

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6424825号  
(P6424825)

(45) 発行日 平成30年11月21日(2018.11.21)

(24) 登録日 平成30年11月2日(2018.11.2)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>GO 1 N 33/58</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/58		Z
<b>GO 1 N 33/48</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/48		P
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/53		U

請求項の数 3 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願2015-539128 (P2015-539128)	(73) 特許権者	000001270
(86) (22) 出願日	平成26年9月16日 (2014. 9. 16)		コニカミノルタ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/074418		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(87) 国際公開番号	W02015/045961	(74) 代理人	110001070
(87) 国際公開日	平成27年4月2日 (2015. 4. 2)		特許業務法人 S S I N P A T
審査請求日	平成29年3月22日 (2017. 3. 22)	(72) 発明者	相宮 拓司
(31) 優先権主張番号	特願2013-199781 (P2013-199781)		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ
(32) 優先日	平成25年9月26日 (2013. 9. 26)		ニカミノルタ株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	高梨 健作
			東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ
			ニカミノルタ株式会社内
		(72) 発明者	古澤 直子
			東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ
			ニカミノルタ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光ナノ粒子標識体、多重免疫染色剤キットおよび多重免疫染色法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

蛍光体を集積した状態で有する蛍光体集積ナノ粒子と、  
該蛍光体集積ナノ粒子の表面に結合した数平均分子量 3 0 0 0 以上の親水性高分子鎖 (A) と、

該親水性高分子鎖 (A) の末端に結合した生体分子認識分子と、  
前記蛍光体集積ナノ粒子の表面に結合した数平均分子量 3 0 0 0 未満の親水性高分子鎖 (B) と、

を備えた蛍光ナノ粒子標識体を有する蛍光免疫染色剤、および明視野観察可能な化学免疫染色剤を用いた多重免疫染色法であって、

前記生体分子認識分子が、蛍光免疫染色対象の生体分子と特異的に結合可能な 1 次抗体に結合可能な 2 次抗体に連結されたビオチンと結合可能なアビジンまたはストレプトアビジンであり、

前記化学免疫染色剤は発色用酵素が連結された抗体であり、

前記多重免疫染色法は、

病理切片中の生体分子と前記化学免疫染色剤とを結合させる結合工程と、該結合工程の後に前記発色用酵素の基質を添加して発色させる発色工程とを含む、化学免疫染色のための化学免疫染色処理工程と、

前記病理切片中の生体分子であって、前記生体分子と同一のまたは異なった生体分子と前記 1 次抗体とを結合させ、該 1 次抗体に前記 2 次抗体とを結合させ、該 2 次抗体に連結

されたビオチンと前記蛍光ナノ粒子標識体の生体分子認識分子とを結合させる、蛍光免疫染色処理工程とを含み、

前記化学免疫染色および前記蛍光免疫染色を同一の病理切片上で行う、多重免疫染色法

。

【請求項 2】

前記親水性高分子鎖 (A) および / または前記親水性高分子鎖 (B) がポリエチレングリコールである、請求項 1 に記載の多重免疫染色法。

【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の多重免疫染色法に用いるための多重免疫染色剤キットであって、

前記蛍光ナノ粒子標識体を有する蛍光免疫染色剤と、前記明視野観察可能な化学免疫染色剤とを備えた、多重免疫染色剤キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光ナノ粒子標識体、該蛍光ナノ粒子標識体を含む多重免疫染色剤キットおよび該多重免疫染色剤キットを用いた多重免疫染色法に関する。

【背景技術】

【0002】

色素または発色用の酵素が結合した抗体を、組織サンプル中の抗原に抗原抗体反応により結合し、発色させて抗原を検出する手法は、免疫組織化学 (IMMUNOHISTOCHEMISTRY; IHC) による手法として広く知られている。このような免疫組織化学的手法は、本来不可視である抗原抗体反応を可視化する発色処理を伴うことから「免疫染色」と称されることがある。免疫染色は、組織サンプル中の生体分子の所在を検出する目的で、医学分野および生命科学の分野において広く用いられている。

【0003】

免疫染色の一例である DAB 染色では、ペルオキシダーゼを連結した抗体と抗原とを抗原抗体反応により結合させた後、発色処理として過酸化水素および DAB (Diaminobenzidine; ジアミノベンジジン) を添加する。これにより、過酸化水素がペルオキシダーゼにより分解され、分解で発生した  $O_2^{2-}$  により DAB 分子同士が重合して発色する化学反応 (化学発色) が生じ、抗原部分が茶色に染色される。この発色量を計測することで、発現した抗原の大体の量を調べることも可能である。また、免疫染色により細胞の種類や位置を特定することも可能であり、ある種の細胞に特異的に発現するマーカー (CD34 抗原等) を標的とする免疫染色は汎用技術として確立されている。

【0004】

上述した化学発色を利用する免疫染色とは別に、励起光が照射されて蛍光を発するナノ粒子 (半導体微粒子等) と抗体とを連結し、該抗体を抗原抗体反応により抗原と結合させることで、抗原を蛍光染色する方法 (蛍光免疫染色) が知られている (例えば、特許文献 1 ~ 3 参照)。

【0005】

特許文献 1 には、分子量 300 ~ 20000 のポリエチレングリコール (PEG) で表面修飾された半導体微粒子が開示されている。また、前記半導体微粒子の PEG の先端に生体分子を設けることも開示されている。

【0006】

特許文献 2 および 3 には、半導体微粒子の表面を PEG (分子量 300 ~ 3000 等) で修飾し、該表面から最も離れた前記 PEG の先端に官能基 (アミノ基等) を設け、さらに、前記官能基に染色対象の生体分子と特異的に結合可能な他の生体分子 (DNA 等) を結合した生体分子蛍光標識剤や、これを用いた免疫蛍光染色法が開示されている。

【0007】

さらに、上述した単独染色とは別に、2 以上の異なる抗原を同時に検出する多重免疫染

10

20

30

40

50

色法も知られている（例えば特許文献4参照）。

【0008】

特許文献4では、同一組織切片上で2種以上の抗原を検出し、それぞれの抗原が発現する場所や量を評価している。さらに、特許文献4には、前記検出をするための呈色物又は発光物として、標識酵素の基質との反応で呈色ないし発光する物質と、蛍光色素とを併用することが、光学顕微鏡と蛍光顕微鏡又はレーザー共焦点顕微鏡を用いることができる観点から好ましいことが記載されている。

【0009】

さらに、同一の生体分子に対して、化学発色を利用する免疫染色と、蛍光色素による発光を利用する蛍光免疫染色とを併用する多重免疫染色を行うことで、生体分子の検出精度が高まることを開示している。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】特開2004-300253号公報

【特許文献2】国際公開WO2010/004777号公報

【特許文献3】国際公開WO2007/086501号公報

【特許文献4】特開2005-17133号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0011】

本発明者らは、化学発色において所定の生体分子を染色するために、酵素と所定の基質との反応により生じる不溶性沈殿物が、蛍光体に照射する励起光および蛍光体が発する発光を吸収し、上記のような多重免疫染色特有の問題の原因となっているものと推測した。そして、蛍光免疫染色において蛍光体を集積した状態で有する蛍光体集積ナノ粒子を用い、かつその蛍光体集積ナノ粒子に特定の長さの親水性高分子鎖を介して生体分子認識分子を結合させて、所定の生体分子を蛍光免疫染色するようにすると、上記のような問題を回避でき、蛍光免疫染色のみを行う単独染色と同等の水準で、所定の生体分子の蛍光観察を行えることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0012】

30

本発明者らは、化学発色を利用する免疫染色と、蛍光色素の発光を利用する蛍光免疫染色とを併用した多重免疫染色法において、蛍光免疫染色のみを行う単独染色と比べて、前記蛍光色素の発光強度ないし観察される輝点数が低下する問題に気付いた。

【0013】

すなわち本発明は、上記問題に鑑みてなされたものであり、化学発色を利用する免疫染色と、蛍光色素等の蛍光体の発光を利用する蛍光免疫染色とを併用した多重免疫染色法において、上述したような発光強度ないし輝点数の低下を抑制することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

上述した目的を実現するために、本発明の一側面を反映した蛍光ナノ粒子標識体は、蛍光体を集積した状態で有する蛍光体集積ナノ粒子と、該蛍光体集積ナノ粒子の表面に結合した数平均分子量3000以上の親水性高分子鎖(A)と、該親水性高分子鎖の末端に結合した生体分子認識分子とを備えた多重免疫染色用の蛍光ナノ粒子標識体である。

40

【0015】

上述した目的を実現するために、本発明の一側面を反映した多重免疫染色剤キットは、上記蛍光ナノ粒子標識体を有する蛍光免疫染色剤と、明視野観察可能な化学免疫染色剤とを備えた、多重免疫染色剤キットである。

【0016】

上述した目的を実現するために、本発明の一側面を反映した多重免疫染色法は、上記蛍光ナノ粒子標識体を有する蛍光免疫染色剤を用いた蛍光免疫染色と、明視野観察可能な化

50

学免疫染色剤を用いた化学免疫染色とを同一切片上で行う、多重免疫染色法である。

【発明の効果】

【0017】

本発明によれば、上記構成により、蛍光免疫染色と化学発色を利用する化学免疫染色とを併用する多重免疫染色において、前記化学発色で生成された不溶性沈殿物による発光強度ないし輝点数の低下を抑制することができる。この結果、蛍光免疫染色を単独で行った場合に得られる輝点数を多重免疫染色においても確保することができる。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】図1(A)は、従来の多重免疫染色法の概念図を示した図である。図1(B)は、本発明に係る多重免疫染色法の一例を示した図である。 10

【図2】図2は、本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体の一例を示す図である。

【図3】図3は、本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体の他の例を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0019】

以下、本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体、多重免疫染色剤キットおよび多重免疫染色法について説明する。本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体は、多重免疫染色に用いられ、蛍光色素等の蛍光体を集積した状態で有する蛍光体集積ナノ粒子と、該蛍光体集積ナノ粒子の表面に結合した数平均分子量3000以上の親水性高分子鎖と、該親水性高分子鎖の末端に結合した生体分子認識分子等を有しているものである。この蛍光体ナノ粒子標識体を有する蛍光免疫染色剤は、化学発色の染色剤とともに多重免疫染色剤として用いることができる。 20

【0020】

〔蛍光体集積ナノ粒子〕

蛍光体集積ナノ粒子は、蛍光体を集積したものであり、蛍光ナノ粒子標識体と呼ばれることもある。このような蛍光体集積ナノ粒子を用いることで、蛍光体自体と比較して、1粒子当たりの発する蛍光の量、すなわち所定の生体分子を標記する輝点の輝度を高めることができる。

【0021】

<蛍光体>

本明細書において「蛍光体」とは、外部からのX線、紫外線または可視光線の照射を受けて励起し、励起状態から基底状態に到る過程において光を発光する物質一般を指す。したがって、本発明にいう「蛍光体」は、励起状態から基底状態に戻るときの遷移態様の如何を問うものでなく、励起一重項からの失活に伴う発光である狭義の蛍光を発する物質であってもよいし、三重項からの失活に伴う発光である燐光を発する物質であってもよい。また、本発明にいう「蛍光体」は、励起光を遮断してからの発光寿命によって限定されるものでもない。したがって、硫化亜鉛やアルミン酸ストロンチウム等の蓄光物質として知られている物質であってもよい。このような蛍光体は、有機蛍光体(蛍光色素)および無機蛍光体に大別することができる。 30

【0022】

〔有機蛍光体〕

蛍光体としての使用可能な有機蛍光体の例としては、フルオレセイン系色素分子、ローダミン系色素分子、Alexa Fluor(登録商標、インビトロジェン社製)系色素分子、BODIPY(登録商標、インビトロジェン社製)系色素分子、カスケード(登録商標、インビトロジェン社)系色素分子、クマリン系色素分子、NBD(登録商標)系色素分子、ピレン系色素分子、Texas Red(登録商標)系色素分子、シアニン系色素分子、ペリレン系色素分子、オキサジン系色素分子等、有機蛍光色素として知られている物質を挙げることができる。 40

【0023】

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 50

、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を用いてもよい。

10

## 【0024】

〔無機蛍光体〕

20

蛍光体として使用可能な無機蛍光体の例としては、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。)のいずれかを挙げることができる。単独でも複数種を混合したものをを用いてもよい。

## 【0025】

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。

## 【0026】

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、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<sub>2</sub>、Si/ZnS、Ge/GeO<sub>2</sub>、Ge/ZnS等を用いることができるが、これらに限定されない。

30

## 【0027】

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。

## 【0028】

<蛍光体集積ナノ粒子の製造方法>

40

蛍光体を集積した蛍光体集積ナノ粒子の製造方法は、特に制限されず、公知の方法により製造することができる。一般的には、樹脂またはシリカを母体として蛍光体をまとめ上げる(当該母体の内部または表面に蛍光体を固定化する)製造方法を用いることができる。

## 【0029】

<有機蛍光体の場合>

有機蛍光体を用いた蛍光体集積ナノ粒子の製造方法として、蛍光体である蛍光色素を樹脂からなる母体の内部または表面に固定した、直径がナノメートルオーダーの樹脂粒子を形成させる方法を挙げることができる。この蛍光体集積ナノ粒子の調製方法は特に限定されるものではないが、例えば、蛍光体集積ナノ粒子の母体をなす樹脂(熱可塑性樹脂また

50

は熱硬化性樹脂)を合成するための(コ)モノマーを(共)重合させながら、蛍光体を添加し、当該(共)重合体の内部または表面に当該蛍光体を取り込ませる方法を用いることができる。

【0030】

上記の熱可塑性樹脂としては、例えば、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリフラン、または、これに類する樹脂を好適に用いることができる。上記の熱硬化性樹脂としては、例えば、ポリキシレン、ポリ乳酸、グリシジルメタクリレート、ポリメラミン、ポリウレア、ポリベンゾグアナミン、ポリアミド、フェノール樹脂、多糖類またはこれに類する樹脂を好適に用いることができる。熱硬化性樹脂、特にメラミン樹脂は、キシレン等の有機溶媒を用いる脱水、透徹、封入などの処理によっても、色素樹脂に内包させた色素の溶出を抑制することができる点で好ましい。

10

【0031】

例えば、有機の蛍光色素(蛍光体)を内包したポリスチレンナノ粒子は、米国特許4326008(1982)に記載されている重合性官能基をもつ有機色素を用いた共重合法や、米国特許5326692(1992)に記載されているポリスチレンナノ粒子への蛍光有機色素の含浸法を用いて作製することができる。

【0032】

一方で、有機蛍光体をシリカからなる母体の内部または表面に固定化したシリカナノ粒子を製造することもできる。そのような製造方法としては、ラングミュア 8巻 2921ページ(1992)に記載されているFITC内包シリカ粒子の合成方法を参考にすることができる。FITCの代わりに所望の蛍光色素を用いることで種々の蛍光色素内包シリカナノ粒子を合成することができる。

20

【0033】

<無機蛍光体の場合>

無機蛍光体を用いた蛍光体集積ナノ粒子の製造方法として、蛍光体である量子ドットをシリカからなる母体の内部または表面に固定した、シリカナノ粒子を形成させる方法が挙げられる。この製造方法は、ニュー・ジャーナル・オブ・ケミストリー 33巻 561ページ(2009)に記載されているCdTe内包シリカナノ粒子の合成を参考にすることができる。

【0034】

また、上記とは異なる蛍光体集積ナノ粒子の製造方法として、シリカビーズをシランカップリング剤で処理して末端をアミノ化し、カルボキシル基末端を有する蛍光体としての半導体微粒子をシリカビーズの表面にアミド結合により結合することで集積し、蛍光体集積ナノ粒子とする方法も挙げられる。

30

【0035】

さらに別の蛍光体集積ナノ粒子の製造方法として、逆ミセル法と、ガラスの前駆体として分子の末端に半導体ナノ粒子への吸着性が良い有機官能基を有する有機アルコキシシランとアルコキシドの混合物を用いたゾル-ゲル法とを組み合わせることにより、半導体ナノ粒子を内部に分散固定したガラス状の粒子を形成し、蛍光体集積ナノ粒子とする例が挙げられる。

40

【0036】

さらに別の蛍光体集積ナノ粒子の製造方法として、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)の存在化で、アミノ基末端の半導体ナノ粒子と、カルボキシル基末端の半導体ナノ粒子を混合し、半導体ナノ粒子間をアミド結合で介して結合することで半導体ナノ粒子を集積し、蛍光体集積ナノ粒子を製造する例が挙げられる。

【0037】

さらに、無機蛍光体を樹脂からなる母体の内部または表面に固定化した集積体を製造することもできる。たとえば、量子ドットを内包したポリマーナノ粒子は、ネイチャー・バイオテクノロジー 19巻 631ページ(2001)に記載されているポリスチレンナノ粒

50

子への量子ドットの含浸法を用いて作製することができる。

【0038】

[親水性高分子鎖]

蛍光体集積ナノ粒子の表面修飾に用いられる親水性高分子鎖としては、蛍光体集積ナノ粒子と後述の生体分子認識分子とを連結するための、所定の数平均分子量を有する親水性高分子(A)と、必要に応じて親水性高分子(A)以外の任意の(通常は親水性高分子(A)より小さな)数平均分子量を有する親水性高分子(B)とが用いられる(図3のPEG鎖1と、PEG鎖2の例を参照)。

【0039】

親水性高分子(A)、(B)の例としては、特に限定されないがポリエチレングリコール、フィコール、ポリビニルアルコール、スチレン-無水マレイン酸交互共重合体、ジビニルエーテル-無水マレイン酸交互共重合体、ポリビニルピロリドン、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルメチルオキサゾリン、ポリエチルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルオキサゾリン、ポリヒドロキシプロピルメタアクリルアミド、ポリメタアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリヒドロキシプロピルメタアクリレート、ポリヒドロキシエチルアクリレート、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ポリアスパルトアミド、合成ポリアミノ酸などが挙げられる。親水性高分子鎖(A)、(B)は、上記例示された親水性高分子により形成される群から選択された1種類または2種以上の親水性高分子を用いることができる。前述の例示された親水性高分子の中では、ポリエチレングリコール(PEG)が、オキシエチレン単位の数により鎖長を設定し  
10  
20  
20

【0040】

親水性高分子鎖(A)の数平均分子量は、3000以上、好ましくは5000以上であり、また好ましくは20000以下である。この親水性高分子鎖(A)の数平均分子量は、化学発色を利用した免疫染色と、蛍光免疫染色とを行う多重免疫染色を行った場合に、蛍光免疫染色を単独で行った場合と比較して、前記蛍光体に起因した輝点数が同程度確認できるよう調整することができる。この輝点数の確認は、後述するように蛍光顕微鏡等を行うことができる。一方、親水性高分子鎖(B)の数平均分子量は、通常3000未満であり、好ましくは300以上である。この親水性高分子鎖(B)の数平均分子量は、蛍光体集積ナノ粒子同士の凝集を防止する効果などを考慮しながら調整することができる。  
30

【0041】

なお、親水性高分子鎖(A)、(B)については、その分子の長さを調節して本発明の効果を得る観点から、親水性高分子の化学構造中に含まれるポリマー構造単位の数により調節されることが好ましい。例えば親水性高分子がPEGの場合は、オキシエチレン単位(-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O)の数(n)により調節されていることが好ましい。

【0042】

(数平均分子量の測定)

蛍光体集積ナノ粒子の数平均分子量は、テトラヒドロフラン(THF)をカラム溶剤として用いたゲルパーミエーションクロマトグラフィー(GPC)法により測定する。

具体的には、測定試料を1mgに対してTHFを1mL加え、室温下にてマグネチック  
40  
スターラーを用いて攪拌を行い、十分に溶解させる。次いで、ポアサイズ0.45~0.50μmのメンブランフィルターで処理した後に、GPCへ注入する。GPCの測定条件は、40にてカラムを安定化させ、THFを毎分1mLの流速で流し、1mg/mLの濃度の試料を約100μL注入して測定する。カラムとしては、市販のポリスチレンジェルカラムを組合わせて使用することが好ましい。例えば、昭和電工社製のShodex GPC KF-801、802、803、804、805、806、807の組合せや、東ソー社製のTSK gel G1000H、G2000H、G3000H、G4000H、G5000H、G6000H、G7000H、TSK guard columnの組合せなどを挙げることができる。

検出器としては、屈折率検出器(RI検出器)が好ましく用いられる。試料の分子量測  
50

定では、試料の有する分子量分布を単分散のポリスチレン標準粒子を用いて作成した検量線等を用いて算出する。検量線作成用のポリスチレン等としては10点程度用いることが好ましい。

【0043】

親水性高分子と前記蛍光体集積ナノ粒子との結合は、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、化学吸着等の適当な結合様式による結合や、結合力の強さの観点から、アミド結合、エステル結合、イミド結合、マレイミド基へのチオール付加を利用した結合等の共有結合等、あるいは、ビオチン-アビジン結合またはビオチン-ストレプトアビジン結合が好ましい。特に、結合力の強さおよび結合の特異性の観点から、ビオチン-アビジン結合またはビオチン-ストレプトアビジン結合がより好ましい。

10

結合方法の例として、ビオチン-アビジン法、チオール基-マレイミド基のカップリング反応法、化学リンカーを用いる方法、架橋剤(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等)を用いた架橋反応法、イオン結合法等を挙げるることができる。

【0044】

化学リンカーの具体例としては、蛍光体集積ナノ粒子の表面にアミノ基(NH<sub>2</sub>基)が存在する場合、例えば以下の[化1]に示すような、ビオチン(生体分子認識分子)と結合したPEG化試薬を好適に用いることができる。

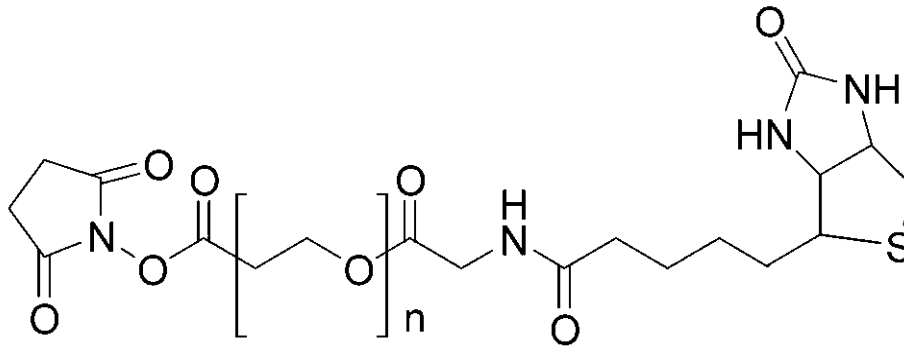
【0045】

20

この場合、PEG化試薬のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル基([化1]の左端部分の官能基)と蛍光体集積ナノ粒子の表面のアミノ基とが反応して、蛍光体集積ナノ粒子にPEG鎖とビオチンが付加されることとなる(図2参照)。

【0046】

【化1】



30

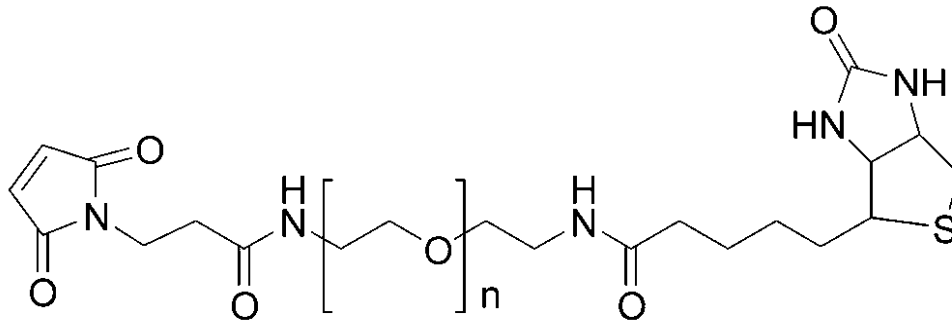
【0047】

また、上記の例とは異なり、蛍光体集積ナノ粒子の表面にスルフヒドリル基(SH基)が存在する場合、例えば以下の[化2]に示すような、ビオチン(生体分子認識分子)と結合したPEG化試薬を好適に用いることができる。この場合、PEG化試薬のマレイミド基([化2]の左端部分の官能基)と蛍光体集積ナノ粒子の表面のスルフヒドリル基(SH基)とが反応して、蛍光体集積ナノ粒子にPEG鎖とビオチンが付加されることとなる(不図示)。

40

【0048】

## 【化2】



10

## 【0049】

[化1]および[化2]のいずれのPEG化試薬の例においても、PEG（親水性高分子）に由来するPEG鎖部分「 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 」の数平均分子量を3000以上とするためにオキシエチレン単位の数（ $n$ ）に設定されることが好ましい。

ポリエチレングリコール（PEG）の代わりに上述した親水性高分子を用いた場合については、親水性高分子由来の部分の鎖長は、上記PEG鎖と同等またはそれ以上の数平均分子量となるように設計して製造し、蛍光ナノ粒子標識体の材料として用いることができる。このような所定の分子量のPEG化試薬等は、例えば、合成メーカー（例えば、CreativePEGWorks等）に合成を依頼して入手することができる。

20

## 【0050】

上記親水性高分子鎖を蛍光体集積ナノ粒子に結合させる前に、結合に必要な官能基をあらかじめ蛍光体集積ナノ粒子や親水性高分子鎖に導入してもよい。例えば、あらかじめ蛍光体集積ナノ粒子に必要な官能基を導入する例としては、熱可塑性樹脂を用いて蛍光体集積ナノ粒子を製造する場合に、スチレンと共にグリシジルメタクリレートモノマーとして用いて共重合させることにより蛍光体集積ナノ粒子の表面にエポキシ基を導入し、さらにアミノ基導入試薬（APS等）を用いたアミノ基導入処理により前記エポキシ基をアミノ基に変換して上記PEG化試薬等を反応させる例が挙げられる。蛍光体集積ナノ粒子1つあたりに結合させる親水性高分子の数は、結合に必要な上記のような官能基の数、あるいは親水性高分子との反応条件などにより調整することができる。

30

## 【0051】

一方、熱硬化性の色素樹脂粒子を製造する場合、メラミン樹脂原料（例えば三和ケミカル社製MX035）をモノマーとして用いて共重合させることにより、表面にアミノ基を有するメラミン系樹脂の色素樹脂粒子を製造し、上記PEG化試薬等を反応させることもできる。

## 【0052】

<生体分子認識分子>

本発明で用いられる生体分子認識分子とは、抗原等の生体分子に特異的に結合する分子を意味する。生体分子認識分子としては、染色対象である特定の生体分子を認識する1次抗体、この抗体を認識する2次（ $\sim n$ 次）抗体、該2次（ $\sim n$ 次）抗体に結合した特定の生体分子を認識またはこれに認識される分子等であり、生体分子認識分子の例としては、抗体やビオチンまたはアビジン（ストレプトアビジン等の類縁体を含む）が挙げられる。

40

## 【0053】

なお、本発明において、「抗体」という用語は、任意の抗体断片または誘導体を含む意味で用いられ、Fab、Fab'2、CDR、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体（ScFv）等の各種抗体を含む。

## 【0054】

本発明において、「抗原」という用語は、生体物質、特に、タンパク質からなる分子または分子断片（ポリペプチド、オリゴペプチド等）を指すが、抗体を作製することができ、免疫染色できる生体物質であれば、タンパク質以外からなる分子または分子断片、例え

50

ば、核酸（一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA（ペプチド核酸）等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子）を抗原とすることができる可能性もある。

【0055】

生体分子認識分子として抗体医薬の構成成分である抗体を用いることができる。抗体医薬としては、例えば、関節リウマチなどの自己免疫疾患、がんなどの悪性腫瘍、ウイルス感染症等の治療に一般的に用いられている抗体医薬が挙げられる。

【0056】

生体分子認識分子と親水性高分子鎖の端部と結合は、蛍光体集積ナノ粒子と親水性高分子鎖との結合と同様、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着、化学吸着等の適当な結合様式による結合や、結合力の強さの観点から、アミド結合、エステル結合、イミド結合、マレイミド基へのチオール付加を利用した結合等の共有結合が好ましい。

【0057】

生体分子認識分子と親水性高分子鎖の端部との結合の具体的な結合方法としては、ピオチン-アビジン法、チオール基-マレイミド基のカップリング反応法、既存の化学リンカーを用いる方法、架橋剤（1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）等）を用いた架橋反応法、イオン結合法等を挙げることができる。

【0058】

化学免疫染色と蛍光免疫染色それぞれの染色対象となる生体分子は特に限定されず、同一であっても異なってもよい。染色対象が2種以上の場合（例えば化学免疫染色の対象をCD34抗原、蛍光免疫染色の対象をVEGFR-2とする場合など）であって、複数の染色対象を異なる染色方法で別々に検出したい場合には、蛍光免疫染色における生体分子認識分子および染色対象の結合様式と、化学免疫染色における生体分子認識分子および染色対象の結合様式は、意図しない結合、分子同士の競合を避けるため、相違させることが適切である。たとえば、化学免疫染色においては、染色対象抗原-1次抗体（マウス抗体）-酵素標識化2次抗体（抗マウスIgG抗体）の複合体を形成させるような結合様式とする一方、蛍光免疫染色においては、染色対象抗原-1次抗体（ウサギ抗体）-ピオチン標識化2次抗体（抗ウサギIgG抗体）-生体分子認識分子としてアビジンを有する蛍光体集積ナノ粒子の複合体を形成させるような結合様式とすることができる。

【0059】

#### < 多重免疫染色法 >

本発明に係る多重免疫染色法は、化学発色を利用した染色と、蛍光ナノ粒子標識体を用いた蛍光免疫染色との双方を行う多重免疫染色法である。本発明に係る多重免疫染色法の染色対象は一般的な免疫染色法で対象となる生体分子であり、腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモン、がんの増殖制御因子、転移制御因子、増殖制御因子受容体、転移制御因子受容体等を例示できる。

【0060】

以下、異なる生体分子A、Bのそれぞれを、化学発色を利用した免疫染色と蛍光免疫染色とによりそれぞれ多重免疫染色する一実施態様を工程（1）～（5）の順に説明する。

【0061】

#### （1）脱パラフィン処理工程

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。

【0062】

ついで、エタノールを入れた容器に病理切片を浸漬させて、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。

【0063】

10

20

30

40

50

水を入れた容器に病理切片を浸漬させて、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。

【0064】

(2) 賦活化処理工程

組織化学染色として免疫組織化学染色を行う場合、公知の方法にならい、目的とする生体分子の賦活化処理を行うことが好ましい。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)、1mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)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。加熱機器としては、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。賦活化処理の加熱処理の温度は50~130、加熱処理の時間は5~30分で行うことができる。

10

【0065】

ついでPBSを入れた容器に、賦活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。

【0066】

(3-1) 染色処理工程A

化学免疫染色のための染色処理工程Aは、病理切片中の特定の生体分子に対して、発色用酵素が連結された抗体等を抗原抗体反応等により結合させる結合工程Aと、該結合工程の後に発色基質を反応系に添加して前記発色用酵素により発色させる発色工程Aとを含む。

20

【0067】

結合工程Aにおいて、生体分子に対する上記結合は公知の方法により行うことができる。なお、この結合の前に、BSA含有PBSなど公知のブロッキング剤を滴下して室温で所定時間(例えば1時間)インキュベートしておくことが好ましい。

【0068】

発色工程Aにおいて、前記発色用酵素の基質、発色剤を反応系に添加して化学発色させるが、本発明の対象となる発色剤は発色反応で不溶性沈殿物を生成するものであって、以下のものを例示することができる。

30

発色用酵素として西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)を用いる場合、TMB(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン)、3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)、4-クロロ-1-ナフトール等が対象となる。また、発色用酵素として酵素アルカリホスファターゼを用いる場合、ニューフクシン等が対象となる。その他、上述のように化学発色により不要性沈殿物が生じる発色剤が対象となる。

【0069】

(3-2) 染色処理工程B

蛍光免疫染色のための染色処理工程Bは、蛍光ナノ粒子標識体の生体分子認識分子と生体分子とを結合させる結合工程Bとを備える。ここでの生体分子とは、蛍光免疫染色の染色対象となる抗原、該抗原と特異的に結合した1次抗体、該1次抗体に結合した2次(n次)抗体、または、前記抗原または前記1~n次抗体に結合した他の生体分子のいずれかを意味する。

40

また、前述した抗原、1次抗体、2次(n次)抗体、他の生体分子、および生体分子認識分子の各分子間の結合の先後は問わない。

結合工程Bの具体的手順の例としては、蛍光ナノ粒子標識体のバッファー(PBS等)分散液を調製し、病理切片に載せて、蛍光ナノ粒子標識体の生体分子認識分子と前記生体分子とを結合させる。次に、バッファー(PBS等)を入れた容器に染色後の切片を浸漬させて、未反応の蛍光ナノ粒子標識体や発色用酵素を有する抗体等を除去する。浸漬時間は3分以上30分以下であることが好ましい。必要により浸漬途中でバッファー(PBS

50

等)を交換してもよい。

【0070】

(4)固定処理工程

固定処理工程は、組織染色処理工程(1)により導入された上述の発色剤や蛍光ナノ粒子標識体を組織切片に固定化する工程である。

【0071】

固定処理溶液として、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、アセトン、エタノール、メタノール等の架橋剤、細胞膜透過物質等が挙げられる。

【0072】

固定処理は、従来公知の手法により行うことができる。固定処理は、具体的には、上述したような固定処理溶液に、組織化学染色工程により得られた染色組織切片を浸漬することにより行うことができる。例えば、稀パラホルムアルデヒド水溶液中に、組織化学染色工程により得られた染色組織切片を数分から数時間程度浸漬することにより行うことができる。

10

【0073】

(5)観察工程

(5-1)明視野観察工程

明視野観察工程は、前記工程(1)~(4)により染色された組織切片に照明光を当て、組織切片に沈着した発色剤の色素を観察し、細胞または組織内の染色対象とする生体分子Aの分布情報(発色点数等)を取得する工程である。

20

【0074】

明視野観察は一般的な方法により行えばよい。例えば、食道がん細胞におけるVEGFR-2タンパク質を染色対象とする生体分子として組織化学染色を行なった場合の明視野観察においては、適切な照明光の照射下で、光学顕微鏡の4倍対物レンズを使用して、検体組織内の癌細胞のVEGFR-2タンパク陽性染色像、陽性染色の強度、陽性細胞率を観察する。次に対物レンズを10倍に切り替え、陽性所見が細胞膜か細胞質に局在するかを確認し、必要に応じてさらに対物レンズ20倍で検索する。

【0075】

本工程において生体分子Aの分布情報および生体分子Bの分布情報は、迅速な観察が行えるよう顕微鏡の鏡筒から取得するようにしてもよいし、顕微鏡に設置されたカメラが撮影した画像を別途表示手段(モニタ等)に表示し、それを観察することにより取得するようにしてもよい。

30

【0076】

(5-2)蛍光観察工程

蛍光観察工程は、上記工程により染色された組織切片中の蛍光ナノ粒子標識体の蛍光体に励起光を照射することにより、該蛍光体の発する蛍光に基づく生体分子Bの分布情報(輝点数等)を取得する工程である。

【0077】

前記励起光は、前記蛍光体に対して適した励起光を照射して蛍光体を励起し、染色対象の生体分子を蛍光で染色する。また、励起光の照射手段も特に限定されるものではない。例えば、蛍光顕微鏡が備えるレーザー光源から、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させるフィルターを用いて、適切な波長および出力の励起光を染色された組織切片に照射すればよい。

40

【0078】

前記励起光は、組織切片の自家蛍光との関係で標識体が発する蛍光が識別可能である限り特に限定されないものの、蛍光の目視観察が可能で、明視野観察可能な染色において用いる基質(例えばジアミノベンジジン)による吸収を避けるとともに、組織切片からの自家蛍光強度が高くなりすぎないようにする観点から、450nm~700nmの波長を有するものが好ましい。また、前記蛍光標識体として用いる蛍光体を構成する蛍光物質としては当該励起光により480nm以上の範囲、好ましくは580~690nmの範囲にピ

50

ークを有する蛍光を発するものを用いる（したがってこの領域の発光波長を有する蛍光を測定するようにする）。

【0079】

また、本工程において生体分子A、Bの各分布情報は、迅速な観察が行えるよう（蛍光）顕微鏡の鏡筒から取得するようにしてもよいし、（蛍光）顕微鏡に設置されたカメラが撮影した画像を別途表示手段（モニタ等）に表示し、それを観察することにより取得するようにしてもよい。標識体として用いる蛍光体を構成する蛍光物質によるが、顕微鏡の鏡筒からの目視により十分に生体分子分布情報を取得することができなくても、カメラが撮影した画像から生体分子分布情報を取得することが可能な場合もある。

【0080】

前記生体分子A、Bの分布情報を取得することとしては、例えば、蛍光の輝点数または発光輝度を基に、一細胞あたりの染色対象の生体分子の数もしくは密度を計測することが挙げられる。蛍光ナノ粒子標識体の蛍光体の励起には、吸収極大波長および蛍光波長に対応した励起光源および蛍光検出用光学フィルターを選択すればよい。輝点数または発光輝度の計測には、市販の画像解析ソフト（例えば、全輝点自動計測ソフト「G-Count」（ジーオングストローム社製））を用いることが好適であるが、計測手段は特に限定されるものではない。

【0081】

上述した多重免疫染色の実施態様では、2種類の生体分子を染色する多重免疫染色の例を示したが、発色剤や蛍光体の発光波長域を変更してさらに多くの生体分子C・・・を検出する多重免疫染色としてもよい。

【0082】

以下、本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体、多重免疫染色剤および多重免疫染色法による作用・効果を説明する。

（1）本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体は、蛍光体を集積した状態で有する蛍光体集積ナノ粒子と、該蛍光体集積ナノ粒子の表面に結合した数平均分子量3000以上の親水性高分子鎖と、該親水性高分子鎖の末端に結合した生体分子認識分子とを備えた粒子である。

本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体を、同一または異なる抗原を検出する目的で蛍光免疫染色と化学発色による免疫染色とを行う多重免疫染色に用いた場合、まず蛍光ナノ粒子標識体の生体分子認識分子が、前記抗原やこれに結合した生体分子（抗体等）と結合して抗原が蛍光で染色される。その一方で、この抗原と同一または別異の抗原に化学発色用の酵素を付加した抗体が結合し、発色剤の添加により化学発色の反応が起こり、該抗原が染色される。このときに、蛍光ナノ粒子標識体の親水性高分子鎖の数平均分子量3000以上であることで、前記化学発色で生じた不溶性沈殿物（発色剤が重合したもの等）から物理的に離れた位置に蛍光体が配置され、不溶性沈殿物により蛍光体からの発光が阻害されにくくなる（図1（A）と（B）を対比して参照）。この結果、蛍光免疫染色を単独で行った場合と同程度の輝点数を確保することができ、多重免疫染色における抗原の検出精度が向上する。

【0083】

（2）前記蛍光体集積ナノ粒子の表面に結合した数平均分子量3000未満の親水性高分子鎖（B）を備えることで、蛍光ナノ粒子標識体の他の分子への非特異的な結合を抑制することができる。

【0084】

（3）前記親水性高分子鎖（A）および/または親水性高分子鎖（B）がポリエチレングリコールであることにより、意図しない生体分子の活性化を防ぐことができる。

【0085】

（4）前記生体分子認識分子が染色対象の抗原と特異的に結合可能な1次抗体もしくは当該1次抗体に結合可能な2次抗体に連結されたビオチンと結合可能なアビジンであれば、ビオチンとアビジンの非常に強固で特異的な結合を蛍光ナノ粒子標識体と生体分子との

10

20

30

40

50

結合に用いることになるため、蛍光ナノ粒子標識体を反応系に添加してから蛍光観察までの時間が短くなり、蛍光体の退色に起因した輝点における蛍光強度の低下の影響を抑制することができる。

【実施例】

【0086】

[実施例1A]

標識剤A（数平均分子量3400ポリエチレングリコールもつストレプトアビジン結合テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子）の合成

スルホローダミン101（「Sulforhodamine 101」、シグマアルドリッチ社製、Texas Red色素）2.5mgを純水22.5mLに溶解した後、ホットスターラーにより溶液の温度を70℃に維持しながら20分間攪拌した。攪拌後の溶液に、メラミン樹脂「ニカラックMX-035」（日本カーバイド工業社製）1.5gを加え、さらに同一条件で5分間加熱攪拌した。

10

【0087】

攪拌後の溶液にギ酸100μLを加え、溶液の温度を60℃に維持しながら20分間攪拌した後、該溶液を放置して室温まで冷却した。冷却した後の溶液を複数の遠心用チューブに分注して、12,000rpmで20分間遠心分離して、溶液に混合物として含まれるテキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子（以下、粒子Aと略称する。）を沈殿させて上澄みを除去した。その後、沈殿した粒子Aの洗浄をエタノールと水で行った。

【0088】

洗浄後の粒子A0.1mgをエタノール1.5mL中に分散し、アミノプロピルトリメトキシシランLS-3150（信越化学工業社製）2μLを加えて8時間、攪拌しながら室温で反応させて表面アミノ化処理を行った。

20

【0089】

表面がアミノ化された粒子Aの濃度を、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3nMに調整し、この溶液に最終濃度10mMとなるようマレイミドPEGカルボキシレートNHS（日油社製SUNBRIGHT MA-034TS 平均分子量3400）を混合して、攪拌しながら室温で1時間反応した。

【0090】

反応液を10,000Gで20分間遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、同一条件で再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を3回行うことで、末端にマレイミド基を有するPEG鎖で表面修飾された粒子Aを得た。

30

【0091】

一方、スルフヒドリル基を有するストレプトアビジンの作製は以下のように行った。まず、1mg/mLに調整したストレプトアビジン（和光純薬工業社製）40μLに対して、64mg/mLに調整したN-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート（N-succinimidyl S-acetylthioacetate, SATA, Pierce社製）70μLを室温で1時間反応させた。すなわち、ストレプトアビジンのアミノ基に対して保護されたチオール基（-NH-CO-CH<sub>2</sub>-S-CO-CH<sub>3</sub>）を導入した。

40

【0092】

その後、公知のヒドロキシルアミン処理により、保護されたチオール基から遊離のチオール基（-SH）を生成して、ストレプトアビジンにチオール基（-SH）を付加する処理を行った。

【0093】

このストレプトアビジン溶液をゲルろ過カラム（Zaba Spin Desalting Columns：フナコシ）により脱塩し、上記メラミン系粒子に結合可能なストレプトアビジンを得た。

50

## 【0094】

P E G 修飾された上記粒子 A とストレプトアビジンとを、E D T A を 2 m M 含有した P B S 中で混合し、1 時間反応させた。1 0 m M メルカプトエタノールを添加し、反応を停止させた。得られた溶液を遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲルろ過カラムを用いて未反応ストレプトアビジン等を除去し、標識剤 A を得た。

## 【0095】

## [実施例 1 B] (多重免疫染色)

実施例 1 A で製造した標識剤 A と一般的な C D 3 4 を免疫染色する D A B 染色キットを用いて、以下のように、血管増殖因子血管内皮細胞増殖因子受容体 - 2 ( V E G F R - 2 ) と食道がん組織の癌細胞の表面抗原 C D 3 4 とを検出する多重免疫染色を行った。

10

## 【0096】

## ( 1 ) 脱パラフィン処理工程

食道がん組織を固定した組織アレイスライド ( U S B i o m a x 社製 T 0 2 2 ) をキシレンに浸漬し、脱パラフィン処理した。

## 【0097】

## ( 2 ) 賦活化処理工程

脱パラフィン処理した後、この組織アレイスライドをクエン酸緩衝液 ( p H 6 . 0 ) に浸漬して、オートクレーブ処理 ( 1 2 1 で 1 5 分間 ) し、抗原の賦活化処理を行った。

## 【0098】

## ( 3 - 1 ) 染色処理工程 A

賦活化処理を行った組織アレイスライドを P B S で洗浄した後、非特異的な結合を防ぐために 1 0 % ヤギ血清 ( ニチレイ社製 ) を添加し、室温下 1 時間放置した。この組織アレイスライドを P B S で洗浄後、抗 C D 3 4 抗体 ( ニチレイ社製マウス抗体 ) を添加し、室温下 3 0 分間放置した。再び組織アレイスライドを P B S で洗浄した後、デキストランポリマーペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体 ( ニチレイ社製 ) を添加し、室温下で 3 0 分間放置した。D A B 基質キット ( ニチレイ社製 ) を用いて、ジアミノベンジジン ( D A B ) を発色基質とする酵素を用いた免疫染色を行った。

20

## 【0099】

## ( 3 - 2 ) 染色処理工程 B

上記 ( 3 - 1 ) の免疫染色後の組織アレイスライドを P B S で洗浄した後、1 0 % ヤギ血清 ( ニチレイ社製 ) を添加し、室温下 1 時間放置した。この組織アレイスライドを P B S で洗浄した後、抗 V E G F R - 2 抗体 ( アブカム社製ウサギ抗体 ) を添加し、室温下 3 0 分間放置した。P B S で洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ抗体 ( ニチレイ社製 ) を添加し、室温下で 3 0 分間放置した。標識剤 A を添加し、室温下 2 時間反応させた。

30

## 【0100】

## ( 4 ) 固定処理工程

上記で得られた免疫組織化学染色切片をエタノール、キシレンの順にスライドを浸漬させ、次いで封入剤 ( メルク社エンテランニュー ) を添加した後、カバーガラスを載せ、固定処理を行い、これを評価スライドとした。

## 【0101】

## ( 5 ) 観察

上記 ( 4 ) で固定処理した二重染色切片を、オリンパス社製汎用蛍光顕微鏡 B X 5 3 を用いて観察を行った。蛍光観察で輝点数を測定する際のテキサスレッド ( 蛍光体 ) の励起波長は 5 8 0 n m 、測定波長は 6 3 0 n m とした。

40

## 【0102】

## [比較例 1 A、1 B]

標識剤 B 分子量 5 2 8 ポリエチレングリコールもつストレプトアビジン結合レキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の合成

実施例 1 A において、マレイミド - P E G - カルボキシレート - N H S ( 日油社製 S U N B R I G H T M A - 0 3 4 T S 平均分子量 3 4 0 0 ) の代わりに、M A L - d P E G -

50

NHS Ester (Quanta社製QB10284a ポリエチレングリコール部分  
 分子量528)を用いた以外は標識剤Aの合成と同様にして行い、標識剤Bを作製し、実施  
 例1Aと同様に多重免疫染色および輝点数を確認する観察等を行った。[表1]に実施例1  
 Bと比較例1Bの結果を示す。

【0103】

【表1】

		PEGの 数平均分子量	酵素発色C34染 色と蛍光VEGF R-2染色の二重 染色における細胞 1つ当たりの輝点 数(相対値)	蛍光VEGFR- 2染色のみの単独 染色における細胞 1つ当たりの輝点 数(相対値)
実施例1B	標識剤A	3400	98	100(基準)
比較例1B	標識剤B	352	30	90

10

【0104】

[実施例2A、2B]

標識剤C 分子量5000と352のポリエチレングリコールもつストレプトアビジン  
 結合レキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の合成

マレイミド-PEG-カルボキシレート-NHS(日油社製SUNBRIGHT MA-  
 034TS 平均分子量3400)の代わりに、マレイミド-PEG-カルボキシレート  
 -NHS(日油社製SUNBRIGHT MA-050TS 平均分子量5000)と、M  
 AL-dPEG-NHS Ester(Quanta社製QB10274a ポリエチレン  
 グリコール部分分子量352)とを最終濃度がそれぞれ1mMと10mMとなるようにして  
 1:10(モル比)で混合したものをを用いたほかは標識剤Aの合成と同様にして標識剤C  
 の合成を行った。また、この標識剤Cを用いて、実施例1Aと同様に多重免疫染色および  
 輝点数を確認する観察等を行った。

20

【0105】

[実施例3A、3B]

標識剤D 分子量20000と2000のポリエチレングリコールもつストレプトアビ  
 ジン結合レキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の合成

マレイミド-PEG-カルボキシレート-NHS(日油社製SUNBRIGHT MA-  
 034TS 平均分子量3400)の代わりに、マレイミド-PEG-カルボキシレート  
 -NHS(日油社製SUNBRIGHT MA-200TS 平均分子量20000)とマ  
 レイミド-PEG-カルボキシレート-NHS(日油社製SUNBRIGHT MA-02  
 0TS 平均分子量2000)とを最終濃度がそれぞれ1mMと10mMとなるようにし  
 て1:10(モル比)で混合したものをを用いたほかは標識剤Aの合成と同様にして標識剤  
 Dの合成を行った。また、この標識剤Dを用いて、実施例1Aと同様に多重免疫染色およ  
 び輝点数を確認する観察等を行った。

30

【0106】

[実施例4A、4B]

標識剤E 分子量40000と528のポリエチレングリコールもつストレプトアビジ  
 ン結合レキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の合成

マレイミド-PEG-カルボキシレート-NHS(日油社製SUNBRIGHT MA-  
 034TS 平均分子量3400)の代わりに、マレイミド-PEG-カルボキシレート  
 -NHS(日油社製SUNBRIGHT MA-400TS 平均分子量40000)とM  
 AL-dPEG-NHS Ester(Quanta社製QB10284a ポリエチレン  
 グリコール部分分子量528)とを最終濃度がそれぞれ1mMと10mMとなるようにして  
 1:10(モル比)で混合したものをを用いたほかは標識剤Aの合成と同様にして標識剤E  
 の合成を行った。また、この標識剤Eを用いて、実施例1Aと同様に多重免疫染色およ  
 び輝点数を確認する観察等を行った。

40

50

【 0 1 0 7 】

【表 2】

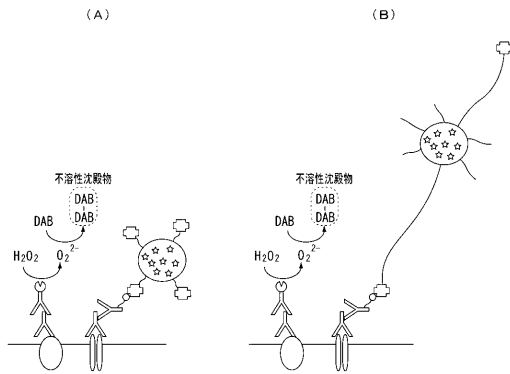
		PEG1の 数平均分子量	PEG2の 数平均分子量	酵素発色C34染色と蛍光VEGFR-2染色の二重染色における細胞1つ当たりの輝点数(相対値)	蛍光VEGFR-2染色のみの単独染色における細胞1つ当たりの輝点数(相対値)
実施例 2B	標識剤C	352	5000	119	125
実施例 3B	標識剤D	2000	20000	108	115
実施例 4B	標識剤E	509	40000	90	95

10

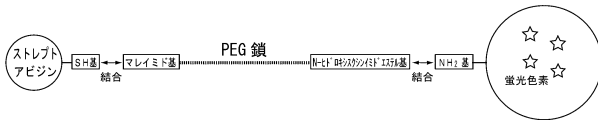
【 0 1 0 8 】

以上、本発明に係る蛍光ナノ粒子標識体、該蛍光ナノ粒子標識体を含む多重免疫染色剤および該多重免疫染色剤を用いた多重免疫染色法を実施の形態および実施例に基づいて説明してきたが、本発明はこれらに限定されず、本発明の要旨を逸脱しないかぎり、設計変更は許容される。

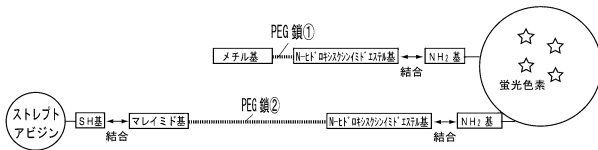
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



## フロントページの続き

(出願人による申告)平成25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)」共同研究産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開2009-292804(JP,A)  
特開2012-194013(JP,A)  
特開2010-112913(JP,A)  
特開2005-017133(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	荧光纳米颗粒标记，多重免疫染色试剂盒和多种免疫染色方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6424825B2</a>	公开(公告)日	2018-11-21
申请号	JP2015539128	申请日	2014-09-16
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	相宮拓司 高梨健作 古澤直子		
发明人	相宮 拓司 高梨 健作 古澤 直子		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	B82Y5/00 B82Y15/00 B82Y20/00 G01N33/582 G01N33/587		
FI分类号	G01N33/58.Z G01N33/48.P G01N33/53.U		
优先权	2013199781 2013-09-26 JP		
其他公开文献	JPWO2015045961A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明旨在通过利用化学显色的荧光免疫染色和利用荧光染料等荧光物质的发光的荧光免疫染色来抑制多重免疫染色方法中发光程度的降低。根据本发明，提供一种集成有荧光体的纳米粒子，其具有集成的荧光体，数均分子量为3000以上的亲水性聚合物链与荧光体一体型纳米粒子的表面结合，并且生物分子识别分子与末端结合通过使用光学纳米颗粒标签，可以实现上述目的。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6424825号 (P6424825)
(45) 発行日 平成30年11月21日(2018.11.21)	(24) 登録日 平成30年11月2日(2018.11.2)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O I N 33/58 (2006.01)	G O I N 33/58	Z
G O I N 33/48 (2006.01)	G O I N 33/48	P
G O I N 33/53 (2006.01)	G O I N 33/53	U
請求項の数 3 (全 18 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-539128 (P2015-539128)	(73) 特許権者 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号	
(86) (22) 出願日 平成26年9月16日(2014.9.16)		
(86) 国際出願番号 PCT/JP2014/074418	(74) 代理人 110001070 特許業務法人 S S I N P A T	
(87) 国際公開番号 W02015/045961		
(87) 国際公開日 平成27年4月22日(2015.4.2)	(72) 発明者 相宮 拓司 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内	
審査請求日 平成29年3月22日(2017.3.22)		
(31) 優先権主張番号 特願2013-199781 (P2013-199781)	(72) 発明者 高梨 健作 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内	
(32) 優先日 平成25年9月26日(2013.9.26)		
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	(72) 発明者 古澤 直子 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 蛍光ナノ粒子標識体、多重免疫染色剤キットおよび多重免疫染色法		