



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102762982 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 31

---

(21) 申请号 201180008281. X (51) Int. Cl.  
(22) 申请日 2011. 02. 03 G01N 33/53(2006. 01)  
(30) 优先权数据 G01N 1/28(2006. 01)  
2010-024784 2010. 02. 05 JP G01N 33/48(2006. 01)  
(85) PCT申请进入国家阶段日  
2012. 08. 03  
(86) PCT申请的申请数据  
PCT/JP2011/052228 2011. 02. 03  
(87) PCT申请的公布数据  
W02011/096468 JA 2011. 08. 11  
(71) 申请人 株式会社日冷生物科学  
地址 日本东京都  
(72) 发明人 笠松敏幸  
(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限  
公司 11243  
代理人 钟晶 於毓桢

权利要求书 1 页 说明书 16 页

---

(54) 发明名称

免疫组织化学染色用前处理液和其浓缩液

(57) 摘要

本发明提供一种前处理液和能够容易地制备该前处理液的免疫组织化学染色用前处理浓缩液,所述前处理液用于从含有被含石蜡的包埋介质包埋的组织待测物的载玻片溶出该包埋介质并活化该组织待测物的抗原性,实施免疫组织化学染色,所述前处理液能够利用3次以上。该免疫组织化学染色用前处理液含有抗原性活化剂、特定的非离子表面活性剂和环糊精或其衍生物,作为余部,含有80质量%以上的水,以前处理液的pH为特定pH的比例含有前述抗原性活化剂,且以特定比例含有前述环糊精或其衍生物。

1. 一种免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,所述前处理液用于从含有被含石蜡的包埋介质包埋的组织待测物的载玻片溶出该包埋介质、且活化该组织待测物的抗原性,实施免疫组织化学染色,所述前处理液能够利用 3 次以上,

所述前处理液含有抗原性活化剂、聚氧乙烯烷基苯基醚系非离子表面活性剂、聚氧乙烯山梨糖醇酐系非离子表面活性剂和环糊精或其衍生物,作为余部,含有 80 质量% 以上的水,按照前处理液的 pH 达到 5.0 ~ 10.0 的比例含有所述抗原性活化剂,且含有 0.01 ~ 1.0 质量% 所述环糊精或其衍生物。

2. 根据权利要求 1 所述的免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,所述聚氧乙烯烷基苯基醚系非离子表面活性剂的含有比例为 0.01 ~ 1.0 质量%,所述聚氧乙烯山梨糖醇酐系非离子表面活性剂的含有比例为 0.3 ~ 3.0 质量%。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,进一步含有两亲性溶液。

4. 根据权利要求 1 ~ 3 中任意一项所述的免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,抗原性活化剂为柠檬酸缓冲液和 / 或含 Tris 的缓冲液。

5. 根据权利要求 1 ~ 4 中任意一项所述的免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,聚氧乙烯烷基苯基醚系非离子表面活性剂为 NP-40、TritonX-100、TritonX-114、或 IGEPAL CA-630 中的至少 1 种,聚氧乙烯山梨糖醇酐系非离子表面活性剂为吐温 20、吐温 40、或吐温 80 中的至少 1 种。

6. 根据权利要求 1 ~ 5 中任意一项所述的免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,环糊精或其衍生物为  $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精、羟基烷基- $\alpha$ -环糊精、羟基烷基- $\beta$ -环糊精、羟基烷基- $\gamma$ -环糊精中的至少 1 种。

7. 根据权利要求 2 ~ 6 中任意一项所述的免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,两亲性溶液为乙二醇、丙二醇、或 1,3-丁二醇中的至少 1 种。

8. 根据权利要求 1 ~ 7 中任意一项所述的免疫组织化学染色用前处理液,其特征在于,进一步含有防腐剂和 / 或杀菌剂。

9. 一种免疫组织化学染色用前处理浓缩液,其特征在于,其为从权利要求 1 ~ 8 中任意一项所述的免疫组织化学染色用前处理液中减少水而得的,在使用时加入规定量的水、呈规定的 pH 而用作免疫组织化学染色用前处理液。

10. 根据权利要求 9 所述的免疫组织化学染色用前处理浓缩液,其特征在于,所述规定的 pH 为 5.0 ~ 7.0,为单液型。

11. 根据权利要求 9 所述的免疫组织化学染色用前处理浓缩液,其特征在于,其为由含有抗原性活化剂的第 1 浓缩液和第 2 浓缩液组成的 2 液型,所述第 2 浓缩液含有聚氧乙烯烷基苯基醚系非离子表面活性剂、聚氧乙烯山梨糖醇酐系非离子表面活性剂、和环糊精或其衍生物,

将所述第 1 浓缩液、所述第 2 浓缩液和规定量的水混合,使所述规定的 pH 为 8.0 ~ 10.0 而使用。

12. 根据权利要求 11 所述的免疫组织化学染色用前处理浓缩液,其特征在于,所述第 2 浓缩液进一步含有两亲性溶液。

## 免疫组织化学染色用前处理液和其浓缩液

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫组织化学染色用前处理液和其浓缩液,所述前处理液能够以短时间且省力地实施免疫组织化学染色法,所述免疫组织化学染色法为:从被含石蜡的包埋介质包埋在载玻片等中的作为抗原的组织待测物溶出该包埋介质、活化抗原性后,洗涤,与抗体反应,染色。更详细而言,涉及同时具有从免疫组织化学染色中使用的、含有被含石蜡的包埋介质包埋的组织待测物的载玻片溶出该包埋介质的作用和活化抗原性的作用,在此后的免疫组织化学染色中也能够获得充分的染色强度,进而一旦使用后也能够使溶出的包埋介质维持分散状态,能够连续使用 3 次以上的用于实施免疫组织化学染色的免疫组织化学染色用前处理液和其浓缩液。

### 背景技术

[0002] 在病理检查中,就含有用于进行免疫组织化学染色的组织待测物的载玻片的脱石蜡和活化抗原性的前处理而言,例如如非专利文献 1 记载那样,通常作为第 1 工序,使经福尔马林固定·石蜡包埋的组织切片 3 分钟×3 次通过二甲苯、苯、甲苯等有机溶剂层,进行脱石蜡。然后,作为第 2 工序,使其 3 分钟×4 次通过乙醇等两亲性溶液,进行载玻片和组织待测物的亲水化。接下来,作为第 3 工序,为了活化经亲水化的组织待测物的抗原性,将经亲水化的组织待测物浸渍到柠檬酸缓冲液、Tris-EDTA 溶液等抗原活化用溶液中,利用加热处理进行抗原的活化。

[0003] 在上述前处理中,第 1 工序中使用的二甲苯、苯、甲苯等有机溶剂毒性高、挥发性也高,因此存在需要通风室等排气设备、导致操作者所处环境恶化的问题。

[0004] 因此,作为代替存在上述问题的有机溶剂的安全性高的脱石蜡剂,由柑橘类表皮提取·纯化的有机溶剂、商品名“Hemo-De”(株式会社 Falma 公司制)以及使用了脂肪族烃(烷烃系)的商品名为“Clear-Plus”和“Hemo-Clear”(均为株式会社 Falma 公司制)、商品名为“Tissue-Clear(ティッシュ・クリア)”(Sakura Finetek Japan Co.,Ltd. 制)等产品已在销售。

[0005] 近年,与使用上述安全性高的脱石蜡剂相比,期待在同一溶液中同时进行上述前处理中的 3 个工序的更简便的方法,并已经提出了几种方法。

[0006] 例如,专利文献 1 中提出如下前处理方法,即,对被石蜡包埋的组织待测物,使用配合了选自芳香族烃、萜或异构烷烃系烃的石蜡增溶化有机溶剂、极性有机溶剂、抗原性活化成分、和表面活性剂等等的溶液,加热至石蜡的熔点以上的温度,从而同时进行脱石蜡和抗原性活化处理的前处理方法。此外,专利文献 1 中还记载了在上述前处理方法之后实施的洗涤工序中,为了除去残存的表面活性剂,可以使洗涤溶液中含有与表面活性剂结合的环糊精。

[0007] 但是,专利文献 1 的实施例 7 中记载了如下问题,即,在将用于前处理方法中的上述溶液连续使用时,前处理后的上述溶液中溶出的残留石蜡附着到下一载玻片而不适合连续使用。

[0008] 进而,在将专利文献 1 中记载的具有上述组成的溶液制成具有碱性的 pH 的溶液时,在贴合了组织待测物的载玻片中的不存在组织待测物的玻璃部分,在上述前处理方法后所进行的免疫组织化学染色时,存在有很可能染色试剂被排斥、发生染色不均的问题。

[0009] 此外,专利文献 2 和 3 中也记载了使用含有各种缓冲液、表面活性剂、乙二醇等的溶液能够与专利文献 1 中记载的上述前处理方法同样地同时进行脱石蜡和抗原性活化处理。

[0010] 但是,这些文献中也与专利文献 1 记载的前处理液同样地无法谋求前处理液的连续使用,对于使溶出的石蜡分散至溶液中等的技术没有任何记载。因此,这些文献中记载的前处理液,在连续使用时也可能发生上述的与专利文献 1 中记载的前处理液同样的问题。

[0011] 然而,已经有几种免疫组织化学染色中使用的、能够同时进行脱石蜡和抗原性活化处理的前处理液在市场上销售。例如,如上述专利文献中记载的仅 1 次使用型的商品名为“Trilogy”(Cell Marque 公司制),以及 1 周内能够连续使用 3 次的商品名为“Target Retrieval Solution”pH9 (3-in-1) (Dako 公司制)已在市场上销售。

[0012] 这些市售品的配合组成虽不明确,但并不含环糊精。此外,任一制品大多产生如下现象,即,由于使用而溶出至前处理液的疏水性物质石蜡大多漂浮在溶液表面。

[0013] 这样的处于溶液表面的漂浮石蜡在从该溶液取出含有组织待测物的载玻片时附着于载玻片,产生了需要增设在此后实施的染色之前进行的洗涤工序、操作变得复杂或可能对之后进行的免疫组织化学染色产生不良影响等问题。进而,在使用自动免疫组织化学染色仪器进行染色时,可能对该仪器产生不良影响。

[0014] 现有技术文献

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献 1 :日本特表 2001-505297 号公报

[0017] 专利文献 2 :日本特表 2003-526086 号公报

[0018] 专利文献 3 :美国专利第 6649368 号说明书

[0019] 非专利文献

[0020] 非专利文献 1 :“酵素抗体法(酶抗体法)”(修订第四版,渡边·中根学际企画 2002)

## 发明内容

[0021] 发明要解决的问题

[0022] 本发明的课题在于,提供一种免疫组织化学染色用前处理液,其在免疫组织化学染色中同时具有如下两种作用,一种作用是从贴合了作为组织待测物的薄切组织切片且该组织切片被含石蜡的包埋介质包埋的载玻片溶出该包埋介质的作用,另一作用是活化该组织待测物的抗原性的作用,该前处理液在此后的免疫组织化学染色中也能够获得充分的染色强度,进而一旦使用后也能够使溶出的包埋介质维持分散状态、能够连续使用 3 次以上且安全性也优异。

[0023] 本发明另一课题在于,提供一种免疫组织化学染色用前处理液,其能够解决上述课题,而且,在免疫组织化学染色中,从贴合了作为组织待测物的薄切组织切片且该组织切片被含石蜡的包埋介质包埋的载玻片溶出该包埋介质、活化该组织待测物的抗原性后进行染色时,能够抑制染色试剂在不存在组织待测物的玻璃部分被排斥、能够防止染色不均。

[0024] 本发明其它课题在于,提供能够在使用时容易地制备能够解决上述课题的免疫组织化学染色用前处理液的免疫组织化学染色用前处理浓缩液。

[0025] 解决问题的手段

[0026] 本发明人等为了解决上述课题进行了深入研究。首先,作为免疫组织化学染色的前处理液,不使用目前所用的二甲苯、苯、甲苯等担心安全性的有机溶剂,而使用能够兼顾环保等的水主体的前处理液,作为兼具如下两种作用的成分,对各种表面活性剂进行了研究,而一种作用是能够从含有被含石蜡的包埋介质包埋的组织待测物的载玻片充分溶出该包埋介质的作用,另一作用是为了能够连续使用前处理液而抑制溶出的包埋介质漂浮于溶液表面、能够使其在溶液中分散等的作用。

[0027] 由其结果可知,1种表面活性剂无法兼具上述2种作用,通过使用特定的2种表面活性剂虽能够在一定程度上实现上述目的,但在使前处理液呈碱性而连续使用3次以上时,在使用了连续使用的前处理液后的染色工序中,染色试剂在不存在待测物的组织的载玻片部分被排斥,可能发生染色不均。

[0028] 因此,通过在特定2种表面活性剂中进一步组合各种高分子化合物等从而探索能够解决上述问题的成分。

[0029] 进而,为了确认能够用同一溶液同时进行上述包埋介质的溶出和抗原性的活化处理且对染色工序中的染色强度几乎没有影响,组合了公知的抗原性活化剂,对能够解决上述各课题的成分组合进行各种研究。

[0030] 并且,对以前在免疫组织化学染色的前处理液中不使用的环糊精或其衍生物也进行了研究,在上述专利文献1中记载有通过在用于前处理液之后的洗涤溶液中含有环糊精或其衍生物从而能够除去残存表面活性剂。

[0031] 其结果是,除了上述特定的2种表面活性剂和抗原性活化剂外,在前处理溶液中配合了2质量%环糊精或其衍生物,进行实验,结果如专利文献1记载那样,或者与表面活性剂结合、或者连表面活性剂自身的作用也受到妨碍,分散能力显著降低,观察到本应解决的石蜡漂浮问题。进而,染色中染色强度也显著降低,未能获得期待的作用效果。然而,出乎意料的是,确认了将环糊精或其衍生物的配合比例设为特定比例时,表面活性剂的作用不受妨碍,染色中染色强度的降低也得到抑制,上述各课题都得到了解决。

[0032] 进而,确认了在上述组成中再加入两亲性溶液时,上述染色强度进一步增强,此外,对使前处理液呈碱性时产生的上述染色试剂的排斥的抑制效果也进一步改善。

[0033] 根据本发明,提供一种免疫组织化学染色用前处理液,其为用于实施免疫组织化学染色的能够利用3次以上的前处理液,所述前处理液从含有被含石蜡的包埋介质包埋的组织待测物的载玻片溶出该包埋介质、且活化该组织待测物的抗原性,

[0034] 所述前处理液含有抗原性活化剂、聚氧乙烯烷基苯基醚系非离子表面活性剂、聚氧乙烯山梨糖醇酐系非离子表面活性剂和环糊精或其衍生物,作为余部,含有80质量%以上的水,按照前处理液的pH达到5.0~10.0的比例含有前述抗原性活化剂,含有0.01~1.0质量%前述环糊精或其衍生物,根据需要还含有两亲性溶液等。

[0035] 此外,根据本发明,提供一种免疫组织化学染色用前处理浓缩液,其为从上述免疫组织化学染色用前处理液减少水而得的,在使用时加入规定量的水、呈规定的pH而用作免疫组织化学染色用前处理液。

[0036] 进而,根据本发明,提供一种上述免疫组织化学染色用前处理浓缩液,其特征在于,上述规定的 pH 为 5.0 ~ 7.0,为单液型。

[0037] 进而,根据本发明,还提供一种上述免疫组织化学染色用前处理浓缩液,其为由含有抗原性活化剂的第 1 浓缩液和第 2 浓缩液组成的 2 液型,所述第 2 浓缩液含有聚氧乙烯烷基苯基醚系非离子表面活性剂、聚氧乙烯山梨糖醇酐系非离子表面活性剂、和环糊精或其衍生物,根据需要进一步含有两亲性溶液,

[0038] 将前述第 1 浓缩液、前述第 2 浓缩液和规定量的水混合,使上述规定的 pH 为 8.0 ~ 10.0 而使用。

[0039] 发明效果

[0040] 本发明的免疫组织化学染色用前处理液含有抗原性活化剂、特定的 2 种表面活性剂和特定比例的环糊精或其衍生物,作为余部,含有 80 质量 % 以上的水,因此,同时具有从含有免疫组织化学染色中使用的被含石蜡的包埋介质包埋的组织待测物的载玻片溶出该包埋介质的作用和活化该组织待测物的抗原性的作用,在此后的免疫组织化学染色中也能够获得充分的染色强度,进而,一旦使用后也能够使溶出的包埋介质维持分散状态、石蜡在使用的溶液表面的漂浮受到抑制,能够连续使用 3 次以上。且由于不含二甲苯等有机溶剂,因此安全性也优异,对环境也是有利的。此外,即使使本发明的免疫组织化学染色用前处理液为碱性溶液时,也能够获得对上述染色试剂的排斥进行抑制的效果。

[0041] 因此,通过使用本发明的免疫组织化学染色用前处理液,能够用短时间、省力地进行免疫组织化学染色。

[0042] 通过使本发明的免疫组织化学染色用前处理液中进一步含有两亲性溶液,上述染色强度进一步增强,此外,对上述染色试剂的排斥进行抑制的效果也进一步改善。

[0043] 本发明的免疫组织化学染色用前处理浓缩液是从本发明的免疫组织化学染色用前处理液减少水而得的浓缩液,因此通过在使用时加入规定量的水,呈规定的 pH 而能够容易地作为免疫组织化学染色用前处理液使用。

## 具体实施方式

[0044] 以下进一步详细说明本发明。

[0045] 本发明的免疫组织化学染色用前处理液和其浓缩液,为用于所谓免疫组织化学染色法中使用的前处理液和其浓缩液;所述免疫组织化学染色法通过基于特异性的抗原抗体反应而检测存在于生物体的正常或肿瘤组织、细胞等中的特定物质(抗原),从而进行病理诊断等。

[0046] 免疫组织化学染色法中使用的组织待测物,出于长期保存等目的通常用福尔马林、醇等固定,然后用含石蜡的包埋介质包埋组织、细胞等而成。将该福尔马林固定石蜡包埋块薄切,贴合到显微镜载玻片,进行免疫组织化学染色。在进行这种免疫组织化学染色时,根据使用的一抗种类而需要在染色前进行脱石蜡和抗原性的活化。

[0047] 就前述脱石蜡和抗原性的活化的一般方法而言,如上所述,例如通过以下三个工序进行,即,用二甲苯、苯、甲苯等有机溶剂对经福尔马林固定·石蜡包埋的组织待测物进行脱石蜡的工序、通过乙醇等两亲性溶液使经脱石蜡的组织待测物亲水化的工序和对经亲水化的组织待测物上存在的抗原进行活化的工序。然后,免疫组织化学染色法则在上述工序

后进行洗涤工序和染色工序。

[0048] 本发明中,能够使用 1 个溶液、即免疫组织化学染色用前处理液同时进行由上述 3 个工序构成的前处理。这样使用的前处理液虽然以前即已提出并已有销售,但其基本为 1 次性使用,很少能够连续使用 3 次以上、例如 3 ~ 4 次左右,本发明则提供这样能够利用 3 次以上的、优选能够利用 3 ~ 5 次的前处理液和其浓缩液。

[0049] 本发明的前处理液含有 80 质量 % 以上的水、优选含有 85 质量 % 以上、特别优选含有 90 质量 % 以上,不含通常使用的二甲苯等存在安全性问题的有机溶剂,含有抗原性活化剂、特定的 2 种非离子表面活性剂和环糊精或其衍生物。水优选使用去离子水。予以说明,该水的含有比例为也包括其它成分中含有的水分量的比例。

[0050] 前述抗原性活化剂只要是能够通过加热处理而活化抗原性的公知物质即可,没有特别限定,可以根据作为对象的组织适当选择能够调整 pH 的物质。作为抗原性活化剂可以列举例如柠檬酸缓冲液、含 Tris 缓冲液、SSC 缓冲液等各种缓冲液、它们中含有 EDTA 等螯合剂的缓冲液。

[0051] 抗原性活化剂的含有比例可以按照使本发明的前处理液的 pH 为 5.0 ~ 10.0、优选为 6.0 ~ 9.0 的方式根据作为对象的组织适当决定。

[0052] 前述特定的 2 种表面活性剂为聚氧乙烯(简记为 POE)烷基苯基醚系非离子表面活性剂和 POE 山梨糖醇酐系非离子表面活性剂。

[0053] POE 烷基苯基醚系非离子表面活性剂是在本发明的前处理液中主要与脱石蜡相关的成分,例如可以优选列举 NP-40、TritonX-100、TritonX-114、或 IGEPAL CA-630 中的至少 1 种。

[0054] POE 烷基苯基醚系非离子表面活性剂的含有比例可以考虑上述主要作用而适当确定,通常为 0.01 ~ 1.0 质量 %, 优选 0.01 ~ 0.5 质量 %, 特别优选 0.05 ~ 0.3 质量 %。当 POE 烷基苯基醚系非离子表面活性剂的含有比例低时,有脱石蜡作用降低之虞,另一方面当含有比例高时,在后述用于活化抗原性的加热中有难以使规定温度保持恒定之虞。

[0055] POE 山梨糖醇酐系非离子表面活性剂,在本发明的前处理液中是主要与通过和后述环糊精或其衍生物的相互作用而在 3 次以上的利用中使溶出的石蜡在前处理液中维持分散的作用相关的成分,可以优选列举出例如吐温(Tween)20、吐温 40、或吐温 80 中的至少 1 种。

[0056] POE 山梨糖醇酐系非离子表面活性剂的含有比例可以考虑上述主要作用适当确定,通常为 0.3 ~ 3.0 质量 %, 优选为 0.5 ~ 1.5 质量 %, 特别优选为 0.5 ~ 1.0 质量 %。当 POE 山梨糖醇酐系非离子表面活性剂的含有比例低时,有连续使用导致上述石蜡的分散性降低之虞,另一方面当含有比例高时,在后述用于活化抗原性的加热中有难以使规定温度保持恒定之虞。

[0057] 环糊精或其衍生物,在本发明的前处理液中是主要与在前处理后进行的染色中抑制染色试剂在载玻片上被排斥有关的成分,此外,还是与使溶出的石蜡在前处理液中维持分散的作用相关的成分,例如可以列举出作为天然物质的  $\alpha$ -环糊精、 $\beta$ -环糊精、 $\gamma$ -环糊精、它们的衍生物,尤其是赋予羟基等而改善了水溶性的物质中的至少 1 种,尤其优选列举出羟基烷基- $\alpha$ -环糊精、羟基烷基- $\beta$ -环糊精、羟基烷基- $\gamma$ -环糊精等羟基烷基环糊精,其中优选列举出羟基烷基- $\beta$ -环糊精。作为该烷基,可以举出例如乙基或丙基。

[0058] 环糊精或其衍生物的含有比例为 0.01 ~ 1.0 质量%，优选为 0.05 ~ 0.5 质量%，特别优选为 0.05 ~ 0.3 质量%。环糊精或其衍生物的含有比例小于 0.01 质量%时，无法获得抑制染色试剂在上述载玻片被排斥的效果。另一方面，当超过 1.0 质量%时，反而使维持溶出的石蜡在前处理液中分散的作用变差，结果会妨碍上述表面活性剂的作用。进而妨碍抗原性的活化，也无法获得充分的染色强度。因此，就环糊精或其衍生物的含有比例的上限而言，会妨碍本发明的预期效果，因此需要特别注意。

[0059] 为了进一步改善该预期效果，本发明的前处理液中，除了上述必须成分以外，此外还可以在不妨碍本发明的预期效果的范围内，为了发挥其它效果等而含有其它成分。

[0060] 作为其它成分，例如，主要是为了在前处理后进行的染色中进一步提高染色强度，此外，通过与环糊精或其衍生物组合而进一步提高染色试剂在上述载玻片的排斥被抑制的效果，优选含有两亲性溶液。

[0061] 作为两亲性溶液，只要是能够期待改善上述效果的溶液即可，没有特别限定，优选列举例如乙二醇、丙二醇或 1,3-丁二醇中的至少 1 种。这些中，乙二醇由于除了改善上述效果，还能够使抑制前处理液中溶出、分散的微细石蜡再次附着到载玻片的效果得以维持，因此在连续 3 次以上的使用中特别优选。

[0062] 本发明的前处理液中含有两亲性溶液时的含有比例可以考虑其效果等而适当确定，通常为 1.0 ~ 5.0 质量%，优选为 2.0 ~ 4.0 质量%。当两亲性溶液的含有比例低时，有无法获得期待的改善效果的作用之虞。另一方面，当两亲性溶液的含有比例高时，有反而妨碍本发明的前处理液的效果即抑制石蜡漂浮的作用之虞。

[0063] 作为其它成分，为了长期维持优异的保存稳定性，除了上述两亲性溶液以外，可以列举出防腐剂、杀菌剂、例如叠氮化钠、硫柳汞、庆大霉素、丙氯诺(ProClin) (商品名，SUPELCO 公司制)、对羟基苯甲酸酯类(paraben)、苯扎氯铵、西吡氯铵中的至少 1 种。

[0064] 其含有比例可以在不妨碍本发明的效果的范围内考虑其功能而适当选择。

[0065] 本发明的免疫组织化学染色用前处理浓缩液是用于制备上述本发明的前处理液的，是从上述本发明的前处理液减少水而得的，在使用时加入规定量的水、呈规定的 pH 而使用。

[0066] 浓缩度可适当选择，通常制成 5 ~ 20 倍浓缩液，优选制成 5 ~ 10 倍浓缩液。

[0067] 为了进一步提高其保存稳定性，本发明的免疫组织化学染色用前处理浓缩液在上述规定的 pH 为 5.0 ~ 7.0 时，优选设为单液型。

[0068] 另一方面，在使上述规定的 pH 为 8.0 ~ 10.0 而使用时，可以设为由第 1 浓缩液和第 2 浓缩液构成的 2 液型，所述第 1 浓缩液含有抗原性活化剂、根据需要的防腐剂，所述第 2 浓缩液含有聚氧乙烯烷基苯基醚系非离子表面活性剂、聚氧乙烯山梨糖醇酐系非离子表面活性剂、和环糊精或其衍生物、根据需要的两亲性溶液、缓冲液。

[0069] 本发明的免疫组织化学染色用前处理浓缩液在为上述单液型时和在为 2 液型时，按照成为规定的 pH 的方式与规定量的去离子水等水混合，从而可以制备本发明的前处理液并使用。

[0070] 本发明的前处理液不论是在用手的方法还是使用自动化仪器的方法中都可以使用，尤其是使用可控制温度的自动仪器和自动免疫组织化学染色仪器的方法较简便，故而优选。

[0071] 使用了本发明的前处理液的免疫组织化学染色中的前处理,例如为了促进脱石蜡,首先在通常 20 ~ 70°C、优选控制在石蜡等包埋介质的融点以上的温度的本发明的前处理液中,导入要处理的具有被含石蜡的包埋介质包埋的组织的载玻片等待测物,进行多次振荡。此时通常可确认到石蜡被除去。

[0072] 接着,为了促进抗原性的活化而升高前处理液的温度,必要时可以施加压力以缩短反应时间。此时的温度通常为 80 ~ 130°C,优选 90 ~ 120°C 左右,在这样的温度下的保持时间通常为 1 ~ 70 分钟,优选 5 ~ 60 分钟左右。

[0073] 进行上述温度升高并处理之后,可以再使前处理液的温度降至 20 ~ 70°C 左右,进行振荡等,从而完成前处理。

[0074] 本发明的前处理液能够连续使用 3 次以上、通常为 3 ~ 5 次、优选 3 ~ 4 次,因此,能够采用使用过的上述前处理液同样地进行下一个组织待测物的前处理,例如,如果是 5 次用的前处理液,则第 1 次和第 5 次的前处理能够获得同样的染色结果。

[0075] 前处理完成后的载玻片可以通过公知的方法进行此后的洗涤工序和免疫组织化学染色工序,从而实施免疫组织化学染色。

[0076] 实施例

[0077] 以下通过实施例、对象例和比较例进一步详细说明本发明,但本发明不受这些例子限定。

[0078] 予以说明,以下所示的例子中,评价是如下述那样进行的。

[0079] 评价项目(1):能否用同一前处理液同时进行脱石蜡和抗原性活化处理

[0080] 评价中,将可能者记为“可”,将不能者记为“否”。

[0081] 评价项目(2):目视观察利用前处理液脱石蜡 + 抗原性活化处理后的石蜡在溶液表面的漂浮情况

[0082] 评价中,将完全不漂浮者记为 5 分、将漂浮极少者记为 4 分、将漂浮有小块者记为 3 分、将小块和大块共存地漂浮者记为 2 分、将漂浮有大块者记为 1 分(结果是以 3 次的平均分表示的)。

[0083] 评价项目(3):目视观察载玻片的免疫组织化学染色用试剂的被排斥情况

[0084] 评价中,将看不到被排斥者记为 5 分、将存在少量微细被排斥者记为 4 分、将存在较多微细被排斥者记为 3 分、将微细被排斥和较大被排斥共存者记为 2 分、将存在较大被排斥或存在较大问题者记为 1 分。

[0085] 评价项目(4):通过光学显微镜观察所确认的染色强度

[0086] 评价中,将与对象例 1 ~ 3 相比较强者记为 2 分、将与对象例 1 ~ 3 相比稍强者记为 1 分、将与对象例 1 ~ 3 为同等程度者记为 0 分、将与对象例 1 ~ 3 相比稍弱者记为 -1 分、将与对象例 1 ~ 3 相比弱者记为 -2 分。

[0087] 评价项目(5):利用前处理液进行脱石蜡 + 抗原性活化处理后的组织厚度(该厚度薄也意味着存在于组织待测物内部的石蜡等已充分溶出。)

[0088] 评价中,将与对象例 1 ~ 3 同等程度者记为 5 分、将与对象例 1 ~ 3 相比厚若干者记为 4 分、将与对象例 1 ~ 3 相比稍厚者记为 3 分、将与对象例 1 ~ 3 相比厚者记为 2 分、将与对象例 1 ~ 3 相比相当厚者记为 1 分。

[0089] 评价项目(6):参照评价项目(1) ~ (5),前处理液能否连续使用 3 次

[0090] 评价中,将能够连续使用 3 次者记为“可”,将不能者记为“否”。

[0091] 对象例 1 ~ 3(将通常进行的脱石蜡工序、亲水化工序和抗原性活化工序分别进行的例子)

[0092] (A) 前处理工序

[0093] < 脱石蜡工序和亲水化工序 >

[0094] 将福尔马林固定、石蜡包埋的扁桃体组织薄切成 3 μm, 贴合到包被载玻片(MAS コート, 松浪硝子工业公司制), 在 37℃ 下干燥 18 小时。将其在二甲苯层中静置 3 分钟 × 3 次, 进行脱石蜡。然后, 在乙醇层中静置 3 分钟 × 4 次, 进行亲水化。在最后的乙醇层静置后, 用 pH7.6 的磷酸缓冲液进行 3 分钟 × 3 次的洗涤。

[0095] < 抗原性活化工序 >

[0096] 在加入了 pH6.0 的柠檬酸缓冲液(对象例 1)、pH7.0 的柠檬酸缓冲液(对象例 2)、或 pH9.0 的含 EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液(对象例 3)(均不含表面活性剂)的各塑料染色瓶中, 加入完成上述亲水化和洗涤后的载玻片, 将各塑料染色瓶放入台式高压灭菌器(ALP Co., Ltd. 株式会社制)中, 在 121℃ 下处理 20 分钟。完成高压灭菌器处理后, 取出塑料染色瓶, 室温下静置 20 分钟, 进行抗原性活化。

[0097] (B) 洗涤工序

[0098] 接下来, 经过上述静置 20 分钟后, 将载玻片移入 pH7.6 的磷酸缓冲液中, 静置 5 分钟 × 3 次, 从而进行洗涤。

[0099] (C) 免疫组织化学染色工序

[0100] (1) 利用手工方法的免疫组织化学染色

[0101] (B) 将进行了洗涤工序的载玻片放入 3% 过氧化氢 / 甲醇溶液中, 轻轻振荡后静置 10 分钟。接下来, 移入 pH7.6 的磷酸缓冲液中, 静置 5 分钟 × 3 次, 从而进行洗涤。

[0102] 将所获得的载玻片上的水分除掉, 用 PAP PEN(大道产业)围住组织待测物的周围。接下来, 将作为一抗的商品名“CD3 兔单克隆抗体(SP7)”(日冷生物科学公司制)滴加到载玻片上, 在 25℃ 下反应 60 分钟。反应完成后, 移入 pH7.6 的磷酸缓冲液中, 静置 5 分钟 × 3 次, 从而进行洗涤。

[0103] 接下来, 将洗涤后的载玻片上的水分除掉, 滴加作为二抗的商品名“Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI)”(日冷生物科学公司制), 在 25℃ 下反应 30 分钟。反应完成后, 移入 pH7.6 的磷酸缓冲液中, 静置 5 分钟 × 3 次, 从而进行洗涤。

[0104] 该洗涤后, 在除掉了水分的载玻片上, 滴加使用商品名“DAB 底物试剂盒”(日冷生物科学公司制)作为显色底物制备的 DAB 溶液, 在室温下反应 5 分钟后, 进行 5 分钟流水洗涤。接着, 除掉水分, 与 Mayer 氏苏木精反应 30 秒而显色后, 进行 5 分钟流水洗涤。

[0105] 接下来, 除掉水分, 通过乙醇层 × 3 次、乙醇层静置 3 分钟 × 1 次, 通过二甲苯层 1 次、二甲苯层静置 5 分钟 × 2 次, 进行脱水、透明化后, 用非水溶性封片剂(日冷生物科学公司制)进行封片。

[0106] (2) 利用自动免疫组织化学染色仪器的免疫组织化学染色

[0107] (B) 将进行了洗涤工序的载玻片安置在自动免疫组织化学染色仪器(商品名“HISTOSTAINER”, 日冷生物科学公司制)(以下简称为“HISTOSTAINER”)的玻片架上, 为了使组织不会干燥而预先加入 pH7.6 的磷酸缓冲液。接下来, 通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤

设置好的载玻片,风干后,将 3% 过氧化氢水(日冷生物科学公司制)滴加到设置好的载玻片上,反应 5 分钟。

[0108] 反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤、风干后,将作为一抗的商品名“CD3 兔单克隆抗体(SP7)(HISTOSTAINER 用)”(日冷生物科学公司制)滴加到载玻片上,在室温下反应 30 分钟。反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤 2 次。接下来,风干后将作为二抗的商品名“Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI)(HISTOSTAINER 用)”(日冷生物科学公司制)滴加到载玻片上,在室温下反应 30 分钟。反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤 2 次。

[0109] 接着,将使用商品名“DAB 底物试剂盒(HISTOSTAINER 用)”(日冷生物科学公司制)作为显色底物制备的 DAB 溶液滴加到载玻片上,在室温下反应 10 分钟,进行显色。反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤 1 次,然后,用水洗涤 1 次。取出染色后的载玻片,进行 5 分钟流水洗涤。流水洗涤后,除掉水分,与 Mayer 氏苏木精反应 30 秒,进而,进行 5 分钟流水洗涤。

[0110] 接下来,除掉水分,通过乙醇层 ×3 次、乙醇层静置 3 分钟 ×1 次,通过二甲苯层 1 次、二甲苯层静置 5 分钟 ×2 次,进行脱水、透明化后,用非水溶性封片剂(株式会社日冷制)进行封片。

[0111] 实施例 1

[0112] (前处理液的制备)(不含两亲性溶液的 pH9.0 的例子)

[0113] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 9.0 的含 EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22 μm 过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%、羟丙基-β-环糊精的最终浓度为 0.1 质量% 的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0114] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0115] (A) 前处理工序

[0116] <脱石蜡工序和抗原性活化工序>

[0117] 在能够控制温度的自动仪器(商品名“PTModule”,赛默飞世尔科技公司制)(以下简称“PTModule”)中加入上述制备的前处理液,将溶液的温度升至 65℃。

[0118] 另一方面,在自动免疫组织化学染色仪器“HISTOSTAINER”中所使用的玻片架上,设置如下载玻片,该载玻片是将福尔马林固定石蜡包埋的扁桃体组织薄切成 3 μm,贴合在包被载玻片(MAS コート,松浪硝子工业公司制)上,在 37℃ 下干燥 18 小时而获得的。

[0119] 当上述“PTModule”内的溶液温度达到 65℃ 时打开盖,在溶液内放入上述设置好的玻片架,振荡数次。此时,从溶液中捞出确认载玻片上未残留石蜡后,安置在“PTModule”中,将盖关闭。然后,按照预先设定的程序用“PTModule”进行加热处理(将溶液从 65℃ 升温至 100℃,在 100℃ 加热 40 分钟后,降温至 65℃。)

[0120] (B) 洗涤工序

[0121] 上述加热处理完成后,在保持安置在玻片架中的状态下轻轻振荡载玻片,将载玻片移入含有 0.05 质量% 的吐温 20 的 pH7.6 的磷酸缓冲液中,静置 5 分钟。此时,通过目

视确认组织待测物和载玻片部分是否残留石蜡(是否可见到即使洗涤也没能除去的石蜡),另外将前处理工序后的前处理液静置至室温附近,通过目视确认溶液表面上的石蜡漂浮情况。

[0122] (C) 利用自动免疫组织化学染色仪器的免疫组织化学染色

[0123] (B) 将进行了洗涤工序的安置在“HISTOSTAINER”的架的载玻片,保持原状地安置在 HISTOSTAINER 中,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤,风干后滴加 3% 过氧化氢水(日冷生物科学公司制),反应 5 分钟。

[0124] 反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤,风干后,将作为一抗的商品名“CD3 兔单克隆抗体(SP7)(HISTOSTAINER 用)”(日冷生物科学公司制)滴加到载玻片上,在室温下反应 30 分钟。反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤 2 次。接下来,风干后,将作为二抗的商品名“Histofine Simple Stain MAX-PO (MULTI)(HISTOSTAINER 用)”(日冷生物科学公司制)滴加到载玻片上,在室温下反应 30 分钟。反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤 2 次。

[0125] 接着,将使用商品名“DAB 底物试剂盒(HISTOSTAINER 用)”(日冷生物科学公司制)作为显色底物制备的 DAB 溶液滴加到载玻片上,在室温下反应 10 分钟。反应完成后,通过 HISTOSTAINER 用 PBS 洗涤 1 次,然后,用水洗涤 1 次。取出染色后的载玻片,进行 5 分钟流水洗涤。流水洗涤后,除掉水分,与 Mayer 氏苏木精反应 30 秒,再进行 5 分钟流水洗涤。

[0126] 接下来,除掉水分,通过乙醇层 ×3 次、乙醇层静置 3 分钟 ×1 次,通过二甲苯层 1 次、二甲苯层静置 5 分钟 ×2 次,进行脱水、透明化后,用非水溶性封片剂(日冷生物科学制)进行封片。

[0127] 不更换前处理液地将以上(A)~(C)的工序进行 3 次。将第 3 次的上述评价项目结果与对象例 1~3 的结果一起示于表 1。其中,对象例的结果为处理 1 次的结果。

[0128] 实施例 2

[0129] (前处理液的制备)(含有两亲性溶液的 pH9.0 的例子)

[0130] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 9.0 的含 EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22 μm 过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%、羟丙基-β-环糊精的最终浓度为 0.1 质量%、乙二醇的最终浓度为 3.0 质量% 的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0131] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0132] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样进行评价。结果示于表 1。

[0133] 予以说明,使用 α-环糊精、β-环糊精或 γ-环糊精代替羟丙基-β-环糊精,与该实施例 2 同样进行评价时获得了同样的结果。但是,α-环糊精和 β-环糊精由于在室温下不溶解,在加热处理时溶解而发挥其效果,因此可知从处理方面来看最优选水溶性的羟丙基-β-环糊精。

[0134] 实施例 3

[0135] (前处理液的制备)(不含两亲性溶液的 pH6.0 的例子)

[0136] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 6.0 的柠檬酸缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%、羟丙基- $\beta$ -环糊精的最终浓度为 0.1 质量%、乙二醇的最终浓度为 3.0 质量%的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0137] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0138] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样进行评价。结果示于表 1。

[0139] 实施例 4

[0140] (前处理液的制备)(含有两亲性溶液的 pH6.0 的例子)

[0141] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 6.0 的柠檬酸缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%、羟丙基- $\beta$ -环糊精的最终浓度为 0.1 质量%、乙二醇的最终浓度为 3.0 质量%的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0142] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0143] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样进行评价。结果示于表 1。

[0144] 实施例 5

[0145] (前处理液的制备)(不含两亲性溶液的 pH7.0 的例子)

[0146] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 7.0 的含氢氧化钠的柠檬酸缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%、羟丙基- $\beta$ -环糊精的最终浓度为 0.1 质量%、乙二醇的最终浓度为 3.0 质量%的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0147] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0148] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样进行评价。结果示于表 1。

[0149] 实施例 6

[0150] (前处理液的制备)(含有两亲性溶液的 pH7.0 的例子)

[0151] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 7.0 的含氢氧化钠的柠檬酸缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%、羟丙基- $\beta$ -环糊精的最终浓度为 0.1 质量%、乙二醇的最终浓度为 3.0 质量%的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0152] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理

液。

[0153] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样进行评价。结果示于表 1。

[0154] 比较例 1

[0155] (前处理液的制备)(不含两亲性溶液和环糊精的 pH9.0 的例子)

[0156] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 9.0 的含 EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0157] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0158] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样进行评价。但是,比较例 1 中,由于前处理液的连续使用时很勉强的,因此将第 2 次进行的结果示于表 1。

[0159] 比较例 2

[0160] (前处理液的制备)(不含环糊精的 pH9.0 的例子)

[0161] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 9.0 的含 EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 的最终浓度为 1.0 质量%、乙二醇的最终浓度为 3.0 质量%的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0162] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0163] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样进行评价。

[0164] 比较例 3 和 4

[0165] (前处理液的制备)(不含环糊精的 pH9.0 的例子)

[0166] 除了使用丙二醇(比较例 3)或 1,3-丁二醇(比较例 4)代替乙二醇以外,与比较例 2 同样地制备前处理液,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样地进行评价。

[0167] [表 1]

[0168]

	评价项目 (1)	评价项目 (2)	评价项目 (3)	评价项目 (4)	评价项目 (5)	评价项目 (6)
对象例 1	-	-	5 分	0 分	5 分	-
对象例 2	-	-	5 分	0 分	5 分	-
对象例 3	-	-	5 分	0 分	5 分	-
实施例 1	可	5 分	4 分	0 分	4 分	可
实施例 2	可	4.5 分	4 分	2 分	4 分	可

实施例 3	可	4.5 分	5 分	0 分	4 分	可
实施例 4	可	4.5 分	5 分	2 分	4 分	可
实施例 5	可	4.5 分	5 分	0 分	4 分	可
实施例 6	可	4.5 分	5 分	2 分	4 分	可
比较例 1	可	5 分	1 分	0 分	4 分	否
比较例 2	可	4.5 分	2 分	2 分	4 分	否
比较例 3	可	4 分	2 分	0 分	4 分	否
比较例 4	可	4 分	2 分	1 分	4 分	否

[0169] 由表 1 的结果可知,不含环糊精的比较例 1~4 中,从载玻片上染色试样的被排斥(评价项目(3))方面来看是不能连续使用的。此外,含有两亲性溶液的比较例 2~4 中,虽然与比较例 1 相比,观察到试样被排斥有一定的缓解,但并不具有能够耐受 3 次以上的连续使用的性能。另一方面可知,实施例中则能够连续使用 3 次,特别是含有两亲性溶液时,具有染色强度(评价项目(4))进一步提高的倾向。

[0170] 予以说明,已经确认实施例 2 中使用 NP-40、TritonX-114、或 IGEPALCA-630 代替 TritonX-100,使用吐温 40、或吐温 80 代替吐温 20 时,能够获得同样的效果。

[0171] 参考比较例 1

[0172] (前处理液的制备)(1 种非离子表面活性剂的研究, pH9.0 的例子)

[0173] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 9.0 的含 EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu$ m 过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照表 2 所示的非离子性表面活性剂的最终浓度为 0.1 质量%的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0174] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0175] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,与实施例 1 同样地进行(A)~(C)工序,同样地对评价项目(1)~(4)进行评价。结果示于表 2。

[0176] [表 2]

[0177]

表面活性剂的种类	评价项目 (1)	评价项目 (2)	评价项目 (3)	评价项目 (4)
TritonX-100	可	1 分	2 分	0 分
NP-40	可	1 分	2 分	0 分
TritonX-114	可	1 分	2 分	0 分
吐温 20	否	4 分	1 分	-1 分

吐温 40	否	4 分	1 分	-1 分
吐温 80	否	4 分	1 分	-1 分

[0178] 由表 2 的结果可知,在配合 1 种表面活性剂时无法实现连续使用。

[0179] 参考比较例 2

[0180] (前处理液的制备)(2 种非离子表面活性剂的研究, pH9.0 的例子)

[0181] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 9.0 的含 EDTA 的 Tris-HCl 缓冲液的 10 倍浓缩液,用 0.22  $\mu\text{m}$  过滤器进行过滤。在获得的 10 倍浓缩液中,按照非离子性表面活性剂 TritonX-100 的最终浓度为 0.1 质量%、吐温 20 为表 2 所示的最终浓度的方式进行添加,制备前处理浓缩液。

[0182] 在获得的前处理浓缩液中按照达到 10 倍量的方式用去离子水定容,制备前处理液。

[0183] 接下来,除了将前处理液换成上述制备的前处理液以外,进行 2 次与实施例 1 同样的(A)~(C)工序,同样地对评价项目(1)~(5)进行评价。将第 2 次的结果示于表 3。

[0184] [表 3]

[0185]

吐温 20 的最终浓度	评价项目 (1)	评价项目 (2)	评价项目 (3)	评价项目 (4)	评价项目 (5)
0.1 质量%	可	2 分	1 分	0 分	3 分
0.3 质量%	可	3 分	1 分	0 分	3 分
0.5 质量%	可	4 分	1 分	0 分	4 分
1.0 质量%	可	5 分	1 分	0 分	4 分
2.0 质量%	可	5 分	1 分	0 分	4 分
3.0 质量%	可	5 分	1 分	0 分	4 分

[0186] 由表 3 的结果可知,使用 2 种特定的表面活性剂时也无法实现连续使用。

[0187] 实施例 7~10 和比较例 5、6

[0188] (环糊精的含有比例的研究)

[0189] 在实施例 2 中,按照羟丙基- $\beta$ -环糊精的最终浓度为 0.01 质量%(实施例 7)、最终浓度为 0.05 质量%(实施例 8)、最终浓度为 0.5 质量%(实施例 9)、最终浓度为 1.0 质量%(实施例 10)、最终浓度为 2.0 质量%(比较例 5)或最终浓度为 15.0 质量%(比较例 6)的方式,以代替按照羟丙基- $\beta$ -环糊精的最终浓度为 0.1 质量%的方式进行配合,除此以外与实施例 2 同样地制备前处理液,同样地进行评价。将结果与实施例 2 的结果一起示于表 4。

[0190] [表 4]

[0191]

	羟丙基- $\beta$ -环糊精 的最终浓度	评价项目 (1)	评价项目 (2)	评价项目 (3)	评价项目 (4)	评价项目 (5)	评价项目 (6)
实施例 2	0.1 质量%	可	4.5 分	4 分	2 分	4 分	可
实施例 7	0.01 质量%	可	4 分	3 分	2 分	4 分	可
实施例 8	0.05 质量%	可	4 分	3.5 分	2 分	4 分	可
实施例 9	0.5 质量%	可	4 分	4 分	1 分	4 分	可
实施例 10	1.0 质量%	可	3.5 分	4.5 分	0 分	4 分	可
比较例 5	2.0 质量%	可	2.5 分	4.8 分	-1 分	4 分	否
比较例 6	15.0 质量%	可	2 分	5 分	-1 分	4 分	否

[0192] 由表 4 的结果可知,即使是含有环糊精时,当其含有比例不在特定范围时,也无法获得能够连续使用的效果。

[0193] 实施例 11

[0194] (2 液型前处理浓缩液的例子)

[0195] 制备将制得的前处理浓缩液稀释 10 倍从而能够将前处理液的 pH 调整为 9.0 的、由含 100mM EDTA 的 500mM 的 Tris-HCl 缓冲液的 10 倍浓缩液和 0.01 质量% 作为防腐剂的叠氮化钠组成的 A 液。

[0196] 此外,制备由 1mM 的柠檬酸缓冲液、1 质量% 的非离子性表面活性剂 TritonX-100、10 质量% 吐温 20、1 质量% 的羟丙基- $\beta$ -环糊精和 30 质量% 乙二醇组成的 B 液。

[0197] 将这些 A 液和 B 液按照 A 液 :B 液 :去离子水为 1 :1 :8 的比例混合,制备 pH 为 9.0 的前处理液。

[0198] 使用获得的前处理液,与实施例 2 同样地进行评价。结果,所有的评价项目中均获得了与实施例 2 同样的结果。

[0199] 参考比较例 3

[0200] (以多糖类、糖链聚合物或高分子聚合物代替环糊精的研究)

[0201] 在实施例 1 中,使用表 5 所示的各种多糖类、糖链聚合物或高分子聚合物代替羟丙基- $\beta$ -环糊精,与实施例 1 同样地制备前处理液。

[0202] 接下来,使用制得的各前处理液,与实施例 1 同样地对评价项目(1)~(3)和(6)进行评价。将结果示于表 5。

[0203] [表 5]

[0204]

代替羟丙基-β-环糊精的聚合物类	评价项目 (1)	评价项目 (2)	评价项目 (3)	评价项目 (6)
葡聚糖(Mw.35000-45000) (1 质量%)	否	1分	1分	否
葡聚糖(Mw.400000-500000) (1 质量%)	否	1分	1分	否
葡聚糖(Mw.2000000) (1 质量%)	可	2分	3分	否
葡聚糖(Mw.5000000-20000000) (1 质量%)	可	1分	3分	否
D-山梨糖醇 (1 质量%)	否	1分	2分	否
海藻糖 (1 质量%)	否	1分	2分	否
PVP(Mw.58000) (1 质量%)	可	4分	2分	否
PVP(Mw.58000) (5 质量%)	可	4分	2分	否
PVP(Mw.34000) (1 质量%)	可	4分	2分	否
PVP(Mw.130000) (1 质量%)	可	3分	1分	否
PVP/VA(Mw.58000) (1 质量%)	可	4分	2分	否
PVP/VA(Mw.58000) (3 质量%)	可	4分	2分	否
PVP/VA(Mw.58000) (5 质量%)	可	4分	2分	否

[0205] PVP:聚乙烯吡咯烷酮

[0206] PVP/VA:聚乙烯吡咯烷酮-醋酸乙烯共聚物

[0207] 由表 5 的结果可知,当配合糖呈直链状的葡聚糖中的分子量较小者、单糖类中的山梨糖醇、二糖类中的海藻糖时,此前能够实现的脱石蜡变得无法进行。认为这些物质妨碍了吐温 20、TritonX-100 的效果。此外可知,分子量大的葡聚糖在加热时会产生臭味。

[0208] PVP 和其共聚物用于分散非水溶性物质等,被用作药品赋形剂,由期待其效果而对数种 PVP 进行研究的上述表 5 的结果可知,虽然在石蜡的漂浮(评价项目(2))方面取得了良好的结果,但在载玻片的染色试样被排斥(评价项目(3))方面,并未获得能够连续使用的结果。此外还可知,随着 PVP 分子量增大,溶液的粘性增大,因此难以使用。

专利名称(译)	免疫组织化学染色用前处理液和其浓缩液		
公开(公告)号	<a href="#">CN102762982A</a>	公开(公告)日	2012-10-31
申请号	CN201180008281.X	申请日	2011-02-03
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日冷		
申请(专利权)人(译)	株式会社日冷生物科学		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社日冷生物科学		
[标]发明人	笠松敏幸		
发明人	笠松敏幸		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/28 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N1/30		
代理人(译)	钟晶		
优先权	2010024784 2010-02-05 JP		
其他公开文献	CN102762982B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供一种前处理液和能够容易地制备该前处理液的免疫组织化学染色用前处理浓缩液，所述前处理液用于从含有被含石蜡的包埋介质包埋的组织待测物的载玻片溶出该包埋介质并活化该组织待测物的抗原性，实施免疫组织化学染色，所述前处理液能够利用3次以上。该免疫组织化学染色用前处理液含有抗原性活化剂、特定的非离子表面活性剂和环糊精或其衍生物，作为余部，含有80质量%以上的水，以前处理液的pH为特定pH的比例含有前述抗原性活化剂，且以特定比例含有前述环糊精或其衍生物。

吐温 20 的最终浓度	评价项目 (1)	评价项目 (2)	评价项目 (3)	评价项目 (4)	评价项目 (5)
0.1 质量%	可	2分	1分	0分	3分
0.3 质量%	可	3分	1分	0分	3分
0.5 质量%	可	4分	1分	0分	4分
1.0 质量%	可	5分	1分	0分	4分
2.0 质量%	可	5分	1分	0分	4分
3.0 质量%	可	5分	1分	0分	4分