

(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  
2014年9月12日(12.09.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/136885 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/055798
- (22) 国際出願日: 2014年3月6日(06.03.2014)
- (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 2013-047257 2013年3月8日(08.03.2013) 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: 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). 中野 寧(NAKANO, Yasushi); 〒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). 磯田 武寿(ISODA, Takeshi); 〒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). 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).
- (74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (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, LT, 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, 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))

(54) Title: STAINING AGENT FOR STAINING TISSUE, PRODUCTION METHOD FOR STAINING AGENT FOR STAINING TISSUE, AND TISSUE STAINING KIT INCLUDING STAINING AGENT FOR STAINING TISSUE

(54) 発明の名称: 組織染色用染色剤、組織染色用染色剤の製造方法および組織染色用染色剤を含む組織染色用キット

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a staining agent for staining tissue, that improves fluorescent signal determination precision; and a tissue staining kit. Provided is a staining agent for staining tissue, containing, as a staining component, pigment resin particles comprising resin particles of a heat-curable resin and fluorescent pigments fixed to the resin particles. The resin particles have a substituent group having the opposite charge to the fluorescent pigments and have an ionic bond or a covalent bond with the fluorescent pigments. The coefficient of variation for the particle diameter of the pigment resin particles is no more than 15%.

(57) 要約: 本発明は、蛍光シグナルの判定精度を向上させた組織染色用染色剤およびこれを含む組織染色用キットを提供することを課題とする。熱硬化性樹脂の樹脂粒子および該樹脂粒子に固定された蛍光色素からなる色素樹脂粒子を染色成分として含有する組織染色用染色剤であって、前記樹脂粒子が前記蛍光色素と逆の電荷の置換基を有して前記蛍光色素とイオン結合、または、共有結合しており、前記色素樹脂粒子の粒径の変動係数が15%以下とする。



WO 2014/136885 A1

## 明 細 書

発明の名称：

組織染色用染色剤、組織染色用染色剤の製造方法および組織染色用染色剤を含む組織染色用キット

### 技術分野

[0001] 本発明は、組織染色用染色剤、組織染色用染色剤の製造方法および組織染色用染色剤を含む組織染色用キットに関する。

### 背景技術

[0002] 医学的診断の1つとして、病理診断が行なわれている。病理診断では、病理医は人体から採取した組織片から病気を診断し、治療や手術の要否を臨床医に伝える。患者の状態と病理診断によって、内科系医師は薬物治療方針を決定し、外科系医師は手術を行うか否かを決定する。

[0003] 病理診断では、臓器摘出や針生検によって得た組織検体を厚さ数ミクロン程度に薄切して組織標本を作成し、様々な所見を得るために光学顕微鏡を用いて拡大観察することが広く行われている。多くの場合、組織標本は、採取した組織を固定するために脱水し、パラフィンブロック化した後、数 $\mu\text{m}$ の厚さに薄切りし、パラフィンを取り除いて作製される。

[0004] 病理診断では、免疫染色と呼ばれる、組織標本に含まれる検出対象の抗原や遺伝子の発現を確認するための染色を行なった後、遺伝子やタンパクの発現異常といった機能異常を診断する免疫観察が行なわれている。

[0005] 免疫染色には、例えば、酵素を用いた色素染色法（DAB染色等）が用いられる（特許文献1）。DAB染色は、ペルオキシダーゼで修飾された抗体を用いて観察対象となる抗原を当該発色により染色し、ペルオキシダーゼの基質であるジアミノベンジジン（DAB）を添加して発色させ、これを観察することで抗原量を測るものである。

[0006] しかしながら、DAB染色のような酵素による染色は、染色濃度が温度・時間などの環境条件により大きく左右されるため、染色濃度から実際の抗原

等の量を見積もることが難しいという課題がある。

- [0007] そのため、病理診断における免疫観察では、酵素標識による染色の代わりに、蛍光標識体を用いる蛍光標識法が行われている。この方法はD A B染色と比べて定量性に優れるという特徴がある（非特許文献1）。蛍光色素が修飾された抗体を用いて対象となる抗原を染色して観察することで抗原量を測るものである。
- [0008] なお、組織標本は、殆ど光を吸収および散乱せず、無色透明に近い場合、観察に先立って、形態観察のために色素による染色を施されることがある。染色手法としては種々のものが提案されている。特に組織標本に関しては、形態を観察するための形態観察染色として、ヘマトキシリンおよびエオジンの2つの色素を用いるヘマトキシリン・エオジン染色（H E染色）が標準的に用いられている（非特許文献1）。
- [0009] 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。
- [0010] 病理医は、染色された組織標本の顕微鏡画像の中で、細胞の核の大きさや形の変化、組織としてのパターンの変化などの形態学的な情報および染色情報をもとに診断を行っている。なお、この他の形態観察染色としては、例えば、細胞診断に用いられるパパニコロウ染色（P a p染色）等がある。一つの切片に対して形態染色と免疫染色の両方を行なうことにより、標本の形態観察と免疫観察を同時に行うこともできる。
- [0011] 組織標本の作製において、染色後の病理切片を封入するための封入剤としては、水系封入剤および油系封入剤が知られている。水系封入剤は一般に標本との屈折率差が大きいため、組織標本を透明にしにくいという課題がある。一方、油系封入剤は、組織標本との屈折率差が小さく、組織標本を透明にすることができる上に、形態染色の色味や発色が良いため、永久標本用として用いられている。このため、油系封入剤が組織標本作成に好適に用いられる。

[0012] 蛍光標識法で用いられる組織染色用染色剤として、蛍光物質が固定され蛍光色素標識法に用いられる樹脂粒子（以下、色素樹脂粒子という。）を含むものが知られている。この染色剤を用いて組織標本である切片を免疫染色および蛍光顕微鏡による観察をして抗原の定量を行う場合、色素樹脂粒子の吸着量は色素樹脂粒子由来の輝点数により評価することができる。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0013] 特許文献1：特開2010-134195号公報

### 非特許文献

[0014] 非特許文献1：Robbins Basic Pathology: With STUDENT CONSULT Online Access, 9e (Robbins Pathology) Saunders, (2012)

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0015] 色素樹脂粒子由来の輝点数を評価する際に、輝点強度にバラツキが生じると、蛍光シグナルの判定精度が悪化する。本発明者らは、輝点のバラツキの原因について鋭意検討した結果、色素樹脂粒子の粒子径のバラツキが蛍光シグナルの判定精度を悪化させることを見出した。

[0016] 具体的には、色素樹脂粒子の粒子径の大小により色素樹脂粒子の輝度が変化するため、例えば設定した蛍光シグナル検出閾値未満の輝度の粒子径となる色素樹脂粒子が存在する場合、本来検出すべき蛍光シグナルが検出されない問題が発生する。

[0017] 逆に、設定した蛍光シグナル検出閾値をはるかに超える輝度となる粒子径となる色素樹脂粒子が存在する場合、サチレーションにより輝点同士が融合して個々の輝点の判別がつかなくなる問題が発生する。

[0018] また、永久切片を作成する際に（図2参照）、切片の水分をエタノール・キシレンで置換する透徹を行うため、透徹によっても蛍光色素の溶出の問題が発生する。例えば、蛍光色素を内包する電荷を有しないポリスチレン粒子

を色素樹脂粒子として含む染色剤を用いて染色した切片を透徹すると、蛍光色素が滲み出て、輝点の観察が困難となって蛍光シグナルの判定精度が悪化する問題が存在する。特に、化学構造中にベンゼン環を含む蛍光色素の場合、永久切片の作成に使用される油系封入剤に蛍光色素が滲み出やすいため、蛍光シグナルの判定精度を悪化させる問題がある。

[0019] 本発明は、上記問題に鑑みてなされたものであって、蛍光シグナルの判定精度を向上させた組織染色用染色剤、及び該組織染色用染色剤の製造方法およびこれを含む組織染色用キットの提供をすることを課題とする。

### 課題を解決するための手段

[0020] すなわち、上述した目的のうち、少なくとも一つを実現するために、本発明の一側面を反映した組織染色用染色剤は、熱硬化性樹脂の樹脂粒子および該樹脂粒子に固定された蛍光色素を有する色素樹脂粒子を染色成分として含有する組織染色用染色剤であって、前記樹脂粒子が前記蛍光色素と逆の電荷の置換基を有して前記蛍光色素とイオン結合、または、共有結合しており、前記色素樹脂粒子の粒径の変動係数が15%以下である。

[0021] また、本発明の一側面を反映した組織染色用染色剤の製造方法は、前記樹脂粒子を合成反応により製造する際の反応系に界面活性剤を添加することにより前記色素樹脂粒子の変動係数を15%以下とする工程を含む。

[0022] また、本発明の一側面を反映した組織染色用キットは、上記のいずれかの組織染色用染色剤を構成成分として含む。

### 発明の効果

[0023] 本発明によれば、色素樹脂粒子の粒径の変動係数が15%以下であることにより、上記輝点のバラツキの問題が解消される。また、蛍光色素と熱可塑性樹脂とがイオン結合または共有結合をすることで蛍光観察時の蛍光色素の滲みが防止される。これらの結果、蛍光シグナルの判定精度が改善された組織染色用染色剤、該組織染色用染色剤の製造方法および組織染色用染色剤を含む組織染色用キットを提供することができる。

### 図面の簡単な説明

[0024] [図1]図1は、本発明に係る色素樹脂粒子を含む組織染色用染色剤により、組織標本の切片を免疫染色した状態を示す模式図であり、色素樹脂粒子の樹脂粒子と色素との結合状態を説明する図である。

[図2]図2は、染色、透徹および封入を行って、図1の切片を作製する流れを示す図である。

[図3] (A)は、従来の組織染色用染色剤を用いて、組織標本の切片の細胞を免疫染色して蛍光観察をした状態を示す模式図である。(B)は、本発明に係る組織染色用染色剤を用いて、組織標本の切片の細胞を免疫染色して蛍光観察をした状態を示す模式図である。

[図4] (A)は、比較例に係る色素樹脂粒子で標識した2次抗体で染色した写真である。(B)は、実施例に係る色素樹脂粒子で標識した2次抗体で染色した写真である。

### 発明を実施するための形態

[0025] 以下、本発明に係る組織染色用染色剤、組織染色用染色剤の製造方法および組織染色用染色剤を含む組織染色用キットについて、図1～図4を参照しながら説明する。

[0026] 本発明に係る組織染色用染色剤は、熱硬化性樹脂の樹脂粒子および該樹脂粒子に固定された蛍光色素を有する色素樹脂粒子を染色成分として含有する組織染色用染色剤であって、前記色素樹脂粒子の粒径の変動係数が15%以下である。

[0027] 前記組織染色用染色剤において、前記蛍光色素が前記樹脂粒子に内包されていてもよい。また、前記イオン結合に寄与している置換基が、前記蛍光色素はマイナス電荷の置換基であり、前記樹脂粒子はプラス電荷の置換基であってもよい。

[0028] さらに、前記蛍光色素全体の電荷および前記樹脂粒子全体の電荷が、前記イオン結合に寄与している置換基の電荷と同一の電荷であってもよい。また、前記蛍光色素は、蛍光色素1分子の分子量/電荷を有する置換基数 $< 400$ であってもよい。

- [0029] また、前記蛍光色素は、蛍光色素1分子あたりにマイナス電荷の置換基を少なくとも2つ有していてもよい。また、前記プラス電荷の置換基がアミノ基であり、前記マイナス電荷の置換基がスルホ基またはカルボキシル基であってもよい。
- [0030] 前記蛍光色素のマイナス電荷の置換基の少なくとも1つがスルホ基であってもよい。また、前記蛍光色素が、ローダミン、BODIPY、スクアリリウムまたは芳香族炭化水素系色素分子であってもよい。
- [0031] 前記樹脂粒子がメラミンを用いて形成され、前記蛍光色素がローダミンまたは芳香族炭化水素系色素分子であってもよい。また、前記樹脂粒子と前記蛍光色素とが、アミド結合、エステル結合、エーテル結合およびC-N結合のいずれかによって共有結合していてもよい。
- [0032] 前記熱硬化性樹脂が、メラミン、尿素、グアナミン、フェノールおよびキシレンからなる群から選択された少なくとも1つのモノマーから形成される構成単位を含んでいてもよい。
- [0033] 本発明に係る組織染色用染色剤の製造方法は、前記樹脂粒子を合成反応により製造する際の反応系に界面活性剤を添加することにより前記色素樹脂粒子の変動係数を15%以下とする工程を含む。
- [0034] 本発明に係る組織染色用キットは、上述したいずれかの組織染色用染色剤を構成品として含む。
- [0035] <色素樹脂粒子>
- この色素樹脂粒子は、図1に示すように、樹脂粒子と蛍光色素とがイオン結合または共有結合したものである。前者の例は、樹脂粒子を構成する樹脂が有するアミノ基に対してプロトンが付加したアンモニウム基と、蛍光色素が有するスルホ基がイオン結合して、色素樹脂粒子を構成しているものである（図1の左側矩形内の破線参照）。一方、後者の例は、樹脂粒子を構成するモノマー由来の部分が有するアミノ基と、蛍光色素が有するスルホ基とが共有結合して、色素樹脂粒子を構成しているものである（図1の右側矩形内の破線参照）。

[0036] 樹脂粒子と蛍光色素との各結合は、樹脂粒子の内部および／または外表面と色素分子との間で行われる。図1に示す例は、それぞれイオン結合または共有結合により色素を内包および／または外表面に固定している例を示している（表面固定については図示省略）。ここで、樹脂粒子と蛍光色素との結合は、イオン結合と共有結合との双方を含むものであってもよい。

[0037] また、樹脂粒子に内包および／または表面固定させる蛍光色素は、樹脂粒子に対して、後述する蛍光色素のいずれか一種を単独で固定しても、複数種を混合して固定させるようにしてもよい。例えば、励起波長と発光波長とにおいて、それぞれ相互に異なる2種以上の蛍光色素を含ませてもよい。

[0038] また、樹脂粒子に蛍光色素を固定する方法は、特に限定されるものではない。樹脂粒子の原料であるモノマーやオリゴマーに蛍光色素分子をイオン結合および／または共有結合させて、これを重合することにより色素樹脂粒子を合成する方法、製造した樹脂粒子に対して色素を吸着させて導入する方法等、樹脂粒子への蛍光色素の導入にはいかなる方法を用いても構わない。

[0039] 色素樹脂粒子の平均粒径は、特に限定されないが、通常10～500nmであり、好ましくは、50～200nmである。

[0040] また、色素樹脂粒子を免疫染色に用いる場合、図1に示すように、例えば、樹脂粒子に対してストレプトアビジンまたはビオチン等のリンカーの一方を付加して、2次抗体にリンカーの他方を付加することにより、免疫染色に用いる構成としてもよい。

[0041] <熱硬化性樹脂>

本発明に係る色素樹脂粒子を構成する熱硬化性樹脂は、蛍光色素を上述したイオン結合および／または共有結合により固定することができる熱硬化性樹脂を含むものであれば、特に限定されない。

[0042] 蛍光色素とのイオン結合に用いられる熱硬化性樹脂は、その構成単位に含まれる水素の少なくとも一部が電荷を有する置換基に置き換えられているか、その化学構造の一部に電荷を有する部分が存在するものである。一方、蛍光色素との共有結合に用いられる熱硬化性樹脂は、上記電荷を有する置換基

の有無に関係なく、化学構造の一部に色素と共有結合可能な部位があり、ここを利用して色素と共有結合していればよい。なお、「電荷を有する置換基または部分」とは、水または酸性または塩基性の水に溶解させたときにプラスまたはマイナスに帯電する置換基または化学構造上の部分を意味する。

[0043] 上記熱硬化性樹脂としては、メラミン、尿素、グアナミン、フェノール、キシレン、およびこれらの誘導体からなる群から選択された少なくとも1つのモノマーから形成される構成単位を含む熱硬化性樹脂を好適に用いることができる。

[0044] このうち、メラミン、尿素およびグアナミンは、プラス電荷の置換基としてアミノ基を構造の一部に有するモノマーである。フェノールは、マイナス電荷の置換基としてフェノール性水酸基を構造の一部に有するモノマーである。キシレンは、電荷を有する置換基や部分のないモノマーであるので、それらが有する水素の一部をプラス電荷またはマイナス電荷の置換基に置換して蛍光色素とのイオン結合に用いることができる。

[0045] これらの熱硬化性樹脂は、電荷を有する置換基ないし部位を含むモノマー、または、蛍光色素が有する官能基と共有結合を生じる反応性基を有する熱硬化性樹脂のモノマーを、公知の重合法により重合させることで製造することができる。

[0046] メラミンのように、最初から電荷を有する置換基が構造に含まれているものであれば、置換基を導入する必要がなく、好適に用いることができる。

[0047] 熱硬化性樹脂のモノマーが有するマイナス電荷の置換基としては、スルホ基 ( $-SO_3^-$ )、カルボキシル基 ( $-COO^-$ ) 等を例示できる。また、熱硬化性樹脂のモノマーが有するプラス電荷の置換基としては、アンモニウム基 ( $-NR_3^+$ ) を挙げることができる。ここでRは水素またはアルキル基である。

[0048] 熱硬化性樹脂のモノマー等に電荷を有する置換基を導入する方法としては、例えば、カルボキシル基の導入については、フリーデルクラフツ反応により直接導入してもよく、あるいは、カルボキシル基を持ったアルキル化合物とモノマーをハロゲン化物とボロン酸に変換して鈴木カップリング反応によ

って結合して導入してもよく、あるいは、カルボキシル基を持ったアルキル化合物とモノマーをハロゲン化物に変換してグリニャール反応等のカップリング反応で結合して導入してもよい。

[0049] スルホ基の導入については、モノマーを発煙硫酸やクロロ硫酸により直接スルホン化してもよく、あるいはスルホ基を持ったアルキル化合物とモノマーをハロゲン化物とボロン酸に変換して鈴木カップリング反応によって導入してもよく、あるいはスルホ基を持ったアルキル化合物とモノマーをハロゲン化物に変換してグリニャール反応等のカップリング反応で結合して導入してもよい。

[0050] アミノ基の導入については、発煙硝酸によるニトロ化とニトロ基の還元反応によってアミノ基に変換してもよく、あるいはモノマーをハロゲン化の形に導きアンモニアとの直接反応やGabriel反応によってアミノ化してもよく、あるいはアミノ基を持ったアルキル化合物とモノマーをハロゲン化物とボロン酸に変換して鈴木カップリング反応によって結合して導入してもよく、あるいはカルボキシル基を持ったアルキル化合物とモノマーをハロゲン化物に変換してグリニャール反応等のカップリング反応で結合して導入してもよい。

[0051] 上記反応の際には適宜保護基を導入し、保護されたカルボキシル基やスルホ基、アミノ基としてモノマーに導入後、脱保護を行なって、カルボキシル基やスルホ基、アミノ基としてもよい。

[0052] 熱硬化性樹脂の分子構造は三次元的な網目構造であり、高分子同士が架橋することによって作られる。このため、熱硬化性樹脂の樹脂粒子に内包された蛍光色素は樹脂粒子の外側に溶出しにくく、蛍光観察の際に輝点の滲みを抑制する効果が得られる。

[0053] 熱硬化性樹脂は、ホモポリマーに限定されず、コポリマーであってもよい。具体的には、上記のポリメラミン等を構成する複数種のモノマーまたはオリゴマーを組み合わせて共重合させたコポリマーや、これらのモノマーまたはオリゴマーと、それ以外種類のモノマーまたはオリゴマーとを共重合させ

たコポリマーであってもよい。

[0054] <蛍光色素>

本発明で用いることが可能な蛍光色素としては、既存のいかなるものを用いても構わない。ただし、熱硬化性樹脂の合成反応の加熱条件下であっても該加熱により悪影響を受けない蛍光色素を用いることが望ましい。蛍光色素は、公知の方法により入手または作製することができる。

[0055] 樹脂粒子と蛍光色素とをイオン結合させる場合、図1の左側の矩形内に示すように、樹脂材料のモノマーまたはオリゴマーと蛍光色素とは反対の電荷を有していることが好ましい。これにより、樹脂材料を熱硬化させる前の段階で、樹脂材料と色素分子とがイオン結合して会合し、蛍光色素を樹脂粒子に内包させやすくすることができる。

[0056] 樹脂粒子と蛍光色素とが会合することにより、蛍光色素の分子が樹脂粒子に固定されるので、樹脂粒子からの色素の溶出が起こり難くなる。同じ会合様式で樹脂粒子と色素を固定する場合、会合部位が多い程、色素と樹脂の固定が強くなるので、色素の溶出は起こり難くなる。このため、蛍光色素は、2以上の置換基を有していることが好ましい。

[0057] また、蛍光色素が隣接する樹脂と樹脂との置換基の間に入り込んで、両者をつなぐ架橋剤のように機能して、樹脂構成単位同士の結合が強固となり、また、樹脂粒子と蛍光色素との結合も強固となるため、色素と樹脂の会合物の溶出も起こり難くなる。さらに、蛍光色素の分子が安定し蛍光色素の耐熱性がさらに上昇するため、熱硬化により重合反応させて樹脂粒子を形成する際に、蛍光色素が熱による悪影響をより受けにくいものとなり、樹脂粒子から蛍光色素が溶出しにくいものとなる。

[0058] 樹脂粒子と蛍光色素とを共有結合させる場合も、上述と同様の理由から蛍光色素が2つ以上の反応基を有していることが好ましい。

[0059] 蛍光色素としては、例えば、ローダミン系色素分子、BODIPY（登録商標、インビトロジェン社製）、スクアリリウム系色素分子、芳香族炭化水素系色素分子等の各系統の色素分子の中から選択することができる。

[0060] このうち、芳香環系色素分子（芳香族炭化水素系色素分子）、ローダミン系色素分子などの蛍光色素は、比較的耐光性が高いため好ましく、なかでも芳香環系色素分子に属するペリレン（perylene）やピレン（Pyrene）、ペリレンジイミド（perylene diimide）が好ましい。さらにローダミン系色素やペリレンジイミドは量子収率や吸光等が優れており、発光効率が優れるため、これらを内包した樹脂粒子は、他の色素を内包した樹脂粒子と比べて発光強度が優れる。

[0061] ローダミン系色素分子の具体例としては、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、5,6-ジカルボキシローダミン、ローダミン 6G、テトラメチルローダミン、X-ローダミン、テキサスレッド、Spectrum Red、LD700 PERCHLORATE、それらの誘導体などが挙げられる。

[0062] BODIPY系色素分子の具体例としては、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）、それらの誘導体などが挙げられる。

[0063] スクアリリウム系色素分子の具体例としては、SRfluor 680-Carboxylate、1,3-Bis[4-(dimethylamino)-2-hydroxyphenyl]-2,4-dihydroxycyclobutenediylum dihydroxide、bis、1,3-Bis[4-(dimethylamino)phenyl]-2,4-dihydroxycyclobutenediylum dihydroxide、bis、2-(4-(Diethylamino)-2-hydroxyphenyl)-4-(4-(diethylimino)-2-hydroxycyclohexa-2,5-dienylidene)-3-oxocyclobut-1-enolate、2-(

4-(Dibutylamino)-2-hydroxyphenyl)-  
 4-(4-(dibutyliminio)-2-hydroxycyclohexa-2,5-dienylidene)-3-oxocyclobut-1-enolate、2-(8-Hydroxy-1,1,7,7-tetramethyl-1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)-4-(8-hydroxy-1,1,7,7-tetramethyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-pyrido[3,2,1-ij]quinolinium-9(5H)-ylidene)-3-oxocyclobut-1-enolate、それらの誘導体などが挙げられる。

[0064] 芳香族炭化水素系色素分子の具体例としては、N,N-Bis-(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-(4-tert-butylphenoxy)-perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide、N,N'-Bis(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-tetraphenoxyperylene-3,4:9,10-tetracarboxylic diimide、N,N'-Bis(2,6-diisopropylphenyl)perylene-3,4,9,10-bis(dicarbimide)、16、N,N'-Bis(2,6-dimethylphenyl)perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide、4,4'-[(8,16-Dihydro-8,16-dioxodibenzo[a,j]perylene-2,10-diyl)dioxy]dibutyric acid、2,10-Dihydroxydibenzo[a,j]perylene-8,16-dione、2,10-Bis(3-aminopropoxy)dibenzo[a,j]perylene-8,16-dione、3,3'-[(8,16-Dihydro-8,16-dioxodibenzo[a,j]perylene-2,10-diyl)dioxy]dipropylamine、17-BIS(Octyl

oxy) Anthra [9, 1, 2-cde-] Benzo [RST] Pentaphene-5-10-Dione、Octadecanoic acid, 5, 10-dihydro-5,10-dioxoanthra[9, 1, 2-cde]benzo[rst]pentaphene-16,17-diylester、Dihydroxydibenzanthrone、Benzenesulfonic acid, 4, 4', 4'', 4'''-[[2, 9-bis[2, 6-bis(1-methylethyl)phenyl]-1, 2,3,8,9,10-hexahydro-1,3,8,10-tetraoxoanthra[2, 1, 9-def:6, 5, 10-d'e'f']diisoquinoline-5, 6, 12, 13-tetrayl]tetrakis(oxy)]tetrakis-, Benzeneethanaminium、4, 4', 4'', 4'''-[[2, 9-bis[2, 6-bis(1-methylethyl)phenyl]-1, 2,3,8,9,10-hexahydro-1,3,8,10-tetraoxoanthra[2, 1, 9-def:6, 5, 10-d'e'f']diisoquinoline-5, 6, 12, 13-tetrayl]tetrakis(oxy)]tetrakis[N,N,N-trimethyl-]、それらの誘導体などが挙げられる。

[0065] <色素樹脂粒子の製造方法>

本発明に係る変動係数15%以下、好ましくは15%未満の色素樹脂粒子は、例えば以下の各工程に沿って製造され、1種または2種以上のモノマーまたはオリゴマーを熱硬化させて色素樹脂粒子を製造する際に、界面活性剤が所定量存在した状態で重合反応を行うことにより製造することができる。樹脂原料に対し、10~60重量%の範囲で乳化作用を有する界面活性剤を加える事で、任意の粒子径を得る事ができ、例えば、30~300nmの粒子を作製できる。また、界面活性剤の割合を増やすと更に小さい粒子も作製可能で30nm以下とすることができる。あるいは、界面活性剤の割合を減らすと更に大きい粒子も作製可能で300nm以上の粒子も作製可能である。また、粒子作製時の界面活性剤は0.1から3.0重量%で任意に変更で

きる。好ましくは0.25から1.0重量%である。これら界面活性剤の割合と添加量は一例であり、任意の範囲で変更できる。

[0066] (1) 混合工程

混合工程は、上記蛍光色素と、界面活性剤と、プロトン供給剤と、樹脂粒子を構成するモノマーまたはオリゴマーの1種または2種以上等とを混合する工程である。

[0067] (界面活性剤)

本発明者らは、製造される色素樹脂粒子の粒径の変動係数が、界面活性剤とモノマー（樹脂構成単位としてのモノマー）とのモル比や、界面活性剤の種類により変化することを見出している。このため、色素樹脂粒子の変動係数が15%以下となるように、界面活性剤の種類やモノマーとのモル比を調節して樹脂を重合させる必要がある。

[0068] 界面活性剤の種類としては、アニオン系、ノニオン系およびカチオン系の全ての界面活性剤を用いることができる。このうち、樹脂粒子の粒径の変動係数に与える界面活性剤の電荷の影響の大きさは、カチオン系の樹脂モノマーに対しては、ノニオン系>アニオン系>カチオン系の関係となるため、アニオン系、ノニオン系の界面活性剤を用いることが好ましい。逆に、アニオン系の樹脂モノマーに対する界面活性剤の電荷の影響の大きさは、ノニオン系>カチオン系>アニオン系の関係となるため、カチオン系、ノニオン系の界面活性剤を用いることが好ましい。

[0069] 界面活性剤としては、以下のものを用いることができるがこれらに限定されない。アニオン系の界面活性剤としては、例えば、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等が挙げられる。ノニオン系の界面活性剤としては、ポリエチレングリコール、ポリオキシエチレンアルキルエーテル等が挙げられる。カチオン系の界面活性剤としては、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド等を挙げることができる。

[0070] また、重合反応系におけるモノマーと界面活性剤との重量比は、モノマー：界面活性剤=10：1～10：6となるように設定することが好ましい。

実施例に示すように、モノマー単位：界面活性剤（モル比）が、100：1.5～100：3.5程度となるように設定することが、より好ましい。

[0071] 界面活性剤としては、例えば、エマルゲンやネオペレックス（登録商標、花王社製）を好適に用いることができる。なお、エマルゲンの有効成分はポリオキシエチレンアルキルエーテルであり、ネオペレックスの有効成分はドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムである。界面活性剤により、外側が水相で内側が油相のミセルが形成され、ミセル内側の油相に上記樹脂を構成するモノマーが包含された状態となり、このミセル内側で重合反応が行われることとなる。

[0072] ミセル内側の油相で重合反応が進み油相内のモノマーが枯渇してくると、水相に分散しているモノマーが油相に移動するようになるが、この際に水と油の界面に位置する界面活性剤が、水相からのモノマー流入量を調節する役割を果たし、製造される樹脂粒子の粒径が揃うと考えられる。

[0073] ミセル内側の油相とミセル外側の水相との界面に位置する界面活性剤の電荷が、水相から油相へ供給されるモノマーの電荷と反対の場合には、水相のモノマーが界面活性剤に電氣的に引き付けられて、ミセル内側の油相へ供給されやすくなる。そのため、カチオン系のモノマーを用いる場合、使用する界面活性剤は、アニオン系、ノニオン系のものを好適に用いることができる。

[0074] また、使用する乳化重合用乳化剤は、重合工程で行う熱硬化反応温度より曇点が高いものを選択する必要がある。熱硬化反応温度より曇点が高いものを選択すると、界面活性剤が水との水和力を失って、その機能を果たさなくなり、樹脂粒子ができずに、樹脂の塊状物になってしまうからである。

[0075] （プロトン供給剤）

熱硬化性樹脂と蛍光色素とをイオン結合させる場合、プラス電荷となる熱硬化性樹脂の置換基や蛍光色素の置換基にH<sup>+</sup>を積極的に供給してプラス電荷とするプロトン供給剤を用いる事もできる。例えば、ギ酸や酢酸、パラトルエンスルホン酸等、これらに類するものが挙げられる。色素に付いている置

換基がカルボン酸やスルホン酸等の酸の場合、これがプロトン供給剤として機能する事もできる。逆に熱硬化樹脂のマイナス電荷となる置換基や蛍光色素の置換基からH<sup>+</sup>を積極的に抜き取るプロトン受容剤を用いる事もできる。例えば、水酸化ナトリウム等の塩基の場合、これがプロトン受容剤として機能する。

[0076] (重合反応促進剤)

熱硬化性樹脂の反応促進剤として、例えば酸を用いる事ができる。メラミン樹脂や尿素樹脂、キシレン樹脂、フェノール樹脂は、いずれも酸触媒により反応が促進される事が知られている。酸としては、例えば、ギ酸、酢酸、硫酸、塩酸、硝酸、パラトルエンスルホン酸、ドデシルベンゼンスルホン酸、等が知られている。熱硬化性樹脂の反応は加温のみでも進行するが、反応促進剤を加えるとより低温で進行するので、反応や性能を制御できる範囲で添加することができる。

[0077] (2) 重合工程

重合工程は、モノマーまたはオリゴマーを熱硬化、即ち重合させて色素樹脂粒子を形成する工程である。重合工程の反応条件（熱硬化温度、重合時間）は、重合させるモノマーまたはオリゴマーの組成から決定され、公知の方法に即して行うことができる。ここで、蛍光色素の性能が低下しない反応条件（蛍光色素の耐熱温度範囲内）とする必要がある。

[0078] 例えば、熱硬化性樹脂にメラミン樹脂を選択する場合、メラミン樹脂の生成反応は70℃～200℃で行われる。好ましくは150～200℃加熱である。蛍光色素の耐熱温度は、ローダミン系色素分子200℃、BODIPY（登録商標、インビトロジェン社製）200℃、スクアリリウム系色素分子200℃、芳香族炭化水素系色素分子300℃以上であり、生成反応に耐えうる蛍光色素を用いる必要がある。

[0079] 重合工程により、内包されている蛍光色素が色素樹脂粒子から溶出しにくいものとなる。万が一、重合反応が不十分で色素樹脂粒子からの蛍光色素の滲みの問題が生じる場合には、製造した色素樹脂粒子を、用いた樹脂の分解

温度や熔融温度以下の温度の色素と樹脂粒子に悪影響が出ない範囲でさらに加熱処理にて熱硬化、つまり架橋を促進させて、蛍光色素の滲みを抑制させる処理を行ってもよい。

[0080] (3) 洗浄工程

洗浄工程は、得られた色素樹脂粒子の分散液から、余剰の樹脂原料や蛍光色素、乳化剤等の不純物を除く工程である。例えば、反応液から樹脂成分を遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再度分散させることで洗浄を行う。遠心分離、上澄み除去、超純水への再分散の一連の洗浄操作は、上澄みに樹脂や色素に由来する吸光・蛍光が見られなくなるまで、複数回繰り返し行うことが好ましい。

[0081] (4) 付加工程

付加工程は、色素樹脂粒子に免疫染色用のリンカー等を付加する工程である。色素樹脂粒子に付加するリンカーの種類は、ストレプトアビジン-ビオチン等のリンカーを用いることができるが、これに限定されない。

[0082] 例示したストレプトアビジン-ビオチンのリンカーの付加は、例えば、以下のように行われる。まず、ストレプトアビジンに対してチオール基導入試薬によりチオール基を付加する一方で、色素樹脂粒子の表面に対してアミノ基導入試薬によりアミノ基を導入した後、アミノ基と反応する活性エステルとチオール基と反応するマレイミド基を両端に有するPEG等のリンカーを用いて、色素樹脂粒子とストレプトアビジンとをリンクさせる方法である。

[0083] アミノ基導入試薬としては、アミノプロピルトリメトキシシラン等が挙げられる。チオール基導入試薬としては、N-スクシミジルSアセチルチオ酢酸が挙げられ、該試薬と上記の付加自体は公知の方法で行うことができる。

[0084] <製造した色素樹脂粒子の確認>

(樹脂粒子の粒径と変動係数)

色素樹脂粒子の粒径は、製造した色素樹脂粒子を、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて電子顕微鏡写真を撮影し、色素樹脂粒子の断面積を計測し、その計測値を相当する円の面積としたときの直径 (面積円相当径) として測

定することができる。色素樹脂粒子の集団の粒子径の平均（平均粒径）および変動係数は、十分な数（たとえば300個）の色素樹脂粒子について、上記のように粒子径を測定した後、平均粒径はその算術平均として算出され、変動係数は式： $100 \times \text{粒径の標準偏差} / \text{平均粒径}$ により算出される。

[0085] [組織染色]

組織染色の方法としては、上記色素樹脂粒子を免疫染色用の蛍光標識体として検出対象の生体物質を染色する蛍光染色法が用いられる。たとえば、特定の抗原に対して免疫染色を行う際には、上記リンカーを介して色素樹脂粒子と1次抗体を直接結合した蛍光標識体（コンジュゲート）を作製し、抗原を染色する方法（1次抗体法）、色素樹脂粒子と2次抗体とを直接結合した蛍光標識体を作製し、抗原に1次抗体を結合したものを染色する方法（2次抗体法）、図1を参照して上述したように、色素樹脂粒子とビオチンを直接結合した蛍光標識体を作製し、抗原に1次抗体、及び、アビジンあるいはストレプトアビジン修飾した2次抗体を結合したものをを用いて染色する方法、同様に色素樹脂粒子にアビジンあるいはストレプトアビジンを直接結合した蛍光標識体を作製し、抗原に1次抗体、及び、ビオチン修飾した2次抗体を結合したものをを用いて染色する方法（ビオチン-アビジン法またはサンドイッチ法）、等を用いることができる。

[0086] 免疫染色に用いる1次抗体はいかなるものでも構わず、免疫染色を行いたい対象によって変わる。例えばHER2を抗原とする免疫染色を行う場合には、抗HER2抗体を用いる。また、2次抗体はいかなるものを用いても構わず、1次抗体によって変わる。例えば、抗マウス、抗ラビット、抗牛、抗ヤギ、抗羊、抗イヌ、および、抗チキン抗体が挙げられる。

[0087] 色素樹脂粒子と抗体やビオチンとの結合は既存のいかなる方法を用いても構わない。例えば、アミンとカルボン酸の反応におけるアミド化、マレイミドとチオールとの反応によるスルフィド化、アルデヒドとアミンの反応によるイミン化、および、エポキシとアミンの反応によるアミノ化等を用いることができる。

[0088] なお、上記の免疫染色は、組織染色に限定されるものではなく、細胞染色に適用することも可能である。また、検出対象とする生体物質は、それと特異的に結合する物質が存在するものであれば限定されるものではない。典型的には、上記のように抗原および抗体の組み合わせが用いられるが、たとえば核酸分子（オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド）およびそれにハイブリダイズしうる配列の核酸分子の組み合わせを用いることも可能である。

[0089] [蛍光観察]

上記工程により組織染色が施された病理切片に用いられている色素樹脂粒子の蛍光色素に応じた適切な波長を有する励起光を照射することで、蛍光色素が発する蛍光を観察する。このような工程により、その病理切片に存在する所定の生体分子を検出することができ、抗体医薬（たとえばHER2を標識とするハーセプチン）の適用の要否を判断するための情報として利用することができる。励起光の照射には、一般的な蛍光観察と同様の照射手段を用いればよく、例えば、蛍光顕微鏡が備えるレーザ光源から、必要に応じて所定の波長を選択すればよい。

[0090] 蛍光の観察は、蛍光顕微鏡の鏡筒から行ってもよいし、蛍光顕微鏡に設置されたカメラが撮影した画像を別途表示手段（モニタ等）に表示して行ってもよい。蛍光色素によるが、蛍光顕微鏡の鏡筒から目視によっては十分に蛍光を観察することができない場合があっても、カメラによる画像の撮影を通じて蛍光を観察することが可能な場合もある。必要に応じて所定の波長を選択的に通過させるフィルタを用いてもよい。

[0091] ここで、免疫染色部の輝度は、免疫染色用の蛍光標識体によって染色された部位の輝度の平均値として取得される値である。また、免疫染色部の輝点とは、図3に示すように、免疫染色用の蛍光標識体によって染色された部位で輝く点を意味する（図3（A）および（B）参照）。

[0092] <組織染色用キット>

本発明に係る組織染色用キットは、上述した組織染色用染色剤を構成品として含む。他の構成品は免疫染色に関する抗体等の試薬等を含んでいてよい。

。

[0093] 以下、本発明に係る組織染色用染色剤、組織染色用染色剤の製造方法および組織染色用キットによる作用・効果について、図1～図4を参照しながら説明する。

(1)色素樹脂粒子の粒径の変動係数が15%以下の場合、輝点の大きさが揃う結果、変動係数が15%を超えるものと異なり、蛍光観察を行った場合の各輝点の大きさが一様となる(図3(A)と(B)または図4(A)と(B))を対比して参照)。このため、蛍光観察で設定するダイナミックレンジに全ての輝点からの蛍光シグナルが収まるようになる。この結果、隣接する輝点同士がサチレーションにより融合する等の上記問題が解消され、輝点同士の判別が担保される。この結果、蛍光シグナルの判定精度が改善される。

[0094] 蛍光色素がプラス電荷またはマイナス電荷の置換基を有し、色素樹脂粒子の樹脂を構成する熱硬化性樹脂が前記蛍光色素とは逆の電荷の置換基を有してイオン結合していることで(図1参照)、色素樹脂粒子により組織切片を染色した後の透徹の際に、樹脂粒子に内包された色素が樹脂粒子の外側に滲み出にくいものとなる。

[0095] (2)蛍光色素が前記樹脂粒子に内包されていることで、不必要に蛍光色素が光に曝されず、これによる蛍光色素の分解・蛍光標識として性能低下を防止することができる。

[0096] (3)特に、前記イオン結合に寄与している置換基が、前記蛍光色素はマイナス電荷の置換基であり、前記樹脂粒子はプラス電荷の置換基であることにより、組織染色後の蛍光観察における蛍光色素の滲みを特に抑制することができる。染色像の明るさを確保することができる。

[0097] (4)前記蛍光色素全体の電荷および前記樹脂粒子全体の電荷が、前記イオン結合に寄与している置換基の電荷と異なる電荷である場合、蛍光色素と樹脂の両分子が互いに電氣的に引き寄せられて、各分子の置換基がイオン結合するため、より蛍光色素が樹脂に固定されやすいものとなる。

[0098] (5)蛍光色素1分子の分子量/電荷を有する置換基数 $< 400$ であることで

、他の分子量頻度で前記置換基を有しているものよりも、組織染色像の蛍光色素の滲み、明るさおよび輝点における性能バランスを高めることができる。

[0099] (6)前記蛍光色素は、蛍光色素1分子あたりにマイナス電荷の置換基を少なくとも2つ有することにより、図1の左側の矩形に示すように、樹脂が有する複数のプラス電荷の置換基に挟持されるように固定される。また、場合によっては、蛍光色素が架橋剤のように固定されて機能する。この結果、より強固に固定される点で1つの置換基を有する場合よりも組織染色像の蛍光色素の滲みを防止することができる。加えて、明るさの性能を確保することができ、輝点の融合等を防止することができる。

[0100] (7,8)プラス電荷の置換基がアミノ基であり、マイナス電荷の置換基がスルホ基またはカルボキシル基であることにより、アミノ基(−NH<sup>+</sup>)に対して、強いマイナス電荷のスルホ基(SO<sub>3</sub><sup>-</sup>)の電子対を配位結合させて樹脂と蛍光色素とを強固に結合させることができる。例えば、メラミン等のアミノ基を有する熱硬化性樹脂に対して、スルホ基を有する蛍光色素を強固に結合させることができる。

[0101] (9)前記蛍光色素が、ローダミン、BODIPY、スクアリリウムまたは芳香族炭化水素系色素分子であることで、蛍光色素と樹脂の疎水性部分の相互作用により、置換基のイオン結合と共に、強固に色素分子と樹脂とを結合させることができる。これにより、組織染色像の蛍光色素の滲みをより一層防止することができる。

[0102] (10,12)前記熱硬化性樹脂がメラミンを用いて形成され、前記蛍光色素がローダミンまたは芳香族炭化水素系色素分子であることにより、メラミン樹脂とローダミンまたは芳香族炭化水素系色素分子がそれぞれ有するベンゼン環同士の疎水的相互作用により、上述した置換基のイオン結合に加えて、より強固に色素分子と樹脂とを結合させることができる。これにより、組織切片作成(図2)後の組織染色像の蛍光色素の滲みをより一層防止することができる。また、輝度と耐光性の観点からも、ローダミンや芳香族炭化水素は好

適に用いられる。

[0103] (11)前記熱硬化性樹脂と前記蛍光色素とが、アミド結合、エステル結合、エーテル結合およびC-N結合のいずれかによって共有結合していることで、色素樹脂粒子により組織切片を染色した後の透徹の際に、蛍光色素が樹脂粒子に内包され強固に維持されるので、樹脂粒子の外側に滲み出ることが抑制される。

[0104] (13)前記樹脂粒子を合成反応により製造する際の反応系に界面活性剤を所定量添加することにより前記樹脂粒子の変動係数を15%以下とする工程を含むことで、変動係数15%以下の色素樹脂粒子を製造することができ、上記効果を有する組織染色用染色剤を提供することができる。

[0105] (14)上記組織染色用染色剤を構成品として含む組織染色用キットであれば、上記効果を有する組織染色用キットを提供することができる。

### 実施例

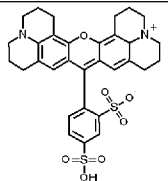
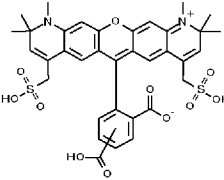
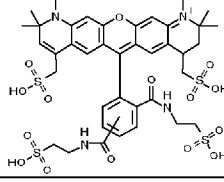
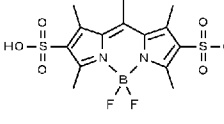
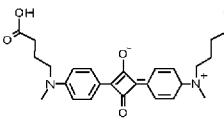
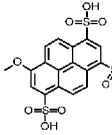
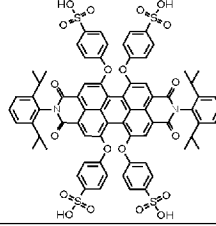
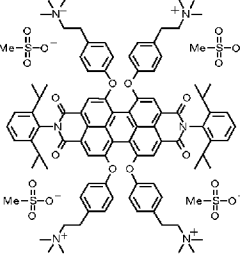
[0106] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[色素]

以下の実施例、比較例に用いた色素を表1に示す。

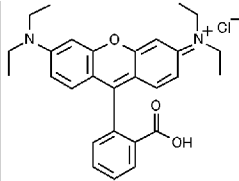
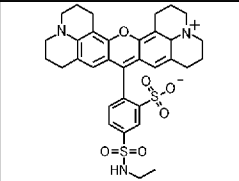
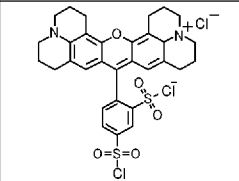
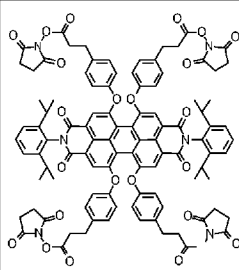
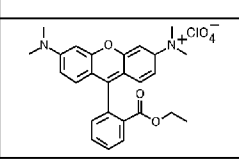
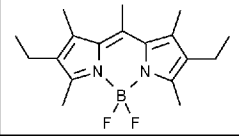
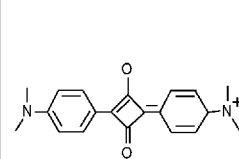
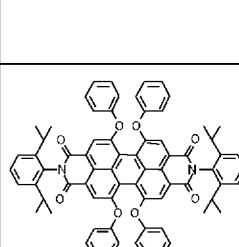
[0107]

[表1-1]

化合物	色素骨格	色素の電荷 (置換基)	化合物構造式	色素 分子量	カルボキシル 基数	スルホ 基数	アミノ 基数	共有結合する 置換基数	色素分子量/ 電荷置換基数
1-1	ローダミン	- (スルホ基)		578	0	2	0	0	289
1-2	ローダミン	- (スルホ基)		693	2	2	0	0	231
1-3	ローダミン	- (スルホ基)		924	0	4	0	0	173
1-4	BODIPY	- (スルホ基)		397	0	2	0	0	199
1-5	スファリラム	- (カルボキシル基)		436	2	0	0	0	218
1-6	ピレン	- (スルホ基)		472	0	3	0	0	157
1-7	ヘリオンジミド	- (スルホ基)		1399	0	4	0	0	350
1-8	ヘリオンジミド	+ (アンモニウム基)		1368	0	0	4	0	342

「-」=マイナス、「+」=プラス

[表1-2]

化合物	色素骨格	色素の電荷 (置換基)	化合物構造式	色素 分子量	カルボキシル 基数	スルホ 基数	アミノ 基数	共有結合する 置換基数	色素分子量/ 電荷置換基数
2-1	ローダミン	— (カルボキシル基)		430	1	0	0	0	430
2-2	ローダミン	— (スルホ基)		605	0	1	0	0	605
3-1	ローダミン	アミド結合		(632)	0	0	0	2	326
3-2	ヘリックス ジミド	アミド結合		(1756)	0	0	0	4	878
4-1	ローダミン	無し		403	0	0	0	0	N.D.
4-2	BODIPY	無し		293	0	0	0	0	N.D.
4-3	スクリラム	無し		291	0	0	0	0	N.D.
4-4	ヘリックス ジミド	無し		1079	0	0	0	0	N.D.

「-」=マイナス、「+」=プラス、「N.D.」=データなし

[0109] [表1-3]

色素骨格	色素骨格構造式	色素骨格のプラス電荷置換基	色素骨格のマイナス電荷置換基
ローダミン		1 (アンモニウム基)	0
BODIPY		0	0
スクアリリウム		1 (アンモニウム基)	1 (四角酸基)
ピレン		0	0
ペリレン		0	0

[0110] 表1-1～表1-2の化合物1-1～4-4は、それぞれ、ローダミン、BODIPY、スクアリリウム、ピレン、または、ペリレンジイミドの骨格（表1-3参照）を持ち、且つ、置換基としてカルボン酸やスルホン酸、アンモニウム基、共有結合部位を持つ色素、あるいは前記置換基が無い色素である。このうち、化合物1-1～1-8は、カルボキシル基やスルホ基を有しており、分子全体としてマイナスの電荷をもっている。化合物2-1～2-2はアンモニウム基を有しており、分子全体としてプラスの電荷を持っている。化合物3-1～3-2は、共有結合部位を有している。化合物4-1～4-4は前記置換基がない。なお、表1-3の通り、ローダミンは骨格にアンモニウム基を一つ含むが、骨格に含まれる置換基については寄与が小さいので、色素の電荷（置換基）の数にはカウントしない。スクアリリウムも同様である。

[0111] [化合物1-1]

市販のスルホローダミン101（シグマアルドリッチ社）を使用した。

[化合物1-2]

A I E X A 5 9 4 に近い構造式を有する化合物 1 - 2 に係る蛍光色素を、既報の特開 2 0 1 0 - 1 8 0 4 9 に従って作製して使用した。

[化合物 1 - 3]

前記化合物 1 - 2 を N H S エステル化した後、2-Aminoethanesulfonic Acid (東京化成工業社) と D F M 中で 9 0 ° C、1 時間反応し、カラムクロマトグラフィーで精製後、使用した。

[0112] [化合物 1 - 4]

市販の D i s o d i u m - 1 , 3 , 5 , 7 , 8 - p e n t a m e t h y l p y r r o m e t h e n e - 2 , 6 - d i s u l f o n a t e - d i f l u o r o b o r a t e c o m p l e x (Exiton社) を使用した。

[化合物 1 - 5]

文献 (J. Phys. Chem. A 2005, 109, 5571) に記載の方法に従い合成し、使用した。

[化合物 1 - 6]

市販の 8-Methoxypyrene-1,3,6-trisulfonic acid trisodium salt (シグマアルドリッチ社) を使用した。

[化合物 1 - 7, 1 - 8, 3 - 1, 3 - 2, 4 - 4]

既報の Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 1528 に従って作製し、使用した。

[化合物 2 - 1]

市販のローダミン B (和光純薬工業社) を使用した。

[化合物 2 - 2]

市販のスルホローダミン 1 0 1 アシッドクロライド (同仁化学社) とエチルアミン (東京化成工業社) を D F M 中で 9 0 ° C、1 時間反応し、カラムクロマトグラフィーで精製後、使用した。

[化合物 4 - 1]

市販のテトラメチルローダミンエチルエステル過塩素酸塩 (シグマアルドリッチ社) を使用した。

## [化合物 4 - 2]

市販の1,3,5,7,8-pentamethyl-2,6-diethylpyrromethene-difluoroborate complex (Exiton社) を使用した。

## [化合物 4 - 3]

市販の1,3-ビス[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-2,4-ジヒドロキシシクロブテンジリウム 二水酸化物, ビス(分子内塩) (シグマアルドリッチ社) を使用した。

[0113] なお、上記化合物の構造は分子内塩として表記しているが、例えばハロゲン化物イオンやメタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホナート等のアニオンがカウンターイオンとして付いている形式でも良い。また、カルボン酸、スルホン酸は酸の形で表記しているが、アルカリ金属等の塩としても良い。また、分子内のカルボン酸、スルホン酸、アンモニウム基の個数を表記しているが、この数には色素骨格自体が含む酸やアンモニウム塩の数は含まない。例えば、ローダミンは色素骨格に1つのアンモニウム基を含むがこれは数えない。同様にスクアリリウムは色素骨格に四角酸とアンモニウム基を含むがこれは数えない。

[0114] 《蛍光色素と熱硬化性樹脂とをイオン結合または共有結合した変動係数15%以下の色素樹脂粒子の製造、組織染色等》

## [実施例 1] (化合物 1 - 1 内包ポリメラミン粒子)

蛍光色素として化合物 1 - 1 である S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 (シグマアルドリッチ社製) 14.4 mg を水 22 mL に加えて溶解した。その後、この溶液に乳化重合用乳化剤のエマルゲン (登録商標) 430 (ポリオキシエチレンオレイルエーテル、花王社製) の 5% 水溶液を 2 mL 加えた。この溶液をホットスターラー上で攪拌しながら 70℃ まで昇温させた後、この溶液にメラミン樹脂原料ニカラック MX-035 (日本カーバイド工業社製) を 0.65 g 加えた。

[0115] さらに、この溶液に界面活性剤としてドデシルベンゼンスルホン酸 (関東化学社製) の 10% 水溶液を 1000  $\mu$ L 加え、70℃ で 50 分間加熱攪拌

した。その後、90℃に昇温して20分間加熱攪拌した。得られた色素樹脂粒子の分散液から、余剰の樹脂原料や蛍光色素等の不純物を除くため、純水による洗浄を行った。

[0116] 具体的には、遠心分離機（クボタ社製マイクロ冷却遠心機3740）にて20000Gで15分間、遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再分散した。遠心分離、上澄み除去および超純水への再分散による洗浄を5回繰り返した。得られたメラミン粒子はメラミン樹脂自体が骨格に多くのアミノ基を含むことから、プラス電荷となった。樹脂粒子の電荷の評価は、NMRやIR等による樹脂組成分析と、ゼータ電位測定により行なった。

[0117] 得られた色素樹脂粒子0.1mgをエタノール1.5mL中に分散し、アミノ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、8時間反応させることにより、樹脂粒子の樹脂表面に存在するヒドロキシル基をアミノ基に変換する表面アミノ化処理を行った。

[0118] 2mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含有したリン酸緩衝液生理的食塩水（PBS）を用いて、得られた色素樹脂粒子の濃度を3nMに調整した。濃度調整した色素樹脂粒子の分散液に対して、終濃度10mMとなるように、SM（PEG）12（Succinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethylene glycol] ester、サーモサイエンティフィック社製）を混合し、20℃1時間反応させて、末端にマレイミドがついた蛍光色素を有する色素樹脂粒子を含む混合液を得た。

[0119] この混合液を10000Gで20分間遠心分離を行い、上澄みを除去した後、2mMのEDTAを含有したPBSを加えて沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による上記洗浄を3回行った。

[0120] （ストレプトアビジンの調製）

一方、ストレプトアビジン（和光純薬工業社製）とN-スクシミジル Sアセチルチオ酢酸（N-succinimidyl S-acetylthi

o a c e t a t e、略称：S A T A）を用いて、ストレプトアビジンに対してチオール基の付加処理を行い、ゲル濾過を行って色素樹脂粒子に結合可能なストレプトアビジンを別途用意した。

[0121] （樹脂粒子とストレプトアビジンの結合）

上記色素樹脂粒子とストレプトアビジンを、2 mMのEDTAを含有したPBS中で混合後、室温で1時間反応させて、両者を結合させる反応を行った。反応後、10 mMメルカプトエタノールを添加して反応を停止させた。得られた溶液を $\phi = 0.65 \mu\text{m}$ の遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲル濾過カラムを用いて未反応のストレプトアビジン等を除去し、ストレプトアビジンが結合した色素樹脂粒子を得た。

[0122] （免疫組織染色）

この色素樹脂粒子を含む組織染色用染色剤を用いて、ヒト乳房組織の免疫染色を行った。ここで組織染色用染色剤は、1%BSA含有PBS緩衝液等の緩衝液を用いた。染色切片は組織アレイスライド（コスモ・バイオ社製、品番CB-A712）を用いた。組織アレイスライドを脱パラフィン処理後、水に置換洗浄し、10 mM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を、PBS緩衝液を用いて洗浄後、1%BSA含有PBS緩衝液で0.05 nMに希釈した抗HER2ウサギモノクローナル抗体（4B5）を組織切片と2時間反応させた。PBSで洗浄後、1%BSA含有PBS緩衝液で希釈したビオチン標識抗ウサギ抗体と、30分間反応させた。さらに、上記組織染色用染色剤を用いて、すなわち上記製造したストレプトアビジンを有する色素樹脂粒子と2時間反応させ、その後洗浄を行うことにより、免疫組織化学染色切片が得られた。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緩衝液に10分間浸漬することにより、固定処理を行った。

[0123] （形態染色）

上記固定処理をした各免疫組織化学染色切片に対してヘマトキシリン染色

を行い、染色後の切片を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て透徹し、封入剤で封入して風乾させることにより、二重染色切片が得られた。ヘマトキシリン染色は、後述の評価において影響はなかった。また、形態染色を行わない場合はエタノール浸漬とキシレン浸漬による透徹のみ、あるいは形態染色としてエオシン染色を追加することもできた。

[0124] (組織像の評価)

市販の蛍光顕微鏡を用いて色素内包樹脂粒子の蛍光組織画像を取得し、輝点計測への影響、組織像の色素にじみ、染色像の明るさについて評価した。

[0125] なお、表2、4～7の「蛍光色素の溶出量」は、色素樹脂粒子をエタノール浸漬し、エタノール中に溶出した色素量を評価した値である。具体的には、色素樹脂粒子0.1mgを1mLのエタノールに浸漬してバス式超音波装置（アズワン社）で10分間超音波を掛けた後、遠心分離をして粒子を除き、上澄み液を蛍光光度計F7000（日立社）で測定し、予め作製した色素濃度と蛍光光度計のピーク値の検量線から、1mL中の色素量（pmol）を算出した値である。この値から、評価1：Her2染色像の色素にじみを間接的に類推できる。

[0126] また、表2中、評価1について、「○」は、蛍光色素の滲みが無いことを示し、「△」は蛍光色素の滲みがあるが輝点を認識することができることを示し、「×」は蛍光色素の滲みにより輝点が確認できないことを示す。

[0127] また、表2中、評価2については、「◎」は、特にHer2染色像が明るいことを示している。「○」は蛍光観察の露光条件を400msとした場合に像に輝点が確認できることを意味し、「△」は、輝点が見えにくいことを意味し、「×」は輝点が確認できないことを意味する。

[0128] また、表2中、評価3については、「○」は蛍光観察画像で輝点数を計測できることを意味し、「△」は計測しにくいことを意味し、「×」は計測不可能であることを意味する。なお、これらの基準は以下の表3～表7および他の例においても同様である。

## [0129] [実施例2] (化合物1-1内包ポリ尿素粒子)

実施例1において、メラミン樹脂原料ニカラックMX-035 (日本カーバイド工業社製) 0.65gの代わりに、尿素樹脂原料0.80gを使用した以外は、実施例1と同様に色素樹脂粒子の製造等を行った。本尿素樹脂は、骨格自体にアミノ基を多く含有することで樹脂がプラス電荷となった。なお、尿素樹脂原料は既存の方法により作製した、メチロール化度が40~70%の尿素であった。

## [0130] [実施例3] (化合物1-1内包ポリキシレン粒子)

実施例1において、メラミン樹脂原料ニカラックMX-035 (日本カーバイド工業社製)の使用量を0.65gの代わりに、キシレン樹脂原料ニカラックY-50 (フドー社製) 0.80g、ブチルイソシアネート0.20g、および、ニカラックMX-035 (日本カーバイド工業社製) 0.20gを使用した点以外は、実施例1と同様に色素樹脂粒子の製造等を行った。本ポリキシレン樹脂は、アミノ基を多く含有することで樹脂がプラス電荷となった。

## [0131] [実施例4, 7, 10, 13, 16, 19, 24, 27, 30, 34] (化合物1-2~3-2内包ポリメラミン粒子)

実施例1において、化合物1-1を、化合物1-2 (実施例4)、化合物1-3 (実施例7)、化合物1-4 (実施例10)、化合物1-5 (実施例13)、化合物1-6 (実施例16)、化合物1-7 (実施例19)、化合物2-1 (実施例24)、化合物2-2 (実施例27)、化合物3-1 (実施例30)、化合物3-2 (実施例34)に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

## [0132] [実施例5, 8, 11, 14, 17, 20, 25, 28, 31, 35] (化合物1-2~3-2内包ポリ尿素粒子)

実施例2において、化合物1-1を、化合物1-2に変更 (実施例5)、化合物1-3 (実施例8)、化合物1-4 (実施例11)、化合物1-5 (実施例14)、化合物1-6 (実施例17)、化合物1-7 (実施例20)

、化合物 2-1（実施例 25）、化合物 2-2（実施例 28）、化合物 3-1（実施例 31）および化合物 3-2（実施例 35）に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0133] [実施例 6, 9, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 33, 37]（化合物 1-2~3-2 内包ポリキシレン粒子）

実施例 3 において、化合物 1-1 を、化合物 1-2（実施例 6）、化合物 1-3（実施例 9）、化合物 1-4（実施例 12）、化合物 1-5（実施例 15）、化合物 1-6（実施例 18）、化合物 1-7（実施例 21）、化合物 2-1（実施例 26）、化合物 2-2（実施例 29）、化合物 3-1（実施例 33）および化合物 3-2（実施例 37）に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0134] [実施例 22]（化合物 1-8 内包ポリフェノール粒子）

実施例 1 において、蛍光色素を化合物 1-1 から化合物 1-8 に変更し、メラミン樹脂原料ニカラック MX-035（日本カーバイド工業製）0.65g の代わりにフェノール樹脂原料ニカノール PR-1440M（フドー社製）0.80g とフェノール 0.20g を用いた点、ドデシルベンゼンスルホン酸（関東化学社製）10%水溶液を 1000  $\mu$ L 添加した後の加熱攪拌（70°C で 50 分間加熱攪拌）を行わずに、90°C、20 分間の加熱攪拌のみを行い、その後、オートクレーブにて 125°C で 5 分間加熱した点以外は、実施例 1 と同様に色素樹脂粒子の製造等を行った。なお、樹脂粒子はフェノールを含むためマイナス電荷となった。

[0135] [実施例 23]（化合物 1-8 内包ポリキシレン粒子）

実施例 1 において、化合物 1-1 を化合物 1-8 に変更し、メラミン樹脂ニカラック MX-035（日本カーバイド工業社製）0.65g の代わりに、キシレン樹脂原料ニカノール Y-50（フドー社製）0.20g、フェノール樹脂原料ニカノール PR-1440M（フドー社製）0.20g、3-(4-Hydroxyphenyl) propionic Acid 0.20g、を用いた点、ドデシルベンゼンスルホン酸（関東化学社製）10%水溶液を 1000  $\mu$ L 添加した

後の加熱攪拌（70℃で50分間加熱攪拌）を行わずに、90℃、20分間の加熱攪拌のみを行い、その後、オートクレーブにて125℃、5分間加熱した点以外は実施例1と同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。なお、本樹脂粒子は、フェニル基とカルボキシル基を有するため、マイナス電荷となった。

[0136] [実施例32, 36]（化合物3-1, 化合物3-2内包ポリフェノール粒子）

実施例22において、化合物1-8を、化合物3-1（実施例32）、化合物3-2（実施例36）に変更した以外実施例は同様に色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0137]

[表2]

	色素略号 (化合物)	色素 電荷	色素の 置換基	色素分子量	置換基数	色素分子 量/ 有電荷 置換基数	樹脂の種類	樹脂 電荷	色素の 溶出量	色素樹脂 粒子 の変動 係数[%]	評価		
											評価1: Her2染色像 の色素にじみ	評価2: Her2染色像 の明るさ	評価3: 輝点計測
実施例 1	1-1	-	スルホ基	578	2	289	ポリメラミン	+	4	10	△	○	○
実施例 2							ポリ尿素	+	4	13	△	○	○
実施例 3							ポリキシレン	+	6	11	△	○	○
実施例 4	1-2	-	スルホ基	693	4	173	ポリメラミン	+	1	10	○	○	○
実施例 5							ポリ尿素	+	1	10	○	○	○
実施例 6							ポリキシレン	+	2	11	○	○	○
実施例 7	1-3	-	スルホ基	924	4	231	ポリメラミン	+	1	11	○	○	○
実施例 8							ポリ尿素	+	1	10	○	○	○
実施例 9							ポリキシレン	+	1	12	○	○	○
実施例 10	1-4	-	スルホ基	397	2	199	ポリメラミン	+	1	12	○	○	○
実施例 11							ポリ尿素	+	1	11	○	○	○
実施例 12							ポリキシレン	+	1	13	○	○	○
実施例 13	1-5	-	カルボキ シル基	436	2	218	ポリメラミン	+	10	10	△	△	○
実施例 14							ポリ尿素	+	10	10	△	△	○
実施例 15							ポリキシレン	+	14	12	△	△	○
実施例 16	1-6	-	スルホ基	472	3	157	ポリメラミン	+	1	10	○	○	○
実施例 17							ポリ尿素	+	1	10	○	○	○
実施例 18							ポリキシレン	+	1	12	○	○	○
実施例 19	1-7	-	スルホ基	1398	4	350	ポリメラミン	+	0	10	○	◎	○
実施例 20							ポリ尿素	+	0	10	○	○	○
実施例 21							ポリキシレン	+	0	12	○	○	○
実施例 22	1-8	+	アミノ基	1366	4	342	ポリフェノール	-	14	12	△	△	○
実施例 23							ポリキシレン	-	19	14	△	△	○
実施例 24	2-1	-	カルボキ シル基	430	1	430	ポリメラミン	+	21	15	△	△	○
実施例 25							ポリ尿素	+	21	13	△	△	○
実施例 26							ポリキシレン	+	29	14	△	△	○
実施例 27	2-2	-	スルホ基	605	1	605	ポリメラミン	+	18	10	△	△	○
実施例 28							ポリ尿素	+	18	10	△	△	○
実施例 29							ポリキシレン	+	24	11	△	△	○
実施例 30	3-1	無し	アミド結合 (共有結合)	632	2	316	ポリメラミン	+	0	10	○	△	○
実施例 31							ポリ尿素	+	0	10	○	△	○
実施例 32							ポリフェノール	-	0	11	○	△	○
実施例 33							ポリキシレン	+	0	11	○	△	○
実施例 34	3-2	無し	アミド結合 (共有結合)	1756	4	439	ポリメラミン	+	0	12	○	△	○
実施例 35							ポリ尿素	+	0	12	○	△	○
実施例 36							ポリフェノール	-	0	12	○	△	○
実施例 37							ポリキシレン	+	0	13	○	△	○

## [0138] (考察)

蛍光色素と樹脂の電荷が逆であり、且つ、色素樹脂粒子の変動係数が15%以下であることから、蛍光観察時の蛍光色素の滲みがほとんどなく、輝度や輝点計測の結果がよいものとなった(実施例1~37)。

[0139] 《熱可塑性樹脂または半導体を用いて形成した蛍光色素粒子による組織染色等》

[比較例1, 2]

実施例 1 で製造した色素樹脂粒子の代わりに、市販のインビトロジェン社製の末端にアミノ基が付いたポリスチレン製の色素樹脂粒子（比較例 1）、末端にアミノ基が付いた市販の半導体ナノ粒子「Q-dot」（比較例 2）を用いて実施例 1 と同様に免疫組織染色および形態染色を行った。

[0140] [表3]

	粒子名	色素溶出量	粒子の変動係数[%]	評価		
				評価 1: Her2 染色像の色素にじみ	評価 2: Her2 染色像の明るさ	評価 3: 輝点計測
比較例 1	インビトロジェン社ポリスチレン粒子	200	10	×	×計測不可	×計測不可
比較例 2	インビトロジェン社「Q-dot」	0	10	○	×	×計測不可

[0141] (考察)

熱可塑性樹脂であるポリスチレン粒子に蛍光色素を固定した色素樹脂粒子であり、色素溶出が生じて組織像の評価 3 では色素が滲んで組織像が見えない結果となった（比較例 1）。

[0142] また、変動係数が 10%以下であっても、市販の半導体ナノ粒子である「Q-dot」では単体輝度が低いため、染色像が見えない結果となった（比較例 2）。

[0143] 《各種電荷の蛍光色素および熱硬化性樹脂で形成した変動係数 15%を超える色素樹脂粒子の場合》

[比較例 3] (化合物 1-1 内包ポリメラミン粒子)

蛍光色素として化合物 1-1 である S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 (シグマアルドリッチ社製) 2.5mg を水 22.5mL に加え溶解した。その後、ホットスターラー上で 70℃まで昇温させた後、メラミン樹脂ニカラック MX-035 (日本カーバイド工業社製) 1.5g を加え、5分間加熱攪拌した。ギ酸 100μL を加え、70℃で 20分間、加熱攪拌した後、室温放冷した。冷却後、反応混合物を遠心用チューブに入れて遠心分離機に

20000Gで20分間、遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再分散させた。遠心分離、上澄み除去および超純水への再分散による洗浄を5回繰り返した。得られたメラミン樹脂粒子は実施例1で作成した粒子と比べて、粒子の変動係数が大きい特徴を有していた。得られた色素樹脂粒子を用いて、実施例1と同様に免疫組織染色および形態染色を行った。

[0144] [比較例4] (化合物1-1内包ポリ尿素粒子)

比較例3において、メラミン樹脂原料ニカラックMX-035(日本カーバイド工業社製)1.5gの代わりに、尿素樹脂原料1.6gを使用した点以外は、実施例1と同様に色素樹脂粒子を製造した。なお、尿素樹脂原料は既存の方法により作製した、メチロール化度が40~70%の尿素である。

[0145] [比較例5] (化合物1-1内包ポリキシレン粒子)

比較例3において、メラミン樹脂原料ニカラックMX-035(日本カーバイド工業社製)1.5gの代わりに、フェノール樹脂原料K-100(フドー社製)0.80gと3,5-Dimethylaniline0.20gを使用した以外は実施例1と同様に色素樹脂粒子の製造等を行った。本キシレン樹脂はアミノ基を多く含有する事で樹脂がプラス電荷となった。

[0146] [比較例6, 9, 12, 15, 18, 21, 26, 29, 32, 36] (化合物1-2~3-2内包ポリメラミン粒子)

比較例3において、化合物1-1を、化合物1-2(比較例6)、化合物1-3(比較例9)、化合物1-4(比較例12)、化合物1-5(比較例15)、化合物1-6(比較例18)、化合物1-7(比較例21)、化合物2-1(比較例26)、化合物2-2(比較例29)、化合物3-1(比較例32)、化合物3-2(比較例36)に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0147] [比較例7, 10, 13, 16, 19, 22, 27, 30, 33, 37] (化合物1-2~3-2内包ポリ尿素粒子)

比較例4において、化合物1-1を、化合物1-2(比較例7)、化合物

1-3 (比較例10)、化合物1-4 (比較例13)、化合物1-5 (比較例16)、化合物1-6 (比較例19)、化合物1-7 (比較例22)、化合物1-8 (比較例27)、化合物2-1 (比較例30)、化合物2-2 (比較例33)、化合物3-1 (比較例37)に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0148] [比較例8, 11, 14, 17, 20, 23, 28, 31, 35, 39] (化合物1-2~3-2内包ポリキシレン粒子)

比較例5において、化合物1-1を化合物1-2 (比較例8)、化合物1-3 (比較例11)、化合物1-4 (比較例14)、化合物1-5 (比較例17)、化合物1-6 (比較例20)、化合物1-7 (比較例23)、化合物2-1 (比較例28)、化合物2-2 (比較例31)、化合物3-1 (比較例35)、化合物3-2 (比較例39)に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0149] [比較例24] (化合物1-8内包ポリフェノール粒子)

比較例3において、化合物1-1を化合物1-8に変更し、メラミン樹脂原料ニカラックMX-035 (日本カーバイド工業社製) 1.5gの代わりに、フェノール樹脂原料ニカノールPR-1440M (フドー社製) 0.80gおよびフェノール0.20gを用いた点、ドデシルベンゼンスルホン酸 (関東化学社製) 10%水溶液を1000 $\mu$ L添加した後の加熱攪拌 (70 $^{\circ}$ Cで50分間加熱攪拌) を行わずに、90 $^{\circ}$ C、20分間の加熱攪拌のみ行い、その後、オートクレーブにて125 $^{\circ}$ Cで5分間加熱した点以外は比較例3と同様に色素樹脂粒子の製造等を行った。なお、樹脂粒子はフェノールを含み、分子全体としてマイナス電荷となった。

[0150] [比較例25] (化合物1-8内包ポリキシレン粒子)

比較例3において、化合物1-1を化合物1-8に変更し、メラミン樹脂原料ニカラックMX-035 (日本カーバイド工業社製) 1.5gの代わりに、フェノール樹脂原料ニカノールPR-1440 (フドー社製) 0.80gおよびフェノール0.20gを用いた点、ドデシルベンゼンスルホン酸 (

関東化学社製) 10%水溶液を1000  $\mu$ L 添加した後の加熱攪拌 (70°C で50分間加熱攪拌) を行わずに、90°C、20分間の加熱攪拌のみ行い、その後、オートクレーブにて125°C 5分間加熱した点以外は、比較例3と同様に色素樹脂粒子の製造等を行った。なお、樹脂粒子はフェノールとカルボキシル基を含み、分子全体としてマイナス電荷となった。

[0151] [比較例34、38]

比較例24において、化合物1-8を、化合物3-1 (比較例34)、化合物3-2 (比較例38) に変更した以外は同様に色素樹脂粒子の製造、形態染色等を行った。

[0152]

[表4]

	色素略号 (化合物)	色素 電荷	色素の 置換基	色素分子量	置換基数	色素分子 量/ 有電荷 置換基数	樹脂の種類	樹脂 電荷	色素の 溶出量	色素樹 脂粒子 の変動 係数 [%]	評価		
											評価1: Her2染色像 の色素にじみ	評価2: Her2染色像 の明るさ	評価3: 輝点計測
比較例 3	1-1	-	スルホ基	578	2	289	ポリメラミン	+	4	22	△	○	×
比較例 4							ポリ尿素	+	5	27	△	○	×
比較例 5							ポリキシレン	+	6	25	△	○	×
比較例 6	1-2	-	スルホ基 カルボキ シル基	693	4	173	ポリメラミン	+	2	23	○	○	×
比較例 7							ポリ尿素	+	2	32	○	○	×
比較例 8							ポリキシレン	+	3	27	○	○	×
比較例 9	1-3	-	スルホ基	924	4	231	ポリメラミン	+	1	22	○	○	×
比較例 10							ポリ尿素	+	1	24	○	○	×
比較例 11							ポリキシレン	+	1	23	○	○	×
比較例 12	1-4	-	スルホ基	397	2	199	ポリメラミン	+	1	22	○	○	×
比較例 13							ポリ尿素	+	1	28	○	○	×
比較例 14							ポリキシレン	+	1	26	○	○	×
比較例 15	1-5	-	カルボキ シル基	436	2	218	ポリメラミン	+	10	25	△	△	×
比較例 16							ポリ尿素	+	11	34	△	△	×
比較例 17							ポリキシレン	+	14	29	△	△	×
比較例 18	1-6	-	スルホ基	472	3	157	ポリメラミン	+	1	20	○	○	×
比較例 19							ポリ尿素	+	1	31	○	○	×
比較例 20							ポリキシレン	+	1	28	○	○	×
比較例 21	1-7	-	スルホ基	1398	4	350	ポリメラミン	+	0	21	○	○	×
比較例 22							ポリ尿素	+	0	32	○	○	×
比較例 23							ポリキシレン	+	0	31	○	○	×
比較例 24	1-8	+	アンモニウム基	1366	4	342	ポリフェノール	-	15	27	△	△	×
比較例 25							ポリキシレン	-	19	32	△	△	×
比較例 26	2-1	-	カルボキ シル基	430	1	430	ポリメラミン	+	21	25	△	△	×
比較例 27							ポリ尿素	+	21	30	△	△	×
比較例 28							ポリキシレン	+	29	30	△	△	×
比較例 29	2-2	-	スルホ基	605	1	605	ポリメラミン	+	18	26	△	△	×
比較例 30							ポリ尿素	+	18	31	△	△	×
比較例 31							ポリキシレン	+	25	31	△	△	×
比較例 32	3-1	無し	アミド結合 (共有結合)	632	2	316	ポリメラミン	+	0	25	○	△	×
比較例 33							ポリ尿素	+	0	27	○	△	×
比較例 34							ポリフェノール	-	0	32	○	△	×
比較例 35							ポリキシレン	+	0	33	○	△	×
比較例 36	3-2	無し	アミド結合 (共有結合)	1754	4	439	ポリメラミン	+	0	26	○	△	×
比較例 37							ポリ尿素	+	0	27	○	△	×
比較例 38							ポリフェノール	-	0	31	○	△	×
比較例 39							ポリキシレン	+	0	33	○	△	×

[0153] (考察)

蛍光色素と樹脂の電荷が逆の電荷であっても、色素樹脂粒子の粒径サイズにバラツキがあり、変動係数15%を超える場合、輝点計測等が困難となった(比較例3~39)。

[0154] 《無電荷の蛍光色素とプラス電荷の樹脂から形成した変動係数15%以下の色素樹脂粒子の場合》

[比較例40, 43, 46, 49] (化合物4-1~4-4内包ポリメラミン粒子)

実施例 1 において、化合物 1-1 を、無電荷の化合物 4-1（比較例 40）、化合物 4-2（比較例 43）、化合物 4-3（比較例 46）、化合物 4-4（比較例 49）に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0155] すなわち、比較例 40, 43, 46, 49 は、変動係数は 15% 以下であるが、尿素樹脂の粒子に対して電荷を有しない蛍光色素（化合物 4-1~4-4）を内包した色素樹脂粒子を製造して、免疫組織染色、形態染色および組織像の評価等を行った例である。

[0156] [比較例 41, 44, 47, 50]（化合物 4-1~4-4 内包ポリ尿素粒子）

実施例 2 において、化合物 1-1 を、無電荷の化合物 4-1（比較例 41）、化合物 4-2（比較例 44）、化合物 4-3（比較例 47）、化合物 4-4（比較例 50）に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0157] すなわち、比較例 41, 44, 47, 50 は、変動係数 15% 以下であるが、ポリ尿素製の樹脂粒子に対して、電荷を有しない蛍光色素（化合物 4-1~4-4）を固定した場合の例である。

[0158] [比較例 42, 45, 48, 51]（化合物 4-1~4-4 内包ポリキシレン粒子）

実施例 3 において、化合物 1-1 を、無電荷の化合物 4-1（比較例 42）、化合物 4-2（比較例 45）、化合物 4-3（比較例 48）、化合物 4-4（比較例 51）に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0159] すなわち、比較例 42, 45, 48, 51 は、変動係数 15% 以下であるが、ポリキシレン製の樹脂粒子に対して、電荷を有しない蛍光色素（化合物 4-1~4-4）を固定した場合の例である。

[0160]

[表5]

	色素略号 (化合物)	色素 電荷	色素の 置換基	色素分子 量	置換基 数	色素分子 量/ 有電荷 置換基数	樹脂の種類	樹脂 電荷	色素の 溶出量	色素樹 脂粒子 の変動 係数[%]	評価				
											評価 1: Her2 染色像 の色にじみ	評価 2: Her2 染色像 の明るさ	評価 3: 輝点計測		
比較例 40	4-1	無し	無し	0	0	無	ポリメラミン	+	127	10	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 41							ポリ尿素	+	127	14	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 42							ポリキシレン	+	565	11	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 43	4-2	無し	無し	0	0	無	ポリメラミン	+	74	10	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 44							ポリ尿素	+	74	10	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 45							ポリキシレン	+	154	11	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 46	4-3	無し	無し	0	0	無	ポリメラミン	+	94	11	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 47							ポリ尿素	+	94	10	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 48							ポリキシレン	+	244	12	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 49	4-4	無し	無し	0	0	無	ポリメラミン	+	83	12	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 50							ポリ尿素	+	83	11	×	×	計測不可	×	計測不可
比較例 51							ポリキシレン	+	189	13	×	×	計測不可	×	計測不可

[0161] (考察)

蛍光色素が電荷を有しておらず樹脂とイオン結合しない上に、共有結合もしないことから色素溶出量が大きく、染色後の蛍光観察時の色素にじみが多くなるため、輝点計測等が困難となった（比較例 40～51）。

[0162] 《マイナス電荷の樹脂にマイナス電荷の蛍光色素を固定した変動係数15%以下の色素樹脂粒子の場合》

[比較例52] (化合物1-1内包ポリフェノール粒子)

実施例 1 において、使用したプラス電荷のポリメラミン樹脂の代わりに、蛍光色素（化合物 1-1）の電荷と同じマイナス電荷を有するポリフェノール樹脂を用いた以外は同様に色素樹脂粒子の製造、ストレプトアビジンの調製および形態染色等を行った（表 6 参照）。

[0163] [比較例53] (化合物1-1内包ポリキシレン粒子)

実施例 1 において、使用した樹脂をプラス電荷のポリメラミン樹脂の代わりにマイナス電荷のポリキシレン樹脂を用いた以外は同様に色素樹脂粒子の製造、ストレプトアビジンの調製および形態染色等を行った（表 6 参照）。

[0164] [比較例54, 56, 58, 60, 62, 64] (化合物1-2～1-7内包ポリフェノール粒子)

比較例 52 において、化合物 1-1 を、化合物 1-2（比較例 54）、化合物 1-3（比較例 56）、化合物 1-4（比較例 58）、化合物 1-5（比較例 60）、化合物 1-6（比較例 62）、化合物 1-7（比較例 64）

に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0165] すなわち、比較例 5 2, 5 4, 5 8, 6 0, 6 2, 6 4 は、変動係数は 15%以下であるが、マイナス (-) 電荷のポリフェノール樹脂の粒子に対して、同一のマイナス (-) 電荷を有する蛍光色素 (化合物 1-1~1-7) を内包させた色素樹脂粒子を製造して、免疫組織染色、形態染色および組織像の評価等を行った例である。

[0166] [比較例55, 57, 59, 61, 63, 65] (化合物1-2~1-7内包ポリキシレン粒子)

比較例 5 3 において、化合物 1-1 を、化合物 1-2 (比較例 5 5)、化合物 1-3 (比較例 5 7)、化合物 1-4 (比較例 5 9)、化合物 1-5 (比較例 6 1)、化合物 1-6 (比較例 6 3)、化合物 1-7 (比較例 6 5) に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0167] すなわち、比較例 5 3, 5 5, 5 7, 5 9, 6 1, 6 3, 6 5 は、変動係数は 15%以下であるが、マイナス (-) 電荷のポリキシレン樹脂の粒子に対して、同一のマイナス (-) 電荷を有する蛍光色素 (化合物 1-1~1-7) を内包させた色素樹脂粒子を製造して、免疫組織染色、形態染色および組織像の評価等を行った例である。

[0168] [表6]

	色素略号 (化合物)	色素 電荷	色素の 置換基	色素分子 量	置換基 数	色素分 子量/ 有電荷 置換基 数	樹脂の 種類	樹脂 電荷	色素の 溶出量	色素樹 脂粒子 の変動 係数[%]	評価		
											評価 1: Her2 染色像 の色素に じみ	評価 2: Her2 染色像 の明るさ	評価 3: 輝点計測
比較例 52	1-1	-	スルホ基	578	2	289	ポリフェノール	-	256	9	×	×	×
比較例 53							ポリキシレン	-	152	11	×	×	×
比較例 54	1-2	-	スルホ基	693	4	173	ポリフェノール	-	188	10	×	×	×
比較例 55							ポリキシレン	-	175	11	×	×	×
比較例 56	1-3	-	スルホ基	924	4	231	ポリフェノール	-	208	10	×	×	×
比較例 57							ポリキシレン	-	168	12	×	×	×
比較例 58	1-4	-	スルホ基	397	2	199	ポリフェノール	-	143	11	×	×	×
比較例 59							ポリキシレン	-	121	13	×	×	×
比較例 60	1-5	-	スルホ基	436	2	218	ポリフェノール	-	101	10	×	×	×
比較例 61							ポリキシレン	-	96	12	×	×	×
比較例 62	1-6	-	スルホ基	472	3	157	ポリフェノール	-	136	10	×	×	×
比較例 63							ポリキシレン	-	124	12	×	×	×
比較例 64	1-7	-	スルホ基	1398	4	350	ポリフェノール	-	189	10	×	×	×
比較例 65							ポリキシレン	-	156	12	×	×	×

[0169] (考察)

蛍光色素と樹脂の電荷が同一のマイナス電荷の場合、電氣的に反発し合っ

て、蛍光色素が樹脂にイオン結合で固定されず、また、共有結合もしていないので、染色後の蛍光観察において蛍光色素の滲みが生じて、輝度や輝点の計測が困難となった（比較例52～65）。

[0170] 《プラス電荷の樹脂にプラス電荷の蛍光色素を固定した変動係数15%以下の色素樹脂粒子場合》

[比較例66]（化合物1-8内包ポリメラミン粒子）

実施例1において、マイナス電荷の蛍光色素（化合物1-1）の代わりに、樹脂と同じプラス電荷の蛍光色素（化合物1-8）を用いた以外は同様に色素樹脂粒子の製造、組織染色等を行った（表7参照）。

[0171] [比較例67]（化合物1-8内包のポリ尿素粒子）

実施例2において、化合物1-1の代わりに化合物1-8を用いた以外は同様に色素樹脂粒子の製造、組織染色等を行った（表7参照）。

[0172] [比較例68]（化合物1-8内包のポリキシレン粒子）

実施例3において、化合物1-1の代わりに化合物1-8を用いた以外は同様に色素樹脂粒子の製造、組織染色等を行った（表7参照）。

[0173] [表7]

	色素略号 (化合物)	色素 電荷	色素の 置換基	色素分子量	置換基数	色素分子 量/ 有電荷 置換基数	樹脂の種類	樹脂 電荷	色素の 溶出量	色素樹 脂粒子 の変動 係数[%]	評価		
											評価1: Her2染色像 の色素にじみ	評価2: Her2染色像 の明るさ	評価3: 輝点計測
比較例66	1-8	+	アンモニウム基	1366	4	342	ポリメラミン	+	110	14	×	×	×
比較例67							ポリ尿素	+	124	12	×	×	×
比較例68							ポリキシレン	+	152	11	×	×	×

[0174]（考察）

蛍光色素と樹脂の電荷が同一のプラス電荷の場合、電氣的に反発し合っており、蛍光色素が樹脂にイオン結合で固定されず、染色後の蛍光観察において蛍光色素の滲みが生じて、輝度や輝点の計測が困難となった（比較例66～8）。

[0175]

[表8]

	色素略号 (化合物)	色素 電荷	色素の 置換基	色素分子量	置換基数	色素分子 量/有電荷 置換基数	樹脂の 種類	樹脂 電荷	色素の 溶出量	色素樹 脂粒子 の変動 係数	評価1: Her2染色 液の色素 にじみ	評価2: Her2染色 像の明るさ	評価3: 輝点 計測
実施例38	1-1	-	スルホ基	578	2	289	ポリメミン	+	5	3	△	○	○
実施例39	1-2	-	スルホ基	693	4	173	ポリメミン	+	1	3	○	○	○
実施例40	1-3	-	スルホ基	924	4	231	ポリメミン	+	1	4	○	○	○
実施例41	1-4	-	スルホ基	397	2	199	ポリメミン	+	1	5	○	○	○
実施例42	1-5	-	カルボキ シル基	436	2	218	ポリメミン	+	9	8	△	△	○
実施例43	1-6	-	スルホ基	472	3	157	ポリメミン	+	1	5	○	○	○
実施例44	1-7	-	スルホ基	1399	4	350	ポリメミン	+	0	4	○	◎	○
実施例45	2-1	-	カルボキ シル基	430	1	430	ポリメミン	+	20	5	△	△	○
実施例46	2-2	-	スルホ基	605	1	605	ポリメミン	+	19	5	△	△	○
実施例47	3-1	無し	アミド結 合(共有 結合)	316	2	316	ポリメミン	+	0	5	○	△	○
実施例48	3-2	無し	アミド結 合(共有 結合)	439	4	439	ポリメミン	+	0	5	○	△	○

## [0176] [実施例38] (化合物1-1内包ポリメミン粒子)

実施例1において、色素樹脂粒子の純水による洗浄の遠心分離の時間を15分から10分に短縮した。また、実施例1と同様に5回の遠心分離と上澄み除去と超純水への再分散の操作の後、新たに遠心分離を1分行ない、沈殿物を取り除いた。それ以外は実施例1と同様とした。

## [0177] [実施例39~48] (化合物1-2~3-2内包ポリメミン粒子)

実施例38において、化合物1-1を、化合物1-2(実施例39)、化合物1-3(実施例40)、化合物1-4(実施例41)、化合物1-5(実施例42)、化合物1-6(実施例43)、化合物1-7(実施例44)、化合物2-1(実施例45)、化合物2-2(実施例46)、化合物3-1(実施例47)、化合物3-2(実施例48)に変更した以外は同様にして色素樹脂粒子の作製等を行った。

[0178] 以上、本発明を実施の形態および実施例に基づいて説明してきたが、本発明はこれら実施例等に限定されず、特許請求の範囲に記載された本発明の要旨を逸脱しない限り、設計変更等は許容される。

## 請求の範囲

- [請求項1] 熱硬化性樹脂の樹脂粒子および該樹脂粒子に固定された蛍光色素を有する色素樹脂粒子を染色成分として含有する組織染色用染色剤であって、
- 前記樹脂粒子が前記蛍光色素と逆の電荷の置換基を有して前記蛍光色素とイオン結合、または、共有結合しており、
- 前記色素樹脂粒子の粒径の変動係数が15%以下である、組織染色用染色剤。
- [請求項2] 前記蛍光色素が前記樹脂粒子に内包されている、請求項1に記載の組織染色用染色剤。
- [請求項3] 前記イオン結合に寄与している置換基が、前記蛍光色素はマイナス電荷の置換基であり、前記樹脂粒子はプラス電荷の置換基である、請求項1または2に記載の組織染色用染色剤。
- [請求項4] 前記蛍光色素全体の電荷および前記樹脂粒子全体の電荷が、前記イオン結合に寄与している置換基の電荷と同一の電荷である、請求項1～3いずれか1項に記載の組織染色用染色剤。
- [請求項5] 前記蛍光色素は、蛍光色素1分子の分子量／電荷を有する置換基数<400である、請求項1～4のいずれか1項に記載の組織染色用染色剤。
- [請求項6] 前記蛍光色素は、蛍光色素1分子あたりにマイナス電荷の置換基を少なくとも2つ有する、請求項3～5いずれか1項に記載の組織染色用染色剤。
- [請求項7] 前記プラス電荷の置換基がアミノ基であり、
- 前記マイナス電荷の置換基がスルホ基またはカルボキシル基である、請求項1～6のいずれか1項に記載の組織染色用染色剤。
- [請求項8] 前記蛍光色素のマイナス電荷の置換基の少なくとも1つがスルホ基である、請求項6または7に記載の組織染色用染色剤。
- [請求項9] 前記蛍光色素が、ローダミン、BODIPY、スクアリリウムまた

は芳香族炭化水素系色素分子である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の組織染色用染色剤。

[請求項10] 前記樹脂粒子がメラミンを用いて形成され、前記蛍光色素がローダミンまたは芳香族炭化水素系色素分子である、請求項 9 に記載の組織染色用染色剤。

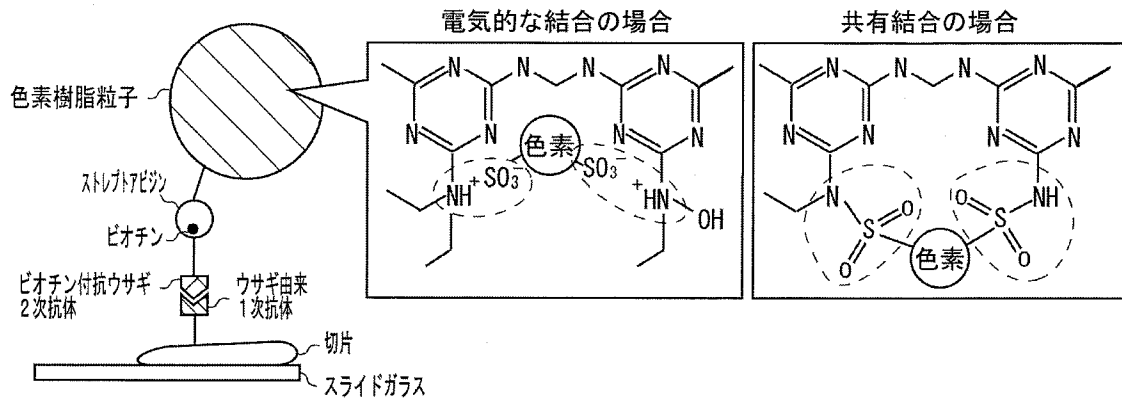
[請求項11] 前記樹脂粒子と前記蛍光色素とが、アミド結合、エステル結合、エーテル結合および C-N 結合のいずれかによって共有結合している、請求項 1 または 2 に記載の組織染色用染色剤。

[請求項12] 前記熱硬化性樹脂が、メラミン、尿素、グアナミン、フェノール、キシレンおよびこれらの誘導体からなる群から選択された少なくとも 1 つのモノマーから形成される構成単位を含み、かつその構成単位に含まれる水素の少なくとも一部が電荷を有する置換基に置き換えられている、請求項 1～9 および 11 のいずれか 1 項に記載の組織染色用染色剤。

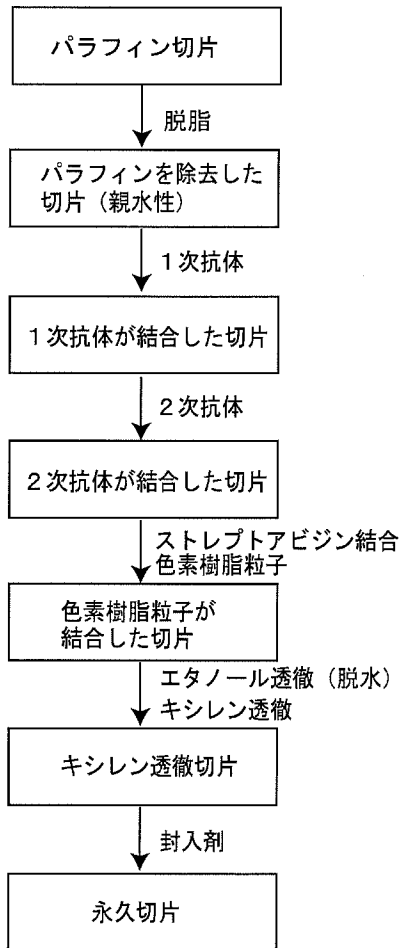
[請求項13] 前記樹脂粒子を合成反応により製造する際の反応系に界面活性剤を添加することにより前記色素樹脂粒子の変動係数を 15% 以下とする工程を含む、組織染色用染色剤の製造方法。

[請求項14] 請求項 1～12 の何れか 1 項に記載の組織染色用染色剤を構成成分として含む、組織染色用キット。

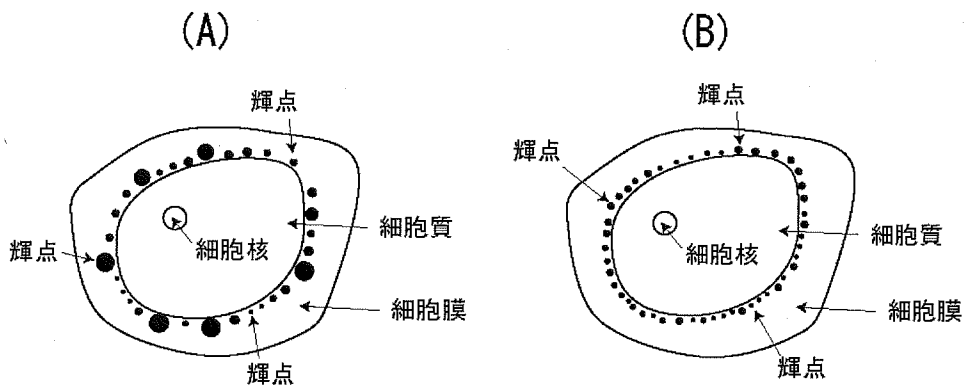
【図1】



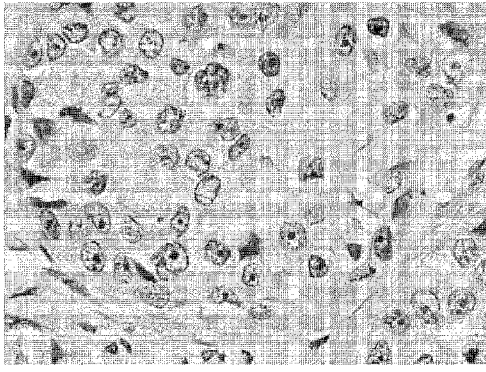
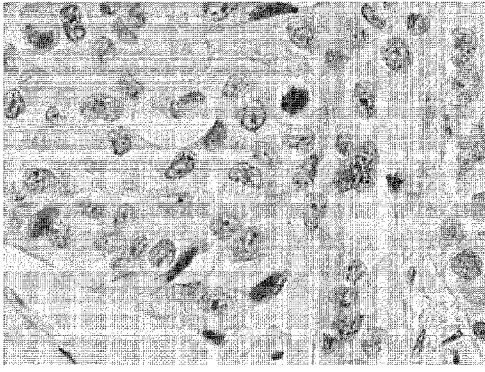
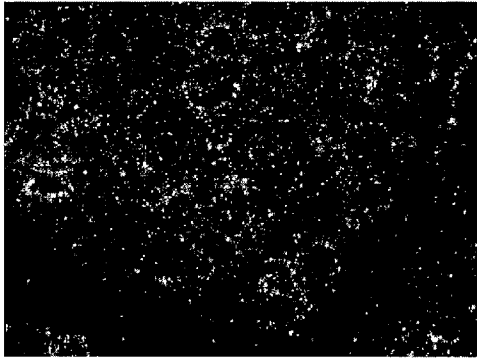
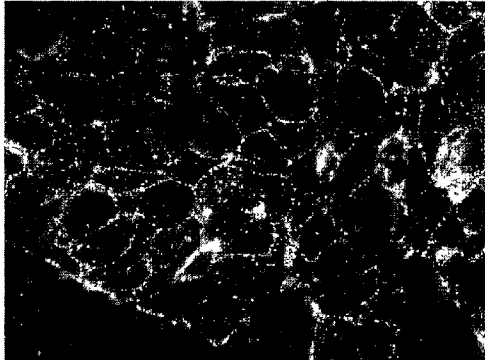
【図2】



【図3】



[図4]

	(A) 粒径の変動係数が悪い (21%以下)	(B) 粒径の変動係数が良い (12%以下)
明視野画像		
蛍光画像		
	輝点サイズにばらつきがあり、粒子1つの輝点か2つの輝点か判別難しく、輝点数の計測が困難。	輝点サイズが揃っており、輝点数の計測が容易。

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/055798

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
G01N33/48(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)  
G01N33/48

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2012/029752 A1 (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 08 March 2012 (08.03.2012), paragraphs [0001], [0020], [0039] & US 2013/0157287 A1 & EP 2613138 A1	1-14
Y	US 4326008 A (California Institute of Technology), 20 April 1982 (20.04.1982), column 4, line 43 to column 5, line 41 (Family: none)	1-12,14
Y	JP 2009-14729 A (The Furukawa Electric Co., Ltd.), 22 January 2009 (22.01.2009), paragraph [0043] & WO 2007/097377 A1 & US 2009/0068639 A1	1-14

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 27 March, 2014 (27.03.14)	Date of mailing of the international search report 08 April, 2014 (08.04.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/055798

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 2007-178315 A (Toyobo Co., Ltd.), 12 July 2007 (12.07.2007), paragraphs [0005], [0006] (Family: none)	13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48(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. G01N33/48		
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 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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) CAplus(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2012/029752 A1 (コニカミノルタエムジー株式会社) 2012.03.08, [0001][0020][0039] & US 2013/0157287 A1 & EP 2613138 A1	1-14
Y	US 4326008 A (California Institute of Technology) 1982.04.20, col.4 line.43-col.5 line.41 (ファミリーなし)	1-12, 14
Y	JP 2009-14729 A (古河電気工業株式会社) 2009.01.22, 【0043】 & WO 2007/097377 A1 & US 2009/0068639 A1	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「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 27.03.2014	国際調査報告の発送日 08.04.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉田 将志 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 4636

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 2007-178315 A (東洋紡績株式会社) 2007. 07. 12, 【0005】【0006】 (ファミリーなし)	13