

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第5843054号  
(P5843054)

(45) 発行日 平成28年1月13日(2016.1.13)

(24) 登録日 平成27年11月27日(2015.11.27)

(51) Int.Cl.	F 1
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

請求項の数 10 (全 30 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2015-531968 (P2015-531968)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成27年3月23日 (2015.3.23)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/JP2015/058703</p> <p>審査請求日 平成27年6月25日 (2015.6.25)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2014-59883 (P2014-59883)</p> <p>(32) 優先日 平成26年3月24日 (2014.3.24)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国 (JP)</p> <p>(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/病理画像等認識基礎技術の研究開発 (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技術)」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</p>	<p>(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</p> <p>(74) 代理人 110001070 特許業務法人SSINPAT</p> <p>(72) 発明者 郷田 秀樹 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</p> <p>(72) 発明者 磯田 武寿 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</p> <p>(72) 発明者 渡辺 泰宏 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</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	--

(54) 【発明の名称】 多重免疫染色法に基づく生体物質の定量方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

病理標本中の細胞膜に発現している生体物質(目的生体物質)の定量方法であって、

(1a) 前記目的生体物質を、蛍光体を用いて免疫染色する工程、

(1b) 前記細胞膜に恒常的に発現している前記目的生体物質とは異なる生体物質(参照生体物質)を、前記目的生体物質用の蛍光体とは異なる蛍光体を用いて免疫染色する工程、

(2) 前記目的生体物質の免疫染色像および前記参照生体物質の免疫染色像を用いて、細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの位置を特定するとともに、前記細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの位置および前記参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルを計測する工程、および

(3) 測定対象領域全体について、または各細胞について、前記細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を、前記参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を用いて補正し、発現量を定量するための指標とする工程を含む定量方法。

【請求項2】

前記工程(3)として、細胞膜の領域内にある目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を、参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値で除することで、シグナルの計測値を用いて補正し、発現量を定量するための指標とする工程を含む請求項1に記載の定量方法。

## 【請求項 3】

前記工程(1a)および(1b)の前後いずれかの工程で、明視野において形態の観察を行うための形態観察染色工程を含む請求項1または2に記載の定量方法。

## 【請求項 4】

前記形態観察染色工程がヘマトキシリン・エオジン染色である、請求項3に記載の定量方法。

## 【請求項 5】

前記工程(3)において、前記目的生体物質および前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測を550nm以上630nm以下の波長で行う、請求項3または4に記載の定量方法。

10

## 【請求項 6】

前記目的生体物質用の蛍光体が蛍光色素内包ナノ粒子であり、前記参照生体物質用の蛍光体が蛍光色素である、請求項1～5のいずれか一項に記載の定量方法。

## 【請求項 7】

前記蛍光色素内包ナノ粒子の平均粒径が50～200nmである、請求項6に記載の定量方法。

## 【請求項 8】

前記参照生体物質が2種類以上である、請求項1～7のいずれか一項に記載の定量方法。

## 【請求項 9】

前記参照生体物質が、ATPase、カドヘリン、サイトケラチンおよびEpCAMからなる群より選択される1種類または2種類以上である、請求項1～8のいずれか一項に記載の定量方法。

20

## 【請求項 10】

請求項1～9のいずれか一項に記載の目的生体物質の定量方法を実施するためのキットであって、

前記目的生体物質用の免疫染色剤を作製するための抗体および蛍光体、ならびに前記参照生体物質用の免疫染色剤を作製するための抗体および蛍光体を含むことを特徴とするキット。

## 【発明の詳細な説明】

30

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、組織切片の細胞膜に発現している生体物質(目的生体物質)の定量方法に関する。詳しくは、本発明は、目的生体物質と、目的生体物質以外の生体物質(参照生体物質)のそれぞれを、蛍光標識体を用いて免疫染色する多重免疫染色方法を利用した、目的細胞の定量方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

病理診断は、人体から採取された材料(細胞、組織等の検体から作製した標本)について顕微鏡で観察し、病理学の知識や手法を用いて病変の有無や病変の種類について診断することであり、治療や手術の方針を決定するために医療の現場で行われている。

40

## 【0003】

このような病理診断のための手法として、特定の疾患に関連する分子(抗原)の標本内における発現状況を観察するために、当該分子とそれに対する抗体および標識体からなる複合体を形成させる、免疫組織化学(Immunohistochemistry: IHC)に基づく染色が広く用いられている。たとえば、乳癌細胞の細胞膜で過剰発現している場合があるHER2(ヒト上皮細胞増殖因子受容体)は、分子標的薬ハーセプチン(登録商標、一般名:トラスツズマブ)のターゲットとなる膜タンパク質であり、染色画像に基づく、乳癌組織におけるHER2の過剰発現が認められるか否かの判定は、当該分子標的薬の治療効果を予測するための重要な指標となる。

50

## 【0004】

免疫組織化学的染色では従来、特定の基質と反応して発色する酵素を標識体として用いる手法（色素染色法）が用いられていた。たとえば、DAB染色は、標識酵素としてペルオキシダーゼ、基質としてジアミノベンジジン（DAB）を用いる色素染色法であり、これらの酵素反応によって、抗原が存在する部位を明視野（光学顕微鏡）で観察可能な褐色に発色させることができる。しかしながら、DAB染色のような酵素標識体を用いる色素染色法は、染色濃度が温度・時間などの環境条件により大きく左右されるため、染色濃度から実際の抗体の発現量を見積もることが難しいという課題がある。

## 【0005】

そこで近年では、酵素標識体の代わりに蛍光標識体を用い、抗原を暗視野（蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡）で観察可能な蛍光の輝点で表すことのできる手法（蛍光標識法）が、免疫組織化学的染色において用いられるようになってきている。

10

## 【0006】

たとえば特許文献1では、無機半導体ナノ粒子、または蛍光有機色素もしくは無機半導体ナノ粒子を内包した粒子（蛍光物質内包ナノ粒子）で細胞膜に存在する生体物質を標識し、一方で細胞膜自体もそれに非特異的に結合する蛍光を発する物質、たとえばエオジンやPKH色素（商品名「CellVue」（登録商標）。強い蛍光発色部位と、それに結合した脂質親和性の長い尾部を有する。）で染色し、蛍光観察画像から細胞膜上の生体物質を定量する方法が提案されている。

## 【0007】

また、特許文献2では、試料中における定量の目的タンパク質と、対照タンパク質とを、それぞれ異なる蛍光色素で標識した抗体を用いて染色し、染色された目的タンパク質および対照タンパク質のそれぞれの総蛍光強度を測定し、目的タンパク質の総蛍光強度と対照タンパク質の総蛍光強度との比を目的タンパク質の定量値とする方法が提案されている。この特許文献2に記載された方法における目的タンパク質としては、抗癌剤感受性マーカーとなるタンパク質、抗癌剤の副作用に関連するタンパク質、予後因子のマーカーとなるタンパク質、診断のキープロテイン（主に分泌タンパク質）など、癌細胞に特異的に発現している様々なタンパク質が挙げられている。一方、参照タンパク質としては、 $\alpha$ -アクチン、GAPDH（グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ）といった、細胞質内で恒常的に発現しているハウスキープング遺伝子がコードするタンパク質（ハウスキープングタンパク質）が挙げられている。

20

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0008】

【特許文献1】特開2013-057631号公報

【特許文献2】特開2008-268167号公報

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

病理診断に用いる細胞、組織、臓器等の切片（病理標本）は、標本作製工程中の固定までの時間、固定時間などの要因により、その保存状態および標本に存在するタンパク質の変性度合が変化する。その変性度合いによって、抗原抗体反応における抗体の認識率が変動する結果、同一の組織・細胞を用いて標本作製しても、一定した結果が得られないということがある。また、目的タンパク質の発現レベルが同じでも、固定した標本を薄切する際の切片の厚さにより、平面的な染色画像上で検出されるタンパク質の量が異なる（切片が厚いほど検出量が多くなる）ことから、目的タンパク質の発現レベルが実質的に同一のはずの組織等から切り出した複数の標本をもちいて観察した場合においても、蛍光物質内包ナノ粒子などの蛍光体に基づく定量値が異なるという問題があった。

40

## 【0010】

また、分子標的薬の効果を見積もるための病理診断においては、細胞膜上に存在する目

50

的タンパク質のみを正確に定量する必要があり、そのためには、細胞膜上に存在する目的タンパク質に特異的に結合した蛍光体に由来するシグナルを抽出する一方、細胞質にある目的タンパク質以外の物質に非特異的に吸着した蛍光体に由来するシグナルは極力除外する必要がある。しかしながら、特許文献2に記載されたような総蛍光強度を測定する方法は、目的タンパク質の位置を特定する手段を備えていないため、上述したような非特異的に吸着した蛍光体を含む、病理標本中に存在する全ての蛍光体に由来するシグナルが定量のために用いられることになり、細胞膜上に存在する目的タンパク質のみを正確に定量することができない。

【0011】

さらに、癌組織では細胞の大きさが検体ごとに異なり、細胞が大きい場合は細胞が小さい場合よりも、染色像上に占める細胞膜領域の相対的な（細胞質領域と比較した）広さが狭くなる。そのため、特許文献2に記載されたように、参照タンパク質としての細胞質内に存在するハウスキーピングタンパク質に由来する総蛍光強度に対する、主に細胞膜上に存在する目的タンパク質に由来する総蛍光強度の比の値を評価値として算出すると、細胞膜の単位面積あたりの目的タンパク質の発現量が同じであったとしても、細胞が大きい場合の方が、細胞が小さい場合よりも評価値が低くなってしまふ。

【0012】

しかも、特許文献2に記載された発明において参照タンパク質として用いられているハウスキーピングタンパク質は主に細胞質内に存在する一方、目的タンパク質は主に細胞膜上に存在する。標本作製時の劣化状態は細胞質部分と細胞膜部分とで相違するため、参照タンパク質としての細胞質内に存在するハウスキーピングタンパク質に由来する総蛍光強度に対する、細胞膜上に存在する目的タンパク質に由来する総蛍光強度の比の値は、そのような劣化状態の相違の影響を受けることになり、細胞膜部分の劣化状態によらずに細胞膜上の目的タンパク質の発現量を正しく評価することができるものではない。

【0013】

その上、癌細胞は細胞ごとの特性が様々であり、ハウスキーピングタンパク質といえども発現量が一定ではなく、大きく変化する場合がある。特許文献2には、1種類のハウスキーピングタンパク質だけを参照タンパク質とする実施形態しか具体的には開示されていないが、そのハウスキーピングタンパク質の発現量が通常通りの検体と大きく変化している検体が混在している可能性のある、広範囲の患者から採取した検体に対して、分子標的薬の適応判断などにおける均質な評価を与えることができないおそれがある。

【0014】

一方、特許文献1に記載された方法では、細胞膜を染色するための物質として細胞膜に非特異的に結合する物質を用いているが、標本作製時の劣化状態がその染色に与える影響も、抗原抗体反応による特異的な結合に基づく細胞膜上に存在する生体物質（目的タンパク質）の染色に与える影響と同じではない。また、特許文献1には、細胞膜を染色した蛍光を利用して、細胞膜上に存在する生体物質を標識した蛍光のみを抽出し、当該生体物質を定量することについては記載されているが、細胞膜を染色した蛍光のシグナル（輝度）を用いて、細胞膜上に存在する生体物質を標識した蛍光のシグナル（輝度ないし輝点数）を補正するという技術的思想は記載されていない。

【0015】

本発明は、病理標本中の細胞膜に発現している生体物質を、標本作製時の劣化状態が蛍光強度に与える影響などを排除して、より正確に定量することのできる定量方法を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者らは、目的生体物質とともに、細胞膜に恒常的に発現している目的生体物質とは異なる生体物質（好ましくは2種類以上のそのような生体物質）を、蛍光体を用いて免疫染色し、シグナルを観測することにより、細胞膜に発現している目的生体物質の蛍光標識シグナルのみを効率的に抽出できるとともに、標本作製工程における薄切、ホルマリン

10

20

30

40

50

固定、抗原賦活化など、標本作製時に起きうるサンプルの質のバラツキの影響を目的生体物質の蛍光標識シグナルから排除するように補正することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 1 7 】

すなわち本発明は、以下の発明を包含する。

【 0 0 1 8 】

[ 項 1 ]

病理標本中の細胞膜に発現している生体物質（目的生体物質）の定量方法であって、

（ 1 a ）前記目的生体物質を、蛍光体を用いて免疫染色する工程、

（ 1 b ）前記細胞膜に恒常的に発現している前記目的生体物質とは異なる生体物質（参照生体物質）を、前記目的生体物質用の蛍光体とは異なる蛍光体を用いて免疫染色する工程、

（ 2 ）前記目的生体物質の免疫染色像および前記参照生体物質の免疫染色像を用いて、細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの位置を特定するとともに、前記細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルおよび前記参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルを計測する工程、および

（ 3 ）測定対象領域全体について、または各細胞について、前記細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を、前記参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を用いて補正し、発現量を定量するための指標とする工程を含む定量方法。

【 0 0 1 9 】

[ 項 2 ]

前記工程（ 3 ）として、細胞膜の領域内にある目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を、参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値で除することで、シグナルの計測値を用いて補正し、発現量を定量するための指標とする工程を含む項 1 に記載の定量方法。

【 0 0 2 0 】

[ 項 3 ]

前記工程（ 1 a ）および（ 1 b ）の前後いずれかの工程で、明視野において形態の観察を行うための形態観察染色工程を含む項 1 または 2 に記載の定量方法。

【 0 0 2 1 】

[ 項 4 ]

前記形態観察染色工程がヘマトキシリン・エオジン染色である、請求項 3 に記載の定量方法。

【 0 0 2 2 】

[ 項 5 ]

前記工程（ 3 ）において、前記目的生体物質および前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測を 5 5 0 n m 以上 6 3 0 n m 以下の波長で行う、項 3 または 4 に記載の定量方法。

【 0 0 2 3 】

[ 項 6 ]

前記目的生体物質用の蛍光体が蛍光色素内包ナノ粒子であり、前記参照生体物質用の蛍光体が蛍光色素である、項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の定量方法。

【 0 0 2 4 】

[ 項 7 ]

前記蛍光色素内包ナノ粒子の平均粒径が 5 0 ~ 2 0 0 n m である、項 6 に記載の定量方法。

【 0 0 2 5 】

[ 項 8 ]

前記参照生体物質が 2 種類以上である、項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の定量方法。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 6 】

## [ 項 9 ]

前記参照生体物質が、A T P a s e、カドヘリン、サイトケラチンおよびE p C A Mからなる群より選択される1種類または2種類以上である、項1～8のいずれか一項に記載の定量方法。

## 【 0 0 2 7 】

## [ 項 1 0 ]

項1～9のいずれか一項に記載の目的生体物質の定量方法を実施するためのキットであって、

前記目的生体物質用の免疫染色剤を作製するための抗体および蛍光体、ならびに前記参照生体物質用の免疫染色剤を作製するための抗体および蛍光体を含むことを特徴とするキット。

10

## 【 発明の 効果 】

## 【 0 0 2 8 】

本発明の定量方法を利用することにより、細胞膜に発現している目的生体物質の抽出および定量の精度を高めることができ、病理診断、特に分子標的薬の効果を見積もるための判定の正確性を改善することができる。

## 【 図面の 簡単な 説明 】

## 【 0 0 2 9 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、本発明に係る多重免疫染色法に基づく生体物質の定量方法の一実施形態を示すフローチャートである。図 1 A は全行程の例を表す図であり、図 1 B は請求項 1 に関する工程だけを抜粋して表している図である。

20

【 図 1 B 】 図 1 B は本発明を構成する根幹となる工程を抜粋して表している図である。

【 図 2 】 図 2 は、実施例 9 において撮影した、目的生体物質 ( H E R 2 ) をテキサスレッド内包メラミン樹脂ナノ粒子で蛍光標識した第 1 免疫染色像である ( カラー写真では赤色で表示してある ) 。 矢印で示しているのは目的生体物質が染色されている部分である。

【 図 3 】 図 3 は、実施例 9 において撮影した、参照生体物質 ( A T P a s e、カドヘリン、サイトケラチンおよび E p C A M ) を A l e x a F l u o r 6 4 7 色素分子で蛍光標識した第 2 免疫染色像である ( カラー写真では緑色で表示してある ) 。 矢印で示しているのは参照生体物質が染色されている部分であり、細胞膜領域を示している。

30

【 図 4 】 図 4 は、図 2 の第 1 免疫染色像および図 3 の第 2 免疫染色像を重ねあわせた免疫染色像である。矢印で示しているのは第 1 免疫染色像および第 2 免疫染色像の染色された部分が重なっている箇所であり、つまり細胞膜領域上の H E R 2 を示している。

## 【 発明を実施するための形態 】

## 【 0 0 3 0 】

## 目的生体物質・参照生体物質

本発明における第 1 の生体物質である目的生体物質は、組織切片の細胞膜に発現している生体物質、特にタンパク質 ( 抗原 ) であって、主に病理診断の観点からの定量ないし検出のために、蛍光標識体を用いた免疫染色の対象とするものを指す。

## 【 0 0 3 1 】

本発明における第 2 の生体物質である参照生体物質は、組織切片の細胞膜に恒常的に発現している目的生体物質とは異なる生体物質、特にタンパク質 ( 抗原 ) であって、目的生体物質の定量ないし検出の精度を高める補正を行うために、蛍光標識体を用いた免疫染色の対象とするものを指す。

40

## 【 0 0 3 2 】

目的生体物質は、病理診断など本発明の定量方法の用途を考慮しながら選択すればよく、特に限定されるものではない。典型的な目的生体物質としては、各種の癌組織の細胞膜で発現しており、バイオマーカーとして利用することができる生体物質、たとえば、E G F R ( H E R 1 ) ( E p i d e r m a l G r o w t h F a c t o r R e c e p t o r : 上皮増殖因子受容体 )、H E R 2 ( H u m a n E p i d e r m a l G r o w t h F a c t o r R e c e p t o r : ヒト上皮増殖因子受容体 )、H E R 3、H E

50

R4、VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor: 血管内皮細胞増殖因子受容体)、IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor: インスリン様増殖因子受容体)、HGR (Hepatocyte Growth Factor Receptor: 肝細胞増殖因子受容体)といった増殖因子の受容体(レセプター)や、PD-1 (Programmed cell death 1)などの免疫系の受容体であるタンパク質が挙げられる。EGFR/HERには、大腸癌などの癌組織において過剰発現しているEGFR/HER1 (ErbB1とも呼ばれる)、乳癌などの癌組織において過剰発現しているEGFR2/HER2 (ErbB2、neuとも呼ばれる)、EGFR3/HER3およびEGFR4/HER4が包含される。VEGFRには、肝臓癌、食道癌などの癌組織における血管内皮細胞において発現が亢進しているVEGFR-1 (Flt-1とも呼ばれる)、VEGFR-2 (Flt-2、KDRとも呼ばれる)およびリンパ管内皮細胞において発現が亢進しているVEGFR-3 (Flt-4とも呼ばれる)が包含される。たとえばHER2は、乳癌に係る病理診断において本発明の定量方法を実施する際の目的生体物質として好適である。

10

## 【0033】

参照生体物質は、目的生体物質と違い、特定の疾患においても発現量が大きく変動しない生体物質から選択することが適切である。たとえば、ATPase、カドヘリン、サイトケラチン、EPCAM (Epithelial Cell Adhesion/Activating Molecule: 上皮細胞接着分子、CD326、KSAまたはTROP1とも呼ばれる。)などの膜タンパク質は、本発明における好ましい参照生体物質になり得る。

## 【0034】

20

参照生体物質は、1種類であってもよいが、2種類以上であることが好ましい。参照生体物質を2種類以上とすることにより、その発現量の総和の変動をより抑えることができ、また多数の蛍光標識体をもって細胞膜の像(細胞膜領域)を形成することができるため、参照生体物質としての安定性を向上させることができる。

## 【0035】

## 免疫染色剤

本発明における第1の免疫染色剤は、目的生体物質を免疫染色によって蛍光標識化するための物質であって、少なくとも、目的生体物質に特異的に結合するプローブと、蛍光体とを含む。

## 【0036】

30

本発明における第2の免疫染色剤は、参照生体物質を免疫染色によって蛍光標識化するための物質であって、少なくとも、参照生体物質に特異的に結合するプローブと、蛍光体とを含む。

## 【0037】

## (プローブ)

第1免疫染色剤用のプローブ(第1プローブ)には、前述したような目的生体物質としてのタンパク質を抗原として特異的に認識して結合する抗体(IgG)を用いることができる。たとえば、EGFRを目的生体物質とする場合は抗EGFR抗体を、HER2を目的生体物質とする場合は抗HER2抗体を第1プローブとして用いることができる。

## 【0038】

40

第2免疫染色剤用のプローブ(第2プローブ)には、前述したような参照生体物質としてのタンパク質を抗原として特異的に認識して結合する抗体(IgG)を用いることができる。たとえば、カドヘリンを目的生体物質とする場合は抗カドヘリン抗体を第2プローブとして用いることができる。

## 【0039】

第1および第2プローブとしての抗体はいずれも、ポリクローナル抗体であってもよいが、定量の安定性の観点から、モノクローナル抗体が好ましい。抗体を産生する動物(免疫動物)の種類は特に限定されるものではなく、従来と同様、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどから選択すればよい。

## 【0040】

50

プローブとしての抗体は、特定の生体物質（抗原）を特異的に認識して結合する能力を有するものであれば、天然の全長の抗体でなく、抗体断片または誘導体であってもよい。すなわち、本明細書における「抗体」という用語には、全長の抗体だけでなく、Fab、F(ab)'<sub>2</sub>、Fv、scFvなどの抗体断片およびキメラ抗体（ヒト化抗体等）、多機能抗体などの誘導体が包含される。

#### 【0041】

##### （蛍光体）

第1免疫染色剤用の蛍光体（第1蛍光体）および第2免疫染色剤用の蛍光体（第2蛍光体）は、当該技術分野において用いられている公知の各種の蛍光体の中から選択することができ、特に限定されるものではない。代表的な蛍光体としては、無機半導体ナノ粒子（「量子ドット」とも呼ばれる）、有機蛍光色素、およびこれらの集積体が挙げられる。

10

#### 【0042】

なお、本明細書における「蛍光体」は、所定の波長の電磁波（X線、紫外線または可視光線）が照射されてそのエネルギーを吸収することで電子が励起し、その励起状態から基底状態に戻る際に余剰のエネルギーを電磁波として放出する、つまり「蛍光」を発する物質であって、「プローブ」と結合させることのできるものを指す。また、「蛍光」は広義的な意味を持ち、励起のための電磁波の照射を止めても発光が持続する発光寿命の長い燐光と、発光寿命が短い狭義の蛍光とを包含する。

#### 【0043】

##### ・無機半導体ナノ粒子

無機半導体ナノ粒子としては、II-VI族化合物、III-V族化合物、またはIV族元素を含有するもの、たとえば、CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、Si、Geなどが挙げられる。また、これらの無機半導体ナノ粒子をコアとし、その外側にシェルが形成されたもの、たとえば、CdSe/ZnS、CdS/ZnS、InP/ZnS、InGaP/ZnS、Si/SiO<sub>2</sub>、Si/ZnS、Ge/GeO<sub>2</sub>、Ge/ZnSなどのコア/シェル型無機半導体ナノ粒子を用いることもできる。

20

#### 【0044】

##### ・有機蛍光色素

有機蛍光色素としては、ローダミン系色素分子、スクアリリウム系色素分子、シアニン系色素分子、芳香環系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子、ピロメセン系色素分子などを例示することができる。あるいは、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、Cy（登録商標、GEヘルスケア社製）系色素分子、DY系色素分子（登録商標、DYOMICS社製）、Hilyte（登録商標、アナスペック社製）系色素分子、DyLight（登録商標、サーモサイエンティフィック社製）系色素分子、ATTO（登録商標、ATTO-TEC社製）系色素分子、MFP（登録商標、Mobicitec社製）系色素分子などを用いることができる。なお、このような色素分子の総称は、化合物中の主要な構造（骨格）または登録商標に基づき命名されており、それぞれに属する蛍光色素の範囲は当業者であれば過度の試行錯誤を要することなく適切に把握できるものである。

30

40

#### 【0045】

##### ・蛍光物質集積ナノ粒子

蛍光物質の集積体として、有機物または無機物でできた粒子を母体とし、複数の蛍光物質がその中に内包されているおよび/またはその表面に吸着している構造を有する、ナノサイズの粒子である「蛍光物質集積ナノ粒子」が挙げられる。この場合、母体（たとえば樹脂）と蛍光物質（たとえば有機蛍光色素）は、互いに反対の電荷を有する置換基ないし部位を有しており、静電的相互作用が働くものであることが好適である。

#### 【0046】

蛍光物質集積ナノ粒子に内包させる蛍光物質としては、上述したような無機半導体ナノ

50

粒子、蛍光色素分子のほか、たとえば、 $Y_2O_3$ 、 $Zn_2SiO_4$ 等を母体とし、 $Mn^{2+}$ 、 $Eu^{3+}$ 等を賦活剤とする「長残光蛍光体」を挙げることができる。

【0047】

蛍光物質集積ナノ粒子を形作る母体のうち、有機物としては、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂、フラン樹脂など、一般的に熱硬化性樹脂に分類される樹脂；スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、AS樹脂（アクリロニトリル-スチレン共重合体）、ASA樹脂（アクリロニトリル-スチレン-アクリル酸メチル共重合体）など、一般的に熱可塑性樹脂に分類される樹脂；ポリ乳酸等のその他の樹脂；多糖を例示することができ、無機物としてはシリカ（ガラス）を例示することができる。

10

【0048】

蛍光物質集積ナノ粒子は、公知の方法（たとえば特開2013-57937号公報参照）に従って作製することができる。より具体的には、たとえば、シリカを母体とし、その中に蛍光物質が内包されている蛍光物質内包シリカ粒子は、無機半導体ナノ粒子、有機蛍光色素などの蛍光物質と、テトラエトキシシランのようなシリカ前駆体とが溶解している溶液を、エタノールおよびアンモニアが溶解している溶液に滴下し、シリカ前駆体を加水分解することにより作製することができる。一方、樹脂を母体とし、蛍光物質を樹脂粒子の表面に吸着させるか、樹脂粒子中に内包させるかした蛍光物質内包樹脂粒子は、それらの樹脂の溶液ないし微粒子の分散液を先に用意しておき、そこに無機半導体ナノ粒子、有機蛍光色素などの蛍光物質を添加して攪拌することにより作製することができる。

20

【0049】

あるいは、樹脂原料の溶液に蛍光色素を添加した後、重合反応を進行させることにより、蛍光物質内包樹脂粒子を作製することもできる。たとえば、母体となる樹脂としてメラミン樹脂のような熱硬化性樹脂を用いる場合、その樹脂の原料（モノマーまたはオリゴマーないしプレポリマー、たとえばメラミンとホルムアルデヒドの縮合物であるメチロールメラミン）と、有機蛍光色素と、好ましくはさらに界面活性剤および重合反応促進剤（酸など）とを含有する反応混合物を加熱し、乳化重合法によって重合反応を進行させることにより、有機蛍光色素内包樹脂粒子を作製することができる。また、母体となる樹脂としてスチレン系共重合体のような熱可塑性樹脂を用いる場合、その樹脂の原料と、有機蛍光色素と（樹脂の原料モノマーとして、あらかじめ有機蛍光色素を共有結合などで結合させたモノマーを用いるようにしてもよい）、重合開始剤（過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチロニトリルなど）を含有する反応混合物を加熱し、ラジカル重合法またはイオン重合法によって重合反応を進行させることにより、有機蛍光色素内包樹脂粒子を作製することができる。

30

【0050】

蛍光物質集積ナノ粒子（特に上記のような製造方法によって得られる蛍光色素内包樹脂粒子）の平均粒径は、病理標本の免疫染色に適した粒径であれば特に限定されないが、輝点としての検出のしやすさなどを考慮すると、通常は10~500nm、好ましくは50~200nmである。また、粒径のばらつきを示す変動係数は、通常は20%以下であり、好ましくは5~15%である。このような条件を満たす蛍光物質集積ナノ粒子は、製造条件を調整することにより製造することができる。たとえば、乳化重合法により蛍光物質集積ナノ粒子を作製する場合は、添加する界面活性剤の量によって粒径を調節することができ、一般的に、蛍光物質集積ナノ粒子の母体原料の量に対する界面活性剤の量が相対的に多ければ粒径は小さくなり、その量が相対的に少なければ粒径は大きくなる傾向にある。

40

【0051】

なお、蛍光物質集積ナノ粒子の粒径は、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて電子顕微鏡写真を撮影して蛍光物質集積ナノ粒子の断面積を計測し、その断面形状を円と仮定したときに、その断面積に相当する円の直径として算出することができる。複数の蛍光物質集積ナノ粒子からなる集団の平均粒径および変動係数は、十分な数（たとえば1000個）

50

の蛍光物質集積ナノ粒子について上記のようにして粒径を算出した後、平均粒径はその算術平均として算出され、変動係数は式： $100 \times \text{粒径の標準偏差} / \text{平均粒径}$ 、により算出される。

【0052】

・好ましい蛍光体

第1蛍光体としては「蛍光色素内包ナノ粒子」が好ましく、第2蛍光体としては「蛍光色素」が好ましい。目的生体物質を蛍光標識する蛍光色素内包ナノ粒子は、目的生体物質を1分子ずつ輝点として表すのに十分な強度の蛍光を発することができ、また、参照生体物質を蛍光標識する蛍光色素は、目的生体物質のシグナル（前記輝点）を適切に補正することができる、標本作製時の劣化状態を反映した強度の蛍光を発することができるためである。

10

【0053】

ただし、本発明はこれらの第1蛍光体および第2蛍光体を用いる実施形態に限定されるものではなく、たとえば、第1蛍光体として無機半導体ナノ粒子、第2蛍光体として蛍光色素を用いる実施形態であってもよく、第1蛍光体および第2蛍光体として互いに異なる波長の蛍光を発する蛍光色素内包ナノ粒子を用いる実施形態であってもよい。参照生体物質として2種類以上の生体物質を免疫染色する場合は、各参照生体物質を異なる波長の蛍光を発する蛍光体で標識する必要はなく、1種類の蛍光体を第2蛍光体として共通して用いることができる。

【0054】

（免疫染色剤の構成）

第1および第2免疫染色剤は、それぞれ目的生体物質および参照生体物質を蛍光標識し、病理診断のために有用なデータを得ることができるシグナルを発することができる限り、特に限定されるものではなく、公知の様々な免疫染色剤を用いることができる。そのような免疫染色剤としては、プローブおよび蛍光体が直接的に、つまり必要に応じてリンカー分子を介していてもよい、共有結合によって連結されているものを用いることもできるが、蛍光標識の効率を向上させて蛍光の劣化につながる時間経過をなるべく抑えるために、プローブおよび蛍光体が間接的に、つまり抗原抗体反応やアビジン・ビオチン反応などを利用した、共有結合以外の結合によって連結される複合体を用いることが好ましい。

20

【0055】

目的生体物質を蛍光標識するための第1免疫染色剤に含まれる蛍光体としては、前述したように「蛍光色素内包ナノ粒子」が好ましい。プローブおよび蛍光体が間接的に連結される第1免疫染色剤の一例として、[目的生体物質に対する抗体（プローブである1次抗体）]...[1次抗体に対する抗体（2次抗体）]-[ビオチン]/[アビジン]-[蛍光体（蛍光色素内包ナノ粒子）]（ここで、"... "は抗原抗体反応により結合していることを表し、"- "は必要に応じてリンカー分子を介していてもよい共有結合により結合していることを表し、"/ "はアビジン・ビオチン反応により結合していることを表す。）という様式によって連結される、3つの分子からなる複合体が挙げられる。

30

【0056】

一方、参照生体物質を蛍光標識するための第2免疫染色剤に含まれる蛍光体としては、前述したように「蛍光色素」が好ましい。プローブおよび蛍光体が間接的に連結される第2免疫染色剤の一例として、[参照生体物質に対する抗体（プローブである1次抗体）]...[1次抗体に対する抗体（2次抗体）]-[蛍光体（蛍光色素）]（ここで、"... "は抗原抗体反応により結合していることを表し、"- "は必要に応じてリンカー分子を介していてもよい共有結合により結合していることを表す。）という様式によって連結される、2つの分子からなる複合体が挙げられる。

40

【0057】

これらの複合体を併用する実施形態において、目的生体物質に対する1次抗体に結合させる2次抗体と、参照生体物質に対する1次抗体に結合させる2次抗体とは、意図しない結合を避けるため、異なる種類の抗体とすることが適切である。たとえば、目的生体物質

50

に対する1次抗体としてマウスIgGを、それに対する2次抗体として抗マウスIgG抗体を用い、一方で参照生体物質に対する1次抗体としてウサギIgGを、それに対する2次抗体として抗ウサギIgG抗体を用いるようにすればよい。1次抗体および2次抗体は、常法に従って作製することもできるし、市販されているものを利用することもできる。

【0058】

2次抗体-ビオチン結合体(ビオチン修飾2次抗体)は、所望の抗体(タンパク質)にビオチンを結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されているビオチン標識試薬(キット)を利用して作製することができる。また、あらかじめ所望の抗体にビオチンが結合されているビオチン修飾2次抗体自体が市販されていれば、それを利用してもよい。

10

【0059】

蛍光体-アビジン結合体(アビジン修飾蛍光体)も、蛍光体にアビジンを結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されているアビジン標識試薬(キット)を利用して作製することができる。この場合のアビジンは、ビオチンとの間でアビジンよりも高い結合力が働く、ストレプトアビジンやニュートラアビジンなどの改良型であってもよい。

【0060】

蛍光体-アビジン結合体の作製方法の具体例を挙げれば次の通りである。蛍光体が樹脂を母体とする蛍光物質集積ナノ粒子である場合、その樹脂が有する官能基と、アビジン(タンパク質)が有する官能基とを、必要に応じて分子の両末端に官能基を有するPEG等のリンカー分子を介することにより、結合させることができる。たとえば、メラミン樹脂であればアミノ基等の官能基を利用することができるし、アクリル樹脂、スチレン樹脂等であれば、側鎖に官能基(たとえばエポキシ基)を有するモノマーを共重合させることにより、その官能基自体またはその官能基から変換された官能基(たとえばアンモニア水を反応させることにより生成するアミノ基)を利用することができるし、さらにはそれらの官能基を利用して別の官能基を導入することもできる。また、蛍光体がシリカを母体とする蛍光物質集積ナノ粒子または無機半導体ナノ粒子である場合、シランカップリング剤で表面修飾することにより所望の官能基を導入することができ、たとえばアミノプロピルトリメトキシシランを用いればアミノ基を導入することができる。一方、アビジンに対しては、たとえばN-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート(SATA)をアビジンのアミノ基と反応させることにより、チオール基を導入することができる。そして、アミノ基との反応性を有するN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)エステルおよびチオール基との反応性を有するマレイミド基をポリエチレングリコール(PEG)鎖の両端に有するクロスリンカー試薬を利用することにより、アミノ基を有する蛍光体と、チオール基が導入されたアビジンとを連結することができる。

20

30

【0061】

2次抗体-蛍光色素結合体(蛍光標識2次抗体)は、所望の抗体(タンパク質)に所望の蛍光色素を結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されている蛍光標識試薬(キット)を利用して作製することができる。また、あらかじめ所望の抗体に所望の蛍光色素が結合されている蛍光標識2次抗体自体が市販されていれば、それを利用してもよい。

40

【0062】

- 目的生体物質の定量方法(図参照) -

本発明に係る目的生体物質の定量方法は、少なくとも下記の工程を含む：

(1a) 目的生体物質を蛍光体を用いて免疫染色する工程(第1免疫染色工程)；

(1b) 参照生体物質を目的生体物質用の蛍光体とは異なる蛍光体を用いて免疫染色する工程(第2免疫染色工程)；

(2) 前記目的生体物質の免疫染色像および前記参照生体物質の免疫染色像について、前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルおよび前記参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルを計測し、細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナ

50

ルを抽出する工程（画像処理・計測工程）：および

（３）測定対象領域全体について、または各細胞について、前記細胞膜の領域内にある目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を、参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を用いて補正し、発現量を定量するための指標とする工程（補正工程）。

【 0 0 6 3 】

なお、第１免疫染色工程および第２免疫染色工程は、どちらかの工程を先に行ってから残る工程を行ってもよいし、同時に行ってもよい。

【 0 0 6 4 】

また、本発明に係る目的生体物質の定量方法は通常、上記の工程以外にも、標本前処理工程、標本後処理工程などを含む。これらの工程は、具体的には、たとえば次のような手順で行われる。

【 0 0 6 5 】

（標本前処理工程）

病理標本は、細胞、組織、臓器などの切片がパラフィンに包埋された状態で保存されていることが多い。このような切片を免疫染色するためには、通常、免疫染色に先立って、切片の脱パラフィン処理、および抗原の賦活化処理が行われる。

【 0 0 6 6 】

脱パラフィン処理は、たとえば、キシレンに病理切片を浸漬してパラフィンを除去し、次いでエタノールに病理切片を浸漬してキシレンを除去し、さらに水に病理切片を浸漬してエタノールを除去するようにして行えばよい。これら３つの操作は、通常、室温で行えばよい。また、それぞれの浸漬時間は３～３０分程度でよく、必要に応じて浸漬途中でそれぞれの処理液を交換してもよい。

【 0 0 6 7 】

抗原の賦活化処理は、たとえば、賦活液（０．０１Ｍクエン酸緩衝液、１ｍＭＥＤＴＡ水溶液、５％尿素水溶液、０．１Ｍトリス塩酸緩衝液等）に、脱パラフィン処理を終えた病理標本を浸漬して加熱し、続いてＰＢＳに病理標本を浸漬して洗浄するようにして行えばよい。賦活液中での加熱は、たとえば温度を５０～１３０、時間を５～３０分とすればよい。また、ＰＢＳでの浸漬は、通常室温で、３～３０分程度でよく、必要に応じて浸漬途中でＰＢＳを交換してもよい。

【 0 0 6 8 】

（染色工程）

（１ａ）第１免疫染色工程：目的生体物質の免疫染色

目的生体物質を免疫染色するための第１免疫染色工程は、前述したような第１免疫染色剤を用いて病理標本を免疫染色する工程である。第１免疫染色剤が、プローブと蛍光体とが直接的に連結しているものである場合は、その第１免疫染色剤を含む溶剤に賦活化工程を終えた病理標本を浸漬すればよい。一方、第１免疫染色剤が、プローブと蛍光体とが間接的に連結に結合している複合体である場合は、それらの複合体を形成するための複数の試薬に、病理標本を順次浸漬すればよい。

【 0 0 6 9 】

たとえば、第１免疫染色剤が、[ １次抗体（プローブ） ] ... [ ２次抗体 ] - [ ビオチン ] / [ アビジン ] - [ 蛍光色素内包ナノ粒子（蛍光体） ] という複合体である場合、最初に１次抗体（プローブ）の溶液（本明細書において「試薬Ⅰ」と称することもある）に病理標本を浸漬する処理（１次反応処理）、次に２次抗体 - ビオチン結合体の溶液（本明細書において「試薬Ⅱ」と称することもある）に病理標本を浸漬する処理（２次反応処理）、最後にアビジン - 蛍光色素内包ナノ粒子の溶液（本明細書において「試薬Ⅲ」と称することもある）に病理標本を浸漬する処理（蛍光標識処理）を行えばよい。

【 0 0 7 0 】

第１免疫染色工程を行う上での条件、たとえば１次反応処理、２次反応処理および蛍光標識処理それぞれにおける、所定の溶液（試薬）に病理標本を浸漬する際の温度および浸

10

20

30

40

50

漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

【0071】

(1b) 第2免疫染色工程：参照生体物質の免疫染色

参照生体物質を免疫染色するための第2免疫染色工程は、前述したような第2免疫染色剤を用いて病理標本を免疫染色する工程である。第2免疫染色剤が、プローブと蛍光体とが直接的に連結しているものである場合は、その第2免疫染色剤を含む溶剤に賦活化工程を終えた病理標本を浸漬すればよい。一方、第2免疫染色剤が、プローブと蛍光体とが間接的に連結に結合している複合体である場合は、それらの複合体を形成するための複数の試薬に、病理標本を順次浸漬すればよい。

10

【0072】

たとえば、第2免疫染色剤が、[1次抗体(プローブ)]...[2次抗体]-[蛍光色素(蛍光体)]という複合体である場合、最初に1次抗体(プローブ)の溶液(本明細書において「試薬i」と称することもある)に病理標本を浸漬する処理(1次反応処理)、次に2次抗体-蛍光色素結合体の溶液(本明細書において「試薬ii」と称することもある)に病理標本を浸漬する処理(2次反応・蛍光標識処理)を行えばよい。

【0073】

参照生体物質を2種類以上にする場合は上記の試薬iに、各参照生体物質に対応する2種類以上の抗体を含ませ、一度に全ての参照生体物質を免疫染色するようにすることが好適である。

20

【0074】

第2免疫染色工程を行う上での条件、たとえば1次反応処理および2次反応・蛍光標識処理それぞれにおける、所定の溶液(試薬)に病理標本を浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

【0075】

(1c) 任意工程

本発明では、もしも必要であれば、明視野において細胞、組織、臓器等の形態を観察することができるようにするための、形態観察染色工程を含めることができる。形態観察染色工程は、常法に従って行うことができる。組織標本の形態観察に関しては、細胞質・間質・各種線維・赤血球・角化細胞が赤～濃赤色に染色される、エオジンを用いた染色が標準的に用いられている。また、細胞核・石灰部・軟骨組織・細菌・粘液が青藍色～淡青色に染色される、ヘマトキシリンを用いた染色も標準的に用いられている(これら2つの染色を同時に行う方法はヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)として知られている)。形態観察染色工程を含める場合は、免疫染色工程の後に行うようにしてもよいし、免疫染色工程の前に行うようにしてもよい。

30

【0076】

(標本後処理工程)

第1および第2免疫染色を終えた病理標本は、観察に適したものとなるよう、固定化・脱水、透徹、封入などの処理を行うことが好ましい。

40

【0077】

固定化・脱水処理は、病理標本を固定処理液(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)に浸漬すればよい。透徹は、固定化・脱水処理を終えた病理標本を透徹液(キシレン等)に浸漬すればよい。封入処理は、透徹処理を終えた病理標本を封入液に浸漬すればよい。これらの処理を行う上での条件、たとえば病理標本を所定の処理液に浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

【0078】

(観察・撮影工程)

観察・撮影工程では、第1免疫染色工程により得られる染色像(第1免疫染色像)およ

50

び第2免疫染色工程により得られる染色像(第2免疫染色像)を取得する。具体的には、所望の倍率における顕微鏡の同一視野において、第1免疫染色工程に用いられた目的生体物質を蛍光標識している第1蛍光体に対応した励起光、および第2免疫染色工程に用いられた参照生体物質を蛍光標識している第2蛍光体に対応した励起光それぞれを病理標本に照射し、それらの蛍光体から発せられた蛍光による免疫染色像それぞれを観察・撮影する。観察工程における励起光は、組織切片の自家蛍光との関係で免疫染色剤用の蛍光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、組織切片からの自家蛍光が高くなりすぎない観点から、550~630nmの波長を有する励起光が好ましい。これらの励起光の照射は、たとえば、蛍光顕微鏡が備えるレーザー光源と、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させる励起光用フィルターを用いることで照射することができる。第1 10 蛍光体に対する励起光の波長と第2蛍光体に対する励起光の波長が異なる場合は、励起光用フィルターを切り替えることで、同一のレーザー光源から両方の波長の励起光を照射することができる。免疫染色像の撮影は、たとえば、蛍光顕微鏡が備えるデジタルカメラによって行うことができる。免疫染色像の撮影の際には、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させる蛍光用フィルターを用いることで、目的とする蛍光のみを含み、目的としない蛍光やノイズとなる励起光およびその他の光を排除した免疫染色像を撮影することができる。第1 20 蛍光体が発する蛍光の波長と第2蛍光体が発する蛍光の波長は、互いの蛍光を区別できるよう異なるものとする必要があるので、蛍光用フィルターを切り替えながら、それぞれの蛍光の免疫染色像を撮影すればよい。

【0079】

(画像処理・計測工程)

画像処理・計測工程では、目的生体物質に関して撮影された第1免疫染色像、および参照生体物質に関して撮影された第2免疫染色像のそれぞれについて、画像処理に基づき、目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルおよび参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルを計測し、細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの位置を特定する。

【0080】

蛍光標識シグナルは、蛍光強度(輝度)として扱ってもよいし、蛍光の輝点数として扱ってもよい。目的生体物質用の蛍光体として蛍光色素内包ナノ粒子を用いる場合、そのシグナルは輝点として扱うことが好ましく、参照生体物質用の蛍光体として蛍光色素を用いる場合、そのシグナルは蛍光強度として扱うことが好ましい。

【0081】

画像処理に用いることができるソフトウェアとしては、たとえば「ImageJ」(オープンソース)が挙げられる。このような画像処理ソフトウェアを利用することにより、免疫染色像から、所定の波長(色)の輝点を抽出してその輝度の総和を算出したり、所定の輝度以上の輝点の数を計測したりする処理、特に、次に述べる第1実施形態および第2実施形態を行う為の処理を、半自動的に、迅速に行うことができる。

【0082】

本発明では、第1染色像および第2染色像を用いることにより、蛍光標識シグナルを計測すると同時に、染色像の細胞膜の領域内(つまり細胞膜上)に存在する目的生体物質 40 に対応している蛍光標識シグナルを特定して抽出することができる。特に、目的生体物質用の蛍光体として蛍光色素内包ナノ粒子を用い、参照生体物質用の蛍光体として蛍光色素を用いる場合、好ましい実施形態として、たとえば次のような第1実施形態および第2実施形態が挙げられる。

【0083】

(2a)第1実施形態

第1実施形態は、次の工程(2a-1)、(2a-2)および(2a-3)を含む：

(2a-1)参照生体物質の免疫染色像(図3参照)から蛍光色素の輝点を抽出して細胞膜領域像を形成すると共に、その細胞膜領域内の輝点の輝度の総和を参照生体物質の蛍光標識シグナルとして計測する工程；

10

20

30

40

50

(2 a - 2) 細胞膜領域像に目的生体物質の免疫染色像(図2参照)を重ねあわせ(図4参照)、細胞膜領域の内側にある蛍光色素内包ナノ粒子の輝点数を目的生体物質の蛍光標識シグナルとして計測する工程;

(2 a - 3) 細胞膜領域内の輝点数を蛍光色素の輝度の総和で除することで補正された計測値をもって、目的生体物質の発現量を定量するための指標値とする工程。

【0084】

すなわち、第1実施形態では、参照生体物質の免疫染色像を、目的生体物質の蛍光標識シグナルを補正するために利用するとともに、細胞膜領域像を形成してそこに含まれる目的生体物質の蛍光標識シグナル(輝点)のみを抽出するために利用している。したがって、別途細胞膜を検出するための染色(たとえば明視野観察できるDAB染色)などは本発明においては不要である。

10

【0085】

(2 b) 第2実施形態

第2実施形態は、次の工程(2 b - 1)、(2 b - 2)および(2 b - 3)を含む:

(2 b - 1) 目的生体物質の免疫染色像(図2参照)から、輝点抽出プログラムに従って蛍光色素内包ナノ粒子の輝点を抽出して細胞膜領域像を形成すると共に、その細胞膜領域内の輝点数を前記目的生体物質の蛍光標識シグナルとして計測する工程;

(2 b - 2) 参照生体物質の免疫染色像(図3参照)と細胞膜領域とを重ねあわせ、細胞膜領域の内側にある蛍光色素の輝度の総和を参照生体物質の蛍光標識シグナルとして計測する工程;

20

(2 b - 3) 細胞膜領域内の輝点数を蛍光色素の輝度の総和で除することで補正された計測値をもって、目的生体物質の発現量を定量するための指標値とする工程。

【0086】

工程(2 b - 1)における輝点抽出プログラムとしては、輝度のムラがある場合でも輝点を適切に抽出できる方法、たとえばトップハット法が挙げられる。

【0087】

このような第2実施形態では、目的生体物質の免疫染色像だけからでも、適切な輝点抽出プログラムを利用することで細胞膜領域像を形成して、そこに含まれるそこに含まれる目的生体物質の蛍光標識シグナル(輝点)のみを抽出することができる。参照生体物質の免疫染色像は、目的生体物質の蛍光標識シグナル(輝点)を補正するための、輝度の総和を求めるためだけに利用できればよい。

30

【0088】

(補正工程)

補正工程では、測定対象領域全体について、または各細胞について、細胞膜の領域内にある目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を、参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値を用いて補正し、発現量を定量するための指標とする。補正の仕方は特に限定されるものではないが、たとえば、それぞれのシグナルの計測値を、換算、変換、あるいは比較などを任意の方法で行うことができる。具体的には、目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルとして蛍光色素内包ナノ粒子の輝点数を用い、参照生体物質に対応する蛍光標識シグナルとして蛍光色素の輝度の総和を用い、前者を後者で除する(割る)ことで補正する方法が好ましい。

40

【0089】

なお、このような補正は、第1および第2免疫染色像の測定対象領域全体(たとえば視野全体、あるいはその他の任意の測定したい関心領域全体)について行ってもよいし、そこに含まれる細胞ごとに行ってもよい。

【0090】

(評価工程)

評価工程では、補正工程で得られた指標、すなわち細胞膜の領域内にある目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルの計測値の補正值に基づき、細胞膜領域内の目的生体物質を定量することで標本の評価を行い、病理診断のために有用な情報を取得する。

50

## 【0091】

標本の評価の方法は、従来の免疫組織化学（IHC）染色に基づく病理診断に準じたものとすることができる。たとえば、乳癌に関する病理診断のために、すなわちHER2タンパク質を特異的ターゲットとする分子標的薬「ハーセプチン」の治療への有効性を判定するため、病理標本中のHER2タンパク質の発現量を評価する方法が広く用いられている（「ハーセプチンの適正な症例選択のためのHER2検査ガイド」2009年9月、トラスツズマブ病理部会作成、第三版）。この方法では、所定のプロトコールにしたがって、DAB染色などによりHER2の免疫染色を行い、染色パターン（標本中の、細胞膜の陽性染色がある癌細胞の割合）の結果から、スコアを求め（3+、2+、1+または0）、陽性が陰性かの判定を行っている（3+=陽性、2+=equivocal、1+または0=陰性）。そして、別途行われる、FISH法によるHER2遺伝子の過剰発現の判定結果と組み合わせて、ハーセプチンの治療対象とすることがどうかを決定する。このような病理診断において、本発明の方法によって得られた、細胞膜上のHER2の発現量の定量に係る補正值を、ハーセプチンの奏効率の結果と統計学的に対比することにより、従来の病理診断に類似したスコアおよび判定を設定することが可能となり、有効性を持つ病理診断を行えるようになる。

10

## 【0092】

## キット

本発明の別の側面において、本発明に係る目的生体物質の定量方法を実施するためのキットが提供される。このキットは少なくとも、目的生体物質用の免疫染色剤を作製するための抗体および蛍光体、ならびに参照生体物質用の免疫染色剤を作製するための抗体および蛍光体を含む。

20

## 【0093】

具体的には、たとえば、目的生体物質用の免疫染色剤として、前述したような[1次抗体（プローブ）]...[2次抗体]-[ビオチン]/[アビジン]-[蛍光色素内包ナノ粒子（蛍光体）]という複合体を形成するものを作製できるよう、1次抗体；2次抗体-ビオチン結合体か、それを調製するための2次抗体、ビオチンおよび反応試薬；アビジン-蛍光色素内包ナノ粒子結合体か、それを調製するためのアビジン、蛍光色素内包ナノ粒子および反応試薬を含むものが好ましい。また、参照生体物質の免疫染色剤として、前述したような[1次抗体（プローブ）]...[2次抗体]-[蛍光色素（蛍光体）]という複合体を形成するものを作製できるよう、1次抗体（参照生体物質を2種類以上とする場合はそれぞれに対応した抗体）；2次抗体-蛍光色素結合体か、それを調製するための2次抗体、蛍光色素および反応試薬を含むものが好ましい。

30

## 【0094】

このキットは更に、必要に応じて、病理標本を免疫染色するためのその他の必要な試薬、部材等や、本発明に係る目的生体物質の定量方法を実施するための説明書などを含んでいてもよい。

## 【実施例】

## 【0095】

## [試薬II：ビオチン修飾抗ウサギIgG抗体の作製]

50mM Tris溶液に、2次抗体として用いる抗ウサギIgG抗体50μgを溶解した。この溶液に、最終濃度3mMとなるようにDTT（ジチオトレイトール）溶液を添加、混合し、37℃で30分間反応させた。その後、反応溶液を脱塩カラム「Zeba Desalt Spin Columns」（サーモサイエンティフィック社、Cat.#89882）に通して、DTTで還元化した2次抗体を精製した。精製した抗体全量のうち200μLを50mM Tris溶液に溶解して抗体溶液を調製した。その一方で、リンカー試薬「Maleimide-PEG<sub>2</sub>-Biotin」（サーモサイエンティフィック社、製品番号21901）を、DMSOを用いて0.4mMとなるように調整した。このリンカー試薬溶液8.5μLを前記抗体溶液に添加、混合し、37℃で30分間反応させることにより、抗ウサギIgG抗体にPEG鎖を介してビオチンを結合させた。この反応溶液を脱塩カラムに通して精製した。脱塩した反応溶液につい

40

50

て、波長300nmにおける吸光度を分光高度計（日立製「F-7000」）を用いて測定することにより、反応溶液中のタンパク質（ビオチン修飾2次抗体）の濃度を算出した。50mM Tris溶液を用いて、ビオチン修飾2次抗体の濃度を250µg/mLに調整した溶液を、ビオチン修飾2次抗体（試薬II）の溶液とした。

#### 【0096】

〔試薬III：ストレプトアビジン修飾テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子〕

（1）テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の調製

テキサスレッド色素分子「Sulforhodamine 101」（シグマアルドリッチ社）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株式会社）1.5gを加え、さらに同一条件で5分間加熱攪拌した。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、その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Xと略称する。）を沈殿させた。上澄みを除去し、沈殿した粒子Xをエタノールおよび水で洗浄した。

10

#### 【0097】

（2）マレイミド基導入テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の調製

洗浄後の粒子X 0.1mg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」（信越化学工業株式会社）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。表面がアミノ化された粒子Xの濃度を、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2mM含有したPBSを用いて3nMに調整し、この溶液にリンカー試薬「SM(PEG)<sub>12</sub>」（サーモサイエンティフィック社製、cat.No. 22112）を最終濃度10mMとなるよう添加、混合して、攪拌しながら室温で1時間反応させた。反応液を10,000Gで20分間の遠心分離にかけ、上澄みを除去した後、EDTAを2mM含有したPBSを加えて沈降物を分散させ、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Xを得た。

20

#### 【0098】

（3）チオール基導入ストレプトアビジンの調製

一方、チオール基を導入したストレプトアビジンは以下のようにして作製した。まず、1mg/mLに調整したストレプトアビジン（和光純薬工業株式会社）の水溶液40µLに、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）の水溶液70µLを加え、室温で1時間より反応させることにより、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。続いて、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）を生成させて、ストレプトアビジンにチオール基（-SH）を導入する処理を完了させた。この溶液をゲルろ過カラム（Zaba Spin Desalting Columns：フナコシ）に通して脱塩し、チオール基を導入したストレプトアビジンを得た。

30

40

#### 【0099】

（4）ストレプトアビジン修飾テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の作製

（2）で調製した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X（テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子）と、（3）で調製したチオール基を導入したストレプトアビジンとを、EDTAを2mM含有するPBS中で混合し、1時間反応させることで、粒子XにPEG鎖を介してストレプトアビジンを結合させた。この反応液に10mM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物を除去し、ストレプトアビジンで修飾

50

された粒子X (試薬III)を得た。

【0100】

[実施例1]

(E1) 標本作製工程および標本前処理工程

培養した乳癌細胞株CRL1500を、4%パラホルムアルデヒドを用いて固定処理した後、常法に従って脱水、包埋および薄切し、標本作製した。この際の固定処理時間を1時間とした処理群、12時間とした処理群、96時間とした処理群、それぞれ3つずつ標本作製した。

【0101】

作製した標本は脱パラフィン処理した後、水に置換する洗浄を行った。洗浄した組織アレイスライドを10mMクエン酸緩衝液中(pH6.0)中で121、15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。賦活化処理後の組織アレイスライドをPBSにより洗浄し、洗浄した組織アレイスライドに対してBSAを1%含有するPBSを用いて1時間ブロッキング処理を行った。

10

【0102】

(E2) 免疫染色工程

(E2-1) 第1・第2免疫染色用共通の1次反応処理

目的生体物質HER2に係る第1免疫染色用の1次反応処理と、参照生体物質カドヘリンに係る第2免疫染色用の1次反応処理は、両方の1次反応処理用の抗体を溶解させた反応処理液を用いて一度に行った。すなわち、BSAを1%含有するPBSを用いて、抗HER2ウサギモノクローナル抗体「4B5」(ペンタナ社)(試薬I)を0.05nMの濃度で含有するとともに、抗パン(Anti-pan)カドヘリン抗体[CH-19](アブカム社、ab6528)を1:200に希釈した濃度で含有する1次反応処理液を調製した。この1次反応処理液に工程(1)で作製した標本を浸漬し、4で1晩反応させた。

20

【0103】

(E2-2) 第1免疫染色用の2次反応処理

[作製例]で作製した試薬II(ビオチン修飾抗ウサギIgG抗体)の溶液を、さらにBSAを1%含有するPBSを用いて6μg/mLに希釈した2次反応処理液を調製した。1次反応処理を終えた標本をPBSで洗浄した後、この2次反応処理液に浸漬し、室温で30分間反応させた。

30

【0104】

(E2-3) 第1免疫染色用の蛍光標識処理

[作製例]で作製した試薬III(ストレプトアビジン修飾テキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子)を、BSAを1%含有するPBSを用いて0.02nMに希釈した蛍光標識反応処理液を調製した。2次反応処理を終えた標本をこの蛍光標識処理液に浸漬し、中性のpH環境下(pH6.9~7.4)、室温で3時間反応させた。

【0105】

(E2-4) 第2免疫染色工用の2次反応・蛍光標識処理

BSAを1%含有するPBSを用いてAlexa Fluor 647標識化抗マウスIgG抗体(ライフテクノロジー社、A21236)を1:200に希釈した2次反応処理液を調製した。1次反応処理を終えた標本をPBSで洗浄した後、この2次反応処理液に浸漬し、室温で30分間反応させた。

40

【0106】

(E2-5) 標本後処理工程

第1および第2免疫染色を終えた標本に対して、純エタノールに5分間浸漬する操作を4回行う固定化・脱水処理を行った。続いて、キシレンに5分間浸漬する操作を4回行う透徹処理を行った。最後に、標本に封入剤「エンタランニュー」(メルク社)を載せて、カバーガラスを被せる封入処理を行い、観察に用いる標本とした。

【0107】

(E3) 評価工程

50

## ( E 3 - 1 ) 観察・撮影工程

この工程における励起光の照射および蛍光の発光の観察には蛍光顕微鏡「B X - 5 3」(オリンパス株式会社)を用い、免疫染色像(400倍)の撮影には、当該蛍光顕微鏡に取り付けた顕微鏡用デジタルカメラ「D P 7 3」(オリンパス株式会社)を用いた。

## 【 0 1 0 8 】

まず、目的生体物質(HER2)の蛍光標識に用いたテキサスレッド色素に対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させ、その状態の免疫染色像を撮影した(第1免疫染色像)。この際、励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルターを用いて575~600nmに設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光用光学フィルターを用いて612~692nmに設定した。蛍光顕微鏡による観察および画像撮影時の励起光の強度は、視野中心部付近の照射エネルギーが900W/cm<sup>2</sup>となるようにした。画像撮影時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないような範囲で調節し、例えば4000μ秒に設定した。

10

## 【 0 1 0 9 】

続いて、励起光用光学フィルターおよび蛍光用光学フィルターを切り替え、参照生体物質(カドヘリン)の蛍光標識に用いたAlexa Fluor 647に対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させ、その状態の免疫染色像を撮影した(第2免疫染色像)。この際、励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルターを用いて620~650nmに設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光用光学フィルターを用いて660~700nmに設定した。蛍光顕微鏡による観察および画像撮影時の励起光の強度は、視野中心部付近の照射エネルギーが400W/cm<sup>2</sup>となるようにした。画像撮影時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないような範囲で調節し、例えば800msに設定した。

20

## 【 0 1 1 0 】

このような第1および第2免疫染色像の撮影は、同一視野において行った後、視野を変えて同じ操作を繰り返し、1標本につき合計5視野ずつ行った(第1~第5視野)。

## 【 0 1 1 1 】

## ( E 3 - 2 ) 画像処理・計測工程

この工程における画像処理には、画像処理ソフトウェア「ImageJ」(オープンソース)を用いた。

## 【 0 1 1 2 】

最初に、参照生体物質であるカドヘリンに関する第2免疫染色像を用いて、蛍光体が発する蛍光の輝度が所定の値以上の領域を、目的生体物質が発現している細胞膜に相当する"輝点計測領域"として抽出した。あわせて、その輝点計測領域を構成する蛍光の強度の総和(Y)を求めた。

30

## 【 0 1 1 3 】

次に、目的生体物質であるHER2に関する第1免疫染色像を、輝点計測領域が抽出された第2免疫染色像に重ねあわせ、当該領域内に位置する、HER2を蛍光標識したテキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子を表す輝点のうち輝度が所定の値以上のものの数(X)を計測した。

## 【 0 1 1 4 】

## ( E 3 - 3 ) 補正工程

補正のために、前記Xの値を前記Yの値で割った値を算出した。このような値を第1~第5視野のそれぞれについて算出した後、それらの平均値を求め、HER2の発現量を評価するために用いる"補正HER2定量値"とした。

40

## 【 0 1 1 5 】

1時間固定処理群(標本数n=3)、12時間固定処理群(n=3)および96時間固定処理群(n=3)、合計9標本についての補正HER2定量値から、変動係数CV(=100×補正HER2定量値の標準偏差/補正HER2定量値の平均値)を算出した。

## 【 0 1 1 6 】

[ 実施例 2 ]

50

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からSK-BR3に変更した以外は、実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER2定量値の変動係数を算出した。

【0117】

[実施例3]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からNDA-MB453に変更した以外は、実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER2定量値の変動係数を算出した。

【0118】

[実施例4]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からNDA-MB175に変更した以外は、実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER2定量値の変動係数を算出した。

【0119】

[実施例5]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からCOLO201に変更した以外は、実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER2定量値の変動係数を算出した。

【0120】

[実施例6]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からHelaに変更した以外は、実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER2定量値の変動係数を算出した。

【0121】

[実施例7]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からMCF-7に変更した以外は、実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER2定量値の変動係数を算出した。

【0122】

[実施例8]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からNDA-MB231に変更した以外は、実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER2定量値の変動係数を算出した。

【0123】

[実施例9]

参照生体物質を、カドヘリン1種類から、ATPase、カドヘリン、サイトケラチンおよびEpCAMの4種類に変更した。すなわち、免疫染色工程に用いた、第1・第2免疫染色用の1次反応処理液として、抗HER2ウサギモノクローナル抗体「4B5」(ペントナ社)(試薬I)を0.05nMの濃度で含有するとともに、抗パンカドヘリン抗体(Anti-pan Cadherin antibody)[CH-19](アブカム社、ab6528)、抗Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase抗体(Anti-alpha 1 Sodium Potassium ATPase antibody)[464.6]-原形質膜マーカー(Plasma Membrane Marker)(アブカム社、ab7671)、抗パンサイトケラチン抗体(Anti-pan Cytokeratin antibody)[PCK-26](アブカム社、ab6401)および抗EpCAM抗体「VU1D9」(アブカム社)それぞれを1:200に希釈した濃度で含有するものを用いた。それ以外は実施例1と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行った。

【0124】

[実施例10]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株をCRL1500からSK-BR3に変更した以外は、実施例9と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正HER

10

20

30

40

50

R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 2 5 】

[ 実施例 1 1 ]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株を C R L 1 5 0 0 から N D A - M B 4 5 3 に変更した以外は、実施例 9 と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 2 6 】

[ 実施例 1 2 ]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株を C R L 1 5 0 0 から N D A - M B 1 7 5 に変更した以外は、実施例 9 と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

10

【 0 1 2 7 】

[ 実施例 1 3 ]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株を C R L 1 5 0 0 から C O L O 2 0 1 に変更した以外は、実施例 9 と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 2 8 】

[ 実施例 1 4 ]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株を C R L 1 5 0 0 から H e l a に変更した以外は、実施例 9 と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

20

【 0 1 2 9 】

[ 実施例 1 5 ]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株を C R L 1 5 0 0 から M C F - 7 に変更した以外は、実施例 9 と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 3 0 】

[ 実施例 1 6 ]

標本作製工程で用いた乳癌細胞株を C R L 1 5 0 0 から N D A - M B 2 3 1 に変更した以外は、実施例 9 と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

30

【 0 1 3 1 】

[ 実施例 1 7 ]

免疫染色工程の後に、さらに H E 染色を行なった以外は、実施例 1 と同様の手順で標本作製工程および免疫染色工程を行い、補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。ここで評価工程においては、目的生体物質および参照生体物質の蛍光標識に用いた色素に対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させて免疫染色像を撮影する工程に加えて、H E 染色による染色像を明視野にて撮影する工程を行った。

【 0 1 3 2 】

[ 参考例 1 ]

実施例 1 の評価工程中の画像処理・計測工程において、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ~ 第 5 視野の平均値を求め、H E R 2 の発現量を評価するために用いる "非補正 H E R 2 定量値" とし、その変動係数 C V を算出した。

40

【 0 1 3 3 】

[ 参考例 2 ]

実施例 2 の評価工程中の画像処理・計測工程において、参考例 1 と同様、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ~ 第 5 視野の平均値を求め、非補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 3 4 】

[ 参考例 3 ]

50

実施例 3 の評価工程中の画像処理・計測工程において、参考例 1 と同様、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ～ 第 5 視野の平均値を求め、非補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 3 5 】

[ 参考例 4 ]

実施例 4 の評価工程中の画像処理・計測工程において、参考例 1 と同様、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ～ 第 5 視野の平均値を求め、非補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 3 6 】

[ 参考例 5 ]

実施例 5 の評価工程中の画像処理・計測工程において、参考例 1 と同様、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ～ 第 5 視野の平均値を求め、非補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 3 7 】

[ 参考例 6 ]

実施例 6 の評価工程中の画像処理・計測工程において、参考例 1 と同様、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ～ 第 5 視野の平均値を求め、非補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 3 8 】

[ 参考例 7 ]

実施例 7 の評価工程中の画像処理・計測工程において、参考例 1 と同様、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ～ 第 5 視野の平均値を求め、非補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 3 9 】

[ 参考例 8 ]

実施例 8 の評価工程中の画像処理・計測工程において、参考例 1 と同様、前記 X の値を前記 Y の値で割る補正を行わず、前記 Y の値自体について第 1 ～ 第 5 視野の平均値を求め、非補正 H E R 2 定量値の変動係数を算出した。

【 0 1 4 0 】

< 結果 >

参考例 1 ～ 8、実施例 1 ～ 8 および実施例 9 ～ 16 の変動係数 C V ( % ) を表 1 に示す。実施例 1 ～ 8 の C V はいずれも 15 % 以下であり、それぞれ参考例 1 ～ 8 の C V よりも数値が低い、つまりばらつきが小さい。参照生体物質の蛍光標識シグナル ( 輝度 ) を用いて目的生体物質の蛍光標識シグナル ( 輝点数 ) を補正することにより、標本が様々な固定条件のものを含む集団である場合にも、目的生体物質の発現量について安定した評価を行えることが分かる。また、実施例 9 ～ 16 の C V はいずれも 10 % 以下であり、それぞれ実施例 1 ～ 8 の C V よりもさらに数値が低い、つまりばらつきが小さい。参照生体物質を複数の種類の混合物 ( カクテル ) とすることにより、さらに目的生体物質の発現量について安定した評価を行えることが分かる。

【 0 1 4 1 】

10

20

30

40

【表 1】

培養細胞	CRL 1500	SKBR3	MDA-MB453	MDA-MB175	COLO 201	MCF7	Hela	MDA-MB231
参考例 (補正なし)	1	2	3	4	5	6	7	8
CV	20%	19%	25%	25%	21%	18%	22%	20%
実施例 (補正あり)	1	2	3	4	5	6	7	8
CV(%)	12%	11%	10%	12%	11%	11%	14%	12%
実施例 (カクテルによる補正あり)	9	10	11	12	13	14	15	16
CV(%)	9%	8%	6%	7%	6%	9%	9%	10%

10

## 【比較例】

## (C1) 標本作製工程

実施例 1 と同様の手順で標本作製工程を行った。

## 【0142】

## (C2) 免疫染色工程

特許文献 2 (特開 2008 - 286167 号公報) の実施例に記載された方法に準じて、細胞質内で発現する  $\alpha$ -アクチンを参照生体物質とし、また目的生体物質の HER2 を蛍光色素内包樹脂ナノ粒子ではなく蛍光色素自体で蛍光標識する免疫染色工程を行った。具体的には次の通りである。

20

## 【0143】

## (C2-1) 第 1 免疫染色工程 (目的生体物質 HER2 の免疫染色)

## (C2-1-1) 1 次反応処理

BSA を 1% 含有する PBS を用いて、抗 HER2 ウサギモノクローナル抗体「4B5」(ペンタナ社)(試薬 I) を 0.05 nM に調整した。この試薬 I の溶液に工程 (1) で作製した標本を浸漬し、4℃ で 1 晩反応させた。

## 【0144】

## (C2-1-2) 2 次反応・蛍光標識処理

BSA を 1% 含有する PBS を用いて Alexa Fluor 488 標識化抗ウサギ IgG 抗体 (ライフテクノロジー社、A11008) を 1:200 に希釈した 2 次反応処理液を調製した。1 次反応処理を終えた標本を PBS で洗浄した後、この 2 次反応処理液に浸漬し、室温で 30 分間反応させた。

30

## 【0145】

(C2-2) 第 2 免疫染色工程 (参照生体物質  $\alpha$ -アクチンの免疫染色)

## (C2-2-1) 1 次反応処理

BSA を 1% 含有する PBS を用いて、 $\alpha$ -アクチン抗体 (アブカム社、ab8229) を 1:200 に希釈した 1 次反応処理液を調製した。第 1 免疫染色工程を終えた標本を PBS で洗浄した後、この 1 次反応処理液に浸漬し、4℃ で 1 晩反応させた。

40

## 【0146】

## (C2-2-2) 2 次反応・蛍光標識処理

BSA を 1% 含有する PBS を用いて Alexa Fluor 647 標識化抗マウス IgG 抗体 (ライフテクノロジー社、A21236) を 1:200 に希釈した 2 次反応処理液を調製した。1 次反応処理を終えた標本を PBS で洗浄した後、この 2 次反応処理液に浸漬し、室温で 30 分間反応させた。

## 【0147】

## (C2-3) 標本後処理工程

第 1 および第 2 免疫染色工程を終えた標本に対して、純エタノールに 5 分間浸漬する操

50

作を4回行う固定化・脱水処理を行った。続いて、キシレンに5分間浸漬する操作を4回行う透徹処理を行った。最後に、標本に封入剤「エンテランニュー」（メルク社）を載せて、カバーガラスを被せる封入処理を行い、観察に用いる標本とした。

#### 【0148】

##### (C3) 評価工程

特許文献2（特開2008-286167号公報）の実施例に記載された方法に準じて、目的生体物質HER2を標識する蛍光の総和を、参照生体物質 - アクチンを標識する蛍光の総和で割った値をHER2定量値として参照する評価工程を行った。具体的には次の通りである。

#### 【0149】

##### (C3-1) 観察・撮影工程

この工程における励起光の照射および蛍光の発光の観察には蛍光顕微鏡「BX-53」（オリンパス株式会社）を用い、免疫染色像（400倍）の撮影には、当該蛍光顕微鏡に取り付けた顕微鏡用デジタルカメラ「DP73」（オリンパス株式会社）を用いた。

#### 【0150】

まず、目的生体物質（HER2）の蛍光標識に用いたAlexa Fluor 488に対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させ、その状態の免疫染色像を撮影した（第1免疫染色像）。この際、励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルターを用いて460～490nmに設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光用光学フィルターを用いて500～540nmに設定した。蛍光顕微鏡による観察および画像撮影時の励起光の強度は、視野中心部付近の照射エネルギーが600W/cm<sup>2</sup>となるようにした。画像撮影時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないような範囲で調節し、例えば800msに設定した。

#### 【0151】

続いて、励起光用光学フィルターおよび蛍光用光学フィルターを切り替え、参照生体物質（ - アクチン）の蛍光標識に用いたAlexa Fluor 647に対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させ、その状態の免疫染色像を撮影した（第2免疫染色像）。この際、励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルターを用いて620～650nmに設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光用光学フィルターを用いて660～700nmに設定した。蛍光顕微鏡による観察および画像撮影時の励起光の強度は、視野中心部付近の照射エネルギーが400W/cm<sup>2</sup>となるようにした。画像撮影時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないような範囲で調節し、例えば800msに設定した。

#### 【0152】

このような第1および第2免疫染色像の撮影は、同一視野において行った後、視野を変えて同じ操作を繰り返し、1標本につき合計3視野ずつ行った（第1～第3視野）。

#### 【0153】

##### (C3-2) 画像処理・計測工程

この工程における画像処理には、画像処理ソフトウェア「ImageJ」（オープンソース）を用いた。

#### 【0154】

目的生体物質であるHER2に関する第1免疫染色像を用いて、蛍光体が発する蛍光の強度の総和（X'）を求めた。同様に、参照生体物質である - アクチンに関する第2免疫染色像を用いて、蛍光体が発する蛍光の輝度の総和（Y'）を求めた。

#### 【0155】

##### (C3-3) 標準化工程

X'の値をY'の値で割って標準化した。このような値を第1～第3視野のそれぞれについて算出した後、それらの平均値を求め、HER2の発現量を評価するために用いる"HER2定量値"とした。

#### 【0156】

1時間固定処理群（標本数n=3）、12時間固定処理群（n=3）および96時間固

10

20

30

40

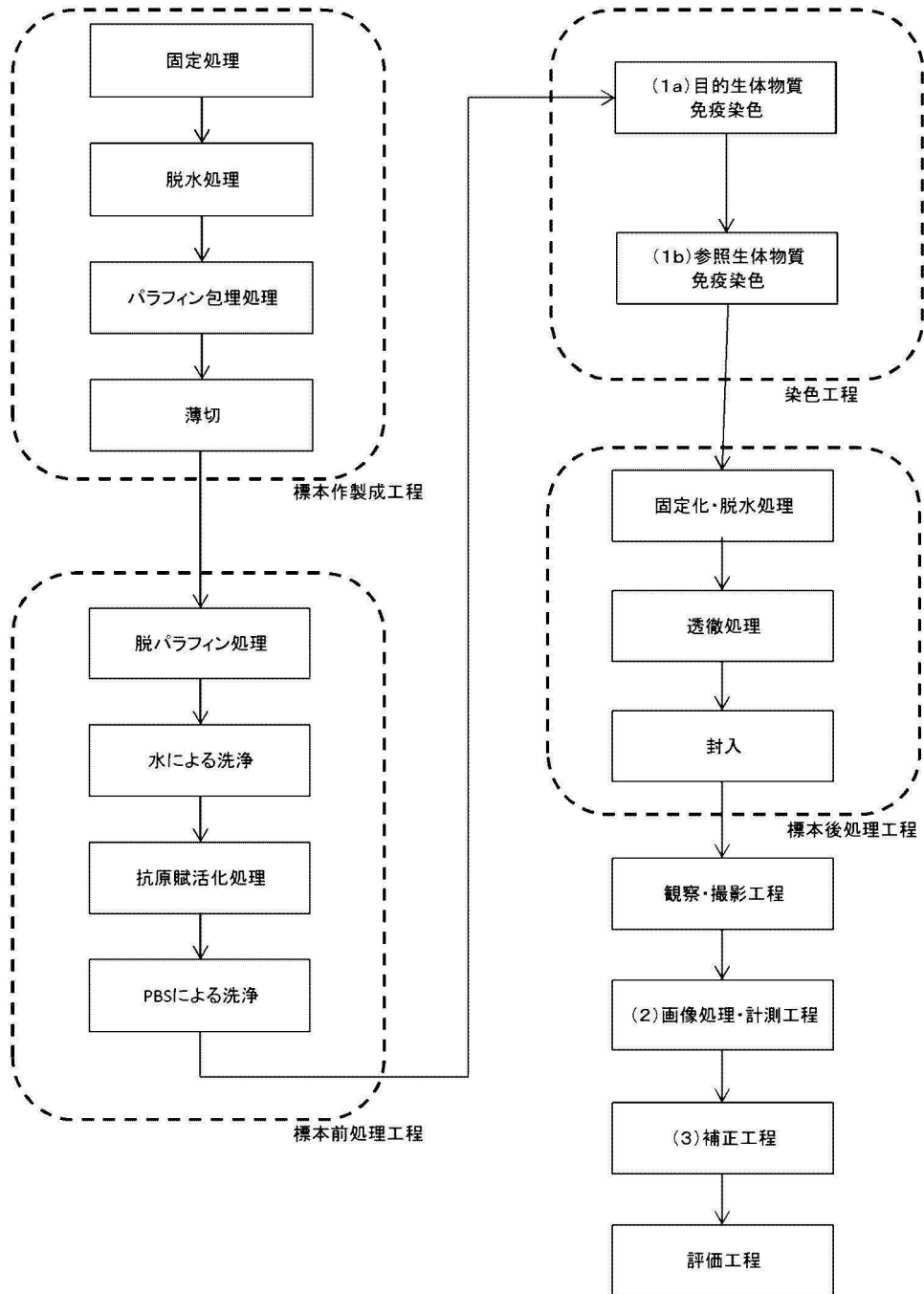
50

定処理群 (  $n = 3$  )、合計 9 標本についての H E R 2 定量値から、変動係数 C V (  $= 100 \times \text{H E R 2 定量値の標準偏差} / \text{H E R 2 定量値の平均値}$  ) を算出した。その結果、C V は 22% であり、前述した実施例の C V よりも数値が大きい、つまりばらつきが大きかった。

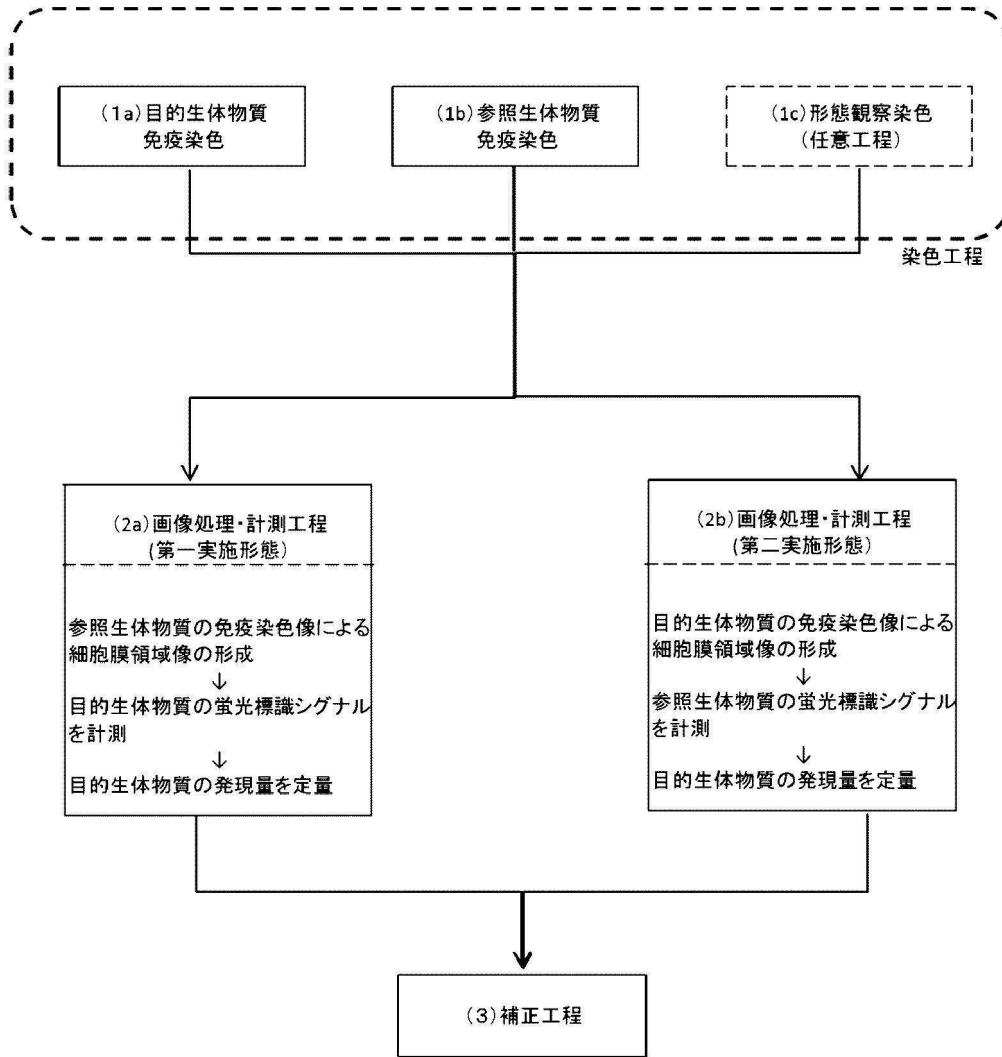
【要約】

本発明は、病理標本中の細胞膜に発現している生体物質を、より正確に定量できる定量方法を提供するものである。本発明は細胞膜上の生体物質 ( 目的生体物質 ) の定量方法であって、( 1 a ) 目的生体物質を蛍光免疫染色する工程、( 1 b ) 細胞膜上の他の生体物質 ( 参照生体物質 ) を、他の蛍光体で免疫染色する工程、( 2 ) 目的生体物質および参照生体物質の免疫染色像を用いて、目的生体物質に対応する蛍光シグナルを特定するとともに、目的生体物質に対応する蛍光シグナルおよび参照生体物質に対応する蛍光シグナルを計測する工程、および ( 3 ) 目的生体物質に対応する蛍光シグナルの計測値を、所定の方法により計測値を補正し、発現量を定量する工程を含む、定量方法である。

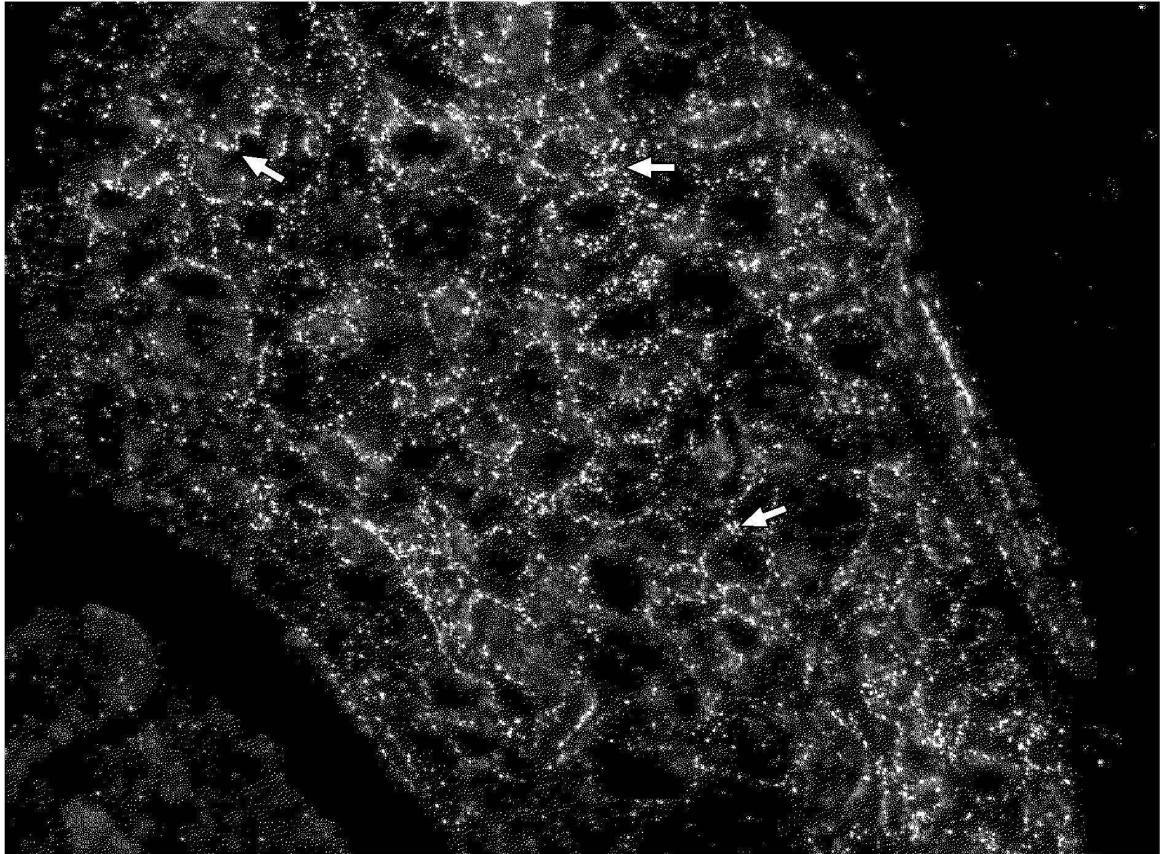
【図1A】



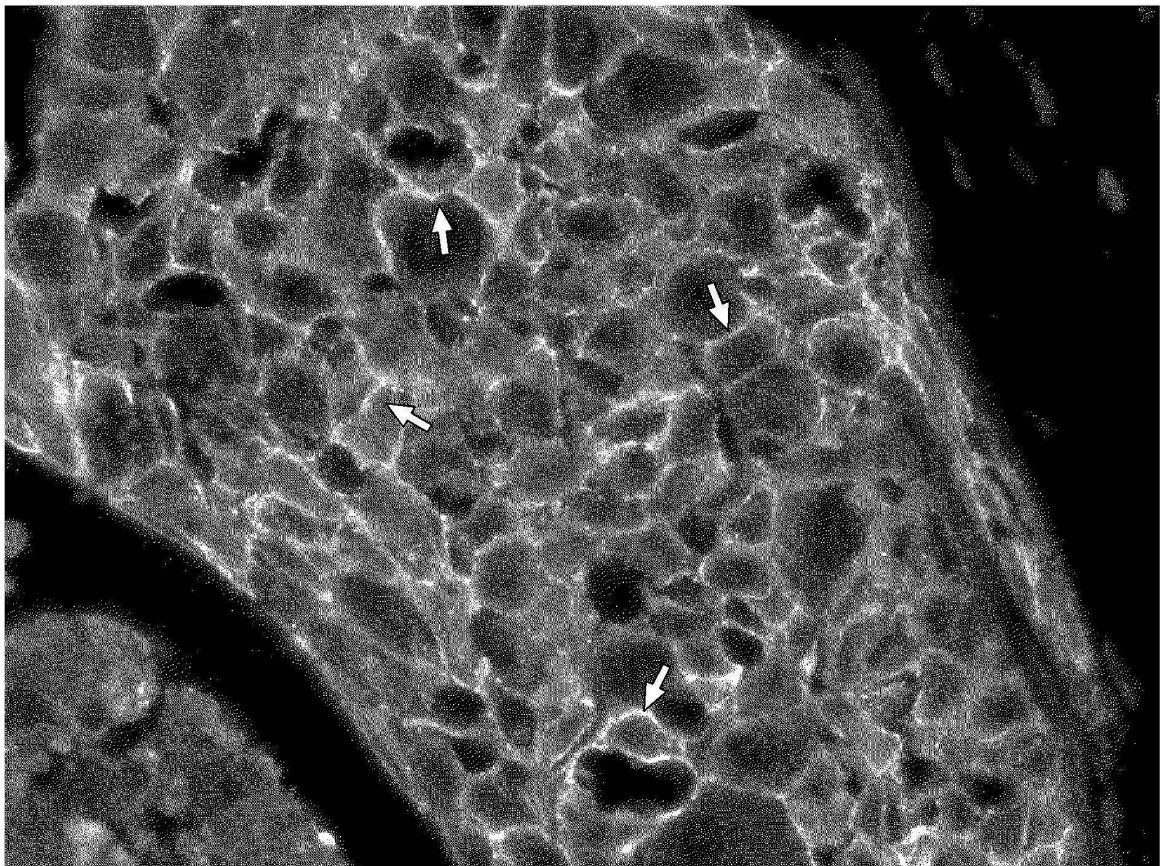
【図1B】



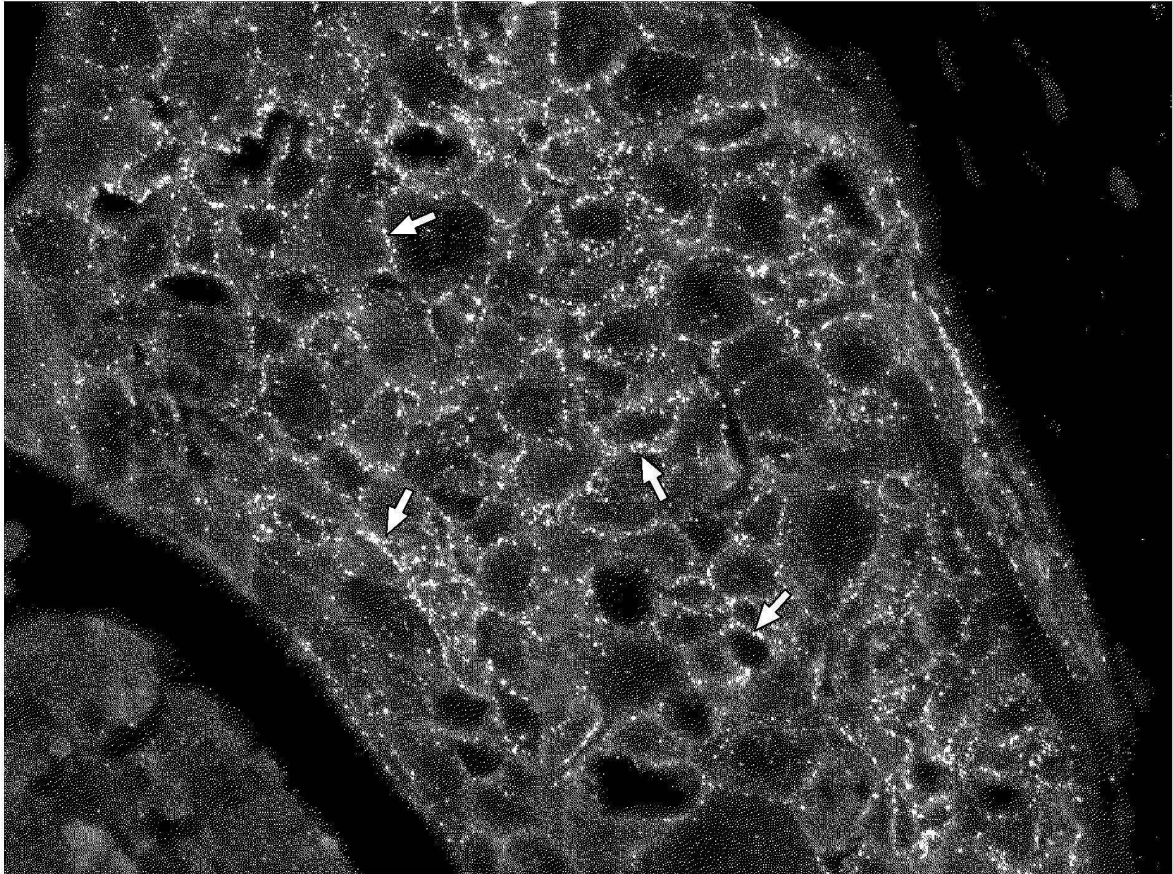
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



---

フロントページの続き

早期審査対象出願

- (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 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
- (72)発明者 渡邊 みか  
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

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開2013-57631(JP,A)  
特開2008-268167(JP,A)  
国際公開第2012/029342(WO,A1)  
特許第5039264(JP,B2)  
特表2009-536355(JP,A)  
国際公開第2012/029752(WO,A1)  
国際公開第2015/045962(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/53

G01N 33/48

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

专利名称(译)	基于多种免疫染色方法定量生物材料的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5843054B1</a>	公开(公告)日	2016-01-13
申请号	JP2015531968	申请日	2015-03-23
[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	郷田秀樹 磯田武寿 渡辺泰宏 権田幸祐 大内憲明 渡邊みか		
发明人	郷田 秀樹 磯田 武寿 渡辺 泰宏 権田 幸祐 大内 憲明 渡邊 みか		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	G01N33/6872 G01N1/30 G01N15/1429 G01N21/6428 G01N21/6456 G01N21/6458 G01N33/582 G01N2001/302 G01N2021/6439 G01N2496/80		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.P		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2014059883 2014-03-24 JP		
其他公开文献	JPWO2015146896A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明提供一种定量方法，其能够更准确地定量病理样本中细胞膜上表达的生物物质。本发明是一种定量细胞膜上的生物物质（靶生物物质）的方法，（1a）对靶生物物质进行荧光免疫染色的步骤，（1b）细胞膜上的另一种生物物质（参考生物物质），用另一种荧光团进行免疫染色的步骤，（2）使用目标生物物质和参考生物物质的免疫染色图像，同时识别与目标生物物质相对应的荧光信号以及与目标生物物质相对应的荧光信号。测量对应于参考生物材料的荧光信号的步骤，以及（3）对应于目标生物材料的荧光信号的测量值，包括通过预定方法校正测量值并定量表达量，定量的步骤。是方式。

(21) 出願番号	特願2015-531968 (P2015-531968)	(73) 特許権者	000001270
(86) (22) 出願日	平成27年3月23日 (2015. 3. 23)		コニカミノルタ株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2015/058703		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
審査請求日	平成27年6月25日 (2015. 6. 25)	(74) 代理人	110001070
(31) 優先権主張番号	特願2014-59883 (P2014-59883)		特許業務法人SSINPAT
(32) 優先日	平成26年3月24日 (2014. 3. 24)	(72) 発明者	郷田 秀樹
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		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
	(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/病理画像等認識基礎技術の研究開発(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技術)」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	(72) 発明者	磯田 武寿
			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	渡辺 泰宏
			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