

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6634566号
(P6634566)

(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)

(24) 登録日 令和1年12月27日(2019.12.27)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	P
CO 3 C 15/00	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
CO 3 C 19/00	(2006.01)	GO 1 N 33/53	M
		CO 3 C 15/00	Z

請求項の数 6 (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-44853 (P2015-44853)
 (22) 出願日 平成27年3月6日(2015.3.6)
 (65) 公開番号 特開2016-164515 (P2016-164515A)
 (43) 公開日 平成28年9月8日(2016.9.8)
 審査請求日 平成30年3月6日(2018.3.6)

(73) 特許権者 504233638
 株式会社森永生科学研究所
 神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16
 (74) 代理人 100137338
 弁理士 辻田 朋子
 (72) 発明者 本庄 勉
 神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16
 号 株式会社森永生科学研究所内
 (72) 発明者 新道 弘規
 大阪府岸和田市八阪町2丁目1番10号
 松浪硝子工業株式会社内
 (72) 発明者 朴 志秀
 大阪府岸和田市八阪町2丁目1番10号
 松浪硝子工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 コントロールスライド及びコントロール実験の方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標識抗体を用いて被験試料中の被験物質を検出する、間接法による免疫染色実験のためのコントロールスライドであって、

前記標識抗体と直接若しくは間接的に複合体を形成し得る結合性物質及び/又は前記標識抗体と複合体を形成し得ない非結合性物質が結合している担持部と、前記被験試料を固定する試料固定部を有する基板を備え、

前記結合性物質は、

標識抗体以外の前記免疫染色実験で用いる抗体、及び/又は

前記免疫染色実験で用いる抗体と同一の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体 10

であり、

前記非結合性物質は、

前記免疫染色実験で用いる抗体と別の動物種由来の抗体、及び/又は

前記免疫染色実験で用いる抗体と別の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体
 であることを特徴とする、コントロールスライド。

【請求項2】

前記被験試料が組織切片であることを特徴とする、請求項1に記載のコントロールスライド。

【請求項3】

前記担持部が粗面ガラスによって構成されていることを特徴とする、請求項1又は2に記 20

載のコントロールスライド。

【請求項 4】

前記粗面ガラスがブラスト処理ガラス又はエッチング処理ガラスであることを特徴とする、請求項 3 に記載のコントロールスライド。

【請求項 5】

標識抗体を用いて被験試料中の被験物質を検出する、間接法による免疫染色実験のためのコントロール実験の方法であって、

基板の担持部に結合している、前記標識抗体と直接若しくは間接的に複合体を形成し得る結合性物質及び/又は前記標識抗体と複合体を形成し得ない非結合性物質に、

前記免疫染色実験で用いる抗体溶液を、前記免疫染色実験と同一条件で接触させることを特徴とし、

前記結合性物質は、

標識抗体以外の前記免疫染色実験で用いる抗体、及び/又は

前記免疫染色実験で用いる抗体と同一の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体であり、

前記非結合性物質は、

前記免疫染色実験で用いる抗体と別の動物種由来の抗体、及び/又は

前記免疫染色実験で用いる抗体と別の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体であることを特徴とする、方法。

【請求項 6】

標識抗体を用いて被験試料中の被験物質を検出する、間接法による免疫染色実験のためのコントロールスライドの製造方法であって、

基板の一部にブラスト処理又はエッチング処理を施して担持部を設け、その担持部に前記標識抗体と直接若しくは間接的に複合体を形成し得る結合性物質及び/又は前記標識抗体と複合体を形成し得ない非結合性物質を結合させることを特徴とし、

前記結合性物質は、

標識抗体以外の前記免疫染色実験で用いる抗体、及び/又は

前記免疫染色実験で用いる抗体と同一の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体であり、

前記非結合性物質は、

前記免疫染色実験で用いる抗体と別の動物種由来の抗体、及び/又は

前記免疫染色実験で用いる抗体と別の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体であることを特徴とする、コントロールスライドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫染色実験のためのコントロールスライド及びコントロール実験の方法に関する。

【背景技術】

【0002】

組織の免疫染色技術は確定診断に不可欠な技術である。免疫染色による診断には間違いが許されないため、染色時に陽性と陰性の対照実験（コントロール実験）を行う必要がある。

欧米先進国では上述した染色時にコントロール実験を行うことが一般化しており、コントロール実験の結果が無いものは信用されない。

【0003】

免疫染色実験におけるコントロール実験は、被験物質が含まれている、又は含まれていないことが予めわかっている組織切片や培養細胞を貼付としたコントロールスライドによって行うことが理想的である。コントロールスライドは、免疫染色実験に際して実験者自

10

20

30

40

50

らが作製したり、市販のものを購入したりすることで入手することができる。しかしながら、後述する問題点により、一般的に染色のバッチ単位に1つコントロールスライドを入れて染色している。

【0004】

例えば、特許文献1では、前立腺がんの悪性度判定用キットのコントロール実験に、前立腺がん由来培養細胞PC3のパラフィン切片標本であるコントロールスライドを用いている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開2013-63978号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従来、免疫染色実験の対象とする被験物質が発現していることが予めわかっている組織や培養細胞が無い場合には、新たに細胞株を樹立するなどしない限りはコントロールスライドを用意することができなかった。

また、従来のコントロールスライドは組織や培養細胞を用いているため、ロットによる再現性を維持することが非常に困難であるという問題がある。

また、市販のコントロールスライドは組織切片か培養細胞を用いているため高価であるという問題がある。一方、コントロールスライドを自作しようとすると、コントロールとなる組織を入手する手間や、培養細胞を培養する手間などがかかり、実験者にとって大きな負担となる。

【0007】

このような状況に鑑みて、新規のコントロールスライドを提供することを本発明の解決しようとする課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決する本発明は、標識抗体を用いて被験試料中の被験物質を検出する免疫染色実験のためのコントロールスライドであって、

前記標識抗体と直接若しくは間接的に複合体を形成し得る結合性物質及び/又は前記標識抗体と複合体を形成し得ない非結合性物質が結合している担持部と、前記被験試料を固定する試料固定部を有する基板を備えることを特徴とする、コントロールスライドである。

結合性物質が担持部に結合している形態の本発明のコントロールスライドによれば、免疫染色実験と同時にそのポジティブコントロール実験を簡便に行うことができる。

また非結合性物質が担持部に結合している形態の本発明のコントロールスライドによれば、免疫染色実験と同時にそのネガティブコントロール実験を簡便に行うことができる。

【0009】

本発明のコントロールスライドによれば、被験物質を含むことが予めわかっている組織や培養細胞を用意する必要が無い。そのため、そのような組織や培養細胞などの入手が困難な場合であっても、本発明のコントロールスライドによればコントロール実験を行うことができる。

【0010】

また、本発明のコントロールスライドは、結合性物質及び/又は非結合性物質が結合している担持部を染色することでコントロール実験の結果を得ることができるため、組織や培養細胞を用いていた従来のコントロールスライドに比して、ロットによる差を低減することができる。すなわち、本発明のコントロールスライドによれば、再現性に優れたコントロール実験を行うことができる。

【0011】

本発明の好ましい形態では、前記結合性物質及び/又は前記非結合性物質がタンパク質

10

20

30

40

50

又は核酸である。

このような形態の本発明によれば、容易にコントロール実験を行うことができる。

【0012】

本発明のコントロールスライドは、被験試料が組織切片である免疫染色実験のコントロール実験に適用することが好ましい。

従来、組織切片の免疫染色実験では、陽性又は陰性であることが確認されている組織切片や培養細胞をコントロールとして使用することが一般的であった。本発明のコントロールスライドによれば、高価でロットによる性質のバラツキがある組織切片や培養細胞を用いずとも、簡便に組織切片の免疫染色実験のコントロール実験を行うことができる。

【0013】

本発明の好ましい形態では、前記担持部が粗面ガラスによって構成されている。

粗面ガラスは単位エリア当たりの表面積が大きい。そのため、このような形態の本発明は、担持部により多くの結合性物質及び/又は非結合性物質を結合することができ、感度に優れたコントロールスライドを提供することができる。

【0014】

本発明の好ましい形態では、前記粗面ガラスがブラスト処理ガラス又はエッチング処理ガラスである。

これによると、簡単に安価な粗面ガラスの担持部を有するコントロールスライドを提供することができる。

【0015】

本発明の好ましい形態では、前記結合性物質が、前記被験物質である。

一般的に免疫染色実験では被験物質と一次抗体との反応と、一次抗体と標識された二次抗体との反応の2段階の抗原抗体反応を行う。このような形態の本発明のコントロールスライドによれば、免疫染色実験で行われる前述の抗原抗体反応が全て正常に動作していることを裏付けることができる。

【0016】

本発明の好ましい形態では、前記免疫染色実験が間接法によるものであって、前記結合性物質が、前記免疫染色実験において用いられる一次抗体と同一の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体である。

このような形態の本発明のコントロールスライドは、担持部に結合しているアイソタイプコントロール抗体と同一の動物種由来の一次抗体を用いる全ての免疫染色実験に用いることができるため、汎用性がある。

【0017】

また、本発明は、標識抗体を用いて被験試料中の被験物質を検出する免疫染色実験のためのコントロール実験の方法であって、

基板の担持部に結合している、前記標識抗体と直接若しくは間接的に複合体を形成し得る結合性物質及び/又は前記標識抗体と複合体を形成し得ない非結合性物質に、前記免疫染色実験で用いる抗体溶液を、前記免疫染色実験と同一条件で接触させることを特徴とする、方法にもある。

本発明の方法によれば、簡便に免疫染色実験のコントロール実験を行うことができる。

【0018】

また、本発明は、標識抗体を用いて被験試料中の被験物質を検出する免疫染色実験のためのコントロールスライドであって、基板の一部にブラスト処理又はエッチング処理を施して担持部を設け、その担持部に前記標識抗体と直接若しくは間接的に複合体を形成し得る結合性物質及び/又は前記標識抗体と複合体を形成し得ない非結合性物質を結合させることを特徴とする、コントロールスライドの製造方法にもある。

本発明の製造方法によれば、容易に本発明のコントロールスライドを製造することができる。

【発明の効果】

【0019】

10

20

30

40

50

本発明のコントロールスライドは汎用性に優れる。また、本発明によれば再現性の高いコントロール実験の結果を得ることができる。

また、本発明の一形態では、従来のコントロールスライドよりも安価なコントロールスライドを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明のコントロールスライドの実施例を表す図である。(A)本発明のコントロールスライドに組織切片を固定する様子を表す図である。(B)試料固定部に組織切片を固定した状態の本発明のコントロールスライドを表す図である。(C)染色操作後のコントロールスライドにカバーガラスを載せ、組織切片を封入する様子を表す図である。(D)組織切片を封入し顕微鏡観察が可能な状態のコントロールスライドを表す図である。

10

【図2】マウスIgG及びヤギIgGを結合したスライドガラスにペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgGを反応させ発色させた結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本明細書においては被験試料についての免疫染色実験を本実験とも言う。

【0022】

本発明のコントロールスライドは、組織切片や培養細胞などを被験試料とする通常の免疫染色実験の何れにも用いることができる。

【0023】

従来、組織切片を用いた免疫染色実験では、高価なコントロールスライドをコントロール実験に用いる必要があった。そのため、組織切片を用いた免疫染色実験におけるコントロール実験に本発明のコントロールスライドを使用することが特に好ましい。

20

【0024】

本発明のコントロールスライドはタンパク質や核酸などを被験物質とする通常の免疫染色実験であれば特に制限なく適用することができる。

【0025】

また、標識抗体の標識の種類も限定されず、放射性同位元素、金コロイド、蛍光色素、酵素、ビオチンなど通常免疫染色において用いられる標識を適用することができる。

【0026】

免疫染色実験が、抗原に直接反応する一次抗体を標識し、抗原抗体反応を1度しか行わない直接法と、標識していない一次抗体を用いて1度目の抗原抗体反応を行い、一次抗体自体を抗原とする別の抗体(二次抗体)をさらに反応させ2回以上の抗原抗体反応を行う間接法の何れであっても、本発明を適用することができる。

30

【0027】

本発明のコントロールスライドにおける担持部に結合させる物質は、標識抗体と直接若しくは間接的に複合体を形成し得る結合性物質であっても、前記標識抗体と複合体を形成し得ない非結合性物質であってもよい。

【0028】

結合性物質が担持部に結合している形態の本発明のコントロールスライドによれば、免疫染色実験のポジティブコントロール実験を簡便に行うことができる(表1)。

40

【0029】

【表 1】

		ポジティブコントロール用	
		直接法	間接法
結合性物質	(A) 被験物質		(B) 被験物質 (C) 標識抗体以外の本実験で用いる抗体 (D) 本実験で用いる抗体と同一の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体

10

【0030】

直接法の免疫染色実験を行う場合に、結合性物質を被験物質とすることで、標識抗体と被験物質との抗原抗体反応のポジティブコントロール実験を行うことができる。(表1(A))。

【0031】

また、間接法の免疫染色実験を行う場合に、結合性物質を被験物質とすることで、免疫染色実験で行われる全ての抗原抗体反応のポジティブコントロール実験を行うことができる(表1(B))。

【0032】

なお、被験物質がタンパク質である場合、該タンパク質における一次抗体の認識部位にあたるペプチドを結合性物質として担持部に結合しても良い。

20

【0033】

また、間接法の免疫染色実験を行う場合に、結合性物質を標識抗体以外の本実験で用いる抗体とすることで、免疫染色実験における当該抗体を抗原とする抗原抗体反応、さらにはそれに続く抗原抗体反応のポジティブコントロール実験を行うことができる(表1(C))。

なお、標識していない一次抗体と標識抗体の2種類の抗体を用いる通常の間接法の免疫染色実験においては、結合性物質を一次抗体とすることで、一次抗体と標識抗体との抗原抗体反応のポジティブコントロール実験を行うことができる。

【0034】

30

また、間接法の免疫染色実験を行う場合に、該免疫染色実験で用いる抗体と同一の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体を結合性物質としても良い。免疫染色実験における抗体を抗原とする抗原抗体反応、さらにはそれに続く抗原抗体反応のポジティブコントロール実験を行うことができる(表1(D))。

このような形態とすることによって上記表1(C)の形態と同一の効果が得られる他、当該アイソタイプコントロール抗体と同一の動物種由来の抗体を用いる全ての免疫染色実験に適用することができ、汎用性に優れる。

【0035】

一方、非結合性物質が担持部に結合している形態の本発明のコントロールスライドによれば、免疫染色実験のネガティブコントロール実験を簡便に行うことができる(表2)。

40

【表 2】

		ネガティブコントロール用	
		直接法	間接法
非結合性物質	(A) 本実験で用いる抗体と抗原抗体反応を起こさない物質		(B) 本実験で用いる抗体と抗原抗体反応を起こさない物質
			(C) 本実験で用いる抗体と別の動物種由来の抗体
			(D) 本実験で用いる抗体と別の動物種由来のアイソタイプコントロール抗体

10

【 0 0 3 6 】

直接法の免疫染色実験を行う場合に、非結合性物質を本実験で用いる抗体と抗原抗体反応を起こさない物質とすることで、免疫染色実験の結果が当該物質を検出した偽陽性でないことを示すネガティブコントロール実験を行うことができる(表 2 (A))。

この場合、非結合性物質は被験物質と同一種類の分子種とすることが好ましい。具体的には、被験物質がタンパク質である場合には、非結合性物質もタンパク質であることが好ましい。

本発明のさらに好ましい実施の形態では、被験物質がタンパク質である場合には、非結合性物質は該タンパク質のホモログであることが好ましい。このような実施の形態とすることによって、本実験で得られた結果が、被験物質であるタンパク質と相同性の高いホモログを認識した偽陽性ではないことを示すことができる。

20

【 0 0 3 7 】

また、間接法の免疫染色実験を行う場合に、非結合性物質を本実験で用いる抗体と抗原抗体反応を起こさない物質とすることで、免疫染色実験の結果が当該物質を検出した偽陽性でないことを示すネガティブコントロール実験を行うことができる(表 2 (B))。

この場合、非結合性物質は被験物質と同一種類の分子種とすることが好ましい。具体的には、被験物質がタンパク質である場合には、非結合性物質もタンパク質であることが好ましい。

本発明のさらに好ましい実施の形態では、被験物質がタンパク質である場合には、非結合性物質は該タンパク質のホモログであることが好ましい。このような実施の形態とすることによって、本実験で得られた結果が、被験物質であるタンパク質と相同性の高いホモログを認識した偽陽性ではないことを示すことができる。

30

【 0 0 3 8 】

また、間接法の免疫染色実験を行う場合に、非結合性物質を本実験で用いる抗体と別の動物種由来の抗体とすることで、免疫染色実験の結果が当該抗体を検出した偽陽性でないことを示すネガティブコントロール実験を行うことができる(表 2 (C))。このような形態の本発明は、免疫染色実験が異なる動物種由来の複数の一次抗体を用いる多重染色である場合に有効である。

また、この場合、非結合性物質である当該抗体はアイソタイプコントロール抗体とすることが好ましい(表 2 (D))。このような形態の本発明は汎用性に優れる。

40

【 0 0 3 9 】

本発明のコントロールスライドの担持部に結合する結合性物質及び非結合性物質としては、組織、培養細胞、又は大腸菌などから抽出した生体由来の物質でも良いし、化学合成した物質でも良い。

結合性物質及び非結合性物質がタンパク質である場合には、培養細胞や組織などから抽出した内在性のタンパク質、培養細胞中で発現ベクターを用いて強制発現させた後に抽出した外来性のタンパク質、大腸菌を用いたタンパク質発現系によるリコンビナントタンパク質、さらには化学合成されたタンパク質の何れを用いても良い。

【 0 0 4 0 】

50

本発明のコントロールスライドは、担持部を有する基板を備える。

担持部を含む基板の素材としては特に限定されないが、ガラスが好ましい。ガラスは透明性に優れるとともに薬品に対して安定しているため、標識抗体の呈色や蛍光を容易に観察することができる。

【0041】

基板をガラス製とする場合には、滑面ガラスであっても粗面ガラスであっても構わないが、担持部は粗面ガラスとすることが好ましい。粗面ガラスは、ブラスト処理やエッチング処理で容易に施すことができる。

このように担持部を粗面ガラスとすることによって、結合できる結合性物質又は非結合性物質の量を増やすことができる。

10

【0042】

粗面ガラスとする場合の平均の粗さ(Ra)は、0.01~20.0 μ mであることが好ましく、0.05~10.0 μ mであることがより好ましく、0.1~1 μ mであることがさらに好ましく、0.2~0.3 μ mであることがさらに好ましく、0.226~0.252 μ mであることが最も好ましい。

【0043】

また、粗面ガラスとする場合の突出の最大の深さ(Rz)は、0.1~150.0 μ mであることが好ましく、0.5~100.0 μ mであることがより好ましく、1.0~10.0 μ mであることがさらに好ましく、2.0~3.0 μ mであることがさらに好ましく、2.19~2.70 μ mであることが最も好ましい。

20

【0044】

また、粗面ガラスとする場合の突出の間隔(Sm)は、10~2000 μ mであることが好ましく、30~1000 μ mであることがより好ましく、50~500 μ mであることがさらに好ましく、100~200 μ mであることがさらに好ましく、165~179 μ mであることが最も好ましい。

【0045】

なお、平均の粗さ(Ra)、最大の深さ(Rz)、突出の間隔(Sm)は、JIS B 0601で規定された定義を用いるものとする。

【0046】

結合性物質又は非結合性物質を担持部に結合させる方法は特に限定されず、公知の方法を用いることができる。

30

ガラス製の基板の担持部にタンパク質や核酸などの生体物質である結合性物質又は非結合性物質を担持させる方法については、シランカップリング法、シリコンバイオ法など、当業者に公知の方法を適用することができる。

【0047】

具体的には、以下の方法によりガラス製の基板の担持部にタンパク質である結合性物質又は非結合性物質を結合させることができる。

すなわち、担持部を0.5%酢酸に溶解した1%(3-グリシジルオキシプロピル)トリメトキシシラン溶液に16時間浸漬した後、乾燥した圧搾空気を吹き付けて乾燥する。

また、0.5M NaClを含む50mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)に、好ましくは0.1~1mg/mlの濃度で結合性物質又は非結合性物質であるタンパク質を溶解した溶液を調製する。

40

そして、(3-グリシジルオキシプロピル)トリメトキシシラン溶液により処理された担持部に、前記タンパク質溶液を滴下し、16時間静置する。

16時間に静置の後、0.05% Tween 20と150mM NaClを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)で担持部を洗浄し、さらに担持部を1mg/mlのウシ血清アルブミンを含むTBSに室温で1時間浸漬する。

その後、担持部を水で洗い流して乾燥した圧搾空気を吹き付けて乾燥することによって、結合性物質又は非結合性物質であるタンパク質を担持部に結合することができる。

【0048】

50

担持部に結合性物質又は非結合性物質を結合した後に、マイクロウェーブ処理、温浴処理、そしてオートクレーブ処理などの賦活化処理を行うこともできる。

【0049】

基板における担持部の数は1つであっても良いが、好ましくは2以上である。

担持部の数を2以上とする場合には、結合性物質と非結合性物質の両方を担持部に結合することが好ましい。このような形態とすることによって、一つのコントロールスライドによってポジティブコントロール実験とネガティブコントロール実験を同時に行うことができる。

【0050】

また、担持部の数を2以上とする場合には、異なる量の結合性物質又は非結合性物質をそれぞれの担持部に結合させることが好ましい。

結合した結合性物質又は非結合性物質の量に比例した強度のシグナルが得られれば、該シグナルが担持部に結合した結合性物質又は非結合性物質に由来することを確認することができる。

【0051】

また、本実験である免疫染色実験が多重染色である場合には、多重染色の対象である複数の被験物質、多重染色で用いる複数の一次抗体、多重染色で用いる一次抗体と同一の動物種由来の複数のアイソタイプコントロール抗体などを結合するために、担持部は複数設けることが好ましい。

【0052】

本発明のコントロールスライドは被験試料を固定するための試料固定部を基板に有する

。本発明のコントロールスライドは、コントロール実験のための担持部と、本実験のための試料固定部を同一の基板に有するため、コントロール実験と本実験を同一条件のもと行うことができ、信頼性の高い実験結果を得ることができる。

【0053】

本発明のコントロールスライドを用いた実験は、通常の免疫染色実験と同様の手法により行うことができる。すなわち、抗体溶液とのインキュベーションと洗浄操作を行うことにより染色を行うことができる。この時、コントロールスライド全体を抗体溶液及び緩衝液に含浸することで、抗原抗体反応及び洗浄操作を行うことができる。

【0054】

このように、本発明のコントロールスライド10によれば、インキュベーション時間、温度など本実験における抗原抗体反応と同様の条件でコントロール実験を行うことができるため、信頼性の高い実験結果を得ることができる。

【0055】

また、本発明は、基板の担持部に結合した結合性物質及び/又は非結合性物質に、免疫染色実験で用いる抗体溶液を、免疫染色実験と同一条件で接触させることを特徴とする、標識抗体を用いて被験試料中の被験物質を検出する免疫染色実験のためのコントロール実験の方法にも関する。

本発明のコントロール実験の方法は、上述の本発明のコントロールスライドを用いることで実現することができる。

【実施例】

【0056】

< 1 > 本発明のコントロールスライドの実施例

図1を参照しながら、本発明のコントロールスライド10の一実施形態を説明する。

【0057】

コントロールスライド10は、スライドガラス11を基板とする。

また、コントロールスライド10は担持部121と担持部122の2つの担持部を有している。担持部121には結合性物質、担持部122には非結合性物質を結合している。

そして、コントロールスライド10は、被験試料を固定するための試料固定部13を有

10

20

30

40

50

している。

【0058】

次に、被験試料としてパラフィン包埋組織切片を用いる場合の本発明のコントロールスライド10の使用方法について説明する。

パラフィン包埋組織切片（組織切片14、パラフィン141）は常法に従ってスライドガラス11上の試料固定部13に固定する（図1A）。

【0059】

なお、被験試料として培養細胞を用いる場合には、コントロールスライド10をサイトスピんに設置し、遠心によって培養細胞を試料固定部13に固定することができる。

【0060】

パラフィン包埋組織切片を固定した後は常法に従い、脱パラフィン処理を行い、パラフィン141を除去する（図1B）。その後、通常の組織免疫染色と同様、抗原を賦活化させるために、コントロールスライド10をマイクロウエーブ処理、温浴処理、そしてオートクレーブ処理などで加熱処理する。

【0061】

その後は通常の免疫染色実験と同様の手順によって染色操作を行うことができる。

すなわち、コントロールスライド10の抗体溶液への含浸と緩衝液による洗浄により染色を行うことができる。

また、撥水ペンを用いて試料固定部と担持部の周りに撥水サークルを形成し、そこへ抗体溶液及び緩衝液を滴下することによって、抗原抗体反応及び洗浄を行ってもよい。

標識抗体が酵素標識である場合には、標識抗体による抗原抗体反応に続く洗浄の後に、試料固定部と担持部を基質溶液と反応させ発色させる。

【0062】

その後、組織切片14上に封入剤を滴下し、カバーガラス15を載せて組織切片14を封入する（図1C、D）。

その後、必要に応じてマニキュア液によりカバーガラス15の端をシールした後に顕微鏡観察を行う。

【0063】

結合性物質を結合させた担持部121が染色され、非結合性物質を結合させた担持部122が染色されていないければ、それぞれの担持部の結果は、組織切片14の染色結果のポジティブコントロール及びネガティブコントロールとすることができる（図1D）。

【0064】

<2> 試験例

以下、スライドガラスを基板とする本発明のコントロールスライドを用いた試験例について説明する。本試験例においては、結合性物質としてマウスIgG、非結合性物質としてヤギIgGを用いた。

【0065】

(1) マウスIgGの調製

マウス血清を4、40、000×gで20分間遠心分離し、上清を得た。この上清10mlを150mM NaClを含む20mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.4）で平衡化した5mlのHiTrap Protein G HP（GEヘルスケア）に1ml/minの流速で通し、次いで20mlの平衡化緩衝液で洗浄した。0.1M グリシン-塩酸緩衝液（pH3.0）でカラムに結合したIgGを溶出し、直ちに1M Tris-塩酸緩衝液（pH8.6）を1/10容量加えて中和し、40mgのマウスIgGを得た。

【0066】

(2) ヤギIgGの調製

ヤギ血清を4、40、000×gで20分間遠心分離し、上清を得た。実施例1と同様の手順でHiTrap Protein G HP（GEヘルスケア）を用いて60mgのIgGを得た。

【0067】

(3) スライドガラスの加工

26mm×76mmのスライドガラスの一部をブラスト処理したものを作製した。ブラスト処理部分の隣に約5mmの幅でガラスエッチング剤(グラスファンタジー、有限会社フロステック)を塗布し、室温で30分間静置した。静置後水でエッチング剤を洗い流し、乾燥した圧搾空気を吹き付けて乾燥してエッチング処理部分を作製した。

【0068】

(4) IgGの担持部への結合

スライドガラスにおけるブラスト処理部分、エッチング処理部分そして、これらの処理がなされていない無処理部分を担持部として、以下の手順で結合性物質であるマウスIgGと、非結合性物質であるヤギIgGを結合した。

加工したスライドガラスを0.5%酢酸に溶解した1%(3-グリシジルオキシプロピル)トリメトキシシラン溶液に16時間浸漬し、その後、乾燥した圧搾空気を吹き付けて乾燥した。0.5M NaClを含む50mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH8.0)を溶媒として調製したマウスIgGとヤギIgGの1mg/mlと0.1mg/mlの溶液を調製した。スライドガラスのブラスト処理部分、エッチング処理部分、及び無処理部分に、上述のマウスIgG溶液及びヤギIgG溶液、並びに20%スクロース水溶液 1μlを滴下して16時間静置した。静置後、0.05% Tween20と150mM NaClを含む20mM Tris-HCl緩衝液(pH7.4)(TBS)で洗浄し、1mg/mlのウシ血清アルブミンを含むTBSに室温で1時間浸漬した。浸漬後水で洗い流し、乾燥した圧搾空気を吹き付けて乾燥した。

【0069】

(5) 染色

賦活化処理を行った後にTBSで洗浄し、上述のマウスIgG及びヤギIgG溶液、並びに20%スクロース水溶液を滴下した部分に、1mg/mlのウシ血清アルブミンを含むTBSで500倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウスIgG(Jackson社)を滴下し、乾燥しないように蓋ができるプラスチック箱に入れて25℃で1時間静置して反応させた。反応後、TBSでペルオキシダーゼ標識抗体を洗浄除去し、ペルオキシダーゼ染色DABキット(ナカライテスク)を用いて5分間染色した。結果を図2に示す。

【0070】

図2に示すように、マウスIgGを結合した担持部はマウスIgGの濃度が1mg/ml、0.1mg/mlの何れであっても染色された。一方、ヤギIgGを結合した担持部は何れも染色されなかった。

結合性物質であるマウスIgGを結合した担持部での観察結果は、ペルオキシダーゼ標識抗体が正常に動作していることを示すポジティブコントロールとなっていることを示している。

また、非結合性物質であるヤギIgGを結合した担持部での観察結果は、ペルオキシダーゼ標識抗体がヤギIgGに交差反応をしていないことを示すネガティブコントロールとなっていることを示している。

【0071】

また、図2に示すように、ブラスト処理されている担持部における発色が最も強く観察され、無処理の担持部における発色が最も弱かった。

この結果は、担持部を粗面ガラスとすることによって、単位エリア当たりに結合できる結合性物質の量を増大させ、結果として標識抗体からのシグナルを増大させることができることを示唆している。

【産業上の利用可能性】

【0072】

本発明は、免疫染色実験のコントロール実験に応用することができる。

【符号の説明】

10

20

30

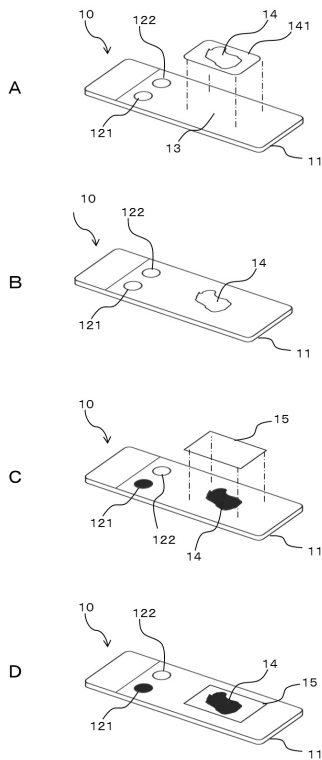
40

50

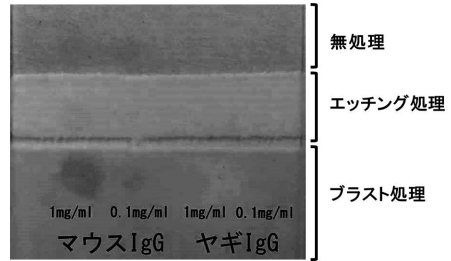
【 0 0 7 3 】

- 1 0 コントロールスライド
- 1 1 スライドガラス (基板)
- 1 2 1 結合性物質を結合させた担持部
- 1 2 2 非結合性物質を結合させた担持部
- 1 3 試料固定部
- 1 4 組織切片 (被験試料)
- 1 4 1 パラフィン
- 1 5 カバーガラス

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 3 C 19/00 A

(72)発明者 宇越 利恵
大阪府岸和田市八阪町2丁目1番10号 松浪硝子工業株式会社内

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特表2002-533695(JP,A)
特開2002-211954(JP,A)
特開2013-039065(JP,A)
特表2012-533288(JP,A)
特表2005-518553(JP,A)
特開昭60-073462(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 4 4
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	控制滑块和控制实验方法		
公开(公告)号	JP6634566B2	公开(公告)日	2020-01-22
申请号	JP2015044853	申请日	2015-03-06
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所 松浪硝子工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所 松浪硝子工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社森永生科学研究所		
[标]发明人	本庄勉 新道弘規 朴志秀 宇越利恵		
发明人	本庄 勉 新道 弘規 朴 志秀 宇越 利恵		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 C03C15/00 C03C19/00		
CPC分类号	C03C15/00 C03C19/00 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.P G01N33/53.D G01N33/53.M C03C15/00.Z C03C19/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB03 4G059/AA08 4G059/AB01 4G059/AB03 4G059/AB09 4G059/AB11 4G059/AC01 4G059/BB04 4G059/BB14		
其他公开文献	JP2016164515A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明解决了提供新颖的控制滑块的问题。对照载玻片10可用于免疫染色实验中，以使用标记的抗体检测测试样品14中的目标物质，所述对照载玻片10的特征在于提供有基底11，其中基底11包括：载体部分12，其结合有能够直接或间接与标记的抗体形成复合物的结合物质和/或不能与标记的抗体形成复合物的非结合物质；样本固定部分13，将感兴趣的样本固定在其上。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6634566号 (P6634566)
(45) 発行日 令和2年1月22日(2020.1.22)	(24) 登録日 令和1年12月27日(2019.12.27)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01) C03C 15/00 (2006.01) C03C 19/00 (2006.01)	F I G01N 33/53 G01N 33/48 G01N 33/53 G01N 33/53 C03C 15/00	Y P D M Z
		請求項の数 6 (全 13 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号 特願2015-44853(P2015-44853)	(73) 特許権者 504233638 株式会社森永生科学研究所	
(22) 出願日 平成27年3月6日(2015.3.6)	神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16 100137338	
(65) 公開番号 特願2016-164515(P2016-164515A)	(74) 代理人 弁理士 辻田 朋子	
(43) 公開日 平成28年9月8日(2016.9.8)	(72) 発明者 本庄 勉 神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目1番16 号 株式会社森永生科学研究所内	
審査請求日 平成30年3月6日(2018.3.6)	(72) 発明者 新道 弘規 大阪府岸和田市八阪町2丁目1番10号 松浪硝子工業株式会社内	
	(72) 発明者 朴 志秀 大阪府岸和田市八阪町2丁目1番10号 松浪硝子工業株式会社内	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 コントロールスライド及びコントロール実験の方法		