

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6112169号
(P6112169)

(45) 発行日 平成29年4月12日 (2017. 4. 12)

(24) 登録日 平成29年3月24日 (2017. 3. 24)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 7 5

GO 1 N 33/48 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 P

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 Y

GO 1 N 21/64 (2006. 01)

GO 1 N 21/64 F

GO 1 N 33/533 (2006. 01)

GO 1 N 33/533

請求項の数 4 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-186551 (P2015-186551)
 (22) 出願日 平成27年9月24日 (2015. 9. 24)
 (62) 分割の表示 特願2013-532608 (P2013-532608)
 の分割
 原出願日 平成24年9月4日 (2012. 9. 4)
 (65) 公開番号 特開2016-27340 (P2016-27340A)
 (43) 公開日 平成28年2月18日 (2016. 2. 18)
 審査請求日 平成27年9月24日 (2015. 9. 24)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-197339 (P2011-197339)
 (32) 優先日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(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
 (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 岡田 尚大
 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

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体物質検出用の蛍光標識体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

メラミン樹脂を母体とし、蛍光色素としてスルホン酸基を持つローダミン系色素分子を内包し、前記蛍光色素は前記母体からなる粒子に吸着している蛍光色素内包ナノ粒子からなることを特徴とする蛍光標識体。

【請求項 2】

前記ローダミン系色素分子がテキサスレッドである、請求項 1 に記載の蛍光標識体。

【請求項 3】

前記ローダミン系色素分子の、励起波長の極大が 5 5 0 ~ 6 2 0 nm の波長域に存在し、発光波長の極大が 5 8 0 ~ 7 0 0 nm の波長域に存在する、請求項 1 または 2 に記載の蛍光標識体。

【請求項 4】

前記蛍光色素内包ナノ粒子の平均粒径が 5 0 ~ 2 0 0 nm である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の蛍光標識体。

【発明の詳細な説明】

【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、外科系の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。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。

10

【0004】

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（H E 染色）が標準的に用いられている（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、例えば細胞診用いられるパ

20

【0005】

また、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（D A B 染色）が用いられる。D A B 染色は、D A B（ジアミノベンジン）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。

30

【0006】

現在、標本の形態観察と免疫観察を同時に行うことが試みられており、例えば、形態観察のためのH E 染色と免疫観察のためのD A B 染色を同時に行なうことが試みられている（特許文献3）。しかしながら、D A B 染色のような酵素標識による染色はH E 染色と色が近いため、H E 染色による染色と酵素標識による染色の識別がしにくく、同時観察が困難という課題がある。加えて、D A B 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。

【0007】

一方、病理診断には蛍光標識体を用いる蛍光標識法が行なわれている。この方法はD A B 染色と比べて定量性に優れるという特徴がある。蛍光標識体を用いて病理診断と形態観察を同時に行う場合、組織染色に用いた染色剤の蛍光の影響を受け易いという課題がある。これに対して例えば、可視光の影響を受けにくい、赤外線領域に励起・発光波長のピークを有する蛍光色素を使うことが挙げられる（特許文献4）。あるいは、形態観察用の染色剤の励起・発光波長と免疫染色用の蛍光標識体の励起・発光波長をずらすことが挙げられる。

40

【0008】

一方で、色素の劣化は一般的に短波長側、特に紫外域で生じやすいことが知られている。染色剤や蛍光標識体の劣化への影響を考慮すると紫外域よりも可視域での励起が望ましい。

50

【0009】

蛍光標識体としては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（特許文献5）。この中で、無機ナノ粒子は上述の可視域で励起させる蛍光標識体には向かないため利用が難しい。一方で、蛍光色素およびその集積体は上述の可視域で励起させる蛍光標識体として利用できる。なお、蛍光色素とその集積体では、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6）。また、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。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0010】

【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】国際公開2008/006006号

【特許文献5】特開2010-209314号公報

【特許文献6】特開2008-147394号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

20

上記のような蛍光標識体を用いて病理診断と形態観察を同時に行なう場合、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やエオジン等の染色剤は徐々に劣化し、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、染色剤ともに劣化が無いことが理想的であるが、現実にはある割合で劣化が生じてしまう。

【0012】

従って、本発明の主な目的は、上記のように励起光の照射により蛍光標識体や染色剤の劣化が生じて、蛍光観察や免疫染色結果の判定を適切に行える方法を実施するために用いることのできる、蛍光標識体を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明者らは、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の内、蛍光標識体（特に蛍光色素内包ナノ粒子）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場合において、免疫染色に用いる蛍光標識体の観察の際に、免疫染色部（蛍光標識体で免疫染色した部位）の輝度保持率（励起光照射開始時点の輝度に対する、観察時の輝度の百分率）が形態観察染色部（蛍光標識体で免疫染色されておらず且つ形態観察用の染色剤で染色された部位）の輝度保持率の80%～120%の範囲であると、蛍光観察や免疫染色結果の判定にほとんど影響を及ぼさない生体物質検出方法となることを見出した。そして、このような生体物質検出方法を実施する上で、例えば、メラミン樹脂またはスチレン樹脂を母体とし、蛍光色素としてスルホン酸基を持つローダミン系色素分子を内包し、前記蛍光色素は前記母体からなる粒子に吸着している蛍光色素内包ナノ粒子からなる蛍光標識体が好適であることを見出した。

40

【0014】

すなわち本発明は、下記の事項を包含する。

〔1〕メラミン樹脂またはスチレン樹脂を母体とし、蛍光色素としてスルホン酸基を持つローダミン系色素分子を内包し、前記蛍光色素は前記母体からなる粒子に吸着している蛍光色素内包ナノ粒子からなることを特徴とする蛍光標識体。

〔2〕前記ローダミン系色素分子がテキサスレッドである、〔1〕に記載の蛍光標識体。

〔3〕前記ローダミン系色素分子の、励起波長の極大が550～620nmの波長域に存

50

在し、発光波長の極大が580～700nmの波長域に存在する、[1]または[2]に記載の蛍光標識体。

[4] 前記蛍光色素内包ナノ粒子の平均粒径が50～200nmである、[1]～[3]のいずれか一項に記載の蛍光標識体。

【発明の効果】

【0015】

本発明の蛍光標識体を用いれば、蛍光標識や染色剤の劣化が生じてても、蛍光観察や免疫染色結果の判定を適切に行える生体物質検出方法を実施することができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

10

【図1】 図1は、エオジンの蛍光スペクトル（励起波長520nm）および励起スペクトル（蛍光波長540nm）である。

【図2】 図2は、実施例1～11（サンプル1-1～1-11）および比較例1～4（サンプル2-1～4）における、エオジン部の輝度保持率（すべて80%で共通）および標識体部の輝度保持率を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0017】

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。

【0018】

20

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）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と、（3）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。さらに、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。

【0019】

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、励起波長が形態観察のための染色剤の励起波長域とは異なる領域に存在する蛍光色素内包ナノ粒子を使用することを想定している。ただし、本発明における免疫染色用の蛍光標識体はそのような蛍光色素内包ナノ粒子に限定されるものではなく、観察の際に免疫染色部の輝度保持率が形態観察染色部の輝度保持率の80%～120%の範囲であるという条件を満たすことのできるその他の蛍光標識体を用いることも可能である。

30

【0020】

なお、（1）の免疫染色する工程と（2）の形態観察染色する工程とでは、どちらの工程の処理が先に実行されてもよく、その順序（先後）は不問である。いずれの順番で免疫染色および形態観察染色がなされた場合も、「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」ことになる。

【0021】

形態観察用の染色剤、免疫染色用の蛍光標識体（蛍光色素内包ナノ粒子）、形態観察染色、免疫染色などの詳細は次のとおりである。

40

【0022】

〔形態観察用の染色剤〕

形態観察用の染色剤としては、ヘマトキシリン・エオジンが特に好適に用いられるが、これに限定されるものではない。エオジンと同様に細胞質等を染色でき、可視域の励起波長と発光波長がエオジンと同様の色素であれば、如何なるものを用いてもよい。例えば、細胞診の際に行われるパパニコロウ染色（Pap染色）に用いられる、オレンジG、エオジンYおよびライトグリーンSFYも、エオジンと同様の可視域の励起波長と発光波長を有する色素である。ヘマトキシリンについても同様に、ヘマトキシリンと同様に細胞核を染色でき、可視域の励起波長と発光波長がヘマトキシリンと同様の色素であれば、如何な

50

るものを用いてもよい。

【0023】

〔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、免疫染色に用いる蛍光標識体の観察の際に、免疫染色部の輝度保持率が形態観察染色部の輝度保持率の80%～120%の範囲であるという条件を達成しうるものである。すなわち、免疫染色用の蛍光標識体としては、励起光を照射することによる輝度保持率の低下が、それと組み合わせて用いられる形態観察用の染色剤（代表的にはヘマトキシリンおよびエオジン）の輝度保持率の低下に対して、一定の範囲内で同調しうるものが用いられる。

【0024】

また、形態観察用の染色の一種である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、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可能性がある。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1に示す。励起スペクトルより、エオジンは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、本発明における免疫染色用の蛍光標識体としては、この波長域を回避した350～450nmの波長域かまたは550nm以上の長波長域に励起波長の極大がある蛍光標識体が好ましい。但し、発光波長との兼ね合いにより、620nm以下に励起波長の極大があることがより好ましい。励起光による染色剤への影響をなるべく低減する観点からは、350～450nmの波長域に励起波長の極大がある蛍光標識体を用いるよりも、550～620nmの波長域に励起波長の極大がある蛍光標識体を用いる方が好ましい。一方、蛍光標識体の発光波長は、エオジンの吸収・発光の影響や組織自家蛍光との兼ね合いから580nm以上の長波長側に極大があることが好ましい。また、蛍光顕微鏡観察時に目視確認できる必要があるため、700nm以下の短波長側に極大があることが好ましい。

【0025】

〔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好適に用いられる。

【0026】

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、免疫染色部の輝度保持率を形態観察染色部の輝度保持率の80%～120%の範囲とするために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。

【0027】

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（耐光性の強い）、免疫染色部の輝度保持率を形態観察染色部の輝度保持率の80%～120%の範囲に調整することのできる、蛍光色素内包ナノ粒子を作製することができる。たとえば、ポリスチレン、ポリメラミン、シリカなどの疎水性の化合物は、耐光性の高い蛍光色素内包ナノ粒子の母体として好ましい。

【0028】

一方、内包される蛍光色素は、代表的な形態観察用の染色剤であるエオジンの吸収波長と重複しないよう、350～450nmの波長域または550nm以上の長波長域で励起する蛍光色素であることが好ましい。

【0029】

そのような蛍光色素は、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、ATTO（登録商標、ATTO-TEC社製）系色素分子、MFP（登録商標、Mobictec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。

10

【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 6G、テトラメチルローダミン、X-ローダミン、テキサスレッド、Spectrum Red、LD700 PERCHLORATE、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、SRfluor 680-Carboxylate、1, 3-Bis[4-(dimethylamino)-2-hydroxyphenyl]-2, 4-dihydroxycyclobutenediylum dihydroxide, bis、1, 3-Bis[4-(dimethylamino)phenyl]-2, 4-dihydroxycyclobutenediylum 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)-ylidene)-3-oxocyclobut-1-enolate、などが挙げられる。

20

30

【0032】

シアニン系色素分子の具体例としては、1-Butyl-2-[5-(1-butyl-1, 3-dihydro-3, 3-dimethyl-2H-indol-2-ylidene)-penta-1, 3-dienyl]-3, 3-dimethyl-3eiti-indolium hexafluorophosphate、1-Butyl-2-[5-(1-butyl-3, 3-dimethyl-1, 3-dihydro-indol-2-ylidene)-3-chloro-penta-1, 3-dienyl]-3, 3-dimethyl-3H-indolium hexafluorophosphate、3-Ethyl-2-[5-(3-ethyl-3H-benzothiazol-2-ylidene)-penta-1, 3-dienyl]-benzothiazol-3-ium iodide、などが挙げられる。

40

【0033】

芳香環系色素分子の具体例としては、N, N-Bis-(2, 6-diisopropylphenyl)-1, 6, 7, 12-(4-tert-butylphenoxy)

50

-perylene-3, 4, 9, 10-tetracarboxylic diimide、N,N'-Bis (2, 6-diisopropylphenyl) -1, 6, 7, 12-tetraphenoxyperylene-3, 4:9, 10-tetracarboxylic diimide、N, N'-Bis (2, 6-diisopropylphenyl) perylene-3, 4, 9, 10-bis (dicarbimide)、16, N,N'-Bis (2, 6-dimethylphenyl) perylene-3, 4, 9, 10-tetracarboxylic diimide、4, 4'-[(8, 16-Dihydro-8, 16-dioxodibenzo[a, j]perylene-2, 10-diyl) dioxy]dibutyric acid、2, 10-Dihydroxydibenzo[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、などが挙げられる。

10

【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。

20

【0035】

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

【0036】

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。

【0037】

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、などが挙げられる。

30

【0038】

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。

40

【0039】

Cy系色素分子の具体例としては、Cy 3. 5、Cy 5、Cy 5. 5、などが挙げられる。

【0040】

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、などが挙げられる。

【0041】

HiLyte系色素分子の具体例としては、HiLyte 594、HiLyte Fluor TR、などが挙げられる。

50

【0042】

DyLight系色素分子の具体例としては、DyLight 594、DyLight 633、などが挙げられる。

【0043】

ATTO系色素分子の具体例としては、ATTO590、ATTO610、ATTO620、ATTO633、ATTO655、などが挙げられる。

【0044】

MFP系色素分子の具体例としては、MFP590、MFP631、などが挙げられる。

【0045】

その他の色素としては、C-Phycocyanin、Phycocyanin、APC (Allophycocyanin)、APC-XL、NorthernLights 637、等が挙げられる。

【0046】

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

【0047】

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。

【0048】

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 (perylene)、特にペリレンジイミド (perylene diimide) 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。

【0049】

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。

【0050】

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10～500nmであり、好ましくは50～200nmである。また、粒径のばらつきを示す変動係数も特に限定されないが、通常は20%程度である。なお、蛍光色素内包ナノ粒子の粒径は、走査型電子顕微鏡 (SEM) 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に断面積を計測し、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1000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。

【0051】

〔形態観察染色工程〕

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 (HE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 (Pap染色) 等がある。

【0052】

HE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

10

20

30

40

50

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。

【0053】

〔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。

【0054】

たとえば、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

【0055】

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。

20

【0056】

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用いることができる。

【0057】

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、たとえば核酸分子（オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）およびそれにハイブリダイズす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。

30

【0058】

〔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、抗体医薬（たとえばHER2を標的とするハーセプチン）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。

【0059】

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、たとえば、蛍光顕微鏡が備えるレーザ光源から、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。

40

【0060】

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を用いてもよい。

【0061】

50

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。

【0062】

本発明の生体物質検出方法においては、免疫染色部の輝度保持率が形態観察染色部の輝度保持率に対して特定の範囲の比率を有するため、免疫染色結果の判定に悪影響を及ぼすことがない。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。

10

【0063】

本発明において、免疫染色部の輝度保持率（RS）の形態観察染色部の輝度保持率（RN）に対する比率（ RS/RN ）は、80～120%の範囲、好ましくは100～120%の範囲に設定される。上記比率が80%を下回ると、蛍光観察時に形態観察染色部の輝度に対し免疫染色部の輝度が相対的に低くなりすぎ、逆に上記比率が120%を上回ると、蛍光観察時に免疫染色部の輝度に対して形態観察染色部の輝度が相対的に低くなりすぎ、どちらの場合も、染色した病理切片から得られる情報が励起光の照射によって大きく変質してしまうおそれがある。

【0064】

ここで、免疫染色部の輝度（S）は、免疫染色用の蛍光標識体によって染色された部位の輝度の平均値として取得される値である。そして、免疫染色部の輝度保持率（RS）は、蛍光観察のための励起光を照射する前の時点の輝度（ S_B ）、および一定時間励起光を照射した後に蛍光標識体が発する蛍光を観察する時点の輝度（ S_A ）から、式 S_A/S_B によって算出される値である。

20

【0065】

一方、形態観察染色部の輝度（N）は、免疫染色用の蛍光標識体によっては染色されていない、形態観察用の染色剤によって染色された部位の輝度の平均値として取得される値である。そして、形態観察染色部の輝度保持率（RN）は、蛍光観察のための励起光を照射する前の時点の輝度（ N_B ）、および一定時間励起光を照射した後に蛍光標識体が発する蛍光を観察する時点の輝度（ N_A ）から、式 N_A/N_B によって算出される値である。

30

【0066】

免疫染色部の輝度（S）および形態観察染色部の輝度（N）は、たとえば、蛍光顕微鏡に設置されたカメラによって画像を撮影し、画像解析ソフトを用いてその撮影画像の所定の範囲の各画素の輝度を算出することによって取得することができる。

【0067】

蛍光観察においては、たとえば、あるテストサンプルについて、ある染色条件（形態観察用の染色剤および免疫染色用の蛍光標識体の組み合わせ）および励起光照射条件（波長、強度等）について、上記のようにして輝度保持率に関する比率（ RS/RN ）を算出してみればよい。上記比率が80～120%の範囲内にあることが確認された場合は、そのテストサンプルと同様の染色条件および励起光照射条件により、他の病理切片について蛍光を観察することで、一定の信頼性のある生体物質検出方法を行うことができる。また、上記比率が80～120%の範囲外にあれば、染色条件および励起光照射条件を変更し、80～120%の範囲内なるよう修正した後、他の病理切片について蛍光を観察すればよい。

40

【0068】

あるいは、特定の染色条件および励起光照射条件について、輝度保持率に関する比率（ RS/RN ）が上記のようにして80～120%の範囲になることが一度確認された後は、同様の組み合わせおよび観察条件が適用される限り、観察の都度テストサンプルを用いて確認することなく、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も可能である。

50

【実施例】

【0069】

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。

【0070】

[サンプルの作製]

(サンプル1-1: Texas Red内包シリカ粒子)

蛍光色素Sulforhodamine 101 acid chloride (同仁社製、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) 3 μ L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回ずつ行った。得られたテトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子のSEM観察を行ったところ、平均粒径は104nm、変動係数は12%であった。

10

【0071】

得られた蛍光体内包シリカナノ粒子を、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-maleimidopropionamido)-dodecaethyleneglycol] ester) を混合し、1時間反応させた。この混合液を10000G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回行うことで抗体結合用の蛍光色素内包粒子を得た。

20

【0072】

一方、抗ヒトHER2抗体を1Mジチオスレイトール (DTT) で還元処理を行い、ゲルろ過カラムにより過剰のDTTを除去することによりシリカ粒子に結合可能な還元化抗体溶液を得た。

【0073】

上記で得られた抗体結合用の蛍光色素内包粒子と還元化抗体とを、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10000G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回行うことで抗ヒトER抗体結合・蛍光色素内包粒子を得た。

30

【0074】

(サンプル1-2: ATTO590内包シリカ粒子)

蛍光色素としてATTO590色素 (ATTO-TEC社製) を用いた。それ以外はサンプル1-1と同様にして、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

40

【0075】

(サンプル1-3: Cresyl Violet内包シリカ粒子)

蛍光色素としてCresyl Violet (シグマアルドリッチ社製) を用い、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) に替えて、3-グリシジルオキシプロピルトリメトキシシラン (3-Glycidylpropyltrimethoxysilane、TCI社製) を用いた。それ以外はサンプル1-1と同様にして、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0076】

(サンプル1-4: ペリレンジイミド内包シリカ粒子)

50

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を濃硫酸で処理した、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。これを蛍光色素として用いた以外はサンプル1-1と同様にして、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0077】

(サンプル1-5: Texas Red内包メラミン粒子)

SulfoRhodamine101 (シグマアルドリッチ社製) 2.5mgを水22.5mLに加えた後、ホットスターラー上で70℃20分間加熱し、水溶性メラミン樹脂「ニカラックMX-035」(日本カーバイド工業社製) 1.5gを加え、さらに5分間加熱攪拌した。ギ酸100μLを加え、20分間60度で加熱攪拌した後、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12000rpm20分かけ、上澄み除去した。この洗浄をエタノールと水で行なった。得られた粒子をサンプル1-1と同様にSM(PEG)12(サーモサイエンティフィック社製、succinimidylo-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaethyleneglycol]ester)で修飾した後、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0078】

(サンプル1-6: ATTO590内包メラミン粒子)

蛍光色素としてATTO590(ATTO-TECH社製)を用いた。それ以外はサンプル1-5と同様にして、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0079】

(サンプル1-7: ペリレンジイミド内包メラミン粒子)

蛍光色素としてペリレンジイミドスルホン酸誘導体を用いた。それ以外はサンプル1-5と同様にして、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0080】

(サンプル1-8: Texas Red内包架橋PS粒子)

TexasRed色素内包架橋PS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5mLにグリシジルメタクリレート(東京化成工業社製) 0.18gとスチレン(和光純薬社製) 0.05g、ジビニルベンゼン0.05g、上記色素結合スチレン0.005g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0.012g加え、12時間反応した。反応液を10000G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た。得られた粒子は、サンプル1-1と同様にSM(PEG)12(サーモサイエンティフィック社製、succinimidylo-[(N-maleimidopropionamido)-dodecaethyleneglycol]ester)で修飾した後、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0081】

(サンプル1-9: ATTO590内包架橋PS粒子)

蛍光色素としてATTO590(ATTO-TECH社製)を用いた。それ以外はサンプル1-8と同様にして、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0082】

(サンプル1-10: Cresyl Violet内包架橋PS粒子)

蛍光色素としてCresyl Violet(シグマアルドリッチ社製)を用いた。それ以外はサンプル1-8と同様にして、抗ヒトHER2抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0083】

(サンプル1-11: ペリレンジイミド内包架橋PS粒子)

蛍光色素としてペリレンジイミドスルホン酸誘導体を酸クロリドとしたものを用いた。それ以外はサンプル 1-8 と同様にして、抗ヒト H E R 2 抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0084】

(サンプル 2-1 : C y - 3 . 5 内包シリカ粒子)

蛍光色素として C y - 3 . 5 S E (ロシュ社)を用いた。それ以外はサンプル 1-1 と同様にして、抗ヒト H E R 2 抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0085】

(サンプル 2-2 : C y - 3 . 5 内包メラミン粒子)

蛍光色素として C y - 3 . 5 S E (ロシュ社)を用いた。それ以外はサンプル 1-5 10 と同様にして、抗ヒト H E R 2 抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0086】

(サンプル 2-3 : B O D I P Y T R 内包シリカ粒子)

蛍光色素として B O D I P Y T R (インビトロジェン社)を用いた。それ以外はサンプル 1-1 と同様にして、抗ヒト H E R 2 抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0087】

(サンプル 2-4 : B O D I P Y T R 内包メラミン粒子)

蛍光色素として B O D I P Y T R (インビトロジェン社)を用いた。それ以外はサンプル 1-5 と同様にして、抗ヒト H E R 2 抗体結合・蛍光色素内包粒子を合成した。

【0088】

[組織染色による評価]

サンプル 1-1 ~ 1 1、2-1 ~ 4 を用いて、ヒト乳房組織の免疫染色と形態観察染色 (H E 染色) とを行なった。サンプル 1-1 ~ 1 1 が実施例 1 ~ 1 1、サンプル 2-1 ~ 4 が比較例 1 ~ 4 に対応する。

【0089】

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、10mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中で 1 5 分間オートクレーブ処理することで、抗原の不活化処理を行った。抗原の不活化処理後の組織アレイスライドは PBS 緩衝液を用いて洗浄後、湿潤箱中で 1 時間 1% BSA 含有 PBS 緩衝液を用いてブロッッキング処理を行った。ブロッッキング処理後、1% BSA 含有 PBS 緩衝液で 0.05 30 nM に希釈した各サンプル 1-1 ~ 1 1、2-1 ~ 4 を組織切片と 3 時間反応させた。各サンプル 1-1 ~ 1 1、2-1 ~ 4 と反応後、組織アレイスライドを、PBS 緩衝液を用いて洗浄した。

【0090】

免疫染色後、形態観察染色 (H E 染色) を行なった。免疫染色した切片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なった後、流水水洗 (約 4 5 °C) を 3 分間行なった。次に、1 % エオジン液で 5 分間染色してエオジン染色を行なった後、純エタノールに 5 分間つける操作を 4 回行ない、洗浄・脱水を行なった。続いてキシレンに 5 分間つける操作を 4 回行ない、透徹を行なった。最後に、封入剤エンテランニュー (M e r c k 社製) を用いて封入し観察用サンプルスライドとした。

【0091】

サンプル 1-1 ~ 1 1、2-1 ~ 4 で免疫染色してその後に形態観察染色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、倒立型蛍光顕微鏡 (カールツァイス社製) を用いて画像を取得した。

【0092】

励起波長 (nm) ・蛍光波長 (nm) は光学フィルターにより設定し、励起は 5 7 5 - 6 0 0 nm、蛍光は 6 1 2 - 6 8 2 nm とした。(なお、表 1、表 2 では、粒子の吸収極大波長・発光極大波長を記している。)。顕微鏡観察、画像取得時の励起波長条件は、5 8 0 nm 励起では視野中心部付近の照射エネルギーが 9 0 0 W / c m² となるようにした。3 6 5 nm 励起では視野中心部付近の照射エネルギーが 5 0 0 W / c m² となるように 50

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任意に設定し画像を取得した。例えば4000 μ 秒で測定を行なった。

【0093】

画像解析ソフトであるImage-Jを用いて取得画像より各画素の輝度を算出し、サンプル1-1~11、2-1~4の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。輝度は「0」を黒（一番暗い）と、「255」を白（一番明るい）としている。同時に、蛍光標識された細胞近傍の、蛍光標識体によって染色されておらず且つエオジンによって染色された部位（形態観察染色部）についても平均輝度（形態観察染色部輝度）を算出した。当該平均輝度はノイズ値（N）に対応する。免疫染色部輝度と形態観察染色部輝度との比をS/N比とした。

10

【0094】

免疫染色部と形態観察染色部の退色評価は、30分間視野を動かさない状態として励起光を照射し続け、照射前（照射開始時点、0分）および照射後（30分）の顕微鏡画像の両方から、免疫染色部輝度および形態観察染色部輝度を取得し、それぞれについて（30分照射後の輝度／照射直後の輝度）で表される輝度保持率を算出することにより行った。また、照射前のS/N比と照射後のS/N比を算出し、（照射後のS/N比－照射前のS/N比）／照射前のS/N比、で表わされる照射前後のS/N比変化率を算出した。この値を励起光照射前後の見え方の違いの指標とすることとした。

【0095】

20

さらに、上記の免疫染色および形態観察染色を同時にした切片の連続切片を用いて、DAB染色を行い、細胞膜上のHER2の発現が少ない（1+）領域をあらかじめ設定しておいた。免疫染色および形態観察染色を同時にした切片における、それに対応する領域について、照射前後で蛍光顕微鏡観察による目視評価を行ない、照射前後で判定が変わらないものは○、判定が変わったものは×、とした。

【0096】

【表 1】

	実施例1		実施例2		実施例3		実施例4		実施例5	
	0分	30分	0分	30分	0分	30分	0分	30分	0分	30分
色素	TexasRed		ATTO590		Cresyl violet		ペリレン		TexasRed	
母体	シリカ		シリカ		シリカ		シリカ		メラミン	
吸収極大波長(nm)	585		594		600		580		590	
発光極大波長(nm)	613		624		620		620		612	
エオジン部輝度	20	16	20	16	20	16	20	16	20	16
蛍光体部輝度	80	59	80	60	80	52	80	71	80	58
S/N比	4.0	3.7	4.0	3.8	4.0	3.3	4.0	4.4	4.0	3.6
照射前後のS/N比変化率(%)	-8		-5		-18		10		-10	
エオジン部の0分輝度に対する30分輝度保持率(%)	80		80		80		80		80	
蛍光体部の0分輝度に対する30分輝度保持率(%)	74		75		66		89		73	
エオジン部輝度保持率に対する蛍光体部輝度保持率の割合(%)	92		94		82		111		91	
0分と30分の目視評価結果の一致	○		○		○		○		○	

10

実施例6		実施例7		実施例8		実施例9		実施例10		実施例11	
0分	30分	0分	30分	0分	30分	0分	30分	0分	30分	0分	30分
ATTO590		ペリレン		TexasRed		ATTO590		Cresyl Violet		ペリレン	
メラミン		メラミン		架橋PS		架橋PS		架橋PS		架橋PS	
595		580		580		594		600		580	
624		625		615		624		620		620	
20	16	20	16	20	16	20	16	20	16	20	16
80	58	80	72	80	64	80	68	80	67	80	77
4.0	3.6	4.0	4.5	4.0	4.0	4.0	4.2	4.0	4.2	4.0	4.8
-10		13		0		5		5		20	
80		80		80		80		80		80	
72		90		80		85		83		96	
90		112		100		106		104		120	
○		○		○		○		○		○	

20

比較例1		比較例2		比較例3		比較例4	
0分	30分	0分	30分	0分	30分	0分	30分
cy3.5		cy3.5		BODIPY TR		BODIPY TR	
シリカ		メラミン		シリカ		メラミン	
581		590		588		592	
596		608		616		620	
20	16	20	16	20	16	20	16
80	44	80	42	80	49	80	47
4.0	2.7	4.0	2.6	4.0	3.1	4.0	3.0
-33		-35		-23		-25	
80		80		80		80	
54		53		62		59	
68		66		77		74	
×		×		×		×	

30

【0097】

表1、図2の実施例1～11がサンプル1-1～11、比較例1～4がサンプル2-1～4に対応する。各実施例、比較例で粒子の色素、母体が異なっており、励起光後の輝度変化の割合が異なっている。このため、形態観察染色部輝度に対する免疫染色部輝度の比であるS/N比も、励起光照射の照射前後で変化している。実施例である、形態観察染色部の輝度保持率に対する免疫染色部の輝度保持率が80～120%の範囲であると、細胞膜上のHER2の発現が少ない(1+)領域について、励起光照射前後で評価が同じとなり、観察サンプルの見え方に大きな影響がない結果となった。一方、比較例である、形態観察染色部の輝度保持率に対する免疫染色部の輝度保持率が80～120%の範囲から外れたものでは、励起光照射前後で評価が異なり、観察サンプルの見え方に影響を与える結果となった。

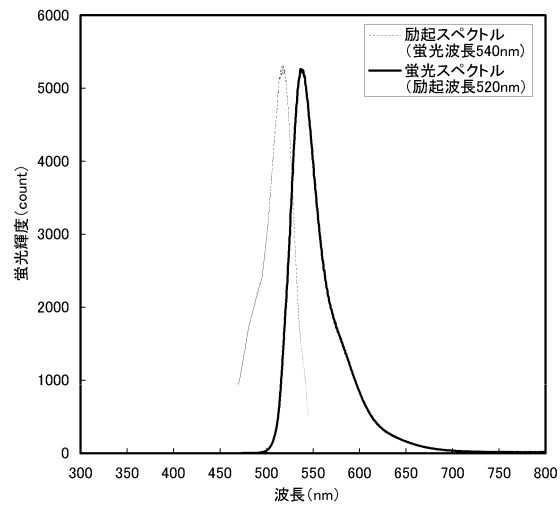
40

【0098】

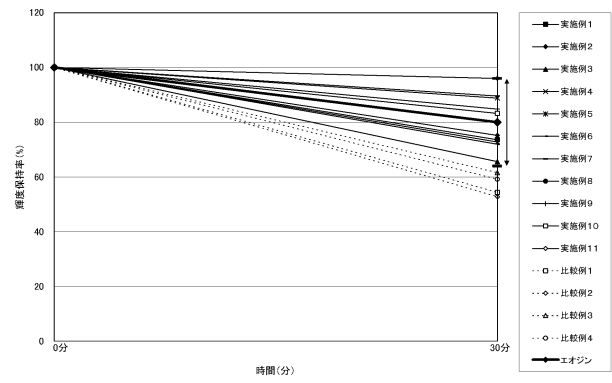
以上から、形態観察染色と免疫染色を同時に行なう場合において、蛍光標識体や染色剤の劣化が生じてても、免疫染色に用いる蛍光標識体の観察の際に、免疫染色部の輝度保持率が形態観察染色部の輝度保持率の80%～120%の範囲であれば、適切に判断できることが分かる。

50

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 0 9 K 11/06 (2006.01) C 0 9 K 11/06
 G 0 1 N 21/64 E

(出願人による申告)平成23年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「がん超早期診断・治療機器の総合研究開発／超早期高精度診断システムの研究開発：病理画像等認識技術の研究開発／病理画像等認識自動化システムの研究開発（1粒子蛍光ナノイメージングによる超高精度がん組織診断システム）」共同研究産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開平06-160387 (JP, A)
 特表2008-543982 (JP, A)
 米国特許出願公開第2004/0101822 (US, A1)
 特表2002-501184 (JP, A)
 特開2010-229219 (JP, A)
 特表2005-524051 (JP, A)
 米国特許出願公開第2004/0197839 (US, A1)
 国際公開第2012/029752 (WO, A1)
 Linyong Zhu, Reversibly Photoswitchable Dual-Color Fluorescent Nanoparticles as New Tools for Live-Cell Imaging, Journal of the American Chemical Society, 2007年 3月 28日, Vol.129/Iss.12, 3524-3526
 Michael J. Murcia and Christoph A. Naumann, Biofunctionalization of Fluorescent Nanoparticles, Biofunctionalization of Nanomaterials, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim Edited by Challa S. S. R. Kumar, 2005年11月, Page.1-40
 J. Paul Robinson PhD, Jennifer Sturgis BS and George L. Kumar PhD, Chapter 10 | Immunofluorescence, Education Guide: Immunohistochemical Staining Methods Fifth Edition, George L Kumar PhD and Lars Rudbeck PhD, 2009年, Page.61-69

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 33/543
 C 0 9 K 11/06
 G 0 1 N 21/64
 G 0 1 N 33/48
 G 0 1 N 33/53
 G 0 1 N 33/533

专利名称(译)	用于检测生物材料的荧光标签		
公开(公告)号	JP6112169B2	公开(公告)日	2017-04-12
申请号	JP2015186551	申请日	2015-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	高梨健作 岡田尚大 中野寧		
发明人	高梨 健作 岡田 尚大 中野 寧		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/48 G01N33/53 G01N21/64 G01N33/533 C09K11/06		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N2021/6439 G01N33/56966 G01N33/57492 G01N33/582 G01N2333/70596		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N21/64.F G01N33/533 C09K11/06 G01N21/64.E G01N33/48.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA04 2G043/BA16 2G043/CA05 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/FA01 2G043/FA02 2G043/FA06 2G043/GA07 2G043/GB16 2G043/JA02 2G043/JA03 2G043/KA02 2G043/KA03 2G043/KA05 2G043/LA03 2G043/MA16 2G043/NA05 2G045/FB12		
审查员(译)	三木隆		
优先权	2011197339 2011-09-09 JP		
其他公开文献	JP2016027340A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种生物物质检测方法，用于从病理标本中特异性地检测生物物质，通过该方法，当使用荧光标记进行免疫染色和使用形态学观察用染色剂进行形态学观察的染色同时进行，荧光的结果即使荧光标记和/或染色剂因激发光照射而恶化，也可以适当地评估观察和免疫染色。根据本发明的生物物质检测方法的特征在于免疫染色部分的亮度保持率相对于荧光标记时形态观察染色部分的亮度保留率而在80%至120%的范围内。观察到用于免疫染色的。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特 許 公 報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6112169号 (P6112169)
(45) 発行日 平成29年4月12日 (2017. 4. 12)	(24) 登録日 平成29年3月24日 (2017. 3. 24)	
(51) Int. Cl. G 0 1 N 33/543 (2006. 01) G 0 1 N 33/48 (2006. 01) G 0 1 N 33/53 (2006. 01) G 0 1 N 21/64 (2006. 01) G 0 1 N 33/533 (2006. 01)	F I G O 1 N 33/543 G O 1 N 33/48 G O 1 N 33/53 G O 1 N 21/64 G O 1 N 33/533	5 7 5 P Y F
請求項の数 4 (全 17 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2015-186551 (P2015-186551) (22) 出願日 平成27年9月24日 (2015. 9. 24) (62) 分割の表示 特願2013-532608 (P2013-532608)の分割 原出願日 平成24年9月4日 (2012. 9. 4) (65) 公開番号 特開2016-27340 (P2016-27340A) (43) 公開日 平成28年2月18日 (2016. 2. 18) 審査請求日 平成27年9月24日 (2015. 9. 24) (31) 優先権主張番号 特願2011-197339 (P2011-197339) (32) 優先日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9) (33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(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 110001070 (74) 代理人 高梨 健作 特許業務法人 S S I N P A T 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 岡田 尚大 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	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 生体物質検出用の蛍光標識体		