

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-58145

(P2017-58145A)

(43) 公開日 平成29年3月23日(2017.3.23)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/48 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	A 2GO45
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/48	P
	GO 1 N 33/53	Y

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2015-180721 (P2015-180721)	(71) 出願人	598041566 学校法人北里研究所 東京都港区白金5丁目9番1号
(22) 出願日	平成27年9月14日 (2015.9.14)	(74) 代理人	100106909 弁理士 棚井 澄雄
		(74) 代理人	100188558 弁理士 飯田 雅人
		(72) 発明者	長塩 亮 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内
		(72) 発明者	佐藤 雄一 神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫染色用増感剤、免疫染色用増感剤キット、及び免疫染色方法

(57) 【要約】

【課題】 免疫染色において試料の染色性を向上可能な免疫染色用増感剤を提供する。

【解決手段】 組織切片の免疫染色に用いられる免疫染色用増感剤であって、陰イオン界面活性剤及び還元剤を含み、前記還元剤が、ホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である免疫染色用増感剤。前記免疫染色用増感剤は、前記陰イオン界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウムであり、前記還元剤がトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンであることが好ましい。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

組織切片の免疫染色に用いられる免疫染色用増感剤であって、陰イオン界面活性剤及び還元剤を含み、前記還元剤が、ホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である、免疫染色用増感剤。

## 【請求項 2】

前記陰イオン界面活性剤を 0.1 ~ 30 (w/v) % の割合で含み、前記還元剤を 0.0001 ~ 20 mol/l の割合で含む、請求項 1 に記載の免疫染色用増感剤。

## 【請求項 3】

前記陰イオン界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウムであり、  
前記還元剤が、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、トリブチルホスフィン(TBP)、2-メルカプトエタノール、2-メルカプトエタノールアミン、ジチオトレイトール(DTT)、及びジチオエリトリートール(DTE)からなる群から選択される少なくとも一種の化合物である、請求項 1 又は 2 に記載の免疫染色用増感剤。

10

## 【請求項 4】

前記陰イオン界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウムであり、前記還元剤がトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンである請求項 1 又は 2 に記載の免疫染色用増感剤。

## 【請求項 5】

組織切片の免疫染色に用いられる免疫染色用増感剤キットであって、  
陰イオン界面活性剤と、還元剤と、を備え、  
前記還元剤がホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である、免疫染色用増感剤キット。

20

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の免疫染色用増感剤を用いる免疫染色方法であって、  
前記組織切片の抗原に抗体を反応させる前に、前記免疫染色用増感剤を組織切片に接触させることを含む、免疫染色方法。

## 【請求項 7】

前記組織切片に対して加熱処理することを含む、請求項 6 に記載の免疫染色方法。

## 【請求項 8】

前記加熱処理の後に、前記免疫染色用増感剤を組織切片に接触させる、請求項 7 に記載の免疫染色方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、免疫染色用増感剤、免疫染色用増感剤キット、及び免疫染色方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

免疫染色は、組織標本に含まれるタンパク質を、抗原抗体反応により検出する手法である。免疫染色は免疫組織化学ともいう。免疫染色は、標的タンパク質の発現の程度を組織学的な情報と併せて取得できる有用な方法であることから、生命科学分野において広く用いられている。

40

免疫染色の対象となる組織標本としては、生体試料を固定した固定標本が用いられるのが通常である。生体試料に対して固定を行うことにより、試料を取得した際の細胞状態を、長期間にわたって保存可能となる。

しかし、生体試料に対して固定を行うことにより、免疫染色の感度が低下する場合が知られている。例えば、ホルマリンを用いて生体試料を固定した場合、固定によりタンパク質に架橋が生じて抗原部分がマスキングされるなど、抗原抗体反応が生じ難い状態になることがある。そこで、試料に対して抗原抗体反応が生じやすい状態にする処理が行われており、抗原賦活化や賦活化処理等と呼ばれている。

50

## 【 0 0 0 3 】

最も一般的な賦活化処理として、タンパク質分解酵素処理と、加熱処理が挙げられる。その他の賦活化処理に関するものとして、特許文献 1 には、賦活化処理に用いられる、C C A を含む抗原賦活剤が開示されている。また、特許文献 2 には、陰イオン性界面活性剤で標本を処理する目的抗原物質の賦活化方法が開示されている。

## 【 先行技術文献 】

## 【 特許文献 】

## 【 0 0 0 4 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 2 - 3 5 0 4 3 0 号 公 報

【 特許文献 2 】 特開 2 0 1 0 - 0 6 6 0 3 4 号 公 報

10

## 【 発明の概要 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

## 【 0 0 0 5 】

しかし、免疫染色の染色性を向上させることについて、上記技術には改良の余地がある。

本発明はこのような事情に鑑みてなされたものであり、免疫染色において試料の染色性を向上可能な、免疫染色用増感剤、免疫染色用増感剤キット、及び免疫染色方法の提供を課題とする。

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 6 】

20

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究した結果、免疫染色の際に特定の界面活性剤及び還元剤を含む免疫染色用増感剤を用いることで、免疫染色の染色性を向上可能であることを見出した。

## 【 0 0 0 7 】

すなわち本発明は、下記の特徴を有する免疫染色用増感剤、免疫染色用増感剤キット、及び免疫染色方法を提供するものである。

## 【 0 0 0 8 】

( 1 ) 組織切片の免疫染色に用いられる免疫染色用増感剤であって、陰イオン界面活性剤及び還元剤を含み、前記還元剤が、ホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である、免疫染色用増感剤。

30

( 2 ) 前記陰イオン界面活性剤を 0 . 1 ~ 3 0 ( w / v ) % の割合で含み、前記還元剤を 0 . 0 0 0 1 ~ 2 0 m o l / l の割合で含む、前記 ( 1 ) に記載の免疫染色用増感剤。

( 3 ) 前記陰イオン界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウムであり、

前記還元剤が、トリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィン ( T C E P ) 、トリブチルホスフィン ( T B P ) 、 2 - メルカプトエタノール、 2 - メルカプトエタノールアミン、ジチオトレイトール ( D T T ) 、及びジチオエリトリートール ( D T E ) からなる群から選択される少なくとも一種の化合物である、前記 ( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の免疫染色用増感剤。

( 4 ) 前記陰イオン界面活性剤がドデシル硫酸ナトリウムであり、前記還元剤がトリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィンである前記 ( 1 ) 又は ( 2 ) に記載の免疫染色用増感剤。

40

( 5 ) 組織切片の免疫染色に用いられる免疫染色用増感剤キットであって、陰イオン界面活性剤と、還元剤と、を備え、

前記還元剤がホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である、免疫染色用増感剤キット。

( 6 ) 前記 ( 1 ) ~ ( 4 ) のいずれか一つに記載の免疫染色用増感剤を用いる免疫染色方法であって、

前記組織切片の抗原に抗体を反応させる前に、前記免疫染色用増感剤を組織切片に接触させることを含む、免疫染色方法。

( 7 ) 前記組織切片に対して加熱処理することを含む、前記 ( 6 ) に記載の免疫染色方

50

法。

(8) 前記加熱処理の後に、前記免疫染色用増感剤を組織切片に接触させる、前記(7)に記載の免疫染色方法。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、免疫染色の染色性を向上可能である。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】免疫染色用増感剤が、染色強度に与える効果を示す免疫染色写真である。

【図2】免疫染色用増感剤中の陰イオン界面活性剤が、染色強度に与える効果を示す免疫染色写真である。

【図3】免疫染色用増感剤中の還元剤が、染色強度に与える効果を示す、免疫染色写真である。

【図4】免疫染色用増感剤中の還元剤及び界面活性剤が、染色強度に与える効果を示す、免疫染色写真である。

【図5】免疫染色用増感剤中の - ME の至適濃度について検討した結果を示す、免疫染色写真である。

【図6】図5の画像を、グレースケールに変換後、2階調化した画像である。

【図7】図6の画像中の領域における、シグナル積算値を示したグラフである。

【図8】免疫染色用増感剤中の D T T の至適濃度について検討した結果を示す免疫染色写真である。

【図9】図8の画像を、グレースケールに変換後、2階調化した画像である。

【図10】図9の画像中の領域における、シグナル積算値を示したグラフである。

【図11】免疫染色用増感剤中の T C E P の至適濃度について検討した結果を示す、免疫染色写真である。

【図12】図11の画像を、グレースケールに変換後、2階調化した画像である。

【図13】図12の画像中の領域における、シグナル積算値を示したグラフである。

【図14】免疫染色用増感剤中の還元剤が染色強度に与える効果を比較した結果を示す、免疫染色写真である。

【図15】図14の画像を、グレースケールに変換後、2階調化した画像である。

【図16】図15の画像中の領域における、シグナル積算値を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0011】

<免疫染色用増感剤>

本実施形態の免疫染色用増感剤は、

組織切片の免疫染色に用いられる免疫染色用増感剤であって、陰イオン界面活性剤及び還元剤を含み、前記還元剤がホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である。本明細書中、免疫染色用増感剤を「増感剤」と略すことがある。

【0012】

陰イオン界面活性剤の種類については特に制限されない。陰イオン界面活性剤としては、例えば、脂肪酸塩、モノアルキル硫酸塩、モノアルキルリン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩等が挙げられる。陰イオン界面活性剤としては、上記のなかではモノアルキル硫酸塩が好ましい。モノアルキル硫酸塩のアルキル基の炭素数は、例えば、8~20であってもよく、10~15であってもよい。モノアルキル硫酸塩としては、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ドデシル硫酸リチウム等のドデシル硫酸塩を例示でき、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)が好ましい。陰イオン界面活性剤は、2種類以上を組み合わせ用いてもよい。

【0013】

本実施形態の増感剤が含有する還元剤は、ホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である。

10

20

30

40

50

本明細書中において、ホスフィンとは、一般式  $R^1 R^2 R^3 P$  [式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$  は、水素原子又は一価の有機基を表す。] で表される有機リン化合物であり、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、トリブチルホスフィン(TBP)等を例示できる。なかでも、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)が好ましく、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)は、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(TCEP-HCl)であってもよい。

本明細書中において、チオール化合物とは、分子内にチオール基を有する化合物であり、2-メルカプトエタノール(-メルカプトエタノール、-ME)、2-メルカプトエタノールアミン、ジチオトレイトール(DTT)、及びジチオエリトリール(DTE)等を例示できる。

10

還元剤は、2種類以上を組み合わせて用いてもよい。

#### 【0014】

増感剤中の陰イオン界面活性剤の濃度は、0.1~30(w/v)%の範囲であることが好ましく、0.3~20(w/v)%の範囲であることがより好ましく、1~15(w/v)%の範囲であることがさらに好ましく、1~3.5(w/v)%の範囲であることが特に好ましい。増感剤中の陰イオン界面活性剤の濃度が上記範囲であることにより、免疫染色の染色性をより効果的に向上させることができる。

#### 【0015】

増感剤中の還元剤の濃度は、0.0001~20mol/lの範囲であることが好ましい。

20

還元剤が、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、トリブチルホスフィン(TBP)、ジチオトレイトール(DTT)、及びジチオエリトリール(DTE)からなる群から選択される少なくとも一種の化合物である場合、増感剤中の当該還元剤の濃度は、0.0001~10mol/lの範囲であることが好ましく、0.001~1mol/lの範囲であることがより好ましく、0.01~0.1mol/lの範囲であることがより好ましく、0.03~0.08mol/lの範囲であることがさらに好ましい。

還元剤が、2-メルカプトエタノール及び/又は2-メルカプトエタノールアミンである場合、増感剤中の当該還元剤の濃度は、0.01~20mol/lの範囲であることが好ましく、0.1~15mol/lの範囲であることがより好ましく、2~4mol/lの範囲であることが特に好ましい。

30

#### 【0016】

増感剤中の陰イオン界面活性剤と還元剤との組み合わせは、ドデシル硫酸塩とチオール化合物との組み合わせのなかでは、ドデシル硫酸ナトリウムとジチオトレイトール(DTT)との組み合わせがより好ましい。

#### 【0017】

増感剤中の陰イオン界面活性剤と還元剤との組み合わせは、ドデシル硫酸塩とホスフィンとの組み合わせが好ましく、なかでもドデシル硫酸ナトリウムとトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンとの組み合わせが特に好ましい。

#### 【0018】

増感剤は、加熱処理された後の組織切片に対して、使用されることが好ましい。増感剤の使用の詳細については後述するが、加熱処理された後の組織切片に用いることで、増感剤の抗原賦活化作用が、より効果的に発揮される。したがって、本実施形態の増感剤は、加熱処理後用の免疫染色用増感剤として好適に用いることができる。

40

#### 【0019】

上記に示す陰イオン界面活性剤及び還元剤を含む増感剤は、還元剤を含まず陰イオン界面活性剤を含む増感剤と比べて、より免疫染色の染色性を向上させることができる。同様に、上記に示す陰イオン界面活性剤及び還元剤を含む増感剤は、陰イオン界面活性剤を含まず還元剤を含む増感剤と比べて、より免疫染色の染色性を向上させることができる。

#### 【0020】

50

本実施形態の増感剤によれば、組織切片の免疫染色の染色性を向上させることができ、標的タンパク質の発現が容易に判別可能となる。したがって、より高い精度での診断や治療薬の選択が可能となり、医療分野等への多大な貢献が期待できる。

#### 【0021】

##### <免疫染色用増感剤キット>

本実施形態の免疫染色用増感剤キットは、陰イオン界面活性剤と、還元剤と、を備え、前記還元剤がホスフィン及びチオール化合物からなる群から選ばれる少なくとも一種である。

#### 【0022】

陰イオン界面活性剤としては、上記免疫染色用増感剤で示したものと同一のものを用いることができる。還元剤としては、上記免疫染色用増感剤で示したものと同一のものを用いることができる。

10

#### 【0023】

本実施形態の免疫染色用増感剤キットは、陰イオン界面活性剤及び還元剤を備えているので、簡便に免疫染色用増感剤を調製することができ、免疫染色の染色性を向上させることができる。したがって、より高い精度での診断や治療薬の選択が可能となり、医療分野等への多大な貢献が期待できる。

#### 【0024】

また免疫染色をより簡便にするという観点から、本実施形態の免疫染色用増感剤キットは、免疫染色に必要な試薬類、器具類等を更に備えていてもよい。免疫染色に必要な試薬類としては、例えば、抗体、抗体希釈液、発色基質等が挙げられる。免疫染色に必要な器具としては、例えば、マイクロチューブ、スライドグラス、カバーガラス等が挙げられる。

20

このように、免疫染色に用いられる試薬類、器具類等をキット化することにより、後述する免疫染色方法を、より簡便に行うことができる。

#### 【0025】

##### <免疫染色方法>

本実施形態の免疫染色方法は、免疫染色用増感剤を用いる免疫染色方法であって、前記組織切片の抗原に抗体を反応させる前に、前記免疫染色用増感剤を組織切片に接触させることを含む。

30

以下、本実施形態の免疫染色方法について、パラフィン包埋切片を使用する場合を例に、詳細に説明する。

#### 【0026】

##### (組織切片の作製)

まず免疫染色方法に用いる組織切片を用意する。組織切片は、患者から採取された組織を、固定剤に浸漬して固定し、固定後の組織を脱水処理し、パラフィン包埋したものを薄切して得ることができる。

固定剤は、ホルムアルデヒド溶液、パラホルムアルデヒド溶液等の、アルデヒド基を有する化合物の溶液を用いることが好ましい。固定化液には、緩衝液やpH調製剤、アルコール等のその他の成分を含有することができる。

40

脱水処理及びパラフィン包埋は、例えば、固定後の組織を70%エタノール、80%エタノール、95%エタノール、100%エタノールに順次浸してエタノール置換した後、キシレン置換し、パラフィンに浸してパラフィン包埋して成形し、組織が包埋されたパラフィンブロックを得る。

次に、パラフィンブロックをマイクロトーム等で適当な厚さに薄切して組織切片を得る。組織切片の厚みは適宜定めればよいが、通常2~10 $\mu$ m程度、好ましくは3~6 $\mu$ m程度である。組織切片は、スライドグラス上に付着させて用いられてもよい。

#### 【0027】

##### (脱パラフィン)

スライドグラス上に付着させた組織切片を、スライドグラスごとキシレンに浸し、脱パ

50

ラフィン操作を行い、次いで、脱パラフィン操作後の組織切片を、スライドグラスごと例えば、95%エタノール、80%エタノール、70%エタノール、洗浄バッファーに順次浸して洗浄する。

**【0028】**

(賦活化処理 - 増感剤処理)

本実施形態の免疫染色方法は、上記実施形態の免疫染色用増感剤を用いる免疫染色方法であって、前記組織切片の抗原に抗体を反応させる前に、前記免疫染色用増感剤を組織切片に接触させることを含む。本明細書中において、免疫染色用増感剤を組織切片に接触させることを「増感剤処理」ということがある。増感剤処理は、賦活化処理の一種として行うことができる。

10

**【0029】**

増感剤を組織切片に接触させる方法は、例えば、スライドグラス上の組織切片の上に増感剤を滴下する方法や、スライドグラス上の組織切片の上に増感剤を塗布する方法や、組織切片を組織切片が付着したスライドグラスごと増感剤中に浸漬させる方法が挙げられる。

**【0030】**

増感剤を組織切片に接触させる時間は、例えば1~60分程度、好ましくは5~30分程度である。組織切片に接触させる増感剤の温度は、例えば0~30度程度、好ましくは15~25度程度である。

**【0031】**

上記免疫染色用増感剤キットを用いて増感剤を調製する場合、組織切片に接触させる前に、予め陰イオン界面活性剤と還元剤とを混合して調製された増感剤を、組織切片に接触させてもよい。別の方法として、組織切片上で増感剤を調製してもよい。組織切片上で増感剤を調製する場合、陰イオン界面活性剤と還元剤の混合方法は制限されるものではなく、例えば、先ず陰イオン界面活性剤を組織切片に滴下した後、この陰イオン界面活性剤に対し還元剤を滴下することで、組織切片上で増感剤を調製してもよい。別法としては、陰イオン界面活性剤と還元剤とを同時に組織切片に滴下してもよく、或いは、先ず還元剤を組織切片上に滴下した後、この還元剤に対し陰イオン界面活性剤を滴下してもよい。

20

**【0032】**

本実施形態の免疫染色方法によれば、増感剤処理により、組織切片の抗原を賦活化させ、免疫染色の染色性を向上させることができる。

30

**【0033】**

(賦活化処理 - 加熱処理)

賦活化処理として、増感剤処理に加えて、その他の賦活化処理法を併用してもよい。本実施形態の免疫染色方法は、組織切片に対して加熱処理することを含むことが好ましい。加熱処理は、賦活化処理の一種として行うことができる。当該加熱処理は、後述の免疫染色用増感剤を組織切片に接触させることより先に行うことが好ましい。加熱方法は、オートクレーブ法、マクローウェーブ法、温浴法等が挙げられ、これらに限定されない。加熱処理温度は、例えば、80~121で行ってもよく、90~121で行ってもよい。加熱時間は5~60分程度で行うことができ、加熱温度等に応じて適宜定めればよい。

40

増感剤処理と加熱処理とを両方とも実施する場合、増感剤処理と加熱処理とを行う順序は制限されるものではなく、例えば増感剤処理と加熱処理とを同時に行ってもよく、増感剤処理の後に加熱処理を行ってもよいが、加熱処理の後に増感剤処理を行うことがより好ましい。先ず加熱処理を行うことで、組織切片の増感剤に対する反応効率が高まると考えられ、より効果的に抗原賦活化を行うことができる。

**【0034】**

(賦活化処理 - その他)

また、その他の賦活化処理法として、タンパク質分解酵素処理やpH調整が挙げられ、増感剤処理に加えて、さらにこれらの賦活化処理法を併用してもよい。

タンパク質分解酵素処理は、組織切片にタンパク質分解酵素を反応させる処理である。

50

用いられるタンパク質分解酵素としては、トリプシン、ペプシン、プロテイナーゼK等が挙げられる。タンパク質分解酵素は、一種以上を組み合わせる用いることができる。タンパク質分解酵素の使用条件は、使用する酵素の反応特性を考慮して適宜定めればよく、例えば、タンパク質分解酵素を溶かしたバッファを、37で10～40分程度組織切片に接触させることが挙げられる。

#### 【0035】

(抗体反応)

次いで、賦活化処理された賦活化処理後の組織切片の抗原に抗体を反応させる抗体反応を行う。本実施形態に示す抗体反応は、ブロッキング、一次抗体反応、二次抗体反応の工程を含む。

10

#### 【0036】

まず、賦活化処理後の組織切片に対し、ブロッキング剤によるブロッキングを行い、抗体の非特異的吸着を防止する。ブロッキング剤は公知であり、当分野において通常用いられるものを使用可能である。ブロッキング剤としては、例えば、正常動物血清、スキムミルク、ウシ血清アルブミン(BSA)、カゼイン等が挙げられる。

#### 【0037】

一次抗体は、組織切片が有する検出対象の抗原を、認識する抗体である。抗体は一次構造を認識するものであってもよく、モノクローナル抗体であってよく、ポリクローナル抗体であってよい。

例えば、ブロッキング後の組織切片に対して一次抗体を含む液を滴下し、組織切片上の抗原と一次抗体を接触させて、一次抗体反応を行ってもよい。

20

#### 【0038】

二次抗体は、上記一次抗体を認識する抗体である。二次抗体は適当な標識物質で標識されていることが好ましい。標識物質を直接又は間接的に検出することで、組織切片上の検出対象の抗原の存在を検出(染色)可能である。

染色方法は当分野において通常用いられるものを使用可能である。二次抗体を酵素標識する方法、蛍光標識する方法、RI標識する方法等を採用可能であり、標識により生産されたシグナルを検出可能である。

#### 【0039】

本実施形態の免疫染色方法によれば、増感剤処理により、組織切片の抗原を賦活化させ、免疫染色の染色性を向上させることができる。したがって、より高い精度での診断や治療薬の選択が可能となり、医療分野等への多大な貢献が期待できる。

30

#### 【実施例】

#### 【0040】

次に実施例を示して本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

なお、単位Mは、mol/Lを表す。

#### 【0041】

<実験1>

(実施例1-1)

肺腺癌患者から取得した腺癌組織を、固定剤(10%ホルマリン)に、室温(20～25)24時間～1週間程度浸漬させ、組織の固定を行った。定法により組織のパラフィンブロックを得た後、該パラフィンブロックをマイクロームにより薄切し、組織切片を得た。得られた組織切片は、スライドガラス上に付着させた。組織切片に対する以下の操作は、組織切片をスライドガラス上に付着させた状態で行った。

40

#### 【0042】

組織切片を、キシレンに10分浸した後、各数秒程度の時間で、100%エタノール、95%エタノール、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールに順次浸漬させ、その後、水で軽く流水水洗した。

スライドガラスの水分を切り、組織切片の上に、3(v/v)%過酸化水素を6～8滴

50



滴下して組織切片全体を覆い、湿箱中に室温で10分静置した後、水で軽く流水水洗した。

【0043】

クエン酸緩衝液（組成：0.01M クエン酸緩衝液，pH6.0）10mLを超純水で200mLにメスアップしたものに、さらにTween20を200 $\mu$ L加え、スターラーで攪拌し、熱処理用バッファーを調製した。染色バットに上記の熱処理用バッファーを入れ、その染色バットに、染色かごにセットした組織切片を入れて、組織切片を熱処理用バッファーに浸漬させ、これを121 $\pm$ 10分間オートクレーブした。オートクレーブの後、扇風機を用い、室温程度にまで組織切片を冷却させた。次いで、TBSに5分間浸漬させた。

10

【0044】

次いで、増感剤処理を行った。以下の組成で調整した増感剤を、組織切片上に100 $\mu$ L/1切片の量でのせ、湿箱中に室温で10分静置した。その後、TBSに5分間 $\times$ 3回浸漬させた。

- ・20% (w/v) SDS ... 10 $\mu$ L (2% (w/v))
- ・100% - ME ... 5 $\mu$ L (5% (w/v))
- ・0.1M Tris HCl (pH6.8) ... 85 $\mu$ L

【0045】

スライドガラスの水分を切り、組織切片の上に、2(v/v)%正常ブタ血清を滴下して組織切片全体を覆い、湿箱中に室温で10分静置した。

20

【0046】

余分な正常ブタ血清をふき取り、希釈した一次抗体[抗Cytokeratin 7 (CK7)抗体(Dako社製：型番M7018)]を上記の正常ブタ血清で1000倍程度に希釈したものを、組織切片上に100 $\mu$ L/1切片の量でのせ、室温で2時間静置した。その後、TBSに5分間 $\times$ 3回浸漬させた。

【0047】

スライドガラスの水分を切り、組織切片の上に、ENVISION+ Dual Link (Dako社製：型番K4061)を1滴たらし、切片上に広げ、室温で30分静置した。その後、TBSに5分間 $\times$ 3回浸漬させた。

【0048】

スライドガラスの水分を切り、組織切片の上に、基質溶液Stable DAB (ファルマ社製：型番FA0118L)を100 $\mu$ L/1切片の量でのせ、室温で2~5分間反応させた。染色比較物間の反応条件は同一とした。その後、TBSに浸漬させ、水で水洗した。

30

【0049】

組織切片をマイヤーヘマトキシリン溶液に浸漬させ、20秒程度反応させた後、水により水洗し、定法により飽和炭酸リチウムで色出した。

その後、脱水エタノール系列及びキシレンに順次浸漬させた後、封入剤を用いて封入した。

免疫染色の結果を、顕微鏡を用いて観察したところ、増感剤を未使用の場合よりも良好な染色結果が得られた(図1)。

40

【0050】

(実施例1-2~1-4)

実施例1-1において、陰イオン界面活性剤及び還元剤について、以下の表1に示す割合で調整した増感剤を用いた以外は、実施例1-1と同様にして、免疫染色を行った。

その結果、実施例1-1と同様に、増感剤を未使用の場合よりも良好な染色結果が得られた。

【0051】

【表 1】

	実施例			
	1-1	1-2	1-3	1-4
SDS	2 %	0.5 %	2 %	0.5 %
$\beta$ -ME	5 %	5 %	—	—
DTT	—	—	10 mM	10 mM
TCEP	—	—	—	—

## 【0052】

&lt; 実験 2 &gt;

( 比較例 2 - 1、参考例 2 - 1 ~ 2 - 4 )

10

増感剤中の陰イオン界面活性剤の効果について検討した。

上記実施例 1 - 1 において、陰イオン界面活性剤及び還元剤の配合を以下の表 2 に示す割合で調整した増感剤を用いた以外は、実施例 1 - 1 と同様にして、免疫染色を行った。比較例 2 - 1 では、増感剤のコントロールとして 0.1 M Tris HCl (pH 6.8) を用いた。

## 【0053】

【表 2】

	比較例	参考例			
	2-1	2-1	2-2	2-3	2-4
SDS	—	0.5 %	2 %	5 %	10 %
$\beta$ -ME	—	—	—	—	—
DTT	—	—	—	—	—
TCEP	—	—	—	—	—

20

## 【0054】

その結果、比較例 2 - 1 に比べて、SDS を少しでも含む増感剤で増感剤処理を行った参考例 2 - 1 ~ 参考例 2 - 4 では、いずれにおいても染色強度が増大した。参考例 2 - 1 (0.5 % (w/v)) に比べて、参考例 2 - 2 (2 % (w/v)) では、より強い染色強度が認められた。参考例 2 - 2 (2 % (w/v)) よりも SDS の濃度の高い、参考例 2 - 3 (5 % (w/v)) と参考例 2 - 4 (10 % (w/v)) では、参考例 2 - 2 (2 % (w/v)) と比べて染色性に大きな差は認められなかった。

30

比較例 2 - 1 及び参考例 2 - 2 の、免疫染色の結果を図 2 に示す。

## 【0055】

&lt; 実験 3 &gt;

( 比較例 3 - 1 ~ 3 - 3、参考例 3 - 1 ~ 3 - 3 )

増感剤中の還元剤の効果について検討した。

上記実施例 1 - 1 において、陰イオン界面活性剤及び還元剤の配合を以下の表 3 に示す割合で調整した増感剤を用いた以外は、実施例 1 - 1 と同様にして、免疫染色を行った。比較例 3 - 1、比較例 3 - 2、比較例 3 - 3 では、増感剤のコントロールとして 0.1 M Tris HCl (pH 6.8) を用いた。

40

## 【0056】

【表 3】

	比較例	参考例	比較例	参考例	比較例	参考例
	3-1	3-1	3-2	3-2	3-3	3-3
SDS	—	—	—	—	—	—
$\beta$ -ME	—	2.86 M	—	—	—	—
DTT	—	—	—	40 mM	—	—
TCEP	—	—	—	—	—	80 mM

## 【0057】

比較例 3 - 1 及び参考例 3 - 1 の、免疫染色の結果を図 3 に示す。

還元剤を含まない増感剤を用いた比較例 3 - 1 に比べて、2.86 M の  $\beta$ -ME を含む増

50

感剤を用いた参考例 3 - 1 では、より強い染色が認められた。

【 0 0 5 8 】

比較例 3 - 2 及び参考例 3 - 2 の、免疫染色の結果を図 3 に示す。

還元剤を含まない増感剤を用いた比較例 3 - 2 に比べて、40 mM の D T T を含む増感剤を用いた参考例 3 - 2 では、より強い染色が認められた。

【 0 0 5 9 】

比較例 3 - 3 及び参考例 3 - 3 の、免疫染色の結果を図 3 に示す。

還元剤を含まない増感剤を用いた比較例 3 - 3 に比べて、80 mM の T C E P を含む増感剤を用いた参考例 3 - 3 では、より強い染色が認められた。

【 0 0 6 0 】

< 実験 4 >

( 実施例 4 - 1 ~ 4 - 3、参考例 4 - 1 ~ 4 - 3 )

増感剤中、還元剤を含むが陰イオン界面活性剤を含まない場合と、還元剤及び界面活性剤を含む場合とで、染色強度の比較を行った。

上記実施例 1 - 1 において、陰イオン界面活性剤及び還元剤の配合を以下の表 4 に示す割合で調整した増感剤を用いた以外は、実施例 1 - 1 と同様にして、免疫染色を行った。

【 0 0 6 1 】

【 表 4 】

	参考例	実施例	参考例	実施例	参考例	実施例
	4-1	4-1	4-2	4-2	4-3	4-3
SDS	—	2 %	—	2 %	—	2 %
$\beta$ -ME	2.86 M	2.86 M	—	—	—	—
DTT	—	—	40 mM	40 mM	—	—
TCEP	—	—	—	—	80 mM	80 mM

【 0 0 6 2 】

参考例 4 - 1 及び実施例 4 - 1 の、免疫染色の結果を図 4 に示す。

2.86 M の  $\beta$ -ME を含む増感剤を用いた参考例 4 - 1 に比べて、2.86 M の  $\beta$ -ME 及び 2 % ( w / v ) の S D S を含む増感剤を用いた実施例 4 - 1 では、より強い染色が認められた。

【 0 0 6 3 】

参考例 4 - 2 及び実施例 4 - 2 の、免疫染色の結果を図 4 に示す。

40 mM の D T T を含む増感剤を用いた参考例 4 - 2 に比べて、40 mM の D T T 及び 2 % ( w / v ) の S D S を含む増感剤を用いた実施例 4 - 2 では、より強い染色が認められた。

【 0 0 6 4 】

参考例 4 - 3 及び実施例 4 - 3 の、免疫染色の結果を図 4 に示す。

80 mM の T C E P を含む増感剤を用いた参考例 4 - 3 に比べて、80 mM の T C E P 及び 2 % ( w / v ) の S D S を含む増感剤を用いた実施例 4 - 3 では、より強い染色が認められた。

【 0 0 6 5 】

< 実験 5 >

( 実施例 5 - 1 ~ 5 - 6 )

増感剤中、界面活性剤と組み合わせる  $\beta$ -ME の至適濃度について検討した。

上記実施例 1 - 1 において、陰イオン界面活性剤及び還元剤の配合を以下の表 5 に示す割合で調整した増感剤を用いたこと、及び一次抗体に、発明者らの研究室で肺腺癌組織をマウスに免疫して作製した抗 M U C 5 B 抗体 ( 培養上清 ) を原液で用いたこと以外は、実施例 1 - 1 と同様にして、免疫染色を行った。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

【表 5】

	実施例					
	5-1	5-2	5-3	5-4	5-5	5-6
SDS	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %	2 %
$\beta$ -ME	0.14 M	0.72 M	1.43 M	2.86 M	5.7 M	11.4 M
DTT	—	—	—	—	—	—
TCEP	—	—	—	—	—	—

## 【0067】

実施例 5 - 1 ~ 実施例 5 - 6 の、免疫染色の結果を図 5 に示す。また図 6 の画像は、図 5 に示す画像を、画像処理ソフト (Adobe Photoshop Elements バージョン 11.0) を用いて、グレースケールに変換後、50% のグレー値のレベルが中間 (128) を超えるピクセルをホワイトに、それに満たないものをブラックに変換することで 2 階調化したものである。

図 7 のグラフは、図 6 の各画像の中央部の囲み内の領域について、画像解析ソフト (ImageJ 1.48v) を用いてシグナル (黒い部分) の積算値を算出し、積算値を各囲み内の領域面積で除算した結果である。図 7 に示されるように、2.86 M の  $\beta$ -ME を使用した実施例 5 - 4 が、その他の濃度の  $\beta$ -ME を用いた実施例に比べ、染色強度が最大となった。

## 【0068】

< 実験 6 >

(実施例 6 - 1 ~ 6 - 4)

増感剤中、界面活性剤と組み合わせる DTT の至適濃度について検討した。

上記実施例 1 - 1 において、陰イオン界面活性剤及び還元剤の配合を以下の表 6 に示す割合で調整した増感剤を用いたこと、及び一次抗体に、発明者らの研究室で肺腺癌組織をマウスに免疫して作製した抗 MUC5B 抗体 (培養上清) を原液で用いたこと以外は、実施例 1 - 1 と同様にして、免疫染色を行った。

## 【0069】

【表 6】

	実施例			
	6-1	6-2	6-3	6-4
SDS	2 %	2 %	2 %	2 %
$\beta$ -ME	—	—	—	—
DTT	1 mM	10 mM	20 mM	40 mM
TCEP	—	—	—	—

## 【0070】

実施例 6 - 1 ~ 実施例 6 - 4 の、免疫染色の結果を図 8 に示す。また上記実験 5 と同様にして、図 8 を処理した画像を図 9 に示す。

図 10 のグラフは、図 9 の各画像の中央部の囲み内の領域について、画像解析ソフト (ImageJ 1.48v) を用いてシグナル (黒い部分) の積算値を算出し、積算値を各囲み内の領域面積で除算した結果である。図 10 に示されるように、40 mM の DTT を使用した実施例 6 - 4 が、その他の濃度の DTT を用いた実施例に比べ、染色強度が最大となった。

## 【0071】

< 実験 7 >

(実施例 7 - 1 ~ 7 - 6)

増感剤中、界面活性剤と組み合わせる TCEP の至適濃度について検討した。

上記実施例 1 - 1 において、陰イオン界面活性剤及び還元剤の配合を以下の表 7 に示す割合で調整した増感剤を用いたこと、及び一次抗体に、発明者らの研究室で肺腺癌組織を

マウスに免疫して作製した抗MUC5B抗体（培養上清）を原液で用いたこと以外は、実施例1-1と同様にして、免疫染色を行った。

【0072】

【表7】

	実施例					
	7-1	7-2	7-3	7-4	7-5	7-6
SDS	2%	2%	2%	2%	2%	2%
$\beta$ -ME	—	—	—	—	—	—
DTT	—	—	—	—	—	—
TCEP	1 mM	10 mM	20 mM	40 mM	60 mM	80 mM

10

【0073】

実施例7-1～実施例7-6の、免疫染色の結果を図11に示す。また上記実験5と同様にして、図11を処理した画像を図12に示す。

図13のグラフは、図12の各画像の中央部の囲み内の領域について、画像解析ソフト（ImageJ 1.48v）を用いてシグナル（黒い部分）の積算値を算出し、積算値を各囲み内の領域面積で除算した結果である。図13に示されるように、60 mMまでは濃度増加に伴い染色強度も増大していくが、80 mMでは微増となった。80 mMのTCEPを使用した実施例7-6が、その他の濃度のTCEPを用いた実施例に比べ、染色強度が最大となった。

20

【0074】

< 実験8 >

（比較例8-1、実施例8-1～8-3）

SDSに組み合わせる各種還元剤について、上記で検討した至適条件における染色強度の比較を行った。

上記実施例1-1において、陰イオン界面活性剤及び還元剤の配合を以下の表8に示す割合で調整した増感剤を用いた以外は、実施例1-1と同様にして、免疫染色を行った。比較例8-1では、増感剤のコントロールとして0.1 M Tris HCl (pH 6.8)を用いた。

【0075】

【表8】

	比較例	実施例		
	8-1	8-1	8-2	8-3
SDS	—	2%	2%	2%
$\beta$ -ME	—	2.86 M	—	—
DTT	—	—	40 mM	—
TCEP	—	—	—	80 mM

30

【0076】

比較例8-1及び実施例8-1～実施例8-3の、免疫染色の結果を図14に示す。また上記実験5と同様にして、図14を処理した画像を図15に示す。

40

図16のグラフは、図15の各画像の中央部の囲み内の領域について、画像解析ソフト（ImageJ 1.48v）を用いてシグナル（黒い部分）の積算値を算出し、積算値を各囲み内の領域面積で除算した結果である。図16に示されるように、 $\beta$ -MEを還元剤として使用した実施例8-1と、DTTを還元剤として使用した実施例8-2に比べ、TCEPを還元剤として使用した実施例8-3で、染色強度が最大となった。

【0077】

以上で説明した各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は一例であり、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、構成の付加、省略、置換、およびその他の変更が可能である。また、本発明は各実施形態によって限定されることはなく、請求項（クレーム）の

50

範囲によってのみ限定される。

【産業上の利用可能性】

【0078】

本発明の免疫染色用増感剤及び免疫染色用増感剤キットによれば、例えば、通常の免疫染色法の一次抗体反応前に、免疫染色用増感剤を反応させるという簡便な作業を行うことで、染色性が大幅に向上する。本発明の免疫染色用増感剤、免疫染色用増感剤キット、及びそれを用いた免疫染色方法は、一例として分子標的治療薬選択や研究などへの適用可能である。

【図7】

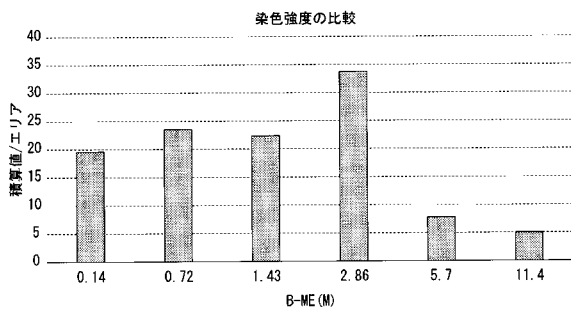


図7

【図13】

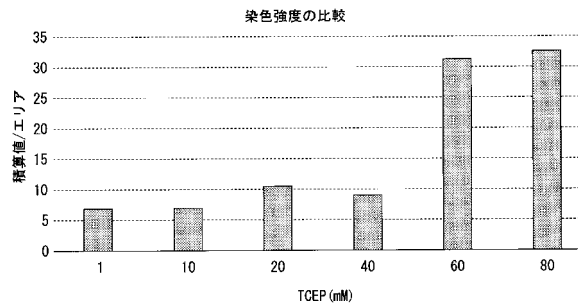


図13

【図10】

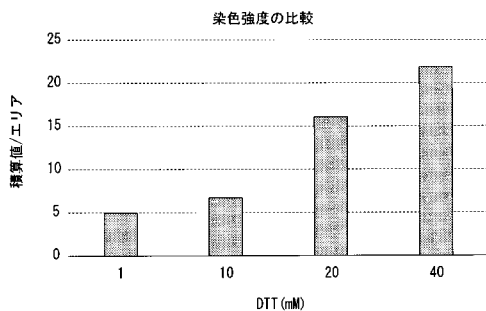


図10

【 図 1 6 】

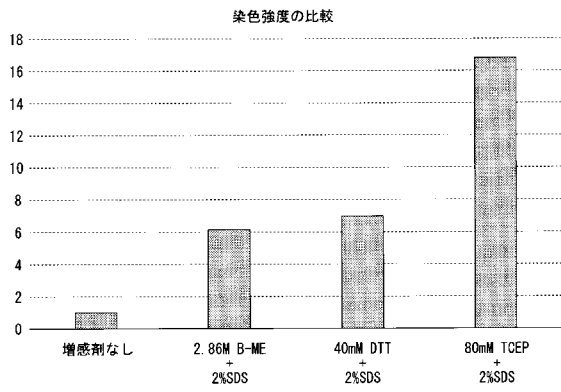


図 1 6

【 図 2 】

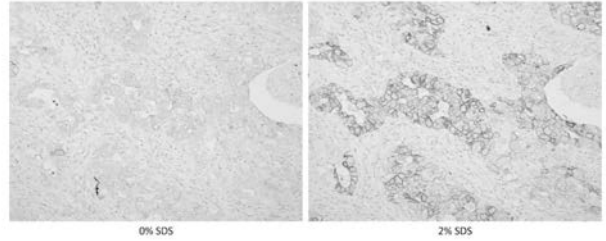


図 2

【 図 1 】

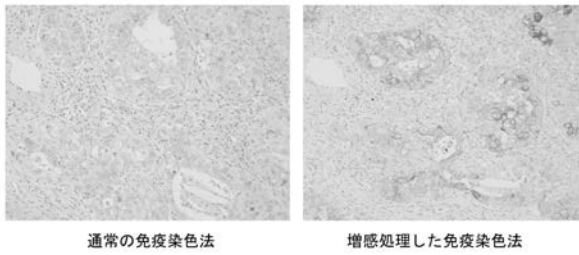


図 1

【 図 3 】

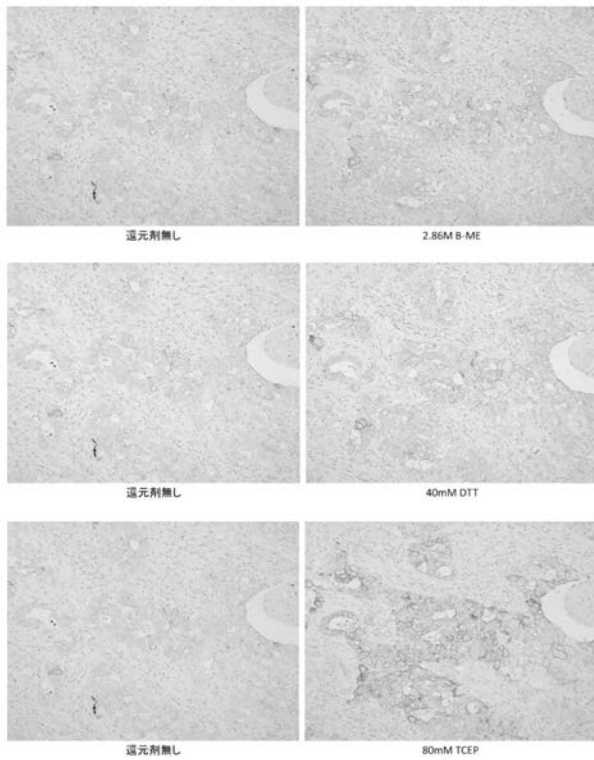


図 3

【 図 4 】

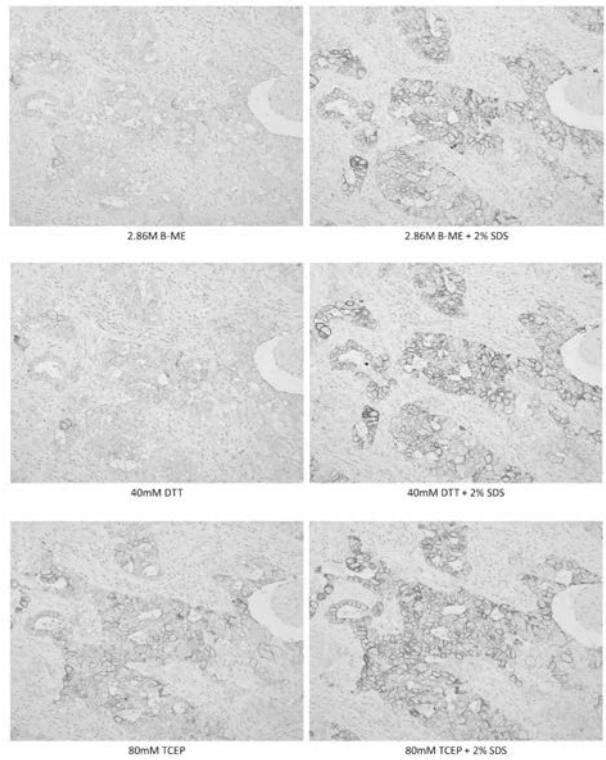
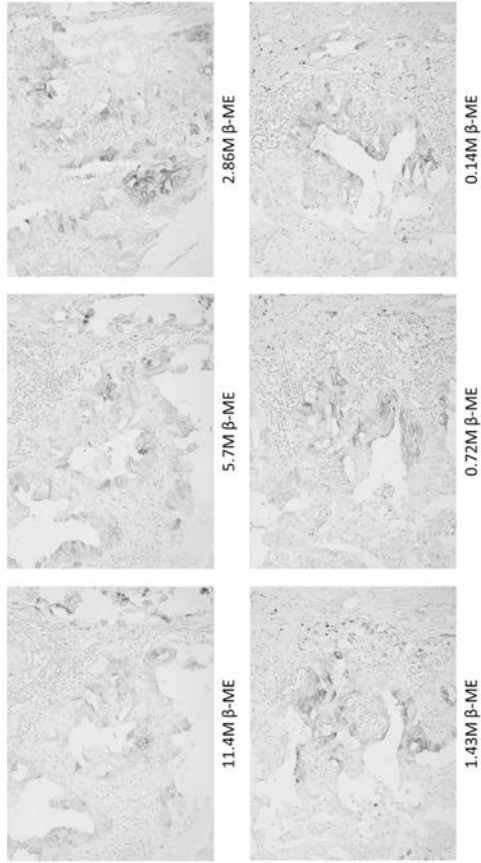
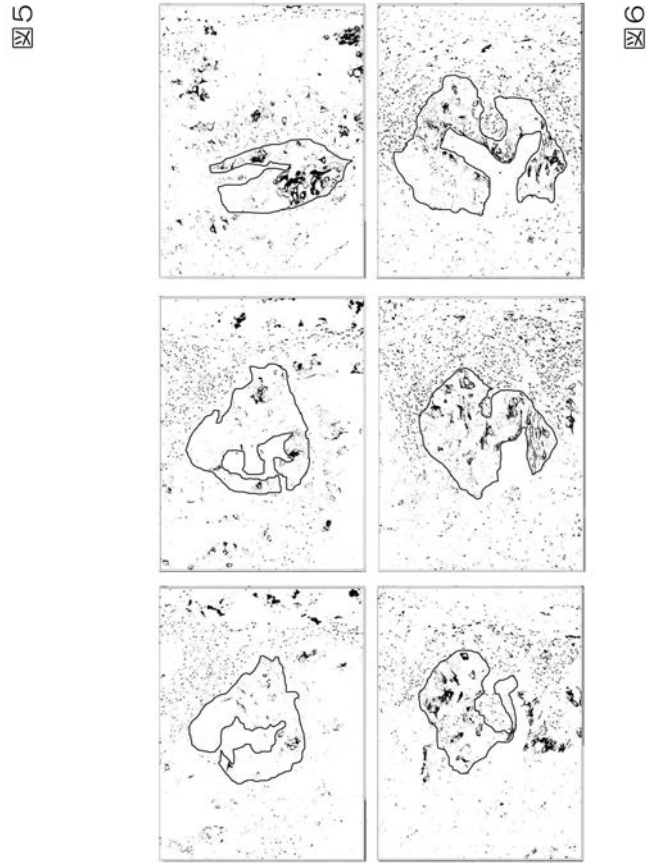


図 4

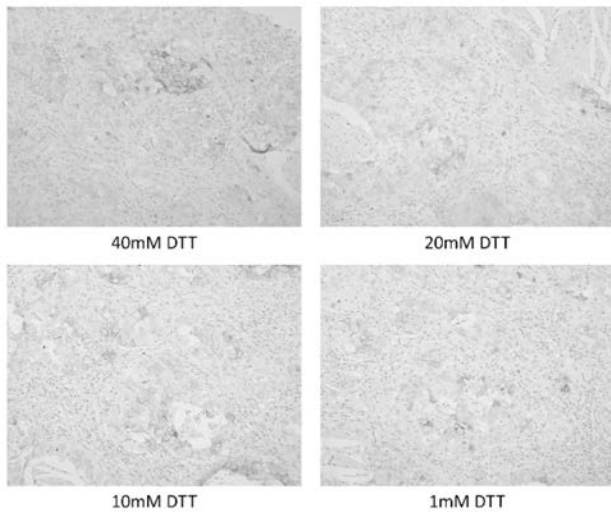
【 図 5 】



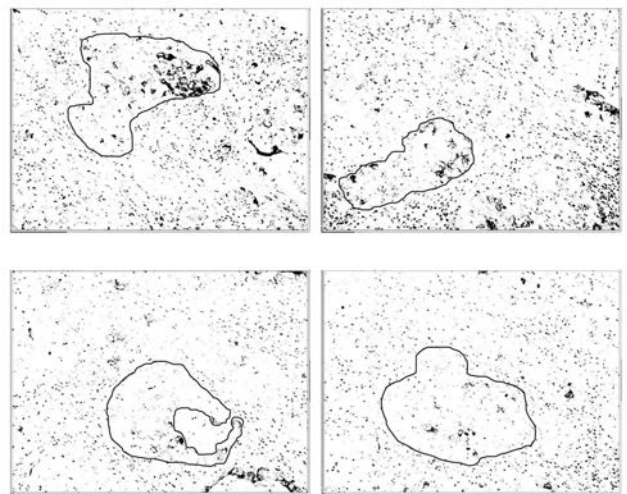
【 図 6 】



【 図 8 】



【 図 9 】



8

9



【 図 1 1 】

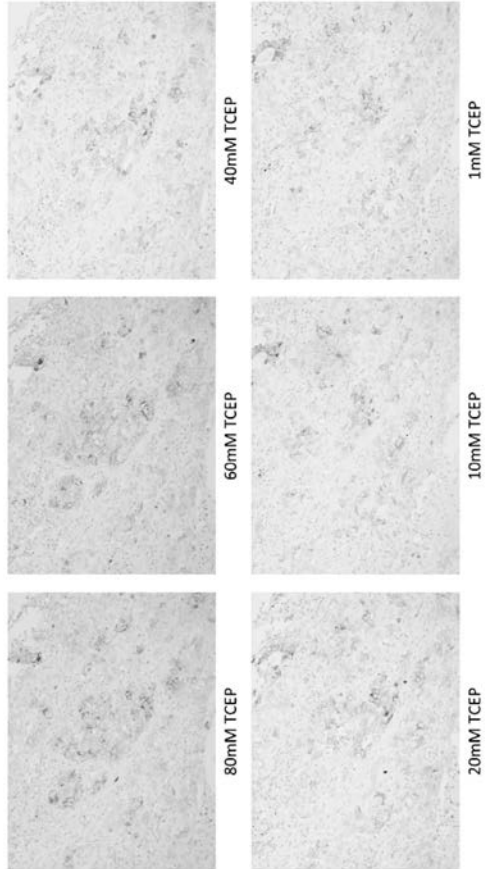


図 1 1

【 図 1 2 】

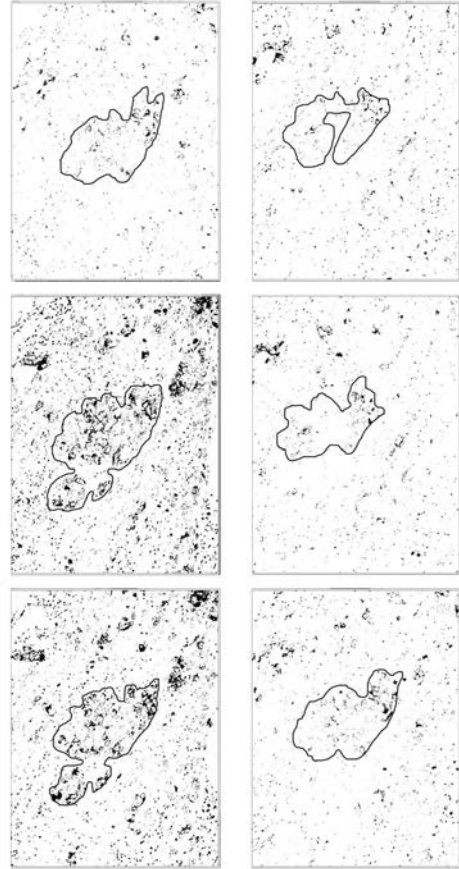


図 1 2

【 図 1 4 】

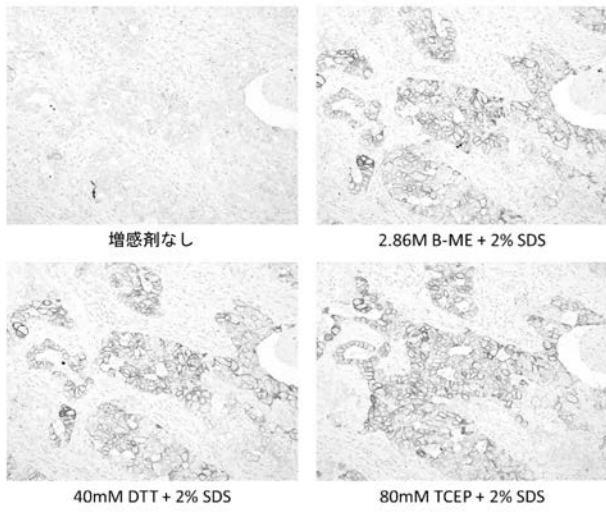


図 1 4

【 図 1 5 】

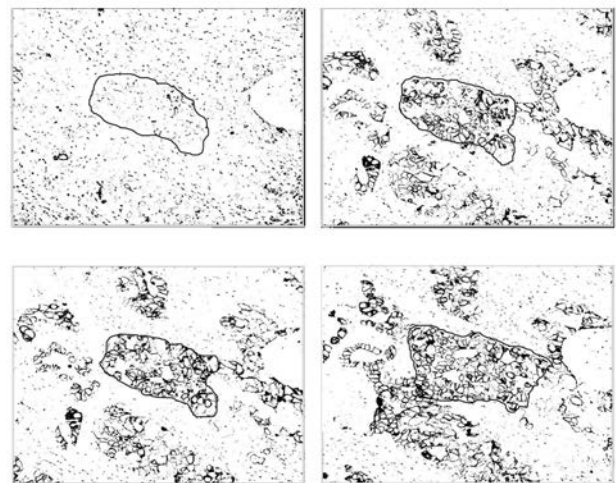


図 1 5

---

フロントページの続き

(72)発明者 鉢村 和男

神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内

(72)発明者 矢野 愛子

神奈川県相模原市南区北里1丁目15番1号 学校法人北里研究所内

Fターム(参考) 2G045 BA11 BA14 BB24 BB29 BB35 CB01 DA36 FB03 FB07