

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 514217

(P2003 - 514217A)

(43)公表日 平成15年4月15日(2003.4.15)

(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	Y 4 B 0 2 4 M 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09		C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566		33/574	D

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 27数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 515717(P2001 - 515717)

(86)(22)出願日 平成12年8月2日(2000.8.2)

(85)翻訳文提出日 平成14年2月5日(2002.2.5)

(86)国際出願番号 PCT/US00/21027

(87)国際公開番号 W001/010910

(87)国際公開日 平成13年2月15日(2001.2.15)

(31)優先権主張番号 60/147,556

(32)優先日 平成11年8月5日(1999.8.5)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/461,938

(32)優先日 平成11年12月15日(1999.12.15)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
ティ オブ カリフォルニア
アメリカ合衆国 94607 - 5200 カリフォル
ニア州 オークランド トウェルフス フ
ロア フランクリン ストリート 1111

(72)発明者 リアオ、 シュ - ユアン
アメリカ合衆国 92807 カリフォルニア州
アナハイム フロンティア コート 62
9

(74)代理人 弁理士 中島 淳 (外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 A S C U S ・ P A P 塗抹においてMN / C A 9 タンパク質の発現を用いる診断方法

(57)【要約】

A S C U S と診断された P a p 塗抹細胞から癌性または前癌性子宮頸部病変の存在を、非定型または正常細胞に発現されたMN / C A 9 抗原の分布を観察することにより確定することであって、(a) MN / C A 9 抗原が非定型細胞上に観察される場合には重要な病変とし、(b) MN / C A 9 抗原が非定型細胞には存在しないが、正常頸管内細胞上には存在する場合には低い悪性度の病変とし、また、(c) MN / C A 9 抗原が非定型細胞および正常頸管内細胞の双方に存在しない場合には良性症状と診断する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベセスダ用語システムのもとで重要性未定の非定型偏平上皮細胞(atypical squamous cells of undetermined significance) (A S C U S) と細胞学的に診断された P a p 塗抹細胞から癌性または前癌性子宮頸部病変の有無を確定する方法であって、前記 P a p 塗抹標本が非定型および正常子宮頸内膜細胞を含むものであり、前記方法が、

(A) 前記 A S C U S と診断された P a p 塗抹細胞を、M N / C A 9 抗原の発現を検出する手法に付すこと；

(B) 前記 A S C U S と細胞学的に診断された P a p 塗抹細胞の非定型または正常細胞に発現された M N / C A 9 抗原の分布を観察すること；そして

(C) (a) 腺癌、侵食癌 (C A)、または高い悪性度の偏平上皮内病変 (high grade squamous intraepithelial lesions) (H S I L) を包含する重要な病変、(b) 低い悪性度の偏平上皮内病変 (low grade squamous intraepithelial lesions) (L S I L)、(c) 非定型性、および (d) 良性症状、のそれぞれの有無を診断することであって、その場合に、

(1) 前記非定型細胞上に病巣または拡散 M N 抗原の存在する場合、前記重要な病変の診断となること；

(2) 前記非定型細胞上に M N 抗原が存在せず、前記正常子宮頸内膜細胞上に M N 抗原が存在する場合、L S I L および / または非定型性の診断となること；
および

(3) 前記非定型細胞上および前記正常子宮頸内膜細胞上に M N 抗原の存在しない場合、良性症状の診断となること；

を含む、方法。

【請求項2】 前記 P a p 塗抹細胞が、A S C U S - 支持反応性 (ASCUS-favor reactive)、他には特定されない A S C U S (ASCUS-not otherwise specified) (N O S)、および、A S C U S - 支持 S I L (ASCUS favor SIL) として下位分類されており、A S C U S - 支持反応性または N O S として下位分類されている P a p 塗抹細胞上に M N / C A 9 の発現されていないことがさらに良性症状の確認となる、請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記MN抗原がMN/CA9タンパク質またはその特徴的なフラクションを含む、請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記MN/CA9タンパク質の特徴的なフラクションが少なくとも1つの前記MN/CA9タンパク質の免疫反応性エピトープを含む、請求項3記載の方法。

【請求項5】 前記発現を免疫組織化学により検出する、請求項1記載の方法。

【請求項6】 前記発現を、MN/CA9タンパク質をコードするRNA転写物の増幅および/またはハイブリダイゼーションにより検出する、請求項1記載の方法。

【請求項7】 前記ASCUSと診断されたPap塗抹細胞が細胞学的に診断されたSILをもたないものである、請求項1記載の方法。

【請求項8】 ベセスダ用語システムのもとで重要性未定の非定型扁平上皮細胞(ASCUS)と細胞学的に診断されたPap塗抹細胞から重要な癌性または前癌性子宮頸部病変の有無を確定する方法であって、前記Pap塗抹標本が非定型および正常子宮頸内膜細胞を含むものであり、前記方法が、

(A) 前記ASCUSと診断されたPap塗抹細胞を、MN抗原の発現を検出する手法に付すこと；

(B) 前記ASCUSと細胞学的に診断されたPap塗抹細胞の非定型または正常細胞に発現されたMN抗原の分布を観察すること；そして

(C) 病巣または拡散MN抗原が当該非定型細胞上に観察される場合に、腺癌、侵食癌(CA)、または高い悪性度の扁平上皮内病変(HSIL)を包含する重要な病変の存在を診断すること；

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【関連出願への相互参照】**

本出願は出願番号09/461,938の一部継続出願であり、次いで1999年8月5日出願の仮特許出願番号60/147,556の利益を要求したものである。

(発明の背景)

子宮頸部癌はその発生率および死亡率双方において、乳癌に次ぎ、世界的にも女性における最も一般的な悪性腫瘍の一つである。合衆国においては、その罹病率および死亡率双方がパパニコラウ(Pap)塗抹試験の導入された1940年代以来劇的に低下している(“NIH合意ステートメント(1)子宮頸部癌”、下記)。積極的なスクリーニングであるにもかかわらず、今なお年間約16,000件もの新たな子宮頸部癌が起こり、約5,000人が死亡する。この罹病率と死亡率のレベルについてその一部の理由は、一部の女性が通常の定期的なPap塗抹試験を受けていないことにもよるが、もう一つの理由はPap塗抹試験が比較的高い頻度で誤診することである。このことは本来的に高い偽陰性率と、矛盾する細胞学的記録システムを含んでいる(Koss, L.G., 1989, 下記; Yobs, A.R., et al., 下記; Koss, L.G., 1993, 下記)。

【0002】

主要な問題は、Pap塗抹スクリーニングの導入以来、子宮頸部細胞学についての記述用語が多様となり、混乱しているということである(Jones, H.W., 下記)。1988年、NCIがスポンサーとなったワークショップでは、細胞学的配点のシステムを明確にすることを企図してPap塗抹スクリーニングについての新たな用語を開拓したが、それが“子宮頸部/膣の細胞学的診断を記録する1988年のベセスダ・システム(Bethesda System)”となった(国立癌研究所ワークショップ、下記)。これは1991年にさらに改定された(Broder, S., 下記)。該ベセスダ・システム(TBS)は、それが知れ渡るにつれ、“重要性未定非定型偏平上皮細胞(atypical squamous cells of undetermined significance)”(ASCUS)および“重要性未定非定型腺細胞(atypical glandular c

ells of underdetermined significance) ” (A G C U S または A G U S) のカテゴリーを導入した。我々は、以前の特許出願番号 09 / 461,930 において、A G U S 診断カテゴリーを有効に取扱う方法を提供した。しかし、A S C U S 診断カテゴリーは細胞病理学者と開業医師とに問題を残している。

【0003】

当初の意図は、反応性 / 炎症性、形成異常、または腫瘍性症状と診断されない症例について、偏平上皮細胞異常のカテゴリーとして A S C U S の呼称を使用することであった (Boemer, S.L., et al., 下記)。残念ながら、A S C U S との診断は個々の臨床的実体を確定せず、P a p スクリーニング手法の本来の限界の一つを反映する。この問題に加えて、試験室での A S C U S との診断は急増し、その頻度は P a p 試験結果すべての 10% にも達している。A S C U S との診断は “ あるラボでの屑籠カテゴリー ” あるいは “ 私の知らないカテゴリー ” と呼ばれている (“ A S C U S をしっかり理解すること ; 新しい臨床試験がどのようにすべきかを示すはずである ” JNCI 87 (No. 7), June 7, 1995)。現在、推奨されていることは、A S C U S の診断に A S C U S - 支持反応性 (ASCUS-favor reactive)、他には特定されない A S C U S (ASCUS-not otherwise specified) (N O S)、または、A S C U S - 支持偏平上皮内病変 (ASCUS-favor squamous intraepithelial lesion) (S I L) を含めてさらに限定されることである (Kuman, R.J., Hanson, et al., 下記)。しかし、これらの特質は論争的である ; A S C U S の診断と関連する不確かさは十分に文献調査されている (Boemer, S.L., et al., 下記)。

【0004】

A S C U S 診断は容易ならぬ臨床的挑戦でもある。A S C U S との診断を受ける女性の三分の一までが重要な病変を抱えている。しかも、患者のスクリーニングで発見される H S I L の三分の一を超える患者が A S C U S ・ P a p 試験結果から確認されるものである。しかし、これはまた A S C U S との P a p 塗抹診断を受ける女性の三分の二が子宮頸部の病変をもっていないことをも意味する。

【0005】

これまで、重要な病変の存在確認を目的として、A S C U S の診断を補完する

のに役立つ満足な追加試験法は確認されていない。しかし、ハイリスク型のヒト・パピローマウイルス (HPV) がPap塗抹標本に存在することを示すスクリーニングは、基礎となるHSIL所有のこれら女性を確認する補助となっている；参照：Sherman, M.E., et al., 下記；および Hatch, K.D., et al., 下記。ハイリスク型のHPVによる感染が侵食性子宮頸部癌の主たる危険因子であることを示す分子的疫学的証拠が増えている；参照：Zur Hausen, H., 下記。しかし、その関連性は、少数ながら細胞学的に陰性の女性が検出可能なハイリスクHPV・DNAをもつことから絶対的なものではない。逆に、一部のHSILはHPV陰性である；参照：Boemer, S.L., et al., 下記。HPV・DNA試験の有用性を確定するために企画された大規模多施設臨床試験 (ALTS 研究) は現在進行中であり、国立癌研究所がスポンサーとなっている。

【0006】

最近の研究は、増殖関連タンパク質、例えば、Ki67およびPCNAの発現が形成異常病変存在の有用な指標としても役立つことを示している；参照：Bulten, J., et al., 下記；および Mittal, K.R., et al., 下記。しかし、特別の分析法はPap塗抹標本に適用されていない。

【0007】

問題の本質は、ASCUS診断が低い悪性度の偏平上皮内病変 (low grade squamous intraepithelial lesion) (LSIL) とも呼称される低い悪性度の偏平上皮内組織新形成 (CINI) 症例の重要な小部分を含むということである。LSILのほんの僅かなパーセンテージがより重度の病変、すなわち、高い悪性度の偏平上皮内病変 (high grade squamous intraepithelial lesion) (HSIL、CIN II、IIIとも呼称) および上皮内癌 (CIS) に進行する。もう一つの重大な問題は、高い悪性度の病変の発生が子宮頸部/膣の塗抹ASCUS診断を受ける患者 (年間合計約二~三百万人) の10%にも及ぶ可能性のあることである (Davey, D.D., et al., 下記)。合衆国における現在の法的情勢の故に、ASCUSの大多数は積極的に膣鏡検査と選択的な生検で追跡している。非定型塗抹標本と共にすべての患者についての膣鏡検査はSILをもつ患者を確認はするが、この検査は実質的に人材的財政的費用を要し、一部の患者を危険な要素をもつ不

必要な浸襲的手段にさらすことになる。

【0008】

A S C U S 診断のさらなる識別を可能とする信頼性の高い補完的試験法を提供し、それによって重要な病変にある患者を同定し、また、L S I L が進行か後退のどちらかに向かっているかのより良い予知状況を提供することが大いに望ましい。

【0009】

一つの方法は代用の生物マーカーを使用することである。以前に、我々はそのような候補となる生物マーカー、M N / C A 9 抗原を同定した (Liao, S.Y., Brewer, C., et al., 下記; Liao, S.Y., and Stanbridge, E.J., et al, 下記)。数年前、我々はこの抗原が事実上すべての子宮頸部癌の原形質膜表面に、その起源に関係なく発現されることを見出した (Liao, S.Y., Brewer, C., et al., 下記)。M N / C A 9 をコードする遺伝子はクローン化されたが、その時点で新規であった (Pastorek, J., et al., 下記)。これは現在カルボニックアンヒドラーゼ・ファミリーのメンバーとして認められている。最近の研究が示唆するところによると、カルボニックアンヒドラーゼ活性に加えて、M N / C A 9 は付着タンパク質として機能する可能性があり、予備的証明ではマウスの N I H 3 T 3 アッセイにおいて形質転換活性を有する可能性のあることを示唆する (Zavada, J., et al., 下記)。

【0010】

良性および新生物性子宮頸部病変の完全な範囲を示す 300 を超える P a p 塗抹標本の研究において、我々は高レベルの M N / C A 9 が A I S と腺癌のすべての症例において発現されること、それが頸部偏平上皮細胞癌の 90% を超える症例においてであり、S I L ではその程度が低いことを示した。この研究の結論は以下のとおりであった：1) 表皮剥離性細胞における M N / C A 9 の発現は組織切片における M N / C A 9 の発現を反復する；2) 子宮頸部塗抹における細胞の拡散した強力な M N / C A 9 の免疫反応性は、陽性細胞が正常または非定型頸管内細胞または形成異常細胞の細胞学的外観を有するか否かに関係なく、常に形成異常と関係していると思われる；および 3) 細胞学的塗抹における事実上すべて

の形成異常腺細胞はMN / C A 9 タンパク質を発現する。このように、表皮剥離性頸管内細胞におけるMN / C A 9 タンパク質の発現は、腺形成異常、A I S、侵食性腺癌、および / またはS I Lの重要な診断生物マーカーであると思われる (Liao, S.Y., and Stanbridge, E.J., et al., 下記)。

【0011】

上記考察のように、A S C U S およびA G U S の細胞学的診断はとりわけ婦人科医を悩ませており、さらなる診察 / 治療の最適処方に関して彼らを途方に迷わせている。我々の先行する同時係属特許出願において、我々はA G U S と診断されたP a p 塗抹において、細胞学とMN / C A 9 発現とを組み合わせることで、重要な病変 (C I N II、III および / またはA I S / C A) を抱える患者の同定できることを証明した。この出願に記載された結果は、臨床試験が国立癌研究所と多施設婦人科腫瘍学グループの援助のもとで開始された程に将来有望なものである。

【0012】

(発明の概要)

本発明は一般的なパパニコラウ (P a p) 塗抹に対する補助試験を提供するものであり、本試験は重要な病変 (偏平上皮内病変 (S I L) および / または癌) を抱える患者をA S C U S の診断により同定することを可能にする。本発明はMN / C A 9 抗原の発現についてのP a p 塗抹の免疫染色と対応する組織学的生検により進める。より詳しくは、A S C U S と診断されたP a p 塗抹をMN / C A 9 抗原の発現について免疫染色する。P a p 塗抹のMN / C A 9 免疫染色の存在は、対応する生検の組織学的診断と相関する。特異的MN / C A 9 免疫染色を示すA S C U S と診断されたP a p 塗抹は、S I L および / または癌 (C A) を含む生検に対応する。免疫染色のパターン (非定型細胞に対する正常細胞のみの病巣または拡散染色) は低い悪性度の偏平上皮内病変 (L S I L) (正常細胞のみの免疫染色) と対する高い悪性度の偏平上皮内病変 (H S I L) および / またはC A (非定型細胞の病巣または拡散染色) を含む生検間で識別する。

【0013】

(発明の詳細な説明)

本発明の方法は、重要性未定の非定型偏平上皮細胞（ASCUS）を観察する際に、MN/CA9抗原発現のレベルと分布の試験を同時に実施し、細胞学的試験、例えば、Pap塗抹により得られる診断を確認することを伴うものである。陽性の結果は臨床的発症がない場合でも形成異常の早期マーカーとして役立つ。MN/CA9抗原は子宮頸部形成異常/癌を確認するのに有用であることを示し、我々の以前の特許出願番号09/461,930に示したように、重要性未定の非定型腺細胞（AGUS）診断カテゴリーを取扱う有効な方法を提供する。今や、我々の研究はMN/CA9の発現がASCUSカテゴリーと関連する重要な病変の同様の識別手段を提供し得ることを示している。

【0014】

我々是对応する組織生検について組織学的診断を実施したASCUSとのPap塗抹診断とともに82の標本につき検討した。表1に示すように、44の標本がMN/CA9の発現に対し染色陽性であった。これらの内、大部分（n=35）はLSILと診断された組織生検であった。ただ1つのMN/CA9陽性塗抹が良性組織生検であった。

【0015】

【表1】

表1：ASCUSと診断されたPap塗抹におけるMN/CA9の免疫反応性と組織生検における偏平上皮内病変（SIL）間の相関

	組織学的診断			
	HSIL (CIN II, III)	LSIL (CIN I)	非定型	良性
MN/CA9免疫反応性 ASCUS (n=101)				
陽性染色 (n=44)	5	35	3	1
拡散染色 (n=19)	2	17	0	0
染色なし (n=38)	0	2*	2	34

*頸部に最小のコンジロームを示す。

【0016】

近年、細胞病理学者の間で比較的共通した慣習となってきたのは、ASCUS診断をASCUS-支持反応性、他には特定されないASCUS(NOS)、およびASCUS-支持SILに下位分類することである。同様の下位分類はAG

USと診断されたPap塗抹についても用いられている。限定的予備実験またはかかる下位分類ASCUS診断において、我々は再度、MN/CA9の発現が組織生検においてSIL(HSILおよびLSIL)の存在と重要に関連していることを見出した(表2)。

【0017】

我々のデータが明瞭に示すのは、ASCUS診断が、SILの存在を予知するという意味で、Pap塗抹においてMN/CA9の免疫陽性同定により補完し得ることである。

【0018】

【表2】

表2：ASCUS下位分類を代表するASCUSと診断されたPap塗抹標本におけるMN/CA9免疫反応性の分析

組織学的診断とMN/CA9抗原の発現

症例数 (MN/CA9陽性数)

	HSIL (CIN II、III)	LSIL (CIN I)	非定型	良性
ASCUS (n=33)				
支持反応性 (n=4)	0	0	1 (1)	3 (0)
N.O.S. (n=20)	2 (2)	9 (8) *	3 (1)	6 (1)
支持SIL (n=9)	3 (3)	2 (2)	1 (1)	3 (0)

* MN/CA9陰性LSILの一例は頸部に最小のコンジロームを示す。

【0019】

我々の知る限りにおいて、我々は先ずMN/CA9の発現が、ASCUSとのPap試験診断を受けた女性に重要な子宮頸部病変が存在するか否かを確定するための有用な生物マーカーたり得るかを評価することから始める。他の研究者達は独立に、組織標本におけるMN/CA9の発現と子宮頸部形成異常および/または癌の存在の関連性についての我々の初期の観察を確認していた；参照：Costa, M.J. (1996), 下記；および Costa, M.J., et al. (1995), 下記。

【0020】

(実施例)

標本収集

臨床標本は長期保存材料から入手し、また日常の臨床診療起源のものであり、

供給源獲得の方法は我々がこれまでの研究すべてのために首尾よく用いてきたものである；参照：Liao, S.Y., Brewer, C., et al.;および Liao, S.Y., and Stanbridge, E.J.,上記。Pap 塗抹標本はスプレー固定した一般の塗抹と薄いPrep 塗抹とを組み合わせたものである。免疫染色したPap 塗抹はすべて脱染色し、パパニコラウ染色により再染色し、永久保存ファイルに保存する。この過程の例を図1に示すが、図1は最初にPap 染色した塗抹（AおよびD）、MN / CA9免疫染色した塗抹（BおよびE）および免疫染色後に再染色したPap 塗抹（CおよびF）を比較した説明図を提供する。再染色したPap 塗抹はなお当初塗抹としての細胞学的性質を保持する。

【0021】

ASCUSの下位分類

我々が入手可能な合計726例のASCUS症例（すべて組織学的に確認）の内、149例がASCUS - 支持反応性であり、416例がASCUS - NOSであり、161例がASCUS - 支持LSILであった。ASCUS - 支持LSILと診断されたこれらの患者は直ちに膣鏡検査と組織学的診断を受ける。他の2つに分類された患者は再びPap 試験を受ける。もし再診断がASCUSまたはLSILであるならば、その患者は膣鏡検査に差し向けられる。

【0022】

免疫染色

M75と命名したMN / CA9：マウス・モノクローナル抗体（MAb）を使用する（Liao, S.Y., Brewer, C., et al.,上記）。該抗体はMN / CA9ペプチドのプロテオグリカン・ドメインを認識する。MN / CA9抗原は顕著に強固であり、Pap 塗抹のパパニコラウ染色（日常的Pap 塗抹の脱染色とそれに続くM75・MAbによる免疫染色を可能とする）並びに組織の固定およびパラフィン包埋にも耐える（Liao, S.Y., Brewer, C., et al.,上記；Liao, S.Y. and Stanbridge, E.J.,上記）。

【0023】

組織切片については、パラフィン包埋組織の5ミクロン切片を脱パラフィン化する。内在性ペルオキシダーゼは2.5%過酸化水素のメタノール溶液中、スラ

イドを45分間インキュベートすることによりブロックする。次いで、スライドを適切なブロック血清(PBS中5%正常ウマ血清)と20分間インキュベートする。インキュベーションはすべて加湿チャンバー内にて室温で実施する。次いで、スライドを腹水由来の一次抗体M75(0.1%ウシ血清アルブミン含有をPBSで1:10,000に希釈)と60分間インキュベートし、次いで、二次ビオチン化ウマ抗マウス免疫グロブリンG抗体(PBSで1:200に希釈)と30分間インキュベートし、引続きアビジンビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(ABCエリート)と30分間インキュベートする(ベクター・ラボラトリーズ(Vector Laboratories)、バーリンガム、CA)。ジアミノベンジジン四塩酸塩(DAB)を色原体(シグマケミカル(Sigma Chemical Co.)、セントルイス、MO)として使用する。処理後、該切片を蒸留水で洗浄し、ヘマトキシリンで対比染色し、パーマウントでスライドに固定する。

【0024】

選択したサンプルの二つの脱パラフィン化切片をマイクロ波で前処理する。つまり、該切片は10mmol/Lのクエン酸一水和物溶液(pH6.0)中で再水和し、マイクロ波オープンに入れ、高セッティングで2×5分間露呈する。該スライドを放冷し、次いで、蒸留水とPBSで洗う。次いで、スライドを上記の染色用に処理する。既知の陽性および陰性の標本を各操作に含める。子宮頸部塗抹標本については、通常のPap染色塗抹をまず1%酸アルコールで脱色し、蒸留水で洗う。次いで、この塗抹を上記手法に従い免疫染色する。

【0025】

免疫染色の特異性は形質膜上に広く存在する褐色反応産物により確認される(図1参照)。免疫染色のパターン(病巣対拡散および正常細胞のみ対非定型細胞)を同定し、記録する。

【0026】

化生の偏平上皮細胞、貯蔵細胞、および円柱細胞は、我々が正常頸管内細胞(EC)と定義する細胞母集団を構成する。MN/CA9免疫反応性パラ基底異常角化細胞および/または正常のECから形態学的に逸脱する細胞は非定型細胞または細胞集塊と考えられる。これら非定型細胞の核は一般に正常ECよりも2~

3倍大きく、核/細胞質比の増大と共に重要な染色質過多を示す。

【0027】

図2を参照すると、パネルAおよびBでは、免疫反応性が見られない。頸部は良性の組織構造を有する(パネルC)。パネルDおよびEでは、拡散陽性が正常頸管内細胞の大多数に見られ、低い悪性度の形成異常(LSIL/CIN I)が子宮頸管組織に同定される(パネルF)。パネルGおよびHでは、MN/CA9免疫反応性が非定型細胞に見られ、核/細胞質比の増大と核の染色質過多を特徴とする。子宮頸部組織切片は高い悪性度の病変を含む(CIN III、パネルI)。400倍の倍率は扁平上皮と腺の変化の範囲を示し、非定型前新生物および新生物病変に対する基準を説明する。パネルAは扁平上皮および腺上皮の整然とした配列を示す正常の子宮頸部であり、パネルBは非定型扁平上皮化生(左)と貯蔵細胞増殖(右)の一例である。パネルCは上皮層化をもつ非定型腺癌の一例である。パネルDおよびEはそれぞれLSILおよびHSILを説明し、パネルFはAISの一例である(倍率:A 100倍、B~F 200倍)。

【0028】

Ki67

Ki67マウス・モノクローナル抗体は市販品から得られ(例えば、イムノテック・コープ(Immunotech Corp.)、メイン)、製造業者のプロトコールに従って使用される。組織切片にKi67免疫染色を行う。免疫染色パターンは増殖の指標として、組織学的診断を確認し(Bulten, J., 上記)、MN/CA9の発現と関係づけるために使用される。我々は、MN/CA9プロトコールを用いることで組織切片の免疫染色は良好に作用することを見出した。Ki67免疫染色の例を図3に示すが、この図では良性の子宮頸部(A)において、Ki67陽性は基底細胞層に制限され(B)、MN/CA9免疫反応性は見られない(C)。これに対し、形成異常子宮頸部(D、CIN III)は形成異常細胞のすべての層にKi67核染色を示し(E)、対応する切片にはMN/CA9の免疫反応性がある(F)。(倍率:200倍)。図3はAGUS・Pap塗抹におけるMN/CA9免疫反応性の染色パターンを示す。

【0029】

免疫染色のパターン（非定型細胞対正常細胞のみの病巣または拡散染色）は、低い悪性度の扁平上皮内病変（LSIL）（正常細胞のみの免疫染色）に対する高い悪性度の扁平上皮内病変（HSIL）および/またはCA（非定型細胞の病巣または拡散染色）を含む生検間を識別する。

【0030】

研究母集団

我々の研究母集団はASCUSとのPap塗抹診断を受けた女性由来のものである。検討した症例はすべて組織学的診断を伴い、最初のASCUS診断の時点で、または具体的に異常またはASCUSであるとする再Pap塗抹診断後に、採取した組織生検に基く。研究標本はすべて長期保存材料を使用する。Pap塗抹と対応する子宮頸部組織標本は共に日常の診断材料由来のものである。塗抹および組織切片は同じ患者から得る。日常の一般的なPap塗抹標本を用いるような症例では、免疫染色塗抹を脱染色し、パパニコラウ染色により再染色する。

【0031】

基本的には、ASCUS診断に関し2つの患者カテゴリーがある：

1) ASCUS - 支持SILとのPap塗抹診断を受ける患者。これらの患者は直ちに膣鏡検査と子宮頸部生検および/または搔爬術を受ける。この群において、我々はMN/CA9発現と病変の存在（SILおよび/またはCA）間の相関性を直接確認することができる。

2) ASCUS - 支持反応性またはASCUS - NOSとのPap塗抹診断を受ける患者。これらの患者は再Pap塗抹により追跡する。もし患者がSILまたは引き続きASCUSとの診断を受けるならば、その場合は3～12ヵ月以内に膣鏡検査と子宮頸部生検および/または搔爬術を実施する。以下のように、いくつかの結果の可能性がある。：

【0032】

【表3】

		<u>MN / CA 9 免疫反応性</u>	<u>生検</u>
可能性 1	第 1 回 P a p 塗 抹	+	N . D .
	第 2 回 P a p 塗 抹	+	S I L / C A
可能性 2	第 1 回 P a p 塗 抹	-	N . D .
	第 2 回 P a p 塗 抹	-	良 性
可能性 3	第 1 回 P a p 塗 抹	-	N . D .
	第 2 回 P a p 塗 抹	+	S I L / C A

【 0 0 3 3 】

小規模研究で、我々は可能性 1 および 2 の例を見出したが、可能性 3 はなかった。このことは重要な病変の存在が陽性の MN / CA 9 の発現を伴うという概念と矛盾しない。さらに、良性 SIL からの進行が 3 ~ 12 ヶ月の追跡期間内に起こるような状況に遭遇する見込みは非常に僅かであろう。少数症例 (n = 20) の遡及的研究において、我々は、正常限度内 (WNL) P a p 塗抹診断から ASCUS への変換が 1 ~ 3 年の期間にわたり存在し、追跡 ASCUS 生検が LSIL または HSIL と診断される場合、両 ASCUS ・ P a p 塗抹は MN / CA 9 免疫陽性であるが、当初の WNL ・ P a p 塗抹は MN / CA 9 陰性であることを見出した。

関係文献目録

以下の文献は出典明示により本明細書の一部として援用される：

Boemer, S.L. and Katz, R.L. “ 重要性未定の非定型偏平上皮細胞 ” の起源について；診断用語の進化。Adv. Anatom. Path. 4:221-232, 1997。

Broder, S. 子宮頸部 / 膣の細胞学的診断報告用ベセスダ・システム：1991 年ベセスダ・ワークショップの報告。JAMA 267:1892, 19,02。

Bulten, J., van der Laak, J.A., Gemmink, J.H., Pahlplatz, M.M., de Wilde, P.C., and Hanselaar, A.G. 子宮頸部上皮内新形成の分類用に将来有望なマーカー M I B 1。J. Pathol. 178(3):268-273, 1996。

Costa, M.J. 子宮頸部癌における MN および K i 6 7 (M I B - 1)：多様な用途を有する新規生物マーカー。Hum. Pathol. 27:17-19, 1996。

Costa, M.J., Ndoeye, A., and Trelford, J.D. 腺分化による子宮頸管癌における MN タンパク質の免疫学的局在決定。Int. J. Surg. Pathol. 3:73-82, 1995。

Davey, D.D., Naryshkin, S., Nielsen, M.D., and Kline, T.S. 重要性未定非定型偏平上皮細胞：実験室内比較および品質保証モニター。 *Diagn. Cytopathol.* 11:390-396, 1994。

Dunn, G., and Everitt, B. 臨床問題と統計的解明。 *Clinical Biostatistics*, New York Halstead Press, pp 1-32, 1995。

論説。 ASCUS をしっかり理解すること；新しい臨床試験がどのようにすべきを示すはずである。 *JN 87* (No. 7), June 7, 1995。

Emmert-Buck, M.R., Bonnet, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., and Liotta, L. レーザー捕獲頭微鏡解剖。 *Science* 274:998-1001, 1995。

Hatch, K.D., Schneider, A., and Abdel-Nour, M.W. 膣鏡検査前の中間およびハイリスク型治療優先順位付けについてのヒト・パピローマウイルス試験の評価。 *Am. J. Obstet Gynecol.* 172:1150-1157, 1995。

Hemington, C.S., Evan, M.F., Gray, W., and McGee, J. O'D. 存続的緩和名頸部細胞学的異常をもつ患者からの対合頸部塗抹と生検とのヒト・パピローマウイルス感染での相関関係。 *Hum. Pathol.* 26:951-955, 1995。

Jones, H.W. ベセスダ・システムの衝撃。 *Cancer* 76:1914-1918, 1995。

Koss, L.G. “子宮頸部癌検出のためのパパニコラウ試験：勝利と悲劇。 *JAMA*, 261:737-743, 1989。

Koss, L.G. 子宮頸腔細胞学における診断精度。 *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117:1240-1242, 1993。

Kurman, R.J., Hanson, D.E., Herbst, A.L., and Noller, K.L. 異常子宮頸部細胞学取扱いの暫定的ガイドライン R。 *JAMA* 271:1866-1869, 1994。

Kurman, R.J., and Solomon, D. 子宮頸部 / 膣の細胞学的診断を記録するベセスダ・システム。用語および標本妥当性に対する定義、基準および説明書。 New York; Springer-Verlag, pp.30-43, 1994。

Larson, A.A., Liao, S.Y., Stanbridge, E.J., Cavenee, W.K., and Hampton, G.M. 遺伝子変化は腫瘍形成に際し蓄積し、多病巣病変の共通の起源であることを暗示する。 *Cancer Research* 57:4171-4176, 1997。

Liao, S.Y., Brewer, C., Zavada, J., Patorek, J., Pastorekova, S., Marietta, A., Berman, M.L., DiSala, P.J., and Stanbridge, E.J. 子宮頸部上皮内偏平上皮および腺新形成と子宮頸部癌の診断生物マーカーとしてのMN抗原の同定。Am. J. Pathol., 145:598-609, 1994。

Liao, S.Y. and Stanbridge, E.J. 子宮頸部パピニコラウ塗抹におけるMN抗原の発現は頸部形成異常の早期診断生物マーカーである。Canc. Epid. Biom. Prev., 5:549-557, 1996。

Mashal, R.D., Lester, S.C., and Sklar, J. ホルマリン固定パラフィン包埋組織におけるX染色体不活化の研究によるクローン分析。Cancer Res. 53:4676-4679, 1994。

McNemar, Q. 心理学統計 (第2版)。New York: Wiley, 1955。

Mittal, K.R., Demopoulos, R.I., and Goswami, S. 正常および異常子宮頸部偏平上皮における増殖性細胞核抗原 (サイクリン) の発現。Am. J. Surg. Pathol. 7:117-122, 1993。

国立癌研究所研究班。子宮頸部 / 膣の細胞学的診断を記録するベセスダ・システム。JAMA 262:931-934, 1989。

NIH合意ステートメント (1) 子宮頸部癌。14:1-16, 1996. Koss, L.G. 子宮頸部癌検出のパピニコラウ試験: 勝利と悲劇。JAMA 261:737-743, 1989。

Patorek, J., Pastorekova, S., Callebaut, I., Morrion, J.P., Zelnik, V., Opavsky, R., Zatovicova, M., Liao, S., Portelle, D., Stanbridge, E.J., Zavada, J., Burny, A., and Kettmarm, R. カルボニックアンヒドラーゼに相同のドメインと推定ヘリックス - ループ - ヘリックスDNA結合セグメントを有するヒト腫瘍関連タンパク質MNのクローニングと評価。Oncogene 9:2877-2888, 1994。

Pastorekova, S., Zavadova, Z., Kostal, M., Babusikova, O., and Zavadz J. 新規準ウイルス剤MaTuは二成分系である。Virology 187:620-626, 1992。

Poljak, M., Brencic, A., Seme, K., Vince, A., and Marin, I.J. ハイリスクおよび中間リスクの子宮頸部癌と関連するヒト・パピローマウイルスの検出用第一世代および第二世代二遺伝子雑種捕獲アッセイの比較評価。J. Clin. Micro

biol. 37:796-797, 1999。

Resnick, R.M., Cornelissen, M.T., Wright, D.K., Echinger, G.H., Fox, H.S., ter Schegget, J., and Manos, M.M. 共通プライマーでのDNA増幅による長期保存子宮頸部癌標本におけるヒト・パピローマウイルスの検出と分類。J. Natl. Cancer Inst. 82:1477-1484, 1990。

Sherman, M.E., Tabarra, S.O., Scott, D.R., Kurman, R.J., Glass, A.G., Manos, M.M., Burk, R.D., Rush, B.B., and Schiffman, M. “ASCUSはHSILを除外”：細胞学的特徴、組織学的関連性、およびヒト・パピローマウイルス検出。Mod. Pathol. 12:335-342, 1998。

Yobs, A.R., Swanson, R.A., and Lamotte, L.C. パパニコラウ塗抹の検査室信頼性。Obstet. Gynecol. 65:235-244, 1985。

Zavada, J., Zavadova, Z., Pastorekova, S., Ciampor, F., Pastorek, J., and Zelnik, V. ヒト腫瘍培養物および臨床標本におけるMaTu-MNタンパク質の発現。Int. J. Cancer 54:268-274, 1993。

zur Hausen, H., 子宮頸部癌の病因と特定ヒト・パピローマウイルス型によるその因果関係。Curr. Topics Microbiol. Immunol. 186:131-156, 1994。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は最初にPap染色した塗抹標本(AおよびD)、MN/CA9免疫染色した塗抹標本(BおよびE)および免疫染色後に再染色したPap塗抹標本(CおよびF)を比較した説明図である。

【図2】

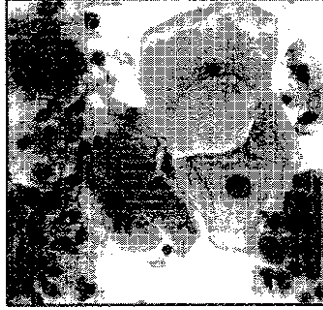
図2はASCUSの細胞学的診断についての一般的なPap塗抹標本(パネルA、DおよびG)と薄いPrep塗抹標本(パネルB、EおよびH)におけるMN/CA9の免疫反応性、および対応する組織構造を示す。

【図3】

図3は良性および形成異常子宮頸部組織におけるKi67とMN/CA9の発現、および対応する組織構造を比較した説明図を示す。

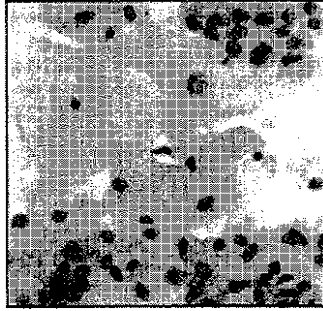
【図1A】

FIG. 1A



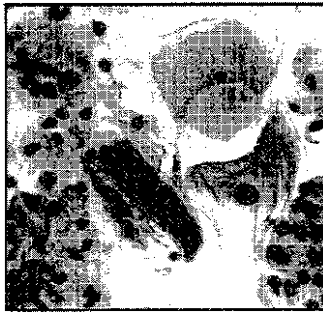
【図1B】

FIG. 1B



【図1C】

FIG. 1C



【図1D】



FIG. 1D

【図1F】

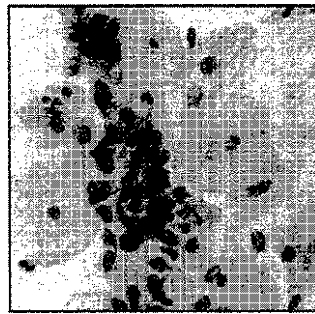


FIG. 1F

【図1G】

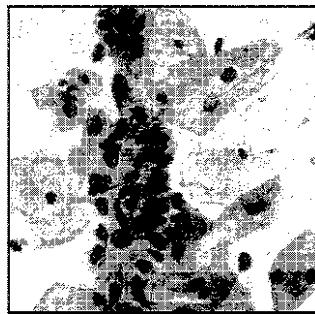
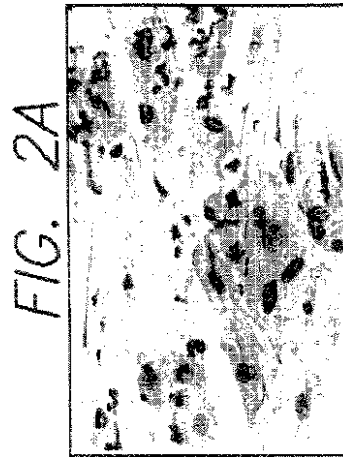
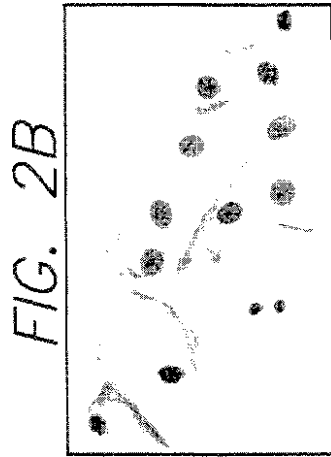


FIG. 1G

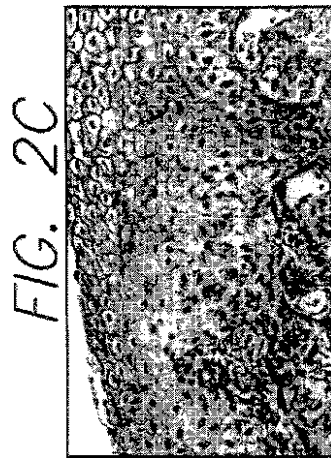
【図2A】



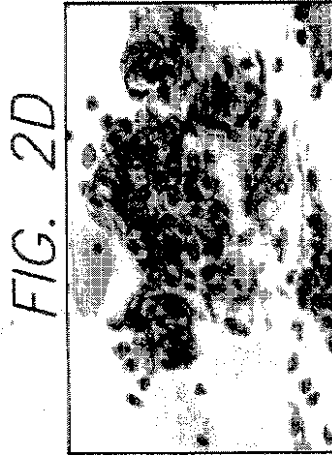
【図2B】



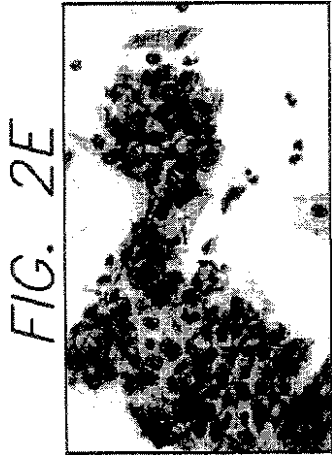
【図2C】



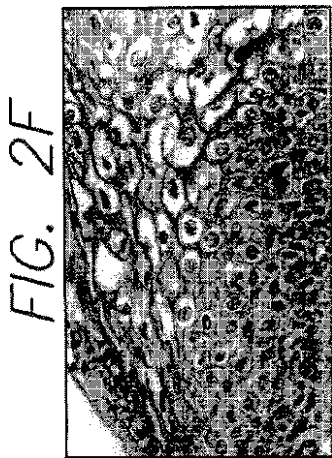
【図2D】




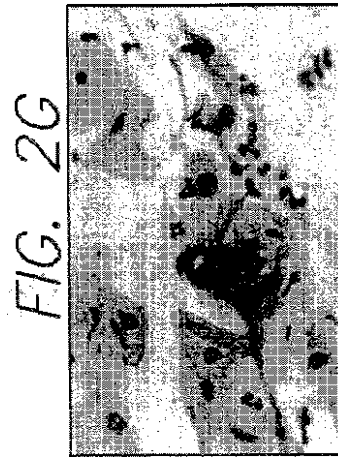
【図2E】




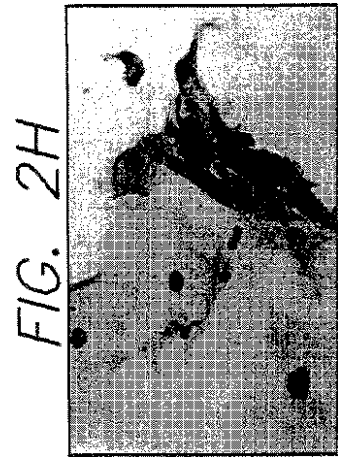
【図2F】




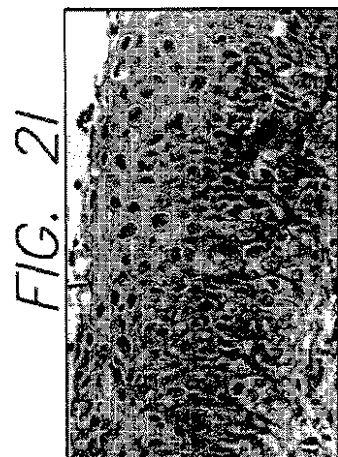
【 2 G】




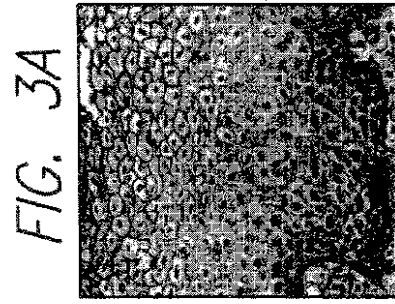
【 2 H】




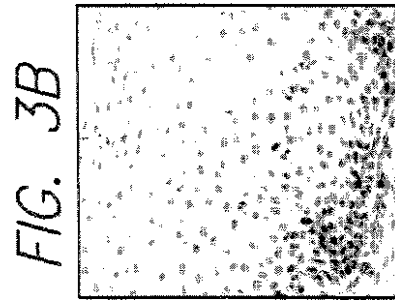
【 2 I】




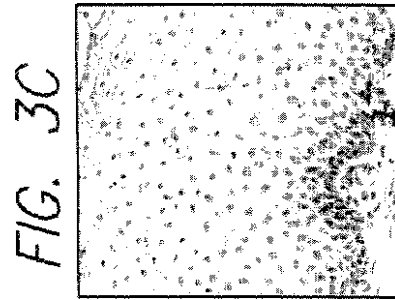
【 3 A】




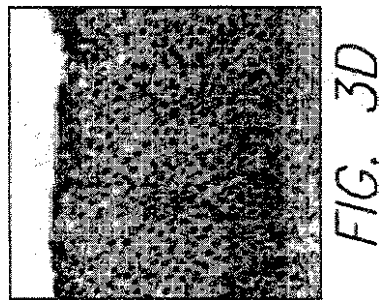
【 3 B】



【 3 C】



【 3 D】



【図3E】

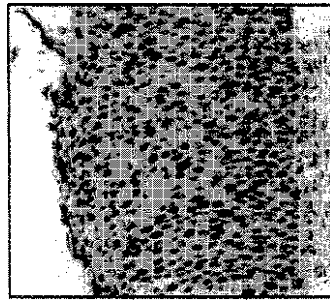


FIG. 3E

【図3F】

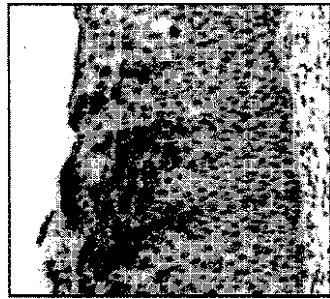


FIG. 3F

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/21027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 16/00; C12P 21/08 US CL : 530/387.1, 387.7 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 530/387.1, 387.7 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STN, EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LIAO et al. . Identification of the MN Antigen as a Diagnostic Biomarker of Cervical Intraepithelial Squamous and Glandular Neoplasia and Cervical Carcinomas. American Journal of Pathology. September 1994, Vol. 145, No. 3, pages 598-609, especially page 509.	1-8
X	LIAO et al. Expression of the MN Antigen in Cervical Papanicolaou Smears Is an Early Diagnostic Biomarker of Cervical Dysplasia. Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention. July 1996, Vol. 5, pages 549-557, see entire document.	1-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier document published on or after the international filing date		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
I document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*G* document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
11 SEPTEMBER 2000	28 NOV 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>Jennifer E. Nichols, NEE HUNT</i> JENNIFER E. NICHOLS, NEE HUNT Telephone No. (703) 308-0196	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
G 0 1 N 33/574		C 1 2 N 15/00	A
(31)優先権主張番号	0 9 / 5 7 2 , 7 5 6		
(32)優先日	平成12年5月16日(2000.5.16)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I T, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP		
(72)発明者	スタンブリッジ、 エリック、 ジェイ. アメリカ合衆国 92625 カリフォルニア 州 コロナ デル マル シーウォード ロード 501		
Fターム(参考)	4B024 AA12 CA09 CA11 HA14 4B063 QA19 QQ02 QQ52 QR55 QS25 QS34		

专利名称(译)	在ASCUS·PAP涂片中使用MN / CA9蛋白表达的诊断方法		
公开(公告)号	JP2003514217A	公开(公告)日	2003-04-15
申请号	JP2001515717	申请日	2000-08-02
[标]申请(专利权)人(译)	加利福尼亚大学董事会		
申请(专利权)人(译)	加州大学董事会		
[标]发明人	リアオシュユアン スタンブリッジエリックジェイ		
发明人	リアオ、シュユアン スタンブリッジ、エリック、ジェイ.		
IPC分类号	G01N33/53 C07K16/30 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	C07K16/3069		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/53.M C12Q1/68.A G01N33/566 G01N33/574.D C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ52 4B063/QR55 4B063/QS25 4B063/QS34		
优先权	60/147556 1999-08-05 US 09/461938 1999-12-15 US 09/572756 2000-05-16 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

通过观察在非典型或正常细胞上表达的MN / CA9抗原的分布，确定诊断为ASCUS的巴氏涂片细胞中是否存在宫颈癌或癌前病变，a) 当在非典型细胞上观察到时，MN / CA9抗原是重要的病变，(b) MN / CA9抗原不存在于非典型细胞上，但存在于正常宫颈细胞中。是低度病变，并且(c) 如果非典型细胞和正常宫颈细胞中都不存在MN / CA9抗原，则诊断为良性。

	HSIL (CIN II, III)	LSIL (CIN I)	非定型	良性
MN/CA9免疫反応性				
ASCUS (n=101)				
陽性染色 (n=44)	5	35	3	1
拡散染色 (n=19)	2	17	0	0
染色なし (n=38)	0	2*	2	34