

(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2015-219109

(P2015-219109A)

(43) 公開日 平成27年12月7日(2015.12.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	P 2GO45
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	C
GO 1 N 33/537 (2006.01)	GO 1 N 33/537	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2014-102883 (P2014-102883)  
 (22) 出願日 平成26年5月16日 (2014.5.16)

特許法第30条第2項適用申請有り 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会発行、「第63回日本医学検査学会講演予稿集」を収録したCD-ROM、平成26年4月10日発行 (刊行物等) 掲載年月日 平成26年3月24日 掲載アドレス <https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/> 掲載アドレス [https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/timetable/timetable17pm.html#speaker17\\_tokio9](https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/timetable/timetable17pm.html#speaker17_tokio9) 掲載アドレス <https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/pdf/O342.pdf>

(71) 出願人 504150450  
 国立大学法人神戸大学  
 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1  
 (71) 出願人 591108178  
 秋田県  
 秋田県秋田市山王4丁目1番1号  
 (71) 出願人 504409543  
 国立大学法人秋田大学  
 秋田県秋田市手形学園町1番1号  
 (74) 代理人 230115864  
 弁護士 永島 孝明  
 (74) 代理人 100149168  
 弁理士 若山 俊輔

最終頁に続く

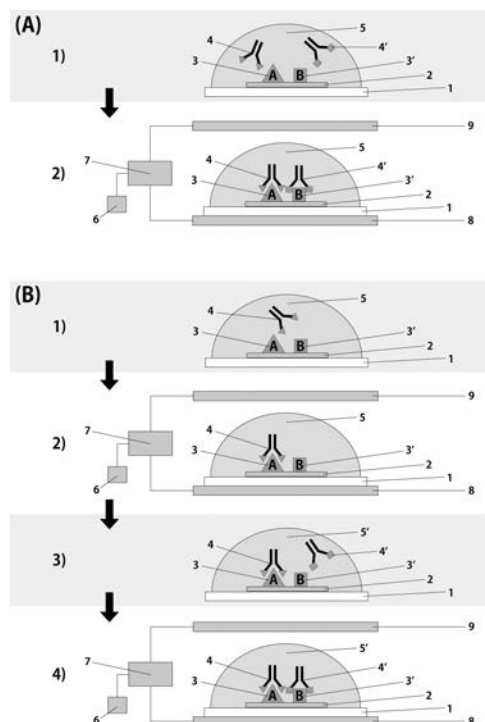
(54) 【発明の名称】 迅速かつ高感度な多重免疫染色法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、検出感度が向上し、再現性の高い多重免疫染色法を開発することを目的とする。

【解決手段】複数種類の抗体を用いて検体中の複数の抗原を検出する多重免疫染色法において、前記抗体を含有する抗体溶液の液滴を前記検体上に形成し、前記液滴に変動電界を印可することで、前記抗原と前記抗体が結合する抗原抗体反応を促進することを特徴とする多重免疫染色法を提供する。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複数種類の抗体を用いて検体中の複数の抗原を検出する多重免疫染色法において、前記抗体を含有する抗体溶液の液滴を前記検体上に形成し、前記液滴に変動電界を印可することで、前記抗原と前記抗体が結合する抗原抗体反応を促進することを特徴とする多重免疫染色法。

## 【請求項 2】

以下の (A) ~ (D) の工程を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の多重免疫染色法

(A) 前記検体を基板上に載置する工程、

(B - 1) 前記複数の抗原のうち一の抗原に特異的に結合できる 1 次抗体を含有する 1 次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B - 2) 前記 1 次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記抗原に前記 1 次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B - 3) 前記検体上から前記 1 次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

(B - 4) 前記 1 次抗体に特異的に結合できる抗体に標識酵素を連結可能にした 2 次抗体を含有する 2 次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B - 5) 前記 2 次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記 1 次抗体に前記 2 次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B - 6) 前記検体上から前記 2 次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

(B - 7) 前記検体上に発色基質を含有する発色溶液を加えて、前記 2 次抗体に連結した標識酵素による発色反応を行う工程、

(B - 8) 前記 1 次抗体、前記 2 次抗体及び前記標識酵素を不活化する工程、

(C) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる 1 次抗体を用いて前記 (B - 1) ~ (B - 8) の工程を  $n - 2$  回繰り返す工程 ( $n$  は 2 以上かつ 10 以下の整数を表す)、及び

(D) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる 1 次抗体を用いて前記 (B - 1) ~ (B - 7) の工程を 1 回行う工程。

## 【請求項 3】

前記工程 (B - 2) 及び (B - 5) において、前記抗原抗体反応を行う時間がそれぞれ 1 ~ 20 分であることを特徴とする、請求項 2 に記載の多重免疫染色法。

## 【請求項 4】

前記工程 (B - 3) 及び (B - 6) において、前記検体を覆うように前記基板上に洗浄液の液滴を形成し、変動電界を印可することにより、前記検体の洗浄を行うことを特徴とする、請求項 2 又は 3 に記載の多重免疫染色法。

## 【請求項 5】

検出する抗原が、Geminin、CDT1 及び H2A.X の 3 つの抗原を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の多重免疫染色法。

## 【請求項 6】

請求項 2 ~ 4 のいずれかに記載の多重免疫染色法に用いるキットであって、

前記検体を載置するための基板と、

$n$  種類の抗原にそれぞれ特異的に結合できる 1 次抗体を含有する  $n$  種類の 1 次抗体試薬と ( $n$  は 2 以上かつ 10 以下の整数を表す)、

前記 1 次抗体に結合する抗体に標識酵素を連結可能にした 2 次抗体を含有する 2 次抗体試薬と、

前記標識酵素により発色する発色基質を含有する  $n$  種類の発色溶液と、

洗浄液とを含むことを特徴とする多重免疫染色用キット。

## 【請求項 7】

Geminin、CDT1 及び H2A.X の 3 つの抗原にそれぞれ特異的に結合できる 1 次抗体を含有する 3 種類の 1 次抗体試薬を含むことを特徴とする、請求項 6 に記載の多

10

20

30

40

50

重免疫染色用キット。

【請求項 8】

複数種類の抗体を用いて検体を染色することにより多重免疫染色標本を製造する方法において、前記抗体を含有する溶液の液滴を前記検体上に形成し、前記液滴に変動電界を印可することで、前記抗原と前記抗体が結合する抗原抗体反応を促進することを特徴とする多重免疫染色標本の製造方法。

【請求項 9】

以下の(A)～(E)の工程を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の多重免疫染色標本の製造方法：

(A) 前記検体を基板上に載置する工程、

(B - 1) 前記複数の抗原のうち一の抗原に特異的に結合できる 1 次抗体を含有する 1 次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B - 2) 前記 1 次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記抗原に前記 1 次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B - 3) 前記検体上から前記 1 次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

(B - 4) 前記 1 次抗体に特異的に結合できる抗体に標識酵素を連結可能にした 2 次抗体を含有する 2 次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B - 5) 前記 2 次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記 1 次抗体に前記 2 次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B - 6) 前記検体上から前記 2 次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

(B - 7) 前記検体上に発色基質を含有する発色溶液を加えて、前記 2 次抗体に連結した前記標識酵素による発色反応を行う工程、

(B - 8) 前記 1 次抗体、前記 2 次抗体及び前記標識酵素を不活化する工程、

(C) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる 1 次抗体を用いて前記 (B - 1) ～ (B - 8) の工程を  $n - 2$  回繰り返す工程 ( $n$  は 2 以上かつ 10 以下の整数を表す)、

(D) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる 1 次抗体を用いて前記 (B - 1) ～ (B - 7) の工程を 1 回行う工程、及び

(E) 発色させた前記検体を固定する工程。

【請求項 10】

前記工程 (B - 2) 及び (B - 5) において、前記抗原抗体反応を行う時間がそれぞれ 1 ～ 20 分であることを特徴とする、請求項 9 に記載の多重免疫染色標本の製造方法。

【請求項 11】

前記工程 (B - 3) 及び (B - 6) において、前記検体上に洗浄液の液滴を形成し、変動電界を印可することにより、前記検体の洗浄を行うことを特徴とする、請求項 9 又は 10 に記載の多重免疫染色標本の製造方法。

【請求項 12】

検出する抗原が、Geminin、CDT1 及び H2A.X の 3 つの抗原を含むことを特徴とする、請求項 9 ～ 11 のいずれかに記載の多重免疫染色標本の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数の抗体を用いて検体中の複数の抗原を検出する多重免疫染色法に関する。また、本発明は、当該多重免疫染色法に用いるキット、及び複数の抗体を用いて検体中の複数の抗原を染色した多重免疫染色標本の製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫染色とは、免疫組織化学 (Immunohistochemistry, IHC) の別称であり、検体となる組織又は細胞に存在する抗原に、蛍光色素や発色反応を行う酵素等の標識を連結した抗

10

20

30

40

50

体を結合させることで、抗原の存在を可視化する方法である。

【0003】

免疫染色には、大きく分けて直接法と間接法とがある。直接法は、蛍光色素や発色反応を行う酵素等の標識を直接抗体に連結し、抗原と反応させる方法である。一方、間接法は、検出すべき抗原に特異的に結合できる抗体（1次抗体）には標識を連結せず、その1次抗体に特異的に結合できる抗体（2次抗体）に標識を連結して検出する方法である。

【0004】

免疫染色を用いれば、患者から採取した組織や細胞に対して、特定の疾患に関連するタンパク質や遺伝子の発現を顕微鏡観察することができるので、免疫染色は病理診断にとって重要な手法である。

例えば、肺がんの病理診断を例に挙げると、肺がんの種類には、腺がん、扁平上皮がん、大細胞がん、及び小細胞がんとがあり、どの種類の肺がんであるかによって最適な治療方法が異なってくる。例えば、腺がんと扁平上皮がんとは、治療効果のある抗がん剤が異なっており、この2つの種類の識別が重要である。この識別には、がん細胞の形態観察のみではなく、免疫染色による識別が有効である。例えば、肺の腺がんの細胞核ではTTF-1 (Thyroid transcription factor) タンパク質が発現していることが多く、TTF-1に特異的な抗体を用いた免疫染色の結果が、腺がんであることの重要な指標となる。

【0005】

しかし、一種類の抗体を用いた免疫染色では正確にがんの種類を識別することは難しいため、複数種類の抗体を用いた免疫染色が一般に行われる。例えば、肺の腺がんと扁平上皮癌を識別するために、腺がんの細胞質に局在するNapsin-Aに特異的な抗体、腺がんの細胞核に局在するTTF-1に特異的な抗体、扁平上皮がんの細胞質に局在するサイトケラチン14 (CK14) に特異的な抗体、そして、扁平上皮がんの細胞核に局在するp63に特異的な抗体の4種類の抗体を用いる方法が開発されている（特許文献1）。

【0006】

このように複数種類の抗体を用いて免疫染色を行う場合には、患者から採取した組織を薄くスライスして複数の切片を用意し、それぞれの切片を異なる抗体で免疫染色するのが一般的な方法である。一つの切片に対して複数の抗体の混合物を単に加えて免疫染色を行っても、異なる抗原が同じ色で検出されることとなり、検出された抗原の区別がつかないからである。

しかし、このように複数の切片を用意する方法では、切片ごとに異なる細胞が存在した異なる試料となるため、免疫染色の結果を正確に対比することができないという問題があった。特に、染色された細胞の数を計測することにより染色の程度を定量化して比較するためには、複数の切片を用いる方法では正確性に問題があった。

【0007】

この問題を解決できる手段として、同一の切片に対して複数の抗体を用いた免疫染色を行い、それぞれの抗体で検出した抗原を色分けして可視化する「多重免疫染色法」が開発されている。

この多重免疫染色法には、大きく分類すると次のイ)～ハ)の3つの方法があり、これらの3つの方法は組み合わせて用いることもできる。

【0008】

イ)異なる標識を有する抗体を用いた直接法による多重免疫染色法：

この方法は、複数の抗原に対してそれぞれ特異的な結合活性を有し、かつ、それぞれ異なる標識が連結した抗体を用いて多重免疫染色を行う方法である。

この方法の一例を図9により説明する。

例えば、抗原Aと抗原Bとが発現している検体に対し（図9（1））、抗原Aに特異的な結合活性を有する抗A抗体に標識酵素としてアルカリホスファターゼを連結したものと、抗原Bに特異的な結合活性を有する抗B抗体に標識酵素としてペルオキシダーゼを連結したものとを混合して加え、抗原抗体反応を行う（図9（2））。次に、アルカリホスファターゼの基質となる発色基質（S1）と、ペルオキシダーゼの基質となる発色基質（S

10

20

30

40

50

2) とを加えて酵素反応により発色させて、抗原 A と抗原 B とを異なる色で染色し、これらの存在位置を可視化することができる ( 図 9 ( 3 ) ) 。

【 0 0 0 9 】

しかし、このイ) の方法では、標識が結合した抗体を用意しなければならず、抗体の種類によっては入手が困難であるという問題があった。また、標識として酵素を用いる場合には、アルカリホスファターゼとペルオキシダーゼしか実質的に選択肢がなく、色分けに限界があるという問題があった。種類が多い蛍光色素を標識として用いた場合でも、蛍光色素は光を受けて退色してしまうため、検体標本の保存ができないという問題がある。

さらに、イ) の方法では、複数の抗体を用いるため、これらの抗体が一部競合するなどして、十分な感度で染色ができないという問題があった。

10

【 0 0 1 0 】

ロ) 動物種が異なる 1 次抗体を用いた間接法による多重免疫染色法 :

この多重免疫染色法は、1 次抗体として、複数の抗原に対してそれぞれ特異的で、かつ、それぞれ動物種が異なる複数種類の 1 次抗体を用い、2 次抗体として、それぞれの動物種に特異的で、かつ、それぞれ異なる標識が結合した複数種類の 2 次抗体を用いることを特徴とする多重免疫染色法である。

この方法の一例を図 1 0 により説明する。

例えば、抗原 A と抗原 B とが発現している検体に対し ( 図 1 0 ( 1 ) ) 、抗原 A に特異的に結合できるマウス由来の抗体 ( マウス由来抗 A 抗体 ) と、抗原 B に特異的に結合できるヒツジ由来の抗体 ( ヒツジ由来抗 B 抗体 ) とを 1 次抗体として混合して加えることにより、抗原抗体反応を行う ( 図 1 0 ( 2 ) ) 。次に、2 次抗体として、マウス由来の抗体に特異的に結合できる抗マウス抗体に標識酵素としてアルカリホスファターゼを連結したものと、ヒツジ由来の抗体に特異的に結合できる抗ヒツジ抗体に標識酵素としてペルオキシダーゼを連結したものとを混合して加え、抗原抗体反応を行う ( 図 1 0 ( 3 ) ) 。最後に、アルカリホスファターゼの基質となる発色基質 ( S 1 ) と、ペルオキシダーゼの基質となる発色基質 ( S 2 ) とを加えて酵素反応により発色させて、抗原 A と抗原 B とを異なる色で染色し、これらの存在位置を可視化することができる ( 図 1 0 ( 4 ) ) 。

20

【 0 0 1 1 】

しかし、このロ) の方法では、それぞれ動物種が異なる複数種類の 1 次抗体を用意する必要があり、抗体の種類によっては入手が困難であるという問題があった。また、標識として酵素を用いる場合には、アルカリホスファターゼとペルオキシダーゼしか実質的に選択肢がなく、色分けに限界があるという問題があった。標識として酵素に代えて蛍光色素を用いた場合でも、蛍光色素は光を受けて退色してしまうため、検体標本の保存ができないという問題がある。

30

さらに、ロ) の方法では、複数種類の抗体を用いるため、これらの抗体が競合するなどして、十分な感度で染色ができないという問題があった。

【 0 0 1 2 】

ハ) 間接法の繰り返しによる多重免疫染色法 :

この多重免疫染色法は、1 次抗体として、複数の抗原に対してそれぞれ特異的な複数種類の 1 次抗体を用い、2 次抗体として、1 次抗体に特異的で、かつ標識が結合した 2 次抗体を用い、1 つの抗原ごとに、1 次抗体と 2 次抗体による抗原抗体反応を繰り返すことを特徴とする多重免疫染色法である。

40

この方法の一例を図 1 1 により説明する。

例えば、抗原 A と抗原 B とが発現している検体に対し ( 図 1 1 ( 1 ) ) 、抗原 A に特異的な結合活性を有する抗 A 抗体のみを 1 次抗体として加えて、抗原抗体反応を行う ( 図 1 1 ( 2 ) ) 。次に、標識酵素としてアルカリホスファターゼが連結した 2 次抗体を加えて、1 次抗体に結合させる ( 図 1 1 ( 3 ) ) 。そして、アルカリホスファターゼの基質となる発色基質 ( S 1 ) を加えて、酵素反応により発色させて抗原 A を染色する ( 図 1 1 ( 4 ) ) 。十分な染色ができたなら、抗体及び酵素を不活化するための処理等を行って、1 回目の免疫染色を終了する ( 図 1 1 ( 5 ) ) 。次に 2 回目の免疫染色として、抗原 B に特異的

50

な結合活性を有する抗 B 抗体を 1 次抗体とし、1 回目と同様に 1 次抗体反応、2 次抗体反応、及び酵素反応による発色を行い、抗原 B を染色する（図 1 1（6）～（8））。2 回目の免疫染色では、1 回目の免疫染色と異なる発色基質（S 3）を用いるため、抗原 B を抗原 A とは異なる色で染色することができる。

この方法を用いた多重免疫染色法については、例えば、非特許文献 1 に記載されている。

#### 【0013】

この八）の方法では、1 次抗体として、標識が結合した抗体を用意する必要はなく、また、動物種が異なる抗体を用意する必要もなく、通常抗体（モノクローナル抗体）を用意すればよいため、イ）とロ）の方法と比べて、より多くの種類の抗原に対して多重免疫染色を行うことが可能である。

また、八）の方法では、免疫染色を繰り返すごとに異なる発色基質を用いて色分けを行うが、発色基質は様々な色の発色剤が入手可能であるため、イ）やロ）の方法と比べて、より多くの種類の抗原を同時に色分けし、より多重の免疫染色を行うことが可能である。

このように、多重免疫染色法の中でも、八）の間接法の繰り返しによる多重免疫染色法が最も適用範囲が広い方法である。

#### 【0014】

しかし、この八）の間接法の繰り返しによる多重免疫染色法では、染色工程を何度も繰り返す必要があるため、多重免疫染色を完了させるために長時間を要するという問題があった。例えば、3 種類の抗体を用いた 3 重免疫染色の場合には、効率よく操作を行っても約 400 分以上の時間を要し、臨床検査としての実用性に問題があった。

さらに、八）の方法では、1 回目の免疫染色では感度に問題はないが、2 回目以降の免疫染色では、既に検体に結合している抗体が障害になり、あるいは、抗体と酵素の不活化処理の影響を受けるなどして、染色を繰り返すごとに感度が低下してしまうという問題があった。

#### 【0015】

以上のように、従来の多重免疫染色法は、いずれの方法においても、検出感度が十分ではないという問題があった。このため、従来の多重免疫染色法では、検出感度を向上させるために、相性のよい抗体セットの選択、抗原賦活化処理の選択、抗体の希釈倍率、抗原抗体反応の時間、そして、繰り返し免疫染色を行う場合には使用する抗体の順序等の条件を、試行錯誤の上で最適な条件に調整する必要があった。また、従来の多重免疫染色法は、条件の違いにより十分な結果が得られない場合もあるなど、再現性にも問題があった。

#### 【0016】

ところで、本発明者らは、変動電界を印可することにより、短時間で免疫染色を行うことを可能とする、迅速免疫染色法を開発している（特許文献 2、非特許文献 2）。

この迅速免疫染色法は、検出目的となるタンパク質を発現している組織に、抗体を含む溶液を滴下して液滴を形成し、変動電界によりこの液滴を攪拌し、抗原抗体反応を促進するものである。具体的には、組織を載置したスライドガラスの下部に電極を配し、その電極と対向する側にも液滴に接触しないように電極を配して、この 2 つの電極間に変動電界を発生させる。この変動電界により液滴が攪拌され、短時間で抗原抗体反応を行うことができ、また、抗体を節約することもできる

#### 【0017】

また、他の研究グループによって、超音波を照射することで、多重免疫染色法の反応時間を短縮し、強度と感度を高める方法が開発されている（非特許文献 3）。

しかし、超音波の照射は、過酸化水素の生成など様々な化学反応を引き起こし、音響エネルギーの吸収により検体の温度上昇を引き起こすものであるため、反応が不安定になる恐れが強いものであった。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0018】

10

20

30

40

50

【特許文献1】国際公開WO2010/122846号パンフレット

【特許文献2】特開2012-013598号公報

【非特許文献1】柳田絵美衣、外3名、ザ・アメリカン・ジャーナル・オブ・サージカル・パスオロジー（The American Journal of Surgical Pathology、略号Am J Surg Pathol）、ウォルターズ・クルワー・ヘルス社（WoltersKluwer Health）、2012年5月発行、36巻、5号、p.769-773

【非特許文献2】戸田洋、外9名、アクタ・ヒストケミカ・エト・サイトケミカ（Acta Histochemica et Cytochemica、略号ActaCytochem. Cytochem.）、日本組織細胞化学会、2011年6月3日発行、44巻、3号、p.133-139

【非特許文献3】Furuhata A、外5名、アクタ・サイトロジカ（Acta Cytologica、略号Acta Cytol.）、国際細胞学会、2010年発行、54巻、3号、p.283-290

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

従来の多重免疫染色法は、同一の検体に対して複数の抗体を用いて染色を行うため、いずれの方法においても検出感度が十分ではないという問題があった。このため、従来の多重免疫染色法では、検出感度を向上させるために、相性のよい抗体セットの選択、抗原賦活化処理の選択、抗体の希釈倍率、抗原抗体反応の時間、そして、繰り返し免疫染色を行う場合には使用する抗体の順序等、免疫染色の条件を試行錯誤の上で最適なものに調整する必要があるという問題があった。また、従来の多重免疫染色法は、条件の違いにより十分な結果が得られない場合もあるなど再現性にも問題があった。

そこで、本発明は、上記従来の状況に鑑み、検出感度が向上し、再現性の高い多重免疫染色法を開発することを目的とする。

【0020】

上記課題を解決するために、本発明者らは鋭意研究した結果、多重免疫染色法を行うにあたり変動電界を印可したところ、染色時間が短縮できるのみならず、意外なことに、多重免疫染色法の検出感度を向上させることができ、再現性が高まることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0021】

すなわち、本発明は、多重免疫染色法に係る下記の第1発明と、多重免疫染色用キットに係る下記の第2発明と、多重免疫染色標本の製造方法に係る下記の第3発明を提供する。

【0022】

第1発明は、多重免疫染色法に係るものである。この多重免疫染色法は、抗体を含有する溶液の液滴を検体上に形成し、この液滴に変動電界を印可することで、抗原抗体反応を促進することを特徴とする。

【0023】

第1発明の多重免疫染色法においては、特に、次の(A)～(D)の工程を含む方法が好ましい。

(A) 前記検体を基板上に載置する工程、

(B-1) 前記複数の抗原のうち一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を含有する1次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B-2) 前記1次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記抗原に前記1次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B-3) 前記検体上から前記1次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

(B-4) 前記1次抗体に特異的に結合できる抗体に標識酵素を連結可能にした2次抗体を含有する2次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B-5) 前記2次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記1次抗体に前記2次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B-6) 前記検体上から前記2次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

10

20

30

40

50

(B - 7) 前記検体上に発色基質を含有する発色溶液を加えて、前記2次抗体に連結した前記標識酵素による発色反応を行う工程、

(B - 8) 前記1次抗体、前記2次抗体及び前記標識酵素を不活化する工程、

(C) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて前記(B - 1) ~ (B - 8)の工程をn - 2回繰り返す工程(nは2以上かつ10以下の整数を表す)、及び

(D) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて前記(B - 1) ~ (B - 7)の工程を1回行う工程。

【0024】

また、上記(A) ~ (D)の工程を含む多重免疫染色法において、工程(B - 2)及び(B - 5)で、抗原抗体反応を行う時間がそれぞれ1 ~ 20分とすることが好ましい。 10

また、工程(B - 3)及び(B - 6)において、検体上に洗浄液の液滴を形成し、変動電界を印可することにより、検体の洗浄を行うことができる。

【0025】

また、上記の免疫染色法において、検出する抗原として、Geminin、CDT1及びH2A.Xの3つの抗原を含ませることができる。

【0026】

第2発明は、多重免疫染色用のキットに係るものである。この多重免疫染色用キットは、上記の免疫染色法に用いるキットであって、

検体を載置するための基板と、 20

n種類の抗原にそれぞれ特異的に結合できる1次抗体を含有するn種類の1次抗体試薬と(nは2以上かつ10以下の整数を表す)、

1次抗体に結合する抗体に標識酵素を連結可能にした2次抗体を含有する2次抗体試薬と、

標識酵素により発色する発色基質を含有するn種類の発色溶液と、

洗浄液とを含むことを特徴とする。

【0027】

上記の多重免疫染色用キットにおいて、Geminin、CDT1及びH2A.Xの3つの抗原にそれぞれ特異的に結合できる1次抗体を含有する3種類の1次抗体試薬を含むキットとすることができる。 30

【0028】

第3発明は、多重免疫染色標本の製造方法に係るものであるが、本発明の多重免疫染色法を用いることにより、多重免疫染色標本を製造することができる。

特に、上記(A) ~ (D)の工程を含む多重免疫染色法を行った後に、(E)発色させた検体を固定する工程を行うことで、多重免疫染色標本を製造することが好ましい。

【発明の効果】

【0029】

第1発明の多重免疫染色法と、第2発明の多重免疫染色用キットと、第3発明の多重免疫染色標本の製造方法とは、いずれも迅速な多重免疫染色を可能とするだけでなく、検出感度を向上させることができるという効果を奏する。 40

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】本発明の多重免疫染色法の二つの実施形態を示す図である。

【図2】本発明の多重免疫染色法及び多重免疫染色標本の製造方法の工程(A)及び(B)の一実施形態を示す図である。

【図3】本発明の多重免疫染色法及び多重免疫染色標本の製造方法の工程(C)の一実施形態を示す図である。

【図4】本発明の多重免疫染色法及び多重免疫染色標本の製造方法の工程(D)及び(E)の一実施形態を示す図である。

【図5】本発明における変動電界印加の一実施形態を示す図である。 50

【図6】本発明の多重免疫染色法による三重免疫染色の一実施例（実施例1）と従来法（比較例1）との染色結果の比較を示す図面に代わる写真である。

【図7】本発明の多重免疫染色法による二重免疫染色の一実施例（実施例2）と従来法（比較例2）との染色結果の比較を示す図面に代わる写真である。

【図8】動物種が異なる抗体を用いた本発明の多重免疫染色法の一実施例（実施例3）と従来法（比較例3）との染色結果の比較を示す図面に代わる写真である。

【図9】従来の多重免疫染色法の一つ（異なる標識を有する抗体を用いた直説法）を示す図である。

【図10】従来の多重免疫染色法の一つ（動物種が異なる1次抗体を用いた間接法）を示す図である。

【図11】従来の多重免疫染色法の一つ（間接法の繰り返し）を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0031】

#### 1. 本発明の多重免疫染色法

本発明の多重免疫染色法は、複数の抗体を用いた多重免疫染色を行うにあたり、抗体を含有する溶液の液滴を検体上に形成し、この液滴に変動電界を印可することで、抗原抗体反応を促進することを特徴とする。

本発明の多重免疫染色法は、複数種類の抗体を混合して多重免疫染色を行う場合に用いることができ、また、一種類の抗体による免疫染色を複数回繰り返して多重免疫染色を行う場合にも用いることができ、さらにこれらを組み合わせて多重免疫染色を行う場合にも用いることができる。

【0032】

本発明の多重免疫染色法の実施形態を図1に示す。

図1(A)は、複数種類の抗体を混合して多重免疫染色を行う場合の一例を示す図である。まず、図1(A)1)に示すように、スライドガラス等の基板(1)上に検体(2)を載置する。検体(2)は、検出目的となる抗原A(3)及び抗原B(3')を発現している。この検体上に、抗原Aに特異的に結合できる抗A抗体(4)及び抗原Bに特異的に結合できる抗B抗体(4')を含有する抗体溶液を滴下するなどして、液滴(5)を形成する。

【0033】

次に、図1(A)2)に示すように、基板を移動して電界攪拌装置にセットする。電界攪拌装置は、例えば、ファンクションジェネレーター(6)で発生させた信号を高圧アンプ(7)で昇圧させ、これを2つの電極(8, 9)に供給し、この2つの電極間(8, 9)で周期的に変動する電界を発生させる装置を用いることができる。この変動電界により、液滴(5)が震動して液滴内部の抗体溶液が攪拌され、抗原と抗体との反応が促進される。

これにより、抗原抗体反応を行う時間を短縮することができるとともに、複数の抗体による抗原抗体反応であっても、免疫染色の検出感度を向上させることができる。

【0034】

図1(B)は、一種類の抗体による免疫染色を複数回繰り返して多重免疫染色を行う場合の一例を示す図である。まず、図1(B)1)に示すように、基板(1)上に検体(2)を載置する。検体(2)は、検出目的となる抗原A(3)及び抗原B(3')を発現している。この検体上に、抗A抗体(4)を含有する抗体溶液を滴下するなどして、液滴(5)を形成する。

【0035】

次に、図1(B)2)に示すように、基板を移動して電界攪拌装置にセットする。電界攪拌装置は、例えば、上述のようにファンクションジェネレーター(6)と高圧アンプ(7)とによって、2つの電極間(8, 9)で変動電界を発生させる装置を用いることができる。この変動電界により、液滴(5)が震動して液滴内部の抗体溶液が攪拌され、抗原と抗体との反応が促進される。

10

20

30

40

50

これにより、一種類目の抗原抗体反応を行う時間を短縮することができる。

【0036】

次に、図1(B)3)に示すように、抗A抗体(4)を含有する抗体溶液を取り除いた上で、抗B抗体(4')を含有する抗体溶液を滴下するなどして、液滴(5')を検体(2)上に形成する。

そして、図1(B)4)に示すように、変動電界を印可して、抗原抗体反応を促進する。

これにより、二種類目の抗原抗体反応を行う時間を短縮できるとともに、検体に既に結合している他の抗体(4)による障害や、あるいは、免疫染色の繰り返しによる影響があっても、抗体(4')を抗原(3')に十分に結合させることができ、免疫染色の検出感度を向上させることができる。

10

【0037】

本発明の多重免疫染色法は、このように、複数種類の抗体を混合して多重免疫染色を行う場合に用いることができ、また、一種類の抗体による免疫染色を複数回繰り返し多重免疫染色を行う場合にも用いることができる。

したがって、本発明の多重免疫染色法は、これらに限定されるわけではないが、背景技術として図9~図11を用いて説明した、上記のイ)~八)のいずれの多重免疫染色法にも用いることができ、また、これらの方法を組み合わせた多重免疫染色法にも用いることができる。

【0038】

20

例えば、イ)異なる標識を有する抗体を用いた直説法による多重免疫染色法の場合には、図9(2)の抗原抗体反応を行う工程において、変動電界を印可して、抗原抗体反応を促進することができる。

また、ロ)動物種が異なる1次抗体を用いた間接法による多重免疫染色法の場合には、図10(2)の1次抗体を用いて抗原抗体反応を行う工程、そして、同図(3)の2次抗体を用いて抗原抗体反応を行う工程において、変動電界を印可して、抗原抗体反応を促進することができる。

そして、ハ)間接法の繰り返しによる多重免疫染色法の場合には、図11(2)、(3)、(6)及び(7)等の抗原抗体反応を行う工程において、変動電界を印可して、抗原抗体反応を促進することができる。

30

【0039】

2. 工程(A)~(D)を有する本発明の多重免疫染色法

2-1. 間接法の繰り返しによる多重免疫染色法の優位性と問題点

上記のイ)~八)の多重免疫染色法のうち、ハ)間接法の繰り返しによる多重免疫染色法は、1次抗体として、標識が結合した抗体を用意する必要はなく、また、動物種が異なる抗体を用意する必要もなく、通常抗体(モノクローナル抗体)を用意すればよい。また、ハ)の方法では、2次抗体も1種類の抗体を用意すれば足りる。このため、ハ)の多重免疫染色法は、イ)とロ)の方法と比べて、より多くの種類の抗原に対して多重免疫染色を行うことが可能である。

さらに、ハ)の方法では、異なる発色基質を用いて色分けを行うが、発色基質は様々な色の発色剤が入手可能であるため、イ)やロ)の方法と比べて、より多くの種類の抗原を同時に色分けし、より多重の免疫染色を行うことが可能である。

40

このように、多重免疫染色法の中でも、ハ)の多重免疫染色法が最も適用範囲が広い。

【0040】

しかし、このハ)の多重免疫染色法では、染色工程を何度も繰り返す必要があるため、多重免疫染色を完了させるために長時間を要するという問題があった。

また、ハ)の方法では、1回目の免疫染色では感度に問題はないが、2回目、3回目と免疫染色を繰り返すごとに感度が低下してしまうという問題があった。

これらの問題を解決できれば、ハ)の方法は、多重免疫染色法の中でも最も優れた方法となり得る。

50

## 【0041】

2-2. 工程(A)~(D)を有する本発明の多重免疫染色法の構成

そこで、本発明者らは鋭意研究した結果、検体中の複数の抗原を検出する多重免疫染色法において、八)の多重免疫染色法を改良し、変動電界の印加と組み合わせ、次の工程を有する多重免疫染色法を開発するに至った。

(A) 前記検体を基板上に載置する工程、

(B-1) 前記複数の抗原のうち一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を含有する1次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B-2) 前記1次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記抗原に前記1次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B-3) 前記検体上から前記1次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

(B-4) 前記1次抗体に特異的に結合できる抗体に標識酵素を連結可能にした2次抗体を含有する2次抗体溶液の液滴を、前記を覆うように前記基板上に形成する工程、

(B-5) 前記2次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記1次抗体に前記2次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、

(B-6) 前記検体上から前記2次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、

(B-7) 前記検体上に発色基質を含有する発色溶液を加えて、前記2次抗体に連結した前記標識酵素による発色反応を行う工程、

(B-8) 前記1次抗体、前記2次抗体及び前記標識酵素を不活化する工程、

(C) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて前記(B-1)~(B-8)の工程をn-2回繰り返す工程(nは2以上かつ10以下の整数を表す)、及び

(D) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて前記(B-1)~(B-7)の工程を1回行う工程。

## 【0042】

2-3. 工程(A)~(D)を有する本発明の多重免疫染色法の効果

上記工程(A)~(D)を有する多重免疫染色法は、1次抗体及び2次抗体として特殊な抗体の組み合わせを使用する必要がなく、発色基質の色の種類の数だけ多重に免疫染色することも可能であるため、検出できる抗原の組み合わせの適用範囲が広いという効果を奏する方法である。また、この多重免疫染色法は、従来問題であった所要時間についても、大幅に短縮することができるという効果を奏する。例えば、3重染色の場合には、従来400分程度必要としていた方法を、160分程度に短縮して実施することも可能である。さらに、この多重免疫染色法は、検出感度が向上しているため、過度な試行錯誤により最適な条件に調整する必要がなく、再現性にも優れているという効果を奏する方法である。

## 【0043】

2-4. 工程(A)~(D)を有する本発明の多重免疫染色法の一実施形態の説明

上記工程(A)~(D)を有する多重免疫染色法について、その一実施形態を図2~4に示す。

図2(A)は、患者から採取した組織等の検体(2)を、スライドガラス等の基板(1)の上に載置する工程(A)の一例を示す。検体(2)は、検出目的となる抗原A(3)、抗原B(3')及び抗原C(3'')を発現している。

## 【0044】

図2(B-1)は、工程(B-1)の一例を示す。抗原A(3)に特異的に結合できる1次抗体(4)を含有する1次抗体溶液を、検体(2)を覆うように基板(1)上に滴下して、1次抗体溶液の液滴(5)を形成している。

この図2(B-1)の状態を静置しても、抗原A(3)と1次抗体(4)との抗原抗体反応が進行するが、その反応を促進するため、次の(B-2)の工程で変動電界を印可する。

図2(B-2)は、変動電界を印可する工程(B-2)の一例を示す。まず、基板(1

10

20

30

40

50

)を移動させて電界攪拌装置にセットする。電界攪拌装置は、ファンクションジェネレーター(6)で発生させた信号を高圧アンプ(7)で昇圧させ、これを2つの電極(8,9)に供給し、この2つの電極間(8,9)で周期的に変動する電界を発生させるものである。この変動電界により、液滴(5)が震動して液滴内部の抗体溶液が攪拌され、抗原A(3)と1次抗体(4)との抗原抗体反応が促進される。

図2(B-3)は、工程(B-3)の一例を示す。まず、1次抗体(4)を含む1次抗体溶液を取り除く。次に、洗浄液(10)を検体(2)を覆うように基板(1)上に形成して、検体(2)に付着した未反応の1次抗体(4)等を取り除くための洗浄を行う。

【0045】

図2(B-4)は、工程(B-4)の一例を示す。1次抗体に特異的に結合できる抗体に標識酵素(11)を連結した2次抗体(12)を含有する2次抗体溶液を、検体(2)を覆うように基板(1)上に滴下して、2次抗体溶液の液滴(13)を形成する。

図2(B-5)は、工程(B-5)の一例を示す。まず、基板(1)を移動して電界攪拌装置に再セットする。電界攪拌装置は、上述のようにファンクションジェネレーター(6)と高圧アンプ(7)とにより、2つの電極間(8,9)で変動電界を発生させる。この変動電界により、液滴(5)が震動して液滴内部の抗体溶液が攪拌され、1次抗体(4)と2次抗体(12)との抗原抗体反応が促進される。

図2(B-6)は、工程(B-6)の一例を示す。まず、2次抗体(12)を含む2次抗体溶液を取り除く。次に、洗浄液(10)を検体(2)を覆うように基板(1)上に形成して、検体(2)に付着した未反応の2次抗体(12)等を取り除くための洗浄を行う。

【0046】

図2(B-7)は、工程(B-7)の一例を示す。検体(2)上に、発色基質を含有する発色溶液(15)を加えて発色反応を行う。発色溶液(14)を加えると、標識酵素(11)により発色基質が化学変化し、発色した化合物が生成されることにより、抗原A付近の生体分子を染色することができる。

図2(B-8)は、工程(B-8)の一例を示す。検体(2)上に処理溶液(15)を加え、加熱処理装置(16)内で加熱して、1次抗体(4)、2次抗体(12)及び標識酵素(11)を不活性化処理を行う。

この不活化処理を行うことにより、後の(C)及び(D)の工程で行う免疫染色において、既に抗原に結合している1次抗体や2次抗体と、新たに加えた1次抗体や2次抗体が交差反応することを防ぐことができる。また、標識酵素を不活化することで、複数回行う免疫染色において、同じ標識酵素が何度も発色反応を触媒することを防ぐことができる。これらの効果により、染色の「かぶり」を抑制し、抗原分布が明瞭な色分けにより可視化された免疫染色の結果を得ることができる。

また、この不活化処理によって、後の(C)及び(D)の工程で検出する抗原B及びCを同時に賦活化することもできる。抗原の賦活化とは、患者から採取した組織等をホルマリン等で固定化して検体を作成すると、タンパク質間の架橋等により抗原決定基が隠されてしまうため、これを露出させて、抗体により認識できるようにするための処理である。

【0047】

次に、図3は、工程(C)の一例を示す。工程(C)では、上記工程で用いた1次抗体とは異なる、他の抗原に結合できる1次抗体を用いて、上記(B-1)~(B-8)の工程をn-2回繰り返す。

例えば、3重染色を行う場合には、通常、n=3であり、(B-1)~(B-2)の工程をn-2=1回繰り返す。4重染色を行う場合には、通常、2回繰り返す。そして、2重染色を行う場合には、n-2=0であり、(C)の工程は行わない。図2~4に示す実施形態では、n=3の三重染色であり、(C)の工程は1回繰り返す。以下、この実施形態について説明する。

【0048】

図3(B-1)に示すように、抗原B(3')に特異的に結合できる1次抗体(4')

10

20

30

40

50

を含有する1次抗体溶液を、検体(2)を覆うように基板(1)上に滴下して、1次抗体溶液の液滴(5')を形成する。

次に、図3(B-2)に示すように、基板(1)を移動させて電界攪拌装置にセットし、変動電界を印可することにより、抗原B(3')と1次抗体(4')との抗原抗体反応を促進する。

そして、図3(B-3)に示すように、1次抗体(4')を含む1次抗体溶液を取り除き、洗浄液(10)で検体(2)の洗浄を行う。

【0049】

このようにして、抗原B(3')に1次抗体(4')を結合させた後に、図3(B-4)~(B-6)に示すように、標識酵素(11)を連結した2次抗体(12)を加えて、1次抗体(4')に2次抗体(12)を結合させる。

10

【0050】

図3(B-7)に示すように、2次抗体を結合させて洗浄を行った後に、1回目の免疫染色で使用した発色基質とは異なる発色基質を含有する発色溶液(14')を加えて、抗原B付近の生体分子を染色する。このように、異なる発色基質を用いることで、抗原Aと抗原Bとを異なる色で染色することができ、これらの抗原の分布を色分けして可視化することができる。

図3(B-8)に示すように、検体(2)に処理液(15)を加えて、加熱処理装置(16)内で加熱することにより、1次抗体(4')、2次抗体(12)及び標識酵素(11)を不活性化する。

20

【0051】

これら(B-1)~(B-8)の工程を、それぞれ異なる1次抗体を用いてn-2回繰り返した後、次の工程(D)に進む。

【0052】

図4は、工程(D)の一例を示す。工程(D)では、上記工程で用いた1次抗体とは異なる、他の抗原に結合できる1次抗体を用いて、上記(B-1)~(B-7)の工程を1回行う。

図4(B-1)に示すように、抗原C(3'')に特異的に結合できる1次抗体(4'')を含有する1次抗体溶液を、検体(2)を覆うように基板(1)上に滴下して、1次抗体溶液の液滴(5'')を形成する。

30

そして、図4(B-2)に示すように、変動電界を印可して抗原抗体反応を行い、抗原C(3'')に1次抗体(4'')を結合させ、その後、図4(B-3)に示すように、洗浄を行う。

次に、図4(B-4)~(B-6)に示すように、2次抗体を用いた抗原抗体反応を変動電界下に行い、その後、洗浄を行う。

【0053】

最後に、1回目及び2回目の免疫染色で使用した発色基質とは異なる発色基質を含有する発色溶液(14'')を加えて、抗原C付近の生体分子を染色する。このようにして、抗原A、B及びCを、それぞれ異なる色で染色することができ、これらの抗原の分布を色分けして可視化することができる。

40

【0054】

### 3. 本発明の多重免疫染色標本の製造方法

本発明はまた、多重免疫染色標本の製造方法を提供する。本発明の多重免疫染色標本の製造方法は、抗体を含有する溶液の液滴を検体上に形成し、この液滴に変動電界を印可することで、抗原抗体反応を促進することを特徴とする。

この多重免疫染色標本の製造方法は、上記で説明した本発明の多重免疫染色法により免疫染色を行うことで、多重免疫染色標本を製造することができる。

【0055】

本発明の多重免疫染色標本の製造方法では、特に、下記の(A)~(E)の工程を含む製造方法とすることが好ましい。

50

- (A) 前記検体を基板上に載置する工程、  
 (B - 1) 前記複数のうちの抗原に特異的に結合できる1次抗体を含有する1次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、  
 (B - 2) 前記1次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記抗原に前記1次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、  
 (B - 3) 前記検体上から前記1次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、  
 (B - 4) 前記1次抗体に特異的に結合できる抗体に標識酵素を連結可能にした2次抗体を含有する2次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程、  
 (B - 5) 前記2次抗体溶液の液滴に変動電界を印可することにより、前記1次抗体に前記2次抗体が結合する抗原抗体反応を促進する工程、  
 (B - 6) 前記検体上から前記2次抗体溶液を取り除き、前記検体を洗浄する工程、  
 (B - 7) 前記検体上に発色基質を含有する発色溶液を加えて、前記2次抗体に連結した前記標識酵素による発色反応を行う工程、  
 (B - 8) 前記1次抗体、前記2次抗体及び前記標識酵素を不活化する工程、  
 (C) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて前記(B - 1) ~ (B - 8)の工程をn - 2回繰り返す工程(nは2以上かつ10以下の整数を表す)、  
 (D) 前記複数の抗原のうち他の一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて前記(B - 1) ~ (B - 7)の工程を1回行う工程、及び  
 (E) 発色させた前記検体を固定する工程。

10

20

20

## 【0056】

上記(E)の工程は、例えば、工程(D)の最終段階で発色させた検体から発色液を取り除き、乾燥させた上で、図4(E)に示すように固定することで行うことができる。

図4(E)は、工程(E)の一例を示すものであり、発色した検体(2)上に封入剤(17)を加え、カバーガラス(18)を被せて、カバーガラスの周辺をシール材(19)で封止することで固定することができる。

## 【0057】

## 4. 本発明の多重免疫染色法及び多重免疫染色標本の製造方法の詳細な説明

以上、本発明の多重免疫染色法及び多重免疫染色標本の製造方法について、図を用いて一実施形態の説明を行ったが、以下、より詳細に本発明の説明を行う。

30

30

## 【0058】

## 4 - 1. 多重免疫染色法の詳細な説明

本発明は、複数種類の抗体を用いて検体中の複数の抗原を検出する多重免疫染色に関する発明である。

本発明で用いる抗体としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、並びにダイアボディ、scFv、Fab等の抗体の抗原結合部位を含む人工抗体等を用いることができる。

## 【0059】

また、本発明で用いる検体としては、細胞を含むものであればいかなるものでもよく、ヒト、ヒト以外の動物又は植物の器官若しくは生体組織の一部又は細胞として得ることができる。また、微生物や培養細胞を検体としてもよい。さらに、観察が可能であれば、これらの細胞の断片を含むものであってもよい。

40

40

## 【0060】

検体は、化学的あるいは物理的に固定されたものを用いてもよく、また、固定されていないものを用いてもよい。化学的な固定としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、スベリミド酸ジメチル二塩酸塩、四酸化オスミウム等を、生体組織や細胞に浸潤させ、生体組織・細胞内の高分子物質を架橋することによって不動化する方法がある。また、物理的な固定としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、煮沸やマイクロウェーブ照射による熱凝固や、凍結により生体組織・細胞内の高分子物質を不動化する方法がある。また、これらを組み合わせ、例

50

50

えば、被検試料を急速凍結後に、ホルマリン/アセトン中で置換固定したものであってもよい。その他、検体に対しては、抗原賦活化等の処理を行ってもよい。

#### 【0061】

通常、器官や生体組織の一部を検体とする場合、そのままの大きさを顕微鏡観察することが難しいため、ある程度の厚さの切片を作製する。切片の作製方法としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、器官や生体組織をOCTコンパウンド等の凍結組織包埋剤に包埋し、凍結してから凍結ミクロトームにて薄切りする方法や、器官や生体組織を凍結せずにそのまま振動式ミクロトーム等により薄切りする方法や、器官や生体組織をパラフィンに包埋し冷却して硬くした後に、ミクロトームにて薄切りする方法などがある。

尚、培養細胞や微生物を検体とする場合には、包埋剤に包埋してブロック状にして切片を作製したり、包埋剤でシート状にしたり、ガラス基板に細胞を固定したりすることもできる。

#### 【0062】

##### 4-2. 変動電界を用いた電界攪拌の詳細な説明

本発明の多重免疫染色法及び多重免疫染色標本の製造方法は、抗体を含有する抗体溶液の液滴を検体上に形成し、液滴に変動電界を印可することで、抗原と抗体が結合する抗原抗体反応を促進することを特徴とする。

液滴に変動電界を印可することにより、抗原抗体反応が促進される仕組みについて、図5を用いて以下に説明する。

図5は、本発明における変動電界の印加方法の一実施形態を示す図である。

図5(1)に示すように、基板(1)上に検体(2)が載置され、その検体(2)上に、抗体(4, 4')を含む抗体溶液の液滴(5)を形成する。この抗体溶液の液滴(5)を形成した基板(1)を、電界攪拌装置にセットする。この電界攪拌装置は、ファンクションジェネレーター(6)で発生させた信号を高圧アンプ(7)で昇圧させ、これを2つの電極(8, 9)に供給し、この2つの電極間(8, 9)で周期的に変動する電界を発生させるものである。

#### 【0063】

水滴は偏極するため、抗体溶液の液滴(5)の表面は、マイナスにチャージしている。また、抗体溶液の液滴(5)表面の電荷に比べれば小さいが、抗体溶液の液滴(5)中の抗体(4, 4')は、タンパク質であるためマイナスにチャージしている。そして、図5(1)に示されるように、抗体溶液の液滴(5)は、表面張力により盛り上がった形状をしている。

ここで、図5(2)に示されるように、電極(8)側がプラスとなるように電界を印可すると、クーロン力により、抗体溶液の液滴(5)の表面が電極(8)側に引き寄せられ、抗体溶液の液滴(5)が平坦な形状に近づく。同様に、抗体(4, 4')も引き寄せられる。そして、図5(3)に示すように、電界を元に戻すと、抗体溶液の液滴(5)は、表面張力により、もとの盛り上がった形状に復帰する。また、一方の電極がマイナスとなるように電界を印可して、電荷の反発力により、抗体溶液の液滴(5)の形状を変化させることもできる。したがって、周期的な変動電界を与えることにより、抗体溶液の液滴(5)を震動させることができ、この震動により、液滴(5)中の抗体溶液を攪拌することができる。この電界攪拌により、抗原抗体反応を促進することができる。

#### 【0064】

尚、電界攪拌を行うためには、抗体溶液の液滴(5)に通電しないように、少なくとも片方の電極と液滴(5)とは非接触の状態とする必要がある。好ましくは、抗体溶液の液滴(5)とその上部の電極(9)との間に空隙を設けるのがよい。

周期的に変動する電界を発生させるための信号は、周期的に変動する信号であればどのようなものでもよく、例えば、これらに限定されるわけではないが、方形波、正弦波、三角波、ノコギリ波などを使用することができるが、攪拌効率を高めるためには、瞬間的な変化の大きい方形波を用いるのが好ましい。

また、信号の周波数は、通常の液滴であれば、0.1~800Hzの周波数で震動させ

10

20

30

40

50

ることができる。

印加する電圧の強度は、液滴の大きさにより異なるが、十分に攪拌効果を生じさせるためには、 $0.35 \sim 2.5 \text{ kV/mm}$ とするのが好ましい。

#### 【0065】

変動電界を発生させる向きとしては、どのような方向であってもよいが、鉛直方向に変動電界を印可するのが好ましい。本発明者らは、この電界攪拌を効率的に行う一つの方法として、印加電圧の主電圧を $0.35 \sim 2.5 \text{ kV/mm}$ とし、これにオフセット電圧 $0.2 \sim 2.2 \text{ kV/mm}$ を加えることで、プラス側に隔たった繰り返し方形波を生成し、抗体溶液の液滴(5)の下部にある電極(8)をプラス側とするのが好ましいことを見出した。

10

#### 【0066】

#### 4-3. 工程(A)~(D)の詳細な説明

本発明の免疫染色方法においては、前述のように、上記(A)~(D)の工程を含む方法とすることが好ましい。

上記(A)の工程は、検体を基板上に載置する工程であるが、ここで使用する「基板」とは、検体を上部に載置する平板部分を有し、かつ、上部に液滴を形成できるものであればどのような形状であってもよいが、顕微鏡観察を行う観点からは、透明な平板状の基板を用いるのが好ましい。特に、顕微鏡観察に通常用いるスライドガラスが好適である。

また、基板には、液滴を形成しやすいように、撥水性の素材で枠を形成することが好ましい。

20

#### 【0067】

上記(A)の工程の前後において、必要により、検体中の抗原を賦活化する処理や、検体に内在する標識酵素と同一の酵素を失活させる処理、又は検体表面をブロッキングする処理等、免疫染色を良好に行うための処理を検体に施すことができる。

検体中の抗原を賦活化する方法としては、例えば、これらに限定されるわけではないが、加熱による方法や、タンパク質分解酵素を用いる方法で抗原を賦活化することができる。加熱による方法では、処理液としてリン酸バッファーやクエン酸バッファー等を用い、 $90 \sim 120$  で加熱する。タンパク質分解酵素を用いる方法では、プロテアーゼやトリプシンを用いることができる。

検体に内在する標識酵素と同一の酵素を失活させる処理としては、例えば、これらに限定されるわけではないが、ヨウ素水溶液で処理するIsobe法や、過酸化水素加メタノールで処理する方法等を用いることができる。

30

検体表面をブロッキングする処理は、抗体が非特異的に検体表面に吸着するのを防ぐために、タンパク質等が吸着しやすい検体表面の箇所にも他のタンパク質をあらかじめ吸着させておく処理である。ブロッキング処理に用いる他のタンパク質としては、BSA(ウシ血清アルブミン)やスキムミルク等を用いることができる。

#### 【0068】

上記(B-1)の工程は、検出目的となる複数の抗原のうち一の抗原に特異的に結合できる1次抗体を含有する1次抗体溶液の液滴を、前記検体を覆うように前記基板上に形成する工程である。

40

ここで、1次抗体溶液は、通常、1種類の1次抗体を含有するものを用いるが、局在する箇所が明らかに異なっていることが事前に判明している2つの以上の抗原があるときには、それぞれの抗原に特異的な2つ以上の抗体を混合した1次抗体溶液を用いることもできる。このように複数の抗体を混合した1次抗体を用いた場合には、複数の抗原を色分けして可視化することができないが、その局在場所により、どの抗原であるかを判別することができる。例えば、細胞核のみに局在することが判明している抗原と、細胞質のみに局在していることが判明している抗原とがあるときには、これらの抗原が同一の色で染色されても判別することができるため、これらの2つの抗原に対する1次抗体を混合して1次抗体溶液とすることもできる。

#### 【0069】

50

上記(B-2)及び(B-5)の工程は、変動電界を印可して抗原抗体反応を行う工程であり、上述した方法により変動電界の印加を行うことができる。ここで、変動電界を印可して抗原抗体反応を行う時間は、抗体の濃度により異なるが、各工程でそれぞれ1~20分とすることが好ましい。多重免疫染色の場合には、反応時間が1分未満では、十分な抗原抗体反応を行うことができず、また、反応時間が20分を越えると、多重免疫染色を行うのに長時間を要してしまう。より好ましい反応時間は3~10分である。従来免疫染色法の抗原抗体反応では、30分から24時間程度の反応時間を必要としたが、本発明では、変動電界を印可することにより、これを大幅に短縮することが可能となる。

#### 【0070】

上記(B-4)の工程は、1次抗体に特異的に結合できる抗体に標識酵素を連結可能にした2次抗体を含有する2次抗体溶液の液滴を、検体を覆うように基板上に形成する工程である。ここで、抗体に連結可能にした標識酵素としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、ペルオキシダーゼやアルカリホスファターゼを用いることができる。

標識酵素を連結可能にした2次抗体としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、標識酵素が直接連結した2次抗体を用いることができ、また、ポリマーを介して標識酵素と抗体が間接的に連結した2次抗体を用いることができる。さらに、標識酵素が直接的又は間接的に実際に連結している2次抗体だけでなく、例えば、ビオチンやアビジン等を介して標識酵素が間接的に連結可能なように、標識酵素が容易に連結できるビオチン等の連結部位を有する2次抗体を用いることもできる。

#### 【0071】

抗体に標識酵素を直接連結する方法としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、架橋剤を介して、化学反応により抗体と標識酵素を共有結合により連結する方法を用いることができる。また、ポリマーを介して標識酵素と酵素を間接的に連結する方法としては、これらに限定されるわけではないが例えば、側鎖に反応性基を有するポリマーを用い、これらの側鎖に抗体と標識酵素を共有結合により連結する方法を用いることができる。さらに、抗体と標識酵素を間接的に連結可能にする方法としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、抗体にビオチンを共有結合で連結し、標識酵素にアビジンを共有結合で連結し、ビオチンとアビジンの親和性により、両者を連結する方法がある。

上記(B-4)の工程で、標識酵素が容易に連結できる連結部位を有する2次抗体を用いる場合には、例えば、まず、ビオチンが連結した2次抗体を加え、次の(B-5)の工程で変動電界を印可してこの2次抗体を1次抗体に結合させ、さらに、アビジンが連結した標識酵素を加えて、これを2次抗体に連結することができる。

#### 【0072】

上記(B-3)及び(B-6)の工程は、抗原抗体反応を行ったのち、検体上から抗体溶液を取り除き、さらに、抗原と結合していない抗体を除去するための洗浄を行う工程である。ここで、洗浄液としては、例えば、TBS(トリス緩衝生理食塩水)やPBS(リン酸緩衝生理食塩水)を用いることができ、1分~20分程度の洗浄を行う。

また、この洗浄を行う際には、検体上に洗浄液の液滴を形成し、変動電界を印可することにより、洗浄液の液滴を攪拌して洗浄を行うことができる。この方法を用いれば、洗浄をより短時間でより効率よく行うことができる。

#### 【0073】

上記(B-7)の工程は、検体上に発色基質を含有する発色溶液を加えて、2次抗体に連結した標識酵素による発色反応を行う工程である。この工程で使用できる発色基質としては、例えば、標識酵素がペルオキシダーゼである場合には、DAB(ジアミノベンジジン、褐色)、AEC(アミノエチルカルバゾール、赤色)、Histo Green(緑色)など、市販の発色基質が多数あり、これらを用いることができる。また、例えば、標識酵素がアルカリホスファターゼである場合には、PermaBlue(青色)、PermaRed(赤色)、BCIP/NBT(紫色)など、市販の発色基質が多数あり、これらを用いることができる。

発色反応を停止するためには、Denaturing Solution(BIOCARE MEDICAL, Pike Lane, USA)等の反応停止用専用試薬を用いてもよい。

10

20

30

40

50

## 【0074】

上述のように、(B-4)の工程では、「標識酵素を連結可能にした2次抗体」を用いるが、これは標識酵素が直接又は間接に実際に連結している2次抗体だけでなく、標識酵素が容易に連結できるビオチン等の連結部位を有する2次抗体も含む。しかし、このような標識酵素が容易に連結できる連結部位を有する2次抗体を使用した場合には、(B-7)の工程を行うまでに、2次抗体に標識酵素を連結しておく必要がある。

## 【0075】

上記(B-8)の工程は、1次抗体、2次抗体及び標識酵素を不活化する工程である。ここで、「不活化」とは、1次抗体の場合には、抗原に結合する活性が不活化すること、又は2次抗体が結合するための抗原となる活性が不活化することを意味する。また、2次抗体の場合には、「不活化」とは、1次抗原に結合する活性が不活化することを意味し、標識酵素の場合には、「不活化」とは、酵素活性が不活化することを意味する。さらに、「不活化」には、このような活性を有する1次抗体、2次抗体又は標的酵素が、検体上から除去されることも含む。

10

## 【0076】

不活化する方法としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、加熱をする方法、抗原から一次抗体を解離して取り除く方法等を用いることができる。

加熱をする方法としては、例えば、オートクレーブや熱湯中で、1~60分処理することにより抗体や酵素を不活化することができる。加熱をする方法を用いれば、同時に次の工程の免疫染色で検出する抗原を賦活化することもできるので好ましい。

20

また、抗原から一次抗体を解離して取り除く方法としては、例えば、酸性のグリシン緩衝液で処理する方法を用いることができる。

## 【0077】

上記(C)の工程は、検出対象となる複数の抗原のうち、それまでの工程で検出した抗原とは異なる他の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて、(B-1)~(B-8)の工程をn-2回繰り返す工程である。

ここで、nとは、2以上10以下の整数を意味する。好適な多重免疫染色を行うためには、nは2以上5以下であることが好ましい。

## 【0078】

上記(D)の工程は、検出対象となる複数の抗原のうち、それまでの工程で検出した抗原とは異なる他の抗原に特異的に結合できる1次抗体を用いて、(B-1)~(B-7)の工程を1回繰り返す工程である。

30

尚、(C)及び(D)の工程においては、1回目の免疫染色で用いた1次抗体と同一の動物種の1次抗体を用いれば、2次抗体は1回目の免疫染色で用いた2次抗体と全く同一のものを用いることもできる。

## 【0079】

さらに、本発明の多重免疫染色法では、上記(A)~(D)の工程に、他の工程を加えてもよい。例えば、これらに限定されるわけではないが、細胞形態を観察しやすくするために色素による染色を行う工程や、他の免疫染色法を行う工程と組み合わせることもできる。

40

細胞形態を観察しやすくするために行う色素による染色としては、例えば、細胞核などを染色するヘマトキシリン・エオシン染色や、多糖類を染色するためのPAS(Periodic-acid-Schiff)染色などを用いることができる。

## 【0080】

## 4-4. 多重免疫染色標本の製造方法の詳細な説明

本発明の多重免疫染色標本の製造方法では、上記の(A)~(D)の工程に加えて、さらに、発色された検体を固定する工程(E)を含ませることができる。

発色された検体を固定する方法としては、これらに限定されるわけではないが、例えば、発色させた検体から発色液を取り除き、乾燥させた上で、封入剤を加え、カバーガラスを被せて、カバーガラスの周辺をシール材で封止することで固定することができる。

50

ここで、封入剤としては、例えば、マリノール（武藤化学社製）やエンテランニュー（メルク社製）を用いることができ、シール材としては、例えば、ワセリンやパラフィンを用いることができる。

【0081】

5．抗Geminin抗体、抗CDT1抗体及び抗H2A.X抗体を用いた多重免疫染色  
本発明の多重免疫染色法及び多重免疫染色標本の製造方法においては、抗Geminin抗体、抗CDT1抗体及び抗H2A.X抗体を用いて多重免疫染色を行うことができる。

細胞増殖・分化制御の破綻はがん化を誘導すると考えられ、がん化のメカニズムの解明やあらたな治療の開発のために、その評価は重要なものである。

細胞周期のフェーズには、G1期、S期、G2期、M期とがあるが、G1期にある細胞のマーカーとしてはCDT1があり、S/G2/M期にある細胞のマーカーとしては、Gemininが知られている。さらに、アポトーシス初期のマーカーと考えられているH2A.Xを加えて、これらのマーカーに対する抗体を用いた多重免疫染色を行うことにより、「悪性腫瘍か否かの診断」、「予後予測」及び「治療方針決定」が可能である。

多重免疫染色のプロトコールを作成するには、数百、数千、数万通りのパターンの中から最適な条件を導いていくこととなるが、本発明の多重免疫染色方法は、Geminin、CDT1及びH2A.Xに対する3重免疫染色を、短時間で、かつ再現性よく行うことを初めて可能としたものである。

【0082】

6．多重免疫染色法に用いるキット

本発明はまた、多重免疫染色に用いるキットを提供する。

本発明のキットは、

検体を載置するための基板と、

n種類の抗原にそれぞれ特異的に結合できる1次抗体を含有するn種類の1次抗体試薬と（nは2以上かつ10以下の整数を表す）、

1次抗体に結合する抗体に標識酵素を連結可能とした2次抗体を含有する2次抗体試薬と、

前記標識酵素により発色する発色基質を含有するn種類の発色溶液と、

洗浄液とを含むことを特徴とする。

【0083】

ここで、基板としては、上述のものを用いることができ、特に、撥水性の素材で形成した枠を有するものが好ましい。このような撥水枠があることにより、検体が大きい場合でも、それをカバーする大きな液滴を形成することが可能である。

また、本発明のキットで用いる、標識酵素を連結可能とした2次抗体や、発色基質や、洗浄液は、例えば、上記で例示したものをを用いることができる。

そして、本発明のキットでは、上記（A）～（D）の工程を含む多重免疫染色のためのプロトコールを記載した説明書を添付することが好ましい。

さらに、本発明のキットで用いる1次抗体試薬として、Geminin、CDT1及びH2A.Xの3つの抗原にそれぞれ特異的な3種類の1次抗体試薬を用いることができる。

【0084】

以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例1】

【0085】

（実施例1）

多重免疫染色の対象とする組織は、咽頭、食道、直腸、扁桃、皮膚、リンパ節の6臓器の正常部位と腫瘍部位から採取した組織を用いた。

これらの組織をそれぞれ、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋ブロック

10

20

30

40

50

を作製した上で、4  $\mu$ mの薄切切片を作製し、これを検体とした。

抗原賦活化としてクエン酸Buffer (pH6.0) に検体を浸した状態で、圧力鍋にて熱処理を行った。抗原賦活化処理後、水洗し、変動電界を印可しつつ、1次抗体として抗Geminin抗体を室温で10分間反応させ、二次抗体としてMACH 2 Double Stain 2 (BIOCARE MEDICAL, Pike Lane, USA) を10分間反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ系発色剤であるPermaBlue/AP (Diagnostic Bio Systems, Serpentine Lane, USA) で青色に発色した。

次に、Gemininの抗原抗体反応の停止と抗原賦活化を目的としてクエン酸Buffer (pH6.0) を用いた熱処理を圧力鍋で3分間行った。その後、変動電界を印可しつつ、抗Cdt-1抗体を10分間反応させ、二次抗体としてMACH 2 Double Stain 2を10分間反応させた後、アルカリフォスファターゼ系発色剤であるPermaRed/AP (Diagnostic Bio Systems, Serpentine Lane, USA) で赤色に発色させた。さらに反応停止専用試薬Denaturing Solution (BIOCARE MEDICAL, Pike Lane, USA) を用いて湿潤箱内で5分間反応させ、Cdt-1の抗原抗体反応を停止させた。

次に、3抗体目のgamma-H2A.Xを4分間反応させ、二次抗体としてMACH 2 Double Stain 1 (BIOCARE MEDICAL, Pike Lane, USA) を4分間反応させた後、DABで茶色に発色させた。

染色が終了したプレパラートは用子にてマリノール (MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan) を用いて封入を行った。

【0086】

実施例1の具体的なプロトコールを次の表1に示す。

【0087】

【表1】

1	脱パラフィン、水洗		
2	抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH6.0クエン酸緩衝液)	9分
3	内因性酵素除去処理	3%過酸化水素加メタノール	5分
4	洗浄	TBS	
5	1次抗体	Geminin	10分
6	洗浄	TBS	3分×3回
7	2次抗体	MACH 2 Double Stain #2 (Rabbit-AP)	10分
8	洗浄	TBS	3分×3回
9	発色	PermaBlue/AP	3分
10	水洗		
11	抗体不活・抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH6.0クエン酸緩衝液)	3分
12	洗浄	TBS	
13	1次抗体	CDT-1	10分
14	洗浄	TBS	3分×3回
15	2次抗体	MACH 2 Double Stain #2 (Rabbit-AP)	10分
16	洗浄	TBS	3分×3回
17	発色	PermaRed/AP	10分
18	水洗		
19	抗体不活処理	Denaturing Solution	5分
20	洗浄	TBS	
21	1次抗体	Phospho-Histone H2A.X	4分
22	洗浄	TBS	3分×3回
23	2次抗体	MACH 2 Double Stain #1 (Rabbit-HRP)	4分
24	洗浄	TBS	3分×3回
25	発色	3-3'-Diaminobezidine-4HCl (DAB)	10秒
26	乾燥		60°C20分
27	封入	Malinol	
		計約	160分

【0088】

10

20

30

40

50

## (比較例 1)

比較例 1 として、変動電界を印可せずに、湿潤箱内で静置することにより抗原抗体反応を行う多重免疫染色を行った。

抗Geminin抗体を 1 次抗体とした抗原抗体反応は 40 分間行い、そこに 2 次抗体を結合させる反応は 30 分行った。抗Cdt-1抗体を 1 次抗体とした抗原抗体反応は 60 分間行い、そこに 2 次抗体を結合させる反応は 40 分行った。抗gamma-H2A.Xを 1 次抗体とした抗原抗体反応は 80 分間行い、そこに 2 次抗体を結合させる反応は 40 分間行った。

それ以外の条件は実施例 1 と同一とした。

比較例 1 の具体的なプロトコールを次の表 2 に示す。

【0089】

【表 2】

1	脱パラフィン、水洗		
2	抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH6.0クエン酸緩衝液)	9分
3	内因性酵素除去処理	3%過酸化水素加メタノール	5分
4	洗浄	TBS	
5	1次抗体	Geminin	40分
6	洗浄	TBS	3分×3回
7	2次抗体	MACH 2 Double Stain #2 (Rabbit-AP)	30分
8	洗浄	TBS	3分×3回
9	発色	PermaBlue/AP	3分
10	水洗		
11	抗体不活・抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH6.0クエン酸緩衝液)	3分
12	洗浄	TBS	
13	1次抗体	CDT-1	60分
14	洗浄	TBS	3分×3回
15	2次抗体	MACH 2 Double Stain #2 (Rabbit-AP)	40分
16	洗浄	TBS	3分×3回
17	発色	PermaRed/AP	10分
18	水洗		
19	抗体不活処理	Denaturing Solution	5分
20	洗浄	TBS	
21	1次抗体	Phospho-Histone H2A.X	80分
22	洗浄	TBS	3分×3回
23	2次抗体	MACH 2 Double Stain #1 (Rabbit-HRP)	40分
24	洗浄	TBS	3分×3回
25	発色	3-3'-Diaminobezidine-4HCl(DAB)	10秒
26	乾燥		60°C20分
27	封入	Malinol	
			計約 400分

【0090】

(実施例 1 と比較例 1 の結果)

実施例 1 と比較例 1 の多重免疫染色の結果をそれぞれ図 6 に示す。

変動電界を印可して抗原抗体反応を行った場合(図 6 右図)には、湿潤箱内で静置し抗原抗体反応を行った場合(図 6 左図)に比べ、染色性の強度が高まり、染色性が安定していた。また、変動電界を印可した場合には、湿潤箱内で静置した場合と比較し、再現性も高い結果となった。

染色時間は、湿潤箱内で静置した場合で約 400 分であったが、変動電界を印可した場合には約 160 分であり、約 4 時間の短縮となった。また、自動染色装置を使用した場合でも約 300 分要するため、自動染色装置での染色と比較しても大幅な時間短縮となっている。

【実施例 2】

## 【 0 0 9 1 】

( 実施例 2 )

次に、実施例 1 と同様の方法により、HepPar-1とCytokeratin7の二つの抗原を検出する二重免疫染色を行った。

実施例 1 ではそれぞれの抗原に特異的な抗体を用いて、3回免疫染色を行ったが、実施例 2 では、最初にHepPar-1に特異的な抗HepPar-1抗体を用いて、変動電界印加による抗原抗体反応を4分間行い、そこに2次抗体を結合させる反応は7分間行った。次に、Cytokeratin7に特異的な抗Cytokeratin7抗体を用いて、変動電界印加による抗原抗体反応を3分間行い、そこに2次抗体を結合させる反応は5分間行った。

実施例 1 では1次抗体としてウサギ抗体を用いたが、実施例 2 では1次抗体としてマウス抗体を用いている。また、実施例 1 では、抗原賦活処理としてpH6.0クエン酸緩衝液を用いて9分処理を行ったが、実施例 2 では、抗原賦活処理としてpH8.0EDTA溶液を用いて2分半処理を行っている。また、抗体の種類により、抗原抗体反応の時間を適したものに調整している。その他の条件は、実施例 1 と実施例 2 とで同一ものとした。

## 【 0 0 9 2 】

実施例 2 の具体的なプロトコールを次の表 3 に示す。

## 【 0 0 9 3 】

## 【 表 3 】

1	脱パラフィン、水洗		
2	抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH8.0EDTA)	2分30秒
3	内因性酵素除去処理	3%過酸化水素加メタノール	5分
4	洗浄	TBS	
5	1次抗体	HepPar-1	4分
6	洗浄	TBS	3分×3回
7	2次抗体	MACH 2 Double Stain #1 (Mouse-AP)	7分
8	洗浄	TBS	3分×3回
9	発色	PermaBlue/AP	3分
10	水洗		
11	抗体不活・抗原賦活処理		30秒
12	洗浄	TBS	
13	1次抗体	Cytokeratin7	3分
14	洗浄	TBS	3分×3回
15	2次抗体	MACH 2 Double Stain #2 (Mouse-HRP)	5分
16	洗浄	TBS	3分×3回
17	発色	DAB	10秒
18	乾燥		60°C20分
19	封入	Malinol	
			計約 90分

## 【 0 0 9 4 】

( 比較例 2 )

比較例 2 として、変動電界を印可せずに、湿潤箱内で静置することにより抗原抗体反応を行う多重免疫染色を行った。

抗HepPar-1抗体を1次抗体とした抗原抗体反応は60分間行い、そこに2次抗体を結合させる反応は30分間行った。抗Cytokeratin7抗体を1次抗体とした抗原抗体反応は60分間行い、そこに2次抗体を結合させる反応は30分間行った。それ以外の条件は実施例 2 と同一とした。

比較例 2 の具体的なプロトコールを次の表 4 に示す。

## 【 0 0 9 5 】

【表 4】

1	脱パラフィン、水洗		
2	抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH8.0EDTA)	2分30秒
3	内因性酵素除去処理	3%過酸化水素加メタノール	5分
4	洗浄	TBS	
5	1次抗体	HepPar-1	60分
6	洗浄	TBS	3分×3回
7	2次抗体	MACH 2 Double Stain #1 (Mouse-AP)	30分
8	洗浄	TBS	3分×3回
9	発色	PermaBlue/AP	3分
10	水洗		
11	抗体不活・抗原賦活処理		30秒
12	洗浄	TBS	
13	1次抗体	Cytokeratin7	60分
14	洗浄	TBS	3分×3回
15	2次抗体	MACH 2 Double Stain #2 (Mouse-HRP)	30分
16	洗浄	TBS	3分×3回
17	発色	DAB	10秒
18	乾燥		60°C20分
19	封入	Malinol	
			計約 250分

10

20

## 【0096】

(実施例2と比較例2の結果)

実施例2と比較例2の多重免疫染色の結果をそれぞれ図7に示す。

変動電界を印可して抗原抗体反応を行った場合(図7右図)には、湿潤箱内で静置し抗原抗体反応を行った場合(図7左図)に比べ、染色性の強度が高まり、染色性が安定していた。また、変動電界を印可した場合には、湿潤箱内で静置した場合と比較し、再現性も高い結果となった。

染色時間は、湿潤箱内で静置した場合で約250分であったが、変動電界を印可した場合には約90分であり、大幅な時間短縮となっている。

30

## 【実施例3】

## 【0097】

(実施例3)

次に、動物種が異なる1次抗体を用いた間接法による本発明の多重免疫染色法を行った。

検出目的となる抗原は、TTF-1、p63、Cytokeratin14及びNapsinAの4種である。使用する1次抗体は、ウサギ由来の抗TTF-1抗体、マウス由来の抗p63抗体、ウサギ由来の抗Cytokeratin14抗体及びマウス由来の抗NapsinA抗体を用いた。これらの4種の1次抗体を混合して検体に滴下し、変動電界を印可して7分間抗原抗体反応を行った。そして、2次抗体として、ホースラディッシュペルオキシダーゼが連結した抗ウサギ抗体と、アルカリホスファターゼが連結した抗マウス抗体を用い、これらの2次抗体を混合して検体に滴下し、変動電界を印可して9分間抗原抗体反応を行った。

40

このように動物種が異なる1次抗体を用いる間接法により、1回の間接法による免疫染色で茶色と青色に色分けして染色することができる。ここで、TTF-1とCytokeratin14は同じ茶色で染色されるが、TTF-1が細胞核で発現し、Cytokeratin14が細胞質で発現するので、両者を識別することができる。また、p63とNapsinAは同じ青色で染色されるが、p63は細胞核で発現し、NapsinAが細胞質で発現するので、両者を識別することができる。

そして、肺の腺がんの場合には、細胞の核がTTF-1(茶色)で細胞質がNapsinA(青色)に発色し、扁平上皮がんの場合には核がp63(青色発色)で細胞質がCytokeratinで(茶色発色)になるので、肺がんの病理診断が可能となる。

50

## 【 0 0 9 8 】

実施例 3 の具体的なプロトコールを次の表 3 に示す。

## 【 0 0 9 9 】

## 【 表 5 】

1	脱パラフィン、水洗		
2	抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH8.0EDTA)	2分30秒
3	内因性酵素除去処理	3%過酸化水素加メタノール	5分
4	洗浄	TBS	
5	1次抗体	TTF-1 (Rabbit) + p63 (Mouse) + Cytokeratin14 (Rabbit) + NapsinA (Mouse)	7分
6	洗浄	TBS	3分×3回
7	2次抗体	MACH 2 Double Stain #1 (Rabbit-HRP + Mouse-AP)	9分
8	洗浄	TBS	3分×3回
9	発色	DAB	10秒
10	水洗		
9	発色	PermaBlue/AP	15分
10	水洗		
18	乾燥		60°C20分
19	封入	Malinol	
			計約 80分

10

20

## 【 0 1 0 0 】

## ( 比較例 3 )

比較例 3 として、変動電界を印可せずに、湿潤箱内で静置することにより抗原抗体反応を行う多重免疫染色を行った。

1次抗体を用いた抗原抗体反応は60分間行い、そこに2次抗体を結合させる反応は30分行った。それ以外の条件は実施例 3 と同一とした。

比較例 3 の具体的なプロトコールを次の表 4 に示す。

## 【 0 1 0 1 】

## 【 表 6 】

1	脱パラフィン、水洗		
2	抗原賦活処理	圧力鍋処理(pH8.0EDTA)	2分30秒
3	内因性酵素除去処理	3%過酸化水素加メタノール	5分
4	洗浄	TBS	
5	1次抗体	TTF-1 (Rabbit) + p63 (Mouse) + Cytokeratin14 (Rabbit) + NapsinA (Mouse)	60分
6	洗浄	TBS	3分×3回
7	2次抗体	MACH 2 Double Stain #1 (Rabbit-HRP + Mouse-AP)	30分
8	洗浄	TBS	3分×3回
9	発色	DAB	10秒
10	水洗		
9	発色	PermaBlue/AP	15分
10	水洗		
18	乾燥		60°C20分
19	封入	Malinol	
			計約 150分

30

40

## 【 0 1 0 2 】

## ( 実施例 3 と比較例 3 の結果 )

実施例 3 と比較例 3 の多重免疫染色の結果をそれぞれ図 8 に示す。

50

変動電界を印可して抗原抗体反応を行った場合（図 8 右図）には、湿潤箱内で静置し抗原抗体反応を行った場合（図 8 左図）に比べ、染色性の強度が高まり、染色性が安定していた。また、変動電界を印可した場合には、湿潤箱内で静置した場合と比較し、再現性も高い結果となった。

染色時間は、湿潤箱内で静置した場合で約 150 分であったが、変動電界を印可した場合には約 80 分であり、大幅な時間短縮となっている。

【産業上の利用可能性】

【0103】

本発明の多重免疫染色法、多重免疫染色用キット、及び多重免疫染色標本の製造方法は、迅速で高感度な多重免疫染色を可能とするため、従来は難しかった多重免疫染色による臨床検査を可能にする。

10

【符号の説明】

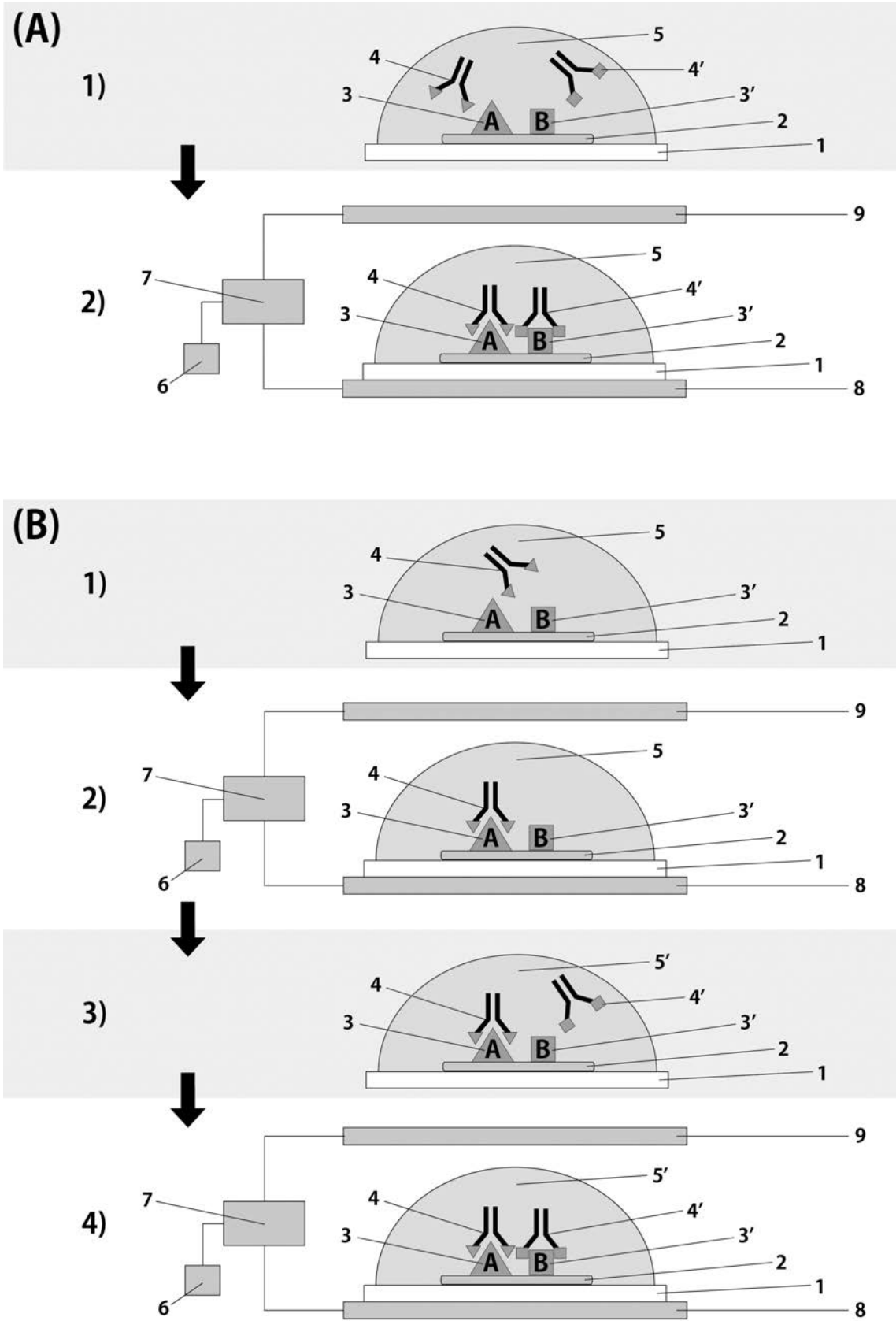
【0104】

- 1 基板
- 2 検体
- 3, 3', 3'' 抗原
- 4, 4', 4'' 抗体
- 5 抗体溶液の液滴
- 6 ファンクションジェネレーター
- 7 高圧アンプ
- 8, 9 電極
- 10 洗浄液
- 11 標識酵素
- 12 2次抗体
- 13 2次抗体溶液の液滴
- 14, 14', 14'' 発色溶液
- 15 処理溶液
- 16 加熱処理装置
- 17 封入剤
- 18 カバーガラス
- 19 シール材

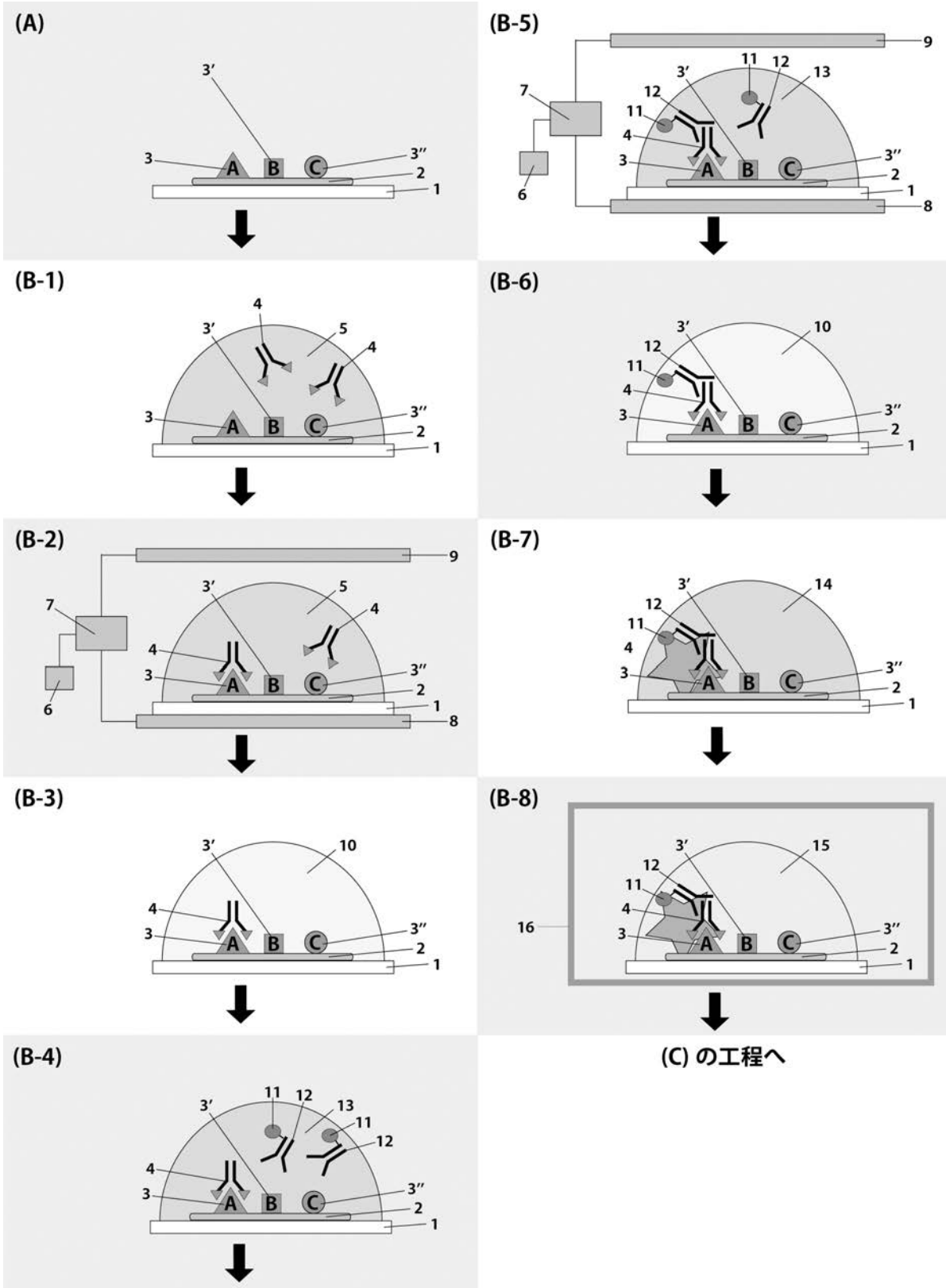
20

30

【 図 1 】

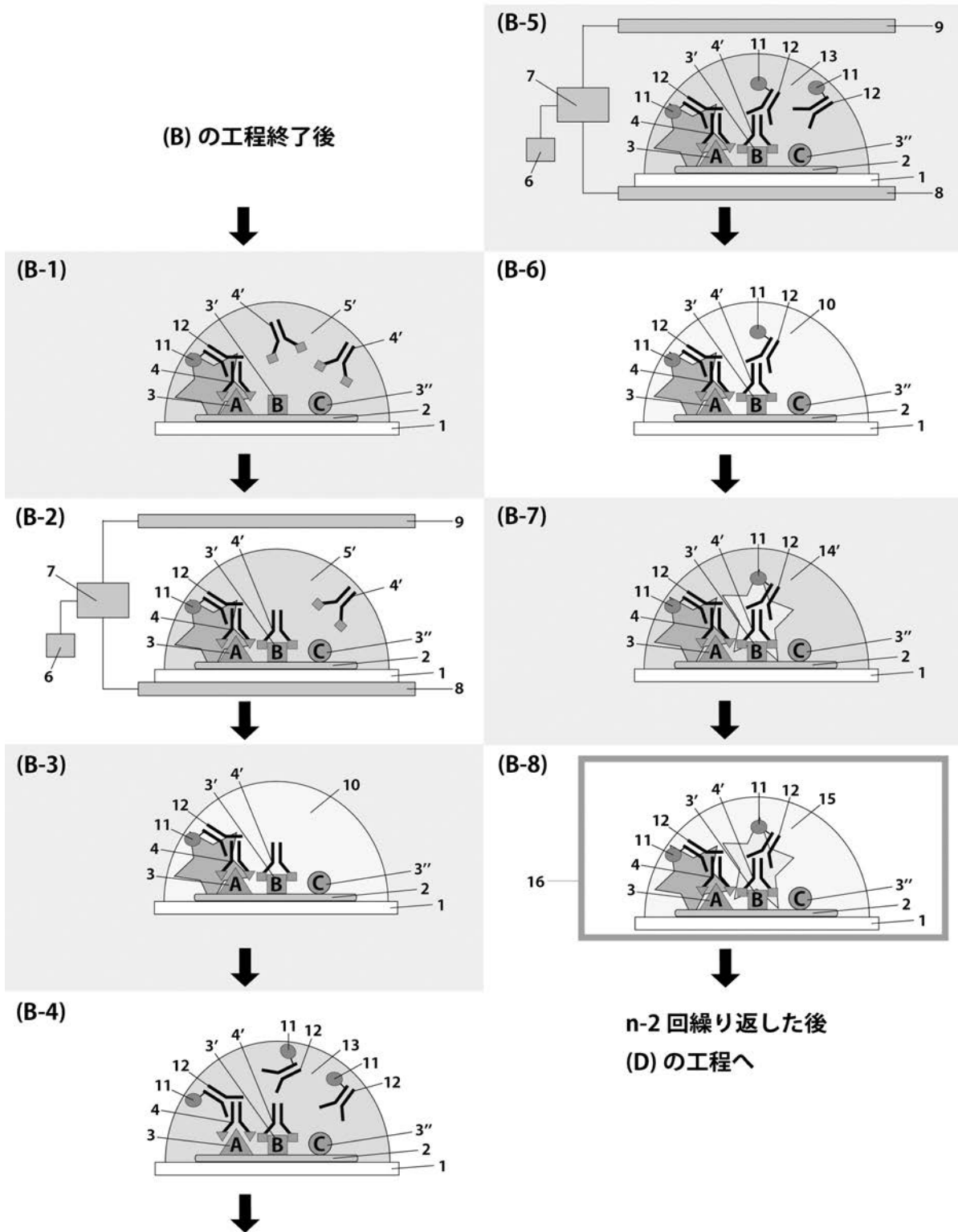


【 図 2 】



【 図 3 】

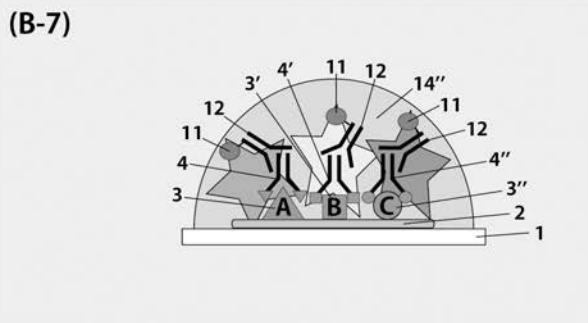
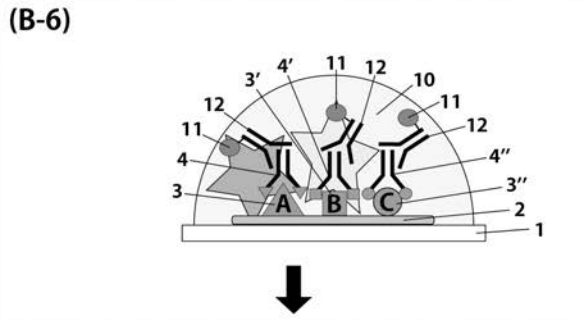
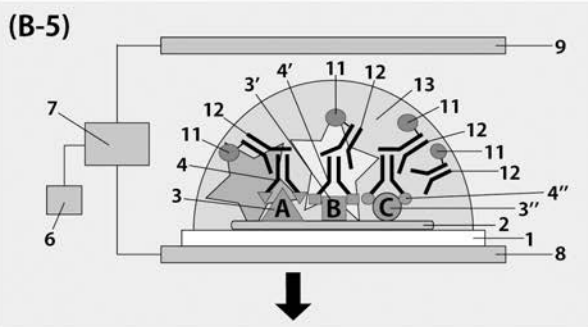
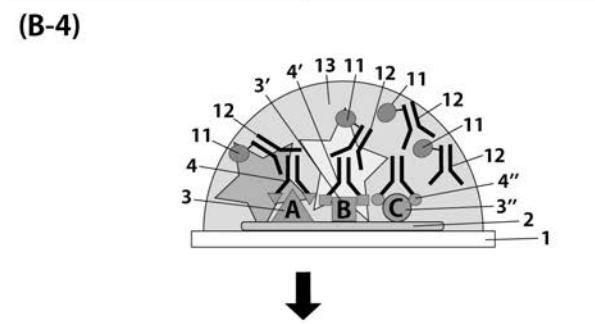
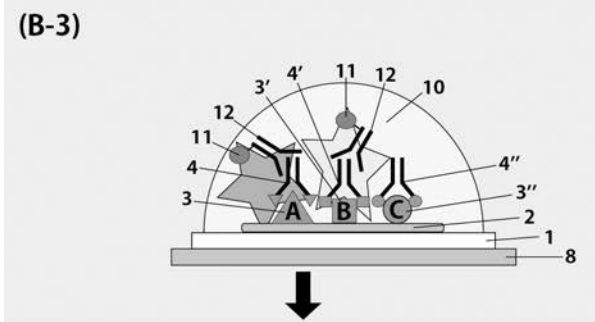
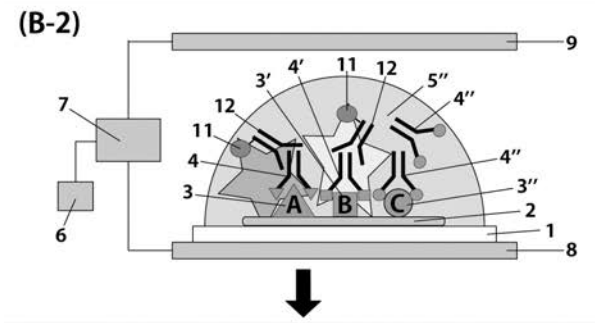
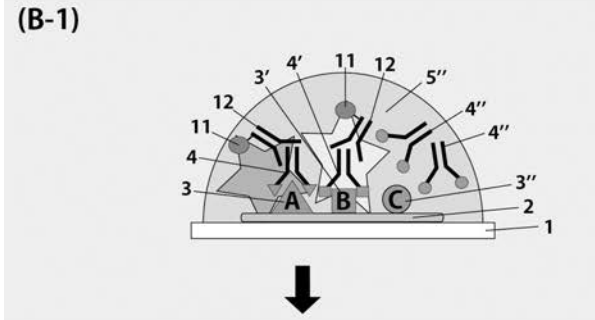
(C) 他の1次抗体を用いて (B-1) ~ (B-8) を n-2 回繰り返す



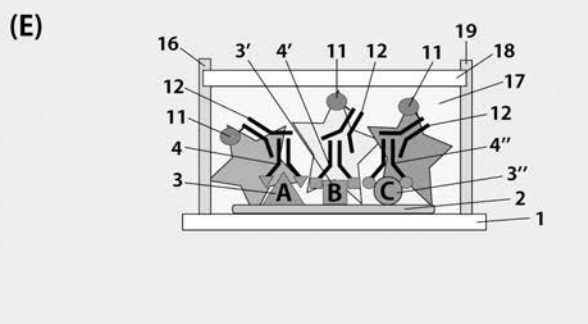
【 図 4 】

(D) 他の1次抗体を用いて (B-1) ~ (B-7) を1回行う

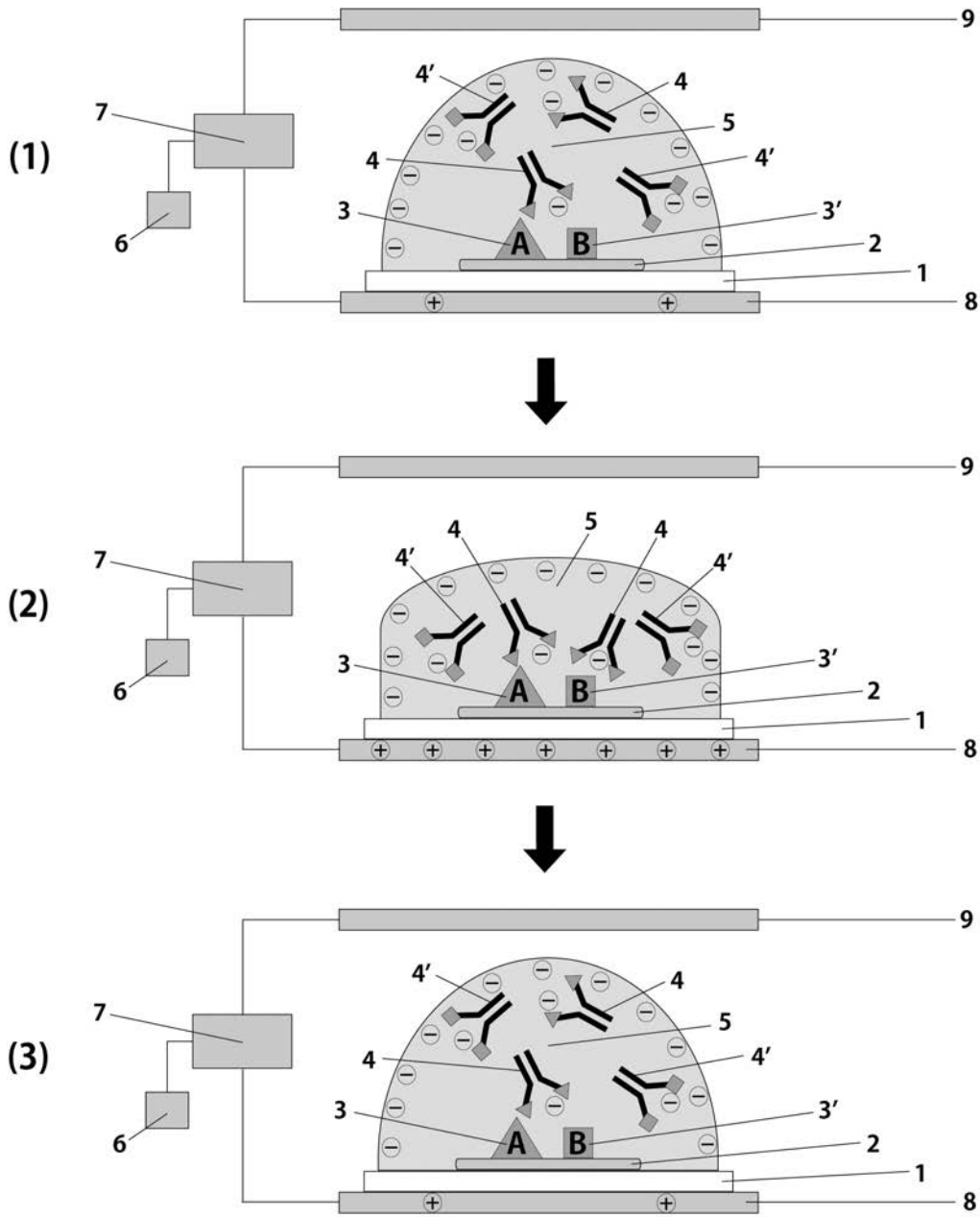
(C) の工程終了後



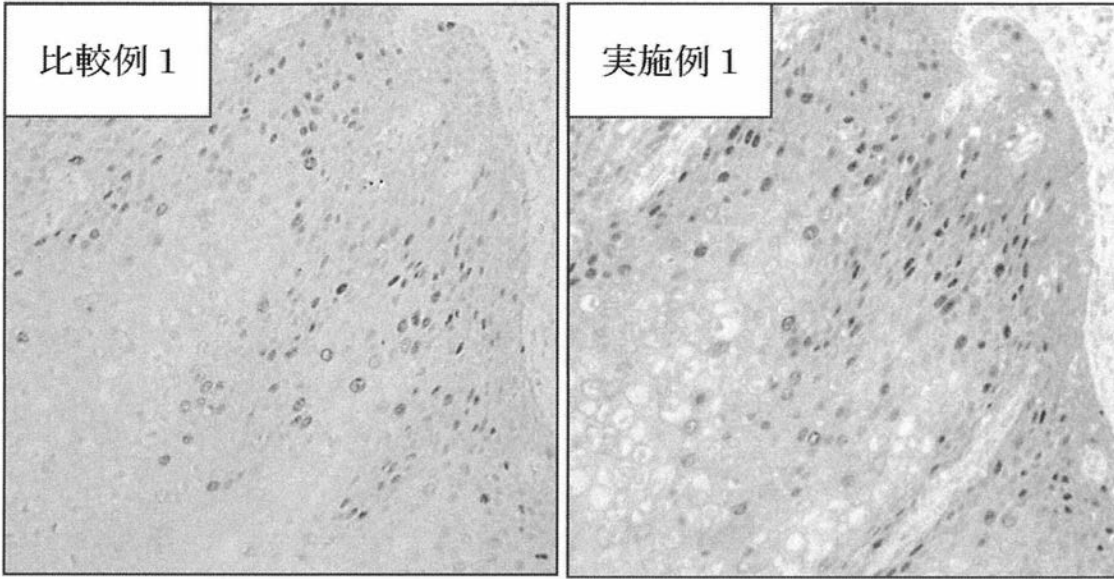
多重免疫染色標本の製造方法の場合



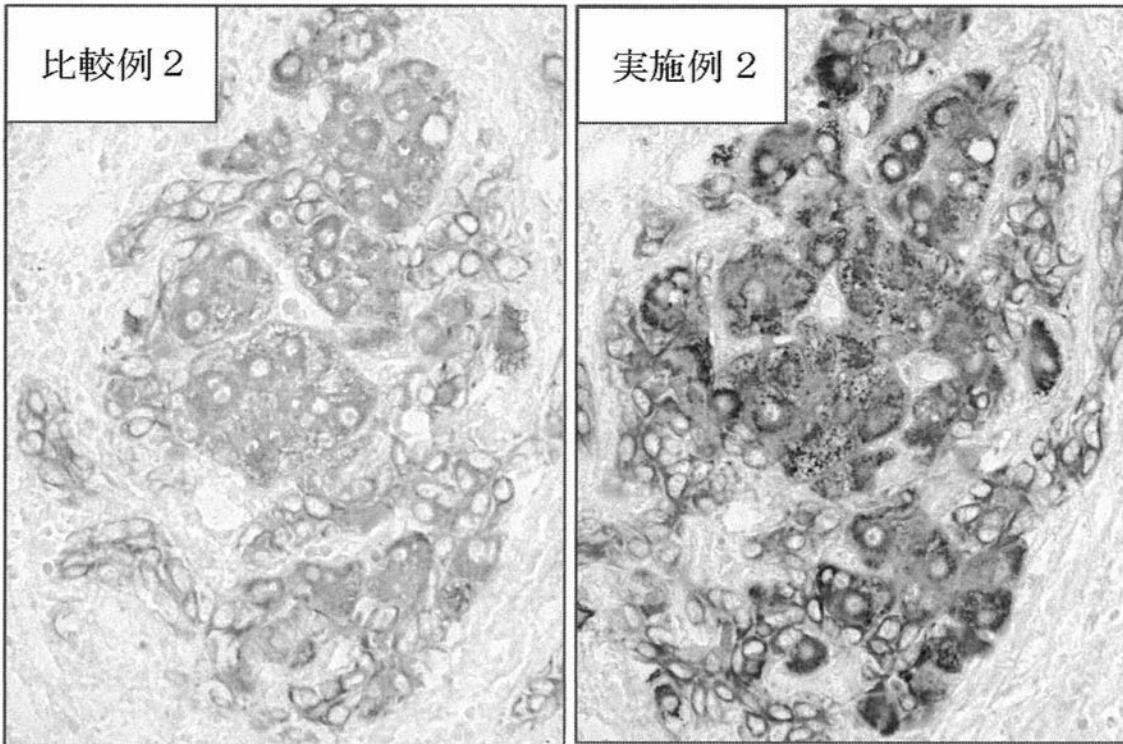
【 図 5 】



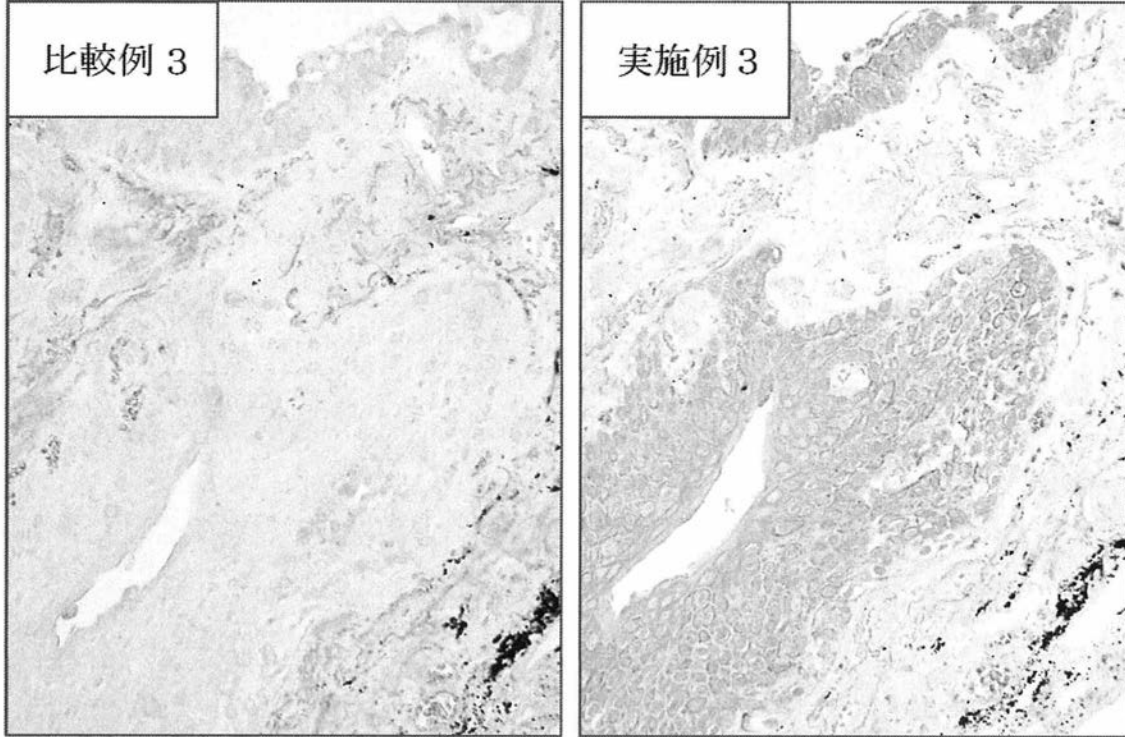
【 図 6 】



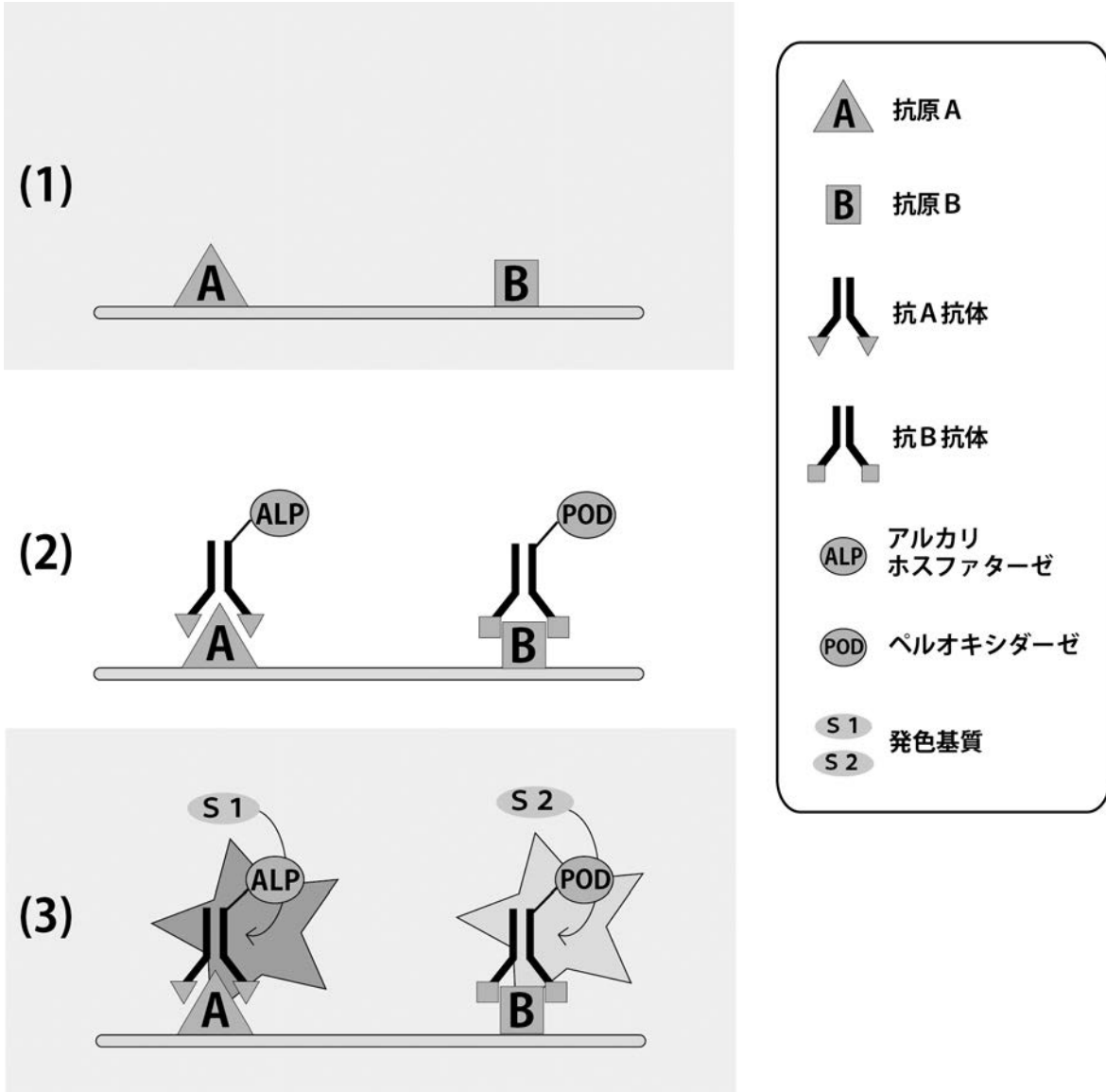
【 図 7 】



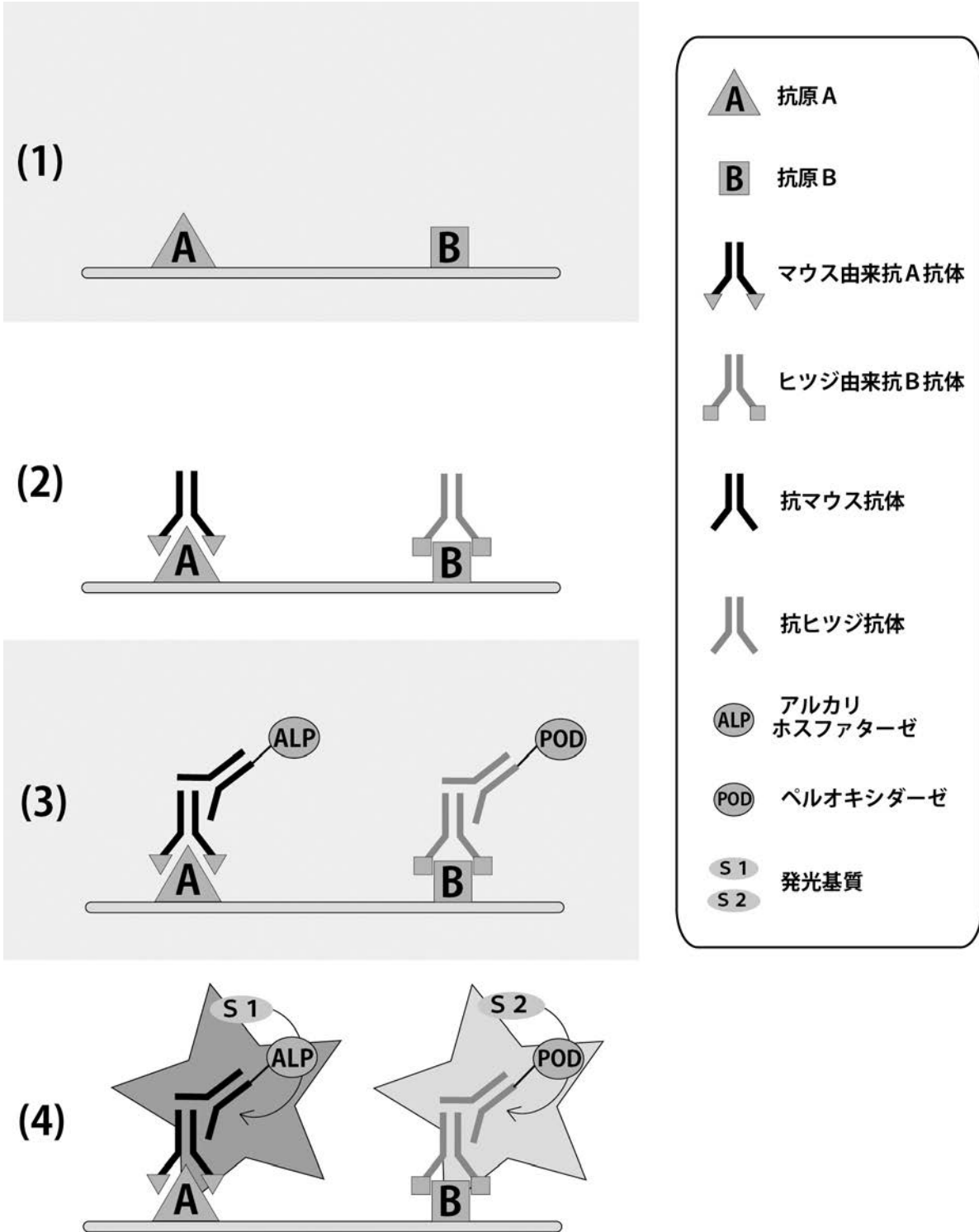
【 図 8 】



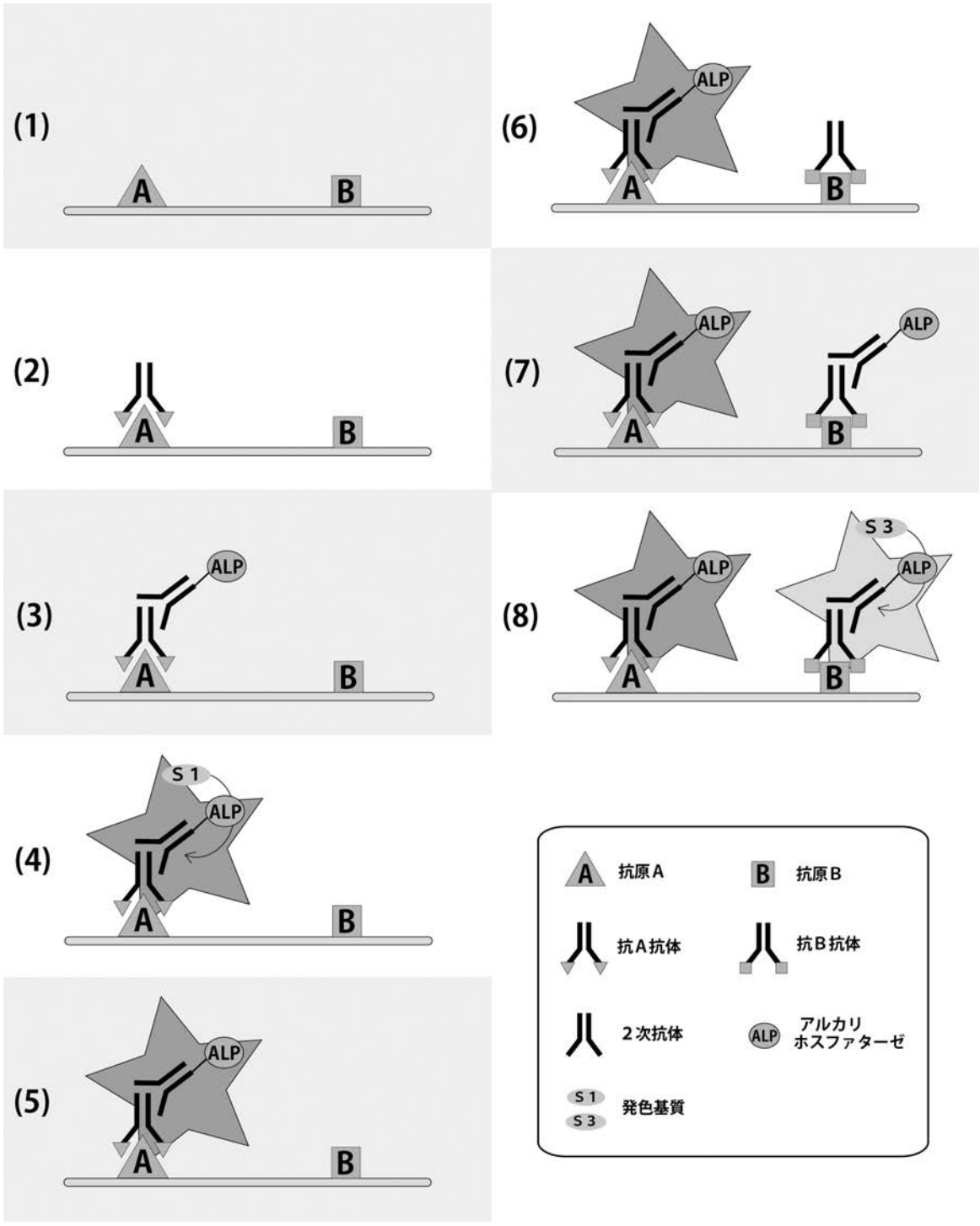
【 図 9 】



【図 10】



【 図 1 1 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 柳田 絵美衣  
兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内
- (72)発明者 伊藤 智雄  
兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1 国立大学法人神戸大学内
- (72)発明者 赤上 陽一  
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内
- (72)発明者 中村 竜太  
秋田県秋田市新屋町字砂奴寄4番11 秋田県産業技術センター内
- (72)発明者 南谷 佳弘  
秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学法人秋田大学 本道キャンパス内
- (72)発明者 南條 博  
秋田県秋田市本道一丁目1の1 国立大学法人秋田大学 本道キャンパス内
- Fターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FB03 FB11 GC12

专利名称(译)	快速灵敏的多重免疫染色方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2015219109A</a>	公开(公告)日	2015-12-07
申请号	JP2014102883	申请日	2014-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学 秋田县 国立大学法人秋田大学		
申请(专利权)人(译)	国立大学法人神戸大学 秋田县 国立大学法人秋田大学		
[标]发明人	柳田絵美衣 伊藤智雄 赤上陽一 中村竜太 南谷佳弘 南條博		
发明人	柳田 絵美衣 伊藤 智雄 赤上 陽一 中村 竜太 南谷 佳弘 南條 博		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/537		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/536.C G01N33/537		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/GC12		
其他公开文献	JP6421369B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

<b>摘要(译)</b> 本発明の目的は、開発一種具有提高的检测灵敏度和高再现性的多重免疫染色方法。在使用多种类型的抗体来检测样本中的多种抗原的多重免疫染色方法中，在样本上形成包含该抗体的抗体溶液的液滴，并对液滴施加变化的电场。用于加速抗原与抗体结合的抗原-抗体反应，从而提供了多种免疫染色方法。[选型图]图1	(21) 出願番号 (22) 出願日	特願2014-102883 (P2014-102883) 平成26年5月16日 (2014.5.16)	(71) 出願人 504150450 国立大学法人神戸大学 兵庫県神戸市灘区六甲台町1-1
	特許法第30条第2項適用申請有り 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会発行、「第63回日本医学検査学会講演予稿集」を収録したCD-ROM、平成26年4月10日発行 (刊行物等) 掲載年月日 平成26年3月24日 掲載アドレス <a href="https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/">https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/</a> 掲載アドレス <a href="https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/timetable/timetable17pm.html#speaker17_toki09">https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/timetable/timetable17pm.html#speaker17_toki09</a> 掲載アドレス <a href="https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/pdf/0342.pdf">https://jamtjamtis.jamt.or.jp/Jamt63/pdf/0342.pdf</a>	(71) 出願人 591108178 秋田県 秋田県秋田市山王4丁目1番1号	(71) 出願人 504409543 国立大学法人秋田大学 秋田県秋田市手形学園町1番1号
			(74) 代理人 100149168 弁理士 若山 俊輔