

多重免疫染色受託サービス

染色（条件検討から）・撮影・解析までのトータルソリューションサービスです。

研究にあわせた多くのご提案が可能です。

- ・ 市販多重免疫染色試薬での受託
- ・ 独自ノウハウによる多重免疫染色
抗原30種超蛍光多重免疫染色もご相談ください。

1. 免疫多重染色の需要と概要	2
2. 蛍光多重染色の市販品	
• SignalStar™ Multiplex	4
• Immuno8 FixVUE™	5
• Spatial Amplification Kit	6
• RNAscope™ Multiomic LS Assay	7
3. ダイレクトラベル抗体の利用	
• 市販ダイレクトラベル抗体の利用	8
• 弊社での抗体へのダイレクトラベル	8
• ストリッピングまたはクエンチング	9
4. 抗体の染色条件検討	10
5. MoxiePlex® を導入した理由	10

 MoxiePlex



HAMAMATSU
PHOTON IS OUR BUSINESS

なぜ、多重染色の需要（問い合わせ）が増えているのでしょうか？

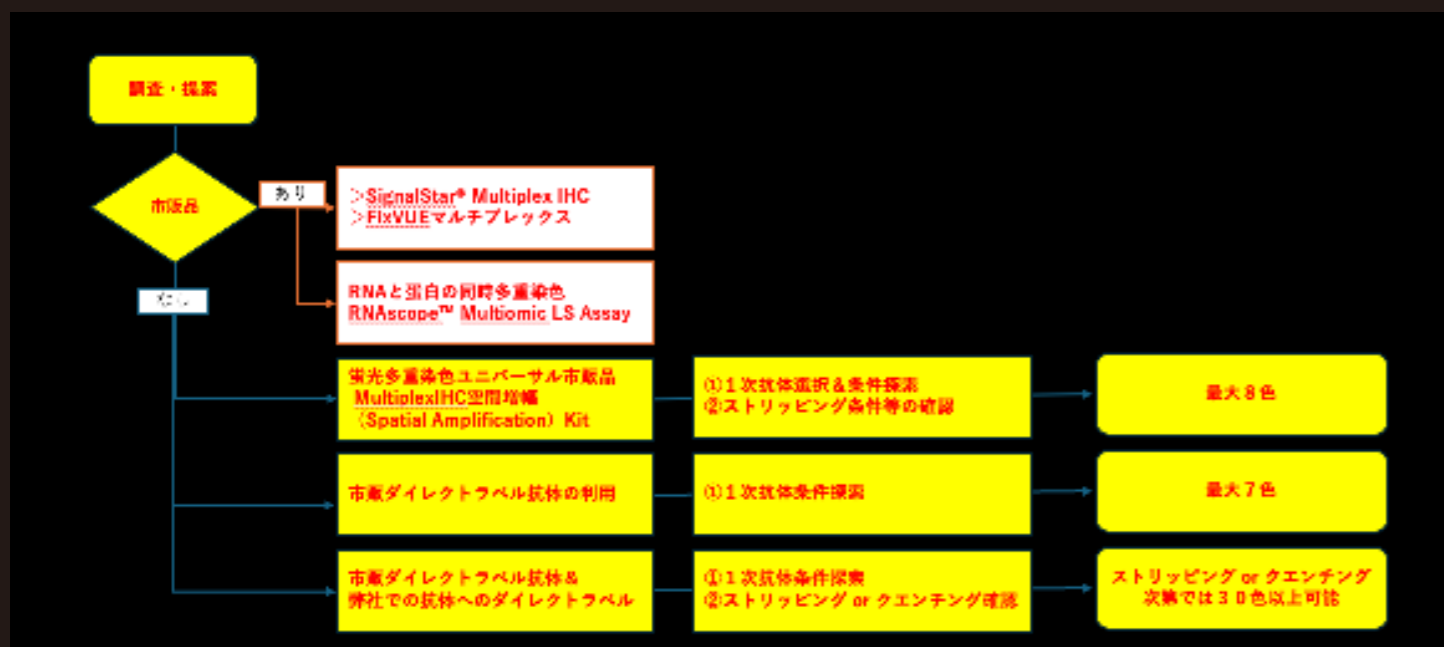
同一病理標本で、同時に多くの抗原を空間的な発現解析を行う研究の需要が増えてきています。従来の免疫染色は、同一病理組織標本上で免疫染色できる数と手法には以下の様な制限がありました。

- ・ 1次抗体の動物種が同じだと染色を分けることができない。
- ▶ 1次抗体の動物宿主を Mouse, Rabbit, Goat, Chicken 等でわけて、それぞれに対する2次抗体を用いることで動物宿主数の染色が可能だが、目的の抗体が入手できるかという課題がある。
- ▶ 染色組織と同じ動物種の1次抗体（Mouseの組織に対して Mouse由来の1次抗体）を利用すると非特異反応等が発生する傾向がある。
- ・ 多重染色ができない場合、連続薄切切片を利用する方法があるが、隣接した薄切組織でも組織の顔が微妙に変化する。5種類の免疫染色を1抗体1枚で染色した場合は、1枚目と5枚目の組織の顔がかなり変わってしまう。

蛍光多重染色は、同一病理標本上で同時に多くの抗原を発現量を含めて検出可能で、各種研究に利用されつつあります。しかし、抗体の反応性（染色条件）の確認、免疫染色工程を何回も繰り返すことが必要で、操作時間などの手間がかかります。さらに、蛍光撮影の大きな課題としての自家蛍光の影響等があり撮影には特別な撮影装置が必要となります。

弊社はこれまで、単染色含めて多くの皆様から免疫染色の条件検討から解析にかけてのご依頼を沢山いただきました。この経験を元に皆様の研究用病理支援受託として、他に無い新しい受託サービスを開始します。

以下、マイルストーンは事前の情報によりスキップできるものも含まれます。



【マイルストーン1：調査&提案】

以下のステップで事前調査（お問い合わせ）から入ります。

1. 多重染色したい対応抗原の調査（お問い合わせ）：対応動物種（臨床・非臨床）抗原名、多重染色数（Plex数）
2. 調査手順：以下の4つの方法がご提案可能です。

《蛍光多重染色のパネル市販品の調査》

- ・ 近年、いくつかのパネルを用いた市販品が販売されてきています。各試薬の特徴がございますので、ご予算、目的によりご相談をお受けします。
 - ▷ SignalStar™ Multiplex IHC (Cell Signaling Technology (以下「CST」と記載))
 - ▷ FixVUE マルチプレックス (Ultivue)

《蛍光多重染色のユニバーサル市販品》

- ・ 最大8色蛍光を高感度で検出できる試薬です。1次抗体、ストリッピング条件の染色順番と組み合わせがフレキシブルに設定可能です。初条件からの検討のご依頼からお受けできます。

《RNAと蛋白の同時多重染色》

- ・ RNAscope™ Multiomic LS Assay (Biotechne)

《ダイレクトラベル抗体の利用》

・ 市販ダイレクトラベル抗体の利用

近年、抗体に蛍光物質をラベル済みで販売されている（ダイレクトラベル抗体）が多く市販されてきております。目的の抗体がこのダイレクトラベル抗体がその中にあるのかの調査を行います。現在市販されている製品で弊社がご紹介できるのは下記となります。

- ▶ CST、abcam、BioLegend、Proteintech

・ 弊社での抗体へのダイレクトラベル&ストリッピングまたはクエンチングの組合せ

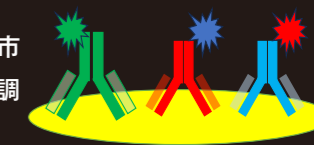
前述の各種手法で検討が難しいという場合、市販品にダイレクトラベル抗体が無い、または自社開発抗体等の場合は、弊社で各種蛍光物質をダイレクトラベルして利用する方法もあります。

一般に市販されている1次抗体であれば原理的には対応可能です。さらにBSA、グリセリンまたはアジ化ナトリウム等が含まれている1次抗体（ポリクローナル抗体は対応不可能）でもラベルすることが可能です。

抗体メーカー名例；CST、abcam、Leica Biosystems、Proteintech等

- ▶ 「市販品ダイレクトラベル抗体」と組み合わせることで自由な多重染色を実施する事が可能です。

- ▶ さらに、ストリッピングまたはクエンチングを利用し、8重以上の染色も可能となります。



いずれの場合も蛍光物質が漏れ込みの少ない離れた測定波長や、自家蛍光の少ない蛍光物質を組合せてご提案申し上げます。

【マイルストーン2：染色】基本 Leica の BOND RX での自動染色で実施します。

《パネル市販試薬》

- ・ 試薬メーカーのプロトコールにより染色を実施します。(P 4, 5)

《蛍光多重染色のユニバーサル市販品》> P 6

- ・ 抗原の所在、抗原量およびストリッピング順番等を細かく検討の上、プロトコールを決めて本番染色となります。

《市販ダイレクトラベル抗体 / 弊社での抗体へのダイレクトラベル》(P 7, 8, 9, 10)

- ・ 条件検討（後述）を実施して、染色 Plex 数、対象抗原を確認してから本番染色となります。
- ・ Plex 数が多い場合は、ストリッピングまたはクエンチング条件（順番）の条件確認を含める場合もあります。

いずれの場合でも、抗体の反応性、局在性を確認するために、連続薄切切片にて HE 染色または名視野 (DAB) からの検討・確認を行うことをご提案させていただくことがあります。



【マイルストーン3：撮影】> (P11,12)

MoxiePlex：多重蛍光染色された組織サンプル全体を高速かつ簡単に画像取得する装置

- ・ Whole Slide Imaging 撮影が可能
- ・ 最大9色蛍光イメージングが可能（400～900nmに高い量子効率を持つカメラ採用）
- ・ 各色16bit出力が可能
- ・ サンプル認識と露光時間の自動化による撮影工数の削減もサンプル認識と露光時間の自動化による撮影工数の削減が可能（手動で設定も可能自家蛍光等の非特異反応を浜松ホトニクス独自の技術で回避し、精度高い撮影が可能
- ・ 対物撮影レンズ：20倍（40倍撮影可能）搭載（近い将来は10倍、40倍も搭載予定）



【マイルストーン4：評価・解析・診断】

《評価・解析》病理評価、画像解析をご希望の場合：参考文献や条件詳細をご教示ください。

ご依頼の内容を事前に協議の上、Betterなシステム・ソフトを用いて実施します。

- ・ HALO ・ QuPath ・ Image J (Original、Fiji版)
- ・ Aperio Image Scope
- ・ NDP.view2 Plus ・ MoxiePlexView

《診断》

- ・ 臨床検体：業務提携先である臨床病理医の対応となります。診断以外にもROIの指定、スコアリング等も可能です。
- ・ 非臨床検体：弊社の経験豊富な獣医師が行います。



蛍光多重染色のパネル市販品について (その1)

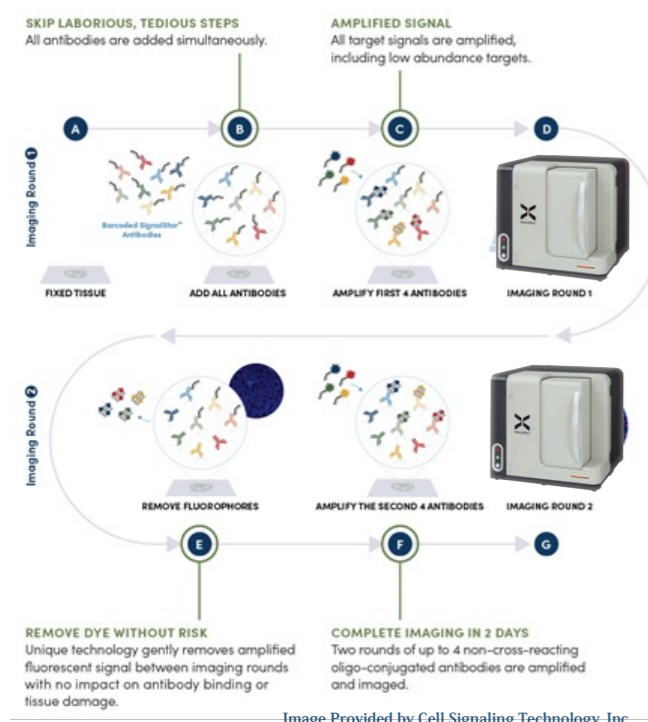
SignalStar® Multiplex IHC



SignalStar® Multiplex IHC (mIHC) は、Cell Signaling Technology (CST) が提供する空間生物学研究用の、カスタマイズ可能で柔軟性のある高度に検証された抗体パネル製品です。この技術は、抗体やオリゴヌクレオチド、蛍光色素を用いて、FFPE 組織における標的の存在量や局在、機能、バイオマーカーとの共発現パターンを調査する技術です。

本品のパネルデザインは、CST の HP 上の自動でパネルをデザインする SignalStar Multiplex IHC パネルビルダーを活用することにより、抗体と蛍光色素の正確な組み合わせを検討する時間を省略できます。すでにヒト用、マウス用の数十のパネル確認済みの抗体が準備されており、4ステップでお好みのパネルを得ることが可能です。

詳細は、CST 社の HP (cst-science.com/signalstar-ad) からご確認ください。



【原理】本品は最大 8 種類のバイオマーカーの同時標識が最短 2 日間で可能です。

- (A) FFPE 組織切片の脱パラフィン、再水和、抗原賦活化
- (B) 希望のすべての抗体 (3 から最大 8 種類のオリゴ標識抗体) を、一次抗体インキュベーションの際に同時に添加します。
- (C) 蛍光色素 (チャンネル: 488、594、647、750) 標識済みの相補的なオリゴヌクレオチドを用いて構築したオリゴ-蛍光色素のコンストラクトを抗体に結合させて、1 回目のイメージングラウンドで最大 4 種類のオリゴ標識抗体のシグナルを増幅させます。
- (D) 1 回目の撮影を行います。
- (E) ブレックスサイズが 4 より大きい場合は、1 回目のオリゴヌクレオチドと蛍光色素を穏やかに除去します。
- (F) 2 回目のイメージングラウンドで、次の最大 4 種類の追加のオリゴ標識抗体のシグナルを増幅させます。
- (G) 2 回目撮影を行います。

その後、コンピューター上で D と G の 2 つの画像を結合し、5 ~ 8 ブレックスの完全な画像を作成します。

<染色例>

SignalStar Multiplex IHC staining examples showing various markers (CD68, CD11c, CD206, SIRPα, CD45, HLA-DRA, CD163, Pan-Keratin) and a comparison graph of Multiplex Technologies Comparison of PD-1 Detection. The graph shows that SignalStar Multiplex IHC has a significantly higher Mean Fluorescence Intensity (MFI) per cell compared to Primary + Secondary Antibodies and Directly Conjugated Antibodies.

他の多くのソリューションとは異なり、SignalStar mIHC パネルはシグナルを増幅させるため、発現レベルの低いバイオマーカーも検出でき、従来よりも多くのバイオマーカーを調査が可能です。

ご希望の染色抗体情報をいただければ、SignalStar Multiplex IHC パネルビルダーを利用してパネル検索からのご相談をお受けすることが可能です。SignalStar Multiplex IHC アッセイキットは受託時にワンストップで準備させていただきます。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.
 U.S. Patent No. 10,781,477, foreign equivalents, and child patents deriving therefrom.
 SignalStar® は Cell Signaling Technology, Inc. の登録商標です。

蛍光多重染色のパネル市販品について (その2)

Immuno8 FixVUE™ パネル



Ultivue 社の InSitu Plex テクノロジーは、DNA バーコード標識抗体を用いた独自の高感度マルチプレックス免疫蛍光染色技術で、4 ~ 8 種のターゲットで構築された Ready-to-use の染色キットです。

Immuno8 FixVUE™ は T 細胞分布と免疫チェックポイント応答を総合的に評価するための以下の 8 種類抗体を検出します。

- ▶ CD3, CD4, CD8, CD68, FoxP3, PD-1, PD-L1, CK/SOX10

詳細は、Ultivue 社の HP (<https://ultivue.com/immuno8-fixvue-panel/>) からご確認ください。

【原理】

本品は FFPE 組織内の 8 種類の抗体の同時染色が可能です。FFPE 組織切片の脱パラフィン、再水和、抗原賦活化を行い



- ① DNA バーコード付きの 8 種の抗体を同時に 1 回で反応させます。

< ROUND 1 >

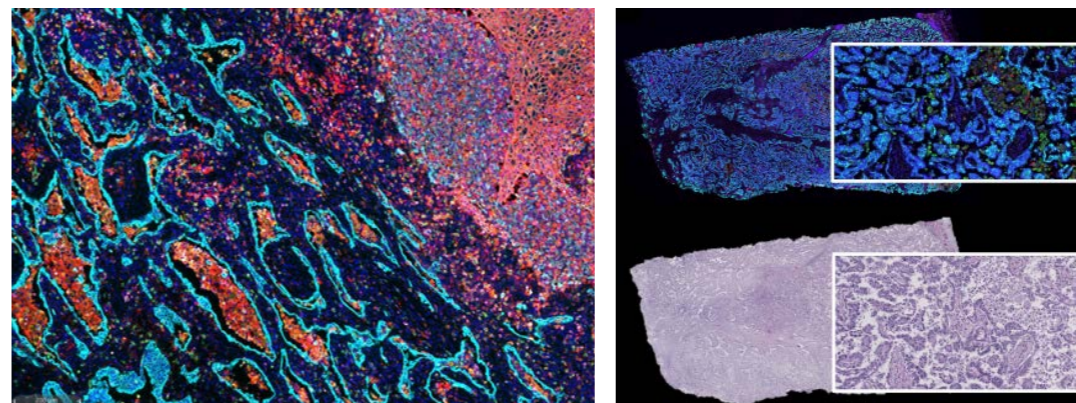
- ② CD8, CD4, PDL-1, CD68 の 4 種のターゲットを増幅させる (ATTO488, ATTO565, ATTO647N, Alexa750)。
- ③④ 相補的な蛍光標識 DNA プローブを加えて増感 ~ 撮影
- ⑤ 蛍光除去

< ROUND 2 >

- ⑥ CD3, FoxP3, CK/SOX10 の 4 種類のターゲット増幅 (ROUND 1 と同じ)
- ⑦⑧ 相補的な蛍光標識 DNA プローブを加えて増感 ~ 撮影

<画像マージ>コンピューター上で ROUND 1 と 2 の画像を結合し、8 ブレックスの完全な画像を作成します。

<染色例>



←組織のダメージが少ないために、蛍光多重染色後に同一スライドを用いて HE 染色をおこなっても、組織の形態が維持できていることも確認されています。

OmniVUE™ パネル

Immuno8 FixVUE™ と同じく Ultivue 社の InSitu Plex テクノロジーを用いた OmniVUE™ も受託する事が可能です。Design your OmniVUE™ Panel の 30 種の抗体から最大 8 種のターゲットを選択し、弊社が代理購入し受託する流れとなります。

Marker descriptions

- CD11b, CD11c, CD14, CD15, CD163, CD20, CD206, CD3
- CD4, CD45RO, CD56, CD68, CD8, CK, FoxP3, GrzB
- HLA-DR, Ki67, MHC II, PD1, PD-L1, Sox10, CK/Sox10, CTLA-4
- CD68/CD163, Lag3, HER2, TROP2, TF, FRα

詳細は HP (<https://ultivue.com/products/omnivue/>) を御覧ください。ご希望の染色抗体情報をいただければ、弊社でも SignMarker descriptions を利用してパネル検索からご相談をお受けすることが可能です。

蛍光多重染色のユニバーサル市販品

MultiplexIHC 空間増幅 (Spatial Amplification)

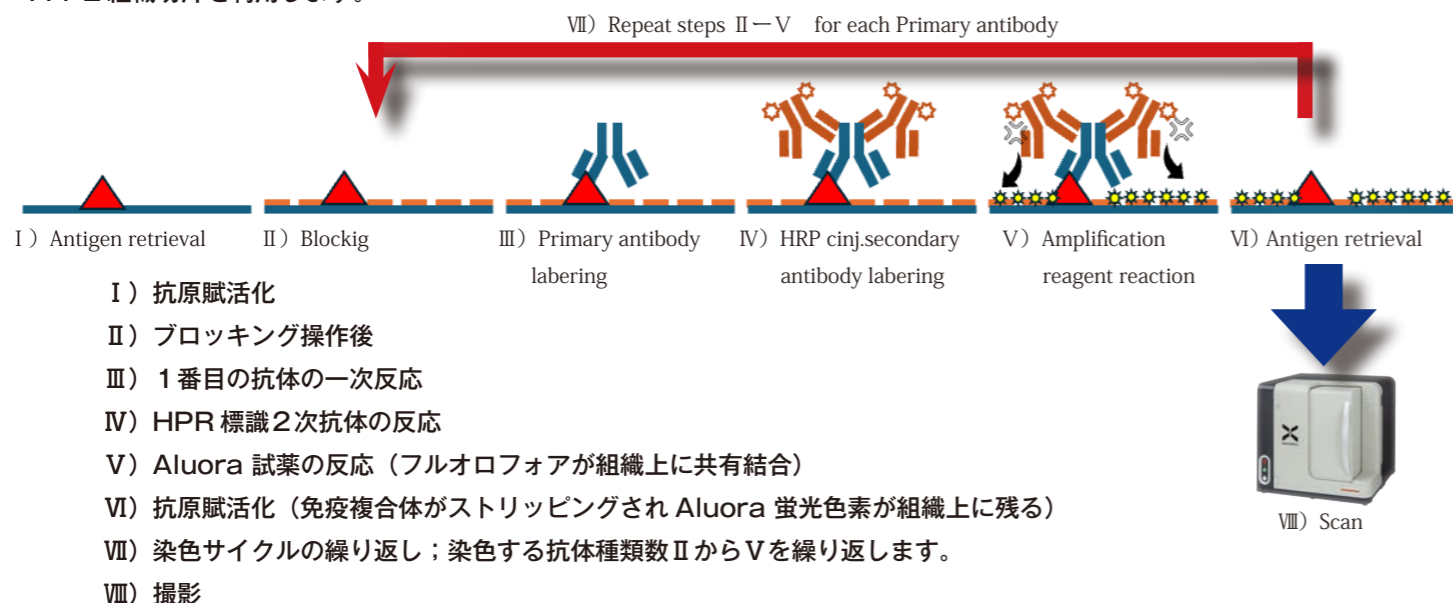
MultiplexIHC 空間増幅 (Spatial Amplification) Kit は、高輝度色素と、酵素を介したシグナル増幅を組み合わせることで、マルチプレックス IHC および空間イメージング用の非常に明るい共有結合フルオロフォアを生成します。蛍光シグナル強度を向上させて、1つの組織サンプルで最大8つのターゲットの染色が可能です。

本品は、某社 (詳細はお問い合わせください) が提供する空間生物学研究用の、カスタマイズ可能で柔軟性のある高度に検証された染色キットであり、高感度蛍光色素を用いて、細胞内における標的の存在量や局在、機能、バイオマーカーとの共発現パターンを調査する技術です。

【原理】

本品は FFPE 組織内の最大 8 種類のバイオマーカーの同時検出が可能です。

FFPE 組織切片を利用します。



【Spatial Amplification 試薬選択ガイド】

多重染色の実験の限界は、自家蛍光や非特異的バックグラウンドを超えて低発現量のタンパク質を検出することです。本キットは明るい高感度色素と、酵素を介したシグナル増幅によってこの制約を克服するのに役立ち、以下の 8 色からの選択となります。

WL 430	WL488	WL514	WL555	WL549	WL647	WL700	WL750
Spatial Reagent	Spatial Reagent	Spatial Reagent	Spatial Reagent	Spatial Reagent	Spatial Reagent	Spatial Reagen	Spatial Reagent

【本品のパラメーターの設定手順 (例)】

1. 多重染色したい抗体情報をお知らせください。抗体は同じ免疫動物 (Mouse、Rabbit で統一) です。
2. 抗体情報 (メーカー、開発時) により、1 次抗体を明視野 (DAB) で賦活化条件、抗体の希釈等の条件検討を実施します。
3. 「2」の情報と抗原の所在情報 (組織の染まる位置) 元に、Aluora 系での色を仮決定し、単染色での染色 (抗体濃度) と賦活化 (ストリッピング) 回数に耐えうる条件検討を実施します。
4. 抗体と抗原の組合せによる賦活化耐性の回数から、染色する順番等を数条件仮決定します。
5. 「4」の結果を元に多重染色を実施し、最適な条件を決定し、本番染色に進みます。

《ご用意いただくもの》

- ・ 対象抗体の抗原が必ず発現している組織または培養細胞 (湿固定臓器または FFEP 包埋ブロック)
- ・ 1 次抗体 (弊社での代理購入を実施します)

他のソリューションとは異なり、本キットは多くのパネルが設定できる反面、多くの事前検討が必要となります。

ご希望の染色抗体情報をいただければ、抗体探索からパネル検索からのご相談、本キットの準備からお受けすることが可能です。

RNA と蛋白の同時多重染色

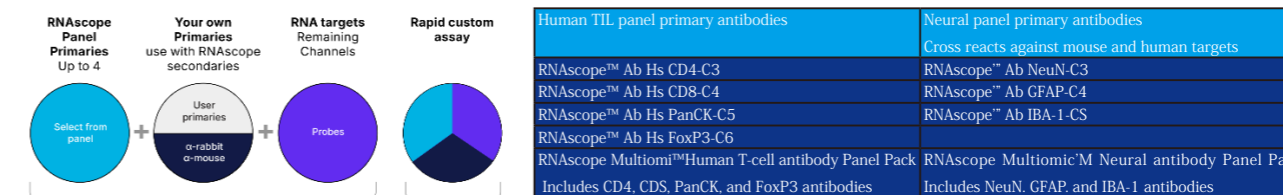
RNAscope™ Multiomic LS Assay

biotechne / ACD

RNAscope™ Multiomic LS Assay は、同一組織切片中の RNA とタンパク質の両方を高感度かつ高特異性で検出し、真のマルチオミクス空間アッセイを実現します。

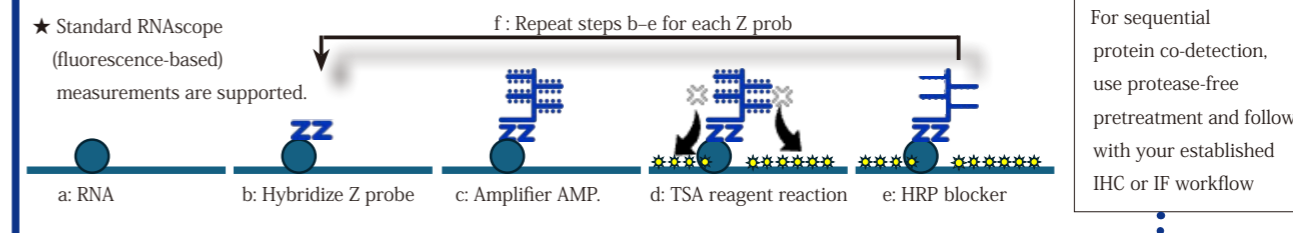
- ・ 実績のあるクラス最高の単分子検出可能な RNAscope 技術を採用
- ・ 柔軟性が高く最大 6 種類の RNA または蛋白を単一細胞解像度で同時検出可能
- ・ 蛋白検出の柔軟性: RNAscope antibodies (例: TIL Panel) が準備され、さらにはお手持ちの 1 次抗体も使用可能
- ・ 多くの抗体を適合させるために、プロテアーゼフリー試薬とプロテアーゼの両方がセットされています。

このアッセイは、RNAscope Multiplex v2 アッセイと同じテクノロジーに基づいており、既存のプロープおよびワークフローと互換性があります。Leica Biosystems の BOND RX 用の自動化アッセイとして設計されています。

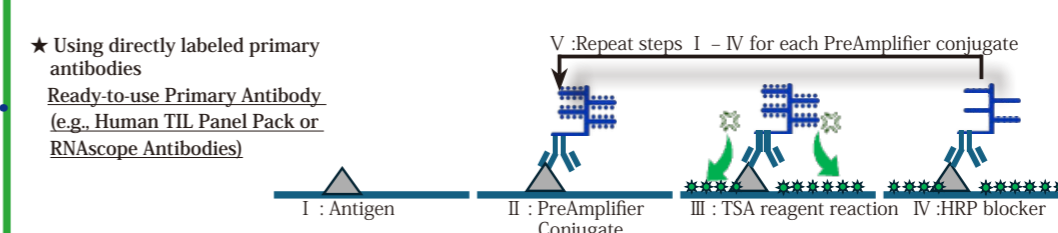


詳細または最新の情報は Biotechne/ACD の HP からご確認ください。

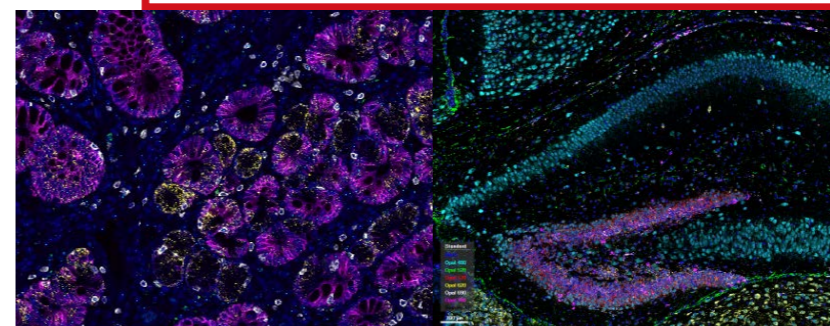
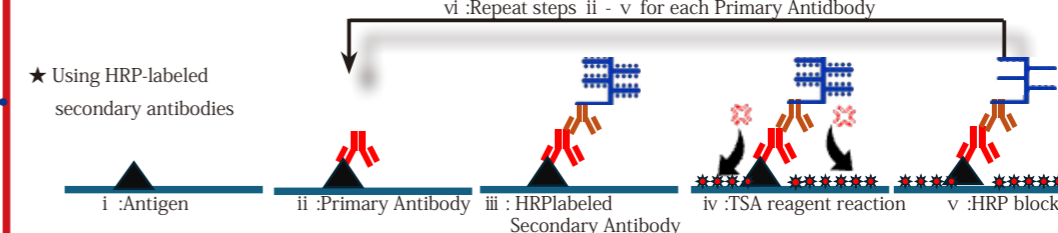
RNA Detection Workflow (RNAscope):



Full Multiomic Workflow using RNAscope antibodies:



Your own unconjugate antibody:



【原理】 TSA 反応後に HRP Blocker を使用して HRP を不活性化して、次の抗体またはプローブの反応を可能にする流れです。

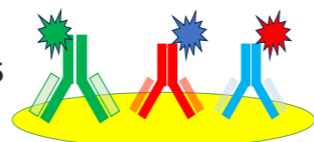
ご希望の染色情報をいただければ、プローブまたは抗体の検索からのご相談をお受けすることが可能です。RNAscope™ Multiomic LS Assay kit は受託時にワンストップで準備させていただきます。

ダイレクトラベル抗体の利用

市販ダイレクトラベル抗体の利用

市販の免疫染色に利用可能なダイレクトラベル抗体を利用するメリットは以下の様に多彩であることです。

- FFPE 検体だけではなく、凍結検体にも対応するものが選択可能な場合があります。
- 市販品の対応項目数は標識が Alexa 関係だけでも以下のように増えてきています(2025年8月時点弊社調査)



抗体メーカー例	Human	Mouse
Cell Signaling Technology	277 抗体	236 抗体
ABCAM	667 抗体	282 抗体
Proteintech	2,900 抗体以上	1,977 抗体以上

- さらに、購入後に免疫染色に使用可能かの検討が必要となりますが、各社からカスタムで一定量の抗体に標識を行うサービスも増えて来ています。

<市販ダイレクトラベル抗体を使用する際の手順>

抗体の選択に際して免疫染色（FFPE または凍結）が可能な抗体は、賦活化条件と抗体の希釈倍数の情報が HP 等から確認することができます。しかし、研究に用いる材料（臓器）、固定条件、使用する FFPE 包埋ブロックの作製時期等については様々な条件の組合せとなります。特に抗体の希釈条件は抗体メーカーの情報からかなり広い濃度が指定（例：100 倍から 2000 倍等）されている事が多く、最低でも事前に簡単な染色条件確認（詳細後述）からのご依頼をご提案させていただきます。

また、蛍光色との組合せの検討も必要となってきます。

弊社での抗体へのダイレクトラベル & ストリッピングまたはクエンチングの組合せ

<弊社での抗体へのダイレクトラベル>

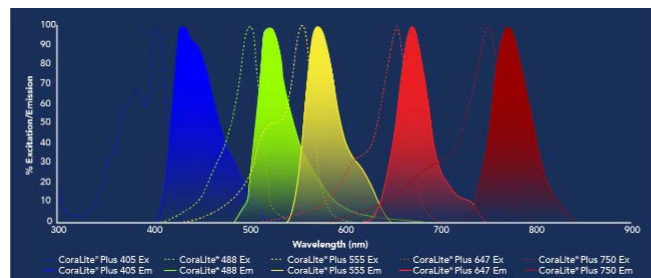
以下のような場合は、弊社で各種蛍光物質をダイレクトラベルして利用する方法もあります。

- 市販品製品パネルで適切なものが見つからない。
- 市販品にダイレクトラベル抗体が無い。
- 自社開発抗体（オリジナル抗体）を利用したい。

弊社では、BSA、グリセリンまたはアジ化ナトリウム等が含まれている抗体（ポリクローナル抗体は対応不可能）にもラベルすることが可能です。

▶ダイレクトラベル方法：FlexAble 抗体標識キット

- IgG と高い親和性を示す“非”共有結合性の『FlexLinker』を用いて抗体を標識します。
- 使用される蛍光色素：CoraLite®&CoraLite Plus
 - CoraLite® および CoraLite Plus は、プロテインテック社独自の蛍光色素で、光安定性に優れ、蛍光の漏れ込みを最小限に抑えた色素であり、蛍光多重染色の組み合わせが可能です。
 - CoraLite® および CoraLite Plus 蛍光色素は、一般的に広く用いられている Alexa Fluor® 蛍光色素と同等の明るさを示します。
 - 重複する蛍光スペクトル領域が最小限であり、共局在を調べる際にそれぞれの蛍光色素を同時に使用できます。
 - 市販品のダイレクトラベル抗体との組合せでの利用も可能です。
 - ラベル後の安定性が数日に限定されていますので、弊社でのラベル操作となります。
- 本番染色で大量のダイレクトラベル抗体が必要な場合は Proteintech へのダイレクトラベル依頼に切り替えることも可能です。(Proteintech の市販品のみ)



<ストリッピングまたはクエンチング>

ダイレクトラベル抗体を利用・併用することで多くの蛍光多重染色が可能となります。しかし、撮影装置側のチャンネル数の制限、蛍光色素の漏れ込み等の影響で検出する「数」の制限が出てくる場合があります。

そこで、同一組織上で染色を繰り返し（ROUND）、撮影を繰り返すことで、原理上は数十の多重染色が可能となります。そのためには前染色で固定された抗体または蛍光色素を除去する方法が必要となり、ストリッピングまたはクエンチングという手法を開発・導入しました。

	ストリッピング	クエンチング
概要	組織上の抗原と反応した1次抗体または1次抗体と二次抗体の免疫複合体を賦活化（熱、pH）または共有結合を乖離させる方法で組織上から「剥がす」ことで、次の蛍光免疫染色を可能にする手法です。	組織上の抗原と反応したダイレクト抗体の「蛍光」を消滅させて、次の蛍光免疫染色の蛍光を成立させる方法です。
原理 Image	<p>① ROUND 1：免疫染色 >撮影</p> <p>ストリッピング</p> <p>② ROUND 2：免疫染色 >撮影</p> <p>ストリッピング</p> <p>③ ROUND 3：免疫染色 >撮影</p> <p>以降繰り返し多重染色データを得る。</p>	<p>① ROUND 1：免疫染色 >撮影</p> <p>クエンチング</p> <p>② ROUND 2：免疫染色 >撮影</p> <p>クエンチング</p> <p>③ ROUND 3：免疫染色 >撮影</p> <p>以降繰り返し多重染色データを得る。</p>
メリット	多くのエビデンスがある。	最終のクエンチング処理後に HE 染色が同じスライドで取得できる
デメリット	賦活化を繰り返すことで抗原の劣化が発生し、ストリッピング後の抗原抗体の反応が低下することがあり、抗体の反応順番を検討する必要がある。賦活化条件や抗体の親和性力によりストリッピングが弱く前反応の抗体（蛍光）が残存する場合もあり、事前の検討が必要である。同一組織での HE 染色で形態が維持できず、完全連続切片で HE を行い形態を確認する必要がある。	近接する抗原やエピトープがある場合の反応においては免疫反応が阻害されてクエンチング後の免疫反応が阻害される可能性がある。（同じ抗原に対する抗体（クローン別）の反応性を確認するのは適さない可能性がある） 蛍光の種類やクエンチング条件・試薬に差があることが確認されている。
弊社技術（詳細情報開示はできません）	ストリッピング方法として、共有結合を乖離させる方法と賦活化を組み合わせることで、4回以上のストリッピングでも抗原性の維持ができる技術を確認・開発している。	比較的きれいなクエンチング条件を確認・開発し、複数回のクエンチングでも多重染色が可能であることを確認している。

蛍光色素の種類が ROUND 間で同じ組合せであっても、以下の方法で解決可能です。

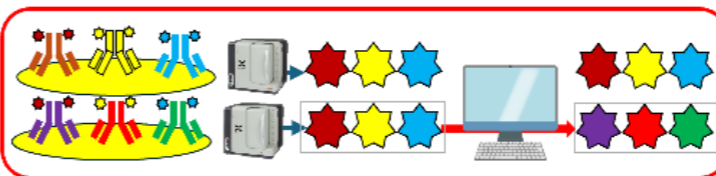
- ①撮影時に擬似カラーという方法で別の色調で撮影する方法
- ②撮影後にビューアソフト上で任意のカラーを設定して研究対象により色を切り替えるという手法

イメージとしては以下のようになります。

3色の蛍光しかなく、ROUND 1 と ROUND 2 が同じ蛍光色を利用した場合



<①疑似カラーでの撮影>
ROUND 2 の撮影時に ROUND 1 と被らない蛍光色に切り替えて撮影する。



<②解析ソフトまたはビューアソフト上での編集>
ROUND 2 の撮影結果を ROUND 1 と被らない蛍光色に切り替える。（解析の際の自由度が高い）



<参考：6色が全部違う蛍光の場合>
そのままの撮影結果が反映される。

ダイレクトラベル抗体利用時の免疫染色の条件検討

標準化された「染色条件探索サービス」

免疫染色に使える抗体なのか、さらに良い染色条件が無いかの探索するサービスで、ダイレクトラベル抗体以外の通常の受託サービス（ダイレクトラベル操作前の抗体評価）です。この条件検討内容をベースに事前に打合せた計画書に沿って実施し、結果は試験報告書にて報告します。

注意事項：WB、ELISA で使用できても免疫染色で使用できるとは限りません。免疫染色に利用できる抗体の開発成功率は数%にも満たないと報告されています。

材料	検討条件数	検討内容	
		前処理	抗体濃度
パラフィン	36条件	6条件	6濃度
	24条件	4条件	6濃度
	12条件	2条件	6濃度
凍結	固定組織	18条件	3条件 6濃度
		12条件	2条件 6濃度
		6条件	1条件 6濃度
	未固定組織	18条件	3条件 6濃度
		12条件	2条件 6濃度
		6条件	1条件 6濃度

市販抗体や自社開発した抗体が研究に使用できるかという事前コンサルティングを含め、試験計画書を依頼者に承認いただき作業に入ります。

納品物は以下となります。

- ・試験計画書、試験報告書（写真付き報告書：書面およびデジタルファイル）
- ・染色済みスライドと試験報告書に使用した染色画像ファイル
- ・オプション：染色済みスライドのWSI画像

多重染色（明視野・暗視野）での検討も可能です。詳しくはお問い合わせください。本サービス成功報酬制ではありません。結果を成果として納品させていただきます。

【参考例】 明視野（※1）

抗体相対濃度	Conc.0	Conc.1	Conc.2	Conc.4	Conc.8	Conc.16
賦活化 A						
賦活化 B						
賦活化 C						
賦活化 D						
賦活化 E						
賦活化 F						

暗視野（※2）

抗体相対濃度	Conc.0	Conc.1	Conc.2	Conc.4	Conc.8	Conc.16
賦活化 A						
賦活化 B						
賦活化 C						
賦活化 D						
賦活化 E						
賦活化 F						

ダイレクトラベル抗体利用時の条件検討例（パラフィン）

下記は受託の流れの一例です。

	市販ダイレクトラベル抗体 (A)	弊社での抗体へのダイレクトラベル (B)
①明視野での検討 (前述)		抗体情報（メーカー、作製元）による賦活化条件により、36条件・24条件・12条件・6条件で実施 染色位置を含め免疫染色で使用できるかの可能性を確認する。
②暗視野での検討	市販抗体の賦活化条件が固定されている場合は、能書に記載されている抗体濃度がカバーできる範囲の抗体6濃度条件で適切な反応濃度を確保 例) 暗視野（※2）「賦活化 A」の行>最低検出濃度「Conc 2」の2管上の「Conc 8」と設定する。	1. 抗体にダイレクトラベルを実施 2. ①で得られた賦活化条件で固定 3. 明視野での抗体濃度の確認 明視野 vs 暗視野（ダイレクトラベル）= 1 : 2~4位の差となるので、①の結果の2~4倍濃い濃度を中心に5濃度（0濃度含めて6濃度）での至適濃度の確認を行う。
③1次抗体の混合調整	②で確認された1次抗体を最終濃度が混合後の濃度に調整する。 例；4 μg/ml が最終濃度として確認された抗体が4種類ある場合は、16 μg/ml に調整した4抗体を均一量で混合すると全抗体が4 μg/ml で反応させることが可能となる。	

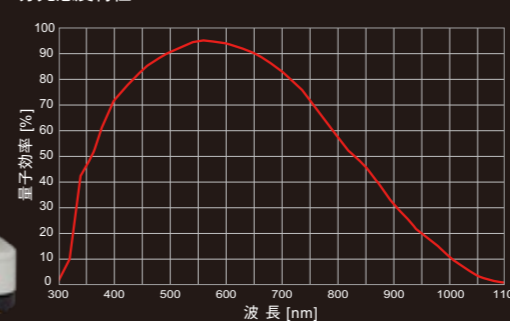
MoxiePlex を導入した理由

- ・ 最大9色のマルチプレックス&アンミキシング蛍光画像撮影
- ・ 高精度・ハイスループットの処理能力
- ・ 充実した装置性能：簡単な操作、高度な組織認識力、自動スキャン

蛍光マルチプレックス解析に適したシステム



分光感度特性



MoxiePlex は、ガラススライド上の多重蛍光サンプル全体に対して、最大で9色の蛍光イメージングが可能です。各色 16bit の出力が可能のため、画像解析に重要となる高い定量性を有する高精度場画像を取得できます。さらに 400nm~900nm の波長域に対して高い量子効率を持つ独自の検出カメラを採用しているため、蛍光試薬の選択の幅が広がり、蛍光強度の低いバイオマーカーも検出することが可能です。

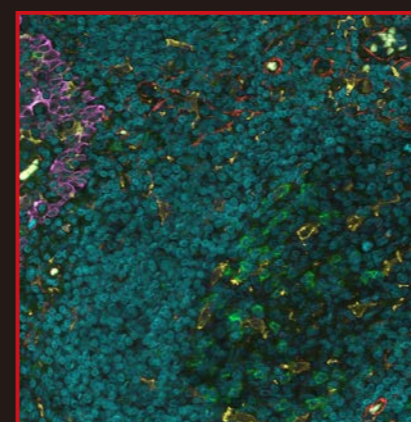
	装置仕様（弊社納品）
スライド搭載枚数	60 slides
対物レンズ	20X (10X,40X 将来装着予定・Automatic) 現在 20倍 40倍撮影可能
明視野スキャン時間	60 sec (20x mode), 70 sec (40x mode)
蛍光スキャン時間	20x objective, (15mm x 15mm) 14 minutes (including unmixing) (15 x 15mm, 40x mode and 5 colors)
Multiplex 撮影数	9 colors (Max)



← MoxiePlex についての詳しい情報は「浜松ホトニクス社」のHPを御覧ください。



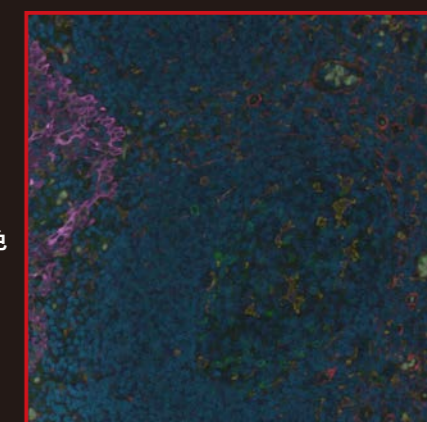
MoxiePlex vs NanoZoomer XR の蛍光画像比較



← MoxiePlex

NanoZoomerXR →

- ・ 同じ染色スライドを両機種で撮影した結果です。
- ・ MoxiePlex の方が構造物が明瞭に撮影されており、自家蛍光も低く、全体のコントラストも高い結果です。
- ・ NanoZoomer XR で MoxiePlex の様な染色強度に調整すると自家蛍光が増強する様な結果となっています。



NanoZoomer XR は 2025 年 9 月時点で当社の装置での撮影であり、ほぼ同時に実施した比較です。

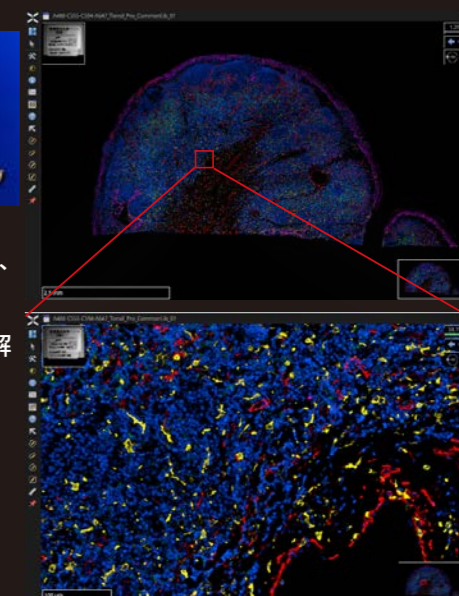
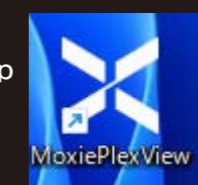
もちろん、明視野での HE 染色、特殊染色、IHC の撮影も十分な機能を有しており、ビューアソフト上で明視野と蛍光画像を重ねて表示することも可能で、組織形態を含めた包括的な観察・解析が可能です。

専用ビューアソフトの提供

MoxiePlex で撮影された画像データは、蛍光: .ome.tif、明視野: .ndp のファイル形式で提供されます。

このファイルを開くために【MoxiePlexView】ソフトが用意されており、一定の許諾条件（許諾承認要）の元で無償提供されます。従来の NDPviewer の使用感と同様に、蛍光の調整、アノテーションの記載追記（長さ、面積）、スクリーンショット撮影、複数画像同時表示等の機能が整備されています。ome.tif は一般フォーマットですので、フリーソフトである【Qpatho等】や、各種解析ソフトでも開いて閲覧・解析に利用することも可能です。

（現在、ファイルのマージは Qpatho の機能を用いて実施する形ですが、近い将来 MoxiePlexView にも組み込まれる予定です）



【アンミキシング技術】と【自家蛍光の低減技術】について

蛍光染色標本を撮影する際に「漏れ込み」と「サンプル内の各自家蛍光」に注意し、目的の観察物を正確に観察または解析する必要があります。

【漏れ込み】

解析や観察対象のチャンネルに隣接するチャンネルからの蛍光が観察されこれを「漏れ込み」と言います。この漏れ込みは、複数の蛍光色素の多重染色を含む実験・撮影において発生する可能性があります。基本的な解決方法としては

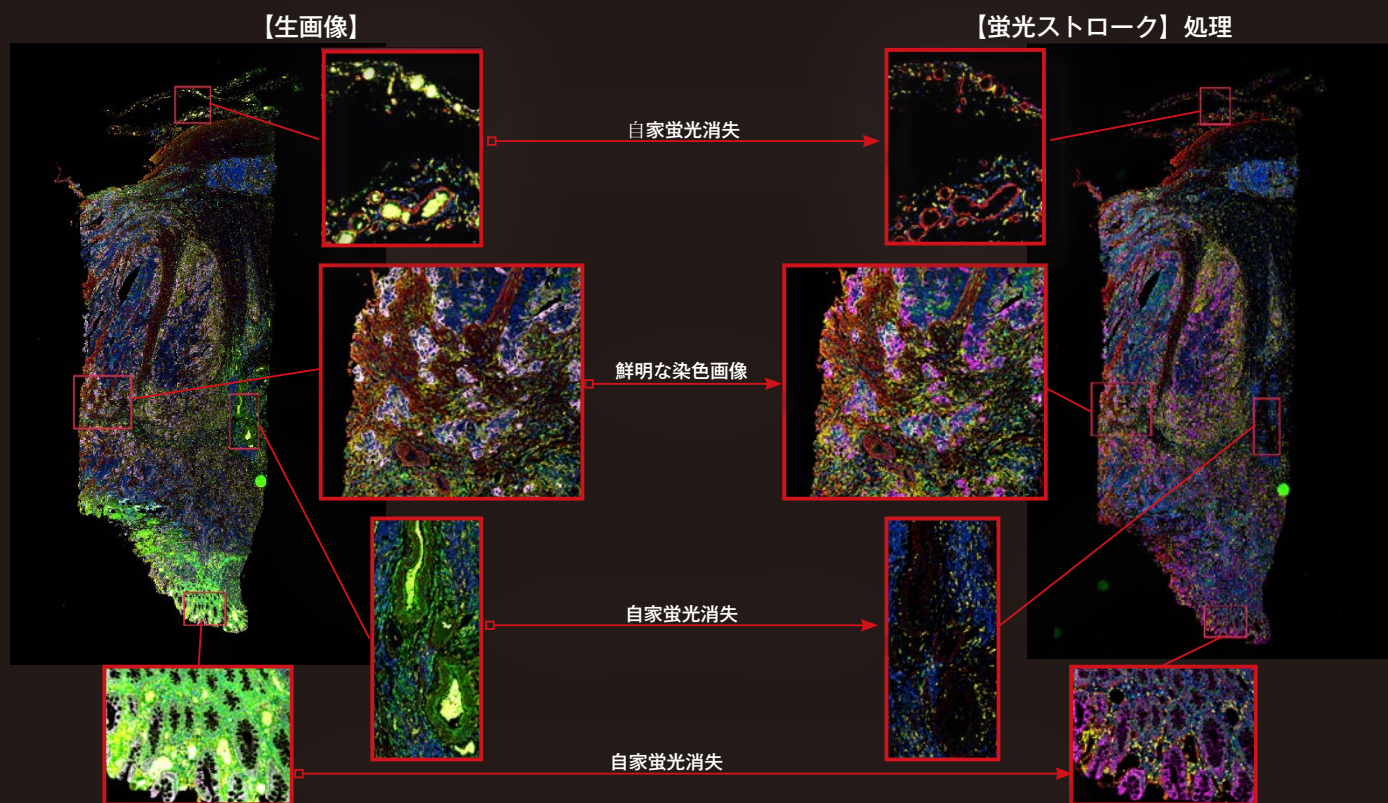
- ・ 蛍光色素とフィルターの選択を適切に行い、スペクトルがお互いにオーバーラップしない蛍光色素またはフィルターの選択を行う。
- ・ 蛍光スペクトルの狭い蛍光色素を選択する。

【自家蛍光 (バックグラウンド)】

病理での蛍光観察実験におけるバックグラウンド蛍光の原因のいくつかを以下に示します。

1. 蛍光色素：試料中の非結合性の色素または色素の非特異的結合
 - ・ ご自分で蛍光物質を標識する際にフリーの蛍光物質を十分に分離除去していない場合に蛍光物質が観察対象と反応してしまうことがあります。
 - ・ F/P 比 (Fluorescent Probe / Protein ratio：タンパク質 1 分子あたりに結合している蛍光物質の平均分子数) が高いほど高感度な検出が可能ですが、標識が過剰だと蛍光消光、シグナル飽和、蛍光と観察対象間の非特異反応による観察対象の不鮮明等のデメリットが生じます。
2. サンプル自体に自家蛍光を発生する「物」が存在
 - ・ 自家蛍光は 350 ~ 500nm の波長の光で励起され短い波長の光を發します。細胞の構造や性質などによって生じる光の自然放出のことで、物質に光を照射すると、光の吸収によって電子が励起状態となり、その状態から基底状態に戻るときに光を發するのが原理です。
 - ・ 特に病理標本の蛍光染色で課題となるのが赤血球の自家蛍光が代表的です。

数色の多重染色では漏れ込みは工夫により回避できる場合がありますが、7色・8色となっていくと漏れ込み回避が難しくなり、さらに自家蛍光の回避は難しくなっていきます。形態学的に赤血球等を確認し一定のアルゴリズムで除去するという方法もありますが、それでは手間と時間がかかっていくだけとなります。MoxiePlex は独自の【アンミキシング技術】と【自家蛍光の低減技術】技術で、特異的な蛍光を検出し、観察・解析を優位に実施する技術が導入されています。以下一例です。



株式会社 BREXA Advan

病理受託部

〒 198-0005 東京都青梅市黒沢二丁目 979 番地の 2

TEL : (0428) 85-8601

お問い合わせ bady-pathology@brexa.com

または右の二次元バーコードから>>

受託 HP <https://pathology-brexaadvan.com>



ご注意：本案内のサービスおよび装置仕様はサービス受託の際に変更される場合があります。詳しくは、お問い合わせにてご確認ください。

本資料の表現は弊社調査結果に基づいております。また、使用されている画像はイメージです。