内に吸引した。

【0129】2.2 プロゲステロン受容体の競合イムノアッセイ

ストレプトアビジンでプレコートしたマイクロタイタープレート (Roche Diagnostics GmbH、製品番号: 1965905) を、PRに対するピオチニルモノクローナル抗体 (ビビル (Viville) ら、上記) 100 μl、濃度 100 ng/ml とともに室温で60分間インキュベートした。膣血試料を PBS / Tween (登録商標) 2

0 (0.05 または Tween) 中で 1:100 に希釈し、1つのウェルあたり、この試料 199 μl を添加した。洗浄後、標準的手順によりペルオキシダーゼで標識した 100 μl の合成ペプチド (ビビル (Viville) ら、上記に記載) を各ウェルに添加し、室温で1時間インキュベーションを行なった。

【0130】ウェルを再度洗浄し (3 × 200 μl の PBS / Tween)、モノクローナル抗体と結合したペルオキシダーゼの量を、基質として ABTS (登録商標) (ABTS は 2, 2'-アジノ-ジ[3-エチルペンズチアゾリンスルホン酸; Roche Biochemicals, オーダー番号 1684302] を用い、製造業者による指示書に従って評価した。

【0131】2.3 結果

有意なレベルのプロゲステロン受容体が子宮内膜症の患者から集めた試料の 67% において測定されたが、子宮内膜症でない患者では 6% のみにプロゲステロン受容体が検出された。

【0132】参考文献リスト

- Anaf, V., et al., *Hum Reprod* 15 (2000) 767-71
- Angerer, L. M., et al., *Methods Enzymol* 152 (1987) 649-61
- Ausubel, F., et al. in "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley Verlag
- Barany, F., *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 189-93
- Barringer, K. J., et al., *Gene* 89 (1990) 117-22
- Blanchard, A. P., et al., *Biosensors & Bioelectronics* 11 (1996) 687-690
- Compton, J., *Nature* 350 (1991) 91-2
- Dallenbach-Hellweg, G. and Poulsen, H., in "Atlas der Histopathologie des Endometriums" (1984), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Diao, R., Practical Considerations for the Design of Quantitative PCR Assays in "PCR STRATEGIES" (1995) 84-108, Eds. I. e. al., Academic Press, New York
- Fahy, E., et al., *PCR Methods Appl* 1 (1991) 25-33
- Fodor, S. P., et al., *Science* 251 (1991) 767-73
- Gall, J. G. and Pardue, M. L., *Proc Natl Acad Sci U S A* 63 (1969) 378-83
- Guatelli, J. C., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 1874-8
- Harlow and Lane, in "Antibodies, A Laboratory Manual" (1988), Cold Spring Harbor Publications, New York
- John, H. A., et al., *Nature* 223 (1969) 582-7
- Kunz, G., et al., *Hum Reprod* 15 (2000) 76-82
- Kwoh, D. Y., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 1173-7
- Landegren, U., et al., *Science* 241 (1988) 1077-80
- Lessey, B. A., et al., *J Clin Endocrinol Metab* 67 (1988) 334-40
- Leyendecker, G., et al., *Hum Reprod* 11 (1996) 1542-51
- Leyendecker, G., et al., *Hum Reprod Update* 4 (1998) 752-62
- Leyendecker, G., *Hum Reprod* 15 (2000) 4-7
- Lockhart, D. J., et al., *Nat Biotechnol* 14 (1996) 1675-80
- Meyer, R., *Zbl Gynäk.* 43 (1919) 745-750
- Noe, M., et al., *Hum Reprod* 14 (1999) 190-7
- Okulicz, W. C., et al., *Biol Reprod* 49 (1993) 24-32
- Padykula, H. A., et al., *Biol Reprod* 40 (1989) 681-90
- PCR Primer, a Laboratory Manual (1995) -, Eds. C. W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y
- PCR protocols: A guide to Methods and Applications (1990), Eds. Innis, Gelfand, Snisky and White, Academic Press, San Diego
- PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (1992), Eds. H. Erlich, Freeman Press, New York

- Pease, A. C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91 (1994) 5022-6
- Sambrook, J., et al. in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Sampson, J. A., Am. J. Obstet. Gynaecol. 14 (1927) 422-429
- Tijssen - in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990), Amsterdam, Elsevier
- Tijssen, P., Hybridization with nucleic acid probes Part I: Theory and nucleic acid preparation in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vo" (1993)
- Tyagi, S., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996) 5395-400
- Urdea, M. S., Biotechnology (N Y) 12 (1994) 926-8
- Vigano, P., et al., Fertil Steril 56 (1991) 894-9
- Viville, B., et al., Hum Reprod 12 (1997) 815-22
- Walker, G. T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 392-6
- Werth, R. and Grusdew, W., Arch. Gynäkol. 55 (1898) 325-409
- Wetzstein, R., Arch. Gynecol. 202 (1965) 1-13
- Wu, D. Y. and Wallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560-9

US 4,683,195

US 4,683,202

US 5,124,246

US 5,362,655

US 5,510,270

US 5,556,752

US 5,578,832

US 5,629,154

US 5,858,803

WO 01/79846

WO 99/63116

【 0 1 3 3 】

一般に受け入れられるか、または広範に使用することができる。

【発明の効果】本発明の子宮内膜症の診断方法によれば、子宮内膜症の分野の臨床診断の常套手法において、

フロントページの続き

F ターム(参考) 4B063 QA19 QQ53 QR32 QR55 QR62
QS25 QS34

【外国語明細書】

1. Title of Invention

Diagnosis of endometriosis from menstrual blood

2. Claims

1. A method for diagnosing endometriosis, said method comprising
 - (a) obtaining a sample of menstrual blood
 - (b) measuring basal cells in said sample or
 - (c) measuring at least one gene product typical for cells of the basal endometrium in said sample and
 - (d) correlating the measurement in (b) or (c) to the diagnosis of endometriosis.
2. The method of claim 1, wherein said gene product is a polypeptide.
3. The method of claim 1, wherein basal cells are measured by immunohistology.
4. The method of claim 2, wherein said gene product is selected from the group consisting of estrogen receptor, progesterone receptor and p450 aromatase.
5. The method of claim 2, wherein said polypeptide is measured in an immunoassay.
6. The method of claim 5, wherein said immunoassay is a sandwich immunoassay.
7. The method of claim 1, wherein said gene product is an mRNA.
8. A method for diagnosing endometriosis, said method comprising
 - (a) obtaining a sample of menstrual blood
 - (b) measuring the amount of at least one gene product typical for basal cells in said sample,
 - (c) measuring the amount of a gene product from cells of the functionalis of the endometrium in said sample,
 - (d) assessing the relative amount of (b) to (c) and
 - (e) correlating said relative amount (d) to endometriosis.
9. The method of claim 8, wherein said gene product from cells of the functionalis of the endometrium is selected from the group of a protein of the cytoskeleton and 17 β HSD-type II.
10. The method of claim 9, wherein said gene product from cells of the functionalis of the endometrium is 17 β HSD-type II.

3. Detailed Description of Invention

Technical Field to which the Invention Pertains

The present invention relates to a method for diagnosing endometriosis. The method comprises obtaining a sample of menstrual blood, measuring basal cells in said sample or measuring at least one gene product typical for cells of the basal endometrium in said sample and correlating said measurement to the diagnosis of endometriosis.

Prior Art

Endometriosis is a common and painful disorder characterized by the growth of endometrial cells at extra uterine (ectopic) sites. Ectopic implantation and growth of endometrial tissue is found on the peritoneum of the abdominal wall and at the outer surface of various organs, including primarily, the lower bowel, ovaries and fallopian tubes (Vigano, P., et al., *Fertil Steril* 56 (1991) 894-9).

Various theories on origin and etiology of endometriosis have been put forward and are currently discussed in the corresponding scientific literature.

In a first hypothesis, endometriosis is considered an autoimmune disease. This theory is based on the findings that in many sera of patients antibodies against "self antigens" are found. Several diagnostic efforts are based on the detection and measurement of auto-antibodies found in sera derived from endometriotic patients (WO 01/79846).

A second hypothesis on the etiology of endometriosis is the so-called "theory of ectopic implantation" Sampson, J. A., *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 14 (1927) 422-429 whereas a third hypothesis explains endometriosis by "metaplasia" of endometrial tissue (Meyer, R., *Zbl. Gynäk.* 43 (1919) 745-750). Several reports suggest that retrograde menstruation which may be linked to abnormal immune function, may play a role in establishing ectopic endometrial lesions (Ishimura, T. and Masuzaki, H., *Am J Obstet Gynecol* 165 (1991) 210-4).

It has been recently found, that endometriosis and adenomyosis are variants of the same disease process with uterine peristalsis and hyperperistalsis being important causal factors. It was proposed that adenomyosis would result from the infiltration of basal endometrium into myometrial dehiscencies that were caused by chronic uterine peristalsis and hyperperistalsis and that the muscular component of adenomyosis would result secondarily from metaplasia of the infiltrating endometrial stroma (Kunz, G., et al., *Hum Reprod* 15 (2000) 76-82). It was furthermore suggested that endometriosis would result from the

detachment of endometrial cells with a higher potential for proliferation and infiltrative growth and from their enhanced transtubal transport by uterine hyperperistalsis into the peritoneal cavity, where they implant on peritoneal surfaces (Leyendecker, G., et al., Hum Reprod 11 (1996) 1542-51; Leyendecker, G., et al., Hum Reprod Update 4 (1998) 752-62; Leyendecker, G., Hum Reprod 15 (2000) 4-7).

Endometriotic tissue is supported by and connected to the bodies blood system. In theory, independent of its "true" etiology, endometriosis might be diagnosed from blood by detecting therein marker-molecules which are indicative for this disease entity. Several approaches are known from the patent literature which focus diagnostic procedures for diagnosis of endometriosis based on the detection of marker molecules from blood or from tissue samples. E.g., WO 99/63116 describes the up-regulation of prothymosin in endometrial tissue and describes approaches for use of prothymosin in the diagnosis of endometriosis, especially from blood or from samples of endometriotic biopsies.

However, it appears that to date for the field of endometriosis no biochemical or immunological marker is generally accepted or broadly used in clinical diagnostic routine despite the urgent need for such a tool.

Problem to be Solved by the Invention

An object of the present invention is to provide means which is generally accepted or broadly used in clinical diagnostic routine in the field of endometriosis.

Means to Solve the Problems

Whereas in the attempts known from the art blood or blood constituents are primarily used in the diagnosis of endometriosis, it now has surprisingly been found that endometriosis can be diagnosed by analyzing menstrual blood.

While there is a tremendous load of endometrial tissue which is shed off as a normal result of the menstrual cycle, it has now been established, that it is possible to detect gene products derived from a special layer of the endometrium, the so-called "zone IV basal endometrium", of which fragments are not or only rarely found in menstrual blood of women without endometriotic lesions but are frequently found in a menstrual blood sample of women suffering from endometriosis.

In a first embodiment the present invention therefore relates to a method for diagnosing endometriosis, said method comprising obtaining a sample of menstrual blood measuring cells of the basal endometrium in said sample or measuring at least one gene product typical for cells of the basal endometrium in said sample and correlating said measurement to the diagnosis of endometriosis.

Preferably, the gene product which is detected from such a basal cell is an mRNA or a polypeptide. Such polypeptide for example is easily detected by immunohistology or by aid of an immunoassay.

In a further preferred embodiment the present invention relates to a method for diagnosing endometriosis, said method comprising obtaining a sample of menstrual blood measuring the amount of at least one gene product typical for cells of basal endometrium in said sample, measuring the amount of a gene product of cells of the functionalis layers of the endometrium in said sample, assessing the relative amount of the gene product typical for basal endometrium to the gene product of the functionalis layers of the endometrium and correlating said relative amount to endometriosis.

Specifically, the gist of the present invention follows:

- [1] A method for diagnosing endometriosis, said method comprising
 - (a) obtaining a sample of menstrual blood
 - (b) measuring basal cells in said sample or
 - (c) measuring at least one gene product typical for cells of the basal endometrium in said sample and
 - (d) correlating the measurement in (b) or (c) to the diagnosis of endometriosis,
- [2] The method of [1] wherein said gene product is a polypeptide,
- [3] The method of [1] wherein basal cells are measured by immunohistology,
- [4] The method of [2] wherein said gene product is selected from the group consisting of estrogen receptor, progesterone receptor and p450 aromatase,
- [5] The method of [2] wherein said polypeptide is measured in an immunoassay,
- [6] The method of [5] wherein said immunoassay is a sandwich immunoassay,
- [7] The method of [1] wherein said gene product is an mRNA,
- [8] A method for diagnosing endometriosis, said method comprising
 - (a) obtaining a sample of menstrual blood
 - (b) measuring the amount of at least one gene product typical for basal cells in said sample,
 - (c) measuring the amount of a gene product from cells of the functionalis of the endometrium in said sample,
 - (d) assessing the relative amount of (b) to (c) and
 - (e) correlating said relative amount (d) to endometriosis,
- [9] The method of [8] wherein said gene product from cells of the functionalis of the endometrium is selected from the group of a protein of the cytoskeleton and 17 β HSD-type II, and
- [10] The method of [9] wherein said gene product from cells of the functionalis of the endometrium is 17 β HSD-type II.

Modes for Carrying Out the Invention

In order to fully understand and appreciate the procedure of and the progress achieved by the present invention, it is necessary to describe in some detail the various tissues comprised within the female uterus, their phylogenetic origin as well as their properties and changes during the course of the menstrual cycle.

The uterus is composed of two different organs, the inner archimetra and the outer neometra (Noe, M., et al., Hum Reprod 14 (1999) 190-7, especially Fig. 5 therein). The endometrial epithelial cells, the endometrial stroma as well as the subendometrial myometrium (archimyometrium or functional zone myometrium) are phylogenetically rather old tissues and therefore termed archimetrium. The later phylogenetic acquisition of muscular layers in addition to the myometrium, which are represented by the stratum vasculare and the stratum supravasculare, appears to be related to the forces that are required for parturition under the condition of viviparity.

Phylogenetically and ontogenetically, the archimetra or endometrial-subendometrial unit constitutes the oldest part of the uterus (hence its denomination archimetra) and is composed of the epithelial and stromal endometrium and the underlying stratum subvasculare of the myometrium with a predominantly circular arrangement of muscular fibers. While both, the endometrium and the subendometrial myometrium display a cyclic pattern of steroid hormone receptor expression, the two other layers of the myometrium, the outer stratum supravasculare with a predominantly longitudinal arrangement of muscular fibers and the stratum vasculare consisting of a three-dimensional mesh of short muscular bundles (Werth, R. and Grusdew, W., Arch. Gynäkol. 55 (1898) 325-409; Wetzstein, R., Arch. Gynecol. 202 (1965) 1-13), rather show a continuously high expression

of both the estrogen receptor (ER) and the progesterone receptor (PR) throughout the cycle (Noe et al., supra). Only the archimetra is of paramesonephric origin, while the outer layers, the neometra, are of non-Müllerian origin (Werth and Grisdew, supra). There is an intimate structural contact between the stratum subvasculare and the stratum vasculare in that the muscular fibers of the two layers blend (Werth and Grisdew, supra). This transitional zone (TZ), which constitutes roughly the inner quart of the stratum vasculare, exhibits an intermediate cyclic pattern of steroid receptor expression (Noe et al., supra).

The functionalis is the endometrial tissue undergoing most changes during a menstrual cycle: In the first half of the menstrual cycle the functionalis is proliferating under the influence of estradiol and is, following the rise of progesterone after ovulation, transformed into the secretory endometrium and shed at the end of a non-pregnancy cycle. The functionalis is comprised of two layers (zone I and II functionalis). Layer III is an intermediate layer between functionalis and basalis. The basal zone IV endometrium is the deepest endometrial layer at the bottom of the glands. It does not undergo secretory transformation, it is usually not shed during menstruation, it is most active at the end of the cycle and has the potential of rebuilding the endometrium. All four layers are composed of epithelium and stroma (Padykula, H. A., et al., Biol Reprod 40 (1989) 681-90; Okulicz, W. C., et al., Biol Reprod 49 (1993) 24-32).

Layer IV of the endometrium is also called "basal endometrium". In the sense of the present invention "basal cells" or "basalis cells" or "cells of the basal endometrium" refer to cells of layer IV of the endometrium.

According to the present invention "functionalis" of "functionalis cells" are the cells comprised in layers I and II of the endometrium.

At the end of the secretory phase and at the time of the onset of menstruation mitotic and hence proliferative activity is only present in the basal zone IV of the primate endometrium, while in all of the functionalis and in the basal zone III mitotic quiescence prevails (Padykula, et al., supra; Okulicz, et al., supra). Furthermore, peristromal smooth muscle cells have been shown to be present in all superficial peritoneal endometriotic lesions and that they may result from stromal metaplasia of the shed and implanted endometrium (Anaf, V., et al., Hum Reprod 15 (2000) 767-71) indicating that, with respect to the main morphological components, i.e. endometrial epithelium, endometrial stroma and smooth muscular tissue, no principal difference exists between endometriosis and adenomyosis.

Surprisingly it has been found, that adenomyosis and endometriosis, result from the dislocation of basal endometrium – adenomyosis by direct infiltration of basal cells into the myometrial wall and endometriosis following the detachment of fragments of zone IV basal cells during menstruation and their transplantation into the peritoneal cavity. Even more surprisingly, it could be shown that diagnosis of endometriosis from menstrual blood is possible based on the specific detection of basal cells or of at least one gene product, which is typical for basal cells.

In a first embodiment the present invention relates to a method for diagnosing endometriosis, said method comprising obtaining a sample of menstrual blood measuring basal cells in said sample or measuring at least one gene product typical for cells of the basal endometrium in said sample and correlating said measurement to the diagnosis of endometriosis.

In a further preferred embodiment the present invention relates to a method for diagnosing endometriosis, said method comprising obtaining a sample of menstrual blood measuring at least one gene product typical for basal cells in said sample and correlating said measurement to the diagnosis of endometriosis.

As discussed above, several theories on the etiology of endometriosis and also a non-consistent terminology is present in the field.

In the sense of the present invention, "endometriosis" is meant to cover both the aspects which in the literature are known as endometriosis and adenomyosis.

As mentioned, the inventive method is based on a sample of menstrual blood. "Menstrual blood" in the sense of the present invention refers to the red blood cells containing fluids which during menses can be collected by various means from vaginal bleeding. In a preferred embodiment menstrual blood is directly collected from the posterior vaginal fornix. Other methods of collecting menstrual blood are the use of absorptives like pads and tampons and their appropriate extraction. It is also preferred to assess the menstrual blood derived in timed samples, i.e. to compare samples taken at the same day after onset of bleeding.

The present invention makes use of a "gene product" (especially a mRNA or a polypeptide) which is "typical for basal cells".

The skilled artisan, by routine procedures, can easily assess whether a gene product is typical for layer IV (i.e. found in layer IV in a significantly higher level as compared to cells of the functionalis) or can be considered specific (present in layer IV and essentially no detectable level of the same gene product in cells of the functionalis. Quantitative routine measures to assess "typical" and "specific" are also at hand and, where considered necessary, may be used.

In the sense of the present invention a gene product is considered typical or a marker molecule for the basal endometrium if said gene product in basal cells is found in amounts at least twice as abundant or higher, or at most half as abundant or lower in basal cells as compared to cells of the other endometrial layers. More preferred the amount of said gene product is increased by at least 5-fold or even more preferred by at least 10-fold, as compared to the cells of the functionalis.

Most easily, both mRNA or polypeptide levels, respectively, are assessed by aid of radioactively labeled detection molecules and their level is assessed by quantifying the radio activity bound to cells of the functionalis as compared to cells of level IV of the endometrium.

The more pronounced the difference in expression pattern for a gene product, the more easy this gene product is used in the detection of basal cells.

It is therefore preferred to use in a method according to the present invention a gene product which is found in a ten-fold higher level in basal cells as compared to cells of the functionalis III of the endometrium. Gene products specific for basal cells are even more preferred.

The term "specific" implies that there is reactivity to one element and that there is essentially no reactivity to the second element for which specificity is assessed. In the present invention a marker is considered specific for basal cells, if it is present there and essentially absent from cells of the functionalis layer of the endometrium during menstruation. However, very low reactivity (< 1% functionalis /layer IV) does not exclude the use of the term specific and gene-products found in such low levels in endometrial cells of the functionalis as compared to layer IV cells, nonetheless, are considered basal cell specific. Preferably, the marker used is a specific marker and most preferred this marker is a specific marker which is only found in basal cells and essentially not found in cells of the functionalis of endometrium.

As the skilled artisan appreciates the diagnosis of a disease based on biochemical or immunological methods always is a compromise between the two extremes of 100 % sensitivity and 100 % specificity. This is especially known from the field of tumor markers. The situation for the present invention is quite similar. With the procedures according to the present invention it is now possible to correlate the measurement of basal cells or the measurement of a gene product typical for basal cells from a sample of menstrual blood to endometriosis.

The more abundant these cells or these gene products are found, the more likely a patient suffers from endometriosis.

In a preferred embodiment the gene product measured is a polypeptide. The following definitions shall apply in this context.

"Diagnostic" means identifying the presence or nature of a pathologic condition. Diagnostic methods differ in their specificity and sensitivity. While a particular diagnostic method may not provide a definitive diagnosis of a condition, it suffices if the method provides a positive indication that aids in diagnosis.

"Test amount" refers to an amount of an analyte in a subject sample, which is then compared to a normal amount of the analyte in a sample (e.g., from a healthy individual) such that the relative comparison of the values provides a reference value for diagnosing a designated disease. Depending upon the method of detection, the test amount may be a determination of the amount of the analyte, but it is not necessarily an amount. The test amount may also be a relative value, such as a plus or a minus score, and also includes an amount indicating the presence or absence of the analyte in a sample.

"Normal amount" refers to an amount or a range of an analyte in a biological sample that indicates health or lack of pathology.

"Diagnostic amount" refers to an absolute or normalized amount of an analyte in a biological sample that is consistent with the diagnosis of a particular disease.

"Polypeptide" refers to a polymer composed of amino acid residues, related naturally occurring structural variants, and synthetic non-naturally occurring analogs thereof linked via peptide bonds, related naturally occurring structural variants, and synthetic non-naturally occurring analogs thereof. Synthetic polypeptides can be synthesized, for example, using an automated polypeptide synthesizer.

"Affinity agent" refers to any material capable of adsorbing an analyte. This includes, without limitation, anion exchange materials, metal chelators, antibodies, protein ligands and polynucleotides.

"Antibody" refers to a polypeptide ligand substantially encoded by an immunoglobulin gene or immunoglobulin genes, or fragments thereof, which specifically binds and recognizes an epitope (e.g., an antigen). The recognized immunoglobulin genes include the kappa and lambda light chain constant region genes, the alpha, gamma, delta, epsilon and μ heavy chain constant region genes, and the myriad immunoglobulin variable region genes. Antibodies exist, e.g., as intact immunoglobulins or as a number of well characterized fragments produced by digestion with various peptidases. This includes, e.g., Fab' and F(ab')₂ fragments. The term "antibody", as used herein, also includes antibody fragments either produced by the modification of whole antibodies or those synthesized *de novo* using recombinant DNA methodologies. It also includes polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, chimeric antibodies and humanized antibodies.

A ligand or a receptor (e.g., an antibody) "specifically binds to" or "is specifically immunoreactive with" a compound analyte when the ligand or receptor functions in a binding reaction which is determinative of the presence of the analyte in a sample of heterogeneous compounds. Thus, under designed assay (e.g., immunoassay) conditions, the ligand or receptor binds preferentially to a particular analyte and does not bind in a significant amount to other compounds present in the sample.

"Immunoassay" refers to a method of detecting an analyte in a sample involving contacting the sample with an antibody that specifically binds to the analyte and detecting binding between the antibody and the analyte. A variety of immunoassay formats may be used to select antibodies specifically immunoreactive with a particular protein. For example, solid-phase ELISA immunoassays are routinely used to select monoclonal antibodies specifically immunoreactive with a protein. See Harlow and Lane, in "Antibodies, A Laboratory Manual" (1988), Cold Spring Harbor Publications, New York, for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity.

"Detecting" refers to determining the presence, absence, or amount of an analyte in a sample, and can include quantifying the amount of the analyte in a sample or per cell in a sample.

"Detectable moiety" or a "label" refers to a composition detectable by spectroscopic, photochemical, biochemical, immunochemical, or chemical means. For example, useful labels include ^{32}P , ^{35}S , fluorescent dyes, electron-dense reagents, enzymes (e.g., as commonly used in an ELISA), biotin-streptavidin, digoxigenin, haptens and proteins for which anti-sera or monoclonal antibodies are available, or nucleic acid molecules with a sequence complementary to a target. The detectable moiety often generates a measurable signal, such as a radioactive, chromogenic, or fluorescent signal, that can be used to quantitate the amount of bound detectable moiety in a sample.

The detectable moiety may be directly or indirectly detectable. Indirect detection can involve the binding of a second directly or indirectly detectable moiety to the detectable moiety. For example, the detectable moiety can be the ligand of a binding partner, such as biotin or a hapten (e.g., digoxin or digoxigenin), which is a binding partner for streptavidin or a corresponding anti-hapten antibody, respectively. The binding partner may itself be directly detectable, for example, an antibody may be itself labeled with a fluorescent molecule. The binding partner also may be indirectly detectable, for example a labeled secondary antibody.

"Linker" refers to a molecule that joins two other molecules, either covalently, or through ionic, van der Waals or hydrogen bonds. Linkers are often used to couple a label to a specific binding partner.

The methods of detecting a polypeptide are numerous, including for example mass spectroscopy, chromatographic procedures and a variety of immunological procedures. Amongst the immunological methods especially the so-called immunoassays, the immunohistological procedures and affinity capture mass spectroscopy shall be mentioned.

An immunoassay according to the present invention - used to detect a marker molecule derived from basal endometrial cells - employs at least one antibody reagent as defined above. Many different immunological procedures are suitable and the skilled artisan will find all information required for setting out and performing such assays in relevant text books, like Tijssen - in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990), Amsterdam, Elsevier.

Typically, the specific antibody reagent is directly or indirectly coated to a solid support, like a membrane (i. g., nitrocellulose) a micro-titer-plate (manufactured for example from PVC, polypropylene or polystyrene), test-tube (glass or a plastic material as described by

micro-titer-plates), a dip-stick (manufactured from the same material as manufactured for test-tube) or a particulate material which usually is based on latex or polystyrene.

For direct coating the antibody is adsorbed to the solid phase directly as the name says. This, however, in many cases has proven disadvantageous, because part of the antibody thereby is denatured, only a rather low density is achieved and conditions for coating have to be optimized for each individual antibody reagent.

Many recently developed immunoassays therefore are based on indirect coating of antibodies to the solid phase. This coating is mediated by use of an analyte-independent binding pair. Well-known examples of such analyte-independent binding pairs are the biotin/streptavidin system or the digoxin-antidigoxin system. Details of such methods are especially given in US 5,858,803 and US 5,362,655.

For routine applications it is preferred to use a solid phase pre-coated with streptavidin and to indirectly bind the analyte specific component of the assay system (e.g. an antibody) to such solid phase in its biotinylated form.

Two types of assay setups are routinely used in analyte detection procedures which are generally referred to competitive-type and sandwich-type assays, respectively. Different ways are known from the literature to perform for example a competitive-type assay. In one mode, the analyte to be detected is labeled and competes with the analyte contained in the sample to be investigated. The more analyte present in the test sample, the lower the signal found in such a competitive-type assay.

When using a sandwich-type assay, both sides of such sandwich are formed by a specific binding partner to the analyte under investigation, preferably both are antibodies. Appropriate antibody reagents are selected which mutually do not interfere in their respective binding to the analyte. Such antibodies are modified to allow for solid phase binding or for signal generation. In such a sandwich-type assay the signal generated is directly proportional to the amount of analyte present in the sample.

In a further preferred embodiment the diagnostic method according to the present invention is characterized in that the detection is performed by immunohistochemistry. Whereas in the immunoassay procedures as described above, the cells contained in a menstrual blood sample are solubilized, for immunohistochemical procedures the menstrual blood sample is directly transferred into a phosphate buffer saline solution which contains formaldehyde. The cells and tissue fragments contained in the menstrual

blood are mixed and fixed therein, allowed to settle, embedded according to standard procedures, and sections cut therefrom are investigated in immunohistochemistry. Several specific examples for performing such immunohistochemical procedures are given in the Examples section.

In immunohistochemistry the investigator has several criteria at hand, for example tissue morphology as well as staining intensity. The skilled pathologist based on the criteria available can easily tell whether a sample analyzed does contain basal cells or not. For such staining procedures polypeptides typical for basal cells i. e. leading to a stronger staining of basal cells, are sufficient for a positive diagnosis of such cells.

It can also be envisaged, that the cells and tissue fragments as contained in menstrual blood are treated to release individual cells from tissue fragments. Such single cells can easily be stained according to standard procedures and analyzed by a fluorescence activated cell sorter.

Using immunohistochemistry on samples from biopsies (obtained by hysterectomy) it has been found that at the time of bleeding only basal cells layer IV of the human endometrium contain significant amounts of estrogen receptor, progesterone receptor, especially progesterone receptor isoform A and aromatase p450. At the time of menses these markers are confined to and specific for cells of the basal endometrium. In a preferred embodiment the polypeptide detected is therefore selected from the group consisting of estrogen receptor, progesterone receptor, progesterone receptor type A, and p450 aromatase. Since the staining for p450 aromatase is most intensive and progesterone receptor type A only has been found in basal cells of the endometrium and not in other layers of the endometrium it is preferred to select either progesterone receptor type A or p450 aromatase. Most preferred is the detection of p450 aromatase.

In a further embodiment the "gene product" is an mRNA. Of course, in diagnostic procedures, a corresponding c-DNA may be used. The following definitions shall apply.

"Nucleic acid sequence", "nucleotide sequence" and "polynucleotide sequence" as used herein refer to an oligonucleotide or polynucleotide, and fragments or portions thereof, and to DNA or RNA of genomic or synthetic origin which may be single- or double-stranded, and represent the sense or antisense strand.

As used herein, the terms "oligonucleotides" and "oligomers" refer to a nucleic acid sequence of at least about 10 nucleotides and as many as about 60 nucleotides, preferably

about 15 to 30 nucleotides, and more preferably about 20 - 25 nucleotides, which can be used as a probe or amplifier.

As used herein, the terms "complementary" or "complementarity" are used in reference to "polynucleotides" and "oligonucleotides" (which are interchangeable terms that refer to a sequence of nucleotides) related by the base complementary to the sequence "5'-ACTG-3'." Complementarity can be "partial" or "total". "Partial" complementarity is where one or more nucleic acid bases is not matched according to the base pairing rules. "Total" or "complete" complementarity between nucleic acids is where each and every nucleic acid base is matched with another base under the base pairing rules. The degree of complementarity between nucleic acid strands has significant effects on the efficiency and strength of hybridization between nucleic acid strands. This is of particular importance in amplification reactions, as well as detection methods which depend upon binding between nucleic acids.

As used herein, the term "hybridization" is used in reference to the pairing of complementary nucleic acids using any process by which a strand of nucleic acid joins with a complementary strand through base pairing to form a hybridization complex. Hybridization and the strength of hybridization (i.e., the strength of the association between the nucleic acids) is impacted by such factors as the degree of complementarity between the nucleic acids, stringency of the conditions involved, the T_m of the formed hybrid, and the G:C ratio within the nucleic acids.

As used in herein, the term "sample template" refers to nucleic acid originating from a sample which is analyzed for the presence of a target sequence of interest. In contrast, "background template" is used in reference to nucleic acid other than sample template which may or may not be present in a sample. Background template is most often inadvertent. It may be the result of carryover, or it may be due to the presence of nucleic acid contaminants sought to be purified away from the sample. For example, nucleic acid from organisms other than those to be detected may be present as background in a test sample.

"Amplification" is defined as the production of additional copies of a nucleic acid sequence and is generally carried out using polymerase chain reaction technologies well known in the art ("PCR Primer, a Laboratory Manual" (1995), Eds. C. W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y.). As used herein, the term "polymerase chain reaction" ("PCR") refers to the method of K. B. Mullis US 4,683,195 and US 4,683,202, hereby incorporated by reference, which describe a method for increasing

the concentration of a segment of a target sequence in a mixture of genomic DNA without cloning or purification. The length of the amplified segment of the desired target sequence is determined by the relative positions of two oligonucleotide primers with respect to each other, and therefore, this length is a controllable parameter. By virtue of the repeating aspect of the process, the method is referred to as the „polymerase chain reaction“ (hereinafter „PCR“). Because the desired amplified segments of the target sequence become the predominant sequences (in terms of concentration) in the mixture, they are said to be „PCR amplified“.

With PCR, it is possible to amplify a single copy of a specific target sequence in genomic DNA to a level detectable by several different methodologies (e.g., hybridization with a labeled probe; incorporation of biotinylated primers followed by avidin-enzyme conjugate detection; incorporation of ^{32}P -labeled deoxynucleotide triphosphates, such as dCTP or dATP, into the amplified segment). In addition to genomic DNA, any oligonucleotide sequence can be amplified with the appropriate set of primer molecules. In particular, the amplified segments created by the PCR process itself are, themselves, efficient templates for subsequent PCR amplifications.

The term „reverse transcription polymerase chain reaction“ and „RT-PCR“ refer to a method for reverse transcription of an RNA sequence to generate a mixture of cDNA sequences, followed by increasing the concentration of a desired segment of the transcribed cDNA sequences in the mixture without cloning or purification. Typically, messenger RNA (mRNA) is reverse transcribed using a single primer (e.g., an oligo-dT primer) prior to PCR amplification of the desired segment of the transcribed DNA using two primers.

As used herein, the term „primer“ refers to an oligonucleotide, whether occurring naturally as in a purified restriction digest or produced synthetically, which is capable of acting as a point of initiation of synthesis when placed under conditions in which synthesis of a primer extension product which is complementary to a nucleic acid strand is induced, (i.e., in the presence of nucleotides and of an inducing agent such as DNA polymerase and at a suitable temperature and pH). The primer is preferably single stranded for maximum efficiency in amplification, but may alternatively be double stranded. If double stranded, the primer is first treated to separate its strands before being used to prepare extension products. Preferably, the primer is an oligodeoxyribonucleotide. The primer must be sufficiently long to prime the synthesis of extension products in the presence of the inducing agent. The exact lengths of the primers will depend on many factors, including temperature, source of primer and the use of the method.

As used herein, the term „probe“ refers to an oligonucleotide (i.e., a sequence of nucleotides), whether occurring naturally as in a purified restriction digest or produced synthetically, recombinantly or by PCR amplification, which is capable of hybridizing to another oligonucleotide of interest. A probe may be single-stranded or double-stranded. Probes are useful in the detection, identification and isolation of particular gene sequences. It is contemplated that any probe used in the present invention will be labeled with any „reporter molecule“, so that it is detectable in any detection system, including, but not limited to enzyme, fluorescent, radioactive, and luminescent systems.

As used herein the term "coding region" when used in reference to a structural gene refers to the nucleotide sequences which encode the amino acids found in the nascent polypeptide as a result of translation of a mRNA molecule. The coding region is bounded, in eukaryotes, on the 5' side by the nucleotide triplet "ATG" which encodes the initiator methionine and on the 3' side by one of the three triplets which specify stop codons (i.e., TAA, TAG, TGA).

As used herein, the term "structural gene" or "structural nucleotide sequences" refers to a DNA sequence coding for RNA or a protein which does not control the expression of other genes. In contrast, a "regulatory gene" or "regulatory sequence" is a gene which encodes products (e.g. transcription factors) which control the expression of other genes.

As used herein, the term "gene" means the deoxyribonucleotide sequences comprising the coding region of a structural gene. A "gene" may also include non-translated sequences located adjacent to the coding region on both the 5' and 3' ends such that the gene corresponds to the length of the full-length mRNA. The sequences which are located 5' of the coding region and which are present on the mRNA are referred to as 5' non-translated sequences. The sequences which are located 3' or downstream of the coding region and which are present on the mRNA are referred to as 3' non-translated sequences. The term "gene" encompasses both cDNA and genomic forms of a gene. A genomic form or clone of a gene contains the coding region interrupted with non-coding sequences termed "introns" or "intervening regions" or "intervening sequences". Introns are segments of a gene which are transcribed into heterogeneous nuclear RNA (hnRNA); introns may contain regulatory elements such as enhancers. Introns are removed or "spliced out" from the nuclear or primary transcript; introns therefore are absent in the messenger RNA (mRNA) transcript. The mRNA functions during translation to specify the sequence or order of amino acids in a nascent polypeptide.

In a preferred mode of the present invention the mRNA level of a gene typically expressed in basal cells is assessed. Most preferred an mRNA corresponding to a gene specifically expressed in layer IV cells as compared to cells of endometrial epithelium is assessed.

Preferably, the basal cell m-RNA is the transcript of a gene coding for estrogen receptor (ER), progesterone receptor type A (PR-A), or aromatase p450. Most preferred are mRNAs of progesterone receptor type A and aromatase p450.

Such mRNA measurement is performed according to standard and routine procedures, such methods involve detecting and/or quantifying expression of a marker gene for basal cells mRNA or cDNA using amplification-based assays with or without signal amplification, hybridization based assays, and combination amplification-hybridization assays.

Polynucleotide assays preferably are performed with a sample of nucleic acid isolated from the biological sample.

The polynucleotide (e.g., genomic DNA, RNA or cDNA) may be isolated from the sample according to any of a number of methods well known to those of skill in the art. Methods for isolating nucleic acids are well known to those of skill in the art and are described, for example, in Tijssen, P., Hybridization with nucleic acid probes Part I: Theory and nucleic acid preparation in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol" (1993); Seite 19 WO 99/63116; Sambrook, J., et al. in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press; Ausubel, F., et al. - in "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley Verlag.

In one embodiment, the assays of the present invention are amplification-based assays for detection of a gene product typical for basal cells (e.g., mRNA or cDNA; hereinafter also referred to as "target"). In an amplification based assay, all or part of an polynucleotide target is amplified, and the amplification product is then detected directly or indirectly. This includes detecting the amplification product by hybridization with a probe, by detecting a product of the appropriate size on a gel or by mass spectrometry, for example, or by determining the sequence of at least a part of the amplification product. When there is no underlying gene product to act as a template, no amplification product is produced (e.g., of the expected size), or amplification is non-specific and typically there is no single amplification product. In contrast, when the underlying gene or gene product is present, the target sequence is amplified, providing an indication of the presence and/or quantity of

the underlying gene or mRNA. Target amplification-based assays are well known to those of skill in the art.

Primers and probes for detecting gene product typical for basal cells may be designed and produced by those of skill by referring to the sequences of genes which are expressed in a pattern typical for layer IV of the endometrium. Suitable primers and probes are sufficiently complementary to the gene product typical for basal cells to hybridize to the target nucleic acid. Primers are usually between about 10 and about 100 bases, typically between about 12 and about 50 bases, and may amplify all, or any portion, of the gene product typical for basal cells.

In one embodiment, a gene product typical for basal cells is amplified and detected using the polymerase chain reaction (including all variants, e.g., reverse-transcriptase-PCR; the Sunrise Amplification System (Oncor, Inc, Gaithersburg MD); and numerous others known in the art). In one illustrative embodiment, PCR amplification is carried out in a 50 μ l solution containing the nucleic acid sample (e.g., cDNA obtained through reverse transcription of mRNA), 100 μ M in each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP; Pharmacia LKB Biotechnology, NJ), the mRNA-specific PCR primer(s), 1 unit/ Taq polymerase (Perkin Elmer, Norwalk CT), 1 x PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris, pH 8.3 at room temperature, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatin) with the amplification run for about 30 cycles at 94° for 45 sec, 55° for 45 sec and 72° for 90 sec.

However, as will be appreciated, numerous variations may be made to optimize the PCR amplification for any particular reaction. Other suitable target amplification methods include the ligase chain reaction (LCR; e.g., Wu, D. Y. and Wallace, R. B., *Genomics* 4 (1989) 560-9; Landegren, U., et al., *Science* 241 (1988) 1077-80; Barany, F., *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 189-93; and Barringer, K. J., et al., *Gene* 89 (1990) 117-22);

5 strand displacement amplification (SDA; e.g., Walker, G. T., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 392-6); transcription amplification (e.g., Kwok, D. Y., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 1173-7); self-sustained sequence replication (3SR; e.g., Fahy, E., et al., *PCR Methods Appl* 1 (1991) 25-33; Guatelli, J. C., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 1874-8); the nucleic acid sequence based amplification (NASBA, Cingene,

0 Mississauga, Ontario; e.g., Compton, J., *Nature* 350 (1991) 91-2); the transcription-based amplification System (TAS); and the self-sustained sequence replication System (SSR).

One useful variant of PCR is PCR ELISA (e.g., Boehringer Mannheim Cat. No. 1 636 111) in which digoxigenin-dUTP is incorporated into the PCR product. The PCR reaction mixture is denatured and hybridized with a biotin-labeled oligonucleotide designed to anneal to an internal sequence of the PCR product. The hybridization products are immobilized on streptavidin coated plates and detected using anti-digoxigenin antibodies. Examples of techniques sufficient to direct persons of skill through *in vitro* amplification methods are found in PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (1992), Eds. H. Erlich, Freeman Press, New York; PCR protocols: A guide to Methods and Applications (1990), Eds. Innis, Gelfand, Snisky and White, Academic Press, San Diego.

Amplified products may be directly analyzed, e.g., by size as determined by gel electrophoresis; by hybridization to a target nucleic acid immobilized on a solid support such as a bead, membrane, slide, or chip; by sequencing; immunologically, e.g., by PCR-ELISA, by detection of a fluorescent, phosphorescent, or radioactive signal; or by any of a variety of other well-known means. An illustrative example of a detection method uses PCR primers augmented with hairpin loops linked to fluorescein and a benzoic acid derivative that serves as a quencher, such that fluorescence is emitted only when the primers unfold to bind their targets and replication occurs.

In addition, methods known to increase the signal produced by amplification of the target sequence may be used. Methods for augmenting the ability to detect the amplified target include signal amplification system such as: branched DNA signal amplification (e.g., US 5,124,246; Urdea, M. S., Biotechnology (N Y) 12 (1994) 926-8); tyramide signal amplification (TSA) System (DuPont); catalytic signal amplification (CSA; Dako); Q Beta Replicase Systems (Tyagi, S., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996) 5395-400).

One of skill in the art will appreciate that whatever amplification method is used, a variety of quantitative methods known in the art can be used if quantitation is desired. Detailed protocols for quantitative PCR may be found in PCR protocols: A guide to Methods and Applications (1990), Eds. Innis, Gelfand, Snisky and White, Academic Press, San Diego and Ausubet et al., supra (Unit 15) and Diaco, R., Practical Considerations for the Design of Quantitative PCR Assays in "PCR STRATEGIES" (1995) 84-108, Eds. I. e. al., Academic Press, New York; US 5,629,154.

A variety of methods for specific DNA and RNA measurement using nucleic acid hybridization techniques are known to those of skill in the art (see Sambrook et al., supra).

Hybridization based assays refer to assays in which a probe nucleic acid is hybridized to a target nucleic acid. Methods of selecting nucleic acid probe sequences for use in nucleic acid hybridization are discussed in Sambrook et al., *supra* and are based on the gene sequence of any appropriate gene typical or preferably specific for basal cells. In some formats, at least one of the target and probe is immobilized. The immobilized nucleic acid may be DNA, RNA, or another oligo- or poly-nucleotide, and may comprise natural or non-naturally occurring nucleotides, nucleotide analogs, or backbones. Such assays may be in any of several formats including: Southern, Northern, dot and slot blots, high-density polynucleotide or oligonucleotide arrays (e.g., Genechips™ Affymetrix), dip sticks, pins, chips, or beads. All of these techniques are well known in the art and are the basis of many commercially available diagnostic kits. Hybridization techniques are generally described in "Nucleic Acid Hybridization, A practical approach" (1985), Eds. Hames; Gall, J. G. and Pardue, M. L., *Proc Natl Acad Sci U S A* 63 (1969) 378-83; John, H. A., et al., *Nature* 223 (1969) 582-7.

One common format is direct hybridization, in which a target nucleic acid is hybridized to a labeled, complementary probe. Typically, labeled nucleic acids are used for hybridization, with the label providing the detectable signal. One method for evaluating the presence, absence, or quantity of a target mRNA is carrying out a Northern transfer of RNA from a sample and hybridization of a labeled target-specific nucleic acid probe. Other common hybridization formats include sandwich assays and competition or displacement assays. Sandwich assays are commercially useful hybridization assays for detecting or isolating nucleic acid sequences. Such assays utilize a "capture" nucleic acid covalently immobilized to a solid support and a labeled "signal" nucleic acid in solution. The biological or clinical sample will provide the target nucleic acid. The "capture" nucleic acid and "signal" nucleic acid probe hybridize with the target nucleic acid to form a "sandwich" hybridization complex. In the absence of target nucleic acid the signal nucleic acid cannot hybridize with the capture nucleic acid.

The present invention also provides probe-based hybridization assays for gene product typical for basal cells employing arrays of immobilized oligonucleotide or polynucleotides to which a target nucleic acid can hybridize. High density oligonucleotide arrays or polynucleotide arrays provide a means for efficiently detecting the presence and characteristics (e.g., sequence) of a target nucleic acid (e.g., a mRNA of estrogen receptor progesterone receptor type A, or aromatase p450). Techniques are known for producing arrays containing thousands of oligonucleotides complementary to defined sequences, at defined locations on a surface using photolithographic techniques for synthesis *in situ* (see, e.g., US 5,578,832; US 5,556,752; and US 5,510,270; Fodor, S. P., et al., *Science* 251 (1991)

767-73; Pease, A. C., et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 5022-6; and Lockhart, D. J., et al., *Nat Biotechnol* 14 (1996) 1675-80) or other methods for rapid synthesis and deposition of defined oligonucleotides (Blanchard, A. P., et al., *Biosensors & Bioelectronics* 11 (1996) 687-690). When these methods are used, oligonucleotides (e.g., 20-mers) of known sequence are synthesized directly on a surface such as a derivatized glass slide. Usually, the array produced is redundant, having several oligonucleotide probes on the chip specific for the polynucleotide corresponding to the gene typical for basal cell to be detected.

An alternative means for detecting expression of a gene encoding a protein typical for basal cells is *in situ* hybridization. *In situ* hybridization assays are well known and are generally described in Angerer, L. M., et al., *Methods Enzymol* 152 (1987) 649-61 and Ausubel et al., *supra*. In an *in situ* hybridization assay, cells or tissue specimens are fixed to a solid support, typically in a permeabilized state, typically on a glass slide. The cells are then contacted with a hybridization solution at a moderate temperature to permit annealing of labeled nucleic acid probes (e.g., ³²S-labeled riboprobes, fluorescently labeled probes) completely or substantially complementary to the target mRNA. Free probe is removed by washing and/or nuclease digestion, and bound probe is visualized directly on the slide by autoradiography or an appropriate imaging techniques, as is known in the art.

In alternative embodiments of polynucleotide assays it is not necessary to isolate nucleic acids (e.g., total or polyA⁺ RNA) from the biological sample prior to carrying out amplification, hybridization or other assays. These embodiments have certain advantages when RNA is to be measured, because they reduce the possibility of loss of mRNA during isolation and handling. For example, many amplification techniques such as PCR and RT-PCR defined above can be carried out using permeabilized cells (histological specimens and FACS analyses), whole lysed cells, or crude cell fractions such as certain cell extracts. Preferably, steps are taken to preserve the integrity of the target nucleic acid (e.g., mRNA) if necessary (e.g., addition of RNAase inhibitors). Amplification and hybridization assays can also be carried out *in situ*, according to the present invention in thin tissue sections from a sample of menstrual blood cells after fixation and embedding such cells (this way of preparing a sample as described in detail in Example 1) PCR, RT-PCR, or LCR amplification methods may be carried out, as well as known in the art, *in situ*, e.g., using a polymerase or ligase, a primer or primer(s), and (deoxy)ribonucleoside triphosphates (if a polymerase is employed), and reverse transcriptase and primer (if RNA is to be transcribed and the cDNA is to be detected) on fixed, permeabilized, or microinjected cells to amplify target RNA. This method is often useful when fluorescently-labeled dNTPs, primers, or other components are used in conjunction with microscopy. In regard to their diagnostic

utility, the results obtained by *in situ* PCR resemble those obtained by immunohistochemistry.

It is also a preferred embodiment according to the present invention to measure between 2 and 5 marker gene products of basal cells in order to further enhance the diagnostic sensibility and/or specificity and to even better correlate the values thus measured from a sample of menstrual blood to endometriosis.

Yet a further diagnostic improvement can be achieved if the value measured for a gene product typical for basal cells is "normalized" to a gene product "from cells of the functionalis". Such gene product is present in the cells of the functionalis of the endometrium in rather a constant amount throughout the menstrual cycle, or such gene product is at least rather constant during menses. Such gene product is for example derived from a gene selected from a gene known in the art as house-keeping gene. Typical house-keeping genes are the genes coding for proteins of the cytoskeleton.

In a preferred embodiment the present invention describes a method not requiring the presence of intact basal cells. Rather the method for diagnosing endometriosis comprises obtaining a sample of menstrual blood, measuring at least one gene product typical for cells of the basal endometrium in said sample and correlating the measurement to the diagnosis of endometriosis. In order to perform such measurement, it is preferred to treat the menstrual blood sample by appropriate measures in order to release the gene products from cellular constituents. As a result, the gene product(s) of interest is obtained in soluble and easily accessible form. In a preferred mode, the sample is diluted into an appropriate incubation buffer. Such incubation buffers are well-known to the skilled artisan. In case of immunoassays an appropriate buffer is selected, serving both the purposes to liberate and/or solubilize proteins and to allow for immunological binding and thus for formation of an immunological complex between the target protein and the immunological binding partner used.

In a further preferred embodiment, the present invention relates to a method for diagnosing endometriosis, said method comprising obtaining a sample of menstrual blood measuring the amount of at least one gene product typical for basal cells in said sample, measuring the amount of a gene product from cells of the functionalis of the endometrium in said sample, assessing the relative amount of the gene product typical for basal cells to the gene product from cells of the functionalis and correlating said relative amount to endometriosis.

A gene product which is typical for cells of the functionalis, especially at the time of menses is for example 17 β HSD-type II (HSD = hydrosteroid dehydrogenase).

Preferably, the gene product level or the gene product levels measured for gene products typical for basal cells are expressed relative to the gene product level of gene coding for a cytoskeletal protein or 17 β HSD-type II. Most preferred 17 β HSD is used to normalize the gene product typical or specific for basal cells and thus to correct for variations, e.g., induced by sampling mode, time or by the intensity of bleeding.

Most preferred a gene product which is specific for basal cells is normalized to a house-keeping gene of cells from the functionalis of the endometrium.

Examples

The following examples and references are provided to aid the understanding of the present invention, the true scope of which is set forth in the appended claims. It is understood that modifications can be made in the procedures set forth without departing from the spirit of the invention.

Example 1: Immunohistology form samples of tissue and menstrual blood

1.1 Tissue samples

Non-pregnant uteri were obtained from 70 pre-menopausal women (aged 24 - 55 years) undergoing hysterectomy for various reasons. Of these women 51 were suffering from endometriosis and/or adenomyosis (aged 26-55 years, mean 42 years). The uteri of the remaining 19 women (aged 24 - 49 years, mean 36 years) were devoid of endometrial and myometrial pathology and during laparotomy of these women there were no signs of endometriosis. All women had regular cycles and no history of hormone therapy for at least six months. The respective phases of the cycle were ensured by correlating the date of the last menstrual period with histological findings according to the usual histological dating method (Dallenbach-Hellweg, G. and Poulsen, H., in "Atlas der Histopathologie des Endometriums" (1984, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo).

In addition, a total number of 35 endometriotic lesions were obtained via laparoscopy or laparotomy from normally cycling pre-menopausal women (aged 25 - 51 years, mean 35 years) without hormone therapy for at least six months. These specimen were excised from various intra- and extra-peritoneal locations such as the parietal, intestinal, uterine, urinary

bladder peritoneum (n=25), ovarian endometriomas (n=6) and the recto-vaginal septum (n=4), respectively. In all cases the exact phase of cycle was known. Table I is a compilation of the number of tissue samples with respect to origin, menstrual phase and immunohistochemistry performed, respectively.

Table I

phase of cycle (days)	uteri of women with endometriosis		adenomyotic lesions		endometriotic lesions		uteri of healthy controls	
	endome- trium	myo- metrium	epithelium/ stroma	PMC	epithelium/ stroma	PMC	endo- metrium	myo- metrium
early prolif. phase (4-7)	10 (15)	10	10 (15)	10	8 (9)	8	4 (5)	4
mid-prolif. phase (8-11)	6 (5)	8	6 (5)	7	6 (9)	9 (13)	2 (2)	4 (2)
late prolif. phase (12-14)	5 (8)	4	3 (8)	3	5 (5)	3	2 (1)	2
early secret. Phase (15-18)	4 (5)	4	4 (5)	4	3 (3)	3	3 (2)	3
mid-secret. phase (19-23)	6 (8)	10	6 (8)	9	5 (4)	10	2 (4)	3 (5)
late secret. phase (24-28)	6 (6)	5	5 (6)	5	5 (5)	3	3 (5)	3
menstrual phase (1-3)	3 (4)	3	3 (4)	3				
total	40 (51)	1 8	37 (51)	16	37 (35)	23	28 (19)	17

The hysterectomy specimens and the excised endometriotic lesions were fixed with 4% buffered formaldehyde (pH 7.1) for twenty four hours.

Sagittally oriented sections of the uterine corpus in the median line were taken from the fundal region and from the anterior and posterior wall containing the entire uterine wall from the uterine cavity to the serosa. One half of the uterine corpus was cut into at least seven slices starting from the tubal isthmus along the intramural passage of the tube (orthogonally with respect to the endometrial surface) to identify adenomyotic and subserosal endometriotic lesions, respectively.

The uterine tissue sections and the excised endometriotic lesions were embedded in paraffin.

1.2 Menstrual blood samples

A total number of 43 menstrual blood samples were collected from 19 healthy women (aged 25 - 37 years, mean 33 years) and 24 women (aged 24 - 42, mean 33 years) years with endometriosis. All women included in this part of the study had undergone laparoscopy and in cases of endometriosis staging of the disease was performed according to the revised AFS classification of the American Society for Reproductive Medicine (13, 5, 3 and 3 patients were stage 1, 2, 3 and 4 respectively). All women had regular cycles and no history of hormone therapy for at least six months. They came into our unit in the morning of their second day of menstruation after having used just a sanitary pad during the foregoing night. In all women roughly one milliliter of menstrual blood was aspirated from the posterior vaginal fornix into a syringe pre-filled with two milliliter of 4% buffered formaldehyde (pH 7.1) for fixation.

Before embedding in paraffin the menstrual blood samples were washed with NaCl-solution to remove red blood cells.

A series of four sequential sections of the endometrial fragments derived from the menstrual blood specimen were examined for the presence or absence of fragments that stained for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), progesterone receptor B isoform (PR-B) and p450 aromatase expression, respectively. The evaluation for each of the individual markers was based on the examination of only one section of the menstrual specimen per marker.

1.3 Immunostaining

5 All immunohistochemical procedures were performed by using an automated slide stainer (Ventana NexES IHC Staining System; Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA). Paraffin-embedded sections (thickness 3 μ m) were mounted on slides before deparaffination and rehydration.

Oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and progesterone receptor B isoform (PRB)

Unmasking of antigen was carried out by using a microwave oven for 40 minutes at 200W (Tris-EDTA-citrat buffer pH 7.8). The sections were then transferred to the Ventana NexES IHC Staining System. For receptor staining the following antibodies were used: Anti-oestrogen-receptor mouse monoclonal antibody developed against prokaryotic recombinant protein corresponding to the full-length alpha form of the oestrogen receptor molecule, at a dilution of 1:10 (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK); anti-progesterone-receptor mouse monoclonal antibody developed against synthetic peptide corresponding to a site of predicted high antigenicity on the human progesterone receptor and binding to both known types of nuclear progesterone receptors (PR-A and PR-B; Viville, B., et al., Hum Reprod 12 (1997) 815-22) at a dilution of 1:10 (Novocastra Laboratories, Newcastle upon Tyne, UK); anti-progesterone-receptor-isoform B mouse monoclonal antibody developed against the progesterone receptor isoform B (PRB) at a dilution of 1:5 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA). In the immunohistochemistry of PRB an amplification kit (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) was used for the enhancement of the staining. The automated staining procedure that included a Basic DAB Detection Kit was terminated by haematoxylin counterstaining and washing with water. The slides were then dehydrated and mounted.

Sections of receptor-positive mammary carcinomas served as positive controls. Negative controls were made using sections of receptor-positive mammary carcinomas without incubation with primary antibody and several oestrogen-receptor-negative tissues (e.g. from tonsils and non-gynecological carcinomas) using the same automated procedure.

P450 aromatase (P450A)

The unmasking of the antigen and the following automated staining procedure that ended with the counterstaining with haematoxylin were the same except of using a Basic Alkaline Phosphatase Red Detection Kit. The staining was performed with primary rabbit anti-aromatase cytochrome P-450 polyclonal antibody recognizing human placental cytochrome P450 aromatase at a dilution of 1:1000 in ventana antibody diluent (Hauptman-Woodward Medical Research Inst., Inc., Buffalo, New York). Sections of normal ovarian tissue containing Graafian follicles served as positive controls. Several P450A-negative tissues (e.g. from tonsils and non-gynecological carcinomas) served as negative controls.

Actin

Unmasking of antigen was performed by a protease solution (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) followed by the same staining-procedure as described for P450A. The primary anti-muscle actin antibody (clone HUC 1-1) was provided by Ventana Medical Systems Inc. in a pre-diluted form and staining performed as described for PR above.

The specific actin immunostaining was used to identify peristromal smooth muscle cells in endometriotic and adenomyotic lesions thereby facilitating the evaluation of their ER and PR staining.

1.4 Evaluation of staining intensity

Oestrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR)

Results of specific nuclear staining were evaluated using a semi-quantitative method. The immunoreactive score (IRS) was calculated using the following equation: $IRS = \sum Pi (i+1)$, where $i=1,2$ or 3 , and Pi is the percentage of stained cells for each intensity, according to the method described by Lessey, B. A., et al., J Clin Endocrinol Metab 67 (1988) 334-40. The staining intensity was graded as 0 = no, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = strong staining, respectively.

The following tissues were counted out separately: The endometrial epithelium and stroma of the functionalis as represented by zone II and of the deep basalis as represented by zone IV; epithelium and stroma of endometriotic and adenomyotic lesions; the outer myometrium represented by the stratum vasculare of the neometra; the archimyometrium (stratum subvasculare); the peristromal muscular tissue of endometriotic and adenomyotic lesions. With respect to the uterine tissues at least 20 high power fields and with respect to the endometriotic lesions at least 5 high power fields were selected at random and evaluated. The immunoreactive score of positively stained cells per uterine region was determined by taking the arithmetic mean of the values of all counted high power fields. There was a high reproducibility of the method in that, in a test series, the interassay variation over the full range of IRS never exceeded 10%.

The data obtained from individual uterine specimen and endometriotic lesions of the premenopausal women were grouped according to phase of the menstrual cycle as described above.

P450 aromatase (p450A) and progesterone receptor B isoform (PRB)

Results of specific staining were obtained using a semiquantitative method based on a four-point scale: 0 = no, 1 = weak, 2 = moderate and 3 = strong staining, respectively. The evaluation was confined to the eutopic and ectopic endometrium and used the same number of high power fields as described above.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with Student's t-test for unpaired data and Fischer's test. Significance was assumed when $p < 0.05$.

1.5 Results

Table III					
parameter	healthy controls		endometriosis		significance (Fischer's-Test)
	positive/n	%	positive/n	%	
ER (epithelium and stroma)	2/19	10	18/24	75	$p < 0.00005$
PR (epithelium)	0/19	0	8/24	33	$p < 0.005$
PR (stroma)	2/19	10	14/24	58	$p < 0.000005$
PRB (epithelium and stroma)	0/19	0	0/24	0	not significant
P450 aromatase (epithelium and stroma)	2/19	10	20/24	83	$p < 0.000005$

It becomes readily obvious from Table II that especially estrogen receptor and p450 aromatase are valuable markers for correlating the presence of basal cells in a menstrual blood sample to endometriosis.

Example 2: Immunoassays from vaginal blood samples**2.1 Menstrual blood samples**

Samples of menstrual blood from women with endometriosis as well as from women without endometriosis were collected in the morning of their second day of menstruation after having used just a sanitary pad during the foregoing night. From all women roughly

one milliliter of menstrual blood was aspirated from the posterior vaginal fornix into a syringe pre-filled with two milliliter of phosphate buffered saline (PBS; pH 7.4).

2.2 Competitive immunoassay for progesterone receptor

Microtiter plates pre-coated with streptavidin (Roche Diagnostics GmbH, product number 1965905) were incubated with 100 µl of biotinylated monoclonal antibody to PR (Viville et al., *supra*) at a concentration of 100 ng/ml for 60' at room temperature. Vaginal blood samples were diluted 1:100 in PBS/Tween® 20 (0,05 or Tween) and 199 µl of such sample added per well. After washing to each well 100 µl of the synthetic peptide (as described by Viville et al., *supra*) labeled with peroxidase according to standard procedures) was added and incubation performed for 1 h at room temperature.

Wells again were washed (3 x 200 µl PBS/Tween) and the amount of peroxidase bound to the monoclonal antibody was assessed using ABTS® (ABTS stands for: 2,2'-azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate; Roche Biochemicals, Order no. 1 684 302) as a substrate according to the instructions given by the manufacturer.

2.3 Results

A significant level of progesterone receptor was measured in 67 % of the samples collected from patients with endometriosis, whereas in only 6 % of the patients without endometriosis progesterone receptor was detected.

List of References

- Anaf, V., et al., Hum Reprod 15 (2000) 767-71
- Angerer, L. M., et al., Methods Enzymol 152 (1987) 649-61
- Ausubel, F., et al. in "Current protocols in molecular biology" (1994), Wiley Verlag
- Barany, F., Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) 189-93
- Barringer, K. J., et al., Gene 89 (1990) 117-22
- Blanchard, A. P., et al., Biosensors & Bioelectronics 11 (1996) 687-690
- Compton, J., Nature 350 (1991) 91-2
- Dallenbach-Hellweg, G. and Poulsen, H., in "Atlas der Histopathologie des Endometriums" (1984), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo
- Diao, R., Practical Considerations for the Design of Quantitative PCR Assays in "PCR STRATEGIES" (1995) 84-108, Eds. I. e. al., Academic Press, New York
- Fahy, E., et al., PCR Methods Appl 1 (1991) 25-33
- Podor, S. P., et al., Science 251 (1991) 767-73
- Gall, J. G. and Pardue, M. L., Proc Natl Acad Sci U S A 63 (1969) 378-83
- Guatelli, J. C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 87 (1990) 1874-8
- Harlow and Lane, in "Antibodies, A Laboratory Manual" (1988), Cold Spring Harbor Publications, New York
- John, H. A., et al., Nature 223 (1969) 582-7
- Kunz, G., et al., Hum Reprod 15 (2000) 76-82
- Kwoh, D. Y., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 86 (1989) 1173-7
- Landgren, U., et al., Science 241 (1988) 1077-80
- Lessey, B. A., et al., J Clin Endocrinol Metab 67 (1988) 334-40
- Leyendecker, G., et al., Hum Reprod 11 (1996) 1542-51
- Leyendecker, G., et al., Hum Reprod Update 4 (1998) 752-62
- Leyendecker, G., Hum Reprod 15 (2000) 4-7
- Lockhart, D. J., et al., Nat Biotechnol 14 (1996) 1675-80
- Meyer, R., Zbl Gynäk. 43 (1919) 745-750
- Noe, M., et al., Hum Reprod 14 (1999) 190-7
- Okulicz, W. C., et al., Biol Reprod 49 (1993) 24-32
- Padykula, H. A., et al., Biol Reprod 40 (1989) 681-90
- PCR Primer, a Laboratory Manual (1995) -, Eds. C. W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, Cold Spring Harbor Press, Plainview N.Y
- PCR protocols: A guide to Methods and Applications (1990), Eds. Innis, Gelfand, Snisky and White, Academic Press, San Diego
- PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (1992), Eds. H. Erlich, Freeman Press, New York

- Pease, A. C., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91 (1994) 5022-6
- Sambrook, J., et al. in "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989), Cold Spring Harbour, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Sampson, J. A., Am. J. Obstet. Gynaecol. 14 (1927) 422-429
- Tijssen - in "Practice and theory of enzyme immunoassays" (1990), Amsterdam, Elsevier
- Tijssen, P., Hybridization with nucleic acid probes Part I: Theory and nucleic acid preparation in "Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vo" (1993)
- Tyagi, S., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996) 5395-400
- Urdea, M. S., Biotechnology (NY) 12 (1994) 926-8
- Vigano, P., et al., Fertil Steril 56 (1991) 894-9
- Viville, B., et al., Hum Reprod 12 (1997) 815-22
- Walker, G. T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 392-6
- Werth, R. and Grusdew, W., Arch. Gynäkol. 55 (1898) 325-409
- Wetzstein, R., Arch. Gynecol. 202 (1965) 1-13
- Wu, D. Y. and Wallace, R. B., Genomics 4 (1989) 560-9

US 4,683,195

US 4,683,202

US 5,124,246

US 5,362,655

US 5,510,270

US 5,556,752

US 5,578,832

US 5,629,154

US 5,858,803

WO 01/79846

WO 99/63116

Effects of the Invention

According to the method for diagnosing endometriosis of the present invention, there can be generally accepted or broadly used in clinical diagnostic routine in the field of endometriosis.

1. Abstract

Problems

To provide means which is generally accepted or broadly used in clinical diagnostic routine in the field of endometriosis.

Solving Means

A method for diagnosing endometriosis, said method comprising

- (a) obtaining a sample of menstrual blood
- (b) measuring basal cells in said sample or
- (c) measuring at least one gene product typical for cells of the basal endometrium in said sample and
- (d) correlating the measurement in (b) or (c) to the diagnosis of endometriosis; and,

a method for diagnosing endometriosis, said method comprising

- (a) obtaining a sample of menstrual blood
- (b) measuring the amount of at least one gene product typical for basal cells in said sample,
- (c) measuring the amount of a gene product from cells of the functionalis of the endometrium in said sample,
- (d) assessing the relative amount of (b) to (c) and
- (e) correlating said relative amount (d) to endometriosis.

2. Representative Drawing

None

专利名称(译)	从经血中诊断子宫内膜异位症		
公开(公告)号	JP2003207509A	公开(公告)日	2003-07-25
申请号	JP2001384300	申请日	2001-12-18
申请(专利权)人(译)	F.霍夫曼 - 罗氏公司		
[标]发明人	ゲルハルトライエンデッカー		
发明人	ゲルハルト ライエンデッカー		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/68		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.Y C12Q1/68.A		
F-TERM分类号	4B063/QA19 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够普遍应用或在子宫内膜异位症临床诊断的常规实践中广泛使用的方法。ŽSOLUTION：这种子宫内膜异位症的诊断方法包括以下步骤：(a) 获取经血样本；(b) 测量样品中的基底细胞或(c) 测量样品中基底子宫内膜细胞中的至少一种典型基因产物；(d) 将(b)或(c)中的测量值与子宫内膜异位症的诊断相关联。或者这种子宫内膜异位症的诊断方法包括以下步骤：(a) 获取经血样本；(b) 测量样品中的基底细胞；(c) 测量样品中子宫内膜功能层细胞诱导的基因产物的量；(d) 评估(b)至(c)的相对量，和(e)将相对量(d)与子宫内膜异位相关联。Ž

	子宮内膜症の女性の子宮		腺筋症の病変		子宮内膜症の病変		健常対照の子宮		
月経周期の期 (日)	子宮内膜	子宮筋層	上皮/ 支質	PMC	上皮/ 支質	PMC	子宮内膜	子宮筋層	
初期増殖期 (4-7)	10 (15)	10	10 (15)	10	8 (9)	8	4 (5)	4	
中期増殖期 (8-11)	6 (5)	6	6 (5)	6	9 (9)	9	2 (2)	2	
後期増殖期 (12-14)	5 (8)	4	3 (8)	3	5 (5)	13	3 (1)	2	
初期分泌期 (15-18)	4 (5)	4	4 (5)	4	3 (3)	3	3 (2)	3	
中期分泌期 (19-23)	6 (8)	6	6 (8)	6	5 (4)	2	3 (4)	3	
後期分泌期 (24-28)	6 (6)	5	5 (6)	5	5 (5)	10	3 (5)	3	
月経期 (1-3)	3 (4)	3	3 (4)	3					
合計	40 (51)	1 8	38	37 (51)	16 37	35 (35)	23 28	17 (19)	9 17