(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3821779号
(P3821779)
(45)発行日　平成18年9月13日(2006.9.13)　(24)登録日　平成18年6月30日(2006.6.30)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/53 (2006.01)　G01N 33/53 D

請求項の数 11　(全 15 頁)

(21)出願番号	特願2002-559686(P2002-559686)
(86)(22)出願日	平成14年1月23日(2002.1.23)
(65)公表番号	特表2005-504262(P2005-504262A)
(43)公表日	平成17年2月10日(2005.2.10)
(86)国際出願番号	PCT/US2002/002225
(87)国際公開番号	WO2002/059620
(87)国際公開日	平成14年8月1日(2002.8.1)
審査請求日	平成16年10月18日(2004.10.18)
(31)優先権主張番号	60/264,643
(32)優先日	平成13年1月26日(2001.1.26)
(33)優先権主張国	米国(US)

(73)特許権者　503265186
アメリカ合衆国
アメリカ合衆国、メリーランド州　２０８５２－３８０４、ロックヴィル、スウィート　３２５、エグゼキュティヴ　ブルヴァード　６０１１
(74)代理人　100080791
弁理士　高島　一
(72)発明者　ビアンコ、キャテリーナ
アメリカ合衆国、メリーランド州　２０８１４、ベセスダ、シンノット　ドライヴ　１００２６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＲＩＰＴＯ－１の検出及び定量

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の検出方法であって、

ａ）ｉ）　Ｃｒｉｐｔｏ－１を含有すると疑われる体液サンプル、

ｉｉ）Ｃｒｉｐｔｏ－１に対する抗体

を用意すること；

ｂ）Ｃｒｉｐｔｏ－１と抗体が結合し、抗原－抗体複合体を形成するような条件下で、体液サンプルを抗体に曝すこと；及び

ｃ）抗原－抗体複合体を検出すること；

を含む方法。

【請求項２】

体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１を定量する工程を更に含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の定量方法であって、

ａ）ｉ）　Ｃｒｉｐｔｏ－１を含有する体液サンプル、

ｉｉ）Ｃｒｉｐｔｏ－１に対する抗体

を用意すること；

ｂ）Ｃｒｉｐｔｏ－１と抗体が結合し、抗原－抗体複合体を形成するような条件下で、体液サンプルを抗体に曝すこと；及び

ｃ）抗原－抗体複合体の量を測定すること；
を含む方法。
【請求項４】
体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量の方法であって、
ａ）ｉ）　Ｃｒｉｐｔｏ－１を含有すると疑われる体液サンプル、
　　ｉｉ）Ｃｒｉｐｔｏ－１に対する抗体
を用意すること；
ｂ）Ｃｒｉｐｔｏ－１と抗体が結合し、抗原－抗体複合体を形成するような条件下で、体液サンプルを抗体に曝すこと；
ｃ）抗原－抗体複合体を検出すること；及び
ｄ）抗原－抗体複合体の量を測定すること；
を含む方法。
【請求項５】
体液サンプルが、乳である、請求項１から４の何れかに記載の方法。
【請求項６】
体液サンプルが、血清である、請求項１から４の何れかに記載の方法。
【請求項７】
体液サンプルが、血漿である、請求項１から４の何れかに記載の方法。
【請求項８】
体液サンプルがヒト由来である、請求項１から４の何れかに記載の方法。
【請求項９】
抗体が、モノクローナル抗体である、請求項１から８の何れかに記載の方法。
【請求項１０】
抗体が、ポリクローナル抗体である、請求項１から８の何れかに記載の方法。
【請求項１１】
酵素結合免疫吸着アッセイの使用を含む、請求項１から１０の何れかに記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
（発明の分野）
本発明は、Ｃｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、乳、血漿、血清、及び他の生物的液体などのサンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。
【０００２】
（発明の背景）
ヒトＣｒｉｐｔｏ－１（ＣＲ－１）は、構造的に関連した蛋白質の大きなファミリー、即ち、マウスＣＲ－１，マウスｃｒｙｐｔｉｃ，Ｘｅｎｏｐｕｓ　ＦＲＬ－１，及びｚｅｂｒａｆｉｓｈ　ｏｎｅ－ｅｙｅｄ　ｐｉｎｈｅａｄ（ｏｅｐ）を含むＥＧＦ－ＣＦＣファミリーの一員である（Ｃｉｃｃｏｄｉｃｏｌａら，ＥＭＢＯ Ｊ．，８：１９８７－１９９１［１０９０］；Ｄｏｎｏら，Ｄｅｖｅｌｏｐ．，１１８：１１５７－１１６８［１９９３］；Ｓｈｅｎら，Ｄｅｖｅｌｏｐ．，１２４：４２９－４４２［１９９７］；Ｋｉｎｏｓｈｉｔａら，Ｃｅｌｌ ８３：６２１－６３０［１９９５］；及び、Ｚｈａｎｇら，Ｃｅｌｌ ９２：２４１－２５１［１９９７］）。これらの蛋白質は、改変ＥＧＦ様ドメインの存在、及びＣＦＣドメインと呼ばれる第２のシステインリッチ領域に特徴づけられる（Ｓａｌｏｍｏｎら，ＢｉｏＥｓｓａｙｓ ２１：６１－７０［１９９９］）。それらはまた、通常のシグナル配列、及びグリコシルホスファチジルイノシトール（ＧＰＩ）部分による膜固定に必須の疎水性Ｃ末端を共有する（Ｍｉｎｃｈｉｏｔｔｉら，Ｍｅｃｈ．Ｄｅｖｅｌｏｐ．，９０：１３３－１４２［２０００］）。ヒトＣＲ－１遺伝子とマウスＣＲ－１遺伝子は、それぞれ分子量が２８ｋＤａと２４ｋＤａである、それぞれ１８８個と１７１個のアミノ酸の糖蛋白質をコードする（Ｂｒａｎｄｔら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６

９：１７３２０－１７３２８［１９９４］）。ＥＧＦ－ＣＦＣ蛋白質は、嚢胚形成期に中胚葉形成と細胞移動を促進することによって、脊椎動物初期胚形成期に必須の役割を果たす（Ｚｈａｎｇら，上記；Ｇｒｉｔｓｍａｎら，Ｃｅｌｌ ９７：１２１－１３２［１９９９］；及び、Ｄｉｎｇら，Ｎａｔｕｒｅ ３９５：７０２－７０７［１９９８］）。ＣＲ－１のｍＲＮＡと免疫反応性蛋白質は、数種のヒト乳癌細胞株で、ヒトの原発性乳癌の約８０％で、及び、ｃ－ｎｅｕ，形質転換成長因子α（ＴＧＦα），ｉｎｔ－３，ポリオーマミドルＴ遺伝子、及びＳＶ－４０ラージＴ遺伝子などの、乳腺で異なる導入遺伝子を過剰発現するマウスで起こる乳腫瘍で発現する（Ｋｅｎｎｅｙら，Ｍｏｌ．Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎ．，１５：４４－５６［１９９６］；Ｑｉら，Ｂｒｉｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６９：９０３－９１０［１９９４］；及び、Ｄｕｂｌｉｎら，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，７：６１７－６２２［１９９５］）。ＣＲ－１はまた、処女、妊娠、乳分泌、及び老齢の乳腺で異なる発現レベルで、発育中のマウス乳腺でも検出できる（Ｋｅｎｎｅｙら，Ｍｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｄｅｖｅｌｏｐ．，４１：２７７－２８６［１９９５］）。処女乳腺では、増殖中の終末芽のｃａｐ幹細胞で主に見出され、ＣＲ－１発現は、妊娠、乳分泌の間、及び老齢の乳腺において、腺管上皮細胞で数倍増加する（Ｋｅｎｎｅｙら，Ｍｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｄｅｖｅｌｏｐ．，４１：２７７－２８６［１９９５］；及び、Ｈｅｒｒｉｎｇｔｏｎら，Ｊ．Ｃｅｌｌ．Ｐｈｙｓｉｏｌ．，１３１：２１５－２２６［１９９７］）。更に、ＣＲ－１は、マウス乳腺上皮細胞株（ＨＣ－１１）と１次マウス乳腺移植片培養物で、乳蛋白質の発現を調節できる（Ｄｅ Ｓａｎｔｉｓら，Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ．，８：１２５７－１２６６［１９９７］）。しかし、乳腺でのＣＲ－１の同定にも係らず、乳房の健康及び疾患でのその役割は、殆ど不明のままであった。従って、種々の生物的液体中のＣｒｉｐｔｏ－１の簡単な検出及び定量を提供する方法の必要性が当該分野で依然存在する。

【０００３】

（発明の要旨）

本発明は、体液Ｃｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、乳（例えば、ヒト乳）、及び他の生物的液体などの体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。

本発明は、Ｃｒｉｐｔｏ－１の検出方法であって、Ｃｒｉｐｔｏ－１を含有すると疑われる体液サンプル及びＣｒｉｐｔｏ－１に対する抗体を用意すること；Ｃｒｉｐｔｏ－１と抗体が結合し、抗原－抗体複合体を形成するような条件下で、体液サンプルを抗体に曝すこと；及び抗原－抗体複合体を検出すること；を含む方法を提供する。一部の好適な実施態様では、体液サンプルは、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される。更に特に好適な実施態様では、体液サンプルはヒト由来である。更なる実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される。別の好適な実施態様では、該方法は酵素結合免疫吸着アッセイ法である。なお更なる実施態様では、該方法は、体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１量を定量する工程を更に含む。

【０００４】

本発明はまた、体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の定量方法であって、Ｃｒｉｐｔｏ－１を含有する体液サンプル、及びＣｒｉｐｔｏ－１に対する抗体を用意すること；Ｃｒｉｐｔｏ－１と抗体が結合し、抗原－抗体複合体を形成するような条件下で、体液サンプルを抗体に曝すこと；並びに抗原－抗体複合体の量を測定すること；を含む方法を提供する。一部の好適な実施態様では、体液サンプルは、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される。一部の特に好適な実施態様では、体液サンプルはヒト由来である。更なる実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される。別の好適な実施態様では、該方法は酵素結合免疫吸着アッセイ法である。なお更なる実施態様では、該方法は、体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１量を定量する工程を更に含む。

【０００５】

本発明はまた、体液サンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量の方法であって、Ｃｒｉｐｔｏ－１を含有すると疑われる体液サンプル、及びＣｒｉｐｔｏ－１に対する抗体を用意すること；Ｃｒｉｐｔｏ－１と抗体が結合し、抗原－抗体複合体を形成するような条件下で、体液サンプルを抗体に曝すこと；抗原－抗体複合体を検出すること；並びに抗原－抗体複合体の量を測定すること；を含む方法を提供する。一部の好適な実施態様では、体液サンプルは、乳、血清、及び血漿からなる群から選択される。一部の特に好適な実施態様では、体液サンプルはヒト由来である。更なる実施態様では、抗体は、モノクローナル抗体及びポリクローナル抗体からなる群から選択される。別の好適な実施態様では、該方法は酵素結合免疫吸着アッセイ法である。

【０００６】

（発明の説明）

本発明は、Ｃｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。特に、本発明は、乳、血清、血漿、及び他の生物的液体などのサンプル中のＣｒｉｐｔｏ－１の検出及び定量のための方法及び組成物を提供する。

【０００７】

栄養素、ビタミン、ミネラルを含有することに加えて、ヒト乳はまた、乳腺の成長と分泌機能の調節、及び新生児の腸粘膜と免疫系の成長、発達、成熟の調節に重要であると考えられている種々の成長因子やサイトカインから構成される（Ｋｉｄｗｅｌｌら，Ｉｎ Ａｔｋｉｎｓｏｎ ａｎｄ Ｌｏｎｎｅｒｄａｌ（ｅｄｓ），Ｐｒｏｔｅｉｎ ａｎｄ Ｎｏｎ－Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｎｉｔｒｏｇｅｎ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｍｉｌｋ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，ＦＬ［１９８９］，ｐｐ．７７－９１）。ヒト乳中で同定された数種の成長因子のうち、ＥＧＦとＴＧＦαは、正常な乳腺上皮に最も重要な分裂促進因子である（Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２１０：１９８－１９９［１９８０］；及び、Ｏｋａｄａら，Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．，４８：１５４０－１５４３［１９９１］）。この点に関し、幾つかの研究では、ＥＧＦとＴＧＦαの両方がヒトとマウスの乳腺上皮細胞の増殖を刺激することが示されており、ヒト乳におけるそれらの存在は、乳腺上皮細胞の増殖と分化に生理的に重要であると考えられる（Ｓｎｅｄｅｃｋｅｒら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８８：１０６３－１０６９［１９９１］）。

【０００８】

事実、ヒト乳は、生物活性を有する種々の異なる蛋白質とペプチドを含有する（Ｒｏｄｒｉｇｕｅｚ－Ｐａｌｍｅｒｏら，Ｃｌｉｎ．Ｐｅｒｉｎａｔｏｌ．，２６：３５５－３５９［１９９９］）。乳に存在する多数の生物活性物質のうちには、多数の成長因子やサイトカインがある（Ｇｒｏｓｖｅｎｏｒら，Ｅｎｄｏｃｒｉｎ．Ｒｅｖ．，１４：７１０－７２８［１９９２］）。これらとしては、インスリン、インスリン様成長因子１（ＩＧＦ－１）、ＥＧＦ、ＴＧＦα、形質転換成長因子β１（ＴＧＦ－β１）及びＴＧＦ－β２、ボンベシン、乳腺由来成長因子Ｉ及びＩＩ、コロニー刺激因子、ヒト乳成長因子Ｉ、ＩＩ及びＩＩＩ、血小板由来成長因子、肝細胞成長因子、血管内皮細胞成長因子、ベータセルリン、顆粒球コロニー刺激因子（ＧＳＦ）、腫瘍壊死因子α（ＴＮＦα）、インターロイキン－１（ＩＬ－１）、並びにインターロイキン－６（ＩＬ－６）が挙げられる（Ｇｒｏｓｖｅｎｏｒら，Ｅｎｄｏｃｒｉｎ．Ｒｅｖ．，１４：７１０－７２８［１９９２］；Ｓｃａｈｍｓ，Ｅｎｄｏｃｒｉｎ．Ｒｅｇｕｌ．，２８：３－８［１９９４］；Ｙａｍａｄａら，Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，４０：１１２－１２０［１９９８］；Ｂｒｙａｎら，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．，４５：８５８－８５９［１９９９］；Ｓｉａｆａｋａｓら，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．，４５：６５２－６５７［１９９９］；Ｈａｗｋｅｓら，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．，４６：１９４－１９９［１９９９］；Ｄｏｎｎｅｔ－Ｈｕｇｈｅｓら，Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．，７８：７４－７９［２０００］；Ｃａｌｈｏｕｎら，Ｐｅｄｉａｔｒ．，１０５：１－６［２０００］；及び、Ｄｕｎｂａｒら，Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ

．，３４４：７１３－７２１［１９９９］）。

【０００９】

ペプチドのＥＧＦ－ＣＦＣファミリーの一員であるＣＲ－１がヒト乳に存在することが、本発明の開発中に行った実験によって初めて示された。本明細書記載のように、ウエスタンブロット分析とＥＬＩＳＡを用い、ＣＲ－１の存在に関し、２４個のヒト乳サンプルを分析した。全てのサンプルで、濃度６２－１１８ｎｇ／ｍｌでＣＲ－１蛋白質が同定された。ヒト乳中のＥＧＦに関し、同様の濃度が報告されている（Ｃａｒｐｅｎｔｅｒ，Ｓｃｉｅｎｃｅ２１０：１９８－１９９［１９８０］；及び、Ｏｋａｄａら，Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．，４８：１５４０－１５４３［１９９１］）。不幸にも、出産後に乳サンプルを集めた時に関する情報は入手できなかった；従って、ヒト乳中のＣＲ－１濃度と乳分泌の明確な期間との間に可能性ある関連が存在するかどうかを確かめることはできなかった。この点に関し、幾つかの成長因子は、初乳で最高濃度に達し、分娩後急速に降下し、乳分泌の最後まで一定に留まる（Ｙａｍａｄａら，Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，４０：１１２－１２０［１９９８］；Ｂｒｙａｎら，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．，４５：８５８－８５９［１９９９］；及び、Ｒｅａｄら，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｒｅｓ．，１８：１３３－１３９［１９８４］）。免疫アフィニティクロマトグラフィによってヒト乳から精製されたＣＲ－１は、ウエスタンブロット分析で評価した時、ヒト組換えＣＲ－１蛋白質とはサイズが異なった。この点に関し、ヒトＣＲ－１蛋白質は、単一のＮ－グリコシル化部位、５個のミリスチル化の可能性がある部位、及びプロテインキナーゼＡとプロテインキナーゼＣによるリン酸化の可能性がある３個のコンセンサス部位を含む（Ｂｒａｎｄｔら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２６９：１７３２０－１７３２８［１９９４］）。事実、サイズが２８ｋＤａと２４ｋＤａのネイティブなヒト及びマウスＣＲ－１蛋白質の他に、マウスＣＲ－１と免疫学的に関連する１４－６０ｋＤａの範囲の他の蛋白質が記載されている（Ｋｅｎｎｅｙら，Ｍｏｌ．Ｃａｒｃｉｎｏｇｅｎ．，１５：４４－５６［１９９６］；及び、Ｓｅｎｏら，Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ １５：２１５－２２９［１９９７］）。乳由来ＣＲ－１対ヒト組換えＣＲ－１蛋白質の可動性の違いが、これらの翻訳後修飾によって説明されると考えられる。しかし、本発明を使用するために、関与する機構の理解は必要ではない。最後に、乳由来ＣＲ－１蛋白質は、ＮＭｕＭＧマウス乳腺上皮細胞でＭＡＰＫリン酸化を刺激できたので、生物学的に活性である。ＣＲ－１がまだ未知の細胞表面レセプターに結合することによって、ＭＡＰＫ経路の活性化が仲介される（Ｂｉａｎｃｏら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７４：８６２４－８６２９［１９９９］）。

【００１０】

乳中の生物活性ＣＲ－１の存在は、この成長因子の幾つかの生物効果を基に、生理学的に重要であると考えられる。例えば、ｒａｓ／ｒａｆ／ＭＡＰＫ経路の活性化によりマウス乳腺上皮細胞の分裂促進効果を生じさせる他に（Ｋａｎｎａｎら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２：３３３０－３３３５［１９９７］）、ＣＲ－１はまた、マウス乳腺上皮細胞株（ＨＣ－１１）、及び妊娠中期マウスから樹立されたマウス１次乳腺移植片培養物の分化を調節できる（Ｄｅ Ｓａｎｔｉｓら，Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ．，８：１２５７－１２６６［１９９７］）。β－カゼインや乳漿酸性蛋白質（ＷＡＰ）などの乳蛋白質を発現することによって、ＨＣ－１１細胞とマウス１次乳腺上皮細胞は、乳腺刺激ホルモンであるデキサメタゾン、インスリン、及びプロラクチン（ＤＩＰ）に応答する。ＣＲ－１は、乳腺刺激ホルモンに応答して、コンフルエントなＨＣ－１１細胞や静止期のマウス１次乳腺移植片培養中でのβ－カゼインやＷＡＰ発現の阻害剤である。しかし、対数増殖期のＨＣ－１１細胞で、ＣＲ－１は、β－カゼイン発現における次なる乳腺刺激ホルモンに誘導される増加に細胞を感受性にできる（Ｄｅ Ｓａｎｔｉｓら，Ｃｅｌｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ．，８：１２５７－１２６６［１９９７］）。ＨＣ－１１細胞におけるＤＩＰに応答してのβ－カゼイン発現に対するＣＲ－１の阻害効果は、ｐ２１^{ras}－及びホスファチジルイノシトール３

’－キナーゼ－依存性経路活性化によって仲介される。従って、活性化されるシグナル伝達経路に依存して、ＣＲ－１は、マウス乳腺上皮細胞に対する分裂促進効果又は分化効果を有する。従って、ヒト乳中のＣＲ－１は、２種の異なる応答を調節すると考えられる。ＣＲ－１発現が上昇する妊娠中（Ｋｅｎｎｅｙら，Ｍｏｌ．Ｒｅｐｒｏｄ．Ｄｅｖｅｌｏｐ．，４１：２７７－２８６［１９９５］；及び、Ｈｅｒｒｉｎｇｔｏｎら，Ｊ．Ｃｅｌｌ Ｐｈｙｓｉｏｌ．，１３１：２１５－２２６［１９９７］）、ＣＲ－１は、乳腺上皮に対しその分裂促進効果を発揮し、よって乳腺上皮細胞の増殖と分化を刺激し、乳蛋白質発現を誘導すると考えられる。対照的に、細胞増殖が止まった乳分泌の間、乳中に存在するＣＲ－１は、乳蛋白質発現を減少するのに重要であり、それ故、乳腺の分化を阻害し、乳腺の退行を促進するのに重要であると考えられる。事実、この機能は、ＣＲ－１がコンフルエントな生存因子が枯渇したＨＣ－１１細胞でアポトーシスを誘導できるという最近の実証によって支持される（Ｄｅ Ｓａｎｔｉｓら，Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ．，７：１８９－１９６［２０００］）。この効果は、カスパーゼ－３様プロテアーゼの発現の増加とＢｃｌ－x_lレベルのダウンレギュレーションにより仲介される（Ｄｅ Ｓａｎｔｉｓら，Ｃｅｌｌ Ｄｅａｔｈ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔ．，７：１８９－１９６［２０００］）。しかし、本発明を使用するために、機構の理解は必要ではない。事実、本発明は、いずれの特定の機構にも限定されないことが意図される。

【００１１】

マウス乳腺の成長と形態形成を調整することに加えて、ＣＲ－１は、ヒト乳癌の病因に関係するかもしれないことが示されている（Ｑｉら，Ｂｒｉｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６９：９０３－９１０［１９９４］；Ｄｕｂｌｉｎら，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，７：６１７－６２２［１９９５］；及び、Ｓａｌｏｍｏｎら，Ｃｒｉｔ．Ｒｅｖ．Ｏｎｃｏｌ．Ｈｅｍａｔｏｌ，１９：１８３－２３２［１９９５］）。浸潤する腺管癌又は小葉癌の約８０％で、及びｉｎ ｓｉｔｕの腺管癌の５０％で、ＣＲ－１発現が検出された（Ｑｉら，Ｂｒｉｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６９：９０３－９１０［１９９４］）。興味深いことには、非関与の隣接乳腺上皮標本の１５％だけが、ＣＲ－１発現に陽性であり、このことはこの疾患のための可能性ある腫瘍マーカーとしてのＣＲ－１の役割を示している（Ｑｉら，Ｂｒｉｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ６９：９０３－９１０［１９９４］）。しかし、ＣＲ－１発現と、腫瘍サイズ、リンパ節関与、増殖性指標、又は、エストロゲンやプロゲステロンレセプター状態などの種々の臨床病理学的パラメータとの間の有意な相関は見出されなかった（Ｄｕｂｌｉｎら，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｏｎｃｏｌ．，７：６１７－６２２［１９９５］）。ヒト乳中のＣＲ－１の存在を示す、本明細書に含まれるデータによれば、乳腫瘍によって十分に高い十分なレベルで発現したＣＲ－１は、癌細胞によって放出され、血液循環に達することが示される。従って、ヒト血清及び／又は血漿中のＣＲ－１レベルの検出と測定は、乳癌の診断における臨床的重要性を見出すであろうと考えられる。事実、幾つかの異なる成長因子やサイトカインが、ヒト乳癌患者の血漿又は血清に存在すると報告されており、それらの濃度は、疾患進行や、化学療法及び内分泌療法に対する応答と有意に関連する（Ｚｈａｎｇら，Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１９：１４２７－１４３２［１９９９］；Ｔａｎｉｇｕｃｈｉら，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．，１：１０３１－１０３４［１９９５］；及び、Ｄｏｒｉｘら，Ｂｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ７６：２３８－２４３［１９９７］）。実際、乳癌患者のヒト血漿中のＣＲ－１を検出するため、本発明の開発中に実験を行った。

【００１２】

本発明の開発中に、妊娠及び乳分泌の間、マウス乳腺で検出されるＣＲ－１発現の増加がこの成長因子の乳中への分泌と関連するかどうかを決定するため、評価を行った。これらの初期の結果に基づき、ヒト乳や他のサンプル中のＣＲ－１の検出と定量に適したＥＬＩＳＡ法とウエスタンブロット分析法を提供する本発明を開発した。本明細書に示すように、方法及び組成物は、濃度６２－１１８ｎｇ／ｍｌで、乳サンプル中の２８ｋＤａのＣＲ

－１の特異的バンドを検出する手段を提供する。更に、本明細書でより詳細に考察するように、免疫アフィニティカラムを用いてヒト乳から精製したＣＲ－１は、ＮＭｕＭＧマウス乳腺上皮細胞でＭＡＰＫのリン酸化を刺激できた。

【００１３】

単一特異的ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体を用いるウエスタンブロット分析によってＣＲ－１発現に関し、ヒト乳の２４個のサンプルを分析した。ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体と反応した２８ｋＤａのバンドは、ヒト乳サンプル中で様々な強度で同定された（図１参照）。全てのサンプルが種々の程度までではあったが、免疫反応性ＣＲ－１蛋白質を発現した。

【００１４】

抗ＣＲ－１抗体によって認識されるバンドが特異的であることを示すために、過剰の組換えＣＲ－１とプレインキュベートしたウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体でサンプル１－９をプローブした。ＣＲ－１蛋白質を予め吸着した抗ＣＲ－１抗体と共にサンプルをインキュベートしたとき、バンドは検出されず、このことは、抗ＣＲ－１抗体によって認識されたバンドの特異性を示している（図２）。ヒト乳中のＣＲ－１の存在と量も、ＥＬＩＳＡによって評価し、定量した。異なる濃度での標準品として組換えＣＲ－１蛋白質を用いて、脱脂ヒト乳サンプル中のＣＲ－１濃度を評価した。ウサギ抗ＣＲ－１ポリクローナル抗体は、１００ｐｇ－１μｇの濃度範囲にわたり組換えヒトＣＲ－１を直線的に検出できることを図３、パネルＡは示す。乳サンプル中６２－１１８ｎｇ／ｍｌの濃度で免疫反応性ＣＲ－１は存在した（図３、パネルＢ参照）。ウエスタンブロット分析によって検出した乳サンプル中の２８ｋＤａのＣＲ－１免疫反応性蛋白質の相対量と、ＥＬＩＳＡで測定した免疫反応性ＣＲ－１の濃度との間には有意な相関があった。

【００１５】

ヒト乳中のＣＲ－１が乳腺上皮細胞に対し生物活性であるかどうかを評価するために、ウエスタンブロット分析とＥＬＩＳＡで決定したとき高レベルのＣＲ－１を発現している単一のヒト乳サンプル（サンプル番号２）を精製のために選択した。抗ＣＲ－１ウサギポリクローナル抗体が結合している免疫アフィニティカラムを用い、脱脂ヒト乳からＣＲ－１を精製した。濃縮、透析、ウエスタンブロット分析によって決定したＣＲ－１濃度の推定（図４）後、ＮＭｕＭＧマウス乳腺上皮細胞に対する活性について精製ＣＲ－１蛋白質をアッセイした。

【００１６】

何匹かのマウスとヒト乳腺上皮細胞株で、ＣＲ－１は、Ｓｈｃのｐ６６、ｐ５２及びｐ４６イソ型のチロシンリン酸化の急速な増加を誘導でき、このチロシンリン酸化は、次いで、ｒａｓ／ｒａｆ／ＭＡＰＫ経路を活性化でき、このことは、ＭＡＰＫのｐ４２とｐ４４イソ型の増大したリン酸化によって示されることが以前示されている（Ｋａｎｎａｎら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７２：３３３０－３３３５［１９９７］）。ＮＭｕＭＧマウス乳腺上皮細胞は、ＳｈｃとＭＡＰＫのリン酸化の増大を伴い、組換え又は化学合成ＣＲ－１に応答する（Ｓｅｎｏら，Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ １５：２１５－２２９［１９９８］；及び、Ｋａｎｎａｎら，上記）。ヒト乳から精製したＣＲ－１が組換えＣＲ－１に匹敵する活性を有するかどうかを確かめるために、血清欠乏のＮＭｕＭＧ細胞を、異なる濃度の免疫精製乳由来ＣＲ－１蛋白質で処理し、組換えヒトＣＲ－１と比較した。乳由来ＣＲ－１による細胞の処理後、ＭＡＰＫの用量依存性活性化が検出された（図５参照）。組換えヒトＣＲ－１（１００ｎｇ／ｍｌ）はまた、乳由来ＣＲ－１の１００ｎｇ／ｍｌによるＭＡＰＫ刺激のレベルに殆ど等しいＭＡＰＫリン酸化を刺激できた。

【００１７】

（定義）

本明細書と特許請求の範囲における用語「サンプル」と「標本」は、その最も広い意味で使用される。好適な実施態様では、これらの用語は、尿、血液、脳脊髄液（ＣＳＦ）、糞便、精液、及び唾液などの体液を含むが、それらに限定されない、ヒト及び他の動物から

得られる全てのタイプのサンプルを包含する。しかし、生物サンプルは、ヒトを含む動物の液体又は組織であってもよい。これらの例は、本発明に適用できるサンプルのタイプを限定するものと解釈されるべきではないからである。

【００１８】

本明細書で使用する場合、用語「液体サンプル」は、液体であるサンプルを指す。例えば、該用語は、乳、血液、血清、血漿、ＣＳＦ、尿、精液、唾液、漿液などの身体性液体（例えば、「生物液体」）を包含する。本発明は、いずれの特定の液体にも限定されるものではないことが意図される。

【００１９】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、特定の抗原と反応する任意の免疫グロブリン分子について使用される。該用語は、任意の源（例えば、ヒト、げっ歯類、非ヒト霊長類、ウサギ、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなど）から得られる任意の免疫グロブリン（例えば、ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＤなど）を包含することが意図される。

【００２０】

本明細書で使用する場合、用語「抗原」は、抗体と反応できる任意の物質について用いられる。この用語は、任意の抗原及び「免疫原」（即ち、抗体形成を誘導する物質）を包含することが意図される。従って、免疫原性反応において、抗体は、抗原又は抗原の一部の存在に応答して産生される。

【００２１】

本明細書で使用する場合、用語「抗原フラグメント」及び「抗原の一部」は、抗原の断片について使用される。抗原フラグメント又は一部は、完全な抗原の小さな割合から大きな割合の範囲（しかし、抗原の１００％ではない）の種々のサイズで存在しうる。しかし、「抗原の少なくとも一部」が特定される状況では、完全な抗原は存在しうると考えられる。一部の好適な実施態様では、抗原のフラグメント又は一部は、抗体によって認識される「エピトープ」（例えば、「抗原決定基」）を含む。他の実施態様では、抗原のフラグメント又は一部は、免疫原性であるが（即ち、このようなフラグメント又は一部は免疫応答を誘導できる）、他の実施態様では、抗原のフラグメント又は一部は、免疫原性ではない（即ち、このようなフラグメント又は部分は免疫応答を誘導できない）。

【００２２】

本明細書で使用する場合、用語「免疫アッセイ」は、抗体を抗原の検出に使用する任意の方法について使用される。直接免疫アッセイ、間接免疫アッセイ、及び「サンドイッチ」免疫アッセイを含むが、それらに限定されない様々な免疫アッセイ様式が、この定義によって包含されると考えられる。特に好適な様式は酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）である。しかし、本発明は、この様式に限定されるものではないことが意図される。放射免疫アッセイ（ＲＩＡ）、免疫蛍光アッセイ（ＩＦＡ）、及びＥＬＩＳＡ法の変法を含むがそれらに限定されない他のアッセイ様式などが挙げられる他の様式が、本発明の方法における使用が見出されることが考えられる。実際、「フロキュレーション」（即ち、抗原－抗体複合体の形成で産生されるコロイド性懸濁液）、「凝集」（即ち、抗体への暴露時の細胞又は他の物質の凝集）、「粒子凝集」（即ち、抗体の存在下での抗原で被覆された粒子の凝集、又は抗原の存在下での抗体で被覆された粒子の凝集）、「補体結合」（即ち、抗体－抗原反応方法における補体の使用）、並びに、血清学、免疫学、免疫細胞化学、組織化学、及び関連分野で通常使用される他の方法が挙げられるが、それらに限定されない他の抗原－抗体反応様式が本発明での使用が見出されることが考えられる。

【００２３】

本明細書で使用する場合、用語「細胞染色」は、細胞を標識又は染色して可視化を高めるのに使用される方法について使用される。この染色又は標識は、フルオロクロム、酵素、金、ヨウ素が挙げられるが、それらに限定されない種々の化合物の使用により達成される。該定義は、ｉｎ　ｓｉｔｕのサンプルに対し試験（即ち、アッセイ）が行われる「ｉｎ　ｓｉｔｕ発色アッセイ」のような方法を包含すると考えられる。ｉｎ　ｓｉｔｕ発色アッセイは、免疫アッセイ（即ち、ＥＬＩＳＡ）又は免疫細胞組織化学の使用を含むとも考

えられる。しかし、本発明は、細胞染色のどんな特定のアッセイ様式にも限定されるものではないことが意図される。

【００２４】

本明細書で使用する場合、用語「捕捉抗体」は、抗原と結合し、それにより、次に適用される抗体による抗原の認識を可能とするために使用される抗体を指す。例えば、一部の好適な実施態様では、捕捉抗体はマイクロタイターウエルと結合されており、ウエルに加えられるサンプル中に存在する抗原（例えば、Ｃｒｉｐｔｏ－１）と結合するよう働く。次いで、別の抗体（「一次抗体」と呼ばれる）が抗原－抗体複合体と結合するのに使用され、抗体－抗原－抗体から構成される「サンドイッチ」を形成する効果がある。この複合体の検出は、幾つかの方法によって行うことができる。一部の特に好適な実施態様では、一次抗体は、ビオチン、酵素、蛍光マーカー、又は放射活性などの標識と共に調製され、この標識を用い直接的に検出される。あるいは、一次抗体を認識する標識した「二次抗体」又は「レポーター抗体」を加え、抗体－抗原－抗体－抗体から構成される複合体を形成させる。再度、適切なレポーター試薬を次いで加え、標識抗体を検出する。他の実施態様では、任意の数の付加的抗体を、所望に応じ加える。一部の実施態様では、これらの抗体はまた、酵素、蛍光マーカー、又は放射活性が挙げられるが、それらに限定されないマーカーで標識される。

【００２５】

本明細書で使用する場合、用語「レポーター試薬」又は「レポーター分子」は、抗原と結合した抗体の存在を検出できる化合物について使用される。例えば、好適な実施態様では、レポーター試薬は、酵素基質と結合された比色物質である。抗体と抗原の結合に際し、酵素はその基質に作用し、発色を引き起こす。他のレポーター試薬として、蛍光産生、発色、発光、及び放射活性の化合物又は分子が挙げられるが、それらに限定されない。この定義はまた、検出システムの一部としてビオチン及びアビジンベースの化合物（例えば、化合物を含むが、ニュートラビジン（ｎｅｕｔｒａｖｉｄｉｎ）やストレプトアビジンに限定されない）の使用を包含する。本発明の１実施態様では、ビオチン化抗体を、アビジンで被覆した固相支持体と共に使用する。

【００２６】

本明細書で使用する場合、用語「シグナル」は、反応、例えば、抗原への抗体の結合が生じたということの指標について使用される。放射活性、蛍光産生反応、及び酵素反応の形態でのシグナルは、本発明と共に使用されるだろうことが考えられる。しかし、本発明は、どんな特定のシグナルにも限定されるものではないことが意図される。一部の実施態様では、シグナルは、定量的及び／又は定性的に評価される。

【００２７】

本明細書で使用する場合、用語「増幅体」は、ＥＬＩＳＡなどの試験方法においてシグナルを増大させるシステムについて使用される。しかし、本発明は、どんな特定のアッセイシステム又は様式における増幅体の使用にも限定されるものではないことが意図される。

【００２８】

本明細書で使用する場合、用語「固相支持体」は、抗体、抗原、及び／又は他の化合物などの種々の試薬の結合に適した任意の固体材料について使用される。例えば、ＥＬＩＳＡ法では、マイクロタイタープレートのウエルはしばしば固相支持体を提供する。固相支持体の他の例として、顕微鏡用スライド、カバーガラス、ビーズ、粒子、細胞培養フラスコ、並びに多数の他の物品が挙げられる。

【００２９】

本明細書で使用する場合、用語「キット」は、試薬及び他の材料の組合せについて使用される。好適な実施態様では、本発明のキットは、マイクロタイタープレート、緩衝液、標識抗体、陽性及び陰性対照、使用者用指示マニュアルなどを含む。本発明のキットは、どんな特定の構成成分、試薬などにも限定されるものではないことが意図される。実際、種々のキット様式が、本発明での使用が見出されるであろうことが意図される。

【００３０】

（実験）
本発明の特定の好適な実施態様及び局面を示し、更に説明するために、以下の実施例を提供するが、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。
【００３１】
以下の実験の開示で、以下の略号が適用される。
℃（摂氏温度）；ｒｐｍ（毎分回転数）；ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）；ＣＦＡ（完全フロインドアジュバント）；ＩＦＡ（不完全フロインドアジュバント）；ＩｇＧ（免疫グロブリンＧ）；ＩＭ（筋肉内）；ＩＰ（腹腔内）；ＩＶ（静脈内又は血管内）；ＳＣ（皮下）；H_2O（水）；ＨＣｌ（塩酸）；ａａ（アミノ酸）；ｂｐ（塩基対）；ｋｂ（キロベース対）；ｋＤ（キロダルトン）；ｇｍ（グラム）；μｇ（マイクログラム）；ｍｇ（ミリグラム）；ｎｇ（ナノグラム）；μｌ（マイクロリットル）；ｍｌ（ミリリットル）；ｍｍ（ミリメートル）；ｎｍ（ナノメートル）；μｍ（マイクロメートル）；Ｍ（モル濃度）；ｍＭ（ミリモル濃度）；μＭ（マイクロモル濃度）；Ｕ（ユニット）；Ｖ（ボルト）；ＭＷ（分子量）；秒（秒）；分（分）；時間（時間）；$MgCl_2$（塩化マグネシウム）；ＮａＣｌ（塩化ナトリウム）；OD_{280}（２８０ｎｍでの光学密度）；OD_{600}（６００ｎｍでの光学密度）；ＰＡＧＥ（ポリアクリルアミドゲル電気泳動）；ＰＢＳ（リン酸緩衝化生理食塩水［１５０ｍＭ ＮａＣｌ，１０ｍＭリン酸ナトリウム緩衝液，ｐＨ７．２］）；ＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）；ＰＥＧ（ポリエチレングリコール）；ＰＭＳＦ（フェニルメチルスルホニルフルオライド）；ＲＴ－ＰＣＲ（逆転写ＰＣＲ）；ＳＤＳ（ドデシル硫酸ナトリウム）；Ｔｒｉｓ（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン）；ｗ／ｖ（体積に対する重量）；ｖ／ｖ（体積に対する体積）；Ａｍｅｒｓｈａｍ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ，Ａｒｌｉｎｇｔｏｎ Ｈｅｉｇｈｔｓ，ＩＬ）；Ｐｉｅｒｃｅ（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｒｏｃｋｆｏｒｄ，ＩＬ）；ＩＣＮ（ＩＣＮ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌｓ，Ｉｎｃ．，Ｃｏｓｔａ Ｍｅｓａ，ＣＡ）；Ａｍｉｃｏｎ（Ａｍｉｃｏｎ，Ｉｎｃ．，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）；ＡＴＣＣ（Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）；Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）；ＢｉｏＲａｄ（ＢｉｏＲａｄ，Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，ＣＡ）；ＧＩＢＣＯ ＢＲＬ又はＧｉｂｃｏ ＢＲＬ（Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ，ＭＤ）；Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）；Ｐｈａｒｍａｃｉａ（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｉｎｃ．，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ）；及び、Ｓｉｇｍａ（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＭＯ）。
【００３２】
これらの実験では、使用したヒト乳サンプルは２４人の健康な女性から得た。これらのサンプルを出産後に集めた時に関するデータは入手できなかった。サンプルを１４，０００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、脂質層除去後、乳の水層を集めた。
ＮＭｕＭＧ正常マウス乳腺上皮細胞を、１０％ウシ胎仔血清を含有するダルベッコ改変イーグル培地で培養した。組換えヒトＣＲ－１（ｒｈＣＲ－１）蛋白質を、Ｅ．ｃｏｌｉで発現させ、当該分野で公知のようにして精製した（Ｓｅｎｏら，Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ １５：２１５－２２９［１９９８］参照）。
【００３３】
実施例１
ウエスタンブロット分析
これらの実験で、脱脂ヒト乳サンプル４０μｌを４－２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルにロードし、還元条件で電気泳動した。電気泳動後、ゲル上の蛋白質をＰＶＤＦ膜に移し、０．０５％ＴＷＥＥＮ（登録商標）－２０界面活性剤を含有する２０ｍＭ Ｔｒｉｓ緩衝化生理食塩水中の５％乾燥乳でブロックした。膜を、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体（

Ｂｉｏｃｏｎ）の１：１０００希釈物と４℃で一晩インキュベートした。ヒト組換えＣＲ－１（１μｇ／ｍｌ）と室温で２時間プレインキュベートしたウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体の１：１０００希釈物で１枚の膜をプローブした。西洋ワサビペルオキシダーゼと結合したヤギ抗ウサギＩｇＧの１：２０００希釈物を用いて、結合したウサギ抗体を検出し（Ａｍｅｒｓｈａｍ）、免疫反応性バンドを、増強化学発光（ｅｎｈａｎｃｅｄ ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｃｅ）によって検出した（Ａｍｅｒｓｈａｍ）。

【００３４】

図１に示すように、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体と反応する２８ｋＤａのバンドが、ヒト乳サンプルにおいて種々の強度で同定された。試験したサンプルの全部が、種々の程度までではあるが、免疫反応性ＣＲ－１蛋白質を発現した。

抗ＣＲ－１抗体によって認識されたバンドが特異的であるかどうかを示すために、過剰の組換えＣＲ－１とプレインキュベートしたウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体でサンプル１－９をプローブした。ＣＲ－１蛋白質で予め吸着した抗ＣＲ－１抗体と共に、サンプルをインキュベートしたとき、バンドは検出されず、このことは、抗ＣＲ－１抗体で認識されたバンドの特異性を示している（図２）。実施例２で下記するように、ヒト乳中のＣＲ－１の存在と量をまた、ＥＬＩＳＡで評価及び定量した。

【００３５】

実施例２

酵素結合免疫吸着アッセイ（ＥＬＩＳＡ）

これらの実験では、各々の脱脂乳サンプル２００μｌを９６マイクロタイターウエルプレートに加え、４℃で一晩インキュベートした。ヒト組換えＣＲ－１蛋白質も、１００ｐｇ－１μｇの範囲の濃度で吸着した。プレートを、３７℃で１時間、２％乳（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ）でブロックし、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体（Ｂｉｏｃｏｎ）の１：３０００希釈物と３７℃で１時間インキュベートした。洗浄緩衝液（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ）でプレートを３回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）と結合したロバ抗ウサギＩｇＧの１：３０００希釈物を加え、３７℃で１時間インキュベートした。次いで、プレートを、洗浄緩衝液で５回洗浄し、ＴＭＢペルオキシダーゼ基質緩衝液（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ）１００μｌをウエルに加えた。発色を考慮するため、プレートを５分間暗所でインキュベートした。停止溶液（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ）の添加によって反応を停止し、吸光度を４５０ｎｍで読み取った。実験は３連で行い、３回繰り返した。

幾つかのＥＬＩＳＡ実験の結果を図３に示す。図３パネルＡは、組換えＣＲ－１蛋白質の異なる濃度を用い、サンプル中のＣＲ－１濃度を評価したプレートの結果を与える。ウサギ抗ＣＲ－１ポリクローナル抗体が、１００ｐｇ－１μｇの濃度範囲にわたり組換えヒトＣＲ－１を直線的に検出できることをこの図は示している。また、図３パネルＢに示すように、免疫反応性ＣＲ－１は、乳サンプル中６２－１１８ｎｇ／ｍｌの濃度で存在した。ウエスタンブロット分析によって検出した乳サンプル中の２８ｋＤａのＣＲ－１免疫反応性蛋白質の相対量（実施例１で記載）と、本実施例で記載のＥＬＩＳＡで測定した免疫反応性ＣＲ－１の濃度との間には有意な相関があった。

【００３６】

実施例３

ヒト乳由来のＣＲ－１蛋白質の免疫精製

製造業者の説明書のとおり、ＡＭＩＮＯＬＩＮＫ（登録商標）Ｐｌｕｓ固定化キット（Ｐｉｅｒｃｅ）を用い、ヒト乳由来のＣＲ－１蛋白質を精製した。要約すると、０．１Ｍクエン酸ナトリウムと０．０５Ｍ炭酸ナトリウムを含有するｐＨ１０のカップリング緩衝液を用い、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１　ＩｇＧを、ＡＭＩＮＯＬＩＮＫ（登録商標）Ｐｌｕｓカップリングゲルに結合した。次いで、脱脂ヒト乳由来のＣＲ－１のアフィニティ精製のために、抗ＣＲ－１抗体結合カラムを用いた。ウエスタンブロット（実施例１参照）とＥＬＩＳＡ（実施例２参照）によって検出されたその高いＣＲ－１レベルのために、ヒト乳サンプル番号２を精製のために選択した。

【００３７】
ヒト乳５ｍｌをカラムに適用し、室温で１時間インキュベートした。ＰＢＳで洗浄後、結合したＣＲ－１蛋白質を、０．１ＭグリシンｐＨ２．５で数画分に溶出し、１Ｍ　Ｔｒｉｓ　ｐＨ９．５で中和した。該蛋白質含有画分をプールし、ＣＥＮＴＲＩＣＯＮ（登録商標）１０（Ａｍｉｃｏｎ）濃縮器で濃縮し、ＰＢＳに対し透析した。実施例１に記載のように、参照として既知濃度の組換えヒトＣＲ－１を用い、ウエスタンブロットによって、精製蛋白質の濃度を評価した。このウエスタンブロットで、ヒト組換えＣＲ－１蛋白質１００ｎｇ（レーン１）と免疫精製乳サンプル４０μｌ（レーン２）を、４－２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で電気泳動し、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体の１：１０００希釈物でプローブした。結果を図４に示す。

【００３８】
実施例４
乳由来ＣＲ－１蛋白質のバイオアッセイ
ヒト乳由来の精製ＣＲ－１蛋白質の活性を試験するために、１００ｍｍプレートにＮＭｕＭＧマウス乳腺上皮細胞を播種し、７０－８０％コンフルエンスに達するまで増殖させた。次いで、ヒトトランスフェリン（１０μｇ／ｍｌ）とＩＶ型ペダーセンフェツイン（１ｍｇ／ｍｌ）とを含有する無血清ダルベッコ改変イーグル培地に、細胞を２４時間移した。組換えヒトＣＲ－１蛋白質１００ｎｇ／ｍｌ、又は実施例２に記載の免疫アフィニティクロマトグラフィによってヒト乳から精製したＣＲ－１で、細胞を３７℃で５分間刺激した。２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ，ｐＨ７．５，１５０ｍＭ　ＮａＣｌ，１％　Ｎｏｎｉｄｅｔ　Ｐ－４０，０．５％デオキシコレート，５ｍＭ　$MgCl_2$，２μｇ／ｍｌアプロチニン，２μｇ／ｍｌロイペプチン，１ｍＭフェニルメチルスルホニルフルオライド，１ｍＭオルトバナジン酸ナトリウム，及び２０ｍＭフッ化ナトリウムを含有する緩衝液中で細胞を溶解した。

【００３９】
粗蛋白質溶解物（３０μｇ／サンプル）を１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で電気泳動し、ＰＶＤＦ膜に移し、５％乾燥乳から調製した溶液でブロックし（実施例１参照）、ウサギポリクローナル抗ホスホＭＡＰＫ抗体（Ｂｉｏｌａｂ）の１：１０００希釈物とインキュベートした。西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）と結合したヤギ抗ウサギＩｇＧとのインキュベーション後、増強化学発光によって免疫反応性バンドを検出した（Ａｍｅｒｓｈａｍ）。

【００４０】
細胞溶解物を、１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で電気泳動し、ＭＡＰＫの活性化リン酸化形態（ｐ４４及びｐ４２）を認識する抗ホスホＭＡＰＫウサギポリクローナル抗体（Ｂｉｏｌａｂ）でプローブした結果を図５は与える。この図で、レーン１は、血清欠乏細胞を含む；レーン２は、ｒｈＣＲ－１（１００ｎｇ／ｍｌ）を含む；レーン３は、乳ＣＲ－１（５０ｎｇ／ｍｌ）を含む；レーン４は、乳ＣＲ－１（１００ｎｇ／ｍｌ）を含む；レーン５は、乳ＣＲ－１（３００ｎｇ／ｍｌ）を含む；レーン６は、乳ＣＲ－１（５００ｎｇ／ｍｌ）を含む。

【００４１】
図５に示すように、乳由来ＣＲ－１による細胞の処理後、ＭＡＰＫの用量依存性活性化が検出された。組換えヒトＣＲ－１（１００ｎｇ／ｍｌ）はまた、乳由来ＣＲ－１の１００ｎｇ／ｍｌによるＭＡＰＫ刺激のレベルに殆ど等しいレベルでＭＡＰＫリン酸化を刺激できた。

【００４２】
実施例５
ヒト血漿中のＣｒｉｐｔｏ－１の検出
これらの実験で、３８人の乳癌患者から得たヒト血漿サンプルからの２００μｌアリコートを、９６マイクロタイターウエルプレートに加え、４℃で一晩インキュベートした。ヒト組換えＣＲ－１蛋白質も、１００ｐｇ－１μｇの範囲の濃度で吸着した。２％乳溶液（

Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ）で３７℃、１時間プレートをブロックし、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体（Ｂｉｃｏｎ）の１：３０００希釈物と共に３７℃で１時間インキュベートした。洗浄緩衝液（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ）でプレートを３回洗浄後、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）と結合したロバ抗ウサギＩｇＧの１：３０００希釈物を３７℃で１時間加えた。次いで、洗浄緩衝液で５回プレートを洗浄し、ＴＭＢペルオキシダーゼ基質緩衝液（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ）１００μｌをウエルに加えた。発色させるため、プレートを暗所で５分間インキュベートした。停止溶液（Ｋｉｒｋｅｒｇａａｒｄ　＆　Ｐｅｒｒｙ）の添加によって反応を停止し、吸光度を４５０ｎｍで読み取った。実験は３連で行い、３回繰り返した。これらのＥＬＩＳＡ実験の結果を図６に示す。この図に示すように、ＣＲ－１は、種々の濃度でこれらのサンプルに存在していた。

【００４３】

上記明細書に記載した全ての刊行物及び特許は、引用により本明細書に含まれる。本発明の範囲と精神を離れること無しに、本発明の記載した方法及び系の種々の改変及びバリエーションが当業者に明白であろう。本発明を特定の好適な実施態様に関し記載してきたが、特許請求した本発明は、このような特定の実施態様に不当に限定されるべきではないことを理解すべきである。実際、免疫アッセイ、分子生物学、内分泌学、及び／又は関連分野の当業者に明白である本発明の実施のための記載した態様の種々の改変は、本発明の範囲内にあることが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、（４－２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で電気泳動し、）抗ＣＲ－１ウサギポリクローナル抗体でプローブした、２４個のヒト乳サンプル中のＣＲ－１のウエスタンブロット分析の結果を与える。

【図２】　図２は、組換えＣＲ－１とプレインキュベートしたポリクローナル抗ＣＲ－１抗体を用いた、ヒト乳中のＣＲ－１のウエスタンブロット分析を示す。ヒト乳サンプル１－９を４－２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で電気泳動し、組換えＣＲ－１蛋白質（１μｇ／ｍｌ）と室温で２時間プレインキュベートしたウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体の１：１０００希釈物でプローブした。

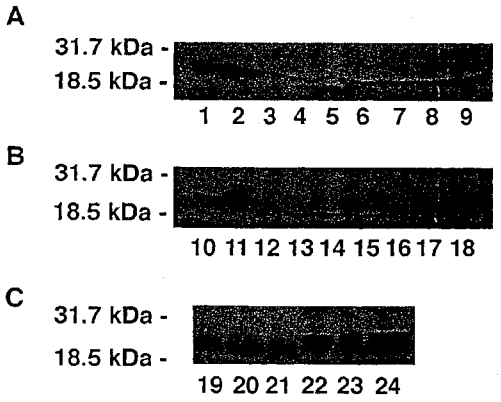
【図３】　図３は、ヒト乳サンプル中のＣＲ－１検出のＥＬＩＳＡ結果を与える。これらのアッセイでは、９６マイクロタイターウエルを、２００μｌの脱脂ヒト乳サンプルで一晩コートし、２％乳でブロックした。パネルＡは、異なる濃度の組換えＣＲ－１蛋白質を用いて評価したサンプル中のＣＲ－１濃度を示す結果を与える。パネルＢは、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体とインキュベートしたプレートの結果を与える。

【図４】　図４は、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体でプローブした、免疫精製乳由来ＣＲ－１のウエスタンブロット分析の結果を与える。この実験で、ヒト組換えＣＲ－１蛋白質１００ｎｇ（レーン１）と免疫精製乳サンプル４０μｌ（レーン２）を４－２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥで電気泳動し、ウエスタン分析のために転写した後、ウサギポリクローナル抗ＣＲ－１抗体の１：１０００希釈物でサンプルをプローブした。

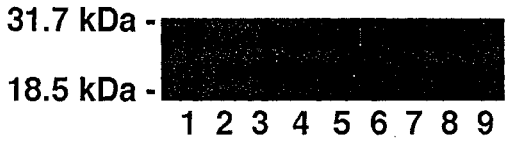
【図５】　図５は、ヒト乳から精製したＣＲ－１によって誘導されたＮＭｕＭＧマウス乳腺上皮細胞でのＭＡＰＫリン酸化を含む実験のＳＤＳ－ＰＡＧＥ結果を与える。種々の濃度でヒト乳から免疫精製したＣＲ－１の異なる濃度で、血清欠乏ＮＭｕＭＧ細胞を３７℃で５分間刺激した。細胞溶解物を、１０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル上で電気泳動した。ウエスタン分析のために転写した後、ＭＡＰＫの活性化リン酸化形態（ｐ４４及びｐ４２）を認識する抗ホスホＭＡＰＫウサギポリクローナル抗体（Ｂｉｏｌａｂ）でサンプルをプローブした。レーン１は、血清欠乏細胞を含む；レーン２は、ｒｈＣＲ－１、１００ｎｇ／ｍｌを含む；レーン３は、乳ＣＲ－１、５０ｎｇ／ｍｌを含む；レーン４は、乳ＣＲ－１、１００ｎｇ／ｍｌを含む；レーン５は、乳ＣＲ－１、３００ｎｇ／ｍｌを含む；レーン６は、乳ＣＲ－１、５００ｎｇ／ｍｌを含む。

【図６】　図６は、２８個のヒト血漿サンプルのOD_{450}結果を示すグラフを与え、これはこれらのサンプル中、種々の濃度でのＣＲ－１の存在を示している。

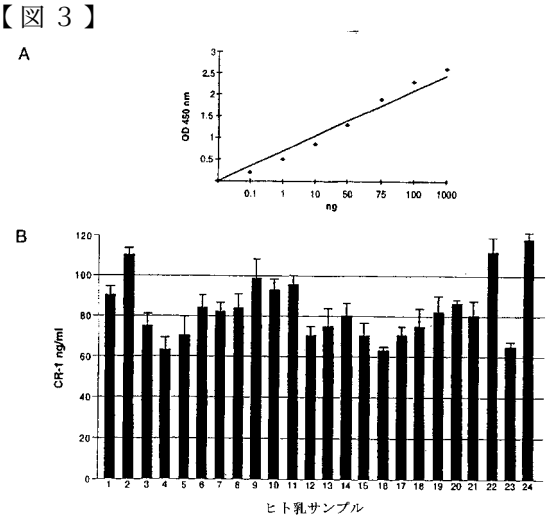
【図１】



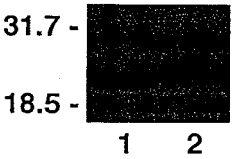
【図２】



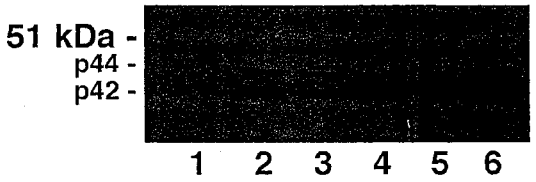
【図３】



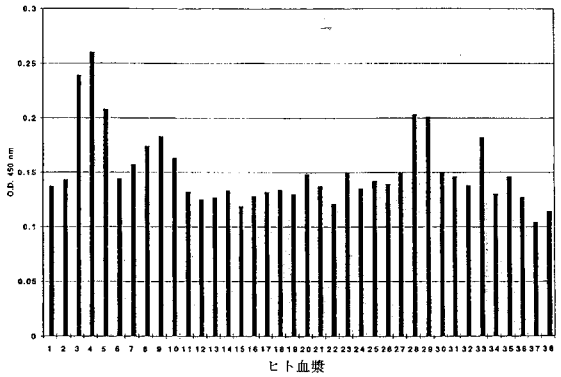
【図４】



【図５】



【図６】



フロントページの続き

(72)発明者　サロモン、デイヴィッド
アメリカ合衆国、メリーランド州　２０８７４、ジャーマンタウン、イーグルス　ネスト　コート　１２２２１

審査官　加々美　一恵

(56)参考文献　米国特許第０５２５６６４３（ＵＳ，Ａ）
米国特許第０５７９２６１６（ＵＳ，Ａ）
The Journal of Biological Chemistry, １９９４年, Vol.269, No.25, p17320-17328
BJU Int., ２０００年, Vol.86, No.7, p894-900

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
G01N 33/48-33/98
MEDLINE(STN)