(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 6 月 16 日(16.06.2016)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2016/093268 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01) *G01N 33/536* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/084500

(22) 国際出願日: 2015 年 12 月 9 日(09.12.2015)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2014-251979 2014 年 12 月 12 日(12.12.2014) JP

(71) 出願人: コニカミノルタ株式会社(KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 郷田 秀樹(GOUDA, Hideki); 〒1007015 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 Tokyo (JP). 高梨 健作(TAKANASHI, Kensaku); 〒1007015 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 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人ＳＳＩＮＰＡＴ(SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目１３番６号 五反田山崎ビル６階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

WO 2016/093268 A1

(54) **Title**: DILUENT FOR FLUORESCENT NANO PARTICLES, KIT FOR IMMUNOFLUORESCENT STAINING WHICH UTILIZES SAME, SOLUTION FOR IMMUNOFLUORESCENT STAINING, IMMUNOFLUORESCENT STAINING METHOD, AND GENE STAINING METHOD

(54) 発明の名称 : 蛍光ナノ粒子用希釈液、これを用いた蛍光免疫染色用キット、蛍光免疫染色用溶液、および蛍光免疫染色法、遺伝子染色法

(57) **Abstract**: [Problem] To provide a means for, in immunostaining using fluorescent nano particles, preventing the occurrence of non-specific adsorption of the fluorescent nano particles to reduce background noises, thereby detecting and quantifying a biological substance of interest with higher accuracy. [Solution] Immunostaining is carried out by diluting fluorescent nano particles with a diluent for fluorescent nano particles, wherein the diluent for fluorescent nano particles contains 1 to 5% (W/W) of a protein having a molecular weight of 40,000 or more (e.g., BSA) and 1 to 3% (W/W) of a protein having a molecular weight of less than 40,000 (e.g., casein). In the diluent, when casein is used as the low-molecular-weight protein, it is preferred that the content of κ-casein in the casein is 10% (W/W) or less and the ratio of the content of α-casein to the content of β-casein, i.e., an α-casein:β-casein ratio, is (40 to 60):(60 to 40) (wherein the total amount of α-casein and β-casein is 100).

(57) 要約: [課題]蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色を行う際に、蛍光ナノ粒子の非特異的な吸着を抑制してバックグラウンドノイズを抑えることで、より高い精度で目的とする生体物質の検出および定量をおこなうための手段を提供する。 [解決手段]分子量４０，０００以上のタンパク質（ＢＳＡ等）を１～５％（Ｗ／Ｗ）、および分子量４０，０００未満のタンパク質（カゼイン等）を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有しており、また低分子量のタンパク質としてカゼインを用いる場合において、好ましくは前記カゼイン内のκ－カゼイン含有比率が１０％（Ｗ／Ｗ）以下であり、含有しているα－カゼイン：β－カゼインの比率が４０：６０～６０：４０（α－カゼインおよびβ－カゼインの合計量を１００とする。）である蛍光ナノ粒子用希釈液により蛍光ナノ粒子を希釈して免疫染色を行う。

明　細　書

発明の名称 ：

蛍光ナノ粒子用希釈液、これを用いた蛍光免疫染色用キット、蛍光免疫染色用溶液、および蛍光免疫染色法、遺伝子染色法

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光免疫染色法（や遺伝子検出法）で使用する蛍光ナノ粒子の希釈液、これを用いた蛍光免疫染色用キット、蛍光免疫染色用溶液、および蛍光免疫染色法、遺伝子染色法に関する。

背景技術

[0002] 近年の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の正確な診断法への必要性が高まっている。具体的には、標的となる生体物質の発現量を定量的に評価することにより、患者ごとの分子標的薬の適用可否を効率的に行うことが求められている。例えば、ある薬剤投与の有効性の判定方法として、標的生体物質のタンパク質等の発現を解析する免疫組織化学〔Ｉｍｍｕｎｏｈｉｓｔｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ；ＩＨＣ〕法および、標的生体物質遺伝子等の増幅を解析するＦＩＳＨ〔Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ ｉｎ ｓｉｔｕ ｈｙｂｒｉｄｉｚａｔｉｏｎ〕法が臨床の場で広く用いられている。

[0003] 現在は、患部より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２～８ミクロンの厚さの薄片に切り、パラフィンを取り除いた切片（以下「組織切片」ともいう。）に対し、標的とする生体物質を染色し、その顕微鏡観察を行っていることが多い。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などの形態学的な情報、染色情報をもとに診断を行っている。画像のデジタル化技術の発達は上述の病理診断に対して、顕微鏡やデジタルカメラなど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および計測して表示する自動化された

病理診断支援装置の提案を可能としている。

[0004] 従来から組織染色方法として、色素を用いるヘマトキシリン－エオジン〔ＨＥ〕染色、酵素を用いたＤＡＢ染色法が広くおこなわれてきたが、その染色濃度は温度、時間などの環境条件により大きく左右され、正確な定量測定は困難であるとされている。

[0005] 他方、色素に代わる標識試薬として蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色法について、特許文献１に開示されている。蛍光ナノ粒子を用いて免疫染色を行うことで、従来の酵素法では得られない高い精度および定量性のある評価が可能となるが、このような高輝度の蛍光体を用いた場合、１粒子でも検出可能なため、蛍光ナノ粒子の非特異的な結合により、バックグラウンドノイズが生じやすくなる、という問題が生じる。（この問題は、例えば疾病に関する遺伝子（例；HER２遺伝子）を検出する場合にも同様に生じる。）

本発明者らは、これまでも蛍光ナノ粒子を用いた定量的な免疫染色法（さらには、遺伝子染色法）における精度をあげるため、特許文献１に記載されているように、ブロッキング工程でタンパク質を切片に添加する事などの鋭意工夫を行ってきた。しかし、蛍光ナノ粒子の希釈液の組成については、特に検討してはこなかった。例えば、特許文献２に記載されているように、これまでは、抗体希釈液として広く用いられている１％ＢＳＡ含有ＰＢＳで蛍光ナノ粒子を希釈してきた。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開２０１３－５７６３１公報

特許文献2：特開２００６－５３０３１公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、上述したような課題を解決するために、蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色（または遺伝子染色）を行う際に、蛍光ナノ粒子の非特異的な吸着

を抑制してバックグラウンドノイズを抑えることで、より高い精度で目的とする生体物質の検出および定量をおこなうための手段を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、蛍光ナノ粒子を用いた蛍光免疫染色法（または遺伝子染色法）で使用する蛍光ナノ粒子の希釈液の組成に着目し、研究を進めた結果、高分子量（Ｍｗ≧４０，０００：ＢＳＡ等）と低分子量（Ｍｗ＜４０，０００：カゼイン等）のタンパク質をそれぞれ所定の濃度で含有する溶液に蛍光ナノ粒子を分散させることで、蛍光ナノ粒子の非特異的な吸着を抑制できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0009] 上述した目的を実現するために、本発明の一側面を反映した蛍光ナノ粒子用希釈液は、蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色（または遺伝子染色）を行う際に使用する、分子量４０，０００以上のタンパク質を１～５％（Ｗ／Ｗ）含有し、かつ分子量４０，０００未満のタンパク質を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有している。

発明の効果

[0010] 蛍光免疫染色（または遺伝子染色）において、蛍光粒子を希釈する際に本発明の蛍光ナノ粒子用希釈液を用いることで、検出時にみられるバックグラウンドノイズを低減させることが可能となり、染色画像の評価するにあたって、精度と定量性の向上を図ることができる。

発明を実施するための形態

[0011] 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。

－　蛍光ナノ粒子用希釈液　－

本発明の蛍光ナノ粒子用希釈液は、少なくとも、高分子量（Ｍｗ≧４０，０００）のタンパク質を１～５％（Ｗ／Ｗ）と低分子量（Ｍｗ＜４０，０００）のタンパク質を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有しており、この溶液を用いて蛍

光ナノ粒子を分散させることで、免疫染色（または遺伝子染色）を行うための蛍光免疫染色用溶液（または遺伝子染色用溶液）を調製することができる。以下、本発明について、より詳細に説明する。

[0012] ＜希釈液＞

本発明の蛍光ナノ粒子用希釈液は、少なくとも、高分子量（Ｍｗ≧４０，０００）のタンパク質を１～５％（Ｗ／Ｗ）および／または低分子量（Ｍｗ＜４０，０００）のタンパク質を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有している。

[0013] 高分子量のタンパク質としてはＢＳＡ（分子量約６６，０００）が好ましい。ＢＳＡは特にタンパク質を安定化する効果を奏する。高分子量のタンパク質の分子量の上限値は特に限定されるものではないが、通常は４００，０００である。高分子量のタンパク濃度が１％を下回ると、観察される輝点の数が減少し、シグナルが弱くなる。一方、このタンパク濃度が５％を超えると輝点が凝集しやすくなり、正確なシグナルの評価が困難になる。このような作用効果の点から、高分子量のタンパク質濃度は１．５～３％（Ｗ／Ｗ）がより好ましい。

[0014] また、低分子量のタンパク質としてはカゼイン（分子量約２３，０００）が好ましい。カゼインを用いることにより、特にタンパク質が非特異的に吸着する部分をふさぐ効果を奏する。低分子量のタンパク質の分子量の下限値は特に限定されるものではないが、通常は１，０００である。低分子量のタンパク濃度が１％を下回ると、バックグラウンドノイズが高くなり、シグナルの定量性が低くなる。一方、このタンパク濃度が３％を超えると、観察される輝点数が減少し、シグナルが弱くなる。このような作用効果の点から、低分子量のタンパク質濃度は１．２～２．４％（Ｗ／Ｗ）がより好ましい。

[0015] また、牛乳などに含有される天然カゼインにおいては、α-カゼイン、β-カゼイン、κ-カゼインおよびγ-カゼインの４種類のカゼインが、それぞれ５０％、３５％、１３％、２％の割合で含有されている。それぞれのカゼインは、市販のものを利用することもできるし、また種々の分画法により分画することもでき、それらを混合することで所望の配合組成のカゼインを調製

することが可能である。

[0016] ここで本発明に係る蛍光ナノ粒子用希釈液に含有されるα－カゼイン：β－カゼインの比率を４０：６０～６０：４０（α－カゼインおよびβ－カゼインの合計量を１００とする。）に、および／またはカゼイン内のκ-カゼインの含有比率を１０％以下に調整することで、観察時におけるバックグラウンドがより抑制され、より定量性のある評価を行うことができる。なお、カゼインは、特にκ-カゼインを中心に、様々なミセル構造を形成することが知られており、上記のような条件を満たす組成がそのミセル構造の形成の態様を介して本発明の作用効果と関係している可能性もある。

[0017] 上記のことから、本発明における蛍光ナノ粒子用希釈液として、具体的には、ＢＳＡを１～５％（Ｗ／Ｗ）、カゼインを１～３％（Ｗ／Ｗ）含有し、該カゼイン内のκ－カゼイン含有比率が１０％（Ｗ／Ｗ）以下であることが好ましい（特に、κ－カゼインの比率が０．５～１０％（Ｗ／Ｗ）であることがより好ましい。）。また、α－カゼイン：β－カゼインの比率が４０：６０～６０：４０（α－カゼインおよびβ－カゼインの合計量を１００とする。）であるものが特に好ましい。

[0018] 各タンパク質を上記の濃度に調整するには、一般的に、ＰＢＳあるいはＴＢＳ等の溶媒（緩衝液）が用いられる。すなわち、本発明の蛍光ナノ粒子用希釈液の溶媒として、これらの緩衝液を用いることができる。

[0019] また、蛍光ナノ粒子用希釈液には、Ｔｗｅｅｎ２０、Ｄｉｇｉｔｏｎｉｎ等の非イオン性界面活性剤が含有されていても良く、またＥＤＴＡ等のキレート剤が含有されていてもよい。

[0020] この蛍光ナノ粒子用希釈液を用いて、目的生体物質用の蛍光ナノ粒子を含む免疫染色用試薬を所望の濃度に希釈することで、バックグラウンドノイズが抑制され、定量性の高い蛍光免疫染色（または遺伝子染色）をおこなうことが可能になる。

[0021] ・キット

さらに本発明においては、蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色（または遺伝子

染色）を行うためのキットが規定される。このキットは少なくとも、目的生体物質用の蛍光ナノ粒子を含む免疫染色用試薬（または遺伝子染色試薬）および上記蛍光ナノ粒子用希釈液を含む。このキットは更に、必要に応じて、目的生体物質を免疫染色するためのその他の必要な試薬、部材等や、本発明に係る蛍光免疫染色（または遺伝子染色）を実施するための説明書などを含んでいてもよい。

[0022] ・染色用溶液

また、本発明においては、目的生体物質用の免疫染色用試薬を上記蛍光ナノ粒子用希釈液で希釈した蛍光免疫染色用溶液（または遺伝子染色用溶液）が提供される。免疫染色用試薬（または遺伝子染色用試薬）の希釈倍率については、目的生体物質と免疫染色用試薬とのアフィニティーに応じて最適化することができる。

[0023] ＜目的生体物質＞

本発明における目的生体物質は、組織切片に発現している生体物質、特にタンパク質（抗原）（や遺伝子）であって、主に病理診断の観点からの定量ないし検出のために、蛍光標識体を用いた免疫染色の対象とするものを指す。

[0024] 目的生体物質は、病理診断など本発明の定量方法の用途を考慮しながら選択すればよく、特に限定されるものではない。典型的な目的生体物質としては、各種の癌組織の細胞膜で発現しており、バイオマーカーとして利用することができる生体物質、たとえば、ＥＧＦＲ（ＨＥＲ１）（Epidermal Growth Factor Receptor：上皮増殖因子受容体）、ＨＥＲ２（Human Epidermal Growth Factor Receptor：ヒト上皮増殖因子受容体）、ＨＥＲ３、ＨＥＲ４、ＶＥＧＦＲ（Vasular Endothelial Growth Factor Receptor：血管内皮細胞増殖因子受容体）、ＩＧＦＲ（Insulin-like Growth Factor Receptor：インスリン様増殖因子受容体）、ＨＧＦＲ（Hepatocyte Growth Factor Receptor：肝細胞増殖因子受容体）といった増殖因子の受容体（レセプター）や、ＰＤ－１（Programmed cell death 1）、ＰＤ－Ｌ１（Programmed cell death l

igand 1）などの免疫系の受容体であるタンパク質が挙げられる。ＥＧＦＲ／ＨＥＲには、大腸癌などの癌組織において過剰発現しているＥＧＦＲ／ＨＥＲ１（ＥｒｂＢ１とも呼ばれる）、乳癌などの癌組織において過剰発現しているＥＧＦＲ２／ＨＥＲ２（ＥｒｂＢ２、ｎｅｕとも呼ばれる）、ＥＧＦＲ３／ＨＥＲ３およびＥＧＦＲ４／ＨＥＲ４が包含される。ＶＥＧＦＲには、肝臓癌、食道癌などの癌組織における血管内皮細胞において発現が亢進しているＶＥＧＦＲ－１（ＦＩｔ－１とも呼ばれる）、ＶＥＧＦＲ－２（ＦＩｔ－２、ＫＤＲとも呼ばれる）およびリンパ管内皮細胞において発現が亢進しているＶＥＧＦＲ－３（ＦＩｔ－４とも呼ばれる）が包含される。たとえばＨＥＲ２は、乳癌に係る病理診断において本発明の定量方法を実施する際の目的生体物質として好適である。

[0025] 目的生体物質は、上記に加えて、癌の増殖や分子標的薬の奏効率に関係する遺伝子として、ＨＥＲ２、ＴＯＰ２Ａ、ＨＥＲ３、ＥＧＦＲ、Ｐ５３、ＭＥＴなどが挙げられる。さらに、癌関連遺伝子として知られている遺伝子として、以下のものが挙げられる。チロシンキナーゼ関連遺伝子として、ＡＬＫ、ＦＬＴ３、ＡＸＬ、ＦＬＴ４（ＶＥＧＦＲ３、ＤＤＲ１、ＦＭＳ（ＣＳＦ１Ｒ）、ＤＤＲ２、ＥＧＦＲ（ＥＲＢＢ１）、ＨＥＲ４（ＥＲＢＢ４）、ＥＭＬ４－ＡＬＫ、ＩＧＦ１Ｒ、ＥＰＨＡ１、ＩＮＳＲ、ＥＰＨＡ２、ＩＲＲ（ＩＮＳＲＲ）、ＥＰＨＡ３、ＫＩＴ、ＥＰＨＡ４、ＬＴＫ、ＥＰＨＡ５、ＭＥＲ（ＭＥＲＴＫ）、ＥＰＨＡ６、ＭＥＴ、ＥＰＨＡ７、ＭＵＳＫ、ＥＰＨＡ８、ＮＰＭ１－ＡＬＫ、ＥＰＨＢ１、ＰＤＧＦＲα（ＰＤＧＦＲＡ）、ＥＰＨＢ２、ＰＤＧＦＲβ（ＰＤＧＦＲＢ）ＥＰＨＢ３、ＲＥＴ、ＥＰＨＢ４、ＲＯＮ（ＭＳＴ１Ｒ）、ＦＧＦＲ１、ＲＯＳ（ＲＯＳ１）、ＦＧＦＲ２、ＴＩＥ２（ＴＥＫ）、ＦＧＦＲ３、ＴＲＫＡ（ＮＴＲＫ１）、ＦＧＦＲ４、ＴＲＫＢ（ＮＴＲＫ２）、ＦＬＴ１（ＶＥＧＦＲ１）、ＴＲＫＣ（ＮＴＲＫ３）が挙げられる。また、乳がん関連の遺伝子としてＡＴＭ、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、ＢＲＣＡ３、ＣＣＮＤ１、Ｅ－Ｃａｄｈｅｒｉｎ、ＥＴＶ６、ＦＧＦＲ１、ＨＲＡＳ、ＫＲＡＳ、ＮＲＡＳ、ＮＴＲＫ３、ｐ５３、Ｐ

ＴＥＮが挙げられる。カルチノイド腫瘍に関連する遺伝子として、ＢＣＬ２、ＢＲＤ４、ＣＣＮＤ１、ＣＤＫＮ１Ａ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＣＴＮＮＢ１、ＨＥＳ１、ＭＡＰ２、ＭＥＮ１、ＮＦ１、ＮＯＴＣＨ１、ＮＵＴ、ＲＡＦ、ＳＤＨＤ、ＶＥＧＦＡが挙げられる。大腸がん関連遺伝子として、ＡＰＣ、ＭＳＨ６、ＡＸＩＮ２、ＭＹＨ、ＢＭＰＲ１Ａ、ｐ５３、ＤＣＣ、ＰＭＳ２、ＫＲＡＳ２（ｏｒ Ｋｉ－ｒａｓ）、ＰＴＥＮ、ＭＬＨ１、ＳＭＡＤ４、ＭＳＨ２、ＳＴＫ１１、ＭＳＨ６が挙げられる。肺がん関連の遺伝子としては、ＡＬＫ、ＰＴＥＮ、ＣＣＮＤ１、ＲＡＳＳＦ１Ａ、ＣＤＫＮ２Ａ、ＲＢ１、ＥＧＦＲ、ＲＥＴ、ＥＭＬ４、ＲＯＳ１、ＫＲＡＳ２、ＴＰ５３、ＭＹＣが挙げられる。肝臓がん関連の遺伝子としては、Ａｘｉｎ１、ＭＡＬＡＴ１、ｂ－ｃａｔｅｎｉｎ、ｐ１６ ＩＮＫ４Ａ、ｃ－ＥＲＢＢ－２、ｐ５３、ＣＴＮＮＢ１、ＲＢ１、Ｃｙｃｌｉｎ Ｄ１、ＳＭＡＤ２、ＥＧＦＲ、ＳＭＡＤ４、ＩＧＦＲ２、ＴＣＦ１、ＫＲＡＳが挙げられる。腎臓がん関連遺伝子として、Ａｌｐｈａ、ＰＲＣＣ、ＡＳＰＳＣＲ１、ＰＳＦ、ＣＬＴＣ、ＴＦＥ３、ｐ５４ｎｒｂ／ＮＯＮＯ、ＴＦＥＢが挙げられる。甲状腺がん関連遺伝子として、ＡＫＡＰ１０、ＮＴＲＫ１、ＡＫＡＰ９、ＲＥＴ、ＢＲＡＦ、ＴＦＧ、ＥＬＥ１、ＴＰＭ３、Ｈ４／Ｄ１０Ｓ１７０、ＴＰＲが挙げられる。卵巣がん関連遺伝子として、ＡＫＴ２、ＭＤＭ２、ＢＣＬ２、ＭＹＣ、ＢＲＣＡ１、ＮＣＯＡ４、ＣＤＫＮ２Ａ、ｐ５３、ＰＩＫ３ＣＡ、ＧＡＴＡ４、ＲＢ、ＨＲＡＳ、ＲＥＴ、ＫＲＡＳ、ＲＮＡＳＥＴ２が挙げられる。前立腺がん関連遺伝子として、ＡＲ、ＫＬＫ３、ＢＲＣＡ２、ＭＹＣ、ＣＤＫＮ１Ｂ、ＮＫＸ３．１、ＥＺＨ２、ｐ５３、ＧＳＴＰ１、ＰＴＥＮが挙げられる。骨腫瘍関連遺伝子として、ＣＤＨ１１、ＣＯＬ１２Ａ１、ＣＮＢＰ、ＯＭＤ、ＣＯＬ１Ａ１、ＴＨＲＡＰ３、ＣＯＬ４Ａ５、ＵＳＰ６が挙げられる。

[0026] ＜抗体＞

一次抗体には、前述したような目的生体物質としてのタンパク質を抗原として特異的に認識して結合する抗体（ＩｇＧ）を用いることができる。たと

えば、ＥＧＦＲ（発現タンパク質）を目的生体物質とする場合は抗ＥＧＦＲ抗体を、ＨＥＲ２を目的生体物質とする場合は抗ＨＥＲ２抗体を用いることができる。

[0027] 二次抗体には、一次抗体を抗原として特異的に認識して結合する抗体（ＩｇＧ）を用いることができる。

[0028] 一次抗体および二次抗体はいずれも、ポリクローナル抗体であってもよいが、定量の安定性の観点から、モノクローナル抗体が好ましい。抗体を産生する動物（免疫動物）の種類は特に限定されるものではなく、従来と同様、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、ヤギ、ヒツジなどから選択すればよい。

[0029] 一次抗体は、特定の生体物質（抗原）を特異的に認識して結合する能力を有するものであれば、天然の全長の抗体でなく、抗体断片または誘導体であってもよい。すなわち、本明細書における「抗体」という用語には、全長の抗体だけでなく、Ｆａｂ、Ｆ(ａｂ)’2、Ｆｖ、ｓｃＦｖなどの抗体断片およびキメラ抗体（ヒト化抗体等）、多機能抗体などの誘導体が包含される。

[0030] ＜蛍光ナノ粒子＞

本発明において用いられる蛍光ナノ粒子としては、目的生体物質を１分子ずつ輝点として表すのに十分な強度の蛍光を発することができる「蛍光物質集積ナノ粒子」が好ましい。

[0031] なお、本明細書における「蛍光物質」は、所定の波長の電磁波（Ｘ線、紫外線または可視光線）が照射されてそのエネルギーを吸収することで電子が励起し、その励起状態から基底状態に戻る際に余剰のエネルギーを電磁波として放出する、つまり「蛍光」を発する物質であって、二次抗体と直接的、あるいは間接的に結合させることのできるものを指す。また、「蛍光」は広義的な意味を持ち、励起のための電磁波の照射を止めても発光が持続する発光寿命の長い燐光と、発光寿命が短い狭義の蛍光とを包含する。

[0032] ＜蛍光物質集積ナノ粒子＞

本発明における蛍光物質集積ナノ粒子は、有機物または無機物でできた粒

子を母体とし、複数の蛍光物質（たとえば蛍光色素）がその中に内包されているおよび／またはその表面に吸着している構造を有する、ナノサイズの粒子である。この場合、母体（たとえば樹脂）と蛍光物質は、互いに反対の電荷を有する置換基ないし部位を有しており、静電的相互作用が働くものであることが好適である。

[0033] 蛍光物質集積ナノ粒子を形作る母体のうち、有機物としては、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、フラン樹脂など、一般的に熱硬化性樹脂に分類される樹脂；スチレン樹脂、アクリル樹脂、アクリロニトリル樹脂、ＡＳ樹脂（アクリロニトリル－スチレン共重合体）、ＡＳＡ樹脂（アクリロニトリル－スチレン－アクリル酸メチル共重合体）など、一般的に熱可塑性樹脂に分類される樹脂；ポリ乳酸等のその他の樹脂；多糖を例示することができ、無機物としてはシリカ、ガラスなどを例示することができる。

[0034] ・半導体集積ナノ粒子

半導体集積ナノ粒子とは、蛍光体としての半導体ナノ粒子が、上記に記載した母体の中に内包されているおよび／またはその表面に吸着している構造を有する。半導体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、たとえば、ＩＩ－ＶＩ族化合物、ＩＩＩ－Ｖ族化合物、またはＩＶ族元素を含有するもの、たとえば、ＣｄＳｅ、ＣｄＳ、ＣｄＴｅ、ＺｎＳｅ、ＺｎＳ、ＺｎＴｅ、ＩｎＰ、ＩｎＮ、ＩｎＡｓ、ＩｎＧａＰ、ＧａＰ、ＧａＡｓ、Ｓｉ、Ｇｅなどが挙げられる。また、半導体が母体に内包されている場合、母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していても、していなくてもよい。

[0035] ・蛍光色素集積ナノ粒子

蛍光色素集積ナノ粒子とは、蛍光色素が、上記に記載した母体の中に内包されている、および／またはその表面に吸着している構造を有する。蛍光色素は特に限定されるものではなく、たとえば、ローダミン系色素分子、スクアリリウム系色素分子、シアニン系色素分子、芳香環系色素分子、オキサジ

ン系色素分子、カルボピロニン系色素分子、ピロメセン系色素分子などを例示することができる。あるいは、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、ＢＯＤＩＰＹ（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、Ｃｙ（登録商標、ＧＥヘルスケア社製）系色素分子、ＤＹ系色素分子（登録商標、ＤＹＯＭＩＣＳ社製）、ＨｉＬｙｔｅ（登録商標、アナスペック社製）系色素分子、ＤｙＬｉｇｈｔ（登録商標、サーモサイエンティフィック社製）系色素分子、ＡＴＴＯ（登録商標、ＡＴＴＯ－ＴＥＣ社製）系色素分子、ＭＦＰ（登録商標、Ｍｏｂｉｔｅｃ社製）系色素分子などを用いることができる。なお、このような色素分子の総称は、化合物中の主要な構造（骨格）または登録商標に基づき命名されており、それぞれに属する蛍光色素の範囲は当業者であれば過度の試行錯誤を要することなく適切に把握できるものである。また、蛍光色素が母体に内包されている場合、蛍光色素は母体内部に分散されていればよく、母体自体と化学的に結合していても、していなくてもよい。

[0036] 蛍光物質集積ナノ粒子は、公知の方法（たとえば特開２０１３－５７９３７号公報参照）に従って作製することができる。より具体的には、たとえば、シリカを母体とし、その中に蛍光物質が内包されている蛍光物質内包シリカ粒子は、無機半導体ナノ粒子、有機蛍光色素などの蛍光物質と、テトラエトキシシランのようなシリカ前駆体とが溶解している溶液を、エタノールおよびアンモニアが溶解している溶液に滴下し、シリカ前駆体を加水分解することにより作製することができる。一方、樹脂を母体とし、蛍光物質を樹脂粒子の表面に吸着させるか、樹脂粒子中に内包させるかした蛍光物質内包樹脂粒子は、それらの樹脂の溶液ないし微粒子の分散液を先に用意しておき、そこに無機半導体ナノ粒子、有機蛍光色素などの蛍光物質を添加して撹拌することにより作製することができる。あるいは、樹脂原料の溶液に蛍光色素を添加した後、重合反応を進行させることにより、蛍光物質内包樹脂粒子を作製することもできる。たとえば、母体となる樹脂としてメラミン樹脂のような熱硬化性樹脂を用いる場合、その樹脂の原料（モノマーまたはオリゴマ

ーないしプレポリマー、たとえばメラミンとホルムアルデヒドの縮合物であるメチロールメラミン）と、有機蛍光色素と、好ましくはさらに界面活性剤および重合反応促進剤（酸など）とを含有する反応混合物を加熱し、乳化重合法によって重合反応を進行させることにより、有機蛍光色素内包樹脂粒子を作製することができる。また、母体となる樹脂としてスチレン系共重合体のような熱可塑性樹脂を用いる場合、その樹脂の原料と、有機蛍光色素と（樹脂の原料モノマーとして、あらかじめ有機蛍光色素を共有結合などで結合させたモノマーを用いるようにしてもよい）、重合開始剤（過酸化ベンゾイル、アゾビスイソブチロニトリルなど）を含有する反応混合物を加熱し、ラジカル重合法またはイオン重合法によって重合反応を進行させることにより、有機蛍光色素内包樹脂粒子を作製することができる。

[0037] 蛍光物質集積ナノ粒子に内包させる蛍光物質としては、上述したような半導体ナノ粒子、蛍光色素のほか、たとえば、Y_2O_3、Zn_2SiO_4等を母体とし、Mn^{2+}，Eu^{3+}等を賦活剤とする「長残光蛍光体」を挙げることができる。

[0038] 蛍光物質集積ナノ粒子（特に上記のような製造方法によって得られる蛍光色素を内包した樹脂粒子）の平均粒径は、病理標本の免疫染色（または遺伝子染色）に適した粒径であれば特に限定されないが、輝点としての検出のしやすさなどを考慮すると、通常は１０～５００ｎｍ、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は、通常は２０％以下であり、好ましくは５～１５％である。このような条件を満たす蛍光物質集積ナノ粒子は、製造条件を調整することにより製造することができる。たとえば、乳化重合法により蛍光物質集積ナノ粒子を作製する場合は、添加する界面活性剤の量によって粒径を調節することができ、一般的に、蛍光物質集積ナノ粒子の母体原料の量に対する界面活性剤の量が相対的に多ければ粒径は小さくなり、その量が相対的に少なければ粒径は大きくなる傾向にある。

[0039] なお、蛍光物質集積ナノ粒子の粒径は、走査型電子顕微鏡（ＳＥＭ）を用いて電子顕微鏡写真を撮影して蛍光物質集積ナノ粒子の断面積を計測し、そ

の断面形状を円と仮定したときに、その断面積に相当する円の直径として算出することができる。複数の蛍光物質集積ナノ粒子からなる集団の平均粒径および変動係数は、十分な数（たとえば１０００個）の蛍光物質集積ナノ粒子について上記のようにして粒径を算出した後、平均粒径はその算術平均として算出され、変動係数は式：１００×粒径の標準偏差／平均粒径、により算出される。

[0040] ＜免疫染色剤の構成＞

目的生体物質を蛍光標識するための免疫染色剤に含まれる蛍光ナノ粒子としては、前述したように「蛍光物質集積ナノ粒子」が好ましい。免疫染色剤は、蛍光標識の効率を向上させて蛍光の劣化につながる時間経過をなるべく抑えるために、一次抗体および蛍光体が間接的に、つまり抗原抗体反応やアビジン・ビオチン反応などを利用した、共有結合以外の結合によって連結される複合体を用いることが好ましい。

[0041] プローブおよび蛍光ナノ粒子が間接的に連結される免疫染色剤の一例として、［目的生体物質に対す一次抗体］…［一次抗体に対する抗体（二次抗体）］～［蛍光ナノ粒子（蛍光物質集積ナノ粒子）］が挙げられる。ここで、“…”は抗原抗体反応により結合していることを表し、“～”が示す結合の態様としては特に限定されず、例えば、共有結合，イオン結合，水素結合，配位結合，物理吸着または化学吸着等が挙げられ、必要に応じてリンカー分子を介していてもよい。例えば、無機物と有機物と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，アルデヒド基など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。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有するシランカップリング剤（例えば、Ｇｅｌｅｓｔ社製ＰＥＧ－ｓｉｌａｎｅ ｎｏ．ＳＩＭ６

４９２．７）等が挙げられる。シランカップリング剤を用いる場合、２種以上を併用してもよい。

[0042] 蛍光物質を内包した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、得られた蛍光物質を内包したシリカナノ粒子を純水中に分散させ、アミノプロピ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、遠心分離またはろ過により表面がアミノプロピル基で修飾された蛍光物質を内包した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、蛍光物質を内包した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。

[0043] 必要により有機分子修飾された蛍光物質を内包した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得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。具体例として、アミノ基に選択的に反応する部位とメルカプト基に選択的に反応する部位との両方を有するｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣ〔Ｓｕｌｆｏｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｙｌ－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蛍光物質を内包したシリカナノ粒子のアミノ基と、抗体中のメルカプト基とを結合させることで、抗体が結合した蛍光物質を内包したシリカナノ粒子が得られる。

[0044] 蛍光物質を内包したポリスチレンナノ粒子に生体物質認識部位（生体物質を特異的に認識可能な部位、例；ビオチン、アビジン、抗体等）を結合させる場合、蛍光物質が蛍光色素の場合であっても、半導体ナノ粒子の場合であっても、同様の手順を適用することができる。すなわち、アミノ基など官能基を有するポリスチレンナノ粒子に半導体ナノ粒子または蛍光有機色素を含

浸することにより、官能基を有する蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子を得ることができ、以降ＥＤＣまたはｓｕｌｆｏ－ＳＭＣＣを用いることで、抗体が結合した蛍光物質内包ポリスチレンナノ粒子ができる。

[0045] プローブおよび蛍光体が間接的に連結される免疫染色剤の他の一例として、［目的生体物質に対する一次抗体］…［一次抗体に対する抗体（二次抗体）］－［ビオチン］／［アビジン］－［蛍光体（蛍光ナノ粒子）］（ここで、“…”は抗原抗体反応により結合していることを表し、“－”は必要に応じてリンカー分子を介していてもよい共有結合により結合していることを表し、“／”はアビジン・ビオチン反応により結合していることを表す。）という様式によって連結される、３つの分子からなる複合体が挙げられる。

[0046] 二次抗体－ビオチン結合体（ビオチン修飾二次抗体）は、所望の抗体（タンパク質）にビオチンを結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されているビオチン標識試薬（キット）を利用して作製することができる。また、あらかじめ所望の抗体にビオチンが結合されているビオチン修飾二次抗体自体が市販されていれば、それを利用してもよい。

[0047] 蛍光ナノ粒子－アビジン結合体（アビジン修飾蛍光体）も、蛍光体にアビジンを結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されているアビジン標識試薬（キット）を利用して作製することができる。この場合のアビジンは、ビオチンとの間でアビジンよりも高い結合力が働く、ストレプトアビジンやニュートラアビジンなどの改良型であってもよい。

[0048] 蛍光体－アビジン結合体の作製方法の具体例を挙げれば次の通りである。

[0049] 蛍光ナノ粒子が樹脂を母体とする蛍光物質集積ナノ粒子である場合、その樹脂が有する官能基と、アビジン（タンパク質）が有する官能基とを、必要に応じて分子の両末端に官能基を有するＰＥＧ等のリンカー分子を介することにより、結合させることができる。

[0050] たとえば、メラミン樹脂であればアミノ基等の官能基を利用することができるし、アクリル樹脂、スチレン樹脂等であれば、側鎖に官能基（たとえばエポキシ基）を有するモノマーを共重合させることにより、その官能基自体

またはその官能基から変換された官能基（たとえばアンモニア水を反応させることにより生成するアミノ基）を利用することができるし、さらにはそれらの官能基を利用して別の官能基を導入することもできる。また、蛍光ナノ粒子がシリカを母体とする蛍光物質集積ナノ粒子または無機半導体ナノ粒子である場合、シランカップリング剤で表面修飾することにより所望の官能基を導入することができ、たとえばアミノプロピルトリメトキシシランを用いればアミノ基を導入することができる。

[0051] 一方、アビジンに対しては、たとえばＮ－スクシンイミジルＳ－アセチルチオアセテート（ＳＡＴＡ）をアビジンのアミノ基と反応させることにより、チオール基を導入することができる。

[0052] そして、アミノ基との反応性を有するＮ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステルおよびチオール基との反応性を有するマレイミド基をポリエチレングリコール（ＰＥＧ）鎖の両端に有するクロスリンカー試薬を利用することにより、アミノ基を有する蛍光体と、チオール基が導入されたアビジンとを連結することができる。

[0053] 二次抗体～蛍光ナノ粒子結合体は、所望の抗体（タンパク質）に所望の蛍光色素を結合させることのできる公知の手法に基づいて、たとえば市販されている蛍光標識試薬（キット）を利用して作製することができる。また、あらかじめ所望の抗体に所望の蛍光ナノ粒子が結合されている二次抗体～蛍光ナノ粒子結合体自体が市販されていれば、それを利用してもよい。

[0054] ― 組織切片の染色方法 －

（免疫染色方法）

以下、本発明で用いる染色方法の一例について説明する。この染色方法が適用できる組織切片（本明細書において、単に「切片」ともいい、例えば病理切片等の切片も包含する用語として用いる。）の作製法は特に限定されず、公知の手順により作製されたものを用いることができる。

[0055] （１．標本作製工程）

（１－１．脱パラフィン処理）

キシレンを入れた容器に、切片を浸漬させ、パラフィン除去する。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。

[0056] 次いでエタノールを入れた容器に切片を浸漬させ、キシレン除去する。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。

[0057] 水を入れた容器に、切片を浸漬させ、エタノール除去する。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。

[0058] （１－２．賦活化処理）

公知の方法に倣い、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のクエン酸緩衝液（ｐＨ６．０）、１ｍＭのＥＤＴＡ溶液（ｐＨ８．０）、５％尿素、０．１Ｍのトリス塩酸緩衝液など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、ウォーターバスなど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。

[0059] 次いで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。

[0060] （２．免疫染色工程）

免疫染色工程では、生体物質を染色するために、目的生体物質に直接的または間接的に結合しうる部位を有する蛍光ナノ粒子を本発明における蛍光ナノ粒子用希釈液に分散させ、組織切片に載せ、目的とする生体物質との反応

を行う。免疫染色工程に用いる蛍光免疫染色用溶液ないしそれを調製するための蛍光ナノ粒子用希釈液およびその他の成分については前述した通りであり、この工程の前にあらかじめ調製しておけばよい。

[0061] たとえば、免疫染色剤が、［一次抗体（プローブ）］…［二次抗体］－［ビオチン］／［アビジン］－［蛍光物質内包ナノ粒子（蛍光体）］（”…”は抗原抗体反応により結合していることを表し、“－”は必要に応じてリンカー分子を介していてもよい共有結合により結合していることを表し、“／”はアビジン・ビオチン反応により結合していることを表す。）という複合体である場合、最初に一次抗体の溶液に病理標本を浸漬する処理（１次反応処理）、次に二次抗体－ビオチン結合体の溶液に病理標本を浸漬する処理（２次反応処理）、最後に本発明に係る蛍光ナノ粒子用希釈液に分散させたアビジン－蛍光物質内包ナノ粒子の溶液（蛍光免疫染色用溶液）に病理標本である組織切片を浸漬する処理（蛍光標識処理）を行えばよい。

[0062] 免疫染色工程を行う上での条件、たとえば１次反応処理、２次反応処理および蛍光標識処理それぞれにおける、所定の溶液（試薬）に病理標本である組織切片を浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

[0063] 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。

[0064] 上述したような１次反応処理を行う前に、ＢＳＡ含有ＰＢＳなど公知のブロッキング剤やＴｗｅｅｎ２０などの界面活性剤を滴下することが好ましい。本発明では、このような１次反応処理前にブロッキング剤を添加する処理（ブロッキング処理）を行った場合であってもなお、蛍光標識処理で用いる蛍光免疫染色用溶液（ないしその調製に用いる蛍光ナノ粒子用希釈液）に所定の２種類のタンパク質を所定の量で配合することにより、バックグラウンドノイズの低減等の本発明の作用効果を発揮することができる。

[0065] （３．標本後処理工程）

免疫染色工程を終えた病理標本は、観察に適したものとなるよう、固定化

・脱水、透徹、封入などの処理を行うことが好ましい。

[0066] 固定化・脱水処理は、病理標本を固定処理液（ホルマリン、パラホルムアルデヒド、グルタールアルデヒド、アセトン、エタノール、メタノール等の架橋剤）に浸漬すればよい。透徹は、固定化・脱水処理を終えた病理標本を透徹液（キシレン等）に浸漬すればよい。封入処理は、透徹処理を終えた病理標本を封入液に浸漬すればよい。これらの処理を行う上での条件、たとえば病理標本を所定の処理液に浸漬する際の温度および浸漬時間は、従来の免疫染色法に準じて、適切なシグナルが得られるよう適宜調整することができる。

[0067] （４．任意工程）

本発明では、もしも必要であれば、明視野において細胞、組織、臓器等の形態を観察することができるようにするための、形態観察染色工程を含めることができる。形態観察染色工程は、常法に従って行うことができる。組織標本の形態観察に関しては、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、エオジンを用いた染色が標準的に用いられている。また、細胞核・石灰部・軟骨組織・細菌・粘液が青藍色～淡青色に染色される、ヘマトキシリンを用いた染色も標準的に用いられている（これら２つの染色を同時に行う方法はヘマトキシリン・エオジン染色（ＨＥ染色）として知られている）。形態観察染色工程を含める場合は、免疫染色工程の後に行うようにしてもよいし、免疫染色工程の前に行うようにしてもよい。

[0068] （５．評価工程）

（５－１．観察・撮影）

観察・撮影工程では、所望の倍率における顕微鏡の同一視野において、免疫染色工程に用いられた目的生体物質を蛍光標識している蛍光体に対応した励起光に対応した励起光それぞれを病理標本に照射し、それらの蛍光体から発せられた蛍光による免疫染色像それぞれを観察・撮影する。これらの励起光の照射は、たとえば、蛍光顕微鏡が備えるレーザー光源と、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させる励起光用光学フィルターを用いることで照

射することができる。免疫染色像の撮影は、たとえば、蛍光顕微鏡が備えるデジタルカメラによって行うことができる。免疫染色像の撮影の際には、必要に応じて所定の波長を選択的に透過させる蛍光用光学フィルターを用いることで、目的とする蛍光のみを含み、目的としない蛍光やノイズとなる励起光およびその他の光を排除した免疫染色像を撮影することができる。

[0069] （５－２．画像処理・シグナル計測）

画像処理・計測工程では、目的生体物質に関して撮影された免疫染色像について、画像処理に基づき、目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルに対応する蛍光標識シグナルを計測し、細胞膜の領域内にある前記目的生体物質に対応する蛍光標識シグナルを特定する。

[0070] 蛍光標識シグナルは、蛍光の輝点数として扱うことが好ましい。

[0071] 画像処理に用いることができるソフトウェアとしては、たとえば「ＩｍａｇｅＪ」（オープンソース）が挙げられる。このような画像処理ソフトウェアを利用することにより、免疫染色像から、所定の波長（色）の輝点を抽出してその輝度の総和を算出したり、所定の輝度以上の輝点の数を計測したりする処理、特に、を上述した実施形態を行うための処理を半自動的に、迅速に行うことができる。

[0072] また、輝点は蛍光ナノ粒子１個に由来するので、大きさが一定であり顕微鏡観察で認識できる。大きさが一定値（例；観測される蛍光ナノ粒子の平均値）より大きなシグナルは凝集輝点と判断する。この輝点と凝集輝点は、ソフトウェアを用いて半自動的に迅速に区別することができる。

[0073] （遺伝子染色法）

上述した免疫染色法以外にも蛍光ナノ粒子を用いて遺伝子を特異的に染色する方法（例；ＦＩＳＨ法）にも、本発明を適用することができる。すなわち、本発明に係る遺伝子染色法は、前述した蛍光ナノ粒子用希釈液と、プローブと、該プローブに結合可能または結合した蛍光ナノ粒子と、を含有する遺伝子染色用溶液を用いて遺伝子を染色する方法である。

[0074] （プローブ）

プローブは、例えば、疾病（癌等）で特異的に発現する生体分子をコードした遺伝子と特異的に結合する核酸のプローブであり、例えば、前述した目的生体物質をコードする遺伝子である。

[0075] プローブは、上述したように特定の疾患に関連する、染色体上の特定領域の一部または全部を含む配列（プローブ配列）を有する核酸分子である。核酸にはＤＮＡ、ＲＮＡ（ｍＲＮＡ，ｔＲＮＡ，ｍｉＲＮＡ，ｓｉＲＮＡ，ｎｏｎ－ｃｏｒｄｉｎｇ－ＲＮＡなど）等の天然に存在する核酸やＰＮＡ、ＬＮＡ（又はＢＮＡ:Ｂｒｉｄｇｅｄ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ）等の人工核酸が含まれる。したがって、核酸分子は、染色体上の核酸配列と相補鎖を形成できるものであれば制限がない。核酸分子は、天然の核酸、人工核酸、または天然の核酸と人工の核酸とが連結した核酸の分子であってもよい。

[0076] （プローブの調製）

目的遺伝子に対するプローブは、公知の方法にしたがって作製することが可能であり、市販品として入手することもできる。プローブの塩基長、塩基配列、ＧＣ含量は、ハイブリダイゼーションさせる際の条件を考慮し、適切なストリンジェンシーを有するものとなるよう調製することができる

（プローブと蛍光ナノ粒子との結合）

プローブと蛍光ナノ粒子との結合は、遺伝子染色法（例；ＦＩＳＨ）に支障がなければ特に制限なく、様々な結合とすることができる。このプローブと蛍光ナノ粒子の結合は、プローブに蛍光ナノ粒子を直接結合する方法、または生体分子同士の結合を介して間接的に結合する方法のいずれでもよい。

[0077] ＜直接結合法＞

直接結合する方法の例としては、例えば、核酸分子の５’末端のリボースＣ５位に結合したリン酸の水酸基または核酸分子の３’末端のリボースのＣ１位に結合した水酸基を公知のチオール基導入試薬によりチオール基（ＳＨ基）に置換し、マレイミドで標識された蛍光ナノ粒子を反応させて、両者を結合する方法が挙げられる。ベクターラボラトリーズ社製「５’ＥｎｄＴａｇ（出願商標）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｌａｂｅｌｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ

」や「3’　ＥｎｄＴａｇ　ＤＮＡ　Ｌａｂｅｌｉｎｇ　Ｓｙｓｔｅｍ」のキットを用いて好適に行うことができる。

[0078] 別法としては、マレイミド基修飾された蛍光ナノ粒子とＴｈｉｏｌ－１１－ｄＵＴＰ溶液とを反応させ、ｄＵＴＰが結合した蛍光ナノ粒子を得た後、ニックトランスレーション法で核酸分子に取り込ませることで、核酸分子に蛍光体集積ナノ粒子を直接結合させることができる。

[0079] ＜間接結合法＞

間接的に結合する方法は、生体分子（第１，２の結合基分子）同士の特異的な結合を介してプローブと蛍光ナノ粒子とを結合させる方法である。生体分子同士の結合として、例えば第１，２の生体分子の組合せとして、アビジンービオチンの結合系、ハプテン－抗ハプテン等が挙げられる。

[0080] 第１結合基分子（ビオチン等）で標識されたDNAの調製方法としては、核酸分子の特定の塩基（例えばチミン（Ｔ））を第１の生体分子（ビオチン等）で標識されたヌクレオチド（例えばＢｉｏｔｉｎ－１６－ｄＵＴＰ）にニックトランスレーションにより置換し、このプローブのビオチンに対して、（ストレプト）アビジンを有する蛍光ナノ粒子を結合させる方法を例示できる。

[0081] 一方、第２の結合基分子（ストレプトアビジン等）で修飾した蛍光ナノ粒子の調製は、例えば、以下のようにして行うことができる。蛍光ナノ粒子と第２結合基分子とにそれぞれ官能基を導入する試薬により官能基を導入し、官能基同士の結合を介して第２の生体分子と蛍光ナノ粒子とを結合させる方法である。このとき、官能基同士の間にリンカーを介在させてもよい。官能基の組み合わせの例としては、ＮＨＳエステル基‐アミノ基、チオール基－マレイミド基の組み合わせ等を例示することができる。リンカーとしては、ＥＭＣＳ（Ｎ－［エプシロン－Ｍａｌｅｉｍｉｄｏｃａｐｒｏｙｌｏｘｙ］ｓｕｃｃｉｎｉｍｉｄｅ　ｅｓｔｅｒ）（旧サーモサイエンティフィック社製）等のリンカーを例示することができる。

[0082] （遺伝子染色）

遺伝子染色を行う場合、（ｉ）プローブと蛍光ナノ粒子とを染色する前に結合させてコンジュゲートを作成し、当該コンジュゲートを用いて検出対象の遺伝子を染色する方法（直接法）、または、（ｉｉ）第１結合基分子（ビオチン等）で修飾されたプローブを検出対象の遺伝子（ＨＥＲ２遺伝子等）にハイブリダイズ（特異的に結合）させた後に（１次反応処理後に）、第２結合基分子（アビジン等）で修飾された蛍光ナノ粒子を当該プローブに特異的に動的に結合させる（２次反応処理する）方法（間接法）がある。

[0083] （ＦＩＳＨ法）

ＦＩＳＨ法は、上述したような各種の手法のそれぞれにとって標準的な手順および処理条件に従って行えばよい。一般的には、組織切片を載置した検体スライドをＦＩＳＨ法に応じた１種類または２種類以上の試薬に、適切な温度および時間条件の下、浸漬すればよい。本発明に係るＦＩＳＨの実施に必要な各種の試薬は、公知の方法にしたがって作製することが可能であり、市販品として入手することもできる。

[0084] ＦＩＳＨ法における標本前処理として、脱パラフィン処理、ＦＩＳＨ用前処理、酵素（プロテアーゼ）処理、固定処理などが行われる。染色処理としては、ＦＩＳＨ法に基づく染色を行う処理（ＦＩＳＨ染色処理）、すなわちＤＮＡ変性処理、ハイブリダイゼーション処理、ポストハイブリダイゼーション処理などと、通常はさらに核染色処理（例えばＤＡＰＩによるもの）が行われる。標本後処理として、溶媒置換処理、充填処理（封入剤を用いた封入処理）、保護処理、必要に応じて溶媒置換処理の前に行われる洗浄処理および脱水処理が行われる。

[0085] 本発明に係る作用・効果について以下説明する。

（１）蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色を行う際に使用する蛍光ナノ粒子用希釈液が、分子量４０，０００以上のタンパク質を１～５％（Ｗ／Ｗ）含有し、かつ分子量４０，０００未満のタンパク質を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有している蛍光ナノ粒子用希釈液であれば、蛍光免疫染色において、蛍光粒子を希釈する際に本発明の蛍光ナノ粒子用希釈液を用いることで、蛍光ナノ粒子の

非特異的吸着が抑制され、検出時にみられるバックグラウンドノイズを低減させることが可能となり、染色画像の評価するにあたって、精度と定量性の向上を図ることができる。

（２）前記分子量４０，０００以上のタンパク質がＢＳＡであれば、特に上記希釈をした際にＢＳＡ以外のタンパク質を安定化する効果を奏する観点から好ましい。

（３）前記分子量４０，０００未満のタンパク質がカゼインであれば、タンパク質が非特異的に吸着する部分（抗原周辺の切片部位等）に付着した分子量４００００以上のタンパク質同士の隙間を埋める（塞ぐ）効果を好適に得ることができる。カゼインは、水に溶けない油性成分(疎水性成分hydrophobic)がカゼイン分子の外側に配位しており、カゼイン分子同士が集まりやすい性質があるため、上記隙間の形状・大きさに応じてカゼイン分子同士が集まって隙間を埋めるため、非特異的吸着を好適に抑制することができる。

[0086] （４、５） 前記カゼイン内のκ－カゼインの比率が０～１０％（Ｗ／Ｗ）の範囲、あるいは、α－カゼイン：β－カゼインの比率が４０：６０～６０：４０（α－カゼインおよびβ－カゼインの合計量を１００とする。）であれば、免疫染色工程後に行う観察・撮影工程および画像処理・計測工程において、バックグラウンドがより抑制され、より定量性のある評価を行うことができる。

（６） （ｉ）上記（１）～（５）のいずれかの蛍光ナノ粒子用希釈液、および（ｉｉ）蛍光ナノ粒子を含有する免疫染色用試薬を含む蛍光免疫染色用キットであれば、免疫染色前に上記蛍光ナノ粒子用希釈液と免疫染色用試薬を混合して蛍光免疫染色に用いるだけで、上述した非特異的吸着を抑制する効果を比較的簡便に得ることができる。

（７） （１）～（５）のいずれかに記載の蛍光ナノ粒子用希釈液および蛍光ナノ粒子を含有する蛍光免疫染色用溶液であれば、該溶液を貯留する容器や該溶液を吸排するピペットチップの内表面に対する蛍光ナノ粒子の非特異的吸着を抑制する効果が得られるので、免疫染色工程の前に蛍光ナノ粒子が

不必要に浪費されることがない。

[0087] （８） 前記蛍光免疫染色用溶液を使用した免疫染色工程を含む蛍光免疫染色法であれば、容器やピペットチップ等に対しても非特異的な吸着を好適に抑制することができるので、その分、蛍光シグナルが増加する。

（９） 上記免疫染色工程が、目的生体物質に対して一次抗体を特異的に結合させる１次反応処理、一次抗体に対し、ビオチンが結合した二次抗体を特異的に結合させる２次反応処理、請求項１～５に記載された蛍光ナノ粒子用希釈液により、アビジンが結合した蛍光ナノ粒子を希釈し、該希釈後の溶液でもって２次抗体を蛍光標識する処理、を順に行う工程を含む蛍光免疫染色法であれば、蛍光ナノ粒子の非特異的吸着が抑制されること以外にも、蛍光ナノ粒子に結合したアビジンの非特異的吸着も抑制される結果、アビジンービオチンの結合系を利用した蛍光標識処理を好適に行うことができる。

（１０）蛍光ナノ粒子を用いたＦＩＳＨ法を行う際に使用する、分子量４０，０００以上のタンパク質を１～５％（Ｗ／Ｗ）含有し、かつ分子量４０，０００未満のタンパク質を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有している蛍光ナノ粒子用希釈液であれば、遺伝子検出を行う場合にも蛍光ナノ粒子の非特異的吸着を抑制して、ノイズ低減や検出シグナルが強まる。

[0088] （１１）前記分子量４０，０００以上のタンパク質がＢＳＡであれば、上記（２）で説明した効果が遺伝子検出においても得られる。

（１２）前記分子量４０，０００未満のタンパク質がカゼインであれば、上記（３）で説明した効果が遺伝子検出においても得られる。

（１３，１４）前記カゼイン内のκ－カゼイン含有比率が１０％（Ｗ／Ｗ）以下であれば、あるいは、α－カゼイン：β－カゼインの比率が４０：６０～６０：４０（α－カゼインおよびβ－カゼインの合計量を１００とする。）であれば、上記（４，５）で説明した効果が遺伝子検出においても得られる。

[0089] （１５）（ｉ）上記（１０）～（１４）のいずれかに記載の蛍光ナノ粒子用希釈液、および（ｉｉ）蛍光ナノ粒子を含有する遺伝子染色用試薬を含む、

遺伝子染色用キットであれば、上記（６）で説明した効果が遺伝子検出においても得られる。

（１６）上記（１０）～（１４）のいずれかに記載の蛍光ナノ粒子用希釈液および蛍光ナノ粒子を含有する遺伝子染色用溶液であれば、上記（７）で説明した効果が遺伝子検出においても得られる。

（１７）前記遺伝子染色用溶液を使用した遺伝子染色工程を含む遺伝子染色法であれば、上記（８）で説明した効果（蛍光シグナル以外にもアイソトープのシグナルについても同様の効果）が得られる。

（１８）上記遺伝子染色工程が、

検出対象の遺伝子に対して、第１結合基分子を有するプローブを特異的に結合させる１次反応処理、

上記（１０）～（１４）に記載された蛍光ナノ粒子用希釈液により、第１結合基分子と特異的に結合する第２結合基分子が結合した蛍光ナノ粒子を希釈し、希釈された溶液でもって、検出対象の遺伝子に特異的に結合したプローブを蛍光標識する２次反応処理、を順に行う工程を含む遺伝子染色法であれば、蛍光ナノ粒子に結合した第２結合基分子の非特異的吸着に起因した蛍光ナノ粒子の非特異的吸着を好適に抑制することができる。

[0090] 特に、第２結合基分子（アビジン等）で標識された蛍光ナノ粒子を用いることから、例えば、エッペンドルフチューブ等のチューブに蛍光ナノ粒子の溶液を使用するまで保管しておくと、チューブ内壁に上記蛍光ナノ粒子の粒子表面や第２結合基分子（アビジン等）の部分が非特異的に結合してしまう問題が生じるが、本発明により、上述した非特異的吸着を抑制することができ、蛍光ナノ粒子が失われにくい。

[0091] さらに、本発明によれば、蛍光ナノ粒子をプローブに連結させる場面で、蛍光ナノ粒子が組織切片に非特異的吸着することが抑制されるので、目的遺伝子の検出する際のノイズの低減や（蛍光）シグナルの増強がなされる。

実施例

[0092] ［作製例１］ビオチン修飾抗ウサギＩｇＧ抗体の作製

５０ｍＭＴｒｉｓ溶液に、２次抗体として用いる抗ウサギＩｇＧ抗体５０μｇを溶解した。この溶液に、最終濃度３ｍＭとなるようにＤＴＴ（ジチオトレイトール）溶液を添加、混合し、３７℃で３０分間反応させた。その後、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、Cat.#89882）に通して、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５０ｍＭＴｒｉｓ溶液に溶解して抗体溶液を調製した。その一方で、リンカー試薬「Maleimide-PEG_2-Biotin」（サーモサイエンティフィック社、製品番号21901）を、ＤＭＳＯを用いて０．４ｍＭとなるように調整した。このリンカー試薬溶液８．５μＬを前記抗体溶液に添加、混合し、３７℃で３０分間反応させることにより、抗ウサギＩｇＧ抗体にＰＥＧ鎖を介してビオチンを結合させた。この反応溶液を脱塩カラムに通して精製した。脱塩した反応溶液について、波長３００ｎｍにおける吸光度を分光高度計（日立製「Ｆ－７０００」）を用いて測定することにより、反応溶液中のタンパク質（ビオチン修飾２次抗体）の濃度を算出した。５０ｍＭＴｒｉｓ溶液を用いて、ビオチン修飾２次抗体の濃度を２５０μｇ／ｍＬに調整した溶液を、ビオチン修飾２次抗体（試薬ＩＩ）の溶液とした。

[0093] ［作製例２］テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の作製

テキサスレッド色素分子「Ｓｕｌｆｏｒｈｏｄａｍｉｎｅ １０１」（シグマアルドリッチ社）２．５ｍｇを純水２２．５ｍＬに溶解した後、ホットスターラーにより溶液の温度を７０℃に維持ながら２０分間撹拌した。撹拌後の溶液に、メラミン樹脂「ニカラックＭＸ－０３５」（日本カーバイド工業株式会社）１．５ｇを加え、さらに同一条件で５分間加熱撹拌した。撹拌後の溶液にギ酸１００μＬを加え、溶液の温度を６０℃に維持しながら２０分間攪拌した後、その溶液を放置して室温まで冷却した。冷却した後の溶液を複数の遠心用チューブに分注して、１２，０００ｒｐｍで２０分間遠心分離して、溶液に混合物として含まれるテキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子を沈殿させた。上澄みを除去し、沈殿した粒子をエタノールおよび水

で洗浄した。得られたナノ粒子の１０００個についてＳＥＭ観察を行い、上述のように平均粒子径を測定したところ、平均粒子径152ｎｍであった。

[0094] ［作製例３］ストレプトアビジン修飾テキサスレッド色素内包メラミン樹脂ナノ粒子の作製

作製例2で得られた粒子０．１ｍｇをＥｔＯＨ１．５ｍＬ中に分散し、アミンプロピルトリメトキシシランＬＳ－３１５０（信越化学工業社製）２μＬを加えて８時間反応させて表面アミノ化処理を行なった。

[0095] 次いで、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）を用いて上記表面アミノ化処理を行なった粒子を３ｎＭに調整し、この溶液に最終濃度１０ｍＭとなるようＳＭ（ＰＥＧ）$_{12}$（サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-［(N-maleimidopropionamido)-dodecaethyleneglycol］ester）を混合し、１時間反応させた。この混合液を１０，０００Ｇで２０分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、ＥＤＴＡを２ｍＭ含有したＰＢＳを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を３回行うことで末端にマレイミド基が付いた蛍光物質内包メラミンナノ粒子を得た。

[0096] 一方、ストレプトアビジン（和光純薬社製）をN-succinimidyl S-acetylthioacetate（ＳＡＴＡ）を用いてチオール基付加処理を行ったのち、ゲルろ過カラムによるろ過を行い、蛍光物質内包メラミンナノ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

[0097] 上記の蛍光物質内包メラミンナノ粒子とストレプトアビジンとを、ＥＤＴＡを２ｍＭ含有したＰＢＳ中で混合し、室温で１時間反応させた。１０ｍＭメルカプトエタノールを添加し、反応を停止させた。得られた溶液を遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲルろ過カラムを用いて未反応ストレプトアビジン等を除去し、ストレプトアビジン結合蛍光物質内包メラミンナノ粒子を作製した。

[0098] ［作製例４］表面修飾基としてカルボン酸塩（カルボキシレート基）を持つＣｄＳｅ／ＺｎＳ半導体ナノ粒子を内包するメラミン樹脂粒子の作製

アルゴン気流下、トリ－ｎ－オクチルホスフィンオキシド７．５ｇに、ステアリン酸２．９ｇ、ｎ－テトラデシルホスホン酸６２０ｍｇ、および、酸化カドミウム２５０ｍｇを加え、３７０℃に加熱混合した。これを２７０℃まで放冷した後、トリブチルホスフィン２．５ｍＬにセレン２００ｍｇを溶解させた溶液を加え、減圧乾燥し、トリ－ｎ－オクチルホスフィンオキシドで被覆されたカドミウムセレニド（ＣｄＳｅ）コア半導体ナノ粒子を得た。

[0099] 得られたＣｄＳｅコア半導体ナノ粒子に、トリ－ｎ－オクチルホスフィンオキシド１５ｇを加えて加熱し、引き続き２７０℃でトリオクチルホスフィン１０ｍＬにジエチルジチオカルバミン酸亜鉛１．１ｇを溶解した溶液を加え、ＣｄＳｅ／ＺｎＳ半導体ナノ粒子を含む分散液を得た。

[0100] 得られたＣｄＳｅ／ＺｎＳ半導体ナノ粒子の濃度が５質量％となるように、デカンに分散させた。この分散液１０μＬにプロピオン酸ナトリウム０．５ｍＬを添加し、室温で撹拌することにより、表面修飾を行った。反応混合物に純水２．５ｍＬを添加した後、ホットスターラーにより溶液の温度を７０℃に維持ながら２０分間撹拌した。撹拌後の溶液に、メラミン樹脂「ニカラックＭＸ－０３５」（日本カーバイド工業（株）製）１．５ｇを加え、さらに同一条件で５分間加熱撹拌した。

[0101] 撹拌後の溶液にギ酸１００μＬを加え、溶液の温度を６０℃に維持しながら２０分間攪拌した後、該溶液を放置して室温まで冷却した。冷却した後の溶液を複数の遠心用チューブに分注して、１２，０００ｒｐｍで２０分間遠心分離して、溶液に混合物として含まれるメラミン樹脂ナノ粒子を沈殿させて上澄みを除去した。その後、沈殿した粒子の洗浄をエタノールと水で行った。平均粒子径が１５０ｎｍのナノ粒子（量子ドット内包メラミン樹脂ナノ粒子）を作製した。

［作製例５］ストレプトアビジン修飾量子ドット内包メラミン樹脂ナノ粒子の作製

作製例３と同様にして、作製例4で得られたナノ粒子０．１ｍｇから、ストレプトアビジン修飾量子ドット内包メラミン樹脂ナノ粒子を得た。

[0102] ［実験例１］

（Ｅ１）標本作製工程

乳がん組織アレイスライド（組織切片を搭載したスライドグラス）を（USBiomax社　br243）を購入し、ベンタナＩ－ＶＩＥＷパスウェーＨＥＲ２（４Ｂ５）キットを用い、ベンタナベンチマークＵＬＴＲＡで染色、ＤＡＢ法によりＨＥＲ２　３＋領域（すなわち癌細胞領域）と間質細胞領域を形態学的に同定した。

[0103] 標本は脱パラフィン処理した後、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クエン酸緩衝液中（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。

[0104] （Ｅ２）免疫染色工程

（Ｅ２－１）免疫染色の１次反応処理

目的生体物質ＨＥＲ２に係る第１免疫染色用の１次反応処理は、ＢＳＡを１Ｗ／Ｗ％含有するＰＢＳを用いて、抗ＨＥＲ２ウサギモノクローナル抗体「４Ｂ５」（ベンタナ社）を０．０５ｎＭの濃度で含有する１次反応処理液を調製した。この１次反応処理液に工程（１）で作製した標本を浸漬し、４℃で１晩反応させた。

[0105] （Ｅ２－２）免疫染色の２次反応処理

作製例１で作製したビオチン修飾抗ウサギＩｇＧ抗体の溶液を、さらにＢＳＡを１Ｗ／Ｗ％含有するＰＢＳを用いて６μｇ／ｍＬに希釈した２次反応処理液を調製した。１次反応処理を終えた標本をＰＢＳで洗浄した後、この２次反応処理液に浸漬し、室温で３０分間反応させた。

[0106] （Ｅ２－３）免疫染色の蛍光標識処理

作製例３で作製したストレプトアビジン修飾テキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子を、表１に示すように、カゼイン（組成＝α－カゼイン（シグ

マ社　ｃ６７８０）：５０Ｗ／Ｗ％、β－カゼイン（シグマ社　ｃ６９０５）：５０Ｗ／Ｗ％）とＢＳＡの含有率がそれぞれ異なった蛍光ナノ粒子用希釈液を用いて、０．０２ｎＭに希釈した蛍光標識反応処理液をそれぞれ調製した。２次反応処理を終えた標本をこの蛍光標識処理液に浸漬し、中性のｐＨ環境下（ｐＨ６．９～７．４）、室温で３時間反応させた。

[0107] （Ｅ３）標本後処理工程

免疫染色を終えた標本に対して、純エタノールに５分間浸漬する操作を４回行う固定化・脱水処理を行った。続いて、キシレンに５分間浸漬する操作を４回行う透徹処理を行った。最後に、標本に封入剤「エンテランニュー」（メルク社）を載せて、カバーガラスを被せる封入処理を行い、観察に用いる標本とした。

[0108] （Ｅ４）評価工程

（Ｅ４－１）観察・撮影工程

この工程における励起光の照射および蛍光の発光の観察には蛍光顕微鏡「ＢＸ－５３」（オリンパス株式会社）を用い、免疫染色像（４００倍）の撮影には、当該蛍光顕微鏡に取り付けた顕微鏡用デジタルカメラ「ＤＰ７３」（オリンパス株式会社）を用いた。

[0109] まず、目的生体物質ＨＥＲ２の蛍光標識に用いたテキサスレッド色素に対応する励起光を標本に照射して蛍光を発光させ、その状態の免疫染色像を撮影した。この際、励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルターを用いて５７５～６００ｎｍに設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光用光学フィルターを用いて６１２～６９２ｎｍに設定した。蛍光顕微鏡による観察および画像撮影時の励起光の強度は、視野中心部付近の照射エネルギーが９００Ｗ／ｃｍ^{2}となるようにした。画像撮影時の露光時間は、画像の輝度が飽和しないような範囲で調節し、例えば４０００μ秒に設定した。

[0110] このような免疫染色像の撮影は、同一視野において行った後、視野を変えて同じ操作を繰り返し、１標本につき合計５視野ずつ行った（第１～第５視野）。

[0111] （Ｅ４－２）画像処理・計測工程

この工程における画像処理には、画像処理ソフトウェア「ＩｍａｇｅＪ」（オープンソース）を用いた。

[0112] 免疫染色像におけるＨＥＲ２を蛍光標識したテキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子を表す輝点のうち輝度が所定の値以上のものの数を計測した。

[0113] 間質ノイズ、ＨＥＲ２　３＋領域（すなわち癌細胞領域）の１細胞あたりの輝点数および凝集輝点数をカウントした。結果を表１に示す。なお、間質細胞領域にはHER2は発現しないので、間質細胞内に位置する輝点は非特異的シグナルすなわちノイズである。間質ノイズである輝点の数が多いということはと非特異的反応が多いことを意味し、これをカウントすることで、免疫反応の評価指標とした。

[0114] [表1]

<table>
<tr><td></td><td colspan="7">カゼイン
α―カゼイン　５０％
β―カゼイン　５０％</td></tr>
<tr><td></td><td></td><td>０．６％</td><td>０．８％</td><td>１．０％</td><td>１．２％</td><td>２．４％</td><td>３・０％</td><td>５．０％</td></tr>
<tr><td rowspan="10">ＢＳＡ</td><td>０．５％</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；○</td></tr>
<tr><td>０．７５％</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；○</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；○</td></tr>
<tr><td>１．０％</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td colspan="4" rowspan="3">Ａ；◎
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；○</td></tr>
<tr><td>３・０％</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；○</td></tr>
<tr><td>５・０％</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；○</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；○</td></tr>
<tr><td>７・５％</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td></tr>
<tr><td>１０・０％</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td></tr>
<tr><td>１２・０％</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；×
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；×
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；○
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td><td>Ａ；○
Ｂ；×
Ｃ；×</td></tr>
</table>

（なお、上記表１中の「％」は「Ｗ／Ｗ％」を意味する。以下の表２～表４も同様である。）

Ａ＝間質ノイズ（輝点数（以下同じ））

５００以上＝×

５００未満３００以上＝○

３００未満２００以上＝◎

２００未満＝☆

Ｂ＝1細胞あたりの輝点数

１０未満=×

１０以上=○

Ｃ＝凝集輝点

３個以上＝×

３個以下＝○

［実験例２］

（Ｅ２－３）免疫染色の蛍光標識処理で用いた蛍光ナノ粒子を分散させる溶液に含有されるカゼインの組成を変更した以外は、実施例１と同様の手順で標本作製工程、免疫染色工程および評価工程を行い、間質ノイズ、１細胞あたりの輝点数および凝集輝点数をカウントした。結果を表２～４に示す。なお、天然カゼインにおける各カゼインの含有比率は、α-カゼイン５０％、β-カゼイン３５％、κ-カゼイン１３％、γ-カゼイン２％である。

[0115] [表2]

		カゼイン（天然）			
		1．0%	1．2%	2．4%	3．0%
BSA	1．0%	・間質ノイズ：５００未満３００以上　○ ・１細胞あたりの輝点数：１０以上　○ ・輝点凝集：なし　○			
	3．0%				
	5．0%				

[0116] [表3]

		カゼイン（α－カゼイン：４５%、β－カゼイン：４５%、κ－カゼイン：１０%）			
		1．0%	1．2%	2．4%	3．0%
BSA	1．0%	・間質ノイズ：２００未満　☆ ・１細胞あたりの輝点数：１０以上　○ ・輝点凝集：なし　○			
	3．0%				
	5．0%				

[0117] [表3A]

		カゼイン（α－カゼイン：49.5%、β－カゼイン：49.5%、κ－カゼイン：1.0%）			
		1．0%	1．2%	2．4%	3．0%
BSA	1．0%	・間質ノイズ：２００未満　☆ ・１細胞あたりの輝点数：１０以上　○ ・輝点凝集：なし　○			
	3．0%				
	5．0%				

[0118] [表4]

		カゼイン（α－カゼイン：５０%、β－カゼイン：５０%、κ－カゼイン：０%）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：３００未満２００以上　◎ ・１細胞あたりの輝点数：１０以上　○ ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

（表１の抜粋）

［実験例３］

間質領域の同定は(E1)と同様に、ベンタナＩ－ＶＩＥＷパスウェーＨＥＲ２（４Ｂ５）キットを用いて実施した。その後、抗ＨＥＲ２ウサギモノクローナル抗体「４Ｂ５」に代えて抗ＨＥＲ３ウサギモノクローナル抗体「SP71」Abnova社を用いたこと以外は、(E2)～(E4)同様に染色および評価を実施した。

その結果、実験例2と同様の結果を得た。

[0119] [表5]

		カゼイン（天然）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：５００未満３００以上　○ ・１細胞あたりの輝点数：　５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

[0120] [表6]

		カゼイン（α－カゼイン：４５%、β－カゼイン：４５%、κ－カゼイン：１０%）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：２００未満　☆ ・１細胞あたりの輝点数：５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

[0121] [表7]

		カゼイン（α－カゼイン：４９%、β－カゼイン：４９%、κ－カゼイン：２%）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：２００未満　☆ ・１細胞あたりの輝点数：５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

[0122] [表8]

		カゼイン（α－カゼイン：５０%、β－カゼイン：５０%、κ－カゼイン：０%）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：３００未満２００以上　◎ ・１細胞あたりの輝点数：５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

［実験例４］

肺組織アレイスライド（組織切片を搭載したスライドグラス）を（USBioma

x社　LC241b）購入し、間質細胞領域の形態学的な同定を抗PD-L1ウサギモノクローナル抗体「ＳＰ１４２」 Spring Bioscience（SBS）社を用いたこと以外は(E1)と同様に、実施した。その後、抗ＨＥＲ２ウサギモノクローナル抗体「４Ｂ５」に代えて抗PD-L1ウサギモノクローナル抗体「ＳＰ１４２」 Spring Bioscience（SBS）社を用いたこと、およびストレプトアビジン修飾テキサスレッド色素内包メラミン樹脂粒子に代えて作製例5で作成したストレプトアビジン修飾量子ドット内包メラミン樹脂ナノ粒子を用いた以外は、(E2)～(E4)同様に染色および評価を実施した。なお、(E)においては照射する励起光の波長は、蛍光顕微鏡が備える励起光用光学フィルター（（株）オプトライン製「ＱＤ６５５－Ｃ」）を用いて４１５～４５５ｎｍに設定し、観察する蛍光の波長は、蛍光用光学フィルターを用いて６４８～６６３ｎｍに設定した。

その結果、実験例2と同様の結果を得た。

[0123] [表9]

		カゼイン（天然）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：５００未満３００以上　○ ・１細胞あたりの輝点数：５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

[0124] [表10]

		カゼイン（α－カゼイン：47.5%、β－カゼイン：47.5%、κ－カゼイン：5.0%）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：２００未満　☆ ・１細胞あたりの輝点数：５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

[0125] [表11]

		カゼイン（α－カゼイン：４９%、β－カゼイン：４９%、κ－カゼイン：２%）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：２００未満　☆ ・１細胞あたりの輝点数：５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

[0126] [表12]

		カゼイン（α－カゼイン：５０%、β－カゼイン：５０%、κ－カゼイン：０%）			
		１．０%	１．２%	２．４%	３．０%
BSA	１．０%	・間質ノイズ：３００未満２００以上　◎ ・１細胞あたりの輝点数：５以上 ・輝点凝集：なし　○			
	３．０%				
	５．０%				

［実験例5］

間質細胞領域を同定する(E1)のプロセスを除いたこと以外は、実験例1と同様に実施した。すなわち、乳がん組織アレイスライド（組織切片を搭載したスライドグラス）を（USBiomax社　br243）を購入し、脱パラフィン処理した後、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クエン酸緩衝液中（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。

[0127] (E2)を同様に実施した直後に、形態観察のためのヘマトキシリン染色を追加実施し、(E3)～(E4)は同様に実施した。その結果、1細胞あたりの輝点数は５以上であり、輝点の凝集はないことが確認できた。なお、間質ノイズの測定は実施しなかった。

[0128] ［作製例６］（ビオチン標識ＢＡＣプローブの調製）

ＣｅｌｌＢｉｏｃｈｅｍＢｉｏｐｈｙｓ．２００６；４５（１）５９の記載の方法に従って、以下のように核酸分子を調製した。ＧＳＰ社から購入したＨＥＲ２－ＤＮＡクローン（約１５０ｋｂｐ）１μｇ（５μＬ）に対して、ニックトランスレーション用のキット（製品名「ＧＳＰ－ニックトランスレーションキット」Ｋ－０１５、ＧＳＰ社製）のプロトコールに従い、以下のようにニックトランスレーション法により、ＨＥＲ２のＤＮＡクローン（核酸分子）のｄＴＴＰをビオチン標識ｄＵＴＰで置換した。

[0129] 次に、１５℃で４時間反応させ、７０℃で１０分間加熱して反応を停止させた。反応後の遠心チューブに２５μＬの蒸留水を添加した。ビオチン標識済みのＢＡＣプローブの反応溶液を核酸精製用マイクロスピンカラム（ＧＥヘルスケア社製「ＭｉｃｒｏＳｐｉｎ　Ｓ－２００ＨＲ　Ｃｏｌｕｍｎ」、製品番号「＃２７－５１２０－０１」）により精製した。この溶液に対して、３Ｍ酢酸ナトリウム溶液（ｐＨ５．２）を約５．５６μＬ、１００％エタノールを１５０μＬ添加し、－２０℃で１時間以上静置した。４℃で１６００

０ｒｐｍで１０分間遠心して沈殿を形成した。さらに、７０％エタノールを５００μＬ添加して、４℃、１６０００ｒｐｍで１分間遠心し上澄みを除去した。沈殿物に５～１０μＬの蒸留水を添加して完全に溶解させ、最終濃度１μｇ／２５０μＬのビオチン標識されたＢＡＣプローブの溶液を得た。

[0130] ［実験例6］

ＦＩＳＨによりＨＥＲ２遺伝子のコピー数を測定した。ＦＩＳＨは以下に示すように、脱パラフィン処理、検体スライドの前処理、酵素処理、検体の固定処理、プローブの準備、検体スライドのＤＮＡの変性処理、ハイブリダイゼーション処理、スライドグラスの洗浄処理、およびＤＡＰＩ染色処理をこの順で行うことで実施した。

[0131] 〔脱パラフィン処理〕

ＨＥＲ２陽性染色対照標本の検体スライド（パソロジー研究所社製「ＨＥＲ２－ＦＩＳＨコントロールスライドＣｏｄｅ ＰＳ－０９００６」）を、以下の（１）～（４）の順で処理することで脱パラフィン処理を行った。（１）ヘモディー（Ｈｅｍｏ－Ｄｅ）に常温で１０分間浸漬する。（２）検体スライドを新しいＨｅｍｏ－Ｄｅに常温１０分間浸漬する。同じ操作を３回繰り返す。（３）検体スライドを１００％エタノールで常温で５分間浸漬し、２回洗浄し、脱水処理を行う。（４）検体スライドを風乾または４５～５０℃のスライドウォーマー上で乾燥させる。

[0132] 〔検体スライドの前処理〕

ＤＮＡプローブの到達性を向上させるために、上記検体スライドに対し以下の（１）～（６）の順で前処理を行い、細胞膜及び核膜の蛋白質の除去を行った。（１）検体スライドを０．２ｍｏｌ／Ｌ ＨＣｌで室温、２０分間処理する。（２）検体スライドを精製水に３分間浸漬する。（３）検体スライドを洗浄緩衝液（２ｘＳＳＣ：ｓｔａｎｄａｒｄ ｓａｉｌｉｎｅ ｃｉｔｒａｔｅ）に３分間浸漬する。（４）検体スライドを８０℃の前処理溶液(１Ｎ ＮａＳＣＮ)に３０分間浸漬する。（５）検体スライドを精製水に１分間浸漬する。（６）検体スライドを洗浄緩衝液（２ｘＳＳＣ）に５分間浸漬し、

この浸漬操作を２回繰り返す。

[0133] 〔酵素処理〕

前処理を行った検体スライドに対して、以下の（１）～（４）の処理をこの順で行うことで酵素処理を行った。（１）前処理した検体スライドを取り出し、ペーパータオルにスライドグラスの下端をつけて余分な洗浄緩衝液を取り除く。（２）検体スライドを３７℃に加温したプロテアーゼ溶液に１０～６０分間浸漬する。この浸漬処理は、細胞膜及び核膜のタンパク質、特にコラーゲンの分解をするために、２５ｍｇ プロテアーゼ（２５００－３０００Ｕｎｉｔｓ／ｍｇ）［ペプシン］／１Ｍ ＮａＣｌ［ｐＨ２．０］５０ｍＬで３７℃、６０分間）で処理することが望ましい。（３）検体スライドを洗浄緩衝液に５分間浸漬する。この操作を２回繰り返す。（４）検体スライドを風乾または４５～５０℃のスライドウォーマー上で２～５分間乾燥させる。

[0134] 〔検体の固定〕

検体の固定処理として、前処理を行った検体スライドに対して以下の（１37）～（３）の処理を行った。（１）検体スライドを１０％中性緩衝ホルマリン（和光純薬社製「４％パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液」、製品番号１６３－２０１４５）に常温で１０分間浸漬する。（２）検体スライドを洗浄緩衝液に５分間浸漬する。これと同じ操作を２回繰り返す。（３）検体スライドを風乾または４５～５０℃のスライドウォーマー上で２～５分間乾燥させる。

[0135] 〔プローブの準備〕

冷凍保存しておいた作成例6で作成したＤＮＡプローブの溶液を室温に戻し、正確な容量を採液可能なピペッティング操作ができる程度まで溶液の粘度を十分にさげて、ボルテックスミキサー等で溶液を混和した。

[0136] 〔検体スライドのＤＮＡの変性〕

検体スライド上のＤＮＡの変性処理として、検体の固定処理を行った検体スライドに対して以下の（１）～（８）の処理を行った。（１）検体スライ

ドの作成前に水で湿らせたペーパータオルを底に敷いた湿潤箱（気密性の容器であり、その側面をペーパータオルでテーピングしたもの）を３７℃インキュベータ内に載置して予備加熱する。（２）変性溶液（７０％ ホルムアミド／ＳＳＣ［１５０ｍＭ ＮａＣｌ、１５ｍＭクエン酸ナトリウム］）のｐＨが常温でｐＨ７．０～８．０であることを確かめる。変性溶液をコプリンジャーに入れ、溶液が７２℃±１℃になるまで温浴槽で加温する（７２±１℃の温浴槽に少なくとも３０分間置く）。（３）ハイブリダイゼーション領域がどの部分か分かるように、検体スライドの裏側に領域を囲むようにダイアモンドペン等でマークする。（４）検体スライドを７２±１℃の変性溶液の入ったコプリンジャー中に浸漬し、検体スライドのＤＮＡを変性する。

（５）ピンセットを使って、検体スライドを変性溶液から取り出し、すぐに常温の７０％エタノール中に入れる。ホルムアミドを除くためにスライドを振盪する。検体スライドを１分間浸漬する。（６）検体スライドを７０％エタノールから取り出し、８５％エタノール中に入れ、ホルムアミドを除くためにスライドを振盪する。検体を１分間浸漬する。１００％エタノールで同じ操作を２回繰り返す。（７）ペーパータオルに検体スライドグラスの下端をつけてエタノールを取り除き、ペーパータオルでスライドグラスの裏側を拭く。（８）検体スライドをドライヤーで風乾または４５～５０℃のスライドウォーマーで２～５分間乾燥させる。

[0137] 〔ハイブリダイゼーション〕

上記変性処理を行った検体スライドに対して以下の（１）～（３）の処理をこの順で行うことで、検体スライドに対して上述したように調製したＤＮＡプローブ１０μＬ（１０～５０ｎｇ）を用いてハイブリダイゼーション処理を行った。（１）検体スライドのハイブリダイゼーション領域に調製した上記ＤＮＡプローブを１０μＬ添加し、すぐに、２２ｍｍ×２２ｍｍのカバーグラスをプローブの上に被せ均一にプローブを広げる。ハイブリダイゼーション領域に気泡が入らないようにする。（２）ペーパーボンドでカバーグラスをシールする。（３）前もって加温した湿潤箱に検体スライドを入れて

蓋をして３７℃のインキュベータで１４～１８時間ハイブリダイゼーションを行う。

[0138] 〔スライドグラスの洗浄〕

上記ハイブリダイゼーション処理を行った検体スライドに対して以下の（１）～（６）の処理をこの順で行うことで、検体スライドの洗浄処理を行った。（１）ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液（２×ＳＳＣ／０．３％ＮＰ－４０）をコプリンジャーに入れる。ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液が７２℃±１℃になるまで温浴槽で予備加熱をする（７２℃±１℃の温浴槽に少なくとも３０分間置く）。（２）ポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液を入れたコプリンジャーをもうひとつ用意し、常温に維持する。（３）ピンセットでペーパーボンドのシールを取り除く。（４）検体スライドをポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液の中に入れる。カバーグラスは自然に溶液中で剥がれるのを待つ。（５）溶液から検体スライドを取り出し、余分な溶液を取り去り、７２±１℃に加温したポストハイブリダイゼーション洗浄緩衝液に２分間浸す。ここで、７３℃を超える温度や処理時間として２分を超えないようにするのが望ましい。（６）コプリンジャーから検体スライドを取り出し、遮光下（締め切った引出や締め切ったキャビネットの棚等）で風乾する。

[0139] （プローブの蛍光標識処理）

ＨＥＲ２遺伝子に結合しビオチンで標識されたＤＮＡプローブに対して、作製例３のストレプトアビジン結合蛍光物質内包メラミンナノ粒子を以下の通りに結合させた。

[0140] 上記作製例3で作成された上記粒子を、希釈液で希釈して0.02ｎＭとし、１００μＬ検体スライド上に滴下し、室温で６０分間結合反応を行った。ＰＢＳで５分間浸漬し、３回洗浄を行った。なお、上記希釈液として1%BSAを用いた場合と、カゼイン（組成＝α‐カゼイン（シグマ社　ｃ６７８０）：５０％、β‐カゼイン（シグマ社　ｃ６９０５）：５０％）とＢＳＡの混合物の場合を比較した。

[0141] （ＤＡＰＩ染色）

ＤＡＰＩ染色は以下のように行った。まず、１０μＬのＤＡＰＩ対比染色液を検体スライドのハイブリダイゼーション領域に添加した。次に、ハイブリダイゼーション処理した後、細胞数をカウントするためにＤＡＰＩ染色（２μｇ／ｍＬＰＢＳ）を２５℃、１０分間行うことで細胞核を染色し、カバーガラスを被せて、シグナルの計測まで検体スライドを遮光して保存した。ＤＡＰＩ（４’，６－Ｄｉａｍｉｄｉｎｏ－２－Ｐｈｅｎｙｌｉｎｄｏｌｅ，Ｄｉｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ）はＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅｓ社（Ｄ１３０６）を使用した。

[0142] （観察）

上述のようにＦＩＳＨを行った検体スライドを以下のように観察した。

[0143] 〈蛍光顕微鏡観察〉

蛍光顕微鏡観察は、上述のようにＦＩＳＨを行った切片を、蛍光顕微鏡Ｚｅｉｓｓ ｉｍａｇｅｒ（Ｃａｍｅｒａ：ＭＲｍモノクロ・冷却機能付、対物レンズ×６０油浸）を用いて、蛍光顕微鏡観察（６００倍）を行い、蛍光画像（蛍光静止画像）および輝点数の計測を行った。

[0144] その結果、粒子希釈液として1%BSAを用いた場合に比較して、カゼイン（組成＝α‐カゼイン（シグマ社 ｃ６７８０）：５０%、β‐カゼイン（シグマ社 ｃ６９０５）：５０%）混合物２．４%とＢＳＡ１～５%の混合液を用いた場合は、輝点数（ＨＥＲ２ ３＋領域（すなわち癌細胞領域）の１細胞あたりの輝点数））が倍増した。

請求の範囲

[請求項1] 蛍光ナノ粒子を用いた免疫染色を行う際に使用する、分子量４０，０００以上のタンパク質を１～５％（Ｗ／Ｗ）含有し、かつ分子量４０，０００未満のタンパク質を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有している蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項2] 前記分子量４０，０００以上のタンパク質がＢＳＡである、請求項１に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項3] 前記分子量４０，０００未満のタンパク質がカゼインである、請求項１または２に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項4] 前記カゼイン内のκ－カゼイン比率が０～１０％（Ｗ／Ｗ）である、請求項３に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項5] 前記カゼインが含有するα－カゼイン：β－カゼインの比率が４０：６０～６０：４０（α－カゼインおよびβ－カゼインの合計量を１００とする。）である、請求項３または４に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項6] （ｉ）請求項１～５のいずれか一項に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液、および（ｉｉ）蛍光ナノ粒子を含有する免疫染色用試薬を含む、蛍光免疫染色用キット。

[請求項7] 請求項１～５のいずれか一項に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液および蛍光ナノ粒子を含有する蛍光免疫染色用溶液。

[請求項8] 請求項７の蛍光免疫染色用溶液を使用した免疫染色工程を含む蛍光免疫染色法。

[請求項9] 上記免疫染色工程が、

目的生体物質に対して一次抗体を特異的に結合させる１次反応処理、

一次抗体に対し、ビオチンが結合した二次抗体を特異的に結合させる２次反応処理、

請求項１～５に記載された蛍光ナノ粒子用希釈液により、アビジン

が結合した蛍光ナノ粒子を希釈し、該希釈後の溶液でもって２次抗体を蛍光標識する処理、

を順に行う工程を含む、請求項８に記載の蛍光免疫染色法。

[請求項10] 蛍光ナノ粒子を用いた遺伝子染色法を行う際に使用する、分子量４０，０００以上のタンパク質を１～５％（Ｗ／Ｗ）含有し、かつ分子量４０，０００未満のタンパク質を１～３％（Ｗ／Ｗ）含有している蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項11] 前記分子量４０，０００以上のタンパク質がＢＳＡである、請求項１０に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項12] 前記分子量４０，０００未満のタンパク質がカゼインである、請求項１０または１１に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項13] 前記カゼイン内のκ－カゼイン含有比率が１０％（Ｗ／Ｗ）以下である、請求項１２に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項14] 前記カゼインが含有するα－カゼイン：β－カゼインの比率が４０：６０～６０：４０（α－カゼインおよびβ－カゼインの合計量を１００とする。）である、請求項１２または１３に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液。

[請求項15] （ｉ）請求項１０～１４のいずれか一項に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液、および（ｉｉ）蛍光ナノ粒子を含有する遺伝子染色用試薬を含む、遺伝子染色用キット。

[請求項16] 請求項１０～１４のいずれか一項に記載の蛍光ナノ粒子用希釈液と、プローブと、該プローブに結合可能または結合した蛍光ナノ粒子と、を含有する遺伝子染色用溶液。

[請求項17] 請求項１６の遺伝子染色用溶液を使用した遺伝子染色工程を含む遺伝子染色法。

[請求項18] 上記遺伝子染色工程が、

検出対象の遺伝子に対して、第１結合基分子を有するプローブを特異的に結合させる１次反応処理、

請求項１０～１４に記載された蛍光ナノ粒子用希釈液により、第１結合基分子と特異的に結合する第２結合基分子が結合した蛍光ナノ粒子を希釈し、希釈された溶液でもって、検出対象の遺伝子に特異的に結合したプローブを蛍光標識する２次反応処理、
を順に行う工程を含む、請求項１７に記載の遺伝子染色法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/084500

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/53(2006.01)i, *G01N21/64*(2006.01)i, *G01N33/48*(2006.01)i, *G01N33/536*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/53, G01N21/64, G01N33/48, G01N33/536

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2012-194013 A (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 11 October 2012 (11.10.2012), paragraphs [0014], [0032] (Family: none)	1-8 9-18
Y	WO 2012/029342 A1 (Konica Minolta, Inc.), 08 March 2012 (08.03.2012), paragraph [0045] & US 2013/0157895 A1 paragraphs [0080] to [0083] & US 2015/0160103 A1 & EP 2613145 A1	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 February 2016 (05.02.16)	16 February 2016 (16.02.16)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/084500

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 8-320323 A (Kabushiki Kaisha Yuka Mediasu), 03 December 1996 (03.12.1996), paragraph [0011] & US 5763161 A column 3, lines 21 to 33	1-18
Y	JP 2014-142348 A (Konica Minolta, Inc.), 07 August 2014 (07.08.2014), paragraph [0054] & US 2014/0186857 A1 paragraph [0061] & US 2014/0220598 A1 & WO 2013/035703 A1 & EP 2755019 A1 & EP 2757378 A2	9,18
Y	WO 2014/136885 A1 (Konica Minolta, Inc.), 12 September 2014 (12.09.2014), paragraph [0088] (Family: none)	10-18
A	JP 9-196922 A (Shino-Test Corp.), 31 July 1997 (31.07.1997), paragraph [0059] (Family: none)	1-18
A	JP 2006-53031 A (Kagoshima University), 23 February 2006 (23.02.2006), claim 8; paragraphs [0030], [0031], [0057], [0058], [0059], [0062], [0064], [0114] (Family: none)	1-18
A	JP 2014-66720 A (Toshiba Corp.), 17 April 2014 (17.04.2014), paragraph [0080] & US 2009/0124024 A1 paragraph [0153] & US 2012/0213669 A1 & US 2014/0105789 A1 & CN 101451995 A	1-18
A	JP 2013-88296 A (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 13 May 2013 (13.05.2013), paragraph [0072](8) (Family: none)	1-18
A	JP 2002-202312 A (Tokuyama Corp.), 19 July 2002 (19.07.2002), (Family: none)	1-18

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０８４５００

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/536(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　G01N33/53, G01N21/64, G01N33/48, G01N33/536

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１６年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１６年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１６年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 2012-194013 A（コニカミノルタエムジー株式会社）2012.10.11, ［００１４］［００３２］（ファミリーなし）	1-8 9-18
Y	WO 2012/029342 A1（コニカミノルタ株式会社）2012.03.08, ［００４５］ & US 2013/0157895 A1[0080]-[0083] & US 2015/0160103 A1 & EP 2613145 A1	1-18
Y	JP 8-320323 A（株式会社ユカ・メディアス）1996.12.03, ［００１１］ & US 5763161 A Col.3 line21-33	1-18

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０５．０２．２０１６	１６．０２．２０１６

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
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）　２Ｊ　３３１２
三木　隆
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３２５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2014-142348 A（コニカミノルタ株式会社）2014.08.07,［００５４］ & US 2014/0186857 A1 [0061] & US 2014/0220598 A1 & WO 2013/035703 A1 & EP 2755019 A1 & EP 2757378 A2	9,18
Y	WO 2014/136885 A1（コニカミノルタ株式会社）2014.09.12,［００８８］（ファミリーなし）	10-18
A	JP 9-196922 A（株式会社シノテスト）1997.07.31,［００５９］（ファミリーなし）	1-18
A	JP 2006-53031 A（国立大学法人　鹿児島大学）2006.02.23,［請求項８］［００３０］［００３１］［００５７］［００５８］［００５９］［００６２］［００６４］［０１１４］（ファミリーなし）	1-18
A	JP 2014-66720 A（株式会社東芝）2014.04.17,［００８０］ & US 2009/0124024 A1 [0153] & US 2012/0213669 A1 & US 2014/0105789 A1 & CN 101451995 A	1-18
A	JP 2013-88296 A（コニカミノルタエムジー株式会社）2013.05.13,［００７２］（８）（ファミリーなし）	1-18
A	JP 2002-202312 A（株式会社トクヤマ）2002.07.19,（ファミリーなし）	1-18