

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4555232号
(P4555232)

(45) 発行日 平成22年9月29日(2010.9.29)

(24) 登録日 平成22年7月23日(2010.7.23)

(51) Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K 49/00 A
A 6 1 B	1/00	(2006.01)	A 6 1 B 1/00 3 0 0 D
G O 1 N	33/48	(2006.01)	G O 1 N 33/48 P

請求項の数 8 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2006-16678 (P2006-16678)	(73) 特許権者	000113263
(22) 出願日	平成18年1月25日(2006.1.25)		H O Y A 株式会社
(65) 公開番号	特開2007-197350 (P2007-197350A)		東京都新宿区中落合2丁目7番5号
(43) 公開日	平成19年8月9日(2007.8.9)	(74) 代理人	110000084
審査請求日	平成20年10月7日(2008.10.7)		特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織の蛍光染色方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

フルオレセイン又はその塩を含有する $pH 4 \sim 6.5$ の酸性水溶液で、生体組織又は生体由来組織を処理して染色した後、当該処理部分を $pH 4 \sim 6.5$ の酸性条件下で蛍光観察することを特徴とする生体組織又は生体由来組織の蛍光染色方法。

【請求項2】

フルオレセイン又はその塩を含有する $pH 7 \sim 10$ の水溶液で、生体組織又は生体由来組織を処理して染色した後、当該処理部分に $pH 4 \sim 6.5$ の酸性水溶液を塗布後に蛍光観察することを特徴とする生体組織又は生体由来組織の蛍光染色方法。

【請求項3】

フルオレセイン又はその塩を含有する $pH 4 \sim 6.5$ の酸性水溶液又は $pH 7 \sim 10$ の水溶液による組織の処理が、組織への当該水溶液の塗布又は当該水溶液への組織の浸漬である請求項1又は2項記載の蛍光染色方法。

【請求項4】

蛍光観察が、蛍光顕微鏡、蛍光内視鏡又は共焦点撮像システムによる観察である請求項1～3のいずれか1項記載の蛍光染色方法。

【請求項5】

フルオレセイン又はその塩を含有する $pH 4 \sim 6.5$ の酸性水溶液であって、生体組織又は生体由来組織を処理して染色した後、当該処理部分を $pH 4 \sim 6.5$ の酸性条件下で蛍光顕微鏡、蛍光内視鏡又は共焦点撮像システムにより蛍光観察するための生体組織又は

10

20

生体由来組織用蛍光染色剤。

【請求項 6】

フルオレセイン又はその塩を含有する pH 7 ~ 10 の水溶液及び pH 4 ~ 6.5 の酸性水溶液の組み合わせであって、該 pH 7 ~ 10 の水溶液で生体組織又は生体由来組織を処理して染色した後、当該処理部分に pH 4 ~ 6.5 の酸性水溶液を塗布後に蛍光観察するための生体組織又は生体由来組織用蛍光染色剤。

【請求項 7】

フルオレセイン又はその塩を含有する pH 4 ~ 6.5 の酸性水溶液又は pH 7 ~ 10 の水溶液による組織の処理が、組織への当該溶液の塗布又は当該溶液への組織の浸漬である請求項 5 又は 6 記載の組織用蛍光染色剤。

10

【請求項 8】

蛍光観察が、蛍光顕微鏡、蛍光内視鏡又は共焦点撮像システムによる観察である請求項 6 又は 7 記載の組織用蛍光染色剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体組織又は生体由来組織を簡便かつ明瞭に蛍光染色する方法及びそれに用いる染色剤に関する。

【背景技術】

【0002】

生体組織の断面像を得ることは医学生物分野において極めて重要である。従来生体より摘出した組織は化学固定、脱水、薄切、染色することにより断面像を得ることができた。

共焦点撮像システムの開発及び共焦点レーザー顕微鏡の普及により、細胞や結合組織が複雑に多層化した生物試料の断面の観察において、細胞や組織を非侵襲的に観察することが可能となった。さらに現在では、共焦点撮像システムを内蔵した医療用内視鏡が開発されている。

20

【0003】

蛍光色素により生体組織及びそれに由来する試料を染色する操作は、共焦点光学システムにおける蛍光像を観察するに際して必要になる。共焦点顕微鏡及びこれを備える医療用内視鏡などを用いて生体組織の観察を行う際には、染色用の試薬は生物学的に安全なものであることが求められる。

30

【0004】

従来、フルオレセインは生体に安全な蛍光造影剤として、水溶液を静脈に注射して眼底検査等に用いられてきた（非特許文献 1）。また、静脈等の血管を経由しない場合においては、染色用試薬を組織表面に直接撒布し染色することができる。組織表面に染色液を撒布する方法は、摘出した臓器を染色する場合に有効な手段である。また、生体内組織を染色する場合においても、静脈に注射して灌流する染色法と比較して染色液は少量で済み、且つ体内の不要な部位への色素灌流がないという点で染色液による生体への影響を少なくできるという利点を持つ。

【0005】

生体組織表面に撒布されたフルオレセイン溶液は組織内部に浸透し、他の一部は組織表面に液だまりとなって残る。この状態で組織に励起光を照射すると浸透したフルオレセイン分子と組織表面に溜まった同分子がいずれも蛍光を発してしまい、染色部位と非染色部位の違いが不鮮明になる。このため、組織表面に染色剤を撒布する方法では、洗浄により非染色部に残存する遊離のフルオレセイン分子を除去しなければならなかった。

40

遊離の色素は、染色後の組織試料を適切な緩衝液や溶液で複数回洗浄することにより、除去することが可能である。しかし、観察しようとする試料は表面が非常に繊細であり、洗浄する際には試料の変形や破損、組織の変性に注意せねばならず、洗浄操作は丁寧かつ注意深く行わなくてはならない。また、過剰な洗浄は染色を行った組織から色素を脱離（脱色）させる原因ともなる。

50

一方、摘出した組織試料を化学固定せずに染色し共焦点顕微鏡で観察する際には、洗浄操作の過程で組織の自己消化、細胞やタンパク質の変性などが起こってしまい、試料が生体内部での状態とは異なってしまふことが問題となる。

【非特許文献1】Gastroenterology, 127(3), 706-713, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、簡便な操作により組織を正確かつ明瞭に蛍光染色する方法及びこれに用いる染色剤を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

そこで本発明者は、フルオレセインに着目して種々検討した。水溶液に溶解されたフルオレセインは、アルカリ側のpHで蛍光を示し、酸性溶液中ではほとんど蛍光を示さない。従って、従来から、フルオレセインはアルカリ側の溶液として用いられ、かつアルカリ条件下で蛍光観察が行われていた。しかし、本発明者が種々検討したところ、フルオレセインは酸性溶液中では、ほとんど蛍光を示さないにもかかわらず、全く意外にも、組織に結合したフルオレセインは酸性条件下で明瞭な蛍光を示すことを見出した。従って、フルオレセイン処理された組織を、蛍光観察時に酸性条件にすれば、組織に結合しているフルオレセインのみが選択的に蛍光染色でき、組織に結合していないフルオレセインはほとんど蛍光を示さないことから、煩雑な洗浄操作をすることなく、明瞭でかつ正確に組織の蛍光染色像が得られることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、フルオレセイン又はその塩を含有する溶液で、組織を処理した後、当該処理部分をpH7未満の酸性条件下で蛍光観察することを特徴とする組織の蛍光染色方法を提供するものである。

また、本発明は、フルオレセイン又はその塩を含有する溶液であって、組織を処理した後、当該処理部分をpH7未満の酸性条件下で蛍光観察するための組織用蛍光染色剤を提供するものである。

【発明の効果】

【0009】

本発明の染色方法によれば、組織に結合したフルオレセインのみを選択的に蛍光染色できるため、明瞭で、かつ正確な染色像が得られる。すなわち、フルオレセインは通常pHの依存性が高く、pH値が高くなるほど蛍光性が高くなる傾向にあるが、蛍光観察条件を酸性条件にするという従来ではありえなかった条件で生体組織を染色することにより、生体組織内部に浸透し、組織と結合したフルオレセイン分子のみが強い蛍光を発生し、且つ遊離のフルオレセイン分子は蛍光を出さないため、染色後の洗浄や灌流などの煩雑かつ侵襲のある操作を行わずに生体組織の蛍光染色像を観察することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明方法では、フルオレセイン又はその塩を含有する溶液で組織を処理する。ここで、組織には、生体組織及び生体由来組織（摘出組織）のいずれも含まれる。生体組織としては、食道、胃、十二指腸、小腸、大腸、直腸、口腔、泌尿器内腔等が挙げられる。生体由来組織としては、これらの生体組織由来の組織、さらには各種の臓器、筋肉組織等由来組織が挙げられる。

【0011】

本発明に用いられるフルオレセイン又はその塩としては、フルオレセイン、フルオレセインナトリウム、フルオレセインカリウム等が挙げられるが、フルオレセイン、フルオレセインナトリウム塩が特に好ましい。このうち、フルオレセイン及びフルオレセインナトリウム塩（ウラニン）が特に好ましい。ここでフルオレセインは、520nmあたりに緑色の蛍光（490nmで励起）を有するため、Arレーザー光（488nm, 514nm）でよ

10

20

30

40

50

く励起される。ウラニンの水溶液は微量であっても光が当たると緑色の蛍光を発する分子内にキサンテン骨格を持つ染料であり、酸性型になっているものである。ウラニン色素の吸収極大は溶媒により異なるが、450～490nmである。

【0012】

本発明における組織の処理手段としては、組織へのフルオレセイン又はその塩を含有する溶液の塗布又は当該溶液への組織の浸漬が好ましい。ここで、組織として生体組織が対象となる場合には、塗布が好ましい。塗布手段としては、噴霧、撒布等の手段が挙げられる。組織として生体由来の組織を用いる場合は、塗布又は浸漬が用いられる。前記溶液の塗布量は、対象組織全体に溶液が到達する量であればよい。

【0013】

蛍光観察時に前記処理部分がpH7未満の酸性条件になっていればよく、用いる前記溶液は、pH7以上の塩基性溶液であっても、pH7未満の酸性溶液であってもよい。フルオレセイン又はその塩を含有するpH7以上の塩基性溶液を用いる場合には、組織を処理した後に、当該処理部分をpH7未満の酸性溶液で洗浄した後に蛍光観察すればよい。また、フルオレセイン又はその塩を含有するpH7未満の酸性溶液を用いる場合には、組織を処理した後、そのまま蛍光観察すればよい。

【0014】

pH7以上のフルオレセイン又はその塩を含有する溶液は、フルオレセイン又はその塩を含有する水溶液に、水溶液をpH7以上にする塩基性物質、例えば水酸化ナトリウム、酢酸ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、グリシン等を添加することにより調製される。好ましいpHは、7～10であり、特に好ましいpH7～8である。またpHの調整は緩衝剤を用いて行うのが好ましく、例えばリン酸ナトリウム、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-塩酸、リジン-塩酸、アルギニン-塩酸などを用いて行うのがより好ましい。

【0015】

pH7未満のフルオレセイン又はその塩を含有する溶液は、フルオレセイン又はその塩を含有する水溶液に、水溶液をpH7以下にする酸性物質、例えばリン酸、塩酸、炭酸、無機酸、酢酸、クエン酸などの無毒性の有機酸を添加することにより調整される。好ましいpHは4～6.5であり、特に好ましいpHは6～7未満である。またpH調整は緩衝剤を用いて行うのが好ましく、例えばリン酸ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、炭酸ナトリウムなどの無毒の酸性緩衝液を用いて行うのがより好ましい。

【0016】

フルオレセイン又はその塩を含有する溶液中のフルオレセイン濃度は0.001mg/mL～50mg/mL、さらに0.1～10mg/mLが好ましい。濃度10mg/mL以上のフルオレセインではpH5以下では析出しやすい溶液状態であり、濃度0.001mg/mL以下では染色性が低い。

【0017】

前記のように、染色対象の組織の処理部分は、酸性溶液による洗浄、あるいはフルオレセイン又はその塩を含有するpH7未満の酸性溶液による処理により、pH7未満の酸性条件になっているので、遊離のフルオレセインは蛍光を生じず、組織に結合したフルオレセインのみが蛍光を生じる。

【0018】

蛍光観察は、励起光を照射して測定すればよい。蛍光染色像は、蛍光顕微鏡、蛍光内視鏡又は共焦点撮像システムにより観察するのが好ましい。共焦点撮像システムには、共焦点顕微鏡、共焦点撮像システムを有する内視鏡等が挙げられる。

【0019】

本発明の蛍光染色剤は、フルオレセイン又はその塩を含有する溶液がpH7未満の酸性溶液である場合には、当該溶液だけで構成される。一方、フルオレセイン又はその塩を含有する溶液が、pH7以上の塩基性溶液である場合には、pH7未満の酸性溶液(洗浄用)との組み合わせで構成される。

【実施例】

10

20

30

40

50

【0020】

次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。

【0021】

実施例 1

フルオレセインの pH 依存性蛍光発光

フルオレセインナトリウムの水溶液 (1 mg/mL) を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液を用いて pH を調整し、励起波長 490 nm / 蛍光波長 530 nm にて測定した。

蛍光測定にはマイクロプレートリーダー (コロナ製、MTP - 800AFC) を使用した。

その結果、図 1 に示すように、フルオレセインの蛍光強度は pH が高くなるほど強くなることがわかった。

10

【0022】

実施例 2

フルオレセインナトリウムのラット大腸染色試験

ラット (8 週齢、オス) の大腸をホルマリン固定したものをを用いて pH に対する染色性の違いを観察した。大腸をリン酸緩衝生理的食塩水 (137 mmol/L NaCl, 8.1 mmol/L Na₂HPO₄, 2.7 mmol/L KCl, 1.57 mmol/L KH₂PO₄, 以下 PBS (-) とする) で 10 秒間洗浄した後、フルオレセインナトリウム (Sigma 製, F6377, 以下 F - Na とする) を調整後、酸、アルカリ、中性の緩衝液で 1 mg/mL に希釈した溶液に浸漬する。緩衝液はそれぞれ 0.1 M・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.1)、0.4 M NaH₂PO₄ 緩衝液 (pH 4.65) を用いた。さらに PBS (-) で 10 秒間洗浄した後、10%ホルマリンリン酸緩衝液で固定したものを共焦点顕微鏡 (ライカマイクロシステムズ製, TCS - SP2) で観察した。

20

【0023】

いずれも染色はよくされてはいたが、pH 7.0 及び 9.0 の緩衝液で希釈した F - Na はバックグラウンドが高くなり、細胞の観察を行うのは適さなかった。

【0024】

実施例 3

溶媒の pH 変化による色素の浸潤および蛍光性の違い

ラット (8 週齢、オス) の大腸を摘出し染色試験を行った。

F - Na (Sigma 製, F6377) を 1 mg/mL で調整し、0.1 M・リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0)、0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.1)、0.4 M NaH₂PO₄ 緩衝液 (pH 4.65) でそれぞれ 0.1 mg/mL に希釈した溶液をつくり、組織を 1 分間浸漬した。さらに PBS (-) で 10 秒間洗浄した後、共焦点顕微鏡 (ライカマイクロシステムズ製, TCS - SP2) にて観察を行った。結果を表 1 に示す。

30

【0025】

【表 1】

溶媒	pH	目視による蛍光強度 (5 段階標記)		観察された像の状態 (蛍光画像の明瞭さ)
		液だまり中の遊離 フルオレセイン	組織内部のフル オレセイン	
0.4M NaH ₂ PO ₄ 溶液	4.65	1	3	明瞭
0.1M リン酸 Na 緩衝液	7.0	5	3	明瞭ではないが組織を認識することは可能
0.1M ホウ酸 Na 緩衝液	9.1	4	3	液だまりのほうが蛍光が強い

40

【0026】

実施例 4

F - Na (Sigma 製, F6377) の等張条件下、pH 4 ~ 7 の範囲での組織染色観察を

50

行った。

ラット（8週齢、オス）の大腸を摘出し、リン酸緩衝生理食塩水（ 137 mmol/L NaCl 、 $8.1\text{ mmol/L Na}_2\text{HPO}_4$ 、 2.7 mmol/L KCl 、 $1.5\text{ mmol/L KH}_2\text{PO}_4$ 、 $4.4\text{ mmol/L CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $1.6\text{ mmol/L MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、以下PBS（+）とする）にて洗浄した後、各pHに調整したF-Na（ 0.1 mg/mL ）に1分間浸漬し、染色したものを共焦点顕微鏡（ライカマイクロシステムズ製、TCS-SP2）にて観察を行った。

ここで生理食塩水を用いての対照試験を同時に行った。静脈注射などで用いられるF-Naの溶媒として生理食塩水が用いられるためである。

共焦点顕微鏡の撮影条件は共焦点ピンホール径を 1.00 airy 、レンズは $\times 20$ 倍及び $\times 63$ 倍油浸レンズの2種類を用いる。Gain値を自動で補正するように設定し、最適な輝度にて観察を行った。

5 mg/mL フルオレセインNa/D.W.を調整し、各pHのクエン酸リン酸緩衝液と生理食塩水を用いて希釈し 0.1 mg/mL とする。調整染色液に浸した後はPBS（+）で洗浄し、観察した。結果を表2に示す。

【0027】

【表2】

クエン酸リン酸緩衝液 pH	目視による蛍光強度 (5段階標記)		観察された像の状態 (蛍光画像の明瞭さ)
	液だまり中の遊離フルオレセイン	組織内部のフルオレセイン	
4.0	1	3	明瞭
5.0	1	4	明瞭
6.0	2	4	明瞭
7.0	3	4	明瞭ではないが組織を認識することは可能
生理食塩水	3	4	液だまりのほうが蛍光が強い

【0028】

実施例5

実施例4で用いた大腸切片を薄切したものを観察し、染色液の浸透度を観察した。

実施例4同様pH（ 4.0 、 5.0 、 6.0 、 7.0 ）及び生理食塩水を用いて希釈し 0.1 mg/mL に調整した。

蛍光顕微鏡（ZEISS社製、LSM510）を使用し、撮影条件はピンホール径 1.0 及びMaxとして撮影し、レンズは $\times 20$ 倍、 $\times 40$ 倍のものを用いた。

切片を観察することで上皮細胞の $50\text{ }\mu\text{m}$ 程度がよく染色されており該部分に蛍光が強くみられることが確認できた。

pHの異なる染色液を用いて観察を行ったが、組織の浸透度に大きな違いは見られなかった。

【0029】

実施例1～5から、フルオレセインアルカリ条件下では遊離のものも、組織に結合したものも蛍光を生じるが、酸性条件下では組織に結合したものだけが蛍光を生じることが明らかである。

【0030】

実施例6

pHを 6.0 に固定し、異なる濃度で観察を行った。

F-Na（Sigma製、F6377）の濃度は各 10 、 1.0 、 0.1 、 0.01 、 0.001 mg/mL とし、クエン酸リン酸緩衝液（pH 6.0 ）で調整後、共焦点顕微鏡（ライカマイクロシステムズ製、TCS-SP2）で観察を行った。

10

20

30

40

50

共焦点顕微鏡の撮影条件は共焦点ピンホール径を1.00 airy、レンズは×20倍及び×63倍油浸レンズの2種類を用いる。Gain値を自動で補正するように設定し最適な輝度にて観察を行った。

低濃度の0.01及び0.001 mg/mLでは染色像を確認することが出来たが、輝度が低いため、鮮明な画像を得ることができなかった。

結果として、0.1～10 mg/mLの範囲では組織浸透性のある鮮明な画像が得られた。

【0031】

実施例7

実施例6で用いた大腸切片を薄切したものを観察し、染色液の浸透度を観察した。

実施例6同様、濃度は各100, 10, 1.0, 0.1, 0.01, 0.001 mg/mLとし、クエン酸リン酸緩衝液(pH6.0)で調整後、共焦点顕微鏡(ZEISS社製, LSM510)の撮影条件は共焦点ピンホール径1.0及びMaxにて撮影し、レンズは×20倍、×40倍を使用した。

その結果、濃度の違いによる観察においては高濃度のものほど粘膜固有層が濃く染色されていた。

【0032】

【表3】

濃度(mg/mL)	粘膜固有層	上皮細胞	核	ゴブレット
10	+++	+++	-	-
1.0	++	+++	-	-
0.1	++	+++	-	-
0.01	+	+++	-	-
0.001	+	+++	-	-

+ : +の数が多いほど好染 - : 染色されず

【0033】

実施例8

フルオレセインナトリウムの染色性の蛍光顕微鏡による観察

フルオレセインナトリウム(以下、F-Na)を染色後、蛍光顕微鏡(ライカ社製, DMIRB)にて観察を行った。

試料としてホルマリン固定されたウサギの小腸を用い、pH4.0及び9.0の条件下で観察した。

F-Naを生理食塩水で1 mg/mlに調整したものを各pHの0.1 Mリン酸緩衝液で希釈し、0.01 mg/mlに再調整した。

ホルマリン固定のウサギ小腸に洗浄操作を行わずにそれぞれのpHで調整した染色液を塗布し、過剰な染色液をろ紙で吸着除去した後の状態で蛍光顕微鏡観察を行った。対物レンズは40倍のものを用いた。

その結果、pH4.0のものは染色後の洗浄操作を行わなくともウサギ小腸絨毛が染色され、明瞭な蛍光像が得られた。しかしpH9.0のものは染色後にそのまま観察を行った場合、絨毛よりも組織外の液体から蛍光が発せられ不鮮明であった。希釈で用いた0.1 Mリン酸緩衝液(pH9.0)で周辺の蛍光溶液を除去するための洗浄操作が必要であった。

【0034】

実施例9

フルオレセインナトリウムの注腸染色

生体内においては、消化器は常に粘液を分泌したり、あるいは逆に体内に取り込まれ消化される。内視鏡での使用時と同様の環境下で本発明の効果を検証するために、生体大腸での染色性を観察した。

酸性領域とアルカリ領域の二つのpHでの生体大腸の染色性と共焦点顕微鏡(ライカ社製 TCS SP2)観察を行った。

10

20

30

40

50

マウス(9週齢,オス)に麻酔をかけた状態で大腸上部からシリンジ(テルモ27G,0.4mm)を用いてF-Na(pH4,1mg/mL)を500 μ L注入した。10分後に大腸を摘出し、腸内をPBS(+)で洗浄した。

大腸の摘出部位は盲腸側から5.5~6.5cmを切除して行った。

図2(ゲイン値480V,上皮から約0 μ m)から、pH4.0では組織の構造を明瞭に観察することが出来、杯細胞が不染であった。

さらにF-NaのpH9.0(1mg/mL,500 μ L)の染色液を用いて観察を行った。pH9.0の染色液では以前のpH差による観察同様、染色部位と遊離のF-Naのある液溜まりとの間で蛍光輝度の差がほとんどなく、組織像は不明瞭であった(図3)。

【0035】

10

実施例10

フルオレセインナトリウム染色における洗浄液のpHによる染色性の違い

フルオレセインナトリウム(以下、F-Na)は、pH7以上の水溶液中で蛍光を強く出す。pH7以上のF-Na水溶液で組織表面を染色すると組織内部及び組織表面の液溜まりが存在するF-Na分子のいずれもが蛍光性を示すため、染色された組織の観察が困難になる。

液溜まりに存在するF-Naは組織表面を洗浄することで除去可能である。しかし洗浄操作により、組織内部のF-Naも溶出するため、染色効果が低下する。

そこでpH7以上のF-Na水溶液で組織を染色後、pH7以下の酸性溶液を少量塗布(撒布)して染色に関与しない遊離のF-Naの蛍光性を消失させ、染色後の観察を行った。結果を表4に示す。

20

【0036】

【表4】

染色液 pH→ 洗浄液 pH	pH9.0→ pH4.0	pH7.0→ pH4.0	pH4.0→ pH7.0
組織内部	染色され蛍光を示す	染色され蛍光を示す	染色され蛍光を示す
液溜まり部	蛍光なし	蛍光なし	蛍光なし
粘膜固有層	染色され蛍光を示す	染色され蛍光を示す	染色されたが、像は不明瞭
細胞の形状 の視認性	上皮組織の細胞の輪郭 を認識できる	上皮組織の細胞の輪郭 を認識できる	細胞形状は認識可能だ がコントラストは低い
陰隔の形状 の視認性	液溜まりと組織内部の コントラストが強く陰窩は明 瞭に見える	液溜まりと組織内部の コントラストが強く陰窩は明 瞭に見える	液だまりが蛍光を発して いて陰窩を認識できない

30

【図面の簡単な説明】

【0037】

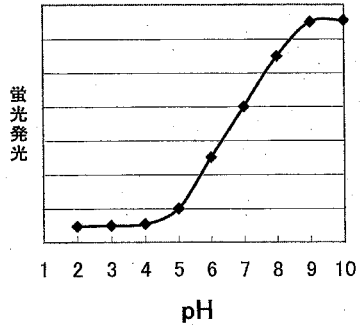
【図1】フルオレセインの蛍光発光のpH依存性を示す図である。

【図2】大腸をpH4.0のフルオレセイン溶液で処理後に蛍光観察した蛍光染色像を示す図である。

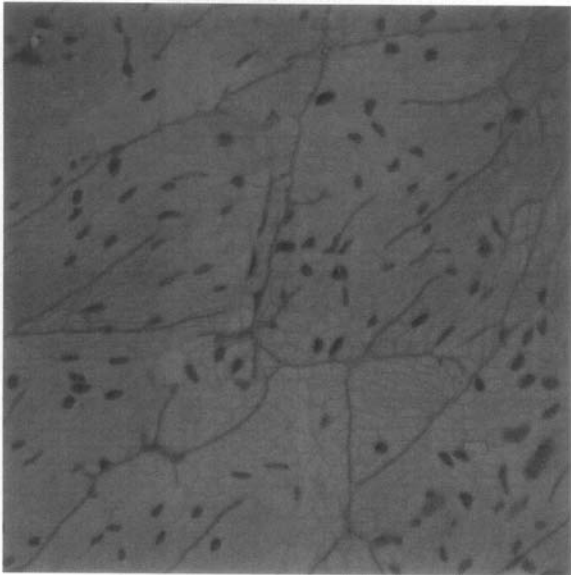
40

【図3】大腸をpH9.0のフルオレセイン溶液で処理後に蛍光観察した蛍光染色像を示す図である。

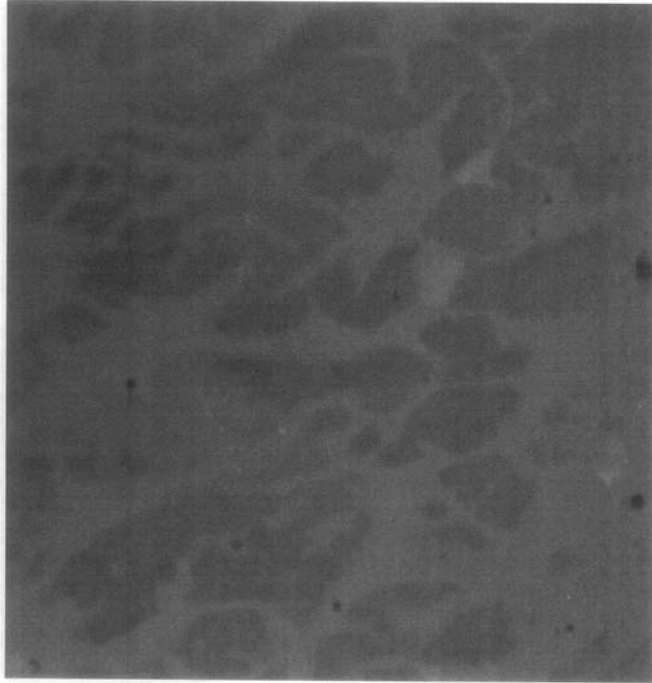
【図1】



【図2】



【 図 3 】



フロントページの続き

- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100121153
弁理士 守屋 嘉高
- (74)代理人 100134935
弁理士 大野 詩木
- (74)代理人 100130683
弁理士 松田 政広
- (74)代理人 100140497
弁理士 野中 信宏
- (72)発明者 山本 晃
東京都板橋区前野町2丁目3番9号 ペンタックス株式会社内
- (72)発明者 飯森 祐介
東京都板橋区前野町2丁目3番9号 ペンタックス株式会社内
- (72)発明者 佐瀬 瑞恵
東京都板橋区前野町2丁目3番9号 ペンタックス株式会社内
- (72)発明者 石黒 麻梨子
東京都板橋区前野町2丁目3番9号 ペンタックス株式会社内

審査官 白形 由美子

- (56)参考文献 特開平03-244395(JP,A)
特開昭61-236732(JP,A)
特開2002-168870(JP,A)
特開平10-179191(JP,A)
Kiesslich,R., et al., Confocal laser endoscopy for diagnosing intraepithelial neoplasias and colorectal cancer in vivo., Gastroenterology, 2004年

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K 49/00

A61B 1/00

G01N 33/48 - G01N 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

PubMed

专利名称(译)	组织荧光染色的方法		
公开(公告)号	JP4555232B2	公开(公告)日	2010-09-29
申请号	JP2006016678	申请日	2006-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	旭光学工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	宾得株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	HOYA株式会社		
[标]发明人	山本晃 飯森祐介 佐瀬瑞恵 石黒麻梨子		
发明人	山本 晃 飯森 祐介 佐瀬 瑞恵 石黒 麻梨子		
IPC分类号	A61K49/00 A61B1/00 G01N33/48		
CPC分类号	G01N1/30 A61K49/0043		
FI分类号	A61K49/00.A A61B1/00.300.D G01N33/48.P A61B1/00.511 A61B1/00.525 A61B1/00.550 A61K49/00		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BA14 2G045/BB14 2G045/BB22 2G045/BB25 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/CB26 2G045/FA16 2G045/FB12 2G045/GB03 2G045/GC15 4C061/HH51 4C061/JJ20 4C085/HH11 4C085/JJ02 4C085/KA27 4C085/KB55 4C085/LL05 4C085/LL20 4C161/HH51 4C161/JJ20		
代理人(译)	村田正树 松田正弘 野信弘		
审查员(译)	白形 由美子		
其他公开文献	JP2007197350A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种荧光染色组织的方法，通过该方法可以在简单的操作中准确且清楚地染色组织，并提供染色剂。ZSOLUTION：这种荧光染色组织的方法包括用含有荧光素或其盐的溶液染色组织，然后在<pH7。的酸性条件下荧光观察处理过的部分。

溶媒	pH	目視による蛍光強度 (5段階標記)		観察された像の状態 (蛍光画像の明瞭さ)
		液だまり中の遊離 フルオレセイン	組織内部のフ ルオレセイン	
0.4M NaH ₂ PO ₄ 溶液	4.65	1	3	明瞭
0.1M リン酸 Na 緩衝液	7.0	5	3	明瞭ではないが組織を認 識することは可能
0.1M ホウ酸 Na 緩衝液	9.1	4	3	液だまりのほうが蛍光が 強い