

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3732510号

(P3732510)

(45) 発行日 平成18年1月5日(2006.1.5)

(24) 登録日 平成17年10月21日(2005.10.21)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 1/04 (2006.01)	GO 1 N 1/04	W
GO 1 N 33/483 (2006.01)	GO 1 N 33/483	C
GO 2 B 21/32 (2006.01)	GO 2 B 21/32	
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 1/28	G
	GO 1 N 1/28	J

請求項の数 9 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願平7-522963	(73) 特許権者	ガバメント オブ ザ ユナイテッド ス テイツ, レプレゼンティッド バイ ザ セクレタリー オブ ザ デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サ ービス
(86) (22) 出願日	平成7年3月1日(1995.3.1)		アメリカ合衆国、ワシントン、ディーシー
(65) 公表番号	特表平10-500205		20201、エス、ダブリュー、イン
(43) 公表日	平成10年1月6日(1998.1.6)		ディペンデンス アベニュー 200
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/002432		
(87) 国際公開番号	W01995/023960	(74) 代理人	弁理士 笹島 富二雄
(87) 国際公開日	平成7年9月8日(1995.9.8)		
審査請求日	平成14年1月9日(2002.1.9)	(74) 代理人	弁理士 笹島 富二雄
(31) 優先権主張番号	203, 780		
(32) 優先日	平成6年3月1日(1994.3.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 顕微鏡視覚化による細胞の隔離

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法において、

a) 細胞の領域を複数有し、それら細胞が接合組織による接着力を有しているような有機体から取得されてスライド上に載置した組織サンプルを供し、

b) 顕微鏡を使用して前記組織サンプルの細胞の像視野を形成し、

c) 前記細胞の像視野から、隣接している細胞の領域とは異なった種類の細胞を有した、関心ある少なくとも1つの細胞の領域を確認し、

d) 前記組織サンプルから前記関心ある少なくとも1つの細胞の領域に先端に接着剤付きのプローブを接触させ、そのとき該プローブの接触表面部は、前記関心のある少なくとも1つの細胞の領域の表面積以下の表面積を有すると共に接着・抽出剤を備えるようにし、

e) 前記細胞の像視野内の前記関心のある少なくとも1つの細胞の領域が前記接着剤付きプローブの接触表面部に取着した状態の前記プローブを引き戻してその関心のある細胞と周囲細胞との間の接着力を破碎し、

f) 前記少なくとも1つの細胞の領域を分子レベルで分析する

それぞれの過程を含んで構成されることを特徴とする方法。

【請求項 2】

前記関心ある少なくとも1つの細胞領域は、同一種の細胞の複数を具有して構成される請求の範囲 1 に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

【請求項 3】

10

20

前記関心ある少なくとも1つの細胞領域を前記組織サンプルから抽出する過程が自動化されている請求の範囲1に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

【請求項4】

前記分析過程は、自動分析器によって処理する過程である請求項1に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

【請求項5】

前記抽出された関心ある少なくとも1つの細胞の領域は、前記自動分析器へ自動搬送するようにした請求の範囲4に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

【請求項6】

前記抽出された関心ある細胞領域が、酵素、抗原、DNA又はRNAに関して分析される請求の範囲1に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

10

【請求項7】

前記像が、ディスプレイモニターに表示される請求の範囲1に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

【請求項8】

前記組織サンプルは、前記像視野の形成前に着色され、前記着色は前記細胞の像視野から前記関心ある少なくとも1つの領域を確認するために用いられる請求の範囲1に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

【請求項9】

前記関心ある少なくとも1つの細胞領域は、自動化されたコントラスト認識方法によって、前記細胞の像視野から確認される請求の範囲8に記載の組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法。

20

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、細胞サンプルの分析のための方法及び装置に関し、特に、特殊なタイプの細胞の純粋な個体群や亜個体群からの酵素、mRNAやDNAの分析を考慮した多くの異なる技術と組み合わせて使用できる細胞サンプルの顕微解剖及び分析のための方法及び装置に関する。

背景技術

現在では、多くの病気が、分子レベルや遺伝子レベルで理解されている。このような分子の分析は、病気の診断及び予後にとって重要である。組織サンプルからの細胞組織材料を直接抽出する従来の方法には限界がある。これは、その抽出物がマーカーに関連した病気の平均的な内容しか反映していないからである。実際には組織は非常に不均一であり、組織の中の最も診断に役立つ部分は、1つの病変の中に、数百以下の細胞に限られることもある。

30

ヒト腫瘍の分子的な研究は、現在のところ、腫瘍の特徴付けに利用できる技術やモデルのシステムに制約されている。かたまり状の組織標本の中に混在する前記多様な細胞個体群のために、ヒト腫瘍細胞におけるタンパク質や核酸の発現を、定量的及び定性的に評価する研究は、損なわれている。概して、浸潤性腫瘍の組織体には、腫瘍細胞、間質細胞、内皮細胞、正常な上皮細胞及び炎症性細胞を含む多種類の細胞が見られる。腫瘍細胞は、細胞個体群全体では比較的小さい割合であることが多いので、これらの標本の中でタンパク質や核酸の正味の変化を判断することは難しい。

40

腫瘍が浸潤し転移するプロセスは、浸潤性腫瘍細胞の増大したタンパク質分解の活動に依存する。マトリクスメタロプロテアーゼ(MMP)と、カテプシンB、D及びLと、プラスミノゲンアクチベータが、前記転移カスケードに関係する。カテプシンDは、乳癌の予後の独立したマーカーになるものとして提案されてきた。相関関係からは、下記の記載の事柄を含めて腫瘍の浸潤に関してはプロテアーゼが重要であるという考えが支持されている。すなわち、高転移性腫瘍細胞株中の増大したプロテアーゼ活性及び／又はプロテアーゼが変化した亜細胞分布、腫瘍組織ホモジネートの免疫組織化学及びアッセイの双方により判定される浸潤性のヒト腫瘍中のプロテアーゼの発現の増加、及びヒト腫瘍中mRNAレ

50

ベルの増加等の事柄である。これらの技術すべては、ヒト腫瘍におけるプロテアーゼの発現に関して、重要な情報を産み出してきたが、腫瘍の浸潤が起こっている特定の領域で、プロテアーゼの増加を示す明確な証拠を提供するものではなかった。

培養によるヒト腫瘍細胞の研究では、腫瘍細胞と宿主細胞や細胞外マトリクスとの複雑な相互作用について、また、それら相互作用が腫瘍細胞のプロテアーゼの生産性あるいは活性をどのように制御するかを説明できない。免疫組織化学的な着色を行えば、腫瘍浸潤領域内の酵素分布を解析することはできるが、組織の定着や抗体抗原の親和性によって変化することとなり、タンパク質のレベルを準定量的にしか評価することができない。さらに、着色結果の定量的な判断は、組織切片の着色パターンのバラツキ、着色強さの主観による評価、及び基質の着色の意味を判断することの困難性のために、複雑となる。また、プロテアーゼの研究に使用される多くの抗体は、酵素前駆体型と活性型酵素種とを区別できない。ヒト腫瘍のホモジネートからの酵素レベルやmRNAレベルの分析は、標本内の細胞個体群の混在や、組織内で発生しうる附随的な病理生理学的な作用を説明することができない。

10

本発明は、特殊な組織学的領域や、それら領域内の細胞個体群の検査を可能にする細胞組織の顕微解剖のためのサンプリング技術に関するものである。

発明の開示

本発明は、細胞組織サンプル中の特殊な細胞を、確認する方法を提供することを、目的とする。

また、細胞組織サンプルから、特殊な細胞を直接抽出する方法を提供することを、目的とする。

20

また、細胞組織サンプル内の特殊な細胞を、自動的に確認する方法を提供することを目的とする。

また、細胞組織サンプルから、特殊な細胞を直接自動的に抽出する方法を提供することを、目的とする。

また、細胞組織サンプルから、純粋な細胞個体群を得る方法を提供することを、目的とする。

本発明の実施例の記載によって明らかになる上記及びその他の目的によって、本発明は、以下の各ステップa～bを包含した、組織サンプルから細胞材料を直接抽出する方法を提供する。

30

a) 細胞の領域を複数有し、それら細胞が接合組織による接着力を有しているような有機体から取得されてスライド上に載置した組織サンプルを供し、

b) 顕微鏡を使用して上記の組織サンプルの細胞の像視野を形成し、

c) 上記細胞の像視野から、隣接している細胞の領域とは異なった種類の細胞を有した、関心ある少なくとも1つの細胞の領域を確認し、

d) 上記組織サンプルから上記関心ある少なくとも1つの細胞の領域に先端に接着剤付きのプローブを接触させ、そのとき該プローブの接触表面部は、上記関心のある少なくとも1つの細胞の領域の表面積以下の表面積を有すると共に接着・抽出剤を備えるようにし、

e) 上記細胞の像視野内の上記関心のある少なくとも1つの細胞の領域が上記接着剤付きプローブの接触表面部に取着した状態の上記プローブを引き戻してその関心のある細胞と周囲細胞との間の接着力を破碎し、

40

f) 上記少なくとも1つの細胞の領域を分子レベルで分析する。

【図面の簡単な説明】

本発明を、添付図面を参照して説明するが、これら図面に示す実施例は、発明をそれのみに限定されるものではないことは言うまでもない。

図1は、組織サンプルを、顕微鏡で顕像化し、ディスプレイモニターに表示し、かつ、映像化されたサンプルの領域を、顕微解剖及び分析のために選択して確認する方法を示す機能システム図である。

図2a～2cは、本発明の一実施例による、スライド上に載せられた組織サンプルから1つの組織サンプル領域を抽出する方法を示す、一連の機能システム図である。

50

図3は、スライド上に載せられた組織サンプルから、サンプル領域を抽出する装置の選択例を示す概略図である。

図4a及び4bは、本発明による、図3の抽出装置と一緒に使用することができる手動抽出器具マニピュレータの概略図である。

図5は、サンプル組織領域を適切な分析プロトコール（protocol）に導く方法を示す機能システム図である。

図6a及び6bは、10個の検体の浸潤性結腸腫瘍の例（図6a）及び5個の検体の浸潤性胸部（乳房）腫瘍の例（図6b）を、同一患者からの正常な結腸粘膜と比較した場合の、MMP-2の発現を示す。

図7は、MMP-2の活性部位のSSCP解析結果を示す。

10

本発明の最良の実施形態

本発明は、分子レベルや遺伝子的レベルの細胞材料を分析する方法に関するものであり、顕微鏡を用いて組織サンプル内の細胞の領域を視覚化し、確認された領域を、関心のある細胞材料の分離、抽出を及び／又は保持を同時に行う表面に接触させ、前記関心のある細胞材料を適切な分析装置に移動することに関する。本発明は、特に、局所的な組織の酵素、抗原、DNA、RNA、等の分析に適用できる。

本発明は、また、完全自動化システムに関するものであり、これにより、組織はスクリーン上に視覚化され、その結果、関心のある細胞の正確な領域を種々のラベルによって確認して、その範囲を囲んだ後、自動的に抽出し、分析することができる。

図1は、組織サンプルを顕微鏡的に顕像化してディスプレイモニターに表示する方法、また、前記顕像化されたサンプルの中のある領域を、その後の顕微解剖及び分析のために、選択し確認する方法を示す機能システム図である。図1に示すように、サンプル組織1が、顕微鏡調査及び顕像化のためにガラススライド2上に供給される。前記サンプル組織1は、従来のどんな方法でもアガロースゲルでのガラススライド2への取付け、サンプル組織1のパラフィン等への固定も含めて、固定することができる。

20

サンプル組織1を上に乗せたガラススライド2が、顕微鏡のステージ上に置かれる。顕微鏡は、参照符号3によって概略的に示され、サンプル組織1の像を入力する。ビデオカメラ（図示せず）が、顕微鏡3に連結される。該ビデオカメラは、顕微鏡3からサンプル組織1の像を入力して、ディスプレイモニター4に組織サンプルの像を表示する。

サンプル組織1の像は、どのような一定の像を入力する場合も顕微鏡3の“視野”に制限される。図1に示すように、サンプル組織像の視界は、異なったタイプの細胞である幾つかの領域、“A”、“B”、“C”、及び“D”を含んでおり、それらは、組織サンプルを適切な染料を用いて着色することにより、選択的に区別できる。例を示すと、図1及び2a～2cにおいて、領域“B”が、関心のある細胞材料の領域であると仮定する。ディスプレイモニター4上の像が、オペレーターによって使用され、関心のあるサンプル組織1の中から1つ乃至複数の領域が選択され、確認される。本発明の一実施例によれば、関心のある領域を選択し、確認した後、オペレータは、装置を手動操作して、ガラススライド2から確認された領域を抽出する。サンプル材料の抽出された領域は、分析サンプルを含むことができる。ない。そうでない場合は、確認され抽出された領域は、廃棄される領域に含むことができ、ガラススライド2に保持されている残りの領域は、後で分析することができる。

30

40

以下に詳述する手動操作に加えて、本発明の別の実施例によれば、ディスプレイモニター4上の像を利用して、サンプル領域を選択し確認することができる。サンプル領域の相対位置は、ビデオカメラ（又は顕微鏡）からの像のデジタル化された信号を入力し、かつ、該サンプルが保持されている顕微鏡3のステージの基準位置を入力するコンピュータを利用して決定される。このような、位置を検出し確認するシステムは、従来技術であり、本発明に係るサンプル準備方法の自動化に容易に適用できる。このように自動化した本発明の実施例では、位置の検出と確認を行うコンピュータは、組織領域の抽出に使用される後述の装置の駆動を制御するためにも使用でき、これによって前記サンプルの取り出しが自動化される。さらに、公知の技術及び装置を使用して、前記サンプルの像を電子的に走査

50

し、所定の着色又は適度の着色をされた領域を、自動的に確認できる。このように、好ましい実施例では、コンピュータを使用して、関心のある領域及び該領域の相対位置を選択及び確認して、装置を操作することにより、前記領域を自動的に取り出すことができる。図2a～図2cは、本発明の一実施例によるスライド上の組織サンプル1から該組織サンプル1の領域を抽出する方法を示す一連の機能システム図である。図2a～2cに示されたステップは、オペレータによる手動操作か、又は従来の慣用的な位置決め及び制御を用いるコンピュータ、例えば、コンピュータ制御ロボット工学で行えることがわかる。

図2a～2cに示された本発明の実施例では、先端に付着／抽出薬6を持つプローブ5が利用される。適切な付着／抽出薬としては、ピコライト(piccolyte)とキシレンとの混合物が含まれる。図2aでは、プローブ5は、手動もしくはコンピュータ制御によって、抽出されるサンプル領域“B”の上方且つ、と同一直線上になるように位置決めされる。図2aから容易に分かるように、接触プローブの先端（と付着／抽出薬）の表面積は、抽出しようとする領域の表面積にほぼ等しいか、又は、小さくする必要がある。さもなければ、隣接した組織領域が過剰に除去されてしまう。

接触プローブ5の先端を、抽出されるサンプル領域“B”の直上にセットした後、該接触プローブ5を下ろして、先端の付着／抽出薬6を前記サンプル領域に接触させる（図2b）。

前記付着／抽出薬6は、前記サンプル領域に容易に密着するものを選択する。前記接触プローブ5の先端の付着／抽出薬6が、前記サンプル領域に接触して（図2b）、該サンプル領域が付着／抽出薬6に密着すると、接触プローブ5を前記接触位置（図2bに示す）から引き戻して、図2cに示すように移動することができる。付着／抽出薬6の相対的粘着力は、前記サンプルをガラススライドに載せるために使用される粘着力に比較して大きいので、接触プローブ5は、前記ガラススライドから引き離され、もしくは、引き戻される時に、該ガラススライドから前記サンプル領域“B”を引き上げる。本発明の一実施例では、プローブ5としてガラスピペットを使用した。本実施例では、ピコライト／キシレン溶液に前記ガラスピペットの先端を浸すことによって、該ガラスピペットの先端が、ピコライト（568g/l）とキシレン（437.5g/l）との溶液でコーティングされる。

ガラススライド2からの前記サンプル領域の取り出しに加えて、図2cに示すように前記プローブ5は前記抽出されたサンプル領域を分析容器7や他の場所、廃物容器、培養細菌媒体等に移動するために使用することができる。好ましい実施例では、接触プローブ5は、前記抽出されたサンプル領域を自動臨床分析装置のサンプル受入れステージに移動させるのに使用することができる。この自動臨床分析装置は、前記サンプル領域に対して所望の分析を行えるように設計されている。このように、本発明により、スライド上サンプルのサンプル領域を確認し、関心のあるサンプル領域をスライド上のサンプルから取り出し、かつ、該抽出されたサンプル領域を自動的に分析できる自動分析装置に移動するための、完全に自動化された方法及びシステムを提供できることが、わかる。

図2cにおいては、前記抽出されたサンプル領域を容器7内に分配するように示されている。この容器は、例えば、前記抽出されたサンプル領域の分析を内部で開始し、実行するような試験管とか、あるいはそれと同様の容器でよい。図2cに示すように、前記接触プローブの先端から、抽出されたサンプル領域の全量の成分又は所望の成分を取り出す試薬溶液8は、抽出されたサンプル領域を容器7内部に入れる前に、上記容器7内に入れることができる。例えば、DNA分析の場合、前記抽出されたサンプル領域を前記接触プローブ5の先端から取り出し、分析用の組織材料を溶かすために、T r i s (50mM, PH8.5), E D T A (1mM), T w e e n 20(0.5%), 及びプロテナーゼK (0.2mg/mL)の溶液が、使用できる。

図2a～2cに示された接触プローブの他には、前記スライド上の組織サンプル1からサンプル領域を抽出するために、吸引孔片を使用することもできる。このような吸引孔片には、サンプル領域を打ち抜き、吸引力によって抽出できる鋭い環状のチップを備えることができる。

図3は、スライド上の組織サンプル1からサンプル領域を抽出する装置の選択的な例の概

10

20

30

40

50

要を示したものである。図3に示した抽出装置9は、切断用の刃10と掴み用のアーム11と、を、含んでいる。掴み用のアーム11は、切断用の刃10に対向する方向に動かすことができる。掴み用のアーム11は、図3では、開いた状態が示されている。掴み用のアーム11は、前記図示された開位置から、先端が、前記切断用の刃10に接触する閉位置まで動かすことができる。掴み用のアーム11はケーブルとプーリからなるシステムによって動きを制御され、掴み用のアーム11は、その基端部に位置するプーリを通るケーブルを引っ張ることにより、前記基端部を支点として動かされる。ケーブルへの引っ張り力は、公知の方法でケーブルに引張力を加える装置上のレバーを動かしたり、ボタン12を押したりすることによってケーブルに加えられる。このような駆動機構は、握り装置の技術として公知である。

10

図3に示した装置を操作する際には、切断用の刃10は装置の中心軸に対して鈍角になっているが、該切断用の刃10を前記抽出されるべき組織サンプル部分の一方の縁にあてがい、前記掴み用のアーム11を閉位置に移動させることにより、組織サンプルの一部を切り取って、すくい上げることができる。掴み用のアーム11は、組織サンプルに接触すると、切断用の刃10をサンプル内に引き入れ、サンプル部分を切断用の刃10に押し付けることによって、サンプル部分は掴み用のアーム11と切断用の刃10との間に接触し、サンプルから切り取られてすくい上げられる。

さらに、図3の装置の選択的な実施例では、プーリの代わりに歯付のギアと、ケーブルの代わりに前記ギアと連動する歯付のロッドと、を用いても掴み用のアーム11の動きは効果的に実施できる。このような機構は、掴み装置の分野において公知である。

20

図4a及び4bは、本発明による前記図3の抽出装置と一緒に使用することができる手動抽出工具操作器の概要図を示す。図4aにおいて、ベース13を有する抽出工具操作器が示され、該ベースは、顕微鏡(図4b参照)のステージの支柱乃至支持部に前記(抽出)装置を取り外し自由に取り付けるためのクランプ手段14を備えている。前記クランプ機構は、クランプ板15を含み、該クランプ板15は、前記ベース13の下側部分の貫通孔17を貫通した貫通シャフト16に固定されている。締結用ノブ18が、前記貫通シャフト16の一端に設けられている。該締結用ノブ18を回転させると、前記クランプ板15が前記ベース13の上部部分に対して移動する。このように、前記抽出工具操作器は、顕微鏡20のステージの支柱乃至支持部21を、前記クランプ板15と支柱13の上部部分19との間に位置させ、ノブ18を回してクランプ板15を顕微鏡20の支柱乃至支持部21に対して締結することによって、顕微鏡20のステージ部分に締結することができる。

30

前記抽出工具操作器は、抽出工具24のシャフトを支持する貫通孔23を内部に備えた工具保持器22を含んでいる。理想的には、前記工具保持器22は、抽出工具24の前後の動きを緩和するようにすべきである。そのため、好ましい実施例では、工具保持器22の貫通孔23に、工具ロックネジ24によって工具のシャフトに対して調整可能に締め付けることができるブッシュを備えるようにする。

工具保持器22は、支持シャフト25に支持され、該シャフト25の両端は、360°方向に緩衝機能を持った自在継手26及び27を介して前記工具保持器22と前記ベース13とに連結されている。支持シャフト25の長さは、前記2つの自在継手26及び27の間で調整自由である。前記独立した360°の自在継手26、27と、支持シャフト25の調整可能な長さとの貫通ボア23内の工具シャフトの位置とを同時に調整することによって、顕微鏡のステージ上に位置するスライド上のサンプルに対して抽出工具を高精度に動かすことができる。そのため、オペレータは、抽出工具操作器に保持された抽出工具を操作して、スライド上の組織サンプルから選択された組織領域を、高精度に取り出すことができる。

40

図5は、サンプル組織領域に対し適切な分析プロトコルを行う方法を示す機能システム図である。図5に示すように、上述した方法でスライド上の組織サンプル1から、組織サンプル領域の微量な抽出を行い、次いで、サンプル準備ステージ28へ移動し、そこで分析のために関心のある細胞を抽出し、収集する。切り取られた細胞もまたこのステージ28で溶かされる。関心のある細胞がDNAやRNAを含んでいる場合は、抽出されたサンプルには、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅及びハイブリダイゼーション、1本鎖DNA高

50

次構造多型 (SSCP) 解析、サザンブロット法又はノーザンブロット法を行う。関心のある細胞がタンパク質を含んでいる場合は、抽出されたサンプルには、ザイモグラフィー、免疫学的分析 (イムノアッセイ)、ないしは生化学的な分析を行う。本発明による凍結組織部分片の選択的抽出、あるいは顕微解剖では、活性型酵素と mRNA の回収や分析も可能である。さらに、これらの部分片から回収された DNA は未変性であるので、DNA 指紋採取のような研究に使用できる。本発明によるパラフィン包埋組織の顕微解剖では、1 ハイパワーフィールドより小さい純粋な細胞個体群若しくは嚢胞で裏打ちされた単一層の上皮細胞からの DNA の PCR 増幅も可能である。

本発明による凍結部分片の顕微解剖に用いられるサンプルの一般的な準備には、顕微解剖用スライド 1 に % アガロースを標準的な顕微鏡組織用スライド上に載せ、カバースリップをする。短時間、例えば 5 分間、の後に、前記カバースリップを前記スライド上に薄いゲルを残して取り除く。小さな凍結組織部分片、例えば厚さ 25 ミクロンの凍結組織部分片を、アガロースゲル上に置き、エオシンによって短時間の着色をする。前記組織は、また、後述する抽出方法により、RNase (リボヌクレアーゼ) を変性させる薬剤で処理することもできる。直接顕微鏡を覗く場合には、上述した技術を用いながら前記組織部分片から関心のある特殊な細胞の個体群や亜個体群を得る。

酵素分析のためには、前記得られた組織見本は、前記関心のある酵素による適切な緩衝剤の中に置かれる。前記酵素レベルは、ザイモグラフィーを含むいくつかの酵素測定方法や、特殊な蛍光基質を用いることによって測定できる。これにより特殊な細胞個体群の酵素発現のレベルを高精度に決定できる。

mRNA 分析において、前記組織標本は、アガロース上に置き、必要であれば RNase を変性させる薬剤で処理する。前記得られた組織標本は、液体窒素によって急速に凍結し、直ちに使用するか、数カ月間 -70° で保存する。mRNA はオリゴ dT カラム (マイクロファーストトラック mRNA アイソレーション キット, インベトロジェン社製) を用いて抽出する。純粋な細胞個体群から回収された mRNA は、PCR 技術を用いて増幅し、解析することができる。

DNA 分析において、前記組織標本は、50 mM の Tris, pH 8.5; 1 mM の EDTA, 0.5% の Tween 20, 及び 0.2 mg/ml のプロテナーゼ K を含有する一段階抽出の緩衝溶液に入れ、 37°C で 4 時間培養、その後 95°C で 10 分間培養する。回収された DNA は、PCR 技術によって増幅し、分析することができる。未変性 DNA が DNA 指紋採取に必要な場合には、プロテナーゼ K を DNase の後で加える。

ルーチンにホルマリン固定されたパラフィン部分片の顕微解剖において、パラフィン包埋組織部分片は、脱パラフィン後、エオシンにより短時間の着色を行った後に、顕微解剖される。組織部分片は顕微鏡で直接見ることができ、また、上述したような粘着剤で覆われた先端を持つ変形ガラスピペットを用いて、関心のある細胞の個体群や亜個体群を得ることができる。単細胞程度に小さい組織標本を、この方法で得ることができる。この解剖の特異性は、公知の技術を著しく改善したことにある。

パラフィン包埋組織の DNA 分析において、前記解剖された組織標本が付着したガラスピペットは、一段階抽出緩衝溶液 (50 mM の Tris, pH 8.5; 1 mM の EDTA, 0.5% の Tween 20, 及び 0.2 mg/ml のプロテナーゼ K) に入れることで、この溶液によって、前記ピペットの先端から前記組織が取り除かれる。サンプルは、その大きさに応じて、 37°C で 2 ~ 24 時間培養、続いて 95°C で 10 分間培養する。前記ガラスピペットの先端は、殺菌して再利用する。

本発明の特徴と特性は、後述する実験例により説明されるが、これに限定されるものではない。本実験例及び全体を通して、特に示されていないとき、% は重量 % である。

以下の実験例は、本発明が、ヒト腫瘍の浸潤によるプロテアーゼ (タンパク質分解酵素) 分布の研究に特に用いることができることを証明するために実施した。胸部 (乳房) 及び結腸癌腫の浸潤領域内の MMP-2 とカテプシン B のレベルを測定し、これらの領域における酵素が、同一患者から採取した正常な細胞の酵素数と比較して、量的に増大しているか否かを評価した。

10

20

30

40

50

後述する実験例では、手術により切除された結腸及び胸部の組織から採取された正常サンプル及び腫瘍サンプルは、分析まで冷凍状態（ -70°C ）で保存した。胸部及び結腸の癌腫の浸潤組織部分片は、組織学（顕微鏡的解剖学）的に選択した。前記腫瘍部分片は、正常な上皮でも、多数の炎症性細胞でもない、浸潤腫瘍と間質とを含む領域の組織を組織学的に選択した。正常組織を用いる対照部分片は、上皮と、その下層の薄い間質の断片を含んでいた。上皮と間質組織との比率は、正常な部分片と腫瘍部分片の両方で同程度の比率となった。

実験例では、顕微解剖用のスライドとして、標準的な組織学的なスライドに、温めた $200\ \mu\text{l}$ のアガロース（1%）とそれを覆うカバースリップをのせたものを用いた。5分間の後、前記カバースリップを、前記スライド上にアガロースの薄層を残して取り外した。20ミクロン厚の凍結部分片をクライオスタット内で準備し、アガロースゲル上に置いた。前記組織は、エオシンに短時間浸した。図3に示された顕微解剖装置によって、解剖を各切片の縁から始めて系統的に解剖し、関心のある組織学的領域を分離することによって、最適条件での顕微解剖を行うことができた。関心のある領域は、その後の分析のためにスライド上に保持した。前記標本のDNA含有量は、吸光度 $260\ \text{nm}$ の分光光度法により定量した。各サンプルのDNA含有量は、各組織部分片内で計測された細胞数に比例した。

実験例 1

本実験例では、細胞数に対応した数の正常組織及び腫瘍組織のサンプルを、各観点から分析した。MMP-2のレベルは、デイモグラフィーにより測定し、アルカス（Arcus）スキャナを用いて定量した。その結果は、スチューデント（students）のt-テスト法を用いて統計学的に処理した。カテプシンBのレベルは、基質Z-Arg-Arg-NHMe c に対する $V_{\max}$ 値として測定した。

本実験例の結果は、下記の表1に示した。この表には、結腸の癌腫／正常上皮、胸部の癌腫／正常上皮の各対に対応した前記カテプシンBを活性をリストした。活性の測定値は、 $V_{\max}$, $\text{nmol}/\text{min} \times \text{mg DNA}$ として表現される。カテプシンBの活性は、結腸の腫瘍の場合は、平均が2.3倍（ $p < 0.005$ ）、胸部の腫瘍の場合は、平均が6.9倍（ $p = 0.077$ ）、増大した。

表1

人体の結腸の悪性腫瘍におけるカテプシンBの活性

サンプル	正常	腫瘍	腫瘍／正常
1	1.38	4.75	3.4
2	1.89	2.25	1.2
3	1.98	6.32	3.2
4	0.49	1.88	3.8
5	0.44	0.72	1.6
6	1.03	1.92	1.9
7	0.47	1.35	2.9
8	0.19	0.33	1.7
9	1.07	0.90	0.8
10	0.33	0.88	2.7
平均値	0.93	2.13	2.3

人体の胸部の悪性腫瘍におけるカテプシンBの活性

<u>サンプル</u>	<u>正常</u>	<u>腫瘍</u>	<u>腫瘍/正常</u>
1	0.63	3.02	4.8
2	0.51	10.08	19.8
3	0.61	4.43	7.3
4	2.21	2.38	1.1
5	2.06	3.72	1.8
<u>平均値</u>	1.20	4.73	6.9

10

表1から明らかなように、5個の検体の胸部腫瘍全てと、10個の検体の結腸腫瘍中9個の検体において、同一患者からの正常な細胞に対応した数値と比較するとカテプシンBの活性の増大が示された(表1)。結腸腫瘍の活性は、正常細胞の19%~283%増に及び、平均の増大率は、2倍以上であった。カテプシンBの活性の増加は、平均増大率が7倍をやや下回る胸部の腫瘍において、より明瞭であった。

実験例 2

本実験例においては、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法が行われた。既に報告された、72kDa IV型コラゲナーゼのcDNA配列に基づいてセンス及びアンチセンスのオリゴヌクレオチドのプライマーが、前記酵素の活性位置を増幅するために合成された(M. Onisto et al, "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Phenotyping of Metalloproteinases and Inhibitors in Tumor Matrix Invasion", Diagn. Mol. Pathol, 2(2):74-80, 1993)。前記対になったオリゴヌクレオチドの配列は、5'-CAA TAC CTG AAC ACC TTC TA, 3'-CTG TAT GTG ATC TGG TTC TTGであった。1本鎖DNA高次構造多型(SSCP)解析用に標識を組み込むPCR反応を、後述する10マイクロリットル反応系で行った。1マイクロリットル10X PCRバッファ(100mM Tris-HCl, pH 8.3; 500mM KCl; 15mM MgCl₂; 0.1% w/vゼラチン); 1マイクロリットルのDNA抽出緩衝溶液; 各50pmolのプライマー; 各20nmolのdCTP, dGTP, dTTT及びdATP; 0.2マイクロリットル [³²P] dCTP (6000Ci/mmol); 及び0.1unitのTaq DNAポリメラーゼ。この増幅反応は、95℃で30秒、60℃で30秒、及び72℃で30秒、を30回繰り返した。

20

30

図6aは、10個の検体の結腸の浸潤性癌腫を、同一患者からの正常な結腸粘膜と比較した場合のMMP-2の発現を表したものである。棒グラフは、前記72kDa前駆体型酵素では約3倍(p<0.001)に、また、前記62kDa活性型酵素では約10倍(p<0.001)に増加したことを示している。

図6bは、5個の検体の胸部浸潤性癌腫のMMP-2の発現を表したものである。棒グラフは、前記72kDa前駆体型酵素では約3倍(p<0.05)に、また、前記62kDa活性型酵素では約10倍(p<0.05)に増加したことを示している。

前記72kDa前駆体型IV型コラゲナーゼの酵素及び62kDa活性型酵素は、10個の検体の結腸腫瘍全て及び5個の検体の胸部腫瘍全てにおいて、同一患者の正常な組織と比較すると増加した。62kDa活性型酵素の増加は、より著しく、結腸及び胸部腫瘍においては共に、正常細胞と比較して平均値で10倍にまで増加した。前記72kDa前駆体型酵素のレベルは、前記二種類の腫瘍において共に平均で3倍に増加した。胸部及び結腸の腫瘍の両方に対して、前記62kDa活性型酵素の増加は、前記前駆体型酵素に比較して、バラツキが多かった。具体的には、前記両腫瘍における62kDa活性型酵素の増加は、3倍から20倍までの範囲であるのに対し、前記72kDa前駆体型酵素の増加は2倍から5倍までの範囲で安定であった。これらの結果は、最近報告されたDavis他(研究("Activity of Type IV Collagenases in Benign and Malignant Breast Disease", Br. J. Cancer, 67: 1126-1131, 1993)のヒト胸部腫瘍の分析に類似した結果を示している。この引用研究では、ヒト乳癌の患者からの組織部分片のザイモグラフィを行っている。この分析では、前記62kDa活性型で存在する総MMP-2の画分が、悪性の疾患においては、統

40

50

計学的に増大すること、また、この種の活性型酵素がより進行した腫瘍の中に高い比率で検出されたこと、を示している。本発明は、浸潤性腫瘍特有の領域内における72kDa及び62kDaの2種類の酵素と、同一患者から採取された対応する正常な状態の上皮と、を比較し、定量的に評価することによって、上記の分析を拡張したものである。

実験例 3

本実験例では、1本鎖DNA高次構造多型(SSCP)解析を行った。ラベルされ増幅されたDNAを、等容量のホルムアミドゲルローディングバッファー(95%のホルムアミド; 20mM EDTA; 0.05%のプロモフェノールブルー、及び0.05%のキシレンシアノル)と、混合し、95°Cで5分間変性した後、6%のアクリルアミド(49:1アクリルアミド:ビス)、5%のグリセロール、及び0.6XTBEで構成されたゲル上に載せた。前記サンプルは、室温で一晩、8Wで電気泳動した。ゲルは、3mmのワットマンペーパー(Whatmanpaper)に移し、乾燥させ、コダックX-OMATを用いてオートラジオグラフィで検出した。

図7は、MMP-2の活性部位のSSCP解析結果を示す。図は正常な結腸粘膜を浸潤性の結腸の癌腫と比較した場合、及び正常な胸部の組織を浸潤性胸部癌腫と比較した場合の、代表的なケースを示している。正常なものの標本と腫瘍の標本との間に相違は見られなかった。各レーンの2つのバンドは単一形状及び二重形状のDNAを表している。10個の検体の結腸の悪性腫瘍と4個の検体の胸部悪性腫瘍の場合も似たような結果が得られた。活性型MMP-2の腫瘍レベルの増加が、前記酵素の変異によるものであるか否かを評価するために、PCR法を使用して、結腸及び胸部腫瘍からのゼラチナーゼAの活性部位をコードするDNA配列を増幅した。前記活性部位は、前記酵素のN末端から10kDaに位置しており、前記72kDa前駆体型酵素を前記62kDa活性型に変換する切断部位を含んでいる。PCRやSSCPによるこの領域の増幅や解析の結果では、前記研究された10個の検体の結腸腫瘍及び4個の検体の胸部腫瘍のどこにも変異は見つからなかった。これらの結果は、浸潤性腫瘍内の活性型酵素レベルの増加が、最大の要因として、腫瘍に関連した活性化種によるものである可能性を示している。また、顕微解剖された凍結組織部分片からのDNAのPCR増幅の感度は、1ハイパワーフィールドより小さくなるように設定した。DNAの増幅と同様に、本発明を用いてRT-PCRを行うことで、小細胞個体群からのmRNAの増幅を行った。

従来の研究は、MMP-2は、ヒト結腸癌腫を増加させることを示している。しかし、*in situ*ハイブリダイゼーション法を用いた最近の幾つかの研究から、ヒト結腸癌腫でのMMP-2のmRNAレベルは、腫瘍細胞ではなく間質細胞において増加することが報告されている。この可能性を探るため、凍結組織部分片を顕微解剖し、腫瘍及び間質細胞それぞれの個体群におけるMMP-2酵素レベルを測定した。ザイモグラフィを用いて酵素レベルを定量するのに十分な組織を単一のハイパワーフィールドから回収した。浸潤性腫瘍細胞とそれに隣接する間質の3例の研究から、72kDa前駆体型MMP-2及び62kDa活性型酵素は、腫瘍細胞と間質細胞個体群の双方に関連していることが示された。予備試験のデータでは、腫瘍-間質の境界面で最大の酵素レベルとなることが示されている。

上記の結果は、本発明による凍結組織部分片の顕微解剖が、従来技術以上に、ヒト腫瘍内の細胞個体群を明瞭に分析できることを示している。前記顕微解剖は、酵素や特別な種類の細胞の純粋な個体群や亜個体群からのmRNA及びDNAの分析も可能な幾つかの異なった技術と組み合わせて使用することもできる。この簡易な技術は、ヒト腫瘍の浸潤中によるプロテアーゼの分配に特徴を与えること、腫瘍及び/又は間質細胞個体群内のプロテアーゼの発現を腫瘍の悪性度を示すものとして正確に判定すること、かつ、前記腫瘍-間質の境界面でのプロテアーゼ活性を抑制するためのアンチプロテアーゼ治療薬の効果をモニターすることについて有用性がある。さらに、この顕微解剖技術を、PCR、RT-PCR、デファレンシャルディスプレイ法及びSSCP解析を組み合わせることにより、不均一なヒト腫瘍サンプルでは明らかにならないような、腫瘍又は間質細胞の特異な亜個体群における遺伝的な変化を確認することができる。

本発明は、特別な手段，材料及び実施例を参照して述べてきたが、上記の言及内容から当業者であれば、容易に本発明の本質的な特性を見出すことができ、後述の請求の範囲に記載されている本発明の精神や範囲を逸脱することなく、様々に変更ないし修正を、種々の用途や特性に適合させることができる。

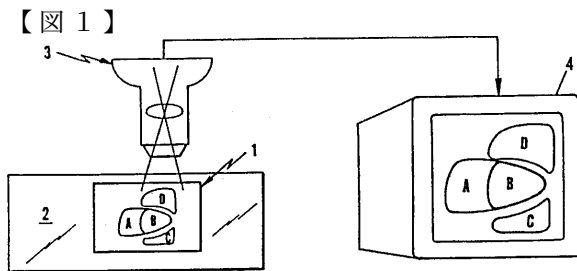


FIG. 1

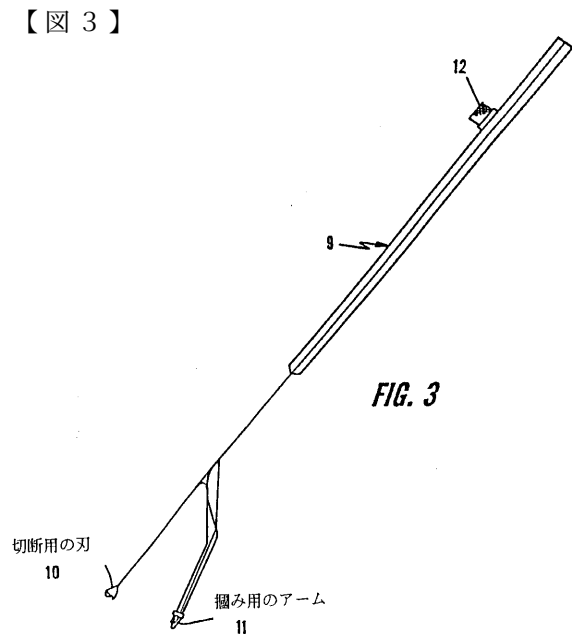


FIG. 3

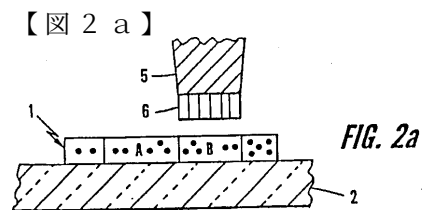
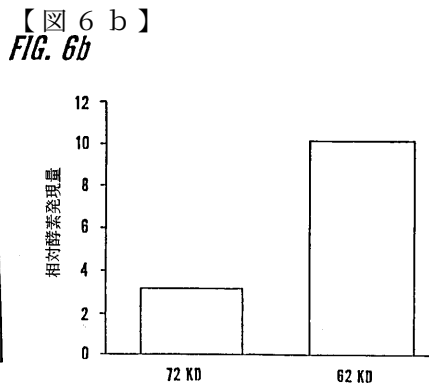
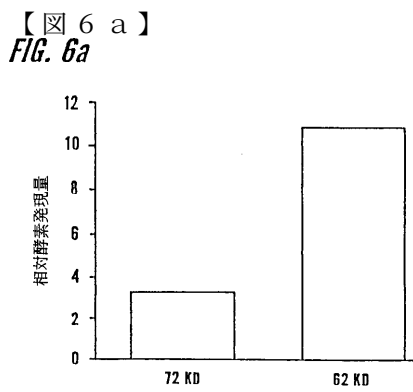
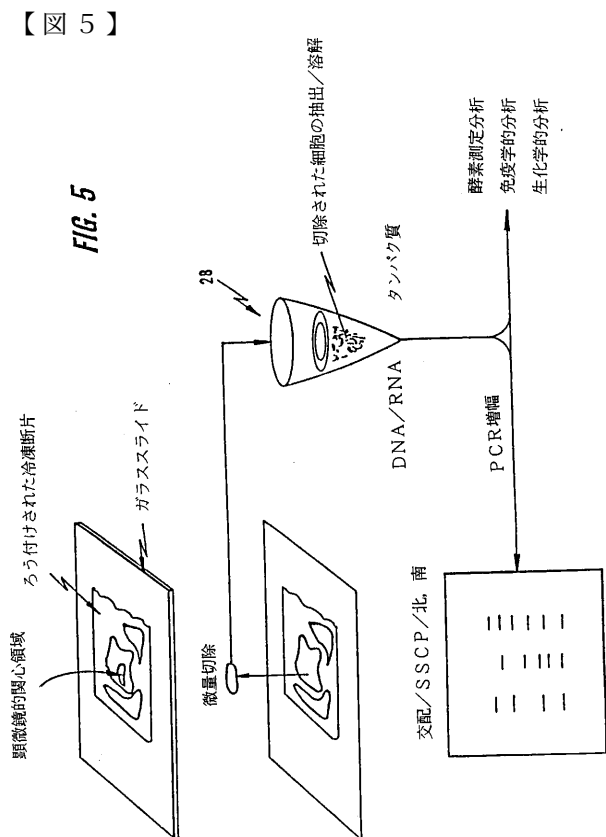
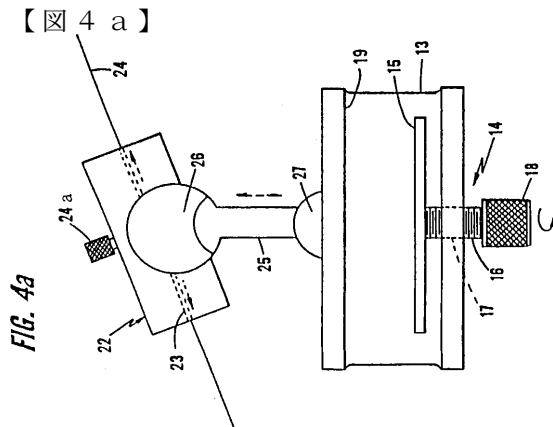
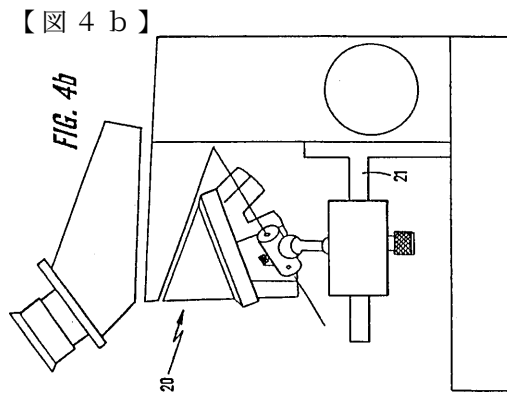
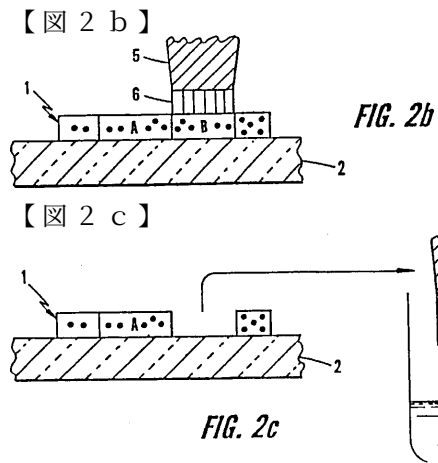


FIG. 2a



【図 7】
糸吉月島

月島音区

正常 腫瘍 正常 腫瘍



FIG.7

フロントページの続き

- (72)発明者 リオッタ, ランス エー.
アメリカ合衆国、メリーランド 20854、ポトマック、ミストウッド ドライブ 9027
- (72)発明者 ズアン, ゼンピン
アメリカ合衆国、メリーランド 20852、ロックビル、グロスベナー プレイス 10101
ナンバー218
- (72)発明者 バック, マイケル アール.
アメリカ合衆国、メリーランド 20814、ベセスダ、ウィスコンシン アベニュー 8200
ナンバー1504
- (72)発明者 ステトラースティープンソン, ウィリアム ジー.
アメリカ合衆国、メリーランド 20902、シルバー スプリング、ウェストチェスター ドラ
イブ 2049
- (72)発明者 ルベンスキー, イリアナ エー.
アメリカ合衆国、メリーランド 20906、シルバー スプリング、フーゴ サークル 155
1
- (72)発明者 ロス, マーク ジェイ.
アメリカ合衆国、メリーランド 20904、シルバー スプリング、セダー クリーク レーン
13667

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開平05-127099 (JP, A)
特開平03-247268 (JP, A)
特開昭62-085840 (JP, A)
特開昭53-043590 (JP, A)
特表昭63-501597 (JP, A)
特表昭60-501687 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 1/04
G01N 1/28
G01N 33/48
G01N 33/483
C12M 1/00