

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6393252号  
(P6393252)

(45) 発行日 平成30年9月19日(2018.9.19)

(24) 登録日 平成30年8月31日(2018.8.31)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 Q 1/28	(2006.01)	C 1 2 Q 1/28	
C 1 2 Q 1/6841	(2018.01)	C 1 2 Q 1/6841	Z
G O 1 N 33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48	P
G O 1 N 33/53	(2006.01)	G O 1 N 33/53	Y

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2015-503043 (P2015-503043)  
 (86) (22) 出願日 平成26年2月28日 (2014.2.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/055004  
 (87) 国際公開番号 W02014/133120  
 (87) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014.9.4)  
 審査請求日 平成28年6月10日 (2016.6.10)  
 (31) 優先権主張番号 特願2013-39672 (P2013-39672)  
 (32) 優先日 平成25年2月28日 (2013.2.28)  
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 505145149  
 株式会社ニチレイバイオサイエンス  
 東京都中央区築地六丁目19番20号  
 (74) 代理人 100081514  
 弁理士 酒井 一  
 (74) 代理人 100082692  
 弁理士 蔵合 正博  
 (74) 復代理人 100157989  
 弁理士 葛谷 稔  
 (72) 発明者 笠松 敏幸  
 東京都東村山市久米川町1-52-14  
 株式会社ニチレイバイオサイエンス 開発  
 センター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標識酵素を用いた染色用DAB含有基質キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ペルオキシダーゼ発色団としてのジアミノベンジジン(DAB)と水とを含む発色団含有溶液(A)、並びにテトラエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物、エチレンジアミン四酢酸・ジアンモニウム塩、グリコールエーテルジアミン四酢酸、及びニトリロ三酢酸からなる群より選択される少なくとも1種のキレート剤と、POE(23)ラウリルエーテルと、イミダゾールと、過酸化水素と、水とを含む発色試薬(B)を含有し、前記発色団含有溶液(A)及び前記発色試薬(B)が別に保管される染色用DAB含有基質キットであって、

該染色用DAB含有基質キットは、前記発色団含有溶液(A)及び前記発色試薬(B)からなる2液タイプ、又は前記発色試薬(B)が、過酸化水素及び水を含む発色化溶液(B1)、並びに前記キレート剤、POE(23)ラウリルエーテル、イミダゾール及び水を含む基質安定化溶液(B2)に分かれている、前記発色団含有溶液(A)、前記発色化溶液(B1)及び前記基質安定化溶液(B2)からなる3液タイプであり、

前記発色試薬(B)又は前記基質安定化溶液(B2)中のPOE(23)ラウリルエーテルの含有量は、前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液中の含有割合として、0.1~0.4質量%となる量であり、

前記発色試薬(B)又は前記基質安定化溶液(B2)中の前記キレート剤の含有量は、前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液中の濃度として、0.3~3mMとなる量である、

ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた染色用DAB含有基質キット。

## 【請求項 2】

前記染色用DAB含有基質キットが前記3液タイプである、請求項1記載のキット。

## 【請求項 3】

免疫染色法又はin situハイブリダイゼーション法の染色に使用するための、請求項1又は2記載のキット。

## 【請求項 4】

前記キレート剤がテトラエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物である請求項1～3のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 5】

前記発色団含有溶液(A)中のDABの含有量は、用いる前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液中の濃度として、0.1～10mg/mLとなる量である請求項1～4のいずれかに記載のキット。

10

## 【請求項 6】

前記発色試薬(B)又は前記基質安定化溶液(B2)中のイミダゾールの含有量は、用いる前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液中の濃度として、3～300mMとなる量である請求項1～5のいずれかに記載のキット。

## 【請求項 7】

前記発色試薬(B)又は前記発色化溶液(B1)中の過酸化水素の含有量は、用いる前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液中の含有割合として、0.001～0.3質量%となる量である請求項1～6のいずれかに記載のキット。

20

## 【請求項 8】

発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)のpHを、用いる前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液のpHが、5～9となるように調整した請求項1～7のいずれかに記載のキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた、免疫組織化学染色(IHC)法、免疫細胞化学染色(ICC)法等の免疫染色法や、in situハイブリダイゼーション(ISH)法における発色反応を、ジアミノベンジジン(DAB)及びその増感剤としてのイミダゾールを含む発色反応液を用い、DABの凝集によるDAB含有基質溶液への沈澱及び非特異的な染色による、例えば、バックグラウンド染色を抑制して、特異染色強度を増強させることが可能なDAB含有基質キットに関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

現在、病理や分子生物学の分野ではIHC法、ICC法又はISH法に用いる発色反応液は、発色するための標識酵素の種類に応じて試薬の使い分けが行われている。標識酵素として現在最も使用されているのはペルオキシダーゼであり、多くは植物性の西洋わさび由来のペルオキシダーゼ(HRP)(分子量40～45kDa)が用いられることが非特許文献1に記載されている。HRPの酵素反応水素供与体としては、茶色に発色するジアミノベンジジン(DAB)及び過酸化水素を含むDAB含有基質溶液が日常的に用いられている。

40

DAB含有基質溶液は、2液または3液に分けられ(DABが反応しないようにDABと過酸化水素が分けられている場合が一般的である)、用事調製を行う高濃度ストック溶液、または乾燥品であるタブレット錠が市販されている。例えば、Dako社製のLiquid DAB+ Substrate Chromogen System(Code: K3468)、Thermo SCIENTIFIC社製のDAB Quanto(Code: TA-XX-QHDX)、Life Technologies社製のStable DAB(Code:750118)、ニチレイバイオサイエンス社製のDAB基質キットが挙げられる。しかし、その組成については公開されていない場合がほとんどである。

非特許文献1には、DAB発色の増感剤としてイミダゾールを添加することが記載されてい

50

る。これまでの経験上、イミダゾールはDAB反応を早める効果はあるが、同時にDABの凝集を引き起こし、一定時間経過後に反応液中への沈殿を引き起こすことがわかっていた。加えて、増感効果が高いが故に、組織上の目的物質以外のHRP存在下周辺にも非特異的な染色、例えば、バックグラウンド染色を引き起こすことがわかっていた。

ところで、特許文献1には、DAB含有基質溶液に必要により非イオン性界面活性剤を含有させること、特許文献2及び3には、DAB含有基質溶液にEDTAを配合できることが記載されている。しかし、これら文献には、上記イミダゾールを配合した場合の課題については何等検討されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特許第3503890号公報

【特許文献2】カナダ特許出願公開第2417671号明細書

【特許文献3】ドイツ特許出願公開第3812605号明細書

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】名倉宏，長村義之，堤寛：改訂四版 渡辺・中根 酵素抗体法 学際企画 2002）「酵素抗体法」（改訂四版 渡辺・中根 学際企画2002）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた、免疫組織化学染色法、免疫細胞化学染色法等の免疫染色法やin situハイブリダイゼーション法における発色反応を、DAB及びその増感剤としてのイミダゾールを含むDAB含有基質溶液を用い、特異染色強度を増強させるとともに、非特異的な染色を抑制することが可能なDAB含有基質キットを提供することにある。

本発明の他の課題は、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた、免疫染色法やin situハイブリダイゼーション法における発色反応を、DAB及びその増感剤としてのイミダゾールを含む発色反応液を用い、特異染色強度を増強させるとともに、DAB含有基質溶液中におけるDABの凝集による沈澱を抑制し、非特異的な染色をも抑制することが可能なDAB含有基質キットを提供することにある。

本発明の別の課題は、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた、免疫染色法やin situハイブリダイゼーション法における発色反応を、DAB及びその増感剤としてのイミダゾールを含むDAB含有基質溶液を用い、特異染色強度を増強させるとともに、バックグラウンド染色等の非特異的な染色を抑制し、且つDAB含有基質溶液中におけるDABの凝集による沈澱を長期間抑制して使用感及び保存安定性をも改善したDAB含有基質キットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究した結果、従来、免疫染色法の酵素抗体法や、in situハイブリダイゼーション法に一般的に使用されている発色のためのDAB含有基質溶液組成に、増感剤として知られるイミダゾールを含有させて、特異染色強度を増加させた場合であっても、特定のキレート剤と、特定の非イオン界面活性剤とを含有させることにより、非特異的な染色を軽減しつつ、スライドガラスを用いた場合に生じる、例えばバックグラウンド染色を抑制しうることを見出した。更に、DAB含有基質溶液を調製後のDABの凝集を阻害することができ、更には、2液タイプ以上とし、その組成を調製することにより、その保存安定性も格段に良くなり、4 遮光保存下では各液の混合後2週間まで沈澱が起こることなく、且つDAB含有基質溶液の調製直後と同等の染色性が得られることを見出し、本発明を完成した。

ここで、本発明においてDAB含有基質溶液とは、本発明のキットを混合又は混合希釈し

10

20

30

40

50

て得られる基質溶液を意味する。また、本明細書中においては、染色を、染色又は発色の意味で用いる場合がある。

#### 【0007】

本発明によれば、ペルオキシダーゼ発色団としてのジアミノベンジジン(DAB)と水とを含む発色団含有溶液(A)、並びにテトラエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム・二水和物(EDTA・2Na)、エチレンジアミン四酢酸・ジアンモニウム塩(EDTA・2NH<sub>4</sub>)、グリコールエーテルジアミン四酢酸(GEDTA)、及びニトリロ三酢酸(NTA)からなる群より選択される少なくとも1種のキレート剤と、POE(23)ラウリルエーテルと、イミダゾールと、過酸化水素と、水とを含む発色試薬(B)を含有し、前記発色団含有溶液(A)及び前記発色試薬(B)が別に保管される染色用DAB含有基質キットであって、該染色用DAB含有基質キットは、前記発色団含有溶液(A)及び前記発色試薬(B)からなる2液タイプ、又は前記発色試薬(B)が、過酸化水素及び水を含む発色化溶液(B1)、並びに前記キレート剤、POE(23)ラウリルエーテル、イミダゾール及び水を含む基質安定化溶液(B2)に分かれている、前記発色団含有溶液(A)、前記発色化溶液(B1)及び前記基質安定化溶液(B2)からなる3液タイプであり、前記発色試薬(B)又は前記基質安定化溶液(B2)中のPOE(23)ラウリルエーテルの含有量は、前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液中の含有割合として、0.1~0.4質量%となる量であり、前記発色試薬(B)又は前記基質安定化溶液(B2)中の前記キレート剤の含有量は、前記染色用DAB含有基質キットの各溶液を混合又は混合希釈したDAB含有基質溶液中の濃度として、0.3~3mMとなる量である、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた、例えば、IHC法、ICC法、又はISH法の染色に使用するためのDAB含有基質キット(以下、本発明のキットと略すことがある)が提供される。

#### 【発明の効果】

#### 【0008】

本発明のキットは、ペルオキシダーゼ発色団としてのDABと水とを含む発色団含有溶液(A)、並びに特定のキレート剤と、特定の界面活性剤と、イミダゾールと、過酸化水素と、水とを含む発色試薬(B)を含有し、少なくとも発色団含有溶液(A)及び発色試薬(B)が別に保管される2液タイプ以上のキットであるので、ペルオキシダーゼを用いた、IHC法、ICC法や、ISH法において、特異染色強度を増強させるとともに、非特異的な染色を抑制し、且つDABの凝集によるDAB含有基質溶液中での沈澱を抑制することができる。更には、上記沈澱を長期間抑制して使用感及び保存安定性をも改善することができる。このような効果を有する本発明のキットは、スライドガラスに貼付した組織検体をIHC法により染色する際、ICC法により細胞検体を染色する際、更にはISH法により組織や細胞検体を染色する際に特に有用である。

#### 【発明を実施するための形態】

#### 【0009】

以下、本発明を更に詳細に説明する。

本発明のキットは、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた、IHC法及びICC法における染色や、ISH法における発色を基盤にして、生体の正常又は腫瘍組織や細胞等に存在する、例えば、抗原、mRNA、DNA等の特定の物質を、DAB発色団を用いて染色することにより、病理診断や生物分子学実験等を行うための、2液タイプ以上のDAB含有基質キットである。

本発明において、IHC法に用いる組織検体、ICC法に用いる細胞検体や、ISH法に用いる組織や細胞検体は、組織や細胞が変性しないように固定後薄切して用いる。例えば、長期保存等を目的として、通常ホルマリンやアルコール等によって検体を固定し、続いてパラフィン等を含む包埋媒体により包埋した後、組織検体を薄切りし、スライドガラスに貼付したものを好ましく用いることができる。染色に先立つ抗原抗体反応や、DIG(Digoxigenin)標識を施したプローブを用いたハイブリダイゼーションの後の抗体反応は、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた、直接法又は間接法等の公知の方法で行うことができる。この際、ペルオキシダーゼとしては、HRPを好ましく用いることができる。

本発明のキットは、好ましくは、上記組織や細胞検体を貼付したスライドガラスを用いた間接法の酵素抗体反応に用いることができる。例えば、検体をホルマリンで固定した後にパラフィン包埋したスライドガラスを脱パラフィンし、親水化した後、必要により抗原性賦活化を行い、内因性ペルオキシダーゼ除去を行った後、一次抗体を反応させるか、あるいはDIG標識を施したプローブを反応させ、次いで、ペルオキシダーゼ、及び二次抗体又は抗DIG抗体が結合したポリマー等を反応させた後、本発明のキットの各溶液を混合して調製したDAB含有基質溶液を反応させて、ペルオキシダーゼを触媒としてその箇所を特異的に発色させる方法に用いることができる。また、発色後、更にヘマトキシリン等により核染色を行うことにより形態を見やすくすることも可能である。

前記DAB含有基質溶液の調製は、例えば、本発明のキットに含まれる各溶液を混合する方法、又は本発明のキットに含まれる各濃縮溶液を、特定量の蒸留水等の水に混合する方法により行うことができる。

#### 【0010】

本発明のキットを用いて、IHC法における染色や、ISH法による発色に用いることができる組織としては、例えば、大腸（正常・癌）、小腸（正常）、十二指腸（正常）、結腸（正常）、胃（正常・癌）、食道（正常）、舌（正常）、肝臓（癌）、膵臓（正常）、腎臓（正常）、脳（正常）、小脳（正常）、心臓（正常）、乳腺（正常・癌）、胎盤、前立腺（正常・癌）、肺（正常・癌）、甲状腺（正常）、扁桃（正常）、リンパ節（正常）、子宮頸部（正常）、悪性黒色腫、ホジキンリンパ腫、胸腺過形成症例、GIST (Gastrointestinal stromal tumor)、中皮腫が挙げられる。以上の組織のうち、大腸（正常・癌）、小腸（正常）、十二指腸（正常）、結腸（正常）、胃（正常・癌）など筋組織または結合組織を含む部分にはバックグラウンド染色が特に見られる傾向があるので、本発明のキットはこれらの組織の染色に極めて有効である。

本発明のキットを用いて、ICC法における染色やISH法における発色に用いることができる細胞としては、例えば、乳癌細胞、肺癌細胞、リンパ芽球（正常）が好ましく挙げられる。

#### 【0011】

本発明のキットは、ペルオキシダーゼ発色団としてのDABと水とを含む発色団含有溶液(A)を含む。この溶液(A)に含まれるDABは、後述する過酸化水素が、ペルオキシダーゼと反応し、その際の酵素反応の水素供与体として作用する。そして、該DABが、重合反応することにより、ペルオキシダーゼ結合部分を特異的に茶系色に発色させることができる。

溶液(A)において、DABの含有量は、最終的にIHC法やICC法の染色又はISH法の発色に用いるDAB含有基質溶液として発色反応しうる量であれば良く、好ましくは、用いるDAB含有基質溶液中の濃度として、0.1~10mg/mLである。0.1mg/mL未満では、発色反応が十分に生じないおそれがあり、一方、10mg/mLを超えると、DAB含有基質溶液とした際にDABが凝集等して沈澱が生じるおそれがある。

#### 【0012】

溶液(A)において、水としては、例えば、蒸留水又は超純水を用いることができる。水の量は、溶液(A)においてDABを溶解しうる量であって、最終的にDAB含有基質溶液とした際に、各成分の含有量が適当な範囲となるように適宜選択して決定することができる。

溶液(A)には、DAB及び水の他に、DABの溶解性又は安定性を向上させるために、各種有機溶媒を含有させることもでき、その含有量は、その目的に応じて適宜選択することができる。

#### 【0013】

本発明のキットは、特定のキレート剤と、POEアルキルエーテル系非イオン界面活性剤及び/又はPOPアルキルエーテル系非イオン界面活性剤と、イミダゾールと、過酸化水素と、水とを含む発色試薬(B)を含む。

発色試薬(B)は、例えば、過酸化水素及び水を含む発色化溶液(B1)と、特定のキレート剤、POEアルキルエーテル系非イオン界面活性剤及び/又はPOPアルキルエーテル系非イオン界面活性剤、イミダゾール及び水を含む基質安定化溶液(B2)とに分割することができる

10

20

30

40

50

。本発明のキットは、DABと過酸化水素とを別に保管する2液タイプ以上のキットであれば何液タイプであっても良いが、効率性を考慮した場合、前記発色団含有溶液(A)及び前記発色試薬(B)からなる2液タイプ、又は前記発色団含有溶液(A)、前記発色化溶液(B1)及び前記基質安定化溶液(B2)からなる3液タイプにすることが好ましい。

#### 【0014】

発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)に用いる特定のキレート剤は、EDTA・2Na、EDTA・2NH<sub>4</sub>、GEDTA、及びNTAからなる群より選択される少なくとも1種であり、特にその効果の点からEDTA・2Na又はGEDTAの使用が好ましい。これらの特定のキレート剤は、特に、DABの非特異的な結合を抑制し、特に、スライドガラスに貼付した組織検体を用いる場合に、バックグラウンド染色を抑制することができる。また、後述する特定の非イオン界面活性剤との組み合わせにより、検体組織が、筋組織や結合組織等であっても、DABの非特異的結合を有効に抑制することができる。

10

前記発色試薬(B)又は前記基質安定化溶液(B2)中の前記キレート剤の含有量は、用量依存的に上記作用効果が改善される傾向にあり、その作用効果を考慮して適宜選択することができる。具体的には、用いるDAB含有基質溶液中の濃度として、好ましくは0.1~10mMとなる量、特に好ましくは0.3~3mMとなる量で含有させることができる。

#### 【0015】

発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)に用いる特定の界面活性剤は、POE(23)ラウリルエーテル(Brij 35)、POE(20)セチルエーテル(Brij 58)、POEステアリルエーテル、POEオレイルエーテル、POEミリスチルエーテル、POEオクチルドデシルエーテル等のPOEアルキルエーテルや、POPラウリルエーテル、POPセチルエーテル、POPステアリルエーテル、POPオレイルエーテル、POPミリスチルエーテル、POPオクチルドデシルエーテル等のPOPアルキルエーテルからなる群より選択される少なくとも1種が挙げられ、特にBrij 35の使用が好ましい。これらの特定の非イオン界面活性剤は、特に、DABと過酸化水素を含むDAB含有基質溶液とした際に、DABの水溶液中での重合や沈澱を抑制する効果に優れ、また、DABの発色強度を増強することもできる。他の界面活性剤、例えば、Triton X-100(4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol)、NP-40(4-Nonylphenyl-polyethylene glycol)もしくはTween 20(Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)を用いた場合、又は非プロトン性極性溶媒、例えば、DMSO(Dimethyl sulfoxide)を用いた場合には、所望の効果が得られない。

20

30

発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)中の前記POEアルキルエーテル系非イオン界面活性剤及び/又はPOPアルキルエーテル系非イオン界面活性剤の含有量は、用量依存的に上記作用効果が改善される傾向にあり、その作用効果を考慮して適宜選択することができる。具体的には、IHC法、ICC法やISH法に用いるDAB含有基質溶液中の含有割合として、好ましくは0.05~30質量%となる量、特に好ましくは0.1~5質量%となる量で含有させることができる。

#### 【0016】

発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)に用いるイミダゾールは、DABの発色において、発色強度を増強させる増強剤として作用する成分である。このような作用効果を示すイミダゾールは、発色強度を増強させる一方で、過酸化水素の存在下、DABの凝集を引き起こし、一定時間経過後にDAB含有基質溶液中への沈殿を引き起こし、加えて、検体組織や検体細胞上の目的物質以外の非特異的な染色、例えば、バックグラウンド染色を引き起こす原因にもなっている。そこで、本発明のキットでは、前記特定のキレート剤及び前記特定の非イオン界面活性剤を組み合わせた、発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)にイミダゾールを配合する。

40

発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)中のイミダゾール含有量は、用量依存的に上記DABの発色増強作用が得られるが、多いと上記問題点が発生する可能性も高くなるので、IHC法、ICC法や、ISH法に用いるDAB含有基質溶液中の濃度として、通常3~300mMとなる量、特に5~100mMとなる量で含有させることが好ましい。また、イミダゾールの

50

濃度を高くする場合には、前記特定のキレート剤の濃度も上記範囲内で高く設定することが好ましい。

【0017】

発色試薬(B)又は発色化溶液(B1)に用いる過酸化水素は、ペルオキシダーゼに作用してDABの発色反応に係る成分である。過酸化水素の含有量は、過剰量であっても良いが、多すぎると特異染色強度が低下するおそれがある。また、少なすぎると発色反応が十分進行せず、また、DAB含有基質溶液とした後の保存性が低下するおそれがある。

そこで、過酸化水素の含有量は、IHC法、ICC法や、ISH法に用いるDAB含有基質溶液中の含有割合として、好ましくは0.001~0.3質量%となる量、特に好ましくは0.01~0.05質量%となる量で含有させることができる。

10

【0018】

発色試薬(B)、発色化溶液(B1)及び基質安定化溶液(B2)に用いる水は、例えば、蒸留水又は超純水を用いることができる。水の量は、各成分の含有量が適当な範囲となるように適宜選択して決定することができる。

本発明のキットにおいて、発色試薬(B)又は基質安定化溶液(B2)のpHは、得られるDAB含有基質溶液のpHが、通常、5~9、特に6~8となるように調整することが、本発明の所望の効果を効率的に得るために好ましい。

pHの調整は、塩酸等のpH調整剤により行うことができる他、リン酸、Tris、MOPS、HEPES、ADA、CHES、MES等の緩衝剤を用いて行うこともできる。過酸化水素を含む発色試薬(B)又は得られるDAB含有基質溶液の保存安定性をより向上させる点からは塩酸等のpH調整剤の使用が特に好ましい。

20

【0019】

本発明のキットに用いる前記各溶液には、本発明の効果が損なわれない範囲で、また、他の効果を得るために他の成分を配合することができる。その他の成分としては、例えば、防腐剤、殺菌剤が挙げられる。

【0020】

本発明のキットは、用手法でも自動機器を用いる方法のいずれでも使用することができる。特に、温度制御可能な自動機器及び自動免疫組織化学染色機器や、自動in situハイブリダイゼーション装置を用いた方法への使用が簡便で好ましい。

本発明のキットを用いた、IHC法、ICC法及びISH法における染色又は発色は、キットの各溶液を混合し、もしくは特定量の水にキットの各溶液を混合溶解して、DAB含有基質溶液を調製し、例えば、スライドガラスの検体組織や検体細胞を用いた酵素抗体法の場合、DAB含有基質溶液を標識した領域に、通常、室温(15~30)で滴下し、1~20分間反応させることにより行うことができる。

30

【実施例】

【0021】

以下、実施例、対照例及び比較例により本発明を更に詳細に説明するが本発明はこれらに限定されない。

尚、以下に示す例において評価は下記のとおり行った。

評価項目(1)

40

特異染色強度：得られた試料の特異染色強度を光学顕微鏡により観察した。

評価は、対照例1又は2の特異染色強度を「+」とし、これを基準にその強度が対照例1又は2の何倍であるかで評価した。

評価項目(2)

バックグラウンド染色：得られた試料のバックグラウンド染色を光学顕微鏡により観察した。

評価は、バックグラウンド染色が認められた比較例1又は8を「+」とし、バックグラウンド染色が認められない対照例1又は8を「-」として、比較例1又は8を基準に、その量より多いものを「+」、約2倍多いものを「2+」として評価した。

評価項目(3)

50

DAB含有基質溶液の色：後述する実施例及び比較例で調製したキットの各溶液を混合した後の混合溶液の色を目視で観察した。

評価項目(4)

DAB含有基質溶液中の沈殿物：後述する実施例及び比較例で調製したキットの各溶液を混合した後の混合溶液中の沈殿物の状態を目視で観察した。

評価項目(5)

保存安定性：後述する実施例及び比較例で調製したキットを、37℃で保存した際に、調製直後のキットを混合して得られたDAB含有基質溶液を用いて評価した特異染色強度及びバックグラウンド染色と同程度の評価結果が得られる保存期間を測定した。

【0022】

ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた免疫組織化学染色試料の作製

(A)脱パラフィン工程及び親水化工程

ホルマリンで固定した後にパラフィン包埋したヒト小腸組織切片をミクロトームで3µmに薄切し、あらかじめシランコーティングされたコーティングスライドガラスに貼り付け、37℃で16時間乾燥させた。これを、キシレン層に3分×3回静置し、脱パラフィンを行った。その後、エタノール層に3分×4回静置し、親水化を行った。

(B)洗浄工程

最後のエタノール層静置後、pH7.6のリン酸緩衝液にて3分×3回の洗浄を行った。

(C)免疫組織化学染色工程

【0023】

用手法での免疫組織化学染色

(B)洗浄工程を行ったスライドガラスの水気を切り、3%過酸化水素/メタノール溶液に10分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、反応終了後、pH7.6のリン酸緩衝液にて、3分×3回の洗浄を行った。

得られたスライドガラスの水気を切り、組織検体の周りをPAPペン(大道産業社製)を用いて囲み、試薬の防波堤を作製した。

次いで、スライドガラスの水気を切り、マウス由来の一次抗体として、商品名「抗アクチン(平滑筋)モノクローナル抗体(クローン1A4)」(ニチレイバイオサイエンス社製)を、スライドガラスに100µL滴下し、25℃で60分間反応させた。反応終了後、pH7.6のリン酸緩衝液にて3分×3回の洗浄を行った。

次に、洗浄したスライドガラスの水気を切って、アミノ酸ポリマーにペルオキシダーゼと、Fab'にした抗マウスIg及び抗ウサギIgを二次抗体として結合させた標識ポリマー(商品名「シンプルステインMAX-PO(MULTI)」、ニチレイバイオサイエンス社製)を100µL滴下し、25℃で30分間反応させた。反応終了後、pH7.6のリン酸緩衝液にて3分×3回の洗浄を行った。

該洗浄後、水気を切ったスライドガラスに、発色基質として、各実施例及び比較例で調製したキットにより得られるDAB含有基質溶液を滴下し、室温で5分間反応させた。反応終了後、5分間流水洗浄を行った。続いて、対比染色のためスライドガラスの水気を切り、マイヤーヘマトキシリンに30秒間反応させ核染色させた後、5分間流水洗浄を行った。

次いで、スライドガラスの水気を切り、エタノール層通過×3回、エタノール層静置3分×1回、キシレン層通過1回、キシレン層静置5分×2回を行い、脱水・透徹を行った。その後、非水溶性封入剤(ニチレイバイオサイエンス社製)を用いて、封入を行って各試料を作製した。

【0024】

対照例1：イミダゾール、特定のキレート剤及び特定の界面活性剤を含まない3液タイプのDAB含有基質キット

発色団含有溶液(A)中の濃度が15mg/mLとなる量のDABを蒸留水に溶解し、発色団含有溶液(A)を調製した。また、蒸留水に過酸化水素を0.6質量%となるように溶解し

10

20

30

40

50

た発色化溶液(B1)と、pH7.6のTris-HClの基質安定化溶液(B2')とを調製した。得られた発色団含有溶液(A)、発色化溶液(B1)及び基質安定化溶液(B2')からなるキットを用い、蒸留水1mLに各溶液1滴(約40μL)を混合攪拌して、DAB含有基質溶液を調製した。

得られたDAB含有基質溶液を用いて、上記方法にしたがって免疫組織化学染色試料を作製した。得られた試料について、評価項目(1)及び(2)を行った。結果を表1に示す。

#### 【0025】

比較例1：特定の界面活性剤を含まない3液タイプのDAB含有基質キット

発色団含有溶液(A)中の濃度が15mg/mLとなる量のDABを蒸留水に溶解し、発色団含有溶液(A)を調製した。また、蒸留水に過酸化水素量が0.6質量%となるように溶解した発色化溶液(B1)と、イミダゾール濃度0.5M、及びEDTA・2Na濃度20mMとなるように蒸留水に溶解し、塩酸でpHを7.5に調整した基質安定化溶液(B2')とを調製した。得られた発色団含有溶液(A)、発色化溶液(B1)及び基質安定化溶液(B2')からなるキットを用い、蒸留水1mLに各溶液1滴(約40μL)を混合攪拌して、DAB含有基質溶液を調製した。得られた溶液中の過酸化水素の含有割合は0.024質量%、イミダゾール濃度は20mM、EDTA・2Na濃度は0.8mMであり、pHは7.5であった。

得られたDAB含有基質溶液を用いて、上記方法にしたがって免疫組織化学染色試料を作製した。得られた試料について、評価項目(1)~(4)を行った。尚、評価項目(3)及び(4)についてはDAB含有基質溶液の調製後1時間経過後に評価を行った。結果を表1及び表2に示す。

#### 【0026】

実施例1：キレート剤としてEDTA・2Naを用いた3液タイプのDAB含有基質キット

基質安定化溶液(B2')の代わりに、イミダゾール濃度0.5M、EDTA・2Na濃度20mM、及びPOE(23)ラウリルエーテル(Brij 35、SIGMA-ALDRICH社製)の含有割合が1質量%となるように蒸留水に溶解し、塩酸でpHを7.5に調整した基質安定化溶液(B2)を調製した。この(B2)溶液の調製以外は、比較例1と同様に、キットを用いてDAB含有基質溶液を調製した。得られた溶液中の過酸化水素濃度は0.024質量%、イミダゾール濃度は20mM、EDTA・2Na濃度は0.8mM、Brij 35の含有割合は0.04質量%であり、pHは7.5であった。また、各評価を比較例1と同様に行った。尚、評価項目(3)及び(4)については、DAB含有基質溶液の調製後3日経過後の評価も行った。結果を表1及び表2に示す。

#### 【0027】

比較例2~4：異なる界面活性剤を含む3液タイプのDAB含有基質キット

Brij 35の代わりに、表1に示すポリオキシソルビタン系非イオン界面活性剤であるTween 20、ポリオキシアルキルフェニルエーテル系非イオン界面活性剤であるTriton X-100又はショ糖脂肪酸エステルである商品名「DKエステルSS」(第一工業製薬社製)を用いた以外は、実施例1と同様に基質安定化溶液(B2')を調製した。発色団含有溶液(A)及び発色化溶液(B1)については、比較例1と同様に調製し、3液タイプのキットとした。得られたキットを用いて比較例1と同様にDAB含有基質溶液を調製し、各評価を実施例1と同様に行った。結果を表1及び表2に示す。尚、得られたDAB含有基質溶液中の各濃度は、実施例1と同様である。

#### 【0028】

実施例2~5：実施例1で用いたキレート剤の種類又は濃度を変更した3液タイプのDAB含有基質キット

EDTA・2Na 20mMの代わりに、表1に示す濃度のEDTA・2NH<sub>4</sub>、NTA、GEDTA又はEDTA・2Naを用いた以外は、実施例1と同様に基質安定化溶液(B2)を調製した。発色団含有溶液(A)及び発色化溶液(B1)については、比較例1と同様に調製し、3液タイプのキットとした。得られたキットを用いて比較例1と同様にDAB含有基質溶液を調製し、各評価を実施例

10

20

30

40

50

1と同様に行った。結果を表1及び表2に示す。尚、実施例5で得られたDAB含有基質溶液中の過酸化水素濃度は0.024質量%、イミダゾール濃度は20mM、EDTA・2Na濃度は0.8mM、Brij 35の含有割合は0.04質量%であり、pHは7.5であった。

【0029】

比較例5～7：異なるキレート剤を含む3液タイプのDAB含有基質キット

EDTA・2Naの代わりに、表1に示す濃度のクエン酸、酒石酸又は没食子酸を用いた以外は、比較例2と同様に基質安定化溶液(B2')を調製した。発色団含有溶液(A)及び発色化溶液(B1)については、比較例1と同様に調製し、3液タイプのキットとした。得られたキットを用いて比較例1と同様にDAB含有基質溶液を調製し、各評価を実施例1と同様に行った。但し、混合1時間後の溶液の色及び沈殿物の状態の評価については行わなかった。結果を表1及び表2に示す。尚、比較例5～7で得られたDAB含有基質溶液中の過酸化水素濃度は0.024質量%、イミダゾール濃度は20mM、クエン酸又は酒石酸濃度は0.8mM、没食子酸濃度は0.08mM、Tween 20の含有割合は0.04質量%であった。

【0030】

【表1】

	(B2)液又は(B2')液の界面活性剤の種類	(B2)液又は(B2')液のキレート剤の種類と濃度	特異染色強度	バックグラウンド染色
対照例1	—	—	+	—
比較例1	—	20mM EDTA・2Na	2.5+	±
実施例1	Brij 35	20mM EDTA・2Na	3+	—
比較例2	Tween 20	20mM EDTA・2Na	3+	+
比較例3	Triton X-100	20mM EDTA・2Na	3+	+
比較例4	DK エステル SS	20mM EDTA・2Na	3+	+
実施例2	Brij 35	20mM EDTA・2NH <sub>4</sub>	3+	—
実施例3	Brij 35	20mM NTA	3+	—
実施例4	Brij 35	20mM GEDTA	3+	—
実施例5	Brij 35	50mM EDTA・2Na	3+	—
比較例5	Tween 20	20mM クエン酸	2+	+
比較例6	Tween 20	20mM 酒石酸	2+	+
比較例7	Tween 20	2mM 没食子酸	+	2+

【0031】

【表2】

	混合1時間後の溶液		混合3日後の溶液	
	色	沈殿物の状態	色	沈殿物の状態
比較例1	透明溶液	沈殿あり	—	—
実施例1	無色透明	沈殿なし	茶色透明	沈殿なし
比較例2	透明溶液	沈殿なし	茶色白濁	沈殿あり
比較例3	透明溶液	沈殿なし	茶色白濁	沈殿あり
比較例4	透明溶液	沈殿なし	茶色白濁	沈殿物が多い
実施例2	無色透明	沈殿なし	茶色透明	沈殿なし
実施例3	無色透明	沈殿なし	茶色透明	沈殿なし
実施例4	無色透明	沈殿なし	茶色透明	沈殿なし
実施例5	無色透明	沈殿なし	茶色透明	沈殿なし
比較例5	—	—	茶色白濁	沈殿あり
比較例6	—	—	茶色白濁	沈殿あり
比較例7	—	—	茶色白濁	沈殿あり

【0032】

表1及び表2より、発色増強作用を有するイミダゾールを含有しない対照例1では、特

異染色強度が低い、バックグラウンド染色は生じなかった。これに対して、イミダゾールを含有する比較例 1 では、特定のキレート剤である EDTA・2Na を含有しても、バックグラウンド染色が生じ、混合 1 時間後という短時間に溶液に沈澱が認められた。比較例 3 ~ 4 は、POEアルキルエーテル系非イオン界面活性剤及びノ又はPOPアルキルエーテル系非イオン界面活性剤以外の非イオン界面活性剤を配合することにより、比較例 1 よりも更に優れた特異染色強度を示したが、バックグラウンド染色も増強され、更に、混合 3 日後の溶液にも沈澱が認められた。比較例 5 ~ 6 は、キレート剤を EDTA・2Na よりもキレート効果が低いものに変更した例であるが、この場合、特異染色強度が EDTA・2Na を用いた比較例 2 より低下し、バックグラウンド染色及び溶液の状態は比較例 2 とほぼ同様な結果であった。これに対して、実施例 1 では、特異染色強度が増強され、バックグラウンド染色も認められず、混合 3 日後の溶液に沈澱も認められなかった。更に、実施例 2 ~ 4 より、EDTA・2Na を特定の他のキレート剤に変更した場合であっても実施例 1 と同様な効果が得られることがわかった。

10

## 【 0 0 3 3 】

実施例 6 : イミダゾールの濃度を変更した 3 液タイプの DAB 含有基質キット

イミダゾールの濃度 0 . 5 M を、0 . 1 M ( DAB 含有基質溶液中のイミダゾール濃度は 4 m M )、0 . 2 M ( DAB 含有基質溶液中のイミダゾール濃度は 8 m M )、0 . 3 M ( DAB 含有基質溶液中のイミダゾール濃度は 1 2 m M ) 及び 0 . 4 M ( DAB 含有基質溶液中のイミダゾール濃度は 1 6 m M ) に変更した以外は、実施例 1 と同様に基質安定化溶液 ( B2 ) を調製し、実施例 1 と同様に 3 液タイプのキットとして、同様な評価を行った。その結果、特異染色強度が、+ 1 . 5 ~ + 2 . 5 の範囲で、イミダゾール濃度の用量依存的に増加することがわかった。バックグラウンド染色及び混合溶液の色並びに沈澱状態は、いずれも実施例 1 と同様であった。

20

## 【 0 0 3 4 】

実施例 7 ~ 1 3 : 界面活性剤の濃度を変更した 3 液タイプの DAB 含有基質キット

Brij 35 の濃度を表 3 に示す濃度に変更した以外は、実施例 1 と同様に基質安定化溶液 ( B2 ) を調製した。発色団含有溶液 ( A ) 及び発色化溶液 ( B1 ) については、比較例 1 と同様に調製し、3 液タイプのキットとした。得られたキットを用いて DAB 含有基質溶液を調製し、得られた混合直後の溶液を用いて免疫組織化学染色試料の作製を行った。得られた試料について、評価項目 ( 1 ) 及び ( 2 ) の評価を行った。結果を表 3 に示す。また、DAB 含有基質溶液調製後、4 遮光下にて 2 週間保存した後の混合溶液を用いて免疫組織化学染色試料の作製を行った。得られた試料について、評価項目 ( 1 ) 及び ( 2 ) の評価、並びに 4 遮光下にて 2 週間保存した後の混合溶液について評価項目 ( 3 ) 及び ( 4 ) の評価を行った。結果を表 4 に示す。尚、調製した DAB 含有基質溶液中の Brij 35 の濃度は、実施例 7 で 0 . 0 2 質量 %、実施例 8 で 0 . 0 6 質量 %、実施例 9 で 0 . 0 8 質量 %、実施例 1 0 で 0 . 1 質量 %、実施例 1 1 で 0 . 1 2 質量 %、実施例 1 2 で 0 . 2 質量 %、実施例 1 3 で 0 . 4 質量 % であった。

30

## 【 0 0 3 5 】

【表 3】

	Brij 35 の濃度 (質量%)	特異染色 強度	バックグラウンド 染色
実施例 7	0.5	3+	—
実施例 8	1.5	3+	—
実施例 9	2.0	3+	—
実施例 10	2.5	3+	—
実施例 11	3.0	3.5+	—
実施例 12	5.0	3.5+	—
実施例 13	10.0	3.5+	—

10

【 0 0 3 6 】

【表 4】

	Brij 35 の濃度 (質量%)	混合後 2 週間 4℃遮光下保存		
		特異染色強度	バックグラウンド染色	溶液保存後の沈澱状態
実施例 7	0.5	3+	—	沈澱あり
実施例 8	1.5	3+	—	沈澱あり
実施例 9	2.0	3+	—	沈澱あり
実施例 10	2.5	3+	—	僅かに沈澱あり
実施例 11	3.0	3.5+	—	沈澱なし
実施例 12	5.0	3.5+	—	沈澱なし
実施例 13	10.0	3.5+	—	沈澱なし

20

【 0 0 3 7 】

表 4 の結果より、特定の界面活性剤の濃度を高くすることで、DAB含有基質溶液を長期保存しても、該溶液に沈澱が生じず、保存安定性に優れることがわかった。

また、実施例 1 3 については、キットを加速試験 3 7 ・ 3 ヶ月および凍結融解試験 マイナス 2 0 保存・3 日間を行った後に各溶液の混合をした後の評価も行った。その結果、染色性及び沈殿に問題はなかった。更に、加速試験及び凍結融解試験後に、混合溶液の 4 遮光下 5 日間保存しての評価も行ったが、特異染色強度の低下はほとんど認められず、バックグラウンド染色変化も認められなかった。しかし、7 日経過後の混合溶液を用いた場合は、染色はされるが、当日調製したものと比較すると若干特異染色強度の低下が見られた。

30

【 0 0 3 8 】

実施例 1 4 : 2 液タイプの DAB 含有基質キット

発色団含有溶液(A)中の濃度が 2 0 m g / m L となる量の DAB を、蒸留水に溶解し、発色団含有溶液(A)を調製した。また、過酸化水素の含有割合が 0 . 0 2 5 質量%、イミダゾール濃度が 2 0 m M、EDTA・2Na 濃度が 2 m M、及び Brij 35 の含有割合が 0 . 4 質量%となるように蒸留水に溶解し、塩酸のみで p H を 7 . 5 に調整した発色試薬(B)を調製した。得られた発色団含有溶液(A)及び発色試薬(B)からなる 2 液タイプのキットを用い、(B)液 5 0 0 μ L に対して、(A)液 1 滴(約 2 0 μ L)を混合攪拌して、DAB 含有基質溶液を調製した。得られた溶液中の過酸化水素の含有割合は 0 . 0 2 5 質量%、イミダゾール濃度は 2 0 m M、EDTA・2Na 濃度は 2 m M、Brij 35 の含有割合は 0 . 4 質量%であり、p H は 7 . 5 であった。

40

得られた DAB 含有基質溶液を用いて、上記方法にしたがって免疫組織化学染色試料を調製した。得られた試料について、評価項目(1)及び(2)を行い、得られたキットについて、評価項目(5)の保存安定性試験を行った。結果を表 5 に示す。

50

## 【 0 0 3 9 】

## 実施例 1 5 ~ 1 8

塩酸のみで pH を 7 . 5 に調整せずに、表 5 に示す緩衝液を H C l 又は N a O H にて滴定し表 5 に示す pH に調整した以外は、実施例 1 4 と同様に発色試薬(B)を調製した。その他、発色団含有溶液(A)の調製、並びに各評価は実施例 1 4 と同様に行った。結果を表 5 に示す。

## 【 0 0 4 0 】

## 【表 5】

	緩衝液(pH)	特異染色強度	バックグラウンド染色	37℃での保存可能期間 評価項目(5)
実施例 14	— (7.5)	3.5+	—	3ヶ月保存可能
実施例 15	MOPS (7.5)	3.5+	—	2ヶ月程度保存可能
実施例 16	HEPES (7.5)	3.5+	—	1ヶ月程度保存可能
実施例 17	ADA (7.5)	3.5+	—	1ヶ月程度保存可能
実施例 18	CHES (9.0)	3.5+	—	2ヶ月程度保存可能

10

MOPS:3-モルホリノプロパンスルホン酸、

HEPES:4-(2-ヒドロキシエチル) - 1 - ピペラジンエタンスルホン酸、

ADA:N-(2-アセトアミド)イミド酢酸、

CHES:N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸。

20

表 5 の結果より、発色試薬(B)は保存試験において、いずれも保存安定性に優れ、緩衝液を含まない実施例 1 4 が特に優れていることがわかった。

## 【 0 0 4 1 】

## 実施例 1 9

EDTA・2Naの濃度を 2 m M から 1 m M、1 . 5 m M に変更した以外は、実施例 1 4 と同様に発色試薬(B)を調製した。その他、発色団含有溶液(A)を調製し、特異染色強度、バックグラウンド染色の評価を行ったところ、いずれも実施例 1 4 と同様であった。また、染色の色調を観察したところ、EDTA・2Na濃度が 1 m M までは、黄土色であったが、1 . 5 m M 以上の場合は、こげ茶色であり、より好ましい色調を示すことがわかった。

## 【 0 0 4 2 】

用手法でのCISH (Chromogenic in situ Hybridization)

( A ) 組織切片作製、脱パラフィン、親水化工程

パラフィン包埋した、あらかじめHER2陽性であることが確認されているヒト乳がん組織ホルマリン固定組織切片をミクロトームで 5 μm に薄切し、あらかじめシランコーティングされたスライドガラスに貼り付け、3 7 ° C、1 6 時間乾燥させた。これをキシレン 3 分 × 3 回静置し、脱パラフィンを行った。その後、エタノール 3 分 × 4 回静置し、親水化を行った。

( B ) 前処理工程

最後のエタノール静置後、スライドの水気を切り、3 % 過酸化水素 / 水に入れ、内因性ペルオキシダーゼ除去を行い、2 5 ° C、5 分間反応させた。反応終了後、リン酸緩衝液 ( pH 7 . 6 ) にて 1 分 × 2 回の洗浄を行った。

40

スライドの水気を切り、事前に温浴にて 9 8 ° C に温めておいた 1 0 m M クエン酸緩衝液 ( pH 6 . 0 ) の中にスライドを入れ、3 0 分間反応させた。

反応終了後、リン酸緩衝液 ( pH 7 . 6 ) にて 2 分 × 2 回の洗浄を行った。

スライドの水気を切り、プロテアーゼ ( ニチレイバイオサイエンス社製 ) を 1 / 5 に希釈した溶液を 1 0 0 μ L 滴下し、2 5 ° C で 3 分間反応させ、反応終了後、リン酸緩衝液 ( pH 7 . 6 ) にて 5 分 × 3 回の洗浄を行った。

脱水操作のため、7 0 %、9 0 % 及び 1 0 0 % エタノール ( 残り成分は脱イオン水 ) と 2 5 ° C で各 1 分間反応後、ドライヤーで冷風を直接スライドガラスにあて、組織を乾燥させた。

50

## 【 0 0 4 3 】

## 変性及びハイブリダイゼーション

ヒト17番染色体上(17q21.1)に存在する、約220 kbの相補鎖となるような配列にリンカーを介してDIG標識を施したHER2プローブを乾燥した組織周辺に10 µL滴下した。

泡を避けながら、22 mm × 22 mmのカバーガラス(松浪硝子工業社製)を組織上に載せ、カバーガラスの周りをペーパーボンドでシールした。シール後、スライドガラスを75に設定されたホットプレートに置き、5分間熱変性を行った。反応後、スライドガラスを湿潤箱に移動し、37で一晩反応させた。

## 【 0 0 4 4 】

## ポストハイブリダイゼーション及び検出

次に、注意して、ペーパーボンドをはがし、2 × SSC(クエン酸緩衝液)バッファーにて25、5分間反応させた。その後、あらかじめ72に温めた2 × SSCバッファーにて5分間、その後リン酸緩衝液(pH 7.6)にて1分 × 2回の洗浄を行った。

アミノ酸ポリマーにペルオキシダーゼとFab'にした抗DIG抗体を結合させた標識ポリマーを100 µL滴下し、25で30分間反応させ、反応終了後、リン酸緩衝液(pH 7.6)にて1分 × 3回の洗浄を行った。

反応前に実施例及び比較例で調製した各溶液からなるキットを用いてDAB含有基質溶液を調製した。スライドガラスの水気を切り、各100 µLのDAB含有基質溶液を滴下し、室温で10分間反応させた。反応終了後、5分間流水洗浄を行った。

続いて、対比染色のためスライドガラスの水気を切り、マイヤーヘマトキシリンに15秒間反応させ核染色させた後、5分間流水洗浄を行った。

次いで、流水洗浄後、水気を切り、エタノール通過 × 3回、エタノール静置3分 × 1回、キシレン通過1回、キシレン静置5分 × 2回を行い、脱水・透徹を行った。その後、非水溶性封入剤(ニチレイバイオサイエンス社製)を用いて、封入を行って、各試料を作製した。

## 【 0 0 4 5 】

対照例2: イミダゾール、特定のキレート剤及び特定の界面活性剤を含まない3液タイプのDAB含有基質キット

発色団含有溶液(A)中の濃度が15 mg/mLとなる量のDABを蒸留水に溶解し、発色団含有溶液(A)を調製した。また、蒸留水に過酸化水素を0.6質量%となるように溶解した発色化溶液(B1)と、pH 7.6のTris-HClの基質安定化溶液(B2')とを調製した。得られた発色団含有溶液(A)、発色化溶液(B1)及び基質安定化溶液(B2')からなるキットを用い、蒸留水1 mLに各溶液1滴(約40 µL)を混合攪拌して、DAB含有基質溶液を調製した。

得られたDAB含有基質溶液を用いて、上記方法にしたがってCISH試料を作製した。得られた試料について、評価項目(1)及び(2)を行った。結果を表6に示す。

## 【 0 0 4 6 】

## 比較例8: 特定の界面活性剤を含まない3液タイプのDAB含有基質キット

発色団含有溶液(A)中の濃度が15 mg/mLとなる量のDABを蒸留水に溶解し、発色団含有溶液(A)を調製した。また、蒸留水に過酸化水素量が0.6質量%となるように溶解した発色化溶液(B1)と、イミダゾール濃度0.5 M、及びEDTA・2Na濃度2.0 mMとなるように蒸留水に溶解し、塩酸でpHを7.5に調整した基質安定化溶液(B2')とを調製した。得られた発色団含有溶液(A)、発色化溶液(B1)及び基質安定化溶液(B2')からなるキットを用い、蒸留水1 mLに各溶液1滴(約40 µL)を混合攪拌して、DAB含有基質溶液を調製した。得られた溶液中の過酸化水素の含有割合は0.024質量%、イミダゾール濃度は2.0 mM、EDTA・2Na濃度は0.8 mMであり、pHは7.5であった。

得られたDAB含有基質溶液を用いて、上記方法にしたがってCISH試料を作製した。得られた試料について、評価項目(1)~(4)を行った。尚、評価項目(3)及び(4)についてはDAB

10

20

30

40

50

含有基質溶液の調製後1時間経過後に評価を行った。結果を表6に示す。

【0047】

実施例20：キレート剤としてEDTA・2Naを用いた3液タイプのDAB含有基質キット  
基質安定化溶液(B2')の代わりに、イミダゾール濃度0.5M、EDTA・2Na濃度20mM  
、及びBrij 35(SIGMA-ALDRICH社製)の含有割合が10質量%となるように蒸留水に溶解し  
、塩酸でpHを7.5に調整した基質安定化溶液(B2)を調製した。この(B2)溶液の調製以  
外は、比較例8と同様にキットを用いてDAB含有基質溶液を調製した。得られた溶液中の  
過酸化水素濃度は0.024質量%、イミダゾール濃度は20mM、EDTA・2Na濃度は0  
.8mM、Brij 35の含有割合は0.4質量%であり、pHは7.5であった。また、各  
評価を比較例8と同様に行った。尚、評価項目(3)及び(4)については、DAB含有基質溶液  
の調製後3日経過後の評価も行った。結果を表6及び表7に示す。

10

【0048】

【表6】

	(B2)液又は(B2')液の 界面活性剤の種類	(B2)液又は(B2')液の キレート剤の種類と濃度	特異染色強 度	バックグラウンド染 色
対照例2	—	—	+	—
比較例8	—	20mM EDTA・2Na	2.5+	±
実施例20	Brij 35	20mM EDTA・2Na	3+	—

20

【0049】

【表7】

	混合1時間後の溶液		混合3日後の溶液	
	色	沈殿物の状態	色	沈殿物の状態
比較例8	透明溶液	沈殿あり	—	—
実施例20	無色透明	沈殿なし	茶色透明	沈殿なし

【0050】

以上の結果から本発明のキットは、CISHに使用した際でも、特異染色強度の増強、バックグラウンド染色の低減及びDAB含有基質溶液中の沈殿抑制効果があることがわかった。

30

---

フロントページの続き

(72)発明者 北野 由里子

東京都東村山市久米川町1 - 52 - 14 株式会社ニチレイバイオサイエンス 開発センター内

審査官 田ノ上 拓自

(56)参考文献 国際公開第2012/092322(WO, A1)

米国特許出願公開第2012/0077211(US, A1)

特表2012-517814(JP, A)

特表2004-515752(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 1/70

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)

专利名称(译)	含有DAB的底物试剂盒，用于使用标记酶进行染色		
公开(公告)号	<a href="#">JP6393252B2</a>	公开(公告)日	2018-09-19
申请号	JP2015503043	申请日	2014-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日冷		
申请(专利权)人(译)	Nichirei公司		
当前申请(专利权)人(译)	Nichirei公司		
[标]发明人	笠松敏幸 北野由里子		
发明人	笠松 敏幸 北野 由里子		
IPC分类号	C12Q1/28 C12Q1/6841 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/28 G01N33/5306		
FI分类号	C12Q1/28 C12Q1/6841.Z G01N33/48.P G01N33/53.Y		
代理人(译)	酒井 一 ZOGO正弘 葛谷 稔		
优先权	2013039672 2013-02-28 JP		
其他公开文献	JPWO2014133120A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

使用含有DAB和咪唑作为其敏化剂的着色反应溶液进行使用过氧化物酶标记的抗体的显色反应，以提高特异性染色强度并通过DAB和背景的聚集沉淀含DAB的底物溶液提供了一种含有DAB的底物试剂盒，其能够抑制非特异性染色，例如染色。本发明的试剂盒包含含有发色团的溶液 (A)，其含有作为过氧化物酶发色团的DAB和水以及选自EDTA·2Na，EDTA·2NH<sub>4</sub>，GEDTA和NTA中的至少一种。(B)含有螯合剂，POE烷基醚非离子表面活性剂和/或POP烷基醚非离子表面活性剂，咪唑，过氧化氢和水，至少一种发色团(A)和着色试剂(B)分开储存。

(19) 日本国特許庁(JP) (12) 特許公報(B2) (11) 特許番号  
特許第6393252号  
(P6393252)

(45) 発行日 平成30年9月19日(2018.9.19) (24) 登録日 平成30年8月31日(2018.8.31)

(51) Int. Cl.	F 1
C 1 2 Q 1/28 (2006.01)	C 1 2 Q 1/28
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6841 Z
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 P
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 Y

請求項の数 8 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2015-503043 (P2015-503043)	(73) 特許権者	505145149 株式会社ニチレイバイオサイエンス 東京都中央区築地六丁目19番20号
(86) (22) 出願日	平成26年2月28日(2014.2.28)	(74) 代理人	100081514 弁理士 酒井 一
(88) 国際出願番号	PCT/JP2014/055004	(74) 代理人	100082692 弁理士 蔵台 正博
(87) 国際公開番号	W02014/133120	(74) 復代理人	100157989 弁理士 葛谷 稔
(87) 国際公開日	平成26年9月4日(2014.9.4)	(72) 発明者	笠松 敏幸 東京都東村山市久米川町1-52-14 株式会社ニチレイバイオサイエンス 開発 センター内
(31) 優先権主張番号	特願2013-39672 (P2013-39672)		
(32) 優先日	平成25年2月28日(2013.2.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標識酵素を用いた染色用DAB含有基質キット