

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02013/147081

発行日 平成27年12月14日 (2015.12.14)

(43) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013.10.3)

(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 G O 4 5
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533	2 G O 5 2
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	R
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 1/28	U

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

出願番号	特願2014-508057 (P2014-508057)	(71) 出願人	000001270
(21) 国際出願番号	PCT/JP2013/059374		コニカミノルタ株式会社
(22) 国際出願日	平成25年3月28日 (2013.3.28)		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(31) 優先権主張番号	特願2012-80781 (P2012-80781)	(71) 出願人	504157024
(32) 優先日	平成24年3月30日 (2012.3.30)		国立大学法人東北大学
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号
		(74) 代理人	110001070
			特許業務法人 S S I N P A T
		(72) 発明者	高梨 健作
			東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コ
			ニカミノルタ株式会社内
		(72) 発明者	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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体物質検出方法

(57) 【要約】

蛍光免疫染色標本において、油系封入剤を使用しても、蛍光染色性が低下しない染色方法を提供する。さらには、当該染色方法によって得られる蛍光免疫染色標本において、励起光の照射による蛍光標識体の劣化を防止し、耐光性能を向上させる方法を提供する。

本発明の生体物質検出方法は、病理切片から生体物質を特異的に検出する生体物質検出方法であって、蛍光標識体を用いた免疫染色工程と、切片の固定処理工程と、水と自由混和しない有機溶媒を含む封入剤を用いて切片を封入する封入処理工程とを有する生体物質検出方法である。さらには、前記封入剤が退色防止剤を含む生体物質検出方法である。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

病理切片から生体物質を特異的に検出する生体物質検出方法であって、蛍光標識体を用いた免疫染色工程と、切片の固定処理工程と、水と自由混和しない有機溶媒を含む封入剤を用いて切片を封入する封入処理工程とを有する生体物質検出方法。

【請求項 2】

前記蛍光標識体が、蛍光色素内包ナノ粒子および蛍光ナノ粒子内包粒子からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を含む、請求項 1 に記載の生体物質検出方法。

【請求項 3】

前記水と自由混和しない有機溶媒が、芳香族炭化水素、不飽和炭化水素、ケトン、エステル、エーテルおよびアルコールからなる群より選ばれる少なくとも 1 種を含む、請求項 1 または 2 に記載の生体物質検出方法。

10

【請求項 4】

前記水と自由混和しない有機溶媒が、キシレン、トルエンおよびリモネンからなる群より選ばれる少なくとも 1 種を含む、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の生体物質検出方法。

【請求項 5】

前記封入剤が退色防止剤を含む、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の生体物質検出方法。

【請求項 6】

前記退色防止剤が、吸収波長 450 ～ 600 nm の波長域で吸光をしない、請求項 5 に記載の生体物質検出方法。

20

【請求項 7】

前記退色防止剤を含む封入剤を用いて作製した切片スライドが透明である、請求項 5 または 6 に記載の生体物質検出方法。

【請求項 8】

前記退色防止剤が、フェノール、アミン、チオール、スルフィド、ジスルフィドおよび不飽和炭化水素からなる群より選ばれる少なくとも 1 種を含む、請求項 5 ～ 7 のいずれか一項に記載の生体物質検出方法。

【請求項 9】

前記退色防止剤が、フェノールおよびアミンからなる群より選ばれる少なくとも 1 種を含む、請求項 5 ～ 8 のいずれか一項に記載の生体物質検出方法。

30

【請求項 10】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の生体物質検出方法に用いるキットであって、水と自由混和しない有機溶媒を含む封入剤と、前記生体物質検出方法を記載した使用説明書とを有する生体物質検出用キット。

【請求項 11】

請求項 5 ～ 9 のいずれか一項に記載の生体物質検出方法に用いるキットであって、水と自由混和しない有機溶媒および退色防止剤を含む封入剤と、前記生体物質検出方法を記載した使用説明書とを有する生体物質検出用キット。

40

【請求項 12】

さらに、免疫染色用の蛍光標識体および蛍光標識化試薬を含む、請求項 10 または 11 に記載の生体物質検出用キット。

【請求項 13】

請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の生体物質検出方法に用いる病理切片であって、生体物質を特異的に検出するための蛍光標識体を用いた免疫染色処理、固定処理、および水と自由混和しない有機溶媒を含む封入剤を用いた封入処理がなされた病理切片。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は生体物質検出方法に関し、特に蛍光標識体を用いて染色される組織染色に関する。

【背景技術】

【0002】

医学的診断の1つとして、病理診断が行なわれている。病理医は人体から採取した組織片から病気を診断し、治療や手術の要不要を臨床医に伝える。患者の状態と病理診断によって、内科系医師は薬物治療方針を、外科系医師は手術を行うか否かを決定する。

【0003】

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。

【0004】

病理診断では、免疫染色と呼ばれる、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が行なわれている。免疫染色には、例えば、酵素を用いた色素染色法（DAB染色等）が用いられる。DAB染色は、ジアミノベンジジン（DAB）を基質として発色させることのできるペルオキシダーゼで修飾された抗体を用いて、観察対象となる抗原を当該発色により染色して観察することで抗原量を測るものである。あるいは蛍光標識法が用いられることもある。蛍光標識法は、蛍光色素が修飾された抗体を用いて対象となる抗原を染色して観察することで抗原量を測るものである。

【0005】

また、標本は光を殆ど吸収および散乱せず無色透明に近い状態、観察に先立って、形態観察のために、色素による染色を施されることがある。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ている（非特許文献1、特許文献1～2）。ヘマトキシリン染色により細胞核・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。なお、この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。一つの切片に対して形態染色と免疫染色の両方を行なうことにより、標本の形態観察と免疫観察を同時に行うこともできる。

【0006】

現在、免疫観察には多くの場合、DAB染色が多く用いられている（特許文献3）。しかしながら、DAB染色のような酵素標識による染色は、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等の量を見積もることが難しいという課題がある。そのため、病理診断における免疫観察では、酵素標識による染色の代わりに、蛍光標識体を用いる蛍光標識法も行なわれている。この方法はDAB染色と比べて定量性に優れるという特徴がある（非特許文献1）。

【0007】

蛍光標識体を用いた観察は共焦点レーザー顕微鏡や落射型蛍光顕微鏡により行なわれる。このような顕微鏡では高強度の励起光があたることになる。例えば、太陽電池の規格JISC 8914で見られるような通常の太陽光曝露試験条件である $1000\text{W}/\text{m}^2$ に対し、典型的な落射型蛍光顕微鏡では100倍の照射光強度の光となる。

【0008】

励起光によって蛍光標識がダメージを受けて発光なくなると、シグナルの低下を引き

10

20

30

40

50

起こす。このため、蛍光標識体を用いた観察においては耐光性能が重要となる。

蛍光標識体としては、蛍光色素や無機ナノ粒子（半導体ナノ粒子、量子ドット等と称されることもある）、それらの集積体の利用が知られている（非特許文献2～3、特許文献4）。蛍光色素や無機ナノ粒子と、それらの集積体では、集積体の方が耐光性能が向上することが報告されている（特許文献5）。従って、耐光性の観点から集積体の方がより好ましいが、蛍光顕微鏡観察において要求される耐光性能には、集積化だけでは十分ではない。なお、色素1個と集積体1個では1個あたりの輝度が集積体の方が高くなるので、シグナルの観点から、集積体の方がより好ましい。

【0009】

標本作製において、染色後の病理切片を封入するための封入剤としては、水系封入剤および油系封入剤が知られている。水系封入剤は標本との屈折率差が大きいために標本を透明としにくい、永久標本としにくい、という課題がある。一方、油系封入剤は標本との屈折率差が小さく標本を透明とできる、形態染色の色味や発色が良い、永久標本用として標準的に用いられている、という特徴がある。このため、油系封入剤の方が標本作製に好適に用いられる。

【0010】

したがって、免疫染色の標本の封入剤としても、永久標本作製でき、また、形態染色との二重染色をする場合には、形態染色の色味や発色が良い油系封入剤を用いる方がより好ましいと考えられる。

【0011】

しかしながら、蛍光染色をおこなった標本を油系封入剤で封入すると、蛍光色素が封入剤中に溶出し、染色性が失われるという問題がある。そのため、蛍光標識体を用いずに染色する場合は油性封入剤を使用できるのに対し、蛍光標識体を用いて染色する場合は、上記問題点を有する水性封入剤を使用せざるを得ないという実情があった。

【0012】

加えて、蛍光標識体の観察には共焦点レーザー顕微鏡や蛍光顕微鏡が用いられる。これらの顕微鏡では、蛍光観察の際に高強度の励起光が染色した切片へとあたることになる。この励起光により、蛍光色素等を用いた蛍光標識体は徐々に劣化し、蛍光観察時や免疫染色結果の判定において大きな影響を及ぼす。蛍光標識体は劣化が無いことが理想的であり、耐光性能を向上させる必要がある。

【0013】

蛍光標識体の耐光性能を向上させるには、封入剤に退色防止剤を混合する方法が考えられる。水系封入剤においては、例えば、蛍光色素として4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を用いる場合、例えば、1,4-ジアザビスクロ[2.2.2]オクタン(DABCO)やプロロングゴールド(登録商標、Molecular probes社製)等の退色防止剤を用いる事でDAPIの耐光性能の改善を図ることが行なわれている。しかしながら、蛍光標識の劣化の緩和はされるが、完全に抑制することはできないため、短時間に観察を行なう必要がある。

【0014】

しかし、油系封入剤を蛍光色素染色に用いることには、上述の問題点があるため、これまで、油系封入剤は蛍光色素染色に用いられてこなかった。そのため、油系封入剤に退色防止剤を混合し、蛍光染色において使用するという動機づけが生じることがなく、そのような試みはなされてこなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0015】

【特許文献1】特表2001-525580号公報

【特許文献2】特開2009-115599号公報

【特許文献3】特開2010-134195号公報

【特許文献4】特開2010-209314号公報

10

20

30

40

50

【特許文献 5】特開 2 0 0 8 - 1 4 7 3 9 4 号公報

【非特許文献】

【 0 0 1 6 】

【非特許文献 1】「診断に役立つ免疫組織化学」、文光堂、2007年

【非特許文献 2】「機能性色素の合成と応用技術」、シーエムシー出版、2007年

【非特許文献 3】「量子ドットの生命科学領域への応用」、シーエムシー出版、2007年

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 7 】

本発明の課題は、蛍光免疫染色標本において、油系封入剤を使用しても、蛍光染色性が低下しない染色方法を提供することである。さらには、当該染色方法によって得られる蛍光免疫染色標本において、励起光の照射による蛍光標識体の劣化を防止し、耐光性能を向上させる方法を提供することである。また、これらの方法の使用に用いられるキットを提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 8 】

本発明者らは、鋭意検討の結果、蛍光標識体を用いた染色において、蛍光標識体を結合させた後に固定処理を行うことで、油系封入剤による封入を行っても、蛍光染色性が低下しないことを見出した。さらに、その際に用いる油系封入剤に、退色防止剤を含有させることで、蛍光標識の耐光性能を大幅に向上させることができることを見出し、本発明を完成するに至った。本発明の一側面では、上記の課題のうち少なくとも一つを実現するために、本発明は以下の事項を含む。

20

【 0 0 1 9 】

[1] 病理切片から生体物質を特異的に検出する生体物質検出方法であって、蛍光標識体を用いた免疫染色工程と、切片の固定処理工程と、水と自由混和しない有機溶媒を含む封入剤を用いて切片を封入する封入処理工程とを有する生体物質検出方法。

[2] 前記封入剤が退色防止剤を含む、項[1]に記載の生体物質検出方法。

[3] 項[1]に記載の生体物質検出方法に用いるキットであって、水と自由混和しない有機溶媒を含む封入剤と、前記生体物質検出方法を記載した使用説明書とを有する生体物質検出用キット。

30

[4] 項[2]に記載の生体物質検出方法に用いるキットであって、水と自由混和しない有機溶媒および退色防止剤を含む封入剤と、前記生体物質検出方法を記載した使用説明書とを有する生体物質検出用キット。

[5] 項[1]に記載の生体物質検出方法に用いる病理切片であって、生体物質を特異的に検出するための蛍光標識体を用いた免疫染色処理、固定処理、および水と自由混和しない有機溶媒を含む封入剤を用いた封入処理がなされた病理切片。

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

項[1]の生体物質検出方法によれば、蛍光標識体を用いた免疫染色において蛍光染色性が低下しない標本を作製することができ、かつ、永久標本を作製することができる。また、形態染色との二重染色をする場合には、形態染色の色味や発色が良い標本を作製することができる。

40

【 0 0 2 1 】

項[2]の生体物質検出方法によれば、上記効果に加え、さらに、蛍光標識の耐光性能を向上させた標本を作製することができる。

項[3]の生体物質検出用キットを用いれば、項[1]の方法で作製できる標本を得ることができる。

【 0 0 2 2 】

50

項〔４〕の生体物質検出用キットを用いれば、項〔２〕の方法で作製できる標本を得ることができる。

【００２３】

項〔５〕の切片は、項〔１〕の方法によって得られる、蛍光染色性が低下しない標本、かつ、永久標本であり、形態染色との二重染色をした場合には、形態染色の色味や発色が良い、蛍光標識体を用いた免疫染色標本である病理切片である。

【発明を実施するための形態】

【００２４】

以下、本発明を実施するための形態について説明するが、本発明はこれらに限定されない。

10

本発明の典型的な実施形態にかかる生体物質検出方法は、病理切片から生体物質を特異的に検出する方法であり、基本的には、（１）蛍光標識体を用いて病理切片を免疫染色する工程と、（２）染色後の病理切片に励起光を照射して蛍光発光させ、その病理切片から生体物質を検出する工程と、を有している。本発明では、（１）の工程において、切片の固定処理工程および封入工程を含む。

【００２５】

（１）の工程は、一般的な生体物質検出方法と同様に、脱パラフィン工程、賦活化処理工程などの工程を有していてもよい。

さらに、（１）の工程の前後どちらかに、形態観察用の染色剤を用いて病理切片を形態観察染色する工程を含んでもいてもよい。こうすることで、蛍光標識体を用いた免疫染色と形態観察用の染色剤を用いた形態観察染色の同時染色を行なうことも可能とできる。

20

【００２６】

本発明では特に、（１）の病理切片を免疫染色する工程において、蛍光標識体として、（Ａ）蛍光色素、（Ｂ）蛍光ナノ粒子、（Ｃ）蛍光色素内包ナノ粒子、（Ｄ）蛍光ナノ粒子内包粒子、を用いることができる。蛍光標識体の輝度が高い方が、ノイズであるエオジンの蛍光や細胞自家蛍光に対する信号値の比の観点から好ましい。従って、本発明の蛍光標識体としては、（Ａ）蛍光色素と比して輝度が高い、（Ｂ）蛍光ナノ粒子、（Ｃ）蛍光色素内包ナノ粒子、および、（Ｄ）蛍光ナノ粒子内包粒子がより好適に用いられる。また、耐光性能がより高いという観点から、集積体である（Ｃ）蛍光色素内包ナノ粒子および（Ｄ）蛍光ナノ粒子内包粒子が特に好適に用いられる。

30

免疫染色用の蛍光標識体、免疫染色工程、形態観察用の染色剤、形態観察染色工程の詳細は次のとおりである。

【００２７】

〔免疫染色用の蛍光標識体〕

本発明における免疫染色用の蛍光標識体は、免疫染色に用いる事ができるものであれば既存の如何なるものでも構わない。（Ａ）蛍光色素、（Ｂ）蛍光ナノ粒子、（Ｃ）蛍光色素内包ナノ粒子、（Ｄ）蛍光ナノ粒子内包粒子、のいずれであっても良い。

【００２８】

〔（Ａ）蛍光色素〕

本発明で用いる蛍光色素は既存の如何なるものを用いても構わない。公知の方法により入手または作製することができる。

40

【００２９】

内包される蛍光色素は、例えば、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、等の中から選択することができる。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、ATTOT（登録商標、ATTOT-TEC社製）系色素分子、MFP（登録

50

商標、M o b i t e c 社製)系色素分子等の中から選択することができる。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。

【0030】

ローダミン系色素分子の具体例としては、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 6 G、テトラメチルローダミン、X - ローダミン、テキサスレッド、S p e c t r u m R e d、L D 7 0 0 P E R C H L O R A T E、などが挙げられる。

【0031】

スクアリリウム系色素分子の具体例としては、S R f l u o r 6 8 0 - C a r b o x y l a t e、1 , 3 - B i s [4 - (d i m e t h y l a m i n o) - 2 - h y d r o x y p h e n y l] - 2 , 4 - d i h y d r o x y c y c l o b u t e n e d i y l i u m d i h y d r o x i d e , b i s、1 , 3 - B i s [4 - (d i m e t h y l a m i n o) p h e n y l] - 2 , 4 - d i h y d r o x y c y c l o b u t e n e d i y l i u m d i h y d r o x i d e , b i s、2 - (4 - (D i e t h y l a m i n o) - 2 - h y d r o x y p h e n y l) - 4 - (4 - (d i e t h y l i m i n i o) - 2 - h y d r o x y c y c l o h e x a - 2 , 5 - d i e n y l i d e n e) - 3 - o x o c y c l o b u t - 1 - e n o l a t e、2 - (4 - (D i b u t y l a m i n o) - 2 - h y d r o x y p h e n y l) - 4 - (4 - (d i b u t y l i m i n i o) - 2 - h y d r o x y c y c l o h e x a - 2 , 5 - d i e n y l i d e n e) - 3 - o x o c y c l o b u t - 1 - e n o l a t e、2 - (8 - H y d r o x y - 1 , 1 , 7 , 7 - t e t r a m e t h y l - 1 , 2 , 3 , 5 , 6 , 7 - h e x a h y d r o p y r i d o [3 , 2 , 1 - i j] q u i n o l i n - 9 - y l) - 4 - (8 - h y d r o x y - 1 , 1 , 7 , 7 - t e t r a m e t h y l - 2 , 3 , 6 , 7 - t e t r a h y d r o - 1 H - p y r i d o [3 , 2 , 1 - i j] q u i n o l i n i u m - 9 (5 H) - y l i d e n e) - 3 - o x o c y c l o b u t - 1 - e n o l a t e、などが挙げられる。

【0032】

シアニン系色素分子の具体例としては、1 - B u t y l - 2 - [5 - (1 - b u t y l - 1 , 3 - d i h y d r o - 3 , 3 - d i m e t h y l - 2 H - i n d o l - 2 - y l i d e n e) - p e n t a - 1 , 3 - d i e n y l] - 3 , 3 - d i m e t h y l - 3 e i t i - i n d o l i u m h e x a f l u o r o p h o s p h a t e、1 - B u t y l - 2 - [5 - (1 - b u t y l - 3 , 3 - d i m e t h y l - 1 , 3 - d i h y d r o - i n d o l - 2 - y l i d e n e) - 3 - c h l o r o - p e n t a - 1 , 3 - d i e n y l] - 3 , 3 - d i m e t h y l - 3 H - i n d o l i u m h e x a f l u o r o p h o s p h a t e、3 - E t h y l - 2 - [5 - (3 - e t h y l - 3 H - b e n z o t h i a z o l - 2 - y l i d e n e) - p e n t a - 1 , 3 - d i e n y l] - b e n z o t h i a z o l - 3 - i u m i o d i d e、などが挙げられる。

【0033】

芳香環系色素分子の具体例としては、N , N - B i s - (2 , 6 - d i i s o p r o p y l p h e n y l) - 1 , 6 , 7 , 1 2 - (4 - t e r t - b u t y l p h e n o x y) - p e r y l e n - 3 , 4 , 9 , 1 0 - t e t r a c a r b o n a c i d d i i m i d e、N , N ' - B i s (2 , 6 - d i i s o p r o p y l p h e n y l) - 1 , 6 , 7 , 1 2 - t e t r a p h e n o x y p e r y l e n e - 3 , 4 : 9 , 1 0 - t e t r a c a r b o x d i i m i d e、N , N ' - B i s (2 , 6 - d i i s o p r o p y l p h e n y l) p e r y l e n e - 3 , 4 , 9 , 1 0 - b i s (d i c a r b i m i d e)、1 6 , N , N ' - B i s (2 , 6 - d i m e t h y l p h e n y l) p e r y l e n e - 3 , 4 , 9 , 1 0 - t e t r a c a r b o x y l i c d i i m i d e、4 , 4 ' - [(8 , 1 6 - D i h y d r o - 8 , 1 6 - d i o x o d i b e n z o [a , j] p e r y l e n e - 2 , 1 0 - d i y l) d i o x y] d i b u t y r i c a c i d、2 , 1 0 - D i h y d r o x y -

10

20

30

40

50

dibenzo[a,j]perylene-8,16-dione、2,10-Bis(3-aminopropoxy)dibenzo[a,j]perylene-8,16-dione、3,3'-[(8,16-Dihydro-8,16-dioxodibenzo[a,j]perylene-2,10-diyl)dioxy]dipropylamine、17-BIS(Octyloxy)Anthra[9,1,2-cde-]Benzo[RST]Pentaphene-5-10-Dione、Octadecanoic acid、5,10-dihydro-5,10-dioxoanthra[9,1,2-cde]benzo[rst]pentaphene-16,17-diylester、Dihydroxydibenzanthrone、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-, Benzeneethanaminium、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-]、などが挙げられる。

【0034】

オキサジン系色素分子の具体例としては、Cresyl violet、Oxazine 170、EVOblue 30、Nile Blueなどが挙げられる。

カルボピロニン系色素分子の具体例としては、CARBOPYRONIN 149などが挙げられる。

【0035】

ピロメセン系色素分子の具体例としては、PYRROMETHENE 650などが挙げられる。

Alexa Fluor系色素分子の具体例としては、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など(以上インビトロジェン社製)が挙げられる。

【0036】

BODIPY系色素分子の具体例としては、BODIPY FL、BODIPY TM R、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)などが挙げられる。

【0037】

Cy系色素分子の具体例としては、Cy 3.5、Cy 5、Cy 5.5(以上GEヘルスケア社製)などが挙げられる。

DY系色素分子の具体例としては、DY-590、DY-610、DY-615、DY-630、DY-631、DY-632、DY-633、DY-634(以上DYOMICS社製)、などが挙げられる。

【0038】

HiLyte系色素分子の具体例としては、HiLyte 594、HiLyte Fluor TR(以上アナスペック社製)などが挙げられる。

DyLight系色素分子の具体例としては、DyLight 594、DyLight 633(以上サーモサイエンティフィック社製)などが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

A T T O系色素分子の具体例としては、A T T O 5 9 0、A T T O 6 1 0、A T T O 6 2 0、A T T O 6 3 3、A T T O 6 5 5 など（以上A T T O - T E C社製）が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

M F P系色素分子の具体例としては、M F P 5 9 0、M F P 6 3 1（以上M o b i t e c社製）などが挙げられる。

その他色素としては、C - P h y c o c y a n i n、P h y c o c y a n i n、A P C（A l l o p h y c o c y a n i n）、A P C - X L、N o r t h e r n L i g h t s 6 3 7（R & D S y s t e m s社製）、等が挙げられる。

10

また、これらの誘導体（蛍光色素として機能しうるもの、例えば、公知の誘導体）を挙げることができる。

【 0 0 4 1 】

〔（B）蛍光ナノ粒子〕

本発明で用いられる蛍光ナノ粒子とは、粒子サイズが1～500nmのものであり、好ましくは10～200nmである。

【 0 0 4 2 】

蛍光ナノ粒子は半導体または蛍光体から構成される。

半導体は例えばI I - V I族半導体であるZ n S e、Z n T e、C d S e、C d T e、P b S、P b S e、P b T e等やI I - V I族半導体であるA l A s、A l S b、G a P、G a A s、G a S b、I n P、I n A s、I n S b等を用いることができ、毒性の観点から、G a PやI n Pを好適に用いることができる。

20

【 0 0 4 3 】

蛍光体は、例えば母体にY₂O₃やY V O₄、Z n O、Z n S等を用い、発光中心にE uやN d等を用いることができる。

蛍光ナノ粒子の粒子サイズ、母体組成、不純物量を調整することで観察に適した励起波長とする。

【 0 0 4 4 】

〔（C）蛍光色素内包ナノ粒子〕

ノイズであるエオジンの蛍光や細胞自家蛍光に対する信号値の比の観点から、蛍光標識体の輝度は高い方が好ましい。従って、本発明における蛍光標識体としては、蛍光色素と比して輝度が高い、蛍光色素内包ナノ粒子がより好適に用いられる。

30

【 0 0 4 5 】

蛍光色素内包ナノ粒子とは、有機物または無機物でできた粒子（母体）中に複数の蛍光色素が内包された構造を有するナノサイズの粒子である。本発明で用いる蛍光色素内包ナノ粒子は、適切な蛍光色素および粒子を形成する有機物または無機物を原料として選択した上で、公知の方法により作製することができる。

【 0 0 4 6 】

粒子を形成する有機物または無機物としては、例えば、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、多糖、シリカ等、安定的に蛍光色素を内包できるものが挙げられる。蛍光色素をこのような粒子中に内包させることにより、蛍光色素単独よりも励起光の照射による劣化の起こりにくい（耐光性が強い）。

40

【 0 0 4 7 】

内包される蛍光色素は、前記（A）蛍光色素の項目で挙げた蛍光色素を用いることができる。また、それらの誘導体（蛍光色素として機能しうるもの、例えば、公知の誘導体）を挙げることができる。

【 0 0 4 8 】

以上のような蛍光色素は、蛍光色素内包ナノ粒子中に、いずれか一種を単独で内包させ

50

るようにしても、複数種を混合して内包させるようにしてもよい。

たとえば、芳香環系色素分子、ローダミン系色素分子などの蛍光色素は比較的耐光性が高いため好ましく、なかでも芳香環系色素分子に属するペリレン (p e r y l e n e)、特にペリレンジイミド (p e r y l e n e d i i m i d e) が好ましい。一方、比較的耐光性の低い蛍光色素であっても、適切な母体を選択することにより、本発明による所定の輝度保持率の条件を満たす蛍光色素内包ナノ粒子を作製できる可能性がある。

【 0 0 4 9 】

蛍光色素内包ナノ粒子の製造方法は特に限定されるものではない。粒子原料であるモノマーに色素分子を結合させて粒子を合成する方法、粒子に色素を吸着させて導入する方法等、粒子への色素の導入にはいかなる方法を用いても構わない。

10

【 0 0 5 0 】

蛍光色素内包ナノ粒子の平均粒径は特に限定されないが、通常 1 0 ~ 5 0 0 n m であり、好ましくは 5 0 ~ 2 0 0 n m である。また、粒径のばらつきを示す変動係数も特に限定されないが、通常は 2 0 % 以下であり、好ましくは 5 ~ 1 5 % である。なお、蛍光色素内包ナノ粒子の粒径は、走査型電子顕微鏡 (S E M) を用いて電子顕微鏡写真を撮影し、蛍光色素内包ナノ粒子の断面積を計測し、その計測値を相当する円の面積としたときの直径 (面積円相当径) として測定することができる。蛍光色素内包ナノ粒子の集団の粒子サイズの平均 (平均粒径) および変動係数は、十分な数 (たとえば 1 0 0 0 個) の蛍光色素内包ナノ粒子について上記のようにして粒子サイズ (粒径) を測定した後、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。

20

【 0 0 5 1 】

〔 (D) 蛍光ナノ粒子内包粒子 〕

本発明で用いられる蛍光ナノ粒子内包粒子とは、有機物または無機物でできた粒子に対し、上記 (B) で説明した蛍光ナノ粒子が内包されてなるものである。蛍光ナノ粒子は、蛍光色素内包ナノ粒子中に、いずれか一種を単独で内包させるようにしても、複数種を混合して内包させるようにしてもよい。

【 0 0 5 2 】

蛍光色素内包ナノ粒子の製造方法は特に限定されるものではない。粒子原料であるモノマーに蛍光ナノ粒子を結合させて粒子を合成する方法、粒子に蛍光ナノ粒子を吸着させて導入する方法等、粒子への蛍光ナノ粒子の導入はいかなる方法を用いても構わない。内包される蛍光ナノ粒子の粒子サイズ、母体組成、不純物量を調整することで観察に適した励起波長とする。

30

蛍光ナノ粒子内包粒子のサイズは 1 0 ~ 5 0 0 n m のものであり、好ましくは 5 0 ~ 2 0 0 n m である。

【 0 0 5 3 】

〔 形態観察染色工程 〕

本発明においては、形態観察染色を行うことができる。形態観察染色工程では、特に組織標本の形態を観察する場合、前述したような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 (H E 染色) が標準的に用いられるが、本発明における形態観察染色は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 (P a p 染色) 等がある。

40

【 0 0 5 4 】

H E 染色では、ヘマトキシリン染色により細胞核・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。他の形態観察染色において、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、発光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。

50

【 0 0 5 5 】

〔 免疫染色工程 〕

本発明における免疫染色の方法としては、前述したような免疫染色用の蛍光標識体で検出の対象とする生体物質を染色する、蛍光染色法が用いられる。

【 0 0 5 6 】

例えば、特定の抗原に対して免疫染色を行う際には、蛍光標識体と１次抗体を直接結合した標識（コンジュゲート）を作製し、抗原を染色する方法（１次抗体法）、蛍光標識体と２次抗体を直接結合した標識を作製し、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）、蛍光標識体とビオチンを直接結合した標識を作製し、抗原に１次抗体とアビジンあるいはストレプトアビジン修飾した２次抗体を結合したものを染色する方法（ビオチン・アビジン法またはサンドイッチ法）等を用いることができる。

10

【 0 0 5 7 】

免疫染色に用いる１次抗体はいかなるものでも構わず、免疫染色を行ないたい対象によって変わる。例えばHER2を抗原とする免疫染色を行なう場合には、抗HER2抗体を用いる。また、２次抗体は如何なるものを用いても構わず、１次抗体によって変わる。例えば抗マウス・ラビット・牛・ヤギ・羊・犬・チキン抗体が挙げられる。

【 0 0 5 8 】

蛍光標識体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。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用いることができる。

20

【 0 0 5 9 】

なお、上記の免疫染色は、組織染色に限定されるものではなく、細胞染色に適用することも可能である。また、検出の対象とする生体物質は、それと特異的に結合する物質が存在するものであれば特に限定されるものではない。典型的には、上記のように抗原および抗体の組み合わせが用いられるが、例えば、核酸分子（オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）およびそれに相補的に結合しうる配列を有する核酸分子の組み合わせを用いることも可能である。

【 0 0 6 0 】

〔 固定処理工程 〕

本発明の染色方法において行われる固定処理工程は、上記免疫染色工程により導入された蛍光標識体を、生体物質もしくは生体物質に結合した抗体等に固定化する工程である。固定化処理液で処理する事で、タンパク質の架橋や変性を行ない、蛍光標識体と生体物質もしくは生体物質に結合した抗体等とを、化学的、物理的により強固に結合し、安定した状態とできる。本発明において固定処理は、固定処理溶液に組織化学染色工程により得られた染色組織切片を浸漬することにより行うことができる。例えば、希バラホルムアルデヒド水溶液中に、組織化学染色工程により得られた染色組織切片を数分から数時間程度浸漬することにより行うことができる。

30

【 0 0 6 1 】

本発明で用いられる固定処理溶液として、ホルマリン、バラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、アセトン、エタノール、メタノール等の架橋剤、細胞膜透過物質等が挙げられる。この中では、強固に固定ができることから、ホルマリン、バラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒドが好ましく用いられる。

40

【 0 0 6 2 】

〔 封入工程 〕

封入工程は、組織切片の有機溶媒による脱水・透徹工程と、油系封入剤による封入工程とからなる。脱水・透徹工程は、染色した組織切片をPBS等の水系洗浄液で洗浄後、EtOH（ethanol）による脱水およびキシレン置換により行なわれる。EtOHによる脱水は、EtOHの水含有率を、例えば、50%、30%、10%、0%というように水含有率を下げたEtOHに、組織切片を順次漬けていき、EtOHに置換することで行なわ

50

れる。EtOH置換した切片をキシレンに漬ける事で、キシレン置換が行なわれ、切片が透徹される。キシレン置換した切片に油系封入剤を載せ、カバーガラス等を載せる事で封入が行なわれる。

【0063】

〔封入剤〕

封入剤は、溶媒（封入溶媒）と樹脂とから構成される。本発明の封入剤には、油系封入剤（一般的に非水溶性封入剤と呼ばれることもある。）を用いる。油系封入剤とは、水と自由混和しない溶媒を含む封入剤をいう。

【0064】

ここで、水と自由混和しないとは、水に対して体積で15%以下の溶解度であるこという。

10

また、本発明の封入剤は、退色防止剤を含むことができる。これを退色防止剤含有封入剤という。

【0065】

封入剤は市販の油系封入剤でも自家で調製してもよい。市販の油系封入剤としては例えばDPX（シグマアルドリッチ社製。主成分：ポリスチレンポリマー約21.8%、キシレン約69.7%）、エンテランニュー（登録商標、メルク社製。主成分：アクリル樹脂、キシレン約60%）、パラマウントN（登録商標、ファルマ社製。主成分：アクリル樹脂、脂肪族炭化水素）を挙げることができる。市販の油系封入剤には、製品をそのままの状態で使用できるものと、製品（原液）を所定の溶媒で希釈した後に使用するものがある。また、カナダバルサムなどのような天然樹脂や、ポリスチレンやポリメタクリル酸メチルなどのような合成樹脂を封入溶媒に溶かすことにより、自家で油系封入剤を調製することができる。

20

【0066】

封入溶媒

本発明では、封入溶媒として、水と自由混和しない有機溶媒を含む溶媒を用いる。上記市販の油系封入剤に含まれている溶媒、市販の油系封入剤を希釈するための所定の溶媒、自家で油系封入剤を調製するために用いた溶媒などが上記封入溶媒に相当する。

【0067】

水と自由混和しない有機溶媒としては、芳香族炭化水素、不飽和炭化水素、カルボニルを含む化合物（ケトン）、エステル、エーテル、アルコールの中から、そのようなものを選択して用いる事ができる。

30

【0068】

このうち、芳香族炭化水素としては、ベンゼン、トルエン、キシレン等を用いる事ができる。不飽和炭化水素としては、リモネン、ピネン等を用いる事ができる。ケトンとしては、シクロヘキサノン、メチルエチルケトン等を用いる事ができる。エステル系としては、酢酸ブチル等を用いる事ができる。エーテルとしては、アニソール、1,4-ジ(2-ヒドロキシエトキシ)ベンゼン、エチレングリコールモノフェニルエーテル等を用いる事ができる。アルコールとしては、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール等を用いる事ができる。特に、キシレン、トルエンおよびリモネンが、入手の容易さ、切片と近い1.5程度の屈折率、作業に適した数十分程度の乾燥速度、の点から好ましい。

40

【0069】

水と自由混和しない有機溶媒は、いずれか一種を単独で用いても、複数種を混合して用いてもよい。

また、封入溶媒は、水と自由混和しない有機溶媒のみからなるものであってもよいし、必要に応じて、本発明の作用効果を阻害しない範囲で、水と自由混和しない有機溶媒とともに、水および/または水と自由混和する有機溶媒を含むものであってもよい。水と自由混和しない封入剤における、封入溶媒中の、水と自由混和しない溶媒の割合（体積%）は、通常50~100%であり、好ましくは70~100%であり、より好ましくは90~100%である。この範囲で規定された、水と自由混和しない溶媒を含む封入剤は、標本

50

との屈折率差が小さく標本を透明とできる、形態染色の色味や発色が良い、永久標本を作成しやすい、より脱水した条件とできるため、標本作製時の水の混入を防止しやすい、標本作製時の乾燥が均一にできる、という観点から好ましい。

【 0 0 7 0 】

樹脂

封入剤に含まれる樹脂は、封入剤の溶媒分が蒸発した後、固形分として残るので、観察に影響を与えないようなものが適切である。従って、ガラスに近い屈折率で透明性が高いものが適切である。また、着色や蛍光は蛍光顕微鏡観察に悪影響を与えるので無い方がよい。本発明に用いる樹脂としては、上記条件を満たすものであれば、特に限定されるものではないが、例えば、カナダバルサムなどのような天然樹脂や、ポリスチレンやポリメタクリル酸メチルなどのような合成樹脂が挙げられる。

10

【 0 0 7 1 】

〔 退色防止剤 〕

退色防止剤としては、フェノール系、アミン系、リン系、硫黄系および不飽和炭化水素系の退色防止剤の中から、水と自由混和しない溶媒を含む封入溶媒への溶解性に問題がないものを選択して用いることができる。

【 0 0 7 2 】

フェノール系の退色防止剤としては、ルチン、カテキン、ヘスペリジン、メチルヘスペリジン、ミリシトリン、クエルセチン、モリン、フィセチン、ナリングニン、ナリングン、ヘスペリジン、タキシフォリン、アピゲニン、ゲオスミン、ルテオリン、シアニジン、デルフィニジン、マルビジン、ペラルゴニジン、ペオニジン、タンニン、トコフェロール、トコトリエノール、のような天然物由来のフェノール類、p - フェニルアゾフェノール、4 - ニトロアニリン、2 , 6 - ジ - t e r t - ブチル - 4 - ヒドロキシメチルフェノール、N , N' - ジサリチルアル - 1 , 2 - プロバンジアミン、トリエチレングリコール - ビス[3 - (3 - t - ブチル - 5 - メチル - 4 - ヒドロキシフェニル)プロピオネート]、1 , 6 - ヘキサンジオール - ビス[3 - (3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル)プロピオネート]、2 , 4 - ビス - (n - オクチルチオ) - 6 - (4 - ヒドロキシ - 3 , 5 - ジ - t - ブチルアニリノ) - 1 , 3 , 5 - トリアジン、ペンタエリスリチル・テトラキス[3 - (3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル)プロピオネート]、2 , 2 - チオ - ジエチレンビス[3 - (3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル)プロピオネート]、オクタデシル - 3 - (3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル)プロピオネート、N , N' - ヘキサメチレンビス(3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシ - ヒドロシンナマミド)、3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシベンジルフォスフォネート - ジエチルエステル、1 , 3 , 5 - トリメチル - 2 , 4 , 6 - トリス(3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシベンジル)ベンゼン、トリス - (3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシベンジル) - イソシアヌレート、オクチル化ジフェニルアミン、2 , 4 , - ビス[(オクチルチオ)メチル] - O - クレゾール、イソオクチル - 3 - (3 , 5 - ジ - t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル)プロピオネート、1 , 3 , 5 - トリス(4 - t - ブチル - 3 - ヒドロキシ - 2 , 6 - ジメチルベンジル)イソシアヌル酸のようなヒンダードフェノール類等を用いることができる。

20

30

40

【 0 0 7 3 】

アミン系の退色防止剤としては、1 , 4 - ジアザビスクロ[2 . 2 . 2]オクタン(D A B C O)等の3級アミンや、フェノチアジン、セバシン酸ビス(2 , 2 , 6 , 6 - テトラメチル - 4 - ピペリジル)、2 , 2 , 6 , 6 - テトラメチルピペリジン等の2級アミン、カフェインのようなアルカロイド、を用いることができる。

【 0 0 7 4 】

リン系の退色防止剤としては、2 - メルカプトベンゾイミダゾール、亜リン酸トリフェニル、トリス(2 - カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩(T C E P H C l)、ジイソデシルペンタエリスリトールジホスファイト、9 , 1 0 - ジヒドロ - 9 - オキサ - 10 - ホスファフェナントレン 1 0 - オキシド等を用いることができる。

50

【 0 0 7 5 】

硫黄系の退色防止剤としては、3, 3 - チオジプロピオン酸ジドデシル、2, 2' - チオジエタノール等のスルフィドや、ジベンジルジスルフィド、DL - α リボ酸（チオクト酸）、3, 6 - ジチア - 1, 8 - オクタンジオール等のジスルフィド、ジチオスレイトールやオクタンジオール等のチオールを用いることができる。

【 0 0 7 6 】

不飽和炭化水素系では、ルテイン、リコピン、アスタキサンチン、カンタキサンチン、カプサンチン、ミキソキサントフィル、ゼアキサンチン、カロテン、レチノイン酸等のカロテン類やカロテノイド類、キサントフィル類、アスコルビン酸、トコトリエノール、不飽和脂肪酸類等を用いる事ができる。

10

【 0 0 7 7 】

前記退色防止剤は、フェノールおよびアミンからなる群より選ばれる少なくとも1種を含むことが好ましい。これらの退色防止剤は、蛍光標識の光退色の原因となる活性酸素による酸化を防止することにより、光退色をより効果的に防止することができる。

【 0 0 7 8 】

退色防止剤は、いずれか一種を単独で用いても、複数種を混合して用いてもよい。

これら退色防止剤は、蛍光顕微鏡観察に悪影響が無いよう、吸収波長450～600nmで吸収が無いことが好ましく、発光波長500～700nmで発光が無いことが好ましい。吸収があると蛍光標識の輝度低下につながる。また、発光があると蛍光顕微鏡観察時にノイズが増加する。なお、退色防止剤吸収の吸収が無いとは、退色防止剤の1mg/mL濃度のキシレン溶液を調整し、10mmセルに入れて吸光度測定を行なった際に、450nmおよび600nmにおける吸光度がともに0.5以下であることをいう。

20

【 0 0 7 9 】

本発明において、蛍光色素の輝度の低下を避ける観点から、上記退色防止剤を含む封入剤を用いて作製した切片スライドは透明であることが好ましい。「透明」とは、作製した切片スライドについて、450～600nmの吸光度測定をしたときに、450nmおよび600nmにおける吸光度がともに0.1以下であることをいう。

【 0 0 8 0 】

〔 蛍光観察工程 〕

上記工程により免疫染色および形態観察染色が施された病理切片に、用いられている蛍光標識体に応じた適切な波長を有する励起光を照射することにより、その蛍光標識体が発する蛍光を観察する。このような工程により、その病理切片内に存在する所定の生体分子を検出することができ、例えば、抗体医薬（例えば、HER2を標的とするハーセプチン等）の適用の適否を判定するための情報として利用することができる。

30

【 0 0 8 1 】

励起光の照射には、一般的な蛍光観察と同様の照射手段を用いればよく、例えば、蛍光顕微鏡が備えるレーザー光源から、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させるフィルターを用いて、適切な波長および出力の励起光を染色された病理切片に照射すればよい。

【 0 0 8 2 】

蛍光の観察は、蛍光顕微鏡の鏡筒から行ってもよいし、蛍光顕微鏡に設置されたカメラが撮影した画像を別途表示手段（モニタ等）に表示して行ってもよい。蛍光物質によるが、蛍光顕微鏡の鏡筒からの目視によっては十分に蛍光を観察することができない場合であっても、カメラによる画像の撮影を通じて蛍光を観察することが可能な場合もある。必要に応じて所定の波長を選択的に透過させるフィルターを用いてもよい。

40

【 0 0 8 3 】

なお、本発明においては同一の病理切片に対して免疫染色および形態観察染色の両方が施されている場合があるが、形態観察染色による像を観察する際には、免疫染色用の蛍光標識体を励起させるための励起光を照射する必要はなく、光学顕微鏡と同様の観察条件下で観察すればよい。

【 0 0 8 4 】

50

そのため、蛍光観察は任意の時間、励起光を照射した後に行うことができるが、通常の照射条件下（照射エネルギー等）において、好ましくは励起光開始から90分以内、より好ましくは励起光開始から30分以内に行うようにする。

【0085】

蛍光顕微鏡による観察の前後では、蛍光標識の輝度は変化しないことが望ましい。本発明においては、一般的な蛍光顕微鏡の絞り全開40倍の観察条件で、30分間光照射後の輝度が、照射前の70%を維持する。この輝度低下の範囲では蛍光免疫染色の観察において、一定の信頼性のある生体物質検出方法とみなして運用することが可能である。

【0086】

〔キット〕

本発明の生体物質検出用キットは、上記工程を含む本発明の生体物質検出方法に使用されるものである。本発明の生体物質検出用キットは、上記水と自由混和しない溶媒を含む封入剤、または、上記水と自由混和しない溶媒ならびに退色防止剤を含む封入剤を有するものであり、さらに、本発明に係る生体物質検出方法が指示として記載された使用説明書、免疫染色用の蛍光標識体および蛍光標識化試薬を有することができる。

【0087】

キットに含まれる免疫染色用の蛍光標識体としては、上記〔免疫染色用の蛍光標識体〕の項に記載された蛍光標識体から選択することができる。蛍光標識化試薬としては、上記〔免疫染色工程〕の項に記載した物質、例えば1次抗体、2次抗体等を選択することができる。封入剤は、上記〔封入剤〕の項に記載されている封入剤であり、その封入剤を構成する溶媒および樹脂は、上記 封入溶媒 および 樹脂 の項にそれぞれ記載した溶媒および樹脂から選択することができる。退色防止剤としては、上記〔退色防止剤〕の項に記載した退色防止剤から選択することができる。

【0088】

使用説明書

キットに含まれる使用説明書は、本発明の方法を実施するために、本発明に係る生体物質検出方法のいずれかが、指示として記載された使用説明書である。使用説明書の具体的態様は上記情報を適切に伝達できるものであればよい。例えば、紙片、キットの包装、キットの構成物のラベル等に印刷されているものでよく、ディスク、CD等コンピュータで読み取り可能な媒体中に記録されているものでもよい。

【実施例】

【0089】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

< 蛍光標識の作製 >

蛍光標識は、すべてストレプトアビジン結合体として作製した。

【0090】

（蛍光標識1：Texas Red色素）

蛍光色素としてSulforhodamine 101 acid chloride（同仁化学社製、Texas Red色素）を用いた。蛍光色素へのストレプトアビジン結合は、以下のおこなった。

【0091】

Texas Red色素に、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3nMに調整し、この溶液に最終濃度10mMとなるようSM（PEG）12（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethyl-ylene glycol] ester）を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、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ナノ粒子を得た。（単位Mはモル濃度mol/Lを表す。）

10

20

30

40

50

【0092】

一方、ストレプトアビジン（和光純薬社製）をN-succinimidyl S-acetylthioacetate（SATA）に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、色素内包ナノ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

【0093】

上記のTexas Red色素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Texas Red色素を得た。

10

【0094】

（蛍光標識2：ペリレン色素）

蛍光色素として用いたペリレンジイミドは次の方法で準備した。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。これを用いた以外は蛍光色素1の方法と同様にして、ストレプトアビジン結合色素を得た。

20

【0095】

（蛍光標識3：Texas Red色素内包メラミンナノ粒子）

Sulforhodamine 101（シグマアルドリッチ社製）2.5 mgを水22.5 mLに加えた後、ホットスターラー上で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）1.5 gを加え、さらに5分間加熱撹拌した。ギ酸100 μLを加え、60〜20分間で加熱撹拌した後、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12,000 rpm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。

【0096】

得られた粒子0.1 mgをEtOH 1.5 mL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）2 μLを加えて8時間反応させて表面アミノ化処理を行なった。

30

【0097】

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-maleomidopropionamid)-dodecaethyleneglycol]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ナノ粒子を得た。

40

【0098】

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、色素内包ナノ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

【0099】

上記の蛍光ナノ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Texas Red色素内包メラミン

50

ナノ粒子を得た。

【0100】

(蛍光標識4：ペリレン色素内包メラミンナノ粒子)

蛍光色素として上記色素2に記載のペリレンジイミドスルホン酸誘導体を用いた。

それ以外は上記蛍光色素3の方法と同様にして、ストレプトアビジン結合ペリレン色素内包メラミンナノ粒子を得た。

【0101】

(蛍光標識5：FITC色素内包メラミンナノ粒子)

蛍光色素としてフルオレセインイソチオシアネート(同仁化学社製、FITC)を用いた。それ以外は上記蛍光色素3の方法と同様にして、ストレプトアビジン結合FITC色素内包メラミンナノ粒子を得た。

10

【0102】

(蛍光標識6：Texas Red色素内包シリカナノ粒子)

蛍光標識1で用いたTexas Red色素3.4mgと3-アミノプロピルトリメトキシシラン(3-aminopropyltrimethoxysilane、信越シリコン社製、KBM903)3μLとをDMF中で混合し、オルガノアルコキシシラン化合物を得た。得られたオルガノアルコキシシラン化合物0.6mLを、48mLのエタノール、0.6mLのTEOS(テトラエトキシシラン)、2mLの水、2mLの28%アンモニア水と3時間混合した。上記工程で作製した混合液を10000Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した。エタノールを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順でエタノールと純水による洗浄を2回ずつ行なった。Texas Red色素内包シリカナノ粒子を得た。

20

【0103】

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2mM含有したPBS(リン酸緩衝液生理的食塩水)を用いて3nMに調整し、この溶液に最終濃度10mMとなるようSM(PEG)12(サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethyleneglycol]ester)を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、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ナノ粒子を得た。

30

【0104】

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、色素内包ナノ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

【0105】

上記の蛍光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、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Texas Red色素内包シリカナノ粒子を得た。

40

【0106】

(蛍光標識7：ペリレン色素内包シリカナノ粒子)

蛍光色素として蛍光標識2で用いたペリレンジイミドを用いた。それ以外は上記蛍光色素6の方法と同様にして、ストレプトアビジン結合ペリレン色素内包シリカナノ粒子を得た。

【0107】

(蛍光標識8：FITC色素内包シリカ内包ナノ粒子)

蛍光色素として蛍光色素3で用いたFITCを用いた。それ以外は上記蛍光色素6の方

50

法と同様にして、ストレプトアビジン結合ペリレン色素内包シリカナノ粒子を得た。

【0108】

(蛍光標識9: Texas Red色素内包ポリスチレンナノ粒子)

Texas Red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。蛍光色素Sulforhodamine 101 acid chloride (同仁社製、Texas Red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。

10

【0109】

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)-dodecaethylenglycol]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ナノ粒子を得た。

20

【0110】

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、色素内包ナノ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

【0111】

上記の蛍光ナノ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Texas Red色素内包ポリスチレンナノ粒子を得た。

30

【0112】

(蛍光標識10: ペリレン色素内包ポリスチレンナノ粒子)

蛍光色素として蛍光標識2で用いたペリレンジイミドを用いた。それ以外は上記蛍光色素9の方法と同様にして、ストレプトアビジン結合ペリレン色素内包シリカナノ粒子を得た。

【0113】

(蛍光標識11: FITC色素内包ポリスチレンナノ粒子)

蛍光色素として蛍光色素3で用いたFITCを用いた。それ以外は上記蛍光色素9の方法と同様にして、ストレプトアビジン結合ペリレン色素内包シリカナノ粒子を得た。

40

【0114】

(蛍光標識12: CdSe)

蛍光ナノ粒子として、カルボン酸末端のCdSe/ZnS(インビトロジェン社: Qdot 605)を用いた。これをEDTA(サーモサイエンス社製)で活性化させた後、蛍光標識1の方法と同様にしてストレプトアビジンと結合させ、ストレプトアビジン結合蛍光ナノ粒子を得た。

【0115】

50

(蛍光標識 1 3 : C d S e 内包ナノ粒子)

C d S e / Z n S デカン分散液 (インビトロジェン社 : Q d o t 6 0 5) 1 0 μ L に T E O S 0 . 1 m g 、エタノール 0 . 0 1 m L 、濃アンモニア水 0 . 0 3 m L を加え 3 時間攪拌して加水分解を行った。得られた混合液を 1 0 , 0 0 0 G で 2 0 分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。エタノールを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順でエタノールと純水による洗浄を 2 回ずつ行い、C d S e 内包ナノ粒子 6 0 m g を得た。

【 0 1 1 6 】

得られた C d S e 内包ナノ粒子の 1 0 0 0 個について S E M 観察を行ったところ、平均粒径 1 0 8 n m 、変動係数は 1 4 % であった。

得られた C d S e 内包ナノ粒子は、蛍光色素 3 との方法と同様に、表面アミノ化、P E G 化、ストレプトアビジン修飾を行ない、ストレプトアビジン結合 C d S e 内包ナノ粒子を得た。

使用した蛍光標識の一覧を表 1 に示す。

【 0 1 1 7 】

【表 1】

(表1)

蛍光標識	蛍光標識種類	色素または ナノ粒子組成	内包粒子母体
蛍光標識1	蛍光色素	テキサスレッド	無し
蛍光標識2	蛍光色素	ペリレン	無し
蛍光標識3	蛍光色素内包粒子	テキサスレッド	メラミン
蛍光標識4	蛍光色素内包粒子	ペリレン	メラミン
蛍光標識5	蛍光色素内包粒子	フルオレセイン	メラミン
蛍光標識6	蛍光色素内包粒子	テキサスレッド	シリカ
蛍光標識7	蛍光色素内包粒子	ペリレン	シリカ
蛍光標識8	蛍光色素内包粒子	フルオレセイン	シリカ
蛍光標識9	蛍光色素内包粒子	テキサスレッド	ポリスチレン
蛍光標識10	蛍光色素内包粒子	ペリレン	ポリスチレン
蛍光標識11	蛍光色素内包粒子	フルオレセイン	ポリスチレン
蛍光標識12	蛍光ナノ粒子	CdSe	無し
蛍光標識13	蛍光ナノ粒子内包粒子	CdSe	シリカ

【 0 1 1 8 】

< 封入剤の作製 >

封入剤として、以下に示す封入剤 1 - 1 ~ 1 - 1 0 、 2 - 1 ~ 2 - 5 および 3 - 1 を準備した。

【 0 1 1 9 】

[退色防止剤含有封入剤]

(封入剤 1 - 1 : ルチン含有封入剤)

封入剤として、エンテランニュー (メルク社製。主成分 : アクリル樹脂、キシレン約 6 0 %) またはパラマウント N (ファルマ社。主成分 : アクリル樹脂、脂肪族炭化水素) を用いた。エンテランニュー、パラマウント N は、購入したものをそのまま希釈せずに用いた。

封入剤に対して退色防止剤として、ルチンを1重量%（以下「wt %」と略記する。）添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0120】

（封入剤1 - 2：2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノールを1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0121】

（封入剤1 - 3：セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)を1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

10

【0122】

（封入剤1 - 4：フェノチアジン含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、フェノチアジンを1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0123】

（封入剤1 - 5：2-メルカプトベンゾイミダゾール）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、2-メルカプトベンゾイミダゾールを1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

20

【0124】

（封入剤1 - 6：亜りん酸トリフェニル含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、亜りん酸トリフェニルを1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0125】

（封入剤1 - 7：ジベンジルジスルフィド含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤としてジベンジルジスルフィドを1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

30

【0126】

（封入剤1 - 8：3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシルを1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0127】

（封入剤1 - 9：DL- α -リボ酸含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、DL- α -リボ酸を1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

40

【0128】

（封入剤1 - 10：レチノイン酸含有封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、レチノイン酸を1wt %添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0129】

（封入剤2 - 1：退色防止剤含有しない封入剤）

封入剤として、エンテランニュー（メルク社製）またはパラマウントN（ファルマ社）を

50

そのまま用いた。退色防止剤は加えなかった。

【0130】

(封入剤2-2:シアニジン含有封入剤)

封入剤に対して退色防止剤として、シアニジンを1wt%添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0131】

(封入剤2-3:p-フェニルアゾフェノール含有封入剤)

封入剤に対して退色防止剤として、p-フェニルアゾフェノールを1wt%添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0132】

(封入剤2-4:4-ニトロアニリン含有封入剤)

封入剤として、エンテランニュー(メルク社製)またはパラマウントN(ファルマ社)を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、4-ニトロアニリンを1wt%添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

10

【0133】

(封入剤2-5:リコピン含有封入剤)

封入剤として、エンテランニュー(メルク社製)またはパラマウントN(ファルマ社)を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、リコピンを1wt%添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

【0134】

(封入剤3-1:DABCO含有水性封入剤)

封入剤として、フルオロマウント(コスモ・バイオ社製;水性封入剤)を用いた。封入剤に対して退色防止剤として、1,4-ジアザビスクロ[2.2.2]オクタン(DABCO)を1wt%添加して攪拌し、退色防止剤含有封入剤を得た。

20

使用した封入剤の一覧を表2に示す。

【0135】

【表 2】

(表2)

封入剤	封入剤に含有する 退色防止剤分類	退色防止剤
封入剤1-1	フェノール系	ルチン
封入剤1-2	フェノール系	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール
封入剤1-3	アミン系	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)
封入剤1-4	アミン系	フェノチアジン
封入剤1-5	リン系	2-メルカプトベンゾイミダゾール
封入剤1-6	リン系	亜りん酸トリフェニル
封入剤1-7	硫黄系	ジベンジルジスルフィド
封入剤1-8	硫黄系	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル
封入剤1-9	硫黄系	DL- α -リボ酸
封入剤1-10	不飽和炭化水素系	レチノイン酸
封入剤2-1	—	なし
封入剤2-2	フェノール系	シアニジン
封入剤2-3	フェノール系	p-フェニルアゾフェノール
封入剤2-4	アミン系	4-ニトロアニリン
封入剤2-5	不飽和炭化水素系	リコピン
封入剤3-1	アミン系	1,4-ジアザビスクロ[2.2.2]オクタン (DABCO)

【0136】

< 組織染色工程 >

[免疫組織染色]

蛍光標識 1 ~ 13 を用いて、ヒト乳房組織の免疫染色を行なった。染色切片はコスモ・バイオ社製の組織アレイスライド (CB-A712) を用いた。組織アレイスライドを脱パラフィン処理後、水に置換洗浄し、10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で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。抗原の賦活化処理後の組織アレイスライドをPBS緩衝液を用いて洗浄後、1% BSA 含有PBS緩衝液を用いて湿潤箱中で1時間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に希釈したビオチン化トラスツズマブを組織切片と2時間反応させ、その後洗浄した。さらに、蛍光標識 1 ~ 13 と0.5時間反応させ、その後洗浄を行うことにより、免疫組織化学染色切片が得られた。得られた免疫組織化学染色切片を4%中性パラホルムアルデヒド水系バッファ溶液中に10分間浸漬することにより、固定処理を行った。

【0137】

[形態染色]

上記で固定処理した免疫組織化学染色切片に対してHE染色を行い、染色後の切片をエタノールに浸漬することにより脱水し、脱水切片をさらにキシレンに浸漬し風乾させることにより透徹を行ったところ、二重染色切片が得られた。なお、形態染色としてHE染色を行なっても、後述の耐光性評価に影響は無い。

【 0 1 3 8 】

[封入]

上記形態染色を行なったものについて、封入を行なった。蛍光標識 1 ~ 1 3 を用い、封入剤として、1 - 1 ~ 1 - 1 0、2 - 1 ~ 2 - 5 および 3 - 1 をそれぞれ用いた。

【 0 1 3 9 】

< 組織サンプルの評価 >

[評価 1 : 退色防止剤吸収]

退色防止剤吸収は、退色防止剤の 1 m g / m L 濃度のキシレン溶液を調整し、1 0 m m セルに入れて吸光度測定を行なった際に、4 5 0 n m および 6 0 0 n m における吸光度がともに 0 . 5 以下であることを退色防止剤吸収無しと、いずれかまたは両方が 0 . 5 を超えるものを退色防止剤吸収有りとした。吸光度測定には日立社製分光光度計 U - 4 1 0 0 を用いた。なお、退色防止剤のキシレン溶解性が悪い場合には、0 . 5 w t % キシレン溶液として、1 0 m m セルに入れて測定を行なった。さらにキシレン溶解性が悪い場合は、溶媒をキシレンと E t O H 等との混合溶媒に替えて測定を行なった。

10

【 0 1 4 0 】

[評価 2 : 3 0 分光照射前後の耐光性評価、改善割合]

蛍光標識 1 ~ 1 3 で免疫染色し、その後に封入剤 1 - 1 ~ 1 - 1 0 または封入剤 2 - 1 ~ 2 - 5 で封入した組織切片に対し、励起光を照射して蛍光発光させ、その組織切片から、正立型蛍光顕微鏡（カールツァイス社製 A x i o I m a g e r 2、モノクロカメラ A x i o C a m M R m 装備）を用いて画像を取得した。

20

【 0 1 4 1 】

励起波長 (n m) および蛍光波長 (n m) は光学フィルターにより設定し、テキサスレッドならびにペリレンイミド、およびその内包ナノ粒子は励起波長 5 7 5 ~ 6 0 0 n m、蛍光波長 6 1 2 ~ 6 8 2 n m とした。フルオレセインおよびその内包ナノ粒子は励起波長 4 5 0 ~ 4 9 0 n m、蛍光波長 5 0 0 ~ 5 5 0 n m とした。C d S e およびその内包ナノ粒子は励起波長 3 4 5 ~ 3 9 5 n m、蛍光波長 6 0 0 ~ 7 0 0 n m とした。

【 0 1 4 2 】

顕微鏡観察および画像取得時の励起波長条件は、励起 5 7 5 ~ 6 0 0 n m では視野中心部付近の照射光強度が 9 0 0 W / c m ²、励起 4 5 0 ~ 4 9 0 n m では視野中心部付近の照射光強度が 9 0 0 W / c m ²、励起 3 6 5 n m では視野中心部付近の照射光強度が 5 0 0 W / c m ²、励起 3 4 5 ~ 3 9 5 n m では視野中心部付近の照射光強度が 5 0 0 W / c m ²、になるようにした。なお、照射光強度は対物 4 0 倍レンズ装着時の光エネルギー値をアドバンテスト社製パワーメータ 8 2 3 0 で測定し、4 0 倍レンズ照射視野面積（約 φ 4 5 0 μ m）で割る事で算出している。画像取得時の露光時間は画像の輝度が飽和しないよう任意に設定し画像を取得した。例えば 1 0 0 0 m 秒で測定を行なった。なお、取得画像は補正を加えず、輝度値がフルレンジでリニアとなるようにした。

30

【 0 1 4 3 】

取得画像より画像解析ソフトである I m a g e - J（米国国立衛生研究所製）を用いて各画素の輝度を算出し、蛍光標識体によって染色された部位（免疫染色部）の平均輝度（免疫染色部輝度）を算出した。当該平均輝度は信号値（S）に対応する。2 5 6 階調のデータにおいて、輝度は「0」を黒（一番暗い）と、「2 5 5」を白（一番明るい）としている。なお、2 5 6 階調よりも高階調な画像を用いる場合は、輝度値を算出後、最大階調値で割り、2 5 5 を掛けることで、2 5 6 階調での値と比較できるようにした。

40

【 0 1 4 4 】

蛍光標識の耐光性評価は、3 0 分間視野を動かさない状態として励起光を照射し続け、照射直後（照射開始時点、0 分）および照射後（3 0 分）の顕微鏡画像の両方から、免疫染色部輝度を取得し、（式：3 0 分照射後の輝度 / 照射直後の輝度 × 1 0 0）、で表される輝度保持率（%）を算出することにより行った。

【 0 1 4 5 】

また、退色防止剤の効果の比較のため、退色防止剤を含まない対応する封入剤を用いて

50

同様の処理を行い、（式：退色防止剤を入れた場合の輝度保持率 / 退色防止剤を入れない場合の輝度保持率 × 100）、で表わされる改善割合（％）を算出した。

【0146】

〔評価3：保存性〕

封入し作製した切片スライドについて、3ヵ月保存後の輝度を評価した。輝度の評価は評価2と同様におこなった。元の輝度に対し、70％以上の輝度を保持している場合は保存性あり（○）、70％未満に低下している場合は保存性なし（×）、とした。

【0147】

〔評価4：透明性〕

封入し作製した切片スライドについて、分光光度計U-4100（日立社製）で、450～600nmの吸光度測定を行ない評価した。450nmおよび600nmにおける吸光度がともに0.1以下を透明（○）と、いずれかまたは両方が0.1を超えるものを不透明（×）とした。封入剤に着色がある場合、透明性が低下する。また、切片が白濁した場合も透明性は低下する。蛍光標識の輝度を維持する観点から、切片スライドは透明であることが好ましい。

10

【0148】

〔評価5：染色維持性〕

油系封入剤で染色ができている事の確認のため、染色時に切片の固定処理工程を行わないサンプルを準備し、固定処理工程を行なったものと比較を行なった。固定処理工程を行わないサンプルに対して、初期輝度が1.1倍以上となっているものを、蛍光染色性を維持している（○）、1.1倍未満となっているものを、蛍光染色性を維持していない（×）とした。

20

以上の評価結果を表3-1～3-7、表4、表5-1～5-3および表6に示す。

【0149】

【表 3 - 1】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例1	En	1	有り	ルチン	無し	58	383	○	○	○
実施例2	En	1	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	53	355	○	○	○
実施例3	En	1	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	52	344	○	○	○
実施例4	En	1	有り	フェノチアジン	無し	49	327	○	○	○
実施例5	En	1	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	43	284	○	○	○
実施例6	En	1	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	44	291	○	○	○
実施例7	En	1	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	41	270	○	○	○
実施例8	En	1	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	42	277	○	○	○
実施例9	En	1	有り	DL- α -リポ酸	無し	39	263	○	○	○
実施例10	En	1	有り	レチノイン酸	無し	41	270	○	○	○
実施例11	En	2	有り	ルチン	無し	65	217	○	○	○
実施例12	En	2	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	62	205	○	○	○
実施例13	En	2	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	60	200	○	○	○
実施例14	En	2	有り	フェノチアジン	無し	58	193	○	○	○
実施例15	En	2	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	53	176	○	○	○
実施例16	En	2	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	54	179	○	○	○
実施例17	En	2	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	51	170	○	○	○
実施例18	En	2	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	52	173	○	○	○
実施例19	En	2	有り	DL- α -リポ酸	無し	50	167	○	○	○
実施例20	En	2	有り	レチノイン酸	無し	51	170	○	○	○

En: エンテランニユー

10

20

30

40

【表 3 - 2】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例21	En	3	有り	ルチン	無し	65	217	○	○	○
実施例22	En	3	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	62	205	○	○	○
実施例23	En	3	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	60	200	○	○	○
実施例24	En	3	有り	フェノチアジン	無し	58	193	○	○	○
実施例25	En	3	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	53	176	○	○	○
実施例26	En	3	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	54	179	○	○	○
実施例27	En	3	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	51	170	○	○	○
実施例28	En	3	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	52	173	○	○	○
実施例29	En	3	有り	DL- α -リポ酸	無し	50	167	○	○	○
実施例30	En	3	有り	レチノイン酸	無し	51	170	○	○	○
実施例31	En	4	有り	ルチン	無し	80	133	○	○	○
実施例32	En	4	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	78	130	○	○	○
実施例33	En	4	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	77	129	○	○	○
実施例34	En	4	有り	フェノチアジン	無し	76	127	○	○	○
実施例35	En	4	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	73	122	○	○	○
実施例36	En	4	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	74	123	○	○	○
実施例37	En	4	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	72	120	○	○	○
実施例38	En	4	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	73	121	○	○	○
実施例39	En	4	有り	DL- α -リポ酸	無し	72	119	○	○	○
実施例40	En	4	有り	レチノイン酸	無し	72	120	○	○	○

En:エンデランニユー

【表 3 - 3】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例41	En	5	有り	ルチン	無し	65	217	○	○	○
実施例42	En	5	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	62	205	○	○	○
実施例43	En	5	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	60	200	○	○	○
実施例44	En	5	有り	フェノチアジン	無し	58	193	○	○	○
実施例45	En	5	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	53	176	○	○	○
実施例46	En	5	有り	亜リン酸トリフェニル	無し	54	179	○	○	○
実施例47	En	5	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	51	170	○	○	○
実施例48	En	5	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	52	173	○	○	○
実施例49	En	5	有り	DL- α -リボ酸	無し	50	167	○	○	○
実施例50	En	5	有り	レチノイン酸	無し	51	170	○	○	○
実施例51	En	6	有り	ルチン	無し	63	250	○	○	○
実施例52	En	6	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	59	235	○	○	○
実施例53	En	6	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	57	229	○	○	○
実施例54	En	6	有り	フェノチアジン	無し	55	220	○	○	○
実施例55	En	6	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	49	198	○	○	○
実施例56	En	6	有り	亜リン酸トリフェニル	無し	50	201	○	○	○
実施例57	En	6	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	48	190	○	○	○
実施例58	En	6	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	48	194	○	○	○
実施例59	En	6	有り	DL- α -リボ酸	無し	47	186	○	○	○
実施例60	En	6	有り	レチノイン酸	無し	48	190	○	○	○

En:エンテランニユー

【表 3 - 4】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例61	En	7	有り	ルチン	無し	78	141	○	○	○
実施例62	En	7	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	75	137	○	○	○
実施例63	En	7	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	74	135	○	○	○
実施例64	En	7	有り	フェノチアジン	無し	73	133	○	○	○
実施例65	En	7	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	70	127	○	○	○
実施例66	En	7	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	70	128	○	○	○
実施例67	En	7	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	69	125	○	○	○
実施例68	En	7	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	69	126	○	○	○
実施例69	En	7	有り	DL- α -リボ酸	無し	68	124	○	○	○
実施例70	En	7	有り	レチノイン酸	無し	69	125	○	○	○
実施例71	En	8	有り	ルチン	無し	63	250	○	○	○
実施例72	En	8	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	59	235	○	○	○
実施例73	En	8	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	57	229	○	○	○
実施例74	En	8	有り	フェノチアジン	無し	55	220	○	○	○
実施例75	En	8	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	49	198	○	○	○
実施例76	En	8	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	50	201	○	○	○
実施例77	En	8	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	48	190	○	○	○
実施例78	En	8	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	48	194	○	○	○
実施例79	En	8	有り	DL- α -リボ酸	無し	47	186	○	○	○
実施例80	En	8	有り	レチノイン酸	無し	48	190	○	○	○

En: エンテランニユー

【表 3 - 5】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例81	En	9	有り	ルチン	無し	70	175	○	○	○
実施例82	En	9	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	67	168	○	○	○
実施例83	En	9	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	66	165	○	○	○
実施例84	En	9	有り	フェノチアジン	無し	64	160	○	○	○
実施例85	En	9	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	60	149	○	○	○
実施例86	En	9	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	60	151	○	○	○
実施例87	En	9	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	58	145	○	○	○
実施例88	En	9	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	59	147	○	○	○
実施例89	En	9	有り	DL- α -リボ酸	無し	57	143	○	○	○
実施例90	En	9	有り	レチノイン酸	無し	58	145	○	○	○
実施例91	En	10	有り	ルチン	無し	85	121	○	○	○
実施例92	En	10	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	84	119	○	○	○
実施例93	En	10	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	83	118	○	○	○
実施例94	En	10	有り	フェノチアジン	無し	82	117	○	○	○
実施例95	En	10	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	80	114	○	○	○
実施例96	En	10	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	80	114	○	○	○
実施例97	En	10	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	79	113	○	○	○
実施例98	En	10	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	79	113	○	○	○
実施例99	En	10	有り	DL- α -リボ酸	無し	79	112	○	○	○
実施例100	En	10	有り	レチノイン酸	無し	79	113	○	○	○

En: エンテランニュー

【表 3 - 6】

	封入剤	蛍光 標識	固定化 処理	退色防止剤	退色 防止剤 吸収	輝度 保持率 [%]	改善 割合 [%]	蛍光 染色性 の維持	保 存 性	透 明 性
実施例101	En	11	有り	ルチン	無し	70	175	○	○	○
実施例102	En	11	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	67	168	○	○	○
実施例103	En	11	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	66	165	○	○	○
実施例104	En	11	有り	フェノチアジン	無し	64	160	○	○	○
実施例105	En	11	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	60	149	○	○	○
実施例106	En	11	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	60	151	○	○	○
実施例107	En	11	有り	ジベンジルスルファイド	無し	58	145	○	○	○
実施例108	En	11	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	59	147	○	○	○
実施例109	En	11	有り	DL- α -リボ酸	無し	57	143	○	○	○
実施例110	En	11	有り	レチノイン酸	無し	58	145	○	○	○
実施例111	En	12	有り	ルチン	無し	88	117	○	○	○
実施例112	En	12	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	86	115	○	○	○
実施例113	En	12	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	86	114	○	○	○
実施例114	En	12	有り	フェノチアジン	無し	85	113	○	○	○
実施例115	En	12	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	83	111	○	○	○
実施例116	En	12	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	83	111	○	○	○
実施例117	En	12	有り	ジベンジルスルファイド	無し	83	110	○	○	○
実施例118	En	12	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	83	110	○	○	○
実施例119	En	12	有り	DL- α -リボ酸	無し	82	110	○	○	○
実施例120	En	12	有り	レチノイン酸	無し	90	105	○	○	○

En:エンテランニュー

(表3-6)

【 0 1 5 5 】

10

20

30

40

【表 3 - 7】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤 吸収	輝度 保持率 [%]	改善 割合 [%]	蛍光 染色性 の維持	保存性	透明性
実施例121	En	13	有り	ルチン	無し	93	109	○	○	○
実施例122	En	13	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	92	108	○	○	○
実施例123	En	13	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	91	108	○	○	○
実施例124	En	13	有り	フェノチアジン	無し	91	107	○	○	○
実施例125	En	13	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	90	106	○	○	○
実施例126	En	13	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	90	106	○	○	○
実施例127	En	13	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	90	105	○	○	○
実施例128	En	13	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	90	106	○	○	○
実施例129	En	13	有り	DL- α -リポ酸	無し	89	105	○	○	○
実施例130	En	13	有り	レチノイン酸	無し	90	105	○	○	○
実施例131	Pm	3	有り	ルチン	無し	65	217	○	○	○
実施例132	Pm	3	有り	2,6-ジ-tert-ブチル-4-ヒドロキシメチルフェノール	無し	62	205	○	○	○
実施例133	Pm	3	有り	セバシン酸ビス(2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジル)	無し	60	200	○	○	○
実施例134	Pm	3	有り	フェノチアジン	無し	58	193	○	○	○
実施例135	Pm	3	有り	2-メルカプトベンゾイミダゾール	無し	53	176	○	○	○
実施例136	Pm	3	有り	亜りん酸トリフェニル	無し	54	179	○	○	○
実施例137	Pm	3	有り	ジベンジルジスルフィド	無し	51	170	○	○	○
実施例138	Pm	3	有り	3,3'-チオジプロピオン酸ジドデシル	無し	52	173	○	○	○
実施例139	Pm	3	有り	DL- α -リポ酸	無し	50	167	○	○	○
実施例140	Pm	3	有り	レチノイン酸	無し	51	170	○	○	○

En: エンテランニユー、Pm: パラマウント-N

【表 4】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例141	En	1	有り	無し	無し	15	-	○	○	○
実施例142	En	2	有り	無し	無し	30	-	○	○	○
実施例143	En	3	有り	無し	無し	30	-	○	○	○
実施例144	En	4	有り	無し	無し	60	-	○	○	○
実施例145	En	5	有り	無し	無し	30	-	○	○	○
実施例146	En	6	有り	無し	無し	25	-	○	○	○
実施例147	En	7	有り	無し	無し	55	-	○	○	○
実施例148	En	8	有り	無し	無し	25	-	○	○	○
実施例149	En	9	有り	無し	無し	40	-	○	○	○
実施例150	En	10	有り	無し	無し	70	-	○	○	○
実施例151	En	11	有り	無し	無し	40	-	○	○	○
実施例152	En	12	有り	無し	無し	75	-	○	○	○
実施例153	En	13	有り	無し	無し	85	-	○	○	○
実施例154	Pm	3	有り	無し	無し	30	-	○	○	○

(表4)

【 0 1 5 7 】

En:エンテランニユー、Pm:パラマウント-N

10

20

30

40

【表 5 - 1】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例155	En	1	有り	シアニジン	無し	58	383	○	○	×
実施例156	En	1	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	49	327	○	○	×
実施例157	En	1	有り	4-ニトロアニリン	無し	47	315	○	○	×
実施例158	En	1	有り	リコピン	無し	42	281	○	○	×
実施例159	En	2	有り	シアニジン	無し	65	217	○	○	×
実施例160	En	2	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	58	193	○	○	×
実施例161	En	2	有り	4-ニトロアニリン	無し	57	189	○	○	×
実施例162	En	2	有り	リコピン	無し	52	175	○	○	×
実施例163	En	3	有り	シアニジン	無し	65	217	○	○	×
実施例164	En	3	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	58	193	○	○	×
実施例165	En	3	有り	4-ニトロアニリン	無し	57	189	○	○	×
実施例166	En	3	有り	リコピン	無し	52	175	○	○	×
実施例167	En	4	有り	シアニジン	無し	80	133	○	○	×
実施例168	En	4	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	76	127	○	○	×
実施例169	En	4	有り	4-ニトロアニリン	無し	75	125	○	○	×
実施例170	En	4	有り	リコピン	無し	73	121	○	○	×
実施例171	En	5	有り	シアニジン	無し	65	217	○	○	×
実施例172	En	5	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	58	193	○	○	×
実施例173	En	5	有り	4-ニトロアニリン	無し	57	189	○	○	×
実施例174	En	5	有り	リコピン	無し	52	175	○	○	×

En:エンデランニュー

【表 5 - 2】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例175	En	6	有り	シアニン	無し	63	250	○	○	×
実施例176	En	6	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	55	220	○	○	×
実施例177	En	6	有り	4-ニトロアニリン	無し	54	214	○	○	×
実施例178	En	6	有り	リコピン	無し	49	196	○	○	×
実施例179	En	7	有り	シアニン	無し	78	141	○	○	×
実施例180	En	7	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	73	133	○	○	×
実施例181	En	7	有り	4-ニトロアニリン	無し	72	131	○	○	×
実施例182	En	7	有り	リコピン	無し	69	126	○	○	×
実施例183	En	8	有り	シアニン	無し	63	250	○	○	×
実施例184	En	8	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	55	220	○	○	×
実施例185	En	8	有り	4-ニトロアニリン	無し	54	214	○	○	×
実施例186	En	8	有り	リコピン	無し	49	196	○	○	×
実施例187	En	9	有り	シアニン	無し	70	175	○	○	×
実施例188	En	9	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	64	160	○	○	×
実施例189	En	9	有り	4-ニトロアニリン	無し	63	157	○	○	×
実施例190	En	9	有り	リコピン	無し	59	148	○	○	×
実施例191	En	10	有り	シアニン	無し	85	121	○	○	×
実施例192	En	10	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	82	117	○	○	×
実施例193	En	10	有り	4-ニトロアニリン	無し	81	116	○	○	×
実施例194	En	10	有り	リコピン	無し	80	114	○	○	×

En:エンテランニュー

【表 5 - 3】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
実施例195	En	11	有り	シアニジン	無し	70	175	○	○	×
実施例196	En	11	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	64	160	○	○	×
実施例197	En	11	有り	4-ニトロアニリン	無し	63	157	○	○	×
実施例198	En	11	有り	リコピン	無し	59	148	○	○	×
実施例199	En	12	有り	シアニジン	無し	88	117	○	○	×
実施例200	En	12	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	85	113	○	○	×
実施例201	En	12	有り	4-ニトロアニリン	無し	85	113	○	○	×
実施例202	En	12	有り	リコピン	無し	90	106	○	○	×
実施例203	En	13	有り	シアニジン	無し	93	109	○	○	×
実施例204	En	13	有り	p-フェニルアゾフェノール	無し	91	107	○	○	×
実施例205	En	13	有り	4-ニトロアニリン	無し	91	107	○	○	×
実施例206	En	13	有り	リコピン	無し	90	106	○	○	×

En:エンテランニュー

【表 6】

	封入剤	蛍光標識	固定化処理	退色防止剤	退色防止剤吸収	輝度保持率 [%]	改善割合 [%]	蛍光染色性の維持	保存性	透明性
比較例1	Fm	3	有り	無し	無し	15	-	○	×	×
比較例2	En	1	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例3	En	2	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例4	En	3	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例5	En	4	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例6	En	5	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例7	En	6	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例8	En	7	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例9	En	8	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例10	En	9	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例11	En	10	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例12	En	11	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例13	En	12	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例14	En	13	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○
比較例15	Pm	3	無し	無し	無し	n.d.	-	×	○	○

En: エンデランニウム、Pm: パラマウント-N、Fm: フルオロマウント
n.d.: 測定せず

これらについて評価を行なった結果、固定化処理を行うことで、水と自由混和しない溶媒を含む封入剤（油系封入剤）を用いても、蛍光染色性の低下（発光部分の減少）および染色のにじみが起きず、実際の観察に用いることができる蛍光染色標本を作製できることが示された。また、退色防止剤を加えることで、輝度保持率が向上することが示された。さらに、吸収のない退色防止剤を用いることで、蛍光観察により適した透明な切片スライ

10

20

30

40

50

ドが得られることが示された。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059374

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/53(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N33/533(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)

G01N33/53, G01N1/28, G01N33/533

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/029752 A1 (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 08 March 2012 (08.03.2012), claims; paragraphs [0053] to [0055] (Family: none)	1-13
Y	JP 2005-329141 A (The University of Tokyo), 02 December 2005 (02.12.2005), paragraphs [0030] to [0034] (Family: none)	1-13
Y	JP 1-163659 A (Meidensha Corp.), 27 June 1989 (27.06.1989), entire text (Family: none)	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ 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
05 June, 2013 (05.06.13)Date of mailing of the international search report
18 June, 2013 (18.06.13)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/059374

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-528406 A (Creighton University), 11 October 2007 (11.10.2007), paragraphs [0123] to [0125] & US 2007/0258895 A1 & EP 1730195 A & WO 2005/087811 A2 & CA 2559144 A & AU 2005222395 A & HK 1104563 A	1-13
Y	JP 2007-518068 A (Mayo Foundation for Medical Education and Research), 05 July 2007 (05.07.2007), example 3 & US 2005/0112116 A1 & EP 1700120 A & WO 2005/051178 A2 & DE 602004019812 D & CN 1910456 A & AT 424560 T & ES 2320006 T	5-9, 11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 9 3 7 4	
A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. G01N33/53 (2006.01)i, G01N1/28 (2006.01)i, G01N33/533 (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. G01N33/53, G01N1/28, G01N33/533			
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 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013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）			
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 2012/029752 A1（コニカミノルタエムジー株式会社）2012.03.08, 特許請求の範囲、段落[0053]-[0055]（ファミリーなし）	1-13	
Y	JP 2005-329141 A（国立大学法人 東京大学）2005.12.02, 段落【0030】-【0034】（ファミリーなし）	1-13	
Y	JP 1-163659 A（株式会社明電舎）1989.06.27, 全文 （ファミリーなし）	1-13	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ 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 05.06.2013		国際調査報告の発送日 18.06.2013	
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） 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 3 / 0 5 9 3 7 4
C (続き) . 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	JP 2007-528406 A (クレイトン ユニバーシティ) 2007.10.11, 段落【0123】 - 【0125】 & US 2007/0258895 A1 & EP 1730195 A & WO 2005/087811 A2 & CA 2559144 A & AU 2005222395 A & HK 1104563 A	1-13
Y	JP 2007-518068 A (マヨ ファウンデーション フォー メディカ ル エデュケーション アンド リサーチ) 2007.07.05, 実施例3 & US 2005/0112116 A1 & EP 1700120 A & WO 2005/051178 A2 & DE 602004019812 D & CN 1910456 A & AT 424560 T & ES 2320006 T	5-9, 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, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(出願人による申告)平成24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 高野 敬三
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 星野 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

(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

(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

Fターム(参考) 2G045 AA24 BB23 BB25 CB01 FB03
2G052 AA28 FA02

(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)	生物物质検出方法		
公开(公告)号	JPWO2013147081A1	公开(公告)日	2015-12-14
申请号	JP2014508057	申请日	2013-03-28
[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		
[标]发明人	高梨健作 郷田秀樹 高野敬三 星野秀樹 中野寧 権田幸祐 大内憲明 渡邊みか		
发明人	高梨 健作 郷田 秀樹 高野 敬三 星野 秀樹 中野 寧 権田 幸祐 大内 憲明 渡邊 みか		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/48 G01N1/28		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/533 G01N33/48.R G01N1/28.U		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB23 2G045/BB25 2G045/CB01 2G045/FB03 2G052/AA28 2G052/FA02		
优先权	2012080781 2012-03-30 JP		
其他公开文献	JP6265119B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种染色方法，其中即使使用油基固定介质，荧光免疫染色样品的荧光染色也不会劣化。此外，在通过染色方法获得的荧光免疫染色的标本中，提供了一种防止由于激发光的照射引起的荧光标记的劣化并提高耐光性能的方法。本发明的生物物质检测方法是用于从病理切片中特异性地检测生物物质的生物物质检测方法，其包括使用荧光标记的免疫染色步骤，切片固定处理步骤以及与水自由混合。并且是使用包含有机溶剂的安装剂来安装部的安装处理步骤。此外，它是一种检测生物物质的方法，其中所述密封剂包含防变色剂。

(19) 日本国特許庁 (JP)		再 公 表 特 許 (A1)		(11) 国際公開番号	
				WO2013/147081	
発行日 平成27年12月14日 (2015.12.14)		(43) 国際公開日		平成25年10月3日 (2013.10.3)	
(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 G 0 4 5	
GO 1 N 33/533 (2006.01)		GO 1 N 33/533		2 G 0 5 2	
GO 1 N 33/48 (2006.01)		GO 1 N 33/48		R	
GO 1 N 1/28 (2006.01)		GO 1 N 1/28		U	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)					
出願番号 特願2014-508057 (P2014-508057)		(71) 出願人 000001270			
(21) 国際出願番号 PCT/JP2013/059374		コニカミノルタ株式会社			
(22) 国際出願日 平成25年3月28日 (2013.3.28)		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号			
(31) 優先権主張番号 特願2012-80781 (P2012-80781)		(71) 出願人 504157024			
(32) 優先日 平成24年3月30日 (2012.3.30)		国立大学法人東北大学			
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号			
		(74) 代理人 110001070			
		特許業務法人 S S I N P A T			
		(72) 発明者 高梨 健作			
		東京都千代田区丸の内二丁目7番2号			
		コニカミノルタ株式会社内			
		(72) 発明者 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			
最終頁に続く					
(54) 【発明の名称】 生物物質検出方法					