

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5462518号  
(P5462518)

(45) 発行日 平成26年4月2日(2014.4.2)

(24) 登録日 平成26年1月24日(2014.1.24)

|                     |                  |              |  |   |
|---------------------|------------------|--------------|--|---|
| (51) Int.Cl.        |                  | F I          |  |   |
| <b>GO 1 N 33/53</b> | <b>(2006.01)</b> | GO 1 N 33/53 |  | Y |
| <b>GO 1 N 33/48</b> | <b>(2006.01)</b> | GO 1 N 33/48 |  | P |

請求項の数 8 (全 13 頁)

|           |                               |           |                      |
|-----------|-------------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2009-94766 (P2009-94766)    | (73) 特許権者 | 803000056            |
| (22) 出願日  | 平成21年4月9日(2009.4.9)           |           | 公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 |
| (65) 公開番号 | 特開2010-243430 (P2010-243430A) |           | 東京都千代田区岩本町二丁目11番1号   |
| (43) 公開日  | 平成22年10月28日(2010.10.28)       | (74) 代理人  | 100088904            |
| 審査請求日     | 平成24年4月4日(2012.4.4)           |           | 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            |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体精製方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫組織化学染色用抗体を含む抗体溶液を、目的標本の組織と同種由来組織を固定処理した組織標本であって、抗原賦活化されていない吸着スライドからなる抗体精製用組織標本に予め接触させ、回収することにより、目的標本中の目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体を吸着除去することを特徴とする免疫組織化学染色用抗体の精製方法。

【請求項 2】

以下の工程を含む、請求項 1 に記載の抗体の精製方法：

- 1) 固定処理した組織標本であって、抗原賦活化されていない抗体精製用組織標本を準備する工程；
- 2) 免疫組織化学染色用抗体を含む抗体溶液を、前記準備した抗体精製用組織標本に接触させ、前記抗体溶液中に含まれる抗体と抗体精製用組織標本に含まれる非特異物質を抗原抗体反応させる工程；
- 3) 前記抗体精製用組織標本に接触させた抗体溶液を回収する工程。

【請求項 3】

固定処理し、かつ抗原賦活化処理を施した目的標本中の目的抗原を、請求項 1 又は 2 に記載の方法で精製した免疫組織化学染色用抗体を用いて抗原抗体反応させ、染色する工程を含む、免疫組織化学染色方法。

【請求項 4】

以下の工程を含む、請求項 3 に記載の染色方法：

10

20

- 1) 固定処理した組織標本であって、抗原賦活化されていない抗体精製用組織標本を準備する工程；
- 2) 免疫組織化学染色用抗体を含む抗体溶液を、前記準備した抗体精製用組織標本に接触させ、前記溶液中に含まれる抗体と抗体精製用組織標本に含まれる非特異物質を抗原抗体反応させる工程；
- 3) 前記抗体精製用組織標本に接触させた抗体溶液を回収する工程；
- 4) 前記回収して得た抗体溶液を、固定処理し、かつ抗原賦活化処理を施した目的標本の薄切切片に接触させ、目的抗原と精製した免疫組織化学染色用抗体とを抗原抗体反応させる工程；
- 5) 前記抗原抗体反応後の薄切切片を、標識物質を付加した二次抗体で処理し、染色する工程。

10

【請求項 5】

請求項 1 又は 2 に記載の抗体の精製方法に用い、目的標本中の目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体を吸着除去するための抗体精製用組織標本であり、目的標本の組織と同種由来組織を固定処理した組織標本であって、抗原賦活化されていない吸着スライドからなることを特徴とする抗体精製用組織標本。

【請求項 6】

少なくとも以下を含む、免疫組織用染色キット：

- a) 請求項 5 に記載の抗体精製用組織標本；
- b) 免疫組織化学染色用抗体を含む抗体試薬；及び
- c) 標識物質を付加した二次抗体を含む標識試薬。

20

【請求項 7】

請求項 4 に記載の工程 2) 及び 3) で、抗体精製用組織標本に抗体溶液を接触させ、抗体溶液を回収した後に、該抗体精製用組織標本を、標識物質を付加した二次抗体で処理することによる、目的抗原以外の非特異反応物質の吸着確認試験方法。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の免疫組織化学染色用キットを用い、該キット中の抗体精製用組織標本に、抗体試薬を接触させ、免疫組織化学染色用抗体を回収した後に、該抗体精製用組織標本を、標識試薬で処理することによる、目的抗原以外の非特異反応物質の吸着確認試験方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫組織化学 (Immunohistochemistry; IHC) 染色に使用する抗体の精製方法に関する。また、該抗体の精製方法を用いた IHC 染色方法に関し、さらには該抗体の精製用組織標本並びに精製用組織標本を含む IHC 染色用キットに関する。

【背景技術】

【0002】

IHC 染色は、目的抗原を認識する抗体を用いて、目的抗原を個々の症例において解析する方法であり、パラフィンブロック切片や凍結切片で解析が可能である。IHC 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。

40

【0003】

IHC 染色において、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は、抗原賦活化処理の前処置として固定処理を行う必要がある。固定処理には化学固定や物理固定処理等があるが、これらの処理により目的抗原は著しく変性を受け、IHC 染色での検出の不安定性や検出不能の結果に至る。

【0004】

50

抗原賦活化は、病理学の分野においてルーチンに処理されたホルマリン固定、パラフィン包埋試料を用いてIHCを行う際に、所望の組織内の生体高分子の抗原性を回復する処理である。近年、加熱処理による安定した抗原賦活化の手法が登場し、IHCの重要性はますます増加した。抗原賦活化として、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)。

【0005】

しかしながら、加熱処理などの強力な賦活化処理により、目的抗原の検出とともに、非特異反応によるバックグラウンドの検出も増えることが観察され、目的抗原との反応と非特異反応との区別に苦慮することも少なくない。

【0006】

IHCは、目的抗原に対する抗体を用いてその局在を可視化する手法であり、その抗体には、様々な動物種でポリクローナル抗体やモノクローナル抗体が作製されている。特異抗体の抗原に対する親和性は抗体により異なり、ProteinA、ProteinG、目的タンパク質のペプチド等により精製された抗体を使用しても、IHCでは発現を検出できないことがほとんどである。またIHCでの使用が可能であっても、非特異反応などによるバックグラウンドが問題となることも多い。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】特許第3797418号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、IHC染色において、組織又は細胞に存在する目的抗原を認識する抗体を用いて目的抗原を検出する場合に、非特異反応を可能な限り低減化し、目的抗原を効果的に検出するIHC染色方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

上記課題を解決するために、本発明者らはIHC染色での抗原賦活化の程度により、目的抗原の発現が弱くバックグラウンドの発色が強く観察され、ある条件では、目的抗原の発現とバックグラウンドの発色が見られるといった「差」があることに着目し、鋭意研究を重ねた結果、組織切片そのものを用いて抗体を精製することにより、IHC染色でのバックグラウンドを低減させ、感度良く目的抗原を検出するを見出し、本発明を完成した。

【0010】

すなわち、本発明は以下よりなる。

1. IHC染色に使用する抗体を、抗体精製用組織標本に予め接触させることにより、目的標本中の目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体を吸着除去することを特徴とするIHC染色用抗体の精製方法。

2. 前記抗体精製用組織標本と目的標本の組織が同種由来である前項1に記載の抗体の精製方法。

3. IHC染色に使用する抗体が、目的標本中の目的抗原と抗原抗体反応する一次抗体である前項1又は2に記載の抗体の精製方法。

4. 以下の工程を含む、前項1～3のいずれか1に記載の抗体の精製方法：

1) 抗体精製用組織標本を準備する工程；

2) IHC染色に使用する抗体を含む溶液を、前記準備した抗体精製用組織標本に接触させる工程；

3) 前記抗体精製用組織標本に接触させた抗体を含む溶液を回収する工程。

5. 前項1～4のいずれか1に記載の方法で精製した抗体を用いて、目的抗原を染色するIHC染色方法。

10

20

30

40

50

6. 以下の工程を含む、前項5に記載の染色方法：

- 1) 抗体精製用組織標本を準備する工程；
- 2) IHC染色に使用する抗体を含む溶液を、前記準備した抗体精製用組織標本に接触させる工程；
- 3) 前記抗体精製用組織標本に接触させた抗体を含む溶液を回収する工程；
- 4) 前記回収して得た抗体を含む溶液を、IHC用の薄切切片に接触させ、目的抗原と精製された抗体とを抗原抗体反応させる工程；
- 5) 前記抗原抗体反応後の薄切切片を、標識物質を付加した二次抗体で処理し、染色する工程。

7. 前項1～4のいずれかに記載の抗体の精製方法に用い、目的標本中の目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体を吸着除去するための、抗体精製用組織標本。

8. 前項7に記載の抗体精製用組織標本を含む、IHC染色用キット。

9. 前項6に記載の工程2)及び3)で、免疫組織化学染色に使用する抗体を含む溶液を接触させ、抗体を回収した後に、該抗体精製用組織標本を標識物質を付加した二次抗体で処理することによる、目的抗原以外の非特異反応物質の吸着確認試験方法。

10. 前項8に記載の免疫組織化学染色用キットを用い、該キット中の抗体精製用組織標本に、免疫組織化学染色に使用する抗体を含む溶液を接触させ、抗体を回収した後に、該抗体精製用組織標本を標識物質を付加した二次抗体で処理することによる、目的抗原以外の非特異反応物質の吸着確認試験方法。

【発明の効果】

【0011】

本発明の方法によれば、検出しにくい目的抗原であっても、非特異に反応する不要な抗体を吸着除去することで、バックグラウンドの染色を抑え、効果的に目的抗原を検出することができる。本発明の抗体の精製方法に使用した精製用組織標本を含むスライド（吸着スライド）は、目的抗原以外のバックグラウンドが染色され、吸着除去された抗体の局在、量を確認することができ、染色の質確認(quality check)が可能となる。IHC染色の際、個々の抗体によりバックグラウンドの低減効果（非特異反応の低減効果）は異なり、一般にバックグラウンドが強いポリクローナル抗体で、バックグラウンドの低減効果が高いが、本発明の抗体の精製方法によりモノクローナル抗体においてもバックグラウンド低減効果が確認された。このことから、本発明の抗体の精製方法は普遍的に使用できる精製

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】乳癌組織における抗MTA1抗体でのIHC染色結果を示す図である。非精製抗体スライドに比べて、精製抗体スライドの方がバックグラウンドが低減化されている。（実施例1）

【図2】乳癌組織における抗RFP抗体でのIHC染色結果を示す図である。非精製抗体スライドに比べて、精製抗体スライドの方がバックグラウンドが低減化されている。また、吸着スライドそのものが染色されており、非特異反応物質と反応する抗体が吸着されていると考えられる。（実施例2）

【図3】乳癌組織における抗Smad4抗体でのIHC染色結果を示す図である。非精製抗体スライドに比べて、精製抗体スライドの方がバックグラウンドが低減化されている。また、吸着スライドそのものが染色されており、非特異反応物質と反応する抗体が吸着されていると考えられる。（実施例3）

【図4】乳癌組織における抗TGF R1抗体のIHC染色結果を示す図である。非精製抗体スライドに比べて、精製抗体スライドの方がバックグラウンドが低減化されている。

また、吸着スライドそのものが染色されており、非特異反応物質と反応する抗体が吸着されていると考えられる。(実施例4)

【図5】乳癌組織における抗CD24抗体のIHC染色結果を示す図である。非精製抗体スライドに比べて、精製抗体スライドの方がバックグラウンドが低減化されている。また、吸着スライドそのものが染色されており、非特異反応物質と反応する抗体が吸着されていると考えられる。(実施例5)

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明は、IHC染色に使用する抗体、即ちIHC染色用抗体を、予め抗体精製用組織標本に接触させることにより、目的標本中の目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体を吸着除去することを特徴とするIHC用抗体の精製方法に関する。

10

【0014】

IHC染色は、通常以下のA)~G)の工程により実施される。本発明のIHC用抗体は、以下の工程において、D)又はE)で使用される一次抗体又は二次抗体に適用することができ、最も好適には一次抗体に適用することができる。本発明の抗体の精製処理は、D)又はE)の前であればどの時点で行なっても良い。例えば、抗体は目的抗原を検出するための目的標本作製前に、精製処理されたものであっても良い。

A)パラフィン包埋による標本作製後、薄切切片の作製工程。

B)作製した薄切切片について、脱パラフィン操作工程。

C)抗原賦活化処理工程。

20

D)一次抗体処理工程。

E)二次抗体処理工程。

F)染色工程。

G)封入工程。

【0015】

上記の抗体精製方法は、以下の1)~3)の工程を少なくとも含む方法により行うことができる。

1)抗体精製用組織標本を準備する工程；

2)IHC染色用抗体を含む溶液を、前記準備した抗体精製用組織標本に接触させる工程；

30

3)前記抗体精製用組織標本に接触させた抗体を含む溶液を回収する工程。

【0016】

上記において、抗体精製用組織標本とは、IHC染色用抗体を予め接触させる組織標本であり、目的抗原を検出するための目的標本とは区別される。抗体精製用組織標本の組織と目的標本の組織は、同種動物由来又は同一動物由来であることが好ましい。同種動物由来とは、例えばヒト組織標本中の目的抗原を検出する場合、ヒト由来の抗体精製用組織標本であることが好ましく、同一ヒト由来でも良い。ヒト以外の動物についても同様のIHC染色を行う場合は、その動物と同種又は同一個体由来の抗体精製用組織標本であるのが好ましい。例えば目的標本から薄切切片を作製した余剰の組織標本を、上記抗体精製用組織標本として使用することもできる。抗体精製用組織標本の厚さは、厚くてもよく、目的標本と同様の厚さとしても良い。抗体精製用組織標本は、抗体精製処理用の容器内に設置することができる。

40

【0017】

本発明の方法は、IHCの最終段階にある、目的抗原が賦活化されない条件で処理された抗体精製用組織標本を吸着材料に用いることで、他の吸着法では除去しきれない不要な抗体を除去することができる。精製する抗体が、腫瘍にのみ発現している抗原を認識するものであれば、非腫瘍組織すなわち正常組織を抗体精製用組織標本とすることもできる。

【0018】

上記において、IHC用抗体は、目的標本中の目的抗原を検出するための一次抗体又は一次抗体を検出するための標識物質を付加した二次抗体であっても良いが、特に好適には

50

一抗体が挙げられる。一次抗体が、目的標本中の目的抗原以外の物質と非特異反応を起こすことにより、IHC染色においてバックグラウンドの一因となるからである。

【0019】

上記において、IHC染色用抗体を抗体精製用組織標本に予め接触させるために、IHC染色用抗体をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)等に溶解し、溶液とするのが好適である。上記調製したIHC染色用抗体を含む溶液を、例えば抗体精製用組織標本を設置した抗体精製処理用容器に注入し、該抗体精製用組織標本中に含まれる非特異反応物質とIHC染色用抗体を十分に反応させた後に、IHC染色用抗体を含む溶液を、例えばピペットなどにより回収することによって、IHC染色用抗体を精製することができる。

【0020】

本発明は、上記精製したIHC染色用抗体を用いて、目的抗原を染色するIHC染色方法にも及ぶ。かかるIHC染色方法は、上述のA)~G)の工程を含む方法により実施可能である。本発明のIHC染色において、抗体の精製処理を行う以外の工程については、自体公知、あるいは今後開発される方法を用いることができ、特に限定されない。

【0021】

本発明のIHC染色方法は、より詳細には上記A)~G)の工程に、以下の工程を組み込んで行うことができる。

- 1) 抗体精製用組織標本を準備する工程；
- 2) IHC用抗体を含む溶液を、前記準備した抗体精製用組織標本に接触させる工程；
- 3) 前記抗体精製用組織標本に接触させた抗体を含む溶液を回収する工程；
- 4) 前記分離して得た抗体を含む溶液を、IHC用の薄切切片に接触させ、目的抗原と精製された抗体とを抗原抗体反応させる工程(工程D)；
- 5) 前記抗原抗体反応後の薄切切片を、標識物質を付加した二次抗体で処理し(工程E)、染色する工程(工程F)。

【0022】

上記工程において、抗体精製用組織標本では、目的抗原以外のバックグラウンドが染色され、またコーティングガラススライドそのものも染色される。一方、目的抗原を検出するための目的標本について、精製抗体を用いて染色したスライドでは、目的抗原以外のバックグラウンドの染色が抑えられていることから、不要な抗体が吸着除去されていることが確認される。

【0023】

本発明は、目的標本中の目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体を吸着除去するための、抗体精製用組織標本にも及び、該抗体精製用組織標本を含むIHC染色用キットにも及ぶ。本発明の抗体精製用組織標本を用いて、目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体の吸着確認試験を行うことができる。具体的には、上記工程2)で、IHC染色に使用する抗体を含む溶液を接触させた抗体精製用組織標本を、標識物質を付加した二次抗体で処理して染色することにより目的抗原以外の非特異反応物質と反応する抗体の吸着確認試験を行う。抗体精製用組織標本中の非特異反応物質とIHC用抗体が反応する為、前述のA)~G)の工程のうち、E)二次抗体処理工程以下の工程を行うことで、IHC染色をすることができる。ここにおいて、染色された抗体精製用組織標本を確認することで、吸着確認試験を行うことができる。さらには吸着除去された抗体の局在、量を確認することができる。染色の質確認(quality check)が可能となる。個々の抗体により、バックグラウンドの低減効果は異なり、一般に、バックグラウンドの強いポリクローナル抗体で、バックグラウンドの低減効果が高いが、本発明の抗体精製方法によるとモノクローナル抗体においてもバックグラウンド低減効果が確認される。

【0024】

本発明は、IHC用抗体を精製した後、非特異反応物質と反応する抗体の吸着を確認する吸着確認試験方法にも及ぶ。上記、吸着確認試験は、上記IHC染色用キットを用い、該キット中の抗体精製用組織標本にIHC染色に使用する抗体を含む溶液を接触させ、抗体を回収した後に、抗体精製用組織標本を標識物質を付加した二次抗体で処理することに

10

20

30

40

50

より行なうことができる。本発明の抗体精製用組織標本は、抗体精製用にキットに含めることができるほか、非特異物質と反応する抗体吸着確認用標本（例えば吸着確認用スライド）としても利用することができる。

#### 【0025】

本法は、IHC用に最適化された抗体精製法であり、組織切片そのものを用いて精製することが最大の特徴である。IHC以外にも、ウェスタンブロッティング(Westernblotting)等の、抗体を利用した他の手法のバックグラウンドの低減にも使用可能であると考えられる。

#### 【実施例】

#### 【0026】

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。

#### 【0027】

(実施例1) 抗MTA1抗体を一次抗体とした乳癌組織の免疫染色

本実施例では、抗MTA1抗体を一次抗体として乳癌組織の免疫染色を行なった。

#### 【0028】

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作製し、ミクロトームを用いて薄切切片（抗体精製用組織標本1枚及びMetastasis-associated protein 1(MTA1)を検出するための目的標本（精製抗体用1枚、非精製抗体用1枚）計3枚）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、各標本の前処理試料を得た。

#### 【0029】

4) 上記により得た各標本の前処理試料のうち、etastasis-associated protein 1(MTA1)を検出するための目的標本2枚（スライドガラス）を、10mM/tris-0.3mM/EDTA-0.3mM/EGTA-0.3mM/CyDTA(trans-1,2-シクロヘキサンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸)-0.025%(v/v)Tween<sup>(R)</sup>20(Poly(Oxyethylene)sorbitan monolaulate)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し、抗原賦活化処理を行った。前記抗体精製用組織標本（スライドガラス）については抗原賦活化処理は行なわず、PBSにて5分ずつ3回洗浄した。

上記各標本（スライドガラス）を、内因性ペルオキシダーゼの抑制操作のために、3% $H_2O_2$ メタノール（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。次にPBSを用いて各々5分ずつ3回洗浄した。

#### 【0030】

5) 抗体の精製

上記抗体精製用組織標本（スライドガラス）に、抗MTA1抗体（Santa Cruz Biotechnology社、クローンH-166、製品番号sc-10813、rabbit polyclonal抗体）をPBSで50倍希釈した抗体溶液を300 $\mu$ l滴下し、室温で1.5時間静置した。その後、抗体溶液をピペットで回収し、本発明の精製抗体溶液を調製した。上記操作により、抗体溶液中の非特異反応物質と反応する抗体が抗体精製用組織標本に吸着反応し、回収した抗体溶液から非特異反応物質と反応する抗体が吸着除去される。

精製を行わない場合は、上記抗体をPBSで50倍希釈したものを非精製抗体溶液とした。

#### 【0031】

6) 免疫組織化学(IHC)染色

A) 精製抗体スライド

上記4)において抗原賦活化処理を行った目的標本（スライドガラス）に、上記5)で

10

20

30

40

50

得た精製抗体溶液を200 µl滴下し、室温で1時間静置した。

#### B) 非精製抗体スライド

精製処理を行わない抗体を用いた染色では、上記4)において抗原賦活化処理を行った目的標本(スライドガラス)にブロッキング処理を行い、その後上記5)の非精製抗体溶液を200 µl滴下し、室温で1時間静置した。ブロッキング処理は、IHC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スライドに滴下して室温で5分間静置し、その後ブロッキング剤を除くことにより行なった。

#### 【0032】

その後、PBSを用いて各々5分ずつ3回洗浄し、上記IHC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)し、封入した。

10

#### 【0033】

上記IHC染色組織は、光学顕微鏡により観察した(図1)。その結果、一次抗体を精製した場合(精製抗体スライド)は、ブロッキング処理を行わなかったにもかかわらず、目的抗原が染色され、精製処理を行わなかった一次抗体の場合(非精製抗体スライド)に比べて、バックグラウンド低減効果が確認された。

20

#### 【0034】

(実施例2) 抗RFP抗体を一次抗体とした乳癌組織の免疫染色

本実施例では、抗ret finger protein(RFP)抗体(ABL社、クローン9H-812、rabbit polyclonal抗体)を一次抗体として乳癌組織の免疫染色を行なった。一次抗体に抗RFP抗体を用いた以外は実施例1の1)~3)と同手法により処理し、前処理試料を得た。上記により得た各標本の前処理試料のうち、RFPを検出するための目的標本(スライドガラス)を、実施例1の4)と同手法により抗原賦活化処理した。前記抗体精製用組織標本(スライドガラス)については抗原賦活化処理は行なわなかった。

30

#### 【0035】

抗体の精製は、抗RFP抗体を用いた以外は実施例1の5)と同手法により行ない、精製抗体溶液とした。精製を行わない場合は、上記抗体をPBSで50倍希釈したものを非精製抗体溶液とした。

#### 【0036】

IHC染色

#### A) 精製抗体スライド

上記抗原賦活化処理を行った目的標本(スライドガラス)に、上記精製抗体溶液を200 µl滴下し、室温で1時間静置した。ブロッキング処理は、行なわなかった。

#### B) 非精製抗体スライド

精製処理を行わない抗体を用いた染色では、上記抗原賦活化処理を行った目的標本(スライドガラス)に上記非精製抗体溶液を200 µl滴下し、室温で1時間静置した。ブロッキング処理は、行なわなかった。

40

#### 【0037】

その後のPBSによる洗浄、二次抗体処理、発色処理、封入処理については、実施例1と同手法により行なった。また、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライドについても同様に二次抗体処理等を行った。

#### 【0038】

上記IHC染色組織は、光学顕微鏡により観察した(図2)。その結果、一次抗体を精製した場合(精製抗体スライド)は、目的抗原が染色され、精製処理を行わなかった一次

50

抗体の場合（非精製抗体スライド）に比べて、バックグラウンド低減効果が確認された。さらに、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライド（吸着スライド）について、抗体溶液から非特異反応抗体を吸着し、バックグラウンドとして染色されていることが確認された。

#### 【 0 0 3 9 】

（実施例 3）抗 S m a d 4 抗体を一次抗体とした乳癌組織の免疫染色

本実施例では、抗 S m a d 4 抗体（Santa Cruz Biotechnology社、クローンB-8、製品番号sc-7966、mouse monoclonal抗体）を一次抗体として乳癌組織の免疫染色を行なった。一次抗体に抗 S m a d 4 抗体を用いた以外は実施例 1 の 1 ) ~ 3 ) と同手法により処理し、前処理試料を得た。また、10mM/tris -0.3mM/EDTA-0.3mM/EGTA-0.3mM/CyDTA-0.025%(v/v)Tween<sup>(R)</sup>20の代わりに蒸留水を用いた以外は実施例 1 の 4 ) と同手法により抗原賦活化処理を行った。前記抗体精製用組織標本（スライドガラス）については抗原賦活化処理は行なわなかった。抗体の精製処理についても、抗 S m a d 4 抗体を用いた以外は実施例 1 の 5 ) と同手法により行なった。

10

#### 【 0 0 4 0 】

I H C 染色

A ) 精製抗体スライド

上記抗原賦活化処理を行った目的標本（スライドガラス）に、上記精製抗体溶液を 2 0 0 μ l 滴下し、室温で 1 時間静置した。ブロッキング処理は、行なわなかった。

B ) 非精製抗体スライド

精製処理を行わない抗体を用いた染色では、上記抗原賦活化処理を行った目的標本（スライドガラス）に上記非精製抗体溶液を 2 0 0 μ l 滴下し、室温で 1 時間静置した。ブロッキング処理は、行なわなかった。

20

#### 【 0 0 4 1 】

その後の P B S による洗浄、二次抗体処理、発色処理、封入処理については、実施例 1 と同手法により行なった。また、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライドについても同様に二次抗体処理等を行った。

#### 【 0 0 4 2 】

上記 I H C 染色組織は、光学顕微鏡により観察した（図 3）。その結果、一次抗体を精製した場合（精製抗体スライド）は、目的抗原が染色され、精製処理を行なわなかった一次抗体の場合（非精製抗体スライド）に比べて、バックグラウンド低減効果が確認された。さらに、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライド（吸着スライド）について、抗体溶液から非特異反応抗体を吸着し、バックグラウンドとして染色されていることが確認された。

30

#### 【 0 0 4 3 】

（実施例 4）抗 T G F R 1 抗体を一次抗体とした乳癌組織の免疫染色

本実施例では、抗 T G F R 1 抗体（Santa Cruz Biotechnology社、クローンV-22、製品番号sc-398、rabbit polyclonal抗体）を一次抗体として乳癌組織の免疫染色を行なった。一次抗体に抗 T G F R 1 抗体を用いた以外は実施例 1 の 1 ) ~ 3 ) と同手法により処理し、前処理試料を得た。また、10mM/tris -0.3mM/EDTA-0.3mM/EGTA-0.3mM/CyDTA-0.025%(v/v)Tween<sup>(R)</sup>20の代わりに10mM/tris -1mM/EDTA-0.025%(v/v)Tween<sup>(R)</sup>20を用いた以外は実施例 1 の 4 ) と同手法により抗原賦活化処理を行った。前記抗体精製用組織標本（スライドガラス）については抗原賦活化処理は行なわなかった。抗体の精製処理は、抗 T G F R 1 抗体 1 0 0 倍希釈したものを 3 0 0 μ l 用い、1 時間インキュベートした以外は実施例 1 の 5 ) と同手法により行なった。

40

#### 【 0 0 4 4 】

I H C 染色

A ) 精製抗体スライド

上記抗原賦活化処理を行った目的標本（スライドガラス）に、上記精製抗体溶液を 2 0 0 μ l 滴下し、室温で 1 時間静置した。ブロッキング処理は、実施例 1 と同手法により行

50

なった。

#### B) 非精製抗体スライド

精製処理を行わない抗体を用いた染色では、上記抗原賦活化処理を行った目的標本(スライドガラス)に上記非精製抗体溶液を200 $\mu$ l滴下し、室温で1時間静置した。ブロッキング処理は、実施例1と同手法により行なった。

##### 【0045】

その後のPBSによる洗浄、二次抗体処理、発色処理、封入処理については、実施例1と同手法により行なった。また、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライドについても同様に二次抗体処理等を行った。

##### 【0046】

上記IHC染色組織は、光学顕微鏡により観察した(図4)。その結果、一次抗体を精製した場合(精製抗体スライド)は、目的抗原が染色され、精製処理を行わなかった一次抗体の場合(非精製抗体スライド)に比べて、バックグラウンド低減効果が確認された。さらに、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライド(吸着スライド)について、抗体溶液から非特異反応抗体を吸着し、バックグラウンドとして染色されていることが確認された。

##### 【0047】

(実施例5)抗CD24抗体を一次抗体とした乳癌組織の免疫染色

本実施例では、抗CD24抗体(NeoMarkers社、クローンSN3b、製品番号MS-1279-P0、mouse monoclonal抗体)を一次抗体として乳癌組織の免疫染色を行なった。一次抗体に抗CD24抗体を用いた以外は実施例1の1)~3)と同手法により処理し、前処理試料を得た。また、10mM/tris -0.3mM/EDTA-0.3mM/EGTA-0.3mM/CyDTA-0.025%(v/v)Tween<sup>(R)</sup>20の代わりにTris -EDTA -tween<sup>(R)</sup>20を用いた以外は実施例1の4)と同手法により抗原賦活化処理を行った。前記抗体精製用組織標本(スライドガラス)については抗原賦活化処理は行なわなかった。抗体の精製処理は、抗CD24抗体50倍希釈したものを300 $\mu$ l用い、1時間インキュベートした以外は実施例1の5)と同手法により行なった。

##### 【0048】

IHC染色

#### A) 精製抗体スライド

上記抗原賦活化処理を行った目的標本(スライドガラス)に、上記精製抗体溶液を200 $\mu$ l滴下し、室温で1時間静置した。ブロッキング処理は、実施例1と同手法により行なった。

#### B) 非精製抗体スライド

精製処理を行わない抗体を用いた染色では、上記抗原賦活化処理を行った目的標本(スライドガラス)に上記非精製抗体溶液を200 $\mu$ l滴下し、室温で1時間静置した。ブロッキング処理は、実施例1と同手法により行なった。

##### 【0049】

その後のPBSによる洗浄、二次抗体処理、発色処理、封入処理については、実施例1と同手法により行なった。また、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライドについても同様に二次抗体処理等を行った。

##### 【0050】

上記IHC染色組織は、光学顕微鏡により観察した(図5)。その結果、一次抗体を精製した場合(精製抗体スライド)は、目的抗原が染色され、精製処理を行わなかった一次抗体の場合(非精製抗体スライド)に比べて、バックグラウンド低減効果が確認された。さらに、抗体精製用組織標本を用いた抗体の精製処理後のスライド(吸着スライド)について、抗体溶液から非特異反応抗体を吸着し、バックグラウンドとして染色されていることが確認された。

##### 【産業上の利用可能性】

##### 【0051】

以上詳述したように、本発明の方法によれば、検出しにくい目的抗原であっても、非特

10

20

30

40

50

異に反応する不要な抗体を吸着除去することで、バックグラウンドの染色を抑え、効果的に目的抗原を検出することができる。本発明の抗体の精製方法に使用した精製用組織標本を含むスライド（吸着スライド）は、目的抗原以外のバックグラウンドが染色され、吸着除去された抗体の局在、量を確認することができ、染色の質確認(quality check)が可能となる。つまり、本発明の抗体精製用組織標本は、該抗体精製用組織標本を用いて抗体を精製した後に、抗体精製用組織標本を常法により二次抗体処理し、染色することで、非特異物質と反応する抗体の吸着結果を確認することができる。これにより、本発明の抗体精製用組織標本は、抗体精製用にキットに含めることができるほか、非特異物質と反応する抗体吸着確認用標本（例えば非特異抗体吸着確認用スライド）としても利用することができる。また本発明の方法により精製された抗体の種類によっては、ブロッキング処理が不要となる効果が発生する。

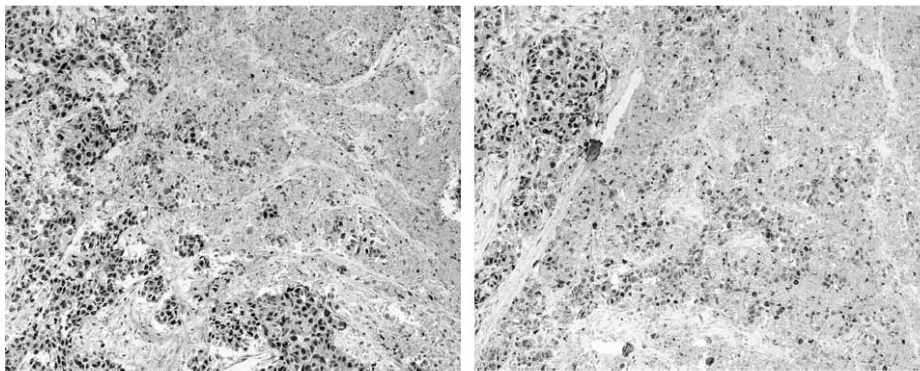
10

## 【 0 0 5 2 】

IHC染色の際、個々の抗体により、バックグラウンドの低減効果（非特異反応の低減効果）は異なるが、一般にバックグラウンドが強いポリクローナル抗体で、バックグラウンドの低減効果が高いが、モノクローナル抗体においても本法によるバックグラウンド低減効果が確認された。このことから、本発明の抗体の精製方法は、普遍的に使用のできる精製法であり、利用価値は非常に高いと考えられる。本発明の方法は、IHC用に最適化された抗体精製法で、組織切片そのものを用いて精製することが最大の特徴であり、IHC以外にも、ウェスタンブロッティング(Westernblotting)等の、抗体を利用した他の手法のバックグラウンドの低減にも使用可能であると考えられる。

20

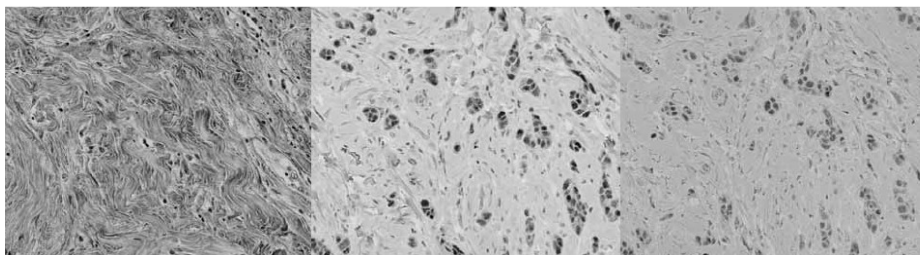
## 【 図 1 】



精製抗体スライド

非精製抗体スライド

## 【 図 2 】



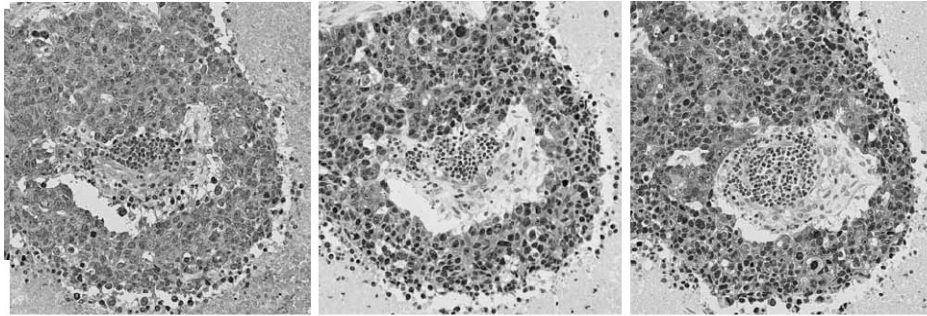
吸着スライド

精製抗体スライド

非精製抗体スライド

(抗体精製用組織標本)

【図3】

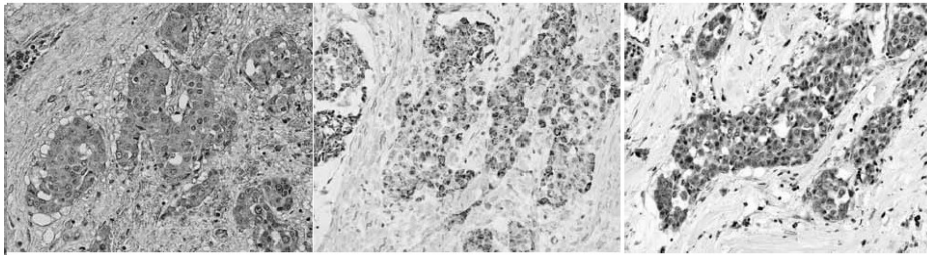


吸着スライド  
(抗体精製用組織標本)

精製抗体スライド

非精製抗体スライド

【図4】

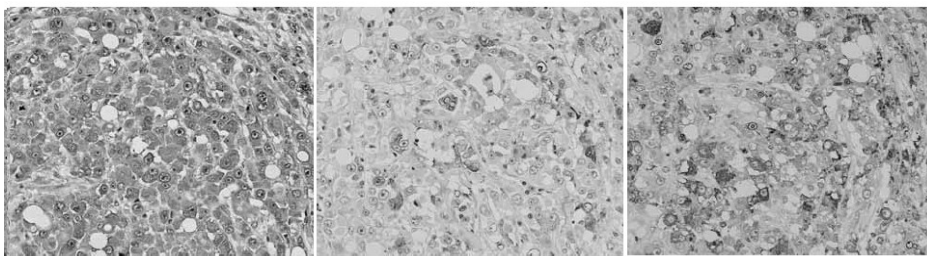


吸着スライド  
(抗体精製用組織標本)

精製抗体スライド

非精製抗体スライド

【図5】



吸着スライド  
(抗体精製用組織標本)

精製抗体スライド

非精製抗体スライド

---

フロントページの続き

- (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
- (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

審査官 吉田 将志

- (56)参考文献 特表2006-512078(JP,A)  
特開昭63-037257(JP,A)  
特開平11-279198(JP,A)  
国際公開第2005/082940(WO,A1)

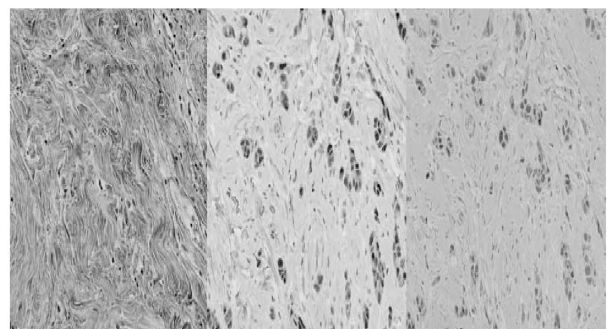
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-98

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 抗体精制方法                                      |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP5462518B2</a>                 | 公开(公告)日 | 2014-04-02 |
| 申请号            | JP2009094766                                | 申请日     | 2009-04-09 |
| [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                                   |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 基金会人文科学基金会                                  |         |            |
| [标]发明人         | 長谷川正規<br>森谷鈴子<br>市原周                        |         |            |
| 发明人            | 長谷川 正規<br>森谷 鈴子<br>市原 周                     |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/53 G01N33/48                         |         |            |
| FI分类号          | G01N33/53.Y G01N33/48.P                     |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/BB25 2G045/CB01 2G045/FA16 2G045/FB03 |         |            |
| 代理人(译)         | 庄司隆<br>Shinobe百合子                           |         |            |
| 审查员(译)         | 吉田正志  |         |            |
| 其他公开文献         | JP2010243430A                               |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>                   |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫组织化学（IHC）染色方法，当通过识别靶抗原的抗体检测靶抗原时，通过靶抗原以外的那些非特异性反应减少背景，能够有效地检测靶抗原存在于组织或细胞中的免疫组织化学（IHC）染色。ZOLUTION：抗原通过组织切片本身进行精制，从而通过IHC染色减少背景，并以更高的灵敏度检测目标抗原。通过使用用于IHC染色的抗体预先与组织样品接触以精制抗体，吸附并除去与靶标样品中除靶抗原之外的非特异性反应物质反应的抗体。Z

【図2】



吸着スライド  
(抗体精製用組織標本)

精製抗体スライド

非精製抗体スライド