

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3857677号
(P3857677)

(45) 発行日 平成18年12月13日(2006.12.13)

(24) 登録日 平成18年9月22日(2006.9.22)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 U
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 5 J
	GO 1 N 33/543 5 4 5 S

請求項の数 9 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2003-366044 (P2003-366044)	(73) 特許権者	303003580
(22) 出願日	平成15年10月27日(2003.10.27)		蓮井 和久
(65) 公開番号	特開2004-271511 (P2004-271511A)		鹿児島県鹿児島市桜ヶ丘8-35-1 鹿児島大学医学部内
(43) 公開日	平成16年9月30日(2004.9.30)	(74) 代理人	100072051
審査請求日	平成15年10月27日(2003.10.27)		弁理士 杉村 興作
(31) 優先権主張番号	特願2003-40286 (P2003-40286)	(74) 代理人	100107227
(32) 優先日	平成15年2月18日(2003.2.18)		弁理士 藤谷 史朗
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100114292
前置審査			弁理士 来間 清志
		(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

最終頁に続く

(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) 【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、二次抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼと担体と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、抗原を検出するにあたり、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と、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であって前記標識タイラミドの沈着反応前とに、非特異反応を抑制する処理を行う、抗原の検出方法。

【請求項2】

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、スキムミルクによる処理、ノンファットミルクによる処理及びカゼイン溶液による処理からなる群から選ばれる少なくとも1種の処理である、請求項1記載の方法。

【請求項3】

0.025～2.5%の範囲のカゼインを含む溶液により非特異反応を抑制する、請求項1又は2記載の方法。

【請求項4】

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、請求項1～3のいずれか一項記載の方法。

【請求項5】

10

20

前記加熱した洗浄液の温度が25～60の範囲内である、請求項4記載の方法。

【請求項6】

前記標識物が可視化し得る物質である、請求項1～5のいずれか一項記載の方法。

【請求項7】

前記可視化し得る物質が、ビオチン及び蛍光物質の少なくとも1種を含むものである、請求項6記載の方法。

【請求項8】

蛍光物質がフルオレセインイソチオシアネートである請求項7記載の方法。

【請求項9】

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、自動化して行う、請求項1～8のいずれか一項記載の方法。 10

【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。 20

【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、一次抗体と呼ぶ。一次抗体に、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為のシグナルを発する物質として蛍光物質、酵素等が挙げられる。

【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。免疫組織染色を行う際、一次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事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が得られない。 30

【0005】

抗原を検出する免疫組織化学的染色方法には、一次抗体を可視化出来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事が知られている[例えば、非特許文献1(2002(平成14)年2月18日)、pp.23-25参照]。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-ビオチン複合法(以下、sABC法という)、二次抗体と標識酵素とをポリマーへ結合させたポリマー試薬法、フルオレセインイソチオシアネート(以下、FITCという)で標識した一次抗体ないし二次抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ(以下、HRPと言う事がある)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(catalyzed reporter deposition)反応という)を追加した超高感度の免疫組織化学的染色方法がある。 40

【0006】

PAP法は、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がある(非特許文献1、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 50

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(以下、DABと言う事がある)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。

【0007】

次に、sABC法は、非特許文献1に記載されている(そのp.138-144)。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を除去し、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(そのp.163に記載)、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。

10

【0008】

また、HRP標識抗FITC抗体を用いる方法が知られている(非特許文献1、p.158)。これによれば、sABC法と同様に固定標本切片を親水化し、FITC標識の一次抗体で抗原を標識するか、又は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等の酵素で標識した抗FITC抗体と反応させ、HRP等の呈色反応で抗原の検出を間接的に行う。商業的なこのキットが知られている(例えば、非特許文献2(online)(平成15年2月17日検索)、ザイメッド社のホームページ参照)。

20

【0009】

また、ポリマー試薬法が知られている[例えば、特許文献1(株式会社ニチレイ、2001(平成13)年7月3日、酵素-タンパク質複合体参照)]。特許文献1では、ポリマーを担体として酵素(HRP等)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。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、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等の呈色反応で、抗原の検出を間接的に行う。商業的には、ENVISION(エンビジョン)、ChemMate ENVISION(ケムメイト・エンビジョン)がダコサイトメーション社(DakoCytomation Co.)から、simple stain system(シンプル・ステイン・システム)がニチレイから、特異抗体と酵素とポリマーの複合体を用いるEPOS system(エポス・システム)がダコサイトメーション社から供給されている。

30

【0010】

また、CARD反応が知られており[例えば、特許文献2(Bobrow, et al.(ボブラウ等)、March 24, 1998(平成10年3月24日)、Catalyzed reporter deposition(異化レポーター沈着: CARD反応))参照]、特許文献2では、claim 9(クレイム9)に、ビオチン化タイラマイドや蛍光標識(FITC等)タイラマイドの利用の記述があり、ビオチン化タイラマイドのCARD反応の記載がある。また、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事は知られている[非特許文献1のp.150-152、及び例えば、非特許文献3(1989(平成1)年12月20日)参照]。また、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記載の標識シグナルの増幅法の組み合わせ[ImmunoMax(イムノマックス)法]で、化学固定された組織のパラフィン切片では検出出来なかった抗原を検出する事が出来る事は知られている[例えば、非特許文献4(1995(平成7)年7月)参照]。非特許文献3及び非特許文献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。即ち、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マイドを沈着させ、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、カタライズド・シグナル・アンプリフィケーション) s

40

50

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p.164-165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、modified ImmunoMax(修飾イムノマックス)法が開発された[例えば、本発明者等による非特許文献5(1997(平成9)年)及び非特許文献6(2000(平成12)年)参照]。また、sABC法の代わりに、HRP標識二次抗体を用い、HRPによるFITC標識タイラミドを沈着させ、HRP標識抗FITC抗体で標識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、標的核酸を標識するin-situ hybridization(インシトゥ・ハイブリダイゼーション)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等の酵素反応の他に、蛍光標識(FITC等)が利用出来る事は知られている[例えば、特許文献3(Goldberg, et al.(ゴールドバーク等)、March 20, 2001(平成13)年3月20日、Methods and compositions for amplifying detectable signals in specific binding assays(特定の結合アッセイにおける検出可能な信号増幅の為の方法及び組成物)参照)。特許文献2のclaim 9と特許文献3に、CARD反応での沈着したタイラミドの標識に、蛍光物質を使う記載がある。

10

【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によって、目的とする抗原の適切な検出を妨げるという問題を有する。

【0012】

この様な非特異反応には、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と、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。

20

【0013】

この様な非特異的反応による問題を解決する為に、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(非特許文献1の前述の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、切片を、親水化の前に0.03%過酸化水素メタノール溶液に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分間浸して行う。

【0014】

抗体の非特異反応は、前述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による非特異反応に含まれる。これらの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事で、非特異反応を抑制する事が知られている[例えば、特許文献4(Tsao, et al.(ツァオ等)、February 9, 1999(平成11)年2月9日、Immuno-histochemical method that reduces background staining(バックグラウンド染色を減少させる免疫組織化学的方法)参照)。また、特異抗体反応前に一価の抗体を反応させる事で、抗体の非特異反応を抑制出来る事が知られている(特許文献4及び非特許文献1のp.43)。また、抗体希釈液に一次抗体と対応したウマ、ヒツジ、ウサギ等の動物血清を1%から5%加える事で非特異反応を抑制する事は知られている(非特許文献1のp.185)。抗体希釈液には、0.1%Tween(トウイーン)20等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。また、0.25%カゼイン溶液を抗体反応の前に5~30分間反応させる事で非特異反応抑制する事は知られている(非特許文献1のp.115)。

30

40

【0015】

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。0.1%アビチン溶液で、内因性ビオチンをマスクし、アビ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が知られている(非特許文献1の前述のp.164-165)。この方法を、sABC法を含む超高感度の免疫組織化学的染色方法に導入する事も知られている(非特許文献5)。非特許文献5には、非特許文献2記載の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ビチン溶液とビオチン溶

50

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る事で、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。非特許文献6には、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倍である事、内因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化学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反応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ので、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の洗浄が必要になる事の記載がある。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。

10

【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。

20

【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、任意に設定出来るものがある。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事が多い。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事が可能なもの(自由型装置)がある。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は知られている[例えば、特許文献5(Rhett, et al.(レット等)、February 19, 2002(平成14年2月19日) Method and apparatus for automatic tissue staining(自動組織染色の為の方法及び機器)参照)。特許文献5には、この自由型装置の記載がある。また、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事は知られている[例えば、非特許文献7(2001(平成13)年3月)参照]。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。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するか、又は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(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(ザ・ベントナ・ディスカバリー))は知られている[例えば、非特許文献8(online)(平成15

30

40

50

年2月17日検索)参照]。

【0019】

【特許文献1】特開2001-181299号公報

【特許文献2】米国特許第5,731,158号明細書

【特許文献3】米国特許第6,203,989号明細書

【特許文献4】米国特許第5,869,274号明細書

【特許文献5】米国特許第6,349,264号明細書

【非特許文献1】名倉宏、長村義之、堤寛編、「渡辺・中根 酵素抗体法」、改訂四版、学際企画、2002(平成14)年2月18日発刊、p.23-25、p.43、p.115、p.136-138、p.138-144、p.147、p.150-152、p.158、p.163、p.164-165、p.185

【非特許文献2】ザイメッド社のホームページ(<http://WWW.zymed.com/>)、「NBA kit(非ビオチン法のキット)」のページ、[online]、[平成15年2月17日検索]、インターネット URL：<http://WWW.zymed.com/pindex/index9.html>

【非特許文献3】Bobrow(ボブロウ) MN, Harris(ハリス) TD, Shaughnessy(ショーネシー) KJ, Litt(リッツ) GJ. Catalyzed reporter deposition(異化レポート沈着), a novel method of signal amplification(信号増幅の新しい方法). Application to immunoassays(免疫アッセイへの適用). J-Immunol-Methods.(Journal of Immunological Methods)、1989 Dec. 20(平成1年12月20日); 125(1-2): pp.279-85

【非特許文献4】Merz(メルツ) H, Malisius(マリシウス) R, Mannweiler(マンワイラー) S, Zhou(Zhou) R, Hartmann(ハートマン) W, Orscheschek(オルシェチェック) K, Moubayed(モーベイド) P, Feller(フェラー) AC (1995)、「ImmunoMax.(イムノマックス). A maximized immunohistochemical method for the retrieval and enhancement of hidden antigens.(隠された抗原の回復及び増強用の最大化された免疫組織化学的方法.)」Lab Invest.(Laboratory Investigation)、The United States and Canadian Academy of Pathology. LWW, Lippincott Williams and Wilkins publishes(リピンコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス出版社) 1995 Jul.(平成7年7月);73(1): pp.149-56.

【非特許文献5】蓮井和久(Hasui K), Sato(サトウ) E, Tanaka(タナカ) Y, Yashiki(ヤシキ) S, Izumo(イズモ) 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(HTLV-1関連非腫瘍性リンパ節腫脹(HANNLA)におけるHTLV-1 p40Tax及びp27Rexタンパク質のポリメラーゼ連鎖反応法によるHTLV-1用量の推定を伴う定量的高感度免疫組織化学(修飾イムノマックス).」DENDRITIC CELLS、1997(平成9年)、Japanese Dendritic Cell Society(日本樹状細胞研究会)、7: pp.19-27

【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超高感度組織化学的検出法による研究(課題番号10670166)」、2000(平成12)年3月、pp.3-9

【非特許文献7】Hashizume(ハシヅメ) K, Hatanaka(ハタナカ) Y, Kamihara(カミハラ) Y, Tani(タニ) Y.、「Automated immunohistochemical staining of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues using a catalyzed signal amplification method(触媒化信号増幅法を用いるホルマリン固定化及びパラフィン-包埋化組織の自動免疫組織化学染色).」Appl-Immunohistochem-Mol-Morphol.(Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology)、2001 Mar(平成13年3月); 9(1): pp.54-60

【非特許文献8】Ventana Medical Systems, Inc.、「The Ventana Discovery」、[online]、[平成15年2月17日検索]、インターネット URL：<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反応による超高感度の免疫組織化学的染色法では、非特許

10

20

30

40

50

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出来ない。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。この様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た非特許文献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反応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反応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。

一方、本発明者は、sABC法の代わりに、一次抗体を、二次抗体とHRP等の酵素とポリマー(担体)とを含むポリマー複合体(商業的には、ChemMate ENVISION、DakoCytomation)と反応させ、HRPによるビオチン化タイラマイドを沈着させ、ストレプトアビチン-HRP複合体で標識増幅を行う方法を検討したが、この方法には特有の非特異反応がもたらされる事を見出した(後述の実験例1、2、実施例1等参照)。

【0021】

そこで、本発明は、新しい検出方法を用い、検出感度を落とす事なく、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、非特異的反應の抑制に着目して、鋭意研究した結果、二次抗体とHRPと担体とのポリマー試薬(ポリマー複合体)の反応を特異抗体の標識に導入し、非特異反應の抑制処理を行う事、例えば、ポリマー複合体と結合した一次抗体との反応前と、その反応後又は標識タイラマイドの沈着反応前に、非特異反應を抑制する処理によって、上記課題を解決した。

【0023】

即ち、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、二次抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼと担体と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應の標識物を可視化する事によって、抗原を検出するにあたり、非特異反應を抑制する処理を行う、抗原の検出方法に係るものである。

【0024】

本発明では、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に、非特異反應抑制処理を行う。

【0025】

また、本発明では、前記ポリマー複合体と前記結合した一次抗体との反応後に、非特異反應抑制処理を行う。

【0026】

あるいはまた、本発明では、前記標識タイラマイドの沈着反應前に、非特異反應抑制処理を行う。

【0027】

また、本発明の好適例では、前記非特異反應抑制処理は、二次抗体と同種の動物血清による処理、スキムミルクによる処理、ノンファットミルクによる処理及びカゼイン溶液による処理からなる群より選ばれる少なくとも1種の処理である。

【0028】

また、本発明の好適例では、0.025～2.5%の範囲のカゼインを含む溶液により非特異反應を抑制する。

【0029】

また、本発明の好適例では、更に、非特異反應生成物及びその他の残存反應物を除去す

10

20

30

40

50

る為に、加熱した洗浄液によって洗浄する工程を含む。

【0030】

また、本発明の好適例では、加熱した洗浄液の温度は25～60 の範囲内である。

【0031】

また、本発明の好適例では、標識物は可視化し得る物質である。

【0032】

また、本発明の好適例では、可視化し得る物質は**ビオチン及び蛍光物質**の少なくとも1種を含むものである。

【0033】

また、本発明の好適例では、**蛍光物質はフルオレセインイソチオシアネート**である。 10

【0034】

また、本発明の好適例では、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、自動化して行う。

【発明の効果】

【0035】

本発明によれば、本発明にかかる二次抗体とHRPと担体とのポリマー試薬反応によって、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を従来のCARD反応の前に実施する間接的免疫組織化学的染色法の1000倍とする一方で、本発明にかかる非特異反応抑制処理によって、一次抗体溶液を希釈する事もなく、洗浄にて一次抗体反応産物の過剰な除去をする事もなく、抗原検出感度を低下させずに、その強い非特異反応を非常に少なくする事を可能にする。また、本発明の超高感度染色方法は、二次抗体とHRPと担体とのポリマー試薬法を、従来のsABC法に変えて用い、内因性ビオチンによる非特異反応を回避し、二次抗体とHRPと担体とのポリマー試薬反応による非特異反応を抑制し、CARD反応の非特異反応の抑制を行い、従来の方法とは比較にならない程の非特異反応の抑制を成功させる。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。本発明の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、従来の方法で十分な検索が出来なかった特異な微量蛋白の検出や生理的な蛋白の発現の検出をより一層高い感度で可能にする事が期待される。 20 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、以下の様になる。

ここでは、図1を参照するが、図1は、本発明の超高感度の免疫組織化学的染色方法を従来の方法と比べて示す概念図であり、免疫組織化学的染色法の一態様における光顕的に識別される最終産物の図である。図1に示す様に、本発明の方法では、一次抗体と西洋ワサビペルオキシダーゼと担体とを含むポリマー複合体を用い、光顕的に識別される新しい最終産物を提供する(図1の4参照)。ただし、図1の4では、前記のポリマー複合体を、二次抗体(Ab)と西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を積み重ねた表示を行っている。 40

【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、目的抗原を検出し易くするのに用いられる)、洗浄、内因性ペル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)の非特異反応の抑制(この処理は一般に行われる)、特異抗体反応、前記抗原抗体反応した一次抗体と酵素及び担体を含む二次抗体との結合(複合体の形成)の非特異反応抑制、前記複合体の形成、CARD反応の非特異反応の抑制、CARD反応と沈着した標識タイラマイドのHRP標識による検出反応の各工程からなり、より高感度な検出を可能にせんとするものである。

【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事で、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 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事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。

10

【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ルオキシダーゼの活性を抑制するものであり、例えば、以下の処理を行う。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。

【0041】

また、本発明は、二次抗体とHRPと担体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、従来の超高感度免疫組織化学的染色法のsABC法に代えて適用し、更に、CARD反応の非特異反応の抑制処理を適用し、検出感度を低下させずに内因性非特異反応の無い、新し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、以下の様になる。

本発明の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(図1)に示す様に、本発明の超高感度の免疫組織化学的染色方法(図1の4)は、従来法(図1の1~3)と比較すると、以下の様に異なる。

30

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反応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(担体)で形成される複合体の周囲にCARD反応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。したがって、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。即ち、本発明の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事と、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事からである。即ち、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、更には、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。

40

【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担体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

50

を可視化する事によって、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と担体を含むポリマー複合体を用いたのは、上述の様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ミ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。

【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、又はレーザー共焦点顕微鏡等が用いられるという観点から、可視化出来る物質が好ましい。また、好ましい実施態様において、前記可視化する事が出来る物質が、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事が出来る。また、蛍光物質としては、フルオレ

10

【0046】

本発明においては、適宜非特異反応抑制処理を行う。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を被覆し、前記一次抗体と非特異的結合物質との結合を抑制する事が可能である。

【0047】

ここで、非特異反応抑制処理とは、標的とする抗原以外の標識を抑制する処理をいう。その一つの処理として、抗体と非特異結合物質との結合を抑制するものがあるが、この様な作用があれば、特に限定されるものではない。この様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、スキムミルク乃至ノンファットミルクからなる群より選ばれる少なくとも1種を挙げる事が出来る。スキムミルク、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事が出来る。

20

【0048】

また、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う事が好ましい。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】

本発明の抗原の検出方法での非特異反応を抑制する処理は、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、又は前記標識タイラミ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、後者は標識タイラミ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ルオキシダーゼ存在部に限定し、異化標識タイラミ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。

30

【0050】

本発明の抗原の検出方法では、更に、非特異反応生成物、及びその他の残存反応物を除去する為に、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】

本発明の抗原の検出方法の好ましい実施態様においては、非特異反応生成物、及びその他の残存反応物を除去する為に、加熱した洗浄液によって洗浄する工程を含むが、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事が出来る。また、前記加熱した洗浄液の温度は、25~60 の範囲内である事が出来る。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。

40

【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等をプログラムして自動免疫装置に組み込み、自動化して行う事が出来る。

【0053】

即ち、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等の

50

情報をプログラムして導入し、自動化して行う事が出来る。

【0054】

(発明の実施の形態)

以下、本発明を実施の形態によって更に具体的に説明するが、本発明が下記実施の形態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、次の16工程により実施する。固定組織パラフィン切片を、

- 1)キシレンとエタノールにそれぞれ3～5回、3～20分間浸す事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(tween20、トウイーン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、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を実施する事が重要な点である。また、別法により組織切片に反応させたHRP標識物を、工程11から工程13を実施する事が重要な点である。

【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、染色を基準化する事を挙げる事が出来る。

【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100mL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、等が用いられ、DakoCytomation 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、前記の0.01Mリン酸緩衝液0.85%塩化ナトリウム溶液(PBS)で10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(tween20)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(tween20)とした溶液であり、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)を前記の0.01Mリン酸緩衝液0.85%塩化ナトリウム溶液(PBS)の10mL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

<ポリマー試薬>

ポリマー(担体)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。

【0069】

<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>

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。

【0070】

<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>

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。

【0071】

<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>

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。

【0072】

<ヘマトキシリン等の溶液>

上記の発色色素と区別出来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。

【0073】

<封入剤に対応した処理>

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(ウルトラマウント)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(ベクトラマウント)封入剤で封入し乾燥固化し、永久標本を作成する。

【実施例】

【0074】

以下、本発明の実験例・実施例を、図面を参照して、より一層詳細に説明する。

図2は、ヒト扁桃固定組織パラフィン標本を用いた従来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験し、抗原回復の有無と抗原回復後の固定と内因性ビオチンのマスク法の影響を検討した。

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法とポリマー試薬法で免疫組織化学的染色を実験して比較した結果を示す。

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、従来のsABC法と比較して、ダコChemMate ENVISION法で免疫組織化学的染色を実験した結果を示す。

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、本発明にかかるポリマー試薬反応前の非特異反応抑制を行った超高感度免疫組織化学的染色を実施した結果を示す。固定が良好の部分、やや固定が不良な部分

10

20

30

40

50

がある。固定は一部の標本では20%緩衝ホルマリン溶液で行った。

図6は、陰性コントロール染色での本発明にかかるポリマー試薬反応前の非特異反応抑制を行った超高感度免疫組織化学的染色でのビオチン化タイラマイド法とフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-タイラマイド法の比較(ヒト虫垂組織)を示す。

図7は、Ki-67抗原のポリマー試薬法、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、本発明にかかるポリマー試薬反応前の非特異反応抑制を行った超高感度免疫組織化学的染色でのビオチン化タイラマイド法、本発明にかかるポリマー試薬反応前と、ポリマー試薬反応後ないしCARD反応前とに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でのビオチン化タイラマイド法による検出(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。

10

図8は、Ki-67抗原の本発明にかかるポリマー試薬反応前、ポリマー試薬反応後ないしCARD反応前に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でのビオチン化タイラマイド法とFITC-タイラマイド法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。

(実験例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的方法(DAKO CSA system, DakoCytomation Co.)を自動免疫染色装置で実験するが、各反応後の洗浄に、35 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う。その結果、sABC法の各洗浄は35 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 加熱0.1% tween20界面活性剤添加TBSによる二回の洗浄が、至適な洗浄である事が示される。

20

【0075】

(実験例2)

洗浄は実験例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験する。

【0076】

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実験する例を示す。全く非特異陽性所見を認めない。

30

【0077】

2)0.01Mクエン酸緩衝液pH6.0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行うが、図2の3に示す様に、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て、94 40分間の熱処理で行い、同様の実験で、図2の4に示す様に、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。

40

【0079】

4)前記の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験した所、図2の5に示す様に、内因性ビオチンによる非特異反応は消失する。しかし、一次抗体に増殖細胞の核を標識する抗Ki-67抗原抗体溶液を用い、前記の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験し、図2の6に示す様に、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事が判明する。

【0080】

したがって、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

50

必要となる。

【0081】

<緩衝10%ホルマリン溶液>

緩衝10%ホルマリン溶液は、リン酸ナトリウム・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】

また、上述の後固定とは、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、化学固定する事である。

【0083】

さらに、上述の抗Ki67抗原抗体溶液は、Ki-67 Antigen(アンティゲン)、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。

【0084】

(実験例3)

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試薬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。結果を表1に示す。

【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。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。検討したポリマー試薬法は、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(ヒストファイン・シンプル・ステイン)、MULTI(マルチ)(P0)(ペルオキシダーゼ標識)、表1の5)である。sABC法と対比して、結果を表1に示す。ポリマー試薬法の全てが、sABC法(表1の1)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応で陽性像を示す他のポリマー試薬法では、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事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>

上述の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作製した。

【0087】

<ダコChemMate ENVISION>

上述のダコChemMate ENVISION(K5027)は、商業的に供給されているポリマー試薬法の一つであり、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)>

10

20

30

40

50

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試薬法である。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・マルチニチレイ(ザイメット社)のHistofine Simple Stain, MULTI (P0)、424154は。商業的に供給されているポリマー試薬法である。

【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提供)

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+: 少数の細胞が淡い染色増を示す。3+: 極少数の細胞が陽性像を示す。2+: 極少数の細胞が淡い陽性像を示す。1+: 極少数の細胞が極めて淡い陽性像を示す。 -: 陽性細胞を認めない。 #1: 非特異反応を認める。)

【0090】

(実験例4)

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を実験した。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】

したがって、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法に代わって良好に組み込めるのはダコChemMate EnVisionポリマー試薬法である。

【0092】

(実験例5)

ポリマー試薬反応前の非特異反応抑制処理を行い、ポリマー試薬反応後ないしCARD反応前の非特異反応処理を行わずに、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Ki-67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、実験した。

10

20

30

40

50

【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】

したがって、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事が示された。

【0095】

(実施例1)

次に、非特異反応を、更に抑制する方法を見出すべく、種々の比較試験を行った。

【0096】

上記実験例等に記載のポリマー試薬法とポリマー試薬法前の非特異抑制処理の導入の超高感度免疫染色で、catalyzed reporter deposition(CARD)反応を、ビオチン化タイラマイド反応とストレプトアピチン-HRP複合体反応による増幅反応とフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-タイラマイド反応と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マイド法とフルオレセインイソチオシアネート(FITC)-タイラマイド法の比較(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、パラフィンを除いた後に、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はポリマー試薬法前非特異反応抑制処理、ポリマー試薬法、ビオチン化タイラマイド反応、ストレプトアピチン-HRP複合体反応による増幅反応、DAB(ジアミノベンチジン)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はポリマー試薬法前非特異反応抑制処理、ポリマー試薬法、FITC-タイラマイド反応と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、異化タイラマイドの非特異沈着反応によるものであり、ビオチンは $C_{12}H_{16}N_2O_3S$ 分子量:244.3であり、FITCは $C_{21}H_{11}NO_5S$ 分子量:389.4であり、タイラマイド(tyramine、チラミン) $C_8H_{11}NO$ 分子量:137.2である事から、分子量はFITC-タイラマイドがビオチン化タイラマイドより大きくなり、FITC-タイラマイドの非特異沈着反応での移動が少ない事が示唆された。

【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(ポリマー試薬法)と一次抗体反応を省いたストレプトアピチン-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、ポリマー試薬法前非特異反応抑制処理とポリマー試薬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

20

30

40

50

染色は、DAKO autostainer(オートステイナー)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抗原のポリマー試薬法、ポリマー試薬法を導入した超感度免疫組織化学的染色方法、ポリマー試薬法とビオチン化タイラミド反応前非特異反応抑制処理を行った超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はポリマー試薬法、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はポリマー試薬法前非特異反応抑制処理とポリマー試薬法を導入した超感度免疫組織化学染色法、dはポリマー試薬法前非特異反応抑制処理とポリマー試薬法を導入した超感度免疫組織化学染色法のビオチン化タイラミド反応前に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、一次抗体反応前の非特異反応処理を行い、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事が理解出来る。したがって、ビオチン化タイラミド反応前に0.25%カゼイン溶液による非特異反応抑制で、ビオチン化タイラミド反応による非特異反応の抑制が出来る事が判明した。

【0102】

図8は、ポリマー試薬法前非特異反応抑制処理とポリマー試薬法を導入した超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ミド法(a)とFITC-タイラミド法(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。ビオチン化タイラミド法(a)よりFITC-タイラミド法(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の分子量がそれぞれ、244.3、389.4である事から、ポリマー試薬のHRPによるそれぞれのタイラミ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事が示唆された。

【0103】

CARD反応による標識タイラミドの異化沈着反応の検出では、その洗浄は強く行っていない事は、非特許文献5(DENDRITIC CELLS 7:19-27, 1997)で明らかにしている。したがって、手法での染色の実際には、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いた。

【0104】

第2世代として商業的に供給されているFITC-タイラミ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に示した様に抗原検出感度を一方で低下させている事が分った。

【0105】

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事なく、超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-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)反応の非特異反応であるのかが問題となった。

【0107】

10

20

30

40

50

今回の試験によって、ビオチン化タイラマイドCARD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セインイソチオシアネート(FITC)-タイラマイド反応と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事から、CARD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事が示唆され、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、ビオチン化タイラマイドのCARD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事が示された。

【0108】

<実施例1等に用いた試薬等>

<ポリマー試薬>

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

≤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】

<ビオチン化タイラマイド試薬>

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-タイラマイド試薬>

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(ゲンポイント・システム)(K0618)のFITC標識タイラマイド溶液。

【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出来る為、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。

【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の最終産物の概念を示す図である。

【図2】実験例2にかかるとの結果を示す図面代用写真である。

【図3】実験例3にかかるとの方法のHTLV-1関連細胞株MT-1のセルブロック標本を用いた結果を示す図面代用写真である。

【図4】実験例4にかかるとの方法のヒト扁桃固定組織パラフィン標本を用いた結果を示す図面代用写真である。

【図5】実験例5にかかるとの方法の結果を示す図面代用写真である。

【図6】実施例1にかかるとのビオチン化タイラマイド法とFITC-タイラマイド法との比較結果を示す図面代用写真である。

【図7】実施例1にかかるとのビオチン化タイラマイド反応前の非特異反応抑制処理の結果を示す図面代用写真である。

【図8】実施例1にかかるとのカゼイン溶液による非特異反応抑制処理の結果を示す図面代用写真である。

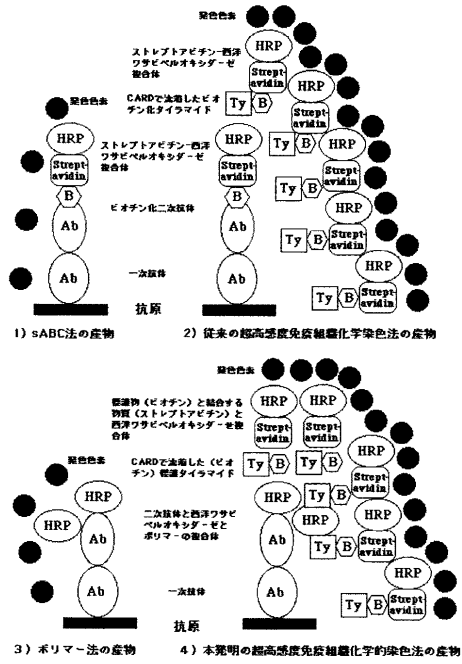
10

20

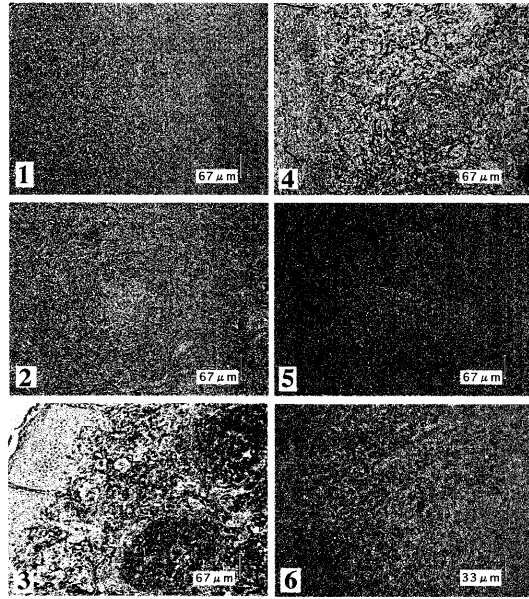
30

40

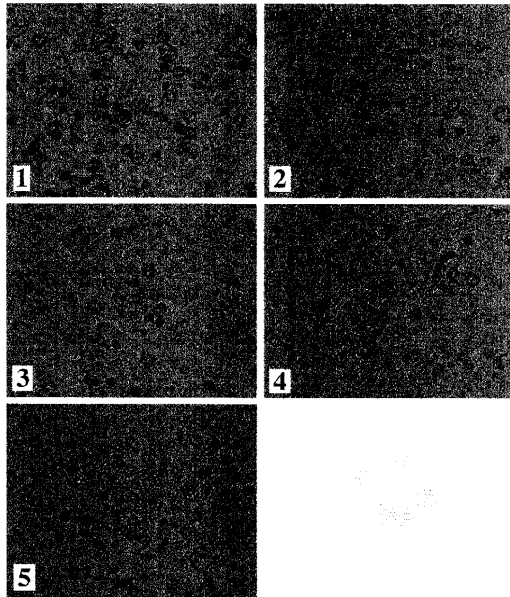
【 図 1 】



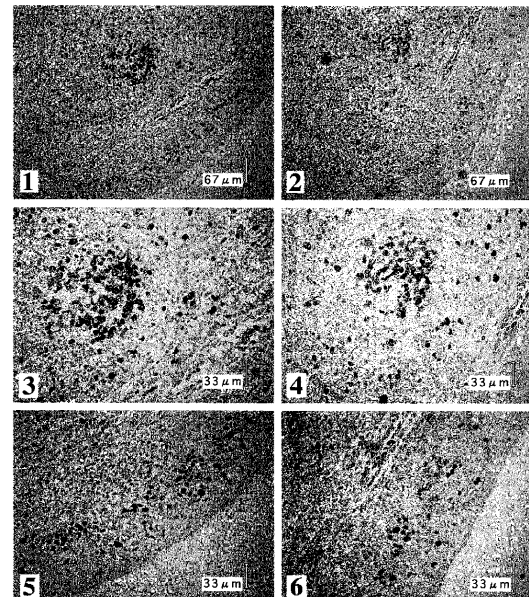
【 図 2 】



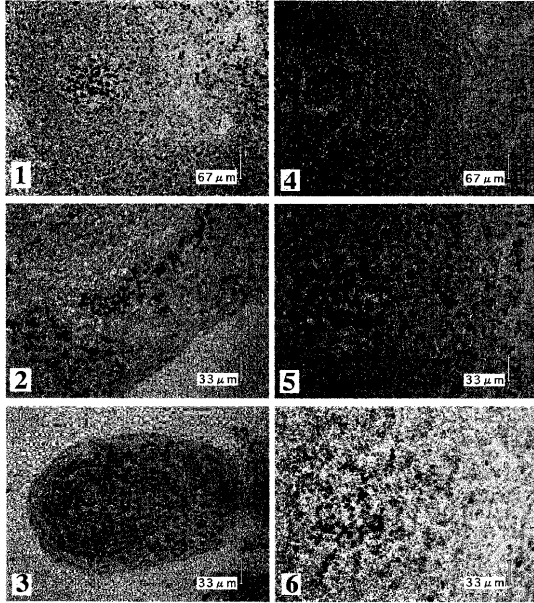
【 図 3 】



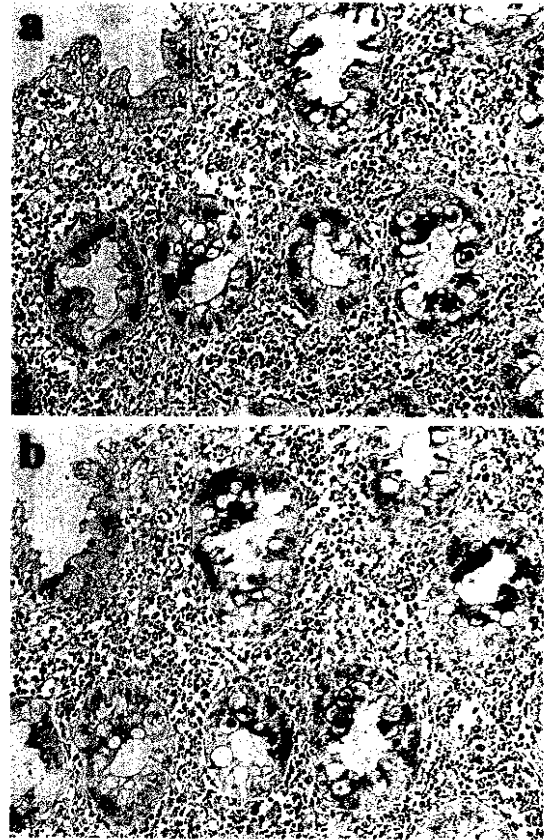
【 図 4 】



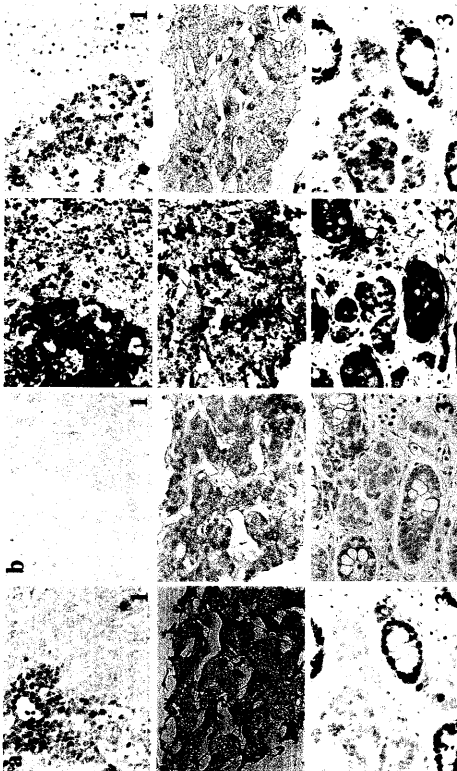
【 図 5 】



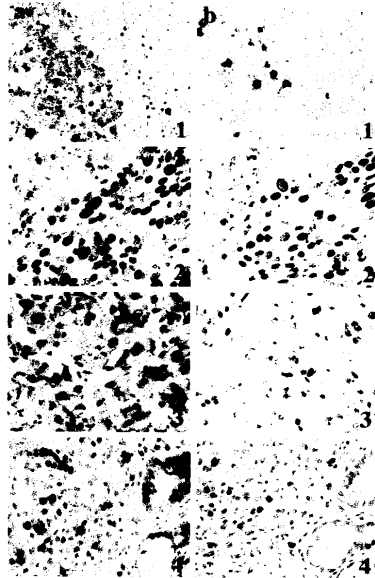
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



フロントページの続き

- (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
- (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

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特表2002 - 543765 (JP, A)
特表2002 - 531082 (JP, A)
国際公開第96 / 007914 (WO, A1)
特開2001 - 181299 (JP, A)
Histochem J., 2002年 5月, 34(5), p215-222

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

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	JP3857677B2	公开(公告)日	2006-12-13
申请号	JP2003366044	申请日	2003-10-27
申请(专利权)人(译)	鹿児島大学長		
当前申请(专利权)人(译)	和久蓮井		
[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	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/48		
FI分类号	G01N33/53.U G01N33/543.545.J G01N33/543.545.S G01N33/48.P		
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		
代理人(译)	藤四郎 克利马清		
优先权	2003040286 2003-02-18 JP		
其他公开文献	JP2004271511A		
外部链接	Espacenet		

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

20)

J P 3857677 B2 2006.1

【图 2】

