

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6168047号  
(P6168047)

(45) 発行日 平成29年7月26日(2017.7.26)

(24) 登録日 平成29年7月7日(2017.7.7)

(51) Int.Cl.		F I			
<b>GO 1 N 33/48</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/48	P	
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N	33/53	Y	
		GO 1 N	33/53	U	

請求項の数 5 (全 27 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2014-507895 (P2014-507895)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成25年3月26日 (2013.3.26)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/JP2013/058701</p> <p>(87) 国際公開番号 W02013/146741</p> <p>(87) 国際公開日 平成25年10月3日 (2013.10.3)</p> <p>審査請求日 平成28年3月7日 (2016.3.7)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2012-80782 (P2012-80782)</p> <p>(32) 優先日 平成24年3月30日 (2012.3.30)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国 (JP)</p>	<p>(73) 特許権者 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号</p> <p>(74) 代理人 110001070 特許業務法人 S S I N P A T</p> <p>(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</p> <p>(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</p> <p>(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</p>
--	---

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織染色方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

同一の特定生体物質に対して、明視野観察可能な染色、および、蛍光染色の両方を行う組織染色方法であって、前記明視野観察可能な染色に用いる標識体と、前記蛍光染色に用いる蛍光標識体とが連続的に結合している組織染色方法。

【請求項 2】

前記明視野観察可能な染色が免疫染色であり、前記蛍光染色が蛍光免疫染色である請求項 1 に記載の組織染色方法。

【請求項 3】

前記蛍光染色に用いる蛍光標識体が、蛍光集積体である請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の組織染色方法。

【請求項 4】

前記明視野観察可能な染色において用いる基質がジアミノベンジジンであり、かつ、前記蛍光染色に用いる蛍光標識体の励起波長が、450 ~ 700 nm である請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の組織染色方法。

【請求項 5】

前記明視野観察可能な染色に用いる標識体と、前記蛍光標識体とが、ビオチン - アビジン結合またはビオチン - ストレプトアビジン結合を介して連続的に結合している請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組織染色方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、組織染色方法に関する。詳しくは、明視野観察可能な染色および発光物質を用いた染色を両方向う組織染色方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

免疫組織化学 (Immunohistochemistry; IHC) は、抗体を用いて組織サンプル中の抗原を検出する組織学 (組織化学) 的手法として広く知られている。この免疫組織化学は、本来不可視である抗原抗体反応を可視化するために発色操作を行う観点から、「免疫染色」などと呼ばれることがある (以下、本明細書においては、この免疫組織化学に対して「免疫組織化学染色」という語を用いることもある。)。抗原抗体反応の所在を可視化するという特徴により、免疫組織化学は、組織サンプル中の生体物質の所在を検出する目的で、医学及び生命化学の分野において広く用いられている。

10

## 【0003】

また、免疫組織化学に関連する組織学 (組織化学) 的手法として、レクチン染色も知られている。このレクチン染色は、レクチンが特定の糖鎖と非免疫的かつ特異的に結合する性質を有することを利用して、レクチンを用いて組織サンプル中の糖鎖を検出する手法であり、糖鎖関連の分野で広く用いられている。

## 【0004】

IHC法では、抗原抗体反応の所在を可視化する方法として、明視野観察可能な染色方法が広く用いられており、具体的には、酵素によって色素沈着性の物質に変換される基質を用いる手法が一般的に用いられている。例えば、臨床現場においては、組織サンプル中のHER2抗原部位に結合した抗HER2抗体を、ジアミノベンジジン (Diaminobenzidine; DAB) を用いて染色して、可視化し、この可視化された抗HER2抗体を通じてHER2の発現量を、明視野観察により検出することが広く行われている。この明視野観察によれば、後述の発光物質を用いる方法に比べ、その染色の色味等のアナログ的に得られる情報を総合的に判断することにより、標的とする分子についてより詳細な情報が得られるという利点がある。

20

## 【0005】

しかしながら、DABのように酵素反応を用いた染色法は反応時間等の染色条件により染色性が変化するため、結果の定量性に課題がある (例えば、非特許文献1、2参照)。また、その判定基準は、染色レベルをスコア0~3とした4段階のみによる大雑把な判定基準であるため定量性に欠けており、さらに、病理医等の熟練度により判定基準が左右されることから、問題となっている。

30

## 【0006】

IHC法では、それ自体が発色性の物質 (以下「発光物質」ともいう。) を用いた可視化の方法も用いられており、例えば、蛍光体が好適に用いられている (蛍光体を用いた免疫染色を、以下「蛍光免疫染色」ともいう。)。蛍光体を用いる可視化の手法によれば、酵素の反応時間等の染色条件による染色性の変化が少ないため再現性に優れ、また、生体物質の所在およびその発現量について、デジタルによる解析が可能であるため、定量性のある評価が可能である (例えば、非特許文献2参照)。

40

## 【0007】

しかしながら、臨床現場においては、上述のDAB等を用いた明視野観察可能な染色方法が長年に亘って使用されており、病理評価におけるノウハウが蓄積されている。このため、熟練した病理医であれば、染色の色味等の情報を基にして、発光物質を用いた方法に比べ、より詳細かつ適切な病理判断を下すことが可能である。

## 【0008】

したがって、蛍光体等の発光物質を用いて可視化された情報のみでは、定量性はあるものの、熟練した病理医の経験を生かした、より詳細かつ適切な病理判断が期待できなくなるという問題点がある。

50

## 【0009】

また、組織サンプル中の生体物質を定量的に検出する検査法としては、遺伝子発現量を評価する fluorescence in situ hybridization 法 (FISH 法) も、臨床現場において用いられている。例えば、HER2 遺伝子を検出するプローブと、17 番染色体セントロメアを検出するプローブを用いて、17 番染色体 1 本あたりの HER2 の遺伝子コピー数を計測し、その結果を基に HER2 遺伝子の増幅の有無を判定することが行われている。

## 【0010】

しかしながら、FISH 法は定量的検査法ではあるが、タンパク質の発現量やその細胞内局在を直接評価する方法ではないことが問題となっている。

10

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0011】

【非特許文献 1】Rimm DL, Nature Biotechnology, vol. 24, No. 8, p. 914 - 916 (2006)

【非特許文献 2】Barrow B et al., Journal of Clinical Pathology, vol. 64, p. 208 - 214 (2011)

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0012】

20

本発明の課題は、前記従来技術の問題点に鑑み、組織サンプル中の生体物質の発現量や所在について、明視野観察可能な染色によって得ることができる詳細な情報、および、蛍光体等の発光物質を用いた染色によって得ることができる定量性の高い情報の両方を取得することができる、高精度の染色を可能とする組織染色法を提供することにある。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0013】

本発明者らは、本発明の目的を達成すべく鋭意検討の結果、明視野観察可能な染色と蛍光染色の両方を、一つの組織切片上の同一の特定生体物質に対して、ともに行うことにより、組織切片における特定生体物質の発現量および局在等について、詳細で、かつ、定量性の高い情報を取得できることを見出し、本発明を完成させるに至った。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、本発明は以下に示す事項を含む。

30

## 【0014】

[1] 同一の特定生体物質に対して、明視野観察可能な染色、および、蛍光染色の両方を行う組織染色方法。

## 【発明の効果】

## 【0015】

本発明によれば、組織切片における特定生体物質の発現量および細胞内局在等の情報について、詳細かつ定量性高く取得できる。また、同一切片を用いて目視による評価とデジタルによる評価のダブルチェックを行うことができ、病理医の熟練度による診断のばらつきをカバーすることができ、結果の判定を適切に行える方法を提供することができる。具体的には、例えば、医師による目視評価後、バーチャルスライドシステム等により自動的に蛍光の輝点をもとにした自動解析を行い、医師の評価と異なる試料を抽出し医師の再評価を提案するシステムなどが挙げられる。さらに、抗体を成分として含む医薬品の有効性の、高精度な判定方法を提供することができる。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0016】

【図 1】 標識化プローブ生体物質の構成の例を示す概念図である。

【図 2】 明視野観察可能な染色に用いる標識体、および蛍光標識体が連続的に結合している標識化プローブ生体物質の一例を示す概念図である。

50

【図3】明視野観察可能な染色に用いる標識体、および蛍光標識体が連続的に結合している標識化プローブ生体物質の一例を示す概念図である。

【図4】実施例6で得られた、同一視野のDAB染色像とビオチン化TXR集積シリカナノ粒子蛍光染色像である。

【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詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

本発明においては、組織サンプル中の発現量および局在等を検出しようとする特定の生体物質（本発明において「検出対象とする生体物質」または「特定生体物質」と称する場合がある。）を、「標識化プローブ生体物質」を用いて組織化学染色をすることにより検出する。

10

【0018】

ここで、「標識化プローブ生体物質」とは、特定生体物質と特異的に結合する生体物質（以下「プローブ生体物質」という。）、および、生体物質を可視化できる物質（以下「標識体」という。）を含む複合体をいう。

【0019】

本発明では、2種類の「標識体」を用いて「標識化プローブ生体物質」を構築する。第1の標識体は、明視野観察可能な染色に用いる標識体（典型的には「色素沈着誘導標識体」）であり、第2の標識体は、蛍光染色に用いる標識体（典型的には「蛍光標識体」）である。

20

【0020】

なお、本発明において、「明視野観察可能な染色」とは、外部からのエネルギーを受けて励起させることなく、通常の光学顕微鏡により目視可能な形で直接可視化されている（つまり可視光を反射する）染色をいう。「目視可能な形で直接可視化」とは、現像等の二次的な操作なしに、生体物質間の特異的結合反応の所在を直接観察することができる状態にすることをいう。「色素沈着誘導標識体」とは、後述する色素沈着を誘導する物質の標識体を、「蛍光標識体」とは、後述する蛍光体の標識体をいう。

【0021】

< 標識体、プローブ生体物質、および標識化プローブ生体物質 >

30

《 標識体 》

標識体は、後述する組織化学染色を組織切片に行う際に、当該組織切片上に存在し、検出対象とする生体物質を可視化するために用いられる。

【0022】

本発明では、上述のように、2種類の「標識体」を用いる。第1の標識体は、明視野観察可能な染色に用いる標識体であり、第2の標識体は、蛍光染色に用いる標識体である。

本発明においては、第1の明視野観察可能な染色に用いる標識体として色素沈着を誘導する物質、第2の蛍光染色に用いる標識体として蛍光体をそれぞれ用いることが好適である。

【0023】

40

但し、抗原抗体反応等、検出対象とする生体物質と、当該検出対象とする生体物質と特異的に結合するプローブ生体物質との結合反応（以下「生体物質間の特異的結合反応」ともいう。）を妨げず、かつ、測定における定量性を妨げない限り特に限定されるものではない。

1. 明視野観察可能な染色に用いられる標識体

〔色素沈着を誘導する物質（色素沈着誘導標識体）〕

本発明の明視野観察を可能とする標識体としては、色素沈着を誘導する物質、すなわち、基質を変化させて色素沈着性の化学種を生じさせる酵素が挙げられる。このような酵素として、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ（ALP）、グルコシダーゼ等の酵素を挙げることができる。

50

## 【 0 0 2 4 】

〔色素沈着に用いられる基質〕

上記酵素により色素沈着性の物質に変換される基質として、色原性基質変換法に基づく従来公知のアッセイ法において、色原性基質として一般的に用いられる基質を用いることができる。このような基質の例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）用基質などの酸化還元酵素用基質、アルカリホスファターゼ（HRP）用基質などのフォスファターゼ用基質、および、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼ用基質などのグリコシダーゼ用基質が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

## 【 0 0 2 5 】

HRPによる酵素反応に用いられる基質の具体例として、3,3'-ジアミノベンジジン（DAB）、3-p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸（HPPA）、ECL plus（商標）、4-クロロ-1-ナフトール/4-クロロナフタレン-1-オールなどが挙げられる。この中では、通常核染色に用いられるヘマトキシリン（青）との色味の違いや保存安定性の観点からDABが汎用されており、好ましく用いられる。

10

## 【 0 0 2 6 】

また、アルカリフォスファターゼ（ALP）による酵素反応に用いられる基質として、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム塩（BCIP/NBT）、4-メチルウンベリフェリルフォスフェート（MUP）、6,8-ジフルオロ-4-メチルウンベリフェリルフォスフェート（DiFMUP）、AttoPhos（登録商標）、9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル)フォスフェート（DDAOP）などが挙げられる。

20

## 【 0 0 2 7 】

$\alpha$ -ガラクトシダーゼによる酵素反応に用いられる基質として、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-D-ガラクトピラノシド（X-gal）、9H-(1,3-ジクロロ-9,9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル)-D-ガラクトピラノシド（DDAOG）、4-メチルウンベリフェリル-D-ガラクトシド（MUG）などが挙げられる。

## 【 0 0 2 8 】

## 2. 蛍光染色に用いられる標識体

〔蛍光体（蛍光標識体）〕

本発明の蛍光染色に用いる標識体としては発光物質を用いることができる。「発光物質」とは、外部からのエネルギーを受けて励起し、励起状態から基底状態に到る過程において光を発光する物質、すなわち、ルミネッセンスにより光を発光する物質である。「外部からのエネルギー」としては、電磁波、熱、摩擦、化学反応等によるエネルギーが挙げられる。また、発光の態様としては、励起一重項からの失活に伴う発光、三重項からの失活に伴う発光等が挙げられる。

30

## 【 0 0 2 9 】

本発明では、このような発光物質として、上述のように蛍光体を用いるのが適切である。蛍光体としては、以下に詳述する有機蛍光色素、半導体ナノ粒子等の蛍光物質、および、複数の蛍光物質を集積してなる蛍光集積体等が挙げられる。

40

## 【 0 0 3 0 】

なお、本明細書において「蛍光体」は、外部からのX線、紫外線または可視光線の照射を受けて励起し、励起状態から基底状態に到る過程において光を発光する物質一般を指す。したがって、本発明にいう「蛍光体」は、励起状態から基底状態に戻るときの遷移態様の如何を問うものでなく、励起一重項からの失活に伴う発光である狭義の蛍光を発する物質であってもよいし、三重項からの失活に伴う発光である燐光を発する物質であってもよい。

## 【 0 0 3 1 】

また、本発明にいう「蛍光体」は、励起光を遮断してからの発光寿命によって限定されるものでもない。したがって、硫化亜鉛やアルミン酸ストロンチウム等の蓄光物質として

50

知られている物質であってもよい。

【0032】

〔有機蛍光色素〕

有機蛍光色素としては、フルオレセイン系色素分子、ローダミン系色素分子、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、カスケード（登録商標、インビトロジェン社）系色素分子、クマリン系色素分子、NBD（登録商標）系色素分子、ピレン系色素分子、Texas Red（登録商標）系色素分子、シアニン系色素分子、ペリレン系色素分子、オキサジン系色素分子等を挙げることができる。

【0033】

具体的には、5 - カルボキシ - フルオレセイン、6 - カルボキシ - フルオレセイン、5, 6 - ジカルボキシ - フルオレセイン、6 - カルボキシ - 2', 4, 4', 5', 7, 7' - ヘキサクロロフルオレセイン、6 - カルボキシ - 2', 4, 7, 7' - テトラクロロフルオレセイン、6 - カルボキシ - 4', 5' - ジクロロ - 2', 7' - ジメトキシフルオレセイン、ナフトフルオレセイン、5 - カルボキシ - ローダミン、6 - カルボキシ - ローダミン、5, 6 - ジカルボキシ - ローダミン、ローダミン 6G、テトラメチルローダミン、X - ローダミン、及びAlexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 635、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665（以上インビトロジェン社製）、メトキシクマリン、NBD、ピレン、Cy5、Cy5.5、Cy7等を挙げることができる。単独でも複数種を混合したものをを用いてもよい。

これらの有機蛍光色素は、1種単独で用いてもよく、あるいは、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

【0034】

〔半導体ナノ粒子〕

半導体ナノ粒子としては、II - VI族化合物、III - V族化合物、I - III - V族化合物、又はIV族元素を成分として含有する半導体ナノ粒子（それぞれ、「II - VI族半導体ナノ粒子」、「III - V族半導体ナノ粒子」、「I - III - V族半導体ナノ粒子」、「IV族半導体ナノ粒子」ともいう。）のいずれかを用いることができる。ここで、「ナノ粒子」という用語は、大きさがナノメートルのオーダー（1～数百ナノメートル）である粒子の意味で用いられる。

【0035】

具体的には、CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、CuInS、CuInSe、AgInSe、AgInS、CuInGaS、Si、Ge等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0036】

本発明においては、蛍光物質として半導体ナノ粒子を用いると、検出対象とする生体物質の所在を輝点の形で観察することができるので好ましい。これらの半導体ナノ粒子は、1種単独で用いてもよく、あるいは、2種以上を組み合わせ用いてもよい。

【0037】

10

20

30

40

50

〔コア/シェル構造を有する半導体ナノ粒子〕

また、本発明では、上記半導体ナノ粒子をコアとし、その上にシェルを設けたコア/シェル構造を有する半導体ナノ粒子を用いることもできる。以下、本明細書中コア/シェル構造を有する半導体ナノ粒子の表記法として、例えば、コアがCdSe、シェルがZnSの場合、CdSe/ZnSと表記する。

【0038】

コア/シェル構造を有する半導体ナノ粒子としては、例えば、CdSe/ZnS、CdS/ZnS、InP/ZnS、InGaP/ZnS、Si/SiO<sub>2</sub>、Si/ZnS、Ge/GeO<sub>2</sub>、Ge/ZnS等を用いることができるが、これらに限定されない。

【0039】

半導体ナノ粒子は必要に応じて、有機ポリマーなどにより表面処理が施されているものを用いてもよい。例えば、表面カルボキシ基を有するCdSe/ZnS(「QdotITK」(登録商標)、インビトロジェン社製)、表面アミノ基を有するCdSe/ZnS(「QdotITK」(登録商標)、インビトロジェン社製)等が挙げられる。

【0040】

〔希土類蛍光体〕

本発明で用いるその他の蛍光物質として希土類蛍光体が挙げられる。希土類蛍光体としては、例えば、酸化ネオジム、塩化ネオジム、硝酸ネオジム、酸化イットルビウム、塩化イットルビウム、硝酸イットルビウム、酸化ランタン、塩化ランタン、硝酸ランタン、酸化イットリウム、塩化イットリウム、硝酸イットリウム、塩化プラジオセム、塩化エルビウム、オルトリン酸、リン酸アンモニウム、リン酸二水素アンモニウム等を用いることができる。

【0041】

〔蛍光集積体〕

また、本発明では、上記蛍光物質のほか、複数の蛍光物質を集積してなる蛍光集積体を蛍光体として用いることもできる。複数の蛍光物質を集積してなる蛍光集積体を蛍光体として用いて組織切片の染色を行うと、汎用顕微鏡を用いたときでも(共焦点レーザー顕微鏡を用いなくとも)検出対象とする生体物質の所在を輝点の形で観察することができるので好ましい。

【0042】

ここで、「複数の蛍光物質を集積してなる蛍光集積体」とは、上述した有機蛍光色素、半導体ナノ粒子などの蛍光物質が表面または内部に存在する態様で集積した集積体を指す。したがって、「複数の蛍光物質を集積してなる蛍光集積体」は、多数の蛍光物質を固定化可能なコアと、このコア上に固定化された複数の蛍光物質からなるシェルとを有するコア/シェル構造の蛍光集積体であってもよいし、あるいは、複数の蛍光物質が基材に内包された構造を有する蛍光体内包ナノ粒子などの形態を有する蛍光集積体であってもよい。

【0043】

蛍光集積体を構成する素材は特に限定されるものではなく、ポリスチレン、アミノ樹脂、ポリ乳酸、シリカ等を挙げることができる。

蛍光集積体は、公知の方法により作製することができる。例えば、有機蛍光色素を集積したシリカナノ粒子は、ラングミュア8巻2921ページ(1992)に記載されているフルオレセインイソチオシアネート(以下「FITC」という。)内包シリカ粒子の合成を参考に合成することができる。FITCの代わりに所望の有機蛍光色素を用いることで種々の有機蛍光色素集積シリカナノ粒子が合成できる。

【0044】

量子ドットを集積したシリカナノ粒子は、ニュー・ジャーナル・オブ・ケミストリー33巻561ページ(2009)に記載されているCdTe集積シリカナノ粒子の合成を参考に合成することができる。

【0045】

有機蛍光色素を集積したポリスチレンナノ粒子は、米国特許第4326008号(19

10

20

30

40

50

82)に記載されている重合性官能基をもつ有機色素を用いた共重合法や、米国特許第5326692号(1992)に記載されているポリスチレンナノ粒子への有機蛍光色素の含浸法を用いて作製することができる。

【0046】

量子ドットを集積したポリマーナノ粒子は、ネイチャー・バイオテクノロジー19巻631ページ(2001)に記載されているポリスチレンナノ粒子への量子ドットの含浸法を用いて作製することができる。

【0047】

蛍光集積体の平均粒径は特に限定されないが、通常は30~800nm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%以下であり、好ましくは5~15%である。ここでいう平均粒径は、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて電子顕微鏡写真を撮影し、十分な数(例えば1000個)の蛍光集積体の断面積を計測し、その計測値を相当する円の面積としたときのその円の直径を粒径として求められる面積円相当径の算術平均(相加平均)であり、変動係数は、上記のようにして測定した粒径分布から算出した値(100×粒径の標準偏差/平均粒径)である。すなわち、本明細書において「平均粒径」は個数平均粒径を指す。

10

【0048】

以上に示した蛍光体の中でも、高い発光強度を得やすく、かつ、優れた定量性を得ることができる点から、複数の蛍光物質を集積してなる蛍光集積体が特に好ましく用いられる。

20

【0049】

<検出対象とする生体物質>

本発明の組織染色方法による検出対象となる生体物質は特に限定されないが、抗原抗体反応等の生体物質間の特異的結合反応を通じて下記標識体による可視化が行われることから、後述するプローブ生体物質が特異的に結合する標的生体物質としても機能するものである。

【0050】

本発明の組織染色方法において、後述する組織化学染色として、免疫組織化学染色(免疫染色)が好適に用いられることから、「検出対象とする生体物質」の典型例として、抗体に対する抗原として機能する生体物質が挙げられる。

30

【0051】

本発明において、「抗原」という用語は、生体物質、特に、分子または分子断片を指すものであり、このような「分子」または「分子断片」としては、例えば、核酸(一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA(ペプチド核酸)等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子)、タンパク質(ポリペプチド、オリゴペプチド等)、アミノ酸(修飾アミノ酸も含む。)、糖質(オリゴ糖、多糖類、糖鎖等)、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体等が挙げられる。

【0052】

具体的には、腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモン等であってもよく、特に限定されない。例えば、抗がん剤として用いられる抗体医薬を抗体として用いる場合、がんの増殖制御因子、転移制御因子、増殖制御因子受容体、転移制御因子受容体等が好適な標的抗原として挙げられる。

40

【0053】

このような増殖制御因子、転移制御因子、増殖制御因子受容体および転移制御因子受容体のうち、がんの増殖制御因子およびその受容体としては、例えば表皮増殖因子(EGF:Epidermal Growth Factor)、EGF受容体(EGFR)、血小板由来増殖因子(PDGF:Platelet-Derived Growth Factor)、PDGF受容体(PDGFR)、インスリン様増殖因子(IGF:Insulin-like Growth Factor)、IGF受容体(IGFR)、線維芽細胞増殖因子(F

50

GF: Fibroblast Growth Factor)、FGF受容体(FGFR)、血管内皮増殖因子(VEGF: Vascular Endothelial Growth factor)、VEGF受容体(VEGFR)、肝細胞増殖因子(HGF: Hepatocyte Growth Factor)、HGF受容体(HGFR)、神経栄養因子(NT: Neurotrophin)、形質転換増殖因子 (TGF : Transforming Growth Factor-)ファミリー、HER2等の細胞増殖因子およびその受容体、並びに、サイクリン(cyclin)、サイクリン依存性キナーゼ(CDK: Cyclin-Dependent Kinase)、サイクリンA、サイクリンB、サイクリンD、サイクリンE、CDK1、CDK2、CDK4、CDK6、p16INK、p15、p21、p27、RB(Retinoblastoma)等の細胞周期を調節する因子を挙げることができる。また、がんの転移制御因子およびその受容体としては、例えばマトリックスメタロプロテアーゼ1(MMP1)、マトリックスメタロプロテアーゼ2(MMP2)、PAR1(Protease Activated Receptor 1)、CXCR4(Chemokine [C-X-C motif] receptor 4)、CCR7(Chemokine [C-C motif] receptor 7)等を挙げることができ、これらの中でもHER2を標的とするトラスツズマブが広く用いられているため、HER2を好適に例示することができる。

10

**【0054】**

また、がんに関連する抗原以外に、TNF-(Tumor Necrosis Factor)、IL-6(Interleukin-6)受容体等の炎症性サイトカイン、RSV F蛋白質等のウィルス関連分子等も、本発明の染色法による検出対象となりうる。

20

**【0055】**

一方、本発明の組織染色方法において、後述する組織化学染色として免疫組織化学染色以外の手法を用いる場合には、「検出対象とする生体物質」は、必ずしも抗原として機能するものである必要はない。例えば、後述する組織化学染色としてレクチン染色を用いる場合、「検出対象とする生体物質」として、糖質(オリゴ糖、多糖類、糖鎖等)またはこれらの修飾分子、複合体等が挙げられ、腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモン等であってもよい。

**【0056】**

なお、本明細書において「同一の特定生体物質」とは、検出対象とする生体物質の種類が同一であることのみならず、対象となる生体物質そのものが同一の分子または分子断片であることを意味する。

30

**【0057】****《プローブ生体物質》**

本発明の組織染色方法においては、組織切片に対して後述する組織化学染色を行う際に、当該組織切片上に存在する「検出対象とする生体物質」に上記標識体を導入する媒体として、当該「検出対象とする生体物質」と特異的に結合する「プローブ生体物質」を使用する。本発明の組織染色方法で用いられるプローブ生体物質として、抗体やレクチン等が挙げられる。

40

**【0058】**

本発明において、「抗体」という用語は、任意の抗体断片または誘導体を含む意味で用いられ、Fab、Fab'<sub>2</sub>、CDR、ヒト化抗体、多機能抗体、単鎖抗体(ScFv)等の各種抗体を含む。

**【0059】**

本発明においては、例えば、抗体医薬の構成成分である抗体を、組織切片の免疫組織化学染色に用いることができる。抗体医薬としては、例えば、関節リウマチなどの自己免疫疾患、がんなどの悪性腫瘍、ウィルス感染症等の治療に一般的に用いられている抗体医薬を用いることができる。

**【0060】**

50

臨床に用いられている代表的な抗体医薬を下記表 1 に示す。表 1 において、例えば、「ハーセプチン」が抗体医薬であり、「トラスツズマブ」がその構成成分として含まれる抗体（すなわち、抗体医薬構成抗体）という関係にある。

【 0 0 6 1 】

【表 1】

表 1 代表的な抗体医薬

対象疾患	一般名	商品名	標的分子
がん 及び 関連疾患	リツキシマブ (Rituximab)	リツキサン (Rituxan : 登録商標)	CD 20
	ゲムツズマブ (Gemtuzumab)	マイロターグ (Mylotarg : 登録商標)	CD 33
	アレムツズマブ (Alemtuzumab)	キャンパス (Campath : 登録商標)	CD 52
	イブリツモマブ (Ibritumomab)	ゼヴァリン (Zevalin : 登録商標)	CD 20
	トシツモマブ (Tositumomab)	ベクサール (Bexxar : 登録商標)	CD 20
	トラスツズマブ (Trastuzumab)	ハーセプチン (Herceptin : 登録商標)	HER 2
	ベバシズマブ (Bevacizumab)	アバスチン (Avastin : 登録商標)	VEGF
	セツキシマブ (Cetuximab)	アービタックス (Erbix : 登録商標)	EGF 受容体
自己免疫 疾患	パニツムマブ (Panitumumab)	ベクティビックス (Vectibix : 登録商標)	EGF 受容体
	インフリキシマブ (Infliximab)	レミケード (Remicade : 登録商標)	TNF- $\alpha$
感染症	パリビズマブ (Palivizumab)	シナジス (Synagis : 登録商標)	RSV F 蛋白質

なお、上記表 1 に示した抗体医薬のうち、ゲムツズマブは、抗腫瘍活性物質であるカリケマイシン (Calicheamicin) と結合してなるゲムツズマブ・オゾガマイシン (Gemtuzumab-Ozogamicin) の形で用いられている。

【 0 0 6 2 】

上記表 1 に示した抗体医薬の中で、トラスツズマブを構成成分として含む抗体医薬（すなわち、ハーセプチン（登録商標））が特に好適に用いられる。

また、本発明の染色法の適用対象とするがんとして、大腸がん、直腸がん、腎がん、乳がん、前立腺がん、子宮がん、卵巣がん、子宮内膜がん、食道がん、血液がん、肝がん、膵がん、皮膚がん、肺がん、乳がん等を挙げることができる。

【 0 0 6 3 】

本発明において、「レクチン」という用語は、糖鎖と特異的に結合する蛋白の総称として用いられる。レクチンの例として、細菌を含むすべての生物界で見出されるリシン B 鎖関連の「R 型レクチン」、真核生物全般に存在し糖タンパク質のフォールディングに關与する「カルネキシン・カルレティキュリン」、多細胞動物に広く存在し、「セレクチン」、「コレクチン」等代表的なレクチンを多く含むカルシウム要求性の「C 型レクチン」、動物界に広く分布しガラクトースに特異性を示す「ガレクチン」、植物豆科で大きな家系を形成する「豆科レクチン」、およびこれと構造類似性をもち動物細胞内輸送に關わる「L 型レクチン」、リソソーム酵素の細胞内輸送に關わるマンノース 6-リン酸結合性の「P 型レクチン」、グリコサミノグリカンをはじめとする酸性糖鎖に結合する「アネキシン」、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し「シグレック」を含む「I 型レクチン」等が挙げられる。

代表的なレクチンを、下記表 2 に示す。

【 0 0 6 4 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2 代表的なレクチン

レクチン			特異性
略号	通称名	由来	糖鎖
Con A	コンカナバリンA	タチナタマメ	Man $\alpha$ 1→6 (Man $\alpha$ 1→3) Man
PNA	ピーナッツレクチン	ピーナッツ	Gal $\beta$ 1→3GalNAc
SBA	大豆レクチン	大豆	GalNAc $\alpha$ 1→3Gal
UEA-I	ハリエニシダレクチン	ハリエニシダ	Fuc $\alpha$ 1→2Gal $\beta$ 1→4GlcNAc

10

## 【 0 0 6 5 】

## 《 標識化プローブ生体物質 》

本発明の組織染色方法では、組織の観察時に、同一の特定生体物質に対して、プローブ生体物質を介して、明視野観察可能な染色に用いた標識体および蛍光染色に用いた蛍光標識体の両方が直接的または間接的に結合している複合体、すなわち「標識化プローブ生体物質」が形成されるようにする。

## 【 0 0 6 6 】

この標識化プローブ生体物質の形成の態様は特に限定されるものではないが、次のような態様が挙げられる。

20

標識化プローブ生体物質の第 1 の態様は、色素沈着を誘導する物質等の明視野観察可能な染色に用いる標識体および蛍光染色に用いる蛍光標識体が、連続的に結合しているもの（つまりこれら 2 種類の標識体を特定生体物質に結合させるためのプローブ生体物質が共有されているもの）である（図 1：態様 1）。標識化プローブ生体物質の第 2 の態様は、色素沈着を誘導する物質等の明視野観察可能な染色に用いる標識体および蛍光染色に用いる蛍光標識体がそれぞれ別個の標識化プローブ生体物質に含まれるもの（つまりこれら 2 種類の標識体を特定生体物質に結合させるためのプローブ生体物質が共有されていないもの）である（図 1：態様 2）。これらのうち、プローブ生体物質の共有化により上記 2 種類の標識体同士が立体障害などに起因する結合障害等により干渉することなく特定生体物質に結合させることができる第一の態様が、組織中の特定生体物質の明視野観察における染色性および蛍光観察における染色性（細胞あたりの蛍光シグナル輝点数等）に優れるためより好ましい。

30

## 【 0 0 6 7 】

ここで、上記第 1 の態様において「連続的に結合」するとは、色素沈着を誘導する物質等の明視野観察可能な染色に用いる標識体、および蛍光体等の発光物質の標識体が、一の標識化プローブ生体物質において、以下に例示するような結合様式により、直接または間接的に結合していることをいう。間接的に結合するとは、なんらかの分子を介して結合することをいう。したがって、連続的に結合することにより、一の標識化プローブ生体物質中に、色素沈着を誘導する物質、および発光物質を含むものとなる。

40

## 【 0 0 6 8 】

このとき、明視野観察可能な染色に用いる標識体、および蛍光体等の発光物質の標識体は、プローブ生体物質との結合において競合しないものであることが適切である。競合が起きる場合、例えば、プローブ生体物質がある分子で修飾されており（例えば、ビオチン等）、両標識体がともにこの分子に結合する分子（例えば、アビジン等）で修飾されている場合、同一の特定生体物質を明視野観察可能な染色に用いる標識体および蛍光体等の発光物質の標識体の両方で標識することができず、どちらか一方で標識することになる。その結果、組織中の特定生体物質の明視野観察における染色性および蛍光観察における染色性はどちらも、明視野観察可能な染色に用いる標識体単独で染色した場合の染色性および蛍光体等の発光物質の標識体単独で染色した場合の染色性と比較して、大きく損なわれる

50

ことになる。

【0069】

一方、色素沈着を誘導する物質等の明視野観察可能な染色に用いる標識体、および蛍光体等の発光物質の標識体が、別個の標識化プローブ生体物質に含まれるものである場合、それぞれの標識化プローブ生体物質に含まれるプローブ生体物質は、組織中の特定生体物質の明視野観察における染色性および蛍光観察における染色性（細胞あたりの蛍光シグナル輝点数等）の両方を高い水準で維持する観点から、同一の特定生体物質の別部位を認識するものであって、生体物質間の特異的結合反応において競合しないものであることが適切である。例えば、上記それぞれの標識化プローブ生体物質に含まれるプローブ生体物質が同一の特定生体物質の同一部位を認識するものであって、生体物質間の特異的結合反応において競合がおきる場合、同一の特定生体物質を明視野観察可能な染色に用いる標識体および蛍光体等の発光物質の標識体の両方で標識することができず、どちらか一方で標識することになる。その結果、組織中の特定生体物質の明視野観察における染色性および蛍光観察における染色性はどちらも、明視野観察可能な染色に用いる標識体単独で染色した場合の染色性および蛍光体等の発光物質の標識体単独で染色した場合の染色性と比較して、大きく損なわれることになる。

10

【0070】

標識化プローブ生体物質は、上記プローブ生体物質（例えば、抗体や、レクチン等）と標識体とが、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着、化学吸着等の適当な結合様式により結合した構造を有する。結合力の強さの観点から、アミド結合、エステル結合、イミド結合、マレイミド基へのチオール付加を利用した結合等の共有結合、あるいは、ビオチン - アビジン結合またはビオチン - ストレプトアビジン結合を介して結合した構造を有することが好ましい。特に、結合力の強さおよび結合の特異性の観点から、ビオチン - アビジン結合またはビオチン - ストレプトアビジン結合を介して結合した構造を有することがより好ましい。

20

【0071】

このような標識化プローブ生体物質は、上記プローブ生体物質に対して、標識体を常法に従って結合させることにより得ることができる。具体的な標識化方法としては、上記プローブ生体物質に対して特異的な親和性を有する抗体（二次抗体）を介する方法、ビオチン - アビジン法、チオール基 - マレイミド基のカップリング反応法、既存の化学リンカーを用いる方法、架橋剤（1 - エチル - 3 - （3 - ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）等）を用いた架橋反応法、イオン結合法等を挙げることができるが、上記プローブ生体物質がヒト化抗体またはヒト抗体である場合、これらの中でも抗体やアビジンとのチオール基 - マレイミド基のカップリング反応法を好適に例示することができる。

30

【0072】

具体的な形成手順は、例えば以下の通りである。

まず、第1の結合基をプローブ生体物質に導入し、当該第1の結合基と結合可能な第2の結合基を標識体に導入する。このとき、第1の結合基とプローブ生体物質との間、および、第2の結合基と標識体との間には、それぞれ適当な鎖長のリンカーが介在していてもよい。ここで、前記第1および第2の結合基は、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、チオール基、マレイミド基等の化学官能基であってもよいし、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンのような分子であってもよい。また、前記第2の結合基として二次抗体を用いる場合には、前記第1の結合基は、プローブ生体物質を構成する、「検出対象とする生体物質」を認識する部位以外の部位であってもよい。

40

【0073】

ここで、第1の結合基を導入したプローブ生体物質、すなわち、第1の結合基とプローブ生体物質とを含む結合基含有プローブ生体物質の好適な例として、ビオチン化抗体、ビオチン化レクチン等のビオチン化プローブ生体物質が挙げられる。一方、第2の結合基を導入した標識体、すなわち、第2の結合基と上記標識体とを含む結合基含有標識体の好適な例として、アビジン結合標識体またはストレプトアビジン結合標識体が挙げられる。た

50

だ、第1の結合基を導入したプローブ生体物質としてアビジン化プローブ生体物質やストレプトアビジン化プローブ生体物質を用いるとともに、第2の結合基を導入した標識体としてビオチン結合標識体を用いることを妨げるものではない。また、第1の結合基を導入したプローブ生体物質における第1の結合基、および、第2の結合基を導入した標識体における第2の結合基として、ビオチンやアビジン（またはストレプトアビジン）の代わりに化学官能基を採用したものをを用いることを妨げるものでもない。

【0074】

その後、第1の結合基を導入したプローブ生体物質と、第2の結合基を導入した標識体とを反応させると、標識化プローブ生体物質が得られる。

この標識化プローブ生体物質は、第1の結合基を導入したプローブ生体物質と、第2の結合基を導入した標識体とを反応させることによって、染色対象とする組織が存在しない状況下で予め調製されたものであってもよいし、あるいは、染色工程の中で、第1の結合基を導入した未標識のプローブ生体物質を組織と反応させてから、当該組織に組み込まれたプローブ生体物質に、第2の結合基を導入した標識体を反応されることにより形成されるものであってもよい。

【0075】

上記標識化プローブ生体物質は、さらに多くの結合基を介するものであってもよい。例えば、第2の結合基を導入した物質に、さらに第3の結合基を導入し、この第3の結合基と結合し得る第4の結合基、ならびに、第5の結合基を導入したいずれかの標識体、および、第5の結合基に結合し得る第6の結合基を導入した他方の標識体を反応させるものであってもよい。

【0076】

このような標識化プローブ生体物質としては、例えば、特定生体物質を認識する抗体、この抗体を認識するビオチン化抗体、ストレプトアビジン化したペルオキシダーゼ標識体、および、ペルオキシダーゼを認識して結合する抗体と蛍光標識体を結合したものを含むものが挙げられる（図2：態様1A）。

【0077】

また、上記の場合において、第4の結合基と第5の結合基、第3の結合基と第6の結合基がそれぞれ同じ結合基であってもよい。このような標識化プローブ生体物質としては、例えば、特定生体物質を認識して結合する抗体、この抗体を認識して結合するビオチン化抗体、ストレプトアビジン化したペルオキシダーゼ標識体、および、ビオチン化した蛍光標識体を含むものが挙げられる（図3：態様1B）。このような態様1Bは、上記態様1Aよりもペルオキシダーゼの機能を損なうおそれが少ないやり方で蛍光標識体を標識化プローブ生体物質に導入することができ、またビオチン化した蛍光標識体は汎用されていて容易に入手可能であるなどの観点から、より好ましい態様である。

【0078】

< 組織化学染色方法 >

(1) 組織化学染色工程

本発明に係る組織化学染色方法において、組織化学染色工程は、組織切片に組織化学染色を行う工程をいう。すなわち、検出対象とする生体物質を認識する物質に、標識体を導入することにより得られる標識化プローブ生体物質と組織切片とを反応させ、生体物質間の特異的結合反応を通じて当該組織切片上に存在する特定生体物質を可視化する工程である。本発明において免疫組織化学染色やレクチン染色等の組織化学染色は、従来公知の手法により行うことができる。

【0079】

本発明の組織化学染色方法が適用できる切片の作製法は特に限定されず、公知の方法により作製されたものをを用いることができる。例えば、病理切片として汎用されているパラフィン包埋切片を組織切片として用いる場合は、次のような手順で組織化学染色を行えばよい。

【0080】

10

20

30

40

50

## ( 1 - 1 ) 脱パラフィン処理工程

キシレンを入れた容器に、病理切片を浸漬させ、パラフィンを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により、浸漬途中でキシレンを交換してもよい。

## 【 0 0 8 1 】

ついで、エタノールを入れた容器に病理切片を浸漬させて、キシレンを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中でエタノールを交換してもよい。

## 【 0 0 8 2 】

水を入れた容器に病理切片を浸漬させて、エタノールを除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また、必要により浸漬途中で水を交換してもよい。

## 【 0 0 8 3 】

## ( 1 - 2 ) 賦活化処理工程

組織化学染色として免疫組織化学染色を行う場合、公知の方法にならば、目的とする生体物質の賦活化処理を行うことが好ましい。賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01M(モル濃度mol/L、以下同じ)クエン酸緩衝液(pH6.0)、1mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)溶液(pH8.0)、5%尿素、0.1Mトリス塩酸緩衝液等を用いることができる。加熱機器としては、オートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバス等を用いることができる。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。温度は50~130、時間は5~30分で行うことができる。

## 【 0 0 8 4 】

ついでPBSを入れた容器に、賦活処理後の切片を浸漬させ、洗浄を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3分以上30分以下であることが好ましい。また必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

## 【 0 0 8 5 】

## ( 1 - 3 ) 標識化プローブ生体物質による染色処理工程

本発明においては、同一の特定生体物質に対して、明視野観察可能な染色と、発光物質を用いた染色の両方を行う。その順序(先後)は不問であるが、同一の特定生体物質に、色素沈着誘導標識体と蛍光標識体とを結合させたのちに、色素沈着に用いる基質を加えて発色させることが、明視野観察の感度を上げる観点から、好ましい。

## 【 0 0 8 6 】

標識化プローブ生体物質による染色処理工程としては、上記標識化プローブ生体物質のPBS分散液を調製し、病理切片に載せて、検出対象とする生体物質と反応させることが好適に行われる。

## 【 0 0 8 7 】

組織化学染色として免疫組織化学染色(免疫染色)を行う場合には、プローブ生体物質として抗体のPBS分散液を調製し、これを病理切片に載せて、検出対象とする生体物質と結合させ、さらにこの抗体と結合する部位を導入した標識体を、抗体に結合させることを行うことが可能である。また、抗体と標識体とを病理切片に載せる前に反応させて、標識化プローブ生体物質を調製し、これを病理切片に載せることでもよい。

## 【 0 0 8 8 】

標識化プローブ生体物質が、より多くの分子から構成されている場合には、それぞれのPBS分散液を調製し、これを適切な順番で順次病理切片に載せて反応させ、検出対象とする生体物質と結合した標識化プローブ生体物質を調製することで、本発明の組織化学染色を行うことが可能である。この場合にも、抗体と標識体とを含む標識化生体プローブの構成物質を、病理切片に載せる前に反応させて、標識化プローブ生体物質を調製し、これを病理切片に載せることでもよい。

10

20

30

40

50

## 【0089】

組織化学染色としてレクチン染色を行う場合には、上記において抗体の代わりに、レクチンを用いて反応を行えばよい。

## 【0090】

複数種の特定生体物質を目的として染色する場合には、各特定生体物質に対応した「プローブ生体物質」、および、対応する特定生体物質ごとに異なる色素沈着誘導標識体、ならびに、蛍光標識体のPBS分散液をそれぞれ調製し、それらを病理切片に載せて、それぞれ目的とする生体物質と反応させればよい。病理切片に載せる際には、それぞれの標識化プローブ生体物質のPBS分散液をあらかじめ混合してもよいし、別々に順次載せてもよい。いずれの場合においても、対応する特定生体物質ごとに、異なる適切な結合基を有する標識化プローブ生体物質を用いることが、異なる特定生体物質を区別する観点から、より好ましい。

10

## 【0091】

反応温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。反応時間は30分以上24時間以下であることが好ましい。なお、染色を行う前に、BSA含有PBSなど公知のブロッキング剤を滴下することが好ましい。

## 【0092】

ついで、PBSを入れた容器に染色後の切片を浸漬させて、未反応の標識体を除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は3分以上30分以下であることが好ましい。必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

20

## 【0093】

## (2) 固定処理工程

本発明の組織染色方法において所要により行われる固定処理工程は、上記組織化学染色工程により導入された標識化プローブ生体物質を、組織切片に固定化する工程である。

## 【0094】

本発明の組織染色方法においては、上記(1)組織化学染色工程の後に、下記(3)形態観察染色工程を行う場合、組織化学染色工程により得られた染色組織切片を直接形態観察染色工程に供してもよい。ただ、形態観察染色後において、標識体として組織切片に導入された蛍光体からの発光強度低下を抑制できる観点から、組織化学染色を行った後、形態観察染色を行う前に固定処理を行う工程を経ることが好ましい。

30

## 【0095】

本発明で用いられる固定処理溶液として、ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、アセトン、エタノール、メタノール等の架橋剤、細胞膜透過物質等が挙げられる。

## 【0096】

本発明において、固定処理は、従来公知の手法により行うことができる。固定処理は、具体的には、このような固定処理溶液に、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、稀パ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。

40

## 【0097】

## (3) 形態観察染色工程

組織標本の形態を観察する場合など、必要に応じて、形態観察染色工程を設けてもよい。形態観察染色方法としては、代表的には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)が挙げられるが、例えば細胞診に用いられるパパニコロウ染色(Pap染色)等、他の形態観察染色も挙げられる。

## 【0098】

しかしながら、エオジン、あるいは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は、自家蛍光の発光波長のピークが蛍光標識体の発光波長のピークと近接する場合がある。したがって、本発明においては、ヘマトキシリン等のみにより形態観察

50

染色を行うことが好ましい。

【0099】

なお、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。他の形態観察染色では、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～濃赤色に染色される。

【0100】

(4) 観察工程

本発明においては、上記工程(1)～(3)の後に、観察工程を行うことができる。以下の観察工程は、どちらが先でもよい。

【0101】

(4-1) 明視野観察工程

明視野観察工程は、上記工程により染色された組織切片に照明光を当て、組織切片に沈着した色素を観察し、細胞または組織内の前記「検出対象とする生体物質」の分布についての情報(以下「生体分子分布情報」という。)を取得する工程である。この「生体分子分布情報」は、組織化学染色として免疫組織化学染色を行った場合には細胞または組織内にある特定の抗原分子の分布についての情報として取得されるものであり、また、組織化学染色としてレクチン染色を行った場合には、細胞または組織内にある特定の糖鎖、あるいはその修飾分子もしくは複合体の分布についての情報として取得されるものである。

【0102】

さらに、明視野観察工程においては、前記形態観察染色により得られる組織標本の形態についての情報(以下「細胞形態情報」という。)を取得することができる。

この明視野観察は一般的な方法により行えばよい。例えば、乳がんにおけるHER2タンパク質を「検出対象とする生体物質」として組織化学染色をおこなった場合の明視野観察においては、適切な照明光の照射下で、光学顕微鏡の4倍対物レンズを使用して、検体組織内の癌細胞のHER2タンパク質陽性染色像、陽性染色の強度、陽性細胞率を観察する。次に対物レンズを10倍に切り替え、陽性所見が細胞膜が細胞質に局在するかを確認し、必要に応じてさらに対物レンズ20倍で検索する。

【0103】

本工程において生体分子分布情報および細胞形態情報は、迅速な観察が行えるよう顕微鏡の鏡筒から取得するようにしてもよいし、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、それを観察することにより取得するようにしてもよい。

【0104】

(4-2) 発光物質観察工程

発光物質観察工程は、上記工程により染色された組織切片に励起光を照射することにより、前記蛍光標識体の発する蛍光に基づく生体分子分布情報を取得する工程である。

【0105】

前記励起光は、標識体を構成する蛍光物質が所望の波長の蛍光を発する、適切な波長を有するものであればよく、励起光の照射手段も特に限定されるものではない。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組織切片に照射すればよい。

前記励起光は、組織切片の自家蛍光との関係で標識体が発する蛍光が識別可能である限り特に限定されないものの、蛍光の目視観察が可能で、明視野観察可能な染色において用いる基質(例えばジアミノベンジジン)による吸収を避けるとともに、組織切片からの自家蛍光強度が高くなりすぎないようにする観点から、450nm～700nmの波長を有するものが好ましい。また、前記蛍光標識体として用いる蛍光体を構成する蛍光物質とし

10

20

30

40

50

ては当該励起光により480nm以上の範囲、好ましくは580～690nmの範囲にピークを有する蛍光を発するものを用いる（したがってこの領域の発光波長を有する蛍光を測定するようにする）。

【0106】

発光物質観察工程における生体分子分布情報および細胞形態情報は、同一視野で取得することができる。すなわち、一枚の染色切片から得られる組織切片の自家蛍光および標識体が発する蛍光の両方が同一の視野に含まれるようにしつつも、それらを区別して認識し、それぞれに基づいて細胞形態情報および生体分子分布情報を取得することが好適である。もちろん、必要であれば、例えば組織切片の自家蛍光または標識体が発する蛍光の一方を十分に低減しうる適切なフィルターを用いることにより、ある視野で細胞形態情報のみを取得するようにし、他の視野で生体分子分布情報を取得するようにしてもよい。

10

【0107】

また、本工程において生体分子分布情報および細胞形態情報は、迅速な観察が行えるよう（蛍光）顕微鏡の鏡筒から取得するようにしてもよいし、（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、それを観察することにより取得するようにしてもよい。標識体として用いる蛍光体を構成する蛍光物質によるが、顕微鏡の鏡筒からの目視により十分に生体分子分布情報を取得することができなくても、カメラが撮影した画像から生体分子分布情報を取得することが可能な場合もある。

【0108】

前記生体分子分布情報を取得することとしては、例えば、蛍光の輝点数または発光輝度を基に、一細胞あたりの「検出対象とする生体物質」の分子数もしくは「検出対象とする生体物質」の密度（すなわち、単位面積あたりの「検出対象とする生体物質」の分子数）を計測することが挙げられる。標識体として用いた蛍光体を構成する蛍光物質の吸収極大波長および蛍光波長に対応した励起光源および蛍光検出用光学フィルターを選択すればよい。輝点数または発光輝度の計測には、市販の画像解析ソフト（例えば、全輝点自動計測ソフト「G-Count」（ジーオングストローム社製））を用いることが好適であるが、計測手段は特に限定されるものではない。

20

【実施例】

【0109】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

30

【0110】

< 1 . 標識体の作製 >

《蛍光集積体の合成》

[合成例1]

(FITC集積シリカナノ粒子)

アミノ反応性FITC（同仁化学社製）6.6mgと3-アミノプロピルトリメトキシシラン（信越シリコン社製：KBM903）3μLとを、N,N-ジメチルホルムアミド（DMF）中で混合、オルガノアルコキシシラン化合物を得た。

【0111】

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のテトラエトキシシラン（TEOS）、2mLの水、2mLの28%アンモニア水と3時間混合した。

40

【0112】

上記工程で作製した混合液を10,000Gで20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。さらに、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。その結果、蛍光集積体として、FITC集積シリカナノ粒子10mgが得られた。

得られたFITC集積シリカナノ粒子の1000個についてSEM観察を行ったところ、それぞれ平均粒径104nm、変動係数は12%であった。

50

## 【0113】

## [合成例2]

(TXR集積シリカナノ粒子)

合成例1において、アミノ反応性FITCに換えて、Texas Red(同仁化学社製、以下「TXR」という。)を用いて同様に合成し、TXR集積シリカナノ粒子10mgを得た。得られたTXR集積シリカナノ粒子の1000個についてSEM観察を行ったところ、平均粒径106nm、変動係数は11%であった。

## 【0114】

## [合成例3]

(半導体ナノ粒子(Qdot605)集積シリカナノ粒子)

CdSe/ZnSデカン分散液(「Qdot605」(登録商標)、インビトロジェン社製)10 $\mu$ LにTEOS0.1mg、エタノール0.01mL、濃アンモニア水0.03mLを加え3時間攪拌して加水分解を行った。

## 【0115】

上記工程で得られた混合液を10,000Gで20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。さらに、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。その結果、蛍光集積体として、Qdot605集積シリカナノ粒子が40mg得られた。

得られたQdot605集積シリカナノ粒子の1000個についてSEM観察を行ったところ、平均粒径108nm、変動係数は14%であった。

## 【0116】

《ビオチン化蛍光集積体の作製》

## [合成例4]

(ビオチン化FITC集積シリカナノ粒子)

合成例1で合成したFITC集積シリカナノ粒子へのビオチンの結合を、以下の手順に従って行うことにより、ビオチン化FITC集積シリカナノ粒子を得た。

## 【0117】

1mLのエタノール中に蛍光集積体を溶解させて3nMとし、3-アミノプロピルトリメトキシシランを0.1 $\mu$ L添加後室温で1時間反応した。得られた溶液を10,000Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、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。同様の手順による洗浄を3回行うことでビオチン結合用蛍光集積体を得た。

## 【0118】

エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を2mM含有したリン酸緩衝液生理的食塩水(PBS)に蛍光集積体を溶解させて3nMに調整し、この溶液に最終濃度10mMとなるようビオチン化ポリエチレングリコール(「NHS-dPEG-Biotin」(登録商標)、TOYOBO社製:QB10198a、PEG鎖長12)を混合し1時間反応した。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。さらに、同様の手順による洗浄を3回行うことでビオチン化FITC集積ナノ粒子を得た。

## 【0119】

## [合成例5]

(ビオチン化TXR集積シリカナノ粒子)

FITC集積シリカナノ粒子の代わりに、合成例2で合成したTXR集積シリカナノ粒子を用いた他は、合成例4と同様にして、ビオチン化TXR集積シリカナノ粒子を合成した。

## 【0120】

## [合成例6]

(ビオチン化Qdot605集積シリカナノ粒子)

FITC集積シリカナノ粒子の代わりに、合成例3で合成したQdot605集積シリ

10

20

30

40

50

カナノ粒子を用いた他は、合成例4と同様にして、ビオチン化Qdot605集積シリカナノ粒子を合成した。

【0121】

《ビオチン化TXRの作製》

[合成例7]

(ビオチン化TXR)

TXR(同仁化学社製)6mgとエチレンジアミン2mgをTHF(脱水)中で反応後、HPLC(GPC)(日本分析工業社製:LC-9101(カラム:JAIGEL-1HおよびJAIGEL-2H、溶媒:THF))で精製を行った。この精製物とアミノ反応性ビオチン(同仁化学社製)をTHF(脱水)中で反応後、上記HPLC(GPC)で同様に精製を行い、ビオチン化TXRを得た。

10

【0122】

《抗ペルオキシダーゼ抗体結合TXRシリカナノ粒子集積体の作製》

[合成例8]

(抗ペルオキシダーゼ抗体結合TXRシリカナノ粒子集積体)

合成例2で合成したTXR集積シリカナノ粒子への抗ペルオキシダーゼ抗体の結合を、以下の手順に従って行うことにより、抗ペルオキシダーゼ抗体結合TXR集積シリカナノ粒子を得た。

【0123】

(抗体結合用蛍光集積体の調製)

EDTAを2mM含有したPBSにTXR集積シリカナノ粒子を溶解させて3nMに調整し、この溶液に最終濃度10mMとなるようsuccinimidyl-[(N-maleomidopropionamid)-dodecaethyleneglycol]ester(サーモサイエンティフィック社製「SM(PEG)12」(商標))を混合し1時間反応した。この混合液を10,000Gで20分間遠心分離を行い、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。さらに、同様の手順による洗浄を3回行うことで抗体結合用蛍光集積体を得た。

20

【0124】

(還元化抗体の調製)

抗ペルオキシダーゼ抗体(シグマアルドリッチ社製:P7899)をN-succinimidyl S-acetylthioacetate(SATA)を用いてチオール基付加処理を行い、ゲルろ過カラムにより過剰の反応試薬を除去することにより、シリカナノ粒子に結合可能な還元化抗体溶液を得た。

30

【0125】

(抗ペルオキシダーゼ抗体結合蛍光集積体の調製)

上記で得られた抗体結合用蛍光集積体と還元化抗体とを、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10,000Gで20分間遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2mM含有したPBSを加えて、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。さらに、同様の手順による洗浄を3回行うことで、抗ペルオキシダーゼ抗体結合TXR集積シリカナノ粒子を得た。

40

【0126】

《アビジン化TXR集積シリカナノ粒子の作製》

[合成例9]

合成例2で合成したTXR集積シリカナノ粒子へのストレプトアビジンの結合を、それぞれ、以下の手順に従って行うことにより、アビジン化TXR集積シリカナノ粒子を得た。

【0127】

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

50

塩水)にTXR集積シリカナノ粒子を溶解させて3 nMに調整し、この溶液に最終濃度10 mMとなるようSM(PEG)12(サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethylene glycol]ester)を混合し1時間反応した。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回行うことでストレプトアビジン結合用蛍光集積体を得た。

#### 【0128】

一方、ストレプトアビジンを、SATAを用いてチオール基付加処理を行い、ゲルろ過カラムにより過剰の反応試薬を除去することによりシリカ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

10

#### 【0129】

上記で得られた結合用蛍光集積体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、アビジン化TXR集積シリカナノ粒子を得た。

#### 【0130】

< 2. 染色および観察工程 >

20

##### [実施例1]

(固定処理の効果)

免疫組織化学染色およびDAB染色を同一の組織切片に施すにあたり、DAB発色後に行う固定処理の効果を、以下の方法により評価した。

#### 【0131】

(1) 免疫組織化学染色

合成例5で作製したピオチン化TXR集積シリカナノ粒子と、組織検査用腫瘍マーカーキット「ペンタナI-VIEWパスウェーHER2(4B5)」(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)とを用いて、以下の手順によりヒト乳房組織の蛍光染色とDAB染色との重ね合わせ免疫組織化学染色(以下「蛍光DAB二重染色」という。)を行った。なお、「ペンタナI-VIEWパスウェーHER2(4B5)」は、抗HER2ウサギ抗体(4B5)、ピオチン化抗ウサギ抗体およびペルオキシダーゼ結合アビジンを標識化プローブ生体物質として含むキットである。また、染色用の切片として、コスモバイオ社製の組織アレイスライド(CB-A712)を用いた。

30

#### 【0132】

組織アレイスライドを脱パラフィン処理後、ペンタナI-VIEWパスウェーHER2(4B5)の添付文書に記載の抗原賦活化処理を行い、次いで、抗HER2ウサギ抗体(4B5)、ピオチン化抗ウサギ抗体、ペルオキシダーゼ結合アビジンの反応後、0.01 nMピオチン化TXR集積シリカナノ粒子を1時間反応させ、PBSによる洗浄後、Peroxidase Stain DAB Kit(ナカライテスク社製:25985-50)を用いてDABの発色を行った。

40

#### 【0133】

(2) 固定処理

上記(1)で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。

#### 【0134】

(3) 脱水、透徹、封入

上記(2)で固定処理した免疫組織化学染色切片に対して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。

50

## 【 0 1 3 5 】

## ( 4 ) 観 察

上記( 3 ) で得られた二重染色切片をスライドガラスで封入し、オリンパス社製汎用蛍光顕微鏡 B X 5 3 を用いて観察を行った( 固定処理「あり」)。測定時の励起波長は、5 8 0 n m、測定波長は 6 3 0 n m とした。

## 【 0 1 3 6 】

対照として、上記染色方法において、工程( 2 ) の固定処理を行わない方法により得られた二重染色切片の観察を行った( 固定処理「なし」)。

観察比較の結果、固定処理を行うことで、D A B 染色性を維持しつつ、蛍光輝点数の減少のない染色ができる事を確認した( 表 3 )。

## 【 0 1 3 7 】

## 【 表 3 】

表 3 観 察 結 果

サンプル	固定処理	観 察 結 果
蛍光DAB二重 染色	あり	細胞膜に、DAB染色なしと同等数の輝点を観察できた。 (1細胞当たりの輝点数6.1) DAB染色性は、ベンタナI-VIEWパスウェーHER2 (4B5) 記載の染色方法と同等であった。
蛍光DAB二重 染色	なし	細胞膜に、DAB染色なしと比較して減少した輝点を観察できた。 (1細胞当たりの輝点数4.1) DAB染色性は、ベンタナI-VIEWパスウェーHER2 (4B5) 記載の染色方法と同等であった。

## 【 0 1 3 8 】

## [ 実 施 例 2 ]

## ( 単 独 染 色 法 と の 比 較 )

実施例 1 に記載の染色方法の工程( 1 ) において、ビオチン化 T X R 集積シリカナノ粒子の反応を行わない染色( 以下「D A B 単独染色」という。)、D A B を添加せず、D A B の発色を行わない染色( 以下「蛍光単独染色」という。)と、蛍光 D A B 二重染色との比較を行った。観察は、顕微鏡を用いた明視野での、形態および D A B 染色観察と、蛍光によるマーカーの輝点ならびに輝度の観察とによって行った。

## 【 0 1 3 9 】

観察の結果、蛍光 D A B 二重染色でのみ、明視野による D A B 染色の観察、および、蛍光によるマーカーの輝点ならびに輝度観察がともに可能であることが分かった( 表 4 )。

## 【 0 1 4 0 】

## 【 表 4 】

	明視野での形態 およびDAB染色観察	蛍光定量計測
DAB単独	○	×
蛍光単独	×	○
蛍光DAB二重染色	○	○

## 【 0 1 4 1 】

## [ 実施例 3 ]

( 酵素反応時間によるマーカー染色性比較 )

ペンタナ I - V I E W パスウェー H E R 2 ( 4 B 5 ) の添付文書記載の染色方法 ( 以下「 D A B 標準染色法」という。 ) において、 P e r o x i d a s e S t a i n D A B K i t ( ナカライテスク社製 : 2 5 9 8 5 - 5 0 ) を用いて D A B の発色を行う際に、酵素反応時間を変化させることによる、マーカー ( H E R 2 ) の染色性の変化について、蛍光 D A B 二重染色および D A B 単独染色における比較実験を行った。

## 【 0 1 4 2 】

比較観察の結果、各観察方法において明視野観察における D A B 色素沈着性を指標としたマーカー染色性確認においては、酵素反応時間を 1 分から 5 分とする事により、D A B 色素沈着が増加して、マーカー染色性が増大したのに対し、蛍光 D A B 二重染色における輝点数および輝度を指標としたマーカー認識性能は変化しない事が分かった。

10

## 【 0 1 4 3 】

## [ 実施例 4 ]

( 染色法の比較 )

以下の ( a ) ~ ( d ) の染色方法による染色を行い、それぞれについて、D A B 標準染色法と比較した色素沈着染色性 ( 明視野観察可能な染色性 )、および、蛍光単独染色と比較した蛍光染色性を画像解析ソフト「 I m a g e J 」 ( 商品名、米国立衛生研究所製 ) を用いて観察し、検証を行った。色素沈着染色性は、画像解析ソフトに取り込んだ染色像を、グレースケール化して階調値化し、階調値のヒストグラムの形状および一定の閾値を越えたヒストグラム面積の割合を指標として評価した。蛍光染色性は、蛍光シグナル輝点数を画像解析ソフトで計測し、指標として評価した。

20

## 【 0 1 4 4 】

D A B 単独染色と比較して、閾値を越えたヒストグラム面積の割合が 6 5 % 以上であり、蛍光単独染色と比較した細胞当たりの蛍光シグナル輝点数が 6 5 % 以上であれば、組織切片上の特定生体物質の発現量および局在等について、詳細で、かつ、定量性の高い情報を取得でき、本発明の作用効果を奏するものと認められる。前記閾値を越えたヒストグラム面積の割合が 8 0 % 以上であり、かつ、前記細胞当たりの蛍光シグナル輝点数が 8 0 % 以上であることが、前記作用効果の観点から好ましい。測定時の励起波長は、5 8 0 n m、測定波長は 6 3 0 n m とした。

30

## 【 0 1 4 5 】

( a ) 実施例 1 に記載の染色方法において、ビオチン化 T X R 集積シリカナノ粒子の代わりに、合成例 9 のアビジン化 T X R 集積シリカナノ粒子を用いた染色 ( 以下「ペルオキシダーゼ、T X R 集積シリカナノ粒子同時染色」という。 )

## 【 0 1 4 6 】

( b ) 実施例 1 に記載の染色方法において、ビオチン化 T X R 集積シリカナノ粒子およびアビジン化ペルオキシダーゼの代わりに、合成例 9 のアビジン化 T X R 集積シリカナノ粒子を用いた染色と、ヒストファイン H E R 2 キット ( M O N O ) ( ニチレイ社製 ) による D A B 染色とを同時に行った染色 ( 以下「アビジン化蛍光体染色 + ヒストファイン D A B 染色」という。 )

40

## 【 0 1 4 7 】

( c ) 実施例 1 に記載の染色方法において、ビオチン化 T X R 集積シリカナノ粒子の代わりに、合成例 8 の抗ペルオキシダーゼ抗体結合 T X R 集積シリカナノ粒子を用いた染色 ( 以下「抗 H R P 抗体を用いた蛍光 D A B 二重染色」という。 )

( d ) 実施例 1 に記載の染色方法による蛍光 D A B 二重染色

## 【 0 1 4 8 】

なお、ヒストファイン H E R 2 キット ( M O N O ) は、マウス抗ヒト H E R 2 / n e u 遺伝子産物モノクローナル抗体 ( S V 2 - 6 1 ) およびペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス I g G ポリクローナル抗体 ( F a b ' ) を、標識化生体プローブ物質として含むキットである。該キットに含まれるマウス抗ヒト H E R 2 / n e u 遺伝子産物モノクローナル抗体と、蛍光単独染色および上記

50

方法 ( b ) で用いる「ペンタナ I - V I E W パスウェー H E R 2 ( 4 B 5 )」に含まれる抗 H E R 2 ウサギ抗体とは、ヒト H E R 2 タンパクへの結合において競合しない。したがって、「アビジン化蛍光体染色+ヒストファイン D A B 染色」は、同一の特定生体物質に対して、明視野観察可能な染色、および、蛍光染色の両方を行うことになる。

【 0 1 4 9 】

その結果、ペルオキシダーゼ、 T X R 集積シリカナノ粒子同時染色においては、 D A B 標準染色と比較した色素沈着染色性および蛍光単独染色と比較した細胞当たりの蛍光シグナル輝点数が顕著に低下した。

【 0 1 5 0 】

アビジン化蛍光体染色 + ヒストファイン D A B 染色においては、 D A B 標準染色と比較した染色性および蛍光単独染色と比較した細胞当たりの蛍光シグナル輝点数について、顕著な低下は認められず、安定した染色性を示した。

【 0 1 5 1 】

抗 H R P 抗体を用いた蛍光 D A B 二重染色および蛍光 D A B 二重染色においては、さらに安定した染色性を示した ( 表 5 )。

【 0 1 5 2 】

【表 5】

	DAB標準染色法と比較した一定の閾値を越えたヒストグラム面積の割合の比	蛍光単独染色と比較した細胞当たりの蛍光シグナル輝点数
(a) ペルオキシダーゼ、 T X R 集積シリカナノ粒子同時染色	40%	34%
(b) アビジン化蛍光体染色+ヒストファイン D A B 染色	69%	68%
(c) 抗 H R P 抗体を用いた蛍光 D A B 二重染色	82%	85%
(d) 蛍光 D A B 二重染色	96%	98%

【 0 1 5 3 】

[ 実施例 5 ]

( 蛍光 D A B 二重染色における蛍光体組成の比較 )

標識体として、以下の ( a ) ~ ( d ) の 4 種類を用いて、蛍光 D A B 二重染色を行い、その染色性と輝点計測性を、汎用蛍光顕微鏡 ( オリンパス社製 : B X 5 3 ) と共焦点レーザー顕微鏡 ( オリンパス社製 : F V 1 0 0 0 - D ) とを用いて比較検討した。励起波長は、 Q - d o t 6 0 5 : 4 0 0 n m、ビオチン化 T X R 集積シリカナノ粒子 : 5 8 0 n m、測定波長は、 Q - d o t 6 0 5 : 6 3 0 n m、ビオチン化 T X R 集積シリカナノ粒子 : 6 3 0 n m とした。染色工程は、実施例 1 と同様に行った。

【 0 1 5 4 】

( a ) ビオチン化 T X R 色素 ( 合成例 7 )

(b) ビオチン化 Q-dot 605 シリカナノ粒子 (ライフテクノロジー社製: Q10301MP)

(c) ビオチン化 TXR 集積シリカナノ粒子 (合成例 5)

(d) ビオチン化 Q-dot 605 集積シリカナノ粒子 (合成例 6)

下記表 6 に示されるように、いずれの標識体を用いた場合でも、共焦点レーザー顕微鏡によって輝度評価を行うことができた。また、(a) ビオチン化 TXR 色素以外の標識体を用いた場合には、輝点計測も行うことができた。

【0155】

さらに、標識体として、集積化された (c) ビオチン化 TXR 集積シリカナノ粒子、および (d) ビオチン化 Q-dot 605 集積シリカナノ粒子を用いた場合、汎用顕微鏡においても輝度の評価および輝点の計測ができることがわかった。

【0156】

【表 6】

標識体	輝度評価	輝点計測 (共焦点)	輝点計測 (汎用顕微鏡)
ビオチン化 TXR シリカナノ粒子	○	n.d.	n.d.
ビオチン化 Q-dot 605	○	○	n.d.
ビオチン化 TXR 集積シリカナノ粒子	○	○	○
ビオチン化 Q-dot 605 集積シリカナノ粒子	○	○	○

【0157】

[実施例 6]

(蛍光 DAB 二重染色における波長検討)

標識体として、ビオチン化 FITC 集積シリカナノ粒子 (合成例 1) およびビオチン化 TXR 集積シリカナノ粒子 (合成例 2) を用いて蛍光 DAB 二重染色を行い、DAB 単独染色と比較した染色性と、蛍光単独染色と比較した細胞当たりの蛍光シグナル輝点数の変化について検証を行った。励起波長は、ビオチン化 FITC 集積シリカナノ粒子: 480 nm、ビオチン化 TXR 集積シリカナノ粒子: 580 nm、測定波長は、ビオチン化 FITC 集積シリカナノ粒子: 530 nm、ビオチン化 TXR 集積シリカナノ粒子: 630 nm とした。染色方法は、実施例 1 と同様に行い、染色性の評価は実施例 4 と同様に行った。

【0158】

表 7 に示す通り、ビオチン化 FITC 集積シリカナノ粒子を用いた染色では、若干の輝点数減少が観察されたが、いずれも良好な蛍光観察を行うことが可能であった。

【0159】

【表 7】

標識体	DAB標準染色法と比較した染色性	蛍光単独染色と比較した細胞当たりの蛍光シグナル輝点数
ビオチン化FITC集積シリカナノ粒子	同程度	91%
ビオチン化TXR集積シリカナノ粒子	同程度	98%

10

## 【符号の説明】

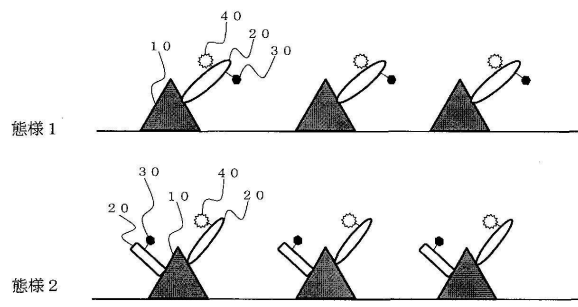
## 【 0 1 6 0 】

- 1 0 . . . 特定生体物質
- 2 0 . . . プローブ生体物質
- 2 1 . . . 特定生体物質を認識して結合する抗体
- 2 3 . . . ペルオキシダーゼを認識して結合する抗体
- 3 0 . . . 明視野観察を可能にする標識体（色素沈着誘導標識体）
- 3 1 . . . ペルオキシダーゼ
- 4 0 . . . 蛍光標識体
- 5 0 . . . 特定生体物質を認識して結合する抗体を認識して結合する抗体
- 7 0 . . . ストレプトアビジン
- 8 0 . . . ビオチン

20

【図1】

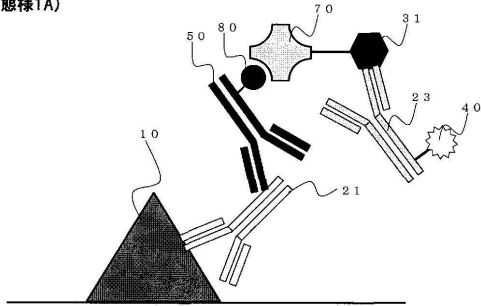
図1



【図2】

図2

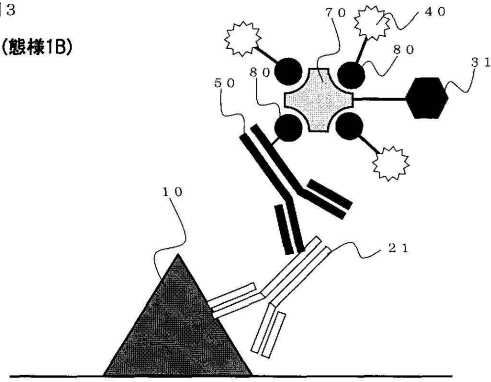
(態様1A)



【図3】

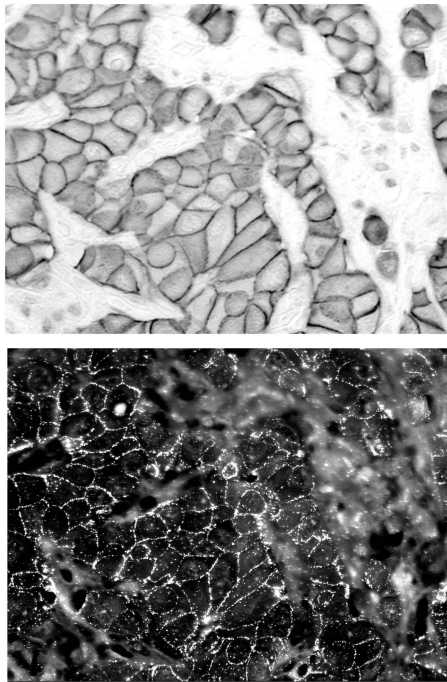
図3

(態様1B)



【図4】

同一視野のDAB染色(上)と蛍光染色(下)



## フロントページの続き

(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 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

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開2008-298654(JP,A)  
国際公開第2009/117138(WO,A2)  
国際公開第2012/029752(WO,A1)  
特開2009-115599(JP,A)  
国際公開第2009/116266(WO,A1)  
TAKAYA MURAKAMI ET AL., A novel method for detecting HIV-1 by non-radioactive in situ hybridization: application of a peptide nucleic acid probe and catalysed signal amplification, THE JOURNAL OF PATHOLOGY, 2001年 1月 1日, vol. 194, no. 1, pages 130 - 135

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48 - 33/98  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
CPlus/MEDLINE/BIOSIS(STN)

专利名称(译)	组织染色方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP6168047B2</a>	公开(公告)日	2017-07-26
申请号	JP2014507895	申请日	2013-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司 国立大学法人东北大学		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	郷田秀樹 星野秀樹 高梨健作 中野寧 権田幸祐 大内憲明 渡邊みか		
发明人	郷田 秀樹 星野 秀樹 高梨 健作 中野 寧 権田 幸祐 大内 憲明 渡邊 みか		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N1/30 G01N21/6428 G01N33/5082 G01N33/52 G01N33/535 G01N33/56966 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/552		
FI分类号	G01N33/48.P G01N33/53.Y G01N33/53.U		
优先权	2012080782 2012-03-30 JP		
其他公开文献	JPWO2013146741A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供组织染色方法，能够以高定量检测高度准确的染色，以及可通过明视野观察获得的详细信息，以及可通过明视野观察获得的详细信息，组织样本中生物物质的表达量和位置到。本发明的组织染色方法是组织染色方法，其中可以对相同的特定生物材料进行明视野观察和荧光染色。

(19) 日本国特許庁 (JP) (12) 特許公報 (B2) (11) 特許番号  
特許第6168047号  
(P6168047)

(45) 発行日	平成29年7月26日 (2017. 7. 26)	(24) 登録日	平成29年7月7日 (2017. 7. 7)
(51) Int. Cl.	F 1		
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 33/53	U

請求項の数 5 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2014-507895 (P2014-507895)	(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
(86) (22) 出願日	平成25年3月26日 (2013. 3. 26)	(74) 代理人	110001070 特許業務法人 S S I N P A T
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/058701	(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
(87) 国際公開番号	W02013/146741	(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
(87) 国際公開日	平成25年10月3日 (2013. 10. 3)	(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
審査請求日	平成28年3月7日 (2016. 3. 7)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-80782 (P2012-80782)		
(32) 優先日	平成24年3月30日 (2012. 3. 30)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く