

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02017/014196

発行日 平成30年4月26日 (2018. 4. 26)

(43) 国際公開日 平成29年1月26日 (2017. 1. 26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	Y 2 GO 4 3
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64	F
	GO 1 N 21/64	E

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

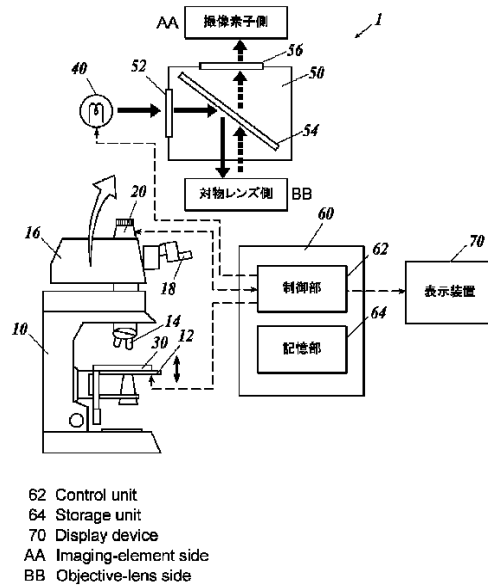
出願番号 特願2017-529886 (P2017-529886)	(71) 出願人 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2016/071037	(74) 代理人 110001254 特許業務法人光陽国際特許事務所
(22) 国際出願日 平成28年7月15日 (2016. 7. 15)	(72) 発明者 富岡 大輔 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内
(31) 優先権主張番号 特願2015-142813 (P2015-142813)	(72) 発明者 郷田 秀樹 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内
(32) 優先日 平成27年7月17日 (2015. 7. 17)	(72) 発明者 佐藤 彰 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
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 目的生体物質の解析方法および解析システム

(57) 【要約】

本発明の課題は、免疫染色剤ごとに蛍光輝点数を正確に解析する目的生体物質の解析システムを提供することである。当該目的生体物質の解析システム1は、組織標本30を、互いに異なる蛍光ナノ粒子を含む複数種類の免疫染色剤で染色し、これを蛍光顕微鏡10を用いて解析するシステムである。解析システム1では、前記免疫染色剤で染色された組織標本30を撮像する蛍光顕微鏡10と、蛍光顕微鏡10を制御する制御装置60とを備える。制御装置60は、前記免疫染色剤それぞれのフィルターセット50ごとの輝度比率を記憶する記憶部64と、蛍光顕微鏡10の撮像結果から、組織標本30のフィルターセット50ごとの蛍光輝点数を計測し、前記輝度比率に基づき、前記免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する制御部62とを有する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織標本を、互いに異なる蛍光ナノ粒子を含む複数種類の免疫染色剤で染色し、これを蛍光顕微鏡を用いて解析する目的生体物質の解析方法において、

前記免疫染色剤それぞれの輝度比率をフィルターセットごとに算出する工程と、

前記組織標本の蛍光輝点数を前記フィルターセットごとに計測し、前記輝度比率に基づき、前記免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する工程と、

を備えることを特徴とする目的生体物質の解析方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の目的生体物質の解析方法において、

10

前記免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する工程では、

免疫染色剤 (1 ~ n) それぞれのフィルターセット (1 ~ N) ごとの輝度比率を $R (1 \sim n , 1 \sim N)$ と、フィルターセット (1 ~ N) ごとに計測した組織標本の蛍光輝点数を $T B (1 \sim N)$ と、免疫染色剤 (1 ~ n) ごとの蛍光輝点数を $L (1 \sim n)$ として下記の連立方程式を作り、その連立方程式の解から、免疫染色剤 (m) の蛍光輝点数 $L (m)$ を算出することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

$$T B (1) = L (1) + R (1 , 2) \times L (2) + R (1 , 3) \times L (3) + \dots$$

$$T B (2) = R (2 , 1) \times L (1) + L (2) + R (2 , 3) \times L (3) + \dots$$

$$T B (3) = R (3 , 1) \times L (1) + R (3 , 2) \times L (2) + L (3) + \dots$$

.....

20

(ただし、n、N、mは正の整数であり、 $1 \leq m \leq n$ である。)

【請求項 3】

請求項 2 に記載の目的生体物質の解析方法において、

前記輝度比率 $R (1 \sim n , 1 \sim N)$ を、下記一般式 (1) から算出することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

一般式 (1) : 輝度比率 $R (m , k) = F L (m , k) / F L (m , p)$

[上記一般式 (1) において、 $F L (m , k)$ は、免疫染色剤 (m) をフィルターセット (k) を使用し撮影した画像全体で観察された輝点の合計輝度値である。 $F L (m , p)$ は、免疫染色剤 (m) をフィルターセット (p) を使用し撮影した画像全体で観察された輝点の合計輝度値である。k は、 $1 \sim N$ の範囲内の整数である。p は、 $1 \sim N$ の範囲内の整数である。n、N 及び m は、それぞれ正の整数であり、 $1 \leq m \leq n$ である。]

30

【請求項 4】

請求項 2 に記載の目的生体物質の解析方法において、

前記輝度比率 $R (1 \sim n , 1 \sim N)$ を、

同一輝点の輝度値を前記フィルターセット (1 ~ N) ごとに測定し、フィルターセット (p) を使用したときに得られる輝度値 X と、フィルターセット (k) を使用したときに得られる輝度値 Y との関係を示す近似直線である下記一般式 (2) の傾き a を輝度比率 $R (m , k)$ として算出することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

一般式 (2) : $Y = a X$

[ただし、k は、 $1 \sim N$ の範囲内の整数である。p は、 $1 \sim N$ の範囲内の整数である。n、N 及び m は、それぞれ正の整数であり、 $1 \leq m \leq n$ である。]

40

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 に記載の目的生体物質の解析方法において、

前記フィルターセットとして、励起フィルターの波長幅が $20 \sim 30 \text{ nm}$ で、蛍光フィルターの波長幅が $30 \sim 50 \text{ nm}$ のフィルターセットを使用することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の目的生体物質の解析方法において、

前記フィルターセットとして、蛍光フィルター同士の波長重複幅が 10 nm 以下のフィルターセットを使用することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

50

【請求項 7】

請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の目的生体物質の解析方法において、
前記蛍光ナノ粒子として半導体ナノ粒子または蛍光物質集積ナノ粒子を使用することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

【請求項 8】

請求項 7 に記載の目的生体物質の解析方法において、
前記蛍光ナノ粒子として発光波長が 400 ~ 700 nm のナノ粒子を使用することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の目的生体物質の解析方法において、
前記蛍光ナノ粒子として、発光波長の重複が 30 % 以下のナノ粒子であって、一方の蛍光ナノ粒子に対応する前記フィルターセットの蛍光フィルターの波長幅での当該一方の蛍光ナノ粒子の強度の積分値に対し、その波長幅での他方の蛍光ナノ粒子の強度の積分値が 30 % 以下であるナノ粒子を使用することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

10

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 に記載の目的生体物質の解析方法において、組織標本が動物モデルから採取され、標本化されたものを使用することを特徴とする目的生体物質の解析方法。

【請求項 11】

組織標本を、互いに異なる蛍光ナノ粒子を含む複数種類の免疫染色剤で染色し、これを蛍光顕微鏡を用いて解析する目的生体物質の解析システムにおいて、
前記免疫染色剤で染色された前記組織標本を撮像する蛍光顕微鏡と、
前記蛍光顕微鏡を制御する制御装置であって、前記免疫染色剤それぞれのフィルターセットごとの輝度比率を記憶する記憶部と、前記蛍光顕微鏡の撮像結果から、前記組織標本の前記フィルターセットごとの蛍光輝点数を計測し、前記輝度比率に基づき、前記免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する算出部とを有する前記制御装置と、
を備えることを特徴とする目的生体物質の解析システム。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は目的生体物質の解析方法および解析システムに関する。

30

【背景技術】

【0002】

従来の免疫染色では、組織切片上で、観察対象となる抗原を、抗体修飾した蛍光体（免疫染色剤）に結合させることで標識し、蛍光顕微鏡で観察することが行われている。

免疫染色を用いたがん関連の病理検査において、同一の組織切片上に複数種類の抗原が存在するような場合、抗原ごとに陽性か陰性かを見ることで、抗がん剤治療の予後不良などを診断することができる。

本出願人はかかる病理検査において、抗原ごとに蛍光輝点数や蛍光強度を解析してその発現レベルを計測しうる生体物質の検出方法や免疫染色剤を提供している（特許文献 1、実施例 3 参照）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献 1】国際公開第 2012 / 029342 号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

ところで、蛍光顕微鏡による観察では、免疫染色剤の種類（蛍光体の励起波長および発光波長）に応じたフィルターセットが鏡筒の所定位置にセットされ観察が行われる。

しかしながら、上記のとおり、複数種類の免疫染色剤を使用し蛍光顕微鏡で観察する場

50

合、1つのフィルターセットで蛍光観察を行ったとき、他の免疫染色剤からの蛍光が映り込んでしまい、免疫染色剤ごとに蛍光輝点数または蛍光輝点から算出される蛍光体粒子数を正確に解析(算出)しえないことがわかってきた。

したがって本発明の主な目的は、複数種類の免疫染色剤を用いた多重免疫染色でも、免疫染色剤ごとに蛍光輝点数を正確に解析することができる目的生体物質の解析方法および解析システムを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決するため、本発明の一態様によれば、組織標本を、互いに異なる蛍光ナノ粒子を含む複数種類の免疫染色剤で染色し、これを蛍光顕微鏡を用いて解析する目的生体物質の解析方法において、前記免疫染色剤それぞれの輝度比率をフィルターセットごとに算出する工程と、前記組織標本の蛍光輝点数を前記フィルターセットごとに計測し、前記輝度比率に基づき、前記免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する工程と、を備えることを特徴とする目的生体物質の解析方法が提供される。

10

【0006】

本発明の他の態様によれば、組織標本を、互いに異なる蛍光ナノ粒子を含む複数種類の免疫染色剤で染色し、これを蛍光顕微鏡を用いて解析する目的生体物質の解析システムにおいて、前記免疫染色剤で染色された前記組織標本を撮像する蛍光顕微鏡と、前記蛍光顕微鏡を制御する制御装置であって、前記免疫染色剤それぞれのフィルターセットごとの輝度比率を記憶する記憶部と、前記蛍光顕微鏡の撮像結果から、前記組織標本の前記フィルターセットごとの蛍光輝点数を計測し、前記輝度比率に基づき、前記免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する算出部とを有する前記制御装置と、を備えることを特徴とする目的生体物質の解析システムが提供される。

20

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば免疫染色剤ごとに蛍光輝点数を正確に解析することができる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

30

【図1】目的生体物質の解析システムの概略的な構成を示す図である。

【図2】目的生体物質の解析方法を経時的に示すフローチャートである。

【図3】輝度比率の算出工程の処理を概略的に説明する図である。

【図4】輝度比率の具体的な算出方法の一例を説明するグラフである。

【図5】蛍光輝点数の算出工程の処理を概略的に説明する図である。

【図6】フィルターセットの励起フィルターと蛍光フィルターとの関係を概略的に示す図である。

【図7】フィルターセットの蛍光フィルター同士の関係を概略的に示す図である。

【図8】蛍光ナノ粒子の発光波長のスペクトルの重複を概略的に説明する図である。

【発明を実施するための形態】

40

【0009】

以下、図面を参照しながら本発明の好ましい実施形態について説明する。

下記では、数値範囲を示す「～」の前後に記載される上限値および下限値はその数値範囲に含まれるものとする。

【0010】

[目的生体物質の解析システム]

図1に示すとおり、目的生体物質の解析システム1は蛍光顕微鏡10、制御装置60および表示装置70を備えている。

蛍光顕微鏡10はステージ12、対物レンズ14、鏡筒16、接眼レンズ18および撮像素子20を備えている。ステージ12には免疫染色後の組織標本30が設置される。鏡

50

筒 1 6 にはランプ 4 0 およびフィルターセット 5 0 が内蔵されている。フィルターセット 5 0 は励起フィルター 5 2、ビームスプリッター 5 4 および蛍光フィルター 5 6 を備えている。

ランプ 4 0 は励起光を出射するランプである。励起フィルター 5 2 は励起光だけを透過するフィルターである。ビームスプリッター 5 4 は所定波長の光を境界として反射または透過する光学部品であって、ここでは励起光を反射し蛍光を透過するものである。蛍光フィルター 5 6 は励起光を遮断し蛍光だけを透過するフィルターである。

蛍光顕微鏡 1 0 では、ランプ 4 0 が点灯すると、励起光が励起フィルター 5 2 を透過しビームスプリッター 5 4 で反射され、対物レンズ 1 4 を通過し組織標本 3 0 に照射される。その結果組織標本 3 0 で蛍光が発光され、蛍光は対物レンズ 1 4 で集光されビームスプリッター 5 4 および蛍光フィルター 5 6 を透過する。その後、蛍光は蛍光像として接眼レンズ 1 8 を介して観察されるとともに、撮像素子 2 0 に撮像される。

【 0 0 1 1 】

蛍光顕微鏡 1 0 にはこれらを制御する制御装置 6 0 が接続されている。

制御装置 6 0 は制御部 6 2 および記憶部 6 4 を備えている。

制御部 6 2 はステージ 1 2 と接続され、ステージ 1 2 の昇降を制御し焦点位置（高さ位置）を制御しうる。制御部 6 2 は撮像素子 2 0 と接続され、撮像素子 2 0 を制御し蛍光像を撮像させ、その蛍光像を受け蛍光画像を生成しうる。制御部 6 2 はランプ 4 0 と接続され、ランプ 4 0 の点灯および消灯を制御しうる。記憶部 6 4 には図 2 の蛍光輝点数算出処理を実行するための目的生体物質の解析プログラムが記憶されている。

制御装置 6 0 には表示装置 7 0 が接続され、表示装置 7 0 には制御装置 6 0 による算出結果などが表示される。

【 0 0 1 2 】

[組織標本]

続いて、組織標本 3 0 について説明する。

組織標本 3 0 は目的生体物質を含む組織切片であって免疫染色剤で染色され、染色後の組織標本 3 0 が蛍光顕微鏡 1 0 のステージ 1 2 に設置される。

【 0 0 1 3 】

(1) 目的生体物質

目的生体物質とは、主に病理診断の観点からの検出または定量のために、蛍光標識体を用いた免疫染色の対象とするものをいい、組織切片に発現している生体物質、特にタンパク質（抗原）である。

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が挙げられる。

【 0 0 1 4 】

(2) 免疫染色剤（抗体 - 蛍光ナノ粒子の結合体）

免疫染色剤としては、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、一次抗体および蛍光ナノ粒子が間接的に、つまり抗原抗体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。染色操作を簡便にするため、免疫染色剤として、一次抗体または二次抗体に蛍光ナノ粒子が直結している複合体を用いることもできる。

【 0 0 1 5 】

免疫染色剤の一例として、[目的生体物質に対する一次抗体] ... [一次抗体に対する抗体（二次抗体）] ~ [蛍光ナノ粒子（以下、「蛍光色素内包樹脂粒子」ともいう。）] が挙げられる。

“ ... ” は抗原抗体反応により結合していることを表し、“ ~ ” が示す結合の態様としては特に限定されず、たとえば、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、抗原抗体結合、ピオチンアビジン反応、物理吸着、化学吸着などが挙げられ、必要に応じてリンカー分子を介していてもよい。

また、一次抗体および蛍光ナノ粒子が間接的に、つまり抗原抗体反応で連結される形態

10

20

30

40

50

以外の、目的生体物質に対する免疫染色剤の形態としては、結合能力の高いハプテン分子を用いた〔ハプテン標識一次抗体〕…〔ハプテンに対する抗体（抗ハプテン抗体）〕～〔蛍光ナノ粒子〕が挙げられるし、同様に結合能力の高い〔ビオチン標識一次抗体〕…〔アビジン〕～〔蛍光ナノ粒子〕が挙げられる。具体的には、ハプテン、抗ハプテン抗体（ジニトロフェノール、抗ジニトロフェノール抗体、ジゴキシゲニン、抗ジゴキシゲニン抗体、フルオレセイン、抗フルオレセイン抗体など）、ビオチン、アビジンおよびその改変体（ストレプトアビジン、ニュートラアビジン等）が、間接反応に關与する化合物として挙げられる。あるいは、FISHにおいては、ハプテンを結合させた核酸分子（プローブ）と、ハプテン親和性分子を結合させた蛍光色素内包樹脂粒子とを含む複合体を形成させる実施形態において用いられる。

10

【0016】

親和性分子を間接的に結合する場合の態様としては、両末端に官能基を有する高分子を用いて、それらの官能基を樹脂が有する官能基と親和性分子が有する官能基のそれぞれと反応させることにより、蛍光色素内包樹脂粒子と親和性分子とをその高分子由来のスペーサー（リンカー）を介して結合させる態様が挙げられる。特にこのような実施形態において、蛍光色素内包樹脂粒子表面の単位面積当たりに結合する親和性分子の量が変動しやすいため、本発明を適用することの有効性が高い。例えば、アミンとカルボン酸の反応によるアミド化、マレイミドとチオールとの反応によるスルフィド化、アルデヒドとアミンの反応によるイミン化、エポキシとアミンの反応によるアミノ化等を利用して、第1親和性分子と（必要に応じてスペーサーと）蛍光色素内包樹脂粒子とを共有結合させることができる。第1親和性分子、必要に応じて用いられるスペーサーの両端、蛍光色素内包樹脂粒子の表面のそれぞれに、上述した反応に關与する官能基を導入しておき、所定の条件下で反応させることで、共有結合によって連結することができる。なお、第1親和性分子とは、このように、蛍光色素内包樹脂粒子の表面に結合している親和性分子をいう。

20

【0017】

スペーサーのなかでは、非特異的吸着を抑制できることなどの観点から親水性高分子が好ましく、特に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やすい観点から好ましい。PEGを用いる場合は、例えばサーモサイエンティフィック社等の市販のものを購入したり、化学構造の繰り返しの単位の数を設定して、試薬メーカー等に製造を依頼したりすることで任意の長さのものを入手することができる。

30

【0018】

スペーサーの長さは、結合する蛍光色素内包樹脂粒子の粒径に応じて、適切な範囲で調整すればよい。単一の長さをもつスペーサーを用いてもよいし、それぞれ異なった2種類以上の長さをもつスペーサーを併用してもよい。単一のスペーサーを用いる場合、スペーサーの長さは1～100nmが好ましい。2種類以上の長さを有するスペーサーを用いる場合、そのうちの少なくとも1種類のスペーサーの長さが1～100nmであり、他のスペーサーの長さが0.1～10nmであることが好ましい。

【0019】

ここで、免疫染色反応の良しあしを決定する重要な要因として生体親和性の性能が挙げられる。この生体親和性の性能は、次のような方法により評価することができる。すなわち、表面に第1親和性分子（代表的にはアビジン）を結合させた蛍光色素内包樹脂粒子を一定濃度で含む一定量の溶液を、該親和性分子と特異的に結合可能な分子（以下、このような分子を「第2親和性分子」ともいい、例えばアビジンに対するビオチンが例として挙げられるがこれに限定されない。）を一定密度で固定化したプレートと反応させた際に、計測される信号値（S）が下記式を満たすものを選択する工程を含む、蛍光色素内包樹脂粒子溶液の生産・評価方法である。

40

$$0.5 \times A \times B \times (C/D) \quad S \quad 1.2 \times A \times B \times (C/D)$$

A：第1親和性分子を結合させた、前記一定濃度の一定量の溶液に含まれる全蛍光色素内包樹脂粒子に内包されている数と同数の蛍光色素単体を、前記プレートと反応させた際に計測される信号値

50

B：前記一定濃度の一定量の溶液に含まれる全蛍光色素内包樹脂粒子の全表面に結合している第1親和性分子の全数を蛍光色素内包樹脂粒子数で割った、蛍光色素内包樹脂粒子1つあたりに結合される第1親和性分子の数

C：前記蛍光色素内包樹脂粒子1粒子あたりの発光強度

D：前記蛍光色素内包樹脂粒子1粒子に内包されている数の蛍光色素単体の発光強度

【0020】

このような粒子の生産・評価方法により、十分な染色性能を持った蛍光色素内包樹脂粒子溶液を選択し、さらに所定の方法で得られた信号値に基づいて蛍光色素内包樹脂粒子の濃度を調整することにより、一定の染色性能を持つ蛍光色素内包樹脂粒子溶液を得ることができる。例えば第2親和性分子がビオチンであり、ビオチン化プレートを用いて、SAで修飾された表面修飾後の蛍光色素内包樹脂粒子を用いた場合、プレートから得られた信号値とその粒子を用いて実際に免疫染色を行なった輝度の強さとの相関関係が高いことから、実際に染色をおこなわずとも粒子の染色性能を判断することができる。さらに、蛍光色素内包樹脂粒子の表面積の総和(T)に対する、ビオチン化プレートに蛍光色素内包樹脂粒子溶液を散布した際に計測される信号値(S)の比の値(S/T)が所定の値となるように溶液を希釈することによって、蛍光色素内包樹脂粒子溶液の濃度を同等の染色性能を持つように調整することが可能となる。従って、異なったロットの蛍光色素内包樹脂粒子溶液を用いて病理染色を行なった場合でも、ばらつきのない染色結果を得ることが可能となる。上記Aの規定に含まれている、蛍光色素の「第1親和性分子を結合させた、前記一定濃度の一定量の溶液中に含まれる全蛍光色素内包樹脂粒子に内包されている数」(a)は、次のようにして計算することが可能である。すなわち、一定濃度(例えば0.01nM、すなわち 6.02×10^9 粒子/mL)の一定量の蛍光色素内包樹脂粒子溶液(蛍光色素内包樹脂粒子標準液)と、それと同じ一定濃度(例えば0.01nM、すなわち 6.02×10^9 分子/mL)の蛍光色素溶液(蛍光色素標準液)を調製し、それぞれの溶液の発光ピーク波長における蛍光強度を測定する。ここで、蛍光色素内包樹脂粒子内には蛍光色素同士が高濃度で集積しているため、濃度消光と呼ばれる現象により、蛍光色素内包樹脂粒子内が発する蛍光が弱められている可能性がある。そのため、「蛍光色素内包樹脂粒子標準液の蛍光強度」に「蛍光色素単体の量子収率/蛍光色素内包樹脂粒子の量子収率」を乗ずることにより、濃度消光の影響が補正された蛍光色素内包樹脂粒子標準液の蛍光強度を算出することができる。この「補正後の蛍光色素内包樹脂粒子標準液の蛍光強度」を「蛍光色素標準液の蛍光強度」で割れば、言い換えれば「蛍光色素内包樹脂粒子標準液の蛍光強度/蛍光色素標準液の蛍光強度」×「蛍光色素単体の量子収率/蛍光色素内包樹脂粒子の量子収率」を算出することにより、「第1親和性分子を結合させた、前記一定濃度の一定量の溶液中に含まれる全蛍光色素内包樹脂粒子に内包されている数」が求まる。なお、量子収率は公知の手段で、例えば「Quantaurus-QY」(絶対PL量子収率測定装置、浜松ホトニクス株式会社)を用いて、計測することができる。

【0021】

上記aの値が算出できれば、その数の蛍光色素を含有する溶液を調製し、第2親和性分子が固定化されたプレートに塗布するなどして反応させることにより、その結果発せられる蛍光強度(信号値)(A)を計測することができる。

【0022】

上記Bの規定に含まれている「一定濃度の一定量の溶液に含まれる全蛍光色素内包樹脂粒子の全表面に結合している第1親和性分子の全数」(b1)は、その全表面に結合している第1親和性分子の総重量を、第1親和性分子の分子量で除することにより算出することができる。ストレプトアビジンに代表される第1親和性分子がタンパク質であるのに対し、蛍光色素内包樹脂粒子の母体は樹脂であるため、BCA法等のタンパク質の定量方法に基づいて、一定量の蛍光色素内包樹脂粒子溶液中のタンパク質(その全てが蛍光色素内包樹脂粒子の表面に結合しているものとする)の濃度を測定することができる。その測定された濃度に「一定量の溶液」の体積を掛ければ、前記タンパク質の総重量を算出ことができ、その総重量を前記タンパク質の分子量(例えばストレプトアビジンの分子量は

10

20

30

40

50

52000)で除すれば、Bの規定に用いられる前記タンパク質(前記第1親和性分子)の全数を算出することができる。

また、同じく上記Bの規定に含まれている、前記一定濃度の一定量の溶液に含まれる「蛍光色素内包樹脂粒子数」(b2)は、粒子カウンター(例えばリオン社製「Liquid Particle Counter」)で計測することが可能である。前項にある第1親和性分子の全数を蛍光色素内包樹脂粒子数で除することにより、蛍光色素内包樹脂粒子一つに結合している第1親和性分子の数を計算することが可能である。

上記b1およびb2の値が算出できれば、 $b1/b2$ により、蛍光色素内包樹脂粒子1つあたりに結合している第1親和性分子の数(平均値)(B)が求まる。

【0023】

上記Cの「前記蛍光色素内包樹脂粒子1粒子あたりの発光強度」は、次のようにして計算することが可能である。すなわち、粒子カウンターを利用して、一定濃度(例えば0.01nM、すなわち 6.02×10^9 粒子/mL)の一定量の蛍光色素内包樹脂粒子溶液(蛍光色素内包樹脂粒子標準液)を調製し、発光ピーク波長における蛍光強度を測定する。蛍光色素内包樹脂粒子標準液の蛍光強度を、当該標準液中に含まれる蛍光色素内包樹脂粒子の数で除することにより、蛍光色素内包樹脂粒子1粒子あたりの発光強度が求まる。

【0024】

上記Dの「前記蛍光色素内包樹脂粒子1粒子に内包されている数の蛍光色素単体の発光強度」は、次のようにして計算することが可能である。すなわち、一定濃度(例えば0.01nM、すなわち 6.02×10^9 分子/mL、蛍光色素の分子量をWとすれば $W \times 10^{-14}$ g/mL)の一定量の蛍光色素溶液(蛍光色素標準液)を調製し、その溶液の発光ピーク波長における蛍光強度を測定する。蛍光色素標準液の蛍光強度に、「蛍光色素内包樹脂粒子1粒子に内包されている蛍光色素の分子数(ないしその重量)/蛍光色素標準液中の蛍光色素の分子数(ないしその重量)」を乗じ、さらに、前述したような濃度消光の影響を補正するため、「蛍光色素単体の量子収率/蛍光色素内包樹脂粒子の量子収率」を乗ずることにより、蛍光色素内包樹脂粒子1粒子に内包されている数(ないし同等の重量)あたりの蛍光色素単体の発光強度が求まる。

【0025】

なお、上記CおよびDで規定する発光強度の測定方法は特に限定されるものではなく、一般的な蛍光光度計を用いて、適切な測定条件において測定すればよい。

信号値が上記式を満たす蛍光色素内包樹脂粒子溶液、換言すれば、相対値化された信号値： $S / \{A \times B \times (C / D)\}$ が0.5~1.2の範囲にある蛍光色素内包樹脂粒子溶液は、染色液として十分な染色性能があると考えられる。たとえば、SA結合蛍光標識液の評価は、次の通り実施できる。

まず、SA結合蛍光標識体の保存液を採取し、パーティクルカウンター「Liquid Particle Counter」(リオン社製)で粒子数を測定した後、濃度を0.05nMに調整する。市販のビオチン化プレート「Well-Coated Biotin, 96-well, Black」(G-BIOSCIENCE社製)をPBSで5回洗浄した後、当該プレート上に、上記の濃度を調整した溶液を、1ウェルにつき100 μ Lずつ添加し、4で一昼夜反応させる。反応後のプレートをPBSで洗浄した後、マイクロプレートリーダー「プレートカメレオンV」(Hidex社製)を用いて、蛍光強度の信号値(S)を測定する。ここで、例えば、後述の実施例3で得られる「免疫染色剤D」について、信号値(S)を、蛍光色素単体の信号値(A)×蛍光色素内包樹脂粒子1つあたりに結合している親和性分子の数(B)×{蛍光色素内包樹脂粒子1粒子あたりの発光強度(C)/(蛍光色素内包樹脂粒子1粒子に内包されている数の蛍光色素単体の発光強度(D))}で割ると、相対値化した値は0.8となるため、良好な染色性能が得られることがわかる。一方、後述の実施例1でニカラック(メラミン樹脂)を用いて作製した蛍光色素集積ナノ粒子に代えて、スチレン樹脂を用いて作製した蛍光色素集積ナノ粒子により染色した場合には良好な染色性能が得られず、その粒子の相対値は0.4である。総じて0.5以上出れば良好な染色性能が得られる。

10

20

30

40

50

本発明によれば、良好な染色性能が得られない粒子を用いた多重染色においても、輝点数算出精度を向上させることができる。

【0026】

(3) 抗体（抗原に対して親和性の高い分子）

一次抗体には、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、HER2を目的生体物質とする場合は抗HER2抗体を、HER3を目的生体物質とする場合は抗HER3抗体を、それぞれ用いることができる。

二次抗体には、一次抗体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。

一次抗体および二次抗体はいずれも、ポリクローナル抗体であってもよいが、定量的安定性の観点から、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。

【0027】

(4) 蛍光ナノ粒子

蛍光ナノ粒子とは、励起光の照射を受けて蛍光発光するナノサイズの粒子であって、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光しうる粒子である。

蛍光ナノ粒子として、好ましくは量子ドット（半導体ナノ粒子）、蛍光物質集積ナノ粒子が使用される。

蛍光ナノ粒子として、好ましくは発光波長が蛍光顕微鏡10の撮像素子20の感度域内に存在するナノ粒子であって、詳しくは発光波長が400~700nmのナノ粒子が使用される。

【0028】

(4.1) 量子ドット

量子ドットとしては、II-VI族化合物、III-V族化合物またはIV族元素を含む半導体ナノ粒子が使用される。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。

【0029】

(4.2) 蛍光物質集積ナノ粒子

蛍光物質集積ナノ粒子は、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（たとえば、上記量子ドット、蛍光色素など）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としては、母体と蛍光物質とが、互いに反対の電荷を有する置換基または部位を有し、静電的相互作用が働くものであることが好適である。

蛍光物質集積ナノ粒子としては、量子ドット集積ナノ粒子、蛍光色素集積ナノ粒子などが使用される。

【0030】

(4.2.1) 母体

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る。

母体のうち、無機物としては、シリカ、ガラスなどを例示することができる。

【0031】

(4.2.2) 量子ドット集積ナノ粒子

量子ドット集積ナノ粒子とは、上記量子ドットが、上記母体の中に内包されている、お

10

20

30

40

50

よび/またはその表面に吸着している構造を有する。

量子ドットが母体に内包されている場合、量子ドットは母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していてもよいし、していなくてもよい。

【0032】

(4.2.3) 蛍光色素集積ナノ粒子

蛍光色素集積ナノ粒子とは、蛍光色素が、上記母体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。

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。

蛍光色素としては、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、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、Morbitec社製)系色素分子、CF (登録商標、Biotium社製)系色素分子、DY (登録商標、DYOMIC社製)系色素分子、CAL (登録商標、BioSearch Technologies社製)系色素分子などを用いることができる。

なお、蛍光色素が母体に内包されている場合、蛍光色素は母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していてもよいし、していなくてもよい。

【0033】

(5) 組織切片の染色方法

染色方法の一例について説明する。

この染色方法が適用できる組織切片(単に「切片」ともいい、病理切片などの切片も含まれる。)の作製法は特に限定されず、公知の手順により作製されたものを用いることができる。

【0034】

(5.1) 標本作製工程

(5.1.1) 脱パラフィン処理

キシレンを入れた容器に、切片を浸漬させ、パラフィン除去する。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。

【0035】

次いでエタノールを入れた容器に切片を浸漬させ、キシレン除去する。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。

【0036】

水を入れた容器に、切片を浸漬させ、エタノール除去する。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。

【0037】

(5.1.2) 賦活化処理

公知の方法に倣い、目的生体物質の賦活化処理を行う。賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01Mのクエン酸緩衝液(pH6.0)、1mMのEDTA溶液(pH8.0)、5%尿素、0.1Mのトリス塩酸緩衝液などを用いることができる。

pH条件は用いる組織切片に応じてpH2.0~13.0の範囲から、シグナルが出て、組織の荒れがシグナルを評価できる程度となる条件で行う。通常はpH6.0~8.0で行うが、特殊な組織切片ではたとえばpH3.0でも行う。

加熱機器はオートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバスなどを用いることができる。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。温度は

10

20

30

40

50

50～130、時間は5～30分で行うことができる。

【0038】

次いで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。

【0039】

(5.2) 免疫染色工程

免疫染色工程では、目的生体物質を染色するために、目的生体物質に直接的または間接的に結合しうる部位を有する蛍光ナノ粒子を含む免疫染色剤の溶液を、切片に乗せ、目的生体物質との反応を行う。免疫染色工程に用いる免疫染色剤の溶液については、この工程の前にあらかじめ調製しておけばよい。

10

【0040】

免疫染色工程を行う上での条件、すなわち免疫染色剤の溶液に組織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。

温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。反応時間は、30分以上24時間以下であることが好ましい。

上述したような処理を行う前に、BSA含有PBSなど公知のプロッキング剤やTween 20などの界面活性剤を滴下することが好ましい。

【0041】

20

(5.3) 標本後処理工程

免疫染色工程を終えた組織標本は、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。

【0042】

固定化・脱水処理は、組織標本を固定処理液（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、メタノールなどの架橋剤）に浸漬すればよい。透徹処理は、固定化・脱水処理を終えた組織標本を透徹液（キシレンなど）に浸漬すればよい。封入処理は、透徹処理を終えた組織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、たとえば組織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

30

【0043】

(5.4) 形態観察染色工程

免疫染色工程とは別に、明視野において細胞、組織、臓器などの形態を観察することができるようにするための、形態観察染色を行ってもよい。

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。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）。

40

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。

【0044】

[目的生体物質の解析方法]

続いて、目的生体物質の解析方法について説明する。

かかる方法は、組織標本を、互いに異なる蛍光ナノ粒子を含む複数種類の免疫染色剤で染色し、これを目的生体物質の解析システム1で解析する方法である。

【0045】

図2に示すとおり、目的生体物質の解析方法では主に、

50

(S1) 免疫染色剤それぞれの輝度比率をフィルターセット50ごとに算出する工程S1 (以下、「輝度比率算出工程S1」ともいう。)と、

(S2) 組織標本30の蛍光輝点数をフィルターセット50ごとに計測し、前記輝度比率に基づき、免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する工程S2 (以下、「蛍光輝点数算出工程S2」ともいう。)と、

を備えている。

【0046】

(1) 輝度比率算出工程S1

輝度比率算出工程S1では、輝度比率を算出するための目的生体物質の種類数に対応する複数種類の免疫染色剤散布サンプルおよびフィルターセット50を、準備する。

10

「免疫染色剤散布サンプル」とは、免疫染色剤をガラス基板上に塗布したものである。「複数種類の免疫染色剤」は、組織標本サンプルの目的生体物質の種類数に対応する、互いに異なる蛍光ナノ粒子を含み、「複数種類のフィルターセット50」も、組織標本サンプルの目的生体物質の種類数に対応する、互いに異なる励起フィルター52、ビームスプリッター54および蛍光フィルター56を備える。

【0047】

その後、免疫染色剤散布サンプルをステージ12に設置する。

その後、フィルターセット50を切り替えながら、フィルターセット50を切り替えるごとに、制御部62が、ランプ40を点灯させ、組織標本サンプルの蛍光像を撮像素子20に撮像させ、組織標本サンプルの蛍光輝点数をフィルターセット50ごとに計測する。

20

蛍光輝点数の計測では、たとえば「ImageJ」(オープンソース)が使用され、かかる画像処理ソフトウェアを利用することにより、蛍光像から所定波長(色)の蛍光輝点を抽出し蛍光輝点を計測する処理を、半自動的に迅速に行いうる。

その後、制御部62が、フィルターセット50ごとの蛍光輝点数の計測結果に基づき、免疫染色剤それぞれの輝度比率をフィルターセット50ごとに算出し、これを記憶部64に記憶させる。

【0048】

たとえば、図3に示すとおり、緑色、赤色、近赤外線蛍光を発光する蛍光ナノ粒子を含む3種類の免疫染色剤A~Cを、それぞれ緑色用、赤色用、近赤外線用の3種類のフィルターセット50を切り替えながら、フィルターセット50を切り替えるごとに、組織標本サンプルの蛍光像の蛍光輝点数を計測し、免疫染色剤それぞれの輝度比率をフィルターセット50ごとに算出する。

30

図3では、緑色発光する蛍光ナノ粒子を含む免疫染色剤Aが、緑色用、赤色用、近赤外線用のフィルターセット50で蛍光輝点数が計測された場合は、輝度比率が1:0.08:0.01と算出された例を示している。

赤色発光する蛍光ナノ粒子を含む免疫染色剤Bが、緑色用、赤色用、近赤外線用のフィルターセット50で蛍光輝点数が計測された場合は、輝度比率が0.12:1:0.08と算出されている。

近赤外線を発光する蛍光ナノ粒子を含む免疫染色剤が、緑色用、赤色用、近赤外線用のフィルターセット50で蛍光輝点数が計測された場合は、輝度比率が0:0.1:1と算出されている。

40

この輝度比率の具体的な算出方法としては、次の二つを挙げることが出来る。まず一つ目の方法(第1の算出方法)は、撮影画像全体で計測された輝点の合計輝度値を用いる方法であり、合計輝度値の比として輝度比率が導かれる。この方法は、画像全体を平均化して導かれる簡易な方法であり、特に、一つ一つの粒子が固有の輝度比率を持たず、その固有値に偏りが無い場合に有効に使用できる。

【0049】

第1の算出方法の具体例としては、輝度比率 $R(1 \sim n, 1 \sim N)$ を、下記一般式(1)から算出する方法が挙げられる。

【0050】

50

一般式(1)：輝度比率 $R(m, k) = FL(m, k) / FL(m, p)$

[上記一般式(1)において、 $FL(m, k)$ は、免疫染色剤(m)をフィルターセット(k)を使用し撮影した画像全体で観察された輝点の合計輝度値である。 $FL(m, p)$ は、免疫染色剤(m)をフィルターセット(p)を使用し撮影した画像全体で観察された輝点の合計輝度値である。kは、1～Nの範囲内の整数である。pは、1～Nの範囲内の整数である。n、N及びmは、それぞれ正の整数であり、 $1 \leq m \leq n$ である。]

【0051】

なお、上記一般式(1)において、m、k、pの組み合わせは、 $FL(m, k) / FL(m, p)$ を満たす組み合わせであることが、輝度比率 $R(m, k)$ の上限が1となり、計算上好ましい。すなわち、フィルターセット(p)はフィルターセット(1～N)のうち、免疫染色剤(m)を撮影した画像全体で観察された輝点の合計輝度値が最大となるフィルターセットであることが好ましい。

10

【0052】

一方、二つ目の方法(第2の算出方法)としては、一輝点あたりの輝度値を、フィルターセット50ごとに測定し、フィルターセット間での輝度値に基づいて、輝度比率を算出する方法が挙げられる。具体的には、例えば、緑色用、赤色用、近赤外用のフィルターセット50ごとに輝度値を測定し、緑色発光する蛍光ナノ粒子を含む免疫染色剤Aの輝度比率を求める場合、緑色用のフィルターセット50で測定された輝度値を縦軸、赤色(もしくは近赤外用)のフィルターセット50で測定された輝度値を横軸としたグラフを作成する(図4参照。)。そして、このグラフから得られる近似曲線 $y = ax$ のaを緑色用のフィルターセット50での測定値に対する赤色もしくは近赤外用のフィルターセット50の輝度比率とする。

20

【0053】

すなわち、第2の算出方法とは、まず、輝度比率 $R(1 \sim n, 1 \sim N)$ を、同一輝点の輝度値を前記フィルターセット(1～N)ごとに測定し、フィルターセット(p)を使用したときに得られる輝度値Xと、フィルターセット(k)を使用したときに得られる輝度値Yとの関係を示す近似直線である下記一般式(2)の傾きaを輝度比率 $R(m, k)$ として算出する方法である。なお、この第2の算出方法において、kは、1～Nの範囲内の整数であり、pは、1～Nの範囲内の整数であり、n、N及びmは、それぞれ正の整数であり、 $1 \leq m \leq n$ である。

30

【0054】

一般式(2)： $Y = aX$

【0055】

なお、上記一般式(2)において、フィルターセット(p)はフィルターセット(1～N)のうち、免疫染色剤(m)を撮影した画像全体で観察された輝点の合計輝度値が最大となるフィルターセットであることが、aの最大値が1となり、計算上好ましい。

【0056】

この二つ目の方法は、一つ一つの粒子が固有の輝度比率を持っていて、その固有値に偏りがある場合であっても、真の輝度比率へ近づけることができる。

【0057】

40

(2) 蛍光輝点数算出工程S2

蛍光輝点数算出工程S2では、組織標本30を、上記と同様の複数種類の免疫染色剤で染色し、免疫染色後の組織標本30をステージ12に設置する。

その後、フィルターセット50を切り替えながら、フィルターセット50を切り替えるごとに、制御部62が、ランプ40を点灯させ、組織標本30の蛍光像を撮像素子20に撮像させ、組織標本30の蛍光輝点数をフィルターセット50ごとに計測する。

【0058】

その後、制御部62が、輝度比率算出工程S1で算出し記憶部64に記憶させた輝度比率を記憶部64から読み出し、その輝度比率に基づき、免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出する。

50

かかる場合、免疫染色剤(1~n)それぞれのフィルターセット50(1~N)ごとの輝度比率をR(1~n, 1~N)と、フィルターセット50(1~N)ごとに計測した組織標本30の蛍光輝点数をTB(1~N)と、免疫染色剤(1~n)ごとの蛍光輝点数をL(1~n)として下記の連立方程式を作り、その連立方程式の解から、免疫染色剤(m)の蛍光輝点数L(m)を算出する。

$$TB(1) = L(1) + R(1, 2) \times L(2) + R(1, 3) \times L(3) + \dots$$

$$TB(2) = R(2, 1) \times L(1) + L(2) + R(2, 3) \times L(3) + \dots$$

$$TB(3) = R(3, 1) \times L(1) + R(3, 2) \times L(2) + L(3) + \dots$$

.....

ただし、n、N、mは正の整数であり、1 ≤ m ≤ nである。

10

【0059】

たとえば、図5に示すとおり、組織標本30に3種類の目的生体物質が含まれ、これを緑色、赤色、近赤外線蛍光を発生する蛍光ナノ粒子を含む3種類の免疫染色剤A~Cで染色した場合、緑色用、赤色用、近赤外線用の3種類のフィルターセット50を切り替えながら、フィルターセット50を切り替えるごとに、組織標本30の蛍光像の蛍光輝点数を計測する。

かかる場合、緑色用のフィルターセット50で572個、赤色用のフィルターセット50で680個、近赤外線用のフィルターセット50で453個の蛍光輝点数を計測したときは、下記の連立方程式を作ることができる。

$$572 = L(1) + 0.12L(2) + 0L(3)$$

$$680 = 0.08L(1) + L(2) + 0.1L(3)$$

$$453 = 0.01L(1) + 0.08L(2) + L(3)$$

20

かかる連立方程式を解くと、L(1) = 500、L(2) = 600、L(3) = 400という解が得られ、緑色の蛍光輝点数を500と、赤色の蛍光輝点数を600と、近赤外線の蛍光輝点数を400と算出することができ、結果的に免疫染色剤A~Cごとの蛍光輝点数を算出することができる。

【0060】

輝度比率算出工程S1、蛍光輝点数算出工程S2では、フィルターセット50として、図6に示すとおり、励起フィルター52の波長幅52aが20~30nmで、蛍光フィルター56の波長幅56aが30~50nmのフィルターセットを使用するのがよい。

30

かかる場合、図7に示すとおり、蛍光フィルター56同士の波長重複幅56bが10nm以下のフィルターセット50を使用するのがよい。

【0061】

免疫染色剤の蛍光ナノ粒子としても、発光波長の重複が30%以下のナノ粒子を使用するのがよい。

「発光波長の重複」とは、図8に示すとおり、一方の蛍光ナノ粒子Aの蛍光スペクトルに対する、他方の蛍光ナノ粒子Bの蛍光スペクトルの重複であって、蛍光ナノ粒子Aに対応する蛍光フィルター56の波長幅56aでの蛍光ナノ粒子Aの強度の積分値(グレー部参照)に対する、波長幅56aの範囲での蛍光ナノ粒子Bの強度の積分値(斜線部参照)である。図8の例では、グレー部の面積に対する、斜線部の面積が30%以下である蛍光ナノ粒子Bを使用するのがよい。

40

【0062】

以上の本実施形態によれば、免疫染色剤それぞれの輝度比率をフィルターセット50ごとに事前に算出しておき、その後組織標本30の蛍光輝点数(総数)をフィルターセット50ごとに計測し、算出済みの輝度比率に基づき、免疫染色剤ごとの蛍光輝点数を算出している。

かかる場合、1つのフィルターセット50で蛍光観察を行っているときに、他の免疫染色剤からの蛍光が映り込んでしまっても、すでに算出済みの輝度比率に基づき、その蛍光観察時の免疫染色剤の蛍光輝点数が算出される。そのため、複数種類の免疫染色剤を用いた多重免疫染色でも、免疫染色剤ごとに蛍光輝点数を正確に解析することができる。

50

【実施例】

【0063】

〔実施例1〕

(1) 免疫染色剤の作製

(1.1) 蛍光色素集積ナノ粒子の合成

蛍光色素として緑色発光色素であるPyrromethene556色素14.4mgを水22mLに加えて溶解させた。その後、この溶液に乳化重合用乳化剤のエマルジョン(登録商標)430(ポリオキシエチレンオレイルエーテル、花王社製)の5%水溶液を2mL加えた。この溶液をホットスターラー上で攪拌しながら70℃まで昇温させた後、この溶液にメラミン樹脂原料ニカラックMX-035(日本カーバイド工業社製)を0.65g加えた。

さらに、この溶液に反応開始剤としてドデシルベンゼンスルホン酸(関東化学社製)の10%水溶液を1000 μ L加え、70℃で50分間加熱攪拌した。その後、90℃に昇温して20分間加熱攪拌した。

得られた色素樹脂粒子の分散液から、余剰の樹脂原料や蛍光色素などの不純物を除くため、純水による洗浄を行った。具体的には、遠心分離機(クボタ社製マイクロ冷却遠心機3740)にて20000Gで15分間、遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再分散した。遠心分離、上澄み除去および超純水への再分散による洗浄を5回繰り返した。

以上の処理により、緑色蛍光色素集積ナノ粒子(励起波長490nm、発光波長520nm)を作製した。

【0064】

かかる緑色蛍光色素集積ナノ粒子の作製において、Pyrromethene556色素に代えてSulforhodamine101(Texas Red)色素を使用し、赤色蛍光色素集積ナノ粒子(励起波長590nm、発光波長620nm)も作製した。

さらにかかる緑色蛍光色素集積ナノ粒子の作製において、Pyrromethene556色素に代えてCy5色素を使用し、近赤外線蛍光色素集積ナノ粒子(励起波長643nm、発光波長647nm)も作製した。

【0065】

(1.2) 蛍光色素集積ナノ粒子の修飾

緑色蛍光色素集積ナノ粒子の末端にNH₂-PEG(polyethylene glycol)-マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗HER2抗体を結合させ、これを「免疫染色剤A」とした。

これと同様に、赤色蛍光色素集積ナノ粒子の末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗Ki67抗体を結合させ、これを「免疫染色剤B」とした。

近赤外線蛍光色素集積ナノ粒子の末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗Cytokeratin14抗体を結合させ、これを「免疫染色剤C」とした。

【0066】

(2) 免疫染色剤散布サンプルの作製および輝度比率の測定

(2.1) 免疫染色剤A~Cをそれぞれガラススライドに塗布することで、免疫染色剤散布スライドを作製した。なお、ヒト乳房組織標本サンプルとして、HER2、Ki67、Cytokeratin14の3種類の抗原を含み、かつ、抗原同士の発現の割合があらかじめ認識されているものを使用することとしてもよい。

【0067】

(2.2) 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡としてCarl Zeiss社製蛍光顕微鏡を、フィルターセットとしてSemrock製フィルターセットを使用した。フィルターセットは免疫染色剤A~C(緑色用、赤色用、近赤外線用)に対応する下記3種類のものを使用した。

【0068】

10

20

30

40

【表 1】

フィルターセット	フィルターセットの励起波長／発光波長		
	緑色用 (Pyromethene556用)	赤色用 (Texas Red用)	近赤外線用 (Cy5用)
励起フィルター	470nm (波長幅30nm)	586nm (波長幅20nm)	640nm (波長幅30nm)
ビームスプリッター	495nm	605nm	660nm
蛍光フィルター	525nm (波長幅50nm)	628nm (波長幅32nm)	690nm (波長幅50nm)

10

【0069】

(3) 蛍光顕微鏡観察

免疫染色剤散布サンプルをステージに設置し、緑色用、赤色用、近赤外線用の3種類のフィルターセットを切り替えながら、フィルターセットを切り替えるごとに、免疫染色剤散布サンプルの蛍光像の画面全体の蛍光輝点から算出された合計輝度値の輝度比率(第1の算出方法)又は、一輝点ごとの輝度値を計測し、免疫染色剤A～Cそれぞれの輝度比率をフィルターセットごとに輝度比率を算出した(第2の算出方法)。第1の算出方法及び第2の算出方法どちらを用いた場合も、同じ輝度比率が得られた。

20

【0070】

【表 2】

免疫染色剤	輝度比率		
	緑色用 フィルターセット	赤色用 フィルターセット	近赤外線用 フィルターセット
免疫染色剤 A (緑色)	1	0.08	0.01
免疫染色剤 B (赤色)	0.12	1	0.08
免疫染色剤 C (近赤外線)	0	0.1	1

30

40

【0071】

(4) 組織標本の免疫染色

ヒト乳房組織標本の免疫染色を行った。

下記工程(4-1)～(4-15)の方法により、免疫染色剤A～Cを用いてヒト乳房組織標本の免疫染色(IHC法)を行った。

工程(4-1): キシレンを入れた容器に組織標本を15分浸漬させた。途中2回キシレンを交換した。

工程(4-2): エタノールを入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。途中2回エタノールを交換した。

50

工程(4-3)：水を入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。

工程(4-4)：10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)に組織標本を浸漬させた。

工程(4-5)：121度で5分オートクレーブ処理を行った。

工程(4-6)：PBSを入れた容器に、オートクレーブ処理後の組織標本を15分浸漬させた。途中3回PBSを交換した。

工程(4-7)：1%BSA含有PBSを組織標本に載せて、1時間放置した。

工程(4-8)：1%BSA含有PBSで0.1nMに希釈した抗HER2抗体が結合された免疫染色剤Aを、組織標本に載せて一晩放置した。

工程(4-9)：PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を15分浸漬させた。

工程(4-10)：1%BSA含有PBSで0.1nMに希釈した抗Ki67抗体が結合された免疫染色剤Bを、組織標本に載せて一晩放置した。

工程(4-11)：PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を15分浸漬させた。

工程(4-12)：1%BSA含有PBSで0.1nMに希釈した抗Cytokeratin14抗体が結合された免疫染色剤Cを、組織標本に載せて一晩放置した。

工程(4-13)：PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を30分浸漬させた。

なお、工程(4-8)～工程(4-13)では、1%BSA含有PBSで最終濃度を0.1nMに調整した免疫染色剤A、B、Cを、組織標本に載せて一晩放置し、その後に、PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を15分浸漬させてもよい。

工程(4-14)：組織標本を4%中性パラホルムアルデヒド溶液で10分間固定処理した後、HE染色を行った。

工程(4-15)：Merck社製Aquatexを滴下後、カバーガラスを載せ、組織標本を封入した。

【0072】

(5)顕微鏡観察

免疫染色後の組織標本をステージに設置し、緑色用、赤色用、近赤外線用の3種類のフィルターセットを切り替えながら、フィルターセットを切り替えるごとに、組織標本の蛍光像の蛍光輝点数を計測した。

【0073】

【表3】

蛍光輝点源	蛍光輝点数		
	緑色用 フィルターセット	赤色用 フィルターセット	近赤外線用 フィルターセット
組織標本	1656	1545	1369
免疫染色剤A (緑色)	L(1) =1500	0.08L(1) =120	0.01L(1) =15
免疫染色剤B (赤色)	0.12L(2) =156	L(2) =1300	0.08L(2) =104
免疫染色剤C (近赤外線)	—	0.1L(3) =125	L(3) =1250

【0074】

蛍光輝点数の計測結果から、下記の連立方程式が作られた。

$$1656 = L(1) + 0.12L(2) + 0L(3)$$

10

20

30

40

50

$$1545 = 0.08L(1) + L(2) + 0.1L(3)$$

$$1369 = 0.01L(1) + 0.08L(2) + L(3)$$

かかる連立方程式を解くと、 $L(1) = 1500$ 、 $L(2) = 1300$ 、 $L(3) = 1250$ という解が得られ、緑色の蛍光輝点数を1500と、赤色の蛍光輝点数を1300と、近赤外線蛍光輝点数を1250と算出され、結果的に免疫染色剤A～Cごとの蛍光輝点数を算出することができた。

すなわち、以上の結果から、検査対象の組織標本では、HER2:Ki67:Cytokeratin14 = 1500:1300:1250の割合で発現していることが確認された。

【0075】

〔実施例2〕

(1) 免疫染色剤の作製

(1.1) 蛍光色素集積ナノ粒子の合成

実施例1の「(1.1) 蛍光色素集積ナノ粒子の合成」と同様にして、緑色蛍光色素集積ナノ粒子(励起波長490nm、発光波長520nm)を作製した。

【0076】

かかる緑色蛍光色素集積ナノ粒子の作製において、Pyrromethene556色素に代えてSulforhodamine101(Texas Red)色素を使用し、赤色蛍光色素集積ナノ粒子(励起波長590nm、発光波長620nm)も作製した。

【0077】

(1.2) 蛍光色素集積ナノ粒子の修飾

緑色蛍光色素集積ナノ粒子の末端にNHS-PEG(polyethylene glycol)-マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗Digoxigenin(DIG)抗体を結合させ、これを「免疫染色剤D」とした。

これと同様に、赤色蛍光色素集積ナノ粒子の末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗Fluorescein(FITC)抗体を結合させ、これを「免疫染色剤E」とした。

【0078】

(1.3) 二次抗体の修飾

ラット由来抗マウス抗体SB77eのアミノ基にNHS-DIGを結合させ、これを「二次抗体A」とした。

これと同様に、ラット由来抗ラビット抗体LORG1にNHS-FITCを結合させ、これを「二次抗体B」とした。

【0079】

(2) 免疫染色剤散布サンプルの作製および輝度比率の測定

免疫染色剤D, Eをそれぞれガラススライドに塗布することで、免疫染色剤散布スライドを作製した。

【0080】

(3) 蛍光顕微鏡観察

免疫染色剤散布サンプルをステージに設置し、緑色用、赤色用の2種類のフィルターセットを切り替えながら、フィルターセットを切り替えるごとに、組織標本サンプルの蛍光像の画面全体の蛍光輝点から算出された合計輝度値もしくは一輝点ごとの輝度値を計測し、免疫染色剤D, Eそれぞれの輝度比率をフィルターセットごとに算出した。

【0081】

(4) 組織標本の免疫染色

下記工程(4-1)～(4-15)の方法により、免疫染色剤D, Eを用いてヒト肺組織標本の免疫染色(IHC法)を行った。

【0082】

工程(4-1):キシレンを入れた容器に組織標本を15分浸漬させた。途中2回キシレンを交換した。

10

20

30

40

50

工程(4-2)：エタノールを入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。途中2回エタノールを交換した。

工程(4-3)：水を入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。

工程(4-4)：10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)に組織標本を浸漬させた。

工程(4-5)：121度で5分オートクレーブ処理を行った。

工程(4-6)：PBSを入れた容器に、オートクレーブ処理後の組織標本を15分浸漬させた。途中3回PBSを交換した。

工程(4-7)：1%BSA含有PBSを組織標本に載せて、1時間放置した。

工程(4-8)：1%BSA含有PBSで3 μ g/mLに希釈した抗PD-L1抗体・抗EGFR抗体混合溶液を、組織標本に載せて一晩放置した。

工程(4-8)：1%BSA含有PBSで2 μ g/mLに希釈したDIGが結合した二次抗体AおよびFITCが結合した二次抗体Bの混合溶液を、組織標本に載せて一晩放置した。

工程(4-8)：1%BSA含有PBSで0.1nMに希釈した抗DIG抗体が結合された免疫染色剤Dおよび抗FITC抗体が結合された免疫染色剤Eを、組織標本に載せて一晩放置した。

工程(4-13)：PBSを入れた容器に、染色後の組織標本を30分浸漬させた。

工程(4-14)：組織標本を4%中性パラホルムアルデヒド溶液で10分間固定処理した後、HE染色を行った。

工程(4-15)：Merck社製Aquatexを滴下後、カバーガラスを載せ、組織標本を封入した。

【0083】

(5) 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡としてCarl Zeiss社製蛍光顕微鏡を、フィルターセットとしてSemrock製フィルターセットを使用した。フィルターセットは免疫染色剤D、E(緑色用、赤色用)に対応する2種類のものを使用した。顕微鏡観察及び蛍光輝点数解析は、実施例1の「(5) 顕微鏡観察」と同様にして行った。

次に、画面全体の蛍光輝点から算出した合計輝度値から輝度比率(第1の算出方法)を求めた。また、一輝点ごとの輝度値を計測し、免疫染色剤A~Cそれぞれの輝度比率をフィルターセットごとに算出した(第2の算出方法)。第1の算出方法又は第2の算出方法どちらを用いた場合も、同じ輝度比率(表4)であり、また、PD-L1:EGFR=200:1400の割合で発現していることが確認された(表5)。

【0084】

【表4】

蛍光輝点源	輝度比率	
	緑色用フィルターセット	赤色用フィルターセット
免疫染色剤D(緑色)	1	0.08
免疫染色剤E(赤色)	0.12	1

【0085】

10

20

30

40

【表 5】

蛍光輝点源	蛍光輝点数	
	緑色用フィルターセット	赤色用フィルターセット
組織標本	1424	312
免疫染色剤D(緑色)	L(1)=1400	0.08L(1)=112
免疫染色剤E(赤色)	0.12L(2)=24	L(2)=200

【0086】

10

〔実施例3(組織標本が動物モデルから搾取され、標本化されたものである例)〕

検査対象の組織標本としてPDXマウス(Patient-derived xenograft)から搾取された組織の標本を用いたこと以外は、実施例2と同様にしてPD-L1およびEGFRに由来する輝点を検出した。

PDXとは、Patient-derived tumor xenograft(患者由来腫瘍異種移植)の略称であり、患者(ヒト)由来の組織をマウスまたはその他の実験動物に移植し、一定期間、マウス等の体内で成長させることをいう。たとえば、ヒト癌の組織が移植されたマウスを1か月近く飼育するとヒト癌組織が増大し、これを患者検体の代替えとして利用する有用性が、近年論じられている。さらに、増大した癌組織を別のマウスに移植することを「継代」と呼んでおり、患者検体を継代によってずっと増やしていくことも可能となっている。

20

【0087】

本実施例で使用する組織標本は、次の手順で準備した。

(1) 検体入手: 移植する大きさ 1 cm^3 の肺がん患者検体は、臨床検体供給元企業であるソフィアバイオ社(Sofia Bio LLC)から購入した。

(2) PDXマウスの作製: 入手した癌組織検体を、3匹のNOD-SCIDマウスの皮下へそれぞれ 3 mm^3 角移植した。無菌施設内でマウスを約1か月間飼育し、癌組織が 1 cm^3 まで増大したらそれを搾取する。搾取した癌組織の一部は10%ホルマリンで24時間固定した後、パラフィンでブロック形態として保管した。

(3) パラフィン切片スライドの染色

【0088】

30

得られたパラフィンブロックを $4\text{ }\mu\text{ m}$ の厚さに切り出して、ガラススライド上に張り付け、実施例2と同様に免疫染色および染色画像の解析を実施した。その際、実施例2における「(1.2)蛍光色素集積ナノ粒子の修飾」については下記のように変更した。

緑色蛍光色素集積ナノ粒子の末端にNH₂-PEG(polyethylene glycol)-マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、末端にマレイミド基が付いた蛍光物質内包メラミンナノ粒子を得た。一方、ストレプトアビジン(和光純薬社製)をN-succinimidyl S-acylthioacetate(SATA)を用いてチオール基付加処理を行ったのち、ゲルろ過カラムによる過を行い、蛍光物質内包メラミンナノ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。上記の蛍光物質内包メラミンナノ粒子とストレプトアビジンとを、EDTAを2mM含有したPBS中で混合し、室温で1時間反応させた。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ストレプトアビジン等を除去し、ストレプトアビジン結合蛍光物質内包メラミンナノ粒子を作製し、これを「免疫染色剤D」とした。

40

一方、同様に赤色蛍光色素集積ナノ粒子の末端にマレイミドを導入した粒子に対しては、これにチオール化した抗EGFR抗体を結合させ、これを「免疫染色剤E」とした。

【0089】

さらに、実施例2における「(1.3)二次抗体の修飾」については、次の通り、ビオチン修飾することに変更した。

(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50 $\mu\text{ g}$ を溶解し

50

た。この溶液に、最終濃度 3 m M となるように D T T (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、D T T 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 200 μ L を 50 m M T r i s 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-PEG2-Biotin」(サーモサイエンティフィック社、製品番号21901)を、D M S O を用いて 0.4 m M となるように調整した。このリンカー試薬溶液 8.5 μ L 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 I g G 抗体に P E G 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て、波長 300 n m 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。50 m M T r i s 溶液を用いて、ビオチン修飾 2 次抗体の濃度を 250 μ g / m L に調整した溶液を、ビオチン修飾 2 次抗体の溶液とした。「免疫染色剤 D」による染色は次のように実施した。すなわち、抗 P D - L 1 ウサギモノクローナル抗体(c l o n e 「S P 1 4 2」Spring Bioscience (SBS) 社) 0.05 n M の濃度で 1 次反応処理し、次に作製したビオチン修飾抗ウサギ I g G 抗体の P B S 溶液 6 μ g / m L で 2 次反応処理した。

10

【0090】

その結果、第 1 の方法で導かれた蛍光輝点数は P D - L 1 : E G F R = 200 : 1400 であり、第 2 の方法で導かれた蛍光輝点数は P D - L 1 : E G F R = 100 : 1400 であった。このような差が生じる要因について不明であるが、ここで用意した患者由来マウス検体スライドの状態に、オリジナル患者検体スライドの状態に比較して何らかの変化が生じている可能性が示唆される。今後、マウス検体スライドの状態をチェックするために、本手法が有効な手段になりえると考察された。

20

【産業上の利用可能性】

【0091】

以上のように、本発明は、複数種類の免疫染色剤を用いた多重免疫染色でも、免疫染色剤ごとに蛍光輝点数を正確に解析することができる目的生体物質の解析方法および解析システムを提供することに適している。

【符号の説明】

【0092】

30

1 目的生体物質の解析システム

10 蛍光顕微鏡

12 ステージ

14 対物レンズ

16 鏡筒

18 接眼レンズ

20 撮像素子

30 組織標本

40 ランプ

50 フィルターセット

40

52 励起フィルター

52 a 波長幅

54 ビームスプリッター

56 蛍光フィルター

56 a 波長幅

56 b 波長重複幅

60 制御装置

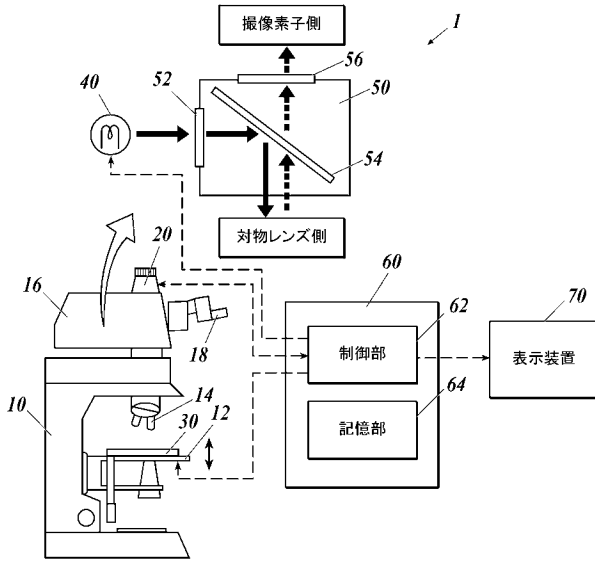
62 制御部

64 記憶部

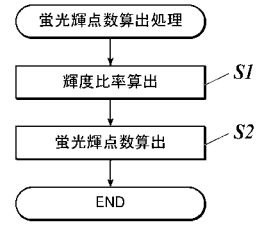
70 表示装置

50

【 図 1 】



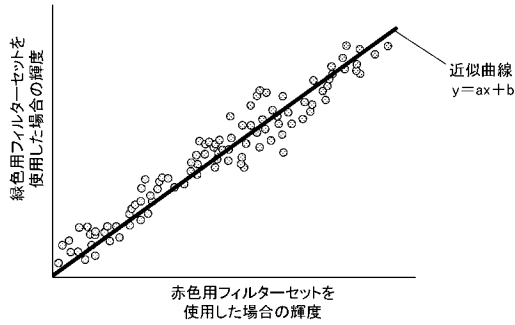
【 図 2 】



【 図 3 】

免疫染色剤	輝度比率		
	緑色用 フィルターセット	赤色用 フィルターセット	近赤外線用 フィルターセット
免疫染色剤 A (緑色)	1	0.08	0.01
免疫染色剤 B (赤色)	0.12	1	0.08
免疫染色剤 C (近赤外線)	0	0.1	1

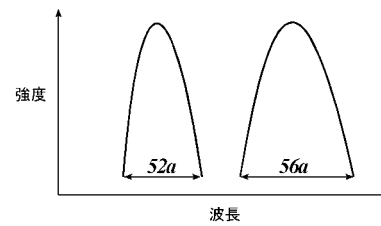
【 図 4 】



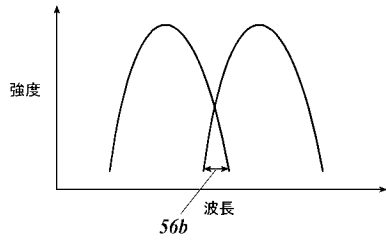
【 図 5 】

蛍光輝点源	蛍光輝点数		
	緑色用 フィルターセット	赤色用 フィルターセット	近赤外線用 フィルターセット
組織標本	572	680	453
免疫染色剤 A (緑色)	L(1) =500	0.08L(1) =40	0.01L(1) =5
免疫染色剤 B (赤色)	0.12L(2) =72	L(2) =600	0.08L(2) =48
免疫染色剤 C (近赤外線)	—	0.1L(3) =40	L(3) =400

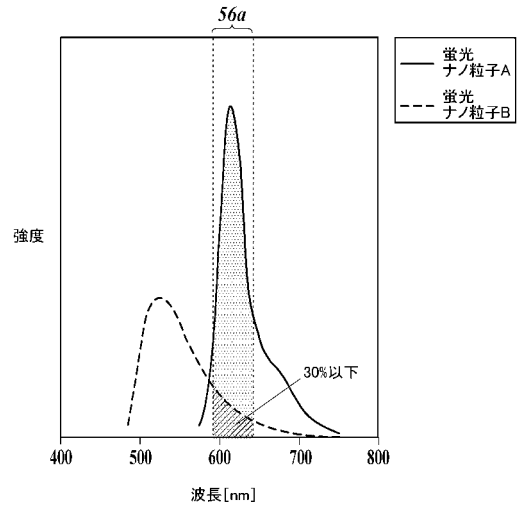
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2016/071037
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/533(2006.01)i, G02B21/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N21/62-21/74, G01N33/48-33/98, G02B21/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/029342 A1 (Konica Minolta, Inc.), 08 March 2012 (08.03.2012), paragraphs [0016] to [0033], [0048] to [0061] & US 2013/0157895 A1 paragraphs [0027] to [0053], [0094] to [0114] & EP 2613145 A1	1-11
Y	JP 2005-037299 A (Hamamatsu Photonics Kabushiki Kaisha), 10 February 2005 (10.02.2005), paragraphs [0005] to [0006], [0012] to [0013], [0041] (Family: none)	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 September 2016 (13.09.16)		Date of mailing of the international search report 27 September 2016 (27.09.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/071037

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009/0245611 A1 (General Electric Co.), 01 October 2009 (01.10.2009), entire text; all drawings (Family: none)	1-11
A	JP 8-320292 A (Olympus Optical Co., Ltd.), 03 December 1996 (03.12.1996), entire text; all drawings (Family: none)	1-11
A	JP 2012-052985 A (Sony Corp.), 15 March 2012 (15.03.2012), entire text; all drawings & US 2012/0056103 A1 & EP 2426481 A1 & CN 102435313 A	1-11

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 7 1 0 3 7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/533(2006.01)i, G02B21/00(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N21/62-21/74, G01N33/48-33/98, G02B21/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2016年 日本国実用新案登録公報 1996-2016年 日本国登録実用新案公報 1994-2016年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2012/029342 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2012.03.08, [0016] - [0033], [0048] - [0061] & US 2013/0157895 A1 [0027] - [0053], [0094] - [0114] & EP 2613145 A1	1-11
Y	JP 2005-037299 A (浜松ホトニクス株式会社) 2005.02.10, [0005] - [0006], [0012] - [0013], [0041] (ファミリーなし)	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 13.09.2016	国際調査報告の発送日 27.09.2016	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 横尾 雅一 電話番号 03-3581-1101 内線 3258	2W 3716

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 6 / 0 7 1 0 3 7
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	US 2009/0245611 A1 (General Electric Company) 2009.10.01, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 8-320292 A (オリンパス光学工業株式会社) 1996.12.03, 全文、全図 (ファミリーなし)	1-11
A	JP 2012-052985 A (ソニー株式会社) 2012.03.15, 全文、全図 & US 2012/0056103 A1 & EP 2426481 A1 & CN 102435313 A	1-11

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 尾崎 雄一

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 高橋 優

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

Fターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA02 EA01 FA01 FA02 HA01 HA02 HA09 JA02
LA03

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	目标生物物质的分析方法和分析系统		
公开(公告)号	JPWO2017014196A1	公开(公告)日	2018-04-26
申请号	JP2017529886	申请日	2016-07-15
[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		
[标]发明人	富岡大輔 郷田秀樹 佐藤彰 尾崎雄一 高橋優		
发明人	富岡 大輔 郷田 秀樹 佐藤 彰 尾崎 雄一 高橋 優		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6458 G01N1/30 G01N21/64 G01N33/533 G01N33/6803 G02B21/00 G02B21/0076 G06K9/0014 G06T7/0012 G06T2207/10024 G06T2207/10056 G06T2207/30024 G06T2207/30242		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N21/64.F G01N21/64.E		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/HA01 2G043/HA02 2G043/HA09 2G043/JA02 2G043/LA03		
优先权	2015142813 2015-07-17 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种用于靶标生物物质的分析系统，该系统准确地分析每种免疫染色剂的荧光亮点的数量。目标生物物质分析系统1是这样的系统，其中组织样品30用包含互不相同的荧光纳米颗粒的多种类型的免疫染色剂染色，并且使用荧光显微镜10对其进行分析。分析系统1包括：荧光显微镜10，其对被免疫染色剂染色的组织样本30成像；以及控制装置60，其控制荧光显微镜10。控制装置60，用于存储每种免疫染色剂的每个过滤器组50的亮度比的存储单元64，根据荧光显微镜10的成像结果，测量组织样本30的每个过滤器组50的荧光亮点的数量，控制单元62用于基于亮度比计算每种免疫染色剂的荧光亮点的数量。

