

(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2007-278883

(P2007-278883A)

(43) 公開日 平成19年10月25日(2007.10.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	2 GO 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	2 GO 5 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78	Z

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2006-106369 (P2006-106369)	(71) 出願人	000000918 花王株式会社 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1 0号
(22) 出願日	平成18年4月7日(2006.4.7)	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736 弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156 弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗原の検出方法

(57) 【要約】

【課題】免疫化学染色方法において、非特異的染色を簡便に軽減できる抗原の検出法を提供する。

【解決手段】免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する抗原の検出方法であって、平板上に載置した検体に抗体液を滴下した後、該抗体液を抗体と反応性のない樹脂フィルムで被覆し、抗原抗体反応を行うことを特徴とする抗原の検出方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する抗原の検出方法であって、平板上に載置した検体に抗体液を滴下した後、該抗体液を抗体と反応性のない樹脂フィルムで被覆し、抗原抗体反応を行うことを特徴とする抗原の検出方法。

【請求項 2】

樹脂フィルムが、比重が 0.7 ~ 0.9 である請求項 1 記載の検出方法。

【請求項 3】

樹脂フィルムが、100 倍希釈した抗体液とフィルム面との接触角が 80° ~ 120° である請求項 1 又は 2 記載の検出方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項記載の抗原の検出方法において使用される抗体液を被覆するための樹脂フィルム。

【請求項 5】

免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する抗原検出キットであって、検体を載置するための平板、抗体液、抗体と反応性のない樹脂フィルム及び発色試薬を含有する抗原検出キット。

【請求項 6】

免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する方法において、平板上に載置した検体に抗体液を滴下した後、該抗体液を抗体と反応性のない樹脂フィルムで被覆し、抗原抗体反応を行い、次いで染色することを特徴とする染色検体の作製方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は検体中の抗原の検出方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

免疫化学染色方法は、組織や細胞中の抗原を抗原抗体反応を用いて検出し、それらを可視化して同定・証明する方法であり、組織や細胞検索に汎用されている H E 染色や特殊染色だけでは検出できない酵素、ホルモン、腫瘍マーカー、免疫グロブリン、病原体、がん遺伝子関連抗原などの様々な物質を検出できる点で極めて有用な方法である（非特許文献 1）。

【0003】

一方、免疫化学染色方法においては、染色過程で非特異的染色が生じやすく、非特異的染色と特異的染色を判別するためには予め抗原の細胞内又は組織内分布の特徴について熟知したうえで、さらに H E 染色した検体との比較を行う等の経験に基づく部分が大きい（非特許文献 2）。このため、細胞又は組織内分布の変化と非特異的染色を正確に判別することは困難であるという問題があった。

【0004】

従来、抗原の染色性を向上させる方法としては、超音波を用いて抗体の検体への浸透を促進し抗体反応時間を短縮し、かつ抗体との反応性を改良する装置（特許文献 1）や検体を蛋白分解酵素で前処理し、蒸発抑制液を用いて染色性を改良した方法（特許文献 2）、検体の作成過程で抗原が失活した場合に賦活化し、染色性を向上する方法（非特許文献 3、非特許文献 4）などが報告されている。

【0005】

しかし、斯かる技術では、抗原の染色性を向上することはできても、非特異的染色を軽減することはできず、却って操作が煩雑になり、また検体が剥離しやすくなるという問題があった。

【特許文献 1】 特開平 8 - 304388 号公報

【特許文献 2】 特開 2001 - 231552 号公報

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Medical technology 別冊 新染色法のすべて p200~211

【非特許文献2】Pathology and Clinical Medicine, 23(3), p309-316, 2005

【非特許文献3】検査と技術, 28(11), p1331-1336, 2000、

【非特許文献4】検査と技術, 29(7), p910-915, 2001

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は免疫化学染色方法において、非特異的染色を簡便に軽減できる抗原の検出法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、免疫化学染色方法において、検体中の抗原に抗体液を添加した後、該抗体液を抗体と反応性のない樹脂フィルムにて覆うことで、抗体液中の抗体濃度を均一化できると共に検体の乾燥防止を図ることができ、非特異的染色を低減できることを見出した。

【0008】

すなわち、本発明は、免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する抗原の検出方法であって、平板上に載置した検体に抗体液を滴下した後、該抗体液を抗体と反応性のない樹脂フィルムで被覆し、抗原抗体反応を行うことを特徴とする抗原の検出方法に係るものである。

【0009】

また、本発明は、上記抗原の検出方法において使用される抗体液を被覆するための樹脂フィルムに係るものである。

【0010】

また、本発明は、免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する抗原検出キットであって、検体を載置するための平板、抗体液、抗体と反応性のない樹脂フィルム及び発色試薬を含有する抗原検出キットに係るものである。

【0011】

また、本発明は、免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する方法において、平板上に載置した検体に抗体液を滴下した後、該抗体液を抗体と反応性のない樹脂フィルムで被覆し、抗原抗体反応を行い、次いで染色することを特徴とする染色検体の作製方法に係るものである。

【発明の効果】

【0012】

本発明の方法によれば、様々な手法の免疫化学染色方法において、抗原や抗体の種類に関係なく非特異的染色を簡便な操作で軽減することができる。そして、この方法は、検体の性状に関係なく適応できることから、免疫化学染色を必要とする組織検索や病理組織検索だけでなく、培養細胞や血液細胞や生検材料における様々な抗原の発現の確認や分布について検討する際にも有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の抗原の検出方法は、免疫化学的染色方法を用いて検体中の抗原を検出する抗原の検出方法であって、平板上に載置した検体に抗体液を滴下した後、該抗体液を抗体と反応性のない樹脂フィルムで被覆し、抗原抗体反応を行うことを特徴とするものである。

免疫化学的染色方法とは、組織や細胞上で抗原抗体反応を利用して特定の抗原を可視化する染色方法である。免疫化学染色方法をはじめとする免疫学的測定法には、検出目的である抗原に対する抗体に標識物質を結合させた標識抗体（1次抗体）を直接抗原に反応させた後に可視化する直接法と、抗原に対する抗体（1次抗体）を抗原に反応させた後、当該抗体を認識する抗体に標識物質を結合させた標識抗体（2次抗体）を反応させて可視化する間接法とがあるが、本発明においてはそれらの何れでもよく、検体中の抗原と抗体の

10

20

30

40

50

種類に応じて検査毎に適宜選択すればよい。

標識物質としては、蛍光物質、酵素等を使用することができるが、酵素を用いるのが好ましい。

【0014】

本発明の抗原の検出法において用いられる検体としては、いかなる組織や細胞でも使用することができ、生体組織や生態から採取した細胞等の生体材料、培養細胞のいずれも用いることができる。

このうち、生体組織については、パラフィン包埋し薄切した組織切片（パラフィン切片）や、凍結した後、薄切した組織切片（凍結切片）を用いるのが好ましい。

当該検体は、検出抗原の種類に応じて、検体の剥離や破損が起こらない範囲で、適宜公知の抗原賦活化処理を行うことができる。斯かる処理としては、例えばオートクレーブやマイクロウェーブによる加熱やタンパク分解酵素処理が挙げられる。

【0015】

当該検体は平板上に載置されるが、固定の有無や固定方法については、検体及び抗体の種類等に応じて検査毎に公知の方法を適宜選択すればよく、細胞を用いる場合は、そのまま載置することでも、平板上に塗抹することでもよい。

尚、平板は、検体を載置でき、樹脂フィルムを保持可能なものであれば、その材質は制限されるものではないが、光学顕微鏡下で標本を観察しやすい点から、プラスチック製、ガラス製の平板等が挙げられる。標本の剥離が少ない観点から特に組織標本作製用のシランコートスライドガラスを用いることが好ましい。

【0016】

本発明に用いる樹脂フィルムは、抗体との反応性がなく抗体液を覆うことができるシートであればよい。

具体的には、抗体液よりも比重が充分に軽くかつ撥水性を有しており、抗体液に浮きながら十分な抗体液を検体上に保持できるものであり、更に十分な柔軟性を有して剥離時に検体を傷つけることなく剥離できる樹脂フィルムが好ましい。

【0017】

斯かる樹脂フィルムとしては、比重が $0.7 \sim 0.9$ 、更に $0.75 \sim 0.85$ 、特に $0.80 \pm 0.10 \text{ mg/cm}^3$ であるものが好ましく、また100倍希釈した抗体液とフィルム面との接触角が $80^\circ \sim 120^\circ$ 、更に $85^\circ \sim 115^\circ$ 、特に $98.0 \pm 10.5^\circ$ である撥水性を有するものが望ましい。

ここで、抗体液とフィルム面との接触角とは、抗体液（100倍希釈抗体を用いた場合）のフィルムとの接線とフィルム面がなす角度をいう。

【0018】

柔軟性は、バルクソフトネス法（JIS規格）にて座屈試験を行った場合の最大点加重が、 $3.0 \text{ N} \sim 6.0 \text{ N}$ 、更に $3.3 \text{ N} \sim 5.6 \text{ N}$ 、特に $4.6 \pm 0.9 \text{ N}$ であるものがより好ましい。

【0019】

また樹脂フィルムの厚さとしては、 $0.08 \text{ mm} \sim 0.14 \text{ mm}$ 、更に $0.9 \text{ mm} \sim 0.13 \text{ mm}$ 、特に $0.12 \pm 0.07 \text{ mm}$ であるものがより好ましい。

【0020】

また、フィルムは抗体液との間に気泡が入ることを防ぐ等、実験操作の确实性と簡便性を増すという観点から透明又は半透明のものがより好ましい。

このような樹脂フィルムの一例としては、PET（ポリエチレンテレフタレート）やPTT（ポリトリエチレンテレフタレート）等のポリエステル系樹脂フィルム、ポリプロピレン等のポリオレフィン系樹脂フィルム、ナイロンフィルム等のポリアミド系樹脂フィルムPVC（ポリ塩化ビニル）樹脂フィルム、ポリ塩化ビニリデン樹脂フィルム等が挙げられる。また、「サランラップTM」等の市販のフィルム等を使用することもでき、特に「パラフィルムTM」が好ましい。

【0021】

10

20

30

40

50

抗体液を樹脂フィルムで被覆した状態で、抗原抗体反応が行われる。これにより、抗体液中の抗体濃度の均一化された状態で、反応を行うことができる。また同時に検体の乾燥防止を図ることができる。

本発明の方法は、抗原や抗体の種類に関係なく適用できるものであり、抗体液における抗体の濃度等は、抗体の活性や特異性等から、染色感度が高くなるよう検査毎に最適濃度を適宜決定すればよい。また、抗体の反応時間は反応温度と密接に関係するが、検査毎に最適な反応時間と温度を設定すればよく、市販の抗体であればその推奨する反応時間や温度で反応させればよい。

【0022】

本発明の方法を用いた抗原の検出手順を以下に説明する（図1参照）。

- 1) 検体を平板上に載置する。
- 2) 抗体液を検体に滴下する。

抗体液の滴下は、マイクロピペット等にて行えばよい。

- 3) 抗体液の上に樹脂フィルムを被せ、抗体液全体を樹脂フィルムで被覆する。

樹脂フィルムは、塵が入らないようにして抗体液の上に被せるようにする。その際、ピンセットなどを用いて穏やかに被覆してフィルムと抗体液の間の気泡を除去することが好ましい。

- 4) 特定の条件下にインキュベートして抗原・抗体反応を行う。

5) 反応終了後、樹脂フィルムを取り外し、洗浄、染色のための発色試薬等を添加して抗原を可視化し、測定のための染色検体を作製する。

尚、測定に間接法を用いる場合は、1次抗体を含有する抗体液を添加し、抗体液を樹脂フィルムで被覆した後、抗原抗体反応を行う。反応終了後、樹脂フィルムを取り外して、一次抗体を洗浄、除去した後、標識抗体（2次抗体）を含有する抗体液を添加し、樹脂フィルムで当該抗体液を被覆して反応を行った後、染色すればよい。

- 6) 可視化された抗原（染色検体）を測定する。

測定手段としては、例えば、光学顕微鏡下での観察が挙げられる。

【0023】

本発明のキットは、上述した本発明の抗原測定方法を実施するためのキットであり、少なくとも検体を載置するための平板、抗体液、抗体と反応性のない樹脂フィルム及び発色試薬を含有するものである。

【0024】

斯くして本発明の方法を用いれば、後記実施例に示すように、抗原や抗体の種類に関係なく非特異的染色を低減することができ、染色むらを低減することができ、より正確に抗原を可視化して同定・証明することができる。

【実施例】

【0025】

実施例1 アポトーシスを検出するためのアビジンビオチン法によるTUNEL染色

ラット組織中のアポトーシスを検出する目的でApoptosis in situ detection kit（和光純薬、No. 295-5301）を用いて直接法により免疫染色を実施した。脱パラフィン（キシレン、5分×3回）し、親水化（エタノール、5分×3回）した組織切片を十分に水洗（Milli-Q水、5分×3回）した後、添付の蛋白分解酵素（Milli-Qにて2000倍希釈）により蛋白分解処理（37 /30分間）により抗原を賦活化した。続いて切片をPBS(pH 7.4(-))にて染色バット内で洗浄（2分×4回）した。検体中のアポトーシスにより断片化したDNAの3'末端に添付のTdTを用いてビオチン標識deoxyuridine triphosphate（以下b-dUTPとする）を付加（50 μl /37 /30分間）させた。B-dUTPを付加後、切片はPBSにて染色バット内で洗浄（5分×3回）した。切片は内因性ペルオキシダーゼを3%過酸化水素水で不活化（室温/5分間）し、PBSにて染色バット内で洗浄（5分×2回）した。つづいてb-dUTP伸長鎖にペルオキシダーゼ標識一次抗体（1切片あたり100 μl；好ましくは200 μlだが、樹脂フィルムを用いることで抗体液の量を半減することができる）をスライド上に添加し、樹脂フィルムにて抗体液を被覆した（この操作過程の模式図を図1に示す）。フィルムと抗体液の間の気

10

20

30

40

50

泡を除去した後、切片をインキュベート（37℃/30分間又は4℃/オーバーナイト）した。切片はPBSにて染色バット内で洗浄（5分×3回）し余分の抗体を除いた後、顕微鏡下でDAB反応液（200μl）を切片上に添加し発色を行った。切片は、水道水中にてDABの発色を停止させ、5%メチルグリーン（室温/5分）にて核染色を行った後、脱水（エタノール、10秒×3回）、透徹（キシレン、10秒×3回）、封入し（ビオライト）、鏡検に用いた。結果を従来のシートを用いない方法で染色した場合と共に図2に示す。

【0026】

図2により、本発明の方法を用いず従来の方法で染色した標本（B）と比較して、樹脂フィルムを用いた本発明の方法により免疫染色を実施した標本（A）においては、非特異的染色、特に標本周辺部に認められる非特異的染色が軽減可能であることが明らかになった。これは、本発明の方法では、抗体液中の抗体濃度が均一化された状態で反応が行なわれること、同時に検体の乾燥を防止したことによると考えられた。

10

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】図1は、抗体液を樹脂フィルムにて被覆する際の実験工程を示した図である。

【図2】図2は、ラット肝臓のホルマリン固定、パラフィン包埋標本のTUNEL染色の結果を示した図である。（A）：樹脂フィルムを使用した場合、（B）：樹脂フィルムを使用しない場合

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(74)代理人 100111028

弁理士 山本 博人

(74)代理人 100101317

弁理士 的場 ひろみ

(74)代理人 100121153

弁理士 守屋 嘉高

(74)代理人 100134935

弁理士 大野 詩木

(74)代理人 100130683

弁理士 松田 政広

(74)代理人 100140497

弁理士 野中 信宏

(72)発明者 森 多恵子

栃木県芳賀郡市貝町赤羽2 6 0 6 花王株式会社研究所内

Fターム(参考) 2G045 AA24 BA14 BB22 CB01 FA16 FB03

2G054 AA08 AB04 BB08 EA06 GB04

专利名称(译)	检测抗原的方法		
公开(公告)号	JP2007278883A	公开(公告)日	2007-10-25
申请号	JP2006106369	申请日	2006-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	花王公司		
申请(专利权)人(译)	花王公司		
[标]发明人	森多惠子		
发明人	森 多惠子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N21/78		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N21/78.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BA14 2G045/BB22 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB03 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/BB08 2G054/EA06 2G054/GB04		
代理人(译)	村田正树 松田正弘 野信弘		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种检测抗原的方法，该方法可以轻松减少免疫化学染色方法中的非特异性染色。一种使用免疫化学染色方法检测样品中抗原的方法，该方法包括将抗体溶液滴到置于板上的样品上，然后使抗体溶液与抗体反应。一种检测抗原的方法，该方法包括在没有涂层的情况下用树脂膜涂覆并进行抗原-抗体反应。 [选择图]无

【图 2】

