

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4558197号
(P4558197)

(45) 発行日 平成22年10月6日 (2010. 10. 6)

(24) 登録日 平成22年7月30日 (2010. 7. 30)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/48 (2006. 01)
 CO 7 B 63/00 (2006. 01)
 GO 1 N 33/566 (2006. 01)
 GO 1 N 37/00 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 Z
 CO 7 B 63/00 A
 GO 1 N 33/566
 GO 1 N 37/00 1 O 3

請求項の数 12 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2000-524662 (P2000-524662)
 (86) (22) 出願日 平成10年12月11日 (1998. 12. 11)
 (65) 公表番号 特表2001-526390 (P2001-526390A)
 (43) 公表日 平成13年12月18日 (2001. 12. 18)
 (86) 国際出願番号 PCT/US1998/026465
 (87) 国際公開番号 WO1999/030154
 (87) 国際公開日 平成11年6月17日 (1999. 6. 17)
 審査請求日 平成17年10月6日 (2005. 10. 6)
 (31) 優先権主張番号 08/990, 168
 (32) 優先日 平成9年12月12日 (1997. 12. 12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391008788
 アボット・ラボラトリーズ
 ABBOTT LABORATORIES
 アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット
 パーク アボット パーク ロード 1 O
 O
 (74) 代理人 100062007
 弁理士 川口 義雄
 (74) 代理人 100105393
 弁理士 伏見 直哉
 (74) 代理人 100114188
 弁理士 小野 誠
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 連続フォーマット高スループットスクリーニング

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

異なる物質の複数の試料の生物プロセスを強化又は阻害する能力を同時に試験する高スループット法であって、

a) 平坦である第 1 マトリックス上に個別物質の 96 個を上回る試料の各々の小容量をアレー状に堆積し、ここに、各個別物質をそれ自身の個別部位を中心にして位置させ、各個別物質がその堆積部位から同定されるようにし、

b) 均一に分散した第 1 アッセイ試薬を収容又は担持する多孔質の第 2 マトリックスに前記第 1 マトリックスを接触させて、個別物質を前記第 2 マトリックス中に拡散させ、拡散後の個別物質の位置を最初に堆積した第 1 マトリックス上の部位に相関させ、ここに前記第 1 及び第 2 マトリックスは分離可能であり、

c) 各個別物質と前記アッセイ試薬の相互作用を観察することにより、拡散した各個別物質の前記生物プロセスを強化又は阻害する能力を測定する前記方法であって、前記個別物質はビーズ上にはない前記方法。

【請求項 2】

請求項 1 の方法であって、さらに

d) 均一に分散した第 2 アッセイ試薬を収容又は担持する第 3 マトリックスに前記第 2 マトリックスを接触させて、第 2 アッセイ試薬を第 2 マトリックス中に拡散させるか、又は各個別物質と第 1 アッセイ試薬を第 3 マトリックス中に拡散させ、後者の場合、第 3 マトリックス中の各個別物質の位置が最初に堆積した第 1 マトリックス上の部位に相関できる

10

20

ように拡散を行い、

e) 前記 c の段階を行う方法。

【請求項 3】

均一に分散したアッセイ試薬の 1 種が高分子である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

均一に分散したアッセイ試薬の 1 種が酵素である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

均一に分散したアッセイ試薬の 1 種が粗生物抽出物である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

均一に分散したアッセイ試薬の 1 種がオルガネラである請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 7】

均一に分散したアッセイ試薬の 1 種が全細胞である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 8】

均一に分散したアッセイ試薬が前記第 2 又は第 3 マトリックスの 1 つの表面に担持した全細胞である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 9】

評価する生物プロセスが前記全細胞によるタンパク質の発現であり、タンパク質の可視化を助長する試薬の溶液もしくは懸濁液又は前記試薬を含む第 4 マトリックスと前記第 2 マトリックスを接触させることにより前記タンパク質の発現を観察する請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

第 1 アッセイ試薬が標識リガンドであり、第 2 アッセイ試薬が前記リガンドの固定化レセプターである請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

第 2 マトリックスを洗浄して、前記固定化レセプターに結合しなかった標識リガンドを除去する請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

洗浄により除去されなかった標識リガンドの可視化を助長する試薬の溶液もしくは懸濁液又は前記試薬を含む第 4 マトリックスと前記第 2 マトリックスを接触させる請求項 11 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の技術分野

少なくとも 1 個の多孔質マトリックスを使用する連続フォーマット高スループットスクリーニング (CF-HTS) によると、医薬産業は多数の化学種の広範な生物又は生化学活性を同時にアッセイすることが可能になる。更に、CF-HTS は多段階アッセイを実施するためにも有用である。

【0002】

発明の背景

生化学及び生物アッセイはタンパク質-タンパク質相互作用、酵素触媒反応、小分子-タンパク質結合から細胞機能に至る広範な系で活性を試験することを目的とする。「高スループットスクリーニング」(HTS) では、化学種の未知の生物又は生化学活性を見いだすためにこの種のアッセイを使用して多数の化学種を試験する。

【0003】

均質アッセイと不均質アッセイ

種々の生物アッセイは均質アッセイと不均質アッセイの 2 種類に大きく分けられる。均質アッセイでは、全試薬を同時に加え、付加操作なしに結果を測定又は解釈する。例えば、ペトリ皿で増殖させた細胞を薬品に暴露させることができる。薬品が細胞に対して毒性で

10

20

30

40

50

ある場合には、単純な観察により透明ゾーンから毒性を検出する。別の例として、細胞を変色させるタンパク質を発現する細胞を使用することもできる。x - g a lを含む寒天中で - ガラクトシダーゼ (- g a l) を発現する細胞を増殖させると、細胞は - g a l タンパク質が発現される程度に依存して多少なりとも青変する。そこで、 - ガラクトシダーゼ遺伝子等のレポーター遺伝子の発現に作用する生物学的段階の均質アッセイを構築することができる。均質アッセイの更に別の例では、酵素によりプロセシングされると変色又は蛍光を変化する物質を利用する。最後に、A m e r s h a m による S c i n t i l l a t i o n P r o x i m i t y A s s a y (S P A) 等の技術はシンチラントを含むビーズに固定したタンパク質又はリガンド結合物質と放射性リガンドの結合を直接測定する。上記例はいずれも最終検出、測定又はシグナル読み取りの前に試薬添加以外の段階を必要としないので均質アッセイである。

10

【 0 0 0 4 】

他方、不均質アッセイはある程度まで元々不適合であるため、1段階に組み合わせることができない少なくとも2段階を必要とする。例えば、多くの不均質アッセイは所定の順序で試薬を添加することが必要である(例えば、所定の試薬がアッセイの初期段階に干渉するが、後期段階を実施するためには必要である場合)。この一般的な例としては、シグナル発生試薬を添加して反応生成物の存在又は濃度を直接調べるアッセイが挙げられる。不均質アッセイの別の一般段階は洗浄段階である。アッセイの初期には過剰の試薬を添加しなければならないことが多いが、後続段階前に洗い流して高いバックグラウンドシグナルなしに反応が進行できるようにする必要がある。例えば、放射性リガンド結合アッセイでは、まず標識リガンドを固体表面に結合したタンパク質と共にインキュベートするが、実際には少数のタンパク質部位にリガンドのごく一部しか結合しない。インキュベーション後に過剰の未結合リガンドを洗い流し、結合放射性リガンドを正確に測定できるようにしなければならない。洗浄は濾過、洗浄/デカントサイクル、沈降/相分離及び/又は遠心分離等の種々の代替方法により実施することができる。

20

【 0 0 0 5 】

多数の生物及び生化学プロセスは不均質法だけで測定することができる。更に、他の生物及び生化学プロセスを均質法に適用することもできるが、これらの他のプロセスは不均質法のほうが費用効果的であり、及び/又は試薬を入手し易い。均質法に用いる方法及びキットは種々のものが市販されており、2、3の例を挙げると、S P A (A m e r s h a m)、蛍光偏光 (J o l l e y ら) 及び時分割蛍光 (P a c k a r d ら) が挙げられる。しかし、この種の方法を使用すると常に余計な費用と時間がかかる。多くのアッセイでは、不均質法のほうが確立しており、迅速に進行し易い。このため、E L I S A、フィルター結合、R I A、ルシフェラーゼ細胞アッセイ等の不均質法の使用は普及し続けている。これらの方法のいくつかについては追って詳述する。

30

【 0 0 0 6 】

高スループットスクリーニング (H T S)

過去数年間の間に医薬産業は薬品候補を見いだすために化合物のライブラリーの H T S をますます利用している。H T S は多数の個別化合物を平行して試験し、多数の試験化合物の生物活性を同時又はほぼ同時にスクリーニングする方法である。現在、最も広く確立している技術は96ウェルマイクロタイタープレートを利用する方法である。このフォーマットでは、96個の反応ウェルを含む単一の8cm x 12cmプラスチックプレートで96個の独立した試験を同時に実施する。これらのウェルは一般に50 ~ 500 µ l のアッセイ容量が必要である。プレート以外に、96ウェルフォーマットを広範な均質及び不均質アッセイに適合させるための多数の器具、材料、ピペッター、ロボット、プレート洗浄器及びプレート読み取り器が市販されている。

40

【 0 0 0 7 】

現在まで、H T S を改善する試みはウェルを小型にすること(小型化)に集中している。ウェル寸法を小さくすると、各プレートのウェル数を増し、より多数の平行試験が可能になる。更に、アッセイ容量を減らすことにより、試験当たりの試薬の費用も減る。更に、

50

より少量のアッセイ容量でより多数の平行試験を実施することができるので、薬品候補を見いだすためにより多数の化合物を同時に試験することもできる。これまでに、小型化は96ウェル技術を384ウェル(96×4)フォーマットに改善するに止まっている。Comleyら, J. Biomol. Screening, vol. 2(3), pp. 171-78(1997)参照。実際に、9600ウェルフォーマットといった高密度フォーマットも報告されている。しかし、小型化は費用と複雑さを伴う。

【0008】

これらの費用と複雑さはスクリーニングフォーマット小型化の主要な3要素に直接関係している。第1に、試験容器(チューブ、ウェル、ディンプル等)を小さくできなければならない。第2に、(通常は試薬を多数のウェルに同時に分配する液体操作ロボットにより)必要な全アッセイ試薬をより小型でより多数のウェルに正確に分配できなければならない。第3に、高密度アレー状の試験結果を「読み取る」ことができなければならない。

10

【0009】

独立した平行アレーが必要であるため、これらの各要素は小型化がどの程度実現可能又は費用効果的であるかという点に問題と限界を加えている。例えば、新規小型フォーマットによっては完全に別の試薬分配方法が必要であったり、新規小型フォーマットに適合可能な解像度、感度及び工学設計をもつ読み取り機器が必要である。各ウェルの寸法を減らすにつれ、容器アレーを作製し、より少量の試薬を分配し、各試料を読み取ることも困難になり、時間消費的で費用も増す。更に、少量の試薬を分配して強度の弱い試料シグナルを測定するのは不正確になり易いので、試料寸法を小さくすると試料間の統計的変動も増す。更に、試料寸法が所定点よりも小さくなると、蒸発や表面張力等の要因により新規小型化フォーマットの実施に更に費用がかかり、複雑になる。

20

HTS技術の大躍進に、産業界は「フリーフォーマットアッセイ」即ち試料間に物理的障壁のないアッセイの可能性を更に切望している。一般にウェルを用いないフォーマットで小液滴を試験することが予想されるが、標準個別化合物系でHTSでフリーフォーマットアッセイを使用することは実際には報告されていない。

【0010】

組み合わせライブラリーのスクリーニング-ゲル透過法

組み合わせ化学の出現により、数百万種の化学種を固体支持体(一般にビーズ)上で迅速に製造することができる。ビーズ結合ライブラリーをスクリーニングするために96ウェルフォーマットが使用されているが、このフォーマットは、(1)各ビーズに少量の化学種しか担持できず、(2)試験化合物数が非常に大きく、(3)ビーズは96ウェルマイクロタイタープレートで取り扱いにくいいため、一般に無効であるとみなされている。

30

【0011】

96ウェルフォーマットによる組み合わせライブラリーのスクリーニングに固有の問題を回避するために、「フリーフォーマット」と言うことのできる単純均質アッセイの使用が報告されている。1例として、組み合わせペプチドライブラリーの単純均質アッセイで色素細胞(メラノサイト)を使用するアッセイがJayawickremesら, Proc. Nat'l Acad. Sci. (USA), vol. 191, pp. 1614-18(March 1994)により報告されている。著者らによると、細胞をペトリ皿でアガロースに加えた後、組み合わせ化合物を担持させたビーズをアガロースの表面に加え、ビーズから化合物を部分的に放出させている。化合物がゲルマトリックスに局在拡散するにつれて活性化合物は細胞を変色させたので、活性化合物は暗色領域として可視化された。

40

【0012】

別の最近の例は、フィラデルフィア、PAで開催された生体分子スクリーニング学会第1回年次会議(1995年11月7~10日)で報告されたDaniel Chelskyの“Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches”である。Chelskyはゲル内の酵素がゲル全体を変色させるようにアガロースゲルの内側でカルボニックアンヒドラーゼの単純均質酵素アッセイを実施した。その

50

後、光リンカーを介して組み合わせ化合物を担持するビーズをゲルの内側に置き、化合物を紫外線により部分的に遊離させた。酵素を阻害した化合物は変色の少ない局所阻害ゾーンとして観察された。最後に、Molecular Diversity, v. 2, pp. 57-63 (1996) において Salmonらは Jayawickremeらの方法に似た方法を報告しており、寒天中で増殖する癌細胞に細胞毒性効果をもつ化合物について組み合わせライブラリーをスクリーニングしている。

全3例は抗菌又は抗癌剤の時間試験ゲルアッセイの変形であり、抗原/抗体相互作用をゲル中で測定する慣用免疫アッセイにも似ている。これらのゲル透過アッセイはビーズ結合組み合わせライブラリーのスクリーニングに好適であったが、このフォーマットを不均質アッセイ又は非ビーズ結合ライブラリーに拡大することについては報告されていない。

10

【0013】

従来の認識では研究者らは試料を混合できる連続フォーマットで試料を試験することができなかった。報告されているアッセイ種は少なく、連続フォーマットでは試料が混ざるという問題に挟まれ、ビーズ結合ライブラリーしかアッセイされていない。これらの制約により、研究者らは96ウェルフォーマットが不均質非ビーズ結合ライブラリースクリーニングに好適であると考えた。フリーフォーマット構成で不均質アッセイを実施できるならば望ましい。更に、フリーフォーマット構成で個別化合物を試験できるならば望ましい。

【0014】

発明の要約

本発明は連続フォーマット高スループットスクリーニング(CF-HTS)に関し、均質又は不均質を問わずに96ウェルフォーマットで実施可能な任意アッセイにフリーフォーマット概念を実現することができる。更に、CF-HTSは均質アッセイでなく不均質アッセイで組み合わせライブラリーをスクリーニングするためにも有用である。更に、CF-HTSは小型化に付随する費用と複雑さを伴うことなしに個別化合物をアッセイすることができる。試薬と試験結果が後続段階で混ざるといとう可能性に関する問題も認められないことが判明した。

20

【0015】

本発明の1態様は試料の生物又は生化学活性の試験に関し、

- a) 場合により1種以上のアッセイ成分を含む多孔質アッセイマトリックス内又はマトリックス上に複数の試料を導入する段階と、
- b) 多孔質アッセイマトリックスでもよいし、そうでなくてもよい少なくとも1種のマトリックスを使用して1種以上のアッセイ成分をアッセイに導入する段階と、
- c) i) アッセイで使用したマトリックスを洗浄し、過剰量の試料、アッセイ成分又はその組み合わせを除去するか、又は
- ii) アッセイで使用したマトリックスをバルク溶液中で又は液体として付加試薬と接触させる付加段階を実施する段階を含む。

30

【0016】

別の態様は、場合により1種以上のアッセイ成分を含む多孔質アッセイマトリックス内又はマトリックス上に複数の試料を導入し、少なくとも2種の付加マトリックスを使用してアッセイを実施することによる、試料の生物又は生化学活性の試験に関する。

40

【0017】

更に別の態様は、場合により1種以上のアッセイ成分を含む多孔質アッセイマトリックス内又はマトリックス上に96個を上回る試料を導入し、アッセイを実施することによる、96個を上回る試料の生物又は生化学活性の同時試験に関する。

【0018】

発明の詳細な説明

CF-HTSの中心思想は試料を多孔質マトリックスに関連させることである。この方法はゲル、プラスチックシート、フィルター又は他の形態の取り扱い易い固体支持体等のマトリックスの内部、上部又は下部に1種以上のアッセイ成分を配置するものである。多孔質マトリックスに加えると、試料は混ざらずにアッセイを実施できるように十分にゆっく

50

りと拡散する。従って、CF-HTSフォーマットは不透過性バリアーでなく拡散により試料を分離する。過度に長時間にわたって試験を続けると、試料と結果は混ざってしまうことがある。しかし、注意深くタイミングをとれば、CF-HTSは個々のウェル又は反応容器に溶剤又はアッセイ成分を充填する必要なしに、非常に高密度の化合物を同時且つ個々にスクリーニングすることができる。更に、反応成分を加えたマトリックスを操作することにより、このフォーマットではより複雑な不均質アッセイを実施することができる。不均質アッセイのマトリックスの操作は全く前例がなく、CF-HTSは広範な生物又は生化学プロセスをスクリーニングする能力において96ウェルフォーマットと同等の柔軟性をもつ。更に、CF-HTSは付随する欠点を伴うことなく小型化により予想される種の利点を達成すると共に、固有の利点をもつ。

10

【0019】

CF-HTSは広範なマトリックス及びアッセイ成分を利用する。マトリックスの非限定的な例としては、アガロース、アクリルアミド、又は他のゼラチン材料、膜、フィルター及びプラスチックが挙げられる。マトリックスは非限定的な例として、ポリスチレン、ポリプロピレン、他のプラスチック、紙繊維、ガラス、ガラス繊維、シリカ、ポリカーボネート、ポリエステル、ポリ塩化ビニリデン及びポリエチレン等の材料から構成することができる。マトリックスは不浸透性固体、多孔質固体（例えばフィルター）、又はゲルとすることができる。アッセイ成分の非限定的な例としては、核酸、タンパク質及び他の合成もしくは天然高分子等の高分子；細胞、細胞溶解液、生物抽出液、オルガネラ、及び他の複合生物体及び混合物；並びに緩衝液、塩類、阻害剤、基質、ペプチド、色素、ヌクレオチド、補因子、イオン及び溶剤等の小分子が挙げられる。

20

【0020】

CF-HTSアッセイは不浸透性バリアーではなく拡散により複数の試料又は化合物を分離するアッセイである。必須構成要素は場合により1種以上のアッセイ成分を含む多孔質アッセイマトリックス内又はマトリックス上に複数（2種以上の）試料を導入することである。アッセイ成分を含む多孔質アッセイマトリックスは、マトリックスに成分を添加、混合、注入、分配又は浸漬することにより調製される。多孔質マトリックスはアッセイ成分をマトリックスの表面内又は表面上にカップリング、塗布、結合、固定、連結、接合又は付着することによっても調製される。更に、多孔質マトリックスは細胞ベッド、酵素又は他の固定化アッセイ成分に溶液又は液体の薄膜を形成することによっても調製される。多孔質アッセイマトリックスはアッセイ成分を併用する場合に成分添加順序及び/又は期間、並びに混合及び拡散程度を制御するために使用される。

30

【0021】

CF-HTSは非多孔質マトリックスを使用してもよい。非多孔質マトリックスはアッセイ成分又は試料を非多孔質マトリックスの表面にカップリング、塗布、結合、固定、連結、接合又は付着することにより調製される。CF-HTSで非多孔質マトリックスを使用する場合には、アッセイ成分の1種以上を空間的に固定する。

【0022】

アッセイ成分をマトリックスの表面に導入すると、アッセイ成分はアッセイ成分を結合し易いように非修飾、修飾又は他の方法で前処理したマトリックスとの共有又は非共有、特異的又は非特異的相互作用により結合される。結合後に、アッセイ成分はアッセイ目的に固定化されるように空間的に固定される。この場合には、試料はアッセイ成分に到達するようにマトリックスに拡散できなければならないか、及び/又はアッセイ成分のサブ成分又は生成物は試料に到達するようにマトリックスに拡散できなければならない。

40

【0023】

試料を含む少なくとも1個の多孔質マトリックスを下記段階の任意の1段階以上で使用する。

【0024】

(1) 試料及び/又はアッセイ成分の1種以上が界面を通して拡散できるように多孔質マトリックスの表面を少なくとも1個の他の（多孔質又は非多孔質）マトリックスと接触さ

50

せる。

【0025】

(2) 2個以上のマトリックスを分離し、成分及び/又は試料の相互作用を停止する。

【0026】

(3) アッセイ成分が相互作用できるように2個以上のマトリックスの表面を相互に接触させる。

【0027】

(4) マトリックスを緩衝液又は他の溶剤で洗浄、リンス又は溶離し、未結合及び/又は非特異的に結合したアッセイ成分を除去する。

【0028】

(5) 溶液中のアッセイ成分をマトリックスに分配、注入、添加もしくは浸漬するか、又は前記成分をマトリックスで濾過する。

【0029】

(6) 1個以上のマトリックス上又はマトリックス中に存在する放射、蛍光、分光又は電磁シグナルを撮像、読取り、走査、検出又は他の方法で可視化する。

【0030】

CF-HTSは従来技術にまさる多数の利点がある。個別ウェルを使用しないため、アッセイ成分又は試薬をウェルに同時に正確に分配する必要がない。その代わりに、均質バルク操作によりアッセイ成分を分配及び混合する。アッセイ成分は均質バルク溶液又はマトリックスとして調製されるので、試料間の統計的変動は最小になる。これに対して、96

【0031】

更に、CF-HTSは多数の化合物を極めて高密度でスクリーニングすることができる。観察される正報が多少「混ざる」としても、正報の近傍の化合物を再試するだけでよい。例えば、10,000個の試料を可視化領域の周囲の50個の候補まで減らすことができたならば、従来の96ウェル技術でも50個の候補を活性化化合物に減らすのは容易である。

【0032】

個別化合物をプラスチックシート上に高充填アレー状に分配し、乾燥した後、CF-HTSを実施することにより、重大な小型化の全問題に対処する。このフォーマットは単にマトリックスに拡散する試料の量を制限することにより小型化を達成するので、小型化を達成するためにプラスチック又は他の材料を改変する必要が全くない。このフォーマットはアッセイ全体が試薬及び溶液をバルク操作する「単一巨大ウェル」でほぼ実施されるので、アッセイ試薬を分配するためにマイクロフルイディクスを必要としない。マイクロフルイディクスにより分配するのは試料のみである。更に、このフォーマットは均質マトリックスで不均質局在ゾーンを探すだけでよいので、統計的変動が著しく少ない。多数の異なるウェルを読み取って比較する必要がない。小型化に予想される全利点(費用、スループット、試薬使用、試験化合物使用)に加え、CF-HTSはアッセイの大部分の段階をバルク操作できる点などの驚くべき利点もある。

【0033】

CF-HTSの中心的側面は、アッセイ成分と試料がマトリックス間の界面でも横方向に迅速に拡散しないという知見である。例えば、アガロースゲルをプラスチックプレートに配置すると、ゲルの表面の界面にかなりの液体が存在する。(ELISAの場合のように)ゲル中のアッセイ成分とプレート上のアッセイ成分の間に相互作用が必要な場合には、ゲル中の成分はゲルからプレートに拡散できなければならない。しかし、CF-HTSは付随する横拡散をかなり遅くするので、プレート上の相互作用はゲル側成分の元の位置の近傍に局在する。ゲル、フィルター又は表面(又は他の任意のマトリックス)の任意組み合わせ間の任意マトリックス-マトリックス界面にこれらの同一原理が当てはまる。この拡散挙動が制御可能であり、一般に全マトリックス界面に適用できるという認識は前例がなく、従来の認識に反する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

試料又は化合物をマトリックス（例えばゲル又は湿潤フィルター）に導入する好適方法は、2個の試料が混合又はオーバーラップせずに各々特定位置に配置されるように、小容量の各試料をプラスチックシートの表面等の表面にアレー状に分配して乾燥する方法である。プラスチックシートをマトリックスに重ねると、試料は元のアレー中のそれらの所定位置に対応する位置でマトリックスに溶解及び拡散する。

【 0 0 3 5 】

試料をアレー状に分配する代替方法は、試料がマトリックス内でオーバーラップしないように各試料の分配容量を十分小さくするよう多孔質マトリックス（例えばフィルター）に試料を分配する方法である。より多量の液体を含む別の多孔質マトリックスに接触すると、化合物は拡散してアッセイを開始する。

10

【 0 0 3 6 】

ビーズに結合した組み合わせ化合物をマトリックスに導入する好適方法は、プラスチックシートの表面等の表面にビーズをランダム又は規則的アレー状に分配する方法である。その後、試験化合物がレービルリンカーによりビーズに共有結合している場合には試験化合物を遊離（開裂）させるようにビーズを処理することができる（光開裂及び気相酸開裂は当技術分野で周知である）。次に各化合物をその元のビーズにより占有されている領域と非共有的に結合させ、乾燥化合物をマトリックス内又はマトリックス上に導入することができる。

【 0 0 3 7 】

個別化合物をマトリックスに導入する代替方法は、浸漬又は他の方法で各化合物をビーズ内又はビーズ上に非共有的に結合する方法である。この方法を使用すると、各ビーズが固有の化合物を担持し続けるように多数の化合物をビーズ上で一度に混合することができる。その後、マトリックスに導入するためにビーズ混合物を表面に容易に広げることができる。この方法は少量液体操作が全く不要である。

20

【 0 0 3 8 】

C F - H T S スクリーンでマトリックスに導入される試料の初期アレーが高密度であり、特定の活性ゾーンが2個以上の試料の初期位置を空間的に占める場合には、これらの試料のいずれも観測活性源である可能性がある。多数の化合物が特定ゾーンに存在するので、初期密度が高いほど各ゾーンの候補化合物は多くなる。化合物が一緒に拡散する可能性もあるが、各々それ自体の空間勾配を維持しているので、任意の1位置で定量的に混合することはない。従って、ゾーンの中心は初期アレーにおける活性化合物の厳密な位置に related 続ける。実際に、正報は稀であるため、各活性ゾーンの活性化合物の同定を確保するために複数の試料を再試験するのは問題ない。

30

【 0 0 3 9 】

本発明の別の態様によると、アッセイのマトリックスに物理的バリヤーを導入し（即ち、厳密に言うとフォーマットを不連続にし）、試料が拡散できる距離を制限する。例えば、夫々酵素と基質を含む2個のゲルをメッシュ（「クッキーカッター」）で各々切断し、各ゲルを多数の個別位置に細分することができる。その後も2個のゲルを接触させることができるので、細分したゲル片の内側に基質と酵素と一緒に拡散できる。その後、アッセイがアッセイ間の拡散なしに完全に独立するように試料を各細分ゲル片に導入することができる。この態様は試料間に統計的偏差を導入し、容量を固定して高密度アレーのシグナルを制限することにより、C F - H T S の利点の一部を事実上削減している。しかし、この態様はアッセイ成分を多数の並列反応容器に分配する必要がなく、試料の部分混合が不要であるというマトリックス不均質アッセイの利点は維持している。

40

【 0 0 4 0 】

g E L I S A

酵素結合免疫アッセイ（E L I S A）は溶液中のリガンドと固定化レセプターの結合を検出する不均質アッセイである。E L I S A は 9 6 ウェルフォーマットでは実施することが困難な多数の試薬混合及び洗浄段階が必要であり、ウェルを 9 6 ウェルフォーマットから

50

384 ウェルフォーマットに細分すると、困難は一層増すと予想される。本発明者らはリガンドと固定化レセプターターゲットの結合の障害を検出するために C F - H T S 法を適用した (g E L I S A)。

【 0 0 4 1 】

レセプターは別の分子と結合することができる任意分子である。非限定的な例はタンパク質、ペプチド、核酸、炭水化物及び上記例の複合体である。レセプターは非限定的な例としてプラスチック表面 (例えばペトリ皿又はプラスチックプレート (N u n c 製品))、高いターゲット結合能をもつ膜又はフィルター (例えばニトロセルロース、ナイロン又は P V D F (M i l l i p o r e , C o r n i n g C o s t a r , S c h l e i c h e r & S c h u e l l , B i o R a d) 又は S A M 膜 (P r o m e g a) 等の修飾膜) 等の数種の可能なマトリックス (レセプターマトリックス) の 1 種に固定化される。多孔質リガンドマトリックス (例えばアガロースゲル又は多孔質膜) は固定化レセプターのリガンドをマトリックス上又はマトリックス中に分配するように調製される。試験化合物又は試料はリガンドマトリックスに直接分配するか、あるいは試料マトリックス (例えばポリスチレン (T e k r a)、ポリビニリデン (例えば D o w B r a n d s 製品) 又は他の軟質プラスチックシートもしくは膜) 上又は中に分配する。試験マトリックスをリガンドマトリックスと接触させ、試料をリガンドマトリックスに拡散させる。適当なインキュベーション時間後にリガンドマトリックスをレセプターマトリックスと接触させ、リガンドと試料を拡散によりレセプターと接触させ、場合により反応させる (図 1 は固定化レセプター R とビオチン化リガンド L の結合を示す)。インキュベーション中に、試料化合物がリガンド / レセプター結合を障害しない限り、リガンドは固定化レセプターに結合する。

【 0 0 4 2 】

適当なインキュベーション期間後、レセプターマトリックスを取り出し、適当な緩衝液で洗浄し、未結合及び非特異的に結合したリガンド及び試料を除去する。その後、リガンドと相互作用し (例えば抗体、ビオチン化リガンドの場合にはアビジン又はストレプトアビジン)、直接 (例えば蛍光又は放射能により) 又は間接的に (例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P)、アルカリホスファターゼ (A P)、 β -ガラクトシダーゼ) 検出することができるアッセイ試薬を含む溶液にレセプターマトリックスを浸漬する (図 2 はビオチン化リガンドに結合したアビジン - H R P 結合体 A H R P を示す)。適当なインキュベーション後にレセプターマトリックスを溶液から取り出し、洗浄して未結合又は非特異的に結合した試薬を除去する。直接シグナル検出の場合には、適当な方法 (例えば分光スキャナー、C C D カメラ、フィルム、ホスホロイメージャー、又はシンチレーション検出装置) を使用してマトリックスを撮像する。間接シグナル (例えば H R P 又は A P) は、基質又は他の必要な反応成分を多孔質基質マトリックス内又はマトリックス上に分配し、このマトリックスをレセプターマトリックスと接触させることにより付加シグナル発生反応が必要である。その後、酵素 (例えば H R P 又は A P) は基質と反応する (図 3)。あるいは、沈降性基質をマトリックスでなく溶液に導入する。任意可視化方法で、リガンド / レセプター結合領域は可視反応を生じ、リガンド / レセプター結合が阻止された領域は可視反応を生じない。

【 0 0 4 3 】

細胞 / リガンド結合

C F - H T S はリガンド / 細胞レセプター結合の障害を検出するためにも使用することができる。慣用アッセイでは、試験化合物と、放射性標識リガンドと、対応するレセプターを発現する細胞をウェル等の容器で混合する。その後、このような結合が試験化合物により障害されていない場合にはレセプターをリガンドに結合させるために十分な時間を与える。未結合及び非特異的に結合した成分を細胞から除去し、細胞と結合した放射能の量を測定する。本発明者らはリガンドの細胞結合の障害を検出するために C F - H T S 法を採用した。

【 0 0 4 4 】

所望レセプターを発現する細胞を非限定的な例としてゲル、フィルター、又は膜（例えば Transwell 組織培養膜（Corning Costar）又は走化性膜（Neuro Probe））等のマトリックス（細胞マトリックス）で培養又はプレーティングする。レセプターの標識リガンドをマトリックス（リガンドマトリックス）上又はマトリックス内に分配するように多孔質マトリックス（例えばアガロースゲル又は多孔質膜）を調製する。試験化合物又は試料をリガンド又は細胞マトリックスに直接分配するか、あるいは別のマトリックス（例えばポリスチレン（Tekra）、ポリビニリデン又は他の軟質プラスチックシートもしくは膜、試料マトリックス）上又はマトリックス内に分配する。試料マトリックスをリガンドマトリックスと接触させ、試料をリガンドマトリックス内に拡散させる。適当なインキュベーション期間後、リガンドマトリックスを好ましくはマトリックスの非細胞側で細胞マトリックスと接触させ、リガンドと試料を拡散によりレセプターと接触させ、反応させる（図4）。インキュベーション中に、試料がリガンド/細胞結合を阻害しない限り、標識リガンドは固定化細胞に結合する。

10

【0045】

インキュベーション後、細胞マトリックスをリガンドマトリックスから分離し、適当な緩衝液で洗浄し、未結合及び非特異的に結合したリガンドと試料を除去する。適当な方法（例えば分光スキャナー、CCDカメラ、フィルム、ホスホロイメージャー、又はシンチレーション検出装置）を使用して細胞マトリックスを撮像する（図5はフィルム上でのアッセイの展開を示す）。

【0046】

20

上述のように、CF-HTSは「フリーフォーマット」アッセイに予想される全利点を達成し、全く異種のフォーマットで全く異種の試薬と装置を使用して全く異種の生物又は生化学アッセイに適用することができる。適用範囲が広いので、以下の実施例により更に説明する。しかし、これらの実施例は本発明の好適態様を説明するものであり、請求の範囲又は明細書を制限するものではない。当業者は発明の範囲及び精神から逸脱することなく特定態様を変更又は修正してもよいことを容易に理解しよう。最後に、全引用文献は参考資料として本明細書の一部とする。

【0047】

実施例

実施例1：バンコマイシン耐性酵素VanAにより生産されるリン酸を検出するための2段階比色ゲルアッセイ

30

VanAは主要なバンコマイシン耐性酵素であり、D-アラニンとD-アラニン又はD-アラニンとD-乳酸の結合を触媒する。従来、この酵素は酵素が活性であるときに遊離されるリン酸から発色することによりアッセイされている（VanA活性はATPをADPとリン酸に加水分解する）。科学者はD-シクロセリンがVanAを用量依存的に阻害することを認識しており、他の潜在的阻害剤に対する陽性対照としてこの阻害剤を使用している。

【0048】

酵素ゲル

45 50 mM HEPES (N-[2-ヒドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸])、20 mM $MgCl_2$ 、20 mM KCl、pH 7.3 中溶融1%アガロース（高融点アガロース、Gibco BRL）に最終VanA濃度2 μ MまでVanA酵素を加えることにより酵素ゲルを調製した。次に、この寒天混合物をBioRadゲルキャスティング装置に注入し、2~8 で30分間凝固させた。

40

【0049】

基質ゲル

ATP、D-アラニン及びD-乳酸を夫々1 mM、1.5 mM及び1.75 mMとなるように溶融アガロースに加え、酵素ゲルについて記載したようにゲルを調製することにより、基質ゲルを調製した。

【0050】

50

試料マトリックス

対照試料として使用される公知阻害剤である D - シクロセリンの 5 0 0 0、2 0 0 0、1 0 0 0、5 0 0、2 0 0、1 0 0 μ M の 1 : 1 エタノール - 水中連続希釈液の 1 μ l アリコートに 1 枚のポリ塩化ビニリデンフィルム (P V D C) 上に分配し、1 0 分間乾燥させた。

【 0 0 5 1 】

阻害剤の存在下で酵素を基質と共にインキュベート

酵素ゲルを試料マトリックスと 5 分間接触させた。次に、基質ゲルを酵素ゲルの上に載せ、1 5 ~ 2 0 分間インキュベートした。次に、2 個のゲルを分離した。インキュベーション中に、酵素が基質の結合を触媒するにつれて、D - シクロセリンが反応を阻害するために十分な濃度であるゾーンを除いてゲル全体にリン酸が生産されると予想される。

10

【 0 0 5 2 】

アッセイの可視化

新たに調製した 0 . 1 5 % マラカイトグリーンと 1 . 4 % モリブデン酸アンモニウムを 1 . 3 3 N H C l に溶かしたリン酸検出カクテルを酵素及び基質ゲルに注ぎ、均一に分配した。これらの試薬はリン酸と反応し、リン酸濃度の増加の関数として次第に濃い緑色を発色する。5 ~ 1 0 分間発色させた (図 6 は阻害剤量を 5 ナノモル ~ 0 . 5 ナノモルとした場合のゲル上の発色を示す)。S t r a t a g e n e E a g l e E y e C C D カメラを使用して緑色ゲルを撮影した。予想通り、阻害ゾーンの緑色が薄くなる程度は加える阻害剤の濃度に相関した。従って、このアッセイを使用すると、他の任意の表面に分配した組み合わせピーズ又は化合物を配置した後にゲルアッセイと接触させることにより V a n A の阻害剤をスクリーニングすることができる。

20

【 0 0 5 3 】

このアッセイは更に、ゲルスクリーニングフォーマットが多段階反応に適応可能であることも立証する。多くのアッセイは多段階を必要とするので、この特徴はこのフォーマットが広範なアッセイで有用であるために必要である。この場合、V a n A アッセイは酵素活性後に発色させる 2 段階アッセイである。発色試薬及び条件は V a n A 活性に干渉し、寒天ゲル内放出にも不適合であるので、このアッセイの均質 (単段階) 法は実現しにくい。従って、まず酵素ゲルアッセイを実施した後に溶液相発色段階を実施することによりこれらの 2 段階を空間及び時間的に分離することが望ましい。

30

【 0 0 5 4 】

実施例 2 : リボソーム結合により刺激された S . C e r e v i s i a e 伸長因子 3 A T P アーゼ活性により生産されたリン酸を検出するための 2 段階ゲルアッセイ

菌類伸長因子 3 (E F - 3) がリボソームと相互作用すると、ホスファターゼ活性が刺激される。本発明者らはこの活性のアッセイに C F - H T S を適用した。

【 0 0 5 5 】

E F - 3 アッセイ緩衝液中に E F - 3 (高度に温度感受性の酵素) と酵母リボソームを含む酵素ゲルを調製した。アッセイ緩衝液中に 1 m M A T P を含む基質ゲルも調製した。両者ゲルは低融点アガロース (G i b c o B R L) 中に 2 % のジメチルスルホキシドを加え、3 7 ° で調製し、3 0 分間 4 ° に静置した。対照試料として使用した E F - 3 の阻害剤である P o l y - L - リジンの連続希釈液を P V D C フィルムに滴下し、乾燥した (試料マトリックス)。次に、酵素ゲルを試料マトリックス上の阻害剤と共にプレインキュベートすることにより実施例 1 と同様にアッセイを実施した。次に、酵素ゲルを基質ゲルと 2 0 分間接触させた。実施例 1 と同様に、酵素ゲルと基質ゲルをマラカイトグリーン / モリブデン酸アンモニウム発色カクテルで染色した。次に、酵素ゲルを C C D カメラで撮影した。阻害剤スポットは緑色のバックグラウンド中に透明なゾーンとして見える。図 7 は阻害剤量を 5 ピコモル ~ 2 0 0 ピコモルとした場合のゲル上の発色を示す。その結果は阻害剤の用量依存性シグナルを示し、新規 E F - 3 阻害剤を見いだすためにこのアッセイで化合物をスクリーニングできると思われる。実施例 2 はオルガネラ又は他の粗生物混合物もしくは抽出物の存在により複雑になった場合でも C F - H T S が有用であることを立

40

50

証する。

【0056】

実施例3：タンパク質-タンパク質相互作用阻害剤のgELISA間接色検出 上述のように、ELISAはレセプターをマイクロタイターウェルに固定化してリガンド-レセプター相互作用の阻害を検出するために一般に使用されている。ELISAで使用される「リガンド-レセプター」対はタンパク質又は他の高分子からの分子と小分子の任意結合対とすることができる。これらのアッセイはレセプターを固定化し、レセプターをリガンドと共にインキュベートし、高いシグナルバックグラウンドを生じる非特異的に結合した不要なリガンドを洗浄により除去し、レセプターと結合したリガンドに可視化剤（例えばレポーター酵素に結合したリガンド特異抗体）を結合し、レポーター酵素の基質を提供することにより可視シグナルを発生することが必要な複雑な多段階アッセイである。ELISAは複雑であるため、HTS産業はELISAをフリーフォーマットアッセイに適用できないとみなしているようである。しかし、本発明者らはこの多段階アッセイをCF-HTSフォーマットに適用し、種々のタンパク質-タンパク質、タンパク質-リガンド及び他のリガンド結合相互作用をアッセイした。

10

【0057】

ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター（uPA）はその対応するレセプター（uPAR）に結合する。uPA/uPAR相互作用は種々の癌の転移に結び付けられている。本発明者らは精製レセプター及びリガンドを使用して従来のuPA/uPAR ELISAをCF-HTSに適用した。

20

【0058】

uPARマトリックス

プラスチックプレート（7.5cm×11.5cm；Nunc，Inc．Naperville，IL製品）をpH7.4及び4のリン酸緩衝塩類（PBS）（Life Technologies，Grand Island，NY）中118nM精製uPAR15mlで一晩被覆した。プラスチックプレートを一晩被覆後、uPAR溶液をデカントし、1%（w/v）カゼインを含むPBS15mlを加えて室温（RT）で2時間インキュベートすることによりプラスチックプレート上の残留結合部位をブロックした。ブロック後、ブロッキング溶液をデカントし、プラスチックプレートをPBS中0.05% Tween-20（ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート）から構成される洗浄用緩衝液20mlで5回洗浄した。洗浄後、プラスチックプレートを10分間室温で乾燥した。これは、活性低下の原因となるマトリックスの過剰乾燥を避けるためにプラスチックプレートを下記アッセイで直後に使用できるような時間に設定した。

30

【0059】

- uPAマトリックス

アッセイの目的には、使用するuPAをビオチンで標識する（-uPA）。（実施例1及び2では溶融寒天に注入したが、これとは対照的に）高温にならないように -uPAを寒天に浸漬することにより -uPAを含むゲルを調製した。寒天はまずアガロース（Sigma，St．Louis，MO）0.1gをPBS10mlと混合し、溶融するまで加熱した後、8×7×0.075cm³ゲル装置（Bio-Rad，Hercules，CA）に注入することにより調製した。（室温又は4で）凝固後、PBS中0.05% Tween-20及び0.1%カゼイン（いずれもSigma，St．Louis，MO製品）からなるアッセイ緩衝液中 -uPA15ml（約10nM）に4で一晩ゲルを浸漬した。ゲルを使用直前に室温で20分間乾燥した。

40

【0060】

試料マトリックス

uPA/uPAR結合の公知小分子阻害剤の不在下に非ビオチン化uPA（pro-uPA）を -uPA/uPAR結合の対照試料阻害剤として使用した。アッセイ緩衝液中0、0.03、0.1、0.3、1及び3μM pro-uPAの5μlアリコートにPVDCフィルム（Dowbrands，L.P．，Indianapolis，IN）上に

50

分配し、2時間室温で乾燥した。

【0061】

uPARをpro-uPA及び -uPAと共にインキュベート乾燥pro-uPAスポットが -uPAゲル表面と接触するように試料マトリックスを -uPAゲルの片側に配置した。pro-uPAを室温で10分間ゲルに拡散させた。次に、 -uPAゲルの反対側をプラスチックプレートに配置し、 -uPA（リガンドとして作用）とpro-uPA（競合的阻害剤として作用）をプラスチックプレートの表面でuPARと相互作用させた。結合/競合反応体を室温で20分間インキュベートした。インキュベーション後にプラスチックプレートをゲルから分離し、洗浄用緩衝液20mlで迅速に4回洗浄した。アビジン-HRP（Sigma, St. Louis, MO）をアッセイ緩衝液で25,000倍に希釈し、15mlをプラスチックプレートに加えることにより、アビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ（アビジン-HRP）結合体溶液を調製した。反応体を室温で10分間インキュベートした後、アビジン-HRP溶液をデカン

10

トし、プラスチックプレートを上述のように洗浄した。プラスチックプレートを20分間乾燥させた。

【0062】

アビジン-HRP中のアビジンはビオチンと特異的に結合するので、「リガンド/レセプター」結合を示すマトリックスの領域のみが発色を示す。「リガンド/レセプター」結合がpro-uPAにより競合的に阻害されるマトリックスの領域は発色しない。

20

【0063】

発色

o-フェニレンジアミンHCl（OPD）タブレット2錠を希釈剤7ml（いずれもAbbottキット番号6172-30、Abbott Labs, Abbott Park, IL）に溶かし、アガロース0.1gを水3mlに溶かして調製したアガロース溶液をこの溶液に加えることにより、比色HRP基質（OPDゲル）を含む発色ゲルを調製した。終量10mlの混合物を8×7×0.075cmミニタンパク質IIゲル装置に注入し、4で15分間凝固させた。ゲルをゲルキャスティングスタンドのガラスプレートからPVC又は軟質プラスチックプレートに移し、室温で10分間風乾した。次に、ゲルを別のPVC又はプラスチックシートに移し、反対側を10分間乾燥した。次に、OPDゲルをプラスチックプレートに加え、発色を開始した。OPDインキュベーション中の種々の時点でプラスチックプレートを440nm帯域フィルター（Omega Optical, Inc., Brattleboro, VT）に載せ、フィルターを光ファイバー拡散プレートに載せてFiber-Lite光源（いずれもDolan-Jenner Industries, Inc., Lawrence, MA製品）で照射した。CCDカメラ（Eagle Eye system, Stratagene, La Jolla, CA）で撮影した。

30

【0064】

対照実験

図8は実施例3の対照実験を示す。図8Aは、アガロース正方形片（1cm²）を各正方形片の下に記載した種々の -uPA濃度の溶液に浸漬した（但し、アガロース正方形片の左側は50nM溶液で標識する）。アガロース正方形片をuPAR固定化プラスチックプレート上でインキュベートした後、取り出した。次に、プラスチックプレートを洗浄し、 -uPA/uPAR結合が生じたマトリックスの領域を上述のように可視化した。図8BはOPD発色中の種々の時点で各アガロース正方形片における -uPAの濃度に対する各正方形片の（NIH Image Analysisソフトウェアを使用してCCDカメラからのデジタル画像を分析することにより決定した）平均画素値（バックグラウンドを差し引いた値）のプロットを示す。アガロースゲルから放出された -uPAは標準ELISA及びこのパラメーターを測定する他のアッセイでこの反応に報告されている値に一致する約3~5nMの半最大結合（K_d）をもつ典型的レセプター-リガンド結合曲線を示した。図8はgELISAにより発生される間接比色シグナルがリガンド-レ

40

50

セプター相互作用の程度に定量的に依存していることを示す。

【0065】

pro-uPA / -uPA 競合の結果

図9はpro-uPAによる -uPA / uPAR 結合の阻害を示す。図9Aのスポットは -uPA / uPAR 結合が阻害された領域を示す。従って、アビジン-HRPはこれらの領域で結合しなかった。従って、HRPはOPDゲル中の基質と反応して発色しなかった。図9Bは定量滴定をヒトの目で判断し易くするためにこれらの同一CCD画像データを別の方法で表示した。

【0066】

実施例4：タンパク質-タンパク質相互作用の阻害剤の直接放射検出

10

T細胞活性化は身体の免疫反応の要素である。T細胞活性化中に下流イベントが生じるためには、p56lck (LCK、タンパク質)がT細胞抗原レセプターの細胞質ドメインのITAM領域(イムノグロブリン関連チロシン介在活性化モチーフ)と相互作用する必要がある。このタンパク質-タンパク質相互作用を阻害する化合物は潜在的免疫抑制剤である。本発明者らはCF-HTSを使用してLCKが膜に固定化されるこのタンパク質-タンパク質相互作用をアッセイした。

【0067】

LCKマトリックス

5mM DTT (ジチオトレイトール)を含むPBS中3μM LCK 5mlに11cm × 2cmストリップを10分間室温で浸した後、緩衝液を除去することにより、ビオチン化LCKをビオチン捕獲膜(SAM膜)(Promega Corp., Madison, WI)に固定化する。これは、SAM膜を直後(数分以内)に下記アッセイで使用できるような時間に設定する。

20

【0068】

ITAM*マトリックス

アガロース0.1gを緩衝液10mlと混合し、溶融するまで加熱した後、8×7×0.075cmゲル装置に注入することにより、放射性標識ITAMペプチド(ITAM*)を含むアガロースゲルを調製する。ITAM*はキャスティング直前に加えるか、又は最終濃度10nMまで凝固後にゲルに浸漬させる。

【0069】

試料マトリックス

スクリーニングしようとする試料をプラスチック表面又はPVDC上に分配し、乾燥して試料マトリックスを形成する。

30

【0070】

ITAM*、LCK及び試料のインキュベーションと可視化

試料がITAM*ゲルに拡散できるように試料マトリックスをITAM*ゲルの片側と接触させる。次に、LCKを固定化したSAM膜とITAM*ゲルの反対側を接触させる。15~45分間インキュベーション後、SAM膜を取り出し、洗浄し、ホスホロイメジャー又はフィルムで撮像する。ITAM-LCK相互作用の阻害剤は画像上の低シグナル強度に対応する低放射能ゾーンにより示される。

40

【0071】

ITAM*/LCK結合の対照実験

アガロース0.1gを緩衝液10mlと混合し、溶融するまで加熱した後、8×7×0.075cmゲル装置に注入することにより、アガロースゲルを調製した。凝固後、直径1cmの円をゲルから打ち抜き、緩衝液中0.1、0.3、1、3、10及び20nM ¹²⁵I 標識ITAM (Amersham, Arlington Heights, IL) 400μlに4で一晩浸漬した。ゲル円を溶液から取り出し、20分間室温で乾燥させた。その後、LCKを固定化したSAM膜にゲルを載せ、45分間室温でインキュベートした。ゲルを取り出し、膜を緩衝液で4回洗浄した。乾燥後、SAM膜をホスホロイメジャーで撮像した。

50

【0072】

図10は¹²⁵I - ITAMとSAM膜上の固定化LCKの用量依存性結合を示す。

【0073】

図11はゲル円内の¹²⁵I - ITAM濃度に対する各¹²⁵I - ITAMゲルの(Molecular Dynamics製品ImageQuantソフトウェアを使用してホスホロイメージャーからのデジタル画像を分析することにより決定した)平均画素値(バックグラウンドを差し引いた値)のプロットを示す。ゲルから固定化LCKに放出された¹²⁵I - ITAMは典型的レセプター - リガンド結合曲線を示した。

【0074】

実施例5：組み合わせゲル/フィルターフォーマットを使用した全細胞レポーター遺伝子アッセイ

10

ルシフェラーゼ遺伝子(Promega製品であるルシフェラーゼレポーター遺伝子)に融合したサイクリックAMP応答配列(CREB)プロモーターを含むプラスミドをHEK細胞として知られる腎細胞にトランスフェクトする。トランスフェクトした細胞をフォルスコリンで処理すると、ルシフェラーゼレポーター遺伝子発現が誘導される。その後、ルシフェラーゼ基質(Promega製品である甲虫ルシフェリン)と適当な補因子(20mMトリシン, pH7.8, 0.1mM EDTA, 33mM DTT, 0.3mM補酵素A, 0.5mMアデノシン三リン酸及び1mM MgCl₂)を含む生物緩衝液をHEK細胞に加えると、従来機器で検出可能な光子発生が生じる。本発明者らはこのアッセイをCF-HTSに適用した。

20

【0075】

細胞マトリックス

培養細胞をトリプシンで処理し、Corning/Costar TRANSWELL(登録商標)膜(プラスチック支持リングを備える3ミクロンポリカーボネートフィルター)に移し、組織培地の存在下に37、5%CO₂下に一晚インキュベートした。その後、培地を膜から除去し、細胞が結合したフィルターを15分間風乾し、直後に下記段階で使用了。

【0076】

インデューサーマトリックス

フォルスコリンの10mMストック(エタノール中Sigmaストック)12μlを1%低融点アガロースゲル6mlに加えることによりルシフェリン発現のインデューサーを含むゲルを調製する。フォルスコリンの最終濃度が20μMになるまでゲルを室温で凝固させる。

30

【0077】

試料マトリックス

フォルスコリン誘導を阻止することが可能な試料をPVC上の個別位置に高密度で分配し、乾燥する。

【0078】

試薬のインキュベーションと阻害の検出

PVCの阻害剤側をインデューサーゲルと共にインキュベートする。次に、フォルスコリンインデューサーを含むゲルを上記のように調製した細胞マトリックスの非細胞側に配置する。これらを一緒に37で5%CO₂下に20分間インキュベートする。次に、フォルスコリンゲルを取り出し、細胞マトリックスを37で5%CO₂下に更に4時間インキュベートし、ルシフェラーゼ構築物の発現を最大にする。ルシフェラーゼ酵素活性(又はその阻害)を検出するために、細胞マトリックスフィルターをそのプラスチック支持リングから物理的に取り外し、ペトリ皿に入れる。適当な補因子を加えた生物緩衝液中のルシフェラーゼ基質(Promega製品である甲虫ルシフェリン)をペトリ皿に注ぎ、シグナルとして発光させる。シグナルはルシフェラーゼを発現する固定化細胞の内側に局在しているので、初期誘導段階の阻害剤は光子発生の低いゾーンとなる。

40

【0079】

50

実施例 6 : リガンド - 細胞相互作用の阻害剤を直接検出するためのゲル / フィルター C F - H T S

細胞表面のリガンド / レセプター結合は最終的に機能的応答 (例えば細胞増殖又は生物活性物質の分泌) を生じるシグナル経路を細胞内で開始する。疾病状態における細胞の生物応答を調節するために、リガンドの細胞表面結合を阻害しようとする例は多い。リガンド / 細胞レセプター結合の阻害剤を評価するための一般的な方法は、阻害剤が放射性標識天然リガンドと細胞の結合を低下させる能力を評価することである。このためには、細胞を放射性リガンド及び阻害剤と共にインキュベートした後、未結合及び非特異的に結合した放射性リガンドを洗浄により除去し、次いで結合放射能の量を測定する。

【 0 0 8 0 】

インターロイキン 8 (I L - 8) は種々の細胞でレセプターと結合することにより炎症に関与する走化性ケモカインである。本発明者らはこの相互作用の阻害剤を評価するために C F - H T S リガンド - レセプター細胞アッセイを開発した。

【 0 0 8 1 】

細胞マトリックス

I L - 8 a レセプターを発現する H E K 細胞 (A T C C , B e t h e s d a , M D) を直径 7 5 m m トランスウェルメンブレンフィルター (C o r n i n g C o s t a r C o r p . , C a m b r i d g e , M A) に約 2.0×10^6 細胞 / プレートの密度でプレATING した。pH 7 . 2 及び 3 7 で 1 0 m M H e p e s (S i g m a , S t L o u i s , M O) を含む緩衝液 (L i f e T e c h n o l o g i e s , G r a n d I s l a n d , N Y 製品である R P M I) 中でメンブレンフィルターと細胞を一晩結合させた。細胞をフィルターに結合した後、培地を捨て、細胞を新鮮な緩衝液で洗浄し、未結合細胞を除去した。細胞側が下を向くようにフィルターを逆さにし、過剰の培地を排出させるような角度にした後、2 0 分間乾燥した。これは、細胞マトリックスを下記アッセイですぐに使用できるような時間に設定した。

【 0 0 8 2 】

リガンドマトリックス

アガロース 0 . 1 g を緩衝液 1 0 m l と混合し、溶融するまで加熱した後、 $8 \times 7 \times 0.075$ c m ゲル装置に注入することにより調製したアガロースゲルに 125 I 標識 I L - 8 (A m e r s h a m , I n c . , A r l i n g t o n H e i g h t s , I L) を浸漬することにより、リガンドマトリックスを調製した。回転プラットフォーム (N e w B r u n s w i c k S c i e n t i f i c C o . , I n c . , E d i s o n , N J) 上でゆっくりと混合しながらゲルに一晩室温で浸漬させた。浸漬後、ゲルを使用直前に室温で 2 0 分間乾燥した。これは、ゲルをアッセイですぐに使用できるような時間に設定した。

【 0 0 8 3 】

試料マトリックス

I L - 8 / 細胞レセプター結合の公知阻害剤の不在下に、非放射性標識 I L - 8 (G e n z y m e C o r p . , C a m b r i d g e , M A) を対照試料阻害剤として使用して 125 I - I L - 8 の H E K 細胞結合の阻害を観察した。1 μ l の 0、0 . 0 3、0 . 1、0 . 3、1、3、1 0 及び 1 0 0 μ M I L - 8 を P V D C 等のプラスチックシート上に分配し、1 時間室温で減圧乾燥した。

【 0 0 8 4 】

インキュベーション

乾燥後の I L - 8 スポットがゲル表面と接触するようにリガンドマトリックスの片側に試料マトリックスを配置した。ゲルを逆さにして反対側を 1 0 分間室温で乾燥し、「阻害剤」をゲルに拡散させた。次に、ゲルを細胞マトリックスの非細胞側に配置した。結合反応体を 4 5 分間室温でインキュベートした。その後、ゲルを除去し、膜の非細胞側を緩衝液で 4 回洗浄した。膜を完全に乾燥させてからプラスチック支持リングから取り外した。次に、膜を X 線フィルム又はホスホロイメジャー (M o l e c u l a r D y n a m i c

10

20

30

40

50

s, Sunnyvale, CA)で撮像した。

【0085】

図12は細胞マトリックスを拡散してIL-8αレセプターを発現するHEK細胞に結合するアガロースゲル中の¹²⁵I-IL-8の用量応答を示す。数個の1cm²アガロース正方形片を種々の指定¹²⁵I-IL-8濃度の溶液に浸漬した。次に、リガンドに浸漬した正方形片を上述のように細胞マトリックスと接触させた。インキュベーション後、正方形片を細胞マトリックスから取り出し、膜の非細胞側を緩衝液で洗浄した。ホスホイメージャーを使用して細胞に結合した¹²⁵I-IL-8の位置を調べた。データによると、このゲルを利用した細胞アッセイにおける直接放射読取り値はリガンド-レセプター相互作用の程度に定量的に依存している。図12は結合領域が形状的に別々のままであることも示しており、シグナルの横拡散がアッセイで問題とならないことが確認される。

10

【0086】

図13は競合的阻害実験の結果を示す。¹²⁵I-IL-8とHEK細胞の結合の阻害は明スポットにより示される。非標識IL-8による阻害が定量的に用量依存性であることも容易に理解されよう。これらのデータは、この場合には非標識IL-8である阻害剤が細胞マトリックスを横断して¹²⁵I-IL-8と細胞の結合を低下できることを示している。

【0087】

実施例7：フィルターを利用した無ゲル機能細胞アッセイ

細胞に組込んだレポーター系に及ぼす試験化合物又は試料の影響を観察することにより細胞機能の変化を測定する例は多い。例えば、グリーン蛍光タンパク質(GFP)等の蛍光細胞内タンパク質、レセプターもしくは接着分子等の細胞外タンパク質、又はルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼもしくは-ガラクトシダーゼ(Promega)等の特異酵素の合成に及ぼす影響の観察が挙げられる。まず、試験化合物を細胞と共にインキュベートする。その後、適当な時間(例えば数分間、数時間又は数日間)細胞にレポータータンパク質を発現させる。その後、レポータータンパク質の量を直接法(例えばGFP)又は間接法(例えば膜結合タンパク質によるELISA法)により定量する。更に酵素の場合には、細胞を破壊してレポータータンパク質を抽出し、酵素活性を定量することができる。その他、レセプターの刺激又は膜電位等の細胞生理の変化に応じて色素の特定分子又は放射性標識代謝物等の挙動又は局在を測定する機能細胞アッセイもある。

20

30

【0088】

細胞内接着分子-1(ICAM-1)の発現に及ぼす化合物の影響を測定するELISAアッセイは次のようにCF-HTSに適用することができる。ICAM-1を発現する内皮細胞をポリカーボネート走化性膜(Neuro Probe)に約5,000細胞/mm²でプレーティングする。細胞を培地中で37℃で一晩インキュベートする。培地を捨て、膜を10分間室温で部分乾燥させる。ICAM-1の誘導を試験している試料又は化合物をプラスチックシート上で乾燥させ、湿潤膜の非細胞側と接触させる。化合物を湿潤チャンバー内で37℃で1時間細胞と相互作用させた後、細胞を培地に浸漬し、5時間37℃でインキュベートする。

40

【0089】

細胞が誘導タンパク質を合成するまで待つてから、培地を膜から除去し、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)又はビオチンに結合しているか又は未結合の抗ICAM-1抗体(Genzyme, R&D systems)を含む緩衝液中で細胞をインキュベートする。室温で30分間インキュベーション後、緩衝液を捨て、細胞を数回洗浄して未結合抗ICAM-1を除去する。FITC結合抗体の場合には、485nm励起及び520nm発光でCCDカメラ(Stratagene, Imaging Research)を使用して膜を撮影する。ICAM-1発現を刺激した化合物はFITC-抗ICAM-1抗体の結合により蛍光が増加したゾーンとなる。ビオチン結合抗体の場合には、アビジン-HRPを含む緩衝液中で室温で10分間細胞をインキュベートする。緩衝液を捨

50

て、未結合アビジン - HRP を洗い流す。その後、四塩化ジアミノベンジジン (Pierce) 等の沈降性 HRP 基質を含む緩衝液に膜を浸漬し、下位の細胞が ICAM - 1 を発現するように誘導された領域で発色を観察する。非結合抗 ICAM - 1 抗体の場合には、結合二次抗 ICAM - 1 抗体を細胞と反応させた後、結合体の適当な基質でシグナルを発生させる。CCD カメラで撮影する。これらの全方法 (FITC、アビジン - HRP 及び抗 ICAM - 1) は同一定量結果を与える代替レポーターであり、即ち ICAM - 1 発現に影響を与える試料をシグナルの増加又は減少したゾーンに相関させることができる。

【0090】

この場合の連続フォーマットマトリックスは膜とプラスチックシートであることに留意されたい。CF - HTS にゲルは不要である。

【0091】

実施例 8：ノイラミニダーゼ阻害に関する個別化合物の CF - HTS アッセイ

試料マトリックス

528 種の構造的に関連する個別化合物のライブラリーを CF - HTS により試験した。Packard Multiprobe MP204DT を使用してバイアルからの化合物を 96 ウェルプレートに希釈し、化合物を希釈してプラスチックシートに移した。化合物をまずバイアル中の DMSO 中 40 mM から 96 ウェルプレート中の DMSO 中 4 mM に希釈した。次に、96 ウェルプレート中で DMSO 中 4 mM から 50 % EtOH / H₂O 中 200 μ M に希釈した。これらの試料を 8 cm \times 8 cm プラスチックシート (Bio-Rad cat. # 165 - 2956) に平均 5 mm の試料間隔で各シート合計 192 個の試料数となるように 1 μ l ずつ 2 画分を移した。従って、各 1 μ l スポットがライブラリーからの特定化合物を約 200 pmol 含むものとした。対照として、公知ノイラミニダーゼ阻害剤である 2, 3 - デヒドロ - 2 - デオキシ - N - アセチルノイラミン酸 (DANA) (Boehringer Mannheim # 528544) の希釈液系を各シート上の化合物の隣に手動分配した。各化合物がプラスチック上のそれ自体の位置で乾燥されるようにシートを減圧乾燥した。

【0092】

酵素マトリックス

アッセイに先立ち、インフルエンザノイラミニダーゼ酵素を 25 % グリセロール、リン酸緩衝塩類から、40 \times で 1 % アガロース、50 mM クエン酸ナトリウム (pH 6.0)、10 mM 塩化カルシウムからなる液化寒天ゲルに 1500 倍に希釈した。8 cm \times 8 cm \times 0.75 mm 酵素ゲルを注入し、温度を 4 $^{\circ}$ C まで下げることで凝固させた。

【0093】

基質マトリックス

合成インフルエンザノイラミニダーゼ基質である 2' - (4 - メチルウンベリフェリル) - 5 - D - N - アセチルノイラミン酸 (Sigma cab. # M - 8639) を DMSO 中 3 mM から液化寒天ゲル中 30 μ M に希釈し、上記酵素ゲルと同様に注入した。

【0094】

インキュベーションと検出

着目化合物を乾燥した側で試料マトリックスに酵素マトリックスを重ねた。次に、基質マトリックスを酵素マトリックスの上に重ねた。マトリックスを室温で 30 分間インキュベートした。この間に、蛍光消光基質と酵素は 2 つのゲルの間に拡散し、基質は酵素により分解され、蛍光強度を増した。これは 340 nm 励起及び 450 nm 発光によりモニターした。酵素活性を阻害することが可能な化合物は蛍光強度の増加を最小にした。ゲルが大部分の位置で蛍光強度を増すにつれて、プラスチックシートからゲルに拡散された酵素阻害剤を含む領域はより低い蛍光をもつ暗領域として見えた。これは発光波長と励起波長を調節するように適当なフィルターを取り付けた CCD カメラにより容易にモニターされた。阻害ゾーンを示す化合物の種を阻害剤マトリックスに対するゾーンの位置により決定した。DANA 対照の蛍光を既知量の各試験阻害剤と比較することにより、化合物毎に IC

10

20

30

40

50

IC_{50} の定量的推定を行った。

【 0 0 9 5 】

ライブラリーの全 5 2 8 種の化合物を 2 回ずつ試験した。使用した合計酵素ゲル容量は 3 3 m l、即ち試験当たり 3 1 . 2 5 μ l とした。更に、全化合物を同時に試験し、アッセイ条件は従来の 9 6 ウェルアッセイに比較して一定であった。更に、図 1 4 に示すように、アッセイは 1 0 0 μ M 程度の低濃度の阻害剤を検出するのに十分感受性であった。活性化合物の推定 IC_{50} 値は試験当たり 2 0 0 μ l を必要とするコストの高い 9 6 ウェルアッセイにより試験した同一化合物で観察される値とよく一致した。定量ゲルアッセイ結果表参照。本実施例は高密度の化合物アレーを試験すると、費用と時間を節約できることを立証するものである。例えば、間隔を 5 m m でなく 2 . 5 m m に僅かに減らすだけで単位容量当たりの試験化合物数は 4 倍になる。この実験では、こうすることによって試験化合物当たりの容量が 1 0 μ l 未満に減ったと思われる。しかも、小型化スクリーニングで一般に使用されている低容量液体操作装置を必要とすることなく大容量で試薬を操作する。

【 0 0 9 6 】

【表 1】

定量ゲルアッセイ結果

| 試料番号 | ゲルからの概算 最大 K_i (μ M) | 9 6 ウェルアッセイからの 推定 IC_{50} (μ M) |
|------|--------------------------------|---|
| 3 4 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 3 5 | 8 0 | > 1 0 0 |
| 3 6 | 8 0 | 4 2 |
| 3 7 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 3 8 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 3 9 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 4 0 | 4 0 | 3 2 |
| 4 1 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 4 2 | 4 0 | 5 0 |
| 4 3 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 4 4 | > 2 0 0 | > 1 0 0 |
| 4 5 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 4 6 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 4 7 | 1 0 | 7 . 5 |
| 4 8 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 4 9 | 1 0 0 | > 1 0 0 |
| 5 0 | 1 0 0 | > 1 0 0 |

【 0 0 9 7 】

この小型化の利点を立証するための追跡実施例として、1 0 , 0 8 0 種の個別化合物を合計酵素ゲル容量 1 7 m l (試験当たり 2 μ l 未満) となるように C F - H T S により試験した。P a c k a r d M u l t i p e t t e を使用して各試料 3 0 n l 容量を 1 m m 間隔で分配した。化合物は濃度 5 m M で D M S O に分配し、各々約 1 5 0 p m o l をプラスチックに分配した。この場合も D A N A を対照阻害剤として使用した。化合物アレーの外側の通常対照滴定以外に盲試験としてアレー自体の内側にも対照滴定を加え、対照試料を

プラスチックに分配する際に 10,080 種の未知化合物と同様に処理した。上記と同様にシートを乾燥し、ノイラミニダーゼアッセイで利用した。全 10,080 種をこの方法により 1 時間未満で同時にスクリーニングした。この場合も、初期化合物のシート分配時を除き、マイクロフルイディクス及びノ又は低容量操作は不要であった。このアッセイで利用される非常に高い密度は阻害剤の検出に干渉しなかった。更に、高密度は（ゲル中の明スポットとして容易に観察される）蛍光化合物が活性化合物の最近傍にあった場合でも、活性化合物の同定を複雑にしなかった。図 15 参照。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 非多孔質マトリックスに担持した g E L I S A 試料を、アッセイ試薬を含む多孔質ゲルマトリックスの片側に接触させ、更に別のアッセイ試薬を担持する非多孔質マトリックスに接触させる方法を示す。

10

【図 2】 g E L I S A 試料マトリックスと多孔質ゲルマトリックスを除去した後に洗浄し、液体又は溶液試薬を添加して非多孔質試薬マトリックス上にレポーター複合体を形成する方法を示す。

【図 3】 レポーター基質を含む多孔質ゲルマトリックスにレポーター複合体マトリックスを接触させることにより g E L I S A アッセイを可視化する方法を示す。

【図 4】 細胞を担持するフィルター表面に対向するフィルター表面にリガンドマトリックスを加える方法を示す。

【図 5】 アッセイを可視化したときに細胞を担持するフィルター表面に観察される様相を示す。

20

【図 6】 種々の濃度の公知用量依存性阻害剤を使用した V a n A アッセイの結果を示す。

【図 7】 種々の濃度の公知阻害剤を使用した E F - 3 アッセイの結果を示す。

【図 8】 タンパク質 - タンパク質相互作用の g E L I S A アッセイの対照実験を示す。

【図 9】 タンパク質 - タンパク質相互作用の「阻害」の g E L I S A 結果を示す。

【図 10】 固定化 L C K への放射性標識 I T A M の用量依存性結合を示す。

【図 11】 I T A M 濃度に対する画素値のグラフであり、典型的レセプター - リガンド結合曲線を示す。

【図 12】 放射性標識 I L - 8 のリガンド - 細胞相互作用の対照実験を示す。

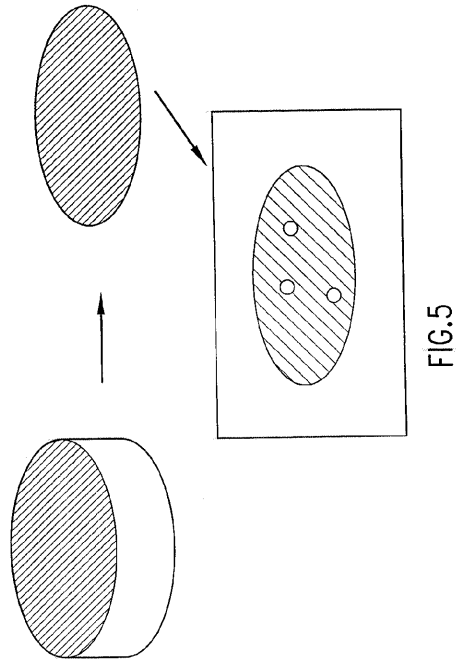
【図 13】 I L - 8 リガンド - 細胞相互作用の「阻害」を示す。

30

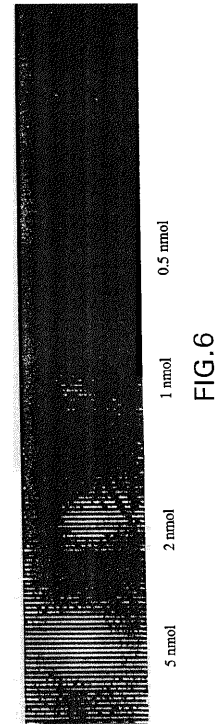
【図 14】 ノイラミニダーゼの阻害剤のアッセイを示す。

【図 15】 ノイラミニダーゼ阻害に関する 10,080 種の個別化合物の同時アッセイを示す。

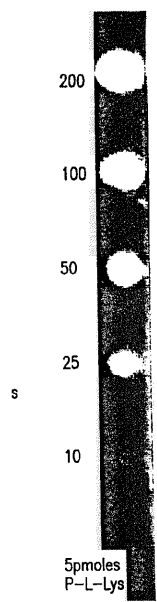
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【図 8】

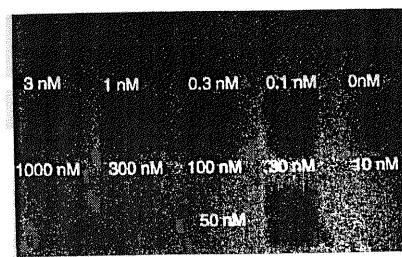


FIG.8A

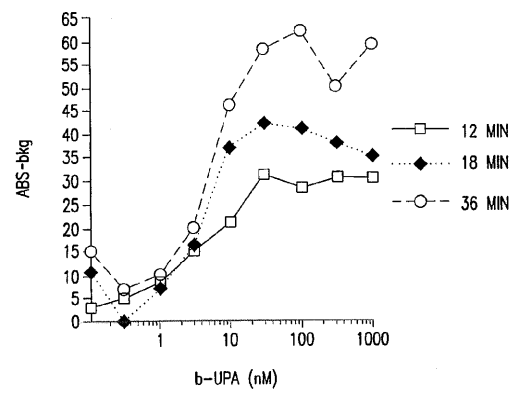
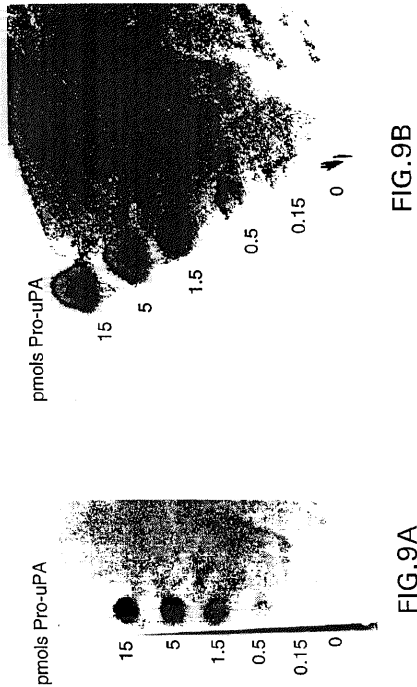
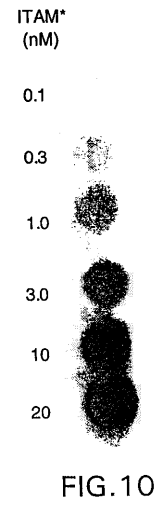


FIG.8B

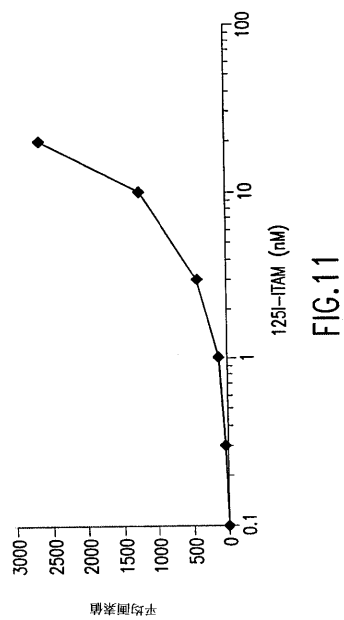
【図 9】



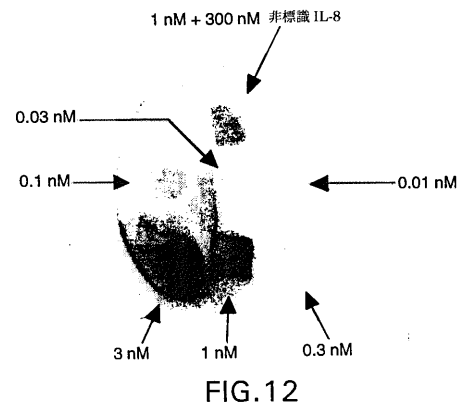
【図 10】



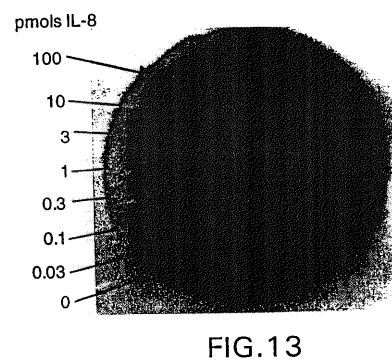
【図 11】



【図 12】



【図 13】



【図 14】

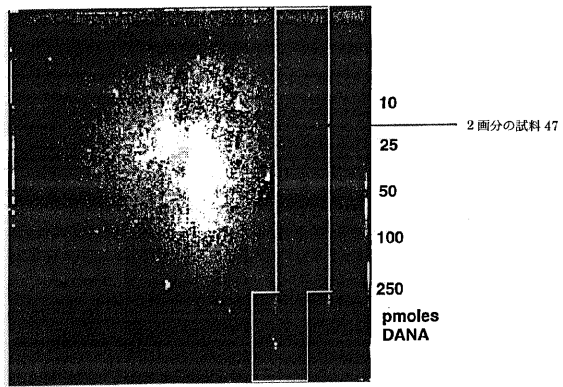


FIG.14

【図 15】

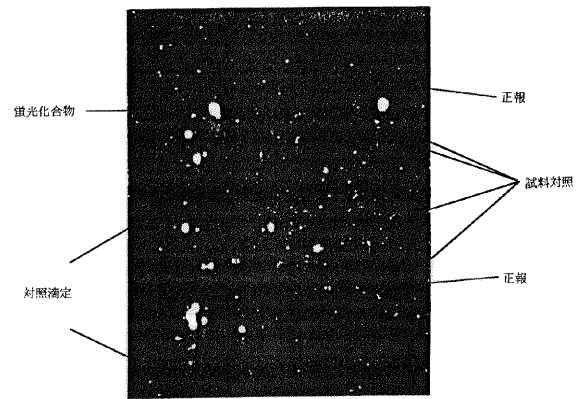


FIG.15

フロントページの続き

- (72)発明者 ビューテル, ブルース・エイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００４８、リバティビル、タマラック・レイン・１０３３
- (72)発明者 シヤードツク, マーク・イー
アメリカ合衆国、イリノイ・６０００２、アンテイオク、ヒルサイド・アベニュー・７４６
- (72)発明者 ブーアバツク, マーチン・ジエイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６１、バーノン・ヒルズ、ウェブスター・ブレイス・１５７
- (72)発明者 バーンズ, デビッド・ジエイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００７３、ラウンド・レイク・パーク、ウオータビュウ・ドライブ
・７４２
- (72)発明者 ジョージフ, メアリー・ケイ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００４８、リバティビル、セント・ウィリアム・ドライブ・１２２
１

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 国際公開第９５／０３０６４２（ＷＯ，Ａ１）
国際公開第９４／００２５１５（ＷＯ，Ａ１）
特開平０７－１９４３９６（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－１４３１５５（ＪＰ，Ａ）

- (58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N 33/48-33/566
G01N 37/00