

(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 - 526777

(P2003 - 526777A)

(43)公表日 平成15年9月9日(2003.9.9)

(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 47数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 515716(P2001 - 515716)

(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/US00/21017

(87)国際公開番号 W001/010909

(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 G U S ・ P a p スミアにおけるMN / C A 9 タンパク質の発現を用いた診断法

(57)【要約】

異型または正常な細胞上に発現されたMN / C A 9 抗原の分布を観察すること、および (a) MN / C A 9 抗原が異型細胞上に観察される時は重大な病変を、 (b) MN / C A 9 抗原が異型細胞には不存在であるが正常な頸管内細胞上には存在している時は低い悪性度分類の病変を、 (c) MN / C A 9 抗原が異型細胞および異常な頸管内細胞の双方に存在しない時は良性状態であると、診断することによる、 A G U S 診断された P a p スミア細胞から癌性または前癌性の子宮頸管の病変の存在を測定すること。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ベセスダシステム用語法のもとに、重大性未確定異型腺細胞（AGUS）として細胞学的に診断されているPapスミア細胞からの、癌性または前癌性の子宮頸部病変の存在を測定する方法であって、前記Papスミアが異型および正常の頸管内細胞を含んでおり、前記方法が：

- （A） 前記AGUS診断されたPapスミア細胞を、それによりMN/CA9抗原の発現が検出される方法に供すること；
- （B） 細胞学的に診断された前記AGUS Papスミア細胞の異型または正常な細胞上に発現されたMN/CA9抗原の分布を観察すること；および
- （C） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞上に観察されており、前記重大な病変が腺癌、浸潤癌（CA）、または高い悪性度分類の扁平上皮内病変（HSIL）を含む時、重大な病変の存在を診断すること；
- （D） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞には存在しないが前記正常な頸管内細胞上には存在しており、低い悪性度分類の病変が扁平上皮内病変（LSIL）または異型を含む時、低い悪性度分類の病変の存在を診断すること、
を包含する、方法。

【請求項2】 請求項1に記載の方法であって、さらに：

- （E） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞および正常な頸管内細胞には不存在である時、良性状態であると診断すること、
を包含する、方法。

【請求項3】 ベセスダシステム用語法のもとに、重大性未確定異型腺細胞（AGUS）として細胞学的に診断されているPapスミア細胞からの、腺癌の存在を測定する方法であって、前記Papスミアが異型および正常の頸管内細胞を含んでおり、前記方法が：

- （A） 前記AGUS診断されたPapスミア細胞を、それによりMN/CA9抗原の発現が検出される方法に供すること；
- （B） 細胞学的に診断された前記AGUS Papスミア細胞の異型または正常な細胞上に発現されたMN/CA9抗原の分布を観察すること；および
- （C） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞上に蜂巣状構造にて観察される時

、腺癌の存在を診断すること；

を包含する、方法。

【請求項4】 請求項2に記載の方法であって、前記腺癌が上皮内腺癌（AIS）または浸潤性腺癌である、方法。

【請求項5】 ベセスダシステム用語法のもとに、重大性未確定異型腺細胞（AGUS）として細胞学的に診断されているPapスミア細胞からの、高い悪性度分類の扁平上皮内病変の存在を測定する方法であって、前記Papスミアが異型および正常の頸管内細胞を含んでおり、前記方法が：

（A） 前記AGUS診断されたPapスミア細胞を、それによりMN/CA9抗原の発現が検出される方法に供すること；

（B） 細胞学的に診断された前記AGUS Papスミア細胞の異型または正常な細胞上に発現されたMN/CA9抗原の分布を観察すること；および

（C） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞上に密なクラスターにて観察される時、高い悪性度分類の扁平上皮病変（HSIL）の存在を診断すること；

を包含する、方法。

【請求項6】 ベセスダシステム用語法のもとに、重大性未確定異型腺細胞（AGUS）として細胞学的に診断されているPapスミア細胞からの、癌性または前癌性の子宮頸部病変の存在を測定する方法であって、前記Papスミアが異型および正常の頸管内細胞を含んでおり、前記方法が：

（A） 前記AGUS診断されたPapスミア細胞を、それによりMN/CA9抗原の発現が検出される方法に供すること；

（B） 細胞学的に診断された前記AGUS Papスミア細胞の異型または正常な細胞上に発現されたMN/CA9抗原の分布を観察すること；

（C） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞上に観察されており、前記重大な病変が腺癌、浸潤癌、または高い悪性度分類の上皮内病変を含む時、重大な病変の存在を診断すること；

（D） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞上に、蜂巢上構造にて観察される時、腺癌の存在を診断すること；および

（E） 前記MN/CA9抗原が前記異型細胞に密なクラスターにて観察される

時、高い悪性度分類の扁平上皮内病変（H S I L）の存在を診断すること、
を包含する、方法。

【請求項7】 ベセスダシステム用語法のもとに、重大性未確定異型腺細胞（A G U S）として細胞学的に診断されているP a pスミア細胞からの、低い悪性度分類の子宮頸管病変の存在を測定する方法であって、前記P a pスミアが異型および正常の頸管内細胞を含んでおり、前記方法が：

（A） 前記A G U S診断されたP a pスミア細胞を、それによりM N / C A 9抗原の発現が検出される方法に供すること；

（B） 細胞学的に診断された前記A G U S P a pスミア細胞の異型または正常な細胞上に発現されたM N / C A 9抗原の分布を観察すること；および

（C） 前記M N / C A 9抗原が前記異型細胞には不存在であるが前記正常な頸管内細胞上には存在している時、低い悪性度分類の扁平上皮内病変（L S I L）または異型の存在を診断すること；

を包含する、方法。

【請求項8】 ベセスダシステム用語法のもとに、重大性未確定異型腺細胞（A G U S）として細胞学的に診断されているP a pスミア細胞からの、癌性または前癌性の子宮頸部病変の有無を測定する方法であって、前記P a pスミアが異型および正常の頸管内細胞を含んでおり、前記方法が：

（A） 前記A G U S診断されたP a pスミア細胞を、それによりM N / C A 9タンパク質またはそれを特徴づける部分が検出される方法に供すること；

（B） 細胞学的に診断された前記A G U S P a pスミア細胞の異型または正常な細胞上に発現されたM N / C A 9抗原の分布を観察すること；

（C） 前記M N / C A 9抗原が前記異型細胞上に蜂巣状構造にて観察される時、腺癌の存在を診断すること；

（D） 前記M N / C A 9抗原が前記異型細胞上に密なクラスターにて観察される時、高い悪性度分類の扁平上皮病変（H S I L）の存在を診断すること；

（E） 前記M N / C A 9抗原が前記異型細胞には不存在であるが前記正常な頸管内細胞上には存在している時、低い悪性度分類の扁平上皮内病変（L S I L）および/または異型の存在を診断すること；および

(F) 前記MN/CA9抗原が前記変異細胞および正常頸管内細胞にない時、
良性状態であると診断すること、

を包含する、方法。

【請求項9】 請求項8に記載の方法であって、前記MN/CA9抗原がMN/CA9タンパク質の特徴づけている部分を含む、方法。

【請求項10】 請求項9に記載の方法であって、前記MN/CA9タンパク質の前記特徴づけている部分が、前記MN/CA9タンパク質の少なくとも1つの免疫反応性エピトープを含む、方法。

【請求項11】 請求項8に記載の方法であって、前記発現が免疫組織化学により検出される、方法。

【請求項12】 請求項8に記載の方法であって、前記発現がMN/CA9タンパク質をコードするmRNA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される、方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

(関連出願に関するクロス・リファレンス)

本出願は、1999年8月5日提出の仮特許出願第60/147,556号の利益を要求する。

【0002】

(発明の背景)

子宮頸癌は、婦人において最も通常の悪性腫瘍の1つであり、世界的にも発生率および死亡率の両方において乳癌に次ぐのみである(NIHコンセンサス・ステートメント(1) Cervical Cancer (子宮頸癌). 1996. 14 : 1 - 18)。一般に先進国、および特に米国では、Papスミアスクリーニングプログラムを広範囲に受け入れた結果、子宮頸癌の発生率および死亡率における劇的な減少がもたらされた。しかしながら、米国で行なわれた最近の調査はなお、年間に推定15,700人の婦人が浸潤性子宮頸癌と診断され、かつ推定4,900人の婦人が子宮頸癌で死亡していることを示した(NIHコンセンサス・ステートメント(1) Cervical Cancer. 1996. 14 : 1 - 18)。さらに、腺癌の発生率は過去20年間に3倍となっており(McGonigle KF, およびBerek JS. Early stage squamous cell and adenocarcinoma of the cervix (初期の扁平上皮細胞と子宮頸部の腺癌). Curr. Opin. Obstet. Gynecol., 1992. 4 : 109 - 119)、また現在では、診断された全子宮頸癌の25%までに相当する(Miller BE, Flax SD, Arheart K, Photopoulos G. The presentation of adenocarcinoma of the uterine cervix (子宮頸部の腺癌の提示). Cancer 1993, 72 : 1281 - 1285 ; およびCrum CP, Cibas ES, Lee KR. : Glandular precursors, adenocarcinomas, and their mimics (腺性前駆体、腺癌、およびそれらの擬態物). Pathology of early cervical neoplasia (初期子宮頸部新生物の病理学). ニューヨーク : チャーチル・リビングストーン (Churchill Livingstone)、1997. 177 -240)。

【0003】

子宮頸癌の相対的に高い発生率には多くの因子が関係づけられてきたが、偽陰性に関する固有に高い割合が、現在のスクリーニングシステムにおける極めて

重要な関心事の1つであるように見える。この誤診は、一部には技術上の問題に帰せられるが、しかし規則や規定によっては容易に改善されない人的な因子に主として基づくものでもあり得る (Kos LG. Cervical (Pap) smear. New directions (子宮頸部 (Pap) スミア、新たな方向). Cancer (Phial.), 71 (別冊); 1993. 1406 - 1412)。

【0004】

近年、新規な子宮頸部細胞サンプリング装置 (例えば、サイトブラシ) の使用が、子宮頸管を含む腺および扁平新生物の両方の検出を改善した。しかしながら、増大された頸管内細胞収穫量は、多くの新たな良性のパターン、および有意に重なり合う性質を有する新生物の頸管内細胞診断学も産み出してきた。これらのパターンは、ルーチンな日常実践では細胞学者になじみがない。この不確かさが、頸管内腺性異形成に関する細胞学的診断の増加に反映されてきた。

【0005】

A I S および腺癌の P a p スミア診断法に関する形態学的基準は、充分記述されてきた (Ayer B, Pacey F, Greenberg M, Bousfield L. The cytologic diagnosis of adenocarcinoma in situ of the cervix uteri and related lesions (子宮頸部の上皮内腺癌および関連病巣の細胞学的診断). I. Adenocarcinoma in situ. Acta Cytol., 1987. 31 : 397 - 411 ; および Pacey NF. Glandular neoplasms of the uterine cervix (子宮頸部の腺性新生物)、Bibbo M編、Comprehensive Cytopathology (包括的細胞病理学). WBサンダース (Saunders)、フィラデルフィア、1991. 243 - 255)。しかしながら、後に A I S および / または浸潤性子宮頸管内腺癌を有することが見出された婦人からの P a p スミアでは、40%までの偽陰性率が報告されている (Crumら、1997, 177 - 240 ; および Kim HS, Underwood D, Frable WJ. Adenocarcinoma in the cervicovaginal Papanicolaou smear: analysis of a 12-year experience (頸腔パパニコラウスミアにおける腺癌 ; 12年間の体験分析). Diagn. Cytopathol., 1991. 7 : 119 - 124)。A I S / C A に関する、より初期の診断ミスは、P a p スミアにおける頸管内腺細胞の存在が少数であること、および / または技術的なアーチファクトに帰せられた。しかしながら、研究は、ヒトにおける誤診が重要な役割を果たす

かもしれないことも示してきた。このことは、形成異常の腺細胞に関する、剥脱性の子宮内膜細胞および/または反応性の頸管内細胞としての不正確な診断を含む (Kosら、1993 ; およびLee KR, Manna EA, St. John T. Atypical endocervical glandular cells : accuracy of cytologic diagnosis (異常な頸管内腺細胞 : 細胞学的診断の正確さ) . Diagn. Cytopathol. 1995. 13 : 202 - 208)。

【0006】

この状況を明らかにする試みの中で、ベセスダ・システム委員会 (the Bethesda System committee) は、1988年、異型腺細胞に関する細胞学的基準を確立し、患者の類別を促進するよう、サブクラス化スキームを有する新規な診断的用語を提案した。反応性の変化は越えるが浸潤性の腺癌には達しない頸管内腺性異常は、重大性が未確定の異型腺細胞(atypical glandular cells of undetermined significance)(AGUS)として報告されることが推奨された (National Cancer Institute Workshop (国立癌研究所ワークショップ) . The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnosis : report of the 1991 Bethesda Workshop (子宮頸/膣部細胞学的診断報告のための改訂されたベセスダシステム : 1991年ベセスダワークショップの報告書) . JAMA, 1992. 267 : 1892 ; およびKurman RJ, Solomon D. The Bethesda System for Reporting Cervical/Vaginal Cytologic Diagnoses (子宮頸/膣部細胞学的診断報告のためのベセスダシステム) . ニューヨーク : スプリンジャー-ベアレグ (Springer-Verlag)、1994. 64- 76)。毎年、125万人もの米国の婦人が、AGUSの診断を受けている (Raab SS, Geisinger KR, Silverman JF, Thomas PA, Stanley MW. Interobserver variability of a Papanicolaou smear diagnosis of atypical glandular cells of undetermined significance (重大性未確定の異常腺細胞パパニコラウスミア診断に関する観察者間の変動性) . Am. J. Clin. Pathol., 1998. 110 : 653 - 659)。しかしながら、このサブクラス化の結果が臨床的に有効であるか、なお証明されるべきである。

【0007】

良性および腫瘍性病変の幅広い形態学的スペクトルが、AGUSのカテゴリーに含まれる。これらは異型性頸管内修復、子宮内膜症、微小腺の過形成、卵管化

生、腺性関与の偏平上皮内病変 (S I L)、および腺性形成異常、および腺癌を含む (Lee KR. Atypical glandular cells in cervical smears from women who have undergone cone biopsy. A potential diagnostic pitfall (円錐切除診を受けた婦人からの子宮頸部スミアにおける異型腺細胞。可能性のある診断上の落とし穴) . Acta. Cytol., 1993. 37 : 705 - 709 ; Pacey F, Ayer B, Greenberg M. The cytologic diagnosis of adenocarcinoma in situ of the cervix uteri and related lesions (子宮頸部の上皮内腺癌および関連病巣の細胞学的診断) . III. Pitfalls in diagnosis (診断の落とし穴) . Acta. Cytol., 1988. 32 : 325 - 330 ; Yahr U, Lee KR. Cytologic findings in microglandular hyperplasia of the cervix (子宮頸部の微小腺過形成における細胞学的所見) . Diagn. Cytopathol. 1991. 7 : 248 - 251 ; Novotny DB, Maygarden SJ, Johnson DE, Frable WJ. Tubal metaplasia (卵管化生) . A frequent potential pitfall in the cytologic diagnosis of endocervical glandular dysplasia on cervical smears (子宮頸部スミアにおける頸管内腺性形成異常の細胞学的診断に頻発する落とし穴) . Acta. Cytol., 1992. 36 : 1 - 10 ; Paceyら、1991 ; および Kos L G. Diagnostic cytology and its histopathologic bases (診断用細胞学およびその病理組織学的基礎) . 第1巻、第4版、フィラデルフィア ; J B リッピンコット (Lippincott) : 1992. 387 : 452 - 454) 。

【 0 0 0 8 】

幾つかの研究室では、頸管内異型性と診断された症例におけるフォローアップが行なわれている。その結果は、A G U S 症例の約 4 0 % が高い悪性度分類の S I L , 上皮内腺癌 (A I S)、または癌を表しており、相対的に 6 0 % が良性かまたは重要性のない病変を表わすことを示している。驚くべき範囲 (1 5 ~ 5 8 %) の患者が、A G U S の P a p スミア診断を受けた後のフォローアップ・バイオプシーにおいて、重大な病変 (H S I L、A I S / C A) を有していた。さらに、重大な病変のうちごく小部分が腺性腫瘍 (A I S / C A) であった。従って、A G U S 診断法は、多くの A G U S 病変が全く腺性ではないので、不適切な名称のように思われる (Wilbur DC, Mulford DM, Sickel JZ, Atkinson KM. The problem of endocervical atypia : new cytologic presentations of normal

endocervical cells (頸管内異型性の問題点 : 正常な頸管内細胞に関する新規な細胞学的提示) . Mod. Pathol. , 1994. 38 : 808 ; Goff BA, Atanasoff P, Brown E, Muntz HG, Bell DA, Rice LW. Endocervical glandular atypia in Papanicolaou smears (パパニコラウスミアにおける頸管内腺性異型性) . Obstet. Gynecol. , 1992. 79 : 101 - 104 ; Leeら、1995 ; Nasu I, Meurer W, Fu YS. Endocervical glandular atypia and adenocarcinoma : A correlation of cytology and histology (頸管内腺性異型性と腺癌 : 細胞学と組織学との相関関係) ., Int. J. Gynecol. Pathol. , 1993. 12 : 208 - 218 ; Taylor R, Guerriere J, Nash JD, Henry MR, O'Conner DM. Atypical cervical cytology : Colposcopic follow-up using The Bethesda System (異型子宮頸部細胞学 : ベセスダシステムを用いたコルコスコーピーによるフォローアップ) , J. Reprod. Med. , 1993. 38 : 443 - 447 ; Kennedy AW, Salmieri SS, Wirth SL, Biscotti CV, Tuason LJ, Travarca MJ. Results of the clinical evaluation of atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS) detected on cervical cytology screening (子宮頸部細胞学的スクリーニングにおいて検出された重大性未確定の異常腺細胞 (AGUS) に関する臨床評価の結果 . Gynecol. Oncol. , 1996. 63 : 14 - 18 ; および Bose S, Kannan V, Kline TS. Abnormal endocervical cells. Really abnormal ? Really endocervical ? (異常頸管内細胞。真に異常か ? 真に頸管内性か ?) Am. J. Clin. Pathol. , 1994. 101 : 708 - 713) 。

【 0 0 0 9 】

反応性の変化および偏平上皮性新形成から腫瘍性腺細胞を分離することを目指した、子宮頸部の腺性病変の診断の助けとなる細胞学的基準を定義するための、多くの試みがあった。しかもなお、細胞病理学者の間では、当初は AGUS と診断された病変を再分類するのに、および良性の AGUS 病変から临床上重大なものを分離するのに、僅かな一致があるだけである (Raabら、1998 ; Novotnyら、1992 ; Nasuら、1993 ; Raab SS, Isacson C, Layfield LJ, Lenel, JC, Sigel, DD, Thomas PA. Atypical glandular cells of undetermined significance: cytologic criteria to separate clinically significant from benign l

esions (重大性未確定の異型腺細胞 : 臨床的重要物を良性病変から分離するための細胞学的基準) . Am. J. Clin. Pathol., 1995. 104 : 574 - 582 ; Raab S S, Snider TE, Potts SA, McDaniel HL, Robinson RA, Nelson DL, Sigman JD, Thomas PA. Atypical glandular cells of undetermined significance. Diagnostic accuracy and interobserver variability using select cytologic criteria (重大性未確定の異型腺細胞。選ばれた細胞学的基準を用いた診断的精度および観察者間の変動性) . Am. J. Clin. Pathol., 1997. 107 : 299 - 307 ; および DiTomasso JP, Ramzy I, Mody DR, Glandular lesions of the cervix . : Validity of cytologic criteria used to differentiate reactive changes , glandular intraepithelial lesions and adenocarcinoma (子宮頸部の腺性病変 : 反応性の変化、腺性上皮内病変、および腺癌を区別するのに用いられる細胞学的基準の妥当性) . Acta. Cytol., 1996. 40 : 1127 - 1135) 。

【 0 0 1 0 】

この診断上の不確かさは、経費 - 利益の観点、および患者に不必要な侵襲性の手技を施ささないようにとの願望の両方から、臨床上の対処法決定に特有のジレンマをもたらせた。従って、反応性 - 修復性の変化 (reactive-reparative changes) により異型である腺細胞を、形成異常および癌により異型である細胞から分離することができる A G U S 診断するための、有用な識別物が必要である。

【 0 0 1 1 】

最近、MN / C A 9 と名付けられた新規な抗原が記述されている。それは、子宮頸部腺癌細胞系、ヒーラ (HeLa) において発見された膜貫糖タンパク質である (Zavada J, Zavadova Z, Pastorekova S, Ciampor F, Pastorek J, Zelnik V. Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens (ヒト腫瘍培養物および臨床標本におけるMa Tu-MNタンパク質の発現) . Int. J. Cancer 1993. 54 : 268 - 274) 。 MN / C A 9 産物をコードする遺伝子は稀である - 炭酸脱水酵素ドメインとして今日までに同定されている唯一の相同機能性ドメインである。新生物形成の進行におけるMN / C A 9 の役割を支持する証拠は、ヒト細胞のハイブリッドにおける腫瘍原性の表現形との関連性、およびMN c DNAを用いたトランスフェクションに続くマウス3 T 3細胞の腫

瘍性形質転換との関連性を含む (Zavadaら、1993 ; およびPastorek J, Pastorekova S, Callebaut I, Morrion JP, Zelnik V, Opavsky R, Zatovicova M, Liao S, Portelle D, Stanbridge EJ, Zavada J, Burny A, Kettmann R. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment (MNのクローニングおよび特徴付け、炭酸脱水酵素に相同性のあるドメインを有するヒト腫瘍関連タンパク質、および推定されるヘリックス-ループ-ヘリックスDNA結合セグメント). *Oncogene* 1994. 9 : 2877 - 2888)。臨床標本に関する予備的なスクリーニングは、MN/CA9タンパク質が非常に少数の正常組織に限定されるが、しかし子宮頸部新生物を含む特定の悪性腫瘍では、有意なレベルの発現が認められた (Pastorekら、1994)。

【0012】

数百の良性および新形成性の子宮頸部検体の研究は、MN/CA9がAISの全ての症例と、子宮頸部扁平上皮新形成の90%以上で発現されることを示している。高レベルのMN/CA9タンパク質の発現は、形成異常の組織に隣接した領域における、見かけ上正常な頸管内細胞において頻繁に観察されるが、正常な子宮頸部はMN/CA9タンパク質を発現しない。さらに、305例のPapsミアの研究も、Papsミア中の剥奪性細胞に見られるMN/CA9発現が、子宮頸部の対応する組織切片におけるMN/CA9発現を発生反復することを示している。実質的には、AISに由来する全ての異型腺細胞および腺癌は高レベルのMN抗原を発現するが、良性の子宮頸部から得られた頸管内細胞は陰性であった (Liao SY, Brewer C, Zavada J, Pastorek J, Pastorekova S, Marietta A, Berman ML, DiSaia PJ, Stanbridge EJ. Identification of the MN antigen as a diagnostic biomarker of cervical intraepithelial squamous and glandular neoplasia and cervical carcinomas (子宮頸部扁平上皮性および腺性新生物および子宮頸癌に関する診断用バイオマーカーとしてのMN抗原の同定). *Am. J. Pathol.*, 1994. 145 : 598 - 609 ; (Liao SY, Stanbridge EJ. Expression of the MN antigen in cervical Papanicolaou smears is an early diagnostic biomarker of cervical dysplasia (子宮頸部パパニコラウスミアにおけ

るMN抗原の発現は、子宮頸部異形成の初期の診断用バイオマーカである)。
Canc. Epid. Biom. Prev., 1996. 5 : 549 - 557)。

【0013】

これらの結果は、MN/CA9抗原の発現がAISおよび腺癌を示すし得ることを示しているが、高い悪性度分類および低い悪性度分類の病変と、良性の状態との間の信頼できる区別を可能にしてはいない。かかる区別を可能にすることは、有意義な臨床診断にとって重要である。偽陰性によって引き起こされる致命的な損害と、偽陽性によって引き起こされる苦痛および費用は、より信頼し得る臨床的方法を要求する。

【0014】

(発明の概要)

本発明は、現在のルーチンな慣用されているPapスミアスクリーニングよりも、さらに正確なAGUS診断法に対する要求を満たすものである。本発明は、AGUS診断されたPapスミア標本上の異型および/または正常な細胞上のMN/CA9抗原の分布に関する新しい洞察を提供し、またMN/CA9抗原に対し、最終的には癌性または前癌状態に関する強力な診断用バイオマーカとして役立つことを可能にさせる臨床的ロードマップとして役立つ。

【0015】

具体的には、本発明は、ベセスダシステムの用語法の下に重大性未確定の異型腺細胞(AGUS)として細胞学的に診断されているPapスミア細胞から、癌性または前癌性の子宮頸部病変の存在を測定するための、信頼できる包括的な方法を初めて提供する。AGUSと診断されたPapスミア細胞は、MN/CA9抗原の発現を検出する、免疫組織化学またはin situ細胞ハイブリダイゼーションなどの方法に供される。AGUSと診断されたPapスミアは、代表的には容易に確認できる形成異常を欠くが、異型および正常な頸管内細胞は含んでいる。重大な又は低い悪性度分類の病変の存在を診断するために用いられるのは、異型または正常細胞上に観察されるMN/CA9抗原の分布である。より詳細には、腺癌、浸潤癌(CA)、または高い悪性度分類の扁平上皮内病変(high grade squamous intraepithelial lesions)(HSIL)を含む重大な病変は、MN/C

A 9 抗原が異型細胞上に観察される時に診断される。低い悪性度分類の扁平上皮内病変 (L S I L) または異型性を含む低度の病変は、MN / C A 9 抗原が異型細胞には存在しないが、正常な頸管内細胞上には存在する時に診断される。良性の状態は、MN / C A 9 が異型および正常な頸管内細胞に存在しない時に診断される。

【 0 0 1 6 】

本発明の好ましい形態では、MN / C A 9 抗原が異型細胞上に観察される時はいつでも、重大な病変の存在のみならずその性質も診断される。1つの態様では、MN / C A 9 抗原が異型細胞上に、円柱状または蜂巣状の形状で検出される時、上皮内腺癌 (adenocarcinoma in situ) (A I S) および侵潤性腺癌を含む腺癌の存在が診断される。もう1つの態様では、MN / C A 9 抗原が異型細胞上に、隙間のないクラスターとして検出される時、H S I L の存在が診断される。

【 0 0 1 7 】

従って、本発明の方法は、P a p スミア標本用の A G U S 診断に関連した不確実性および偽陰性の問題を克服する。さらに、該方法は、異型 P a p スミア中で、重大な病変、低い悪性度分類の病変、または良性の状態に関連するものを識別する。

【 0 0 1 8 】

(発明の詳細な説明)

本発明の方法は、重大性未確定の異型腺細胞を観察する際に、細胞学的検査、例えば、P a p スミアによって得られた診断を確認するための、MN / C A 9 抗原の発現のレベルおよび分布を検査することを包含する。陽性の結果は、臨床上の状態発現がない場合でも、形成異常の初期のマーカーとして役立つ。

【 0 0 1 9 】

I . P a p スミアの獲得

いかなる細胞診断法においても第1のステップは、精査のための好適な P a p スミア細胞を得ることである。慣用されている P a p スミアテストでは、細胞学者は、子宮頸部の整列物から幾らかの細胞を擦過すること、該細胞をスライドグラス上に塗抹すること、およびパパニコラウ染料を用いて染色することにより得

られた、剥脱性の細胞標本を検査する。細胞学者は、悪性の状態の存在を示す異常に見える細胞の存在について、染色されたスミアを調べる。「悪性の状態」という用語は、上皮内腺癌(AIS)、浸潤性腺癌(CA)、新生物、悪性または腫瘍細胞などを含む形成異常の存在を指す。

【0020】

本発明の方法では、悪性の状態を潜伏させ得る又は得ない患者から、剥脱性(exfoliative)細胞標本が得られる。標本は、綿棒、へら、またはサイトブラシといった子宮頸部サンプリング器具を、子宮頸部または膣粘膜の部分に沿って細胞標本を得るように回転することによって得られ得る。好適な標本は、扁平上皮(squamous)および/または腺(glandular)細胞を有する頸管内細胞を含むであろう。

【0021】

剥脱性の細胞標本は、一般に、スライド上に塗抹され、スライド表面上に標本の薄層を供給する。しかしながら、細胞の異常性に関する手動的観察、または細胞学的材料に関する自動化された分析は、標本スライド上の「単層」の細胞を調製することにより、最適化され得る。「単層」とは、主として単一細胞および細胞の小さいクラスターからなる、均一に分布した細胞材料の実質的に2次元的な層として定義される。剥脱された細胞を解離する、および標本スライド上に「単層」の細胞を生成するように解離された細胞を用いる先の方法は、超音波振盪、ローターによるせん断、シリンジング、強制ろ過、遠心分離、沈降、およびフィルター転移を含む。かかる技術の実例は、Hutchinson, M.L.ら、Anatomic Pathology、96巻3号、300-305頁(1991)によって記述された、自動化ThinPrep(登録商標)システム(サイティック・コーポレーション(Cytoc Corporation)、マールボロウ、マサチューセッツ州)、および米国特許第5,346,831号に記載されたサイトリッチ(CytoRich)プロセスシステム(ホフマン・ラ・ロシュ社(Hoffman-La Roche Inc.)、ナトリー、ニュージャージー州)を含む。

【0022】

二重スミアが得られる時は、1つのスミアは慣用されているパパニコラウ法に

従って染色され、もう一方のスミアはMN / CA 9 抗原の発現を検出するために使用され得る。或いは、細胞学的検査の後、P a p 染料を除去するよう慣用されているP a p スミア標本は脱染色され、次いで、例えば免疫組織化学技術を用いて、MN / CA 9 抗原の発現を検出するよう再染色され得る。

【0023】

II. 細胞学的Dx : ザ・ベセスダ・システム (TBS)

TBS分類システムは、P a p スミア細胞に関する予備的な細胞学的診断に用いられる。1988年の臨床検査室改良法は、P a p スミアのスクリーニング結果を報告するための同一基準のシステムを指令した。この法令に従って開発されたシステムは、ザ・ベセスダ・システム (TBS) として知られており、1991年以来、初期の分類システムに代わり効力を発している。用語を最も広く解釈することを除き、この2つのシステムを互いに関連づけるための正確な方法は、ない。

【0024】

ザ・ベセスダ・システムはまず、試料の適切性、例えば、頸管内細胞が存在するかどうかを報告し、さらに異常な結果に関する記述的な用語を使用する。このシステムは、P a p スミア上で検出される、真菌、細菌、原虫、またはウイルスの感染による任意の良性の細胞性変化を記載してもよい。さらに、結果は、P a p スミアが、炎症、萎縮性膣炎、放射線照射、または子宮内避妊具 (IUD) に関連する反応性の細胞変化を検出したかどうか報告し得る。

【0025】

良性の細胞変化に対応しない異型細胞または細胞クラスターを含むP a p スミアには、上皮細胞異常という記述的診断が与えられる。上皮細胞異常という記述的診断は、さらに扁平上皮または腺細胞の異常として類別される。

【0026】

扁平上皮細胞異常に関する記述的診断は：(1) 重大性未確定の異型扁平上皮細胞 (ASCUS) ; (2) 低い悪性度分類の扁平上皮内病変 (LSIL) ; (3) 高い悪性度分類の扁平上皮内病変 (HSIL) を含み得る。ASCUSは、扁平上皮内病変 (SIL) に関する基準には合致しない異常を示すが、にもか

ならず注目するに足るものでもない。このASCUSカテゴリーは更に、Favor Reactive Process (支持反応性プロセス)、Changes Associated with Atrophy (萎縮関連性変化)、またはFavor Neoplasia (支持新形成)によって評価され得る。LSILは、軽度の形成異常を含み、またヒト乳頭腫ウイルス(HPV)を示唆する変化を含み得る。HSILは、中程度から重度の形成異常、上皮内癌(carcinoma in situ)、および扁平上皮細胞癌を含む。

【0027】

腺細胞異常に関する記述的診断は：(1)閉経後の婦人では細胞学的に良性である、腺性子宮内膜細胞；(2)重大性未確定の異型腺細胞(AGUS)；および(3)頸管内、子宮内膜、子宮外、または他の腺癌などの非浸潤性または悪性新生物を含み得る。AGUSカテゴリーは、Favor Reactive Process (支持反応性プロセス)、Favor Neoplastic Process (支持新形成性プロセス)、およびNot Otherwise Specified (NOS) (他には特定されない)によって更に評価され得る。

【0028】

III. 検出手順

ベセスダシステム用語法の下に重大性未確定な異型腺細胞(AGUS)として細胞学的に診断されてきたPapスミア細胞は、MN/CA9抗原の発現が検出される手順に供される。

【0029】

A. MN/CA9抗原

「MN/CA9抗原」という用語は、本明細書中では、MN/CA9遺伝子またはそのフラグメントによりコードされたタンパク質および/またはポリペプチドを意味するものとして定義される。「ポリペプチド」は、ペプチド結合により共有結合性に結合されたアミノ酸の鎖であり、本明細書中では、50個以下のアミノ酸から成るとみなされる。「タンパク質」は本明細書中では、50個以上のアミノ酸から成るポリペプチドであると定義される。MN/CA9遺伝子は、約48kDaのMN/CA9タンパク質をコードする。MN/CA9タンパク質は膜貫糖タンパク質であり、ヒラ細胞および幾つかのヒト癌の、細胞表面上および

核内に局在し得る。MN / C A 9 タンパク質はヒーラ細胞中では、54および58 k D a の双子タンパク質として発現され、それらはジスルフィド結合されたオリゴマーを形成し得る。MN / C A 9 タンパク質の遺伝子は、配列番号1のヌクレオチド配列を含んでおり、それは、本明細書中に参考として援用される米国特許第5,387,676号に記載されているように、配列番号2のアミノ酸配列をコードする。

【0030】

新形成性細胞によりインビボで産生されるタンパク質またはポリペプチドが、細胞培養中の腫瘍細胞によって産生されるものから、配列において変化され得ることは、理解し得る。従って、MN / C A 9 抗原は、MN / C A 9 アレレによってコードされたタンパク質および/またはポリペプチドを含み、それらはアミノ酸の置換、伸長、欠失、切断、およびそれらの組合せを制限することなく含む変化したアミノ酸配列を有しており、それらは本発明の範囲内に入る。

【0031】

タンパク質が、インビボでタンパク質分解または分解性プロセスのような翻訳後の修飾を受けることもまた認識されており、従って、切断されたMN / C A 9 ポリペプチドか、または例えば、グリコシル化、リン酸化、アデニル化、またはミリストイル化された残基の有無により、有意に修飾されたMN / C A 9 タンパク質もまた臨床標本中に見出され得る。従って、「MN / C A 9 抗原」という用語は、本明細書中では、抗MN / C A 9 抗体に対して探知可能に結合する抗原決定基または免疫反応性エピトープなどの、MN / C A 9 タンパク質および/またはポリペプチドを特徴付けている部分を保持している、修飾されたMN / C A 9 タンパク質および/またはポリペプチドを含むものとして用いられる。

【0032】

B. 免疫組織化学

本発明の1つの態様では、MN / C A 9 抗原は、MN / C A 9 タンパク質 / ポリペプチドと特異的に結合し得る結合性部分と反応し得、それにより結合性部分 / MN / C A 9 抗原複合体を生成する。代表的には、標本は、MN / C A 9 抗原に特異的な抗体と、該抗体が抗原性部位に結合する条件下で接触される。接触後

、抗体 / 抗原複合体の有無が測定される。

【0033】

結合性部分は、代表的には、抗体 / MN / CA9 抗原複合体を形成し得る抗体、即ち、抗MN / CA9 抗体である。本明細書中で用いられるように、「抗体」という用語は、結合性タンパク質、例えば免疫グロブリン、またはMN / CA9 抗原に関する好適な結合親和性および特異性を有する、免疫グロブリン可変領域様結合性ドメインを含む、他のタンパク質を意味するものと理解される。ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を産生する方法は、当分野で周知である。抗体は、ヒト、マウス、またはそれらの組合せを含む哺乳類の源に由来し得る。抗体は、好ましくはIgGであるが、IgM、IgE、IgAなどであり得る。さらに、好適な結合性ドメインを有する他の有用な抗体は、Fab、F(ab')₂、Fvなどのような抗体フラグメントを含む。抗体フラグメントは、慣用されている技術、例えば、パパインまたはペプシンを用いた、抗体のペプチダーゼ消化によって調製され得る。

【0034】

或いは、抗体フラグメントは、好ましくは、超可変部を含む軽鎖および / または重鎖 (V_HおよびV_L) の可変領域から、さらになお好ましくは、V_HおよびV_L 領域から遺伝子的に工作され得る。従って、1つ以上の抗原と結合し得る「ハイブリッド」抗体、定常 - 可変領域キメラ、異なる起源からの重鎖および軽鎖を有する「複合体」免疫グロブリン、および改善された特異性と他の特性とを有する「改変された」抗体は、本発明で使用するために組換え技術によって調製され得る。

【0035】

モノクローナル抗体が、好ましい。代表的な抗MN / CA9 抗体、モノクローナル抗体M75を産生するマウスハイブリドーマは、米国特許第5,387,676号(本明細書中に参考として援用されている)に開示されるように、1992年9月17日、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション[ATCC、メリーランド州、ロックビル(米国)]に、ATCC番号HB11128の下に寄託された。

【0036】

抗体と標本との接触は、一般に、水性緩衝システム中で行なわれる。標本と抗体との接触時間の後、スライドは水性緩衝化溶液を用いて、未反応の抗体を除去するよう洗浄される。次に、抗原に対する抗体の結合が、標識化システムの使用によって検出される。

【0037】

抗原/抗体(免疫)複合体の存在を測定するために、検出可能なシグナルを産生する手段が検定システムに取り入れられる。例えば、直接標識法では、検定に用いられる1次抗体、例えば抗MN/CA9抗体を、検出可能なシグナルを産生し得る標識に複合体化し得る。標識は、フルオレセイン、ローダミン、Cy5などのような蛍光色素を含む発色団か；またはアルカリ性ホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼなどのような酵素であり得る。或いは、1次抗体は、第2の結合性部分と特異的に結合するリガンドに複合体化し得、ここで、リガンドはDNPなどのハプテンか、またはビオチンを含み得る。間接標識法もまた用いられ得、そこでは、洗浄されたスライドを、1次抗体または1次抗体に複合体化されたリガンドに特異的に結合する第2の結合性部分と接触させ得る。例えば、マウスの源に由来するモノクローナル抗体が1次抗体である場合、標識された抗マウス免疫グロブリンが2次抗体として用いられ得る。或いは、アビジンを含む分子または抗ビオチン抗体が、特異的に結合してビオチンに複合体化された1次または2次抗体とともに複合体を形成し得る。

【0038】

さらに、1次または2次の結合性部分、またはそれらのリガンドは、酵素性、蛍光性、放射性、リン光性、または着色粒子標識などの、検出可能な標識に結合され得る。標識された複合体は、例えば顕微鏡検査により、または画像検出器の援助を得て検出され得る。

【0039】

C. 増幅およびin situハイブリダイゼーション

本発明のもう1つの態様では、MN/CA9発現は、MN/CA9タンパク質/ポリペプチドをコードする標的RNA分子を選択的に検出するための、in sit

u細胞ハイブリダイゼーションを用いて測定され得る。標的mRNA分子は、例えば、プライマーおよび、MN/CA9タンパク質/ポリペプチドをコードするmRNA分子の少なくとも一部分か、またはその相補的な配列と、特異的にハイブリダイズし得るハイブリダイゼーションプローブを用いて、増幅および検出され得る。好ましくは、プライマーおよび/またはハイブリダイゼーションプローブは、配列番号1の部分に実質的に相補的か、または同一であるオリゴヌクレオチドである。最も好ましくは、プローブは、配列番号1に相補的な配列と、穏やかから緊縮性までのハイブリダイゼーション条件下に、ハイブリダイズし得る。

【0040】

IV. MN/CA9抗原およびDxの分布

本方法の次の工程は、AGUSであると細胞学的に診断されたPapスミアの異型および/または正常細胞上に発現されたMN/CA9抗原の分布を観察することである。形態学的に正常な予備(reservoir)および円柱状細胞は、転移性の扁平上皮細胞を含めて、我々が正常な頸管内細胞(EC)と定義する細胞ポピュレーションを構成する。正常な扁平上皮細胞、頸管内予備細胞、または円柱状細胞から形態学的に逸脱したいかなる細胞クラスターも、異型細胞クラスターとみなされる。異型細胞の核は、一般に、正常なEC細胞よりも3~5倍大きく、増大された核/細胞質比を有する有意な過染色症を示す。異型細胞は、異型扁平上皮の化生、異型の予備細胞増殖、および頸管内腺性異型に由来し得る。

【0041】

MN/CA9抗原発現の分布は、1つ以上の一般的なパターンに入り得る。陰性のMN/CA9発現パターンは、標識が全く観察されないか、または2個以下の正常な頸管内細胞が検出可能に標識される場合に存在する。他方、陽性のMN/CA9発現パターンは、検出可能な標識がどの異型細胞クラスターにも、あるいは2以上の正常な頸管内細胞クラスターにおいて観察される場合に存在する。散在性の染色パターンは、異型細胞/細胞クラスターの大部分か、または各々のスミアにおいて100以上の正常な頸管内細胞/細胞クラスターが、強いMN/CA9発現を示している場合である。さらに、単離された頸管内細胞クラスターおよび/または異型細胞のみが陽性である場合には、焦点性の染色パターンが観

察される。

【0042】

本発明の方法は、先にAGUSと診断されたPapスミア細胞中の偽陰性の結果のレベルを低下させる。子宮頸癌の前駆体は形成異常であり、当分野では子宮頸部上皮内新生物(CIN)または扁平上皮内病変(SIL)としても周知である。推定上は腺起源の異型細胞が観察される場合、細胞はAGUSと診断され、細胞学者はそれを形成異常であるとは考えない。本発明の方法では、重大な又は重篤な癌性または前癌性の病変は、AGUSと診断されたPapスミア標本の異型細胞上のMN/CA9抗原の検出と関連付けられるので、偽陰性の結果が回避される。重大な病変は、腺癌、浸潤癌(CA)、および高い悪性度分類のSIL(HSIL)を含み得る。異型細胞上のMN/CA9抗原の発現は、時折、低い悪性度分類のSIL(LSIL)と関連付けられるが、この「偽陽性」の結果は、HSILに進行するであろう病変を前もって警告し得る。

【0043】

本発明の好ましい態様は、代表的には異型細胞上に見い出される2つの特定のMN/CA9抗原染色パターンを含み、それらは常に、重大または重篤な病変を有する患者から得られたPapスミアを、子宮頸癌またはその前駆体と関連するものとして診断する。

【0044】

本発明の1つの好ましい態様では、Papスミア細胞は、本明細書では焦点性に円柱状かまたは蜂巢状の構造として記述される、MN/CA9発現のパターンを示す。蜂巢状パターンの実例は、図2(パネル1)、図6(パネルF)、および図7(パネルF)に見出され得る。散在性パターンでの異型細胞およびクラスター上の蜂巢状構造は、腺癌(AIS)または浸潤性腺癌を有する患者から得られるPapスミアの特徴である。

【0045】

本発明のもう1つの好ましい態様では、Papスミア細胞は、密なクラスター中に配置された異型細胞上のMN/CA9発現のパターンを示す(参考のため、図2、パネルB、C、F、G、およびH;図5、パネルEおよびF;図6、パネ

ルE；および図7、パネルEを参照のこと）。密なクラスター中の異型細胞の染色パターンは、散在性または焦点性であり得る（例えば、図2、パネルFおよびGを参照のこと）、通常は、高い悪性度分類のSIL（HSIL）を有する患者からのP a pスミア細胞の特徴である。

【0046】

本発明の更にもう1つの態様では、低い悪性度分類の病変が、より重篤な病変から区別され得る。かかる低い悪性度分類の病変は、もう1つの染色パターンに関連づけられ、そこでは、MN / C A 9抗原は異型細胞上に検出されないが、正常な細胞に限定される。MN / C A 9抗原の存在を正常なE C細胞上のみ検出する染色法は、低い悪性度分類のSIL（LSIL）および異型を含む、より重篤でない低い悪性度分類の病変を有する患者から得られたP a pスミアを診断する。

【0047】

最後に、本発明の好ましい形態は、先に記載されたMN / C A 9発現の任意のパターンの不存在が、一般に良性状態と相関関係する1工程を含む。結果として、正常および異型細胞がいずれもMN / C A 9抗原に関する染色を示さない陰性の染色パターンは、良性状態であると診断する。

【0048】

本発明は、子宮頸癌およびその前駆体に関連した重大で低い悪性度分類の病変の存在を診断するための、改善された方法を提供する。該方法は、重大性未確定の異型腺細胞（AGUS）と先に類別された、P a pスミア標本における不確実性および/または偽陰性の結果の問題を克服する。P a pスミア標本には、容易に確認できる形成異常が存在しなくても、該方法は、子宮頸部における重大な癌性または前癌性の病変から、より重篤でない病変を識別することができる。さらに、MN / C A 9発現の不存在は、良性状態に関する信頼できる指標である。

【0049】

本発明は、特定の好ましいその形態についてかなり詳細に述べてきたが、他の形態が可能である。例えば、本発明のスクリーニング検定法は、自動化され得、それによって多数の標本を同時にスクリーニングするのを促進する。従って、添

付の請求項の精神および範囲は、本明細書に記載された好ましい形態に関する記載に制限されない。

【0050】

(実施例)

SILを有してもいなくても、AGUSであるとの個々の細胞学的診断を有する全部で245個のPapスミアが調べられた。バイオプシー材料に関する対応する組織学的検査は、それぞれの症例で行なわれた。我々は、異型および新形成性子宮頸部組織が診断された全ての症例で、MN/CA9免疫反応性が見られることを発見した。対照的に、AGUSの細胞学的診断を有する正常な子宮頸部のPapスミアは、MN/CA9陰性であった。重要なこととして、AISおよび浸潤性腺癌の全症例において、高レベルのMN/CA9タンパク質発現が見られた。

【0051】

表1は、頸管内異型と診断された症例において、本研究を、幾つかの他の研究室により為されたフォローアップ研究と比較している。集積された結果は、表1に示されるように、AGUS症例の約40%が高い悪性度分類のSIL、上皮内腺癌(AIS)または癌を表し、また相対的に60%が良性または重大でない病変を表わすこと示している。

【0052】

【表1】

表1 ルーチンのPapスミアにおける異型腺性細胞 (AGUS) という細胞学的診断を有する症例のフォローアップ組織学的診断

フォローアップ診断	参照							本研究	平均
	Wilburら	Goffら	Leeら	Boseら	Taylorら	Kennyら			
良性/異型	46*	40	42	20	64	81	19	44	
LSIL	13	24	0	37	17	4	31	18	
HSIL	32	30	44	41	20	5	39	30	
AIS/腺癌	9	13	14	0	0	10	11	8	
重大な病変**	41	43	58	41	20	15	50	38	
全症例数	225	56	74	44	77	30	245		

* パーセントで表されたデータ。

** 重大な病変=HSILおよびAIS/CA

【0053】

材料および方法

組織標本：1994年7月～1998年9月の間に、南部カリフォルニア、オレンジ郡における民間の細胞学研究所によって検査された185,414例のPapスミアから、SILを有する又は有しないAGUS（発生率：0.3%）という細胞学的診断を有する557人の患者からの個々のPapスミアを回収した。フォローアップの組織学的確認は、251例のPapスミアにおいて同定された（フォローアップ率：43%）。これらのうち6例は、頸管内搔爬（n=3）、子宮内膜搔爬のみ（n=2）、および空気乾燥されたスミア（n=1）において不十分な材料であるため除外された。従って、本研究に含められた全Papスミアの総数は245であった。本研究に含まれた患者の年齢の中央値は、39歳（範囲は20～81歳）であった。全てのPapスミアは、サイトブラシおよび木製へらによって収集された。子宮頸部の組織切片の源は、コルポスコピー向けの子宮頸管バイオプシー、頸管内搔爬、子宮頸部円錐切除、または子宮摘出術からであった。

【0054】

細胞学：Papスミアは、6名の細胞技術者によりスクリーニングされ、3名

の協会認定細胞病理学者を含む8名の病理学者によって精査された。TBS類別法が、この研究において用いられ、AGUSという細胞学的診断はさらに、AGUS - 支持反応性(AGUS-favor reactive)、AGUS - 支持新形成性(AGUS-favor neoplastic)、および他には特定されないAGUS (AGUS-not otherwise specified) (AGUS - NOS) に類別される。Papスミアは、診断的ストリンジェンシーについて精査されなかった；従って、この結果は、民間の実施状況における実際の細胞学的スクリーニングと一致している。細胞学的および組織学的データが相互に関連付けられた。MN/CA9の免疫反応性は、盲検様式で判断され、続いて、結果は、組織学データと相互に関連付けられた。当初の組織学的診断とMN/CA9免疫反応性との間に不一致がある場合にのみ、MN/CA9の免疫染色の結果に関する知識を用いて、組織学的切片が精査された。

【0055】

免疫組織化学的研究：MN/CA9タンパク質を検出するために用いられたマウスモノクローナル抗体は、先に記載されている(Pastorekら、1994)。抗体は、ホルマリン固定され、パラフィン包埋された切片、およびデータ集積されたPapスミア中の抗原を認識する(Liaoら、1994；およびLiaoら、1996)。組織切片および脱色されたPapスミアを、抗MN/CA9 Mab (MN75)を用いての免疫組織化学的染色は、先に記載されたペルオキシダーゼ技術を用いて行なわれた(Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures (免疫ペルオキシダーゼ技術におけるアビジン - ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(ABC)の使用：ABCと未標識抗体(PAP)との比較. J. Histochem. Cytochem., 1981. 29 : 577 - 580)。既知の陽性および陰性の組織標本が、各々のランに含められた。手短かにいえば、スミアを1%酸アルコールを用いて脱色し、蒸留水でリンスした。パラフィン包埋された組織の5ミクロン切片を、脱パラフィンした。内在性ペルオキシダーゼは、スライドを、メタノール中の3.0%過酸化水素溶液中にて10分間インキュベートすることによりブロックした。スライドは次いで、好適なブロッキング血清(PBS中の5%の正常ウマ血清)とともにインキュベートし、続いて、腹水由来の精

製された1次抗体MN75(0.1%BSAを含むPBS中の1:10,000希釈物)とともに60分間インキュベートした。次に、2次の、ビオチニル化されたウマの抗マウス免疫グロブリンG抗体(PBS中の1:200希釈物)が30分間にわたり添加され、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体(ABCエリート(Elite))とともに30分間インキュベートした(ベクター・ラボラトリーズ、バーリングゲーム(Burlingame)、カリフォルニア州)。ジアミノベンジジンテトラヒドロクロリドを、クロマゲンとして用いた(シグマ・ケミカル社、セントルイス、ミズーリ州、)。処理の後、切片を蒸留水で洗浄し、ヘマトキシリンで後染色し、パラマウント(Permount)を用いてマウントした。

【0056】

免疫組織化学的分析：染色の特異性は、主として原形質膜上の茶色の反応生成物の存在により定義された。染色の強度は、2スケール・システム；即ち、弱い(+)および強い(++~+++))を用いることにより主観的に定義した。高倍率の拡大においてのみ検出可能な、細胞質のごく弱い染色は、特異性を欠くことから陰性とみなされた(Liaoら、1996)。強く又は弱く染色された全ての細胞および/または細胞クラスターは、高倍率の拡大下に評価された。正常な扁平上皮細胞、頸管内予備細胞、または円柱状細胞から形態学的に逸脱している、細胞クラスター中のいかなるMN/CA9免疫反応性細胞も、異型の細胞クラスターとしてみなされた。これらの異型細胞の核は、一般に、正常の頸管内細胞(EC)よりも3~5倍大きく、増大した核/細胞質比を有する有意な過染色性を示した。各々のスミアにおける陽性の細胞または細胞クラスターの数は、4Xの走査倍率下でカウントされた。散在性のMN/CA9免疫反応性は、50%以上の異型細胞/細胞クラスターか、または各々のスミアにおける100以上の正常の頸管内細胞/細胞クラスターが、強い(++/+++))MN/CA9免疫反応性を示す時として定義される。スミアは、褐色の染色が、任意の異型細胞クラスターにおいて、または2つ以上の正常な頸管内細胞クラスターにおいて同定される場合には陽性として、また褐色の反応が見られないか、または染色が各スミアにおいて2以下の正常な頸管内細胞クラスターに限定される場合には陰性としてスコアされた。

【0057】

(実施例1)

組織学：各症例からの子宮頸部の組織切片を精査し、良性、異型、子宮頸管上皮内新形成(CIN)、またはAIS/癌(AIS/CA)と解釈した。腺性異型/新形成、およびCINの診断に用いられた基準は、CrumおよびKurmanによって定義されたものである(Crum CP, Cibas ES, Lee KR. Criteria for grading squamous intraepithelial lesions (扁平上皮内病変の悪性度分類のための基準). Pathology of Early Cervical Neoplasia (初期の子宮頸管新形成の病理学)、ニューヨーク チャーチヒル リビングストン、1997. 47 - 91 ; およびKurman RJ, Norris HJ, Wilkinson E. Tumors of the cervix, vagina, and vulva (子宮頸部、膣、および外陰部の腫瘍). Atlas of Tumor Pathology (腫瘍病理学図表集) 第3シリーズ、分冊4, Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 37 - 139)。) 代表的な例を、図1に示す。良性のカテゴリーは、炎症を有する又は有しない正常な子宮頸部(パネルA)を含んだ。異型の診断は、異型扁平上皮化生/異型予備細胞増殖、および頸管内腺性異型(パネルBおよびC)を含んだ。CINの診断用に2スケール・システム、即ち、低い悪性度分類(コンジローマ/CIN I)(パネルD)および高い悪性度分類(CIN IIおよびCIN III)(パネルE)を用いた。AISの例を、パネルFに示す。

【0058】

細胞学と組織学の間の相関関係：AGUS P apスミアに関する種々のカテゴリーと、子宮頸管標本の組織学的診断との間の比較分析を、表2に略述する。

【0059】

【表2】

表2 AGUSという細胞学的診断を有する患者のバイオプシー・フォローアップ

組織学的診断	細胞学的診断							
	AGUS 全カテゴリー N=245		AGUS- 支持反応性 N=29		AGUS-NOS N=57		AGUS- 支持新形成性 N=59	
	No.	(%)	SIL 無 n=28	SIL 有 n=1	SIL 無 n=137	SIL 有 n=20	SIL 無 N=51	SIL 有 n=8
良性	34	(14)	13	0	20	0	1	0
異型*	12	(5)	3	0	8	0	1	0
LSIL	78	(31)	9	1	55	2	7	2
HSIL	95	(39)	1	0	49	18	22	5
子宮内膜腺癌	3	(1)	0	0	0	0	3	0
AIS**	25	(10)	2	0	5	0	17	1

* 異型扁平上皮化生、異型予備細胞増殖、または腺性異型。

** 共存性の初期間質性浸潤が3例に見られた。

【0060】

調べた245症例のうち、29例(12%)のPapスミアがAGUS-支持反応性であり、157例(64%)がAGUS-NOSであり、59例(24%)がAGUS-支持新形成性と診断された。SILの共存細胞学的診断は、1例のAGUS-支持反応性、20例のAGUS-NOS、および8例のAGUS-支持新形成性のPapスミアで見いだされた。

【0061】

バイオプシー・フォローアップは、34例(14%)の子宮頸部が明白な異常を有していないことを示した。対応するPapスミアは、AGUS-支持反応性と診断された13標本、AGUS-NOSとしての20、およびAGUS-支持新形成性と診断された1標本であった。

【0062】

子宮頸部標本の12例(5%)が、異型という組織学的診断を受けた。細胞学的診断は、3例のAGUS-支持反応性、8例のAGUS-NOS、および1例のAGUS-支持新形成性であった。

【0063】

組織学的診断の重要な部分は、LSIL(76症例)またはHSIL(95症

例)であった。LSIL診断の場合には、対応する細胞学的診断は：10例のAGUS - 支持反応性、57例のAGUS - NOS、および9例のAGUS - 支持新形成性であった。細胞学的診断に関する同様の幅広い分布が、HSILコホートに見られた。ここでは、1例のAGUS - 支持反応性、67例のAGUS - NOS、および27例のAGUS - 支持新形成性であった。

【0064】

最も重篤な病変カテゴリーである、AIS/CAには、28症例(11%)があり、そのうち3例は子宮内膜腺癌であった。対応する細胞学的診断は；2例のAGUS - 支持反応性、5例のAGUS - NOS、および21例のAGUS - 支持新形成性であった。

【0065】

従って、発明者らの研究は、AGUS Papスミアの50%が、フォローアップ・バイオプシーにおいて重大な病変(HSILおよびAIS/CA)を有することを示した。AGUS - 支持新形成性Papスミアの大半(81%)が、HSILまたはAIS/CAであると組織学的に確認されたけれども、AGUS - NOS Papスミアの46%が、子宮頸部で重大な病変を見られたに過ぎなかった。従って、これらの診断は明らかに、臨床医が直面している苦境を反映している。AGUS - NOSという診断は、AGUSの細胞学的診断カテゴリーの最も容易で最も頻繁に用いられるものでありで、臨床上的結果を予言するのに非常に有用ということではなかった。

【0066】

PapスミアにおけるMN/CA9免疫反応性：正常なPapスミアでは、剥脱性の頸管内細胞/細胞クラスターと、下部子宮部分に由来する子宮内膜細胞とは、首尾一貫してMN/CA9陰性である(データは示さず)。AGUS Papスミアでは、我々は、細胞学的形態学/免疫反応性の組合せに関する比較的複雑なパターンを見出した。これらは図2に例示されており、この研究における解釈を成功させる骨組みとして役立つ。TBS類別において記述された、異型腺細胞に関する細胞学的基準を、この解釈において用いた(国立癌研究所ワークショップ。The revised Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytology)。

ologic diagnosis : report of the 1991 Bethesda Workshop (子宮頸部 / 膾細胞学的診断報告のための改訂されたベセスダシステム : 1991年ベセスダワークショップの報告) . JAMA, 1992. 267 : 1892 ; および Kurman ら、1994)) 。 パネル A は、何ら MN / CA9 免疫反応性を示さない AGUS P a p スミアを示す。陽性の免疫染色が見られるスミアでは、2つの広いカテゴリーがある : 正常な EC を有するか又は有しない異型細胞が陽性である場合のもの、および正常な EC のみが染色される場合のもの (パネル B ~ D) 。 陽性の免疫染色を示すスミアでは、染色の強度の変異に遭遇する。パネル B は、強い陽性 (矢印) である異型細胞のクラスターと、弱い陽性 (矢頭) である正常な EC のクラスターを例示している。免疫染色のパターンも変化し得る。パネル F は、焦点性の染色の例を示しており、パネル G は、散在性の免疫反応性の例を示している。異型細胞が染色されたこれらの P a p スミアには、形態学的変異がある。染色された異型細胞の幾つかは、密なクラスター内に配置されており (パネル H) 、そこでは、他のスミア中に焦点性の円柱状または蜂巣状の構造が観察された (パネル I) 。

【 0 0 6 7 】

MN / CA9 免疫染色と組織学的診断との相関関係 : 先に述べた免疫染色パターンの分布と、それらの組織学的診断との相関関係を図 3 に例示する。異型から AIS / CA に及ぶ組織学的診断を有する全ての標本が、MN / CA9 発現に関して陽性であることは一目瞭然である。反対に、良性の子宮頸部に関する全ての症例は、MN / CA9 陰性 P a p スミアを有した。

【 0 0 6 8 】

組織学的に診断された形成異常の程度と、対応する P a p スミアにおける MN / CA9 陽性細胞の形態学との間には、興味深い相関関係があった。AIS / CA または HSIL という組織学的診断を有する標本は、全ての症例において、対応する P a p スミア中の異型細胞 ± 正常 EC の免疫染色を示した。さらに、AIS / CA の症例では、免疫反応性の異型細胞は常に、散在性の染色パターンを有する焦点性の円柱状または蜂巣状の特徴を示した。反対に、HSIL の場合には、MN / CA9 陽性異型細胞は、通常、密なクラスター内に配置されており (参考のため、図 2、パネル B、C、H、および I を参照のこと) 、症例の一部の

み(28%)が散在的な免疫染色パターンを示した。LSILという診断の症例では、14/76が同様のパターンを示したのに対し、残りは正常なECのみの染色を示した(参考のため、図2、パネルDを参照のこと)。異型の組織学的診断を有する症例の数は小さいが(n=12)、それらの全ては正常なECのみの免疫染色を示した。最後に、良性症例の全てが、MN/CA9陰性であった。

【0069】

これらのデータから直ちに明らかであるのは、異型細胞がMN/CA9を示す非常に多数の症例では、重大な病変(HSILおよびAIS/CA)の存在が示されることである。低い悪性度分類の病変に関しては、画像はより不鮮明である。LSIL症例の一部(14/76)が実際に異型細胞の免疫染色を示しているのに対し、残りは抗原を発現する正常なECのみである。この後者の特徴も、異型の全ての症例(n=12)で見られる。従って、これらの基準から、これら後者の2つのカテゴリーの組織学的診断を、MN/CA9免疫反応性に基づいて、自信を持って識別することは不可能である。

【0070】

統計学的分析：免疫陽性スミアを、真の診断的分析に供した(Dunn G. Everitt B. Clinical problems and statistical solutions (臨床上の問題および統計学的解明). Clinical Biostatistics (臨床生物統計学)、ニューヨークホルステッド・プレス 1995 ; 1 - 32)。この分析では、免疫染色された異型細胞と、対応するバイオプシーにおける重大な病変との相関関係は、陽性予測値を有すると考えられる。同様に、免疫染色された正常ECのみと、重大な病変との相関関係は、陰性予測値を有すると考えられる。その分析を、表3に示す。明らかに、感度、特異性、および陽性の予測値が優れている。

【0071】

【表3】

表3 免疫陽性スミアの真の診断的分析

試験結果	真の診断	
	HSIL/AIS/CA	LSIL/異型
異型細胞 陽性	123	14
正常細胞のみ 陽性	0	74

感度	= 123 / 123	= 1.00 (100%)
特異性	= 74 / 88	= 0.84 (84%)
陽性予測値	= 123 / 137	= 0.90 (90%)
陰性予測値	= 74 / 74	= 1.00 (100%)

【0072】

(実施例2)

AGUS診断のカテゴリーとそれらの免疫染色パターン：上記のデータから、AGUSの一般的な診断を受けている関連するPapスミア中の異型細胞のMN/CA9免疫染色に基づいて、高い悪性度分類の病変が予測されることは明らかである。図4は、AGUS診断（即ち、AGUS-支持反応性、AGUS-NO S、およびAGUS-支持新形成性）が、各々のMN/CA9免疫染色パターンと比較された場合に、どれほど予言的であったかを示している。

【0073】

AGUS-支持反応性：全部で29症例が、このカテゴリーに診断された。細胞学的診断と一致して、フォローアップ・バイオプシーは、45% (n=13) が良性であった。これらの全ては、MN/CA9陰性であった。異型のうち3例と、LSILの10例は診断された。これらの全ては、正常なECのみの免疫染色を示した。また、1例のHSILおよび2例のAISがあった。全てはMN/CA9陽性であり、異型細胞の染色をともなっていた。重要なこととして、重大な病変が見られた少数の症例が、異型細胞のMN/CA9免疫染色によって予測された。

【0074】

Pap染色および免疫染色の例を、図5に示す。パネルA、B、およびCの異

型細胞クラスターの全ては、最少の細胞の重なり、および中程度の過染色性ととも、核の多型性を示す。パネルBでは、異型細胞は繊毛のある化生細胞（矢印）に結合している。しかしながら、繊毛のある細胞クラスターを含め（パネルEおよびF）、細胞のMN/CA9免疫染色があった場合、高い悪性度分類の病変（HSIL）が子宮頸部に見い出された。反対に、免疫染色が見られなかった場合には、形成異常の組織は全く同定されなかった（パネルD）。

【0075】

AGUS - NOS（他には特定されない）：これは、AGUS診断の最大のカテゴリーであった（ $n = 157$ ）。組織学的診断は、明らかに、この領域に伴う臨床上的の問題を示している。完全な範囲の良性、低い悪性度分類および高い悪性度分類の病変が、各々のカテゴリーに有意な数を有するて見い出された（表2）。再度、全ての高い悪性度分類の病変は、Papスミアにおける異型細胞のMN/CA9免疫染色を示した。LSILの症例では、僅かに14/76がこのパターンを示したにすぎない：異型に関する組織学的診断の症例において見られたように、正常なECの免疫染色のみが残りの部分において見られた。従って、重大な病変（HSILおよびAIS）が存在する症例では、MN/CA9の陽性に基づき容易に診断された。重要なこととして、それらは、このAGUS - NOSのカテゴリーで全体の46%を表していた。

【0076】

Pap染色および免疫染色の例を、図6に示す。パネルA、B、およびCにおける全ての異型細胞は、細胞の重なり、中程度の核多型性、およびわずかに増大した核/細胞質比を示している。再び、HSIL（パネルE）およびAIS（パネルF）は、異型細胞が陽性に染色された症例においてのみ組織学的に同定された。MN/CA9免疫染色性が全く検出されなかった症例では、形成異常病変は観察されなかった（パネルD）。

【0077】

AGUS - 支持新形成性：このカテゴリーにおける組織学的診断の殆どは、重大な病変（HSIL、AIS/CA）の存在を確証した。表2において例証されたように、27例の（46%）のHSIL、および21例の（36%）のAIS

/CAがあった。全てが、異型細胞のMN/CA9免疫染色性を示した。LSILおよび異型と診断された症例(各々n=9およびn=1)は、正常なECのみ陽性の染色を示した。今一度、MN/CA9免疫染色パターンは、重大な病変を正確に予言した。

【0078】

Pap染色と免疫染色の例を、図7に示す。パネルA、B、およびCにおける全ての異型細胞クラスターが、細胞の重なり、著しい核多型性、過染色性、および増大した核/細胞質比を示している。HSILおよびAISは、Papスミアのものに対応する子宮頸部において観察され、そこでは、MN/CA9免疫染色は、異型細胞クラスターにおいて見られた(パネルEおよびF)。良性の組織学は、MN/CA9陰性のPapスミアにおいて見られた(パネルD)。

【0079】

考察

本発明で、我々は、異型細胞のMN/CA9免疫染色性±AGUS Papスミアにおける正常なECと、HSILかまたはAIS/CAであるかにかかわらず、子宮頸部における重大な病変の存在との間の明確な関連について明らかにした(図3)。同様に、我々は、MN/CA9免疫染色性の欠如と、子宮頸部に病変がないこととの間の明確な関係を明らかにした。しかしながら、MN/CA9免疫染色パターンは、LSILと異型との間を識別しない。異型の全ての症例およびLSILの82%(n=62)の症例で、正常なECのみの免疫染色が観察された。LSILの残りの症例は、異型±正常なECの染色性を示した。LSILの症例のこの少なさ(n=14)は、偽陽性の小さなパーセントを表わす(異型細胞の染色が、子宮頸部における重大な病変の存在を診断するものであるという意味で)か、またはこれらの病変はHSILへ進行しているであろうということの予後的な指標であるかもしれない。さらに、AIS症例に見られる免疫染色パターンは、常に散在性で、かつ染色された細胞クラスターは円柱状または蜂巢状の構造を示す。このことは、細胞が密なクラスター内に配置され、それらがほとんどの症例において焦点性の免疫染色パターンを示すHSILの症例と対照的である。従って、染色された細胞クラスターの形態における差と、それらの免疫

染色パターンに基づき、AGUS Papスミア診断でAISおよびHSILの間の識別が可能である。このことは、明確かつ重要な臨床的含意を有する。

細胞学的診断を補佐するものとしての本発明の診断法の価値は、AGUSスミアが3つのサブカテゴリー、AGUS - 支持反応性、AGUS - NOS、およびAGUS - 支持新形成性(図4)に分類される場合に特に明らかである。予期されたように、AGUS - 支持新形成性という診断の殆どは、重大な病変の存在と相関していた。これらの全ても、異型細胞のMN/CA9免疫染色を示した。LSILおよび異型の症例(全部でn=12)は、正常なECのみの陽性染色を示した。AGUS - NOSのカテゴリーは、フォローアップ・バイオプシーで最も範囲の広い病変を示した。再び、異型細胞のMN/CA9免疫染色性は、重大な病変が見つけれられた症例の全てを予言した。少数(n=14)の「偽陽性」が、ここで見つけられており、それらは、異型細胞がMN/CA9陽性であるLSILの症例である。この「偽陽性」染色パターンは、AGUS - NOSカテゴリーでのみ見つかっていることは興味深く、先に考察したように、進行するべく運命づけられている病変を予後判定し得る。AGUS - 支持反応性のカテゴリーでは、相対的に少ない(n=3)ものが、重大な病変を有していた。全てが、MN/CA9免疫染色パターンにより正確に診断され、偽陽性は認められなかった。

【0080】

これらのデータは、本発明に関連しては、異型細胞におけるMN/CA9抗原の発現が、AGUS診断で使用される優れたバイオマーカーであること、およびどのAGUS診断が重大な病変を生じ易いか決定するのを補佐するものとしての大きな利点を有して、臨床医に使用され得ることを明示する。このことは、AGUS診断の約40%のみが重大な病変に対応して関連づけられることが示されたので、明確な費用 - 効果の可能性を有する(表1を参照)。

【0081】

本発明は、特定の好ましい形態に関してかなり詳細に記載してきたが、他の形態も可能である。従って、添付の請求項の精神および範囲は、本明細書中に記載された好ましい形態の記述に制限されるべきではない。

【図面の簡単な説明】

本発明のこれら及び他の特徴、側面、および利益は、以下の記述、添付の請求項、および添付の図面を参照して更に理解される。

【図1】

異型、前新形成、および新形成性病変を診断するための基準を例示するための、扁平上皮および腺性の変化のスペクトルを示している：パネルAは、正常な子宮頸部であり、整然とした扁平上皮および腺性上皮を示しており、パネルBは、異型扁平上皮の化生（左）および予備細胞の増殖（右）の例であり、パネルCは、上皮の層状構造を有する腺性異型の例であり、パネルDおよびEは、各々LSILおよびHSILを例示しており、パネルFは、AISの例である（倍率：A 100x、B~F 200x）。

【図2】

AGUS PapスミアにおけるMN/CA9免疫反応性に関する染色パターンを示す。パネルAは、何ら免疫染色性を示さないスミアであり；パネルBは、異型細胞（矢印）および正常EC（矢頭）の両方における陽性の免疫染色を示しており、パネルCは、MN/CA9陽性の異型細胞のみを示しており、パネルDは、正常なECのみの免疫反応性の例であり、パネルEには対応するPap染色とともに、さらに免疫反応性のパターンは焦点性（パネルF）または散在性（パネルG）であり得、免疫染色された細胞の形態は密なクラスター（パネルH）または蜂巢状構造（パネルI）であり得る。（倍率：A、F、およびG 100x；HおよびI 200x；B、C、D、およびE、400x）

【図3】

AGUS PapスミアのMN/CA9免疫染色の分布と、それらの組織学的診断との相関関係を示す。

【図4】

AGUS PapスミアのMN/CA9免疫染色の分布を、3つのカテゴリー：支持反応性、他には特定されない（NOS）、および新形成性支持で示し、またそれらの組織学的診断との相関関係を示す。

【図5】

拡大された核のサイズ、最少化された細胞の重なり、および中程度の核の多型

(パネルA、B、およびC)などの、AGUS-支持反応性Papスミアにおける異型細胞クラスターの細胞学的特徴を示し、MN/CA9発現を検出するために脱染色され免疫染色された同一の細胞クラスターが、いかなる免疫反応性も組織学的病変に結びつけられない例(パネルD)や、強い(パネルE)および弱い(パネルF)免疫反応性がHSILの組織学的診断と結びつけられる例を提供する:パネルEにおいて差し示された繊毛のある細胞がMN/CA9陰性であることに注意(倍率:400x)。

【図6】

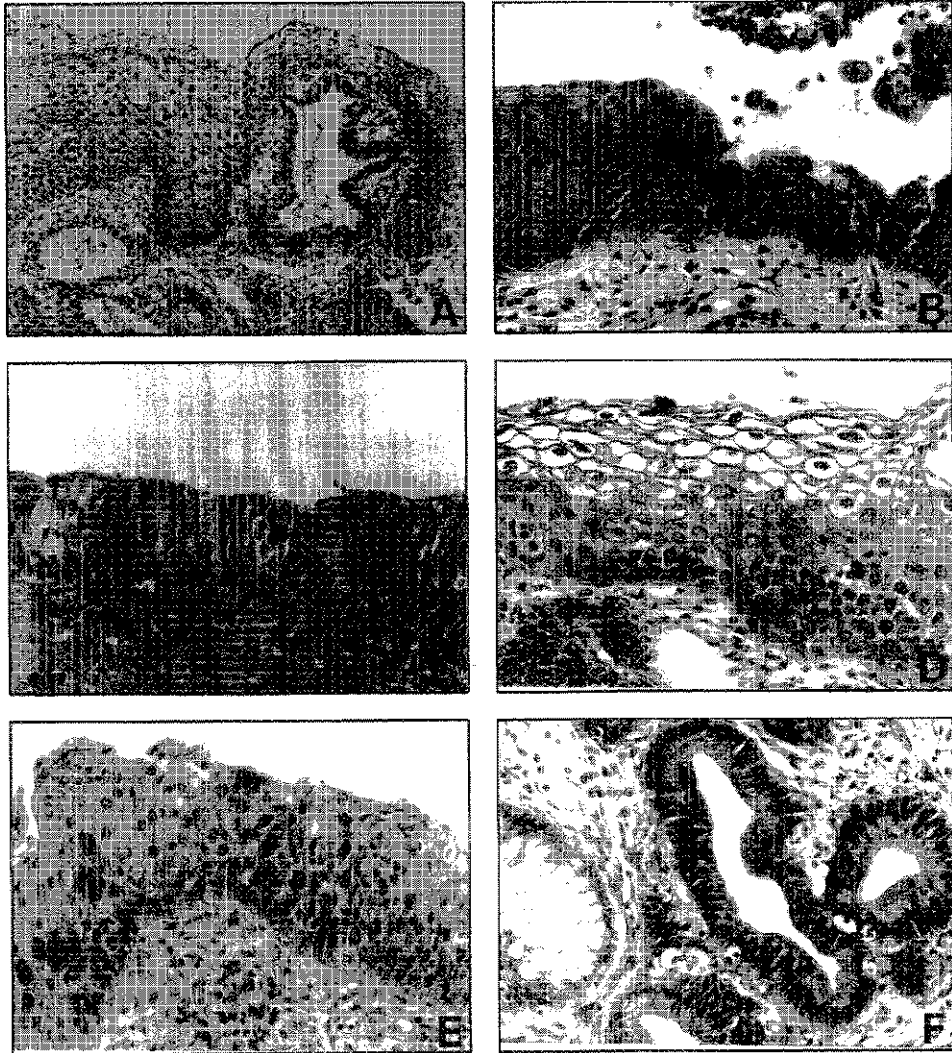
隣接する中間の細胞(矢印)の核より3倍大きい核、および増大された細胞の重なりと核の過染色性といった、AGUS-Papスミアにおける異型細胞クラスターの細胞学的特徴(パネルA、B、およびC)を示すが、同一の標本に関する対応するMN/CA9免疫染色は、フォローアップ・バイオプシーで陰性であったものに対応するパネルDでは陰性の免疫染色を、HSILという組織学的診断に相当するパネルEでは陽性の免疫染色を、またフォローアップ・バイオプシーで腺癌と診断されたものに相当するパネルFでは特徴的な蜂巢状パターンの免疫染色を示す(倍率:400x)。

【図7】

AGUS-支持新形成性Papスミアにおける異型細胞クラスターに関する、有意な細胞の重なり、核の多型および過染色性といった、細胞学的特徴を示し(パネルA、B、およびC)、対応するMN/CA9免疫染色は、良性であるフォローアップ・バイオプシーに対応する陰性の免疫染色の例(パネルD)、HSILという組織学的診断に対応する陽性の免疫染色の例(パネルE)、および染色された細胞であって、蜂巢状および円柱状の特徴を示し(パネルF)、AISと診断されたフォローアップ・バイオプシーに対応する細胞を示す(倍率:400x)。

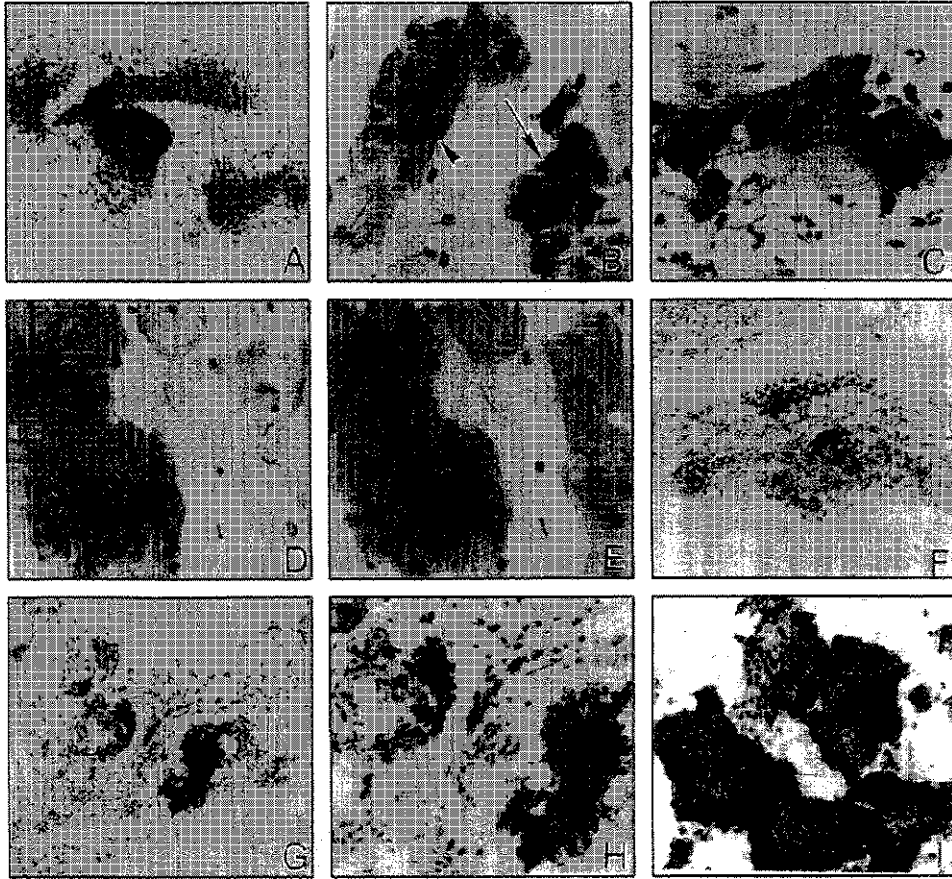
【図1】

FIG. 1

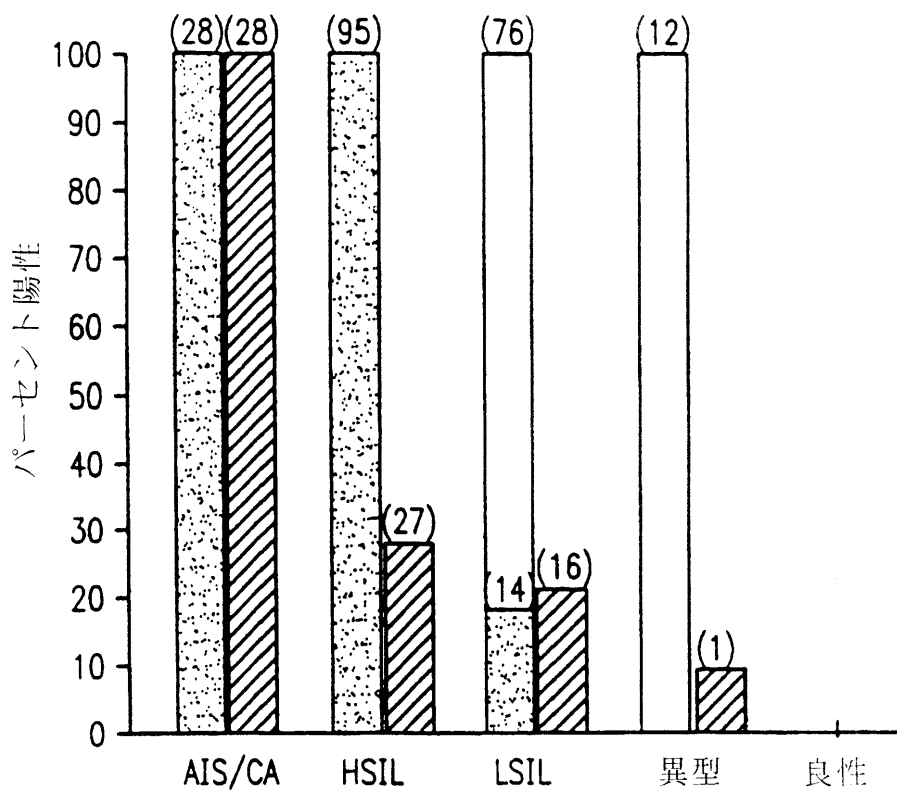


【図2】

FIG. 2



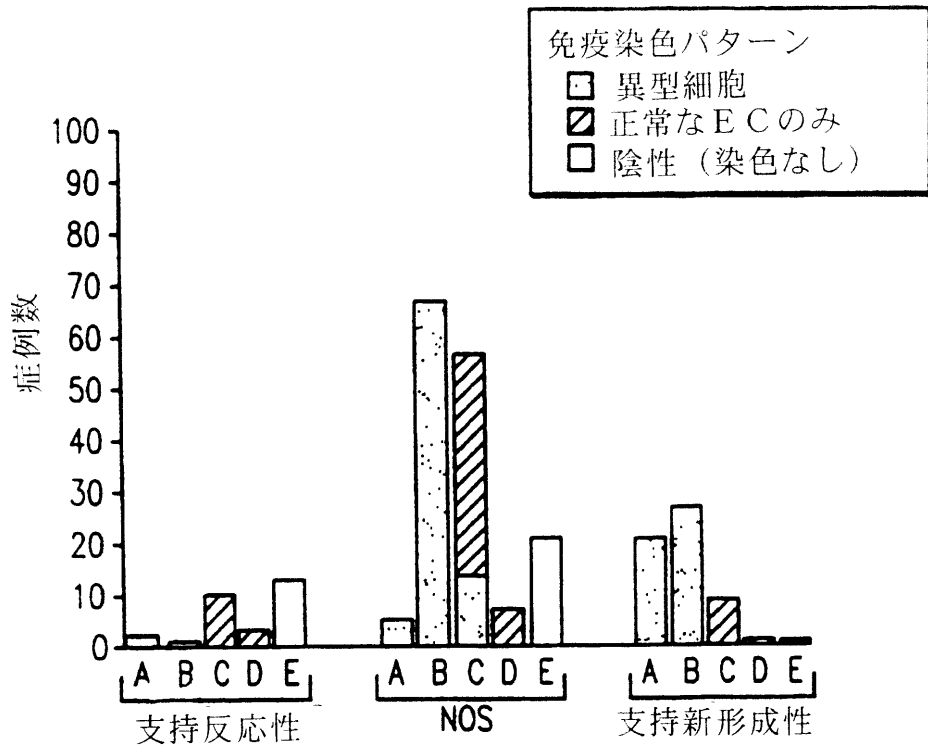
【図3】



免疫染色パターン

- 異型細胞
- 正常なECのみ
- 散在性染色パターン

【図4】



組織学的診断

A:AIS/CA

B:HSIL

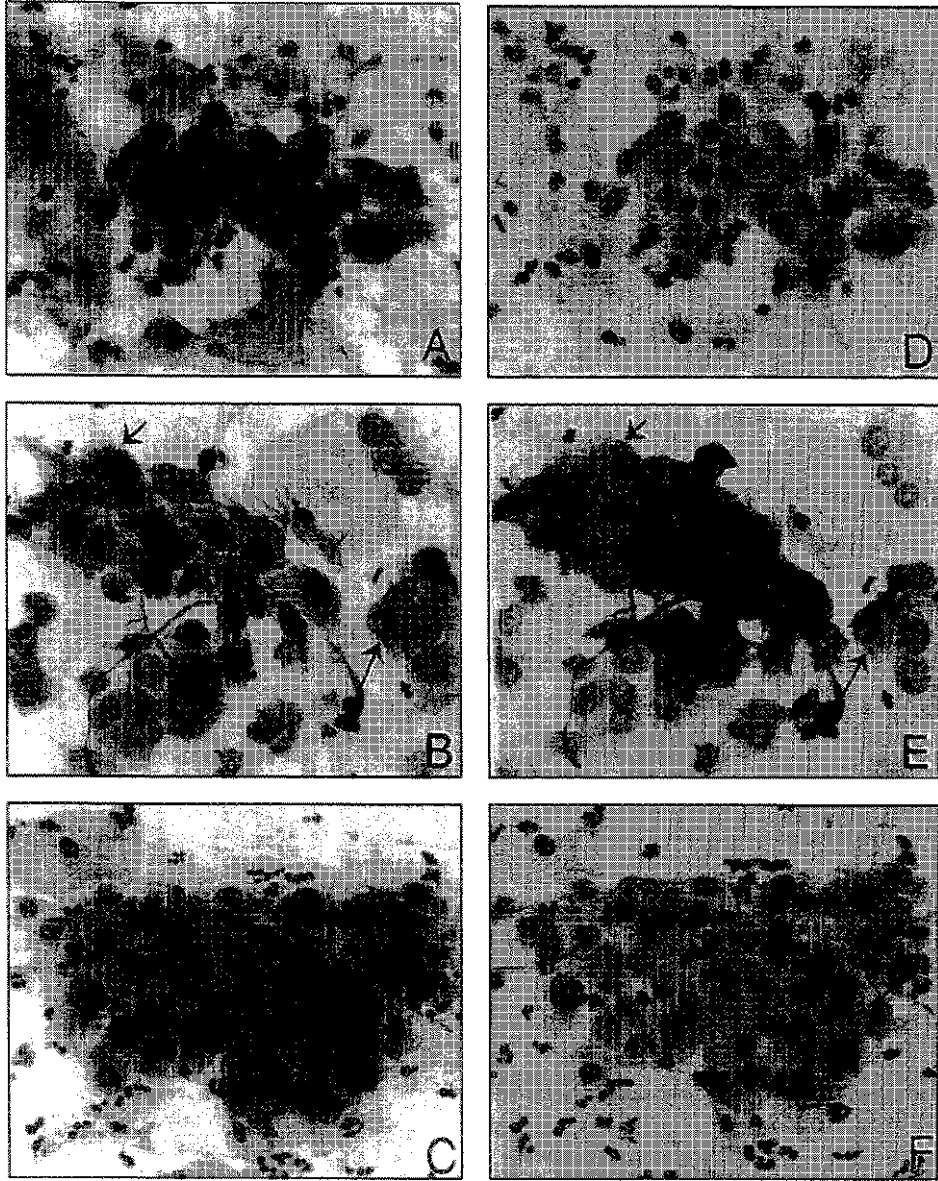
C:LSIL

D:異型

E:良性

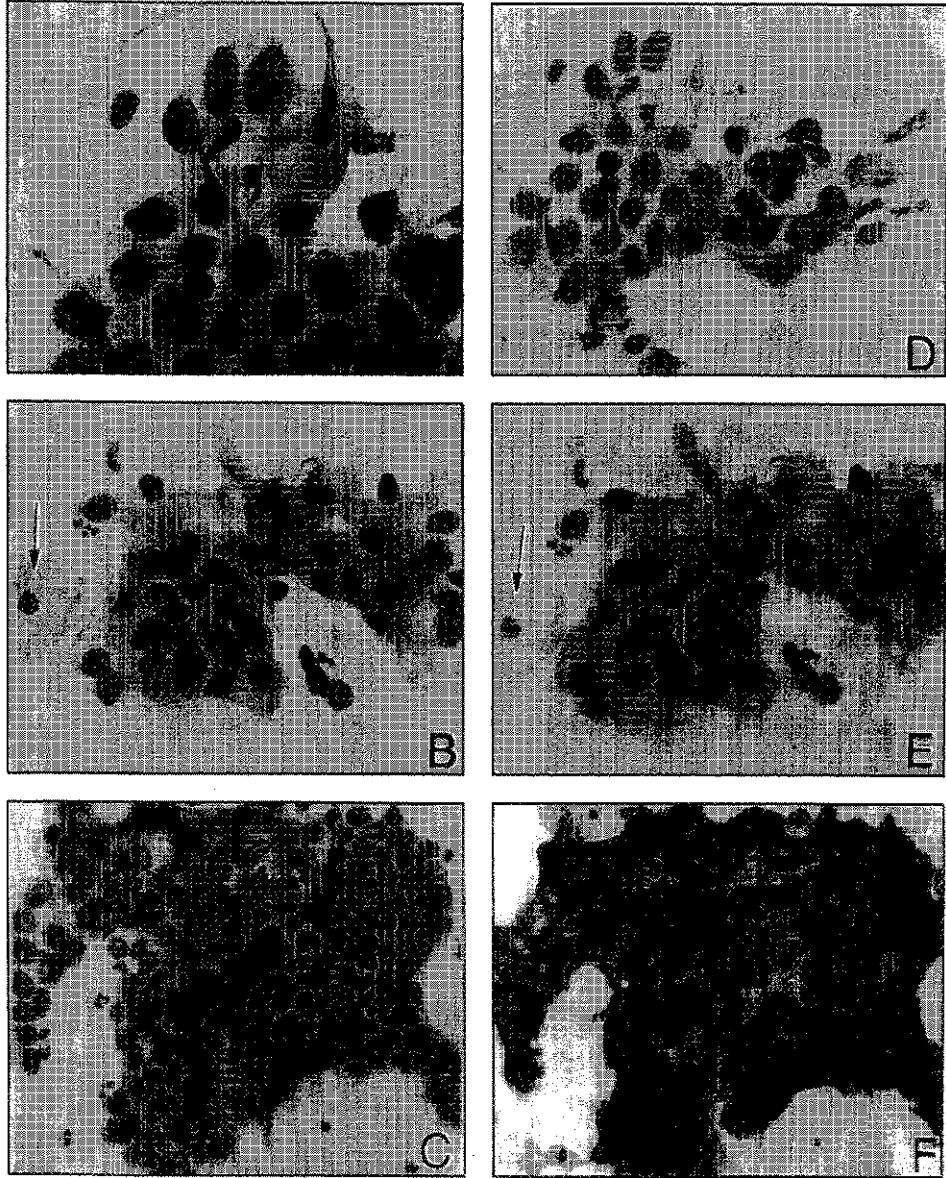
【図5】

FIG. 5



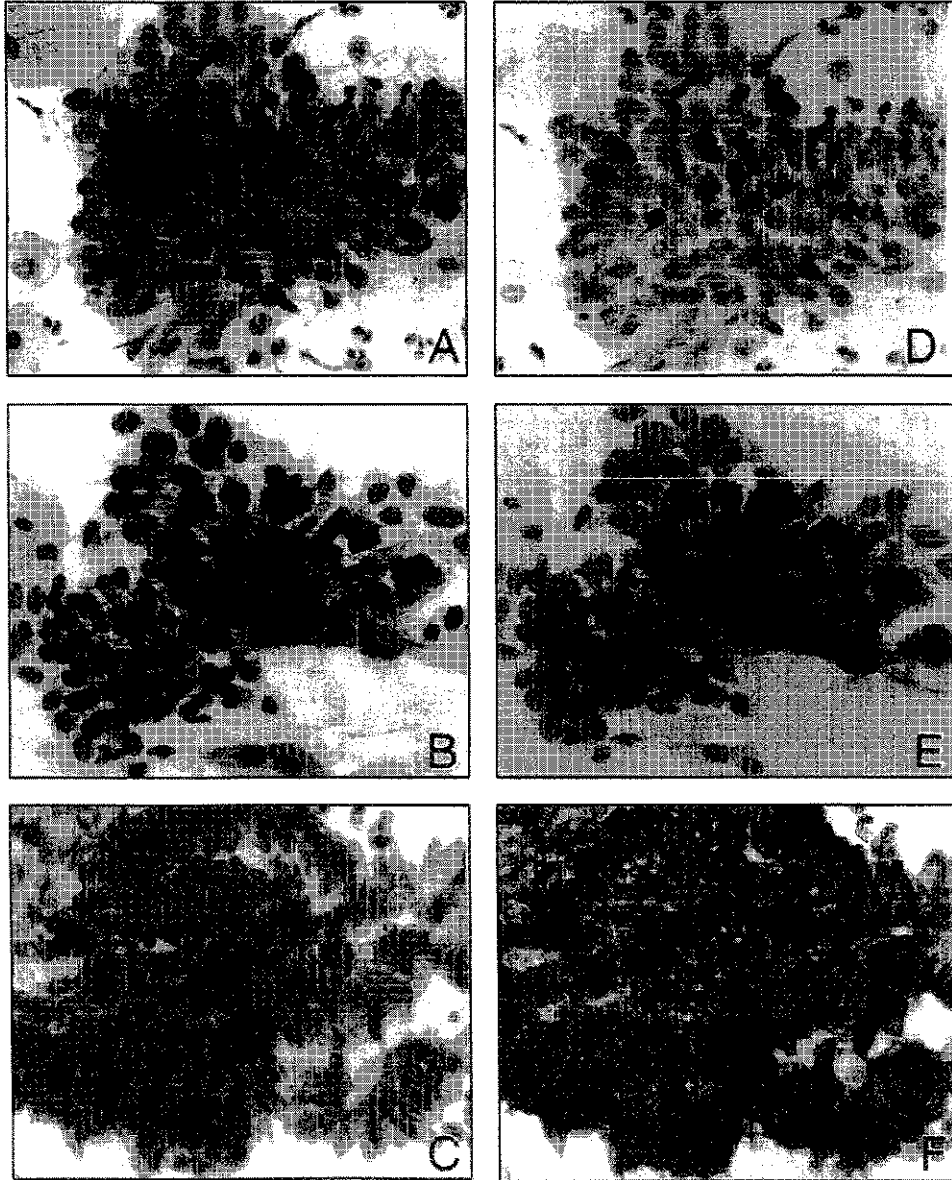
【図6】

FIG. 6



【図7】

FIG. 7



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/21017
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C07K 16/00, C12P 21/08; C07H 21/04 US CL : 530/387.1, 387.7; 536/24.2 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; 536/24.2 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) EAST, STN		
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., "Expression of the MN Antigen in Cervical Papanicolaou Smears Is an Early Diagnostic Biomarker of Cervical Dysplasia., Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention," July 1996, Volume 5, pages 549-557, especially page 549.	1-12
X	LIAO et al., "Identification of the MN Antigen as a Diagnostic Biomarker of Cervical Intraepithelial Squamous and Glandular Neoplasia and Cervical Carcinomasm," American Journal of Pathology, September 1994, Vol 145, No. 3, pages 598-609, especially page 598	1-12
<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: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *B* earlier document published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 AUGUST 2000		Date of mailing of the international search report 21 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
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, 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 BA36 CA12 HA14 4B063 QA19 QQ02 QQ53 QR55 QR62 QS34		

专利名称(译)	在AGUS·Pap涂片中使用时MN / CA9蛋白表达的诊断方法		
公开(公告)号	JP2003526777A	公开(公告)日	2003-09-09
申请号	JP2001515716	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/BA36 4B024/CA12 4B024/HA14 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS34		
优先权	60/147556 1999-08-05 US 09/461938 1999-12-15 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

观察在非典型或正常细胞上表达的MN / CA9抗原的分布，以及 (a) 在非典型细胞上观察到MN / CA9抗原时有明显的病变， (b) MN / CA9。当抗原在非典型细胞中不存在但存在于正常宫颈细胞中时，低度病变被分类为 (c) 非典型细胞和异常宫颈细胞中的MN / CA9抗原。通过将两者均不存在的诊断为良性，从而确定经AGUS诊断的Pap涂片细胞是否存在癌性或癌前宫颈病变。

試験結果	真の診断	
	HSIL/AIS/CA	LSIL/異型
異型細胞 陽性	123	14
正常細胞のみ 陽性	0	74

感度 = 123 / 123 = 1.00 (100%)
 特異性 = 74 / 88 = 0.84 (84%)
 陽性予測値 = 123 / 137 = 0.90 (90%)
 陰性予測値 = 74 / 74 = 1.00 (100%)