

(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2010-66034

(P2010-66034A)

(43) 公開日 平成22年3月25日(2010.3.25)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	P	2 GO 4 5
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y	

審査請求 未請求 請求項の数 10 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号	特願2008-230547 (P2008-230547)	(71) 出願人	803000056
(22) 出願日	平成20年9月9日 (2008.9.9)		財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 東京都中央区日本橋小伝馬町13-4
		(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆
		(74) 代理人	100124453 弁理士 資延 由利子
		(74) 代理人	100135208 弁理士 大杉 卓也
		(74) 代理人	100152319 弁理士 曾我 亜紀
		(72) 発明者	長谷川 正規 愛知県名古屋市中区三の丸四丁目1番1号 独立行政法人国立病院機構名古屋医療セ ンター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原賦活化方法

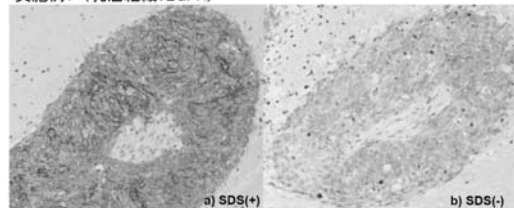
(57) 【要約】

【課題】本発明は、パラフィン包埋後の標本について、組織又は細胞に存在する目的抗原物質を認識する抗体を用いて免疫組織化学染色を行う場合に、より効果的に目的抗原物質の抗原賦活化を行う方法を提供することを課題とする。

【解決手段】パラフィン包埋後の標本の免疫組織化学染色による分析において、免疫組織化学染色の前に、炭素数8~20のアルキル基を有する硫酸塩、若しくはスルホン酸塩である陰イオン性界面活性剤(スルホン酸塩の場合はK、Na、NH₄から選ばれる)で標本を処理することによる。

【選択図】 図1

実施例1 (乳癌組織: EGFR)



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

パラフィン包埋後の標本を免疫組織学的化学染色により分析する場合において、炭素数 8 ~ 20 のアルキル基を有する硫酸塩、若しくはスルホン酸塩である陰イオン性界面活性剤（スルホン酸塩の場合は K、Na、NH₄ から選ばれる）で標本を処理することを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

【請求項 2】

陰イオン性界面活性剤が、オクチル硫酸ナトリウム、エチルヘキシル硫酸ナトリウム、ウンデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸カリウム、ドデシル硫酸アンモニウム、ヘキサデシル硫酸ナトリウム及び / 又はオクタデシル硫酸アンモニウムである請求項 1 に記載の賦活化方法。

10

【請求項 3】

2 ~ 0.005 % (w/v) 濃度の陰イオン性界面活性剤を含む溶液で標本を処理する請求項 1 又は 2 に記載の賦活化方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 の何れかに記載の賦活化方法において、陰イオン性界面活性剤処理と 30 ~ 130 の加熱処理を組み合わせることを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

【請求項 5】

陰イオン性界面活性剤処理と加熱処理を同時に行う請求項 4 に記載の目的抗原物質の賦活化方法。

20

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 の何れかに記載の賦活化方法と、タンパク質分解酵素処理を組み合わせることを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 の何れかに記載の賦活化方法と、還元剤処理を組み合わせることを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 の何れかに記載の賦活化方法により処理したパラフィン包埋標本を免疫組織化学染色により分析することを特徴とする組織又は細胞の分析方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の分析方法に使用するキットであり、炭素数 8 ~ 20 のアルキル基を有する硫酸塩、若しくはスルホン酸塩である陰イオン性界面活性剤（スルホン酸塩の場合は K、Na、NH₄ から選ばれる）を少なくとも含む免疫組織化学染色による組織又は細胞の分析用キット。

30

【請求項 10】

陰イオン性界面活性剤が、オクチル硫酸ナトリウム、エチルヘキシル硫酸ナトリウム、ウンデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸カリウム、ドデシル硫酸アンモニウム、ヘキサデシル硫酸ナトリウム及び / 又はオクタデシル硫酸アンモニウムである請求項 9 に記載の分析用キット。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原賦活化方法に関する。より詳しくは、病理学などの分野において、ルーチンに処理された組織又は細胞のホルマリン固定、パラフィン包埋された標本を用いて、組織や細胞に存在する特定の抗原について免疫組織化学染色を行う場合に、抗原物質の抗原性を回復する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫組織化学 (Immunohistochemistry; IHC) は、発現したタンパク質を認識する抗体を用いて、特定のタンパク質などを個々の症例において解析する方法であり、パラフィ

50

ンブロック切片や凍結切片で解析が可能である。免疫組織化学染色は、病理学的に広く用いられる染色法であり、組織又は細胞に存在する特定の抗原を認識する抗体を用いて可視化し、その局在を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡下で観察するために考案された染色法である。免疫組織化学方法により、組織や細胞の構造の観察や組織内の生体高分子（タンパク質、多糖、mRNAなど）の分布を調べるために、固定をした試料を用いる必要がある。固定は、1) 組織内の物質を速やかに不動化し、生体に近い状態を保つ、2) 自己分解や腐敗を防ぎ、死後変化を最小にする、3) 再現性のある組織像を得る、4) 目的とする構造にコントラストを与える、などの目的のために行う。病理組織などの光学顕微鏡レベルでの評価のためには10%ホルマリン溶液が標準的な固定液であり、組織内で酵素活性や抗原の検出を行う酵素組織化学や免疫組織化学では、酵素活性や抗原性を保存する固定法が要求される。

10

【0003】

固定には化学固定と物理固定がある。化学固定では細胞、組織内の高分子物質を架橋することによって不動化する。主な固定剤としては、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウムなどがある。ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドは主としてタンパク質を固定する。ホルムアルデヒドは大きな組織片にも速やかに浸透する。物理固定には、1) 煮沸やマイクロウェーブ照射による変性（熱凝固）、2) エタノールやアセトンなど有機溶媒による沈殿、3) 酢酸やトリクロロ酢酸などによる変性、沈殿、4) 凍結、などがある。凍結したものは、凍結中又は融解後に固定する必要がある。このような化学固定や物理固定処理により、目的抗原物質は著しく変性を受け、免疫組織化学での検出の不安定性や検出不能の結果に至る。

20

【0004】

ホルマリン固定等による免疫反応性の低下を防ぐために、抗原賦活化処理を行う。抗原賦活化には主として、1) ペプシン、トリプシンなどのタンパク質分解酵素処理や、2) 加熱処理がある。タンパク質分解酵素処理では、タンパク質の一部が消化、抽出され、抗体が抗原に接触しやすくなるが、抗原性の劇的な賦活化は期待できないことが多い。加熱処理ではホルムアルデヒドによるタンパク質の架橋が切断されるとともに、タンパク質や核酸の一部が抽出される。よりタンパク質の抽出率を上げるために、加熱処理液中に界面活性剤を混入する手法が知られている。具体的には、ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル (NP-40, Igepal CA630)、ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート (Tween20)、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル (Triton-X-100)、ポリオキシエチレン-ポリオキシプロピレン縮合物 (Pluronic F68)、3-(1-ピリジニオ)-1-プロパンスルホン酸 (NDSB 201)などを0.1~0.5% (w/v)の割合で加える。上述の界面活性剤は、非イオン性の界面活性剤又は両イオン性の界面活性剤であるが、上述の界面活性剤含有抗原賦活化液による加熱処理でも十分に賦活できないことは多い。

30

【0005】

近年、タイラミドを用いた超高感度増感法が開発され、labeled streptavidin-biotin法 (LSAB法) 等では検出困難な微量な抗原に対して染色が可能となっている。しかしながら、タイラミドを用いた増感法では、二次抗体当量の発色を増しているに過ぎず、バックグラウンドをも超高感度で増感してしまう。

40

【0006】

また、免疫染色の前処理の際に、CCA (体系名シトラコン無水物(2-メチルマレイン酸無水物))を用いて前処理する方法が開示されている(特許文献1)。

【0007】

一方、ホルマリン・パラフィンでの標本切片による免疫反応性の低下を防ぐために、凍結切片を用いる場合もある。しかしながら、凍結切片はパラフィン切片に比べて組織形態の保持が劣るため、組織学的及び細胞学的な観察から得られる情報量が乏しくなるのが現状である。従って、免疫組織化学的及び酵素組織化学的解析に有用な標本作製方法が求められていた。

【0008】

50

全身諸臓器又は組織（硬組織を除く）の形態学的、免疫組織化学的ならびに酵素組織化学的に有用な標本作製法として、P L P (periodate-lysine-paraformaldehyde) 液で固定し、A M e X (acetone, methyl benzonate and xylene-method) 法によるパラフィン包埋法を用いる方法も開示されている（特許文献 2）。

【0009】

しかしながら、いずれの方法においても十分とはいえず、より効果的な方法が求められる。重要なのは、目的抗原物質を、認識抗体にいかにもうまく認識される形で露出させることができるかである。免疫組織化学は、目的抗原物質に対する抗体を用いてその局在を可視化する手法であるが、多くの抗体は目的抗原物質（タンパク質）の一部のペプチドを認識するように作られている為、タンパク質の高次構造は、抗体の認識には不利な構造である。免疫組織化学では、固定された組織や目的抗原物質を、生体の状態に戻すのではなく、抗体の作製された際認識される直線的なペプチドの状態にいかにも近づけることができるかが重要である。

10

【特許文献 1】特許第 3797418 号公報

【特許文献 2】特表第 2002-82026 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、パラフィン包埋後の標本について、組織又は細胞に存在する目的抗原物質を認識する抗体（一次抗体）を用いて免疫組織化学染色を行う場合に、より効果的に目的抗原物質の抗原賦活化を行う方法を提供することを課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは上記課題を解決するために、鋭意検討を重ねた結果、炭素数 8 ~ 20 のアルキル基を有する硫酸塩、若しくはスルホン酸塩である陰イオン性界面活性剤（スルホン酸塩の場合は K、Na、NH₄ から選ばれたもの）で標本を処理することで、より効果的に抗原を賦活化できることを見出し、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明は以下よりなる。

1. パラフィン包埋後の標本を免疫組織学的化学染色により分析する場合において、炭素数 8 ~ 20 のアルキル基を有する硫酸塩、若しくはスルホン酸塩である陰イオン性界面活性剤（スルホン酸塩の場合は K、Na、NH₄ から選ばれる）で標本を処理することを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

30

2. 陰イオン性界面活性剤が、オクチル硫酸ナトリウム、エチルヘキシル硫酸ナトリウム、ウンデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸カリウム、ドデシル硫酸アンモニウム、ヘキサデシル硫酸ナトリウム及び / 又はオクタデシル硫酸アンモニウムである前項 1 に記載の賦活化方法。

3. 2 ~ 0.005% (w/v) 濃度の陰イオン性界面活性剤を含む溶液で標本を処理する前項 1 又は 2 に記載の賦活化方法。

4. 前項 1 ~ 3 の何れかに記載の賦活化方法において、陰イオン性界面活性剤処理と 30 ~ 130 の加熱処理を組み合わせることを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

40

5. 陰イオン性界面活性剤処理と加熱処理を同時に行う前項 4 に記載の目的抗原物質の賦活化方法。

6. 前項 1 ~ 5 の何れかに記載の賦活化方法と、タンパク質分解酵素処理を組み合わせることを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

7. 前項 1 ~ 6 の何れかに記載の賦活化方法と、還元剤処理を組み合わせることを特徴とする目的抗原物質の賦活化方法。

8. 前項 1 ~ 7 の何れかに記載の賦活化方法により処理したパラフィン包埋標本を免疫組織化学染色により分析することを特徴とする組織又は細胞の分析方法。

9. 前項 8 に記載の分析方法に使用するキットであり、炭素数 8 ~ 20 のアルキル基を有

50

する硫酸塩、若しくはスルホン酸塩である陰イオン性界面活性剤（スルホン酸塩の場合は K、Na、NH₄ から選ばれる）を少なくとも含む免疫組織化学染色による組織又は細胞の分析用キット。

10．陰イオン性界面活性剤が、オクチル硫酸ナトリウム、エチルヘキシル硫酸ナトリウム、ウンデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸カリウム、ドデシル硫酸アンモニウム、ヘキサデシル硫酸ナトリウム及び/又はオクタデシル硫酸アンモニウムである前項9に記載の分析用キット。

【発明の効果】

【0013】

パラフィン包埋後の標本を、陰イオン性界面活性剤で処理する本発明の目的抗原物質の賦活化方法によると、目的抗原物質が直線化することで抗原性が回復し、より強い目的抗原物質の発現が観察される。本方法により、より効果的な免疫組織化学染色を行うことができ、組織又は細胞の病理学的分析を正確に行うことができる。特に、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）は、電気泳動の際に汎用されている。このように汎用されている陰イオン性界面活性剤を用いて標本を処理することで、安価で容易に、感度よく免疫組織化学染色に目的抗原物質を検出することができる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明において、パラフィン包埋標本の作製方法は、自体公知の方法を適用することができる。

20

組織や細胞の固定は、1)組織や細胞内の物質を速やかに不動化し、生体に近い状態を保つ、2)自己分解や腐敗を防ぎ、死後変化を最小にする、3)再現性のある組織や細胞像を保つ、4)目的とする組織や細胞の構造にコントラストを与える、などの目的のために行う。固定には化学固定と物理固定がある。化学固定に用いられる固定剤としては、ホルムアルデヒド（ホルマリン）、グルタルアルデヒド、四酸化オスミウムなどが挙げられる。ホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドは主としてタンパク質を固定する。ホルムアルデヒドは大きな組織片にも速やかに浸透する。物理固定には、1)煮沸やマイクロウェーブ照射による変性（熱固定）、2)エタノールやアセトンなど有機溶媒による沈殿、3)酢酸やトリクロロ酢酸などによる変性、沈殿、4)凍結などが挙げられる。

【0015】

30

固定後に、組織や細胞などの検体の性質に応じて、さらに脱脂操作や脱灰操作を行うことができる。例えば、乳腺、皮下組織、骨髄などの、検体に脂肪成分の多い組織のパラフィン包埋に際しては、固定後にアセトン、クロロホルム、メタノール・クロロホルム混合液（1：1若しくは1：2）などで処理することにより脱脂操作を行うことができる。また、骨、歯、石灰化した病巣、結石を含む腎臓や胆嚢などの、検体に石灰が含まれる場合は、そのまま包埋したのでは薄切が困難である。包埋に先立って、石灰化組織からマイクロームで薄切を容易にするために、あらかじめ石灰を除去する脱灰操作を行うことができる。一般には、硝酸、ギ酸、三塩化酢酸などの酸類により処理する方法が挙げられる。

【0016】

40

次に、脱水のために通常エタノールを用いる。急に濃度の濃いエタノールに入れると組織の強い収縮と硬化が起きるので、例えば70% 80% 90% 100%のように低濃度のエタノールから高濃度のエタノールに移して処理することができる。さらに、検体にパラフィンを浸透させるために、例えばキシレンを用いて処理することができる。まず、1：1キシレン・パラフィン混合液に浸し、次にパラフィン液に検体を浸すことができる。

【0017】

以上のように処理した検体を型に入れ、溶かしたパラフィンを注ぎ固め、パラフィン包埋し、パラフィン包埋標本を作製することができる。パラフィンの処理温度は、パラフィンの種類、検体、目的に応じて適宜選択することができる。パラフィンで包埋した検体を、顕微鏡下で組織を観察する場合に、厚い組織片を薄く切り、透過光線を充分通す必要が

50

ある。上記の如く、固定、脱水、包埋の操作を加えて一定の硬さを与えた後に組織片などの検体を例えばミクロトームを用いて薄く切ることができる。

【0018】

上述により得られた固定パラフィン包埋組織の薄切切片を、例えばキシレンで脱パラフィン処理した後、免疫組織化学染色のため、目的抗原物質を認識する抗体で抗原抗体反応をさせる。

【0019】

免疫組織化学染色は、目的抗原物質に対する抗体を用いてその局在を可視化する方法である。抗体は、目的抗原物質、つまり目的タンパク質のごく一部のペプチドをエピトープとして認識するので、抗体が作製されたときに認識される直線的なペプチドの状態に抗原タンパク質を近づけることにより、目的抗原物質の抗原性を回復することができる。

10

【0020】

本発明の目的抗原物質の賦活化処理は、抗原抗体反応の前に行うことができる。本発明の賦活化処理は、目的抗原物質に対する抗体を適用する前であればよく、特に限定されないが、陰イオン性界面活性剤の効果、使用量などを勘案すると、薄切切片を作製した後に処理するのが望ましい。具体的には、30～130、好ましくは50～125、更に好ましくは95～121での加熱処理と組み合わせて処理することができる。本発明の賦活化処理と加熱処理は、同時に行ってもよいし、異なる順序で行ってもよいが、加熱処理と同時に処理するのが特に好適である。陰イオン性界面活性剤を加えた状態で、上記の温度範囲内で必要な時間、加熱処理を行うことができる。処理時間は、特に限定されないが、例えば1～60分程度、好ましくは5～40分程度、より好ましくは約10～15分程度とすることができる。本発明の賦活化処理を加熱処理と異なる順序で行う場合は、いずれが先であってもよい。

20

【0021】

ここにおいて、使用する陰イオン性界面活性剤は、炭素数8～20のアルキル基を有する硫酸塩、若しくはスルホン酸塩である陰イオン性界面活性剤である。スルホン酸塩の場合は、K、Na、NH₄から選択される。硫酸塩としては、具体的にはオクチル硫酸ナトリウム、エチルヘキシル硫酸ナトリウム、ウンデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸カリウム、ドデシル硫酸アンモニウム、ヘキサデシル硫酸ナトリウム、オクタデシル硫酸アンモニウム等を例示することができる。また、スルホン酸塩としては、オクチルスルホン酸ナトリウム、エチルヘキシルスルホン酸ナトリウム、ウンデシルスルホン酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸ナトリウム、ドデシルスルホン酸カリウム、ヘキサデシルスルホン酸ナトリウム、オクタデシルスルホン酸ナトリウム、オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ウンデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ドデシルベンゼンスルホン酸カリウム、ヘキサデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、オクタデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等を例示することができる。前記の陰イオン性界面活性剤は、単独もしくは2種以上を混合して用いることができる。

30

【0022】

使用する陰イオン性界面活性剤は、上記のうち、好適にはオクチル硫酸ナトリウム、エチルヘキシル硫酸ナトリウム、ウンデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、ドデシル硫酸カリウム、ドデシル硫酸アンモニウム、ヘキサデシル硫酸ナトリウム、オクタデシル硫酸アンモニウムであり、より好適にはドデシル硫酸ナトリウム、又はドデシル硫酸アンモニウムであり、特に好適にはドデシル硫酸ナトリウムである(SDS)。

40

【0023】

使用する陰イオン性界面活性剤の量は、標本中の対象分子、即ち対象とする目的抗原物質の量に対して決定することができる。具体的には、界面活性剤を緩衝液などを用いて溶解することができ、濃度としては、2～0.005%(w/v)、好ましくは0.1～0.025%(w/v)、より好ましくは0.08～0.04%(w/v)、最も好適には0.05%(w/v)

50

)とすることができる。緩衝液は、金属イオンや酸化剤が混入していないものを使用することが望ましく、具体的にはクエン酸緩衝液、EDTA溶液、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などを用いることができる。従来は、目的抗原物質の賦活化処理において、非イオン性界面活性剤等が用いられていたが、陰イオン性界面活性剤は用いられていなかった。陰イオン界面活性剤が用いられなかった理由として、強い界面活性作用により組織破壊性が強く、またスライドガラスから剥離しやすくなることなどが挙げられる。

【0024】

目的抗原物質の賦活化処理は、自体公知の方法と組み合わせて行ってもよい。例えば、タンパク質分解酵素処理を組み合わせてもよい。タンパク質分解酵素は、免疫賦活化法に使用可能な酵素であればよく、特に限定されないが、例えばペプシンやトリプシンなどの自体公知の酵素を使用することができる。

10

【0025】

本発明の陰イオン性界面活性剤を用いた抗原賦活化処理は、さらに他の賦活化処理法と組み合わせて実施することができる。例えば還元剤処理と同時に行うことができる。還元剤としては特に限定されないが、具体的にはメルカプト系還元剤、芳香族チオール系還元剤、有機リン酸化合物及び/又はピルピン酸アミド系還元剤が挙げられる。メルカプト系還元剤としては、メルカプトエタノールが挙げられ、さらに具体的には2-メルカプトエタノール及び/又は2-メルカプトエタノールアミンなどが挙げられる。芳香族チオール系還元剤としては、ジチオスレイトール(Dithiothreitol, DTT)が挙げられ、有機リン酸化合物としてはTCEP(Tris[2-carboxyethyl]phosphine)が挙げられる。さらに、チオグリコール酸及びその塩類、システイン及びその塩類、亜硫酸塩などの還元剤に、アンモニア、モノエタノールアミン、炭酸水素アンモニウム、水酸化ナトリウムなどのアルカリ剤を併用して用いてもよい。

20

【0026】

使用する還元剤の量は、標本中の対象分子、即ち対象とする目的抗原物質の量に対して適宜決定することができる。還元剤を溶解する緩衝液は、金属イオンや酸化剤が混入していないものを使用することが望ましく、具体的にはクエン酸緩衝液、EDTA溶液、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)などを用いることができる。本発明の賦活化処理と還元剤処理は、同時に行ってもよいし、異なる順序で行ってもよい。本発明の賦活化処理と還元剤処理を異なる順序で行う場合は、いずれが先であってもよい。

30

【0027】

上記目的抗原物質の賦活化処理後に、目的抗原物質に対して認識する抗体(一次抗体)を作用させ、抗原抗体反応をさせる。一次抗体は、目的抗原物質に応じて用いることができ、自体公知の一次抗体、特に、既に市販されている抗体などを使用することができる。また、糖タンパクの糖鎖部分を認識する抗体も使用することができる。

【0028】

本発明は、上記賦活化方法により処理したパラフィン包埋標本を免疫組織化学染色により分析する組織又は細胞の分析方法にも及ぶ。さらに、上述の陰イオン性界面活性剤を少なくとも含む、免疫組織化学染色による組織又は細胞の分析用キットにも及ぶ。該キットには、上述の陰イオン性界面活性剤の他、陰イオン性界面活性剤の溶媒、一次抗体、標識抗体、標識一次抗体などを含んでいてもよい。

40

【実施例】

【0029】

以下に本発明の実施例を示し、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

【0030】

(実施例1) 乳癌組織における上皮成長因子受容体(Epidermal Growth Factor Receptor: EGFR)の免疫組織化学染色

本実施例では、乳癌組織のEGFRを目的抗原物質として検出した。

50

1) 乳癌組織について、一般的な手法に従ってパラフィン包埋による標本を作製し、ミクロトームを用いて薄切切片を作製した。

2) 作製した薄切切片について、キシレン100% - 5分、100% - 5分、100% - 5分、メタノール100% - 5分、100% - 5分、100% - 5分で処理し、脱パラフィン操作を行った。

3) その後、流水で5分間洗浄し、前処理試料を得た。

【0031】

4) 上記により得た前処理試料について、抗原賦活化処理は以下のa)又はb)の方法で行った。

a) 陰イオン性界面活性剤あり

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(200mL) pH 7.0及び0.05%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(0.1g)を含む溶液の入ったバット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

b) 陰イオン性界面活性剤なし(非イオン性界面活性剤あり)

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(199mL) pH 7.0及び0.5%(v/v)ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(NP-40, Igepal ICA630)(1mL)を含む溶液の入ったバット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

【0032】

5) 免疫組織化学染色

上記a)又はb)の各抗原賦活化処理した試料を、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて各々5分ずつ3回洗浄した。内因性ペルオキシダーゼの抑制操作のために、3% H_2O_2 (30% H_2O_2 15mL + メタノール135mL) 150mLを含むバット中に15分間静置した。再度、PBSを用いて各々5分ずつ3回洗浄した。組織が乾かないよう注意して、ティッシュペーパーで周囲のPBSをよく拭いた。

【0033】

免疫組織化学染色用キット(UltraTech HRP Streptavidin-Biotin Detection System (Beckman Coulter社))に含まれるブロッキング液を上記試料に滴下し、室温で10分間静置した。その後、ブロッキング剤を除き、一次抗体を試料に加えた。一次抗体は、抗EGFRマウスモノクローナル抗体(Novocastra社NCL-EGFR-384、クローン:EGFR.25、20倍希釈)を用い、抗体溶液100 μ Lずつを試料にかけ、室温で60分間静置した。

【0034】

その後、PBSを用いて各々5分ずつ3回洗浄し、上記免疫組織化学染色用キットに含まれるビオチン標識二次抗体を加えて室温で10分間静置した。PBSを用いて各々5分ずつ3回洗浄し、酵素標識ストレプトアビジン液を加えて室温で10分間静置した。PBSを用いて各々5分ずつ3回洗浄し、ジアミノベンチジン(DAB)発色液を加えて室温で1~5分間で発色を確認した。PBSにて発色停止後、流水で5分間洗浄し、ヘマトキシリンを用いて20秒間染色を行った。50で1分間発色し、流水で1分間洗浄、脱水透徹(メタノール100% - 5分、100% - 5分、100% - 5分、キシレン100% - 5分、100% - 5分、100% - 5分)し、封入した。

【0035】

組織は、光学顕微鏡により観察した。その結果、SDSを含む溶液で処理した場合に、抗原賦活化が劇的に増強された(図1)。

【0036】

(実施例2) 乳癌組織におけるRet Finger Protein (RFP)の免疫組織化学染色

本実施例では、乳癌組織において、RFPを目的抗原物質として検出した。

乳癌組織について、実施例1と同様に、1)~3)の操作を行い、前処理試料を得た。上記により得た前処理試料について、抗原賦活化処理は以下のa)又はb)の方法で行った。

【0037】

10

20

30

40

50

a) 陰イオン性界面活性剤あり

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(200mL)pH 7.0及び0.05%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(0.1g)を含む溶液の入ったバット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

b) 陰イオン性界面活性剤なし(非イオン性界面活性剤あり)

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(199mL)pH 7.0及び0.5%(v/v)ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(NP-40, Igepa ICA630)(1mL)を含む溶液の入ったバット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

【0038】

10

5) 免疫組織化学染色及び観察

免疫組織化学染色のための一次抗体に、抗RFPラビットポリクローナル抗体(免疫生物研究所No.18791、濃度:1µg/mL)を用いた他は、実施例1と免疫組織化学染色は同手法により染色を行い、封入した。また、実施例1と同様に光学顕微鏡により観察した。その結果、SDSを含む溶液で処理した方が、非イオン性界面活性剤で処理した場合に比べて、抗原賦活化が増強した(図2)。

【0039】

(実施例3) 子宮内膜癌組織におけるCA19-9の免疫組織化学染色

本実施例では、子宮内膜癌組織において、CA19-9を目的抗原物質として検出した。

20

乳癌組織について、実施例1と同様に、1)~3)の操作を行い、前処理試料を得た。上記により得た前処理試料について、抗原賦活化処理は以下のa)又はb)の方法で行った。

a) 陰イオン性界面活性剤あり

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(200mL)pH 7.0及び0.05%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(0.1g)を含む溶液の入ったバット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

b) 陰イオン性界面活性剤なし

Dako社Autostainer Plus Link(自動染色装置)を使用。前処理試料(スライドガラス)をDako社Target Retrieval Solutionで温浴処理(95)を行った。

30

【0040】

免疫組織化学染色のための一次抗体に、抗CA19-9抗体(Fujirebio Diagnostic社製)(希釈済抗体)を用いた他は、実施例1と同手法により染色を行い、封入した。組織は、光学顕微鏡により観察した。その結果、SDSを含む溶液で処理した場合に、抗原賦活化が増強された(図3)。

【0041】

(実施例4) 乳癌組織におけるAndrogen Receptor(AR)の免疫組織化学染色

本実施例では、乳癌組織において、ARを目的抗原物質として検出した。

乳癌組織について、実施例1と同様に、1)~3)の操作を行い、前処理試料を得た。上記により得た前処理試料について、抗原賦活化処理は以下のa)、b)又はc)の方法で行った。

40

a) 陰イオン性界面活性剤あり、還元剤あり

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(199.5mL)pH 7.0及び0.05%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(0.1g)及び0.25%(v/v)2-メルカプトエタノール(2-ME)(0.5mL)を含む溶液の入ったバット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

b) 陰イオン性界面活性剤あり

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(200mL)pH 7.0及び0.05%(w/v)ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)(0.1g)を含む溶液の入ったバット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

50

c) 陰イオン性界面活性剤なし(非イオン性界面活性剤あり)

前記前処理試料(スライドガラス)を、0.01モルクエン酸溶液(199mL)pH 7.0及び0.5%(v/v)ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル(NP-40, Igepa ICA630)(1mL)を含む溶液の入ったパット中に浸し、121で15分間オートクレーブ処理を行った。

【0042】

免疫組織化学染色のための一次抗体に、抗ARマウスモノクローナル抗体(Dako社、クローン:AR441、50倍希釈)を用いた他は、実施例1と同手法により染色を行い、封入した。組織は、光学顕微鏡により観察した。その結果、SDS+2-ME及びSDSを含む溶液で処理した場合に、抗原賦活化が増強された(図4)。

10

【産業上の利用可能性】

【0043】

以上詳述したように、本発明のパラフィン包埋後の標本を陰イオン性界面活性剤で処理する目的抗原物質の賦活化方法によると、目的抗原物質(タンパク質)の直線化により抗原性が回復し、より抗原賦活化が増強された。本方法により、より効果的な免疫組織化学染色を行うことができ、組織又は細胞の病理学的分析を正確に行うことができる。従って、本発明の免疫賦活化方法は、病理学的分析機関や医療の基礎的研究分野において利用することができる。さらに、免疫組織化学染色のための本発明の組織又は細胞の分析用キットを用いて分析を行うと、正確かつ容易に分析することができるため、必要最小限の一次抗体量で済むことから、経済的にも優れている。

20

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】乳癌組織の抗EGFR抗体による免疫組織化学での分析結果を示す図である。(実施例1)

【図2】乳癌組織の抗RFP抗体による免疫組織化学での分析結果を示す図である。(実施例2)

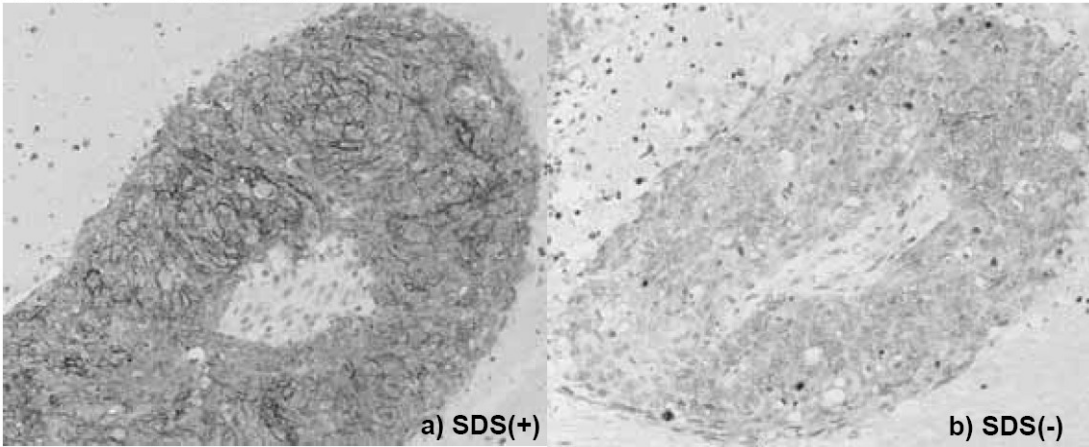
【図3】子宮内膜癌組織の抗CA19-9抗体による免疫組織化学での分析結果を示す図である。(実施例3)

【図4】乳癌組織の抗AR抗体による免疫組織化学での分析結果を示す図である。(実施例4)

30

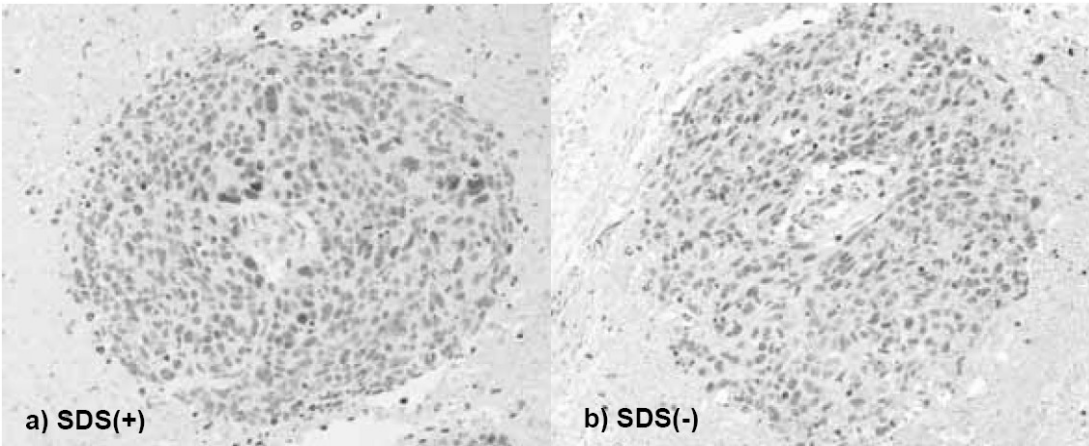
【 図 1 】

実施例1 (乳癌組織:EGFR)



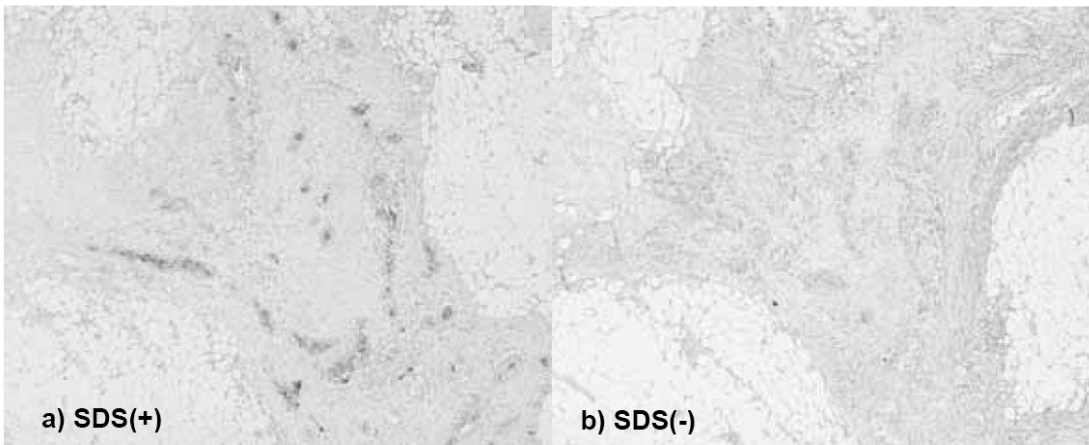
【 図 2 】

実施例2 (乳癌組織:RFP)



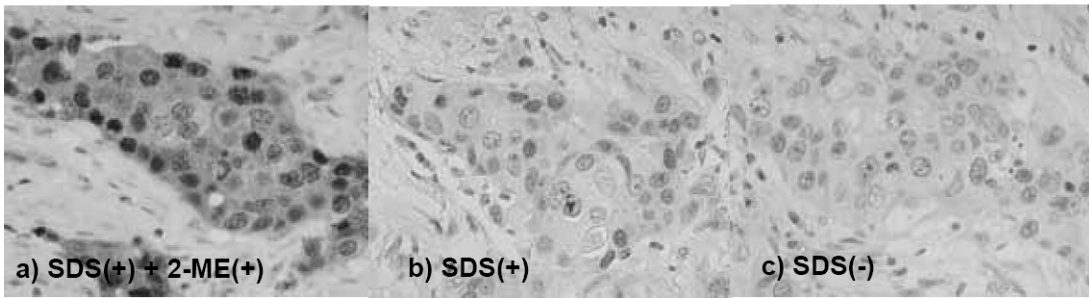
【 図 3 】

実施例3 (子宮内膜癌組織:CA19-9)



【 図 4 】

実施例4 (乳癌組織:AR)



フロントページの続き

(72)発明者 森谷 鈴子

愛知県名古屋市中区三の丸四丁目1番1号 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター内

(72)発明者 市原 周

愛知県名古屋市中区三の丸四丁目1番1号 独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター内

Fターム(参考) 2G045 AA24 BA11 BA14 BB22 BB24 BB29 CB01 FA16 FB01 FB03

FB13

专利名称(译)	抗原活化方法		
公开(公告)号	JP2010066034A	公开(公告)日	2010-03-25
申请号	JP2008230547	申请日	2008-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	NAT癌症CENT		
申请(专利权)人(译)	日本健康科学基金会		
[标]发明人	長谷川正規 森谷鈴子 市原周		
发明人	長谷川 正規 森谷 鈴子 市原 周		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BA11 2G045/BA14 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB29 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB13		
代理人(译)	庄司隆 Shinobe百合子		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：当通过使用识别组织或细胞中存在的靶抗原物质的抗体进行免疫组织化学染色时，为靶抗原物质提供更有效的抗原活化方法，所述抗体是先前石蜡包埋的样品。ΣSOLUTION：在用免疫组织化学染色分析石蜡包埋样品时，样品用含有碳数为8-20的烷基的硫酸盐或磺酸盐的阴离子表面活性剂处理（在磺酸盐的情况下，选自K，Na，NH < SB> 4 </ SB>）在免疫组织化学染色之前。Σ

实施例1（乳癌組織：EGFR）

