

(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2020-98097

(P2020-98097A)

(43) 公開日 令和2年6月25日(2020.6.25)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	Z N A P		2 G O 4 5
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y		4 H O 4 5
CO 7 K 16/18	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D		
		CO 7 K 16/18			

審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2017-72111 (P2017-72111)	(71) 出願人	000189017
(22) 出願日	平成29年3月31日 (2017. 3. 31)		松浪硝子工業株式会社
			大阪府岸和田市八阪町2丁目1番10号
		(71) 出願人	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
		(74) 代理人	100196313
			弁理士 村松 大輔
		(72) 発明者	朴 志秀
			大阪府岸和田市八阪町2-1-10 松浪硝子工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 スライドガラス及びスライドガラスの製造のための溶液

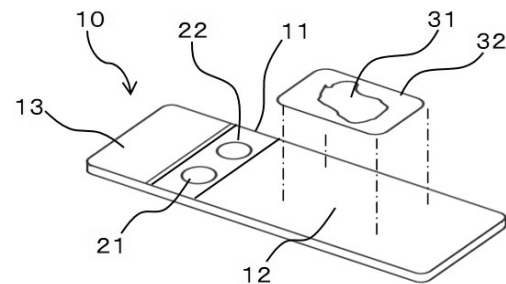
(57) 【要約】

【課題】免疫染色検査におけるコントロール試験を同時に行うことができ、組織免疫染色における賦活化工程にも耐え得るような新規のスライドガラスを提供する。

【解決手段】

被験試料を固定する試料固定部と、樹脂組成物の薄膜を備え、該薄膜上に、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が固定されている薄膜部と、を有することを特徴とする。

【選択図】 図2



【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免疫染色検査のためのスライドグラスであって、

前記被験試料を固定する試料固定部と、

樹脂組成物の薄膜を備え、該薄膜上に、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が固定されている薄膜部と、

を有することを特徴とする、スライドグラス。

【請求項 2】

前記樹脂組成物中の成分と、結合性物質及び／又は非結合性物質とが、シランカップリング剤を介して結合することにより、結合性物質及び／又は非結合性物質が前記薄膜部に固定されていることを特徴とする、請求項 1 に記載のスライドグラス。

【請求項 3】

前記樹脂組成物が、平均粒子径 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下の粒子を含んでいることを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載のスライドグラス。

【請求項 4】

前記樹脂組成物が、疎水性樹脂を含む請求項 1 ～ 3 の何れか一項に記載のスライドグラス。

【請求項 5】

前記薄膜の蒸留水に対する接触角 20° 以上であることを特徴とする、請求項 1 ～ 4 の何れか一項に記載のスライドグラス。

【請求項 6】

前記薄膜の表面の、JIS規格のB0601に準拠して算出される平均の粗さ(Ra)が、 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする、請求項 1 ～ 5 の何れか一項に記載のスライドグラス。

【請求項 7】

前記被験物質がタンパク質であることを特徴とする、請求項 1 ～ 6 の何れか一項に記載のスライドグラス。

【請求項 8】

前記結合性物質が以下の(1)～(3)より選ばれるタンパク質又はペプチドであることを特徴とする、請求項 7 に記載のスライドグラス。

(1) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質

(2) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質の部分ペプチド

(3) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質の部分ペプチドの繰り返しペプチド

【請求項 9】

前記タンパク質がALK、ALK融合タンパク質、PD1及びPD-L1から選ばれることを特徴とする、請求項 7 又は 8 に記載のスライドグラス。

【請求項 10】

前記被験物質がALK又はALK融合タンパク質であり、

前記(2)のペプチドが、付加アミノ酸配列を有していてもよい、配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドであり、

前記(3)のペプチドが、付加アミノ酸配列を有していてもよい、配列番号1のアミノ酸配列からなるペプチドの繰り返しペプチド

であることを特徴とする、請求項 8 に記載のスライドグラス。

【請求項 11】

結合性物質及び／又は非結合性物質を $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以上含み、樹脂組成物の薄膜上に滴下することで薄膜部に結合性物質及び／又は非結合性物質を固定するために用いられることを特徴とする、請求項 1 ～ 10 の何れか一項に記載のスライドグラスの製造のための溶液

10

20

30

40

50

。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、病理診断における免疫染色検査のためのスライドグラスに関する。

【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試験（コントロール試験）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試験を行うことが一般化しており、コントロール試験の結果が無いものは信用されない。

【0003】

免疫染色検査におけるコントロール試験は、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したスライドグラスによって行うことが理想的である。

特許文献1には、前立腺がんの悪性度判定用キットのコントロール試験のため、前立腺がん由来培養細胞PC3のパラフィン切片標本が貼付されたコントロールスライドが開示されている。

【0004】

また、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が端部に予め貼付されており、被験試料と同時に免疫染色をすることができるスライドグラスが市販されている。

【0005】

また、特許文献2には、その免疫染色検査における測定対象であるタンパク質やペプチドがスポットされたニトロセルロースやプラスチック、ガラス又はナイロン製膜類からなるスタンプやスティッカーを備えるスライドグラスが開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2013-63978号公報

【特許文献2】特表2002-533695号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

従来、免疫染色検査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用のスライドグラスを用意することができなかった。

また、従来、被験物質が含まれていることが既知である組織切片等が予め貼付されているスライドグラスは、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、このようなスライドグラスは組織切片や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、コントロール用のスライドグラスを自作しようとする、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なり大きな負担となる。

【0008】

また、特許文献2に記載されているようなスライドグラスは、加熱工程やタンパク質分解工程など、組織染色における賦活化工程においてスタンプやスティッカーが剥離するこ

とがあるという問題点があった。

【 0 0 0 9 】

このような状況に鑑みて、免疫染色検査におけるコントロール試験を同時に行うことができ、組織免疫染色における賦活化工程にも耐え得るような新規のスライドガラス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】

【 0 0 1 0 】

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検査のためのスライドガラスであって、

前記被験試料を固定する試料固定部と、

樹脂組成物の薄膜を備え、該薄膜上に、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が固定されている薄膜部と、

を有することを特徴とする、スライドガラスである。

【 0 0 1 1 】

本発明によれば、組織免疫染色における賦活化工程などの過酷な条件下においた場合であっても、被験試料の免疫染色検査と、固定された結合性物質及び／又は非結合性物質における染色結果に基づく、当該免疫染色検査のコントロール試験を同時に行うことができる。

【 0 0 1 2 】

本発明の好ましい形態では、前記樹脂組成物中の成分と、結合性物質及び／又は非結合性物質とが、シランカップリング剤を介して結合することにより、結合性物質及び／又は非結合性物質が前記薄膜部に固定されていることを特徴とする。

結合性物質及び／又は非結合性物質をシランカップリング剤を介して固定することにより、賦活化工程などの過酷な条件への耐性を向上させることができ、より信頼性の高い免疫染色検査の結果を得ることができるスライドガラスを提供することができる。

【 0 0 1 3 】

本発明の好ましい形態では、前記樹脂組成物が、平均粒子径 $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下の粒子を含んでいることを特徴とする。

樹脂組成物が前記数値範囲の粒子径の粒子を含むことにより、コントロール試験の感度を向上させることができる。

【 0 0 1 4 】

本発明の好ましい形態では、前記樹脂組成物が、疎水性樹脂を含む。

疎水性樹脂を含む樹脂組成物を用いることにより、薄膜上において結合性物質または非結合性物質をより狭い範囲に凝集して固定し、これらの密度を向上させることができ、コントロール試験の感度を向上させることができる。

【 0 0 1 5 】

本発明の好ましい形態では、前記薄膜の蒸留水に対する接触角が 20° 以上である。

薄膜の蒸留水に対する接触角を前記範囲とすることにより、薄膜上において結合性物質または非結合性物質をより狭い範囲に凝集して固定し、これらの密度を向上させることができ、コントロール試験の感度を向上させることができる。

【 0 0 1 6 】

本発明の好ましい形態では、前記薄膜の表面の、JIS規格のB0601に準拠して算出される平均の粗さ(Ra)が、 $0.4\text{ }\mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする。

薄膜の表面の粗さを前記範囲とすることにより、コントロール試験の感度を向上させることができる。

【 0 0 1 7 】

本発明は被験物質がタンパク質である場合に適用することが特に有用である。

この場合、本発明の好ましい形態では、前記結合性物質が以下の(1)～(3)より選ばれるタンパク質又はペプチドである。

10

20

30

40

50

- (1) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質
- (2) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質の部分ペプチド
- (3) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質の部分ペプチドの繰り返しペプチド

【 0 0 1 8 】

本発明の好ましい形態では、前記タンパク質が A L K、A L K 融合タンパク質、P D 1 及び P D - L 1 から選ばれることを特徴とする。

【 0 0 1 9 】

また、本発明の好ましい形態では、前記被験物質が A L K 又は A L K 融合タンパク質であり、

10

前記 (2) のペプチドが、付加アミノ酸配列を有していてもよい、配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドであり、

前記 (3) のペプチドが、付加アミノ酸配列を有していてもよい、配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドの繰り返しペプチド

である。

かかる形態の本発明のスライドグラスによれば、高い信頼性をもって肺癌の検査を行うことができる。

【 0 0 2 0 】

また、本発明は、上述のスライドグラスの製造のために用いる溶液にも関する。本発明の溶液は、結合性物質及び / 又は非結合性物質を $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 以上含み、樹脂組成物の薄膜上に滴下することで薄膜部に結合性物質及び / 又は非結合性物質を固定するために用いられることを特徴とする。

20

本発明の溶液を用いることで、容易にコントロール試験の感度に優れたスライドグラスを製造することができる。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 1 】

本発明のスライドグラスによれば、再現性の高いコントロール試験を行うことができ、免疫染色検査の信頼性を向上させることができる。

また、本発明のスライドグラスは、従来のコントロール試験用のスライドよりも安価に提供することができる。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

【 図 1 】被験物質がタンパク質である場合の結合性物質の選択肢を表す模式図である。図中、タンパク質又はペプチドは横長の矩形で模式的に表し、左端が N 末端、右端が C 末端を表す。斜線部は付加アミノ酸配列を表す。

【 図 2 】本発明のスライドグラスの実施例を表す図である。

【 図 3 】試験例における組織免疫染色の結果を表す写真である。スライドグラスの薄膜部には、正面右側からマウス I g G、ヤギ I g G、ラビット I g G が固定されている。染色した乳癌組織の切片の拡大写真を吹き出し内に示す。

【 発明を実施するための形態 】

40

【 0 0 2 3 】

本明細書においては被験試料についての免疫染色検査を本検査とも言う。

【 0 0 2 4 】

本発明は免疫染色実験に制限なく適用することができるが、組織診断・細胞診断などの病理診断に適用することが好ましい。すなわち、検査対象者から採取した組織切片や細胞を被験試料とすることが好ましい。

【 0 0 2 5 】

従来、組織切片を用いた免疫染色実験 (診断) では、高価なスライドグラスを検査に用いる必要があった。そのため、被験試料が組織切片である場合に、本発明のスライドグラスを使用することが特に好ましい。

50

【 0 0 2 6 】

被験物質は特に限定されず、タンパク質や核酸などを例示することができる。

【 0 0 2 7 】

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。

【 0 0 2 8 】

免疫染色検査が、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。

10

【 0 0 2 9 】

本発明のスライドガラスにおける薄膜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。

【 0 0 3 0 】

結合性物質が薄膜部に固定されている形態の本発明のスライドガラスによれば、免疫染色検査のポジティブコントロール試験を簡便に行うことができる（表1）。

【 0 0 3 1 】

【表1】

[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) 標識抗体以外の本検査で用いる抗体 (D) 本検査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

20

【 0 0 3 2 】

直接法の免疫染色検査を行う場合に、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試験を行うことができる。（表1（A））。

30

【 0 0 3 3 】

また、間接法の免疫染色検査を行う場合に、結合性物質を被験物質とすることで、免疫染色検査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試験を行うことができる（表1（B））。

【 0 0 3 4 】

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を含むペプチドを結合性物質として薄膜部に結合しても良い。

【 0 0 3 5 】

また、間接法の免疫染色検査を行う場合に、結合性物質を標識抗体以外の本検査で用いる抗体とすることで、免疫染色検査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試験を行うことができる（表1（C））。

40

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検査においては、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試験を行うことができる。

【 0 0 3 6 】

また、間接法の免疫染色検査を行う場合に、該免疫染色検査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。免疫染色検査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

50

ロール試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検査に適用することができ、汎用性に優れる。

【００３７】

一方、非結合性物質が薄膜部に固定されている形態の本発明のスライドガラスによれば、免疫染色検査のネガティブコントロール試験を簡便に行うことができる（表２）。

【表２】

[表2]	ネガティブコントロール用	
	直接法	間接法
非結合物質	(A) 本検査で用いる抗体と抗原抗体反応を起こさない物質	(B) 本検査で用いる抗体と抗原抗体反応を起こさない物質
		(C) 本検査で用いる抗体と別の動物種由来の抗体
		(D) 本検査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

【００３８】

直接法の免疫染色検査を行う場合に、非結合性物質を本検査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、免疫染色検査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試験を行うことができる（表２（Ａ））。

20

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。

【００３９】

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、本検査で得られた結果が、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。

【００４０】

また、間接法の免疫染色検査を行う場合に、非結合性物質を本検査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、免疫染色検査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試験を行うことができる（表２（Ｂ））。

30

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、本検査で得られた結果が、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。

【００４１】

40

また、間接法の免疫染色検査を行う場合に、非結合性物質を本検査で用いる抗体と別の動物種由来の抗体とすることで、免疫染色検査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試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、免疫染色検査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。

【００４２】

また、非結合性物質として標識抗体を薄膜部に固定してもよい。このような形態とすることで、標識抗体の発色反応についてのポジティブコントロールとすることができる。

50

【 0 0 4 3 】

本発明のスライドガラスの薄膜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。

【 0 0 4 4 】

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 5 】

また、結合性物質及び非結合性物質はペプチドであってもよい。

特に、被験物質がある特定のタンパク質である場合には、結合性物質は、図 1 を参照しながら説明するように、以下の (1) ~ (3) より選ばれるタンパク質又はペプチドであることが好ましい。

【 0 0 4 6 】

(1) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質

結合性物質として、被験物質であるタンパク質そのものを薄膜部に固定してもよい (図 1 (1) 上段)。また、末端に付加アミノ酸配列を有する該タンパク質を結合性物質として薄膜部に固定してもよい (図 1 (1) 下段)。なお、図 1 には N 末端に付加アミノ酸配列を有するタンパク質を図示しているが、C 末端に付加アミノ酸配列を有するタンパク質

【 0 0 4 7 】

なお、「付加アミノ酸配列」には、F L A G タグ、m y c タグ、H I S タグ、G S T タグ、G F P タグのようなタンパク質タグに限られず、被験物質以外のタンパク質や部分ペプチドなどの配列や、特に機能性のないスペーサー配列などが含まれる。

【 0 0 4 8 】

(2) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質の部分ペプチド

結合性物質として、被験物質であるタンパク質の部分ペプチドを薄膜部に固定してもよい (図 1 (2) 上段)。この部分ペプチドとしては、被験物質であるタンパク質の抗原部位を構成するペプチドが好ましく例示できる (図 1 (2))。

また、末端に付加アミノ酸配列を有する該部分ペプチドを結合性物質として薄膜部に固定してもよい (図 1 (2) 下段)。なお、図 1 には N 末端に付加アミノ酸配列を有する部分ペプチドを図示しているが、C 末端に付加アミノ酸配列を有する部分ペプチドを結合性物質としてもよい。

【 0 0 4 9 】

(3) 付加アミノ酸配列を有していてもよい、被験物質であるタンパク質の部分ペプチドの繰り返しペプチド

結合性物質として、被験物質であるタンパク質の部分ペプチドの繰り返しペプチドを薄膜部に固定してもよい (図 1 (3) 上段)。この部分ペプチドとしては、被験物質であるタンパク質の抗原部位を構成するペプチドが好ましく例示できる (図 1 (3))。

また、末端に付加アミノ酸配列を有する該繰り返しペプチドを結合性物質として薄膜部に固定してもよい (図 1 (3) 中段)。なお、図 1 には N 末端に付加アミノ酸配列を有する繰り返しペプチドを図示しているが、C 末端に付加アミノ酸配列を有する繰り返しペプチドを結合性物質としてもよい。

さらに、繰り返し単位である部分ペプチドの間にスペーサー配列を有している繰り返しペプチドを結合性物質として薄膜部に固定してもよい。

【 0 0 5 0 】

上記 (1) ~ (3) に示したタンパク質又はペプチドについては、遺伝子工学技術を用いて常法により製造することができる。

なお、薄膜部にペプチドを固定する場合には、該ペプチドのアミノ酸長は、好ましくは

10

20

30

40

50

5 以上である。

【 0 0 5 1 】

本発明は組織診断や細胞診断などの病理診断に適用することが好ましい。この場合には、特定疾患のマーカータンパク質を被験物質とすることが好ましい。

【 0 0 5 2 】

このようなマーカータンパク質としては、例えば P D 1、P D - L 1、H E R 2、T O P 2 A、H E R 3、E G F R、P 5 3、M E T、A L K、A L K 融合遺伝子その他の各種のがん・腫瘍関連遺伝子（いわゆるバイオマーカー遺伝子）由来のタンパク質、さらにはがんの増殖因子、転写制御因子、増殖制御因子受容体、転写制御因子受容体等のがんに関連するタンパク質などを挙げることができる。

10

【 0 0 5 3 】

具体的に、肺癌のマーカーである A L K 又は A L K 融合タンパク質を被験物質とする場合について説明を加える。

この場合には、（ 1 ）付加アミノ酸配列を有していてもよい、A L K 又は A L K 融合タンパク質そのものを結合性物質として薄膜部に固定してもよい。

【 0 0 5 4 】

また、（ 2 ）付加アミノ酸配列を有していてもよい、表 3 に示すアミノ酸配列（配列番号 1）からなる A L K タンパク質の部分ペプチドを薄膜部に固定することが好ましい。

【 0 0 5 5 】

また、（ 3 ）付加アミノ酸配列を有していてもよい、表 3 に示すアミノ酸配列（配列番号 1）からなる A L K タンパク質の部分ペプチドの繰り返しペプチドを薄膜部に固定することが好ましい。

20

【 0 0 5 6 】

【 表 3 】

[表3]

```

RKHQELQAMQMELOSPPEYKLSKLRTSTIMTDYNPNYCFAGKTSISDLKEVPRKNITLIRG
LGHGAFGEVYEGQVSGMPNDPSPQLQVAVKTLPEVCEQDELDLMEALISKFNHQNIVR
CIGVSLQSLPRFILLELMAGGDLKSFLRETRPRPSQPSSLAMLDLLHVARDIACGQYLEE
NHFIHRDIAARNCLLTCPGPGRVAKIGDFGMARDIYRASYRKGCCAMLPVKWMPPEAFM
EGIFTSKTDWTSFGVLLWEIFSLGYMPYPSKSNQEVLEFVTSGGRMDPPKNCPGPVYRIM
TQCWQHQPEDRPNFAILLERIEYCTQDPDVINTALPIEYGPLVEEEEKVPVRPKDPEGVPPL
LVSSQAKREEERSPAAPPPLPTTSSGKAACKPTAAEISVRVPRGPAVEGGHVNMAFSQS
NPPSELHKVHGSRNKPTSLWNPTYGSWFTEKPTKKNNPIAKKEPHDRGNLGLGEGSCTVP
PNVATGRPLPGASLLLEPSSLTANMKEVPLFRLRHFPCGNVNYGYQQQGLPLEAATAPGA
GHYEDTLKSKNSMNQPGP

```

30

配列番号1

【 0 0 5 7 】

本発明のスライドガラスは、樹脂組成物の薄膜を備える薄膜部を有する。

樹脂組成物としては、塗料に用いられるものを好ましく例示することができ、アルキド系樹脂、不飽和ポリエステル系樹脂、メラミン系樹脂、尿素系樹脂（アミノ樹脂）、フェノール系樹脂、エポキシ系樹脂、塩化ビニル系樹脂、アクリル系樹脂、アクリルウレタン系樹脂、ウレタン系樹脂、シリコン系樹脂、アクリルシリコン系樹脂、フッ素系樹脂などを含む組成物を例示することができる。

【 0 0 5 8 】

特に樹脂組成物としては、疎水性樹脂を好ましく例示することができる。疎水性樹脂としては、飽和若しくは不飽和の鎖状若しくは環状の炭化水素基、フッ化アルキル基などの疎水基を有する疎水性モノマーを構成単位として含む重合体が例示できる。

40

【 0 0 5 9 】

疎水性樹脂としては、フッ素系樹脂を含む組成物を好ましく例示することができる。フッ素系樹脂としては、ポリテトラフルオロエチレンなどの完全フッ素化樹脂、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニルなどの部分フッ素化樹脂、ペルフルオロアルコキシフッ素樹脂、四フッ化エチレン・六フッ化プロピレン共重合体、エチレン・四フッ化エチレン共重合体、エチレン・クロロトリフルオロエチレン共重合体などのフッ素化樹脂共重合体などを例示することができる。

50

【0060】

樹脂組成物における樹脂の含有量は、好ましくは10～70質量%、より好ましくは20～60質量%、さらに好ましくは30～50質量%である。

【0061】

樹脂組成物は粒子を含んでいることが好ましい。粒子としては特に制限は無いが、通常塗料に添加されるものを好ましく例示することができる。具体的には、シリカ、アルミナ、酸化チタン、ジルコニア、酸化鉄、窒化ケイ素、チタン酸バリウム、硫酸バリウム、炭酸バリウム、カーボンブラック、リン酸亜鉛、リン酸鉄、リン酸アルミニウム、リン酸カルシウム、亜リン酸亜鉛、シアニ化亜鉛、酸化亜鉛、トリポリリン酸アルミニウム、モリブデン酸亜鉛、モリブデン酸アルミニウム、モリブデン酸カルシウム及びリンモリブデン酸アルミニウム、リンモリブデン酸アルミニウム亜鉛などの無機微粒子や、エポキシ樹脂微粒子、ポリイミド樹脂微粒子、ベンゾグアナミン樹脂微粒子などの有機微粒子が挙げられる。

10

【0062】

薄膜部における標識抗体のシグナルの観察を容易にする観点で、樹脂組成物は白色又は無色の粒子である酸化チタン粒子やシリカなどを含むことが特に好ましい。

【0063】

粒子の平均粒子径は、好ましくは100 μm 以下、より好ましくは50 μm 以下、より好ましくは30 μm 以下、さらに好ましくは20 μm 以下、さらに好ましくは10 μm 以下である。

20

このような平均粒子径の粒子を含むことにより、薄膜部における標識抗体のシグナル強度を高め、コントロール試験の感度を向上させることができる。

【0064】

なお、粒子の平均粒子径は、動的光散乱法を用いて測定することが出来る。例えば、適当な有機溶剤に粒子を超音波などにより均一に分散させ、FPR A-1000（大塚電子（株）製）を用いて、粒子の粒度分布を質量基準で作成し、そのメディアン径を平均粒子径とすることで測定される。

【0065】

薄膜を形成する前の樹脂組成物における粒子の含有量は、好ましくは1～60質量%、より好ましくは5～50質量%、さらに好ましくは10～40質量%である。

30

【0066】

樹脂組成物は溶剤を含んでいてもよい。溶剤としては、例えば、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、酢酸メトキシブチル、酢酸アミル、酢酸メチルセロソルブ、セロソルブアセテート、酢酸ジエチレングリコールモノメチルエーテル、酢酸カルビトール等のエステル系溶剤、ジオキサン、エチレングリコールジエチルエーテル、エチレングリコールジブチルエーテル等のエーテル系溶剤、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン等のケトン系溶剤、トルエン、キシレン、エチルベンゼン、トリメチルベンゼン、ナフタレン、テトラリン、ソルベントナフサ、芳香族混合炭化水素等の芳香族炭化水素系溶剤を挙げることができる。

【0067】

樹脂組成物には、本発明の効果を損なわない限度で、紫外線吸収剤、光安定剤、酸化防止剤、レベリング剤、消泡剤、増粘剤、沈降防止剤、染料、艶消し剤等の任意の成分を含むことができる。

40

【0068】

樹脂組成物の薄膜の形成方法は特に限定されない。好ましくは、流動性のある塗料形態の樹脂組成物をスライドガラスの任意の位置に塗布し、これを硬化させることにより形成することができる。

【0069】

薄膜の厚みは特に限定されず、結合性物質又は非結合性物質を固定可能であればよい。

【0070】

50

結合性物質又は非結合性物質の樹脂組成物の薄膜上への固定の方法は特に限定されず、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。

【0071】

シランカップリング法を用いる場合には、シランカップリング剤としては、n - ブチルトリメトキシシラン、n - デシルトリエトキシシラン、ジシクロペンチルジメトキシシラン、ジエチルジエトキシシラン、ジイソプロピルジメトキシシラン、シクロヘキシルエチルジエトキシシラン、シクロヘキシルエチルジメトキシシラン、シクロヘキシルトリメトキシシラン、シクロペンチルトリメトキシシラン、ジメチルジエトキシシラン、ジメチルジメトキシシラン、ジメチルジプロポキシシラン、ジフェニルジエトキシシラン、ジフェニルジメトキシシラン、ドデシルトリエトキシシラン、ドデシルトリメトキシシラン、エチルトリエトキシシラン、エチルトリメトキシシラン、(フルフリルオキシメチル)トリエトキシシラン、2 - [メトキシ(ポリエチレンオキシ)プロピル]トリメトキシシラン、3 - メトキシプロピルトリメトキシシラン、メチルトリメトキシシラン、メチルトリエトキシシラン、メチルトリ - n - プロポキシシラン、メチルトリス(2 - メトキシエトキシ)シラン、オクタデシルメチルジエトキシシラン、オクタデシルトリメトキシシラン、オクタデシルトリエトキシシラン、7 - オクテニルトリメトキシシラン、オクチルトリエトキシシラン、オクチルトリメトキシシラン、3 - (ペンタフルオロフェニル)プロピルトリメトキシシラン、ペンチルトリエトキシシラン、フェネチルトリメトキシシラン、フェニルジエトキシシラン、フェニルメチルジメトキシシラン、フェニルメチルジエトキシシラン、プロピルトリメトキシシラン、(ドデカフルオロ - 1, 1, 2, 2 - テトラヒドロオクチル)トリエトキシシラン、(3, 3, 3 - トリフルオロプロピル)トリメトキシシラン、メチルビニルジメトキシシラン、ビニルメチルジエトキシシラン、ビニルフェニルジエトキシシラン、ビニルトリ - t - ブトキシシラン、ビニルトリイソプロペノキシシラン、ビニルトリメトキシシラン、ビニルトリフェノキシシラン、ビニルトリス(2 - メトキシエトキシ)シラン、アセトキシメチルトリメトキシシラン、アセトキシメチルトリエトキシシラン、3 - アセトキシプロピルトリメトキシシラン、3 - ベンゾイルオキシプロピルトリメトキシシラン、3 - トリフルオロアセトキシプロピルトリメトキシシラン、3 - (メタ)アクリルオキシプロピルトリメトキシシラン、(メタ)クリルオキシメチルトリエトキシシラン、(メタ)クリルオキシメチルトリメトキシシラン、3 - (メタ)アクリルオキシプロピルメチルジエトキシシラン、3 - (メタ)アクリルオキシプロピルメチルジメトキシシラン、3 - (メタ)アクリルオキシプロピルトリエトキシシラン、3 - (メタ)アクリルオキシプロピルトリス(2 - メトキシエトキシ)エトキシシラン、6 - (メタ)アクリルオキシヘキシルトリメトキシシラン、11 - (メタ)アクリルオキシウンデカノイルトリメトキシシラン、11 - (メタ)アクリルオキシウンデカノイルトリエトキシシラン、11 - (メタ)アクリルオキシウンデカノイルメチルジメトキシシラン、アリルジメトキシシラン、アリルトリエトキシシラン、アリルトリメトキシシラン、3 - ブテニルトリエトキシシラン、ベンジルトリエトキシシラン、ジビニルジエトキシシラン、1, 1 - ジエトキシ - 1 - シラシクロペンタ - 3 - エン、5 - (ビシクロヘプテニル)トリエトキシシラン、[2 - (3 - シクロヘキセニル)エチル]トリエトキシシラン、[2 - (3 - シクロヘキセニル)エチル]トリメトキシシラン、(3 - シクロペンタジエニルプロピル)トリエトキシシラン、(3 - シクロペンタジエニルプロピル)トリメトキシシラン、フェニルトリエトキシシラン、フェニルトリメトキシシラン、スチリルエチルトリメトキシシラン、p - トリルトリメトキシシラン、ビス[(3 - メチルジメトキシシリル)プロピル]ポリプロピレンオキシド、1, 2 - ビス(トリメトキシシリル)エタン、1, 2 - ビス(トリエトキシシリル)エタン、ビストリエトキシシリルメタン、1, 9 - ビス(トリエトキシシリル)ノナン、1, 8 - ビス(トリエトキシシリル) - 1, 7 - オクタジエン、1, 4 - ビス(2 - トリエトキシシリルエチル)ベンゼン、1, 6 - ビス(トリメトキシシリル)ヘキサン、1, 3 - ジメチルテトラメトキシジシロキサン、1, 3 - ジオクチルテトラメトキシジシロキサン、(ヘプタデカフルオロ - 1, 1, 2, 2 - テトラ

10

20

30

40

50

ヒドロデシル)トリエトキシシラン、3-(ペンタフルオロイソプロポキシ)プロピルトリエトキシシラン、ヘキサデシルトリメトキシシラン、n-ヘキシルトリエトキシシラン、n-ヘキシルトリメトキシシラン、イソブチルトリエトキシシラン、イソブチルトリメトキシシラン、イソオクチルトリエトキシシラン、プロモフェニルトリメトキシシラン、3-プロモプロピルトリメトキシシラン、3-プロモプロピルトリエトキシシラン、1,1-プロモウンデシルトリメトキシシラン、2-クロロエチルメチルジメトキシシラン、2-クロロエチルトリメトキシシラン、2-(クロロメチル)アリルトリメトキシシラン、クロロメチルメチルジエトキシシラン、クロロメチルメチルジイソプロポキシシラン、[(クロロメチル)フェニルエチル]トリメトキシシラン、(p-クロロメチル)フェニルトリメトキシシラン、(p-クロロメチル)フェニルトリ-n-プロポキシシラン、クロロメチルトリエトキシシラン、クロロメチルトリメトキシシラン、クロロフェニルトリエトキシシラン、3-クロロプロピルメチルジメトキシシラン、3-クロロプロピルトリメトキシシラン、3-クロロプロピルトリエトキシシラン、ヨードメチルトリメトキシシラン、2-(3,4-エポキシシクロヘキシル)エチルトリエトキシシラン、2-(3,4-エポキシシクロヘキシル)エチルトリメトキシシラン、5,6-エポキシヘキシルトリエトキシシラン、(3-グリシジルオキシプロピル)メチルジメトキシシラン、(3-グリシジルオキシプロピル)トリメトキシシラン、3-エチル-3-(3-トリエトキシシリルプロポキシ)メチルオキセタン、3-メチル-3-(3-トリエトキシシリルプロポキシ)メチルオキセタン、 γ -アミノプロピルトリエトキシシラン、N- β -(アミノエチル)- γ -アミノプロピルトリメトキシシラン、 γ -グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、 γ -メタアクリロキシプロピルトリメトキシシラン、N- β -(N-ビニルベンジルアミノエチル)- γ -アミノプロピルトリメトキシシランなどが例示できる。

10

20

【0072】

結合性物質又は非結合性物質がタンパク質又はペプチドである場合には、シランカップリング剤として、末端にアミノ基を有するアミノシラン系カップリング剤を用いることが好ましい。タンパク質等の有するカルボキシル基と、アミノシラン系カップリング剤の有するアミノ基の静電相互作用により、タンパク質等を薄膜部に強固に固定することができる。

【0073】

結合性物質又は非結合性物質をシランカップリング剤を介して結合させる方法は常法に基づき行うことができるが、例えば以下のような方法を挙げることができる。

30

まず、薄膜をシランカップリング剤を溶解させた酢酸水溶液に浸漬した後、乾燥した圧搾空気を吹き付けて乾燥する。

NaClを含む炭酸ナトリウム緩衝液に、結合性物質又は非結合性物質を溶解した溶液を調製する。

この溶液をシランカップリング剤により処理された薄膜に、前記タンパク質溶液を滴下し静置する。

静置の後、緩衝液で薄膜を洗浄し、さらに薄膜をウシ血清アルブミンを含む緩衝液に室温で浸漬する。

その後、薄膜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を薄膜に固定することができる。

40

【0074】

薄膜に結合性物質又は非結合性物質を固定した後は、スライドガラスを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に付しても、薄膜から結合性物質等が剥離せず、標識抗体のシグナルを観察することができる。

【0075】

本発明のスライドガラスは、上述のように樹脂組成物の薄膜に結合性物質又は非結合性物質の溶液を滴下することによって製造することができる。

この滴下用の溶液における結合性物質及び/又は非結合性物質の含有量の下限は、特に限定されないが、好ましくは0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上、より好ましくは1 $\mu\text{g/mL}$ 以上で

50

ある。

滴下用の溶液における結合性物質及び／又は非結合性物質の含有量を前記範囲とすることによって、容易にコントロール試験の感度に優れたスライドガラスを製造することができる。

【0076】

また、この滴下用の溶液における結合性物質及び／又は非結合性物質の含有量の上限は、特に限定されないが、好ましくは1000mg/mL以下、より好ましくは100mg/mL以下である。

【0077】

樹脂組成物の薄膜の蒸留水に対する接触角は、好ましくは20°以上、より好ましくは35°以上、より好ましくは40°以上、より好ましくは50°以上、より好ましくは70°以上、さらに好ましくは90°以上、さらに好ましくは110°以上、さらに好ましくは130°以上である。

薄膜の蒸留水に対する接触角をこのような範囲とすることにより、薄膜上において結合性物質又は非結合性物質をより狭い範囲に凝集して固定し、これらの密度を向上させることができ、コントロール試験の感度を向上させることができる。

なお、接触角は任意の接触角計を用いることにより測定可能である。

【0078】

樹脂組成物の薄膜の表面の平均の粗さ(Ra)は、好ましくは0.4μm以上、より好ましくは0.5μm以上、さらに好ましくは0.6μm以上である。

薄膜の表面の粗さを前記範囲とすることにより、薄膜の単位面積当たりに固定される結合性物質又は非結合性物質の密度を向上させ、標識抗体のシグナル強度が向上する。すなわち、コントロール試験の感度を向上させることができる。

【0079】

また、樹脂組成物の薄膜の表面の最大の深さ(Rz)は、特に限定されないが、好ましくは0.4μm以上、0.5μm以上、より好ましくは0.6μm以上、さらに好ましくは0.7μm以上である。

【0080】

また、樹脂組成物の薄膜の表面の突出の間隔(Sm)は、好ましくは10~2000μm、より好ましくは30~1000μm、さらに好ましくは50~500μm、さらに好ましくは100~200μmであることが最も好ましい。

【0081】

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。

【0082】

スライドガラスに固定する結合性物質又は非結合性物質の数は1つであっても良いが、好ましくは2以上である。

結合性物質と非結合性物質をそれぞれ独立して薄膜に固定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、一つのスライドガラスによってポジティブコントロール試験とネガティブコントロール試験を同時に行うことができる。

【0083】

また、薄膜に固定する結合性物質又は非結合性物質の数を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、それぞれ独立して薄膜に固定することが好ましい。

固定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、該シグナルが薄膜に固定され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。

【0084】

また、本検査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

10

20

30

40

50

イソタイプコントロール抗体などを、それぞれ独立して薄膜に固定することが好ましい。

【0085】

本発明のスライドガラスは被験試料を固定するための試料固定部を有する。

本発明のスライドガラスは、コントロール試験のための薄膜部と、本検査のための試料固定部を同一の基板上に有するため、コントロール試験と本検査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。

【0086】

本発明のスライドガラスを用いた検査は、通常の免疫染色検査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、スライドガラス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。

10

【0087】

このように、本発明のスライドガラスによれば、インキュベーション時間、温度など本検査における抗原抗体反応と同様の条件でコントロール試験を行うことができるため、信頼性の高い検査結果を得ることができる。

【実施例】

【0088】

< 1 > 本発明のスライドガラスの実施例

図2を参照しながら、本発明のスライドガラス10の一実施形態を説明する。

【0089】

20

スライドガラス10は端部にラベリング等をするためのフロスト部13を備える。フロスト部13はガラス表面に砂を吹き付けることにより粗面化処理することによって形成することができる。

なお、フロスト部13に代えて、塗料をスライドガラス10の端部に塗布し、そこへラベリング等が可能な構成としてもよい。また、全自動免疫染色機に供する際には、フロスト部にバーコードシールを貼付してもよい。

【0090】

スライドガラス10はフロスト部13側に樹脂組成物の薄膜からなる薄膜部11を備える。スライドガラス10における薄膜部11の位置、範囲については特に限定されないが、図2に示すようにスライドガラス10の端部寄りの位置に、スライドガラス10の短手方向を長辺とする略矩形に形成することが好ましい。

30

【0091】

薄膜部11には結合性物質21と非結合性物質22がそれぞれ固定されている。図2には結合性物質21と非結合性物質22がそれぞれ1種ずつ薄膜部11に固定された形態を示すが、薄膜部11に固定する結合性物質21及び非結合性物質22の種類や数は特に限定されない。

【0092】

図2におけるスライドガラス10においては、フロスト部13及び薄膜部11以外の部分が試料固定部12である。試料固定部12の位置や面積は図2に示す形態に限られず適宜設計可能である。

40

【0093】

図2には試料としてパラフィン包埋組織切片（組織切片31、パラフィン32）を試料固定部12に固定する態様を示す。試料固定部12へのパラフィン包埋組織切片の固定は常法により行うことができる。

また、本発明を細胞診断に適用する際には、常法により細胞を試料固定部12に固定することができる。例えば、スライドガラス10をサイトスピンに設置し、遠心によって培養細胞を試料固定部12に固定したり、検査対象者の検査対象部位よりスパーテル等で擦り取った細胞を試料固定部12に塗布することで固定することができる。

【0094】

試料固定部12には、試料の剥離防止のためのコーティングを施してもよい。

50

【 0 0 9 5 】

試料固定部 1 2 に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 3 2 を除去する。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、スライドガラス 1 0 を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で加熱処理する。

その後は通常の免疫染色検査と同様の手順によって染色操作を行うことができる。

【 0 0 9 6 】

免疫染色の結果、結合性物質 2 1 を固定した箇所が染色され、かつ、非結合性物質 2 2 を固定した箇所が染色されていなければ、これらの結果が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なり、組織切片 3 1 の染色結果は信頼できるものであると判断することができる。

10

【 0 0 9 7 】

< 2 > 試験例

(1) 薄膜部の形成

フッ素系樹脂を含む合成樹脂 4 0 質量 %、平均粒子径 5 μ m の顔料 (シリカ、酸化チタン (I V)、銅、銅化合物、カーボンブラック) 4 0 質量 %、及び溶剤 (エチレングリコールモノブチルエーテルアセテート、石油ナフサ、トリエチルベンゼン、高沸点エステル系混合溶剤、酢酸エチル) 2 0 質量 % を含む塗料形態の樹脂組成物を調製した。

調製した樹脂組成物をスライドガラスに塗布することで薄膜を形成し、これが固化するまで静置した。

20

【 0 0 9 8 】

このようにして形成した薄膜の蒸留水に対する接触角は、接触角計で測定したところ 1 3 0 ° であった。

また、薄膜の表面粗さ (R a) は、J I S B 0 6 0 1 に準拠して計測したところ、0 . 6 8 μ m であった。

【 0 0 9 9 】

(2) 結合性物質及び非結合性物質の固定

上で形成した薄膜を 3 - アミノプロピルトリエトキシシランを溶解させた酢酸水溶液に浸漬した後、乾燥した圧搾空気を吹き付けて乾燥させ、薄膜部にアミノシランコーティングを施した。

30

【 0 1 0 0 】

N a C l を含む炭酸ナトリウム緩衝液に、1 m g / m l の濃度でマウス I g G (アイソタイプコントロール抗体)、ラビット I g G (アイソタイプコントロール抗体)、及びヤギ I g G (アイソタイプコントロール抗体) を溶解した抗体溶液を調製した。

これら抗体溶液をアミノシランコーティングされた薄膜部にそれぞれ滴下し静置した。

その後、緩衝液で薄膜部を洗浄し、さらに薄膜部をウシ血清アルブミンを含む緩衝液に室温で浸漬しブロッキングした。

その後、薄膜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させた。

【 0 1 0 1 】

(3) 染色

上で作製したスライドガラスに乳癌組織のパラフィン包埋切片を固定した。このパラフィン包埋切片が固定されたスライドガラスについて、自動免疫染色装置 (R o c h e 社自動免疫染色装置) を用いて以下の手順で免疫染色を行った。染色結果は図 3 に示す。また、本試験例で用いた抗体及び染色結果を表 4 にまとめる。

40

【 0 1 0 2 】

1 . * * * * * E Z P r e p の選択 * * * * *

2 . * * * * * 時間合わせ段階を開始する * * * * *

3 . * * * * * エアーミキサーをオフ * * * * *

4 . 加熱 (7 5 、 4 分)

5 . E Z P r e p を適用し容積調整

50

- 6 . インキュベート (4 分)
- 7 . 洗 浄
- 8 . E Z P r e p を 適 用 し 容 積 調 整
- 9 . インキュベート (4 分)
- 1 0 . スライド洗 浄
- 1 1 . E Z P r e p を 適 用 し 容 積 調 整
- 1 2 . 液体カバースリップ適用
- 1 3 . 加熱 (7 6 、 4 分)
- 1 4 . 洗 浄
- 1 5 . 脱パラフィン液を適用し容積調整 10
- 1 6 . 液体カバースリップ適用
- 1 7 . 加熱 (4 2 、 2 分)
- 1 8 . * * * * * エアーミキサーをオン * * * * *
- 1 9 . 洗 浄
- 2 0 . コンディショナー # 1 を適用
- 2 1 . C C L o n g カバースリップを適用
- 2 2 . 加熱 (9 5 、 8 分)
- 2 3 . コンディショナー # 1 を適用
- 2 4 . 液体カバースリップを適用
- 2 5 . 加熱 (1 0 0 、 4 分) 20
- 2 6 . 液体カバースリップを適用
- 2 7 . コンディショナー # 1 を適用
- 2 8 . インキュベート (4 分)
- 2 9 . 液体カバースリップを適用
- 3 0 . E Z P r e p と C C バッファーを適用し容積調整
- 3 1 . インキュベート (4 分)
- 3 2 . 液体カバースリップを適用
- 3 3 . コンディショナー # 1 を適用
- 3 4 . インキュベート (4 分)
- 3 5 . 液体カバースリップを適用 30
- 3 6 . コンディショナー # 1 を適用
- 3 7 . インキュベート (4 分)
- 3 8 . 液体カバースリップを適用
- 3 9 . コンディショナー # 1 を適用
- 4 0 . インキュベート (4 分)
- 4 1 . 液体カバースリップを適用
- 4 2 . コンディショナー # 1 を適用
- 4 3 . インキュベート (4 分)
- 4 4 . 液体カバースリップを適用
- 4 5 . E Z P r e p と C C バッファーを適用し容積調整 40
- 4 6 . インキュベート (4 分)
- 4 7 . 液体カバースリップを適用
- 4 8 . コンディショナー # 1 を適用
- 4 9 . インキュベート (4 分)
- 5 0 . 液体カバースリップを適用
- 5 1 . コンディショナー # 1 を適用
- 5 2 . インキュベート (4 分)
- 5 3 . スライドヒーターを無効
- 5 4 . インキュベート (8 分)
- 5 5 . 洗 浄 50

56. スライド容積を調整
57. 液体カバースリップを適用
58. * * * * * 反応バッファーの選択 * * * * *
59. 加熱 (42 、 2 分)
60. 洗浄
61. スライド容積を調整
62. I - V I E W I N H I B I T O R を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (4 分)
63. 洗浄
64. スライド容積を調整 10
65. 抗ビメンチン抗体 (V 9) (マウスモノクローナル I g G) 溶液を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (1 6 分)
66. 洗浄
67. スライド容積を調整
68. 液体カバースリップを適用
69. 洗浄
70. スライド容積を調整
71. B L O C K E R A を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (4 分)
72. 洗浄 20
73. スライド容積を調整
74. B L O C K E R B を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (4 分)
75. I - V I E W B I O T I N I g G (ビオチン標識抗マウス / ラビット I g G 抗体 (ヤギ I g G)) 溶液を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (8 分)
76. 洗浄
77. スライド容積を調整
78. 液体カバースリップを適用
79. 洗浄 30
80. スライド容積を調整
81. I - V I E W S A - H R P 溶液を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (8 分)
82. 洗浄
83. スライド容積を調整
84. 液体カバースリップを適用
85. 洗浄
86. スライド容積を調整
87. I - V I E W D A B 溶液を 1 滴適用、I - V I E W H ₂ O ₂ 溶液を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (8 分) 40
88. 洗浄
89. スライド容積を調整
90. I - V I E W C O P P E R を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (4 分)
91. 洗浄
92. スライド容積を調整
93. ヘマトキシリン I I (C o u n t e r s t a i n) を 1 滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート (1 6 分)
94. 洗浄
95. スライド容積を調整 50

96. BLUING REAGENT (Post Counterstain) を1滴適用、液体カバースリップを適用、インキュベート(4分)

97. 洗浄

【0103】

【表4】

[表4]			染色の結果
組織染色に用いた抗体	一次抗体	抗ビメンチン抗体(V9)(マウスモノクローナルIgG)	○
	二次抗体	ビオチン標識抗マウスIgG抗体(ラビットIgG)	
薄膜部に固定した抗体	ポジティブコントロール	マウスIgG(アインタイプコントロール抗体)	○
	ネガティブコントロール	ヤギIgG(アインタイプコントロール抗体)	×
	ポジティブコントロール	ラビットIgG(アインタイプコントロール抗体)	○

10

【0104】

図3及び表4に示した結果は、薄膜部において、マウスIgG及びラビットIgGを固定したスポットの染色が観察された。これは、本試験例の組織染色における一次抗体と二次抗体の抗原抗体反応、及びそれに続く発色反応が正常に動作していることを示している。

一方、薄膜部において、ヤギIgGを固定したスポットでは発色が観察されなかった。これは、二次抗体がマウスIgGに特異的に反応していることを示唆している。

【0105】

この通り、薄膜部において、マウスIgG及びラビットIgG、そしてヤギIgGを固定したスポットの染色結果がそれぞれ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なっており、図3に示す乳癌組織切片の免疫染色結果の正確性を担保している。

20

【0106】

以上の結果より、薄膜部に固定された結合性物質又は非結合性物質は、組織免疫染色を行う際の脱パラフィン工程や賦活化工程を経ても剥離することがないため、本発明はコントロール試験を同時に行うことができるスライドガラスとして非常に有用であることが証明された。

【産業上の利用可能性】

【0107】

本発明は、免疫染色検査に応用することができる。

30

【符号の説明】

【0108】

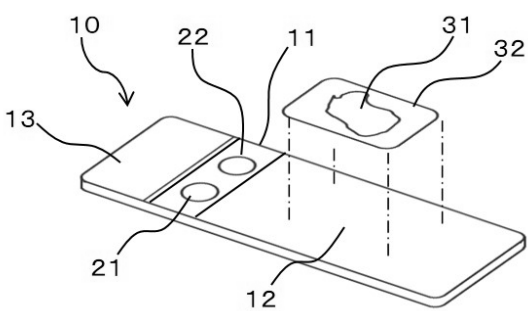
- 10 スライドガラス
- 11 薄膜部
- 12 試料固定部
- 13 フロスト部
- 21 結合性物質
- 22 非結合性物質
- 31 組織切片
- 32 パラフィン

40

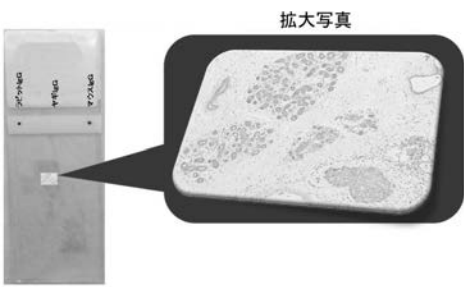
【 図 1 】

被験物質		抗原部位
結合性物質	(1)	抗原部位 抗原部位
	(2)	抗原部位 抗原部位
	(3)	抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位 抗原部位

【 図 2 】



【 図 3 】



【 配 列 表 】

2020098097000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 新道 弘規

大阪府岸和田市八阪町 2 - 1 - 1 0 松浪硝子工業株式会社内

(72)発明者 栗原 圭

神奈川県横浜市金沢区幸浦二丁目 1 番 1 6 号 株式会社森永生科学研究所内

F ターム(参考) 2G045 CB01 DA36 FA16 FB03 FB07 HA20

4H045 AA11 AA30 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	载玻片及其制造方案		
公开(公告)号	JP2020098097A	公开(公告)日	2020-06-25
申请号	JP2017072111	申请日	2017-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	松浪硝子工业株式会社 株式会社森永生科学研究所		
申请(专利权)人(译)	松浪硝子工业株式会社 株式会社森永生科学研究所		
[标]发明人	朴志秀 新道弘規 栗原圭		
发明人	朴志秀 新道弘規 栗原圭		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 C07K16/18		
CPC分类号	C07K16/18 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/48.ZNA.P G01N33/53.Y G01N33/53.D C07K16/18		
F-TERM分类号	2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/HA20 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	泰介村松		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题:提供一种新型载玻片,其能够在免疫染色测试中同时执行对照测试,并且能够承受组织免疫染色中的激活步骤。[解] 用于将测试样品固定的样品固定部件和树脂组合物的薄膜,在该薄膜上,是能够与标记抗体直接或间接形成复合物和/或与标记抗体形成复合物的结合物质。并且,固定有不能形成的非结合性物质的薄膜部分。[选择图]图2

