

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4137444号
(P4137444)

(45) 発行日 平成20年8月20日(2008.8.20)

(24) 登録日 平成20年6月13日(2008.6.13)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 37/00 1 O 2

GO 1 N 33/48 (2006.01)

GO 1 N 33/48 M

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 Z

C 1 2 Q 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/00 C

GO 1 N 33/483 (2006.01)

GO 1 N 33/483 F

請求項の数 64 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-512292 (P2001-512292)
 (86) (22) 出願日 平成12年7月26日(2000.7.26)
 (65) 公表番号 特表2003-505694 (P2003-505694A)
 (43) 公表日 平成15年2月12日(2003.2.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/020354
 (87) 国際公開番号 W02001/007915
 (87) 国際公開日 平成13年2月1日(2001.2.1)
 審査請求日 平成19年7月26日(2007.7.26)
 (31) 優先権主張番号 60/145,613
 (32) 優先日 平成11年7月26日(1999.7.26)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 301046880
 ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド
 ステイツ オブ アメリカ アズ リプレ
 ゼンテッド バイ ザ セクレタリー デ
 パートメント オブ ヘルス アンド ヒ
 ユーマン サービシーズ ザ ナショナル
 インステ
 アメリカ合衆国 メリーランド州 ロック
 ビル エグゼクティブ プールバード 6
 O 1 1 スート # 3 2 5 オフィス オ
 ブ テクノロジー トランスファー
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞分析用の捕捉領域を有する層状装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む、生物標本を分析する方法：

生物標本に由来する種々の生物分子と相互作用する種々の同定分子を含む1つまたはそれ以上の異なる層を持つ基質に該生物標本を置く段階；および

生物標本の成分が基質の異なる層内の種々の同定分子と相互作用することを許容する条件下で、該生物標本の成分を1つまたはそれ以上の異なる層を通して移送させる段階であって、該生物標本の2次元構造が移送の際に保存されて、異なる同定分子と相互作用する移送成分が異なる層の各々で生物標本の成分の位置に対応するパターンを生成し、それにより生物試料を分析する段階。

【請求項 2】

生物標本が細胞標本である、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

層が隣接しており、かつ細胞標本の成分が基質の毛管現象によって基質の異なる層を通して移送される、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

層状化された基質が、細胞標本に毛管圧を与える隣接した多孔性の層を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 5】

細胞標本の成分が、電気泳動によって基質の異なる層を通して移送される、請求項2に

記載の方法。

【請求項 6】

成分が基質の層を通して移送される際に、該成分が標本の細胞構築を維持する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

種々の同定分子と細胞標本の成分との間の相互作用を標本の細胞構築と関連させることをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

複数の異なった個別の細胞標本を基質の表面に置くことをさらに含み、該複数の個別の細胞標本と移送される特定の成分との相関が維持される、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 9】

基質の表面に少なくとも 20 の異なる細胞標本が置かれる、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

細胞標本が組織標本の切片である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

細胞標本が腫瘍の切片である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

基質の異なる層における種々の同定分子の相互作用のパターンと同定済みの成分とを関連させることをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

基質の層が少なくとも 10 である、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 14】

基質の層が少なくとも 100 である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

基質の層の厚さが少なくとも約 25 μm である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 16】

同定分子が細胞標本の成分と相互作用する抗体である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

同定分子が細胞標本の異なる細胞領域と相互作用し、かつ該同定分子の相互作用が該細胞標本の領域と関連される、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 18】

細胞標本の成分を基質を通して移送する前に、層状化された基質の表面に該細胞標本が置かれる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 19】

層を通して細胞標本の成分を選択的に移送するために、該細胞標本の成分を該層を通して移送する前に該標本が処理される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 20】

標本がゲル中の層状化した基質の表面に置かれ、かつ種々の分子サイズの成分を選択的に移送するため、該ゲルの濃度が変化をつけられる、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

比較的小さい分子サイズのタンパク質を選択的に移送するため、高濃度のゲルが用いられる、請求項 20 に記載の方法。

40

【請求項 22】

標本の成分がどの同定分子と相互作用するかを特定することによって、該成分を同定することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 23】

同定済みの成分を第二の同定分子と反応させて、該同定済みの成分が他の成分と会合しているか否かを決定することをさらに含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

細胞標本が腫瘍標本であり、かつ同定済み成分が無処置のタンパク質であり、かつ第二

50

のタンパク質が該腫瘍中の該タンパク質と会合しているか否かを決定するために他の成分の同定が行われる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

複数の腫瘍標本が基質に置かれ、かつ該複数の腫瘍標本の成分が同時に個別に基質を通して移送される、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

複数の腫瘍標本が、様々な腫瘍進行期における特定の種類の腫瘍の標本である、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

複数の腫瘍標本が、様々な腫瘍進行期における特定の被験者由来の腫瘍の標本である、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

細胞標本が、関心対象の細胞集団をより大きな細胞集団から採取することによって得られる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 2 9】

関心対象の細胞集団の採取が、細胞集団をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションすることを含む、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

細胞標本が、関心対象の細胞集団に由来する細胞溶解産物を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 3 1】

1 つまたはそれ以上の層が導電性の層である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 3 2】

層が分離可能であり、分離された各層の中に保持された細胞標本の成分を個別に同定するため、該細胞標本の成分を移送させた後に分離される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

各層が高濃度アガロースゲル、低濃度アガロースゲル、高濃度ポリアクリルアミドゲル、低濃度ポリアクリルアミドゲル、および膜からなる群より選択される、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

同定分子が抗体、核酸、ペプチド、受容体、およびリガンドからなる群より選択される分子である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

同定分子が細胞標本の成分を層の中に保持する捕捉分子を含む方法であって、該捕捉分子と試料の該成分との組合せと会合する検出分子、または該同定分子により認識される領域とは異なる該成分の領域と会合する検出分子に該同定分子を暴露することをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

成分がタンパク質であり、同定分子がタンパク質の第一のドメインを認識し、かつ検出分子がタンパク質の別の領域を認識する、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

検出分子が抗体、核酸、ペプチド、受容体、リガンド、および染料からなる群より選択される、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

同定分子が、移送される成分を細胞標本中の成分の量に比例する量で捕捉し、かつ該同定分子が該細胞標本中の該成分の比例量の量的指標を提供する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 3 9】

細胞標本が組織切片、培養細胞、および細胞診断試料からなる群より選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4 0】

種々の同定分子と相互作用する移送される成分が、基質の異なる層を通して移送される前に、タンパク質分解反応または核酸分解反応に供されていない無処置のタンパク質または無処置の核酸分子を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 1】

細胞標本成分のある成分を捕捉すること、および質量分析シーケンシングを行って該捕捉成分を同定すること、をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4 2】

細胞標本が置かれる基質の表面が細胞合着の 2 次元マトリックスを提供し、かつ異なる層を通して細胞標本の成分を移動することで第三の次元を提供し、細胞合着の該 2 次元マトリックス中の細胞標本の成分の位置と 3 次元マトリックス中の移送された成分の位置との間に同定可能な相関がある、層状化した基質を通した該細胞標本の成分の移送によって 3 次元マトリックスを生成する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の 3 次元マトリックスを伴う基質。

【請求項 4 4】

以下の段階を含む、細胞標本を分析する方法：

隣接する面をもつ多数の異なる層を含み、各層が細胞標本の成分と相互作用しこれを捕捉することができる対応する捕捉分子を含む、基質を提供する段階；

細胞標本を該基質の表面に接触させ、かつ標本の無処置の成分をマトリックスの異なる層の隣接表面を通して移送する段階であって、細胞標本の 2 次元構造が移送の際に保存される段階；

20

該標本の無処置の成分を該捕捉分子と反応させる段階；および

異なる層の中の捕捉パターンを該細胞標本の 2 次元構造と相関させる段階。

【請求項 4 5】

細胞標本中の成分の量と相関する量の成分を捕捉分子が捕捉する、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

無処置の成分が、タンパク質分解反応または核酸分解反応の処理段階に供されていない 1 つまたはそれ以上のタンパク質または核酸を含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 7】

30

基質の表面への細胞基質の接触が、基質の表面に複数の異なる細胞標本を接触させることを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 8】

異なる層における捕捉のパターンが 3 次元マトリックスを生成し、該 3 次元マトリックスと細胞標本中の特異的細胞構造との間に相関がある、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 9】

標本の無処置の成分の移送が、多数の異なる層を横断して電流が流れるように基質の隣接面に電流を流すことを含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 0】

多数の異なる層が多数の隣接した導電性ゲルを含み、電流が該導電性ゲルを通過する、請求項 4 9 に記載の方法。

40

【請求項 5 1】

標本の無処置の成分の移送が毛管現象による移送を含む、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 5 2】

多数の異なる層が、細胞標本に毛管圧を与える隣接したニトロセルロース層を含む、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

細胞標本を接触させることができ、かつ細胞合着的に維持することができる表面を有する層状化された基質を含む装置であって、該基質の連続層が、該細胞標本の対応する無処置の成分と相互作用することができ、かつ該対応する無処置の成分を保持することができ

50

る種々の同定分子を含み、

該層が互いに隣接し導電性であり、かつ細胞標本の2次元構造と成分の移送先である基質中の位置との相関を維持したまま該細胞標本の無処置の成分を該層を通して通過させることができる層を含む、細胞標本を分析するための装置。

【請求項54】

層状化された基質が、成分を該基質に通過させるための毛管圧を細胞標本に与える能力を持つ、請求項53に記載の装置。

【請求項55】

層状化された基質が多孔性のニトロセルロース層である、請求項54に記載の装置。

【請求項56】

層状化された基質が導電性である、請求項53に記載の装置。

【請求項57】

基質の表面を通して該基質の異なる層に電流を流すため、該基質に対して位置決めされた電極をさらに含む、請求項56に記載の装置。

【請求項58】

基質の表面上の細胞標本をさらに含む、請求項57に記載の装置。

【請求項59】

細胞標本の無処置の成分が層を通して移送されて3次元マトリックスが確立され、該3次元マトリックス中において表面上の細胞構築が複数の層中の固有の成分と相関する、請求項58に記載の装置。

【請求項60】

連続層が実質的に平行である、請求項53に記載の装置。

【請求項61】

電流が層を実質的に横断する方向に流れる、請求項57に記載の装置。

【請求項62】

以下のものを含む、生物試料の分子分析のためのシステム：

面と面とを合わせて重ねられた多数の分離マトリックスを通して試料から該試料の成分を移動させるあいだ、該試料を保持することのできる試料支持体であって、該試料の2次元構造が該試料の成分の移動の際に保存される試料支持体；

面と面とを合わせて重ねられて隣接し、各々が該試料の1つまたはそれ以上の成分とハイブリダイズできる捕捉分子を含む、複数の分離マトリックス；

該試料支持体から面を通して該分離マトリックスの中へ、該試料の少なくとも1つの成分を移動させるための移送手段；

試料成分の移動中、複数の該分離マトリックスを面と面とを合わせた配置で保持し、しかし以後の分析が行えるよう複数の該分離マトリックスを互いに分離することを許容するハウジング；および

該捕捉分子と該試料の成分との間のハイブリッド形成をその中でさらに分析できる第二のハウジング。

【請求項63】

移送手段が、マトリックスの面を通過して電流が流れるように位置決めされた1組の電極を含む、請求項62に記載のシステム。

【請求項64】

移送手段が支持体の多孔性構造を含み、分離マトリックスを通して成分を移動させるための毛管圧が該多孔性構造により作成される、請求項62に記載のシステム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は細胞標本の成分の分離と同定に関する。特に本発明は発現スキャン法に関し、特に、対象とする標本成分の位置と標本の他の部分との空間的な関係を維持したまま標本成分を同定する方法を例として示す。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

発明の背景

ヒトゲノムプロジェクトおよび他の遺伝子発見構想により、ヒト遺伝子の数、ゲノム位置、および配列に関する情報が劇的に増加している。遺伝子に関する知識の増大を基礎として、生物試料のmRNAおよびプロテオミクスの解析を高スループットで行う新しい技術が開発され、正常な生理状態や病的な状態を反映する遺伝子および遺伝子産物を大局的な視点から見られるようになりつつある。拡大を続ける遺伝子データベースと新たに開発されつつある分析技術とを組み合わせることによって、正常な細胞生理や疾患状態の根底にある分子置換の理解が飛躍的に深まる可能性がある。しかし、ホールセルの組織試料などの多くの生物標本は細胞が複雑な不均質性を持っているため、その分析には依然として独特の難しさがある。

10

【 0 0 0 3 】

紙片に直接組織切片を乗せ、続けて電気泳動を行うことを最初に報告したのはリンドナー（Lindner）ら（1956）である。その後、サラビス（Saravis）ら（1979）はアガロースゲルを用いて、ボンテ（Bonte）（1978）はポリアクリルアミドゲルを用いて、対象のタンパク質をより良好に分離した。ネフホフ（Neuhoff）（1980）の概説に報告されているように、ホールセル組織に対してこれらの方法をルーチンに行うことは技術的な難しさのため普及せず、分離前に細胞溶解により試料からタンパク質を抽出する方法が主流となった。

【 0 0 0 4 】

より近年になってインツェディマーセク（Inczyedy-Marcsek）ら（1988）が、超薄層ポリアクリルアミドゲル上に直接置いた凍結保存試料に電気泳動と等電点電気泳動を行う方法を発表した。超薄膜ゲルを用いることによって試料の細胞を溶解することなく組織試料からタンパク質を抽出することが可能になり、当分野における初期技術者らによる技術的難点がいくつか克服された。また、シュマカー（Schumacher）ら（1990）も等電点電気泳動を用いて凍結保存切片内に存在する酵素、糖タンパク質、および神経ペプチドを同定する方法を発表した。このプロセスでは超薄層ゲル上に直接試料を置き、続いて等電点電気泳動を行う。インツェディマーセク（Inczyedy-Marcsek）らの方法でもシュマカー（Schumacher）らの方法でもゲルが用いられ、タンパク質または他の対象分子は電荷および分子量に関連した物理的特性に応じてゲル媒質中を移動する。しかし、これらのアプローチで得られる情報は測定中の試料に含まれる分子の総量であり、標本中に存在している種々の細胞種すべてに含まれるタンパク質と核酸の総計にすぎない。

20

30

【 0 0 0 5 】

クリオスタット組織試料に対する分析法として、等電点法および電気泳動、さらに免疫化学分析法が公開されている。具体的には、シュマカー（Schumacher）およびトルドルン（Trudrung）（1991）、ならびにファンデルスライツ（Van der Sluis）ら（1988）が、組織を直接等電点電気泳動した後ウエスタンブロット法を行うことによって、それぞれアルカリフォスファターゼおよびバソプレシンなどのペプチドを同定する方法を発表している。この免疫化学分析法では、対象とするタンパク質または分子を毛管現象により等電点電気泳動ゲルからニトロセルロース膜へと移動させる。次に、免疫染色法により膜結合タンパク質が検出される。ファンデルスライツ（Van der Sluis）ら（1988）は組織の連続切片にこの方法を適用することによって組織試料中のタンパク質のおよその位置を決定することを試みた。しかし、免疫検出プロセスの前に等電点電気泳動を行っていたため、その組織試料中のタンパク質の存在を示すことができなかった。

40

【 0 0 0 6 】

免疫組織化学（IHC）法およびインサイチューハイブリダイゼーション（ISH）法を用いた組織切片中の細胞集団の分子分析が行われている。ISH法はジン（Jin）およびロイド（Lloyd）（1997）が、IHC法はグローガン（Grogan）（1992）が概説している。これらの技術は、複雑な組織切片中で特定のタンパク質またはmRNAの細胞局在を調べる上で有用なツールとなっているが、いずれも3つの大きな難点を有している。第一に、IHC法およびISH法

50

では1つの試料につき1つの分子種しか分析できない。第二に、クロスハイブリダイゼーション法による人為的染色が検査結果の精度に大きく影響する。最後に、いずれの技術も発現量が中等度または低度であるタンパク質およびmRNAについては視覚化できる能力に限界がある。

【0007】

全組織試料から特定のサブセットの細胞を分離する技術が開示されている。たとえばエマートブック (Emmert-Buck) ら (1996) は、レーザーマイクロダイセクション技術を用いて、組織病理学的に定義された顕微鏡レベルの細胞集団を迅速に収集する方法を発表している。また、コノネン (Kononen) ら (1998) が説明しているような組織アレイでは、数百の別々の組織試料において個々の分子を同時に調べることができる。しかし、依然として当技術分野においては、細胞標本中に存在する特定のタンパク質または他の分子を分析する改善された方法が求められている。すなわち、いくつかの態様でもとの組織試料中の特定のタンパク質または分子の位置に関する情報を提供できる方法、および/または、IHC法およびISH法における問題点をいくつか回避できる方法である。

10

【0008】

開示の概要

本発明の開示では、細胞標本などの生物標本を分析するための方法、システム、および装置を説明する。方法には、それぞれ異なる同定分子を含む、マトリックスまたは層などの捕捉領域を持つ基質に標本を乗せる段階、および、基質中の各領域 (隣接する層など) に含まれる種々の同定分子との相互作用を許容する条件下で標本の成分を各領域を通して移送する段階、が含まれる。1つの態様では、電気泳動により、または細胞標本中を移動する移送緩衝剤の毛管現象により、細胞標本の成分が基質中 (基質中の異なるマトリックスまたは層など) を移送される。特異的な例では、実質的に平行な複数の層を通して連続的に成分が移送される。

20

【0009】

基質を通した細胞標本の成分の移送は、必要であれば標本の細胞構築を維持したまま行うことができる。いくつかの態様では標本の細胞構築を維持することが可能であるため、細胞成分と相互作用する種々の同定分子の位置と、細胞標本中の細胞成分の本来の位置とを相関させることができる。分析は、基質表面上の1つまたはそれ以上の異なった個別の細胞標本に対して行うことができる。細胞標本の例としては、組織切片 (特に腫瘍組織の切片)、細胞診断試料、マイクロダイセクションした細胞、および培養細胞が含まれるが、これに限定されない。通常よりやや厚く、約25~約50 μm で切り出した細胞分裂停止 (cytostat) 組織切片を用いることにより、存在量が中等度および低度である分子の検出能力が向上する。

30

【0010】

基質中の領域 (マトリックスまたは層など) の数は1~100以上とすることができ、各領域 (層など) の (たとえば) 厚さが少なくとも25 nmあれば、たとえば数百、数千、数万でもよい。特定の態様において、領域は基質の幅全体にわたっていてもよく (複数の層に)、標本の成分は各層を通常、横切る方向に移送される。ただし、層に対して実質的に平行または他の角度で移送されてもよい。基質の層に存在する同定分子は、たとえば細胞標本の成分と相互作用する抗体とすることができ、標本中に存在する関心対象の分子の同定に用いることができる。この他の同定分子の代表例としては核酸、ペプチド、受容体、およびリガンドを含むが、これらに限定されない。同定分子は、たとえば標本の成分を層中に保持する捕捉分子をふくんでいてもよい。この場合、捕捉分子と試料の成分との組合せと会合する検出分子、または同定分子で認識された領域とは異なる領域の成分と会合する検出分子に同定分子を暴露することによって分析を行うことができる。たとえば、関心対象の分子をタンパク質とし、同定分子にこのタンパク質の第一のドメインを認識させ、検出分子にこのタンパク質の第二のドメインを認識させることができる。

40

【0011】

別の特定の態様は、隣接する表面を持つ複数の領域 (層など) を有する基質を提供し、標

50

本を基質の表面に接触させ、かつ標本の成分（無処置の成分など）をマトリックスの各層の隣接表面を通して移送することによって、標本を分析する方法である。基質の各層には標本中のある成分と相互作用しこれを捕捉することのできる捕捉分子が1種類ずつ含まれている。標本の各成分は捕捉分子と反応し、各層の捕捉パターンを、標本に関する情報と相関させることができる。たとえば、ある層におけるある抗体との相互作用は、標本中にその抗原が存在することを示す。ある層における相互作用の位置を標本中の位置と相関させることができる。細胞標本の場合には、標本の採取源である組織標本の細胞構築を保存しておくことができ、これによって捕捉パターンと標本の細胞成分または細胞以下の成分とを相関させることが可能となる。

【0012】

本発明のいくつかの態様で用いられる捕捉分子は、標本中に存在する1つまたはそれ以上の関心対象分子のうち少なくともいくつかは基質中の下流の領域（層など）に移動するのを抑制する能力を持つ。この方法により、いくつかの態様において、複数の2次元パターンとして見ることで捕捉パターンが得られ、これを重ねると3次元本来のマトリックスを形成することができる。特異的な態様においては、この2次元パターンは標本中の関心対象分子の発現パターンまたは存在パターンを反映したものとなり、この点において細胞合着のものとなる。標本が細胞標本で、2次元パターンが細胞合着である場合、捕捉の3次元マトリックスは細胞標本中の特異的な細胞構築に相関させることができる。タンパク質またはmRNAの存在は特定の遺伝子産物の発現と関連していることから、いくつかの態様においてはこのスキャン法を発現スキャン法と呼ぶことができる。

【0013】

本発明の別の態様には標本分析用の装置が含まれる。この装置には、複数の領域（マトリックスまたは層など）を持つ基質が含まれ、標本は基質の表面に接触され、かつ細胞合着性などの空間的合着性が維持される。このような例において、連続した領域（基質の層など）は種々の同定分子を含んでおり、それぞれの同定分子は標本中の対応する無処置の成分と相互作用しこれを保持することができる。そしてこれは、基質層を通して移送する前にタンパク質分解、核酸分解、その他の分解を行っていない細胞標本でも実施することができる。この装置は、互いに隣接し、導電性があり、基質表面上の位置とその成分が移送される基質内の位置との相関を維持しながら各層を通して細胞標本の無処置の成分を移送させることができる基質層を有していてもよい。または、各層が分離していてもよい（特に成分が電気泳動によって移送される場合）。

【0014】

いくつか特定の例において、基質は、基質中に成分を移送させるため、標本に毛管圧をかけることができる構造にする。このような例の1つはニトロセルロース膜を積層化した構造である。電気泳動による移動が必要な場合は、たとえば基質中の各層を通るなどの電流を基質に流すため、位置を基質に対応させた電極を装置に含める。このような態様では、関心対象の成分が電流によって標本から基質中の1つまたはそれ以上の層へと移動する。液圧差による移動を利用する場合は、基質の層にわたって液圧差を生じさせこれを維持する手段を装置に含める。

【0015】

別の局面として、特定の態様では細胞標本などの生物試料に分子分析を行うシステムも含まれる。このシステムはたとえば、試料支持体、互いに隣接した複数の分離領域（マトリックスまたは層など）、移送手段、および少なくとも2つのハウジングを含むことができる。試料支持体は、試料の成分が試料から分離領域へと移動する間、試料を保持できるものである。分離領域はたとえば、表面同士を合わせて並べる（たとえば重ねる）ことができ、かつ各領域（たとえばマトリックスまたは層）は試料中の1つまたはそれ以上の成分にハイブリダイズできる捕捉分子を含む。本システムの移送手段は、試料支持体にある試料の成分を少なくとも1つ、試料表面から分離マトリックス中へと移動させることができるものである。移送手段としては、たとえば毛管現象、液圧差、またはマトリックスに電流を流すための1組の電極、がある。

【 0 0 1 6 】

本システムの特異的なハウジングの一例は、試料の成分が移動する間は複数の分離マトリックスを互いに面を合わせて並べた状態で保持するが、一方、以後の分析が行えるよう、それぞれの分離マトリックスを互いに分離させることができるものである。第二のハウジングは、捕捉分子と細胞標本中の関心対象の成分とのハイブリダイゼーションを分析するための場所である。

【 0 0 1 7 】

以下に添付の図面を参照しながらいくつかの態様を詳細に説明していくが、これにより、上述の、またその他の本発明の目的、特徴、および利点がより明らかになるであろう。本明細書に特定の態様の例が記載されていることは、これらが本発明に必要不可欠であるとい

10

【 0 0 1 8 】

いくつかの態様の詳細な説明

以下の詳細な説明では、捕捉領域を持つ基質に細胞標本を乗せる方法、および、細胞標本の成分を基質の捕捉領域を通して移送する方法を開示する。捕捉領域は基質中の識別可能な細区分であり、異なる基質領域はそれぞれ異なる同定成分を含む。また、移送は、細胞標本の成分が基質の各領域の各同定分子と反応できる条件下で行われる。それぞれの領域は、個々に識別可能な基質のサブユニットなど、様々な形態をとることができ、同定分子が懸濁または付着したマトリックスもこれに含まれる。マトリックスは必ずしも規則正しいアレイでなくてよく、深さが比較的浅く、かつ幅および長さのある表面をもつユニットを意味する。マトリックスの表面は基質が試料を通過する方向に対して平行でも、垂直でも、または他の角度でもよい。マトリックスは基質の幅全体に渡っていても渡っていなくてもよく、異なるマトリックス間で大きさ（幅、長さ、および深さなど）が実質的に同じでも異なっているもよい。マトリックスの一例は、互いに分離できてもできなくてもよい、一連の個別の薄い階層の1つである層である。基質は多くの異なる形態をとることができるが、説明のため、物理的に互いに分離できる層からなる基質として説明する。

20

【 0 0 1 9 】

この特定の態様において、生物標本（たとえば組織切片またはその他の細胞集団であり、本明細書では細胞標本と呼ぶ）は、各層を別個に分析しそれを本来の標本の細胞構築と関連させることができるよう、複数の層を持つ基質中に分離される。図1の前立腺組織の切片は、無処置の組織切片の顕微鏡像が様々に異なりうる様子を示しており、これらを利用して種々の分析の結果と関連させることができる。図1の前立腺組織の切片には、腫瘍と関連しないリンパ球である範囲1、腫瘍に隣接する正常な上皮である範囲2、低グレードの腫瘍である範囲3、支質である範囲4、高グレードの腫瘍である範囲5、過形成である範囲6、低グレードの前立腺上皮内新形成（PIN）である範囲7、腫瘍に隣接しない正常上皮である範囲8、および、腫瘍と関連したリンパ球である範囲9がみられる。無処置の細胞標本の種々の分子の性質を決定し、これらの分子の性質を組織の特定の部位と関連させることは重要な意味がある。本発明の層状発現スキャン（LES）法の特定の態様によってこれが可能となる。

30

【 0 0 2 0 】

層状発現スキャン法の一例を模式図として図2に示す。無処置の組織切片（たとえば前立腺切片30）、採取した無処置の細胞溶解産物32、または採取した細胞溶解産物34、などの1つまたはそれ以上の生物試料を用意し試料ゲルと呼ばれる超薄層ゲルの中または上に置く。試料ゲルを多層ゲルに接触させる。たとえば、多層の基質36の表面（上面など）に接触させる。

40

【 0 0 2 1 】

試料ゲルには、アガロース、ポリアクリルアミド、およびゼラチンを基礎としたマトリックスを含む、既知のゲルマトリックスを利用することができる。試料ゲルがアガロースである場合、その濃度はたとえば約0.1 % ~ 約5 %の範囲とし、「超薄」すなわち厚さ約0.10 μm ~ 1 mmとなるようキャストイングしてもよい。または、生物試料を多層基質36の中、

50

または上面などの表面上に直接置いてもよい。図を単純化するため、図2では無処置の前立腺切片30が多層基質36の上面に直接置かれている。

【0022】

基質層Aの表面は各層間の境界面に実質的に平行であり、この基質層Aの上面に標本30が直接置かれる。図示のため層の数は11とし（より多数の層、たとえば少なくとも数百または数千の層を使用することができる）、それぞれの層をA~Kで示している。各層は膜またはフィルムでもよく、それぞれ同定分子を1種類（またはそれ以上）含むことができる。同定分子は、特定の抗原を認識する抗体、または、標本中の相補的DNA配列にハイブリダイズすることによってプローブとして機能するDNA配列などである。同定分子は、A~Kの各層で異なっているようにても同じでもよい。

10

【0023】

標本30を層Aの平らな上面に置いた後、標本全体の二次元構造を維持したまま標本中の可溶性内容物を一連の層A~Kに通過させる（たとえば毛管現象または電気泳動により）。タンパク質や核酸など標本の成分が各膜を通過する際に、基質層中の同定分子が関心対象のタンパク質または分子と相互作用する。この相互作用が起こった後、各膜を分離し（図2B）、二次抗体またはDNA配列に暴露するなどしてさらに分析を行い、感度および特異度共に高い分子プロファイル、もしくは細胞標本の「発現スキャン（expression scan）」を得る。全組織標本に対して分析を行う場合は、最後の段階として、最初の組織標本に隣接する部位から切り出した基準標本を用いて、無処置の標本中の関心部位（細胞異形性の部位など）を発現スキャン法の結果と関連させることもできる。このようにして標本中の分子的特徴（特定のタンパク質の発現など）を組織学的に関心のある部位（前立腺嚢の浸潤など）と関連させることができる。この例においては、前立腺嚢の浸潤（またはより広義には転移）と関連付けた特定のタンパク質の発現の位置を決定することができる。

20

【0024】

この細胞標本分析の例では、各層がそれぞれ異なる同定分子を持つ層状の基質に細胞標本を乗せ、隣接した各層中の各同定分子と細胞標本中の成分とが相互作用できる条件下で成分を各層に通過させることを含む。細胞標本としては、組織切片、培養細胞、細胞診断試料が含まれるがこれらに限定されない。クリオスタット法で作製した腫瘍の組織切片は本方法に特に適している。組織切片の標準的な作製法はレフコビッツ（Lefkovits）ら（1996）が示している。関心対象の分子の量が、細胞あたり1~10,000コピー、または1~100コ

30

【0025】

本発明の方法で分析するための細胞標本を得るには、たとえばレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によって大きな細胞集団から関心のある細胞集団を採取してもよく、または採取した細胞集団の溶解産物を用いてもよい。マイクロダイセクション用の組織試料の作製方法はエマートブック（Emmert-Buck）ら（1996）およびボナー（Bonner）ら（1997）が発表している。エマートブック（Emmert-Buck）ら（1996）およびボナー（Bonner）ら（1997）が発表しているレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により、組織試料から関心対象の特定の細胞集団を採取することができ、1つの標本に含まれる種々の組織タイプの内容に対応した分析用試料を個々に得ることができる。図1は、調べたい集団を9つ含む組織試料を示している。この9つをそれぞれレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により個別に分離することができる。もしくは、腫瘍発達中のタンパク質発現またはmRNAの変化など、同じ組織を経時的に比較することも可能である。I型多発性内分泌腺腫の原因遺伝子meninなど、含有量が非常に少ないタンパク質またはmRNAを調べようとする場合は、マイクロダイセクションした細胞由来の高濃度の溶解産物を用意してこれを用いることができる。含有量の非常に少ないmRNAは、1細胞中の存在量が1~10,000コピー程度であろう。含有量の少ないmRNAを逆転写/ポリメラーゼ連鎖反応（RT

40

50

/PCR)法で増幅しておき、対応するcDNAを分析することも可能である。

【0026】

前述のとおり、作製した細胞標本は、分析前の取り扱いを簡便にするためゲルの上に置くことも可能である。いくつかの態様において、アガロースまたはポリアクリルアミドの超薄層ゲルを試料ゲルとすることができる。試料ゲルには、トリスホウ酸EDTA緩衝液に溶解した標準的な2%アガロースを用いることもできる。これを標準的な組織観察用スライドガラス上に200 μ lピペットし、カバーガラスをかけて、厚さ0.5~1mmオーダーの超薄層ゲルを作製する。試料ゲルは、細胞標本中の各成分の分離を補助することを目的として選択することができる。この分離機能は、基質36各層への特定の成分の移動を変化させるまたは促進するような、および/または、試料中に保持させたい成分の移動を遅らせるような、特定の構造を試料ゲルに持たせることによって達成できる。分離機能を補助する構造的変化としては、ゲルの細孔径を変化させることによるゲル濃度の変化、またはゲル組成の変化がある。後者の例としては酸性または塩基性の処方により特定の成分の移動を促進または遅延させる方法がある。試料ゲルの分離機能を必要としない場合は、2%、pH 7.4のTBEアガロースゲルなど、中性のゲルを選択することができる。

10

【0027】

ゲルの分離機能が必要なく、試料の物理的形態が適切な場合(たとえば組織切片の場合)は、基質36の第一の層A(図2A)の平らな上面に標本30を直接置く。ゲルを使用しない場合でも、分析する標本を事前に処理することによって特定の標的分子を選択的に基質層中に移送することができる。このような処理の一例は界面活性剤を含む移送緩衝液を用いることである。界面活性剤は、細胞膜(形質膜など)中に存在する成分の移送を促進する傾向を持つ。

20

【0028】

可溶化した細胞溶解産物、精製したタンパク質、または核酸を試料とする場合は、以下のように試料ゲルを作製することができる。厚さ2 mmの2 %アガロースゲルに「穿孔」して、試料の「ウェル」として機能する一連の穴を作る(直径はたとえば4 mm)。次に、試料を1%液体アガロースに添加し、ウェルに入れ、固化させて試料ゲル34を得る。この方法で作製した試料ゲルを基質層36の上に乗せることができる。

【0029】

図2Aに示す態様の層状基質36には、図2Aに示すように複数の隣接層とすることができ、かつ、図2Bに示すように複数の分離した(隣接しない)層に後に分離することができる、分離可能な材料の層(ニトロセルロースの層A~K、Schleicher and Schuell、ニューハンプシャー州、キーン、製品番号#BA-85)が含まれる。ニトロセルロース膜は、タンパク質がニトロセルロースに結合するのを阻害する阻害剤で処理することができ、同定分子と相互作用して捕捉されない限りタンパク質が層を通過できるようになる。細胞標本の成分が隣接層を通過した後、層を分離すると、各層に保持された成分を個別に分析することができる。

30

【0030】

この他の基質層の例として、高濃度アガロースゲル、低濃度アガロースゲル、高濃度ポリアクリルアミドゲル、低濃度ポリアクリルアミドゲル、および、ニトロセルロール紙のような多孔質膜などの膜があるが、これに限定されない。低濃度アガロースとは約0.1~約3%、高濃度アガロースとは約3%以上の濃度である。低濃度ポリアクリルアミドゲルとは約2~約20%、高濃度ポリアクリルアミドゲルとは約20%以上の濃度である。このようなゲルまたは膜は、機械的強度を提供するため、または基質各層間に細胞標本成分を効率的に移送させかつ成分が基質36を通過する際に試料(試料30など)の2次元構造を維持するための「接触物質」を提供するため、ポリエステル膜またはその類似物で裏打ちすることもできる。

40

【0031】

ニトロセルロース層は、層A(図2A)の上面に乗せた標本(標本34など)に毛管圧をかけ、標本の成分を各層に通過させる、多孔性層の例である。このような多孔性の層または膜

50

は膜の片面から他面への液体の移動を可能にし、標本に毛管現象を生じさせて標本中の可溶性成分を複数の膜に通過させる。多孔性層の細孔径は可能な範囲でどの大きさでも差し支えなく、典型的には細孔径約0.45 μm のニトロセルロース膜である。基質中の層の数は、図2Aおよび2Bには図示の目的でA~Kの11層が示してあるが、たとえば約1層から少なくとも2、5、10、さらには1000層にまで、幅広い数を取ることができる。層の数は、部分的には使用する結合分子または同定分子の数の違いに基づいて決定することができ、最終的には、細胞成分を基質に通過させる能力によってのみ制限される。基質の各層は全て同一の構造でも、または異なる基質の種類が混合していてもよい。

【0032】

本明細書に開示の態様の1つにおいて、基質中の各層（または他の種類の領域）に、1種類またはそれ以上の関心対象分子と相互作用する少なくとも1種類の同定分子のコピーを複数含浸させることができる。同様に、基質の各層は複数の異なる同定分子を含んでいてもよく、たとえば、各層（または他の種類の領域）に1種類またはそれ以上の同定分子を含ませることができる。基質の別の態様では、全ての層（または他の種類の領域）に同じ同定分子が含まれ、様々な基質の層を通過する際の差動的移送によって分離が行われる。差動的移送は、細孔径もしくはpH、または、多孔度もしくはpH勾配など、基質層の物理特性に層Aから層Kへの方角で変化をつけることによって促進することができる。同様に、他の態様においては、基質層の一部は同定分子を含まず、各層を通過する試料成分の差動的移送を促進させる働きをすることもできる。

【0033】

同定分子の代表例としては、抗体、核酸、ペプチド、受容体、リガンド、色素、染料、または比色酵素が含まれるが、これに限定されない。同定分子の具体例としては抗前立腺特異抗原抗体（Scripps、カリフォルニア州、サンディエゴ）、抗サイトケラチン抗体、抗アクチン抗体（Sigma、ミズーリ州セントルイス）、抗PB39抗体、および抗menin抗体（National Cancer Institute Core Antibody Lab、メリーランド州フレドリック）がある。同定分子は関心対象分子と特異的に相互作用することができる。たとえば、抗体の結合、または一本鎖DNA配列との相補的作用、またはより一般的に色素とその色素で染色される分子との相互作用などがある。関心対象分子が基質中の次の層へ移動するのが同定分子により妨げられる場合は、同定分子を捕捉分子と呼ぶ。

【0034】

試料中に存在する液体が基質中を毛管現象で移動することによって細胞標本の成分が移送される場合は、基質が互いに物理的に接触した複数の層（または他の領域）を持つことが望ましい。隣接基質層A~Kを用いることによって（図2Aのように）、拡散の影響が抑制され関心対象のタンパク質または分子が基質を正確に通過し、毛管現象による成分の移動も促進される。または電気泳動、ある種の等電点電気泳動、または荷電分子を移動させるその他類似の方法を用いて、成分を基質の層（または他の領域）に通過させることができる。電気泳動、またはその他の電気を用いた方法を実施する場合は、理論上、基質の各層はアガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルなど導電性のものを使用する。電気泳動を基礎とする方法は、一般的に、細胞標本から荷電種を分離する用途に限定されるであろう。しかし、電気泳動を用いる場合は隣接基質層を使用する必要がなくなる。たとえば、電気泳動された標本が通過する各層の間に導電性の媒質（たとえば液体、特に液体に塩を溶解することによって形成しうるような、イオンを含む液体）が存在する限り、各層は互いに離れていてもよい。

【0035】

試料成分を基質の層（または他の領域）に通過させる別の方法は、液圧差への応答による液体の移動によるものである。たとえば、圧縮ガスなどによる圧力を試料に与えて試料中に存在する液体を基質36へと押し出し通過させることができる。または、圧力のかかった別の液体を用いて試料成分を基質層のより圧力が低い部分に移送させることができる。試料中に存在する液体、または試料成分を基質層中へと運ぶための液体は、基質36において、試料（試料30など）を乗せた面と反対側を真空にすることによって、基質36の移送を促

進させることもできる。このようなアプローチにより隣接する液体媒質を確立することができるため、各層は隣接していてもしていなくてもよい。

【0036】

これら開示の例において、関心対象分子が基質層を通過した後は、各層を分離し、第二の抗体またはDNA配列など、最初の捕捉に用いたものとは異なる第二の同定分子を用いて分析を行うことができる。たとえば第二の抗体は、基質層中で抗原と結合した本来の抗体を認識する抗体など、特異的な結合剤とすることができる。第二の同定剤を用いることによって、発現スキャン法における特異度の高い染色シグナルを確実に得ることができる。

【0037】

各基質層を別々に分析する様子を図2A、2Bに示す。この例では、前立腺全体の断面に相当するヒト前立腺組織のホールマウント切片を基質の上面に乗せ、10層の捕捉層を通してニトロセルロース膜上まで移送させた。上皮を選択的に染色する抗サイトケラチン抗体を用いて、標準的なイムノプロット法に実質的に類似した方法でニトロセルロース膜を処理した。

【0038】

図3A（サイトケラチン抗体移送層）と図3B（同じ組織ブロックから切り出した隣接切片のヘマトキシリン・エオシン染色）とを比較すると、移送過程を通じて組織切片の基本的構造が保持されていることがわかる。

【0039】

この技術を用いた分子捕捉の特異性は、それぞれ異なる抗体を膜全体に結合させた10枚の捕捉層を通して前立腺組織のホールマウント切片を移送した実験でも確認された。組織切片の移送後、各膜を変性緩衝液に浸漬して捕捉された分子を取り出し、続いて抗PSA（前立腺特異抗原）を用いてイムノプロット法で分析した。電気泳動後で30 kDaの単一PSAバンドが分離されたことから、PSAが特異的に捕捉されていることが確認された。

【0040】

この方法により非常に高いスループットの分析が可能であることを示すため、PSA捕捉実験を繰り返し行った。ただし、捕捉層を100層とし、層#100に抗PSAを入れた。層#100でPSAが問題なく捕捉された。使用できる捕捉膜の数には制限がないと思われ、したがって本方法では、数百、さらには数千の層を用いた発現スキャン法が可能であり、これにより数千の分子種を同時に測定することができる。

【0041】

マイクロダイセクション法を行った試料に対するスキャン技術の使用法を示すため、3つの異なる被検体から9つの別々の細胞集団をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにより組織切片から採取し、可溶化し、9つの独立した5 mmスポットとして10層の捕捉層を通して移送した。層#10には抗PSAポリクローナル抗体を入れておいた。前立腺上皮細胞から採取した細胞集団を基質の最上層の左上に置いた。組織の移送後、層#10を抗PSAモノクローナル抗体でプロービングし、増強化学発光（ECL）で視覚化した。前立腺上皮を含む組織試料についてのみ特異的PSA染色が視覚化され、この結果は、PSAが上皮内に局在するという既知の情報と一致していた。試料2～9はPSA染色に対して適切に陰性であった。

【0042】

細胞構築が保たれることは、細胞所見と発現スキャン法で決定される分子の特徴との関係を調べることに役立つ。たとえば、リンパ球の存在を、他の層と関連する所見と関連させることができる。また、特定の受容体の発現を上皮に相関させる、またはマッピングすることができる。また、他の分子マーカーを化生または嚢浸潤の部位と関連付けることができる。

【0043】

基質層を個別に分析できることから、関心対象分子の複数の領域、すなわち、タンパク質のドメイン、またはRNA転写物のエクソンを調べることができる。これについては実施例で詳しく説明する。細胞標本中の関心対象成分の量に比例する量で同定分子が相互作用す

10

20

30

40

50

る場合は、本方法により、細胞標本中の関心対象成分の相対的な量を定量的に示すことができる。分離後に質量分析シーケンシングを行って捕捉されたアミノ酸配列の特徴を決定することもできる。

【0044】

以下に具体的な実施例を説明する。これにより本発明がよりよく理解されるであろう。

【0045】

実施例1

前立腺腫瘍におけるPSA、チューブリン、アクチン、およびサイトケラチンの同定
前立腺腫瘍の切片でLESを実施した。予備実験では関心対象タンパク質としてサイトケラチンを用いた。前立腺の薄切凍結切片を作製して、ヒト前立腺組織のホルマウントクリオスタット切片を用意した。切片の厚さは約10 μ mとした。図1に示すように、この切片は、正常上皮、前癌状態の部位、低グレードおよび高グレードの腫瘍病巣、ならびに癌細胞と相互作用しているリンパ球といった顕著な腫瘍宿主相互作用などを含む、生物学的に重要な複数の細胞集団を含んでいる。この切片を、組織観察用スライドガラス上にキャストした超薄層2%アガロースゲルに乗せた。切片を2%アガロース溶液で覆った。カバーガラスを切片の上に寄せ、かつアガロースを重合させて、組織切片を間に挟んだ2層の試料ゲルを作製した。この組織試料を含むアガロース試料ゲルを、1.75" X 1.75"、細孔径0.45のニトロセルロース膜 (Schliecher and Schuell、ニューハンプシャー州キーン) でつくった単層の基質の表面に接触させた。次にこの膜を、4 で一晩、抗サイトケラチン抗体 (Sigma、1:1000に希釈) でプロービングした。次にこの膜に対して、室温で30分間、ビオチン標識した二次抗体 (Sigma、力価1:5000) で2回目のプロービングを行った。製造業者 (Pierce、イリノイ州ロックフィールド) の推奨に従って増強化学発光 (ECL) を用いたオートラジオグラフィで膜を視覚化した。

【0046】

次に、膜の層中の「捕捉分子」の特異性を検証する実験を行った。上述の超薄層2%アガロースゲルの中に前立腺組織のクリオスタット切片20 μ mを用意した。この組織切片の成分を室温で一晩、毛管現象によって、隣接した10枚のニトロセルロース膜 (0.5" X 0.5"、細孔径0.45、Schliecher and Schuell) に通過させた。各膜には使用前にそれぞれ異なる同定分子、この場合は抗体を、室温で1時間結合させた。膜を1X PBSで10分間、3回洗浄し、室温で1時間、市販の阻害剤 (Pierce) で処理し、その後再度洗浄した。ニトロセルロース / 抗体膜 (図2のA~J) の調製は以下のとおりとした。

【0047】

【表1】

層	同定分子	供給源
A	抗 PB39, 644	NCI
B	抗アクチン	Sigma
C	抗チューブリン	Sigma
D	抗 PB39, 655	NCI
E	ポリクローナル抗 PSA	Scirpps、カリフォルニア州、サンディエゴ
F	抗 CAIR 1	NCI
G	抗 PB-39, 656	NCI
H	抗サイトケラチン	Sigma
I	抗 CD-3	NCI
J	抗 PB-39, 645	NCI

【0048】

1988年9月27日にマークス (Marks) に認められた米国特許第4,774,177号、または1988年2月23日にリング (Ring) に認められた米国特許第4,727,037号に開示されているような既知の方法に従って、ニトロセルロース膜に抗体を結合させた。これらの開示は参照によって本明細書に組み入れられる。

【0049】

ニトロセルロース層は、基質の上面に置いた標本に毛管圧を与え、標本の成分を各層を通して移送する多孔性層の例である。このような多孔性の層または膜は、膜の一面から他面への液体の移動を可能にし、標本に毛管圧を与えることによって標本中の可溶性成分を複数の層に通過させる。ニトロセルロースはタンパク質などの生体分子と強力に結合するが、たとえばタンパク質結合を阻害し、かつタンパク質または他の生体分子がニトロセルロース層を通過するのを促進するため、よく知られている阻害剤でニトロセルロースを変質させることができる。

10

【0050】

阻害剤は、試料の成分が基質を通過する際に基質との間で非特異的な相互作用をするのを防ぐ働きをする。「阻害剤」は、非特異的な結合を阻害するものの、特定の同定分子とその標的物との間の特異的な反応、たとえば免疫化学的反応などには活性を示さない、種々の添加剤に対して用いられる集合的な用語である。最も一般的な阻害剤はタンパク質の濃縮溶液である。このような溶液の例としては、10~20%ウシ胎仔血清、および、PBS、TBS、またはTBSTなどの緩衝液に溶解した5%脱脂粉乳がある。市販の阻害剤は、SuperBlock (商標)、Blocker (商標) BLOTTO、Blocker (商標) BSA、およびSeaBlock (商標) (Pierce Chemical、イリノイ州、ロックフォード)、および、非動物タンパク阻害剤であるNAP-SureBlocker (商標) (Geno Technology、ミズーリ州、メープルウッド) などを含む。

20

【0051】

移送後、各膜を別々に30 μ lのSDS試料緩衝剤 (Novex、カリフォルニア州、サンディエゴ) に浸漬し、捕捉された分子を取り出した。除去された可溶性分子を、4~20%トリスグリシンアクリルアミドゲル (Novex) 上で、110 Vで1.5時間電気泳動して分離した。40V、2時間で細孔径0.2 μ mのPVDF膜にタンパク質を移送し、力価1:1000の抗PSAモノクローナル分子 (Scripps) を用いて標準的なイムノプロット法で分析した。いずれの例においても、抗体で捕捉された分子のシグナルは適切な分子量サイズのバンドに限定されていた。

【0052】

阻害剤のみで処理した99枚の層と表面に抗PSAポリクローナル抗体を結合させた100枚目の層を用いて上述の実験を繰り返し、100枚の膜の層を通した移送の実行可能性を確認した。ウェスタンブロッティング分析の結果、層100にのみPSAが捕捉されていた。層1~99における非特異的なPSAの捕捉は阻害剤による前処理で回避することができる。層100に今度は抗マトリックスメタロプロテイナーゼ2抗体を用いて同様の実験を行った。ウェスタンイムノブロッティング分析の代わりにズッカー (Zucker) ら (1994) が開示しているゲル酵素電気泳動法を用いて、分離したタンパク質を分析した。したがって、数千の基質層を用いれば、組織試料中または分離した細胞集団中に存在する数千の分子を同時に測定することが可能となる。

30

【0053】

採取した細胞集団中のPSAの存在を検出するため、さらなる実験を行った。組織の種類によって識別される細胞集団を、エマートブック (Emmert-Buck) ら (1997) が発表しているレーザーマイクロダイセクション技術を用いてそれぞれ別々に収集する。図6に示すように、10の上皮試料1~10を試料ゲル上に一列に並べ、10の非上皮試料11~20を上皮試料のすぐ下の二列目に並べた。20の試料全てをニトロセルロース膜10枚 (A~J) からなる基質に移送した。このうち、膜Jのみ表面に抗PSA抗体を結合させておいた。移送後、10枚の膜をそれぞれ抗PSAモノクローナル抗体でプロービングし、上述の増強化学発光 (ECL) で視覚化した。最初の9枚の膜A~IはECLシグナルを発せず、このことはPSAが捕捉されなかったことを示していた。一方、膜Jでは上皮を含む試料 (試料番号1~10) の全てについてPSAが染色陽性となり視覚化された。この結果は、PSAが上皮に局在するという既知の知見

40

50

と一致している。試料11～20は上皮細胞を含んでおらず、PSA染色は適切に陰性となった。

【0054】

実施例2

前立腺特異抗原（PSA）の選択的捕捉

基質層内で分子捕捉が選択的に行われることを示すため、5名の患者の組織標本から細胞試料を採取し、標準的なタンパク質抽出緩衝液中に溶解した。試料は、正常肺、肺癌、食道癌、正常前立腺、および乳癌組織の溶解産物を含んだ。それぞれの細胞溶解産物を、捕捉膜セットの最上層に設けた互いに独立した直径4 mmのスポットに入れた。これは、厚さ2 mmのアガロースゲルに直径4 mmの穴（「ウェル」）をあけ1 %液体アガロースに溶解産物を添加し、4 mmウェルをこの溶解産物 / アガロース溶液で満たして凝固させて達成した。このようにして作製した試料ゲルを捕捉膜セットの最上層の上に置いた。さらに、精製PSAを陽性対照試料として用いた。この実験では、それぞれ異なる抗体を結合させた10層のニトロセルロース層で捕捉膜を構成した。抗PSAポリクローナル抗体を層番号10（連続捕捉膜の10枚目）に結合させた。6つの組織試料を基質の上面に置き、毛管現象によって捕捉膜を通して移送し、続いてそれぞれの膜を分析した。図4Aは抗PSAモノクローナル抗体でプロービングし、増強化学発光（ECL）で視覚化した後の捕捉層10である。試料1（精製PSA）および5（正常前立腺組織）からは陽性のシグナルが出ており、このことはPSAが問題なく捕捉されたことを示している。試料2（正常肺）、3（肺癌）、4（食道癌）、および6（乳癌）はPSAを含んでおらず、結果も適正に陰性となった。

【0055】

最上層に乗せた各試料の位置は、試料が通過した膜上で実質的に保存され、かつ再現されていた。このように空間的關係が実質的に維持されるため、得られるパターンを本来の標本と容易に相関させることができる。

【0056】

実施例3

PSA捕捉の特異性

捕捉プロセスの特異性を示すため、前立腺組織の単一の試料を溶解し、実施例2に上述の捕捉層セットに移送した。ただし、抗PSAポリクローナル抗体を膜5に入れた。前立腺組織を移送した後、各膜を変性緩衝液に浸漬して、捕捉された分子を取り出した。続いて、各膜から得られたタンパク質をゲル電気泳動で分離し（層1から得られたタンパク質をレーン1に、層2から得られたタンパク質をレーン2に流した。以下同様）、抗PSAモノクローナル抗体を用いてイムノプロット法で分析した。図4Bは捕捉層1～9の結果を示している。レーン5（抗PSA抗体が結合された層5を示す）には、 $M_r = 30,000$ （30 kDa）の位置に明確なPSAバンドが現れている。他の捕捉膜はPSA陰性である。この結果は、PSAがその抗体を含む膜だけに捕捉されたことを示している。さらに、イムノプロットで単一のバンドが得られたことは、実施例2の捕捉膜で得られたECLシグナルがPSAに特異的であったことを示している。

【0057】

高スループットな分析法としてのこの方法の可能性を示すため、同様の実験を繰り返した。ただし、101層の捕捉層に組織を通過させ、層100に抗PSA抗体を入れた。図4CはPSAが問題なく特異的に捕捉されたことを示している。レーン100（抗PSA抗体が結合された層100を示す）だけが、 $M_r = 30,000$ （30 kDa）の位置に単一の明確なPSAバンドを示している。他の捕捉膜はPSA陰性である。これだけ多数の層を通過させても特異的かつ選択的に捕捉が行われたことは、各層に異なる捕捉剤を入れることにより、層状発現スキャン法を用いて数百、数千、さらには数万の分子種を同時測定できることを示している。

【0058】

実施例4

活性酵素の捕捉

層状発現スキャン法による活性酵素の捕捉および分析が可能であることを示すため、実施

10

20

30

40

50

例3に上述した10層の実験を行った。ただし、捕捉層5には抗PSA抗体の代わりに、抗マトリックスメタロプロテイナーゼ2 (MMP-2) 抗体を結合した。精製MMP-2タンパク質を捕捉層に通過させ、続いて各膜をゼラチン酵素電気泳動法で分析した。図4Dに示すように、捕捉層5に対応するレーン5の $M_r = 72,000$ (72 kDa) に単一のバンドが出ており、これはMMP-2が問題なく捕捉されたことを示している。抗MMP-2抗体を含まない層に対応する他のレーンは全てMMP-2陰性であった。

【0059】

実施例 5

核酸の選択的補足および特異的捕捉

この実施例は、層状発現スキャン法により核酸分析ができることを示すものである。それぞれPOV1遺伝子 (PB39, NCI) および アクチン遺伝子 (Clontech、カリフォルニア州パロアルト) のcDNAを含むプラスミドから、 ^{32}P 標識PCR産物 (200 bp) を増幅した。この放射能標識したPCR産物をアガロースゲルから取り出し、各産物の5%を、実施例2で説明した組織試料のようにそれぞれ独立した4 mmのスポットに入れた。PCR産物を6X SSCを用いて一晩、毛管移送により10層の捕捉層を通して移送した。この実験では、捕捉層を2%アガロースゲルの超薄層 (<50 μm) で構成した。捕捉層5に、POV1遺伝子の全cDNAを含むプラスミドを入れた。層5を作製するあいだに、最終濃度が30 ng/ μL となるようゲル重合前のアガロースにPOV cDNA含有プラスミドを添加した。膜セットの通過後に捕捉されなかったPOV1および アクチンのPCR産物を結合させるため、ブロックしていないニトロセルロース膜を使用した。移送後、各層を分けX-OMATラジオグラフィで視覚化した。図5は、POV1 cDNAが層5で選択的に問題なく捕捉され、一方、全層を通過したアクチンのPCR産物はブロックしていないニトロセルロース層に到達して反応するまで捕捉されなかったことを示している。

【0060】

実施例 6

無処置の組織切片の移送

上述の実施例は、組織試料を適切に採取し可溶化すれば層状発現スキャン法による分析が可能であることを示している。層状発現スキャン法は、無処置の組織切片の分析にも用いることができる。無処置の組織切片を試料として用いる場合、組織切片の2次元構造を、移送後特定の捕捉層に位置づけされる細胞成分の2次元パターンと関連させることができる。

【0061】

組織切片の2次元構造が維持されることを示すため、前立腺全摘出標本から得た厚さ10 μm のヒト前立腺ホルマウントクリオスタット切片を、10層または100層のアガロースゲルセットの上面に置いた。この無処置の組織切片を一晩室温にて毛管現象によって各層を通して移送した。各層は1.75平方インチ、細孔径0.45 μm のニトロセルロース膜とした (Schleicher and Schuell)。組織切片の移送後、抗サイトケラチン抗体 (Sigma、希釈1:1000) で各ニトロセルロース膜をブローピングして上皮要素を選択的に同定し、製造業者 (Pierce) の推奨に従ってECLで視覚化した。

【0062】

図3 A~Dは、移送した切片 (図3Aおよび図3C) とヘマトキシリン・エオシン (H&E) 染色した隣接切片とを比較したものであり、これによって移送過程を通じて組織切片の基本的な構造が保たれていることがわかる。移送した切片の全体的な構造は対応するH&E染色切片と非常によく類似しており、組織切片中の個々の腺上皮要素の位置を確認することができる。このように、層状発現スキャン法を用いて、組織切片の2次元構造と捕捉層に移送される成分の2次元的位置との相関を維持したまま無処置の組織切片を分析することができる。分解能を単一細胞レベルにすれば、特定の分子の有無について個々の細胞を分析することができる。たとえば前立腺癌において、正常な腺、前癌状態の病巣、ならびに高グレードおよび低グレードに腫瘍化した腺、さらには腫瘍化した腺のうち前立腺嚢に浸潤しているものなど重要な部分集団も全て同時に分析することができるであろう。または、

分解能を顕微構造レベルにすれば、特定のタンパク質の位置を個々の細胞小器官まで特定することができる。

【0063】

実施例7

層状発現スキャン膜

これら実施例で用いられている同定および捕捉の層を作製する上で有用な膜およびゲルは、以下の特性を1つまたはそれ以上有していてもよい。第一に、個々の同定分子または捕捉分子（例：抗体、核酸、および色素）を固定可能である特性。第二に、試料から移動してきた細胞成分が層のセットを効率的に通過し適切な層で蓄積または反応するのを許容する特性。第三に、生物試料の2次元的な関係が失われるのを最小限に抑えながら生物試料の移送を促進する特性、である。

10

【0064】

層状発現スキャン用の層のセットを構築するのに適した材料の例としては、ニトロセルロース膜、誘導体化ニトロセルロース膜、高濃度アガロースゲル、低濃度アガロースゲル、高濃度ポリアクリルアミドゲル、低濃度ポリアクリルアミドゲル、および、ニトロセルロース紙のような多孔性膜などの膜がある。低濃度アガロースとは約0.1～約3%、高濃度アガロースとは約3%以上の濃度である。低濃度アクリルアミドとは約2～約20%、高濃度アクリルアミドとは約20%以上の濃度である。

【0065】

各層は2つ以上の膜またはゲルからなるものでもよい。たとえば、ポリエステル膜などの極性ポリマー膜といった薄層ポリマー膜をニトロセルロース膜、アガロースゲルまたはポリアクリルアミドゲルと組み合わせて層状発現スキャン用の複合膜をつくることができる。

20

【0066】

ある特定の態様において複合膜は以下のようにつくられる。薄い（10 μm）ポリエステル膜をバックボーン層として用いる。次に2%アガロースなどの可溶性重合材料でポリエステル膜をコーティングし、ポリエステルのバックボーンを覆う超薄層（< 1 μm）を形成する。ポリエステルのバックボーンに塗布する前に、重合材料に捕捉分子（例：抗体または核酸）を添加しておく。バックボーンにコーティングされたポリマーはゲルを形成し、そのゲル構造の中に捕捉分子を不可逆的にトラップする。この捕捉分子を含んだポリエステルバックボーン/ポリマーゲルの複合膜を、層状発現スキャン法の捕捉膜として用いることができる。実験により、このような複合膜が上述の基準に見合って極めて有効であることが確認されている。複合膜が特に有する利点は、ポリエステルバックボーンにコーティングされたポリマーゲルが各層間の「接触物質」として機能し、それによって試料内の2次元構造に対応する関係が失われるのを最小限に抑えながら生体分子を効率的に移送させるという点である。

30

【0067】

実施例8

腫瘍の進行中における関心対象分子の結合状態または結合相手の決定

腫瘍の進行期によって識別される複数の腫瘍細胞集団を、エマートブック（Emmert-Buck）ら（1997）が発表しているレーザーマイクロダイセクション技術を用いて個別に収集する。各細胞集団を、実施例1のように試料ゲル中のそれぞれの位置に置く。試料ゲルを多層基質の上に置く。基質のうち少なくとも1層には、関心対象分子と結合する1つまたはそれ以上の既知の結合相手に対する抗体を架橋しておく。分子は架橋剤で処理しておくことができ、これによって結合相手は移送中もクリオスタットの準備時と同じ状態に保たれる。細胞集団の成分が上述のように基質層を通して移送されたら、各層を分け、関心対象分子をゲルに流して捕捉抗体でプロービングする。この実験ではこのようにして、組織試料作製時のその化学種の分子量を決定することによって、腫瘍進行の様々な段階において関心対象分子が結合されているかフリーの状態かを示すことができる。

40

【0068】

50

新しい結合相手を検索するには、移送前の架橋を行わずに上述の結合状態決定実験を行う。細胞標本を移送した後は、質量分析を用いて、関心対象のタンパク質と共に捕捉されたタンパク質を決定することができる。ハング（Huang）ら（1999）が発表しているように、捕捉分子から分離しゲル内に単離した後にMS-MS（質量分析 - 質量分析）シーケンシングを行うことによって、マイクロダイセクションした比較的少数の細胞から得たタンパク質を同定することができる。

【 0 0 6 9 】

実施例 9

正常細胞集団と疾病細胞集団との比較発現

LESは、組織試料中で疾患に関連して生じた分子置換を検索するための「オープンシステム」として使用することができる。この例では、正常な細胞試料と疾病の細胞試料とを実施例1に記載の試料ゲルに入れる。膜の層に架橋される情報分子には、抗体、ペプチド、または、既知のタンパク質またはssDNAまたはmRNAのライブラリに対応するDNAを用いることができる。多数の捕捉分子を同時に用いて、正常細胞集団と疾病細胞集団とで捕捉分子のターゲットの発現を比較分析する。分析対象の試料は1人の患者のものでも複数の患者のものでもよい。正常細胞と疾病細胞とでタンパク質または核酸の発現が異なることが示されたら、そのタンパク質または核酸に結合する捕捉分子によってそのタンパク質または核酸を同定することができる。この同定結果は標準的なシーケンシング技術で確認することができ、またはそのようなシーケンシングを最初に行っておいて、捕捉分子のターゲットが未知のものかを知ることができる。

【 0 0 7 0 】

実施例 1 0

腫瘍の進行中における関心対象のタンパク質の構造決定

腫瘍の進行期によって識別される種々の細胞集団を、エマートブック（Emmert-Buck）ら（1996）が発表しているレーザーマイクロダイセクション法を用いて個別に収集する。各細胞集団を、実施例1のように試料ゲル中のそれぞれの位置に置き、試料ゲルを基質の上に置く。基質の膜のうち少なくとも1枚には腫瘍抑制タンパクに対するポリクローナル抗体を架橋しておく。細胞集団の成分が基質層を通して移送されたら各膜を分ける。分子を捕捉した抗腫瘍抑制タンパクの膜を、腫瘍抑制タンパクの異なる領域を認識する、それぞれ異なる標識をつけた2つのモノクローナル抗体でプロービングする。抗体の1つはタンパク質のN末端に特異的なもの、もう1つはC末端に特異的なものとする。腫瘍進行の様々な時期についてタンパク質のN末端またはC末端の有無を比較することにより、腫瘍進行のある時点で腫瘍抑制タンパクが切断されるかどうかを検出することができる。変異はタンパク質切断につながる事象の一例である。スミス（Smith）ら（1993）が報告しているように、たとえば腺腫性結腸ポリポシス症（APC）の腫瘍抑制遺伝子産物にみられるように、正常細胞と腫瘍細胞との移行においてこのようなタンパク質の変性が起こることが知られている。

【 0 0 7 1 】

実施例 1 1

試料ゲルからの差動的移送の利用

最初に高濃度のゲル中に組織標本を入れると、移送が比較的小さいタンパク質に限られる。または、低濃度のゲルを用いると大きい分子の移送と分析ができる。正常な前立腺ではPSAが上皮細胞内のみに局在しているが、腫瘍においてはPSAが支質に入り込むことができるようになり、Chenら（1995）が記述しているように -1抗キモトリプシン抗体（ACT）に結合される。PSAとACTは、PSA単独より顕著に大きい凝集的な分子量をもつ酵素阻害剤複合体を形成する。組織試料を入れるゲルの特性を変えることにより、腫瘍中のPSAとPSA-ACT複合体とを別々に分析することができる。2 %アガロースゲル中に前立腺腫瘍の切片を置いたときは、PSAが選択的に膜で捕捉される。しかし、ゲルの濃度を0.5%まで下げると、PSAおよびPSA-ACTの両方が膜を通過し捕捉される。分子の移動に影響するよう実験濃度を変えることによって、特定の目的に合わせて実験をカスタマイズすることが可能であ

る。たとえば、細胞以下のレベルの分子プロファイルを調べるには、可溶性のタンパク質または膜に結合したタンパク質を選択的に可動化する界面活性剤を入れた、または入れない移送用緩衝剤を使用することができる。

【0072】

実施例12 自動発現スキャン法

本発明の層状発現スキャン法を、様々な用途の自動実験装置と組み合わせて使うことができる。たとえば、このプロトタイプシステムの捕捉層を透明な薄膜で置き換えて、数千の層を重ねても厚さがわずかに数ミリとなるようにすることができる。したがって、移送および検出または固定の間の組織試料の総移動距離が最小限となり、本システムの細胞分解能を最適化することができる。この用途では、組織試料、洗浄緩衝剤、および蛍光標識した二次検出分子を無処置の膜のセットに通過させる。これにより各捕捉層を分離して個別に処理する必要がなくなる。試料、洗浄緩衝剤、および蛍光標識した二次検出分子を重ねた層に通過させる際の方向は、試料成分を通過させるのと同じ方向でもよく、または、層とは逆方向もしくは層に沿った方向など別の方向でもよい。次に、無処置の膜のセットを共焦点蛍光顕微鏡で分析し、各層の発現データを取得して組織切片の高質な組織像に重ね合わせる。図4に示したものと同様の実験でこのアプローチを実施した。膜を無処置のセットとしたまま各検出試薬を捕捉膜に通過させた。捕捉および分析が問題なく行われた。

【0073】

また別の態様においては、重ねた層をスキャンとスキャンとの間に変性緩衝剤で洗浄して捕捉された分子を除去することにより、捕捉層のセットを繰り返し用いて発現スキャンを生成することができる。この目的に適した緩衝剤としては、界面活性剤または尿素などの変性剤、および塩化ナトリウムなどの塩を含む緩衝剤がある。それぞれの濃度は、重ねた層から捕捉された分子を除去するのに十分な濃度とする。適した変性緩衝剤の具体例の1つは、1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および500mM塩化ナトリウムを含む緩衝剤である。当業者にはこの他の変性緩衝剤も知られており、自動発現スキャン法の用途に適しているかどうかは、特定の変性緩衝液システムで層を洗浄した後、結合した分子がその層に引き続き存在しているかどうかを分析することによって決定することができる。

【0074】

別のアプローチでは、捕捉膜を分離可能なものとし、組織を移送した後、個別に処理する。分離した膜は、個々の分子の発現レベルを測定する以外にも詳しく調べることができる。たとえば、質量分析を行って、関心対象のタンパク質と共に「共捕捉」された結合相手を同定することができる。

【0075】

実施例13

クローニングされた個々の生体分子の分析

層状発現スキャン (LES) 法を用いて、細胞集団から取得され標準的な方法でバクテリア中にクローニングされたメッセンジャーRNAなど、クローニングされた個々の生体分子を分析することができる。

【0076】

特定の態様では、バクテリアを培地に培養し、標識したヌクレオチドの存在下で個々のコロニーを成長させる。次に個々のコロニーをLES装置の上面に乗せ、実施例5に記載のようなLES層のセットに各コロニーからの核酸を通過させる。各LES層には個々のcDNAクローンを入れておく。クローニングされたDNAがLES層のセットを通過したら、各捕捉膜上のハイブリダイゼーションの有無を分析することによって、全てのバクテリアコロニーのcDNAを同時に同定することができる。この特定の手法の1つの用途は、特定の細胞mRNA集団に由来する多数のバクテリアクローンを同定することによって、与えられた細胞集団の遺伝子発現分析を高スループットで行うことである。

【0077】

実施例14

細胞のゲノム内容の分析

層状発現スキャン法を用いて、個々の細胞の、または組織切片中の細胞のゲノムDNAの内容を分析することができる。その一例は以下のとおりである。

【0078】

一連の細胞株から取得したDNAを精製し、「タグ付けした」(放射能標識または蛍光標識した)ヌクレオチドで標識し、実施例2に記載のとおりLES装置の上部の膜に作った溝へ入れる。この特定の態様では、各LES層に特異的なゲノムDNAクローンを入れておく。DNA試料をLES層に通過させ、細胞試料由来のDNA断片を、対応するゲノムクローンを含むLES層と特異的にハイブリダイズさせる。次にLES層を(ラジオグラフィまたは蛍光により)分析して、LES層セットに含まれる各遺伝子座について各細胞試料のDNA量を定量的に測定する。この用途は、一連の細胞株内で増幅または消去されるDNAの特異的な領域(および関連遺伝子)を決定するのに役立つであろう。

10

【0079】

以上の実施例の多くは、分析対象材料の移動経路を横断する方向に連続した、個々のまたは分離した層を持つ層状基質と関連付けて説明したが、同じ原理を他の構成の基質にも適用することができる。たとえば、移動経路に対して実質的に平行に、または他の角度で、層を配置することもできる。他の態様において、各層をそれぞれ異なる捕捉分子を持つ複数の領域に細分割することもでき、これによりより複雑なパターンを精製することが可能である。パターンはユーザーまたは画像処理ソフトウェアによる認識が可能である。各領域は層内で任意の形状にすることができ、基質中を通る試料の移動方向に対してどのような方向でもよい。ただし、特に有用な態様においては、標本を接触させる基質の表面と関心対象分子を捕捉する領域との空間的相関を維持するため、各領域の方向は移動方向を横断する方向となる。

20

【0080】

開示した態様では、基質表面上の位置に対応する連続層内の相互作用パターンを調べているが、標本に含まれる分子に関する情報を伝えるものであればいかなるパターンを使用してもよい。特に複雑なパターン(基質の様々な深さに渡ってもよい規則的または不規則的なパターンで、各層に複数の種類の捕捉分子を置くことによって得られるような種類のパターン)を用いる場合は、パターンを保存し比較する上でパターン認識ソフトウェアが特に有効である。

【0081】

本発明の原理を適用できる態様は多数考えられる。したがって、上述の態様は本発明の特定の例にすぎないことが認識されるべきである。また、これらの態様は本発明の範囲を限定するものでもない。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲によって定義され、これら特許請求の範囲と精神に含まれるものは全て本発明に含まれる。

30

【0082】

参考文献

W. Bonte, Acta histochem. 62: 68-77 (1978).

Z. Chen ら、 Clin. Chem. 41:1273-82 (1995).

M. Emmert-Buck ら、 Science 274: 998-1001 (1996).

M. Inczedy-Marcsek ら、 Acta Histochem. Supp. 36: S377-94 (1988).

T. Grogan, Am. J. Clin. Pathol. 4(Supp. 1): S35-8 (1992).

Z. Huang ら、 Anal Biochem 268:305-17 (1999).

10

L. Jin and R. Lloyd, J. Clin. Lab. Anal. 11:2-9 (1997).

J. Kononen ら、 Nat. Med. 4: 844-847 (1998).

I. Lefkovits ら、 (編), Immunology Methods Manual (1996).

J. Lindner ら、 Naturwissenschaften 43: 201 (1956).

V. Neuhoff, Electrophoresis '79 (1980).

20

C. Saravis ら、 J. Immun. Meth. 29:97-100 (1979).

U. Schumacher ら、 (1990), Histochem. J. 22:433-438 (1990).

U. SchumacherおよびD. Trudrung, Anal. Biochem. 194: 256-58 (1991).

M. Schena ら、 Science 270: 467-469 (1995).

K. Smith ら、 Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 2846-2850 (1993).

P. van der Sluis ら、 Electrophoresis 9: 654-66 (1988).

30

L. Zhang ら、 Science 276: 1268-1272 (1997).

S. Zucker ら、 Clin. Exp. Metastasis 12:13-23 (1994).

【図面の簡単な説明】

【図 1】 前立腺切片の図である。本発明を用いて、前立腺の種々の部分および種々の細胞集団がどのように分析対象となりうるかを示している。この特定の態様において、この方法を層状発現スキャン (LES、Layered Expression Scanning) 法と呼ぶ。

40

【図 2 A】 本発明の方法の模式図である。ホルマウントの組織標本、採取した無処置の細胞、および、採取し溶解した細胞の3種類の出発標本を示している。また、本発明の基質の一例の拡大斜視図も示す。基質は互いに隣接する複数の多孔性の層からなり、各層内にはそれぞれ異なる同定分子が結合されている。

【図 2 B】 基質の1つの態様を示す。図 2 Aのものと似ているが、各層が分離している。

【図 3】 複数の捕捉層を通して移送される間、ホルマウント組織試料の2次元構造が維持されることを示す顕微鏡写真である。前立腺組織の無処置の切片 (図 3 B)、および、各層内にそれぞれ異なる種類の抗体が結合された捕捉膜層を毛管現象によって通過した後の像 (図 3 A) を示す。このヒト前立腺のホルマウント切片は前立腺器官全体の横断

50

面である。この切片を10層からなる捕捉層の最上層の上に置き、各層を通してニトロセルロース膜へと移送した。続いて、上皮を特異的に染色する抗サイトケラチン抗体を用いて標準的なイムノプロット法に類似した方法でニトロセルロース膜を処理した(図3A)。図3Bは同じ組織ブロックの隣接部位から切り出した切片をヘマトキシリン・エオシン染色したもので、これと図3Aとを比較すると、移送プロセス中に組織切片の基本構成が維持されていたことが確認できる。図3Cはホルマウント組織切片を100層に通過させた後のニトロセルロース膜を抗サイトケラチン抗体で染色したもので、図3Dは同じ組織ブロックの隣接部位から切り出した切片をヘマトキシリン・エオシン染色したもので、この2枚の図を比較すると、100層の捕捉層を通過させた後も組織切片の構造が維持されていることがわかる。

10

【図4A】 抗PSA抗体を結合させた捕捉膜で得られた染色パターンを示す。細胞溶解試料の5試料(うち1試料のみがPSAを含有)と、陽性対照である精製PSA 1試料を用意し、それぞれ独立した4 mmスポットとして10層の捕捉膜を通過させたものである。各捕捉膜にはそれぞれ異なる抗体を結合しておいた。

【図4B】 10層を重ねたLES層の各層をPSAについて電気泳動分析して得られた染色パターンを示す。

【図4C】 100層を重ねたLES層の各層をPSAについて電気泳動分析して得られた染色パターンを示す。

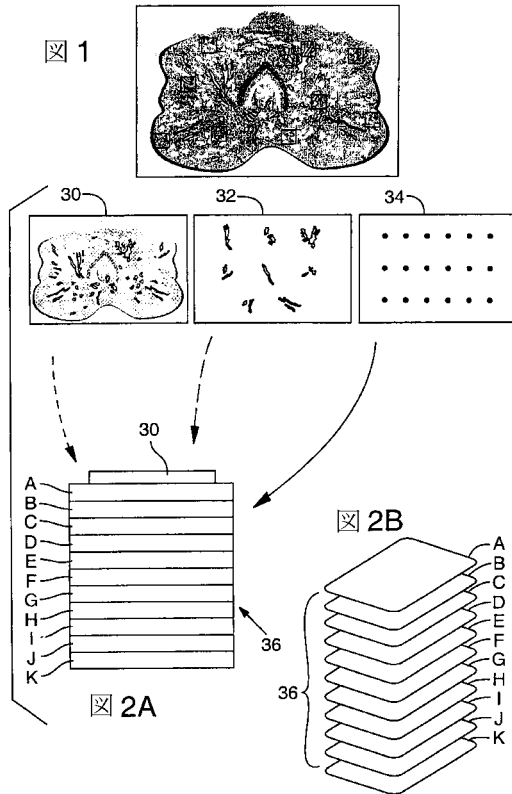
【図4D】 100層を重ねたLES層にmmp-2を通過させた後のゲル酵素電気泳動像を示す。

【図5】 povl転写物およびBアクチン転写物のPCR産物を放射標識しそれぞれ独立したスポットとして10層の捕捉層を通過させた後の、10層のLES層およびニトロセルロース膜のオートラジオグラフを示す。層5は完全なpovl cDNAを含むプラスミドと結合させた。ブロックしていないニトロセルロース膜(図中一番上)は、10層の通過中に捕捉されなかった転写物を結合させるために用いた。

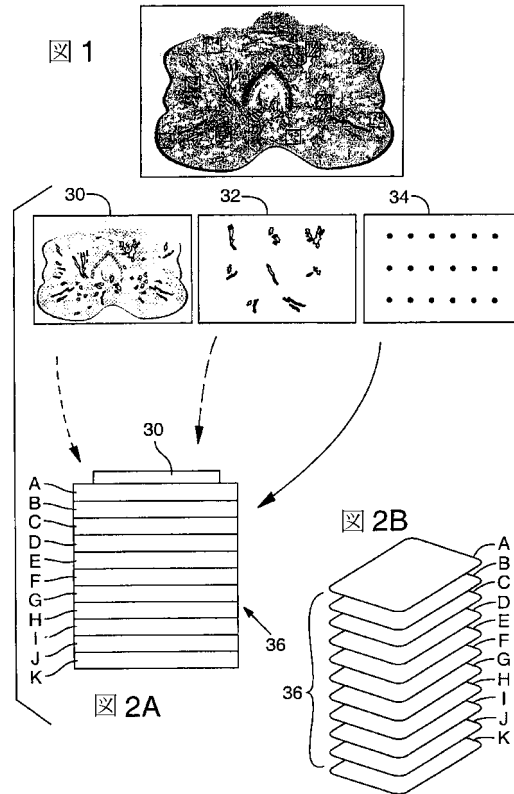
20

【図6】 10層(A~J)を通過させる、種々の20の試料を入れた出発ゲル、および第10層のPSA染色パターンを示す。

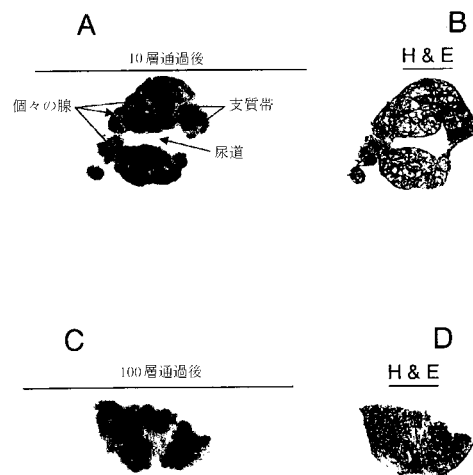
【図 1】



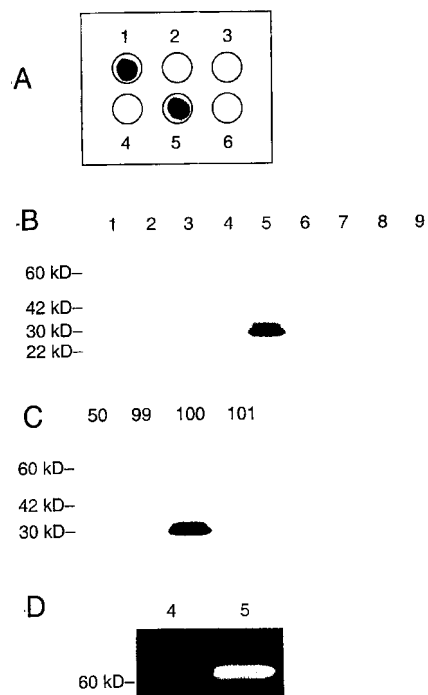
【図 2】



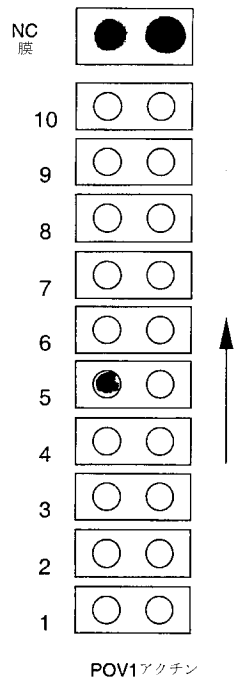
【図 3】



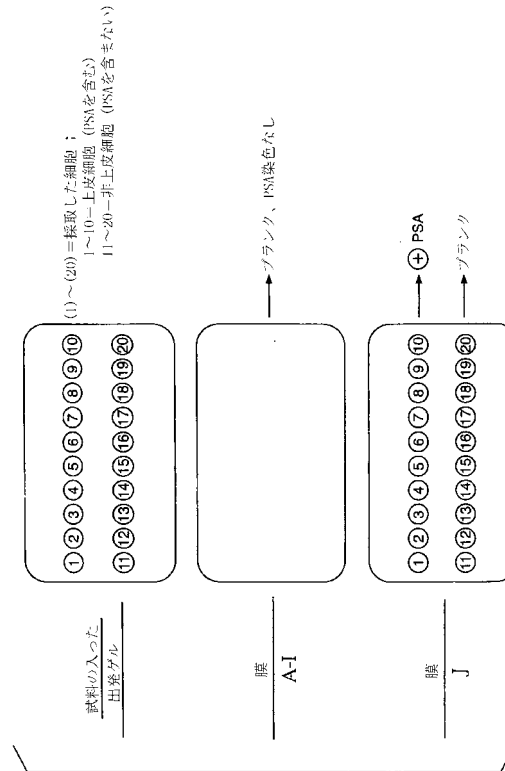
【図 4】



【図 5】



【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/543 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 2 1
		G 0 1 N 33/566	

(72)発明者 エメルト - バック マイケル アール .
 アメリカ合衆国 メリーランド州 シルバー スプリング セダー クリーク レーン 1 3 6 2
 0

審査官 福田 裕司

(56)参考文献 特開平 0 3 - 1 1 5 8 6 1 (J P , A)
 実公平 0 1 - 0 4 2 0 4 1 (J P , Y 2)
 特表 2 0 0 2 - 5 1 9 6 4 3 (J P , A)
 国際公開第 9 9 / 0 1 3 3 1 3 (W O , A 1)
 特開 2 0 0 0 - 0 7 8 9 9 8 (J P , A)
 特開平 0 1 - 2 4 4 3 6 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 35/00 ~ 37/00
 G01N 1/00 ~ 1/44
 G01N 33/48 ~ 33/98
 C12M 1/34
 C12Q 1/00