

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02018/151071

発行日 令和1年12月12日 (2019.12.12)

(43) 国際公開日 平成30年8月23日 (2018.8.23)

(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	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	GO 1 N 33/53 M	
	C 1 2 Q 1/6841 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

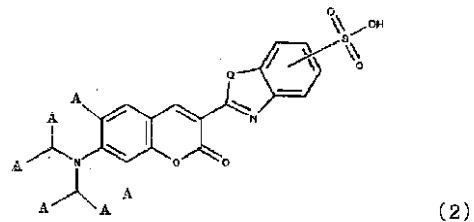
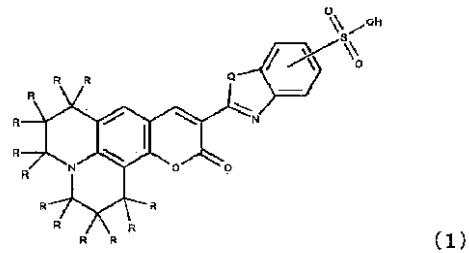
出願番号 特願2018-568515 (P2018-568515)	(71) 出願人 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2018/004802	
(22) 国際出願日 平成30年2月13日 (2018.2.13)	
(31) 優先権主張番号 特願2017-24875 (P2017-24875)	(74) 代理人 110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(32) 優先日 平成29年2月14日 (2017.2.14)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(72) 発明者 西川 賢司 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内
	(72) 発明者 高梨 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 磯田 武寿 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光標識法

(57) 【要約】

本発明は、下記式(1)または(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物またはその塩を母体粒子に内包してなるアミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行う蛍光標識法である。式(1)中、Rは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、はイオウ原子、酸素原子またはN-R¹を表わし、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。式(2)中、Aは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R¹を表わし、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。本発明の蛍光標識法によると、緑色の輝点が明瞭であり、多色同時染色の場合、他の色領域、たとえば赤色領域への漏れ込みが小さく、緑色の輝点と赤色の輝点との良好なバランスが得られる。

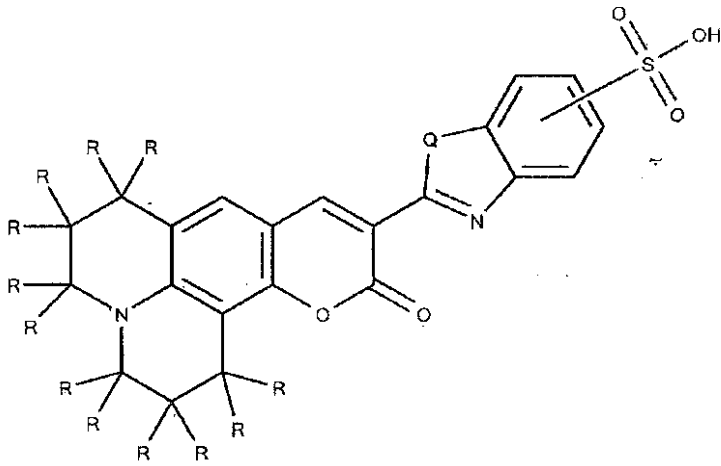


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記式(1)または(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物またはその塩を母体粒子に内包してなるアミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行う蛍光標識法。

【化 1】



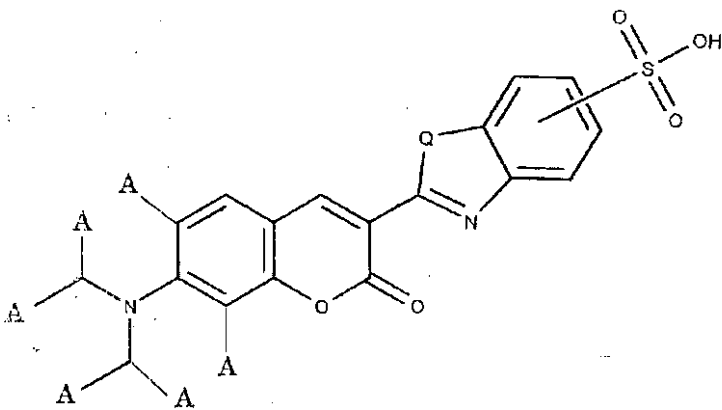
(1)

10

20

(式(1)中、Rは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R¹を表わし、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。)

【化 2】



(2)

30

(式(2)中、Aは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R¹を表わし、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。)

【請求項 2】

前記アミノクマリン化合物内包粒子の平均粒径が80~200nmである請求項1に記載の蛍光標識法。

40

【請求項 3】

前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いた標識を含む多重標識を行う請求項1または2に記載の蛍光標識法。

【請求項 4】

免疫染色法またはFISHである請求項1~3のいずれかに記載の蛍光標識法。

【請求項 5】

前記免疫染色法は、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48、CD59、IDO、TDO、CSF-1R、HDAC、CXCR4、FLT-3、TIGIT、INF-、INF-、INF-、INF-、INF-、INF-、INF-、CSF、EPO、EGF、FGF、PDGF、HGF、TGF、CD3、CD4、CD25、CD28、CD80、

50

CD86、CD160、CD57、OX40、OX40L、ICOS、ICOSL、CD155、CD226、CD112、CD27、CD70、4-1BB、4-1BBL、GITR、GITRL、BTLA、HVEM、TIM-3、Galectin-9、LAG-3、B7-H3、B7-H4、B7-H5、CD40、CD40L、PD-1、PD-L2、2B4、KLRG-1、E-Cadherin、N-Cadherin、R-Cadherin、CD68、CD163およびCSF1-Rから選択される少なくとも2つの染色対象タンパク質に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重染色を行い、前記染色対象タンパク質の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて染色する請求項4に記載の蛍光標識法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、色素としてアミノクマリン化合物を用い、このアミノクマリン化合物が内包されたアミノクマリン化合物内包樹脂粒子により標識を行う、免疫染色法およびFISH等の蛍光標識法に関する。

【背景技術】

【0002】

現在、免疫染色法およびFISH等の蛍光標識法が広く利用されている。

たとえば、医療においては、被験者が対象疾患に罹患しているか否かを判断するためのデータを提供するために、被験者の組織切片等について免疫染色が広く行われている。この免疫染色では、例えば、前記罹患の有無によって発現量が増減する生体内の分子（抗原）に、蛍光標識した抗体を特異的に結合させることにより抗原を蛍光標識し、蛍光シグナルの量から疾患に関連する抗原の量を定量することが行われる。蛍光標識した抗体を抗原に結合させる技術として、蛍光色素を粒子に内包させたナノ粒子に抗体を直接的または間接的に結合させ、これを抗原に結合させる技術がたとえば特許文献1に開示されている。

【0003】

蛍光色素としては、緑色領域、赤色領域、オレンジ色領域および遠赤外線領域の各領域において発光を呈する色素がそれぞれ用いられている。異なる領域において発光する2種以上の色素を用いて、2つ以上の領域において同時に標識を行う多重標識は、きわめて有効な標識手段であって、その技術の発展が期待されている。

【0004】

緑色領域で発光する色素としては、たとえば特許文献2に記載されたPyrrromethene556が挙げられる。

しかし、Pyrrromethene556を内包したナノ粒子を用いて蛍光標識を行うと、緑色の輝点が不明瞭であり、また多重標識の場合、他の色領域への漏れ込みが大きく、効果的な観察ができないという問題があった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】WO2015/159776

【特許文献2】WO2012/133920

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、上記のような従来技術に伴う問題を解決しようとするものであって、緑色の輝点が明瞭であり、多重標識の場合、他の色領域への漏れ込みが小さい蛍光標識法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意研究した結果、緑色色素として特定構造を

10

20

30

40

50

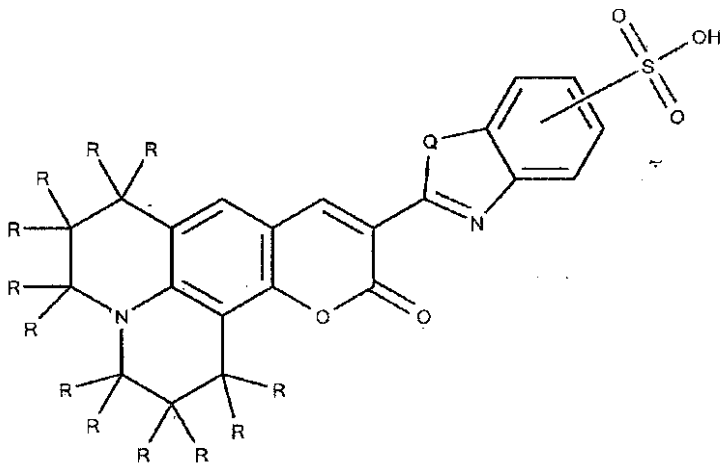
有するアミノクマリン化合物を用い、このアミノクマリン化合物が内包されたアミノクマリン化合物内包粒子により標識を行うことにより上記の課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明の蛍光標識法は、下記式(1)または(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物またはその塩を母体粒子に内包してなるアミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行う蛍光標識法である。

【0009】

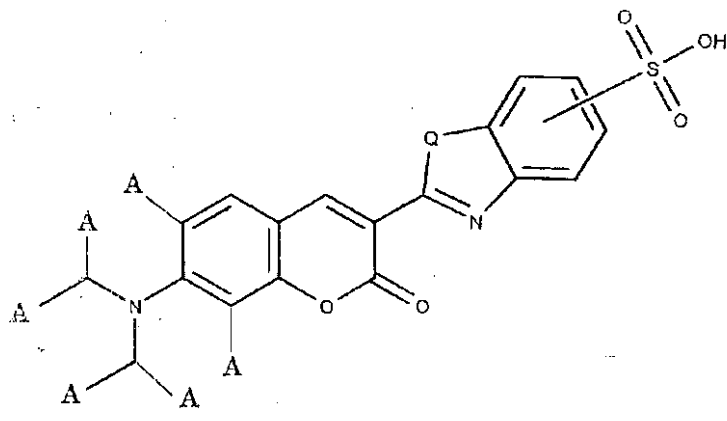
【化1】



(式(1)中、Rは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R¹を表わし、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。)

【0010】

【化2】



(式(2)中、Aは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わし、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R¹を表わし、R¹は水素原子またはメチル基を表わす。)

40

【0011】

前記蛍光標識法において、前記アミノクマリン化合物内包粒子の平均粒径が80~200nmであることが好ましい。

前記蛍光標識法は、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いた標識を含む多重標識を行うことができる。

前記蛍光標識法は、たとえば免疫染色法およびFISHである。

【0012】

前記免疫染色法の好適な態様として、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48、CD59、IDO、TDO、CSF-1R、HDAC、CXCR4、FLT-3

50

、 TIGIT、 INF- 、 INF- 、 INF- 、 INF- 、 INF- 、 INF- 、 INF- CSF、 EPO、 EGF、 FGF、 PDGF、 HGF、 TGF、 CD3、 CD4、 CD25、 CD28、 CD80、 CD86、 CD160、 CD57、 OX40 (CD134)、 OX40L (CD252)、 ICOS (CD278)、 ICOSL (CD275)、 CD155、 CD226、 CD112、 CD27、 CD70、 4-1BB (CD137)、 4-1BBL (CD137L)、 GITR (CD357)、 GITRL、 BTLA (CD272)、 HVEM (CD270)、 TIM-3、 ガレクチン-9 (Galectin-9)、 LAG-3 (CD223)、 B7-H3 (CD276)、 B7-H4、 B7-H5、 CD40、 CD40L、 PD-1、 PD-L2、 2B4 (CD244)、 KLRG-1、 E-Cadherin、 N-Cadherin、 R-Cadherin、 CD68、 CD163およびCSF1-Rから選択される少なくとも2つの染色対象タンパク質に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重染色を行い、前記染色対象タンパク質の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて染色する蛍光標識法を挙げることができる。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明の蛍光標識法により蛍光標識を行うと、緑色の輝点が明瞭であり、多重標識の場合、他の色領域、たとえば赤色領域への漏れ込みが小さく、緑色の輝点と赤色の輝点との良好なバランスが得られる。

【発明を実施するための形態】

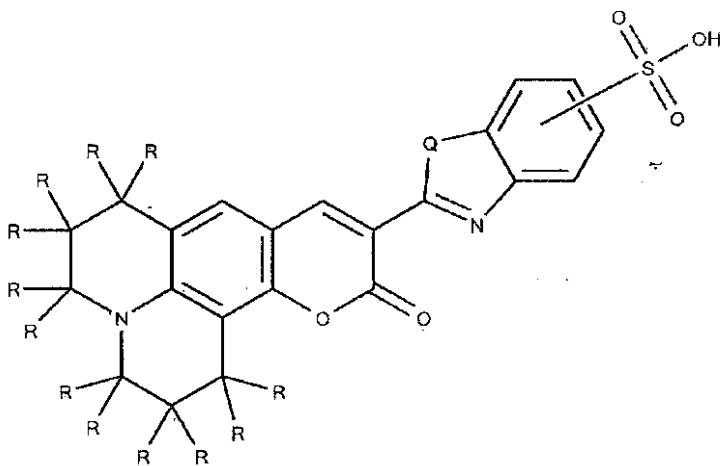
【0014】

本発明の蛍光標識法は、下記式(1)または(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物またはその塩を母体粒子に内包してなるアミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行う蛍光標識法である。

20

【0015】

【化3】

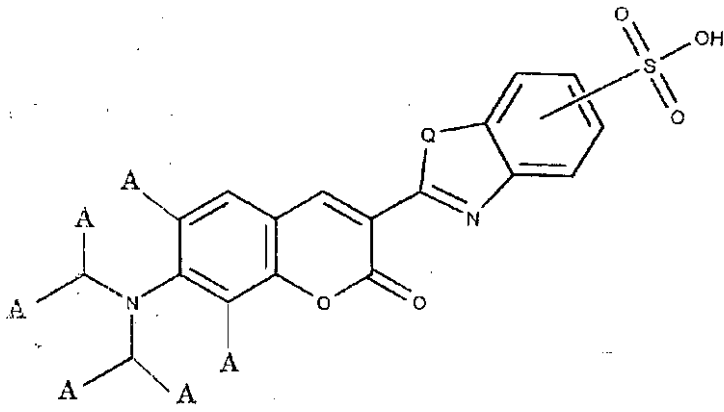


30

【0016】

40

【化4】



10

式(1)中、13個のRは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わす。

式(2)中、6個のAは、それぞれ独立に水素原子またはメチル基を表わす。

【0017】

式(1)および(2)中、Qはイオウ原子、酸素原子またはN-R¹を表わす。前記R¹は水素原子またはメチル基を表わす。本発明のアミノクマリン化合物は、式(1)または(2)のQがイオウ原子である場合、ベンゾチアゾール構造を有し、酸素原子である場合、ベンゾオキサゾール構造を有し、N-R¹である場合、ベンゾイミダゾール構造を有することになる。

20

【0018】

式(1)および(2)に含まれるスルホン酸基SO₃Hは、前記ベンゾチアゾール構造、ベンゾオキサゾール構造またはベンゾイミダゾール構造に含まれるベンゼン環が有する結合可能な4つの炭素原子のうちどの炭素原子に結合していてもよい。

【0019】

式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物と式(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物とは、スルホン化されたベンゾチアゾール残基、ベンゾオキサゾール残基またはベンゾイミダゾール残基を有するアミノクマリン構造を有する点において共通する。

30

【0020】

式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物は、クマリン構造に結合する窒素原子が、クマリン構造に含まれるベンゼン環の4つの炭素原子とともに、2つの6員環を形成している点、すなわちアミノクマリンのアミノ基がジュロリジン構造となっている点で公知のスルホン化クマリン系化合物と構造が相違する。

【0021】

式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物は、公知のスルホン化クマリン系化合物よりも、励起波長が長波長であり、最大励起強度を与える波長が475nm以上であり、たとえば475~510nmである。また、本発明のアミノクマリン化合物は、発光波長も公知のスルホン化クマリン系化合物より長波長であり、最大発光強度を与える波長が510nm以上であり、たとえば510~540nmである。

40

【0022】

式(1)で表わされるアミノクマリン化合物は、該アミノクマリン化合物のスルホン基を水素原子で置換して形成されるアミノクマリン化合物に比較して、発光強度が強いという特徴を有する。

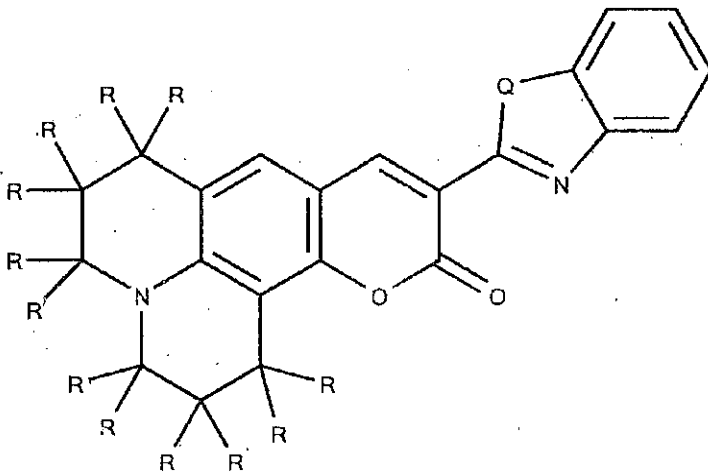
【0023】

式(1)で示される構造を有するアミノクマリン化合物は、たとえば、下記式(3)で示される構造を有するクマリン化合物をスルホン化する方法により製造することができる。具体的には、式(3)で示されるクマリン化合物0.1gに対して発煙硫酸を1ml加えて、0~140℃で、1~8時間反応させることにより製造することができる。

50

【0024】

【化5】



10

(3)

(式(3)中のRおよびQは、それぞれ式(1)中のRおよびQと同義である。)

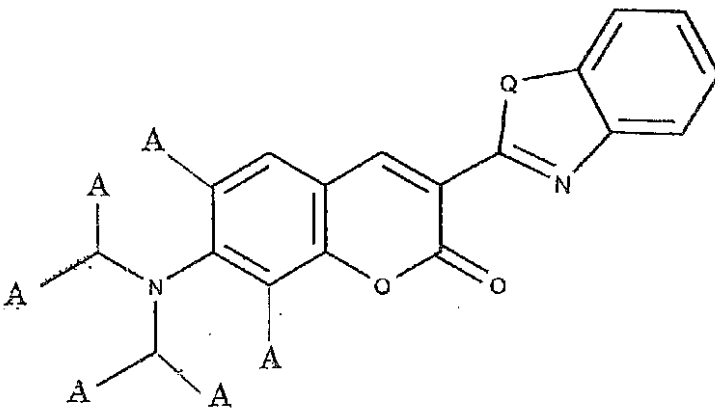
【0025】

式(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物は、たとえば、下記式(4)で示される構造を有するクマリン化合物をスルホン化する方法により製造することができる。具体的には、式(4)で示されるクマリン化合物0.1gに対して発煙硫酸を1ml加えて、0~140℃で、1~8時間反応させることにより製造することができる。

20

【0026】

【化6】



30

(4)

(式(4)中のAおよびQは、それぞれ式(2)中のRおよびQと同義である。)

【0027】

前記アミノクマリン化合物内包粒子は、式(1)または式(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物と該アミノクマリン化合物を内包する母体粒子とを有する。

40

アミノクマリン化合物を内包する母体粒子は、有機粒子または無機粒子であり、アミノクマリン化合物を内包できる限り特に制限はない。

前記有機粒子としては、熱硬化性樹脂であることが好ましい。熱硬化性樹脂は三次元的な網目構造を有するので、これに包み込まれたアミノクマリン化合物は樹脂粒子から離脱しにくく、免疫染色等の蛍光標識において好適である。熱硬化性樹脂としては、メラミン樹脂、尿素樹脂、アニリン樹脂、グアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂およびフラン樹脂等を挙げることができる。これらの中でも、メラミン樹脂、尿素樹脂等のアミノ樹脂は、色素の樹脂粒子からの離脱をより効果的に抑止できる点で、特に好ましい。

【0028】

前記無機粒子としては、シリカ粒子、ガラス粒子等を例示できる。

50

母体粒子に内包されるアミノクマリン化合物の量は、特に制限はなく、アミノクマリン化合物内包粒子を免疫染色等の蛍光標識に用いる場合に、検出可能な輝度を確保できる量であればよい。

【0029】

アミノクマリン化合物内包粒子の平均粒径は、特に制限はないが、免疫染色等の蛍光標識に用いる場合には、通常20～500nm、好ましくは80～200nmである。アミノクマリン化合物内包粒子の平均粒径が200nmを超えると標識性に問題が生じる場合があり、80nm未満であると、視認性に問題が生じる場合がある。

【0030】

上記平均粒径は、SEM観察でアミノクマリン化合物内包粒子の1000個について粒径を測定し、その平均値として算出される。

アミノクマリン化合物内包粒子の製造方法は、特に制限されず、公知の方法を採用することができる。一般的には、アミノクマリン化合物の存在下に樹脂またはシリカ等の母体を形成し、アミノクマリン化合物を母体粒子の中に内包させる方法を用いることができる。

【0031】

母体粒子が有機粒子である場合には、たとえば、乳化重合法により、母体粒子を合成するための(コ)モノマーを(共)重合させながら、アミノクマリン化合物を添加し、当該(共)重合体の内部または表面にアミノクマリン化合物を取り込ませる方法を用いることができる。

【0032】

母体粒子がシリカ等の無機粒子である場合には、たとえば、ラングミュア 8巻 2921ページ(1992)に記載されているFITC内包シリカナノ粒子の合成方法を参考にすることができる。FITCの代わりにアミノクマリン化合物を用いることでアミノクマリン化合物内包シリカナノ粒子を合成することができる。

【0033】

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、最大励起強度を与える波長が475～510nmであり、最大発光強度を与える波長が510～540nmであることが好ましい。

式(1)で表わされるアミノクマリン化合物を樹脂に内包させて製造されたアミノクマリン化合物内包樹脂粒子は、そのアミノクマリン化合物のスルホン基を水素原子で置換して形成されるアミノクマリン化合物を樹脂に内包させて製造されたアミノクマリン化合物内包樹脂粒子に比較して、発光強度が強い傾向がある。これは、式(1)で表わされるアミノクマリン化合物は、該アミノクマリン化合物のスルホン基を水素原子で置換して形成されるアミノクマリン化合物よりも、樹脂に内包されやすい性質があり、樹脂により多く取り込まれるからであると推測される。

【0034】

本発明の蛍光標識法は、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行う。前記蛍光標識法としては、免疫染色法およびFISH等を挙げることができる。免疫染色法およびFISHの具体的な操作方法は特に限定されず、公知の方法を用いることができる。色素粒子にて標識を行う従来の免疫染色法またはFISHにおいて、前記色素粒子として前記アミノクマリン化合物内包粒子を使用すればよい。

【0035】

免疫染色法の場合、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて、HER2およびKi67の他、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48およびCD59などの染色対象タンパク質に対しても染色することができる。

【0036】

本発明の蛍光標識法は、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いた標識を含む多重標識であってもよい。すなわち、2つ以上の標識対象に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重標識を行い、その染色対象の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識することができる。たとえば、複数の標識対象について、そのうちの一部の

10

20

30

40

50

標識対象に対して前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行い、他の標識対象に対して緑色以外の発光を示す色素を含む粒子を用いて標識を行って、複数の標識対象を緑色と緑色以外の色とで別々に標識化することができる。

【0037】

たとえば、免疫染色法においては、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48およびCD59から選択される少なくとも2つの染色対象タンパク質に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重染色を行い、前記染色対象タンパク質の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて染色することができる。そうすれば、たとえば、PDL1をアミノクマリン化合物内包粒子によって緑色に染色し、CTLA4を赤色で染色して、PDL1とCTLA4とを異なる色で標識化するということが可能になる。

この多重染色においては、PDL1、CTLA4、CD8、CD30、CD48、CD59、IDO、TDO、CSF-1R、HDAC、CXCR4、FLT-3、TIGIT、INF-、INF-、INF-、INF-、INF-、INF-、INF-、CSF、EPO、EGF、FGF、PDGF、HGF、TGF、CD3、CD4、CD25、CD28、CD80、CD86、CD160、CD57、OX40（別名CD134）、OX40L（別名CD252）、ICOS（別名CD278）、ICOSL（別名CD275）、CD155、CD226、CD112、CD27、CD70、4-1BB（別名CD137）、4-1BBL（別名CD137L）、GITR（別名CD357）、GITRL、BTLA（別名CD272）、HVEM（別名CD270）、TIM-3、Galectin-9、LAG-3（別名CD223）、B7-H3（別名CD276）、B7-H4、B7-H5、CD40、CD40L、PD-1、PD-L2、2B4（別名CD244）、KLRG-1、E-Cadherin、N-Cadherin、R-Cadherin、CD68、CD163およびCSF1-Rから選択される少なくとも2つの染色対象タンパク質に対してそれぞれ異なる色素を用いて多重染色を行い、前記染色対象タンパク質の少なくとも1つを、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて染色することができる。

【0038】

前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行うと、明瞭な緑色の輝点を確認でき、赤色領域などの他の色領域への漏れ込みが小さい。このため、特定の標識対象に対して前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて緑色の標識を行い、他の染色対象に対して赤色色素を含む色素粒子を用いて赤色の標識を行うと、得られる緑色の輝点は赤色領域への漏れ込みが小さく、緑色の輝点と赤色の輝点との良好なバランスが得られる。

【0039】

前記アミノクマリン化合物は、前記アミノクマリン化合物以外のクマリン化合物に比較して、赤色領域に近い発光領域を有するが、前記アミノクマリン化合物内包粒子を用いて標識を行うと、前記アミノクマリン化合物以外のクマリン化合物を含む色素粒子よりも、赤色領域への漏れ込みがむしろ小さいという効果が得られる。

【実施例】

【0040】

[合成例1]

20 mLバイアル管瓶に下記式(5)で表わされる化合物 600 mgを入れ、発煙硫酸 6 mLを加えて、25℃にて4時間攪拌し、反応を行った。反応の進行はTLCにて確認した。具体的には、反応液の一部をNaOH水溶液にて中和した後、反応液にエタノールを加え、CHCl₃を2、MeOHを3の割合で混合した溶液を用いてTLCを行った。原料のRf値0.88に対し、目的物のRf値0.73であり、このTLCのデータより、反応の収束および目的物の生成を確認した。

【0041】

50 mLバイアル管瓶に氷を8分目(30 mL)まで入れ、この中に反応液を少しずつ加えた。生成した色素が懸濁した懸濁液が得られた。この懸濁液を遠心分離し、上澄み液を除去して色素を沈殿として回収した。沈殿を純水10 mLで分散し、この分散液を遠心分離して、上澄み液を除去して、沈殿を回収し、再度、純水10 mLで分散し、この分散

10

20

30

40

50

液を遠心分離して上澄み液を除去して、沈殿を回収した。回収した沈殿をエタノールで分散し、この分散液を遠心分離し、上澄み液を除去して、沈殿として下記式(Ⅰ)で表わされるアミノクマリン化合物Ⅰを得た。アミノクマリン化合物Ⅰの収率は80%であった。

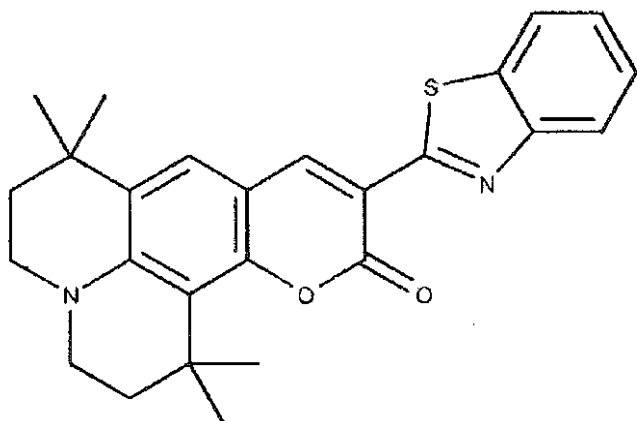
【0042】

得られた沈殿物を乾燥後、得られた粉末を純水に加えた後、NaOH水溶液で中和し、沈殿を溶解し、溶液のpHを7~8とした。この溶液を凍結乾燥機にて乾燥する事により、アミノクマリン化合物ⅠのNa塩を得た。アミノクマリン化合物Ⅰは、スルホン酸体では水への溶解性が悪いのに対し、Na塩とする事で、水に速やかに溶解することを確認した。

【0043】

【化7】

10

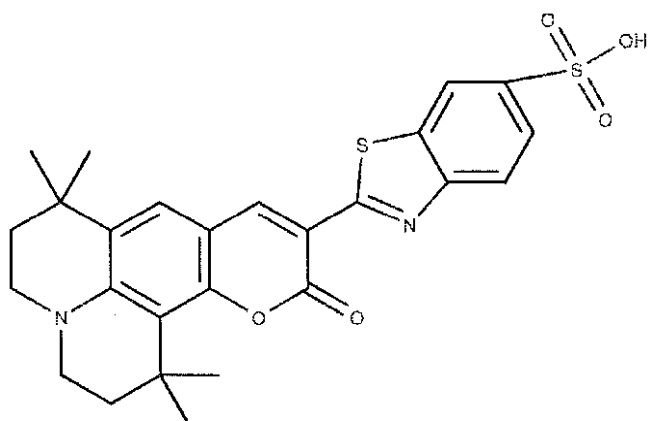


(5)

20

【0044】

【化8】



(Ⅰ)

30

【0045】

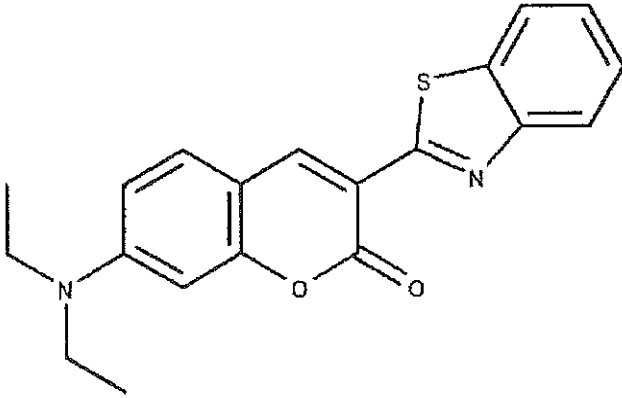
[合成例2]

式(5)で表わされる化合物の代わりに下記式(6)で表わされるアミノクマリン化合物ⅱを用いたこと以外は製造例1と同様の方法により、下記式(Ⅱ)で表わされるアミノクマリン化合物Ⅱを得た。

【0046】

40

【化 9】

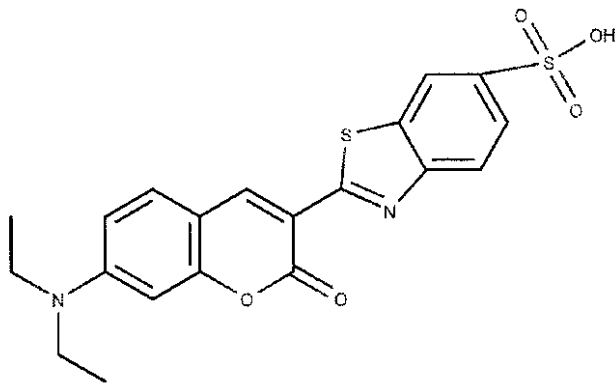


(6)

10

【0047】

【化 10】



(II)

20

【0048】

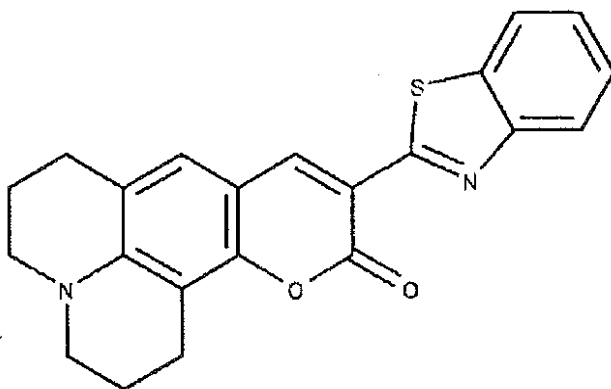
【合成例 3】

式(5)で表わされる化合物の代わりに下記式(7)で表わされるアミノクマリン化合物 i を用いたこと以外は製造例 1 と同様の方法により、下記式(III)で表わされるアミノクマリン化合物 III を得た。

30

【0049】

【化 11】

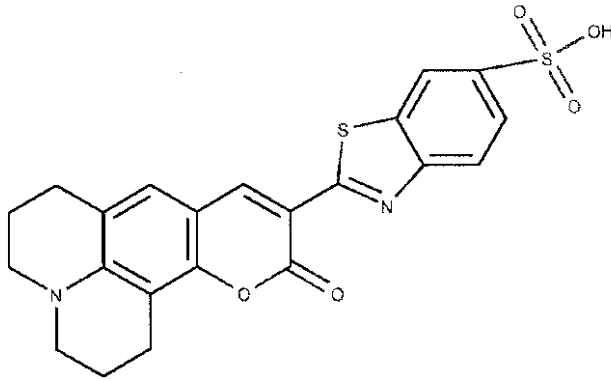


(7)

40

【0050】

【化 1 2】



10

(I I I)

【 0 0 5 1 】

[製造例 1]

アミノクマリン化合物 I 3.4 mg に塩化チオニル 0.1 mL を加え、65℃ 4 時間、加熱混合した後、真空乾燥を行なって余剰の塩化チオニルを除去した。得られたアミノクマリン化合物と塩化チオニルの反応物と 3 - アミノプロピルトリメトキシシラン (3 - aminopropyltrimetoxysilane、信越シリコン社製、KBM903) 3 μ L を 1.2 mL の N,N - ジメチルホルムアミド (DMF) の中で混合し、オルガノアルコキシシラン化合物を得た。

20

【 0 0 5 2 】

得られたオルガノアルコキシシラン化合物液 0.3 mL を、99% エタノール 2.4 mL、テトラエトキシシラン (TEOS) 0.3 mL、超純水 0.75 mL、および 2.8 質量% のアンモニア水 0.75 mL と 25℃ で 3 時間混合した。

【 0 0 5 3 】

上記工程で作製した混合液を 10000 G で 20 分間遠心分離し、上澄みを除去した。この沈殿に対して、エタノールを加えて、沈殿物を分散させ、再度遠心分離をするリンスを行った。さらに同様のリンスを 2 回繰り返し、アミノクマリン化合物内包粒子 I を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 60 nm であった。

30

【 0 0 5 4 】

[製造例 2]

超純水 0.85 mL、アンモニア水 0.85 mL としたこと以外は製造例 1 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 II を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 80 nm であった。

【 0 0 5 5 】

[製造例 3]

超純水 1.10 mL、アンモニア水 1.10 mL としたこと以外は製造例 1 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 III を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 150 nm であった。

40

【 0 0 5 6 】

[製造例 4]

超純水 1.15 mL、アンモニア水 1.15 mL としたこと以外は製造例 1 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 IV を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM 観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は 195 nm であった。

【 0 0 5 7 】

[製造例 5]

超純水 1.20 mL、アンモニア水 1.20 mL としたこと以外は製造例 1 と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子 V を得た。得られた粒子の 1000 個について SEM

50

M観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は220nmであった。

【0058】

[製造例6]

アミノクマリン化合物Iの代わりにアミノクマリン化合物IIを用いたこと以外は製造例3と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子VIを得た。得られた粒子の1000個についてSEM観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は150nmであった。

【0059】

[製造例7]

アミノクマリン化合物I 14.4mgを水22mLに加えて溶解させた。この溶液に乳化重合用乳化剤のエマルジョン(登録商標)430(ポリオキシエチレンオレイルエーテル、花王社製)の5%水溶液を2mL加えた。

【0060】

この溶液をホットスターラー上で攪拌しながら70℃まで昇温させた後、この溶液にメラミン樹脂原料ニカラックMX-035(日本カーバイド工業社製)を0.65g加えた。この溶液に反応開始剤としてドデシルベンゼンスルホン酸(関東化学社製)の10%水溶液を1000μL加え、70℃で50分間加熱攪拌し、その後、90℃に昇温して20分間加熱攪拌した。以上の操作により、アミノクマリン化合物内包粒子VIIを得た。

【0061】

得られたアミノクマリン化合物内包樹脂粒子VIIの分散液から、純水による洗浄を行い、余剰の樹脂原料やアミノクマリン化合物などの不純物を除いた。具体的には、遠心分離機(クボタ社製マイクロ冷却遠心機3740)にて20000Gで15分間、遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再分散した。遠心分離、上澄み除去および超純水への再分散による洗浄を5回繰り返した。

アミノクマリン化合物内包粒子VIIの1000個についてSEM観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は150nmであった。

【0062】

[製造例8]

アミノクマリン化合物Iの代わりにアミノクマリン化合物IIを使用したこと以外は製造例7と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子VIIIを得た。

アミノクマリン化合物内包粒子VIIIの1000個についてSEM観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は150nmであった。

【0063】

[製造例9]

アミノクマリン化合物Iの代わりにアミノクマリン化合物IIIを使用したこと以外は製造例7と同様の方法で、アミノクマリン化合物内包粒子IXを得た。

アミノクマリン化合物内包粒子IXの1000個についてSEM観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は150nmであった。

【0064】

[製造例10]

アミノクマリン化合物Iの代わりに緑色色素であるPyrromethene556を用いたこと以外は製造例1と同様の方法で、色素内包粒子iを得た。得られた粒子の1000個についてSEM観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は150nmであった。

【0065】

[製造例11]

アミノクマリン化合物Iの代わりに緑色色素であるPyrromethene556を用いたこと以外は製造例7と同様の方法で、色素内包粒子iiを得た。得られた粒子の1000個についてSEM観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は150nmであった。

10

20

30

40

50

【0066】

[製造例12]

アミノクマリン化合物Iの代わりに赤色色素であるスルホローダミン101を用いたこと以外は製造例7と同様の方法で、色素内包粒子iiiを得た。得られた粒子の1000個についてSEM観察を行い、平均粒径を測定したところ、平均粒径は150nmであった。

【0067】

[実施例1]

下記の方法により免疫染色を行った。

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子Iを、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)を2mM含有する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となるようにSM(PEG)₁₂(サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecanethyleneglycol]ester)を混合し、5℃で1時間反応させた。

【0068】

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に、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ついたアミノクマリン化合物内包粒子Iを得た。

【0069】

1mg/mLに調整したストレプトアビジン(和光純薬工業社製)40μLを210μLのボレートバッファーに加えた後、64mg/mLに調整した2-イミノチオラン塩酸塩(シグマアルドリッチ社製)70μLを加え、室温で1時間反応させた。これにより、ストレプトアビジンのアミノ基に対してチオール基(-NH-C(=NH₂⁺Cl⁻)-CH₂-CH₂-CH₂-SH)を導入した。

【0070】

このストレプトアビジン溶液をゲルろ過カラム(Zaba Spin Desalting Columns:フナコシ)により脱塩し、上記シリカ系粒子に結合可能なストレプトアビジンを得た。このストレプトアビジン全量(0.04mg含有)とEDTAを2mM含有したPBSを用いて上記0.67nMに調整したシリカ系粒子740μLとを混合し、室温で1時間反応させた。

【0071】

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アミノクマリン化合物内包粒子Iを得た。

【0072】

(ビオチン修飾された2次抗体の作製)

50mM Tris-HCl溶液(pH7.5)に抗ウサギIgG抗体50μgを溶解した。該溶液に、最終濃度3mMとなるようにDTT(dithiothreitol)溶液を混合した。その後、該溶液を37℃で30分間反応させた。その後、脱塩カラムを用いてDTTで還元化した2次抗体を精製した。精製した抗体全量のうち200μLを50mM Tris-HCl溶液(pH7.5)に溶解して抗体溶液を得た。その一方で、スパーサーの長さが30オングストロームであるリンカー試薬「(+)-Biotin-PEG₆-NH₂Mal」(PurePEG社製,製品番号2461006-250)を、DMSOを用いて0.4mMとなるように調整した。この溶液8.5μLを前記抗体溶液に添加し、混和して37℃で30分間反応させた。

【0073】

この反応溶液を脱塩カラム「Zeba Desalt Spin Columns」(サーモサイエンティフィック社製,Cat.#89882)に供して精製した。脱塩した反応溶液の波長300nmの吸収を分

10

20

30

40

50

光高度計（日立製「F - 7000」）により計測して反応溶液に含まれるタンパク質の量を算出した。50 mM Tris 溶液により反応溶液を250 µg/mLに調整し、該溶液をビオチン化2次抗体の溶液とした。

【0074】

（染色）

（1）標本処理工程

（1-1）脱パラフィン処理工程

染色用の組織切片として、HER2（3+）とHER2（-）の組織アレイスライド（コスモバイオ社製「CB - A712のシリーズ」）を用いた。この組織アレイスライドを脱パラフィン処理した。

10

【0075】

（1-2）賦活化処理工程

脱パラフィン処理した組織アレイスライドを水に置換する洗浄を行った。洗浄した組織アレイスライドを10 mMクエン酸緩衝液中（pH 6.0）中で121、15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。賦活化処理後の組織アレイスライドをPBSにより洗浄し、洗浄した組織アレイスライドに対してBSAを1%含有するPBSを用いて1時間ブロッキング処理を行った。

【0076】

（2）免疫染色処理工程

（2-1）1次反応

BSAを1%含有するPBSを用いて、ペンタナ社製「抗HER2ウサギモノクローナル抗体（4B5）」を0.05 nMに調整し、該1次抗体の溶液を上述のブロッキング処理した組織アレイスライドに対して4で1晩反応させた。

20

【0077】

（2-2）2次反応

1次反応を行った組織アレイスライドをPBSで洗浄した後、1%BSA含有のPBSで6 µg/mLに希釈した上記ビオチン化2次抗体と室温30分間反応させた。

【0078】

（2-3）蛍光標識処理

2次反応を行った組織アレイスライドに対して、1%BSA含有のPBSで0.02 nMに希釈したストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子Iを、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。該反応後の組織アレイスライドをPBSで洗浄した。

30

【0079】

（3）形態観察染色工程

免疫染色後、ヘマトキシリン・エオシン染色（HE染色）を行った。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った。その後、該組織切片を45の流水で3分間洗浄した。次に、1%エオシン液で5分間染色してエオシン染色を行った。

【0080】

（4）固定処理工程

免疫染色工程および形態観察染色工程を終えた組織切片に対して、純エタノールに5分間浸漬する操作を4回行い、洗浄・脱水を行った。続いて、キシレンに5分間浸漬する操作を4回行い、透徹を行った。最後に、封入剤（メルク社製「エンテランニュー」）を用いて、組織切片を封入して観察用のサンプルの組織アレイスライドとした。

40

【0081】

（5）観察・計測工程

固定化処理工程を終え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（オリンパス社製「BX - 53」）、顕微鏡用デジタルカメラ（オリンパス社製「DP73」）により観察および撮像を行った。上記励起光は

50

、光学フィルターに通すことで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、光学フィルターを通すことで612～692nmに設定した。顕微鏡観察、画像取得時の励起波長の条件は、580nmの励起で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4000μ秒に設定)して撮像した。HER2(3+)の組織の輝点数は、400倍で撮像した画像をもとにImageJ FindMaxims法により計測した1000細胞の平均値とした。

視野内の細胞膜上の輝点数Sおよび視野内の細胞外の輝点数Nを測定し、S/Nを算出した。S/Nを表1に示す。

【0082】

[実施例2～5、7、8]

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

実施例2～5、7、8においては、アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりにアミノクマリン化合物内包粒子II～VI、VIIをそれぞれ使用したこと以外は実施例1と同様の方法でストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子II～VI、VIIをそれぞれ得た。

【0083】

(ビオチン修飾された2次抗体の作製)

実施例2～5、7、8においては、実施例1と同様の方法でビオチン化2次抗体の溶液を得た。

【0084】

(染色)

実施例2～5、7、8においては、ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりにストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子II～VI、VIIをそれぞれ使用したこと以外は実施例1と同様の方法で、S/Nを算出した。S/Nを表1に示す。

【0085】

[実施例6]

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子Iの代わりにアミノクマリン化合物内包粒子IIIを使用したこと以外は実施例1と同様の方法でストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子IIIを得た。

(ビオチン修飾された2次抗体の作製)

実施例1と同様の方法でビオチン化2次抗体の溶液を得た。

【0086】

(染色)

(1) 標本処理工程

(1-1) 脱パラフィン処理工程

染色用の組織切片としてPDL1の組織アレイスライドを用いた。この組織アレイスライドを脱パラフィン処理した。

【0087】

(1-2) 賦活化処理工程

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

【0088】

(2) 免疫染色処理工程

(2-1) 1次反応

10

20

30

40

50

B S A を 1 % 含有する P B S を用いて、Cell Signaling Technology 社製「抗 PD-L1 ウサギモノクローナル抗体 (E1L3N)」を 0 . 0 5 n M に調整し、該 1 次抗体の溶液を上述のブロッキング処理した組織アレイスライドに対して 4 で 1 晩反応させた。

【 0 0 8 9 】

(2 - 2) 2 次反応

1 次反応を行った組織アレイスライドを P B S で洗浄した後、1 % B S A 含有の P B S で 6 μ g / m L に希釈した上記ビオチン化 2 次抗体と室温 3 0 分間反応させた。

【 0 0 9 0 】

(2 - 3) 蛍光標識処理

2 次反応を行った組織アレイスライドに対して、1 % B S A 含有の P B S で 0 . 0 2 n M に希釈したストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子 I I I を、中性の p H 環境 (p H 6 . 9 ~ 7 . 4) 室温の条件下で 3 時間反応させた。該反応後の組織アレイスライドを P B S で洗浄した。

10

【 0 0 9 1 】

(3) 形態観察染色工程

免疫染色後、ヘマトキシリン・エオシン染色 (H E 染色) を行った。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った。その後、該組織切片を 4 5 の流水で 3 分間洗浄した。次に、1 % エオシン液で 5 分間染色してエオシン染色を行った。

【 0 0 9 2 】

(4) 固定処理工程

免疫染色工程および形態観察染色工程を終えた組織切片に対して、純エタノールに 5 分間浸漬する操作を 4 回行い、洗浄・脱水を行った。続いて、キシレンに 5 分間浸漬する操作を 4 回行い、透徹を行った。最後に、封入剤 (メルク社製「エンテランニュー」) を用いて、組織切片を封入して観察用のサンプルの組織アレイスライドとした。

20

【 0 0 9 3 】

(5) 観察・計測工程

実施例 1 と同様の方法で、S / N を算出した。S / N を表 1 に示す。

【 0 0 9 4 】

[実施例 9]

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子 I の代わりにアミノクマリン化合物内包粒子 V I I I を使用したこと以外は実施例 1 と同様の方法でストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子 V I I I を得た。

30

【 0 0 9 5 】

(ビオチン修飾された 2 次抗体の作製)

実施例 1 と同様の方法でビオチン化 2 次抗体の溶液を得た。

(染色)

ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包シリカナノ粒子 I I I の代わりにストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子 V I I I を使用したこと以外は実施例 6 と同様の方法で、S / N を算出した。S / N を表 1 に示す。

40

【 0 0 9 6 】

[比較例 1]

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子 I の代わりに色素内包粒子 i を使用したこと以外は実施例 1 と同様の方法でストレプトアビジン結合色素内包粒子 i を得た。

【 0 0 9 7 】

(ビオチン修飾された 2 次抗体の作製)

実施例 1 と同様の方法でビオチン化 2 次抗体の溶液を得た。

(染色)

50

ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子 I の代わりにストレプトアビジン結合色素内包粒子 i を使用したこと以外は実施例 1 と同様の方法で、S/N を算出した。S/N を表 1 に示す。

【0098】

[比較例 2]

(色素内包粒子のストレプトアビジン修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子 I の代わりに色素内包粒子 i を使用したこと以外は実施例 1 と同様の方法でストレプトアビジン結合色素内包粒子 i を得た。

【0099】

(ビオチン修飾された 2 次抗体の作製)

実施例 1 と同様の方法でビオチン化 2 次抗体の溶液を得た。

(染色)

ストレプトアビジン結合アミノクマリン化合物内包粒子 I I I の代わりにストレプトアビジン結合色素内包粒子 i を使用したこと以外は実施例 6 と同様の方法で、S/N を算出した。S/N を表 1 に示す。

【0100】

【表 1】

	染色対象	色素	粒子の種類	粒径(nm)	S/N
実施例1	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	60	120
実施例2	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	80	200
実施例3	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	150	205
実施例4	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	195	200
実施例5	HER2	アミノクマリン化合物I	シリカ	220	105
実施例6	PDL1	アミノクマリン化合物I	シリカ	150	120
実施例7	HER2	アミノクマリン化合物II	シリカ	150	190
実施例8	HER2	アミノクマリン化合物II	メラミン樹脂	150	220
実施例9	PDL1	アミノクマリン化合物II	メラミン樹脂	150	120
比較例1	HER2	Pyrrromethene556	シリカ	150	35
比較例2	PDL1	Pyrrromethene556	シリカ	150	35

【0101】

表 1 より、式 (1) または (2) で示される構造を有するアミノクマリン化合物 I ~ I I I を内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行うと、式 (1) または (2) で示される構造を有するアミノクマリン化合物以外の色素である Pyrrromethene556 を内包した色素内包粒子を用いた場合に比較して、S/N が向上することが確認された。

【0102】

[実施例 10]

下記の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。

(色素内包粒子の修飾)

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子 V I I の末端に N H S - P E G (polyethylene glycol) - マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗 H E R 2 抗体を結合させ、抗 H E R 2 抗体結合アミノクマリン化合物内包樹脂粒子を作製した。

上記と同様に、色素内包粒子 $i i i$ の末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗 $K i 6 7$ 抗体を結合させ、抗 $K i 6 7$ 抗体結合色素内包粒子を作製した。

【 0 1 0 3 】

(組織標本の免疫染色)

下記工程 (1) ~ (1 3) によりヒト乳房組織標本の免疫染色 (I H C 法) を行った。

工程 (1) : キシレンを入れた容器に組織標本を 1 5 分浸漬させた。途中 2 回キシレンを交換した。

工程 (2) : エタノールを入れた容器に組織標本を 1 0 分浸漬させた。途中 2 回エタノールを交換した。

工程 (3) : 水を入れた容器に組織標本を 1 0 分浸漬させた。

工程 (4) : 1 0 m M クエン酸緩衝液 (p H 6 . 0) に組織標本を浸漬させた。

工程 (5) : 1 2 1 で 5 分間オートクレーブ処理を行った。

工程 (6) : P B S を入れた容器に、オートクレーブ処理後の組織標本を 1 5 分浸漬させた。途中 3 回 P B S を交換した。

工程 (7) : 1 % B S A 含有 P B S を組織標本に載せて、1 時間放置した。

工程 (8) : 1 % B S A 含有 P B S で 0 . 1 n M に調整した抗 H E R 2 抗体結合アミノクマリン化合物内包樹脂粒子を組織標本に載せて一晩放置し、H E R 2 を標識した。

工程 (9) : P B S を入れた容器に標識後の組織標本を 1 5 分浸漬させた。

工程 (1 0) : 1 % B S A 含有 P B S で 0 . 1 n M に調整した抗 $K i 6 7$ 抗体結合色素内包粒子を、組織標本に載せて一晩放置し、 $K i 6 7$ を標識した。

工程 (1 1) : P B S を入れた容器に標識後の組織標本を 3 0 分浸漬させた。

工程 (1 2) : 組織標本を 4 % 中性パラホルムアルデヒド溶液で 1 0 分間固定処理した後、H E 染色を行った。

工程 (1 3) : Merck 社製 Aquatex を滴下後、カバーガラスを載せ、組織標本を封入した。

10

20

【 0 1 0 4 】

(顕微鏡観察)

蛍光顕微鏡として Carl Zeiss 社製蛍光顕微鏡を、フィルターセットとして Semrock 製フィルターセットを使用した。フィルターセットは免疫染色剤 (緑色用および赤色用) に対応する下記 2 種類を使用した。

30

【 0 1 0 5 】

【 表 2 】

フィルターセット	フィルターセットの励起波長／発光波長	
	緑色用	赤色用
励起フィルター	470nm(波長幅30nm)	586nm(波長幅20nm)
ビームスプリッター	495nm	605nm
蛍光フィルター	525nm(波長幅50nm)	628nm(波長幅32nm)

40

【 0 1 0 6 】

免疫染色後の組織標本をステージに設置し、緑色用および赤色用の 2 種類のフィルターセットを切り替えながら、フィルターセットを切り替えるごとに、組織標本の蛍光像の蛍光輝点数を計測した。結果を表 3 に示す。

【 0 1 0 7 】

[実施例 1 1、1 2]

実施例 1 1 および 1 2 においては、アミノクマリン化合物内包樹脂粒子 V I I の代わりにアミノクマリン化合物内包粒子 I X およびアミノクマリン化合物内包粒子 V I I I をそれぞれ使用したこと以外は実施例 1 0 と同様の方法により多重免疫染色を行った。結果を

50

表 3 に示す。

【 0 1 0 8 】

[比較例 3]

アミノクマリン化合物内包樹脂粒子 V I I の代わりに色素内包粒子 i i を使用したこと以外は実施例 1 0 と同様の方法により多重免疫染色を行った。結果を表 3 に示す。

【 0 1 0 9 】

【 表 3 】

	緑色色素	緑用フィルター		赤用フィルター	
		緑色輝点数	赤色輝点数	緑色輝点数	赤色輝点数
実施例10	アミノクマリン化合物I	4100	24	30	1320
実施例11	アミノクマリン化合物III	4200	36	30	1320
実施例12	アミノクマリン化合物II	3800	58	40	1320
比較例3	Pyromethene556	1500	156	120	1300

10

【 0 1 1 0 】

表 3 より、HER 2 および Ki 6 7 の二重染色の結果、式 (1) または (2) で示される構造を有するアミノクマリン化合物 I ~ I I I を内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行うと、式 (1) または (2) で示される構造を有するアミノクマリン化合物以外の色素である Pyromethene 5 5 6 を内包した色素内包粒子を用いた場合に比較して、緑色輝点の赤色輝点への漏れ込みが少ないことが確認された。

20

【 0 1 1 1 】

さらに、式 (1) または (2) で示される構造を有するアミノクマリン化合物 I ~ I I I を内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行った場合、二重染色の赤輝点数への影響はほとんどないことが表 3 から確認された。

【 0 1 1 2 】

[実施例 1 3]

下記の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。

30

(色素内包粒子の修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子 V I I I の末端に N H S - P E G (polyethylene glyco l) - マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗 C T L A 4 抗体を結合させ、抗 C T L A 4 抗体結合アミノクマリン化合物内包粒子を作製した。

上記と同様に、色素内包粒子 i i i の末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗 P D L 1 抗体を結合させ、抗 C T L A 4 抗体結合色素内包粒子を作製した。

【 0 1 1 3 】

(組織標本の免疫染色)

下記工程 (1) ~ (1 3) によりヒト乳房組織標本の免疫染色 (I H C 法) を行った。

40

工程 (1) : キシレンを入れた容器に組織標本を 1 5 分浸漬させた。途中 2 回キシレンを交換した。

工程 (2) : エタノールを入れた容器に組織標本を 1 0 分浸漬させた。途中 2 回エタノールを交換した。

工程 (3) : 水を入れた容器に組織標本を 1 0 分浸漬させた。

工程 (4) : 1 0 m M クエン酸緩衝液 (p H 6 . 0) に組織標本を浸漬させた。

工程 (5) : 1 2 1 で 5 分間オートクレーブ処理を行った。

工程 (6) : P B S を入れた容器に、オートクレーブ処理後の組織標本を 1 5 分浸漬させた。途中 3 回 P B S を交換した。

工程 (7) : 1 % B S A 含有 P B S を組織標本に載せて、1 時間放置した。

50

工程(8) : 1% BSA含有PBSで0.1 nMに調整した抗CTLA4抗体結合アミノクマリン化合物内包粒子を組織標本に載せて一晩放置し、CTLA4を標識した。

工程(9) : PBSを入れた容器に標識後の組織標本を15分浸漬させた。

工程(10) : 1% BSA含有PBSで0.1 nMに調整した抗CTLA4抗体結合色素内包粒子を、組織標本に載せて一晩放置し、PDL1を標識した。

工程(11) : PBSを入れた容器に標識後の組織標本を30分浸漬させた。

工程(12) : 組織標本を4%中性パラホルムアルデヒド溶液で10分間固定処理した後、HE染色を行った。

工程(13) : Merck社製Aquatexを滴下後、カバーガラスを載せ、組織標本を封入した。

10

(顕微鏡観察)

実施例10と同様の方法で顕微鏡観察を行った。結果を表4に示す。

【0114】

[実施例14]

下記の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。

(色素内包粒子の修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子VIIIIの末端にNHS-PEG (polyethylene glycol) -マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗CD8抗体(Dako社製「抗CD8マウスモノクローナル抗体(C8/144B)」)を結合させ、抗CD8抗体結合アミノクマリン化合物内包粒子を作製した。

20

上記と同様に、色素内包粒子iiiの末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗PDL1抗体を結合させ、抗PDL1抗体結合色素内包粒子を作製した。

【0115】

(組織標本の免疫染色)

下記工程(1)~(13)によりヒト乳房組織標本の免疫染色(IHC法)を行った。

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

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

工程(3) : 水を入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。

30

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

工程(5) : 121 で5分間オートクレーブ処理を行った。

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

工程(7) : 1% BSA含有PBSを組織標本に載せて、1時間放置した。

工程(8) : 1% BSA含有PBSで0.1 nMに調整した抗CD8抗体結合アミノクマリン化合物内包粒子を組織標本に載せて一晩放置し、CD8を標識した。

工程(9) : PBSを入れた容器に標識後の組織標本を15分浸漬させた。

工程(10) : 1% BSA含有PBSで0.1 nMに調整した抗PDL1抗体結合色素内包粒子を組織標本に載せて一晩放置し、PDL1を標識した。

40

工程(11) : PBSを入れた容器に標識後の組織標本を30分浸漬させた。

工程(12) : 組織標本を4%中性パラホルムアルデヒド溶液で10分間固定処理した後、HE染色を行った。

工程(13) : Merck社製Aquatexを滴下後、カバーガラスを載せ、組織標本を封入した。

(顕微鏡観察)

実施例10と同様の方法で顕微鏡観察を行った。結果を表4に示す。

【0116】

[実施例15]

下記の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。

50

(色素内包粒子の修飾)

アミノクマリン化合物内包粒子V I I Iの末端にNH S - P E G (polyethylene glyco I) - マレイミド試薬を用いてマレイミドを導入し、これにチオール化した抗C D 3 0抗体(Dako社製「抗CD30マウスモノクロナール抗体(BerH2))を結合させ、抗C D 3 0抗体結合アミノクマリン化合物内包粒子を作製した。

上記と同様に、色素内包粒子i i iの末端にマレイミドを導入し、これにチオール化した抗P D L 1抗体を結合させ、抗P D L 1抗体結合色素内包粒子を作製した。

【0117】

(組織標本の免疫染色)

下記工程(1)~(13)によりヒト乳房組織標本の免疫染色(IHC法)を行った。

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

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

工程(3):水を入れた容器に組織標本を10分浸漬させた。

工程(4):10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)に組織標本を浸漬させた。

工程(5):121で5分間オートクレーブ処理を行った。

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

工程(7):1%BSA含有PBSを組織標本に載せて、1時間放置した。

工程(8):1%BSA含有PBSで0.1nMに調整した抗C D 3 0抗体結合アミノクマリン化合物内包粒子を組織標本に載せて一晩放置し、C D 3 0を標識した。

工程(9):PBSを入れた容器に標識後の組織標本を15分浸漬させた。

工程(10):1%BSA含有PBSで0.1nMに調整した抗P D L 1抗体結合色素内包粒子を組織標本に載せて一晩放置し、P D L 1を標識した。

工程(11):PBSを入れた容器に標識後の組織標本を30分浸漬させた。

工程(12):組織標本を4%中性パラホルムアルデヒド溶液で10分間固定処理した後、HE染色を行った。

工程(13):Merck社製Aquatexを滴下後、カバーガラスを載せ、組織標本を封入した。

(顕微鏡観察)

実施例10と同様の方法で顕微鏡観察を行った。結果を表4に示す。

【0118】

[比較例4]

アミノクマリン化合物内包粒子V I I Iの代わりに色素内包粒子i iを使用したこと以外は実施例13と同様の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。結果を表4に示す。

【0119】

[比較例5]

アミノクマリン化合物内包粒子V I I Iの代わりに色素内包粒子i iを使用したこと以外は実施例14と同様の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。結果を表4に示す。

【0120】

[比較例6]

アミノクマリン化合物内包粒子V I I Iの代わりに色素内包粒子i iを使用したこと以外は実施例15と同様の方法により緑色および赤色の多重免疫染色を行った。結果を表4に示す。

【0121】

10

20

30

40

【表 4】

	緑色色素	緑色輝点数			赤色輝点数
		CTLA4	CD8	CD30	PDL1
実施例13	アミノクマリン化合物II	2200	-	-	800
実施例14	アミノクマリン化合物II	-	1100	-	800
実施例15	アミノクマリン化合物II	-	-	520	800
比較例4	Pyrrromethene556	920	-	-	720
比較例5	Pyrrromethene556	-	140	-	430
比較例6	Pyrrromethene556	-	-	200	410

10

【0122】

表4より、PDL1とCTLA4、CD8またはCD30との二重染色の結果、式(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物IIを内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行うと、式(1)または(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物以外の色素であるPyrrromethene556を内包した色素内包粒子を用いた場合に比較して、緑色輝点の赤色輝点への漏れ込みが少ないことが確認された。

20

【0123】

さらに、式(2)で示される構造を有するアミノクマリン化合物IIを内包したアミノクマリン化合物内包粒子を用いて免疫染色を行った場合、HER2およびKi67の二重染色の場合と同様に、二重染色の赤輝点数への影響はほとんどないことが表4から確認された。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2018/004802
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. G01N33/53(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) Int.Cl. G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018 Registered utility model specifications of Japan 1996-2018 Published registered utility model applications of Japan 1994-2018 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Caplus/REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2016/129444 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 18 August 2016, see entire text, in particular, claims, paragraphs [0025], [0026], [0040], [0045], [0087], [0095], etc. (Family: none)	1-5
Y	JP 2015-093878 A (KONICA MINOLTA, INC.) 18 May 2015, see entire text, in particular, claims, paragraphs [0028], [0031], [0073], [0080]-[0089], etc. (Family: none)	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 08 May 2018 (08.05.2018)		Date of mailing of the international search report 22 May 2018 (22.05.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/004802

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/045961 A1 (KONICA MINOLTA, INC.) 02 April 2015, see entire text, all drawings, in particular, claims, paragraphs [0022], [0058], [0059], etc. (Family: none)	1-5
Y	JP 2006-045314 A (FUJI ELECTRIC HOLDINGS CO., LTD.) 16 February 2006, see entire text, in particular, paragraphs [0041]-[0043], [0049]-[0052], etc. (Family: none)	1-5
A	JP 06-009892 A (NIPPON KANKO SHIKISO KENKYUSHO KK) 18 January 1994, see entire text, in particular, claims, paragraphs [0006]-[0009], etc. (Family: none)	1-5
A	JP 06-271599 A (BAYER AG.) 27 September 1994, see entire text, etc. & US 5547860 A & EP 608737 A1	1-5
A	JP 07-508309 A (MOLECULAR PROBES, INC.) 14 September 1995, see entire text, etc. & JP 3442777 B2 & JP 2004-2851 A & US 5326692 A & US 5573909 A & US 5723218 A & WO 1993/023492 A1 & EP 596098 A1	1-5
A	JP 2004-309458 A (INST OF PHYSICAL & CHEMICAL RES) 04 November 2004, see entire text, etc. & US 2004/0190134 A1	1-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 0 4 8 0 2									
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)1											
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											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2018年										
日本国実用新案登録公報	1996-2018年										
日本国登録実用新案公報	1994-2018年										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY (STN)											
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 2016/129444 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2016.08.18, 全文、特に、 [特許請求の範囲]、段落[0025]、[0026]、[0040]、[0045]、 [0087]、[0095]等参照 (ファミリーなし)	1-5									
Y	JP 2015-093878 A (コニカミノルタ株式会社) 2015.05.18, 全文、特に、[特 許請求の範囲]、段落[0028]、[0031]、[0073]、[0080] -[0089]等参照 (ファミリーなし)	1-5									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献									
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 08.05.2018		国際調査報告の発送日 22.05.2018									
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) 草川 貴史	2 J 4 0 7 5								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

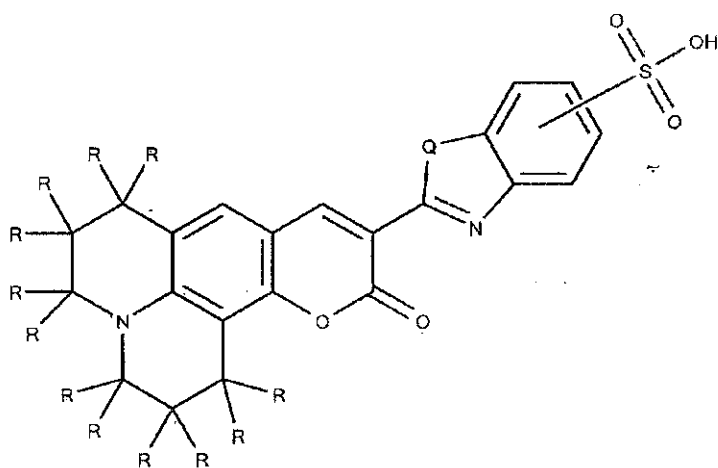
国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 8 / 0 0 4 8 0 2
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2015/045961 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2015.04.02, 全文・全図、特に、[特許請求の範囲]、段落[0022]、[0058]、[0059]等参照 (ファミリーなし)	1-5
Y	JP 2006-045314 A (富士電機ホールディングス株式会社) 2006.02.16, 全文、特に、段落[0041]-[0043]、[0049]-[0052]等参照 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 06-009892 A (株式会社日本感光色素研究所) 1994.01.18, 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落[0006]-[0009]等参照 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 06-271599 A (バイエル・アクチエンゲゼルシャフト) 1994.09.27, 全文等参照 & US 5547860 A & EP 608737 A1	1-5
A	JP 07-508309 A (モレキュラー・プロウブズ・インコーポレーテッド) 1995.09.14, 全文等参照 & JP 3442777 B2 & JP 2004-2851 A & US 5326692 A & US 5573909 A & US 5723218 A & WO 1993/023492 A1 & EP 596098 A1	1-5
A	JP 2004-309458 A (独立行政法人理化学研究所) 2004.11.04, 全文等参照 & US 2004/0190134 A1	1-5

フロントページの続き

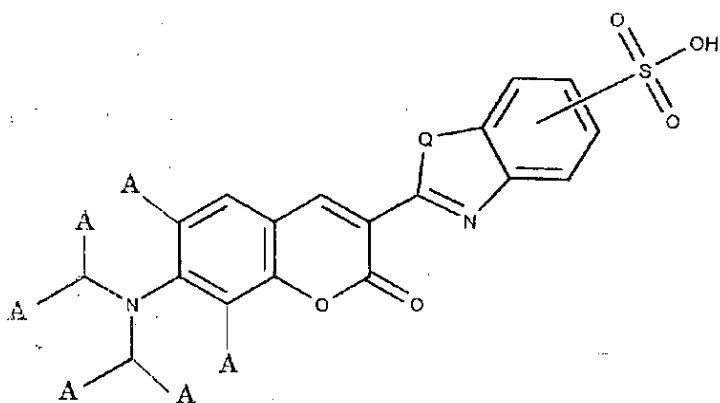
(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM,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

Fターム(参考) 4B063 QA13 QA18 QQ42 QQ61 QR32 QR41 QR56 QS34 QS36 QX02

【要約の続き】



(1)



(2)

(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)	荧光标记法		
公开(公告)号	JPWO2018151071A1	公开(公告)日	2019-12-12
申请号	JP2018568515	申请日	2018-02-13
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	西川賢司 高梨健作 磯田武寿		
发明人	西川 賢司 高梨 健作 磯田 武寿		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/6841		
CPC分类号	C09B57/02 C09B67/0013 C09B67/009 C09B67/0097 G01N33/53 G01N33/533		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/53.M C12Q1/6841.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QQ42 4B063/QQ61 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR56 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
优先权	2017024875 2017-02-14 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是一种荧光标记方法，其中使用通过将具有下式(1)或(2)表示的结构的氨基香豆素化合物或其盐封装在母粒子中而获得的氨基香豆素化合物的封装粒子进行标记。在式(1)中，每个R独立地表示氢原子或甲基，表示硫原子，氧原子或NR1，并且R1表示氢原子或甲基。式(2)中，A独立地表示氢原子或甲基，Q表示硫原子，氧原子或NR1，R1表示氢原子或甲基。根据本发明的荧光标记方法，绿色亮点是透明的，并且在多色同时染色的情况下，泄漏到其他颜色区域中，例如红色区域很小，并且绿色亮点和红色亮点是。获得了良好的平衡。

