

(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2004-271511

(P2004-271511A)

(43) 公開日 平成16年9月30日(2004.9.30)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/48 P

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53 U

GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/543 5 4 5 J

GO 1 N 33/543 5 4 5 S

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2003-366044 (P2003-366044)	(71) 出願人	391012523 鹿児島大学長 鹿児島県鹿児島市郡元1丁目2番24号
(22) 出願日	平成15年10月27日 (2003.10.27)	(74) 代理人	100072051 弁理士 杉村 興作
(31) 優先権主張番号	特願2003-40286 (P2003-40286)	(72) 発明者	蓮井 和久 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部内
(32) 優先日	平成15年2月18日 (2003.2.18)	(72) 発明者	村田 長芳 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	出雲 周二 鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部内

(54) 【発明の名称】 免疫組織化学的染色による抗原の検出方法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、検出感度を落とすことなく、内因性ビオチン等による非特異反応の抑制を達成し超高感度の免疫組織化学的染色による抗原の検出方法を提供するものである。

【解決手段】本発明の抗原の検出方法は、固定組織標本切片中の抗原を検出する超高感度の免疫組織化学的染色方法による抗原の検出方法であって、前記抗原と一次抗体とを結合させて、二次抗体及び西洋ワサビペルオキシダーゼを含むポリマー複合体と、前記結合した一次抗体とを結合させて、前記西洋ワサビペルオキシダーゼによる標識タイラマイドの沈着反応の標識物を可視化することによって、抗原を検出することを特徴とする。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

固定組織標本切片中の抗原を検出する超高感度の免疫組織化学的染色方法による抗原の検出方法であって、前記抗原と一次抗体とを結合させて、二次抗体及び西洋ワサビペルオキシダーゼを含むポリマー複合体と、前記結合した一次抗体とを結合させて、前記西洋ワサビペルオキシダーゼによる標識タイラミドの沈着反応の標識物を可視化することによって、抗原を検出する抗原の検出方法。

## 【請求項 2】

前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体との反応前に、非特異反応を抑制する処理を行う請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体との反応後に、非特異反応を抑制する処理を行う請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記標識タイラミドの沈着反応前に、非特異反応を抑制する処理を行う請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記非特異反応を抑制する処理が、二次抗体と同種の動物血清による処理、スキンミルクによる処理、ノンファットミルクによる処理、及びガゼイン溶液による処理からなる群から選択される少なくとも1種であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 項のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記カゼイン処理を、0.025 ~ 2.5%の範囲のカゼインを含む溶液により行なうことを特徴とする請求項 1 ~ 5 項のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 7】

さらに、非特異反応生成物、及びその他の残存反応物を除去するために、加熱した洗浄液によって洗浄する工程を含む、ことを特徴とする請求項 1 ~ 6 項のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記加熱した洗浄液の温度が、25 ~ 60 の範囲内であることを特徴とする請求項 7 記載の方法。

30

## 【請求項 9】

前記標識物が、可視化することができる物質である請求項 1 ~ 8 項のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記可視化することができる物質が、ビオチン、蛍光物質の少なくとも一つを含むものである請求項 9 記載の方法。

## 【請求項 11】

蛍光物質が、フルオレスセンス・イソシアネートである請求項 10 記載の方法。

## 【請求項 12】

反応液、反応時間、及び洗浄回数をプログラムして自動免疫装置に組み込み、自動化して行なう請求項 1 ~ 11 項のいずれか1項に記載の方法。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、抗原の検出方法に関し、特に、免疫組織化学的染色を用いた抗原の検出方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

近年の免疫科学の進歩により、抗原抗体反応を用いて微量の物資を感度良く検出する免

50

疫測定が広く用いられている。免疫測定の中で一般的なものとして、免疫組織染色及び酵素免疫測定がある。

#### 【0003】

免疫組織染色とは、組織上の特定の抗原を、その抗原を特異的に認識する抗体によって検出する方法である。通常、組織を固定後パラフィン包埋したブロックから薄切した切片上に特定の抗原を認識する抗体を反応させ、反応した抗体の有無から抗原の存在を判断する。最初に抗原と反応させる抗体を、通常、第一抗体と呼ぶ。第一抗体に、視覚又は機器により検出し得るシグナルを発する物質を結合させておけば、そのシグナルの強度から第一抗体の量がわかり、それは即ち切片上の抗原の量に対応する。この目的を達成するためのシグナルを発する物質として蛍光物質、酵素などが挙げられる。

10

#### 【0004】

光学顕微鏡での染色像の解析が可能となった現在では、シグナルを発する物質として酵素を用いるのが一般的となった。免疫組織染色を行なう際、第一抗体に酵素を結合させておけば、その酵素の発色性の基質を加えることにより酵素活性に対応した発色が得られ、それは抗体の量に対応、即ち組織上に存在する抗原の量に対応する。しかし、この方法では通常十分な感度を得られない。

#### 【0005】

抗原を検出する免疫組織化学的染色方法には、一次抗体を可視化できる酵素や標識物で標識したものをを用いる直接法と一次抗体を標識せずに二次抗体を標識する間接法があることが記載されている(酵素抗体法 学際企画 20002.2.18発刊、p.23-25 (以下、非特許文献1という))。一般に、間接法には、抗原を一次抗体で標識した後に、この特異抗体を標識する間接法に属するペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ法(以下、PAP法という)、ストレプトアビチン-ビオチン複合体法(以下、sABC法という)、二次抗体と標識酵素とのポリマーへ結合させたポリマー試薬法、FITCで標識した一次抗体ないし二次抗体をHRP標識抗FITC抗体を用いる方法、sABC法に異化レポーター沈着反応(以下、CARDという)を追加した超高感度の免疫組織化学的染色方法がある。

20

#### 【0006】

PAP法は、「改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法 名倉宏、長村義之、堤寛編 学際企画 20002.2.18発刊、非特許文献1」に記載されている。これには、ウサギの一次抗体を反応させ、次に、過剰なブタ抗ウサギ抗体を反応させる方法である(当該文献、p.136-138)。ブタ抗ウサギ抗体の2つのウサギ抗体に対する結合部の一つに、ウサギ抗HRP抗体とHRPを可溶性結合させた複合体(PAP複合体)を抗原抗体反応で結合する。HRPと過酸化水素水とジアミノベンチジン等のカップリング色素で抗原の存在部位に呈色反応を生じさせる。ヘマトキシリン溶液で核を対比染色した後に、濃度の漸増するエタノール系列に切片を浸し脱水し、キシレンを浸透させ、カバーガラスでプラスチック溶剤を用いて封入する。

30

#### 【0007】

次に、sABC法は、上記非特許文献1のp.138-144に記載されている。この方法によれば、固定組織パラフィン切片のパラフィンの除去、非特許文献1のp.163に記載されている0.03%過酸化水素水メタノール液に20分間浸し内因性ペルオキシダーゼ活性を抑制し、リン酸緩衝液で親水化する。切片中の抗原を一次抗体で標識する。ビオチン化二次抗体を一次抗体と反応させ、ストレプトアビチン-HRP複合体で標識し、HRPと過酸化水素水とジアミノベンチジン等のカップリング色素で抗原の存在部位に呈色反応を生じさせる。ヘマトキシリン溶液で核を対比染色した後に、濃度の漸増するエタノール系列に切片を浸し脱水し、キシレンを浸透させ、カバーガラスでプラスチック溶剤を用いて封入する。

40

#### 【0008】

また、HRP標識抗FITC抗体を用いる方法は、上記非特許文献1のp.158に記載されている。これによれば、sABC法と同様に固定標本切片を親水化し、FITC標

50

識の一次抗体で抗原を標識するか、抗原と反応させた一次抗体をFITC標識二次抗体で標識し、そのFITCをHRPなどの酵素で標識した抗FITC抗体と反応させ、HRPなどの呈色反応で、抗原の検出を間接的に行う。ザイメッド社のホームページ（以下、非特許文献2という）に、商業的にこのキットの記載がある。

【0009】

また、特開2001-181299号（以下、特許文献1という）では、ポリマー試薬法が知られている。特許文献1では、ポリマーを担体として酵素（HRPなど）と抗体（蛋白）の複合体で、高感度に特異抗体で標識される物質の検出が可能との記載がある。この特許文献1の請求項13に、ポリマー試薬法の記載がある。また、上記非特許文献1のp.147に、以下に示すポリマー試薬法の実施法の記載がある。sABC法と同様に固定標本切片を親水化し、切片中の抗原を特異抗体と反応させ、二次抗体とHRP等の酵素とポリマーの複合体と反応させ、HRPなどの呈色反応で、抗原の検出を間接的に行う。商業的には、ENVISION、ChemMate ENVISIONがダコサイトメーション社から、simple stain systemがニチレイから、二次抗体の代わりに特異抗体と酵素とポリマーの複合体を用いるEPOS systemがダコサイトメーション社から供給されている。

【0010】

また、CARDは、米国特許第5,731,158号（以下、特許文献2という）に記載があり、この特許文献2では、claim 9に、ビオチン化タイラミドや蛍光標識（フルオレスシン・イソシアネート（FITC）等）タイラミドの利用の記述がある。この特許文献2の請求項9に、ビオチン化タイラミドのCARDの記載がある。上記非特許文献1のp.150-152とJ Immunol Methods, 1989（以下、非特許文献3という）では、酵素反応での特異物質の沈着を特定の物質の検出の増幅に用い、超高感度の検出が可能であるとの記載がある。また、Lab Invest.（以下、非特許文献4という）では、化学固定された組織のパラフィン切片で、抗原回復処理と〔非特許文献1〕の標識シグナルの増幅法の組み合わせ（ImmunoMax法）で、化学固定された組織のパラフィン切片では検出できなかった抗原を検出することができるとの記載がある。上記非特許文献3及び上記非特許文献4に、超高感度の免疫組織化学的染色法の以下に示す実施法の記載がある。すなわち、sABC法と同様に固定標本切片を親水化し、抗原回復し、sABC法で抗原を標識し、HRPによるビオチン化タイラミドを沈着させ、ストレプトアビチン-HRP複合体で標識増幅を行い、抗原の検出感度をsABC法の1000倍に増幅する超高感度の免疫組織化学的染色を行う方法である。この染色方法はImmunoMax法として報告され、商業的にはcatalyzed signal amplification（CSA）systemとしてダコサイトメーション社より供給されている。しかし、抗原回復による内因性ビオチンによる非特異反応は強く、非特許文献1のp164-165に記載の内因性ビオチンを0.1%アビチン溶液と0.01%ビオチン溶液に浸しマスクする方法を導入したものが開発された。そして、DENDRITIC CELLS 1997（以下、非特許文献5という）と平成10年度～平成11年度科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））研究成果報告書 HTLV-1関連疾患のHTLV-1超高感度組織科学的検出法による研究（以下、非特許文献6という）に記載のmodified ImmunoMax法が開発された。また、sABC法の代わりに、HRP標識抗FITC抗体を用いる方法に、HRPによるビオチン化タイラミドを沈着させ、ストレプトアビチン-HRP複合体で標識増幅を行い、抗原の検出感度をHRP標識抗FITC抗体を用いる方法の1000倍に増幅する超高感度の免疫組織化学的染色方法がキット化され、非ビオチン法のCSAIIとしてダコサイトメーション社から供給されている。さらに、米国特許第6,203,989号（以下、特許文献5という）では、標的核酸を標識するin-situ hybridizationの増幅したシグナルを可視化する方法として、HRP、アルカリフォスファターゼなどの酵素反応の他に、蛍光標識（フルオレスシン・イソシアネート（FITC）等）が利用できるとの記載がある。特許文献2の請求項9と特許文献5にCARDでの沈着

10

20

30

40

50

したタイラマイドの標識に、蛍光物質を使う記載がある。

【0011】

また、免疫組織化学的染色における非特異反応は、目的とする抗原以外の非特異的結合物質をも染色され、ひいては目的とする抗原として最終的に検出されてしまうという問題がある。

【0012】

このような非特異反応は、固定組織標本切片に内在する原因によるものと固定組織標本切片の処理に起因するもの、染色の各反応の試薬の問題、染色の各反応後の洗浄の問題、染色操作の問題が原因となるものがある。

【0013】

このような非特異的反応による問題を解決するために、内因性ペルオキシダーゼ活性による非特異反応の抑制方法が知られている(上記非特許文献1のp.163)。内因性ペルオキシダーゼ活性による非特異反応は、固定組織標本切片の内在する原因による非特異反応の一つである。内因性ペルオキシダーゼ活性の抑制は、固定組織標本パラフィン切片のパラフィンを除き親水化の前に、0.03%過酸化水素メタノール溶液に切片を20分間浸すか、親水化後に0.3%過酸化水素リン酸緩衝液に5分間浸して行なう。

【0014】

抗体の非特異反応は、染色の各反応の試薬の問題、染色の各反応後の洗浄の問題による非特異反応に含まれる。染色に関わる非特異的反応の問題に対して、断片化免疫グロブリン抗体を特異(一次)抗体や二次抗体に用いることで非特異反応を抑制することが知られている(米国特許第5,869,274号(以下、特許文献4という)では、特異抗体反応の前に一価の抗体を反応させることで、抗体の非特異反応を抑制できるとの記載がある。この特許文献4と上記非特許文献1のp.43)。非特許文献1のp.185に、抗体希釈液に一次抗体と対応したウマ、ヒツジ、ウサギなどの動物血清を1%から5%加えることで非特異反応を抑制することの記載がある。また、非特許文献1のp.115に、0.25%カゼイン溶液を抗体反応の前に5~30分間反応させることで非特異反応抑制することの記載がある。抗体希釈液に0.1%Tween20などの界面活性剤を添加したトリス緩衝液が商業的に供給され用いられている。

【0015】

また、抗原回復法による非特異反応は、固定組織標本切片の処理に起因するものであるが、超高感度の免疫組織化学的染色法で問題となる。その主たる原因が抗原回復された内因性ビオチンである。非特許文献1のp164-165に、0.1%アピチン溶液で、内因性ビオチンをマスクし、アピチンの残余ビオチンとの結合部を0.01%ビオチン溶液でマスクする方法の知られている。この方法をsABC法を含む超高感度の免疫組織化学的染色法に導入することも知られている(Hasui K, Sato E, Tanaka Y, Yashiki S, Izumo S. (1997) Quantitative highly-sensitive immunohistochemistry (Modified Immunomax) of HTLV-1 p40tax and p27rex proteins in HTLV-1-associated non-neoplastic lymphadenopathy (HANNL A) with estimation of HTLV-1 dose by polymerase chain reaction. DENDRITIC CELLS 1997 Japanese Dendritic Cell Society 7: 19-27. (以下、非特許文献5という。))。この非特許文献5には、〔非特許文献2〕のImmunomax法で、内因性ビオチンによる非特異反応があり、従来発表されているアピチン溶液とビオチン溶液でのビオチンのマスクを導入し、反応後の洗浄条件を変えらることで、超高感度免疫組織化学染色が可能であるとの記載がある。(蓮井和久 平成10年度~平成11年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書 HTLV-1関連疾患のHTLV-1超高感度組織科学的検出法による研究(課題番号 10670166)) (以下非特許文献6という)。この文献には、平成12年3月 p.3-9

10

20

30

40

50

では、HRPによるビオチン化タイラマイドの沈着反応による標識の増幅が1000倍であること、内印性ビオチンのマスク法の超高感度免疫染色法への至適導入部、各超高感度免疫組織科学的染色の反応後の洗浄、後固定の非特異反応抑制条件等の記載がある。

【0016】

免疫組織化学的染色法の洗浄液は、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、界面活性剤を加えたトリス緩衝液が用いられる。免疫組織化学的染色では、各反応後に、5分間3回の洗浄が行われる。非特許文献5と非特許文献6に、超高感度免疫組織化学的染色方法では、それに含まれるsABC法では十分な反応後の洗浄が必要であり、CARDのビオチン化タイラマイドの沈着は非特異なものであるため、非沈着ビオチン化タイラマイドの残留を除く洗浄と沈着ビオチン化タイラマイドのHRP標識ストレプトアビチンによる標識後のある程度 10  
の洗浄が必要になることの記載がある。また、非特許文献5と非特許文献6に、キャピラリーギャップ法の染色装置を用いた場合には、sABC法の十分な洗浄は35に加熱した界面活性剤を加えたトリス緩衝液で、HRPによるビオチン化タイラマイド沈着反応後は室温トリス緩衝液での洗浄が必要であるとの記載がある。

【0017】

一方、免疫組織化学的染色法の基準化の為に、自動免疫染色装置が普及してきている。キャピラリーギャップ法と呼ばれる2枚の固定組織標本切片のスライドガラスを向き合わせ、その間に毛細管現象を利用して反応液や洗浄液を吸い上げ、反応ないし洗浄後に吸収材で溶液を吸収する。この操作をコンピューター制御するものである。また、コンピューター制御で、反応液や洗浄液を所定の場所からマイクロポンプで吸引し、水平に配置した 20  
固定組織標本切片のスライドガラスに反応液や洗浄液を滴下する滴下型がある。この滴下型の自動免疫染色装置の染色方法は用手法と同じもので、普及して来ている。更に、加熱温度制御の出来る基盤の上に、基盤に固定組織標本切片を対面させてスライドガラスをセットし、反応液や洗浄液を基盤とスライドガラスの間に送り、温度制御下で諸反応と洗浄を行う自動免疫装置も出現している。

【0018】

自動免疫染色装置は、コンピューター制御下の装置で、組織化学的染色方法を実施するものである。組織標本の切片を貼付したスライドの装置へのセットの方法で、二枚のスライドを狭い間隙で重ね、その間に毛細管現象で反応試薬等が入ってくるキャピラリーギャップ法とその変法、スライドに反応試薬等を滴下する滴下型がある。また、免疫組織染色 30  
方法の各反応の時間、各反応後の洗浄の方法等をコンピューターのプログラムとして供給されているものと、各反応の試薬の各スライドへの分配、各反応の時間、各反応後の洗浄方法を、任意に設定できるものがある。前者は、特定の免疫組織化学的方法を実施するもの(固定型装置)であり、一般に、その試薬や洗浄液等が共に供給されることが多い。後者は、その使用者の設定した免疫組織化学的染色法を実施させることが可能なもの(自由型装置)がある。米国特許第6,349,264号(以下、特許文献3という)では、コンピューター制御による水平に配列したスライドへの滴下方式での自動免疫染色装置の記載がある。この特許文献3に、この自由型装置の記載がある。また、Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2001 Mar(以下、非特許文献7という)では、抗原回復を加熱式攪拌装置での熱処理による抗原回復法と従来発 40  
表されているアビチン溶液とビオチン溶液でのビオチンのマスクを導入した超高感度免疫染色法(CSA法)の自動免疫染色装置での実施が可能であるとの記載がある。この非特許文献7には、この自動免疫染色装置での超高感度の免疫組織化学的染色が可能であると記載されている。<http://www.ventanadiscovery.com/product/index.html>(以下、非特許文献8という)では、加熱温度制御の出来る基盤の上に、基盤に対応する面に固定組織標本切片が来る形でスライドガラスをセットし、反応液や洗浄液を基盤とスライドガラスの間に送り、温度制御下で諸反応と洗浄を行う自動免疫装置(The Ventana Discovery)の記載がある。この非特許文献8には、加熱温度制御の出来る基盤の上に、基盤に対面して固定組織標本切片のスライドガラスをセットし、反応液や洗浄液を基盤とスライドガラスの間に送り 50

、温度制御下で諸反応と洗浄を行う自動免疫装置の記載がある。

【0019】

【特許文献1】特開2001-181299号公報(株式会社ニチレイ、平成13(2001)年7月3日、酵素-タンパク質複合体)。

【特許文献2】米国特許第5,731,158号公報明細書(Bobrow, et al. March 24, 1998, Catalyzed reporter deposition)。

【特許文献3】米国特許第6,349,264号公報明細書(Rhett, et al. February 19, 2002 Method and apparatus for automatic tissue staining)。

10

【特許文献4】米国特許第5,869,274号公報明細書(Tsao, et al. February 9, 1999 Immuno-histochemical method that reduces background staining)。

【特許文献5】米国特許第6,203,989号公報明細書(Goldberg, et al. March 20, 2001 Methods and compositions for amplifying detectable signals in specific binding assays)。

【非特許文献1】改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法 名倉宏、長村義之、堤寛編 学際企画 200002.2.18 発刊

20

【非特許文献2】ザイメッド社のホームページ(<http://www.zymed.com/>)のNBA kit(非ビオチン法のキット)のページ(<http://www.zymed.com/pindex/index9.html>)

【非特許文献3】Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ, Litt GJ. Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. J-Immunol-Methods. 1989 Dec 20; 125(1-2): 279-85。

【非特許文献4】Merz H, Malisius R, Mannweiler S, Zhou R, Hartmann W, Orscheschek K, Moubayed P, Feller AC (1995) ImmunoMax. A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens. Lab Invest. The United States and Canadian Academy of Pathology. LWW, Lippincott Williams and Wilkins publishers 1995 Jul; 73(1): 149-56。

30

【非特許文献5】Hasui K, Sato E, Tanaka Y, Yashiki S, Izumo S. (1997) Quantitative highly-sensitive immunohistochemistry (Modified ImmunoMax) of HTLV-1 p40tax and p27rex proteins in HTLV-1-associated non-neoplastic lymphadenopathy (HANNLA) with estimation of HTLV-1 dose by polymerase chain reaction. DENDRITIC CELLS 1997 Japanese Dendritic Cell Society 7: 19-27。

40

【非特許文献6】蓮井和久 平成10年度~平成11年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書 HTLV-1関連疾患のHTLV-1超高感度組織科学的検出法による研究(課題番号 10670166)。

50

【非特許文献7】Hashizume K, Hatanaka Y, Kami hara Y, Tani Y. Automated immunohistochemical staining of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a catalyzed signal amplification method. Appl-Immunohistochem-Mol-Morphol. 2001 Mar; 9(1): 54-60。

【非特許文献8】<http://www.ventanadiscovery.com/product/index.html>。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0020】

しかしながら、sABC法とCARDによる超高感度の免疫組織化学的染色法は、非特許文献5、非特許文献6に記載された内因性ビオチンのマスク法を導入し、更に、非特許文献6に記載された自動免疫染色装置への導入が行われているが、この内因性ビオチンのマスクでは内因性ビオチンによる非特異反応の抑制は完全には達成できない。ここで、内因性ビオチンとは、組織切片中の細胞等に分布するビオチンを意味する。このような内因性ビオチンは、ある程度各組織の細胞中に存在するが、特に、内因性ビオチンの含有量が高いのは、肝臓や甲状腺である。この内因性ビオチンによる非特異反応を回避すべく開発され非特許文献1のp.158と非特許文献2に記載された非ビオチン法とCARDによる超高感度の免疫染色法の抗原検出感度は、sABC法とCARDによる超高感度の免疫組織化学的染色の方法より低いという問題も存在する。

【0021】

そこで、本発明は、検出感度を落とすことなく、内因性ビオチン等による非特異反応の抑制を達成し超高感度の免疫組織化学的染色方法による抗原の検出方法を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0022】

本発明者は、非特異的反応の抑制に着目し鋭意研究の結果、2次抗体とHRPとのポリマー試薬反応を特異抗体の標識に導入することで、上記課題を解決した。

【0023】

すなわち、本発明の抗原の検出方法は、固定組織標本切片中の抗原を検出する超高感度の免疫組織化学的染色方法による抗原の検出方法であって、前記抗原と一次抗体とを結合させて、二次抗体及び西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下、HRPともいう)を含むポリマー複合体と、前記結合した一次抗体とを結合させて、前記西洋ワサビペルオキシダーゼによる標識タイラミドの沈着反応の標識物を可視化することによって、抗原を検出することを特徴とする。

【0024】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体との反応前に、非特異反応を抑制する処理を行うことを特徴とする。

【0025】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体との反応後に、非特異反応を抑制する処理を行うことを特徴とする。

【0026】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記標識タイラミドの沈着反応前に、非特異反応を抑制する処理を行うことを特徴とする。

【0027】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記非特異反応を抑制する処理が、二次抗体と同種の動物血清による処理、スキンミルクによる処理、ノンファットミルクによる処理、及びガゼイン溶液による処理からなる群から選択される少なくとも

10

20

30

40

50

1種であることを特徴とする。

【0028】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記カゼイン処理を、0.025～2.5%の範囲のカゼインを含む溶液により行なうことを特徴とする。

【0029】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、さらに、非特異反応生成物、及びその他の残存反応物を除去するために、加熱した洗浄液によって洗浄する工程を含む、ことを特徴とする。

【0030】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記加熱した洗浄液の温度が、25～60の範囲内であることを特徴とする。 10

【0031】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記標識物が、可視化することができる物質であることを特徴とする。

【0032】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、前記可視化することができる物質が、ビオチン、蛍光物質の少なくとも一つを含むものであることを特徴とする。

【0033】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、蛍光物質が、フルオレスセンス・イソシアネートであることを特徴とする。 20

【0034】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、反応液、反応時間、及び洗浄回数をプログラムして自動免疫装置に組み込み、自動化して行なうことを特徴とする。

【発明の効果】

【0035】

西洋ワサビペルオキシダーゼによる標識タイラマイドの沈着反応(CARD)とその標識物の検出を含む超高感度の免疫組織化学的染色法の抗原検出感度は、CARDの前に実施する間接的免疫組織化学的染色法の1000倍となる。現在の光顕的免疫組織化学的染色で検出されている蛋白等は、病態での異常高発現ないし生理的に多量に存在するものであるとの理解がある。超高感度免疫組織化学的染色法の光顕的免疫組織化学的染色への導入は、特異な微量蛋白の検出や生理的な蛋白の発現の検出を可能にすることが期待されている。 30

【0036】

本発明は、超高感度の免疫組織化学の実用への大きな契機となると考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0037】

まず、本発明の抗原の検出方法について概略を説明すれば、以下のようになる。

【0038】

基本的には、抗原回復処理(この処理は必須ではないが、抗原の抗原性をより高め、ひいては、目的抗原を検出しやすくするのに用いられる。)、洗浄、内因性ペプオキシダーゼ活性の抑制、特異抗体反応(一次抗体と第一抗原との抗原抗体反応)、前記抗原抗体反応した一次抗体と酵素を含む二次抗体との結合(複合体の形成)、第一抗原の同定、の各工程からなる。この工程中に、適宜洗浄、非特異反応抑制処理を行いより高感度な検出を可能にせんとするものである。 40

【0039】

本発明の抗原の検出方法は、固定組織標本切片中の抗原を検出する超高感度の免疫組織化学的染色方法による抗原の検出方法である。ここで、固定組織(パラフィン包埋)標本切片について説明すると、固定組織(パラフィン包埋)標本とは、生物組織から切り出され、固定化された標本のことで、例えば、10%緩衝ホルマリン液等で化学固定され、濃度が漸増するエタノール溶液系列で水分が除かれ、100%キシレン等で浸透され、60 50

前後の溶解したパラフィン等の溶液で浸透され、低温下でパラフィン等で固化された標本をいう。固定組織（パラフィン包埋）標本切片は、通常、薄切装置で作成されたその標本の3ミクロン前後の厚さの切片で、適切に処理されたスライドに貼付されている。固定組織パラフィン標本切片が免疫組織化学的染色に供される時には、100%キシレンに浸透することでパラフィンを除き、100%エタノールでそのキシレンを置換した後に、リン酸緩衝液等に浸透して、親水化される。

【0040】

内因性ペルオキシダーゼ活性の抑制は、化学固定やその後の組織の処理でも活性を失わない組織中の細胞の有するペプオキシダーゼの活性を抑制するものであり、たとえば、以下の処理を行なう。固定組織パラフィン標本切片から100%キシレンでパラフィンを除き、キシレンを100%エタノールで除いた後に、0.03~1%過酸化水素メタノール溶液に10~30分間浸すか、固定組織パラフィン標本切片を親水化した後に、1~5%過酸化水素含有0.01Mリン酸緩衝食塩水pH7.2に5~10分間浸す。これは、非特許文献1のp113、非特許文献5及び6、並びに、ダコサイトメーション社から供給されているCSAキットにも含まれている。

10

【0041】

また、本発明は、2次抗体とHRPとのポリマー試薬とその非特異反応抑制処理（例えば、カゼイン溶液による前処理）を超高感度免疫組織化学的染色法のsABC法と置換することにより、新規な検出感度を低下させずに内因性非特異反応の無い超高感度免疫組織化学的染色法を開発したものであるともいえる。

20

【0042】

次に、本発明の方法の原理について説明すれば、以下のようになる。本発明を含む免疫組織化学的染色法で形成され光学顕微鏡下で識別される産物の概念図を図1に示す。従来のsABC法とCARDと沈着したビオチン化タイラマイドの可視化による超高感度の免疫組織化学的染色法で産生される光学顕微鏡で識別される産物は、抗原、一次抗体、ビオチン化二次抗体、HRP標識ストレプトアビチンで形成される複合体の周囲にCARDで沈着したビオチン化タイラマイドとそれを標識したHRP標識ストレプトアビチンとそのHRPの呈色産物（ジアミノベンチジン）から構成される。

【0043】

一方、本発明の超高感度の免疫組織化学的染色の産物は、抗原、一次抗体、二次抗体とHRPとポリマーで形成される複合体の周囲にCARDで沈着したビオチン化タイラマイドとそれを標識したHRP標識ストレプトアビチンとそのHRPの呈色産物（ジアミノベンチジン）から構成される。従って、この発明の超高感度の免疫組織化学的染色の産物は構成が従来のものとは異なる新規なものである。すなわち、本願発明の1つの特徴として、二次抗体として、ビオチン化していないものを使用した点にある。これは、本発明者の鋭意研究の結果、ビオチン化した二次抗体を用いると検出反応が余分に生じ、工程が増えるということ、当該ビオチン化二次抗体のビオチンによって非特異反応が生じること、からである。すなわち、ビオチン化二次抗体を用いない場合には、工程が簡略化され、さらには、抗原の検出感度に影響を及ぼす非特異反応を抑制するという利点を有する。

30

【0044】

本発明においては、固定組織標本切片中の抗原と一次抗体とを結合させて、二次抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼとのポリマー複合体と、前記結合した一次抗体とを結合させて、前記西洋ワサビペルオキシダーゼによる標識タイラマイドの沈着反応の標識物を可視化することによって、抗原を検出する。ここで、二次抗体及び西洋ワサビペルオキシダーゼを含むポリマー複合体を用いたのは、上述のように従来のビオチン化二次抗体によるビオチンの使用による弊害を除去しようとするものである。西洋ワサビペルオキシダーゼによる標識タイラマイドの沈着反応については、常法により、特に限定されるものではない。

40

【0045】

また、沈着反応の標識物は、免疫染色された標本の観察に光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、又

50

はレーザー共焦点顕微鏡などが用いられるという観点から、可視化できる物質が好ましい。また、好ましい実施態様において、前記可視化することができる物質が、ビオチン、蛍光物質の少なくとも一つを含むものを挙げることができる。また、蛍光物質としては、フルオレスセンス・イソシアネ-を挙げることができる。

【0046】

本発明においては、適宜非特異反応抑制処理を行なうことが好ましい。これは、当該非特異反応抑制処理によって、一次抗体と非特異的に結合する非特異的結合物質へ被膜し、前記一次抗体と非特異的結合物質との結合を抑制することが可能である。

【0047】

ここで、非特異反応抑制処理とは、広く、一次抗体と、非特異反応結合物質との結合を抑制する処理を意図し、このような作用があれば、特に限定されるものではない。このような非特異反応抑制処理として、例えば、カゼインによる処理、二次抗体と同種の動物血清、スキンミルク乃至ノンファットミルク、からなる群から選択される少なくとも1種を挙げることができる。スキンミルク、ノンファットミルクは、特に血清中の酵素等の活性を避ける為にも用いることができる。

【0048】

また、前記カゼイン処理を、0.025~2.5%の範囲のカゼインを含む溶液により行なうことが好ましい。このような範囲としたのは、さらに好ましくは、0.1~1.0%の範囲、最も好ましくは、0.25%±0.1%である。

【0049】

非特異反応を抑制する処理は、好ましくは、前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体との反応前、前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体との反応後、前記標識タイラマイドの沈着反応前に行う。それぞれ、前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体の反応の前での非特異的反応を抑制する処理は、一次抗体を抗原として二次抗体の特異な抗原抗体反応のみを反応産物として残し、後者は標識タイラマイドの異化反応を生じる部位をポリマー複合体の西洋ワサビペプオキシダーゼ存在部に限定し、異化標識タイラマイドの沈着を西洋ワサビペルオキシダーゼ存在部に限局させるという観点からである。

【0050】

本発明の抗原の検出方法では、さらに、非特異反応生成物、及びその他の残存反応物を除去するために、加熱した洗浄液によって洗浄する工程を含んでもよい。

【0051】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、さらに、非特異反応生成物、及びその他の残存反応物を除去するために、加熱した洗浄液によって洗浄する工程を含む。この工程において、非特異的反応生成物及び残存反応物を除去することができる。また、前記加熱した洗浄液の温度が、25~60の範囲内であることを特徴とする。かかる温度範囲では、抗原抗体反応が起こり、ひいては、非特異的反応生成物及び残存反応物の十分な除去が可能となる。

【0052】

また、本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様において、反応液、反応時間、及び洗浄回数をプログラムして自動免疫装置に組み込み、自動化して行なうことができる。

【0053】

すなわち、市販の自動免疫組織化学的染色装置に、上記反応液、反応時間、及び洗浄回数などの情報をプログラムして導入し、自動化して行なうことができる。

【実施例】

【0054】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明は、下記実施例に限定して解釈される意図ではない。

【0055】

本発明の超高感度の免疫組織化学的染色法は、次ぎの16工程により実施する。固定組織パラフィン切片を、

10

20

30

40

50

- キシレンとエタノールにそれぞれ3～5回、3～20分間浸すことでパラフィンを除き、
- 2) 0.3～6% 過酸化水素水メタノール溶液に5～30分間浸し、一次の内因性ペルオキシダーゼの活性の抑制を行い、
- 3) 0.005～0.02Mリン酸緩衝液0.5～1%塩化ナトリウム溶液(PBS)で洗浄し、固定組織標本切片の親水化を行い、
- 4) 抗原に対応した抗原回復処理(一般的には、0.001～0.02Mクエン酸緩衝液等に切片を浸し、オートクレーブで110～140℃、1～15分間の熱処理を行い、冷却後に、PBSに浸す。)を行い、
- 5) 自動免疫染色装置に固定組織標本切片を配置し、
- 6) 0.3～6%過酸化水素水PBSに1～15分間反応させ、二次の内因性ペルオキシダーゼの活性の抑制を行い、25～60℃に加熱した0.01～0.2%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート(tween 20)を含む0.5～1%塩化ナトリウムを加えた0.01～0.1Mトリス緩衝液(TBS)洗浄液で1～4回洗浄し、
- 7) 0.1～1%カゼイン溶液に2～30分間反応させ、抗原特異(一次)抗体の非特異反応の抑制前処理を行い、
- 8) それぞれ一次抗体の至適希釈溶液と至適反応時間(13分間～2時間)で反応させた後、25～60℃に加熱したTBS洗浄液で2～5回洗浄し、
- 9) 0.1～1%カゼイン溶液に2～30分間反応させ、特異ポリマー試薬反応の非特異反応の抑制前処理を行い、
- 10) ポリマー試薬を10分間～1時間反応させ、25～60℃前後に加熱したTBS洗浄液で2～5回洗浄し、
- 11) 0.1～1%カゼイン溶液に2～30分間反応させ、ビオチンないし蛍光物質で標識されたタイラミド試薬反応の非特異反応の抑制処理を行い、
- 12) ビオチンないし蛍光物質で標識されたタイラミド試薬と10～30分間反応させ、25～60℃前後に加熱したTBS洗浄液で2～4回洗浄し、
- 13) ストレプトアビチンないし蛍光物質と特異的に反応する抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素ないし蛍光物質の複合体溶液と10分間～1時間反応させ、25～60℃前後に加熱したTBS洗浄液で2～4回洗浄する。
- 【0056】
- 14) 対応した酵素の発色剤(HRPであればジアミノベンチジン等と過酸化水素)の溶液で呈色反応させ、水で1～3回洗浄し、
- 15) ヘマトキシン等の溶液で、後対比染色を行い、水で1～3回洗浄し、
- 16) 自動免疫染色装置から固定組織標本切片を外し、
- 17) 封入剤に対応した処理を行い、超高感度免疫染色を行った固定組織標本パラフィン切片を永久標本とし、光学顕微鏡下での抗原の検出となる。
- 【0057】
- 11)の過程で、蛍光物質で標識したタイラミド試薬を12)で用いる場合には、0.1～1%カゼイン溶液に2～30分間反応させ、ビオチンないし蛍光物質で標識されたタイラミド試薬反応の非特異反応の抑制処理を行なった後、25～60℃に加熱したTBS洗浄液で、1～3回洗浄する。
- 【0058】
- 13)の過程で、ストレプトアビチンないし蛍光物質と特異的に反応する抗体と蛍光物質の複合体溶液を用いる場合、その後に、蛍光物質による核等の対比染色を実施するか、実施せずに、染色は終了し、蛍光顕微鏡下での抗原の検出となる。
- 【0059】
- 本発明として、別法により一次抗体を反応させ、洗浄した後に、工程9から工程13を実施することが重要な点である。
- 【0060】
- 自動化としては、工程5から工程15までの各反応液、反応時間、洗浄回数をプログラムして自動免疫染色装置に組み込み、染色を基準化することを挙げることができる。

10

20

30

40

50

## 【0061】

< 発明の実施の形態の溶液等の説明 >

< キシレン >

キシレンは、特級キシレンを用いる。

< エタノール >

エタノールは、特級エタノールを用いる。

## 【0062】

< 0.3% 過酸化水素水メタノール溶液 >

特級過酸化水素水（30%溶液）を、特級メタノールで100倍希釈したものをを用いる。

## 【0063】

< 0.01Mリン酸緩衝液0.85%塩化ナトリウム溶液（PBS） >

28.7gのリン酸水素第二ナトリウム・12水と3.3gのリン酸第二水素ナトリウム二水和物を1Lのイオン交換水に溶解した0.1Mリン酸緩衝液に、85gの塩化ナトリウムを加え、オートクレーブで完全に溶解し室温まで冷却し、10N水酸化ナトリウム水でpHを7.6に調整したものを10倍溶液として、使用時に10倍にイオン交換水で希釈する。

## 【0064】

< 0.01Mクエン酸緩衝液等 >

2.1gのクエン酸・一水和物と2.94gクエン酸三ナトリウム・二水和物を100 mlのイオン交換水にオートクレーブで加熱し溶解し、10N水酸化ナトリウム水でpHを6.0に調整し、イオン交換水で100mlに調節したものを10倍溶液とし、使用時に10倍にイオン交換水で希釈する。商業的には、10倍溶液がDakoCytomation Co.やダイヤトロンから供給されている。その他に、抗原回復には、

【非特許文献7】のp.114に記載されている1mM EDTA溶液 pH 8.0、などが用いられ、Dako Cytomation Co.から供給されている。

## 【0065】

< 3% 過酸化水素水PBS >

特級過酸化水素水（30%溶液）を、28.7gのリン酸水素第二ナトリウム・12水と3.3gのリン酸第二水素ナトリウム二水和物を1Lのイオン交換水に溶解した0.1Mリン酸緩衝液に、85gの塩化ナトリウムを加え、オートクレーブで完全に溶解し室温まで冷却し、10N水酸化ナトリウム水でpHを7.6に調整したものを10倍溶液として、使用時に10倍にイオン交換水で希釈する0.01Mリン酸緩衝液0.85%塩化ナトリウム溶液（PBS）で100倍に希釈する。

## 【0066】

< 35 前後に加熱した0.1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（tween 20）を含む0.825塩化ナトリウム加0.05Mトリス緩衝液（TBS）洗浄液 >

121.1gのトリスヒドロキシメチルアミノメタン（シグマ社）を800mlのイオン交換水で希釈しオートクレーブで加熱溶解後に、1N塩酸でpHを7.5に調整し、イオン交換水で1Lにした1Mトリス溶液500mlと、292.2gの塩化ナトリウムを800mlのイオン交換水でオートクレーブ加熱溶解しイオン交換水で1Lにした5M塩化ナトリウム溶液360mlを、イオン交換水で20Lに希釈し、0.1%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（tween 20）とした溶液。自動免疫染色装置の洗浄液タンクに入れて、35 前後に加熱したものである。

## 【0067】

< 0.25% カゼイン溶液 >

25mgのカゼイン（シグマ社）を28.7gのリン酸水素第二ナトリウム・12水と3.3gのリン酸第二水素ナトリウム二水和物を1Lのイオン交換水に溶解した0.1Mリン酸緩衝液に、85gの塩化ナトリウムを加え、オートクレーブで完全に溶解し室温まで冷却し、10N水酸化ナトリウム水でpHを7.6に調整したものを10倍溶液として、使用時に10倍にイオン交換水で希釈する0.01M PBSの10 mlに希釈したものを。商業的には、DakoCytomation Co.から供給されている。

## 【0068】

10

20

30

40

50

## &lt; ポリマー試薬 &gt;

デキストランポリマーに直接二次抗体とHRPを結合させた試薬で、DakoCytomation Co.から商業的にダコ ChemMate ENVISION試薬として供給されている。

【 0 0 6 9 】

## &lt; ビオチンないし蛍光物質で標識されたタイラマイド試薬 &gt;

ビオチン化タイラマイドと過酸化水素水の試薬で、DakoCytomation Co.からはダコCSA Systemの増幅試薬として、パーキンエルマーライフサイエンスジャパン株式会社からはTSA免疫組織化学染色・in situ Hybridization増感システムのキットの増幅試薬として供給されている。

【 0 0 7 0 】

## &lt; ストレプトアビチンと西洋ワサビペルオキシダーゼ等の酵素ないし蛍光物質の複合体溶液 &gt;

ビオチンないし蛍光物質で標識されたタイラマイド試薬に対応した沈着したタイラマイドを標識する試薬。HRP標識タイラマイドであればストレプトアビチンと西洋ワサビペルオキシダーゼ等複合体溶液は、DakoCytomation Co.からはダコCSA Systemの酵素標識試薬として供給されている。パーキンエルマーライフサイエンスジャパン株式会社からはTSA免疫組織化学染色・in situ Hybridization増感システムのキットの酵素や蛍光物質標識試薬として供給されている。

【 0 0 7 1 】

## &lt; 対応した酵素の発色剤（HRPであればジアミノベンチジン等と過酸化水素）の溶液 &gt;

酵素の発色基質溶液。商業的に、種々のものが供給されている。

【 0 0 7 2 】

## &lt; ヘマトキシリン等の溶液 &gt;

上記の発色色素と区別できる色素溶液を用いた核ないし細胞質の染色で、後対比染色を行う。一般的には、ヘマトキシリン溶液が用いられる。DakoCytomation Co.から自動免疫染色装置での染色用にダコ ChemMateヘマトキシリン試薬が供給されている。

【 0 0 7 3 】

## &lt; 封入剤に対応した処理 &gt;

発色基質に合わせて、ジアミノベンチジンであれば、エタノール系列に浸しての脱水後に、プラスチック封入剤で封入し、長期の保存に耐える永久標本を作成する。3-アミノ-9-エチルカルバゾールでの発色では、DakoCytomation Co.から供給されるUltramount試薬で、70 °Cでの加熱固化で永久標本を作成する。ベクター社の種々の発色基質では、冷風による乾燥後に、VectaMount封入剤で封入し乾燥固化し、永久標本を作成する。

【 0 0 7 4 】

## 実施例 1

sABC法とHRPによるCARD反応とその検出からなる超高感度免疫組織化学の方法(DAKO CSA system, DakoCytomation Co)を自動免疫染色装置で実施し、各反応後の洗浄に、35 °C加熱0.1% tween20界面活性剤添加トリス緩衝液(TBS)洗浄液を用い、洗浄回数と洗浄効果の関係の検討を行った。その結果、sABC法の各洗浄は35 °C加熱0.1% tween20界面活性剤添加TBSによる三回の洗浄が、HRPによるCARD反応とその検出の反応後の洗浄は35 °C加熱0.1% tween20界面活性剤添加TBSによる二回の洗浄が、至適な洗浄であることが示された。

【 0 0 7 5 】

## 実施例 2

洗浄は実施例 1 で示した至適洗浄法で、従来の超高感度の免疫組織化学の方法を種々の臓器の固定組織パラフィン標本切片で自動免疫染色装置を使い実施した。

【 0 0 7 6 】

1) 熱処理にて抗原回復を行わない固定組織パラフィン標本切片では、従来の超高感度免疫組織化学の方法で一次抗体反応を省くと、陽性反応を認めない。図 2 の 1 と 2 に、ヒト扁桃組織固定パラフィン標本切片で、抗原回復処理を行わず、一次抗体反応を省いて、従来の超高感度の免疫組織化学的染色を自動免疫染色装置での実施例を示す。全く非特異

10

20

30

40

50

陽性所見を認めない。

【0077】

2) 0.01Mクエン酸緩衝液pH 6.0に切片を浸し、オートクレーブで121 5分間の加熱処理での抗原回復を行い、従来の超高感度免疫組織化学の方法で一次抗体反応を省いて実施したが、図2の3に示すように、強い内因性ビオチンによる非特異反応を認める。

【0078】

3) 抗原回復を加熱型攪拌器を用い94 40分間の熱処理での抗原回復を行い、同様の実施で、図2の4に示すように、内因性ビオチンによる非特異反応を認める。図2の3に示すオートクレーブでの抗原回復例と比べて、非特異反応は弱い、特異反応の評価に問題となる非特異反応である。

10

【0079】

4) 前記も加熱型攪拌器を用いた抗原処理を行い、緩衝10%ホルマリン溶液で後固定30分間行い、同様に従来の超高感度免疫組織化学の方法で一次抗体反応を省き実施した所、図2の5に示すように、内因性ビオチンによる非特異反応は消失した。しかし、一次抗体に増殖細胞の核を標識する抗Ki67抗原抗体溶液を用いて、前記も加熱型攪拌器を用いた抗原処理を行い、緩衝10%ホルマリン溶液で後固定30分間行い、同様に従来の超高感度免疫組織化学の方法を実施し、図2の6に示すように、極少数の核が陽性を示したのみであった。抗原回復した抗原が緩衝10%ホルマリン溶液での後固定で再度マスクされていることが判明した。

【0080】

従って、従来の超高感度免疫組織化学の方法の根本的な非特異反応の抑制の方法が必要となった。

20

【0081】

緩衝10%ホルマリン溶液は、リン酸一ナトリウム・2水塩4gとリン酸二ナトリウム・12水塩26gをイオン交換水900mlに溶解し、特級ホルムアルデヒド液(ホルマリン)100mlを加えて作成する。

【0082】

後固定とは、固定組織パラフィン標本切片は、作成の過程で初めに化学固定されているが、パラフィンを除き親水化してから、再度、化学固定することである。

【0083】

抗Ki67抗原抗体溶液は、Ki-67 Antigen, MIB-1 (マウス単クローン抗体) (DakoCytomation Co. M7240)のダコ抗体希釈溶液での50倍希釈溶液である。

30

実施例3

【0084】

二次抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼとポリマーとの複合体によるポリマー法の抗原検出感度を検討した。従来の超高感度の免疫組織化学的染色方法に組み込まれているsABC法を対照とした。

【0085】

検索に用いた固定組織パラフィン標本切片は、ヒトT細胞親和性ウイルス1型(HTLV-1)関連のMT-1細胞株のセルブロック標本である。用いた一次抗体は、HTLV-1の関連蛋白であるp40Tax蛋白のラット単クローン抗体(WATM-1, 琉球大学の田中勇悦教授より供与)を用い、100倍、500倍、1000倍にダコ抗体希釈液で希釈した溶液を用いた。検討したポリマー法は、抗ラット免疫グロブリン抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼを短いポリマーと複合体を用いるもの(表1の2)、ダコChemMate ENVISION(表1の3)、ダコENVISION+(抗マウス一次抗体用)(表1の4)、ニチレイ(ザイメット社)のヒストファイン・シンプル・ステイン・マルチ(ペルオキシダーゼ標識)(Histofine Simple Stain, MULTI (P0)、表1の5)である。sABC法と対比して、結果を表1に示す。ポリマー法の全てが、sABC法と比較して背景の非特異反応が少なかった。抗ラット免疫グロブリン抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼを短いポリマーと複合体を用いるもの(表1の2)がほぼsABC法と同等の抗原検出感度を示した。抗マウス免疫グロブリン抗体のラット免疫グロブリンとの交叉反

40

50

応で陽性像を示す他のポリマー法では、ダコChemMate EnVision(表1の3)がsABC法とほぼ同様の検出感度であった。ダコChemMate EnVision(表1の3)とダコEnVision+(抗マウス一次抗体用)(表1の4)の抗原検出感度の差は、ダコChemMate EnVision(表1の3)より短いポリマーを用いていることに起因している可能性が示唆された。図3に、それぞれの100倍希釈一次抗体溶液での染色結果を示す。

【0086】

<セルブロック標本>

セルブロック標本は、大量に培養した細胞ないし採取された細胞を試験管に集め、500rpmで10秒程、フラッシュ遠沈し、細胞集塊を作り、それに、10%緩衝ホルマリン溶液を注ぎ30分間固定し、この固定された細胞集塊を組織と同様に処理し、パラフィン包埋標本を作成した。

【0087】

<ダコChemMate ENVISION>

ダコChemMate ENVISION(K5027)は、商業的に供給されているポリマー法の一つであり、自動免疫染色装置での染色を前提に供給されている。ダコEnVisionより抗原検出感度が高いとされている。

【0088】

<ダコENVISION+(抗マウス一次抗体用)>

ダコENVISION+(抗マウス一次抗体用)(K4006は、商業的に供給されているポリマー法である。チレイ(ザイメット社)のヒストファイン・シンプル・ステイン・マルチニチレイ(ザイメット社)のヒストファイン・シンプル・ステイン・マルチ(ペルオキシダーゼ標識)(Histofine Simple Stain, MULTI(PO)、424154)は、商業的に供給されているポリマー法である。

【0089】

【表1】

MT-1細胞のセルブロックホルマリン固定パラフィン包埋標本切片を用いたポリマー法の抗原検出感度の検討

一次抗体溶液	1	2	3	4	5
陰性コントロール	#1	-	-	-	-
WATM-1					
x100	10+	9+	8+	7+	7+
x500	2+	4+	3+	2+	1+
x1000	1+	2+	1+	1+	-

表中の記号は次のことを表す。

- 1: 抗ラット免疫グロブリンビオチン化二次抗体を用いたsABC法
- 2: 抗ラット免疫グロブリンと西洋ワサビペルオキシダーゼとより短いポリマーの複合体によるポリマー法
- 3: ダコ ChemMate ENVISION
- 4: ダコ ENVISION+ (抗マウス)
- 5: ニチレイ Histofine Simple Stain MULT(PO)

陰性コントロール: ダコ陰性コントロール溶液

WATM-1: 抗ヒトT細胞親和性ウイルス1型 p40Tax 蛋白抗体(ラット単クローン抗体、田中勇悦琉球大学教授供与)

x100, x500, x1000: ダコ ChemMate 抗体希釈液で100倍、500倍、1000倍に希釈した一次抗体溶液を使用

評価法 (10+: 多くの細胞が強い陽性像を示す。9+: 多くの細胞が明瞭な陽性像を示す。8+: 多くの細胞が陽性像を示す。7+: 相当多くの細胞が陽性像を示す。6+: 中程度の細胞が陽性像を示す。5+: 少数の細胞が陽性像を示す。4+: 少数の細胞が薄い染色増を示す。3+: 極少数の細胞が陽性像を示す。2+: 極少数の細胞が薄い陽性像を示す。1+: 極少数の細胞が極めて薄い陽性像を示す。 -: 陽性細胞を認めない。 #1: 非特異反応を認める。)

【0090】

次に、ヒト扁桃組織の固定組織パラフィン標本切片を用い、0.01Mクエン酸緩衝液pH6.0

に浸しオートクレーブでの熱処理による抗原回復を行い、一次抗体は抗Ki67抗原抗体溶液でKi-67 Antigen, MIB-1 (マウス単クローン抗体) (DakoCytomation Co. M7240)をダコ抗体希釈溶液での50倍に希釈した溶液を用い、sABC法とダコChemMate EnVisionを実施した。その染色像を、図4に示す。sABC法(図4の1、3、5)とダコChemMate EnVision(図4の2、4、6)は、ややsABC法が強いがほぼ同様の陽性像を示した。

【0091】

従って、ウサギ、マウス、ラットの一次抗体の利用の観点から、sABC法と同等の抗原検出感度を有し、超高感度の免疫組織化学的染色方法にsABC法に代わって組み込めるのはダコChemMate EnVisionポリマー法である。

【0092】

実施例4

本発明の超高感度免疫組織化学的染色を、ヒト扁桃固定組織パラフィン標本切片を用い、0.01Mクエン酸緩衝液pH6.0に浸しオートクレーブでの熱処理による抗原回復を行い、一次抗体は抗Ki67抗原抗体溶液でKi-67 Antigen, MIB-1 (マウス単クローン抗体) (DakoCytomation Co. M7240)をダコ抗体希釈溶液での50倍に希釈した溶液を用い、実施した。

【0093】

固定の良好な切片の領域では、リンパ球と扁平上皮の増殖細胞の核が標識された(図5の1、2、3)。一方、固定の余り良くない領域では、背景の非特異反応が強く出現した(図5の4と5)。20%緩衝ホルマリン溶液で化学固定された組織パラフィン標本切片では、良好な染色結果が得られた(図5の6)。

【0094】

従って、本発明の超高感度免疫組織化学的染色法で、固定の良好である固定組織パラフィン標本切片では、非常に背景の非特異反応の少ない染色が可能であることが示された。

【0095】

実施例5

次に、非特異反応を、さらに抑制する方法を見出すべく、種々の比較試験を行なった。

【0096】

上記実施例に記載のポリマー法導入の超高感度免疫染色で、catalyzed reporter deposition (CARD)/catalyzed signal amplification (CSA)反応を、ビオチン化タイラミド反応とストレプトアビチン-HRP複合体反応による増幅反応とフルオレスセンス・イソチオネート(FITC)-タイラミド反応とHRP標識抗FITC抗体反応による増幅反応を比較した。

【0097】

図6は、陰性コントロール染色でのビオチン化タイラミド法とフルオレスセンス・イソチオネート(FITC)-タイラミド法の比較(ヒト虫垂組織)を示す。まず、10%ホルマリン液固定パラフィン包埋ヒト虫垂粘膜組織標本切片を、0.01Mクエン酸緩衝液によるオートクレーブ121 5分間で抗原回復前処理を行い、一次抗体反応を省いた後に、aはポリマー法、ビオチン化タイラミド反応、ストレプトアビチン-HRP複合体反応による増幅反応、DAB過酸化水素呈色反応を行い、ヘマトキシリン核染色を行った。bはポリマー法、FITC-タイラミド反応とHRP標識抗FITC抗体反応による増幅反応、DAB過酸化水素呈色反応を行い、ヘマトキシリン核染色を行った。その結果、共に、ヒト虫垂粘膜組織の腺上皮に非特異反応を示した。しかし、bの方が、非特異反応は弱かった。この反応はビオチンによるものではなく、異化タイラミドの非特異沈着反応によるものであり、ビオチンはC12H16N2O3S 分子量: 244.3であり、FITCはC21H11N05S 分子量: 389.4であり、タイラミド(tyramine) C8H11NO 分子量: 137.2であることから、分子量はFITC-タイラミドがビオチン化タイラミドより大きくなり、FITC-タイラミドの非特異沈着反応での移動が少ないことが示唆された。

【0098】

上記を確認する為に、ヒトリンパ節、ヒト扁平上皮癌組織、ヒト肝臓癌組織、ヒト胃癌組織、ヒト胃カルチノイド組織の緩衝10%ホルマリン溶液固定パラフィン包埋組織切片を

10

20

30

40

50

用いて、抗体Ki-67抗原抗体(MIB-1)を用い、染色方法は、超高感度免疫染色方法でのビオチン化タイラマイド法、FITC-タイラマイド法を用いると共に、対象として、ChemMate En Vision (ポリマー法)と一次抗体反応を省いたストレプトアビチン-HRP複合体反応による内因性ビオチンの検出法を行った。

【0099】

超高感度免疫染色方法は、全て、ポリマー法を導入した方法に、ビオチン化タイラマイド法はビオチン化タイラマイド反応の前に0.25%のカゼイン溶液による非特異反応抑制を行い、FITC-タイラマイド法は0.25%のカゼイン溶液による非特異反応抑制後に2回の界面活性剤添加トリス緩衝液での洗浄を行った後にFITC-タイラマイド反応を2倍の時間(30分間)行った。このそれぞれの染色プロトコールの相違は、0.25%のカゼイン溶液による非特異反応抑制の有無とその後の界面活性剤添加トリス緩衝液の有無の効果を評価して、それぞれが最も強い陽性反応を示す設定を決めたものである。

10

染色は、DAKO autostainerを用いて、洗浄緩衝液は35℃に加熱した界面活性剤添加トリス緩衝液である。

【0100】

図7は、Ki-67抗原のポリマー法、ポリマー法を導入した超感度免疫組織化学的染色方法、ポリマー法とビオチン化タイラマイド反応前非特異反応抑制処理を行った超高感度免疫組織化学的染色方法による検出とストレプトアビチン-HRP複合体反応による内因性ビオチンの検出(ヒトリンパ節、肝臓癌周囲の肝臓正常部、胃カルチノイド組織)を示す。

【0101】

aはポリマー法、bは一次抗体(MB-1)反応を省きストレプトアビチン-HRP複合体反応を行ったもの、cはポリマー法を導入した超高感度免疫組織化学染色法(既特許出願の方法)、dはポリマー法を導入した超高感度免疫組織化学染色法(既特許出願の方法)のビオチン化タイラマイド反応前に0.25%カゼイン溶液による非特異反応抑制を行ったものである。ただし、一次抗体は、界面活性剤添加トリス緩衝液抗体希釈液で100倍に希釈して用い、aは1時間、cとdは30分の反応で行った。標本は、1はリンパ節、2は肝臓癌の伴う肝臓正常部、3は胃粘膜でカルチノイドを伴う部分である。その結果、図7に示す様に、bでの内因性ビオチンのストレプトアビチン-HRP複合体反応による検出は、2の肝臓正常部で淡く認められるのみであった。aとdは、dがより感度の高いKi-67抗原の検出が行われているが、cでは非特異反応がどの切片でも強いことが理解出来る。従って、ビオチン化タイラマイド反応前に0.25%カゼイン溶液による非特異反応抑制で、ビオチン化タイラマイド反応による非特異反応の抑制が出来ることが判明した。

20

30

【0102】

図8は、超高感度免疫染色方法での前に0.25%カゼイン溶液による非特異反応抑制処理を行ったビオチン化タイラマイド法(a)とFITC-タイラマイド法(b)で、リンパ節(1)、扁平上皮癌(2)、肝臓癌(3)、胃癌(4)の組織でKi67抗原を検出したものである。ビオチン化タイラマイド法(a)よりFITC-タイラマイド法(b)はKi-67抗原の検出感度が低くなっているのが明らかである。これは、ビオチンとFITCの分子量が244.3、389.4であることから、ポリマー試薬のHRPによるそれぞれのタイラマイドとの複合体の異化反応による沈着反応が分子量に反比例して低下していることが示唆された。

40

【0103】

CARD/CSA反応による標識タイラマイドの異化沈着反応の検出では、その洗浄は強く行っ  
てはならないことは、DENDRITIC CELLS 7:19-27, 1997で明らかにしている。従って、用  
手法での染色の実施では、室温での界面活性剤を添加しないトリス緩衝液ないしリン酸緩  
衝液での洗浄が行われてた。

【0104】

第2世代として商業的に供給されているFITC-タイラマイドによる増幅反応は、異化沈  
着物質の分子量の増加による沈着範囲の狭小化により、この問題を解決するものであるが  
、図8に示したように抗原検出感度を一方で低下させている事がわかった。

【0105】

50

今回の我々の発見したビオチン化タイラミド反応前の非特異反応の抑制で、このCARD/CSA反応の非特異沈着の抑制ないし拡散した沈着の抑制は抗原の検出感度を低めることなく、超高感度免疫組織化学的染色を実施出来るものである。

【0106】

従来法では、十分な洗浄を行うと共に、非特異反応の出現する現象が見られた。この現象は、ストレプトアビチン(St-Av)-西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)複合体反応による内因性ビオチンの検出なのか、catalyzed reporter deposition (CARD)/catalyzed signal amplification (CSA)反応の非特異反応であるのかが問題となった。

【0107】

今回の試験によって、ビオチン化タイラミド反応とSt-Av-HRP反応による増幅反応とフルオレセン・イソシアネート(FITC)-タイラミド反応とHRP標識抗FITC抗体反応による増幅反応を比較して、後者の増幅反応での非特異反応が少ないことから、CARD/CSA反応における異化物質の非特異拡散沈着反応がこの非特異反応の原因であることが示唆され、それがこの検索で確認されると共に、その抑制には、0.25%カゼイン溶液による非特異反応の抑制が有効であり、かつ、抗原検出感度は、ビオチン化タイラミドのCARD/CSA反応による超高感度免疫組織化学的染色方法がより高いことが示された。

10

【0108】

<実施例5に用いた試薬等>

<ポリマー試薬>

ダコ・サイトメーション社のダコChemMate ENVISION K5027。

20

0.25%カゼイン溶液試薬：ダコ・サイトメーション社の非特異反応ブロッキング試薬 X0909。

【0109】

<ビオチン化タイラミド試薬>

ダコ・サイトメーション社のダコCSA System K1500のボトル8の増幅試薬。

【0110】

<ストレプトアビチン-HRP複合体>

ダコ・サイトメーション社のダコCSA System K1500のボトル9の酵素標識試薬。

【0111】

<FITC-タイラミド試薬>

30

ダコ・サイトメーション社のCSA II (K1497)の増幅試薬ないしダコ・サイトメーション社のダコGenPoint system (K0618)のFITC標識タイラミド溶液。

【0112】

<HRP標識抗FITC抗体試薬>

ダコ・サイトメーション社のダコGenPoint system (K0618)の抗FITC抗体/HRP二次酵素試薬。

【産業上の利用可能性】

【0113】

高感度の抗原検出法を提供できるため、生物学、医学、分子生物学等の種々の関連分野において、研究分析にとどまらず、実用面にも多大な需要があると考えられる。

40

【図面の簡単な説明】

【0114】

【図1】本発明の超高感度の免疫組織化学的染色方法を含む免疫組織化学的染色法の一実施態様における光顕的に識別される最終産物の概念図である。

【図2】図2は、ヒト扁桃固定組織パラフィン標本を用いた本発明の免疫組織化学的染色法による抗原の検出方法による結果を示す。標本切片を用い従来の超高感度免疫組織化学的染色法を実施し、抗原回復の有無と抗原回復後の固定の影響を検討した。

【図3】図3は、HTLV-1関連細胞株MT-1のセルブロック標本で、HTLV-1関連蛋白のp40Tax蛋白の特異抗体(WATM-1)を用い、sABC法とポリマー法で免疫組織化学的染色を実施した結果を示す。

50

【図4】図4は、ヒト扁桃固定組織パラフィン標本切片を用い、抗原回復後に、Ki-67抗原抗体一次抗体反応を行い、sABC法とダコChemMate ENVISION法で免疫組織化学的染色を実施した結果を示す。

【図5】図5は、ヒト扁桃固定組織パラフィン標本切片を用い、抗原回復後に、Ki-67抗原抗体一次抗体反応を行い、本発明の超高感度免疫組織化学的染色を実施したもの。固定が良好の部分。やや固定が不良な部分。固定を20%緩衝ホルマリン溶液で行った結果を示す。

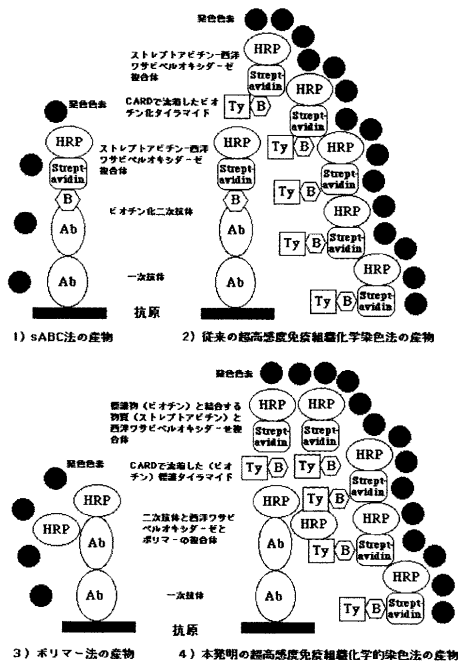
【図6】図6は、陰性コントロール染色でのビオチン化タイラマイド法とフルオレスセンス・イソチオネート (FITC) -タイラマイド法の比較 (ヒト虫垂組織) を示す。

【図7】図7は、Ki-67抗原のポリマー法、ポリマー法を導入した超感度免疫組織化学的染色方法、ポリマー法とビオチン化タイラマイド反応前非特異反応抑制処理を行った超高感度免疫組織化学的染色方法による検出とストレプトアビチン-HRP複合体反応による内因性ビオチンの検出 (ヒトリンパ節、肝臓癌周囲の肝臓正常部、胃カルチノイド組織) を示す。

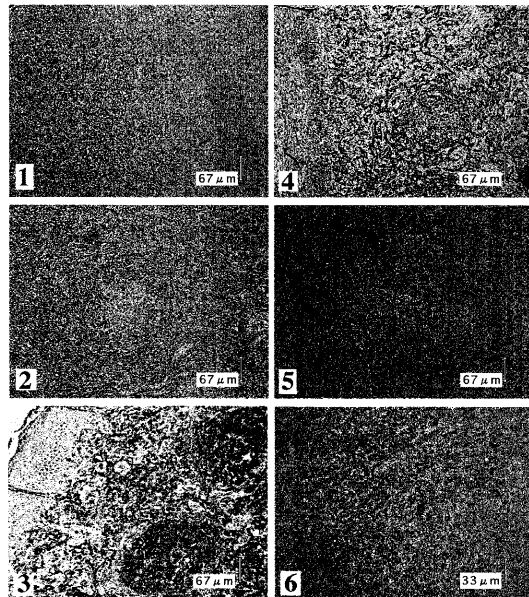
【図8】図8は、Ki-67抗原のポリマー法とビオチン化タイラマイド反応前非特異反応抑制処理を行ったビオチン化タイラマイド法、FITC-タイラマイド法の超感度免疫組織化学的染色による検出感度の相違 (ヒトリンパ節、扁平上皮癌、肝臓癌、胃癌組織) を示す。

10

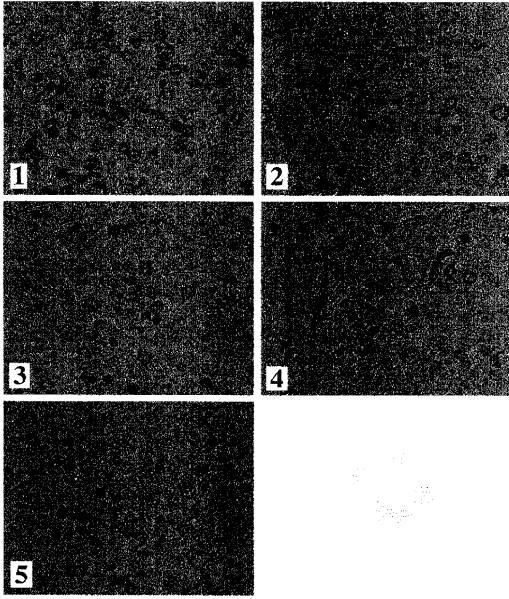
【図1】



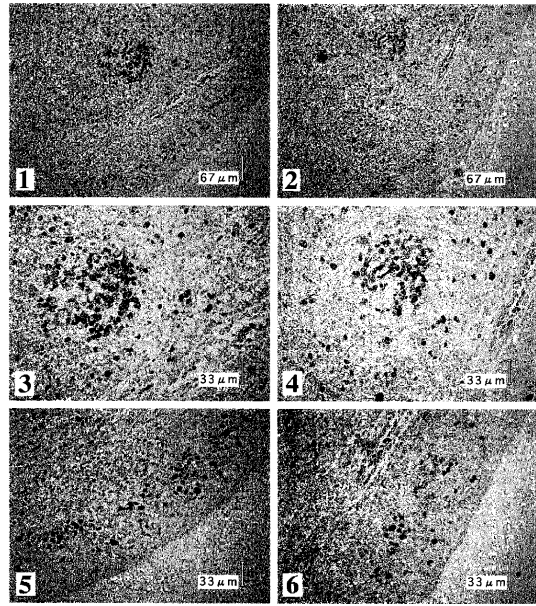
【図2】



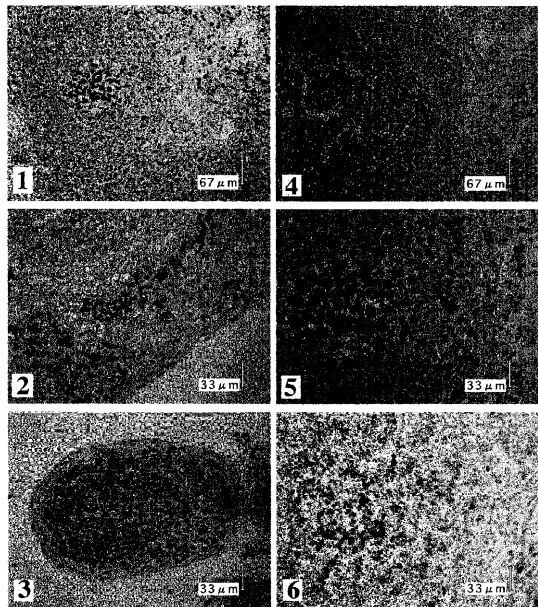
【 図 3 】



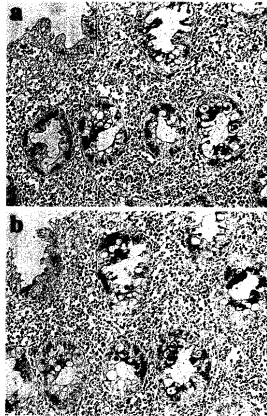
【 図 4 】



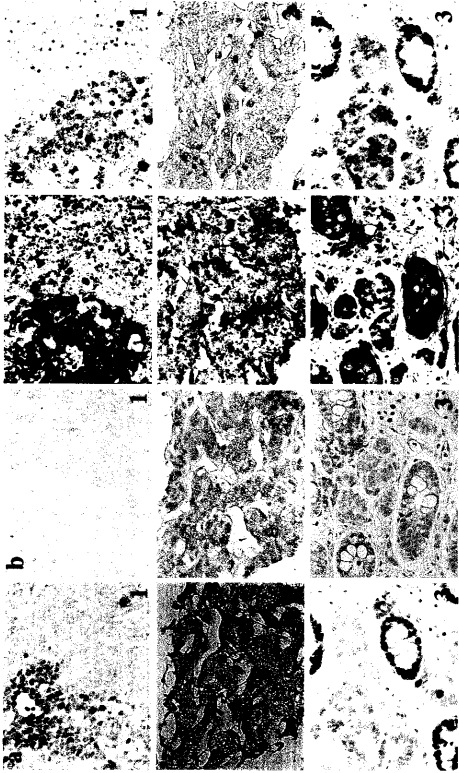
【 図 5 】



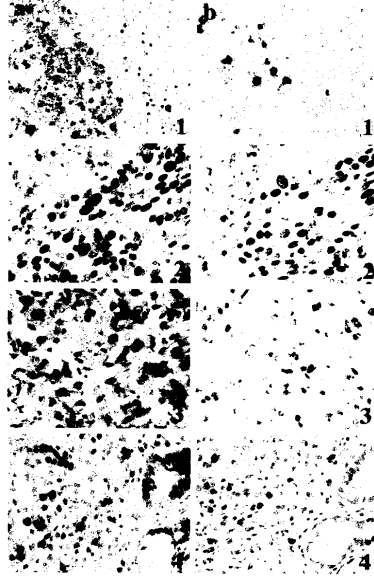
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



专利名称(译)	通过免疫组织化学染色检测抗原的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004271511A</a>	公开(公告)日	2004-09-30
申请号	JP2003366044	申请日	2003-10-27
申请(专利权)人(译)	鹿児島大学長		
[标]发明人	蓮井和久 村田長芳 出雲周二		
发明人	蓮井 和久 村田 長芳 出雲 周二		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/53.U G01N33/543.545.J G01N33/543.545.S		
F-TERM分类号	2G045/BA14 2G045/BB14 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB41 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15		
优先权	2003040286 2003-02-18 JP		
其他公开文献	JP3857677B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过免疫组织化学染色以超高灵敏度检测抗原的方法，其通过内源性生物素等抑制非特异性反应而不降低检测灵敏度。ZSOLUTION：这种通过超高灵敏度的免疫组化染色法检测抗原的方法适用于检测固定组织标本片中的抗原。该方法包括将抗原与第一抗体连接，并将含有第二抗体和辣根过氧化物酶的聚合物复合物与连接的第一抗体连接，以显示辣根过氧化物酶标记的酪胺的沉积反应标记，从而检测抗原。Z

一次抗体溶液	1	2	3	4	5
陰性コントロール	#1	.	.	.	.
WATM-1					
x100	10+	9+	8+	7+	7+
x500	2+	4+	3+	2+	1+
x1000	1+	2+	1+	1+	-