(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2012-194013
(P2012-194013A)
(43)公開日　平成24年10月11日(2012.10.11)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/53	***(2006.01)***	G01N	33/53	Y	２G045
G01N 33/48	***(2006.01)***	G01N	33/48	P	
G01N 33/531	***(2006.01)***	G01N	33/531	B	
G01N 33/552	***(2006.01)***	G01N	33/552		

審査請求 未請求　請求項の数 4　ＯＬ　（全 10 頁）

(21)出願番号　特願2011-57345 (P2011-57345)
(22)出願日　平成23年3月16日 (2011.3.16)

（出願人による申告）国等の委託研究の成果に係る特許出願（平成２２年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「がん超早期診断・治療機器の総合研究開発／超早期高精度診断システムの研究開発：病理画像等認識技術の研究開発／病理画像等認識自動化システムの研究開発（１粒子蛍光ナノイメージングによる超高精度がん組織診断システム）」委託研究、産業技術力強化法第１９条の適用を受ける特許出願）

(71)出願人　303000420
コニカミノルタエムジー株式会社
東京都日野市さくら町１番地
(71)出願人　504157024
国立大学法人東北大学
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号
(74)代理人　110001254
特許業務法人光陽国際特許事務所
(72)発明者　高野　敬三
東京都日野市さくら町１番地　コニカミノルタエムジー株式会社内
(72)発明者　星野　秀樹
東京都日野市さくら町１番地　コニカミノルタエムジー株式会社内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫組織化学染色方法及び反応試薬

(57)【要約】　（修正有）
【課題】免疫組織化学染色方法において、標識体の非特異的な反応を抑制する。
【解決手段】蛍光物質を複数結合してなるシリカ粒子を蛍光標識体として用いて生体組織を染色する免疫組織化学染色方法において、生体組織に蛍光標識体が非特異的に吸着するのを抑制するために、核酸分子を含む反応試薬を用いる。核酸分子は、１～１００塩基のものを用いる。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
蛍光標識体を用いて生体組織を染色する免疫組織化学染色方法において、
前記生体組織に前記蛍光標識体が非特異的に吸着するのを抑制する反応試薬に核酸分子が含まれることを特徴とする免疫組織化学染色方法。
【請求項２】
前記核酸分子が１～１００塩基であることを特徴とする請求項１に記載の免疫組織化学染色方法。
【請求項３】
前記蛍光標識体が蛍光物質を複数結合してなるシリカ粒子であることを特徴とする請求項１又は２に記載の免疫組織化学染色方法。
【請求項４】
蛍光標識体を用いて生体組織を染色する免疫組織化学染色用の、前記生体組織に前記蛍光標識体が非特異的に吸着するのを抑制する反応試薬において、
核酸分子が含まれることを特徴とする反応試薬。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、免疫組織化学染色方法及び反応試薬に関する。
【背景技術】
【０００２】
従来、抗原抗体反応を利用して、組織切片上の特定の抗原を可視化する免疫組織化学染色方法が用いられている。免疫組織化学染色では、ＤＡＢ法等に代表される酵素を用いた染色法がよく知られている。この酵素を用いた染色法は、温度、時間等の環境条件により大きく左右されるため、目的の抗原分子を正確に測定することは困難である。そこで、これに代わる標識試薬として、定量性能の高い蛍光色素が免疫組織化学染色に用いられている（特許文献１参照）。しかし、発明者らが特許文献１に開示されている方法により、有機蛍光色素であるＦＩＴＣを用いて作製した免疫染色組織切片を蛍光顕微鏡下で観察したところ、その発光輝度は極めて弱く、また、数分の顕微鏡観察で褪色してしまうため、極微量のバイオマーカーを検出するためには、更なる改善が必要であることがわかった。
【０００３】
近年、高輝度かつ光褪色に強い蛍光標識体の開発が盛んに進められている。そのような高輝度蛍光標識体として、半導体微粒子や蛍光色素を含有したシリカ粒子、ポリスチレン粒子等が挙げられる。ポリスチレン等の高分子ビーズの多くは疎水性であり、純水や緩衝液に分散させるためには特別な処理が必要となるのに対し、蛍光シリカ粒子は親水性が高く、純水や緩衝液に分散させやすいため、特別な処理は必要ない。さらに、蛍光色素を含有したシリカ粒子は、高輝度であること、光褪色に強いこと、及び、光散乱が小さいこと等の理由から、免疫組織化学染色の蛍光標識体として適性が高い。
【０００４】
また、免疫組織化学染色では、標識体と、組織切片中のタンパク質等との非特異的結合を抑制するためにブロッキングが行われる（特許文献２、特許文献３参照）。一般的に、免疫組織化学染色では、ブロッキング試薬として、１～５％の正常動物血清、１～５％のウシ血清アルブミン、５～１０％のスキムミルク又はＴｗｅｅｎ２０等が使用されている。
【先行技術文献】
【特許文献】
【０００５】
【特許文献１】特開昭６３－６６４６５号公報
【特許文献２】特開平７－２１８５０８号公報
【特許文献３】特開２００４－２１９１１１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、ブロッキング試薬の選択及び濃度調整の最適化は、利用する標識体、抗体、検体毎に行う必要があり、多くの場合には非特異的な反応が十分に抑制されていないため、免疫組織化学染色を正確かつ迅速に実施する上で問題となっていた。例えば、シリカ粒子は核酸に吸着しやすい性質があり、蛍光標識体として蛍光シリカ粒子を用いる場合には、蛍光シリカ粒子の核酸への非特異的吸着を抑制する反応試薬（ブロッキング試薬）が求められている。
【０００７】
本発明は、上記の従来技術における問題に鑑みてなされたものであり、標識体の非特異的な反応を抑制することを課題とする。
【課題を解決するための手段】
【０００８】
上記課題を解決するために、請求項１に記載の発明は、蛍光標識体を用いて生体組織を染色する免疫組織化学染色方法において、前記生体組織に前記蛍光標識体が非特異的に吸着するのを抑制する反応試薬に核酸分子が含まれることを特徴とする。
【０００９】
請求項２に記載の発明は、請求項１に記載の免疫組織化学染色方法において、前記核酸分子が１～１００塩基であることを特徴とする。
【００１０】
請求項３に記載の発明は、請求項１又は２に記載の免疫組織化学染色方法において、前記蛍光標識体が蛍光物質を複数結合してなるシリカ粒子であることを特徴とする。
【００１１】
請求項４に記載の発明は、蛍光標識体を用いて生体組織を染色する免疫組織化学染色用の、前記生体組織に前記蛍光標識体が非特異的に吸着するのを抑制する反応試薬において、核酸分子が含まれることを特徴とする。
【発明の効果】
【００１２】
本発明によれば、標識体の非特異的な反応を抑制することができる。
【発明を実施するための形態】
【００１３】
以下、本発明を実施するための形態について説明するが、本発明はこれらに限定されない。本実施の形態では、蛍光標識体を用いて生体組織を染色する免疫組織化学染色方法において、生体組織に蛍光標識体が非特異的に吸着するのを抑制する反応試薬（ブロッキング試薬）として、核酸分子が含まれるものを用いる。
【００１４】
〔ブロッキング試薬の調整〕
免疫組織化学染色におけるブロッキング試薬としては、従来、スキムミルク、ＢＳＡ、動物血清又はそれらの組み合わせ等がよく用いられている。スキムミルクとしては、生化学実験用一般試薬として使用されるスキムミルクであればよいが、ノンファットスキムミルクが好ましい。動物血清としては、ウサギ血清、ヤギ血清、マウス血清、ラット血清等、免疫組織化学染色に適するものであればよいが、ウサギ血清、ヤギ血清が好ましい。スキムミルク、ＢＳＡ、動物血清の最終濃度は、１～１０重量％が好ましく、５重量％がより好ましい。さらに、免疫組織化学染色のブロッキング試薬には、スキムミルク、ＢＳＡ、動物血清に加えて、界面活性剤が含まれる場合もある。界面活性剤としては、生化学実験用一般試薬として使用される界面活性剤であればよい。具体的には、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｔｗｅｅｎ４０、Ｔｗｅｅｎ６０、Ｔｗｅｅｎ８０、Ｔｗｅｅｎ８５、ＴｒｉｔｏｎＸ１００等の界面活性剤が挙げられるが、Ｔｗｅｅｎ２０、ＴｒｉｔｏｎＸ１００が好ましい。最終濃度は、０．０１～１体積％が好ましく、０．０５体積％がより好ましい。

【００１５】
本実施の形態では、上記従来のスキムミルク、ＢＳＡ、動物血清、界面活性剤等を加えたブロッキング試薬に、核酸分子を加えたものを使用する。核酸分子としては、デオキシボ核酸、リボ核酸等が挙げられるが、安定性、取り扱いの点からデオキシリボ核酸が好ましい。また、核酸の長さ（大きさ）としては、１～１０００塩基の核酸であることが好ましく、１～１００塩基の核酸であることがより好ましい。核酸分子が大き過ぎると、拡散性が悪くなるためである。作製方法としては、各種細胞からゲノムＤＮＡを生成し、それを超音波破砕機やＤＮＡ分解酵素等で破砕する方法や、ＰＣＲ法にて塩基を重合させて所望の大きさの核酸を得る方法等が考えられるが、操作のしやすさの点からゲノムＤＮＡを超音波で破砕して、ブロッキング用の核酸を得ることが好ましい。ブロッキング試薬における核酸の濃度は、最終濃度が１～１０００μｇ／ｍＬであることが好ましく、１０～１００μｇ／ｍＬであることがより好ましい。
【００１６】
〔生体物質認識部位と結合した蛍光シリカ粒子の作製〕
蛍光標識体として、蛍光物質を複数結合してなるシリカ粒子（蛍光シリカ粒子）に生体物質認識部位を結合させたものを用いる。蛍光物質を複数結合してなるシリカ粒子として、例えば、蛍光物質を複数内包したシリカ粒子（蛍光物質内包シリカ粒子）が挙げられる。
【００１７】
本発明で用いられる蛍光物質としては、有機蛍光色素、量子ドットを挙げることができる。２００～７００ｎｍの範囲内の波長の紫外～近赤外光により励起されたときに、４００～９００ｎｍの範囲内の波長の可視～近赤外光の発光を示すことが好ましい。
【００１８】
有機蛍光色素としては、フルオレセイン系色素分子、ローダミン系色素分子、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（インビトロジェン社製）系色素分子、ＢＯＤＩＰＹ（インビトロジェン社製）系色素分子、カスケード系色素分子、クマリン系色素分子、エオジン系色素分子、ＮＢＤ系色素分子、ピレン系色素分子、Ｔｅｘａｓ　Ｒｅｄ系色素分子、シアニン系色素分子等を挙げることができる。
【００１９】
具体的には、５－カルボキシ－フルオレセイン、６－カルボキシ－フルオレセイン、５，６－ジカルボキシ－フルオレセイン、６－カルボキシ－２’，４，４’，５’，７，７’－ヘキサクロロフルオレセイン、６－カルボキシ－２’，４，７，７’－テトラクロロフルオレセイン、６－カルボキシ－４’，５’－ジクロロ－２’，７’－ジメトキシフルオレセイン、ナフトフルオレセイン、５－カルボキシ－ローダミン、６－カルボキシ－ローダミン、５，６－ジカルボキシ－ローダミン、ローダミン　６Ｇ、テトラメチルローダミン、Ｘ－ローダミン、及びＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　３５０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４０５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４３０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　４８８、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５００、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５１４、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５３２、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５４６、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５５５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５６８、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　５９４、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６１０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６３３、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６３５、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６４７、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６６０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　６８０、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７００、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７５０、ＢＯＤＩＰＹ　ＦＬ、ＢＯＤＩＰＹ　ＴＭＲ、ＢＯＤＩＰＹ　４９３／５０３、ＢＯＤＩＰＹ　５３０／５５０、ＢＯＤＩＰＹ　５５８／５６８、ＢＯＤＩＰＹ　５６４／５７０、ＢＯＤＩＰＹ　５７６／５８９、ＢＯＤＩＰＹ　５８１／５９１、ＢＯＤＩＰＹ　６３０／６５０、ＢＯＤＩＰＹ　６５０／６６５（以上インビトロジェン社製）、メトキシクマリン、エオジン、ＮＢＤ、ピレン、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７等を挙げることができる。単独でも複数種を混合したものを用いてもよい。
【００２０】

量子ドットとしては、II－VI族化合物、III－V族化合物、又はIV族元素を成分として含有する量子ドット（それぞれ、「II－VI族量子ドット」、「III－V族量子ドット」、「IV族量子ドット」ともいう。）のいずれかを用いることができる。単独でも複数種を混合したものを用いてもよい。

【００２１】

具体的には、ＣｄＳｅ、ＣｄＳ、ＣｄＴｅ、ＺｎＳｅ、ＺｎＳ、ＺｎＴｅ、ＩｎＰ、ＩｎＮ、ＩｎＡｓ、ＩｎＧａＰ、ＧａＰ、ＧａＡｓ、Ｓｉ、Ｇｅが挙げられるが、これらに限定されない。

【００２２】

上記量子ドットをコアとし、その上にシェルを設けた量子ドットを用いることもできる。以下、本明細書中シェルを有する量子ドットの表記法として、コアがＣｄＳｅ、シェルがＺｎＳの場合、ＣｄＳｅ／ＺｎＳと表記する。例えば、ＣｄＳｅ／ＺｎＳ、ＣｄＳ／ＺｎＳ、ＩｎＰ／ＺｎＳ、ＩｎＧａＰ／ＺｎＳ、Ｓｉ／SiO_2、Ｓｉ／ＺｎＳ、Ｇｅ／GeO_2、Ｇｅ／ＺｎＳ等を用いることができるが、これらに限定されない。

【００２３】

量子ドットは必要に応じて、有機ポリマー等により表面処理が施されているものを用いてもよい。例えば、表面カルボキシ基を有するＣｄＳｅ／ＺｎＳ（インビトロジェン社製）、表面アミノ基を有するＣｄＳｅ／ＺｎＳ（インビトロジェン社製）等が挙げられる。

【００２４】

生体物質認識部位とは、目的とする生体物質と特異的に結合及び／又は反応する部位である。例えば、タンパク質、抗体等が挙げられる。生体物質認識部位と蛍光物質内包シリカナノ粒子の結合の態様としては特に限定されず、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着及び化学吸着等が挙げられる。結合の安定性から共有結合等の結合力の強い結合が好ましい。

【００２５】

また、生体物質認識部位と蛍光物質内包シリカナノ粒子の間を連結する有機分子があってもよい。例えば、生体物質との非特異的吸着を抑制するため、ポリエチレングリコール鎖を用いることができ、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社製　ＳＭ（ＰＥＧ）１２を用いることができる。

【００２６】

蛍光物質内包シリカナノ粒子へ生体物質認識部位を結合させる場合、蛍光物質が有機蛍光色素の場合でも、量子ドットの場合でも同様の手順を適用することができる。例えば、無機物と有機物を結合させるために広く用いられている化合物であるシランカップリング剤を用いることができる。このシランカップリング剤は、分子の一端に、加水分解でシラノール基を与えるアルコキシシリル基を有し、他端に、カルボキシル基、アミノ基、エポキシ基、アルデヒド基等の官能基を有する化合物であり、上記シラノール基の酸素原子を介して無機物と結合する。具体的には、メルカプトプロピルトリエトキシシラン、グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、ポリエチレングリコール鎖をもつシランカップリング剤（例えば、Ｇｅｌｅｓｔ社製　ＰＥＧ－ｓｉｌａｎｅ　ｎｏ．ＳＩＭ６４９２．７）等が挙げられる。シランカップリング剤を用いる場合、二種以上を併用してもよい。

【００２７】

蛍光物質内包シリカナノ粒子とシランカップリング剤との反応手順は、公知の手法を用いることができる。例えば、得られた蛍光物質内包シリカナノ粒子を純水中に分散させ、アミノプロピルトリエトキシシランを添加し、室温で１２時間反応させる。反応終了後、遠心分離又はろ過により表面がアミノプロピル基で修飾された蛍光物質内包シリカナノ粒子を得ることができる。続いて、アミノ基と抗体中のカルボキシル基とを反応させることで、アミド結合を介し抗体を蛍光物質内包シリカナノ粒子と結合させることができる。必要に応じて、ＥＤＣ（１－Ｅｔｈｙｌ－３－［３－Ｄｉｍｅｔｈｙｌａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌ］ｃａｒｂｏｄｉｉｍｉｄｅ　Ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ：Ｐｉｅｒｃｅ（登録商

標）社製）のような縮合剤を用いることもできる。

【００２８】

必要により、有機分子で修飾された蛍光物質内包シリカナノ粒子と直接結合しうる部位と、分子標的物質と結合しうる部位とを有するリンカー化合物を用いることができる。具体例として、アミノ基と選択的に反応する部位とメルカプト基と選択的に反応する部位の両方をもつｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ（Ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ　４［Ｎ－ｍａｌｅｉｍｉｄｏｍｅｔｈｙｌ］－ｃｙｃｌｏｈｅｘａｎｅ－１－ｃａｒｂｏｘｙｌａｔｅ：Ｐｉｅｒｃｅ社製）を用いると、アミノプロピルトリエトキシシランで修飾した蛍光物質内包シリカナノ粒子のアミノ基と、抗体中のメルカプト基を結合させることで、抗体結合した蛍光物質内包シリカナノ粒子ができる。

【００２９】

〔染色方法〕

次に、染色方法について述べる。本発明の免疫組織化学染色方法は生体組織（病理切片組織）に限定されず、細胞染色にも適用可能である。

また、この染色方法が適用できる切片の作製法は特に限定されず、公知の方法により作製されたものを用いることができる。

【００３０】

１）脱パラフィン工程

キシレンを入れた容器に、病理切片を浸漬させ、パラフィンを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、３分以上３０分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でキシレンを交換してもよい。

次いで、エタノールを入れた容器に病理切片を浸漬させ、キシレンを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、３分以上３０分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でエタノールを交換してもよい。

次いで、水を入れた容器に、病理切片を浸漬させ、エタノールを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、３分以上３０分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中で水を交換してもよい。

【００３１】

２）賦活化処理

公知の方法にならい、目的とする生体物質の賦活化処理を行う。賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、０．０１Ｍクエン酸緩衝液（ｐＨ６．０）、１ｍＭＥＤＴＡ溶液（ｐＨ８．０）、５％尿素、０．１Ｍトリス塩酸緩衝液等を用いることができる。加熱機器は、オートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバス等を用いることができる。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。温度は５０－１３０℃、時間は５－３０分で行うことができる。

次いで、ＰＢＳ（Phosphate Buffered Saline：リン酸緩衝生理食塩水）を入れた容器に、賦活化処理後の切片を浸漬させ、洗浄を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、３分以上３０分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でＰＢＳを交換してもよい。

【００３２】

３）生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包シリカナノ粒子を用いた染色

まず、生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包シリカナノ粒子のＰＢＳ分散液による染色を行う前に、病理切片に上記のブロッキング試薬を滴下する。あるいは、生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包シリカナノ粒子のＰＢＳ分散液に、予めブロッキング試薬を混ぜておき、病理切片と反応させてもよい。

生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包シリカナノ粒子のＰＢＳ分散液を病理切片に載せ、目的とする生体物質と反応させる。蛍光物質内包シリカナノ粒子と結合させる生体物質認識部位を変えることにより、さまざまな生体物質に対応した染色が可能となる。数種類の生体物質認識部位が結合された蛍光物質内包シリカナノ粒子を用いる場合には、それぞれの蛍光物質内包シリカナノ粒子ＰＢＳ分散液を予め混合しておいてもよいし、別

々に順次病理切片に載せてもよい。
温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。反応時間は、３０分以上２４時間以下であることが好ましい。
次いで、ＰＢＳを入れた容器に、染色後の切片を浸漬させ、未反応蛍光物質内包シリカナノ粒子の除去を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、３分以上３０分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でＰＢＳを交換してもよい。
組織の形態観察のため、ヘマトキシリン－エオジン染色を行ってもよい。
カバーガラスを切片に載せ、封入する。必要に応じて市販の封入剤を使用してもよい。
【００３３】
４）蛍光顕微鏡下の観察
染色した病理切片に対し蛍光顕微鏡を用いて、目的とする生体物質の発現レベルを蛍光輝度に基づいて評価する。用いた蛍光物質の吸収極大波長及び蛍光波長に対応した励起光源及び蛍光検出用光学フィルターを選択する。
蛍光輝度の計測には、オリンパス（登録商標）社製画像解析装置（ＣＯＬＯＲ　ＩＭＡＧＩＮＧ　ＡＮＡＬＹＺＥＲ　ＳＰ５００Ｆ　ＯＬＹＭＰＵＳ）を使用し、染色結果を数値化する。蛍光輝度は０～２５５の数値範囲で示され、より高い値ほど染色の程度が強い。数値化の対象として、標的部位（細胞膜部）及び非特異的吸着部位（細胞核部）の蛍光輝度を測定する。
【実施例】
【００３４】
次に、本発明に係る免疫組織化学染色方法を上記実施の形態に基づいて具体的に実施した実施例について説明するが、本発明はこれらに限定されない。
【００３５】
（蛍光標識体の準備）
直径５０ｎｍの蛍光シリカ粒子（ＭｉｃｒｏＭｏｄ社製　ｓｉｃａｓｔｅｒ－ＲｅｄＦ）を１００μＬのＰＢＳに懸濁させ、最終濃度１０ｎＭの蛍光シリカ粒子懸濁液を得た。この蛍光シリカ粒子懸濁液に、５ｍｇ／ｍＬの抗ＨＥＲ２抗体（ＣＳＴジャパン社製　ｒａｂｂｉｔ　ｍＡｂ）１０μＬを添加し、１時間混合した。その後、遠心分離機（トミー精工社製　ＭＸ－２０５）を用いて、１５０００ｒｐｍで１５分間遠心分離を実施し、蛍光シリカ粒子の沈殿を得た。次いで、蛍光シリカ粒子の沈殿をＰＢＳに懸濁させた。この洗浄操作を３回繰り返し、余分な抗体を除去し、抗ＨＥＲ２抗体が結合された抗体結合蛍光シリカ粒子を得た。
【００３６】
（ブロッキング試薬の準備）
核酸試薬（Ｓｉｇｍａ社製　Ｄｅｏｘｙｒｉｂｏｎｕｃｌｅｉｃ　ａｃｉｄ）を入手し、１．５mLのチューブに移し、ＰＢＳ１ｍＬに懸濁させた。その核酸懸濁液を氷上に設置し、超音波破砕機（Ｔａｉｔｅｃ（登録商標）社製　ＶＰ－０５０、プローブ：ＶＰ－ＭＳ０２、出力：１５Ｗ）にて破砕処理を行った。ここで、超音波の照射時間は、１分間、１０分間とした。破砕後、核酸溶液の一部を採取し、ゲル電気泳動にて核酸分子の長さを確認したところ、超音波を１０分照射した核酸分子は１～１００ｂｐ程度であり、超音波を１分照射した核酸分子は１０１～１００００ｂｐ程度であった。
【００３７】
次いで、それぞれ得られた核酸溶液を１００℃で１０分間加熱し、氷上に移し急冷させることにより、ブロッキングに用いる核酸溶液を得た。超音波を１０分照射したもの（１～１００ｂｐ）を核酸溶液１、超音波を１分照射したもの（１０１～１００００ｂｐ）を核酸溶液２とする。吸光計にて、核酸溶液１及び２の濃度を測定したところ、どちらも約１２ｍｇ／ｍＬであった。
【００３８】
ＰＢＳ溶液に核酸溶液１（最終濃度５０μｇ／ｍＬ）、ＢＳＡ溶液（最終濃度１％）を

溶解させ、免疫組織化学染色用ブロッキング試薬イを作製した。同様に、ＰＢＳ溶液に核酸溶液２（最終濃度５０μｇ／ｍＬ）、ＢＳＡ溶液（最終濃度１％）を溶解させ、免疫組織化学染色用ブロッキング試薬ロを作製した。この段階で、免疫組織化学染色用ブロッキング試薬イ，ロに含まれる核酸分子の塩基は、ペアがほどけた状態となっている。

【００３９】

（切片の染色）

先に作製した抗体結合蛍光シリカ粒子を用いてヒト乳房組織の免疫染色を行った。染色切片は、コスモバイオ社製の組織アレイスライド（ＣＢ－Ａ７１２）を用いた。

工程（１）：キシレンを入れた容器に病理切片を３０分浸漬させた。途中３回キシレンを交換した。

工程（２）：エタノールを入れた容器に病理切片を３０分浸漬させた。途中３回エタノールを交換した。

工程（３）：水を入れた容器に病理切片を３０分浸漬させた。途中３回水を交換した。

工程（４）：１０ｍＭクエン酸緩衝液（ｐＨ６．０）に病理切片を３０分浸漬させた。

工程（５）：１２１℃で１０分間オートクレーブ処理を行った。

工程（６）：ＰＢＳを入れた容器に、オートクレーブ処理後の切片を３０分浸漬させた。

工程（７）：ブロッキング試薬（核酸：最終濃度５０μｇ／ｍＬ、ＢＳＡ：最終濃度１％を含有したＰＢＳ溶液）を組織に載せて、１時間放置した。

工程（８）：ブロッキング試薬（核酸：最終濃度５０μｇ／ｍＬ、ＢＳＡ：最終濃度１％を含有したＰＢＳ溶液）で０．０５ｎＭに希釈した抗ＨＥＲ２抗体が結合された抗体結合蛍光シリカ粒子を組織に載せて３時間放置した。

工程（９）：ＰＢＳを入れた容器に、染色後の切片をそれぞれ３０分浸漬させた。

工程（１０）：Ｍｅｒｃｋ　Ｃｈｅｍｉｃａｌｓ社製Ａｑｕａｔｅｘを滴下後、カバーガラスを載せて封入し、試料を得た。

【００４０】

なお、工程（７）、（８）で、免疫組織化学染色用ブロッキング試薬イ（１～１００塩基）を用いた試料を試料Ａ、免疫組織化学染色用ブロッキング試薬ロ（１０１～１００００塩基）を用いた試料を試料Ｂとした。また、工程（７）、（８）において核酸を含有しないブロッキング試薬で処理した試料を試料Ｃとした。

【００４１】

（染色切片の評価）

オリンパス社製画像解析装置（ＣＯＬＯＲ　ＩＭＡＧＩＮＧ　ＡＮＡＬＹＺＥＲ　ＳＰ５００Ｆ　ＯＬＹＭＰＵＳ）を使用し、染色結果（蛍光輝度）を数値化した。なお、蛍光輝度は０～２５５の数値範囲で示され、より高い値ほど染色の程度が強い。数値化の対象として、標的部位である乳癌細胞の細胞膜部、及び非特異的吸着部位である細胞核部について、各々３か所を任意に選択し、平均値を算出した。ブロッキングの効果は、標的部位の蛍光量を非特異的吸着部位の蛍光量で除した値（Ｓ／Ｎ）をもって示した。すなわち、Ｓ／Ｎ比が大きいほど、非特異的吸着部位での染色の程度は弱く、かつ標的部位での染色の程度が強いことを示す。表１に、試料Ａ，Ｂ，Ｃについての評価結果を示す。

【００４２】

【表１】

試料名	核酸分子の有無	核酸分子の長さ	S／N
試料A	含有する	1～100 塩基	31.1
試料B	含有する	101～10000 塩基	5.9
試料C	含有しない	－	2.8

【００４３】
核酸分子を含有したブロッキング試薬で処理した試料Ａ，Ｂは、核酸分子を含有しないブロッキング試薬で処理した試料Ｃに比べて、高いＳ／Ｎ比を示した。さらに、核酸分子の長さが１～１００塩基の試料Ａは、核酸分子の長さが１０１～１００００塩基の試料Ｂに比べて、高いＳ／Ｎ比を示した。核酸分子の長さが１～１００塩基のブロッキング試薬は、蛍光シリカ粒子を標識体として用いた免疫組織化学染色において優れたブロッキング効果を有することが示された。
【００４４】
以上説明したように、核酸分子を含む反応試薬（ブロッキング試薬）を用いることにより、標識体が生体組織内の核酸に吸着するのを防ぎ、標識体の非特異的な反応を抑制することができる。詳細なメカニズムについては不明であるが、核酸分子を含有したブロッキング試薬が蛍光シリカ粒子に優先的に吸着し、非特異吸着を抑制したと推測される。したがって、より鮮明な染色像を取得することができる。また、取り扱いが簡便かつ安価な免疫組織化学染色用の反応試薬を提供することができる。

フロントページの続き

(72)発明者　岡田　尚大
東京都日野市さくら町１番地　コニカミノルタエムジー株式会社内
(72)発明者　中野　寧
東京都日野市さくら町１番地　コニカミノルタエムジー株式会社内
(72)発明者　権田　幸祐
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内
(72)発明者　武田　元博
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内
(72)発明者　大内　憲明
宮城県仙台市青葉区片平二丁目１番１号　国立大学法人東北大学内

Ｆターム(参考) 2G045 AA24　BA01　CB01　FB03