

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5915531号  
(P5915531)

(45) 発行日 平成28年5月11日(2016.5.11)

(24) 登録日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 P
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533
GO 1 N 33/58 (2006.01)	GO 1 N 33/58 Z
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/00

請求項の数 2 (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2012-531709 (P2012-531709)	(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23年3月15日(2011.3.15)	(74) 代理人 110001254 特許業務法人光陽国際特許事務所
(86) 国際出願番号 PCT/JP2011/055991	(72) 発明者 相宮 拓司 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内
(87) 国際公開番号 W02012/029342	(72) 発明者 郷田 秀樹 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内
(87) 国際公開日 平成24年3月8日(2012.3.8)	(72) 発明者 岡田 尚大 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内
審査請求日 平成26年1月16日(2014.1.16)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-193155 (P2010-193155)	
(32) 優先日 平成22年8月31日(2010.8.31)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-193153 (P2010-193153)	
(32) 優先日 平成22年8月31日(2010.8.31)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-191621 (P2010-191621)	
(32) 優先日 平成22年8月30日(2010.8.30)	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織評価方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

蛍光物質を複数集積した蛍光物質集積粒子に生体物質認識部位が結合されたものを染色試薬として用いて組織切片を染色し、

当該染色された組織切片の蛍光輝点の数と各蛍光輝点の輝度とを計測し、

当該計測された蛍光輝点の数及び各蛍光輝点の輝度に基づいて、前記染色された組織切片に結合している蛍光物質集積粒子の粒子数を算出し、

当該算出された蛍光物質集積粒子の粒子数に基づいて、前記染色された組織切片における前記生体物質認識部位に対応する生体物質の発現レベルを評価する組織評価方法。

【請求項2】

請求項1に記載の組織評価方法において、

前記計測された蛍光輝点の数及び各蛍光輝点の輝度から輝度分布を求め、

当該輝度分布に基づいて前記蛍光物質集積粒子1粒子当たりの輝度を算出し、

前記計測された各蛍光輝点の輝度の和及び前記算出された蛍光物質集積粒子1粒子当たりの輝度に基づいて、前記染色された組織切片に結合している蛍光物質集積粒子の粒子数を算出し、

当該算出された蛍光物質集積粒子の粒子数に基づいて、前記染色された組織切片における前記生体物質の発現レベルを評価する組織評価方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

## 【0001】

本発明は、組織染色方法、組織評価方法および生体物質検出方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

病理診断では、まず採取した組織を固定するために脱水し、パラフィンによるブロック化といった処理を行った後、2～8μmの厚さの薄片に切り、パラフィンを取り除き、染色して顕微鏡観察を行う。病理医は、こ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等の形態学的な情報、染色情報をもとに診断を行っている。画像のデジタル化技術の発達に伴い、病理診断の分野においても、顕微鏡やデジタルカメラ等を用いてデジタルカラー画像として入力された病理画像から、病理医が病理診断を行う際に必要となる情報を抽出・計測して表示する自動化された病理診断支援装置が普及してきている。

10

## 【0003】

例えば、特許文献1には、病理画像から細胞核領域及び細胞質領域をそれぞれ特定する核・細胞質分布推定手段と、病理画像から腺腔領域（細胞組織を殆ど含まない領域）を特定する腺腔分布抽出手段と、癌細胞が存在するか否かを判定する癌部位推定手段と、癌の進行度を判定する進行度判定手段と、癌細胞の分布図や進行度等を表示する画像表示手段と、を有する病理診断支援装置が開示されている。

## 【0004】

また、特許文献2には、正常部位と癌部位をそれぞれ選択的に染色するような2種類の染料で病理標本を染色し、更にスペクトル画像からランベルト・ベールの法則を用いて染色濃度を評価し、癌細胞の有無を判定する癌細胞の検出方法が開示されている。

20

## 【0005】

しかし、いずれの評価法を用いた場合でも、組織染色方法は従来色素染色法（例えばヘマトキシリン-エオジン染色）、酵素を用いた色素染色法（例えばDAB染色）であり、その染色濃度は温度、時間等の環境条件により大きく左右され、病理診断支援装置の正確な定量測定性能を生かし切れていない。

## 【0006】

また、色素に代わる標識試薬として感度性能が高い蛍光色素が組織染色の研究に用いられているが（非特許文献1参照）、発明者らが、特許文献3に開示されている細胞識別・定量方法により、有機蛍光色素であるFITCを用い作製した病理切片を蛍光顕微鏡下で観察したところ、その発光輝度は極めて弱く、極微量のバイオマーカーを発光レベルによって自動判別することはできず、更なる改善が必要であることがわかった。

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】特開2004-286666号公報

【特許文献2】特表2001-525580号公報

【特許文献3】特開昭63-66465号公報

## 【非特許文献】

40

## 【0008】

【非特許文献1】「病理と臨床 Vol.25 2007年臨時増刊号 診断に役立つ免疫組織化学」文光堂 2007年

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

これに対し、近年、抗体医薬を中心とした分子標的薬治療の広がりに伴い、分子標的薬をより効率的に使用するため、正確な診断法の必要性が高まってきている。病理診断においても、より正確に疾病の診断を行うため、極微量のバイオマーカーを組織切片上で定量的に検出することが求められている。しかし、従来の病理組織染色方法では、安定した定

50

量性能、微量検出性能を得ることは困難であった。

【0010】

本発明は、上記の従来技術における問題に鑑みてなされたものであり、微量の生体物質（バイオマーカー）を定量的に検出することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0012】

上記課題を解決するために、

本発明によれば、

蛍光物質を複数集積した蛍光物質集積粒子に生体物質認識部位が結合されたものを染色試薬として用いて組織切片を染色し、

当該染色された組織切片の蛍光輝点の数と各蛍光輝点の輝度とを計測し、

当該計測された蛍光輝点の数及び各蛍光輝点の輝度に基づいて、前記染色された組織切片に結合している蛍光物質集積粒子の粒子数を算出し、

当該算出された蛍光物質集積粒子の粒子数に基づいて、前記染色された組織切片における前記生体物質認識部位に対応する生体物質の発現レベルを評価する組織評価方法が提供される。

【発明の効果】

【0014】

本発明によれば、微量の生体物質を定量的に検出することができるのに加え、組織切片から計測された蛍光輝点の数及び各蛍光輝点の輝度に基づいて、組織切片に結合している蛍光物質集積粒子の粒子数を算出し、その粒子数に基づいて、生体物質の発現レベルを評価するので、生体物質の定量評価において、安定した評価結果を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】1細胞当たりの粒子数と1細胞当たりの輝度の経時変化を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

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。

【0017】

本実施形態では、組織染色方法と、これを利用した組織評価方法および生体物質検出方法とを、提供する。

本実施形態にかかる組織染色方法では、生体物質認識部位が結合した蛍光物質を集積したナノ粒子を用いる。

【0018】

本実施形態にかかる組織評価方法では、生体物質認識部位が結合された蛍光物質又は蛍光物質集積粒子を用い、その輝点の数に基づいて組織切片上に存在するバイオマーカーと結合した蛍光物質又は蛍光物質集積粒子の数を求める。

【0019】

本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）染色試薬を用いて病理切片を染色する工程と、（2）染色後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。

特に、（2）の工程では、染色試薬として2種類のナノ粒子を使用する。

一方のナノ粒子には、一定の生体物質認識部位が結合され、かつ、一定の蛍光物質が内包されている。他方のナノ粒子には、一方のナノ粒子の生体物質認識部位とは異なる生体物質認識部位が結合され、かつ、一方のナノ粒子の蛍光物質とは異なる蛍光波長を有する蛍光物質が内包されている。すなわち、各ナノ粒子には、互いに異なる生体物質認識部位が結合され、蛍光波長が互いに異なる蛍光物質が内包されている。そのため、蛍光物質に起因する蛍光波長の違いから、生体物質認識部位に応じた2種の生体物質を検出することができるし、生体物質認識部位の選定から、将来的には現在未確認の抗原を特定すること

10

20

30

40

50

もできると考えられる。

なお、本発明の好ましい実施形態では、2種類のナノ粒子を用いた例を示すが、生体物質認識部位と蛍光物質（蛍光波長）とが互いに異なれば、3種類以上のナノ粒子を用いて3種類以上の生体物質を検出するものとしてもよい。

蛍光物質などの種類や特性、生体物質検出方法の詳細は下記のとおりである。

#### 【0020】

〔蛍光物質〕

本発明で用いられる蛍光物質としては、有機蛍光色素、量子ドット（半導体粒子）、希土類粒子を挙げることができる。200～700nmの範囲内の波長の紫外～近赤外光により励起されたときに、400～900nmの範囲内の波長の可視～近赤外光の発光を示すことが好ましい。

10

#### 【0021】

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（インビトロジェン社製）系色素分子、BODIPY（インビトロジェン社製）系色素分子、カスケード系色素分子、クマリン系色素分子、エオジン系色素分子、NBD系色素分子、ピレン系色素分子、Texas Red系色素分子、シアニン系色素分子等を挙げることができる。

#### 【0022】

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、エオジン、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。

20

30

#### 【0023】

量子ドットとしては、II - VI族化合物、III - V族化合物、又はIV族元素を成分として含有する量子ドット（それぞれ、「II - VI族量子ドット」、「III - V族量子ドット」、「IV族量子ドット」ともいう。）のいずれかを用いることができる。単独でも複数種を混合したものをを用いてもよい。

40

#### 【0024】

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

#### 【0025】

上記量子ドットをコアとし、その上にシェルを設けた量子ドットを用いることもできる。以下、本明細書中シェルを有する量子ドットの表記法として、コアがCdSe、シェル

50

がZnSの場合、CdSe/ZnSと表記する。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。

量子ドットは必要に応じて、有機ポリマー等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（インビトロジェン社製）、表面アミノ基を有するCdSe/ZnS（インビトロジェン社製）等が挙げられる。

【0026】

希土類粒子としては、例えば、酸化ネオジム、塩化ネオジム、硝酸ネオジム、酸化イッテルビウム、塩化イッテルビウム、硝酸イッテルビウム、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。

10

【0027】

〔蛍光物質を複数集積した粒子〕

本発明において蛍光物質を複数集積した粒子とは、蛍光物質がナノ粒子内部に分散されたもの（蛍光物質を複数内包したナノ粒子（蛍光物質内包ナノ粒子））、粒子外部に集積したもの、粒子の内部、外部によらず集積したものをいい、蛍光物質とナノ粒子自体とが化学的に結合していても、していなくてもよい。

ナノ粒子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、ポリ乳酸、シリカ等を挙げることができる。

20

【0028】

本発明で用いられる蛍光物質を複数集積した粒子は、公知の方法により作製することが可能である。

例えば、有機蛍光色素を内包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FITC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内包シリカナノ粒子を合成することができる。

【0029】

量子ドットを内包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内包シリカナノ粒子の合成を参考に合成することができる。

30

【0030】

量子ドットを外包したシリカナノ粒子は、ケミカル・コミュニケーション 2670ページ（2009）に記載されているCdSe/ZnSを5-amino-1-pentanolとAPSでキャッピングした粒子を表面に集積したシリカナノ粒子の合成を参考に合成することができる。

【0031】

有機蛍光色素を内包したポリスチレンナノ粒子は、米国特許4326008（1982）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5326692（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。

40

【0032】

量子ドットを内包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。

【0033】

本発明で用いられる蛍光物質を複数集積した粒子の平均粒径は特に限定されないが、30～800nm程度のものを用いることができる。平均粒径が30nm未満の場合には、集積粒子に含まれる蛍光物質が少なく、目的とする生体物質の定量評価が困難となり、800nmを超える場合には、病理組織での生体物質との結合が困難となるためである。な

50

お、平均粒径は、40～500nmの範囲内であることがより好ましい。ここで、平均粒径を40～500nmとしたのは、40nm未満の場合には、高価な検出系が必要となり、500nmを超える場合には、物理的な大きさから定量範囲が狭まるためである。また、粒径のばらつきを示す変動係数(=(標準偏差/平均値)×100%)は特に限定されないが、20%のものを用いることができる。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の粒子について断面積を計測し、各計測値を円の面積としたときの円の直径を粒径として求めた。本願においては、1000個の粒子の粒径の算術平均を平均粒径とした。変動係数も、1000個の粒子の粒径分布から算出した値とした。

#### 【0034】

10

〔緩衝液〕

緩衝液とは、抗原-抗体反応に適した環境を安定して維持するための溶媒である。例えば、リン酸緩衝液生理的食塩水(PBS)、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、MES緩衝液、クエン酸-リン酸緩衝液等である。

#### 【0035】

〔生体物質認識部位と蛍光物質を集積したナノ粒子との結合〕

本発明に係る生体物質認識部位とは、目的とする生体物質と特異的に結合及び/又は反応する部位である。例えば、ヌクレオチド鎖、タンパク質、抗体等が挙げられる。具体的には、細胞表面に存在するタンパク質であるHER2に特異的に結合する抗HER2抗体、細胞核に存在するエストロゲン受容体(ER)に特異的に結合する抗ER抗体、細胞骨格を形成するアクチンに特異的に結合する抗アクチン抗体等があげられる。中でも抗HER2抗体及び抗ER抗体を蛍光物質集積ナノ粒子に結合させたものは、乳癌の投薬選定に用いることができ、好ましい。

20

#### 【0036】

生体物質認識部位と蛍光物質集積ナノ粒子の結合の態様としては特に限定されず、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着及び化学吸着等が挙げられる。結合の安定性から共有結合等の結合力の強い結合が好ましい。

#### 【0037】

また、生体物質認識部位と蛍光物質集積ナノ粒子の間を連結する有機分子があってもよい。例えば、生体物質との非特異的吸着を抑制するため、ポリエチレングリコール鎖を用いることができ、Thermo Scientific社製SM(PEG)12を用いることができる。

30

#### 【0038】

蛍光物質集積シリカナノ粒子へ生体物質認識部位を結合させる場合、蛍光物質が有機蛍光色素の場合でも、量子ドットの場合でも、希土類粒子の場合でも同様の手順を適用することができる。

例えば、無機物と有機物を結合させるために広く用いられている化合物であるシランカップリング剤を用いることができる。このシランカップリング剤は、分子の一端に加水分解でシラノール基を与えるアルコキシシリル基を有し、他端に、カルボキシル基、アミノ基、エポキシ基、アルデヒド基等の官能基を有する化合物であり、上記シラノール基の酸素原子を介して無機物と結合する。

40

具体的には、メルカプトプロピルトリエトキシシラン、グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、ポリエチレングリコール鎖をもつシランカップリング剤(例えば、Gelst社製PEG-silane no. SIM6492.7)等が挙げられる。シランカップリング剤を用いる場合、二種以上を併用してもよい。

#### 【0039】

有機蛍光色素集積シリカナノ粒子とシランカップリング剤との反応手順は、公知の手法を用いることができる。

例えば、得られた有機蛍光色素集積シリカナノ粒子を純水中に分散させ、アミノプロピ

50

ルトリエトキシシランを添加し、室温で12時間反応させる。反応終了後、遠心分離又は過により表面がアミノプロピル基で修飾された有機蛍光色素集積シリカナノ粒子を得ることができる。続いてアミノ基と抗体中のカルボキシル基とを反応させることで、アミド結合を介し抗体を有機蛍光色素集積シリカナノ粒子と結合させることができる。必要に応じて、EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride: Pierce社製)のような縮合剤を用いることもできる。

#### 【0040】

必要により、有機分子で修飾された有機蛍光色素集積シリカナノ粒子と直接結合しうる部位と、分子標的物質と結合しうる部位とを有するリンカー化合物を用いることができる

10

具体例として、アミノ基と選択的に反応する部位とメルカプト基と選択的に反応する部位の両方をもつ sulfosuccinimide (Sulfosuccinimide 4[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate: Pierce社製)を用いると、アミノプロピルトリエトキシシランで修飾した有機蛍光色素集積シリカナノ粒子のアミノ基と、抗体中のメルカプト基を結合させることで、抗体結合した有機蛍光色素集積シリカナノ粒子ができる。

#### 【0041】

蛍光物質集積ポリスチレンナノ粒子へ生体物質認識部位を結合させる場合、蛍光物質が有機蛍光色素の場合でも、量子ドットの場合でも、希土類粒子の場合でも同様の手順を適用することができる。すなわち、アミノ基等の官能基をもつポリスチレンナノ粒子へ有機蛍光色素、量子ドット又は希土類粒子を含浸することにより、官能基もつ蛍光物質集積ポリスチレンナノ粒子を得ることができ、以降EDC又はsulfosuccinimideを用いることで、抗体結合した蛍光物質集積ポリスチレンナノ粒子ができる。

20

#### 【0042】

〔染色方法(生体物質検出方法)〕

以下、本発明の染色方法(生体物質検出方法)について述べる。

本発明の染色方法は病理切片組織に限定せず、細胞染色にも適用可能である。

本発明の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用いることができる。

30

#### 【0043】

##### 1) 脱パラフィン工程

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。

次いで、エタノールを入れた容器に病理切片を浸漬させ、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。

次いで、水を入れた容器に、病理切片を浸漬させ、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。

40

#### 【0044】

##### 2) 賦活化処理

公知の方法にならひ、目的とする生体物質の賦活化処理を行う。

賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)、1mMEDTA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。

次いで、水、PBSを入れた容器に、賦活化処理後の切片を浸漬させ、洗浄を行う。温

50

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。

#### 【0045】

3) 生体物質認識部位が結合された蛍光物質集積ナノ粒子を用いた染色

生体物質認識部位が結合された蛍光物質集積ナノ粒子のPBS分散液を病理切片に載せ、目的とする生体物質と反応させる。蛍光物質集積ナノ粒子と結合させる生体物質認識部位を変えることにより、さまざまな生体物質に対応した染色が可能となる。

複数(2種以上)の生体物質を検出しようとする場合は、生体物質認識部位が異なる蛍光物質内包ナノ粒子PBS分散液をそれぞれ調製し、病理切片に載せ、目的とする生体物質との反応を行う。病理切片に載せる際に、それぞれの蛍光物質内包ナノ粒子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。混合比は特に限定されるものではないが、本発明の効果が表れるには両者の比は1:1~5:1でよい。

蛍光物質集積ナノ粒子のPBS分散液には、BSA含有PBS等、公知のプロッキング剤やTween20等の界面活性剤を含有させてもよい。

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。

蛍光物質集積ナノ粒子による染色を行う前に、BSA含有PBS等、公知のプロッキング剤を滴下することが好ましい。

次いで、PBSを入れた容器に、染色後の切片を浸漬させ、未反応蛍光物質集積ナノ粒子の除去を行う。PBS溶液にはTween20等の界面活性剤を含有させてもよい。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。

組織の形態観察のため、ヘマトキシリン-エオジン染色を行ってもよい。

カバーガラスを切片に載せ、封入する。必要に応じて市販の封入剤を使用してもよい。

#### 【0046】

4) 蛍光顕微鏡下の観察

染色した病理切片に対し蛍光顕微鏡を用いて、目的とする生体物質の発現レベルを輝点数又は発光輝度に基づいて評価する。

輝点数又は発光輝度の計測では、用いた蛍光物質の吸収極大波長及び蛍光波長に対応した励起光源は及び蛍光検出用光学フィルターを選択する。

輝点数又は発光輝度の計測は、画像解析ソフト、例えば、公開解析ソフトImageJ、株式会社ジーオングストローム社製の全輝点自動計測ソフトG-Countを用いて行うことができる。

#### 【0047】

次に、本発明を上記実施形態に基づいて具体的に実施した実施例について説明するが、本発明はこれらに限定されない。

#### 【実施例1】

#### 【0048】

[手順1: 蛍光物質内包粒子の合成]

テトラメチルローダミン(インビトロジェン社製TAMRA-SE)6.6mg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)3μL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。

#### 【0049】

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観察を行い、200粒

10

20

30

40

50

子の粒子径を測定したところ、平均粒径104 nm、変動係数は12%であった。

【0050】

同様の方法で、Cy5-SE（ロシュ社製）を用いて平均粒子径20、42、103、204、498 nmのCy5内包・シリカナノ粒子を得た。

【0051】

また、同様の方法で、FITC-SE（インビトロジェン社製）を用いて平均粒子径106 nmのFITC内包・シリカナノ粒子を得た。

【0052】

[手順2：蛍光物質内包粒子への抗体の結合]

手順1で得られた蛍光物質内包シリカナノ粒子（テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子、Cy5内包・シリカナノ粒子、FITC内包・シリカナノ粒子）のそれぞれを、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2 mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3 nMに調整し、この溶液に最終濃度が10 mMとなるようSM（PEG）12（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[(N-maleomidopropionamid)-dodecaethyleneglycol] ester）を混合し、1時間反応させた。この混合液を10000 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回行うことで抗体結合用シリカナノ粒子を得た。

10

【0053】

一方、抗ヒトER抗体を1 M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。

20

【0054】

上記で得られた抗体結合用シリカナノ粒子と還元化抗体溶液とを、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10000 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回行うことで抗ヒトER抗体結合・蛍光物質内包シリカナノ粒子を得た。

30

【0055】

[手順3：蛍光物質内包粒子を用いた組織染色]

手順2で作製した抗ヒトER抗体結合・蛍光物質内包シリカナノ粒子を用いてヒト乳房組織の免疫染色を行った。染色切片は、コスモバイオ社製の組織アレイスライド（CB-A712）を用いた。組織アレイスライドを脱パラフィン処理した後、組織アレイスライドを浸漬する液体をキシレン、エタノール、水の順に置換して洗浄し、10 mMクエン酸緩衝液（pH 6.0）中で15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。抗原の賦活化処理後の組織アレイスライドは、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キング処理を行った。

40

【0056】

ブロッキング処理後、1% BSA含有PBS緩衝液で0.05 nMに希釈した各抗ヒトER抗体結合・蛍光物質内包シリカナノ粒子を組織切片と3時間反応させた。抗ヒトER抗体結合・蛍光物質内包シリカナノ粒子と反応させた後、組織アレイスライドをPBS緩衝液で洗浄し、Merck Chemicals社製Aquatexを用いて封入した。

【0057】

[手順4：蛍光物質内包粒子を用いて染色した組織の輝点計測]

手順3で染色した組織切片についてオリンパス社製DSU共焦点顕微鏡を用いて画像を取得し、ジーオングストローム社製の輝点計測ソフトウェア、G-countを用いて輝点の計測を行った。

Cy5の観察は、励起フィルター（640/30 nmのバンドパスフィルター）、ビー

50

ムスプリッター（660 nm）、蛍光フィルター（690 / 50 nmのバンドパスフィルター）のフィルターセットを用いた。

テトラメチルローダミンの観察は、励起フィルター（550 / 25 nmのバンドパスフィルター）、ビームスプリッター（570 nm）、蛍光フィルター（605 / 70 nmのバンドパスフィルター）のフィルターセットを用いた。

FITCの観察は、励起フィルター（470 / 40 nmのバンドパスフィルター）、ビームスプリッター（495 nm）、蛍光フィルター（525 / 50 nmのバンドパスフィルター）のフィルターセットを用いた。

組織アレイスライド中の予めDAB染色で染色濃度が異なることが予測された8スポットについて、各30細胞の輝点の数を計測し、1細胞当たりの輝点の数（平均値）を求めた。また、同様に、8スポットについて、各30細胞の発光輝度を計測し、1細胞当たりの発光輝度（平均値）を求めた。

【0058】

[比較例：蛍光色素単体を用いた組織染色]

比較例として、Cy5、テトラメチルローダミン、FITC蛍光色素単体に抗ヒトER抗体を結合させたものを用い、手順3と同様の方法で組織アレイスライドを染色し、手順4と同様の方法で組織の輝点を計測した。

具体的には、組織アレイスライド中の8スポットについて、各30細胞の輝点の数及び発光輝度を計測し、1細胞当たりの輝点の数及び1細胞当たりの発光輝度を求めた。

【0059】

[実験結果A]

まず、標識体に含まれる蛍光色素の違い（すなわち、発光波長の違い）によるバイオマーカー（ER）の検出感度の差について検討した。

表1に、Cy5内包・シリカナノ粒子（平均粒子径103 nm）、テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子（平均粒子径104 nm）、FITC内包・シリカナノ粒子（平均粒子径106 nm）のそれぞれを用いた場合に計測された1細胞当たりの輝点数を示す。表1において、「-」は、バックグラウンドレベル以上の輝点がないことを示し、「+」は、発光が強く、周囲の輝点と区別がつかないことを示している。

【0060】

【表1】

標識体の発光波長と1細胞当たりの輝点数

標識体	スポット番号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cy5内包・シリカナノ粒子	-	4	14	32	120	392	+	+
テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子	-	6	12	34	112	380	+	+
FITC内包・シリカナノ粒子	-	-	10	36	118	381	+	+

-:バックグラウンドレベル以上の輝点なし

+:発光が強く周囲の輝点と区別がつかない

【0061】

表1に示すように、いずれの蛍光物質内包粒子を用いた場合でも、輝点数の差によりバイオマーカーの定量評価が可能となっている。ただし、スポット番号2の組織切片について、Cy5内包・シリカナノ粒子及びテトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子を用いた場合には、輝点数を計測可能であったのに対し、FITC内包・シリカナノ粒子を用いた場合には、バックグラウンドレベル以上の輝点は計測されなかった。すなわち、励起波長が長いCy5（励起波長650 nm、発光波長670 nm）、テトラメチルローダミ

10

20

30

40

50

ン（励起波長 550 nm、発光波長 570 nm）の内包粒子の方が、FITC（励起波長 495 nm、発光波長 520 nm）の内包粒子と比べて、より微量のバイオマーカーを検出できることがわかる。

【0062】

[実験結果 B]

次に、標識体の粒子径の違いによるバイオマーカー（ER）の検出感度の差について検討した。

表 2 に、Cy5 内包・シリカナノ粒子（平均粒子径 20、42、103、204、498 nm）のそれぞれと、Cy5 色素単体（比較例）を用いた場合に計測された 1 細胞当たりの輝点数を示す。表 2 において、「-」は、バックグラウンドレベル以上の輝点がないことを示し、「+」は、発光が強く、周囲の輝点と区別がつかないことを示している。

【0063】

【表 2】

標識体の粒子径と1細胞当たりの輝点数

標識体	スポット番号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cy5色素単体	-	-	-	-	+	+	+	+
Cy5内包・シリカナノ粒子 平均粒子径20nm	-	-	-	-	+	+	+	+
Cy5内包・シリカナノ粒子 平均粒子径42nm	-	-	12	39	129	406	+	+
Cy5内包・シリカナノ粒子 平均粒子径103nm	-	4	14	32	120	392	+	+
Cy5内包・シリカナノ粒子 平均粒子径204nm	-	4	10	36	114	383	+	+
Cy5内包・シリカナノ粒子 平均粒子径498nm	-	6	13	33	122	+	+	+

-:バックグラウンドレベル以上の輝点なし

+:発光が強く周囲の輝点と区別がつかない

【0064】

表 2 に示すように、平均粒子径が 42、103、204、498 nm の Cy5 内包・シリカナノ粒子を用いた場合には、輝点数を計測可能な各スポットにおいて、輝点数の差によりバイオマーカーの定量評価が可能となっている。しかし、平均粒子径が 498 nm の Cy5 内包・シリカナノ粒子を用いた場合には、スポット番号 6 の組織切片において輝点の区別がつかなくなっており、バイオマーカーが高頻度に発現している場合の定量範囲が狭まることがわかる。

【0065】

また、Cy5 色素単体を用いた場合、平均粒子径 20 nm の Cy5 内包・シリカナノ粒子を用いた場合には、スポット番号 1 ~ 4 の組織切片では、バックグラウンドレベル以上の輝点がなく、スポット番号 5 ~ 8 の組織切片では、周囲の輝点と区別がつかないため、微量のバイオマーカーに対する輝点レベルの定量評価が不可能なことがわかる。

【0066】

[実験結果 C]

次に、蛍光色素内包粒子と蛍光色素単体とによるバイオマーカー（ER）の検出感度を輝点数で比較した。

表 3 に、Cy5 内包・シリカナノ粒子（平均粒子径 103 nm）、テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子（平均粒子径 104 nm）、FITC 内包・シリカナノ粒子（

平均粒子径 106 nm)、Cy5、テトラメチルローダミン、FITCのそれぞれを用いた場合に計測された1細胞当たりの輝点数を示す。表3において、「-」は、バックグラウンドレベル以上の輝点がないことを示し、「+」は、発光が強く、周囲の輝点と区別がつかないことを示している。

【0067】

【表3】

色素内包粒子と色素単体による染色比較(輝点数)

標識体	スポット番号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cy5内包・シリカナノ粒子	-	4	14	32	120	392	+	+
テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子	-	6	12	34	112	380	+	+
FITC内包・シリカナノ粒子	-	-	10	36	118	381	+	+
Cy5	-	-	-	-	+	+	+	+
テトラメチルローダミン	-	-	-	-	+	+	+	+
FITC	-	-	-	-	+	+	+	+

-:バックグラウンドレベル以上の輝点なし

+:発光が強く周囲の輝点と区別がつかない

【0068】

表3から、蛍光色素単体を用いて組織染色を行った場合には、スポット番号1~4の組織切片では、バックグラウンドレベル以上の輝点がなく、スポット番号5~8の組織切片では、周囲の輝点と区別がつかないため、微量のバイオマーカーに対する輝点レベルの定量評価が不可能なことがわかる。

一方、標識体として蛍光物質内包粒子を用いた場合には、微量のバイオマーカーに対しても、精度良く定量的に検出することができる。

【0069】

[実験結果D]

次に、蛍光色素内包粒子と蛍光色素単体とによるバイオマーカー(ER)の検出感度を発光輝度で比較した。

表4に、Cy5内包・シリカナノ粒子(平均粒子径103nm)、テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子(平均粒子径104nm)、FITC内包・シリカナノ粒子(平均粒子径106nm)、Cy5、テトラメチルローダミン、FITCのそれぞれを用いた場合に、DSU共焦点顕微鏡により取得された画像データに基づいて計測された1細胞当たりの発光輝度を示す。発光輝度の単位はa.u.(任意単位)である。表4において、「0」は、バックグラウンドレベル以下の発光であることを示している。

【0070】

10

20

30

40

【表 4】

## 色素内包粒子と色素単体による染色比較(発光輝度)

標識体	スポット番号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cy5内包・シリカナノ粒子	0	42	160	390	1280	3920	9860	12333
テトラメチルローダミン内包・シリカナノ粒子	0	60	143	366	1190	3686	10024	11369
FITC内包・シリカナノ粒子	0	0	112	382	1220	3842	10211	12488
Cy5	0	0	0	0	38	118	260	360
テトラメチルローダミン	0	0	0	0	33	129	248	393
FITC	0	0	0	0	24	120	263	386

0:バックグラウンドレベル以下の発光

## 【0071】

表4から、蛍光色素単体を用いた場合と比較して、蛍光物質内包粒子を用いた場合には、より微量なバイオマーカーを検出可能なことがわかる。

## 【0072】

以上説明したように、蛍光物質を複数集積した粒子に生体物質認識部位が結合されたものを染色試薬として用いることにより、組織切片を蛍光観察する際の1粒子当たりの輝度が高くなるため、微量のバイオマーカー(生体物質認識部位に対応する生体物質)を感度良く、定量的に検出することができる。

## 【0073】

また、蛍光物質を複数内包した粒子を用いる場合には、蛍光物質が粒子に内包されることにより、蛍光物質の耐久性が高まる。

## 【実施例2】

## 【0074】

[手順1: 蛍光物質集積粒子の合成]

テトラメチルローダミン(インビトロジェン社製TAMRA-SE)(励起波長550nm、発光波長570nm)6.6mg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)3μL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。

## 【0075】

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集積・シリカナノ粒子のSEM観察を行い、200粒子の粒子径を測定したところ、平均粒径104nm、変動係数は12%であった。

## 【0076】

同様の方法で、Cy5-SE(ロシュ社製)(励起波長650nm、発光波長670nm)を用いて平均粒子径103nmのCy5集積・シリカナノ粒子を得た。

## 【0077】

[手順2: 蛍光物質集積粒子と量子ドットへの抗体の結合]

10

20

30

40

50

手順1で得られた蛍光物質集積シリカナノ粒子(テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子、Cy5集積・シリカナノ粒子)のそれぞれを、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が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-maleimidopropionamide)-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シリカナノ粒子を得た。

【0078】

一方、抗ヒトER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。

【0079】

上記で得られた抗体結合用シリカナノ粒子と還元化抗体溶液とを、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・蛍光物質集積シリカナノ粒子を得た。

【0080】

インビトロジェン社製QD655抗体標識キット(Q22021MP)を用いて量子ドットに抗ヒトER抗体を結合させた。抗体の結合はキットの処方にしたが、SMCCによる量子ドットの活性化、DTTによる抗体の還元工程を経て、量子ドットと抗体の結合反応を行うことで行った。

【0081】

[手順3：蛍光物質集積粒子と量子ドットを用いた組織染色]

手順2で作製した抗ヒトER抗体結合・蛍光物質集積シリカナノ粒子と抗ヒトER抗体結合・量子ドットを用いてヒト乳房組織の免疫染色を行った。染色切片は、コスモバイオ社製の組織アレイスライド(CB-A712)を用いた。組織アレイスライドを脱パラフィン処理した後、組織アレイスライドを浸漬する液体をキシレン、エタノール、水の順に置換して洗浄し、10mMクエン酸緩衝液(pH6.0)中で15分間オートクレーブ処理することで、抗原の賦活化処理を行った。抗原の賦活化処理後の組織アレイスライドは、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キング処理を行った。

【0082】

ブロッキング処理後、1%BSA含有PBS緩衝液で0.05nMに希釈した各抗ヒトER抗体結合・蛍光物質集積シリカナノ粒子又は抗ヒトER抗体結合・量子ドットを組織切片と3時間反応させた。その後、組織アレイスライドをPBS緩衝液で洗浄し、Merck Chemicals社製Aquatexを用いて封入した。

【0083】

[手順4：染色した組織の輝点、輝度、粒子数計測]

手順3で染色した組織切片についてオリンパス社製DSU共焦点顕微鏡を用いて画像を取得し、ジーオングストローム社製の輝点計測ソフトウェア、G-countを用いて輝点の計測を行った。

Cy5の観察は、励起フィルター(640/30nmのバンドパスフィルター)、ビームスプリッター(660nm)、蛍光フィルター(690/50nmのバンドパスフィルター)のフィルターセットを用いた。

テトラメチルローダミンの観察は、励起フィルター(550/25nmのバンドパスフィルター)、ビームスプリッター(570nm)、蛍光フィルター(605/70nmの

10

20

30

40

50

バンドパスフィルター)のフィルターセットを用いた。

QD655の観察は、励起フィルター(350/50nmのバンドパスフィルター)、ビームスプリッター(400nm)、蛍光フィルター(590nmのロングパスフィルター)のフィルターセットを用いた。

組織アレイスライド中の予めDAB染色で染色濃度が異なることが予測された8スポットについて、各60細胞の輝点の数と各輝点の輝度を計測した。

【0084】

[実験結果A]

まず、蛍光物質集積粒子や量子ドットを用いた場合に得られた各輝点の輝度分布(輝度毎の輝点数)に基づいて、1粒子当たりの輝度を求めた。具体的には、輝度分布から、最も頻度の高い輝度を1粒子当たりの輝度とする。

Cy5集積・シリカナノ粒子、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子、QD655のそれぞれを用い、8スポット(各スポットにつき各60細胞)から輝点を計測した。その結果、Cy5集積・シリカナノ粒子を用いた測定では輝度82の輝点数が最も多く、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子を用いた測定では輝度69の輝点数が最も多く、QD655を用いた測定では輝度64の輝点数が最も多かった。

【0085】

表5に、Cy5集積・シリカナノ粒子、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子、QD655のそれぞれを用いた場合の、8スポット全体(60細胞×8スポット)から計測された各輝点の輝度分布を示す。輝度の単位はa.u.(任意単位)である。表5は、輝度が0-30、31-60、61-90、91-120、121-150、151-180、181-210、211-255の範囲の輝点数を示している。

【0086】

【表5】

#### 1輝点当たりの輝度の分布

標識体	輝度							
	0-30	31-60	61-90	91-120	121-150	151-180	181-210	211-255
Cy5集積・シリカナノ粒子	4	88	814	41	62	210	42	143
テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子	8	49	923	69	242	42	118	63
QD655	3	20	1120	36	242	32	96	66

【0087】

表5から、Cy5集積・シリカナノ粒子では、輝度が61-90、151-180、211-255の範囲にピークが存在していることがわかる。Cy5集積・シリカナノ粒子では、輝度82の輝点数が最も多いため、輝度151-180に含まれる輝点は2粒子分の合計輝度であり、輝度211-255に含まれる輝点は3粒子分の合計輝度であることがわかる。このように、輝度分布に基づいて、蛍光物質集積粒子や量子ドット1粒子当たりの輝度を求めることができる。

【0088】

[実験結果B]

次に、実験結果Aの結果に基づいて、Cy5集積・シリカナノ粒子では1粒子当たりの輝度を82、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子では1粒子当たりの輝度を69、QD655では1粒子当たりの輝度を64と仮定して、各スポットでの「1細胞当たりの輝度の和」を「1粒子当たりの輝度」で割ることで、各スポットでの「1細胞当たりの粒子数」を求めた。

表6に、Cy5集積・シリカナノ粒子、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子

、QD655のそれぞれを用いた場合の、各スポットでの1細胞当たりの粒子数を示す。表6において、「-」は、バックグラウンドレベル以上の輝点がないことを示している。

【0089】

【表6】

標識体の発光波長と1細胞当たりの粒子数

標識体	スポット番号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cy5集積・シリカナノ粒子	-	4	14	32	120	392	688	811
テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子	-	6	12	34	112	380	648	863
QD655	-	-	-	22	98	421	699	920

-:バックグラウンドレベル以上の輝点なし

【0090】

表6に示すように、Cy5集積・シリカナノ粒子、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子、QD655のそれぞれについて、1細胞当たりの粒子数の差によりバイオマーカーの発現レベルを定量的に評価することができる。しかし、より微量のバイオマーカーに対する輝点レベルの定量評価（スポット番号2、3）においては、Cy5集積・シリカナノ粒子、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子を用いた場合の方が、QD655を用いた場合よりも、検出感度が優れていることがわかる。

【0091】

[実験結果C]

次に、蛍光物質集積粒子又は量子ドットを用いて染色した組織における輝点の経時変化について検討した。

手順3で染色した組織切片を作製してから0日、3日、30日、90日後に、手順4に従って組織アレイスライド中のスポット番号6の組織切片の60細胞に含まれる輝点の数と各輝点の輝度を計測した。次いで、実験結果Bと同様の方法で、1細胞当たりの粒子数を算出した。また、各輝点の輝度の和を細胞数で割ることにより、1細胞当たりの輝度を算出した。

図1に、Cy5集積・シリカナノ粒子、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子、QD655のそれぞれを用いた場合の、スポット番号6の組織切片について算出された1細胞当たりの粒子数と1細胞当たりの輝度の経時変化を示す。

図1から、1細胞当たりの輝度は、組織切片の作製から時間が経過するにつれて次第に減少しているが、1細胞当たりの粒子数は、組織切片作製後90日後も安定した数値を示すことがわかる。すなわち、各粒子が発する蛍光輝度は次第に減少するが、組織切片に存在するバイオマーカーと結合した粒子の数は変化しない。したがって、1細胞当たりの粒子数の差に基づいてバイオマーカーの発現レベルを定量的に評価することで、より安定した評価結果を得ることができる。

【0092】

[実験結果D]

次に、蛍光物質集積粒子や量子ドットを用いて染色した場合と蛍光色素単体を用いた場合とを比較した。

蛍光色素単体を用いた場合の例として、Cy5、テトラメチルローダミンに抗ヒトER抗体を結合させたものを用い、手順3と同様の方法で組織アレイスライドを染色し、手順4と同様の方法で組織アレイスライド中の8スポットについて、各60細胞に含まれる輝点の数と各輝点の輝度を計測した。次いで、実験結果Bと同様の方法で、1細胞当たりの粒子数を算出した。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 9 3 】

表 7 に、Cy 5 集積・シリカナノ粒子、テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子、QD 6 5 5、Cy 5、テトラメチルローダミンのそれぞれを用いた場合の、各スポットでの 1 細胞当たりの粒子数を示す。表 7 において、「 - 」は、バックグラウンドレベル以上の発光がないことを示し、「 + 」は、バックグラウンドレベル以上の発光はあるが、輝点の判定はできないことを示している。

## 【 0 0 9 4 】

## 【表 7】

色素内包粒子と色素単体による染色比較(1細胞当たりの粒子数)

標識体	スポット番号							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cy5集積・シリカナノ粒子	—	4	14	32	120	392	688	811
テトラメチルローダミン集積・シリカナノ粒子	—	6	12	34	112	380	648	863
QD655	—	—	—	22	98	421	699	920
Cy5	—	—	—	—	+	+	+	+
テトラメチルローダミン	—	—	—	—	+	+	+	+

—:バックグラウンドレベル以上の発光なし

+:バックグラウンドレベル以上の発光あり(輝点の判定不可)

## 【 0 0 9 5 】

表 7 から、蛍光色素単体での組織染色では、バイオマーカーに対する輝点レベルでの定量評価が不可能であることがわかる。

## 【 0 0 9 6 】

以上説明したように、組織切片から計測された蛍光輝点の数に基づいて、生体物質の発現レベルを評価するので、生体物質の定量評価において、安定した評価結果を得ることができる。

## 【 0 0 9 7 】

また、蛍光物質を複数集積した蛍光物質集積粒子を用いることにより、蛍光観察時の 1 粒子当たりの輝度が高くなるため、微量の生体物質を感度良く、定量的に検出することができる。

## 【実施例 3】

## 【 0 0 9 8 】

[ 蛍光物質内包ナノ粒子 a ~ f の合成 ]

[ 合成例 1 : 蛍光有機色素内包シリカ : Cy 5 内包シリカナノ粒子の合成 ]

下記工程 ( 1 ) ~ ( 4 ) の方法により、「ナノ粒子 a」を作製した。

工程 ( 1 ) : Cy 5 の N - ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体 ( GEヘルスケア社製 ) 1 mg ( 0 . 0 0 1 2 6 mmol ) とテトラエトキシシラン 4 0 0 μ L ( 1 . 7 9 6 mmol ) とを混合した。

工程 ( 2 ) : エタノール 4 0 mL、1 4 % アンモニア水 1 0 mL を混合した。

工程 ( 3 ) : 工程 ( 2 ) で作製した混合液を室温下攪拌しているところに、工程 ( 1 ) で調製した混合液を添加した。添加開始から 1 2 時間攪拌を行った。

工程 ( 4 ) : 反応混合物を 1 0 0 0 0 g で 6 0 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一回ずつ行った。

10

20

30

40

50

得られたシリカナノ粒子 a の走査型電子顕微鏡 (SEM; 日立社製 S-800 型) 観察を行ったところ、平均粒径は 110 nm、変動係数は 12% であった。

【0099】

[合成例 2: 蛍光有機色素内包シリカ: TAMRA 内包シリカナノ粒子の合成]

下記工程 (1) ~ (4) の方法により、「ナノ粒子 b」を作製した。

工程 (1): TAMRA の N-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体 (GE ヘルスケア社製) 2 mg (0.00126 mmol) とテトラエトキシシラン 400  $\mu$ L (1.796 mmol) とを混合した。

工程 (2): エタノール 40 mL、14% アンモニア水 10 mL を混合した。

工程 (3): 工程 (2) で作製した混合液を室温下攪拌しているところに、工程 (1) で調製した混合液を添加した。添加開始から 12 時間攪拌を行った。

工程 (4): 反応混合物を 10000 g で 60 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一回ずつ行った。

得られたシリカナノ粒子 b の走査型電子顕微鏡 (SEM; 日立社製 S-800 型) 観察を行ったところ、平均粒径は 100 nm、変動係数は 15% であった。

【0100】

[合成例 3: 量子ドット内包シリカ: 発光波長 655 nm の CdSe/ZnS 内包シリカナノ粒子の合成]

下記工程 (1) ~ (4) の方法により、「ナノ粒子 c」を作製した。

工程 (1): CdSe/ZnS デカン分散液 (インビトロジェン社 Qdot 655) 10  $\mu$ L とテトラエトキシシラン 40  $\mu$ L とを混合した。

工程 (2): エタノール 4 mL、14% アンモニア水 1 mL を混合した。

工程 (3): 工程 (2) で作製した混合液を室温下攪拌しているところに、工程 (1) で作製した混合液を添加した。添加開始から 12 時間攪拌を行った。

工程 (4): 反応混合物を 10000 g で 60 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 1 回ずつ行った。

得られたシリカナノ粒子 c の SEM 観察を行ったところ、平均粒径は 130 nm、変動係数は 13% であった。

【0101】

[合成例 4: 量子ドット内包シリカ: 発光波長 585 nm の CdSe/ZnS 内包シリカナノ粒子の合成]

下記工程 (1) ~ (4) の方法により、「ナノ粒子 d」を作製した。

工程 (1): CdSe/ZnS デカン分散液 (インビトロジェン社 Qdot 585) 10  $\mu$ L とテトラエトキシシラン 40  $\mu$ L とを混合した。

工程 (2): エタノール 4 mL、14% アンモニア水 1 mL を混合した。

工程 (3): 工程 (2) で作製した混合液を室温下攪拌しているところに、工程 (1) で作製した混合液を添加した。添加開始から 12 時間攪拌を行った。

工程 (4): 反応混合物を 10000 g で 60 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 1 回ずつ行った。

得られたシリカナノ粒子 d の SEM 観察を行ったところ、平均粒径は 120 nm、変動係数は 12% であった。

【0102】

[合成例 5: 蛍光有機内包ポリスチレンナノ粒子: Cy5 内包ポリスチレンナノ粒子の合成]

下記工程 (1) ~ (3) の方法により、「ナノ粒子 e」を作製した。

工程 (1): Cy5 の N-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体 (GE ヘルスケア社製) 1 mg (0.00126 mmol) を、ジクロロメタン 60  $\mu$ L、エタノール 12

10

20

30

40

50

0  $\mu$  L に溶解させた。

工程 ( 2 ) : 表面官能基アミノ基で粒径 1 0 0 n m ポリスチレンナノ粒子水分散液 ( micromod社製 ) 1 . 5 m L を激しく攪拌しているところに、工程 ( 1 ) で作製した混合液を添加した。添加開始から 1 2 時間攪拌を行った。

工程 ( 3 ) : 反応混合物を 1 0 0 0 0 g で 6 0 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 1 回ずつ行った。

得られたポリスチレンナノ粒子 e の S E M 観察を行ったところ、平均粒径は 1 0 0 n m 、変動係数は 5 % であった。

#### 【 0 1 0 3 】

[ 合成例 6 : 蛍光有機内包ポリスチレンナノ粒子 : T A M R A 内包ポリスチレンナノ粒子の合成 ]

下記工程 ( 1 ) ~ ( 3 ) の方法により、「ナノ粒子 f 」を作製した。

工程 ( 1 ) : T A M R A の N - ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導體 ( G E ヘルスケア社製 ) 2 m g ( 0 . 0 0 1 2 6 m m o l ) を、ジクロロメタン 6 0  $\mu$  L 、エタノール 1 2 0  $\mu$  L に溶解させた。

工程 ( 2 ) : 表面官能基アミノ基で粒径 1 0 0 n m ポリスチレンナノ粒子水分散液 ( micromod社製 ) 1 . 5 m L を激しく攪拌しているところに、工程 ( 1 ) で作製した混合液を添加した。添加開始から 1 2 時間攪拌を行った。

工程 ( 3 ) : 反応混合物を 1 0 0 0 0 g で 6 0 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 1 回ずつ行った。

得られたポリスチレンナノ粒子 f の S E M 観察を行ったところ、平均粒径は 1 0 0 n m 、変動係数は 6 % であった。

#### 【 0 1 0 4 】

[ 蛍光物質内包シリカナノ粒子への抗体の結合 ]

蛍光物質内包シリカナノ粒子 a ~ d に対し、以下の手順により抗体結合を行った。

詳しくは、ナノ粒子 a , c に対して工程 ( 1 ) ~ ( 7 ) , 工程 ( 8 ) ~ ( 9 ) , 工程 ( 1 2 ) ~ ( 1 4 ) の操作をおこなって抗体を結合し「粒子 A , C 」を形成し、ナノ粒子 b , d に対して工程 ( 1 ) ~ ( 7 ) , 工程 ( 1 0 ) ~ ( 1 1 ) , 工程 ( 1 5 ) ~ ( 1 7 ) の操作をおこなって抗体を結合し「粒子 B , D 」を形成した。

#### 【 0 1 0 5 】

工程 ( 1 ) : 1 m g のナノ粒子 a ~ d を純水 5 m L に分散させた。アミノプロピルトリエトキシシラン水分散液 1 0 0  $\mu$  L を添加し、室温で 1 2 時間攪拌した。

工程 ( 2 ) : 反応混合物を 1 0 0 0 0 g で 6 0 分遠心分離を行い、上澄みを除去した。

工程 ( 3 ) : 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 1 回ずつ行った。得られたアミノ基修飾したシリカナノ粒子 a ~ d の F T - I R 測定を行ったところ、アミノ基に由来する吸収が観測でき、アミノ基修飾できたことを確認できた。

工程 ( 4 ) : 工程 ( 3 ) で得られたアミノ基修飾したシリカナノ粒子 a ~ d を、E D T A ( エチレンジアミン四酢酸 ) を 2 m M 含有した P B S ( リン酸緩衝液生理的食塩水 ) を用いて 3 n M に調整した。

工程 ( 5 ) : 工程 ( 4 ) で調整した溶液に最終濃度 1 0 m M となるよう S M ( P E G ) 1 2 ( サーマサイエンティフィック社製、succinimidyl - [ ( N - maleomido propionamid ) - dodecaethylene glycol ] ester ) を混合し、1 時間反応させた。

工程 ( 6 ) : 反応混合液を 1 0 0 0 0 g で 6 0 分遠心分離を行い、上澄みを除去した。

工程 ( 7 ) : E D T A を 2 m M 含有した P B S 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 回行った。最後に 5 0 0  $\mu$  L P B S を用い再分散させた。

10

20

30

40

50

## 【0106】

工程(8)：100 $\mu$ gの抗ヒトER抗体を100 $\mu$ LのPBSに溶解させたところに、1Mジチオスレイトール(DTT)を添加し、30分反応させた。

工程(9)：反応混合物についてゲルろ過カラムにより過剰のDTTを除去し、還元化抗ヒトER抗体溶液を得た。

## 【0107】

工程(10)：100 $\mu$ gの抗HER2抗体を100 $\mu$ LのPBSに溶解させたところに、1Mジチオスレイトール(DTT)を添加し、30分反応させた。

工程(11)：反応混合物についてゲルろ過カラムにより過剰のDTTを除去し、還元化抗HER2抗体溶液を得た。

10

## 【0108】

工程(12)：粒子aまたは粒子cを出発原料にして、工程(7)で得られた粒子分散液と工程(9)で得られた還元化抗ヒトER抗体溶液とをPBS中で混合し、1時間反応させた。

工程(13)：10mMメルカプトエタノール4 $\mu$ Lを添加し、反応を停止させた。

工程(14)：反応混合物を10000gで60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回行った。最後に500 $\mu$ LのPBSを用い再分散させ、抗ヒトER抗体結合した蛍光物質内包シリカナノ粒子Aおよび粒子Cを得た。

## 【0109】

20

工程(15)：粒子bまたは粒子dを出発原料にして、工程(7)で得られた粒子分散液と工程(11)で得られた還元化抗HER2抗体溶液とをPBS中で混合し、1時間反応させた。

工程(16)：10mMメルカプトエタノール4 $\mu$ Lを添加し、反応を停止させた。

工程(17)：反応混合物を10000gで60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回行った。最後に500 $\mu$ LのPBSを用い再分散させ、抗HER2抗体結合した蛍光物質内包シリカナノ粒子Bおよび粒子Dを得た。

## 【0110】

[ 蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子への抗体の結合 ]

30

蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子e, fに対し、以下の手順により抗体結合を行った。

詳しくは、ナノ粒子eに対して工程(1)~(2), 工程(5)~(7)の操作をおこなって抗体を結合し「粒子E」を形成し、ナノ粒子fに対して工程(3)~(4), 工程(8)~(10)の操作をおこなって抗体を結合し「粒子F」を形成した。

## 【0111】

工程(1)：100 $\mu$ gの抗ヒトER抗体を100 $\mu$ LのPBSに溶解させたところに、1Mジチオスレイトール(DTT)を添加し、30分反応させた。

工程(2)：反応混合物についてゲルろ過カラムにより過剰のDTTを除去し、還元化抗ヒトER抗体溶液を得た。

40

## 【0112】

工程(3)：100 $\mu$ gの抗HER2抗体を100 $\mu$ LのPBSに溶解させたところに、1Mジチオスレイトール(DTT)を添加し、30分反応させた。

工程(4)：反応混合物についてゲルろ過カラムにより過剰のDTTを除去し、還元化抗HER2抗体溶液を得た。

## 【0113】

工程(5)：粒子eの分散液と工程(2)で得られた還元化抗ヒトER抗体溶液とをPBS中で混合し、1時間反応させた。

工程(6)：10mMメルカプトエタノール4 $\mu$ Lを添加し、反応を停止させた。

工程(7)：反応混合物を10000gで60分遠心分離を行い、上澄みを除去した後

50

、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回行った。最後に500  $\mu$ LのPBSを用い再分散させ、抗ヒトER抗体結合した蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子Eを得た。

【0114】

工程(8)：粒子fの分散液と工程(4)で得られた還元化抗ヒトHER2抗体溶液とをPBS中で混合し、1時間反応させた。

工程(9)：10 mMメルカプトエタノール4  $\mu$ Lを添加し、反応を停止させた。

工程(10)：反応混合物を10000 gで60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回行った。最後に500  $\mu$ LのPBSを用い再分散させ、抗HER2抗体結合した蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子Fを得た。

10

【0115】

[ 蛍光物質への抗体結合 ]

比較として、抗ヒトER抗体をCy5に結合させた「色素G」と、抗HER2抗体をTAMRAに結合させた「色素H」とを、以下の手順により作製した。

詳しくは、工程(1)～(2)、工程(5)～(6)、工程(9)～(11)の操作をおこなって色素Gを形成し、工程(3)～(4)、工程(7)～(8)、工程(12)～(14)の操作をおこなって色素Hを形成した。

【0116】

工程(1)：100  $\mu$ gの抗ヒトER抗体を100  $\mu$ LのPBSに溶解させたところに、1 Mジチオスレイトール(DTT)を添加し、30分反応させた。

20

工程(2)：反応混合物についてゲルろ過カラムにより過剰のDTTを除去し、還元化抗ヒトER抗体溶液を得た。

【0117】

工程(3)：100  $\mu$ gの抗HER2抗体を100  $\mu$ LのPBSに溶解させたところに、1 Mジチオスレイトール(DTT)を添加し、30分反応させた。

工程(4)：反応混合物についてゲルろ過カラムにより過剰のDTTを除去し、還元化抗HER2抗体溶液を得た。

【0118】

工程(5)：Cy5のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体(GEヘルスケア社製)1 mg(0.00126 mmol)を、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)を2 mM含有したPBS(リン酸緩衝液生理的食塩水)を用いて3 nMに調整した。

30

工程(6)：工程(5)で調整した溶液に最終濃度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-maleomido)propionamid]-dodecaethyleneglycol)ester)を混合し、1時間反応させた。

【0119】

工程(7)：TAMRAのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体(GEヘルスケア社製)2 mg(0.00126 mmol)を、EDTA(エチレンジアミン四酢酸)を2 mM含有したPBS(リン酸緩衝液生理的食塩水)を用いて3 nMに調整した。

40

工程(8)：工程(7)で調整した溶液に最終濃度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-maleomido)propionamid]-dodecaethyleneglycol)ester)を混合し、1時間反応させた。

【0120】

工程(9)：工程(6)で得られた反応混合物に、工程(2)で得られた還元化抗ヒトER抗体溶液をPBS中で混合し、1時間反応させた。

工程(10)：10 mMメルカプトエタノール4  $\mu$ Lを添加し、反応を停止させた。

工程(11)：ゲルろ過カラムにより過剰のメルカプトエタノールを除去し、Cy5結合した還元化抗ER2抗体溶液(色素G)を得た。

50

## 【 0 1 2 1 】

工程（ 1 2 ）：工程（ 6 ）で得られた反応混合物に工程（ 4 ）で得られた還元化抗 H E R 2 抗体溶液を P B S 中で混合し、 1 時間反応させた。

工程（ 1 3 ）： 1 0 m Mメルカプトエタノール 4 μ L を添加し、反応を停止させた。

工程（ 1 4 ）：ゲルろ過カラムにより過剰のメルカプトエタノールを除去し、 T A M R A 結合した還元化抗 H E R 2 抗体溶液（色素 H ）を得た。

## 【 0 1 2 2 】

以上の処理により形成した粒子 A ~ F , 色素 G ~ H の特性を表 8 に示す。

## 【 0 1 2 3 】

## 【表 8 】

10

粒子		A	B	C	D
蛍光物質 内包 ナノ粒子	ナノ粒子	a	b	c	d
	蛍光物質	Cy5	TAMRA	Qdot655	Qdot585
	構成材料	シリカ			
生体物質 認識部位		抗HER 抗体	抗HER2 抗体	抗HER 抗体	抗HER2 抗体

20

粒子		E	F	色素G	色素H
蛍光物質 内包 ナノ粒子	ナノ粒子	e	f	—	
	蛍光物質	Cy5	TAMRA	Cy5	TAMRA
	構成材料	ポリスチレン			—
生体物質 認識部位		抗HER 抗体	抗HER2 抗体	抗HER 抗体	抗HER2 抗体

30

## 【 0 1 2 4 】

【 評価実験：（ 1 ）粒子 A ~ F , 色素 G ~ H を用いた組織染色 】

作製した粒子 A ~ F , 色素 G ~ H を用いてヒト乳房組織の免疫染色を行った。

染色切片はコスモバイオ社製の組織アレイスライド（CB-A712）を用いた。あらかじめ D A B 染色により E R および H E R 2 染色濃度を観察し、（ 1 ） E R 発現量が高くて H E R 2 発現量も高い、（ 2 ） E R 発現量が高くて H E R 2 発現量が低い、（ 3 ） E R 発現量が低くて H E R 2 発現量も低い異なる 3 種のロットを用意し、それぞれ染色を行った。

## 【 0 1 2 5 】

（ 1 ）：キシレンを入れた容器に病理切片を 3 0 分浸漬させた。途中 3 回キシレンを交換した。

40

（ 2 ）：エタノールを入れた容器に病理切片を 3 0 分浸漬させた。途中 3 回エタノールを交換した。

（ 3 ）：水を入れた容器に、病理切片を 3 0 分浸漬させた。途中 3 回水を交換した。

（ 4 ）： 1 0 m Mクエン酸緩衝液（pH6.0）に病理切片を 3 0 分浸漬させた。

（ 5 ）： 1 2 1 で 1 0 分オートクレーブ処理を行った。

（ 6 ）： P B S を入れた容器に、オートクレーブ処理後の切片を 3 0 分浸漬させた。

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

## 【 0 1 2 6 】

（ 8 ）： 1 % B S A 含有 P B S で 0 . 0 5 n M に希釈した抗ヒト E R 抗体結合した蛍光体  
内包ナノ粒子 A 1 0 μ L と、 1 % B S A 含有 P B S で 0 . 0 5 n M に希釈した抗 H E R 2

50

抗体結合した蛍光体内包ナノ粒子B 10 μLとを混合し、組織に載せて3時間放置した。  
 (9) : 1% BSA含有PBSで0.05 nMに希釈した抗ヒトER抗体結合した蛍光体内包ナノ粒子C 10 μLと、1% BSA含有PBSで0.05 nMに希釈した抗HER2抗体結合した蛍光体内包ナノ粒子D 10 μLとを混合し、(8)とは別なスライドの組織に載せて3時間放置した。

(10) : 1% BSA含有PBSで0.05 nMに希釈した抗ヒトER抗体結合した蛍光体内包ナノ粒子E 10 μLと、1% BSA含有PBSで0.05 nMに希釈した抗HER2抗体結合した蛍光体内包ナノ粒子F 10 μLとを混合し、(8)および(9)とは別なスライドの組織に載せて3時間放置した。

(11) : 1% BSA含有PBSで0.05 nMに希釈した抗ヒトER抗体結合した色素G 10 μLと、1% BSA含有PBSで0.05 nMに希釈した抗HER2抗体結合した色素H 10 μLとを混合し、(8)~(10)とは別なスライドの組織に載せて3時間放置した。

【0127】

(12) : PBSを入れた容器に、染色後の切片をそれぞれ30分浸漬させた。

(13) : Merck Chemicals社製Aquatexを滴下後、カバーガラスを載せ封入した。

【0128】

[評価実験 : (2) 粒子A~F, 色素G~Hを用いて染色した組織の輝点計測]

染色した組織切片に励起光を照射して蛍光発光させ、その組織切片からオリンパス社製DSU共焦点顕微鏡を用いて画像を取得し、ジーオンオングストロング社製輝点計測ソフト、G-countを用いて輝点数および発光輝度を計測した。

Cy5およびQdot655については、励起波長633nm、検出波長660nmとした。TAMRAおよびQdot585については、励起波長543nm、検出波長580nmとして観察を行った。

輝点数は、組織アレイスライド中の8スポットについて各30細胞の輝点を計測し、その平均値を求めた。発光輝度は、8スポットそれぞれについて視野全体の蛍光強度を合算し、その平均値を求めた。

【0129】

表9, 表10に、3種のロットと粒子A~F, 色素G~Hの組合せとに応じた「実験例1~7」における輝点数および発光輝度の計測結果を示す。

【0130】

【表9】

実験例		1 (実施例)	2 (実施例)	3 (実施例)	4 (比較例)
ロット		1			
		ER発現(高) HER2発現(高)			
染色試薬		粒子A・B	粒子C・D	粒子E・F	色素G・H
輝点数	660nm	150	130	155	検出不可
	580nm	175	190	180	検出不可
蛍光強度	660nm	800	750	820	検出不可
	580nm	870	980	950	検出不可

【0131】

【表 10】

実験例		5 (実施例)	6 (実施例)	7 (実施例)
ロット		1	2	3
		ER発現(高) HER2発現(高)	ER発現(高) HER2発現(低)	ER発現(低) HER2発現(低)
染色試薬		粒子A・B		
輝点数	660nm	150	170	20
	580nm	175	20	10
蛍光強度	660nm	800	850	160
	580nm	870	150	100

10

## 【0132】

表9から、蛍光有機色素を単独で抗体に結合した実験例4では、蛍光強度が弱くバックグラウンド光と区別がつかず、標的とする生体物質が検出できなかった。これに対し、蛍光物質内包粒子を用いた実験例1～3では、蛍光強度が高く、標的とする生体物質の検出が容易に可能となった。

20

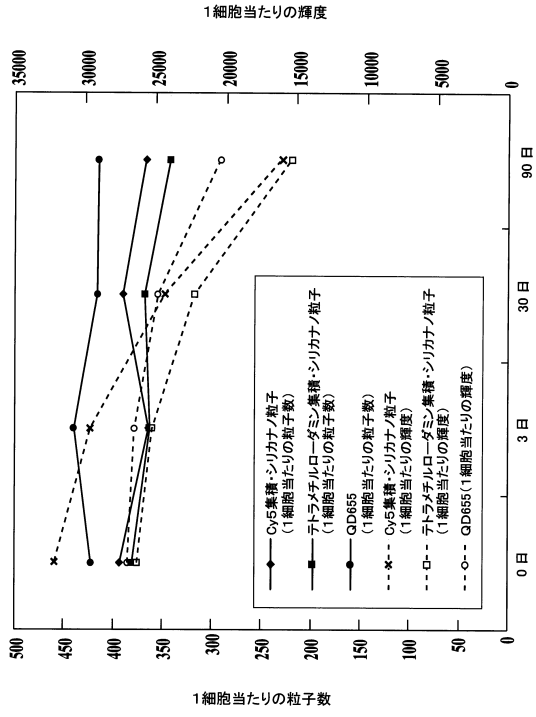
表10から、ER2およびHER2の発現量の異なる切片を用いた実験例5～7では、それぞれの発現量に応じて輝点数および蛍光強度が変化しており、蛍光物質、生体物質認識部位が互いに異なる粒子を染色試薬として使用すれば、複数の生体物質の発現レベルを同一切片で計測できることがわかった。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0133】

本発明は、微量の生体物質を定量的に検出するのに好適に利用することができる。

【 図 1 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 中野 寧  
東京都日野市さくら町1番地 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社内
- (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 武田 元博  
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

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特表2008-541015(JP,A)  
特開2004-077389(JP,A)  
特開2004-132838(JP,A)  
特開2002-228654(JP,A)  
特表2006-519376(JP,A)  
渡邊朋信, 生体超微細1分子可視化技術によるナノDDSとがん標的治療に関する研究 共焦点レーザー顕微システムを用いたin vivo, in vitroにおける細胞内信号伝達計測手法の確立に関する研究, 生体超微細1分子可視化技術によるナノDDSとがん標的治療に関する研究 平成18年度 総括・分担研究年度終了報告書, 日本, 2007年, Page.15-17  
長谷川朝美、外5名, ピンファイバービデオスコープ法による細胞内タンパク質の1分子可視化, バイオメディカル分析科学シンポジウム講演要旨集, 日本, 2004年 6月 3日, Vol.17th, Page.39-40

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)