

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B1)

(11) 特許番号

特許第5696300号
(P5696300)

(45) 発行日 平成27年4月8日(2015.4.8)

(24) 登録日 平成27年2月20日(2015.2.20)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 1/38	(2006.01)	GO 1 N 1/28	Y
GO 1 N 1/30	(2006.01)	GO 1 N 1/30	
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	P

請求項の数 6 (全 34 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2014-30179 (P2014-30179)</p> <p>(22) 出願日 平成26年2月20日(2014.2.20)</p> <p>審査請求日 平成26年3月25日(2014.3.25)</p> <p>(出願人による申告)平成25年度、課題解決型医療機器等開発事業「自動化による術中高速組織診断のための新型免疫組織染色装置の開発」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 591108178 秋田県 秋田県秋田市山王4丁目1番1号</p> <p>(73) 特許権者 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</p> <p>(74) 代理人 100082669 弁理士 福田 賢三</p> <p>(74) 代理人 100095337 弁理士 福田 伸一</p> <p>(74) 代理人 100095061 弁理士 加藤 恭介</p> <p>(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</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
--	--

(54) 【発明の名称】 自動電界免疫組織染色装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

所定の抗体を用い、被験対象となる組織標本中の抗原を検出する免疫組織染色を構成する一連の反応が、電界付与に基づく攪拌現象によって迅速化され、かつ自動化される自動電界免疫組織染色装置であって、

前記組織標本が固定された基板が載置されるステージを有する試料載置ユニットと、
前記抗体を含んだ溶液が収容される収容部及び、前記収容部から前記溶液を前記基板上の前記組織標本へ向けて滴下する滴下部材を備える溶液供給ユニットと、

前記基板に滴下された溶液を攪拌するための相対する電極の一方である環状電極を備えた電界攪拌ユニットと、

前記電界攪拌ユニットの上部に設けられ、前記基板上的前記組織標本へ向けて滴下された前記溶液及び前記組織標本を洗浄する洗浄液を排出する排出管と、洗浄液を供給する供給管とを備え、前記組織標本へ滴下された前記溶液を排出した後前記組織標本への前記洗浄液の供給及びその排出により前記組織標本を洗浄する洗浄ユニットと、

前記抗体を含んだ溶液を前記基板に滴下するときには前記試料載置ユニットを前記溶液供給ユニットへ搬送し、前記基板に滴下された溶液を攪拌及び前記組織標本を洗浄するときには前記試料載置ユニットを前記電界攪拌ユニットへ搬送するためのステージ搬送部と

を有し、

前記洗浄ユニットは、前記組織標本へ滴下された前記溶液と前記組織標本へ供給された

前記洗浄液とを排出するとき又は前記洗浄液を前記組織標本へ供給するときには、前記排出管又は前記供給管を前記環状電極の貫通穴にそれぞれ挿入して行うことを特徴とする自動電界免疫組織染色装置。

【請求項 2】

前記溶液供給ユニットはカセット体を備え、前記収納部及び前記滴下部材は前記カセット体に出し入れ可能に収納されていることを特徴とする請求項 1 に記載の自動電界免疫組織染色装置。

【請求項 3】

前記基板に滴下された溶液を攪拌するための他方の電極が、前記ステージの内部に配設されていることを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 に記載の自動電界免疫組織染色装置。

10

【請求項 4】

前記組織標本へ向けて前記溶液を滴下するときには前記試料載置ユニットが前記ステージ搬送部によって前記溶液供給ユニットへ搬送され、前記試料載置ユニットに載置された前記組織標本が固定された前記基板が前記溶液供給ユニットの前記収納部の直下に位置したときに、前記溶液供給ユニットは前記組織標本に対して前記溶液を滴下することを特徴とする請求項 1 乃至請求項 3 の何れか 1 項に記載の自動電界免疫組織染色装置。

【請求項 5】

前記基板に滴下された溶液を攪拌するときには前記試料載置ユニットが前記ステージ搬送部によって前記電界攪拌ユニットへ搬送され、前記試料載置ユニットに載置された前記組織標本が固定された前記基板が前記電界攪拌ユニットの前記環状電極の直下に位置したときに、前記組織標本に滴下された前記溶液に対して電界が与えられ、前記溶液が攪拌されることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 4 の何れか 1 項に記載の自動電界免疫組織染色装置。

20

【請求項 6】

前記環状電極は、前記貫通穴の中心点を通るように直線状の凹部が設けられていることを特徴とする請求項 1 乃至請求項 5 の何れか 1 項に記載の自動電界免疫組織染色装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、例えば、外科手術や内視鏡手術時の限られた時間内に、被験対象となる組織標本（病変部）の性質を特定する術中迅速病理診断に利用することが可能な自動電界免疫組織染色装置及び、自動電界免疫組織染色方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

物理的な現象として、高電圧交流電界によってクーロン力が発生し、このクーロン力で液滴が一方向に吸引されることが知られる。与える高電圧の極性変化によって液滴が振動することも知られる。液滴が吸引され、振動すれば、液滴内に存在する微細物は攪拌されることになる。本発明者らは、これらの物理的な現象に着目し、高電圧交流電界を与えることで、1 mL 以下、特に 50 から数 100 μ L オーダーの微少量の液滴を非接触に攪拌する技術をこれまでに開発してきた。特に、この技術を、抗体を含んだ液滴に適用すれば、抗体が液滴内で攪拌され積極的に分散されることになると考えられる。本発明者らは、下記特許文献 1 において、例えば、ELISA における抗原定着工程、ブロッキング工程、抗原抗体反応工程、発色反応工程の各工程の所要時間を著しく短縮した非接触攪拌技術（以下、「電界攪拌技術」とも称する。）を提案している。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】特開 2010 - 119388 号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

50

【 0 0 0 4 】

ここで、外科手術や内視鏡手術時の限られた時間内に病変部の性質を特定する術中迅速病理診断には、その時間の制約から、5分以内に染色可能なH E染色(ヘマトキシリン・エオジン染色)が用いられているのが現状である。しかし、H E染色は、単に細胞や組織構造の全体像を把握しやすくするための染色法であるので、小さながん遺残やリンパ節微小転移が見逃されることも多いという問題がある。一方、がん遺残やリンパ節転移を可能な限り見逃さないようにするには、病原となるタンパク質(抗原)の有無により判断可能な抗原抗体反応を利用した免疫組織染色を術中迅速病理診断として採用することが有効である。しかし、従来の免疫組織染色の所要時間は2時間以上とされ、40分以内に診断を完了することが求められる術中迅速病理診断に適さないという問題があった。

10

【 0 0 0 5 】

なお、約30分で遺伝子増幅するOSNA法を利用したリンパ節転移診断機器が市販されているが、同法による転移診断は形態学的な情報が欠如するため、信頼性に欠ける。自動免疫組織染色装置も市販されているが、これらは大量の免疫組織染色を一度に処理する目的で開発され、最短でも90分を要するために術中迅速病理診断に不適である。

【 0 0 0 6 】

また、仮に、免疫組織染色による術中迅速病理診断が可能となれば、これをより広く普及させる必要がある。普及を進めていくには、診断に関わる試料を簡便に作成できるようにすること、処理工程を高精度化すること、市販のスライドガラス上ですべてを処理することができ、取扱いを容易化すること等が望まれる。すなわち、迅速化とともに、人手をかけないで免疫組織染色を進めるための自動化が求められることになる。したがって、一次抗体と抗原との抗原抗体反応や、二次抗体と一次抗体との抗原抗体反応等の反応工程をはじめ、反応工程の前後に行われる洗浄工程を含めて迅速化及び自動化していく必要がある。洗浄工程は従来、手作業でされるために人手を要していた。

20

【 0 0 0 7 】

本発明は、上記実情に鑑み提案され、上記特許文献1で提案したような高電圧交流電界を被験対象に与え、被験対象を非接触な攪拌技術で自動化を進めて構築した自動電界免疫組織染色装置及び、自動電界免疫組織染色方法を提供することを目的とする。特に、本発明は、免疫組織染色に費やす所要時間を著しく短縮し、反応時(攪拌時)に試料温度を上昇させず、かつ、抗体と抗原との抗原抗体反応や、その前後に必要なとされる洗浄に係る工程の完全自動化を目的とした。

30

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

上記目的を達成するため、本発明は、所定の抗体を用い、被験対象となる組織標本中の抗原を検出する免疫組織染色を構成する一連の反応が、電界付与に基づく攪拌現象によって迅速化され、かつ自動化される自動電界免疫組織染色装置であって、前記組織標本が固定された基板が載置されるステージを有する試料載置ユニットと、前記抗体を含んだ溶液が収容される収容部及び、前記収容部から前記溶液を前記基板上の前記組織標本へ向けて滴下する滴下部材を備える溶液供給ユニットと、板状又は環状の一方の電極を備えた電界攪拌ユニットと、前記基板上の前記組織標本へ向けて滴下された前記溶液を排出する排出管を備えた洗浄ユニットとを有することを特徴とする。

40

【 0 0 0 9 】

前記自動電界免疫組織染色装置において、前記試料載置ユニットが、前後又は左右に搬送可能であることが好ましい。

前記試料載置ユニットに、他方の電極が配設されていることが好ましい。

前記他方の電極が、前後又は左右に搬送可能であることが好ましい。

前記他方の電極が、前記ステージの内部に配設されていることが好ましい。

前記収容部が、カセット体に備えられていることが好ましい。

前記一方の電極が、貫通穴を有していることが好ましい。

前記排出管が、前記一方の電極の前記貫通穴に出し入れ可能であることが好ましい。

50

前記試料載置ユニットが搬送され、前記溶液供給ユニットの前記収容部の直下に前記組織標本が固定された基板が位置したときに、前記組織標本に対して前記溶液が滴下されることが好ましい。

前記試料載置ユニットが搬送され、前記電界攪拌ユニットの前記一方の電極の直下に前記組織標本が固定された基板が、前記溶液が滴下された上で位置したときに、前記組織標本に滴下された前記溶液に対して電界が与えられ、前記溶液が攪拌されて前記反応が進められることが好ましい。

前記反応が進められた前記組織標本に対し、前記洗浄ユニットの前記排出管により前記溶液が排出されることが好ましい。

前記洗浄ユニットが、前記基板上の前記組織標本へ向けて前記組織標本を洗浄する洗浄液を供給する供給管を備え、前記反応が進められた前記組織標本に対し、前記供給管により前記洗浄液が供給されることが好ましい。

前記供給管が、前記一方の電極の前記貫通穴に出し入れ可能であることが好ましい。

前記基板に、区分される複数の領域が形成され、この領域毎に前記組織標本が載置可能であり、前記一方の電極及び前記他方の電極が、前記領域に対応させて複数設けられていることが好ましい。

前記基板に、前記抗原と前記抗体との抗原抗体反応が進行したかどうかの指標となる陽性コントロール又は陰性コントロールが固定されていることが好ましい。

【0010】

このほか、前記一方の電極に、前記貫通穴を中心点として対称に突部が形成されていることが好ましい。なお、前記自動電界免疫組織染色装置は、前記試料載置ユニットが搬送され、前記電界攪拌ユニットの前記一方の電極の直下に前記組織標本が固定された基板が位置したときに、前記組織標本に対して電界が与えられて前記抗原が賦活化される作用を備えることが好ましい。

【0011】

また、本発明は、前記自動電界免疫組織染色装置を用いて行われる自動電界免疫組織染色方法であって、前記組織標本へ向けて、前記抗原と反応する一次抗体を含む第一の溶液を滴下し、この第一の溶液に対して電界を与えて前記第一の溶液を攪拌し、前記抗原と前記一次抗体との抗原抗体反応を進める工程を含むことを特徴とする。

特に、前記自動電界免疫組織染色方法において、前記抗原と前記一次抗体との抗原抗体反応の後に、前記第一の溶液を吸引して排出する工程を含むことが好ましい。

前記第一の溶液を吸引して排出した後、前記組織標本へ向けて、前記一次抗体と反応する二次抗体を含む第二の溶液を滴下し、この第二の溶液に対して電界を与えて前記第二の溶液を攪拌し、前記一次抗体と前記二次抗体との抗原抗体反応を進める工程を含むことが好ましい。

前記一次抗体と前記二次抗体との抗原抗体反応の後に、前記第二の溶液を吸引して排出する工程を含むことが好ましい。

前記抗原と前記一次抗体との抗原抗体反応を進めることから前記第二の溶液を吸引して排出することまでを自動化することが好ましい。

【0012】

前記自動電界免疫組織染色方法は、前記洗浄ユニットが、前記基板上の前記組織標本へ向けて前記組織標本を洗浄する洗浄液を供給する供給管を備え、前記第一の溶液を吸引して排出した後であって、前記一次抗体と前記二次抗体との抗原抗体反応を進める前に、前記組織標本へ向けて前記供給管により前記洗浄液を供給し、この洗浄液に対して電界を与えて前記洗浄液を攪拌し、前記組織標本を洗浄し、前記第二の溶液を吸引して排出した後、前記組織標本へ向けて前記供給管により前記洗浄液を供給し、この洗浄液に対して電界を与えて前記洗浄液を攪拌し、前記組織標本を洗浄することが好ましい。

また、前記一方の電極が、貫通穴を有し、前記供給管が、前記一方の電極の前記貫通穴に出し入れ可能であることが好ましい。

前記基板に、区分される複数の領域が形成され、この領域毎に前記組織標本が載置可能

10

20

30

40

50

であり、前記一方の電極及び前記他方の電極が、前記領域に対応させて複数設けられていることが好ましい。

前記基板に、前記抗原と前記抗体との抗原抗体反応が進行したかどうかの指標となる陽性コントロール又は陰性コントロールが固定されていることが好ましい。

なお、前記自動電界免疫組織染色方法は、前記一方の電極及び前記他方の電極の間に、前記組織標本が固定された基板を載置し、前記組織標本に対して電界を与え、前記抗原を賦活化する工程を備えるが好ましい。この場合、本発明において、抗原を賦活化することから第二の溶液を吸引して排出することまでを自動化することができる。

【発明の効果】

【0013】

本発明は、組織標本が固定された基板が載置される試料載置ユニット、組織標本へ向けて抗体を含んだ溶液を滴下する溶液供給ユニット、一方の電極を有して、組織標本に滴下された溶液へ向けて電界を与える電界攪拌ユニットを有している。これらのユニットが連携して動作することで、抗体等の溶液を滴下し、抗原抗体反応を進めて免疫組織染色を構成する一連の反応を自動化することができる。さらに、組織標本へ向けて滴下された抗体等の溶液を排出する排出管を備えた洗浄ユニットを有し、抗体等の溶液の排出も自動的に進めることができる。本発明では、これらの構成により、免疫組織染色を構成する一連の反応の迅速化及び、自動化に成功している。したがって、時間の制約に厳しさのある術中迅速病理診断に適用可能な自動電界免疫組織染色装置及び、自動電界免疫組織染色方法を提供することができる。

【0014】

特に、電界攪拌ユニットに、組織標本を洗浄する洗浄液を供給する供給管を備えさせ、組織標本に対して供給管により洗浄液を供給する構成とすれば、抗原抗体反応の前後に必要な洗浄プロセスまでを迅速化し、自動化することができる。また、確実な免疫組織染色を進めることができる。そうすると、時間の制約に厳しさのある術中迅速病理診断に確実に適用することのできる自動電界免疫組織染色装置及び、自動電界免疫組織染色方法として提供することができる。

【0015】

さらに、基板に区分される複数の領域を形成し、この領域毎に組織標本を載置可能とし、併せて一方の電極及び他方の電極が、上記領域に対応するように複数設けられている構成にとすれば、複数の組織標本を同時に免疫組織染色することができる。基板に、抗原と抗体との抗原抗体反応が進行したかどうかの指標となる陽性コントロール又は陰性コントロールが固定されている構成とすれば、免疫組織染色のロット毎の妥当性、確実性を保証することが可能になる。一方の電極及び他方の電極の間に、組織標本が固定された基板を載置し、組織標本に対して電界を与えて抗原を賦活化する構成によって、免疫組織染色で染色される抗原の割合が向上する。したがって、本発明に係る自動電界免疫組織染色装置の品質及び、自動電界免疫組織染色方法の質を向上させることができる。

【0016】

なお、一方の電極に、貫通孔を中心点として対称に突部が形成されている構成とすることで電界分布のバランスが崩れるので、組織標本上に滴下された溶液の局所へ向けて電界を集中させて与えることができる。これにより、滴下する溶液の液量を減らして液滴の高さを減じ、抗体と組織標本中の抗原との接触機会を増やすことができる。さらに、一の電極と他の電極との電極間距離を短くすること、電界強度を高めること等によっても抗体と組織標本中の抗原との接触機会を増やすことができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明に係る自動免疫組織染色装置の全体を概略で示す概略斜視図である。

【図2】自動免疫組織染色装置を構成する試料載置ユニットの概略側面図である。

【図3】自動免疫組織染色装置を構成する溶液供給ユニットの要部を示す概略斜視図と、溶液供給ユニットを構成するシリンダ及びプランジャロッドの説明図である。

10

20

30

40

50

【図4】自動免疫組織染色装置を構成する電界攪拌ユニットの概略側面図である。

【図5】自動免疫組織染色装置を構成する洗浄ユニットの要部を示す概略斜視図である。

【図6】自動免疫組織染色装置において試料載置ユニットと溶液供給ユニットとが連係して動作し、組織標本に対して溶液が供給される様子を説明する説明図である。

【図7】自動免疫組織染色装置において試料載置ユニットと電界攪拌ユニットとが連係して動作し、溶液が攪拌される様子を説明する説明図である。

【図8】自動免疫組織染色装置に採用された非接触攪拌技術を模式的に説明する説明図である。

【図9】自動免疫組織染色装置に採用された非接触攪拌技術を適用しても、液温が上昇しないでほぼ一定であることを説明するグラフである。

【図10】抗体の分散性向上をゼータ電位の変化で説明する説明図である。

【図11】自動免疫組織染色装置において抗原と一次抗体との抗原抗体反応前に、組織標本に対して電界を与えることで、電界を与えない場合に比べて免疫組織染色で染色される割合が向上したことを説明する説明図である。

【図12】自動免疫組織染色装置において試料載置ユニットと電界攪拌ユニットと洗浄ユニットとが連係して動作し、組織標本が洗浄される様子を説明する説明図である。

【図13】(a)は、電界攪拌ユニットにおける上部電極の他の例である電界集中型電極を拡大して示す拡大図、(b)は、電界集中型電極を用いた際の液滴の流れを、矢印を用いて模式的に説明する説明図である。

【図14】試料載置ユニットに載置される基板上に形成された2穴タイプのはっ水リングを説明する説明図である。

【図15】(a)は、比較例4のプロトコールから得られた免疫組織染色の結果を示す顕微鏡写真、(b)は、実施例1で得られた免疫組織染色の結果を示す顕微鏡写真である。

【図16】(a)は、実施例2で得られた免疫組織染色の結果を示す顕微鏡写真、(b)は、比較例5で得られた免疫組織染色の結果を示す顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明に係る自動電界免疫組織染色装置並びに、当該装置を用いて行う自動電界免疫組織染色方法についての一実施形態を、図面を参照しつつ詳述していく。この実施形態は、本発明の構成を具現化した例示に過ぎない。本発明は、特許請求の範囲に記載した事項を逸脱することがなければ、種々の設計変更を行うことができる。

【0019】

なお、本発明に係る自動電界免疫組織染色装置により、所定の抗体を用いて被験対象となる組織標本中の抗原を検出する免疫組織染色に関する一連の反応が、電界付与に基づく攪拌現象によって迅速化され、かつ、この一連の反応のほとんどが自動化される。したがって、本発明は、免疫組織染色を時間的な制約がある術中迅速病理診断に適用可能とする。また、抗体試薬を希釈、すなわち節約して免疫組織染色をすることが本発明に係る自動電界免疫組織染色装置を使えば可能となるので、免疫組織染色にかかる費用を抑えることができる。本発明は、凍結切片を用いた術中迅速診断、パラフィン切片を用いた免疫組織染色診断に適用可能であるほか、核酸のハイブリダイゼーション、その他の抗原抗体反応等の迅速化、自動化に貢献することもできる。

【0020】

本発明に係る自動電界免疫組織染色装置1は、図1に示すように、その筐体に、試料載置ユニット2、溶液供給ユニット3、電界攪拌ユニット4及び洗浄ユニット5を有している。また、その筐体には、ステージ21を各ユニット(溶液供給ユニット3、電界攪拌ユニット4及び洗浄ユニット5)に搬送するステージ搬送部23、カセット搬送部35、上部電極搬送部42、洗浄管搬送部53が備えられている。各搬送部の動力源として、モーター等の公知の動力源を採用することができる。

【0021】

自動電界免疫組織染色装置1は、試料載置ユニット2、溶液供給ユニット3、電界攪拌

10

20

30

40

50

ユニット4及び洗浄ユニット5が相互に連係して動作することにより、各種の作用を及ぼすことができる。具体的には、試料載置ユニット2と電界攪拌ユニット4とが動作し、組織標本中の抗原が賦活化される。試料載置ユニット2と溶液供給ユニット3とが動作し、組織標本に対して所定の抗体を含む溶液等が供給される。試料載置ユニット2と電界攪拌ユニット4とが動作し、所定の抗体を含む溶液が供給された組織標本に対し、抗原抗体反応が進められる。試料載置ユニット2、電界攪拌ユニット4及び洗浄ユニット5が動作し、所定の抗体を含む溶液等を排出したり、洗浄液を供給したりすることにより、組織標本が洗浄される。なお、本発明において抗原が賦活化されるとは、抗原抗体反応が進められる前の組織標本に対して電界が与えられることで、組織標本中の抗原の抗体に対する反応性が高まることをいう。

10

【0022】

図1及び図2に示すように、試料載置ユニット2は、組織標本Tが固定された基板としてのガラス基板Gが載置される載置部21Aを有し、この載置部21Aを前後又は左右又は上下に搬送可能なステージ21を備えている。このステージ21の内部に、載置部21Aに近接させて、他方の電極である下部電極22が配設されている。また、試料載置ユニット2は、ステージ21が前後又は左右に搬送されるようにステージ搬送部23に取り付けられて構成されている。組織標本Tが固定される基板として、ガラス製の基板ほか、プラスチック製の基板を採用することができる。

【0023】

ステージ21を備える試料載置ユニット2は、ステージ搬送部23により、溶液供給ユニット3、電界攪拌ユニット4及び洗浄ユニット5に向けてそれぞれに搬送される。ステージ21は中央部がへこんで形成され、このへこんだ領域が載置部21Aとなる。ガラス基板Gは、ステージ21の載置部21Aがへこんでいるので、載置部21Aに確実に收容される。また、下部電極22には、電導性の高い銅、アルミ合金、ステンレス、透明電極である酸化インジウムスズ(ITO)等をはじめとする公知の電極材料を採用することができる。下部電極22の厚みは4~10mmであることが、安定的な電界形成の観点から望ましい。その形状は、後述する一方の電極としての上部電極との間で電界を形成することができれば、板状、円盤状、棒状等、各種の形状を採用することができる。

20

【0024】

ガラス基板Gには、固定されている組織標本Tを囲むように、耐アセトン性を有し、電界分布に影響を与えない樹脂からその枠が形成されているリング状で撥水性のはっ水リング24が配設されている(図12も参照のこと)。はっ水リング24の枠により、溶液供給ユニット3から滴下されてくる溶液が組織標本T上で、液滴としてドーム形状を形成することになる。はっ水リング24の材質は、例えば、ポリビニル系、ポリ塩化ビニル系、シリコン系又はフッ素系から1つ選ばれる。なお、図1には2つのリングが形成された枠からなる2穴タイプのはっ水リング24Aが現れている。

30

【0025】

ここで、はっ水リング24に滴下された溶液は、その樹脂部分である枠によって組織標本T上で45度以下の接触角となるドーム形状を形成する。これにより、その液滴底面の径寸法のばらつきが抑制されるととともに、滴下される液量に応じて最大高さ(頂点位置)が一定となる。このため、ドーム形状を形成している溶液の頂点位置と、電極(下部電極22又は上部電極41)との間の距離のばらつきが抑制され、その結果、電界を与えて溶液を攪拌する際の、攪拌の度合いのばらつきも抑制される。すなわち、再現性に優れた高い品位の攪拌を実現することができる。

40

【0026】

そして、自動電界免疫組織染色装置1では、溶液の頂点位置と、電極との間の距離をロット毎に調整する調整機構、与える電界強度をロット毎に調整する調整機構及び、滴下された溶液の高さをセンシングする機構を不要とし、その構成を簡略化することができる。

【0027】

本発明では、上述したはっ水リング24に限定されないで、固定されている組織標本T

50

を囲むように何らかの撥水性の枠を、ガラス基板 G に載置してもよい。また、撥水機能を備えたインクを使ってガラス基板 G に円や矩形を描画することも可能である。ガラス基板 G に固定されている組織標本 T を囲むように撥水処理剤を塗布し、ガラス基板 G 上に撥水性を有する部位を形成してもよい。

【 0 0 2 8 】

ガラス基板 G は、例えば、幅 26 mm、長さ 76 mm、厚み 0.8 mm の大きさのスライドガラスを用いることができる。はっ水リング 24 は、内径が 10 mm ~ 20 mm であり、枠を形成している樹脂部分の幅は、45 度以下の接触角のドーム形状を溶液に形成させるために、0.5 mm ~ 3 mm、好ましくは 2 mm ~ 3 mm とする。はっ水リング 24 の厚みは 0.15 mm ~ 0.3 mm であることが好ましい。また、例えば、長方形の撥水の枠を採用することが可能であり、その滴下する溶液の液量は、3000 μ L 以下の範囲で許容される。ただし、滴下する溶液の液量は攪拌の均一性の面から、8 ~ 1000 μ L であることが好ましい。

10

【 0 0 2 9 】

図 1 及び図 3 に示すように、溶液供給ユニット 3 は、組織標本 T 中の抗原と反応する抗体として一次抗体を含む溶液 S 等が収容される収容部としてのシリンダ 31 を有するカセット体 32 を備えている。また、シリンダ 31 に出し入れ可能にして設けられ、シリンダ 31 から一次抗体を含む溶液 S 等をガラス基板 G 上の組織標本 T へ向けて滴下する滴下部材としてのプランジャロッド 33 を備えている。溶液供給ユニット 3 は、一次抗体を含む溶液 S 等の滴下時にプランジャロッド 33 を押圧するピストン 34 を備えている。カセット体 32 は、前後又は左右又は上下に搬送するカセット搬送部 35 に取り付けられている。

20

【 0 0 3 0 】

シリンダ 31 は、一次抗体を含む溶液 S 等が収容されやすくするために広口とされたフランジ部 31A と、溶液 S 等が収容される本体部 31B と、ガラス基板 G 上の組織標本 T へ向けて滴下するための誘導路となる筒先部 31C とからなる筒体である。カセット体 32 には、上下方向に貫通させた貫通孔が形成されている。この貫通孔は、シリンダ 31 に対応した形状で、シリンダ 31 を収容するためのシリンダ収容部 32A となる。プランジャロッド 33 は、ピストン 34 により押圧されることで溶液 S 等をガラス基板 G 上に滴下する。

30

【 0 0 3 1 】

本実施形態において、シリンダ 31 毎に、例えば、組織標本 T 中の抗原と反応する一次抗体を含む溶液 S のほか、一次抗体と反応する二次抗体を含む二次抗体溶液、免疫組織染色に必要な内因性ペルオキシダーゼ除去のためのブロッキング溶液、その他の試薬が収容される。また、溶液供給ユニット 3 では、カセット搬送部 35 によりカセット体 32 が搬送される際に、どのシリンダ 31 に備えられたプランジャロッド 33 がピストン 34 により押圧されるのかが決定される。すなわち、カセット搬送部 35 によりカセット体 32 が搬送される際に、どの種類の溶液がガラス基板 G 上の組織標本 T に向けて滴下されるのかが決定される。

【 0 0 3 2 】

図 1 及び図 4 に示すように、電界攪拌ユニット 4 は、本実施形態において貫通穴 41A (図 12 も参照のこと) を有する環状で、試料載置ユニット 2 の下部電極 22 と対をなす一方の電極としての上部電極 41 を備えている。また、電界攪拌ユニット 4 は、上部電極搬送部 42 に取り付けられて、前後又は左右又は上下に搬送される。上部電極 41 についても下部電極 22 と同様、導電性の高い銅、アルミ合金、ステンレス、透明電極である酸化インジウムスズ (ITO) 等をはじめとする公知の電極材料を採用することができる。その厚みは 4 ~ 10 mm であることが、安定的な電界形成の観点から好ましい。その形状は貫通孔が形成されれば、板状であってもよい。

40

【 0 0 3 3 】

図 1 及び図 5 に示すように、洗浄ユニット 5 は、ガラス基板 G 上の組織標本 T へ向けて

50

滴下された一次抗体を含む溶液 S 等を排出する排出管 5 1 及び、ガラス基板 G 上の組織標本 T へ向けて組織標本 T を洗浄する洗浄液を供給する供給管 5 2 を備えている。排出管 5 1 と供給管 5 2 とは、洗浄管搬送部 5 3 に取り付けられている。この洗浄管搬送部 5 3 によって排出管 5 1 と供給管 5 2 とは前後又は左右又は上下に搬送され、上部電極 4 1 の貫通穴 4 1 A に出し入れ可能である。また、図示が省略されているが、排出管 5 1 から外部へ溶液 S 等を排出する排出管接続チューブが排出管 5 1 に接続され、外部から供給管 5 2 へ洗浄液を供給する供給管接続チューブが供給管 5 2 に接続される。

【 0 0 3 4 】

なお、洗浄液として、免疫組織染色に用いられるものとして P B S (リン酸緩衝生理食塩水) を例示することができる。本発明では、P B S に限定されないで、免疫組織染色を有効に進めることが可能な各種の洗浄液を採用することができる。NaCl、KCl、NaHPO₄、KH₂PO₄ が配合された P B S でもよい。カルシウムやマグネシウムを含む組成の洗浄液を採用し得る。また、界面活性剤を含んだ洗浄液であってもよい。

10

【 0 0 3 5 】

本発明の自動電界免疫組織染色装置 1 では、図 6 に示すように、試料載置ユニット 2 が搬送され、溶液供給ユニット 3 の所定のシリンダ 3 1 の直下に組織標本 T が固定されたガラス基板 G が位置したときに、組織標本 T に対しシリンダ 3 1 に収容されている溶液が滴下される。例えば、組織標本 T に対し、一次抗体を含む溶液 S が滴下される。

【 0 0 3 6 】

まず、どの溶液 (一次抗体を含む溶液 S、一次抗体と反応する二次抗体を含む二次抗体溶液、内因性ペルオキシダーゼ除去のためのブロッキング溶液、その他の試薬) がガラス基板 G 上の組織標本 T に向けて滴下されるのが決定される。その上で、決定された溶液 (図 6 において、一次抗体を含む溶液 S) が収容されているシリンダ 3 1 に備わるプランジャロッド 3 3 の直上にピストン 3 4 が位置するように、カセット搬送部 3 5 によりカセット体 3 2 が搬送される。同時に、組織標本 T が固定されているガラス基板 G が載置されたステージ 2 1 が、決定された溶液である一次抗体を含む溶液 S が収容されているシリンダ 3 1 の直下の位置までステージ搬送部 2 3 により搬送される。

20

【 0 0 3 7 】

次に、一次抗体を含む溶液 S を収容しているシリンダ 3 1 に備えられたプランジャロッド 3 3 がピストン 3 4 により押圧される。これにより、シリンダ 3 1 の筒先部 3 1 C を通じ、一次抗体を含む溶液 S が、組織標本 T が固定されているガラス基板 G 上に滴下される。ピストン 3 4 により押圧され、滴下される一次抗体を含む溶液 S の 1 回の滴下液量は、5 ~ 6 0 0 μ L である。

30

【 0 0 3 8 】

なお、組織標本 T が固定されているガラス基板 G 上に滴下されるのが、一次抗体を含む溶液 S のほかに、上述した二次抗体溶液、ブロッキング溶液又はその他の試薬のいずれかが滴下される場合がある。この場合にも、上述した試料載置ユニット 2 と溶液供給ユニット 3 とが連係した同様な動作により、その選択された溶液が、組織標本 T が固定されているガラス基板 G 上に滴下される。二次抗体溶液の 1 回の滴下液量は 5 ~ 6 0 0 μ L とすればよい。内因性ペルオキシダーゼ除去のためのブロッキング溶液の 1 回の滴下液量は 5 ~ 1 0 0 0 μ L が好ましい。

40

【 0 0 3 9 】

本発明では、図 7 に示すように、試料載置ユニット 2 と電界攪拌ユニット 4 とが連係して動作することにより、一次抗体を含む溶液 S 等が供給された組織標本 T に対して抗原抗体反応が進められる。また、組織標本 T 中の抗原が賦活化される。

【 0 0 4 0 】

まず、組織標本 T へ向けて溶液 (図 7 において、一次抗体を含む溶液 S) が滴下されたガラス基板 G を載置するステージ 2 1 がステージ搬送部 2 3 により、電界攪拌ユニット 4 の上部電極 4 1 の直下の位置まで搬送される。その上で、組織標本 T に対し、上部電極 4 1 及び試料載置ユニット 2 の下部電極 2 2 の間に電界が与えられ、一次抗体を含む溶液 S

50

の攪拌によって、一次抗体を含む溶液S中の一次抗体と組織標本T中の抗原との抗原抗体反応が進められる。

【0041】

具体的には、湿度 $60 \pm 20\%$ に制御された環境下で、印加電界強度の主電圧としてプラス側に $0.4 \sim 1.5 \text{ kV/mm}$ 、これにオフセット電界強度 $0.15 \sim 0.7 \text{ kV/mm}$ が加えられて生成されるプラス側に偏った繰り返しの方波の交流電界が与えられる。特に、与えられる交流電界として $0.1 \sim 300 \text{ Hz}$ の範囲から一次抗体を含む溶液Sが活発に攪拌される周波数が選択される。このような交流電界が上部電極41及び下部電極22の間に形成され、一次抗体を含む溶液Sが攪拌される。なお、上部電極41、下部電極22のどちらをプラス側としても良い。印加電界強度が、プラス側に 1.5 kV/mm より強いと放電する可能性があり、 0.4 kV/mm 未満より低いと攪拌が生じない可能性がある。オフセット電圧が、 1 kV/mm より強いと放電する可能性があり、 0.2 kV/mm より低いと生じない可能性がある。本発明では、一次抗体と組織標本T中の抗原との抗原抗体反応に必要な時間が従来に比べて大幅に短縮され、5～7分で済む。

10

【0042】

また、上部電極41及び下部電極22の間で電界が形成される際には、ガラス基板G上に滴下された溶液が、一次抗体を含む溶液Sのほかに、二次抗体溶液、ブロッキング溶液又はその他の試薬である場合がある。この場合にも、上述した試料載置ユニット2と電界攪拌ユニット4とが連係した動作によって溶液が攪拌される。したがって、一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応や非特異的反応を抑制するための反応等、免疫組織染色を構成する一連の反応を、電界付与に基づく攪拌によって迅速化することができる。

20

【0043】

ここで、自動電界免疫組織染色装置1における電界付与に基づく攪拌により、抗原抗体反応等が迅速化する仕組みを、図8を参照しつつ説明する。

【0044】

図8に示すように、上部電極41及び下部電極22の間に形成されている交流電界の波形が突状となる瞬間において、攪拌される溶液（例えば、一次抗体を含む溶液S）は、上部電極41に向けて吸引される（図8中のI参照）。また、交流電界の波形が凹状の（へこんだ）波形となる瞬間において、攪拌される溶液は、下部電極22に向けて吸引されてへこんだ形状となる（図8中のII参照）。さらに、攪拌される溶液は、その波形が突状に復帰する瞬間においてへこんだ形状が回復し（図8中のIII参照）、続いて、波形が突状となるのに伴って再び、上部電極41に向けて吸引される（図8中のIV参照）。このような攪拌により、溶液内でブラウン運動している粒子（一次抗体等）は、その運動速度が加速され、抗原と接触する機会が増えることとなる。その結果、抗原抗体反応が迅速化するのである。

30

【0045】

攪拌される溶液は、図9に示すように、選択される周波数が $0.1 \sim 300 \text{ Hz}$ の範囲と低周波であるので、温度上昇が起こりにくい。図9では、液量を $150 \mu\text{L}$ とし、上部電極41及び下部電極22の間の電極間距離を 5.4 mm とし、印加電圧を 3 kV とし、周波数をそれぞれ 21 Hz 、 91 Hz としたときの溶液の温度上昇を調べた結果を示している。したがって、自動電界免疫組織染色装置1を室温で使用する限り、タンパク質や組織の変性による非特異反応は生じ難い。また、図10において、自動電界免疫組織染色装置1を使って溶液に所定の印加強度で電界を与えることにより、攪拌が進行し分散性が向上していることを、攪拌によりゼータ電位がマイナス方向へシフトすることを利用して示した。なお、図10中の（図10において黒く塗りつぶされた三角形）で現される点は、公知の卓上ボルテックスミキサーにより任意の溶液を攪拌したときに示されたゼータ電位の値である。

40

【0046】

本発明では、図示を省略するものの、試料載置ユニット2と電界攪拌ユニット4とが連係して動作することで、電界攪拌ユニット4の上部電極41の直下に組織標本Tが固定さ

50

れたガラス基板Gが位置したときに、組織標本Tに対して電界が与えられ、組織標本T中の抗原が賦活化される。なお、抗原の賦活化は、ガラス基板Gに固定されている組織標本Tに対し、一次抗体を含む溶液S等を供給する前の段階で行われる。図11に示すように、抗原と一次抗体との抗原抗体反応前に、組織標本Tに対して電界を与えることで、電界を与えない場合に比べ免疫組織染色で染色される割合が向上し、抗原の反応性が高まる。図11において、電界を30秒～3分間与えて抗原を賦活化したサンプルは電界を与えないサンプルに比べ、免疫組織染色で染色される割合が10～30%程度向上している。

【0047】

自動電界免疫組織染色装置1で抗原が賦活化されるには、まず、組織標本Tが固定されているガラス基板Gを載置するステージ21がステージ搬送部23により、電界攪拌ユニット4の上部電極41の直下の位置まで搬送される。その上で、組織標本Tに対し、上部電極41及び試料載置ユニット2の下部電極22の間に電界が与えられ、組織標本T中の抗原が賦活化される。

10

【0048】

具体的には、印加電界強度の主電圧としてプラス側に0.4～2kV/mm、これにオフセット電界強度0.25～1kV/mmが加えられて生成されるプラス側に偏った繰り返し方形波の交流電界が与えられる。特に、与えられる交流電界として0.1～20Hzの範囲から抗原が活発に反応する適切な周波数が選択される。このような交流電界が、上部電極41及び下部電極22の間に形成される。なお、抗原を賦活化させる時間は30秒～3分とすることが好ましい。

20

【0049】

自動電界免疫組織染色装置1内では、抗原が賦活化される時、湿度60±20%の環境下に制御されている。また、上部電極41、下部電極22のどちらをプラス側としてもよい。

【0050】

本発明では、図12に示すように、試料載置ユニット2と電界攪拌ユニット4と洗浄ユニット5とが連係して動作し、ガラス基板G上の溶液(図12において、一次抗体を含む溶液S)が排出されたり、ガラス基板G上へ洗浄液が供給されたりすることで、組織標本Tが洗浄される。なお、この洗浄の間、組織標本Tが固定されているガラス基板Gが載置されたステージ21は、上部電極41の直下の位置に維持される。

30

【0051】

まず、抗原と一次抗体との抗原抗体反応が進んだ組織標本Tに対し、排出管51の管先が上部電極41の貫通穴41Aに出し入れされながら、ガラス基板G上の組織標本Tへ向けて滴下されている一次抗体を含む溶液Sが吸引され、排出される。これにより、組織標本T中の抗原と未反応の一次抗体がガラス基板G上から除去される。

【0052】

また、排出管51によって一次抗体を含む溶液Sが排出された組織標本Tに対し、供給管52の管先が上部電極41の貫通穴41Aに出し入れされながら、ガラス基板G上の組織標本Tへ向けて洗浄液が供給される。特に、供給管52を通じてガラス基板G上の組織標本Tへ向けて洗浄液が供給された後に、ガラス基板G上の洗浄液に対して電界が与えられ、洗浄液の攪拌によって組織標本Tが洗浄される。

40

【0053】

具体的には、印加電界強度の主電圧としてプラス側に0.4～1.5kV/mm、これにオフセット電界強度0.15～0.7kV/mmが加えられて生成されるプラス側に偏った繰り返し方形波の交流電界が与えられる。特に、与えられる交流電界として0.1～300Hzの範囲から洗浄液が活発に攪拌する適切な周波数が選択される。このような交流電界が、上部電極41及び下部電極22の間に形成されて洗浄液が攪拌されることとなる。印加電界強度が、プラス側に1.5kV/mmより強いと放電する可能性があり、0.4kV/mm未満より低いと攪拌が生じない可能性がある。また、オフセット電圧は、1kV/mmより強いと放電する可能性があり、0.2kV/mmより低いと生

50

じない可能性がある。供給する洗浄液の液量は1回の洗浄あたり、5～1000 μ Lが好ましい。洗浄液に交流電界が与えるときにも、上部電極41、下部電極22のどちらをプラス側としてもよい。

【0054】

組織標本Tを洗浄した後の洗浄液は、排出管51によって吸引され、排出されて、組織標本T中の抗原と未反応の一次抗体がガラス基板G上から除去される。これにより、従来の手作業による洗浄に比べて時間が短縮されるとともに、安定した洗浄によって染色のばらつきを抑制することができる。

【0055】

なお、ガラス基板G上に滴下される溶液が、一次抗体を含む溶液Sのほかに、二次抗体溶液、ブロッキング溶液又はその他の試薬である場合がある。この場合にも、上述した試料載置ユニット2と洗浄ユニット5が連係する同様な動作により、これらの溶液を除去するとともに洗浄液を供給し、ガラス基板G上の組織標本Tに対して適切な洗浄することができる。

10

【0056】

また、排出管51を使った溶液の排出、供給管52を使った洗浄液の供給は公知のポンプ等の装置を駆動させることにより達成することができる。このような組織標本Tに対する洗浄は、複数回繰り返すことができる。排出管51を使った溶液の排出、供給管52を使った洗浄液の供給を複数回、繰り返すことで染色のばらつきを確実に抑制することができる。排出管51と供給管52の本数及び配置は、特に限定するものではないが、上述したように1本ずつ設けるほか、供給管52を中央に設け、その周囲に排出管51を1本又は複数本設ける等の構成を例示することができる。

20

【0057】

本発明により、抗原の賦活化から、抗原と一次抗体との抗原抗体反応、PBS洗浄、内因性ペルオキシダーゼ除去、PBS洗浄、一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応、PBS洗浄までを自動化することができる。

【0058】

ここで、本発明に係る自動電界免疫組織染色装置を構成するにあたり、電界攪拌ユニットの一方の電極について、図13(a)に示すように、貫通穴を中心点として対称に突部を二箇所形成し、電界を局所的に集中させるようにした電界集中型上部電極410を採用してもよい。図13(b)に示すように、突部形状によって、上部電極及び下部電極の間に形成される電界の分布のバランスを崩すことで、形成した突部の数(二箇所)だけ溶液表面が吸引されることになるので、より大きな攪拌効果が得られる。さらに、攪拌時には水リング24の樹脂部分が防波堤のように機能することで溶液を内側へ跳ね返すため、溶液に乱流が生じ、攪拌がより活発化することになる。

30

【0059】

また、形成した突部の数(二箇所)だけ溶液表面が吸引されるため、吸引される溶液の高さが低くなり、溶液中の粒子(一次抗体等)と組織標本との接触頻度を増やすことができる。また、吸引される溶液の高さが低くなることにより、より電極間距離を狭くことができ、電界強度を高めることができ、やはり攪拌効果を大きくすることができる。攪拌効果が大きいことにより、抗原抗体反応に要する時間を短くすることもできる。

40

【0060】

この突部は、貫通穴を中心点として対称に2か所以上6か所以下形成されることが好ましい。貫通穴は内径が10mm未満であり、電界集中型上部電極の外径が22mm～30mmであることが好ましい。その他、電界集中型上部電極の厚みは突部と突部との間の凹み(へこみ)の深さをmmとしたときに、3mm+mmであることが好ましい。また、突部と突部との間の幅は、突部と突部との間の凹み(へこみ)の深さをmmとしたときに、1.5mmであることが好ましい。

【0061】

電界集中型上部電極410では、より大きな攪拌効果が得られるため、抗原抗体反応に

50

おける攪拌、洗浄時の攪拌において有利である。ただし、抗原を賦活化する際には、上述した上部電極 4 1 を使って電界を与えるのが好ましい。

【 0 0 6 2 】

また、本発明に係る自動電界免疫組織染色装置を構成するにあたり、基板に区分される複数の領域を形成し、この領域毎に組織標本を載置可能とすることで、複数の組織標本を一度に免疫組織染色することができる。具体的には、基板に設けるはっ水リングに関し、図 1 4 に示すように、滴下領域が 2 箇所、区分されて形成されるように、内径 2 0 mm のリングが 2 つ形成された枠を有する 2 穴タイプのはっ水リング 2 4 A を採用すればよい。これに対応し、自動電界免疫組織染色装置 1 では、図 1 に示すように、はっ水リング 2 4 A より形成された複数の領域に基づいて、それぞれ上部電極 4 1 及び下部電極 2 2 が 2 つずつ設けられている。さらに、供給管 5 2 及び排出管 5 1 も 2 つずつ設けられている。

10

【 0 0 6 3 】

また、図 1 4 に示すように、ガラス基板 G に設けたはっ水リング 2 4 A の内側に、溶液（例えば、一次抗体を含む溶液 S）が攪拌されたか否かが視認可能な陽性コントロール P C 又は陰性コントロール N C を固定することもできる。陽性コントロール P C は攪拌されると発色し、陰性コントロール N C は攪拌されると非発色となる。したがって、陽性コントロール P C が発色し、又は、陰性コントロール N C が非発色となることで、免疫組織染色反応が行われたか否かの指標にすることができる。

【 0 0 6 4 】

例えば、図 1 4 に示すように、ガラス基板 G に設けた 2 つのリングを有するはっ水リング 2 4 A の一方のリング内側に、陽性コントロール P C 又は陰性コントロール N C を固定した上で、他方のリング内側に組織標本 T を固定する。このような形態のガラス基板を用い、本発明に係る自動電界免疫組織染色装置を使って免疫組織染色を構成する一連の反応を進める。そうすると、陽性コントロール P C 又は陰性コントロール N C を指標に一連の反応が適切に進んだか否かを判断することができ、染色の失敗を未然に防いで免疫組織染色の品位を向上することができる。

20

【 0 0 6 5 】

はっ水リング 2 4 A にはその樹脂部分である枠上に、ガラス基板 G から剥がし易くするタグ 2 4 A 1 を 1 ~ 2 箇所、設けることが好ましい。また、はっ水リングに関し、内径を 1 0 mm 程度とすれば 3 つのリングの枠を形成することもできる（図示省略）。

30

【 0 0 6 6 】

このほか、本発明に係る自動電界免疫組織染色装置に、加温機構を具備させるようにしてもよい。下部電極を例えばペルチェ素子などのヒーターにて加温する。下部電極を 3 5 ~ 3 8 に加温することで、抗原抗体反応の反応性が向上するからである。

【実施例】


【 0 0 6 7 】

本発明に係る自動電界免疫組織染色装置を使った自動電界免疫組織染色方法に沿った基本プロトコールの例を下記 [表 1] に示す。また、下記 [表 2] に、比較例として免疫組織染色に係り、各社から市販されているキットを利用した従来のプロトコール例を示す。

【 0 0 6 8 】

40

【表 1】

染色工程	装置内	本発明(実施例1、実施例2)	
1. アセトン固定	用手法	2分	
2. PBS 洗浄	用手法	15秒	
3. 電界賦活化	装置投入	30秒~60秒	
4. 一次抗体		5~7分	
5. 電界 PBS 洗浄		30秒~60秒	
6. 内因性ペルオキシダーゼ除去		1分	
7. 電界 PBS 洗浄		30秒~60秒	
8. 二次抗体		5分	
9. 電界 PBS 洗浄		装置取出し	1分
10. DAB 発色		用手法	2分
11. 洗浄・核染・封入	用手法	1分	
		~22.5分	

10

20

30

【表 2】

染色工程	比較例1	比較例2	比較例3	比較例4
PBS 洗浄	-	10分×3回	-	-
アセトン固定	4°C 10分	適時	10分	4°C 10分
PBS 洗浄	5分×2回	10分×3回	適時	5分×3回
内因性ペルオキシダーゼ除去	10分	10分	5~10分	-
PBS 洗浄	5分×2回	5分×3回	5分×3回	-
ブロッキング	60分	60分	20分	-
PBS 洗浄	-	-	5分×3回	-
一次抗体	4°C 一晚(480分以上)	60分	室温 60分	60分
PBS 洗浄	5分×3回	5分×3回	5分×3回	5分×3回
二次抗体	室温 30分	60分	45分	30分
PBS 洗浄	5分×3回	5分×3回	5分×3回	5分×3回
アビジン-ビオチン複合体液	室温 30分	30分	15分	-
PBS 洗浄	5分×3回	5分×3回	30秒	-
DAB 発色	適時	適時	5分	5分
洗浄・核染・封入	12分	適時	3分	1分
合計時間	697分以上	340分以上	223分以上	151分

【0069】

すなわち、[表1]に示すように、本発明に係る自動電界免疫組織染色方法では、組織標本をアセトンでガラス基板に固定し、PBSによる洗浄を行った上で、自動電界免疫組

10

20

30

40

50

織染色装置の試料載置ユニットにおける載置部に組織標本が固定されたガラス基板を載置する。この状態で、自動電界免疫組織染色装置を作動させる。

【0070】

自動電界免疫組織染色装置内では、試料載置ユニットが搬送されて、電界攪拌ユニットの上部電極の直下に組織標本が固定されたガラス基板が位置し、この組織標本に対して電界が30～60秒間与えられて、組織標本中の抗原が賦活化される。続いて、試料載置ユニットが搬送されて、溶液供給ユニットの一次抗体を含む溶液が収容されている収容部の直下に、抗原を賦活化させた組織標本が固定されているガラス基板が位置し、この組織標本に対して一次抗体を含む溶液が滴下される。さらに、試料載置ユニットが搬送されて、電界攪拌ユニットの上部電極の直下にガラス基板が位置し、一次抗体を含む溶液が滴下された組織標本に対して電界が5～7分間与えられ、一次抗体を含む溶液の非接触な攪拌によって一次抗体と組織標本中の抗原との抗原抗体反応が進む。

10

【0071】

抗原と一次抗体との抗原抗体反応の後、洗浄ユニットが搬送されて、排出管の管先が上部電極の貫通孔を通じて一次抗体を含む溶液に届き、一次抗体を含む溶液が吸引されて排出される。また、洗浄ユニットの供給管の管先が上部電極の貫通孔から組織標本へ向けて覗いて、洗浄液としてのPBSがガラス基板上に供給される。このPBSに対して電界が30～60秒間与えられ、PBSの非接触な攪拌によって、組織標本が洗浄される。洗浄に用いたPBSはガラス基板上から排出管により吸引して排出される。

【0072】

20

次に、自動電界免疫組織染色装置内では、試料載置ユニットが搬送されて、溶液供給ユニットの内因性ペルオキシダーゼ除去のためのブロッキング溶液が収容されている収容部の直下に、抗原と一次抗体との抗原抗体反応を終え、PBSにより洗浄された組織標本が固定されているガラス基板が位置し、このブロッキング溶液が滴下される。また、試料載置ユニットが搬送されて、電界攪拌ユニットの上部電極の直下にブロッキング溶液が滴下された組織標本が固定されているガラス基板が位置し、この組織標本に対して電界が1分間与えられる。ブロッキング溶液の非接触な攪拌によって、免疫組織染色で用いられる発色剤（ジアミノベンジジン液：DAB液）に対する非特異的な発色が有効に抑えられる。

【0073】

ブロッキング溶液の攪拌の後、洗浄ユニットが搬送され、排出管の管先が上部電極の貫通孔を通じてブロッキング溶液に届き、ブロッキング溶液が吸引されて排出される。また、洗浄ユニットの供給管の管先が上部電極の貫通孔から組織標本へ向き、PBSがガラス基板上に供給される。このPBSに対して電界が30～60秒間与えられ、PBSの非接触な攪拌によって、組織標本が洗浄される。洗浄に用いたPBSはガラス基板上から排出管により吸引されて排出される。

30

【0074】

さらに、自動電界免疫組織染色装置内では、試料載置ユニットが搬送されて、溶液供給ユニットの二次抗体溶液が収容されている収容部の直下に、抗原と一次抗体との抗原抗体反応、PBSによる洗浄及び、ブロッキング溶液によるブロッキングを終えた組織標本が固定されているガラス基板が位置し、二次抗体溶液が滴下される。また、試料載置ユニットが搬送され、電界攪拌ユニットの上部電極の直下に二次抗体溶液が滴下された組織標本が固定されているガラス基板が位置し、この組織標本に対して電界が5分間与えられる。二次抗体溶液の非接触な攪拌によって一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応が進む。

40

【0075】

一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応の後、洗浄ユニットが搬送され、排出管の管先が上部電極の貫通孔を通じて二次抗体溶液に届いて、これを吸引して排出する。また、洗浄ユニットの供給管の管先が上部電極の貫通孔から組織標本へ向き、洗浄液としてのPBSがガラス基板上に供給する。このPBSに対して電界が1分与えられ、PBSの非接触な攪拌によって、組織標本が洗浄される。さらに、洗浄に用いたPBSはガラス基板上から排出管により吸引して排出される。そして、自動電界免疫組織染色装置の作動を停止し、一

50

連の反応を進めたガラス基板を試料載置ユニットから外部へ取り出す。

【0076】

その後、ガラス基板上の組織標本に対し、二次抗体の標識酵素であるペルオキシダーゼと反応するジアミノベンジジンによって発色し（DAB発色）、核染色により細胞核を染色し、発色が退色しないように封入する等の従来の免疫組織染色と同様な処理を行う。

【0077】

本発明に係る自動電界免疫組織染色方法では、自動電界免疫組織染色装置を利用することにより、免疫組織染色を構成する一連の反応であるアセトン固定からDAB発色、核染色、封入等の操作までを22.5分程度で完了することができる。また、自動電界免疫組織染色装置を利用することにより、抗原の賦活化から二次抗体による抗原抗体反応の後の洗淨までを自動で進めることができる。

10

【0078】

一方、[表2]に示すように、各社から市販されているキットを利用した従来の免疫組織染色方法（比較例1～3）では、アセトン固定からDAB発色、核染色、封入等の操作までに少なくとも223分以上を要する。

【0079】

また、上記特許文献1に係る特開2010-119388号公報に開示の電界攪拌技術を利用し、一次抗体と組織標本中の抗原との抗原抗体反応及び、一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応を電界攪拌技術で進める一方、その前後の洗淨工程を手作業で進めた免疫組織染色の例として比較例4を取り上げた。比較例4の場合、アセトン固定からDAB発色、核染色、封入等の操作までに151分を要した。

20

【0080】

特に、一次抗体と抗原との抗原抗体反応や一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応の時間が、比較例1～4において60分程度、或いはそれ以上の時間を要する。これに対し、本発明において、それぞれ5分に短縮される。また、抗原抗体反応の前後の洗淨工程が、比較例において5分を3セット、すなわち15分以上の時間を要する。これに対し、本発明において、それぞれ30～60秒又は1分に短縮される。

【0081】

（実施例1）

実施例1では、ポジティブコントロールに対して本発明に係る自動電界免疫組織染色装置を利用し、免疫組織染色を行った。その基本プロトコールは、上記[表1]のとおりである。実施例1における免疫組織染色の結果である顕微鏡写真を、図15(b)に示す。図15(a)には、比較例4として示したプロトコールにより免疫組織染色を行い、その結果である顕微鏡写真を示している。

30

【0082】

また、実施例1における免疫組織染色に用いた一次抗体、二次抗体及びその液量、洗淨液の液量、はっ水リングの内径を下記[表3]に示した。

【0083】

【表 3】

組織		脳腫瘍
抗体		抗 Ki-67 抗体(mib-1)
	一次抗体	DAKO 製 組織染色用希釈済み抗体 IR シリーズ
	二次抗体	DAKO 製 Envision
液量	抗体	200 μ L
	洗浄液	400 μ L
はっ水リング径		20mm

10

20

【 0 0 8 4 】

実施例 1 において、ポジティブコントロール標本中の抗原を賦活化するにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。ガラス基板上の組織標本に対して印加電界強度 4 . 5 k V、周波数 1 H z の矩形波で 1 分間の条件で電界を与えた。電極と組織標本との隙間は 3 . 3 mm であった。

【 0 0 8 5 】

また、一次抗体と抗原との抗原抗体反応を進めるにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。内径 2 0 mm のはっ水リングに一次抗体を含む溶液をガラス基板上の組織標本へ向けて 2 0 0 μ L 滴下し、この溶液に対して印加電界強度 4 k V、オフセット電圧 2 k V、周波数 1 ~ 3 0 H z の矩形波で 4 分 3 0 秒間の条件で電界を与えた。電極と溶液との隙間は 4 . 5 mm であった。

30

【 0 0 8 6 】

また、一次抗体と抗原との抗原抗体反応の後の洗浄工程を進めるにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。一次抗体を含む溶液を排出管により排出した後、供給管 1 2 を用いて洗浄液である P B S を 4 0 0 μ L、ガラス基板上の組織標本へ向けて供給し、この洗浄液に対して印加電界強度 4 k V、オフセット電圧 2 k V、周波数 1 ~ 3 0 H z の矩形波で 3 0 秒間の条件で電界を与えた。電極と洗浄液との隙間は 6 mm であった。その後、洗浄液を排出管により排出した。なお、洗浄工程において、洗浄の時間は 3 0 秒であり、その回数は 1 回で十分であった。

40

【 0 0 8 7 】

一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応を進めるにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。内径 2 0 mm のはっ水リングに二次抗体を含む溶液をガラス基板上の組織標本へ向けて 2 0 0 μ L 滴下し、この溶液に対して印加電界強度 4 k V、オフセット電圧 2 k V、周波数 1 ~ 3 0 H z の矩形波で 5 分間の条件で電界を与えた。電極と溶液との隙間は 4 . 5 mm であった。

【 0 0 8 8 】

また、一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応の後の洗浄工程を進めるにあたって付与し

50

た電界条件は、以下のとおりである。二次抗体を含む溶液を排出管により排出した後、供給管12を用いて洗浄液であるPBSを400 μ L、ガラス基板上の組織標本へ向けて供給し、この洗浄液に対して印加電界強度4kV、オフセット電圧2kV、周波数1~30Hzの矩形波で30秒間の条件で電界を与えた。電極と洗浄液との隙間は6mmであった。その後、洗浄液を排出管により排出した。なお、この洗浄工程において、洗浄の時間は30秒であり、その回数は2回で十分であった。

【0089】

本発明は、免疫組織染色の所要時間が22.5分であって、比較例4の所要時間(151分)の約7分の1に短縮されている。にもかかわらず、実施例1において、図15(b)に示す本発明による免疫組織染色の結果は、図15(a)に示す比較例4によるものと同等に明瞭であることが理解される。

【0090】

(実施例2)

実施例2では、リンパ節組織に対して本発明に係る自動電界免疫組織染色装置を利用し、免疫組織染色を行った。その基本プロトコールは、上記[表1]のとおりである。実施例2における免疫組織染色の結果である顕微鏡写真を、図16(b)に示す。図16(a)は、比較例5として行った免疫組織染色の例であり、その結果である顕微鏡写真を示している。比較例5では、上記[表1]の基本プロトコールにおいて、抗原抗体反応やPBSによる洗浄時に電界を付与せず、溶液や洗浄液を攪拌しないで免疫組織染色を進めた。

【0091】

実施例2における免疫組織染色に用いた一次抗体、二次抗体及びその液量、洗浄液にお液量、はっ水リングの内径を下記[表4]に示した。

【0092】

【表4】

組織		リンパ節
抗体		抗 CD20 抗体(B-cell)
	一次抗体	DAKO 製 組織染色用希釈済み抗体 IR シリーズ
	二次抗体	DAKO 製 Envision
液量	抗体	200 μ L
	洗浄液	400 μ L
はっ水リング径		20mm

【0093】

実施例2において、一次抗体と抗原との抗原抗体反応を進めるにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。内径20mmのはっ水リングに一次抗体を含む溶液をガラス基板上の組織標本へ向けて200 μ L滴下し、この溶液に対して印加電界強度4kV、

オフセット電圧 2 kV、周波数 10 Hz の矩形波で 5 分間の条件で電界を与えた。電極と溶液との隙間は 4.5 mm であった。

【0094】

また、一次抗体と抗原との抗原抗体反応の後の洗浄工程を進めるにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。一次抗体を含む溶液を排出管により排出した後、供給管 12 を用いて洗浄液である PBS を 400 μ L、ガラス基板上の組織標本へ向けて供給し、この洗浄液に対して印加電界強度 4 kV、オフセット電圧 2 kV、周波数 10 Hz の矩形波で 30 秒間の条件で電界を与えた。電極と洗浄液との隙間は 6 mm であった。その後、洗浄液を排出管により排出した。なお、洗浄工程において、洗浄の時間は 30 秒であり、その回数は 1 回で十分であった。

10

【0095】

一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応を進めるにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。内径 20 mm のはっ水リングに二次抗体を含む溶液をガラス基板上の組織標本へ向けて 200 μ L 滴下し、この溶液に対して印加電界強度 4 kV、オフセット電圧 2 kV、周波数 10 Hz の矩形波で 5 分間の条件で電界を与えた。電極と溶液との隙間は 4.5 mm であった。

【0096】

また、一次抗体と二次抗体との抗原抗体反応の後の洗浄工程を進めるにあたって付与した電界条件は、以下のとおりである。二次抗体を含む溶液を排出管により排出した後、供給管 12 を用いて洗浄液である PBS を 400 μ L、ガラス基板上の組織標本へ向けて供給し、この洗浄液に対して印加電界強度 4 kV、オフセット電圧 2 kV、周波数 10 Hz の矩形波で 30 秒間の条件で電界を与えた。電極と洗浄液との隙間は 6 mm であった。その後、洗浄液を排出管により排出した。なお、この洗浄工程において、洗浄の時間は 30 秒であり、その回数は 1 回で十分であった。

20

【0097】

実施例 2 において、図 16 (b) に示す本発明による免疫組織染色の結果が、図 16 (a) に示す比較例 5 によるものより明瞭であることが理解される。なお、実施例 2 では、電界付与による抗原の賦活化を行っていない。

【0098】

以上、本発明の実施形態を例示して詳述したが、上記実施形態は、出願人が最良であるものと信じて開示する形態であって、本発明がこれに限定されるものではない。本発明は、特許請求の範囲に記載された事項を逸脱することがなければ、種々の設計変更を行うことが可能である。

30

【0099】

例えば、本発明を実施するに際し、抗原との非特異的な反応を抑制し、免疫組織染色の染色性を向上させるためのブロッキング工程は不要であるが、敢えてブロッキング工程を行っても免疫組織染色自体に支障は生じない。さらに、CK や CD20 等の反応性の高い抗体を用いる場合、抗原を賦活化する工程を行う必要の無い場合がありうる。そして、上述したように、本発明は、免疫組織染色を時間的な制約がある術中迅速病理診断に適用可能とする。また、抗体試薬を希釈、すなわち節約して免疫組織染色をすることが可能となる。本発明は、凍結切片を用いた術中迅速診断、パラフィン切片を用いた免疫染色診断に適用可能であるほか、核酸のハイブリダイゼーション、その他の抗原抗体反応等の迅速化、自動化に貢献することもできる。

40

【0100】

また、上記実施形態では、試料載置ユニットが搬送されて、免疫組織染色を構成する一連の反応が行われる構成を説明したが、本発明がこれに限定されるものではない。本発明は、試料載置ユニットが固定されたままで、溶液供給ユニット、電界攪拌ユニット及び洗浄ユニットが搬送されることにより、免疫組織染色を構成する一連の反応が行われる構成とすることも可能である。このような構成において本発明は、試料載置ユニットで基板上に滴下された溶液等が、決してこぼれることがないというメリットを有することとなる。

50

【符号の説明】

【0101】

1	自動電界免疫組織染色装置（本発明）	
2	試料載置ユニット	
21	ステージ	
21A	載置部	
22	下部電極（他方の電極）	
23	ステージ搬送部	
24	はっ水リング	
24A	2穴タイプのはっ水リング	10
24A1	タグ	
3	溶液供給ユニット	
31	シリンジ	
31A	フランジ部	
31B	本体部	
31C	筒先部	
32	カセット体	
32A	シリンダ収容部	
33	プランジャロッド	
34	ピストン	20
35	カセット搬送部	
4	電界攪拌ユニット	
41	上部電極（一方の電極）	
41A	貫通穴	
410	電界集中型上部電極	
42	上部電極搬送部	
5	洗浄ユニット	
51	排出管	
52	供給管	
53	洗浄管搬送部	30
G	ガラス基板	
S	一次抗体を含む溶液	
T	組織標本	
NC	ネガティブコントロール	
PC	ポジティブコントロール	

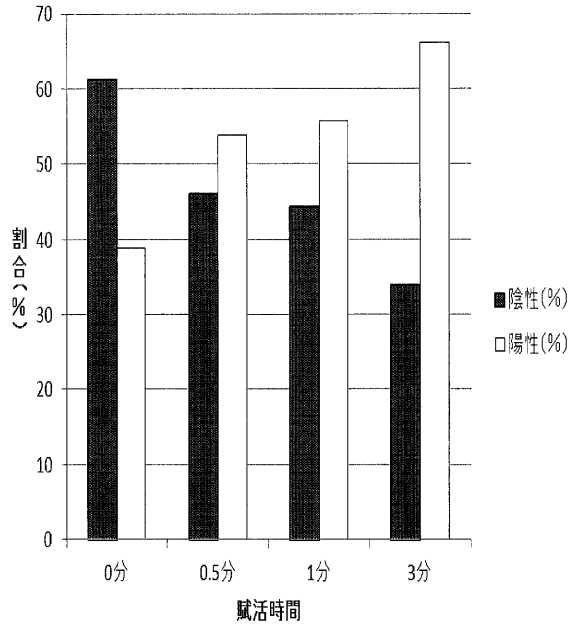
【要約】

【課題】免疫組織染色を迅速化且つ自動化し、術中迅速病理診断に利用可能とする。

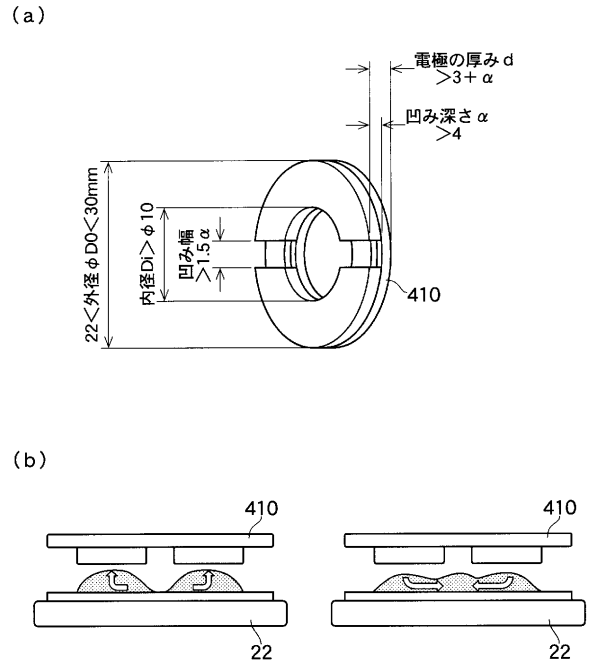
【解決手段】自動電界免疫組織染色装置1を、試料載置ユニット2、溶液供給ユニット3、電界攪拌ユニット4及び洗浄ユニット5を備えて構成し、組織標本Tが固定されているガラス基板Gを載置する試料載置ユニット2と、上部電極41を備える電界攪拌ユニット4とを連動させて組織標本T中の抗原を賦活化し、試料載置ユニット2と、各種の溶液を収容している溶液供給ユニット3とを連動させて組織標本Tに対して一次抗体を含む溶液Sを供給し、試料載置ユニット2と電界攪拌ユニット4とを連動させて組織標本T中の抗原と一次抗体との抗原抗体反応を進め、電界攪拌ユニット4と洗浄ユニット5とを連動させて、一次抗体を含む溶液Sを排出したり、洗浄液を供給したりすることにより、組織標本Tを洗浄し、免疫組織染色の迅速化及び自動化を図る。

【選択図】図1

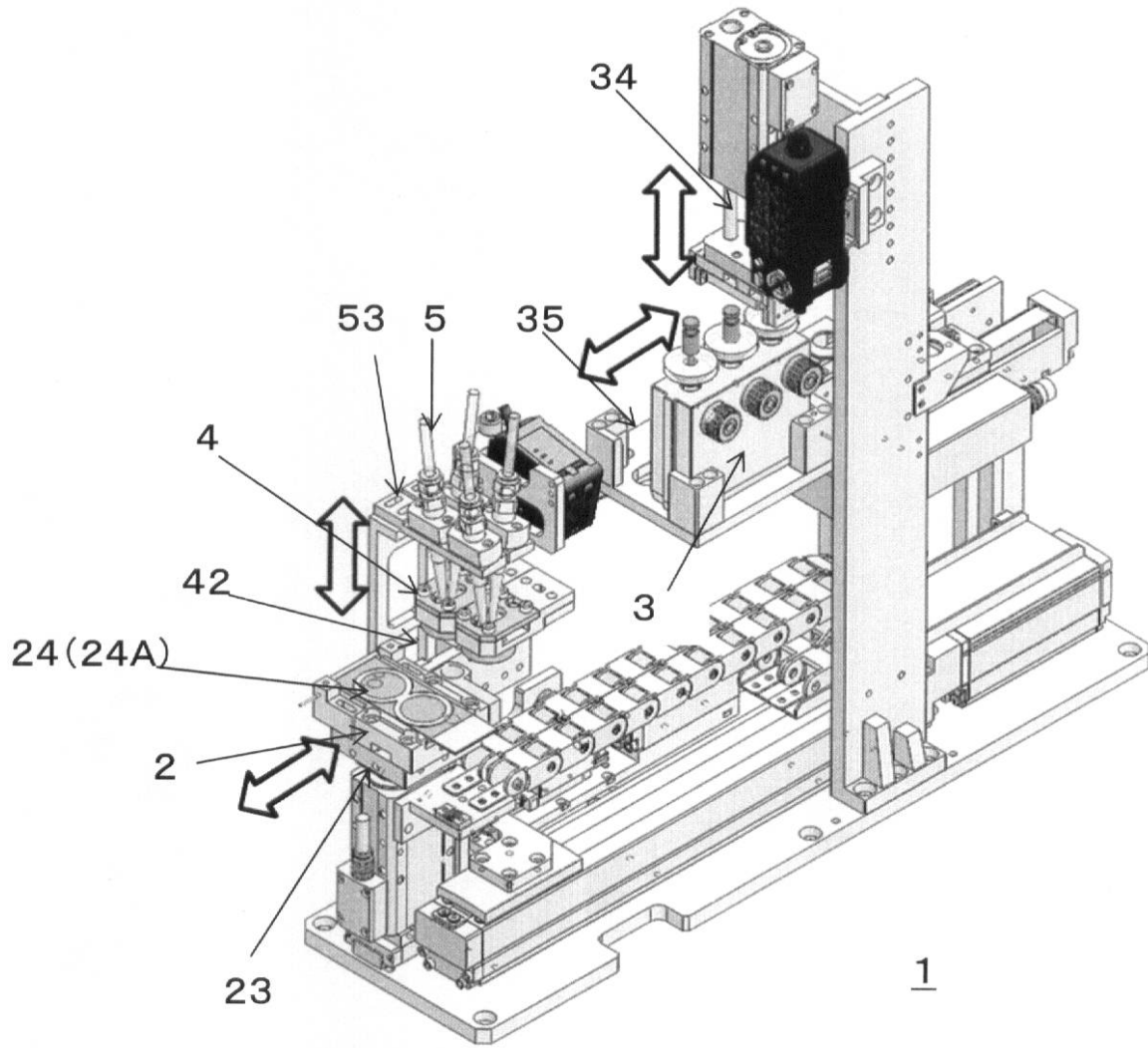
【図 1 1】



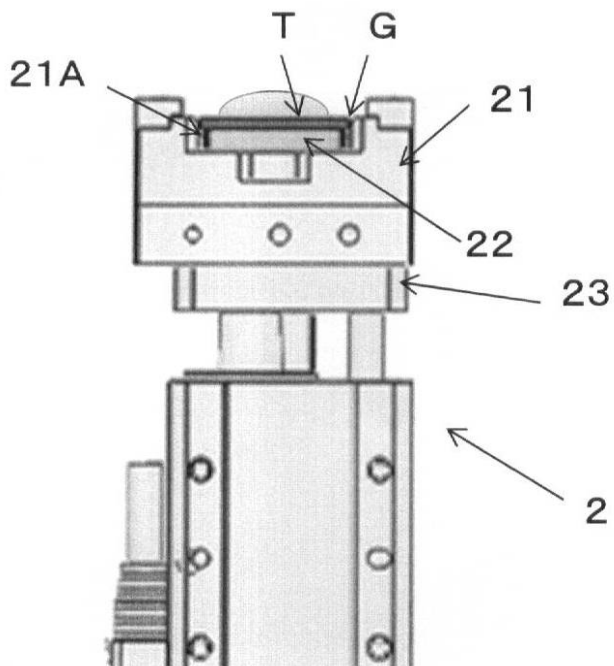
【図 1 3】



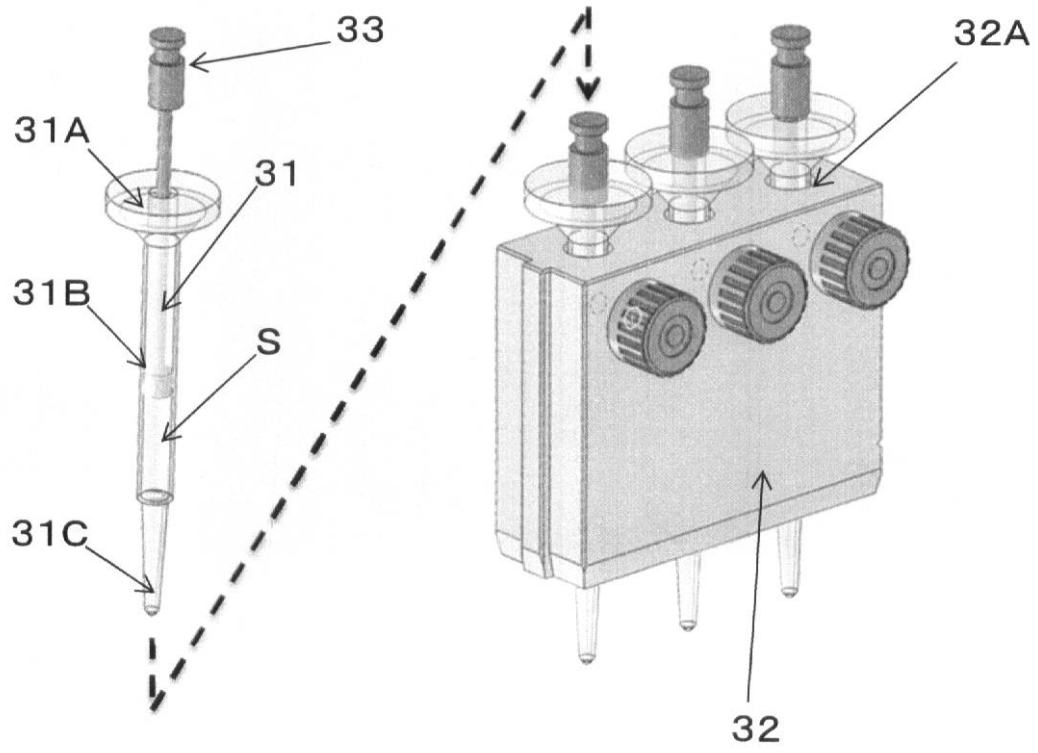
【図1】



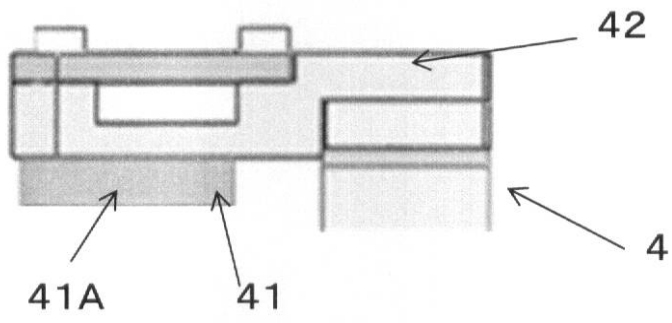
【図2】



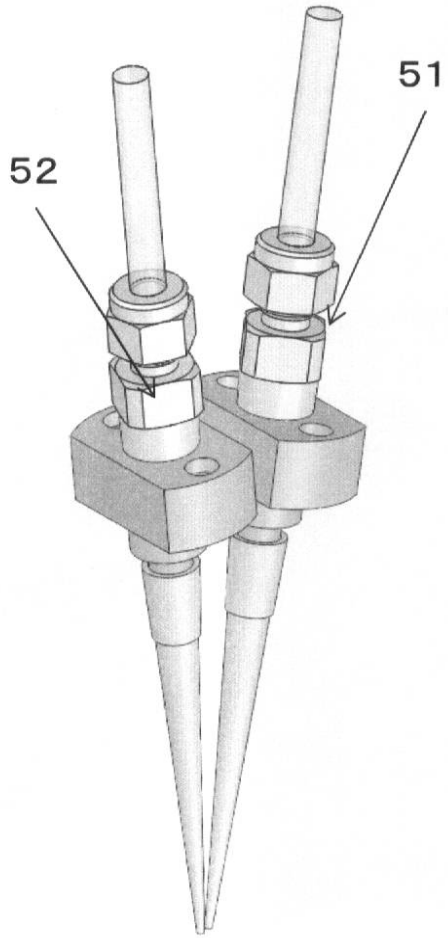
【図3】



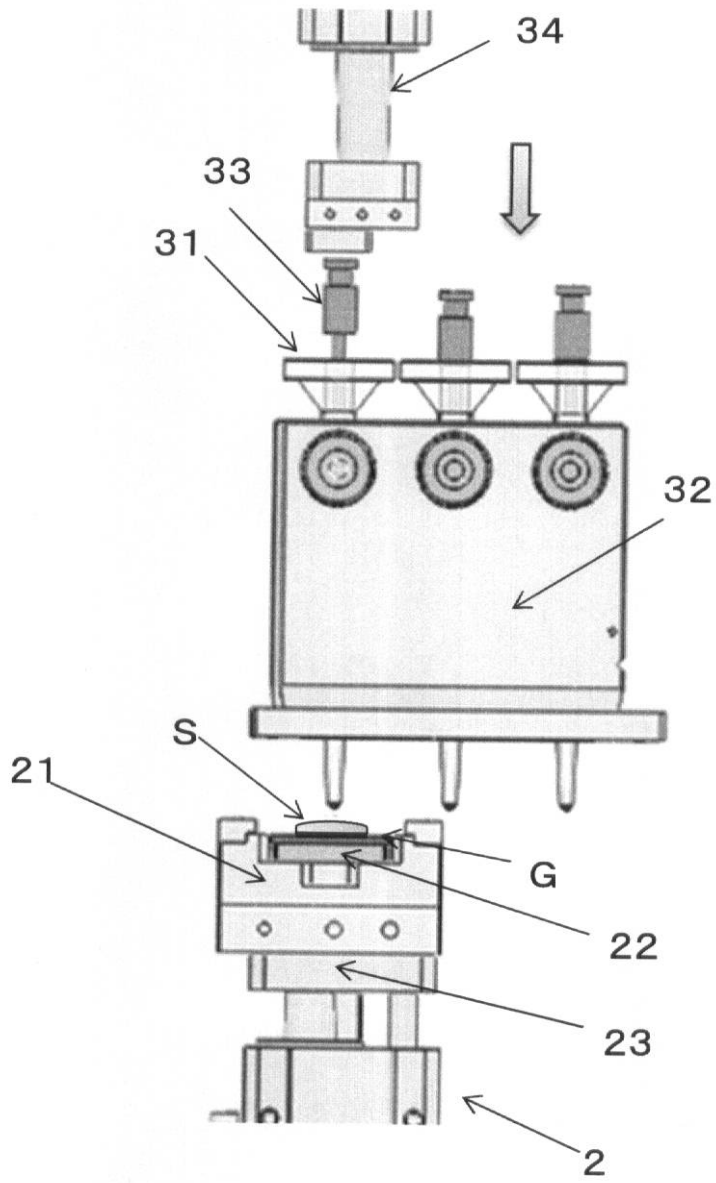
【図4】



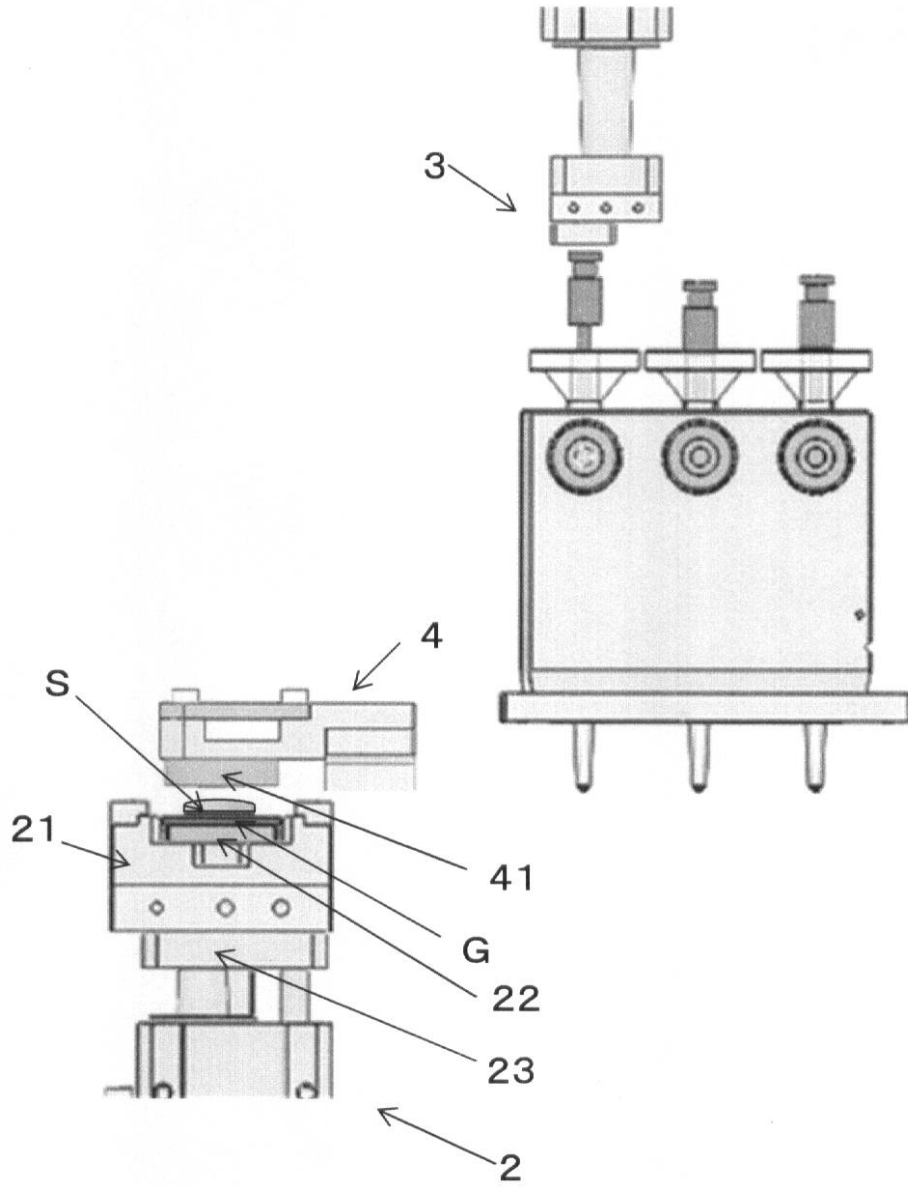
【図5】



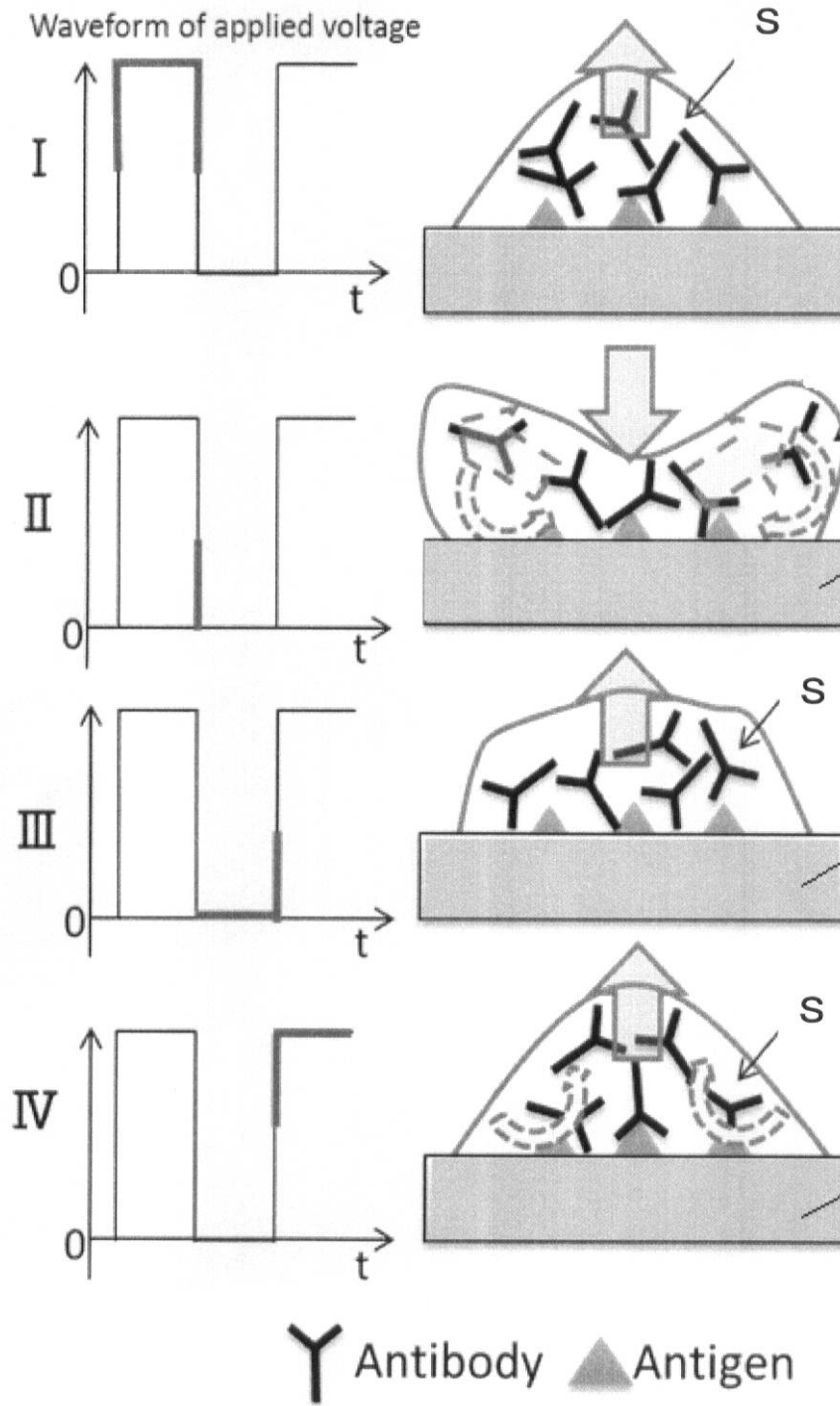
【図6】



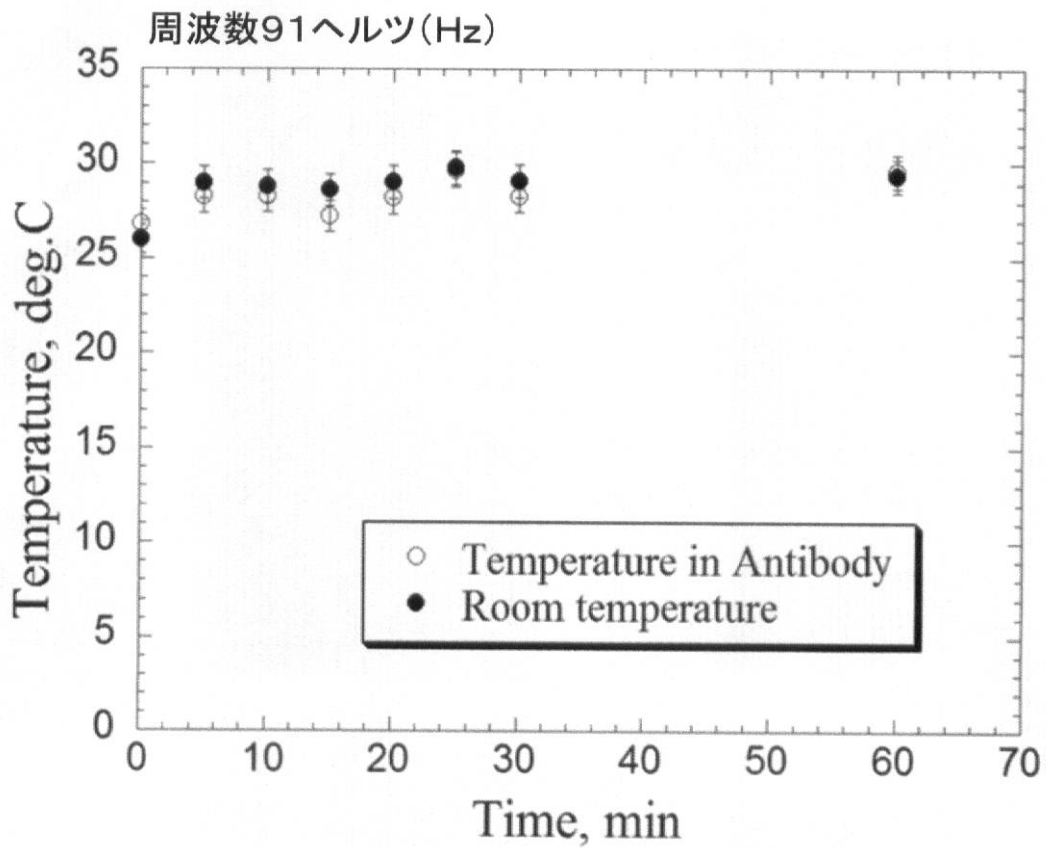
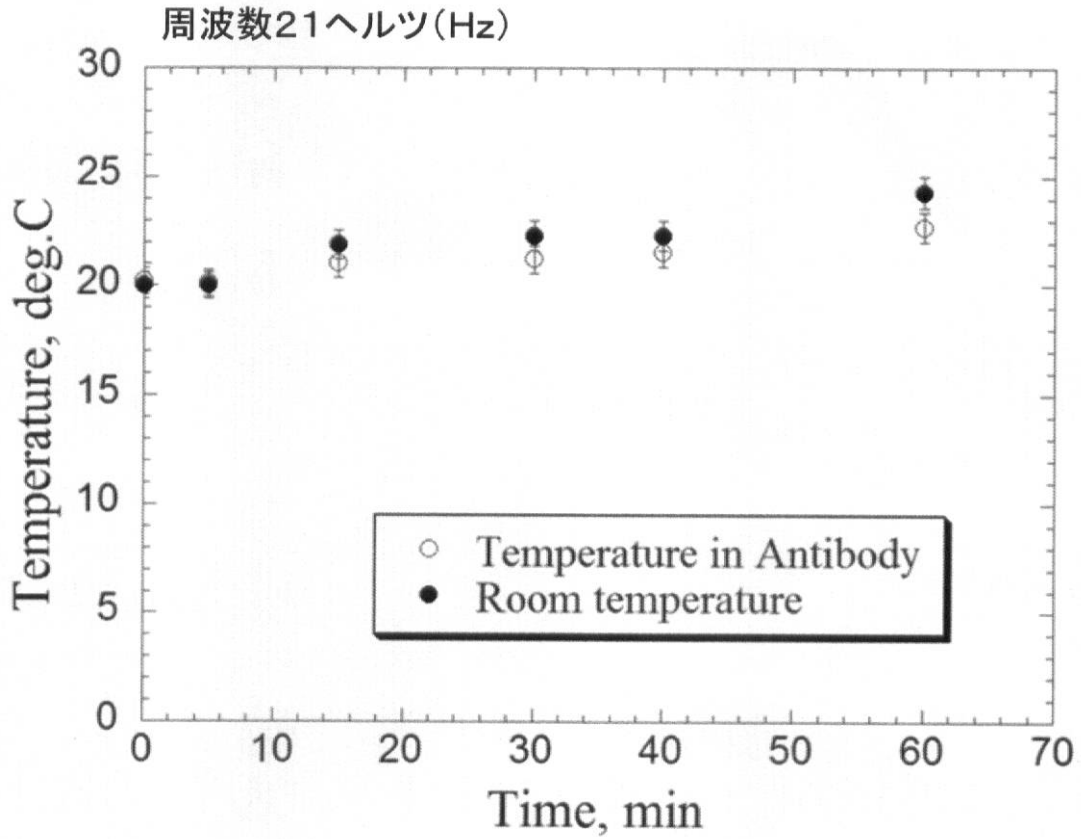
【図7】



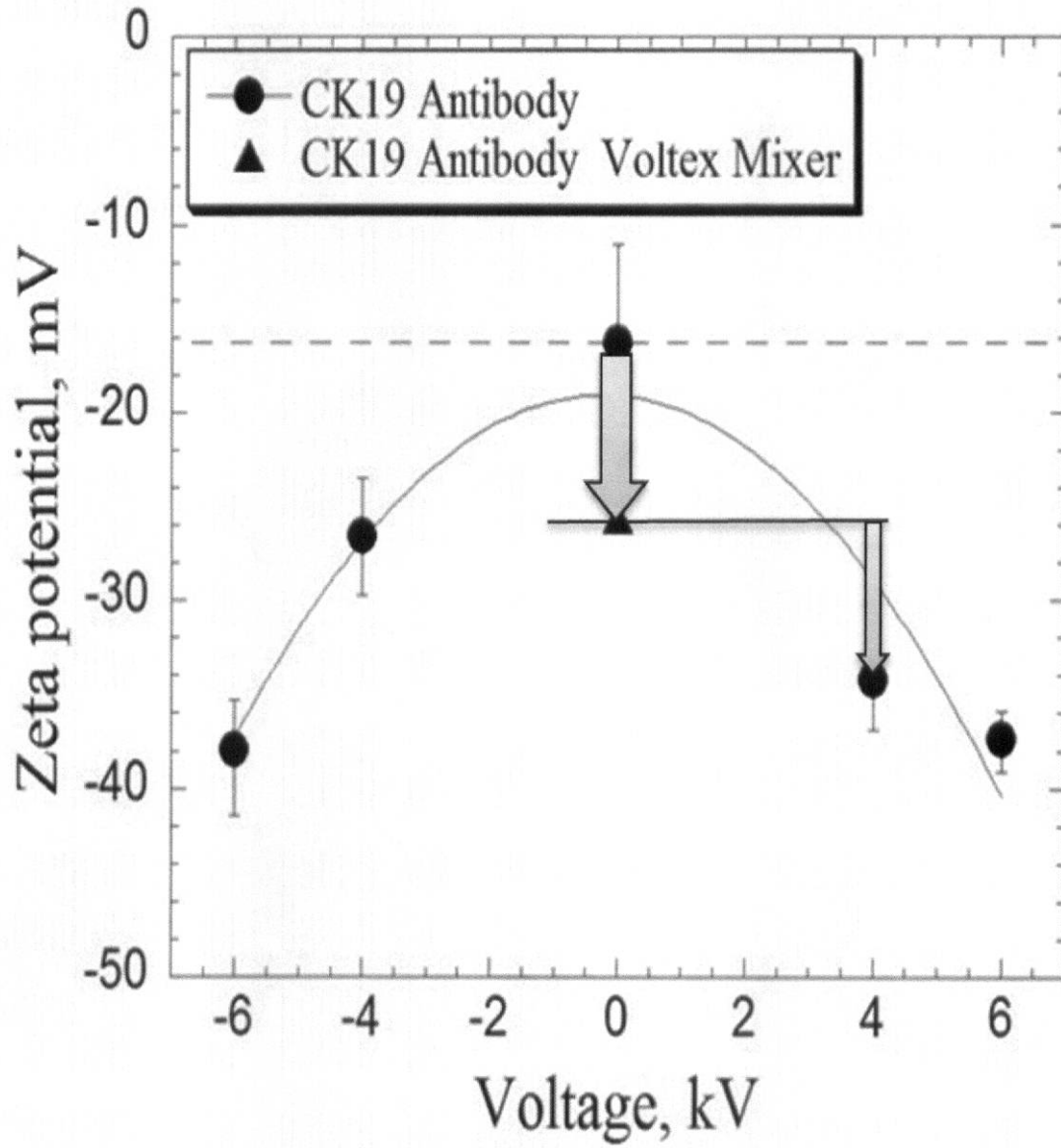
【 図 8 】



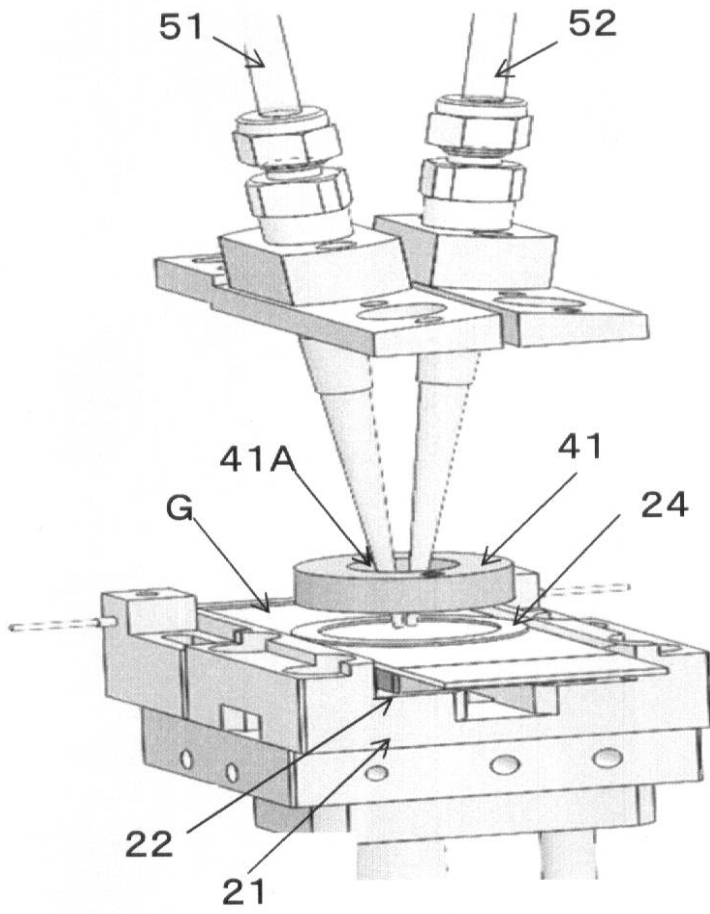
【図9】



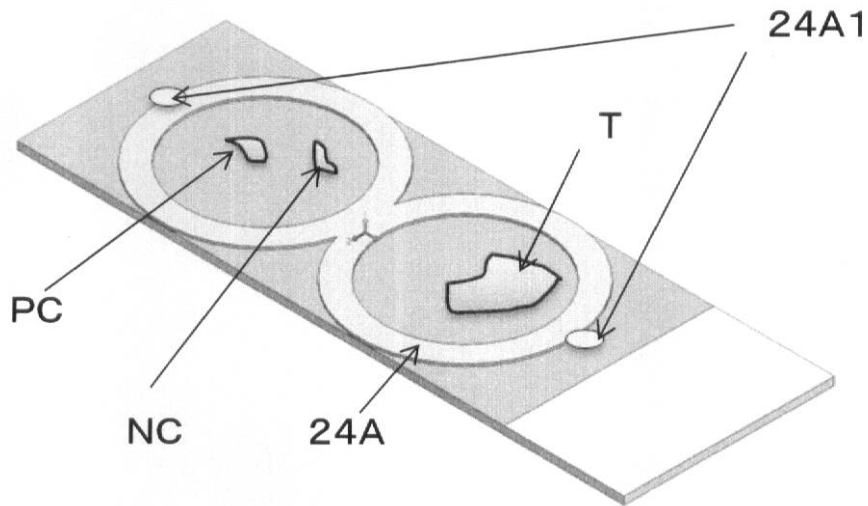
【 図 1 0 】



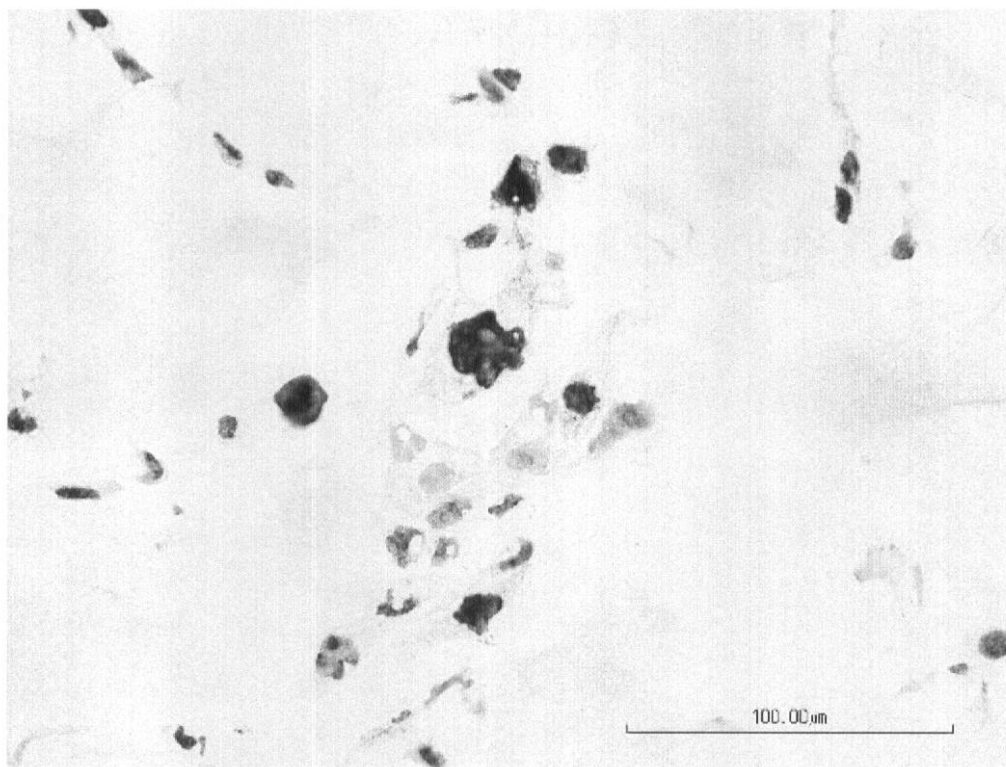
【図12】



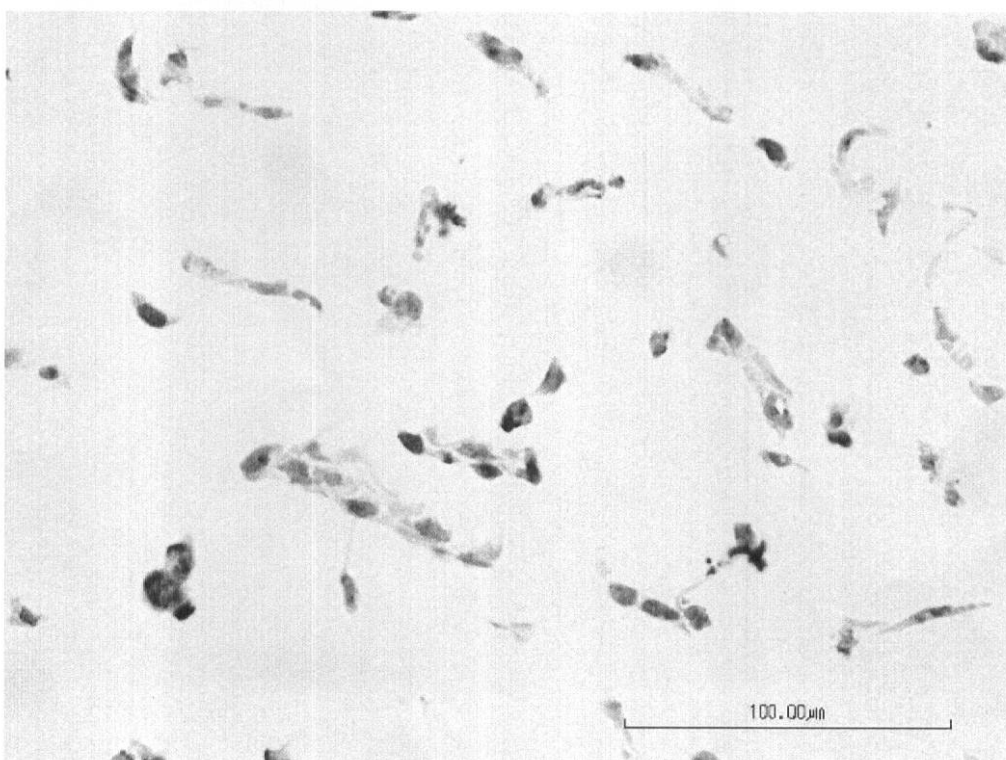
【図14】



【 図 15 】

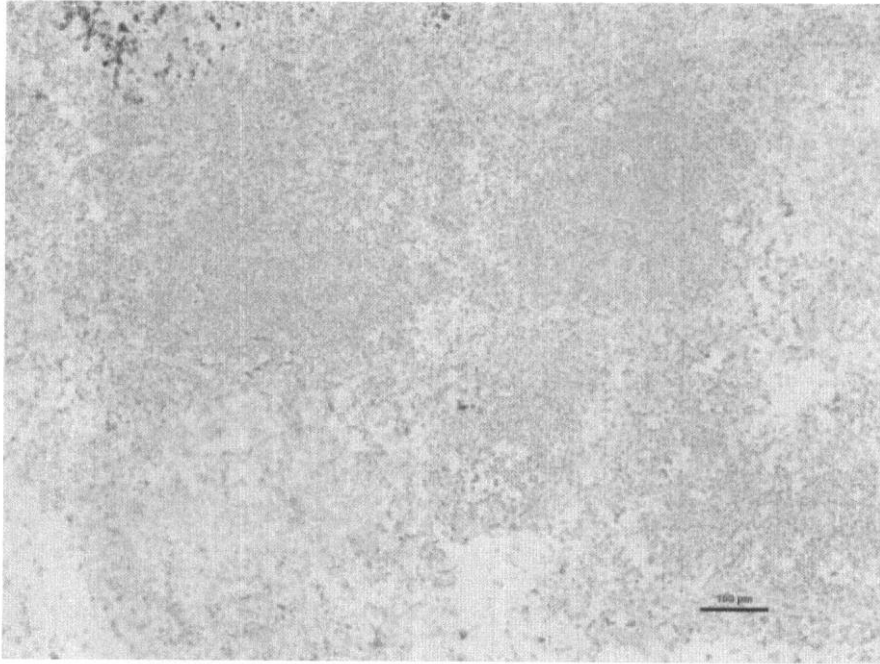


(a) 比較例 4

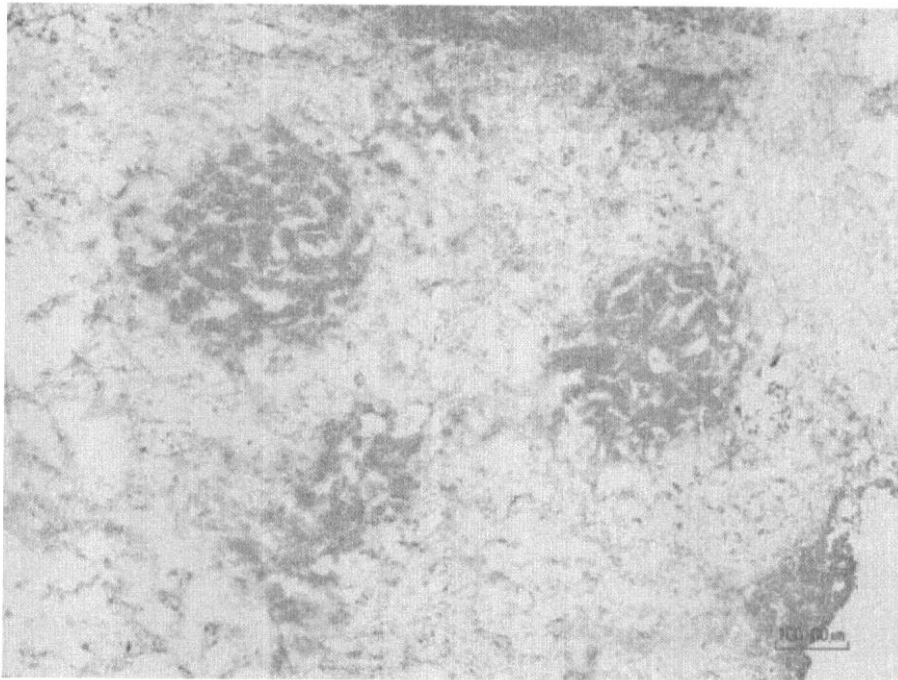


(b) 実施例 1

【図16】



(a)比較例5



(b)実施例2

フロントページの続き

- (72)発明者 加賀谷 昌美
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 池田 洋
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

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2012-013598(JP,A)
特表2008-527330(JP,A)
特開2012-159480(JP,A)
特表平04-507295(JP,A)
中村竜太、他5名、電界非接触攪拌技術を用いた抗原抗体反応の迅速メカニズムの解明、精密工学会大会学術講演会講演論文集、日本、2013年、Vol.2013秋季(CD-ROM)、Page.ROMBUNNO.J64
加賀谷昌美、産学官連携イノベーション顕在化事業 医工連携による医療機器開発、秋田県産業技術センター業務年報、2012年、Vol.2012、pp.69-70

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

G01N 1/30

G01N 1/38

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	自动电界免疫组织染色装置		
公开(公告)号	JP5696300B1	公开(公告)日	2015-04-08
申请号	JP2014030179	申请日	2014-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	秋田县 国立大学法人秋田大学		
申请(专利权)人(译)	秋田县 国立大学法人秋田大学		
当前申请(专利权)人(译)	秋田县 国立大学法人秋田大学		
[标]发明人	赤上陽一 加賀谷昌美 中村竜太 池田洋 南谷佳弘 南條博		
发明人	赤上 陽一 加賀谷 昌美 中村 竜太 池田 洋 南谷 佳弘 南條 博		
IPC分类号	G01N33/48 G01N1/30 G01N1/38 G01N33/53		
FI分类号	G01N1/28.Y G01N1/30 G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/BB25 2G045/FB03 2G045/JA07 2G052/AA33 2G052/FA10 2G052/FB10 2G052/GA30		
代理人(译)	福田贤三 福田进一 加藤恭介		
其他公开文献	JP2015155811A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：加快免疫组织化学染色的速度并使其自动化，以便将其用于术中快速病理诊断。 解决方案：自动电场免疫组织化学染色设备1包括样品放置单元2，溶液供应单元3，电场搅拌单元4和清洗单元5，以及固定有组织样品T的玻璃基板G。 将要放置的样本放置单元2和具有上电极41的电场搅拌单元4互锁以激活组织样本T中的抗原，样本放置单元2和包含各种溶液的溶液被激活。 包含第一抗体的溶液S通过与供应单元3联锁而被供应至组织样本T，并且组织样本T中的抗原和第一抗体通过联结样品放置单元2和电场搅拌单元4而联锁。 通过进行抗原-抗体反应并使电场搅拌单元4和洗涤单元5互锁以排出包含第一抗体的溶液S或供给洗涤溶液，从而洗涤组织样品T并进行免疫组织化学染色。 加快速度并实现自动化。 [选型图]图1

染色工程	装置内	本発明(実施例1、実施例2)	
1. アセトン固定	用手法	2分	
2. PBS 洗浄	用手法	15秒	
3. 電界賦活化	装置投入	30秒~60秒	
4. 一次抗体		5~7分	
5. 電界 PBS 洗浄		30秒~60秒	
6. 内因性ペルオキシダーゼ除去		1分	
7. 電界 PBS 洗浄		30秒~60秒	
8. 二次抗体		5分	
9. 電界 PBS 洗浄		装置取出し	1分
10. DAB 発色		用手法	2分
11. 洗浄・核染・封入	用手法	1分	
		~22. 5分	