

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02014/133120

発行日 平成29年2月2日 (2017.2.2)

(43) 国際公開日 平成26年9月4日 (2014.9.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/28 (2006.01)	C12Q 1/28	2G045
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68	A 4B063
GO1N 33/48 (2006.01)	GO1N 33/48	P
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53	Y
GO1N 33/535 (2006.01)	GO1N 33/535	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

出願番号	特願2015-503043 (P2015-503043)	(71) 出願人	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
(21) 国際出願番号	PCT/JP2014/055004	(74) 代理人	100081514 弁理士 酒井 一
(22) 国際出願日	平成26年2月28日 (2014.2.28)	(74) 代理人	100082692 弁理士 蔵合 正博
(31) 優先権主張番号	特願2013-39672 (P2013-39672)	(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
(32) 優先日	平成25年2月28日 (2013.2.28)	(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
(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

(57) 【要約】

ペルオキシダーゼ標識抗体を用いた発色反応を、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の凝集によるDAB含有基質溶液への沈澱、及びバックグラウンド染色等の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。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EDTA・2Na、EDTA・2NH₄、GEDTA及びNTAの少なくとも1種のキレート剤と、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)を含み、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液タイプ以上である。

【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、ポリオキシエチレン(POE)アルキルエーテル系非イオン界面活性剤及びポリオキシプロピレン(POP)アルキルエーテル系非イオン界面活性剤の少なくとも1種からなる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、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。

10

【請求項 2】

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、ポリオキシエチレン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)とが別に保管される2液タイプであり、キットを3液タイプとした請求項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】

POEアルキルエーテル系非イオン界面活性剤及びPOPアルキルエーテル系非イオン界面活性剤が、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、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及びPOPオクチルドデシルエーテルからなる群より選択される少なくとも1種である請求項1~3のいずれかに記載のキット。

20

【請求項 5】

キレート剤がEDTA・2Naであり、且つPOEアルキルエーテル系非イオン界面活性剤が、POE(23)ラウリルエーテルである請求項1~3のいずれかに記載のキット。

【請求項 6】

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1~5のいずれかに記載のキット。

30

【請求項 7】

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、0.1~10mMとなる量である請求項1~6のいずれかに記載のキット。

【請求項 8】

前記発色試薬(B)又は前記基質安定化溶液(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POPアルキルエーテル系非イオン界面活性剤の少なくとも1種の非イオン界面活性剤の含有量は、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基質溶液中の含有割合として、0.05~30質量%となる量である請求項1~7のいずれかに記載のキット。

40

【請求項 9】

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1~8のいずれかに記載のキット。

【請求項 10】

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

50

て、0.001～0.3質量%となる量である請求項1～9のいずれかに記載のキット。

【請求項11】

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1～10のいずれかに記載のキット。

【請求項12】

ペルオキシダーゼが、西洋わさび由来のペルオキシダーゼである請求項1～11のいずれかに記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【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。

【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。

20

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。

30

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。

40

【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

50

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・2NH₄)、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、ポリオキシエチレン(以下POEと略す)アルキルエーテル系非イオン界面活性剤及びポリオキシプロピレン(以下POPと略す)アルキルエーテル系非イオン界面活性剤の少なくとも1種からなる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、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。

また、本発明によれば、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アルキルエーテル系非イオン界面活性剤及びPOPアルキルエーテル系非イオン界面活性剤の少なくとも1種からなる非イオン界面活性剤、イミダゾール

10

20

30

40

50

ル、及び水を含む基質安定化溶液(B2)とが別に保管される2液タイプであり、キットを3液タイプとした上記キットが提供される。

更に本発明によれば、DABを用いた組織、細胞又はこれらの一部の染色に、本発明のキットを使用する、IHC法、ICC法、又はISH法が提供される。

更にまた、本発明によれば、DABを用いた組織、細胞又はこれらの一部の染色に、本発明のキットを用いることを特徴とする染色法が提供される。

【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。

10

【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。

20

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。

30

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、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。

40

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

50

(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。

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・2NH₄、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。

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。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

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。

10

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。

20

【 0 0 1 6 】

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。

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。

30

【 0 0 1 7 】

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。

40

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。

【 0 0 1 8 】

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。

50

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。

【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。

【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)

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)

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マイクロームで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

10

20

30

40

50

最後のエタノール層静置後、pH 7.6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、pH 7.6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100 μ L滴下し、25℃で60分間反応させた。反応終了後、pH 7.6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100 μ L滴下し、25℃で30分間反応させた。反応終了後、pH 7.6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

最終に得られるDAB含有基質溶液中の濃度が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1mLに各溶液1滴(約40 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

最終に得られるDAB含有基質溶液中の濃度が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40 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0.024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。

10

20

30

40

50

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製作した。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。

10

【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。

20

【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・2NH₄、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。

30

【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。

40

【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 ₄	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+

10

【 0 0 3 1 】

【表 2】

20

	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

30

【 0 0 3 2 】

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殿が認められた。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 / 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 日後の溶液にも沈殿が認められた。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 日後の溶液に沈殿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。

40

50

【 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 mM)、0.2 M (DAB 含有基質溶液中のイミダゾール濃度は 8 mM)、0.3 M (DAB 含有基質溶液中のイミダゾール濃度は 12 mM) 及び 0.4 M (DAB 含有基質溶液中のイミダゾール濃度は 16 mM) 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。

10

【 0 0 3 4 】

実施例 7 ~ 13：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

20

【 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+	—

30

【 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

10

【0037】

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 13 については、キットを加速試験 37 °C・3 ヶ月および凍結融解試験 マイナス 20 °C 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、染色性及び沈澱に問題はなかった。更に、加速試験及び凍結融解試験後に、混合溶液の 4 °C 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。

20

【0038】

実施例 14 : 2 液タイプの DAB 含有基質キット

最終に得られる DAB 含有基質溶液中の濃度が 20 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、過酸化水素の含有割合が 0.025 質量%、イミダゾール濃度が 20 mM、EDTA・2Na 濃度が 2 mM、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 pH 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 500 µL に対して、(A) 液 1 滴 (約 20 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 0.025 質量%、イミダゾール濃度は 20 mM、EDTA・2Na 濃度は 2 mM、Brij 35 の含有割合は 0.4 質量%であり、pH は 7.5 であった。

30

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。

【0039】

実施例 15 ~ 18

塩酸のみで pH を 7.5 に調整せずに、表 5 に示す緩衝液を HCl 又は NaOH にて滴定し表 5 に示す pH に調整した以外は、実施例 14 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 14 と同様に行った。結果を表 5 に示す。

40

【0040】

【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。

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14が特に優れていることがわかった。

【0041】

実施例19

EDTA・2Naの濃度を2mMから1mM、1.5mMに変更した以外は、実施例14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14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1mMまでは、黄土色であったが、1.5mM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。

20

【0042】

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マイクロームで5μm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、37℃、16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。

30

(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、25℃、5分間反応させた。反応終了後、リン酸緩衝液(pH7.6)にて1分×2回の洗浄を行った。

スライドの水気を切り、事前に温浴にて98℃に温めておいた10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)の中にスライドを入れ、30分間反応させた。

反応終了後、リン酸緩衝液(pH7.6)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100μL滴下し、25℃で3分間反応させ、反応終了後、リン酸緩衝液(pH7.6)にて5分×3回の洗浄を行った。

40

脱水操作のため、70%、90%及び100%エタノール(残り成分は脱イオン水)と25℃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。

【0043】

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220kb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10μL滴下した。

泡を避けながら、22mm×22mmのカバーガラス(松浪硝子工業社製)を組織上に載せ

50

、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。

【0044】

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(pH7.6)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100μL滴下し、25で30分間反応させ、反応終了後、リン酸緩衝液(pH7.6)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100μL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。

【0045】

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

最終に得られるDAB含有基質溶液中の濃度が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。

【0046】

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

最終に得られるDAB含有基質溶液中の濃度が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 20 mM、EDTA・2Na 濃度は 0.8 mM、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。

【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+	—

10

【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

20

【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。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/055004
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/28(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/535(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q1/28, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/531, G01N33/535 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2012/0171668 A1 (Ventana Medical Systems, Inc.), 05 July 2012 (05.07.2012), particularly, example 4 & WO 2012/092322 A1 & AU 2011352251 A & CA 2817374 A & IL 226479 D & CN 103282516 A	1-12
Y	US 2012/0077211 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORP.), 29 March 2012 (29.03.2012), the entire specification (particularly, table 10) & WO 2010/077870 A2	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 May, 2014 (16.05.14)		Date of mailing of the international search report 27 May, 2014 (27.05.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 5 5 0 0 4	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/28(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/535(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/28, C12Q1/68, G01N33/53, G01N33/531, G01N33/535			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/WPIX(STN)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	
Y	US 2012/0171668 A1 (Ventana Medical Systems, Inc.) 2012.07.05, 特に「Example 4」 & WO 2012/092322 A1 & AU 2011352251 A & CA 2817374 A & IL 226479 D & CN 103282516 A	1-12	
Y	US 2012/0077211 A1 (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION) 2012.03.29, 明細書全体 (特に「TABLE 10」) & WO 2010/077870 A2	1-12	
C欄の続きにも文献が列挙されている。		パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 16.05.2014		国際調査報告の発送日 27.05.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 小暮 道明	4 N 9 3 5 8
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB25
4B063 QA01 QQ22 QR55 QS33 QS34

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

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	JPWO2014133120A1	公开(公告)日	2017-02-02
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		
[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 C12Q1/68 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/535		
CPC分类号	C12Q1/28 G01N33/5306		
FI分类号	C12Q1/28 C12Q1/68.A G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/535		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB25 4B063/QA01 4B063/QQ22 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34		
代理人(译)	酒井 一 ZOGO正弘		
优先权	2013039672 2013-02-28 JP		
其他公开文献	JP6393252B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用过氧化物酶标记的抗体的显色反应是通过使用含有DAB和咪唑作为其敏化剂的显色反应溶液进行的，以提高比色强度，以及由于DAB的聚集和背景导致的含DAB底物溶液的沉淀。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。本发明的试剂盒包括含发色团的溶液，该溶液含有DAB作为过氧化物酶发色团和水(A)，以及EDTA·2Na，EDTA·2NH₄，GEDTA和NTA以及POE中的至少一种螯合剂。烷基醚型非离子表面活性剂和/或POP烷基醚型非离子表面活性剂，咪唑，过氧化氢，其含有含氢的成色剂(B)，至少含有发色团的溶液(A)并且，将显色剂(B)分开保存的二液型。

(19) 日本国特許庁(JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2014/133120
発行日 平成29年2月2日(2017.2.2)	(43) 国際公開日 平成26年9月4日(2014.9.4)	
(51) Int. Cl. C12Q 1/28 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/535 (2006.01)	F I C12Q 1/28 C12Q 1/68 G01N 33/48 G01N 33/53 G01N 33/535	ターマコード(参考) 2G045 4B063
出願番号 特願2015-503043(P2015-503043)	(71) 出願人 505145149	審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全19頁)
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/055004	株式会社ニチレイバイオサイエンス	
(22) 国際出願日 平成26年2月28日(2014.2.28)	東京都中央区築地六丁目1-9番20号	
(31) 優先権主張番号 特願2013-39672(P2013-39672)	(74) 代理人 100081514	
(32) 優先日 平成25年2月28日(2013.2.28)	弁理士 酒井 一	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(74) 代理人 100082692	
	弁理士 蔵合 正博	
	(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	
	(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	
	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