

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6237194号
(P6237194)

(45) 発行日 平成29年11月29日(2017.11.29)

(24) 登録日 平成29年11月10日(2017.11.10)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/48 (2006.01) GO 1 N 33/48 P
 GO 1 N 33/536 (2006.01) GO 1 N 33/536 D

請求項の数 6 (全 17 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2013-260732 (P2013-260732)</p> <p>(22) 出願日 平成25年12月18日 (2013.12.18)</p> <p>(65) 公開番号 特開2015-117980 (P2015-117980A)</p> <p>(43) 公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)</p> <p>審査請求日 平成28年9月26日 (2016.9.26)</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 110001254 特許業務法人光陽国際特許事務所</p> <p>(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</p> <p>(72) 発明者 中野 寧 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 岡田 文徳 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】 染色方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光色素を樹脂中に内包した蛍光粒子であって平均粒径の異なる2種以上の前記蛍光粒子を、標識剤として用いる病理切片の染色方法において、

前記病理切片に対して、第1の平均粒径であり且つ第1の蛍光色を発する第1の蛍光粒子を用いて特定の抗原を免疫染色する工程と、

前記病理切片に対して、平均粒径が前記第1の蛍光粒子の前記第1の平均粒径より小さい第2の平均粒径であり且つ前記第1の蛍光色と異なる第2の蛍光色を発する第2の蛍光粒子を用いて前記特定の抗原を免疫染色する工程と、

を有することを特徴とする染色方法。

【請求項2】

請求項1に記載の染色方法において、

前記第1の蛍光粒子と前記第2の蛍光粒子とで平均粒径の差が40nm以上であることを特徴とする染色方法。

【請求項3】

請求項1または2に記載の染色方法において、

前記第1の蛍光粒子の平均粒径が120~200nmであることを特徴とする染色方法。

【請求項4】

請求項1~3のいずれか一項に記載の染色方法において、

前記第1の蛍光粒子の平均粒径が120～200nmであり、

前記第2の蛍光粒子の平均粒径が20～80nmであることを特徴とする染色方法。

【請求項5】

請求項1～4のいずれか一項に記載の染色方法において、

前記病理切片を、ヘマトキシリン・エオジン染色する工程をさらに有し、

前記第1の蛍光粒子として580nm付近の波長の光で励起する蛍光粒子を使用し、前記第2の蛍光粒子として600nm以上の波長の光で励起する蛍光粒子を使用することを特徴とする染色方法。

【請求項6】

請求項1～5のいずれか一項に記載の染色方法において、

前記第1の蛍光粒子を用いて特定の抗原を免疫染色する工程の後に、前記第2の蛍光粒子を用いて前記特定の抗原を免疫染色する工程を行うことを特徴とする染色方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は病理切片の染色方法に関し、特に免疫染色と形態観察染色とを共に実現しうる技術に関する。

【背景技術】

【0002】

病理診断では、臓器摘出や針生検によって得た組織検体を厚さ数ミクロン程度に薄切して組織標本を作成し、様々な所見を得るために光学顕微鏡を用いて拡大観察することが広く行われている。多くの場合、標本は、採取した組織を固定するため脱水し、パラフィンブロック化した後、数μmの厚さに薄切りし、パラフィンを取り除いて作製される。ここで、標本は光を殆ど吸収および散乱せず無色透明に近いため、観察に先立って色素による染色を施すのが一般的である。

20

【0003】

染色手法としては種々のものが提案されている。

特に組織標本に関しては、標本の形態を観察するための形態観察染色として、ヘマトキシリンおよびエオジンの2つの色素を用いるヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)が標準的に用いられ(非特許文献1、特許文献1～2参照)、ヘマトキシリン染色(H染色)により細胞核・石灰部・軟骨組織・細菌・粘液が青藍色～淡青色に染色され、エオジン染色(E染色)により細胞質・間質・各種線維・赤血球・角化細胞が赤～濃赤色に染色される。病理医は、染色された組織標本の顕微鏡画像の中で、細胞の核の大きさや形の変化、組織としてのパターンの変化などの形態学的な情報、染色情報、をもとに診断を行っている。

30

【0004】

他方、病理診断では、免疫染色と呼ばれる、組織標本の分子情報の発現を確認するための分子標的染色を施し、遺伝子やタンパクの発現異常といった機能異常を診断する免疫観察も行なわれている。

免疫染色では、たとえば蛍光染色法(蛍光標識法)が用いられる。蛍光染色法は、蛍光色素などの蛍光粒子で修飾した抗体を用いて、対象となる抗原を染色し観察することで抗原量を測る手法である。

40

【0005】

近年では、同一の病理切片に対し、形態観察染色と蛍光染色法による免疫染色(蛍光免疫染色)とを共に行うことが試みられており、たとえば、HER2などの膜に発現するタンパクを検出する場合には、HE染色と蛍光免疫染色とを共にしている。

かかる場合、細胞の形態観察と蛍光粒子の観察との両方を行いたいため、ある程度エオジンが発光する励起波長で蛍光粒子を励起させている。その際に、輝度の低い蛍光粒子(たとえばQ-dotなど)では、E染色により蛍光が埋もれてしまい輝点の観測が不可能となるため、E染色に埋もれない輝度を有する蛍光粒子を選択することが必要となってくる。

50

現在用いられている蛍光粒子では、輝度はその粒子の体積に比例することから、HE染色時においてある程度大きな粒径を有する粒子が必要となっており、実際には粒径が150nm程度の粒子が用いられている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特表2001-525580号公報

【特許文献2】特開2009-115599号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】診断に役立つ免疫組織化学、文光堂

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

ところで、抗原の発現数の少ない病理切片においてはそれほど大きな問題とはならないが、抗原の発現数の多い病理切片では、抗原間の距離が150nm以下になることが考えられ問題が発生する。

たとえば、図5に示すとおり、蛍光粒子12とビオチン14とを直接結合した標識体10を作製し、標識体10を用いて、抗原20に1次抗体30とアビジン42で修飾した2次抗体40とを結合したものを免疫染色する方法では、蛍光粒子12が150nm程度の粒径を有しているため、蛍光粒子12同士の立体障害によって抗原20と結合できない蛍光粒子12が存在し、すべての抗原20を認識できなくなってしまう。

このような問題に対し、粒径の小さい蛍光粒子12のみを用いれば、抗原20間の距離が狭くても蛍光粒子12が認識可能となり、H染色のみの観察条件では輝点数が増加する。しかしながら、粒径の小さい蛍光粒子12では輝度自体が低いため、蛍光免疫染色とHE染色とを共に行うと、エオジンの蛍光より蛍光粒子12の蛍光のほうが弱く、輝点の確認できず、蛍光免疫染色による定量性が低下する。

【0009】

したがって、本発明の主な目的は、蛍光免疫染色と形態観察染色とを共に行う場合であっても、蛍光免疫染色による抗原の定量性を向上させることができる染色方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記課題を解決するため本発明によれば、

蛍光色素を樹脂中に内包した蛍光粒子であって平均粒径の異なる2種以上の前記蛍光粒子を、標識剤として用いる病理切片の染色方法において、

前記病理切片に対して、第1の平均粒径であり且つ第1の蛍光色を発する第1の蛍光粒子を用いて特定の抗原を免疫染色する工程と、

前記病理切片に対して、平均粒径が前記第1の蛍光粒子の前記第1の平均粒径より小さい第2の平均粒径であり且つ前記第1の蛍光色と異なる第2の蛍光色を発する第2の蛍光粒子を用いて前記特定の抗原を免疫染色する工程と、

を有することを特徴とする染色方法が提供される。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、蛍光免疫染色と形態観察染色とを共に行う場合であっても、蛍光免疫染色による抗原の定量性を向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】蛍光粒子の樹脂量と平均粒径との関係を概略的に示す図である。

【図2】エオジンの励起スペクトルと蛍光スペクトルとを概略的に示すスペクトル図であ

10

20

30

40

50

る。

【図3】大径蛍光粒子と小径蛍光粒子とを用いた免疫染色時の粒子の挙動を概略的に示す模式図である。

【図4】本発明の実施例にかかる総タンパク量（抗原量）と輝点数との関係を示す図である。

【図5】従来技術の問題点を説明するための図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

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。

【0014】

本発明の好ましい実施形態にかかる染色方法は、基本的には（1）病理切片を平均粒径の大きい蛍光粒子を用いて免疫染色する工程と、（2）病理切片を平均粒径の小さい蛍光粒子を用いて免疫染色する工程と、（3）形態観察のための染色試薬を用いて病理切片を形態観察染色する工程とを、有している。

特に（1）、（2）の病理切片を免疫染色する工程では、互いに平均粒径の異なる蛍光粒子を標識剤として使用するようになっている。そして蛍光染色後の病理切片に対しては、励起光を照射してこれら蛍光粒子を蛍光発光させ、その病理切片から生体物質（抗原）を検出するようになっている。

【0015】

（1）の免疫染色する工程と（2）の免疫染色する工程とでは、（1）の免疫染色する工程の処理を先に実行し、その後（2）の免疫染色する工程の処理を実行する。なお、蛍光粒子の輝点の観察については、HE染色条件で、平均粒径の大きい蛍光粒子の輝点数をカウントし、その後励起波長を切り替えることで平均粒径の小さい蛍光粒子の輝点数をカウントする。

他方、（1）、（2）の免疫染色する工程と（3）の形態観察染色する工程とでは、好ましくは（1）、（2）の免疫染色する工程の処理を先に実行し、その後（3）の形態観察染色する工程の処理を実行するのがよいが、その順序（先後）は入れ替わってもよい。

【0016】

免疫染色やそこで使用する蛍光粒子の特性や種類、形態観察染色などの詳細は下記のとおりである。

【0017】

[免疫染色]

(i) 染色方法

免疫染色では蛍光染色法が好適に用いられる。

蛍光染色法は抗原を蛍光粒子で染色する方法である。

染色の際には、蛍光粒子と1次抗体を直接結合した標識体を作製し、抗原を染色する方法（1次抗体法）、蛍光粒子と2次抗体を直接結合した標識体を作製し、抗原に1次抗体を結合したものを染色する方法（2次抗体法）、蛍光粒子とビオチンとを直接結合した標識体を作製し、抗原に1次抗体とアビジンで修飾した2次抗体とを結合したものを染色する方法（ビオチン-アビジン法、図5参照）などを用いることができる。

1次抗体は特に限定されず、免疫染色を行おうとする対象（抗原）によって変わる。たとえばHER2抗原の免疫染色を行う場合には、抗HER2抗体を用いる。

「抗原」は膜タンパク質や細胞質内のタンパク質などが好適な対象である。

2次抗体も特に限定されず、1次抗体によって変わる。たとえば抗マウス・ラビット・牛・ヤギ・羊・犬・チキンが挙げられる。

蛍光粒子と抗体やビオチンの結合は既存の如何なる方法を用いても構わない。たとえば、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などを用いることができる。

10

20

30

40

50

【0018】

(ii) 標識剤

免疫染色では、まず、標識剤として蛍光粒子を使用する。

本実施形態にかかる「蛍光粒子」とは、蛍光色素を樹脂中に内包した蛍光色素内包樹脂粒子である。

【0019】

(ii-A) 構成材料

蛍光色素としては、たとえば、ローダミン系色素分子、Alexa Fluor (インビトロジェン社製)系色素分子、BODIPY (インビトロジェン社製)系色素分子、Texas Red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、ローダミン系色素分子、オキサジン系色素分子、芳香環系色素分子、カルボピロニン系色素分子などを挙げることができる。

具体的には、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 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)、Cy5、Cy5.5、1, 3 - Bis[4 - (dimethylamino) - 2 - hydroxyphenyl] - 2, 4 - dihydroxycyclobutenediyl lithium dihydroxide, bis、1, 3 - Bis[4 - (dimethylamino)phenyl] - 2, 4 - dihydroxycyclobutenediyl lithium dihydroxide, bis、2 - (4 - (Diethylamino) - 2 - hydroxyphenyl) - 4 - (4 - (diethyliminio) - 2 - hydroxycyclohexa - 2, 5 - dienylidene) - 3 - oxocyclobut - 1 - enolate、2 - (4 - (Dibutylamino) - 2 - hydroxyphenyl) - 4 - (4 - (dibutyliminio) - 2 - hydroxycyclohexa - 2, 5 - dienylidene) - 3 - oxocyclobut - 1 - enolate、2 - (8 - Hydroxy - 1, 1, 7, 7 - tetramethyl - 1, 2, 3, 5, 6, 7 - hexahydropyrido[3, 2, 1 - ij]quinolin - 9 - yl) - 4 - (8 - hydroxy - 1, 1, 7, 7 - tetramethyl - 2, 3, 6, 7 - tetrahydro - 1H - pyrido[3, 2, 1 - ij]quinolinium - 9(5H) - ylidenene) - 3 - oxocyclobut - 1 - enolate、1 - Butyl - 2 - [5 - (1 - butyl - 1, 3 - dihydro - 3, 3 - dimethyl - 2H - indol - 2 - ylidenene) - penta - 1, 3 - dienyl] - 3, 3 - dimethyl - 3 - eiti - indolium hexafluorophosphate、1 - Butyl - 2 - [5 - (1 - butyl - 3, 3 - dimethyl - 1, 3 - dihydro - indol - 2 - ylidenene) - 3 - chloro - penta - 1, 3 - dienyl] - 3, 3 - dimethyl - 3H - indolium hexafluorophosphate、3 - Ethyl - 2 - [5 - (3 - ethyl - 3H - benzothiazol - 2 - ylidenene) - penta - 1, 3 - dienyl] - benzothiazol - 3 - ium iodide、N, N-Di-(2, 6-diisopropylphenyl)-1, 6, 7, 12-(4-tert.butyl-phenoxy)-perylene-3, 4, 9, 10-tetracarboxylic diimide、N,N-Bis(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetraperoxyperylene-3,4:9,10-tetracarboxylic diimide、N,N'-Bis(2,6-diisopropylphenyl)

10

20

30

40

50

perylene-3,4:9,10-bis(dicarbimide)、Benzenesulfonic acid, 4,4',4'',4'''-[2,9-bis[2,6-bis(1-methylethyl)phenyl]-1,2,3,8,9,10-hexahydro-1,3,8,10-tetraoxoanthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinoline-5,6,12,13-tetrayl]tetrakis(oxy)]tetrakis-、Benzeneethaniminium, 4,4',4'',4'''-[2,9-bis[2,6-bis(1-methylethyl)phenyl]-1,2,3,8,9,10-hexahydro-1,3,8,10-tetraoxoanthra[2,1,9-def:6,5,10-d'e'f']diisoquinoline-5,6,12,13-tetrayl]tetrakis(oxy)]tetrakis[N,N,N-trimethyl-, ROX (X-Rhodamine, Rhodamine Red X)、DY-590、5-ROX、Spectrum Red、PYRRROMETHEN E650、Texas Red、BODIPY TR、DyLight 594、AlexaFluor 594、HiLyte594、HiLyteFluor TR、Cresyl violet、ATTO590、MFP590、DY-610、ATTO610、DY-615、Oxazine170、ATTO620、C-Phycocyanin、AlexaFluor 633、Phycocyanin、ATTO633、DY-630、DY-632、DY-633、MFP631、DyLight633、NorthernLights637、DY-631、DY-634、Nile Blue、APC(Allophycocyanin)、APC-XL、EVOblue30、SRfluor 680-CarboxylateLD700 PERCHLORATE、ATTO 655などを挙げることができる。

10

これら蛍光色素は、単独で用いられてもよいし、複数種が混合され用いられてもよい。

【0020】

内包用の樹脂としては、たとえば、ポリスチレン、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリアクリロニトリル、ポリ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、ポリフラン、ポリキシレン、フェノール樹脂などがあり、安定に蛍光色素を内包できるものが使用される。

蛍光色素の内包には、原料であるモノマーに蛍光色素の分子を結合させて粒子を合成する方法、樹脂に蛍光色素を吸着させて導入する方法など、樹脂中への蛍光色素の導入はいろいろな方法を用いても構わない。

20

【0021】

(ii-B) 平均粒径などの特性

次に、免疫染色では、互いに平均粒径の異なる2種以上の蛍光粒子を用いる。「平均粒径」とは、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて電子顕微鏡写真を撮影し十分な数(本実施形態では1000個)の粒子について断面積を計測し、各計測値を円の面積としたときの円の直径の算術平均である。

これら蛍光粒子間では、いずれも蛍光色素内包樹脂粒子が使用され、蛍光色素は異なってもよいし同じでもよく、内包用の樹脂も異なってもよいし同じでもよい。

30

【0022】

平均粒径の大きい蛍光粒子(大径蛍光粒子)としては、好ましくはペリレンジイミド(PI)をポリメラミン中に内包したPI色素内包ポリメラミン粒子や、PIをポリスチレン中に内包したPI色素内包ポリスチレン粒子が使用され、より好ましくはPI色素内包ポリメラミン粒子が使用される。HE染色時に必要な輝度の観点から、大径蛍光粒子の平均粒径は、好ましくは120-180nm(120nm以上で180nm以下)である。

平均粒径の小さい蛍光粒子(小径蛍光粒子)としては、好ましくはCy5をポリメラミン中に内包したCy5色素内包ポリメラミン粒子や、Cy5をポリスチレン中に内包したCy5色素内包ポリスチレン粒子が使用され、より好ましくはCy5色素内包ポリメラミン粒子が使用される。大径蛍光粒子の平均粒径との関係から、小径蛍光粒子の平均粒径(上限値)は、好ましくは80nm以下である。汎用顕微鏡において、HE染色時に輝点としてカウントできる必要があるという観点から、小径蛍光粒子の平均粒径(下限値)は、好ましくは20nm以上である。

40

【0023】

平均粒径の異なる蛍光粒子の作製(粒径制御)にあたっては、合成時の内包用の樹脂量と蛍光色素量とを一定として、樹脂量を増減することにより、平均粒径の異なる蛍光粒子が合成可能である。たとえば、内包用の樹脂量と蛍光色素量との比を0.04とした場合の蛍光粒子の平均粒径の分布例を、図1に示す。

【0024】

(ii-C) 励起・発光波長

50

HE染色に用いられるエオジンは顕微鏡観察条件によっては蛍光を放つ。エオジン吸収波長は多くの蛍光標識体の励起波長と重複するため、HE染色に用いたエオジンの発光が蛍光標識体の観察を妨害するという課題がある。

エオジンの蛍光スペクトル(励起波長520nm)と励起スペクトル(蛍光波長540nm)を、図2に示す。励起スペクトルより、エオジンは350nm未満の波長域および450nmを超えかつ550nm未満の波長域で効率よく励起されることがわかる。

従って、本実施形態にかかる蛍光粒子は、この波長域を回避した350~450nmの波長域かまたは550nm以上の長波長域の光で励起される必要がある。

好ましくは、大径蛍光粒子の蛍光色素については580nm付近の波長の光で励起する蛍光色素を使用し、小径蛍光粒子の蛍光色素については600nm以上の波長の光で励起する蛍光色素を使用する。

10

【0025】

[形態観察染色]

形態観察染色のうち、特に組織標本に関しては、標本の形態を観察するための形態観察染色として、ヘマトキシリンおよびエオジンの2つの色素を用いるHE染色が標準的に用いられているが、これに限定されるものではない。他の形態観察染色としては、例えば細胞診に用いられるパパニコロウ染色(Pap染色)等がある。

また、HE染色では、H染色により細胞核・石灰部・軟骨組織・細菌・粘液が青藍色~淡青色に染色され、E染色により細胞質・間質・各種線維・赤血球・角化細胞が赤~濃赤色に染色されるが、これに限定されるものではない。ヘマトキシリン類縁体やヘマトキシリンと同様の吸収波長を持つ色素により細胞核・石灰部・軟骨組織・細菌・粘液が青藍色~淡青色に染色され、エオジン類縁体やエオジンと類似の吸収波長を持つ色素により細胞質・間質・各種線維・赤血球・角化細胞が赤~濃赤色に染色されてもよい。

20

【0026】

以上の本実施形態によれば、大径蛍光粒子を用いて免疫染色した後に、小径蛍光粒子を用いて免疫染色するため、大径蛍光粒子の立体障害で染色できなかった部位の染色を行うことができる(図3参照)。かかる場合において、小径蛍光粒子の励起波長と発光波長が600nm以上であるため、輝点の輝度が低くても、エオジンの蛍光による影響を受けず、輝点(抗原)を認識することができる。

したがって、HE染色における視認性を維持したまま、抗原数が多く蛍光粒子の立体障害が問題となってくるような病理切片においても、より多くの抗原を認識可能となり、結果として蛍光免疫染色と形態観察染色とを共に行う場合であっても、蛍光免疫染色による抗原の定量性を向上させることができる。

30

【実施例1】

【0027】

(1) 蛍光粒子/標識体サンプルの作製

蛍光粒子としてPI色素内包ポリメラミン粒子を、標識体としてストレプトアビジンが結合したPI色素内包ポリメラミン粒子を、下記のとおり作製した。

N,N'-Bis(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylene-3,4:9,10-tetracarboxdiimideを濃硫酸で処理し、ペリレンジイミドスルホン酸誘導体を作製した。これを酸クロリドに変換してペリレンジイミドスルホン酸クロリド誘導体とした。

40

ペリレンジイミドスルホン酸クロリド誘導体14.4mgを水22.5mLに加えた後、ホットスターラ上で70~20分間加熱し、メラミン樹脂ニカラックMX-035(日本カーバイド工業社製)0.65g(粒径150nm)を加え、さらに5分間加熱攪拌した。ギ酸100μLを加え、60~20分間で加熱攪拌した後、室温放冷した。冷却後、反応混合物を遠心用チューブに入れて遠心分離機に12,000rpmで20分間かけ、上澄み除去した。この洗浄をエタノールと水で行なった。

得られた粒子0.1mgをEtOH(エタノール)1.5mL中に分散し、アミン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時間反応

50

させて表面アミノ化処理を行なった。

得られた色素内包ナノ粒子を、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2 mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3 nMに調整し、この溶液に最終濃度10 mMとなるようSM（PEG）12（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethylene glycol] ester）を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000 Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2 mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、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が付いた蛍光色素内包樹脂粒子（蛍光粒子）を得た。

一方、ストレプトアビジン（和光純薬社製）をN-succinimidyl S-acetylthioacetate（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ろ過を行い、蛍光色素内包樹脂粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

上記の蛍光色素内包樹脂粒子とストレプトアビジンとを、EDTAを2 mM含有したPBS中で混合し、1時間反応させた。10 mM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PI色素内包ポリメラミン粒子A（標識体）を得た。

このような製造方法において、PI量とポリメラミン量とを一定としてポリメラミン量を増減させ、ストレプトアビジン結合PI色素内包ポリメラミン粒子のサンプルB～Hを作製した（表1参照）。

【0028】

(2) 染色方法

病理切片として、あらかじめELISAで総タンパク量を測定している培養細胞を使用した。抗原はHER2を用いた。

その後、上記病理切片を、サンプルA～Hを用いて免疫染色し、その後形態観察染色（H染色およびHE染色）を実施した。免疫染色と形態観察染色は下記のとおり実施した。

培養細胞を脱パラフィン処理した後、水に置換する洗浄を行った。洗浄した培養細胞スライドを10 mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）中で121、5分間オートクレープ処理することで、抗原の不活性化処理を行った。

不活性化処理後の培養細胞スライドを、PBS緩衝液を用いて洗浄した後、湿潤箱中で1時間1%BSA含有PBS緩衝液を用いてブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、1%BSA含有PBS緩衝液で0.05 nMに希釈した抗HER2ウサギモノクローナル抗体（4B5）（ペンタナ社製）を組織切片と2時間反応させた。これをPBS緩衝液で洗浄後、1%BSA含有PBS緩衝液で2 μg/mLに希釈した4B5に結合するビオチン標識抗ウサギモノクローナル抗体と30分反応させた。この反応後、1%BSA含有PBS緩衝液で0.2 nMに希釈した前述の蛍光色素内包樹脂粒子を組織切片と、中性のpH環境（pH 6.9～7.4）、室温の条件下で3時間反応させた。小径粒子を反応させる際には、上記反応後、培養細胞スライドをPBS緩衝液を用いて洗浄した後、1%BSA含有PBS緩衝液で0.2 nMに希釈した小径粒子を用いて湿潤箱中で反応される。その後、培養細胞スライドを、PBS緩衝液を用いて洗浄した。

免疫染色後、形態観察染色（H染色およびHE染色）を行った。免疫染色した培養細胞スライドをマイヤーヘマトキシリン液で5分間染色してヘマトキシリン染色を行った（H染色）。その後、該切片を45の流水で3分間洗浄した。次に、1%エオジン液で5分間染色してエオジン染色を行った（HE染色）。

H染色後またはHE染色後、純エタノールに5分間漬ける操作4回を行い、洗浄・脱水を行った。続いてキシレンに5分間漬ける操作を4回を行い、透徹を行った。最後に、封入剤（「エンテランニュー」、Merck社製）を用いて組織切片を封入して観察用のサンプルスライドとした。

【0029】

10

20

30

40

50

(3) 輝点数のカウント

H染色後の輝点数とHE染色後の輝点数とを下記のとおりカウントした。

免疫染色および形態観察染色した組織切片に対して所定の励起光を照射して蛍光を発光させた。その状態の組織切片を蛍光顕微鏡（BX-53，オリンパス社製）により観察および撮像を行った。また、輝点計測は、ImageJ FindMaxima法により計測した（露光時間400m秒でNoiseToleranceは60）。上記励起光は、光学フィルターに通すことで、PI色素内包ポリメラミン粒子に対して575～600nmに設定した。また、観察する蛍光の波長（nm）の範囲についても、光学フィルターに通すことで、612～682nmに設定した。顕微鏡観察、画像取得時の励起波長条件は視野中心部付近の照射エネルギーが900W/cm²となるようにした。画像取得時の露光時間は画像の輝度が飽和しないように任意に設定（例えば400m秒に設定）して撮像した。

10

H染色後の輝点数とHE染色後の輝点数とをカウントした結果を表1に示す。

【0030】

【表1】

サンプル	蛍光粒子		H染色時 輝点数 (/細胞150個)	HE染色時 輝点数 (/細胞150個)
	蛍光色素	平均粒径 (nm)		
A	PI	150	3096	3051
B	PI	120	3246	3095
C	PI	100	3487	2963
D	PI	80	3675	2654
E	PI	60	3826	1253
F	PI	20	4123	221
G	PI	10	2685	58
H	PI	5	645	0

20

30

【0031】

(4) まとめ

表1に示すとおり、H染色時の輝点数に着目して、サンプルAからサンプルHにかけて順に確認すると、サンプルFからサンプルGにかけて当該輝点数が著しく減少している。この結果から、小径蛍光粒子を用いた抗原の定量化にあたり、蛍光粒子の平均粒径（下限値）は好ましくは20nm以上であると判断される。

40

他方、H染色時の輝点数とHE染色時の輝点数とに着目して、サンプルAからサンプルHにかけてサンプルごとにこれら輝点数の差を確認すると、サンプルDにおいて輝点数の差が著しく大きくなっている。この結果から、小径蛍光粒子を用いた抗原の定量化にあたり、蛍光粒子の平均粒径（上限値）は好ましくは80nm以下であると判断される。

【実施例2】

【0032】

(1) 蛍光粒子/標識体サンプルの作製

表2～表5に示すとおり、大径蛍光粒子または小径蛍光粒子を含むストレプトアビジン

50

結合蛍光色素内包樹脂粒子のサンプルを作製した。

サンプル 1 - 1、2 - 1、3 - 1、4 - 1では、標識体として市販（インヴィトロジェン社製）のストレプトアビジン結合 Q d o t 6 5 5 を用いた。

サンプル 1 - 2 ~ 1 - 1 1、2 - 2 ~ 2 - 1 1、3 - 2 ~ 3 - 1 1、4 - 2 ~ 4 - 1 1では、[実施例 1]と同様にして標識体を作製した。なお、免疫染色において1番目に使用する標識体として[実施例 1]と同様にPIを使用しサンプル作製し、2番目に使用する標識体としてPIを単にCy5に変更しサンプル作製した（平均粒径はCy5量とポリメラミン量とを一定としてポリメラミン量を増減させ制御した。）。

【0033】

サンプル 1 - 1 2 ~ 1 - 1 4、2 - 1 2 ~ 2 - 1 4、3 - 1 2 ~ 3 - 1 4、4 - 1 2 ~ 4 - 1 4では、下記のとおり、蛍光粒子としてPI色素内包ポリスチレン粒子を、標識体としてストレプトアビジンが結合したPI色素内包ポリスチレン粒子を、それぞれ作製した。

PI色素内包ポリスチレン粒子はソープフリー乳化重合法により作製した。[実施例 1]のPI蛍光色素を4-アミノスチレン（東京化成工業社製）と室温条件で1時間混合し、色素結合スチレンを作製した。アルゴンバブリングした純水中5 mLにグリシジルメタクリレート（東京化成工業社製）0.18 gとスチレン（和光純薬社製）0.05 g、ジビニルベンゼン0.05 g、上記色素結合スチレン0.005 gを加えた。攪拌しながら70 に昇温し、水溶性アゾ重合開始剤であるV-50（和光純薬社性）を0.012 g加え、12時間反応した。反応液を10000 Gで20分遠心分離し、粒子を回収した。回収した粒子を純水に分散し再度遠心分離で回収する事で精製を行なった。得られた粒子を過剰のアンモニア水に加え、粒子末端のエポキシ基をアミノ基へと変換し、末端にアミノ基を持つ色素内包ポリスチレンナノ粒子を得た。

得られた色素内包ナノ粒子を、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2 mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3 mMに調整し、この溶液に最終濃度10 mMとなるようSM（PEG）12（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethylene glycol]ester）を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000 Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2 mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、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が付いた蛍光色素内包樹脂粒子（蛍光粒子）を得た。

一方、ストレプトアビジン（和光純薬社製）をN-succinimidyl S-acetylthioacetate（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ろ過を行い、蛍光色素内包樹脂粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

上記の蛍光色素内包樹脂粒子とストレプトアビジンとを、EDTAを2 mM含有したPBS中で混合し、1時間反応させた。10 mM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PI色素内包ポリスチレン粒子（標識体）を得た。

なお、サンプル 1 - 1 2 ~ 1 - 1 4、2 - 1 2 ~ 2 - 1 4、3 - 1 2 ~ 3 - 1 4、4 - 1 2 ~ 4 - 1 4でも、免疫染色において2番目に使用する標識体としてPIを単にCy5に変更しサンプル作製した（平均粒径はCy5量とポリスチレン量とを一定としてポリスチレン量を増減させ制御した。）。

【0034】

(2) 染色方法と輝点数のカウント

[実施例 1]と同様にして、免疫染色と形態観察染色とを実施し、H染色後の輝点数とHE染色後の輝点数とをカウントした。

なお、免疫染色にあたっては、大径蛍光粒子（PI色素内包樹脂粒子）を反応させた後に、PBSで3回洗浄し、小径蛍光粒子（Cy5色素内包樹脂粒子）を反応させた。輝点数のカウントにあたっては、励起光は、光学フィルターに通すことで、PI、Cy5色素内包樹脂

10

20

30

40

50

粒子それぞれに対して575～600nm、635～650nmに設定し、観察する蛍光の波長(nm)の範囲についても、光学フィルターに通すことで、それぞれ612～682nm、650～700nmに設定した。

H染色後の輝点数とHE染色後の輝点数とをカウントした結果を表2～表5に示す。

【0035】

表2はELISA測定による総HER2タンパク量が36.1μg/mlの結果を、表3はELISA測定による総HER2タンパク量が78.0μg/mlの結果を、表4はELISA測定による総HER2タンパク量が150.8μg/mlの結果を、表5はELISA測定による総HER2タンパク量が701.8μg/mlの結果を、それぞれ示す。

【0036】

【表2】

サンプル	樹脂	1番目に染色する粒子		2番目に染色する粒子		H染色時 合計 輝点数 (/細胞 150個)	HE染色時		
		蛍光 色素	平均 粒径 (nm)	蛍光 色素	平均 粒径 (nm)		1番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	2番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	合計 輝点数 (/細胞 150個)
1-1	—	Qdot 655	20	—	—	2240	82	—	—
1-2	ホリ メラミン	PI	80	Cy5	150	1842	1054	3	1057
1-3	ホリ メラミン	PI	120	Cy5	80	1620	1605	39	1644
1-4					60	1615	1600	51	1651
1-5					20	1610	1594	74	1668
1-6	ホリ メラミン	PI	150	Cy5	80	1441	1406	64	1470
1-7					60	1490	1452	91	1543
1-8					20	1418	1398	109	1507
1-9	ホリ メラミン	PI	200	Cy5	80	1220	1212	152	1364
1-10					60	1226	1225	176	1401
1-11					20	1223	1220	205	1425
1-12	ホリ スチレン	PI	150	Cy5	80	1392	1389	60	1449
1-13					60	1388	1384	88	1472
1-14					20	1394	1395	106	1501

【0037】

10

20

30

40

【表3】

サンプル	樹脂	1番目に染色する粒子		2番目に染色する粒子		H染色時 合計 輝点数 (/細胞 150個)	HE染色時		
		蛍光 色素	平均 粒径 (nm)	蛍光 色素	平均 粒径 (nm)		1番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	2番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	合計 輝点数 (/細胞 150個)
2-1	—	Qdot 655	20	—	—	4250	324	—	—
2-2	ポリ メタリン	PI	80	Cy5	150	3670	2650	15	2665
2-3	ポリ メタリン	PI	120	Cy5	80	3250	3245	142	3387
2-4					60	3246	3241	280	3521
2-5					20	3240	3231	394	3625
2-6	ポリ メタリン	PI	150	Cy5	80	3092	3054	345	3399
2-7					60	3061	3026	450	3476
2-8					20	3014	2996	624	3620
2-9	ポリ メタリン	PI	200	Cy5	80	2540	2533	641	3174
2-10					60	2561	2559	810	3369
2-11					20	2554	2548	912	3460
2-12	ポリ スチレン	PI	150	Cy5	80	3230	3218	320	3538
2-13					60	3224	3209	426	3635
2-14					20	3226	3210	601	3811

10

20

30

【0038】

【表4】

サンプル	樹脂	1番目に染色する粒子		2番目に染色する粒子		H染色時 合計 輝点数 (/細胞 150個)	HE染色時		
		蛍光 色素	平均 粒径 (nm)	蛍光 色素	平均 粒径 (nm)		1番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	2番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	合計 輝点数 (/細胞 150個)
3-1	—	Qdot 655	20	—	—	7852	832	—	—
3-2	ホリ メラミン	PI	80	Cy5	150	6954	5510	34	5544
3-3	ホリ メラミン	PI	120	Cy5	80	6155	5908	394	6302
3-4					60	6140	5915	597	6512
3-5					20	6151	5900	741	6641
3-6	ホリ メラミン	PI	150	Cy5	80	6083	6081	704	6785
3-7					60	6122	6087	896	6983
3-8					20	6014	5998	1189	7187
3-9	ホリ メラミン	PI	200	Cy5	80	5540	5534	954	6488
3-10					60	5521	5510	1243	6753
3-11					20	5497	5496	1520	7016
3-12	ホリ スチレン	PI	150	Cy5	80	6050	6032	681	6713
3-13					60	6032	6008	821	6829
3-14					20	6041	6022	1056	7078

10

20

30

【 0 0 3 9 】

【表5】

サンプル	樹脂	1番目に染色する粒子		2番目に染色する粒子		H染色時 合計 輝点数 (/細胞 150個)	HE染色時		
		蛍光 色素	平均 粒径 (nm)	蛍光 色素	平均 粒径 (nm)		1番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	2番粒子 輝点数 (/細胞 150個)	合計 輝点数 (/細胞 150個)
4-1	—	Qdot 655	20	—	—	12593	1823	—	—
4-2	メラミン	PI	80	Cy5	150	7594	5934	56	5990
4-3	メラミン	PI	120	Cy5	80	6878	6745	1823	8568
4-4					60	6865	6729	2075	8804
4-5					20	6881	6772	2341	9113
4-6	メラミン	PI	150	Cy5	80	6551	6509	2291	8800
4-7					60	6498	6488	2949	9437
4-8					20	6523	6502	3654	10156
4-9	メラミン	PI	200	Cy5	80	5895	5894	2843	8737
4-10					60	5904	5898	3253	9151
4-11					20	5899	5894	4056	9950
4-12	ホリスチレン	PI	150	Cy5	80	6432	6420	2094	8514
4-13					60	6420	6409	2678	9087
4-14					20	6437	6430	3485	9915

【0040】

表2～表5、図4に示すとおり、サンプル1-1、2-1、3-1、4-1では、小径の標識剤(Qdot655)のみで免疫染色しており、H染色時の輝点数は抗原の定量化にあたりより正確な値であると考えられるが、輝点そのものの輝度が低いため、HE染色時にはエオジンの蛍光の影響を受け輝点数が激減している。

なお、表2～表5では、サンプル1-1、2-1、3-1、4-1におけるH染色時の輝点数が、抗原の定量化にあたりより正確な値であって理想的な値をとり、合計輝点数がこの値に近いほど、抗原の定量化が向上していると判断することができる。

サンプル1-2、2-2、3-2、4-2では、先に小径蛍光粒子で免疫染色しその後に大径蛍光粒子で免疫染色しており、HE染色時において小径蛍光粒子による輝点数が少なく、抗原の定量化が向上しているとはいえない。

【0041】

これに対し、サンプル1-3～1-11、2-3～2-11、3-3～3-11、4-3～4-11では、先に大径蛍光粒子で免疫染色しその後に小径蛍光粒子で免疫染色しており、HE染色時において小径蛍光粒子による輝点数が多く、抗原の定量化が向上しているといえる。

このような結果から、蛍光染色と形態観察染色とを共に行う場合、蛍光染色による抗原の定量性を向上させるには、先に大径蛍光粒子で免疫染色しその後に小径蛍光粒子で免疫染色することが有用であることがわかる。

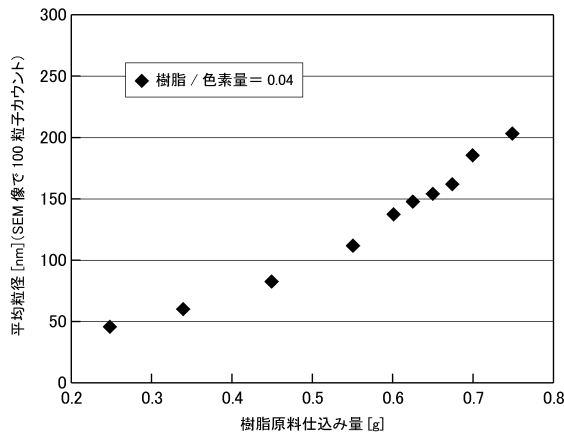
さらに、サンプル 1 - 6 ~ 1 - 8、2 - 6 ~ 2 - 8、3 - 6 ~ 3 - 8、4 - 6 ~ 4 - 8 と、サンプル 1 - 12 ~ 1 - 14、2 - 12 ~ 2 - 14、3 - 12 ~ 3 - 14、4 - 12 ~ 4 - 14 との比較から、前者のサンプル群のほうがHE染色時における小径蛍光粒子による輝点数が多く、蛍光粒子の内包用の樹脂としては、ポリスチレンよりもポリメラミンのほうが好適であることがわかる。

【符号の説明】

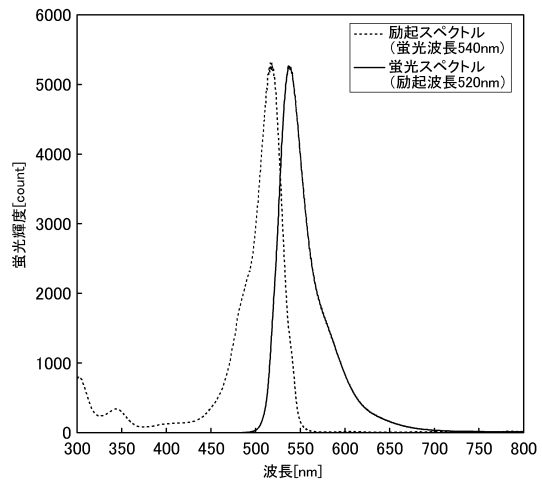
【 0 0 4 2 】

- 1 0 標識体
- 1 2 蛍光粒子
- 1 4 ビオチン
- 2 0 抗原
- 3 0 1次抗体
- 4 0 2次抗体
- 4 2 アビジン

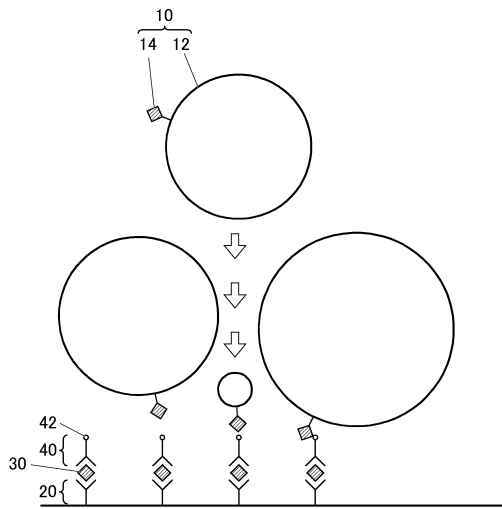
【 図 1 】



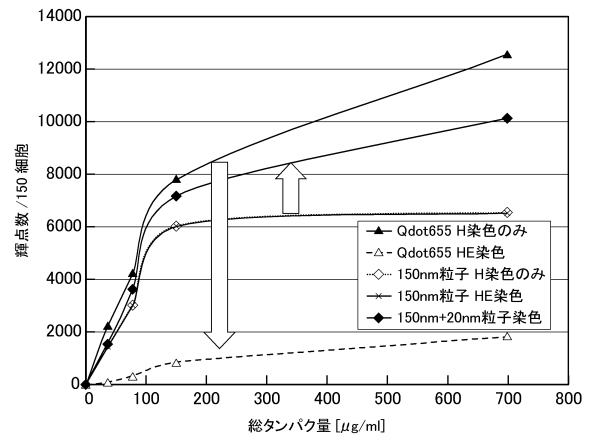
【 図 2 】



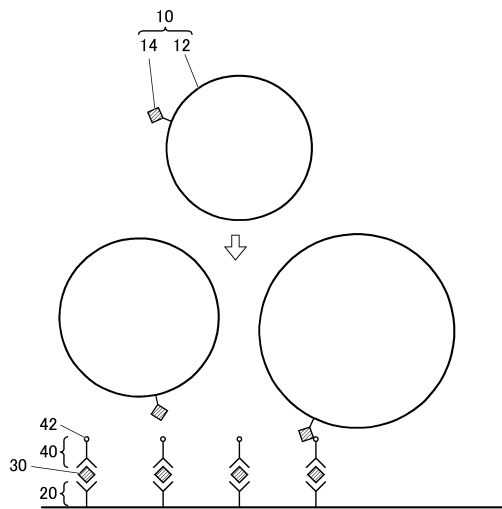
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

- (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 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第2013/035688(WO, A1)
特開2005-077301(JP, A)
国際公開第2012/029342(WO, A1)
特開平10-123137(JP, A)
特開2010-112748(JP, A)
特開平04-106470(JP, A)
米国特許第7141431(US, B2)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	染色方法		
公开(公告)号	JP6237194B2	公开(公告)日	2017-11-29
申请号	JP2013260732	申请日	2013-12-18
[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 国立大学法人东北大学		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	高橋優 中野寧 岡田文徳 権田幸祐 大内憲明 渡邊みか		
发明人	高橋 優 中野 寧 岡田 文徳 権田 幸祐 大内 憲明 渡邊 みか		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/536		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/536.D		
F-TERM分类号	2G045/BA14 2G045/BB24 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB12		
其他公开文献	JP2015117980A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：即使进行荧光免疫染色和形态学观察染色，也要通过荧光免疫染色来提高抗原的定量性。摘要：公开了一种使用在树脂中含有荧光染料的荧光颗粒12染色病理切片的方法，其中使用两种或多种具有不同平均粒径的荧光颗粒12作为标记剂。在这种染色方法中，优选使用具有大平均粒径的第一荧光颗粒免疫染色病理切片的步骤和通过平均粒径小于第一荧光颗粒的第二荧光免疫染色病理切片的步骤并使用颗粒进行免疫染色。点域

(19) 日本国特許庁(JP) (12) 特許公報(B2) (11) 特許番号
特許第6237194号
(P6237194)

(45) 発行日 平成29年11月29日(2017.11.29) (24) 登録日 平成29年11月10日(2017.11.10)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/48 (2006.01) GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 33/536 (2006.01) GO 1 N 33/536 D

請求項の数 6 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2013-260732(P2013-260732)	(73) 特許権者	000001270 コニカミノルタ株式会社
(22) 出願日	平成25年12月18日(2013.12.18)		
(65) 公開番号	特開2015-117980(P2015-117980A)	(74) 代理人	東京部千代田区丸の内二丁目7番2号 110001254 特許業務法人光陽国際特許事務所
(43) 公開日	平成27年6月25日(2015.6.25)	(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
審査請求日	平成28年9月26日(2016.9.26)	(72) 発明者	中野 寧 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	岡田 文徳 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】 染色方法