

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6926805号
(P6926805)

(45) 発行日 令和3年8月25日 (2021.8.25)

(24) 登録日 令和3年8月10日 (2021.8.10)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 B

請求項の数 5 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願2017-153864 (P2017-153864)	(73) 特許権者	000002369
(22) 出願日	平成29年8月9日 (2017.8.9)		セイコーエプソン株式会社
(65) 公開番号	特開2019-32254 (P2019-32254A)		東京都新宿区新宿四丁目1番6号
(43) 公開日	平成31年2月28日 (2019.2.28)	(74) 代理人	100116665
審査請求日	令和2年5月21日 (2020.5.21)		弁理士 渡辺 和昭
		(74) 代理人	100179475
			弁理士 仲井 智至
		(74) 代理人	100216253
			弁理士 松岡 宏紀
		(72) 発明者	青木 太朗
			秋田県湯沢市岩崎字壇ノ上1番地 秋田エ
			プソン株式会社内
		(72) 発明者	鈴木 千春
			秋田県湯沢市岩崎字壇ノ上1番地 秋田エ
			プソン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 動物組織を用いた免疫染色の評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

動物組織を薄片化した試料に、
賦活化処理を施す工程と、
ブロッキング処理を施す工程と、
一次抗体反応を行わせる工程と、

二次抗体反応用の試薬に加熱処理を施して、前記二次抗体反応用の試薬に含まれる発色反応に寄与するタンパク質の一部を凝集物として除去し、少なくともウシアルブミン、スキムミルク、ゼラチンのいずれかのタンパク質を加えて希釈液を調製する工程と、

前記希釈液を用いて、前記二次抗体反応用の試薬を希釈して、反応用試薬を調製する工程と、

前記反応用試薬を用いて二次抗体反応を行わせる工程と、
発色反応を行わせる工程と、
吸光度測定を行う工程と、を備えた免疫染色の評価方法。

【請求項2】

前記希釈液を調製する工程では、前記凝集物を除去した上清に、少なくともウシアルブミン、スキムミルク、ゼラチンのいずれかの前記タンパク質を加え、

前記反応用試薬を調製する工程では、前記反応用試薬に含まれるタンパク質の種類と濃度との調整を行う、請求項1に記載の免疫染色の評価方法。

【請求項3】

10

20

前記加熱処理は、100℃以上、120℃以下の温度で、10分間以上実施する請求項1または請求項2に記載の免疫染色の評価方法。

【請求項4】

前記発色反応を行わせる工程の前に、前記試料を載置した基板における前記試料の周囲へ、撥水剤を用いて撥水枠を形成する工程を備えた、請求項1から請求項3のいずれか1項に記載の免疫染色の評価方法。

【請求項5】

対向して配置された第1電極および第2電極を備え、前記第1電極と前記第2電極との間に電界を生じさせる電界攪拌機構により、

前記一次抗体反応を行わせる工程、前記二次抗体反応を行わせる工程のうち、少なくとも1つの工程において攪拌操作を実施する請求項1から請求項4のいずれか1項に記載の免疫染色の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、動物組織を用いた免疫染色の評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫染色は、癌などの病理診断の有効な手段として活用されている。このような病理診断は、手術中に行われる場合もあることから、免疫染色をより迅速かつ正確に行うための装置の開発が進められている。免疫染色では、組織中の抗原と抗体とを反応（抗原抗体反応）させた後、抗原抗体反応を発色基質の発色によって可視化して、抗原抗体反応の反応量の多少を発色強度の差として観察する。そのため、免疫染色に用いる装置の開発においては、発色強度を詳細に評価して微小な発色強度の変化を効果として積み重ね、装置開発に反映させる必要がある。

【0003】

従来、発色強度の評価方法として、動物組織を用いて免疫染色を行い、発色の強弱を目視などで観察する方法と、タンパク質などの検体を基板上に定着させ、ELISA（Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay）法によって発色強度を吸光度として数値化する方法と、の二つの方法が知られていた。

【0004】

例えば、特許文献1には、特定の化合物を用いた酵素免疫染色法などにおいて、目視または分光光度計などを用いて、染色色素に関する情報を読み取る評価方法が紹介されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開平5-2020号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、特許文献1に記載の免疫染色法では、動物組織の免疫染色に用いる装置の開発には適さないという課題があった。詳しくは、抗体としてヒトIgG（免疫グロブリンG）を用いた酵素免疫染色法が例示されている。この方法では、抗体を単体で用いることから、病理診断における免疫染色と工程が異なり、実際の人体組織に対して、抗原抗体反応量の評価結果に微小なずれが生じる懸念があった。なぜなら、使用する試薬の粘度や表面張力によって抗原抗体反応量が異なる場合があるためである。また、動物組織の免疫染色では、細胞膜の膜電位の影響を受ける可能性がある。

【0007】

また、特許文献1では、ヒト大腸癌のパラフィン切片を用いた免疫組織染色も例示され

10

20

30

40

50

ている。この方法では、人体組織の染色による色素像が適正に得られたか否かの判断は、目視によるものである。このような染色法を手術中に用いる場合は、迅速かつ適正な判断が求められる。したがって、動物組織の免疫染色に用いる装置の開発では、抗原抗体反応量と発色強度との関係を目視の判断に頼るのではなく数値化することが求められている。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明は、上述の課題の少なくとも一部を解決するためになされたものであり、以下の形態または適用例として実現することが可能である。

【0009】

〔適用例〕 本発明における免疫染色の評価方法は、動物組織を薄片化した試料に、賦活化処理を施す工程と、ブロッッキング処理を施す工程と、一次抗体反応を行わせる工程と、二次抗体反応用の試薬に加熱処理を施して、二次抗体反応用の試薬に含まれる発色反応に寄与するタンパク質の一部を凝集物として除去し、少なくともウシアルブミン、スキムミルク、ゼラチンのいずれかのタンパク質を加えて希釈液を調製する工程と、希釈液を用いて、二次抗体反応用の試薬を希釈して、反応用試薬を調製する工程と、反応用試薬を用いて二次抗体反応を行わせる工程と、発色反応を行わせる工程と、吸光度測定を行う工程と、を備える。

【0010】

本適用例によれば、動物組織を用いた免疫染色において、抗原抗体反応量の数値化が可能な、従来よりも動物組織の免疫染色に用いる装置の開発に適した評価方法を提供することができる。

【0011】

詳しくは、動物組織の免疫染色に用いる二次抗体反応用の試薬は、含まれる酵素標識抗体（発色に寄与するタンパク質）の含有量が過剰なものが多い。これは、病理診断においては、発色強度（抗原抗体反応量）をコントロールすることよりも、抗原抗体反応を確実に行わせ、動物組織を発色させることを優先するためである。酵素標識抗体が過剰に存在すると、一次抗体と結合しない遊離分が組織上に多く残存して非特異的な発色反応が起こり、発色強度が過度に増大しやすくなる。

【0012】

そこで、二次抗体反応用の試薬に加熱処理を施して、発色反応に寄与するタンパク質の一部を凝集物として除去する。このとき、発色に寄与するタンパク質の一部が除去されることから、粘度などの物性が二次抗体反応用の試薬から変化する可能性がある。そのため、少なくとも発色反応に寄与しにくいウシアルブミン、スキムミルク、ゼラチンなどのタンパク質を加えて希釈液とする。これにより、希釈液では、発色反応に寄与するタンパク質の含有量が低減されたまま、発色反応に寄与しにくいウシアルブミン、スキムミルク、ゼラチンなどのタンパク質を添加することから、含まれるタンパク質の含有量が増加して、希釈液の物性を二次抗体反応用の試薬に近付けることができる。さらに希釈液を用いて二次抗体反応用の試薬を希釈し、反応用試薬とする。希釈液と二次抗体反応用の試薬とは、比較的に近い物性であるため、二次抗体反応用の試薬を希釈液で希釈しても、二次抗体反応用の試薬と反応用試薬との物性差が抑えられる。すなわち、反応用試薬では、二次抗体反応用の試薬と比べて、物性の変化を抑えながら、発色反応に寄与するタンパク質の含有量が低減される。これにより、一次抗体と結合しない、発色反応に寄与するタンパク質の遊離分の残存が低減される。そのため、非特異的な発色反応の進行を抑制し、微小な抗原抗体反応量の差を顕在化させることができる。したがって、顕在化された微小な抗原抗体反応量の差を、吸光度として数値化することにより、免疫染色用の装置開発に反映させることができる。

【0013】

反応用試薬では、二次抗体反応用の試薬に対して、粘度や表面張力などの物性の差が低減される。そのため、動物組織（試料）への滴下や試料上での濡れ広がりなどの挙動を近付けることができる。また、他の試薬を用いて二次抗体反応用の試薬を希釈するのではな

10

20

30

40

50

いため、物性を二次抗体反応用の試薬に対して容易に近付けることができる。

【0014】

これらにより、従来よりも動物組織の免疫染色に用いる装置の開発に適した評価方法を提供することができる。また、動物組織を用いた免疫染色において、従来と比べて、微小な抗原抗体反応量の差を顕在化させることが可能であるため、装置開発のみならず、免疫染色における工程または条件の改良、試薬類の開発などにも適用することができる。

【0015】

上記適用例に記載の免疫染色の評価方法において、希釈液を調製する工程では、凝集物を除去した上清に、少なくとも発色反応に寄与しにくいウシアルブミン、スキムミルク、ゼラチンなどのタンパク質を加え、反応用試薬を調製する工程では、反応用試薬に含まれるタンパク質の種類と濃度との調整を行うことが好ましい。

10

【0016】

これによれば、遠心分離を用いて凝集物を容易に除去することができる。反応用試薬に含まれるタンパク質の種類と濃度とを調整することから、反応用試薬における物性を、二次抗体反応用の試薬に近付けることがさらに容易になる。

【0017】

上記適用例に記載の免疫染色の評価方法において、加熱処理は、100℃以上、120℃以下の温度で、10分間以上実施することが好ましい。

【0018】

これによれば、二次抗体反応用の試薬に含まれる、発色反応に寄与するタンパク質の一部を、熱変性によって凝集させ、容易に凝集物とすることができる。

20

【0019】

上記適用例に記載の免疫染色の評価方法は、発色反応を行わせる工程の前に、試料を載置した基板における試料の周囲へ、撥水剤を用いて撥水枠を形成する工程を備えることが好ましい。

【0020】

これによれば、撥水剤を用いて撥水枠を形成することで、貼付式の撥水枠に起因する非特異的な反応の進行を抑制し、吸光度測定におけるノイズ要因を低減することができる。詳しくは、貼付式の撥水枠を用いると、発色反応時に該撥水枠の周辺も発色することがある。そのため、撥水剤による撥水枠を形成することによって、非特異的な反応の進行を抑えて、撥水枠に起因する発色を低減することが可能となる。また、撥水剤を用いた撥水枠は、貼付式と比べて撥水枠の高さが低くなるため、撥水枠の内側に試薬や洗浄液などが溜まりにくく、試料の洗浄性を向上させることができる。

30

【0021】

上記適用例に記載の免疫染色の評価方法において、対向して配置された第1電極および第2電極を備え、第1電極と第2電極との間に電界を生じさせる電界攪拌機構により、一次抗体反応を行わせる工程、二次抗体反応を行わせる工程のうち、少なくとも1つの工程において攪拌操作を実施することが好ましい。

【0022】

これによれば、電界攪拌機構による攪拌操作（電界攪拌）によって、一次抗体反応、二次抗体反応における攪拌の効率が向上して、混合が促進される。そのため、一次抗体反応を行わせる工程、二次抗体反応を行わせる工程の少なくとも1つの工程において反応時間が短縮され、動物組織を用いた免疫染色の評価を迅速に行うことができる。

40

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】動物組織が固定された組織標本を示す斜視図。

【図2】実施形態に係る動物組織を用いた免疫染色の工程を示すフローチャート。

【図3】電界攪拌機構の電気的および機械的な構成を示す概略図。

【図4】電界攪拌機構の電極構造を示す斜視図。

50

【図 5】電界攪拌機構の電極構造を示す断面図。

【図 6 A】電界攪拌機構による攪拌原理を示す模式図。

【図 6 B】電界攪拌機構による攪拌原理を示す模式図。

【図 6 C】電界攪拌機構による攪拌原理を示す模式図。

【図 7】試薬中のタンパク質の濃度を示すグラフ。

【図 8】実施例に係る動物組織を用いた免疫染色の評価方法の工程を示す表。

【図 9】実施例 1 および比較例 1 に係る吸光度および S / N 比を示すグラフ。

【図 10】実施例 2 および実施例 3 に係る一次抗体反応時間と吸光度との関係を示すグラフ。

【図 11】実施例 4 に係る二次抗体反応時間と吸光度との関係を示すグラフ。

10

【図 12】実施例 5 および実施例 6 に係る吸光度および S / N 比を示すグラフ。

【図 13】動物組織を用いた免疫染色の従来の工程を示すフローチャート。

【図 14】E L I S A 法の工程を示すフローチャート。

【発明を実施するための形態】

【0024】

以下、本発明の実施形態について、図面を参照して説明する。以下に説明する実施の形態は、本発明の一例を説明するものである。本発明は、以下の実施の形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を変更しない範囲において実施される各種の変形例も、本発明に含まれる。なお、以下の各図においては、各層や各部材を認識可能な程度の大きさにするため、各層や各部材の尺度を実際とは異ならせしめている。

20

【0025】

＜従来の免疫染色の評価方法＞

まず、動物組織を用いた従来の免疫染色における、基本的な工程の一例について、図 1、図 13、図 14 を参照して説明する。図 1 は動物組織が固定された組織標本を示す斜視図であり、図 13 は、動物組織を用いた免疫染色の従来の工程を示すフローチャートであり、図 14 は、E L I S A 法の工程を示すフローチャートである。

【0026】

〔動物組織を用いる方法〕

図 1 に示したように、動物組織を用いた組織標本 T s は、基板 9 に固定される。基板 9 としては、J I S R 3703 : 1998 にて規格化された、幅 26 mm、長さ 76 mm、厚さ 1.1 mm の無色透明な顕微鏡用スライドガラスが用いられる。基板 9 には、固定された組織標本 T s に対して供給される試薬などの液体を、所定の範囲内で保持するために、例えば、シール状の撥水枠 4 が貼付されている。撥水枠 4 は、例えば、枠内の直径が 20 mm の円形である。撥水枠 4 は、基板 9 に撥水剤をリング状に塗布して形成してもよい。撥水枠 4 の形状は、円形であることに限定されず、四角形などの多角形や楕円形などであってもよい。

30

【0027】

撥水枠 4 は、基板 9 に対して 1 つ形成されることに限定されず、例えば 2 つ形成してもよい。一方の撥水枠 4 内にアクティブ組織標本を固定し、他方の撥水枠 4 内に比較用のネガティブ組織標本を固定してもよい。

40

【0028】

図 13 に示したように、動物組織を用いた免疫染色の従来の工程の一例は、脱パラフィン処理（工程 S 21）、賦活化処理（工程 S 22）、ブロッキング処理（工程 S 23）、一次抗体反応（工程 S 24）、二次抗体反応（工程 S 25）、発色反応（工程 S 26）、観察（工程 S 27）を備えている。

【0029】

まず、工程 S 21 の前処理として、動物組織から薄片状に切り出した組織標本 T s を、基板 9 に貼付して試料とする。具体的には、パラフィン包埋法を用いて、動物組織をパラフィンに包埋し、ミクロトームを用いて薄片状に切り出す処理を行う。切り出した動物組織の薄片（組織標本 T s）は、上述した基板 9 の撥水枠 4 の内側に貼り付けて固定し、以

50

降の操作を行う。組織標本T sの厚さは、例えば3 μ mから6 μ mである。上記の処理には公知の方法が採用可能であり、本明細書では説明を省略する。なお、パラフィン包埋法に代えて凍結切片法を用いて、動物組織を薄片状に切り出し、組織標本T sとしてもよい。そして、工程S 2 1へ進む。

【0030】

図13の工程S 2 1（脱パラフィン処理）では、組織内部の水分がパラフィンで置換されている組織標本T sから、パラフィンを取り除く。具体的には、まずキシレンなどのパラフィンが可溶な非水溶性の有機溶剤に組織標本T sを浸漬し、パラフィンを非水溶性の有機溶剤と置換して除去する。これにより、組織標本T sは、非水溶性の有機溶剤が組織内部まで浸透した状態となる。次に、無水エタノールなどの水溶性の有機溶剤に組織標本T sを浸漬し、非水溶性の有機溶剤を水溶性の有機溶剤と置換して除去する。次に、組織標本T sを、PBS-T（ブロッキング作用を有するノニオン性界面活性剤Tween 20を含むPBS（Phosphate Buffered Saline：リン酸緩衝生理食塩水））などの洗浄液を用いて洗浄して、水溶性の有機溶剤を除去する。そして、工程S 2 2へ進む。

【0031】

工程S 2 2（賦活化処理）では、組織標本T sの動物組織における抗原に賦活化処理を施して、抗原のエピトープを再露出させる。賦活化処理の方法としては、タンパク質分解酵素処理、加熱処理が挙げられる。タンパク質分解酵素処理では、緩衝液に、ペプシン、プロテナーゼK、またはトリプシンなどのタンパク質分解酵素を溶解した処理液を用いる。加熱処理では、組織標本T sを緩衝液と共に、例えば100℃前後の温度まで加熱する。加熱方法としては、電子レンジ、オートクレーブ、ウォーターバスなどが採用可能である。緩衝液は、賦活化処理の方法や、後工程の工程S 2 4で用いる一次抗体に応じて選択する。賦活化処理の後、PBS-Tなどの洗浄液を用いて洗浄を行う。そして、工程S 2 3へ進む。

【0032】

工程S 2 3（ブロッキング処理）では、発色におけるバックグラウンドや偽陽性信号を低減するために、ブロッキング処理を施す。ブロッキング処理の種別としては、組織標本T sに対する抗体の非特異的な結合を防ぐためのブロッキング、内因性ビオチンのブロッキング、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング、自家蛍光の抑制などが挙げられる。ブロッキング処理の方法および用いる薬剤は、上記の種別に応じて選択され、公知の方法および薬剤が採用可能である。ブロッキング処理を施した後、PBS-Tなどの洗浄液を用いて洗浄を行う。そして、工程S 2 4へ進む。

【0033】

工程S 2 4（一次抗体反応）では、一次抗体（抗原に特異的に結合する抗体）を含む一次抗体反応用の試薬を組織標本T sに接触させて、組織標本T sの動物組織中の抗原と一次抗体とを反応（結合）させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば150 μ Lの一次抗体反応用の試薬を、組織標本T sに対して滴下する。このとき、適当な希釈液を用いて一次抗体反応用の試薬を希釈して用いてもよい。一次抗体反応は、静置などによって進行させる方法が採用される。一次抗体反応用の試薬は、検出対象とする抗原、一次抗体を標識とするか否かなどに応じて、適宜選択される。一次抗体反応を行わせた後、PBS-Tなどの洗浄液を用いて洗浄を行う。そして、工程S 2 5へ進む。

【0034】

工程S 2 5（二次抗体反応）では、二次抗体を含む二次抗体反応用の試薬を組織標本T sに接触させて、一次抗体反応にて抗原と結合した一次抗体に対して、さらに二次抗体を結合させる。具体的には、例えばマイクロピペットなどを用いて、150 μ Lの二次抗体反応用の試薬を、組織標本T sに対して滴下する。二次抗体反応においても、一次抗体反応と同様に、静置などの方法によって反応を進行させる。二次抗体反応用の試薬は、一次抗体の種類などに応じて適宜選択される。なお、二次抗体反応を行わずに、直接、一次抗体を標識してもよい。二次抗体反応を行わせた後、PBS-Tなどの洗浄液を用いて洗浄を行う。そして、工程S 2 6へ進む。

【0035】

工程S26（発色反応）では、3，3'-ジアミノベンジジン（DAB）や3-アミノ-9-エチルカルバゾール（AEC）などの発色基質を含む発色試薬を組織標本Tsに接触させる。これにより、一次抗体と結合した二次抗体（一次抗体を標識する場合には、一次抗体）の作用によって、発色基質を酸化させて発色させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば150μLの発色試薬を、組織標本Tsに対して滴下する。これにより、組織標本Tsにおいて、抗原抗体反応が行われた部位を発色させることができる。発色反応の後、水などを用いて洗浄し、発色反応を停止させると共に、余分な発色基質を除去する。なお、発色基質とは異なる色調およびコントラストを付与させるように、さらに対比染色を施してもよい。そして、工程S27へ進む。

10

【0036】

工程S27（観察）では、光学顕微鏡などを用いて、組織標本Tsを観察する。病理診断においては、発色によって組織の形状を際立たせ、組織中の細胞配列の乱れなどを把握して、病変の有無や程度を診断する。このように、従来の動物組織を用いた免疫染色は、発色の強弱が明確であれば病理診断の目的に合致する。ところが、動物組織は同じ標本であっても観察者によって評価結果が異なる場合がある。したがって、動物組織の免疫染色に用いる装置の開発においては、装置の改良に反映させるために、抗原抗体反応量を詳細に数値化したいという要望があった。

【0037】

[ELISA法]

20

次に、ELISA法について説明する。図14に示したように、ELISA法の工程の一例は、固相化（工程S31）、ブロッキング処理（工程S32）、一次抗体反応（工程S33）、発色反応（工程S34）、反応停止（工程S35）、吸光度測定（工程S36）を備えている。

【0038】

工程S31（固相化）では、上述した撥水枠4（図1参照）を形成した基板9を用いて、撥水枠4の内側に、特定のタンパク質などの検体（抗原）を含む溶液を、例えば150μL滴下する。これにより、撥水枠4の内側に、薄膜状の検体の層が形成される。次いで、TBS-T（ノニオン性界面活性剤Tween20を含むTBS（Tris Buffered Saline：トリス緩衝生理食塩水））などの洗浄液を用いて洗浄する。そして、工程S32へ進む。

30

【0039】

工程S32（ブロッキング処理）では、染色におけるバックグラウンドや偽陽性信号を低減するために、ブロッキング処理を施す。ブロッキングの種別としては、検体に対する抗体の非特異的な結合を防ぐためのブロッキング、内因性ビオチンのブロッキング、内因性ペルオキシダーゼのブロッキング、自家蛍光の抑制などが挙げられる。ブロッキング処理の方法および用いる薬剤は、上記の種別に応じて選択され、公知の方法およびブロッキング剤が採用可能である。具体的には、例えば、検体に対する抗体の非特異的な結合を防ぐためには、ウシアルブミン、スキムミルク、またはゼラチンなどのブロッキング剤を含む溶液を検体に接触させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えばブロッキング剤を含む溶液150μLを、検体に対して滴下する。これにより、検体中に含まれる非特異的な結合を引き起こす因子や基板9の表面にブロッキング剤が結合して、ブロッキング処理が施される。この後、TBS-Tなどの洗浄液を用いて洗浄を行う。そして、工程S33へ進む。

40

【0040】

工程S33（一次抗体反応）では、一次抗体（検体に特異的に結合する抗体）を含む一次抗体反応用の試薬を、検体の層に接触させて、検体中の抗原と一次抗体とを反応（結合）させる。具体的には、例えばマイクロピペットなどを用いて、150μLの一次抗体反応用の試薬を、検体に対して滴下する。一次抗体反応は、静置などによって進行させる方法が採用される。抗原と一次抗体との反応を促進するために、電界攪拌を用いることが好

50

ましい。一次抗体反応用の試薬は、検出対象とする抗原、一次抗体を標識とするか否かなどに応じて、適宜選択される。一次抗体反応を行わせた後、TBS-Tなどの洗浄液を用いて洗浄を行う。そして、工程S34へ進む。

【0041】

工程S34（発色反応）では、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン（TMB）などの発色基質を含む発色試薬を検体に接触させて、一次抗体に標識された酵素の作用によって、発色基質を酸化させて発色させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば150 μ Lの発色試薬を、検体に対して滴下する。これにより、検体における抗原抗体反応量の多少（検体の抗原と結合した一次抗体の多少）に対応して、発色基質が発色する。すなわち、抗原の量（抗原抗体反応量）と発色強度とは相関関係を有している。なお、ELISA法においても、上述した動物組織を用いた従来の免疫染色のように、さらに二次抗体反応用の試薬を用いて、一次抗体と二次抗体とを結合させてから、酵素で標識された二次抗体で発色させてもよい。そして、工程S35へ進む。

10

【0042】

工程S35（反応停止）では、発色基質を発色させた後に、例えば希硫酸などの反応停止薬を検体に接触させて、発色反応を停止させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば0.2 M (2 mol/L)の硫酸水溶液150 μ Lを、検体に対して滴下する。そして、工程S36へ進む。

【0043】

工程S36（吸光度測定）では、マイクロプレートリーダーなどを用いて、検体の吸光度を測定する。吸光度を測定する光の波長は、用いた発色基質に応じて選択される。測定された吸光度から抗原の濃度を求めることが可能である。このように、ELISA法は、動物組織自体を試料として用いるのではなく、特定のタンパク質などの成分を検体とする。そのため、吸光度をもって数値化が可能であるが、病理診断における免疫染色と工程が異なっている。また、使用する試薬の粘度や表面張力によって抗原抗体反応量が異なる場合があることから、実際の人体組織に対して、抗原抗体反応量の評価結果に微小なずれが生じる懸念があった。

20

【0044】

＜実施形態に係る評価方法＞

次に、本発明の実施形態に係る、動物組織を用いた免疫染色の評価方法について、図2を参照して説明する。図2は、実施形態に係る動物組織を用いた免疫染色の工程を示すフローチャートである。なお、図2に示した工程フローは一例であって、これに限定されるものではない。

30

【0045】

実施形態に係る免疫染色の評価方法は、動物組織を薄片化した試料（組織標本Ts）に、賦活化処理を施す工程S2と、ブロッキング処理を施す工程S3と、一次抗体反応を行わせる工程S4と、二次抗体反応用の試薬に加熱処理を施して、二次抗体反応用の試薬に含まれる発色反応に寄与するタンパク質の一部を凝集物として遠心分離によって除去し、少なくとも発色反応に寄与しにくいタンパク質を加えて希釈液を調製する工程S5-1と、希釈液を用いて、二次抗体反応用の試薬を希釈して、反応用試薬を調製する工程S5-2と、反応用試薬を用いて二次抗体反応を行わせる工程S6と、発色反応を行わせる工程S7と、吸光度測定を行う工程S9と、を備える。

40

【0046】

まず、図2に示した工程S1（脱パラフィン処理）の前工程として、上述した動物組織を用いた従来の免疫染色（以降、単に「従来の免疫染色」ということもある。）の工程と同様に、動物組織をパラフィン包埋して薄片状に切り出す。薄片の厚さは、例えば3 μ mから6 μ mとし、基板9（図1参照）の貼付式（シール状）の撥水枠4内に貼り付けて固定し、組織標本Ts（パラフィン切片）とする。なお、パラフィン切片に代えて凍結切片を用いてもよい。凍結切片法を用いる場合は、次の工程S1は省略する。

【0047】

50

図2に示した工程S1から工程S3は、従来の免疫染色の工程S21（脱パラフィン処理）から工程S23（ブロッッキング処理）と同様にして行う。そして、工程S4へ進む。

【0048】

工程S4（一次抗体反応）では、一次抗体を含む一次抗体反応用の試薬を組織標本Tsに接触させて、動物組織中の抗原と一次抗体とを反応（結合）させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば150μLの一次抗体反応用の試薬を、組織標本Tsに対して滴下する。一次抗体反応用の試薬は、検出対象とする抗原、一次抗体を標識とするか否かなどに応じて、適宜選択される。一次抗体反応用の試薬は、市販の抗体希釈液にて、例えば体積比で50倍以上、150倍以下の範囲に希釈して用いる。そのため、一次抗体反応用の試薬に含まれる一次抗体の濃度が低減される。このとき、一次抗体反応では、静置などによって反応を進行させる方法、または後述する電界攪拌を用いて反応を進行させる方法が採用される。抗原と一次抗体との混合を促進させるために、電界攪拌を用いることが好ましい。一次抗体反応を行わせた後、PBS-Tなどの洗浄液を用いて洗浄を行う。そして、工程S5-1へ進む。

10

【0049】

工程S5-1（希釈液の調製）では、まず、二次抗体を含む試薬に加熱処理を施して、二次抗体反応用の試薬に含まれる発色反応に寄与するタンパク質（二次抗体）の一部を、熱変性によって凝集させて凝集物とする。二次抗体反応用の試薬は、一次抗体の種類などに応じて適宜選択される。加熱処理は、100℃以上、120℃以下の温度で、10分以上実施する。このような加熱処理を施すことによって、発色反応に寄与するタンパク質の一部を凝集物とし、減量することができる。加熱処理の方法としては、特に限定されないが、ホットスターラー（スターラーを備えたホットプレート）、ウォーターバス（湯煎）、ブロックヒーターなどが採用可能である。また、凝集物の生成を促進するために、攪拌しながら加熱処理を施すことが好ましい。次いで、生成した凝集物を、例えば、ろ過や遠心分離などの手段を用いて除去する。ろ過に用いるフィルターの目詰まりなどの観点から、遠心分離を用いることが好ましい。本実施形態では、遠心分離機を用いて凝集物を沈殿させて除去し、上清とする。

20

【0050】

次に、上清へ少なくとも発色反応に寄与しにくいタンパク質を加えて、凝集物として除去した発色反応に寄与するタンパク質の分を補填する。これにより、希釈液における粘度などの物性を、二次抗体反応用の試薬に近づけることができる。発色反応に寄与しにくいタンパク質としては、ウシアルブミン、スキムミルク、ゼラチンなどが挙げられる。発色反応に寄与しにくいタンパク質は、例えば、水などの媒体に、溶解または分散したものをを用いてもよい。上清に対する、発色反応に寄与しにくいタンパク質の添加量は、特に限定されないが、例えば、上清1mLに対して、10mg以上、20mg以下の範囲で添加する。このような添加量とすることによって、希釈液に含まれるタンパク質の種類と濃度とを調整し、反応用試薬における物性の調整を容易に行うことができる。また、このような希釈液を用いて、二次抗体反応用の試薬を次工程S5-2で希釈しても、希釈液の物性が二次抗体反応用の試薬に比較的に近いことから、発色強度の調整などの目的のために、物性を大きく変えずに希釈率を変更することができる。そして、工程S5-2へ進む。

30

40

【0051】

工程S5-2（反応用試薬の調製）では、希釈液を用いて、二次抗体反応用の試薬を希釈して反応用試薬を調製する。このとき、反応用試薬に含まれるタンパク質の種類と濃度との調整を行う。これにより、反応用試薬の物性が調整される。調整される反応用試薬の物性としては、粘度、表面張力、pHなどが挙げられる。これらの物性を、希釈液による二次抗体反応用の試薬の希釈率などにより、適宜調整する。希釈液による二次抗体反応用の試薬の希釈率は、特に限定されないが、例えば、二次抗体反応用の試薬を、希釈液によって、体積比で20倍以上、100倍以下の希釈率の範囲で希釈する。このような倍率で希釈することによって、反応用試薬に含まれるタンパク質の濃度と、反応用試薬の物性との調整を容易に行うことができる。以上により、次の工程S6において、一次抗体と結合

50

しない、発色反応に寄与するタンパク質の遊離分を低減すると共に、反応用試薬の物性を二次抗体反応用の試薬に近付けることができる。そして、工程 S 6 へ進む。

【0052】

なお、例えば洗浄液として用いる PBS-T などを用いて、二次抗体反応用の試薬を希釈し、発色反応に寄与するタンパク質の濃度を低減することは可能であるが、物性を二次抗体反応用の試薬に近付けることは難しく、物性の調整に時間を要する場合がある。

【0053】

工程 S 6（二次抗体反応）では、反応用試薬を組織標本 T s に接触させて、一次抗体反応にて抗原と結合した一次抗体に対して、さらに二次抗体を結合させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば 150 μ L の反応用試薬を、組織標本 T s に対して滴下する。二次抗体反応においても、一次抗体反応と同様に、静置または電界攪拌にて反応を進行させる。一次抗体と二次抗体との混合を促進させるために、電界攪拌を用いることが好ましい。二次抗体反応を行わせた後、PBS-T などの洗浄液を用いて洗浄を行う。

10

【0054】

ここで、工程 S 7（発色反応）の前に、基板 9 において、試料としての組織標本 T s を囲むように貼られたシール状の撥水枠 4 を剥がし取り、組織標本 T s の周囲へ、免疫組織化学染色用の撥水ペンなどの撥水剤を用いて、新たな撥水枠 4 を形成する工程を設ける。これにより、貼付式の撥水枠 4 に起因する非特異的な反応の進行を抑制し、工程 S 9（吸光度測定）におけるノイズ要因を低減することができる。詳しくは、貼付式の撥水枠 4 を用いると、発色反応時に撥水枠 4 の周辺も発色することがある。そのため、撥水剤を用いて撥水枠 4 を形成することによって、非特異的な反応の進行を抑えて、撥水枠 4 に起因する発色を低減することが可能となる。また、撥水剤を用いた撥水枠 4 は、貼付式と比べて撥水枠 4 と基板 9 との段差が小さくなるため、撥水枠 4 の内側に試薬や洗浄液などが溜まりにくく、組織標本 T s の洗浄性や乾燥性を向上させることができる。そして、工程 S 7 へ進む。

20

【0055】

工程 S 7（発色反応）では、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン (TMB) などの、主に ELISA 法に用いられる発色基質を含む発色試薬を検体に接触させる。これにより、二次抗体の作用によって発色反応が進行し、発色基質を酸化させて発色させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば 150 μ L の発色試薬を、組織標本 T s に対して滴下する。発色反応により、組織標本 T s における抗原抗体反応量の多少に対応して、発色基質が発色する。すなわち、抗原の量（抗原抗体反応量）と発色強度とは相関関係を有している。

30

【0056】

なお、本実施形態では、試料として動物組織を用いているが、発色基質としては、ELISA 法用の発色基質を用いることが好ましい。上述したように、TMB は ELISA 法に用いる発色基質である。そのため、従来の動物組織を用いた免疫染色とは異なり、撥水枠 4 内側の略全面（撥水枠 4 に滴下した発色試薬の略全面）が発色する。そして、工程 S 8 へ進む。

40

【0057】

工程 S 8（反応停止）では、発色基質を発色させた後に、例えば希硫酸などの反応停止薬を組織標本 T s に接触させて、発色反応を停止させる。具体的には、マイクロピペットなどを用いて、例えば 0.2 mol/L (0.2 M) の硫酸水溶液 150 μ L を、組織標本 T s に対して滴下する。そして、工程 S 9 へ進む。

【0058】

工程 S 9（吸光度測定）では、撥水枠 4 内の発色した液体（発色した発色試薬）を 96 ウェルプレートなどに採取し、マイクロプレートリーダーなどを用いて、撥水枠 4 内の吸光度を測定する。吸光度を測定する光の波長は、用いた発色基質に応じて選択される。例えば、発色基質として TMB を用いると、発色により青色を呈し、希硫酸などで反応を停

50

止させると黄色を呈する。そのため、吸光度測定では、450nmを測定波長とする。吸光度をもって、抗体の量を数値化することができる。また、あらかじめ検出対象とする抗原（特定のタンパク質など）を用いて、濃度に対する吸光度の検量線を作成しておき、組織標本Tsの吸光度と検量線とから、組織標本Ts中の抗原の濃度を定量し、数値化してもよい。

【0059】

ここで、上述したように、反応用試薬はタンパク質の種類と量とが調整されている。そのため、発色反応は急激に進行しにくく、かつ飽和しにくくなっている。これにより、二次抗体反応の反応時間を調整すれば、発色強度の大きさを調整することができる。また、上述したように、一次抗体反応用の試薬は、従来よりも希釈率を大きくしている。そのため、二次抗体反応と同様にして、一次抗体反応の反応時間を調整しても、発色強度の大きさを調整することができる。以上により、上述した工程のみならず、動物組織を用いた免疫染色における様々な条件などを変更して、発色強度の大きさを変動させることが可能になる。そのような条件変更による発色強度の変化の知見をもって、動物組織の免疫染色に用いる装置の開発や改良に反映させることができる。

10

【0060】

<電界攪拌機構>

本実施形態に係る電界攪拌機構の概略構成について、図3を参照して説明する。図3は、電界攪拌機構の電気的および機械的な構成を示す概略図である。

【0061】

図3に示したように、本実施形態の電界攪拌機構100は、ステージとして機能する第1電極としての下側電極10、第2電極としての上側電極20、昇降機構120、移動機構130、電界発生部140、制御部150、操作部160、電源部（図示せず）を備えている。電源部は、例えば交流電源装置であって、昇降機構120、移動機構130、電界発生部140を駆動するための電力を外部交流電源から供給する。

20

【0062】

電界攪拌機構100においては、下側電極10と上側電極20とを上下方向に対向して配置し、下側電極10と上側電極20との間に電界を生じさせることが可能である。これにより、上述した本実施形態の免疫染色の工程（評価方法）では、対向して配置された下側電極10と上側電極20との間に電界を生じさせ、一次抗体反応を行わせる工程S4、二次抗体反応を行わせる工程S6のうち、少なくとも1つの工程において電界攪拌による攪拌操作を実施する。

30

【0063】

操作部160は、制御部150、と電気的に接続され、例えば、液晶表示パネルなどの表示部と、表示部に重畳されたタッチパネル方式の入力部とを含んでいる。表示部には、入力部としての各種操作ボタンが表示され、それらを押すことにより選択可能である。これによって、操作部160は、制御部150を介して、電界攪拌機構100の各部を駆動制御し、上記各種操作ボタンに対応する各種操作を行わせる。

【0064】

制御部150は、例えばCPU（Central Processing Unit）およびメモリーを有している。制御部150は、昇降機構120、移動機構130、電界発生部140と電気的に接続され、操作部160にて選択された各種操作に応じて、それらに電気信号を伝達して各種操作を実行させる。

40

【0065】

昇降機構120は、下側電極10と機械的に接続され、制御部150と電気的に接続されている。昇降機構120は、例えば、電気モーター駆動によるステージ移動装置であって、制御部150の電気信号により、下側電極10を上下方向に移動させることが可能である。これにより、下側電極10と上側電極20との間の、上下方向の距離（電極間距離）を調節することが可能である。

【0066】

50

移動機構 130 は、上側電極 20 と機械的に接続され、制御部 150 と電氣的に接続されている。移動機構 130 は、例えば、電気モーター駆動による電極移動機構であって、制御部 150 の電気信号により、上側電極 20 を上下方向と交差する方向、例えば前後方向へ移動させることが可能である。これにより、下側電極 10 に対する上側電極 20 の位置を変えて、下側電極 10 への基板 9 の着脱を容易にすることが可能である。

【0067】

ここで、上述した前後方向は、基板 9 を下側電極 10 に載置した場合の、基板 9 の長手方向と略一致する。また、上側電極 20 と下側電極 10 とが対向する上下方向、および該前後方向と直交する方向を、左右方向とする。

【0068】

下側電極 10 および上側電極 20 は、電界発生部 140 と接続されている。電界発生部 140 は、例えば、矩形波発生回路である。電界発生部 140 は、例えば、0 V から 4.5 kV の電位差の範囲で、かつ 1 Hz から 100 Hz の周波数範囲で、交流電圧としての矩形波を発生させることが可能である。具体的には、上側電極 20 に対して、下側電極 10 の極性を正極性（+）とした矩形波や、下側電極 10 の極性を負極性（-）とした矩形波を発生させることができる。例えば、下側電極 10 と上側電極 20 との間の電位差を 4 kV とする場合には、下側電極 10 の電位を -1 kV とし、上側電極 20 の電位を +3 kV とし、電位差 4 kV を実現してもよい。これにより、電界発生部 140 は、制御部 150 に制御されて、下側電極 10 と上側電極 20 とに電位を与えて交流電界を発生させる。

【0069】

上側電極 20 に対向する下側電極 10 の表面には、液滴 S が形成された基板 9 が載置される。液滴 S は、基板 9 の撥水枠 4（図 1 参照）の内側に滴下された、一次抗体反应用の試薬または反应用試薬である。液滴 S は、撥水枠 4 の撥水作用によって基板 9 の表面を濡れ広がらずに、撥水枠 4 の内側で凸状に盛り上がった状態で保持される。液滴 S と基板 9 の表面との間には、組織標本 T s（図示せず）が固定されている。

【0070】

次に、電界攪拌機構 100 における、上側電極 20 および下側電極 10 を含む電極構造について、図 4 および図 5 を参照して説明する。図 4 は、電界攪拌機構の電極構造を示す斜視図である。図 5 は、電界攪拌機構の電極構造を示す断面図である。

【0071】

図 4 に示したように、上側電極 20 と対向する下側電極 10 の表面には、載置部 13 が設けられている。載置部 13 によって基板 9 を前後方向に沿って配置して、基板 9 の位置決めが可能である。具体的には、載置部 13 は、前後方向に延在する一対のガイド部 11 と、前後方向の後端側に設けられ、左右方向に延在する度当たり部 12 とを有している。基板 9 の長手方向の一方の端が度当たり部 12 に当接するように、一対のガイド部 11 の間に基板 9 を挿入すれば、基板 9 の長手方向の他方の端が前方に張り出した状態で、基板 9 が下側電極 10 上に配置される。ピンセットなどの把持ツールを用いて、基板 9 の前方に張り出した部分を把持すれば、下側電極 10 に対して基板 9 の着脱を容易に行うことができる。

【0072】

上側電極 20 における下側電極 10 と対向する表面には、前後方向に延在する溝 21 が設けられている。溝 21 の断面構造は四角形であり、上下方向に切り立った側面と平坦な底面とを有している。

【0073】

図 5 に示したように、下側電極 10 に液滴 S が形成された基板 9 を載置して、下側電極 10 と上側電極 20 とを対向して配置したときに、溝 21 は、液滴 S の直上に位置するように設けられている。上述したように、基板 9 としては、JIS R 3703：1998 にて規格化された顕微鏡用スライドガラス（幅 26 mm、長さ 76 mm、厚さ 1.1 mm の無色透明なガラス）を用いる。基板 9 に形成される撥水枠 4 の直径は、例えば 20 mm

mである。溝21の左右方向の幅d3は例えば8mmであり、溝21の深さは例えば4mmである。

【0074】

上側電極20における下側電極10と対向する表面のうち、溝21内部の表面を底面20bとし、底面20b以外の表面を表面20aとする。基板9が載置される下側電極10の表面10aと、表面20aとの間の、上下方向における電極間距離d1は、表面10aと底面20bとの間の、上下方向における電極間距離d2よりも小さくなる。なお、ガイド部11の表面10aにおける高さは、基板9の厚さよりも小さくなっている。

【0075】

次に、電界攪拌機構100を用いた電界攪拌の攪拌原理について、図6Aから図6Cを参照して説明する。図6A、図6B、図6Cは、電界攪拌機構による攪拌原理を示す模式図である。なお、図6Aから図6Cでは、上述した上側電極20の溝21および一对のガイド部11は、図示を省略している。

10

【0076】

図6Aに示したように、撥水枠4の撥水作用により、基板9上で液滴Sは凸状に盛り上がって保持される。盛り上がった液滴Sの基板9上における高さhは、主に、液滴Sにおける容量、粘度、表面張力、および液滴Sが接する基板9の表面の界面張力により決まる。特に、液滴Sの粘度は、温度に依存するため、電界攪拌機構100を用いる場合の温度管理は重要になる。液滴S（一次抗体反応用の試薬または反応用試薬）は、基板9への滴下量の調整のし易さや、攪拌の容易さなどの理由から、例えば5cps以下とすることが好ましい。また、一般に液体の粘度は温度に依存するため、電界攪拌機構100には、液滴Sを加温することによって液滴Sの粘度を低減する機構を設けてもよい。液滴Sを加温して、抗原抗体反応を促進させてもよい。

20

【0077】

基板9の1つの撥水枠4に形成される液滴Sの容量は、動物組織の大きさや試薬の種類および濃度によって適宜選択される。具体的には、例えば50μL以上、600μL以下である。

【0078】

次に、電界発生部140によって、上側電極20と下側電極10との間に交流電界が発生すると、図6Bに示したように、交流電界によって液滴Sの頂部が引き上げられる方向にクーロン力が働き、液滴Sは変形して高さhがΔh分大きくなる。また、交流電界によって、液滴Sの頂部が引き上げられる方向のクーロン力が働かなくなる（液滴Sに重力が作用する）と、あるいは液滴Sの頂部が引き下げられる方向のクーロン力が働くと、図6Cに示したように、液滴Sの頂部が陥没した状態に変形して、液滴Sの高さhは小さくなる。

30

【0079】

電界攪拌とは、このような変形（振動）を連続的に発生させて、少量の液体を非接触で攪拌する方法である。電界攪拌を用いて液滴Sを攪拌することにより、基板9に固定された組織標本Tsの抗原または抗体と、液滴Sとの接触の機会を増大させ、静置を用いた場合と比べて攪拌効率を高めることができる。すなわち、静置による発色強度と同程度の発色強度を得るには、反応時間を短縮することができる。

40

【0080】

以上に述べたように、上記実施形態に係る動物組織を用いた免疫染色の評価方法によれば、以下の効果を得ることができる。

【0081】

二次抗体反応用の試薬に加熱処理を施して、発色反応に寄与するタンパク質の一部を凝集物として除去し、上清とする。上清は、発色に寄与するタンパク質の一部が除去されていることから、粘度などの物性が二次抗体反応用の試薬から変化している場合がある。そのため、上清に、発色反応に寄与しにくいタンパク質を加えて希釈液とする。これにより、希釈液では、発色反応に寄与するタンパク質の含有量が低減されたまま、発色反応に寄

50

与しにくいタンパク質を添加することによって、希釈液に含まれるタンパク質の含有量を増加させ、物性を二次抗体反応用の試薬に近付けることができる。さらに希釈液を用いて二次抗体反応用の試薬を希釈し、反応用試薬とする。希釈液と二次抗体反応用の試薬とは、比較的に近い物性であるため、二次抗体反応用の試薬を希釈液で希釈しても、二次抗体反応用の試薬と反応用試薬との物性差が抑えられる。すなわち、反応用試薬では、二次抗体反応用の試薬と比べて、物性の変化を抑えながら、発色反応に寄与するタンパク質の含有量が低減される。これにより、一次抗体と結合しない、発色反応に寄与するタンパク質の遊離分の残存が低減される。そのため、非特異的な発色反応の進行を抑制し、微小な抗原抗体反応量の差を顕在化させることができる。したがって、顕在化された微小な抗原抗体反応量の差を、吸光度として数値化することができる。抗原抗体反応量を数値化することにより、発色強度を目視だけでなく客観的に判断が可能となつて、免疫染色用の装置開発に反映させることができる。

10

【0082】

反応用試薬では、二次抗体反応用の試薬に対して、粘度や表面張力などの物性の差が低減される。そのため、組織標本T sへの滴下や組織標本T s上での濡れ広がりなどの挙動を近付けることができる。また、他の試薬を用いて二次抗体反応用の試薬を希釈するのではないため、物性を二次抗体反応用の試薬に対して容易に近付けることができる。

【0083】

工程S5-1（希釈液の試薬の調製）において、遠心分離を用いて凝集物を容易に除去することができる。反応用試薬に含まれるタンパク質の種類と濃度とを調整することから、反応用試薬の物性を二次抗体反応用の試薬に近付けることがさらに容易になる。

20

【0084】

加熱処理を、100℃以上、120℃以下の温度で、10分間以上実施することから、二次抗体反応用の試薬に含まれる、発色反応に寄与するタンパク質の一部を、熱変性によって凝集させ、容易に凝集物とすることができる。

【0085】

工程S7（発色反応）の前に撥水剤を用いて撥水枠4を形成することで、貼付式の撥水枠4に起因する非特異的な反応の進行を抑制し、吸光度測定におけるノイズ要因を低減することができる。また、撥水剤を用いた撥水枠4は、貼付式と比べて撥水枠4の高さが低くなるため、撥水枠4の内側に試薬や洗浄液などが溜まりにくく、試料の洗浄性や乾燥性を向上させることができる。

30

【0086】

電界攪拌機構100による攪拌操作（電界攪拌）によって、液滴Sを効率的に攪拌することができる。そのため、電界攪拌を工程S4（一次抗体反応）、工程S6（二次抗体反応）の少なくとも1つの工程において用いれば、反応時間が短縮され、免疫染色の評価を迅速に行うことができる。

【0087】

以上により、従来よりも動物組織の免疫染色に用いる装置の開発に適した評価方法を提供することができる。また、動物組織を用いた免疫染色において、従来と比べて、抗原抗体反応量の違いを数値化することが可能であるため、装置開発のみならず、免疫染色における工程または条件の改良、試薬類の開発などにも適用することができる。

40

【0088】

次に、上記実施形態の動物組織を用いた免疫染色の評価方法について、実施例と比較例とを示し、上記実施形態の効果をより具体的に説明する。

【0089】

<タンパク質濃度>

二次抗体反応用の試薬、上清、および希釈液におけるタンパク質の濃度を調査した。二次抗体反応用の試薬としては、Dako（登録商標）EnVision（登録商標）+Dual Link System-HRP（商品名、Agilent社）（以降、単に「EnVision試薬」と略記する。）を用いた。まず、工程S5-1として、EnV

50

i s i o n 試薬を耐熱ガラス製の試験管に入れ、時折振とうさせながら 115℃で 10 分間の加熱処理を施した。これにより、E n V i s i o n 試薬に含まれている発色反応に寄与するタンパク質を熱変性させ、凝集物とした。次いで、室温（約 20℃）程度まで放冷してから遠沈管に移し、小型超遠心機 C S 1 5 0 N X（日立工機社）を用いて、回転速度 1 5 0 0 0 r p m（revolution per minute）で 10 分間の遠心分離を行った。これにより、凝集物を除去した上清 1 a を得た。

【0090】

次に、工程 S 5 - 2 として、ウシアルブミンのアルブミンウシ血清由来 A 7 9 0 6（製品名、S i g m a - A l d r i c h 社）を添加した。添加量は、ウシアルブミンの質量で、上清 1 a の 1 m L 当たり 1 3 m g とした。次いで、攪拌、混合して希釈液 2 a とした。

【0091】

次に、E n V i s i o n 試薬、上清 1 a、および希釈液 2 a について、L o w r y 法を用いて、それぞれが含有するタンパク質の濃度を測定した。その結果を図 7 に示した。図 7 は、試薬中のタンパク質の濃度を示すグラフである。

【0092】

図 7 に示したように、E n V i s i o n 試薬のタンパク質の濃度は、1 5 . 6 m g / m L であった。これに対して、上清 1 a では、工程 S 5 - 1 においてタンパク質の一部を熱変性させて除去したことにより、タンパク質の濃度が 2 . 0 m g / m L まで低減されていた。希釈液 2 a では、工程 S 5 - 1 において上清 1 a にウシアルブミンを添加したことにより、タンパク質の濃度が 1 1 . 1 m g / m L に増加した。これにより、希釈液 2 a を用いて E n V i s i o n 試薬を希釈すれば、P B S - T などの洗浄液を用いた場合と比べて、タンパク質の濃度を大きく変えずに希釈することができる。すなわち、反応用試薬の粘度などの物性を、E n V i s i o n 試薬に近付けることができる。

【0093】

<吸光度および S / N 比>

【実施例 1】

実施例 1 の動物組織を用いた免疫染色の評価方法について、図 8 を参照して説明する。図 8 は、実施例に係る動物組織を用いた免疫染色の評価方法の工程を示す表である。

【0094】

動物組織として、ブタ肝臓組織を用いた。動物組織の採取から、パラフィン包埋法を用いて薄片状に切り出し、基板 9（J I S R 3 7 0 3 : 1 9 9 8 に準拠した顕微鏡用スライドガラス）に貼り付けて固定するまでの工程については、公知の方法が採用可能であり、説明は省略する。動物組織は、ミクロトームにて厚さ 4 μ m の薄片状に切り出して、基板 9 に貼り付けた。以降、試料（組織標本 T s）とは基板 9 に貼付した状態の動物組織をいう。なお、以下に説明する各工程は、特に断わりがない限り、室温（約 20℃）環境下で行った。

【0095】

図 8 に示したように、工程 S 1 では、試料に脱パラフィン処理を施した。具体的には、キシレンを満たした容器を 3 槽用意し、試料を順次、該容器のキシレンに浸漬した。浸漬時間は、1 槽につき 3 分間とした。次に、無水エタノールを満たした容器を 4 槽用意し、試料を順次、該容器の無水エタノールに浸漬した。浸漬時間は、1 槽につき 1 分間とした。その後、洗浄として、P B S - T を満たした容器を 3 槽用意し、試料を順次、該容器の P B S - T に浸漬した。浸漬時間は、1 槽につき 10 秒間とした。そして、工程 S 2 へ進む。

【0096】

工程 S 2 では、試料に賦活化処理を施した。具体的には、市販の賦活化処理液 E p i t o p e R e t r i e v a l S o l u t i o n p H 9（商品名、L a i c a 社）を用いた。試料を浸漬した該賦活化処理液を、湯煎にて 9 8℃で 4 5 分間加熱した。次いで、室温（約 20℃）で 20 分間自然冷却（放冷）した。その後、洗浄として、P B S - T を満たした容器を 3 槽用意し、試料を順次、該容器の P B S - T に浸漬した。浸漬時間は、

1 槽につき 1 0 秒間とした。次に、試料を囲むように貼付式の撥水枠 4（直径 2 0 mm）を基板 9 に貼り付けた。そして、工程 S 3 へ進む。

【0 0 9 7】

工程 S 3 では、ブロッキング処理を施した。具体的には、3 質量%濃度の過酸化水素水へ試料を 5 分間浸漬した。その後、洗浄として、P B S - T を満たした容器を 3 槽用意し、試料を順次、該容器の P B S - T に浸漬した。浸漬時間は、1 槽につき 1 0 秒間とした。そして、工程 S 4 へ進む。

【0 0 9 8】

工程 S 4 では、一次抗体反応用の試薬を用いて、一次抗体反応を行わせた。具体的には、一次抗体反応用の試薬として、D a k o（登録商標）A n t i - H u m a n H e p a t o c y t e C l o n e O C H 1 E 5（商品名、A g i l e n t 社）を用い、希釈液 D a k o（登録商標）R E A L A n t i b o d y D i l u e n t（商品名、A g i l e n t 社）にて体積比で 5 0 倍に希釈して希釈試薬を調製した。次に、マイクロピペットを用いて、該希釈試薬を試料に 1 5 0 μ L 滴下した。試料が該希釈試薬の液滴に包まれた状態で静置して、一次抗体反応を行わせた。静置時間は 1 0 分間とした。この静置時間が一次抗体反応時間である。その後、洗浄として、P B S - T を満たした容器を 3 槽用意し、試料を順次、該容器の P B S - T に浸漬した。浸漬時間は、1 槽につき 1 0 秒間とした。そして、工程 S 5 - 1 へ進む。

【0 0 9 9】

ここで、ブランク試料は、工程 S 4 において、試料に滴下した希釈試薬に代えて、希釈液 D a k o（登録商標）R E A L A n t i b o d y D i l u e n t（商品名、A g i l e n t 社）を試料に 1 5 0 μ L 滴下した。この他は、以降の工程も同様に行ってブランク試料とした。すなわち、上記の希釈液には一次抗体が含まれないため、ブランク試料では、一次抗体反応が起こらない。

【0 1 0 0】

工程 S 5 - 1 では、上清 1 a を調製した。上清 1 a は、上述したタンパク質濃度の調査と同様にして調製した。

【0 1 0 1】

次に、上清 1 a とウシアルブミンとを用いて希釈液 2 a を調製した。希釈液 2 a は、上述したタンパク質濃度の調査と同様にして調製した。そして、工程 S 5 - 2 へ進む。

【0 1 0 2】

工程 S 5 - 2 では、反応用試薬 3 a を調製した。具体的には、希釈液 2 a を希釈液として用い、E n V i s i o n 試薬を体積比で 2 5 倍に希釈し、反応用試薬 3 a とした。そして、工程 S 6 へ進む。

【0 1 0 3】

工程 S 6 では、反応用試薬 3 a を用いて、二次抗体反応を行わせた。具体的には、マイクロピペットを用いて、反応用試薬 3 a を試料に 1 5 0 μ L 滴下した。試料が反応用試薬 3 a の液滴に包まれた状態で 1 0 分間静置して、二次抗体反応を行わせた。この静置時間が二次抗体反応時間である。その後、洗浄として、P B S - T を満たした容器を 3 槽用意し、試料を順次、該容器の P B S - T に浸漬した。浸漬時間は、1 槽につき 1 0 秒間とした。次に、基板 9 から貼付式の撥水枠 4 を剥がし取り、市販の撥水ペンとしてスーパー・パップペン リキッドブロッカー（商品名、大道産業社）を用いて、試料およびブランク試料のそれぞれの周囲に直径 2 0 mm の撥水枠 4 を形成した。そして、工程 S 7 へ進む。

【0 1 0 4】

工程 S 7 では、発色試薬を用いて発色反応を行わせた。具体的には、発色基質の T M B を含む市販の発色試薬 T M B O n e C o m p o n e n t H R P（商品名、ベチルラボラトリーズ社）を用い、マイクロピペットにて該発色試薬を試料に 1 5 0 μ L 滴下した。試料が発色試薬の液滴に包まれた状態で 5 分間静置して、発色反応を行わせた。発色反応の進行により、試料のみならず、撥水枠 4 内側の略全面に T M B による発色が発現した。そして、工程 S 8 へ進む。

【0105】

工程S8では、発色反応を停止させた。具体的には、マイクロピペットを用いて、0.2 mol/Lの硫酸水溶液を試料に150 μ L滴下した。試料が該硫酸水溶液の液滴に包まれた状態で15分間静置して、発色反応を停止させた。そして、工程S9へ進む。

【0106】

工程S9では、マイクロプレートリーダーを用いて、試料の吸光度を測定した。具体的には、撥水枠4の内側の液体（発色した発色試薬）を96ウェルプレートに採取して、マイクロプレートリーダーとして、Multiskan（登録商標）GO吸光マイクロプレートリーダー51119250（商品名、サーモフィッシャーサイエンティフィックラボプロダクツ社）を用いて、採取した液体における波長450 nmの光の吸光度を測定した。また、ブランク試料についても同様にして吸光度を測定し、試料の吸光度をブランク試料の吸光度で除して、実施例1の吸光度のS/N比（Signal-to-Noise ratio）を求めた。実施例1の試料の吸光度およびS/N比を図9に示した。

10

【0107】

〔比較例1〕

比較例1では、実施例1の動物組織を用いた免疫染色の評価方法において、工程S5-1から工程S5-3を行わず、工程S6にて反应用試薬3aを用いずに、EnVision試薬（二次抗体反应用の試薬）を原液のまま用いた他は、実施例1と同様に行った。得られた比較例1の試料の吸光度およびS/N比を図9に示した。

【0108】

実施例1および比較例1の試料の吸光度およびS/N比について、図9を参照して説明する。図9は、実施例1および比較例1に係る吸光度およびS/N比を示すグラフである。図9において、横軸は実施例1および比較例1の水準を表し、左の縦軸は試料の吸光度（棒グラフ）を表し、右の縦軸は吸光度のS/N比（点グラフ）を表している。

20

【0109】

図9に示したように、実施例1では比較例1と比べて、試料の吸光度が約1/3に減少すると共に、ブランク試料の吸光度も減少してS/N比が大きくなった。したがって、二次抗体反応に反应用試薬3aを用いることにより、非特異的な発色反応の進行が抑制されて、ノイズが低減されることが示された。

【0110】

<一次抗体反应用の試薬の希釈率>

〔実施例2および実施例3〕

次に、工程S4における一次抗体反应用の試薬の希釈率を変更し、一次抗体反応時間を5分間から60分間まで振った場合の吸光度を調査した。

【0111】

まず、実施例2として、実施例1の評価方法において、工程S4の一次抗体反応時間を、5、10、20、30、40、50、60分間と振った他は実施例1と同様に行って、実施例2のそれぞれの試料の吸光度を測定した。その結果を図10に示した。

【0112】

次に、実施例3では、実施例1の工程S4における一次抗体反应用の試薬（Dako（登録商標）Anti-Human Hepatocyte Clone OCH1E5（商品名、Agilent社））に対する、希釈液（Dako（登録商標）REAL Antibody Diluent（商品名、Agilent社））の添加量（希釈率）を変更した。具体的には、一次抗体反应用の試薬を希釈液にて体積比で100倍に希釈して希釈試薬を調製し、一次抗体反応に用いた。この他は実施例2と同様にして、一次抗体反応時間を振り、実施例3のそれぞれの試料の吸光度を測定した。その結果を図10に示した。

40

【0113】

実施例2および実施例3の試料の吸光度について、図10を参照して説明する。図10は、実施例2および実施例3に係る一次抗体反応時間と吸光度との関係を示すグラフであ

50

る。図10において、横軸は一次抗体反応時間を表し、縦軸は試料の吸光度を表している。

【0114】

図10に示したように、実施例2では、一次抗体反応時間を5分間から60分間の間で振っても、吸光度の変化が小さいことが分かった。これは、一次抗体反応に用いた希釈試薬に含まれる一次抗体の濃度が高く、5分間の一次抗体反応で反応の進行が略飽和するためである。実施例3では、実施例2と比べて、一次抗体反応時間によって吸光度が大きく変化することが分かった。これは、実施例3では、実施例2と比べて、希釈試薬中の一次抗体が少量であるため、一次抗体反応の進行が60分間では飽和しないことを示している。

10

【0115】

＜二次抗体反应用の試薬の希釈率＞

[実施例4]

次に、工程S5-2におけるEnVision試薬の希釈率を変更し、二次抗体反応時間を5分間から60分間まで振った場合の吸光度を調査した。具体的には、実施例1の希釈液2aを希釈液として用い、EnVision試薬を体積比で50倍に希釈し、反应用試薬3bとした。実施例4では、一次抗体反応に実施例3と同一の希釈試薬（体積比で100倍に希釈）を用い、二次抗体反応に反应用試薬3bを用い、工程S6の二次抗体反応時間を5、10、20、30、40、50、60分間と振った。これ以外の工程は、実施例1と同様にして行い、実施例4のそれぞれの試料の吸光度を測定した。その結果を図11に示した。

20

【0116】

実施例4の試料の吸光度について、図11を参照して説明する。図11は、実施例4に係る二次抗体反応時間と吸光度との関係を示すグラフである。図11において、横軸は二次抗体反応時間を表し、縦軸は試料の吸光度を表している。

【0117】

図11に示したように、実施例4では、実施例3と比べて吸光度の変化がより急峻になり、かつ吸光度の数値も大きくなった。これは、反应用試薬3bにおける二次抗体の濃度がより適切になったため、反応条件（二次抗体反応時間）に対して、より鋭敏に吸光度の変化を捉えることができたことを示している。

30

【0118】

＜二次抗体反应用の試薬の希釈率＞

[実施例5および実施例6]

次に、一次抗体反応および二次抗体反応における電界攪拌機構の適用による効果について調査した。一次抗体反応および二次抗体反応（抗原抗体反応）において、従来の静置によって該反応を行わせた実施例5と、静置に代えて電界攪拌機構による電界攪拌を施して該反応を行わせた実施例6とについて、試料の吸光度およびS/N比を求めて双方を比較した。

【0119】

実施例5では、実施例3と同様な一次反应用の希釈液（希釈率が体積比で100倍）を一次抗体反応に用い、実施例4と同様な反应用試薬3bを二次抗体反応に用いた他は、実施例1の評価方法と同様にして試料の吸光度およびS/N比を求めて、その結果を図12に示した。なお、実施例5では、実施例1と同様に、一次抗体反応および二次抗体反応は、共に静置にて10分間とした。

40

【0120】

実施例6では、一次抗体反応および二次抗体反応共に、静置に代えて電界攪拌を施した他は、実施例5と同様にして試料の吸光度およびS/N比を求めて、その結果を図12に示した。具体的には、電界攪拌染色装置（電界攪拌機構）として、ヒスト・テック（登録商標） R-IHC Type A2（商品名、サクラファインテックジャパン社）を用いた。電界攪拌条件は、一次抗体反応では、電圧を4.0kV、周波数を5Hz、電極間

50

距離 d_1 を 4.1 mm とし、二次抗体反応では、電圧を 4.0 kV、周波数を 4 Hz、電極間距離 d_1 を 4.1 mm とし、一次抗体反応時間および二次抗体反応時間共に 10 分間とした。

【0121】

実施例 5 および実施例 6 の試料の吸光度および S/N 比について、図 12 を参照して説明する。図 12 は、実施例 5 および実施例 6 に係る吸光度および S/N 比を示すグラフである。図 12 において、横軸は実施例 5 および実施例 6 の水準を表し、左の縦軸は試料の吸光度（棒グラフ）を表し、右の縦軸は吸光度の S/N 比（点グラフ）を表している。

【0122】

図 12 に示したように、実施例 5 および実施例 6 の吸光度は、実施例 1（図 9 参照）の吸光度 0.75 と比べて、実施例 5 が 0.304、実施例 6 が 0.378 と小さな値となった。実施例 5 および実施例 6 の S/N 比は、実施例 1 の S/N 比 5.7 と比べて、実施例 5 が 8.0、実施例 6 が 11.5 と大きくなることが分かった。特に、実施例 6 は電界攪拌を用いたことにより、実施例 5 よりもさらに S/N 比が向上し、電界攪拌による効果が示された。

【0123】

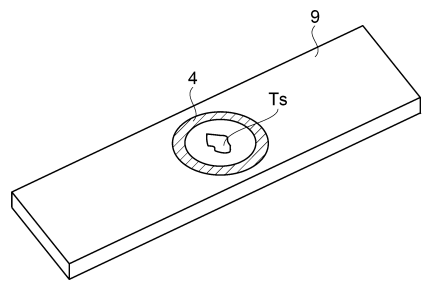
以上に述べた実施例および比較例の結果から、本実施例においては、一次抗体反応に用いる試薬は希釈することが好ましく、その希釈率は、体積比で 100 倍であることがより好ましく、反应用試薬は、二次抗体反応に寄与するタンパク質の含有量を減らし、その分を二次抗体反応に寄与しにくいタンパク質で補うように調整することが好ましく、希釈液による二次抗体反应用の試薬の希釈率は、体積比で 50 倍であることがより好ましく、抗原抗体反応には電界攪拌機構による電界攪拌を用いることがより好ましいことが示された。

【符号の説明】

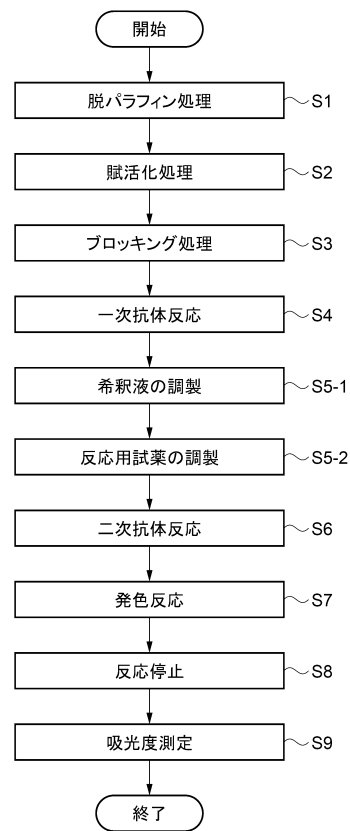
【0124】

1 a … 上清、2 a … 希釈液、3 a、3 b … 反应用試薬、4 … 撥水剤、9 … 基板、10 … 第 1 電極としての下側電極、20 … 第 2 の電極としての上側電極、100 … 電界攪拌機構、Ts … 組織標本。

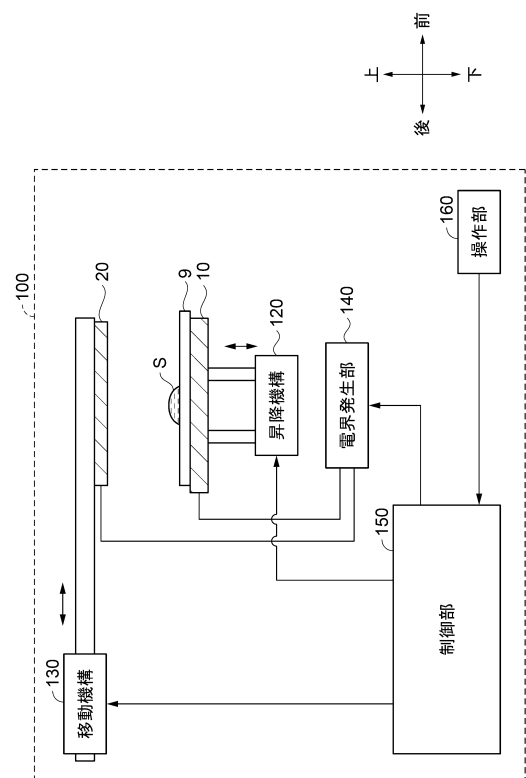
【図 1】



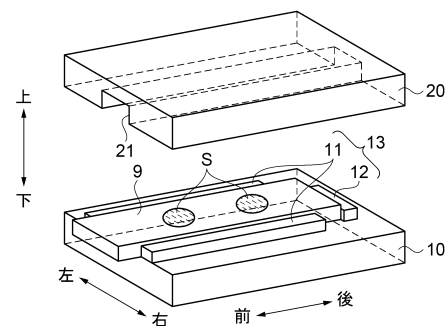
【図 2】



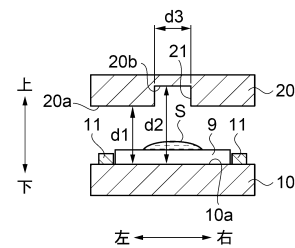
【図 3】



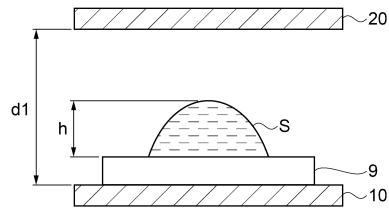
【図 4】



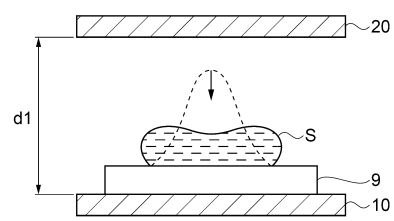
【図 5】



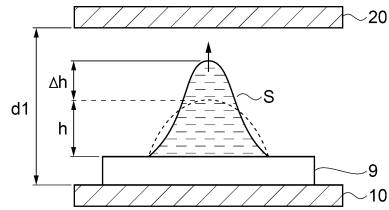
【図 6 A】



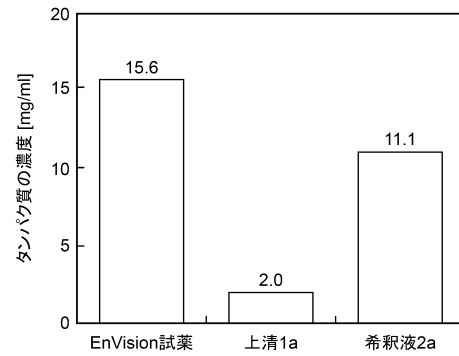
【図 6 C】



【図 6 B】



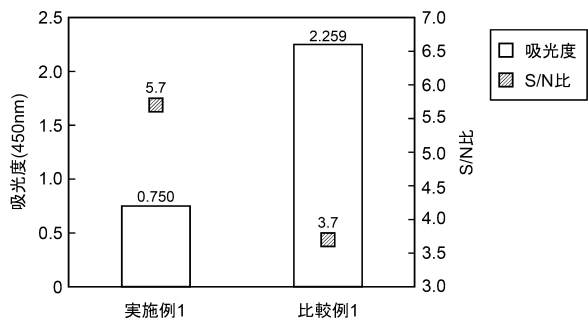
【図 7】



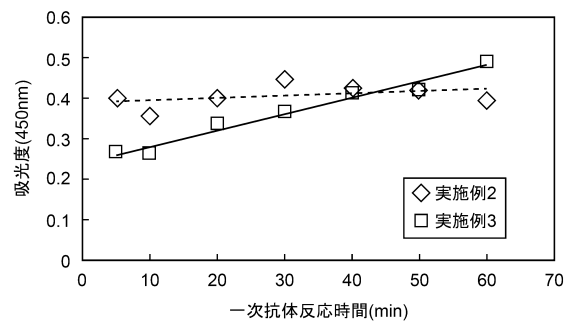
【図 8】

工程	内容	時間
S1	キシレンの3槽構成	各槽3分
	エタノールの4槽構成	各槽1分
	洗浄	PBS-Tの3槽構成 各槽10秒
S2	賦活化処理	Epitope Retrieval Solution pH9 へ浸漬し、98℃湯煎 45分 その後、室温で自然冷却する 冷却20分
	洗浄	PBS-Tの3槽構成 各槽10秒
	撥水枠の形成	φ20mm 撥水枠(貼付式)を貼付する —
S3	ブロッキング処理	3質量%過酸化水素水へ浸漬する 5分
	洗浄	PBS-Tの3槽構成 各槽10秒
S4	一次抗体反応	一次抗体反応用の試薬: Dako Ant-Human Hepatocyte Clone OCH1E5 希釈液: Dako REAL Antibody Diluent 一次抗体反応用の試薬を希釈液で希釈して、150μLを試料に滴下する 滴下後 10分放置
	洗浄	PBS-Tの3槽構成 各槽10秒
S5-1	上清の調製	Dako EnVision + Dual Link System-HRP に115℃で加熱処理を施す 10分
		遠心分離(150000rpm)にて、上清を得る 10分
	希釈液の調製	上清へウシアルブミンを、上清1mL当たり13mg添加して攪拌し、希釈液とする —
S5-2	反応用試薬の調製	Dako EnVision + Dual Link System-HRP (Dako)を、希釈液で希釈して、反応用試薬とする —
S6	二次抗体反応	反応用試薬を試料に150μL滴下する 滴下後 10分放置
	洗浄	PBS-Tの3槽構成 各槽10秒
S7	発色反応	発色試薬: TMB One Component HRP 発色試薬を、試料に150μL滴下する 滴下後 5分放置
	発色停止	0.2mol/L 硫酸水溶液を、試料に150μL滴下する —
S9	吸光度測定	450nmの波長における吸光度を測定する —

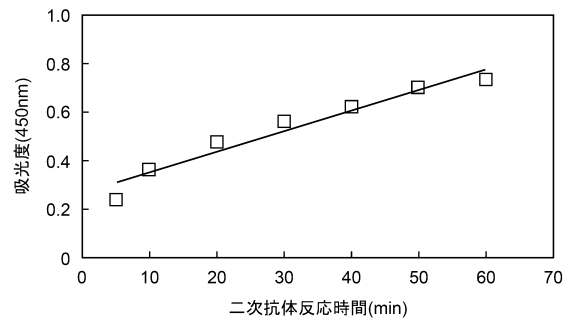
【図 9】



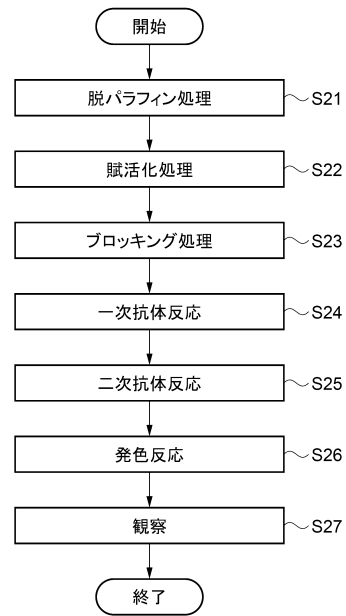
【図 10】



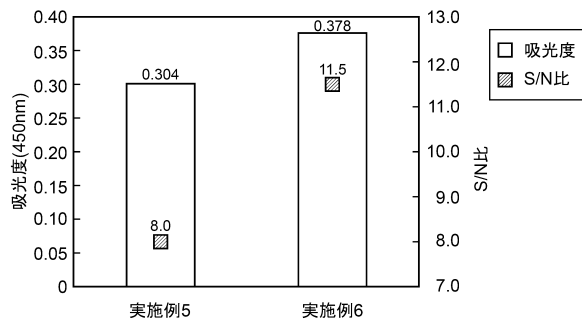
【図 1 1】



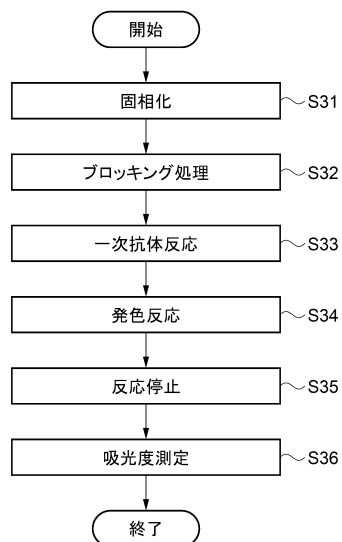
【図 1 3】



【図 1 2】



【図 1 4】



フロントページの続き

審査官 三好 貴大

- (56)参考文献 特開平05-188055 (JP, A)
米国特許出願公開第2015/0233902 (US, A1)
特開平02-152999 (JP, A)
特開2015-111095 (JP, A)
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98