(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
2021年10月7日(07.10.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/201233 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/28 (2006.01)　*G01N 33/48* (2006.01)
G01N 1/28 (2006.01)　*G01N 33/536* (2006.01)
G01N 1/30 (2006.01)　*G01N 33/58* (2006.01)
G01N 1/36 (2006.01)

(21) 国際出願番号：　PCT/JP2021/014173

(22) 国際出願日：　2021年4月1日(01.04.2021)

(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 2020-066711　2020年4月2日(02.04.2020)　JP

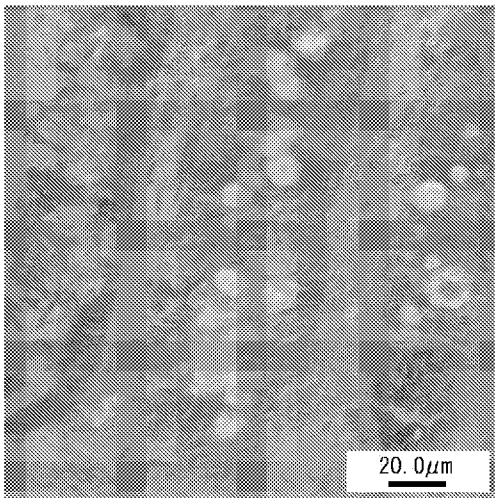
(71) 出願人: 公立大学法人名古屋市立大学(**PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA CITY UNIVERSITY**) [JP/JP]; 〒4678601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄１番地 Aichi (JP). 株式会社林原(**HAYASHIBARA CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎６７５番地１ Okayama (JP).

(72) 発明者: 稲垣 宏(**INAGAKI Hiroshi**); 〒4678601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄１番地 公立大学法人名古屋市立大学 大学院医学研究科内 Aichi (JP). 高瀬 弘嗣(**TAKASE Hiroshi**); 〒4678601 愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄１番地 公立大学法人名古屋市立大学 大学院医学研究科内 Aichi (JP). 草野 創(**KUSANO Hajime**); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎６７５番地１ 株式会社林原内 Okayama (JP). 永池 宏(**NAGAIKE Hiroshi**); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎６７５番地１ 株式会社林原内 Okayama (JP). 有安 利夫(**ARIYASU Toshio**); 〒7028006 岡山県岡山市中区藤崎６７５番地１ 株式会社林原内 Okayama (JP).

(54) **Title:** STAINING METHOD, MICROSCOPIC OBSERVATION METHOD, STAINING AGENT AND STAINING KIT

(54) 発明の名称： 染色方法及び顕微鏡観察方法、並びに染色剤及び染色キット

［図3］



(57) **Abstract:** A staining method that comprises staining a biological sample with a coumarin fluorescent dye to give a fluorescent-stained sample, bringing the fluorescent-stained sample into contact with osmium tetroxide, then embedding the sample in an epoxy resin and slicing the same to give a slice sample containing the fluorescent-stained sample.

(57) 要約：クマリン系蛍光色素を用いて生物学的試料を染色した蛍光染色試料を得て、前記蛍光染色試料を四酸化オスミウムに接触させ、さらにエポキシ樹脂内に包埋した後、切片化することにより、前記蛍光染色試料を含んだ切片試料を得る染色方法。

［続葉有］

WO 2021/201233 A1

(74) 代理人：棚井 澄雄，外 (TANAI Sumio et al.)；〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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).

規則4.17に規定する申立て：

一 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)）

添付公開書類：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

染色方法及び顕微鏡観察方法、並びに染色剤及び染色キット

技術分野

[0001] 本発明は、染色方法及び顕微鏡観察方法、並びに染色剤及び染色キットに関する。本願は、２０２０年４月２日に、日本に出願された特願２０２０－０６６７１１号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 従来、生体組織や微生物等が有する細胞小器官や膜構造等の微細構造を観察する方法として、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の観察を併用する光－電子相関顕微鏡法（ＣＬＥＭ法）が活用されている（例えば、特許文献１）。

一般に、染色に使用される蛍光色素は、四酸化オスミウムやエポキシ化合物等を使用する電子顕微鏡観察のための前処理に対する耐性が低い。このため、蛍光色素で染色した切片試料を電子顕微鏡で観察するためにオスミウム処理及びエポキシ樹脂包埋した場合、切片試料中の蛍光色素が構造変化を受けることによって蛍光が消えてしまう問題があった。

このため、ＣＬＥＭ法を実施する場合、同一の切片試料に対して、蛍光観察用の蛍光染色処理と、電子顕微鏡観察用の前処理の両方を行うことができず、蛍光染色した切片試料の蛍光顕微鏡観察を行った後、さらに電子顕微鏡で観察するために、その切片試料に対してオスミウム処理及びエポキシ樹脂包埋処理を行う必要があった。しかし、このような従来方法では、オスミウム処理及びエポキシ樹脂包埋処理を経た電子顕微鏡観察用の切片試料が、蛍光観察した切片試料と同一の状態である保証が無いという問題があった。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開２０１７－００６０７０号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、単一の切片試料について、蛍光染色とオスミウム処理及びエポキシ樹脂包埋処理を予め施し、その後に蛍光顕微鏡観察及び電子顕微鏡観察を行うことが可能な、染色方法と、その染色方法で得た切片試料の顕微鏡観察方法、並びに前記染色方法に有用な染色剤及び染色キットを提供する。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、クマリン系蛍光色素が四酸化オスミウム及びエポキシ樹脂包埋処理を経ても分解し難いことを見出し、本発明を完成させた。

[0006] ［１］ 下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素を用いて生物学的試料を染色した蛍光染色試料を得て、前記蛍光染色試料を四酸化オスミウムに接触させ、さらにエポキシ樹脂内に包埋した後、切片化することにより、前記蛍光染色試料を含んだ切片試料を得る、染色方法。

［２］ 前記生物学的試料を予め酸化処理することによって、前記生物学的試料に含まれる多糖類が有する水酸基の少なくとも一部をアルデヒド基に変化させる酸化処理を行う、［１］に記載の染色方法。

［３］ 前記多糖類に形成した前記アルデヒド基の一部に前記クマリン系蛍光色素を結合させ、前記蛍光染色試料を得る、［２］に記載の染色方法。

［４］ 前記生物学的試料に対して、前記クマリン系蛍光色素を有する一次抗体を結合させる、［１］に記載の染色方法。

［５］ 前記生物学的試料に対して一次抗体を結合させた後、前記一次抗体に対して間接的に前記クマリン系蛍光色素を結合させる、［１］に記載の染色方法。

［６］ 前記一次抗体がビオチンを有しており、前記ビオチンに対して、前記クマリン系蛍光色素を複数有するアビジン又はストレプトアビジンを結合させる、［５］に記載の染色方法。

［７］ 前記生物学的試料に対してペルオキシダーゼを有する一次抗体もしくは二次抗体を結合させ、過酸化水素存在下で、前記クマリン系蛍光色素を有するチラミド化合物を前記ペルオキシダーゼの触媒作用によりラジカル化

し、前記一次抗体もしくは前記二次抗体の近傍にある蛋白質に前記チラミド化合物を結合させ、前記蛍光染色試料を得る、［１］に記載の染色方法。

［８］　［１］～［７］に記載の何れか一項に記載の染色方法により得た切片試料について、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の両方を用いて観察する、顕微鏡観察方法。

［９］　前記蛍光顕微鏡で観察した画像と、前記電子顕微鏡で観察した画像を重ね合わせた画像を得る、［８］に記載の顕微鏡観察方法。

［１０］　下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素を含む、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される、染色剤。

［１１］　前記生物学的試料が、染色された後に蛍光顕微鏡観察にも供されるものである、［１０］に記載の染色剤。

［１２］　下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素が有する反応性基が化学結合した標識体を含む、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される、染色剤。

［１３］　前記標識体が、抗体、アビジン、ストレプトアビジン、及びチラミド化合物からなる群から選択される１種以上である、［１２］に記載の染色剤。

［１４］　前記生物学的試料が、染色された後に蛍光顕微鏡観察にも供されるものである、［１２］又は［１３］に記載の染色剤。

［１５］　［１０］～［１４］の何れか一項に記載された染色剤を備えた、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される、染色キット。

［１６］　［１２］～［１４］の何れか一項に記載された１種以上の標識体を含む染色剤と、生物学的試料に結合する任意の一次抗体に間接的に前記標識体を結合させる１種以上の試薬と、を含んでなる、［１５］に記載の染色キット。

［１７］　前記試薬として、ビオチンを有し、前記一次抗体に結合する二次抗体を含み、前記標識体として、前記クマリン系蛍光色素が有する前記反応

性基が化学結合したアビジンまたはストレプトアビジンを含んでなる、［１６］に記載の染色キット。

［１８］　前記試薬として、ペルオキシダーゼを有し、かつ前記一次抗体に結合する二次抗体を含み、前記標識体として、前記クマリン系蛍光色素が有する前記反応性基が化学結合したチラミド化合物と、過酸化水素と、を含んでなる、［１６］に記載の染色キット。

［１９］　前記生物学的試料が、染色された後に蛍光顕微鏡観察にも供されるものである、［１５］～［１８］の何れか一項に記載の染色キット。

発明の効果

[0007]　本発明の染色方法にあっては、ＣＬＥＭ法に供する生物学的試料について、クマリン系蛍光色素を用いた蛍光染色に続いて、さらにオスミウム処理及びエポキシ樹脂包埋処理を行うことができる。これにより、従来のＣＬＥＭ法で必要であった処理（蛍光顕微鏡観察に既に使用した試料について行う、オスミウム処理、エポキシ樹脂包埋処理等）を行うことなく、同一の切片試料について、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を連続的に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]実施例１で得た染色切片試料を蛍光顕微鏡で観察した画像Ａ１である。

[図2]実施例１で得た染色切片試料を電子顕微鏡で観察した画像Ｂ１である。

[図3]実施例１で得た画像Ａ１と画像Ｂ１を重ね合わせた画像Ｃ１である。

[図4]実施例２で得た染色切片試料を蛍光顕微鏡で観察した画像Ａ２である。

[図5]実施例２で得た染色切片試料を電子顕微鏡で観察した画像Ｂ２である。

[図6]実施例２で得た画像Ａ２と画像Ｂ２を重ね合わせた画像Ｃ２である。

[図7]参考実験１の結果を示すグラフである。

[図8]参考実験２の結果を示すグラフである。

[図9]参考実験３の結果を示すグラフである。

[図10]参考実験４の結果を示すグラフである。

[図11]参考実験５の結果を示すグラフである。

[図12]参考実験６の結果を示すグラフである。

[図13]参考実験７の結果を示すグラフである。

[図14]参考実験８の結果を示すグラフである。

[図15]参考実験９の結果を示すグラフである。

[図16]参考実験１０の結果を示すグラフである。

[図17]参考実験１１の結果を示すグラフである。

[図18]参考実験１２の結果を示すグラフである。

[図19]参考実験１３の結果を示すグラフである。

[図20]参考実験１４の結果を示すグラフである。

[図21]実施例３の蛍光免疫染色を行った切片試料の観察画像Ａ３である。

[図22]比較例１のＤＡＢ染色を行った切片試料の観察画像Ｂ３である。

[図23]実施例３で得た観察画像Ａ３と、比較例１で得た観察画像Ｂ３を重ね合わせた画像Ｃ３である。

発明を実施するための形態

[0009] 《染色対象》

本発明の染色方法は、細胞、生体組織、微生物、ウイルス等の生物学的試料に適用することができる。染色した試料をＣＬＥＭ法で観察するためには、試料を電子顕微鏡観察に適した厚さの切片にする必要がある。本発明の染色方法に供する試料は、予めパラフィン包埋切片や凍結切片等の切片にされていてもよいし、後述の蛍光染色を行った後に、定法により切片化してもよい。

[0010] パラフィン包埋切片を染色対象として使用する場合、蛍光染色を行う前に、キシレン、エタノール、イオン交換水に順に浸漬する公知方法等により、脱パラフィン処理を行うことが好ましい。

[0011] 《染色方法》

本発明の第一態様は、蛍光染色工程とエポキシ樹脂包埋工程とを有する染色方法である。

蛍光染色工程は、下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素を用いて生

物学的試料を染色した蛍光染色試料を得る工程である。

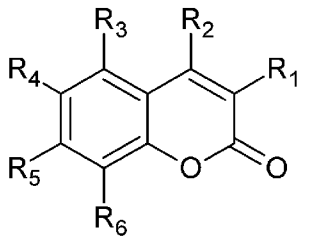
エポキシ樹脂包埋工程は、前記蛍光染色試料を四酸化オスミウムに接触させ、さらにエポキシ樹脂内に包埋した後、切片化することにより、前記蛍光染色試料を含んだ切片試料を得る工程である。以下、各工程を説明する。

[0012] ＜蛍光染色工程＞

本工程では、クマリン系蛍光色素を含む染色液と、染色対象の生物学的試料を接触させることにより、生物学的試料に含まれる目的の物質にクマリン系蛍光色素を直接に又は間接的に結合させる。

下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素を以下では化合物（Ｉ）ということがある。

[0013] [化1]



・・・（Ｉ）

[0014] 式（Ｉ）中、R_1～R_6はそれぞれ独立に、水素原子または任意の置換基であり、

R_1、R_2及びR_5から選択される少なくとも１つは反応性基を含み、

前記反応性基は、アルデヒド、アミン、チオールと化学結合を形成しうる官能基であり、

R_1は芳香環を有してもよく、前記芳香環に結合する１つ以上の水素原子は、リンカーを介して前記反応性基によって置換されていてもよく、

前記芳香環が炭素原子以外のヘテロ原子を有する芳香族複素環である場合、前記ヘテロ原子にリンカーを介して前記反応性基が結合していてもよく、

R_4及びR_6はそれぞれ独立にR_5と環を形成していてもよい。

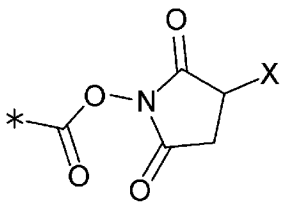
前記芳香環は、１価又は２価の単環式でもよいし、１価又は２価の多環式でもよい。前記芳香環は、１価又は２価の芳香族炭化水素でもよいし、１価又は２価の芳香族複素環でもよい。

[0015] 前記反応性基のうちアルデヒドと化学結合を形成しうる官能基としては、例えば、アミノ基（－ＮＨ$_2$）、ヒドラジド基（－ＣＯＮＨ－ＮＨ$_2$）、アミノキシ基（－Ｏ－ＮＨ$_2$）等が挙げられる。

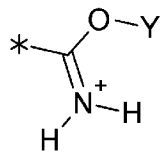
前記反応性基のうちアミンと化学結合を形成しうる官能基としては、例えば、下記式（Ｑ－１）で表されるＮ－ヒドロキシスクシンイミジル基（ＮＨＳ基）、下記式（Ｑ－２）で表されるイミドエステル基等が挙げられる。

前記反応性基のうちチオールと化学結合を形成しうる官能基としては、例えば、下記式（Ｑ－３）で表されるマレイミド基等が挙げられる。

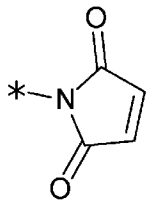
[0016] [化2]



・・・（Ｑ－１）



・・・（Ｑ－２）



・・・（Ｑ－３）

［式中、＊は他の原子に結合していることを表し、Ｘは水素原子又はスルホン酸塩（例えばスルホン酸Ｎａ）を表し、Ｙはメチル基又はエチル基を表す。］

[0017] 前記反応性基はＲ$_1$～Ｒ$_6$が結合するクマリン環構造に直接結合していてもよいし、リンカーを介してクマリン環構造に間接的に結合していてもよい。

[0018] 前記リンカーは２価の有機基である。前記リンカーは前記反応性基をクマリン環構造へ直接又は間接に連結することができる。

前記リンカーとしては、例えば、炭素数１～１０の直鎖状の脂肪族炭化水素基が挙げられる。

[0019] 前記脂肪族炭化水素基を構成する１つ以上のメチレン基は、酸素原子同士が結合する場合を除いて、エーテル基（－Ｏ－）、チオエーテル基（－Ｓ－

）、エステル基（－ＣＯ－Ｏ－）、カルボニル基（－Ｃ(＝Ｏ)－）、カルボキシアミド基（－ＣＯ－ＮＨ－）、スルホニル基（－$ＳＯ_2$－）、スルホンアミド基（－$ＳＯ_2$－ＮＨ－）、ヒドラジド基（－ＣＯＮＨ－ＮＨ－）などの２価の置換基に置換されていてもよい。

[0020] 前記脂肪族炭化水素基を構成する１つ以上のメチレン基は、炭素数５～８の環状の脂肪族炭化水素基に置換されてもよい。この環式基は、環状の脂肪族炭化水素に結合する任意の２つの水素原子が除かれた２価の基である。この環式基を構成する前記水素原子が除かれた３価の炭素原子（－ＣＨ＜）はニトリロ基（－Ｎ＜）に置換されていてもよい。

[0021] 式（Ｉ）中、$Ｒ_1$～$Ｒ_6$の何れか１つ以上が任意の置換基である場合、任意の置換基はそれぞれ独立に、例えば、炭素数１～１０の直鎖又は分岐鎖の脂肪族飽和炭化水素基、炭素数１～８の直鎖又は分岐鎖の脂肪族不飽和炭化水素基、スルホン酸基（－$ＳＯ_3Ｈ$）、カルボン酸基（－ＣＯＯＨ）、アセチル基（－$ＣＯＣＨ_3$）、炭素数１～４のアルコキシ基、ハロゲン原子、水酸基等が挙げられる。さらに、前記任意の置換基として、前記脂肪族飽和炭化水素基又は前記脂肪族不飽和炭化水素基を構成する１つ以上のメチレン基が、酸素原子同士が結合する場合を除いて、－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－$ＳＯ_2$－、又は－ＮＨ－によって置換された置換基も挙げられる。

前記任意の置換基が負電荷を有する酸基である場合、その酸基はナトリウム塩、カリウム塩等の塩を形成していてもよい。前記任意の置換基が正電荷を有する場合（例えば、４級アンモニウムを構成する窒素原子を有する場合）、前記正電荷は任意のカウンターアニオンと塩を形成していてもよいし、負電荷を有する別の任意の置換基と分子内塩を形成していてもよい。前記任意の置換基の水素原子はハロゲン原子によって置換されていてもよい。

前記任意の置換基は負電荷を有するカルボン酸基を含まないことが好ましい。前記酸基を含まないことにより、外部から与えられたエポキシ化合物に対して前記酸基が反応することを防止することができる。

[0022] 式（Ｉ）中、R_1が有する前記芳香環に結合する１つ以上の水素原子は、置換基R_{11}によって置換されていてもよい。置換基R_{11}は、２価の有機基であるリンカー及びこのリンカーの末端に結合した前記反応性基を有する。置換基R_{11}が有するリンカーとして、前述の２価の有機基の例示が挙げられる。前記芳香環に結合する１つ以上の水素原子は、置換基R_{11}以外の任意の置換基で置換されていてもよい。

[0023] 置換基R_{11}としては、例えば、－（CH_2）$_r$－Ｑが挙げられる。ここで、Ｑは前記反応性基の何れかを表し、ｒは０～１０の整数を表す。置換基R_{11}を構成する各メチレン基は、酸素同士が結合する場合を除いて、－Ｏ－、－Ｃ（＝Ｏ）－、－Ｃ（＝Ｏ）Ｏ－、－Ｏ－Ｃ（＝Ｏ）－、－ＮＨ－、－SO_2－、又は－Ｓ－によって置換されていてもよい。

式（Ｉ）中、複数の置換基R_{11}が存在する場合、それらの置換基R_{11}は互いに同じであってもよいし、異なっていてもよい。

[0024] 化合物（Ｉ）は、オスミウム処理やエポキシ樹脂包埋処理に対する耐性を充分に発揮し、蛍光特性が優れる点から、下記式（Ｉ－Ａ）～（Ｉ－Ｈ）で表される化合物であることが好ましい。下記式中、Ｑは前記反応性基を表し、Ｌは前記リンカーを表し、Ａｒは２価の芳香環を表す。

下記式（Ｉ－Ｇ）の「－Ｌ－Ｑ」基は、Ａｒが有する任意の水素原子を置換していてもよいし、Ａｒを構成するヘテロ原子に結合していてもよいことを表す。後者の場合、前記ヘテロ原子は正電荷を有していてもよく、（Z^-）はこの正電荷に対する任意のカウンターアニオンを表す。前者の場合、（Z^-）は存在しなくてよい。あるいは正電荷を有する前記ヘテロ原子と分子内の任意の酸基とが、分子内塩を形成していても良く、その場合も（Z^-）は存在しなくてよい。

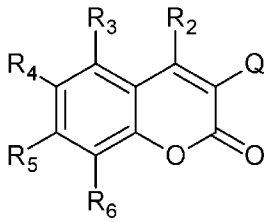
下記式（Ｉ－Ｈ）において、Ａｒは窒素原子を有する芳香族複素環を表し、この窒素原子に「－Ｌ－Ｑ」基が結合していることを表す。前記窒素原子は正電荷を有し、（Z^-）は任意のカウンターアニオンを表す。

前記カウンターアニオンとしては、例えば、ハロゲン化物イオン、スルホ

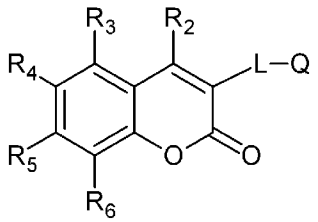
ン酸アニオン、ヘキサフルオロリン酸アニオン、テトラフルオロホウ酸アニオン、ｐ－クロロベンゼンスルホン酸アニオン、ｐ－トルエンスルホン酸アニオン、ベンゼンスルホン酸アニオン、トリフルオロメタンスルホン酸アニオン、トリフルオロ酢酸アニオン等の１価アニオンが挙げられる。正電荷を有する前記窒素原子と分子内の任意の酸基とが、分子内塩を形成していても良く、その場合は（Z^-）が存在しなくてよい。

[0025]

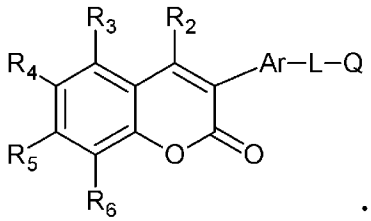
[化3]



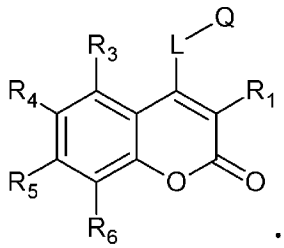
・・・（Ｉ－Ａ）



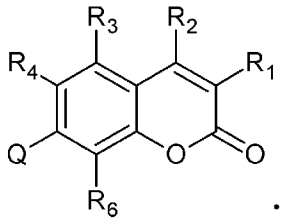
・・・（Ｉ－Ｂ）



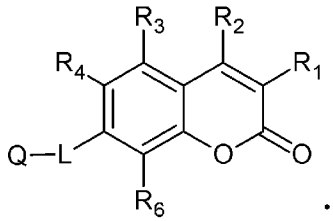
・・・（Ｉ－Ｃ）



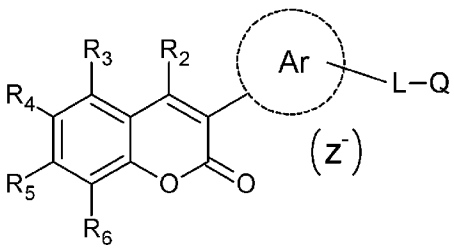
・・・（Ｉ－Ｄ）



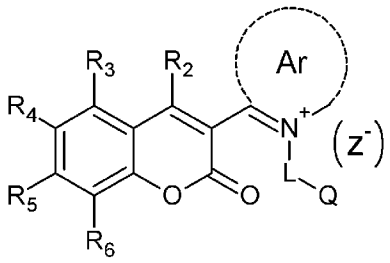
・・・（Ｉ－Ｅ）



・・・（Ｉ－Ｆ）



・・・（Ｉ－Ｇ）



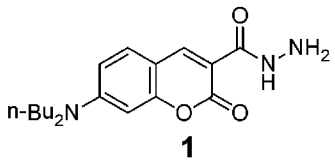
・・・（Ｉ－Ｈ）

[0026] 化合物（Ｉ）の好適な具体例として、例えば、下記式（１）～（１７）で表される化合物が挙げられる。下記式（１）および下記式（４）は、それぞ

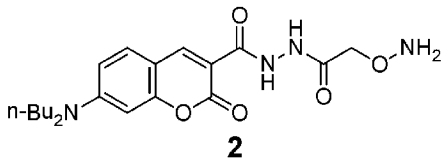
れ後述の実施例で使用したＮＫＸ－４０２３およびＮＫＸ－４１９０である。

[0027] [化4]

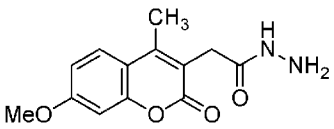
《Ｒ１に反応性基》



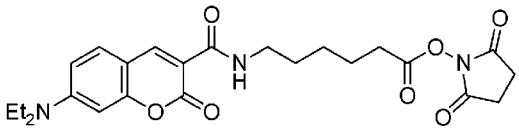
1



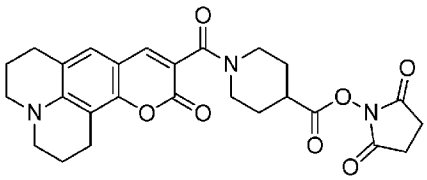
2



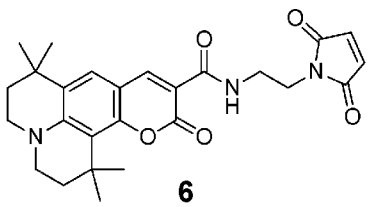
3



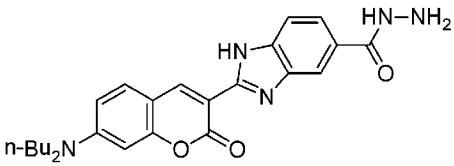
4



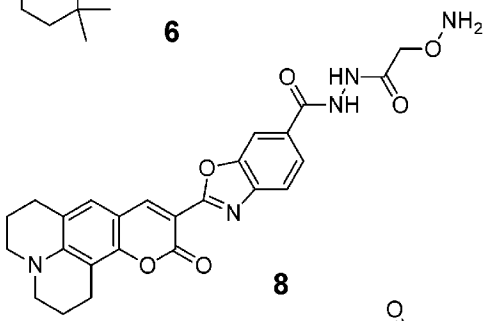
5



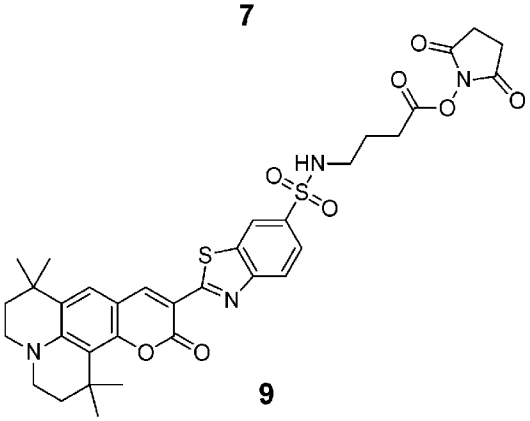
6



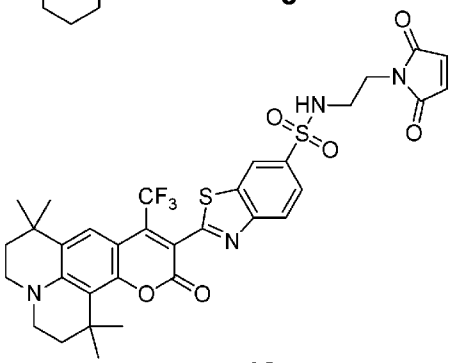
7



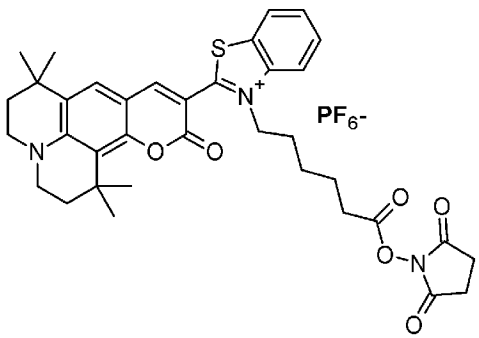
8



9



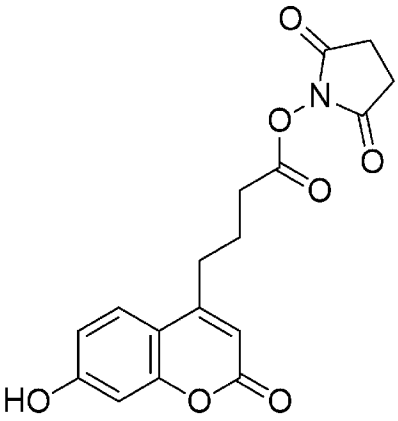
10



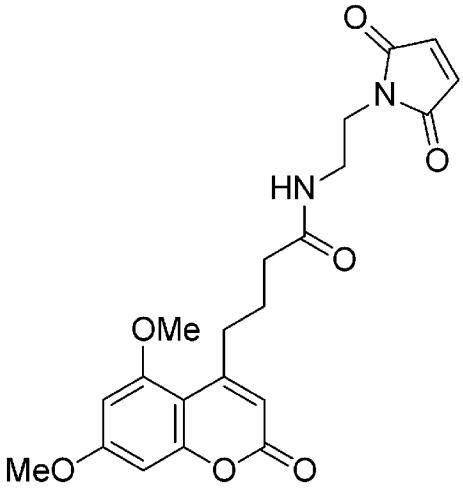
17

[0028] [化5]

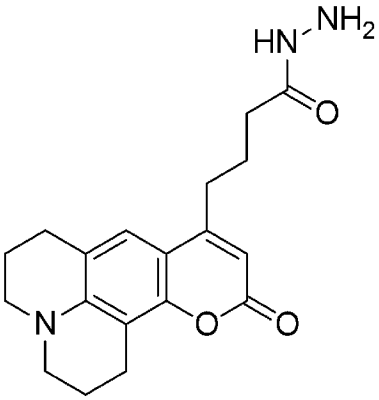
《R 2に反応性基》



11



12

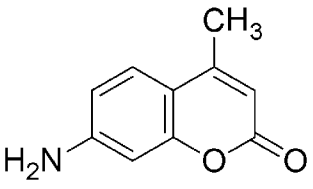


13

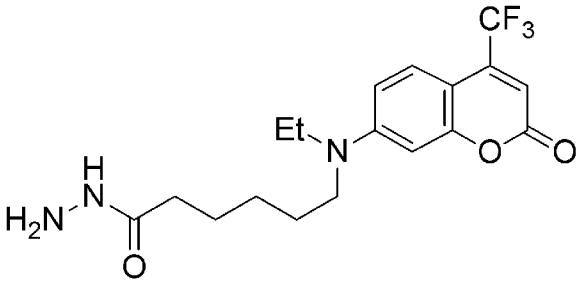
[0029]

[化6]

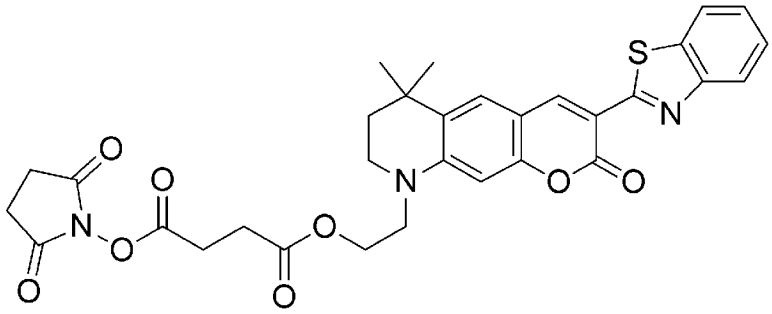
《R 5に反応性基》



14(AMC)



15

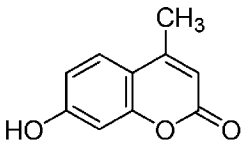


16

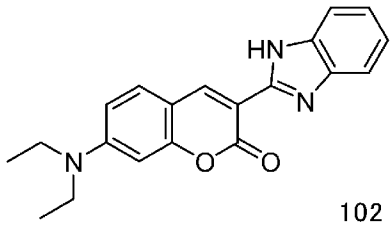
[0030] 下記式（１０１）～（１１２）で表される参考化合物は、前記反応性基を有しない点で化合物（Ｉ）に該当しないが、化合物（Ｉ）と同様のクマリン環構造を有する。よって、ここで例示する参考化合物または同様のクマリン環構造を有する他の参考化合物に、前記反応性基を結合させることにより、本発明に係る化合物（Ｉ）を得ることができる。前記反応性基は、前記参考化合物に直接に結合してもよいし、前記リンカーを介して結合してもよい。前記反応性基及び任意に介在してもよい前記リンカーは、前記参考化合物が有する水素原子を置換して結合してもよいし、前記参考化合物が有するヘテロ原子に結合してもよい。

[0031]

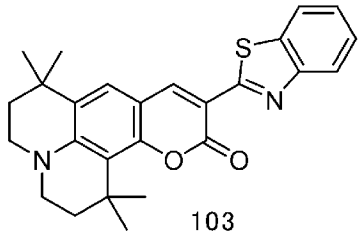
[化7]



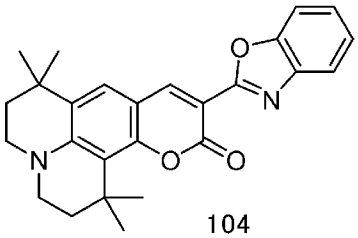
101



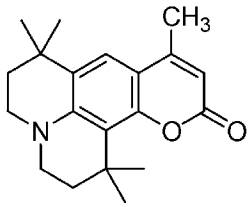
102



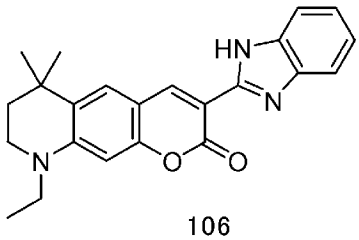
103



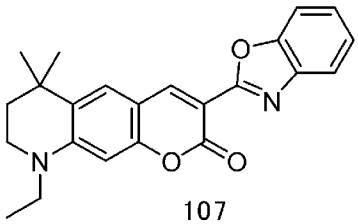
104



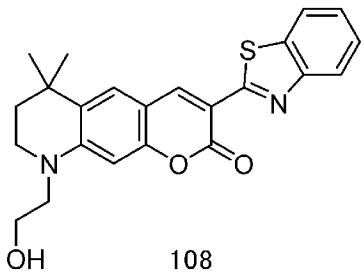
105



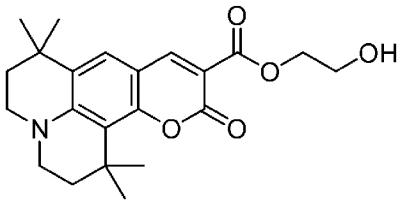
106



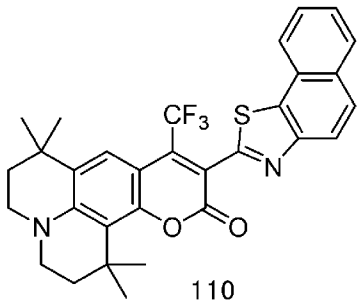
107



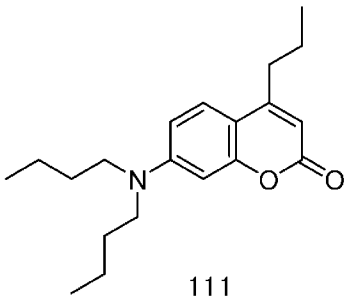
108



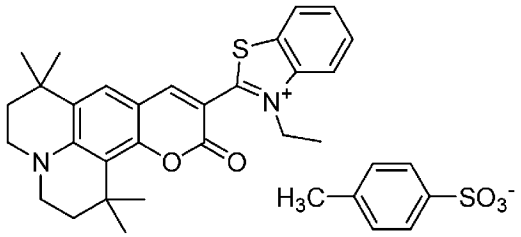
109



110



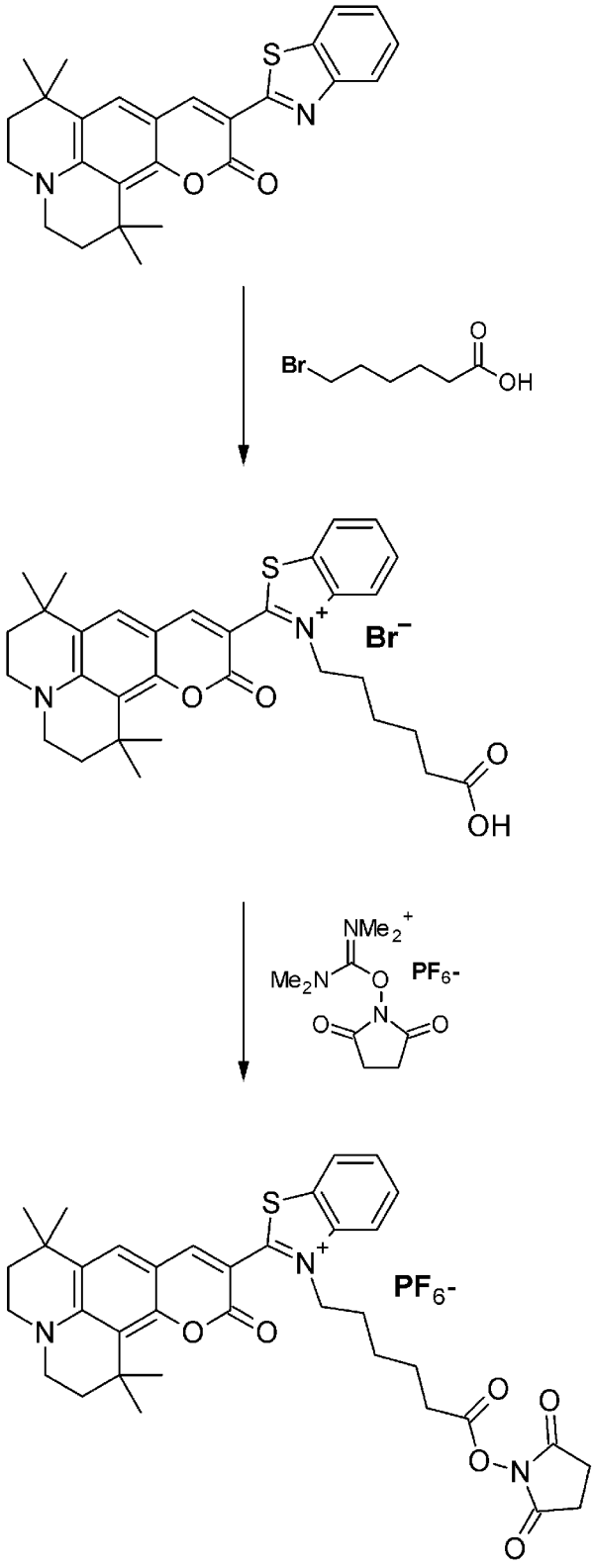
111



112

[0032] 前記参考化合物が有するヘテロ原子に前記リンカーを介して前記反応性基を結合させる一例として、下記反応式で表される合成方法が挙げられる。

[0033] [化8]



[0034] 1種以上の化合物（Ｉ）を含む染色液を染色対象の生物学的試料に接触させて染色する（以下、蛍光染色と記す。）ことにより、前記反応性基の種類

に応じて、生物学的試料に含まれる所望の物質に化合物（Ｉ）を結合させることができる。

[0035] 化合物（Ｉ）が有する反応性基がアルデヒド基と結合する場合、生物学的試料に含まれるアルデヒド基を有する物質に対して化合物（Ｉ）を結合させることができる。

また、本来的にはアルデヒド基を有さない物質であっても、生物学的試料を予め前処理することによって、所望の分子にアルデヒド基を予め形成してもよい。例えば、多糖類を含む粘液を生産する細胞（腺細胞）を蛍光染色する場合、前記細胞を含む組織切片を過ヨウ素酸で処理し、細胞中に含まれる多糖類を酸化することにより、多糖類分子中の水酸基をアルデヒド基に酸化する前処理が挙げられる。この前処理は、ＰＡＳ染色における処理として公知である。

[0036] 前記多糖類としては、酸化剤によって酸化されてアルデヒド基を生成する多糖類であれば特に限定されず、例えば、グルコースを構成単位に有する多糖類が挙げられる。具体的には、例えば、グリコーゲン、粘液たんぱく、糖蛋白質、糖脂質等が挙げられる。前記糖蛋白質にはＦｃ領域が多糖類によって修飾された抗体も含まれる。

[0037] 蛍光染色によって生物学的試料に含まれるアルデヒド基を有する物質と、化合物（Ｉ）をシッフ反応により結合させた後、形成された結合（シッフ塩基）を安定化する目的で、還元的アミノ化試薬を用いてもよい。還元的アミノ化試薬としては、例えば、２－ピコリンボランが挙げられる。還元的アミノ化試薬は蛍光染色で用いる化合物（Ｉ）を含む染色液に適当な濃度で予め添加しておくことができる。

[0038] 化合物（Ｉ）が有する反応性基がアミノ基と結合する場合、生物学的試料に含まれるアミノ基を有する物質に対して化合物（Ｉ）を結合させることができる。アミノ基を有する物質の代表例として、リシン（Ｌｙｓ）残基やアルギニン（Ａｒｇ）残基を有する蛋白質が挙げられる。

[0039] 生物学的試料に対して、アミノ基と結合する反応性基を有する化合物（Ｉ

）を含む染色液を接触させた場合、化合物（Ｉ）は生物学的試料に含まれる蛋白質に非特異的に結合する。目的の蛋白質のみに化合物（Ｉ）を結合させる場合は、目的の蛋白質に対して結合する抗体を使用することが好ましい。つまり、試薬として使用する抗体のアミノ基に化合物（Ｉ）を予め結合させた標識抗体を準備して、この標識抗体の抗原特異性を利用して、標識抗体を生物学的試料に含まれる目的の蛋白質に結合させることにより、標識抗体を介して目的の蛋白質に化合物（Ｉ）を結合させることができる。

[0040] 化合物（Ｉ）が有する反応性基がチオール基と結合する場合、生物学的試料に含まれるチオール基を有する物質に対して化合物（Ｉ）を結合させることができる。チオール基を有する物質の代表例として、システイン（Ｃｙｓ）残基やジスルフィド結合（－Ｓ－Ｓ－）を有する蛋白質が挙げられる。ジスルフィド結合はジチオスレイトール（ＤＴＴ）やβメルカプトエタノールによって還元することによりチオール基に変換することができる。

[0041] 生物学的試料に対して、チオール基と結合する反応性基を有する化合物（Ｉ）を含む染色液を接触させた場合、化合物（Ｉ）は生物学的試料に含まれる蛋白質に非特異的に結合する。目的の蛋白質のみに化合物（Ｉ）を結合させる場合は、目的の蛋白質に対して結合する抗体を使用することが好ましい。つまり、試薬として使用する抗体のチオール基に化合物（Ｉ）を予め結合させた標識抗体を準備して、この標識抗体の抗原特異性を利用して、標識抗体を生物学的試料に含まれる目的の蛋白質に結合させることにより、標識抗体を介して目的の蛋白質に化合物（Ｉ）を結合させることができる。

[0042] 蛍光染色の一例として、例えば、第一の抗体に第一の化合物（Ｉ）を結合させた第一標識抗体と、第二の抗体に第二の化合物（Ｉ）を結合させた第二標識抗体とをそれぞれ準備して、これら２種類の標識抗体を用いて試料を多重に蛍光染色することができる。この場合、各化合物（Ｉ）の蛍光波長が異なり、各抗体の抗原特異性が異なることが好ましい。

[0043] 化合物（Ｉ）で抗体を標識する蛍光染色において、化合物（Ｉ）で標識するのは、一次抗体であってもよいし、二次抗体であってもよく、さらには、

一次抗体に直接または間接に特異的に結合する他の分子であってもよい。

[0044] ［化学発光増強法］

化合物（Ｉ）は、アビジン・ビオチンの特異的結合性を利用した標識システム（アビジン・ビオチン-システム）に適用することもできる。例えば、二次抗体をビオチンで標識しておき、この二次抗体に対して結合させるアビジンを化合物（Ｉ）で標識しておくことにより、「抗原＋一次抗体＋二次抗体＋複数のビオチン＋複数のアビジン＋複数の化合物（Ｉ））」という複合体を形成して、目的の抗原に対して、蛍光染色を行うことができる。個々の二次抗体に複数のビオチンを標識しておくことにより、個々の二次抗体に対して複数のアビジンを結合させることができる。このとき、各アビジンに複数の化合物（Ｉ）を標識しておくことにより、結果として、目的の抗原に対して多数の化合物（Ｉ）を間接的に結合させることができる。

上記の方法において、アビジンに代えてストレプトアビジンを使用してもよい。

[0045] 化合物（Ｉ）は、ＣＡＲＤ（Ｃａｔａｌｙｚｅｄ　ｒｅｐｏｒｔｅｒ　ｄｅｐｏｓｉｔｉｏｎ）法と呼ばれる、酵素を用いたシグナル増幅システムに適用することもできる。例えば西洋わさび由来のペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）とチラミド基質を用いたＣＡＲＤ法が知られている。具体的には、二次抗体をＨＲＰで標識しておき、ＨＲＰの基質である過酸化水素の存在下でチラミド基質を添加すると、チラミド基質が反応性に富むラジカル中間体に変換され、近傍に存在する蛋白質中のチロシン残基やトリプトファン残基に非特異的に共有結合を形成する。つまり、「抗原＋一次抗体＋二次抗体＋ＨＲＰ」の複合体の近傍に、化合物（Ｉ）で標識したチラミド基質を多数集積することにより、目的の抗原又はその近傍に対して、蛍光染色を行うことができる。

[0046] 蛍光染色の簡単な方法としては、例えば、化合物（Ｉ）の１種以上を任意の濃度で含む染色液に、生物学的試料の切片を室温で１５～６０分程度浸漬させた後、取り出し、過剰な化合物を水洗する方法が挙げられる。

前記染色液に含まれる化合物（Ｉ）の合計の濃度としては、従来の蛍光染色に使用される蛍光色素の濃度と同様でよく、例えば０．０１ｇ／Ｌ～０．２ｇ／Ｌが挙げられる。

化合物（Ｉ）が抗体、アビジン、チラミド基質等に予め結合されている場合、染色液に含まれる化合物（Ｉ）の濃度は、これら抗体、アビジン、チラミド基質等の濃度に合わせて適宜設定される。

[0047] 蛍光染色の効率を高める観点から、生物学的試料は予め個片化（ブロック化）された個片化試料であるか、切片化された切片試料であることが好ましい。切片試料の厚さとしては、例えば、１μｍ～５０μｍ程度とすることができる。生物学的試料の切片化は、生物学的試料をパラフィン包埋したり、凍結したりした後に、ミクロトーム等で切片にする等の定法により行われる。

本工程により生物学的試料を蛍光染色して得た蛍光染色試料は、次のエポキシ樹脂包埋工程に供される。

[0048] ＜エポキシ樹脂包埋工程＞

本工程では、前段で得た蛍光染色試料について、透過型電子顕微鏡で観察する試料に対して行われる公知の固定処理と樹脂包埋処理を行う。

まず、蛍光染色試料に対して、グルタルアルデヒドやホルムアルデヒドが含まれた還元剤溶液を接触させて、前固定を行ってもよい。この前固定は任意の処理であり、蛍光染色試料に含まれる蛋白質を変性して固定させることができる。前段の蛍光染色において、抗体やアビジン等を使用した場合、抗原やビオチンに結合した抗体やアビジンを固定することができる。この際、クマリン環骨格を有する化合物（Ｉ）は、後に蛍光観察を行うことができる程度にその化学構造を維持することができる。

なお、前固定は任意の処理であり、前固定を行わずに四酸化オスミウム処理を行っても構わないが、前固定を行った方が細胞構造を充分に保つことができ、電子顕微鏡観察の精度を向上させることができる。

前固定は４℃程度で１時間から一晩ほど行えばよい。

[0049] 次に、蛍光染色試料に対して、四酸化オスミウムが含まれる酸化剤溶液を接触させて、後固定を行う。前固定に続いて後固定を行うことにより、細胞構造を充分に保つことができ、電子顕微鏡観察の精度を向上させることができる。

後固定は氷冷の温度（０～４℃）で１５分～１時間程度行えばよい。

[0050] 後固定に続いて、ウランを用いた重金属染色を行うことが好ましい。具体的には、後固定を行った蛍光染色試料に対して、酢酸ウラニルが含まれる重金属溶液を接触させて染色することが好ましい。重金属は、蛍光染色試料に含まれる蛋白質や一部の脂質に優先的に吸着するので、電子顕微鏡観察においてこれらのコントラストを高めることができる。

また、蛍光染色試料に対して、酢酸ウラニル染色に代えて、或いは酢酸ウラニル染色に加えて、鉛染色を施してもよい。具体的な鉛染色の方法は定法により行うことができる。

[0051] 続いて、重金属染色を行った蛍光染色試料に対して、エタノールやアセトン等の水溶性有機溶媒を接触させて、蛍光染色試料に含まれる水分を脱水させる。例えば、まず５０～７０％エタノール水溶液を接触させ、徐々にエタノール濃度を高めたエタノール水溶液に置換していき、最後にはエタノール１００％に置換する方法が挙げられる。さらに、酸化プロピレン（プロピレンオキシド）等の液状エポキシ化合物やエポキシ樹脂に置換し、蛍光染色試料に含まれる水をエポキシ化合物やエポキシ樹脂に置換した後、６０℃程度で熱重合することにより硬化させる。この結果、蛍光染色試料を固定し、エポキシ樹脂に包埋した、包埋試料が得られる。

[0052] 包埋試料はエポキシ樹脂の塊であるので、定法により、透過型電子顕微鏡観察に適した厚さ、例えば、５０ｎｍ～１２０ｎｍの切片にスライスすることができる。

[0053] 以上の工程で得た切片試料は、蛍光観察用の蛍光染色と、電子顕微鏡観察用のオスミウム処理の両方が施されている。

[0054] 前記切片試料に結合した化合物（Ｉ）は、光で励起された後に蛍光を発す

る。この蛍光を蛍光顕微鏡等で観測することにより、切片試料におけるアルデヒド基を有する物質の分布や、抗体に特異的に結合する抗原の局在等を調べることができる。

化合物（Ｉ）が発する蛍光波長は、化合物（Ｉ）のクマリン環構造が支配的であり、置換基によって蛍光波長が変化する。例えば、３２０ｎｍ～５３０ｎｍ付近の波長、３４０ｎｍ～４５０ｎｍ付近の波長、又は３６５ｎｍ～４０５ｎｍ付近の波長で励起して、可視領域の波長の蛍光として観測することができる。

[0055] 前記切片試料に結合したオスミウムやウラン等の重金属は、切片試料に照射された電子線の向きを変えるので、切片試料の重金属が吸着した領域は、透過する電子が少ない影のように暗い領域として検出される。一方、生体を構成している水素、炭素、酸素、窒素等の軽原子は電子の透過に大きな影響を与えないので、これらが存在する領域は、透過する電子が多い明るい領域として検出される。この結果、重金属が吸着し易い蛋白質や脂質の一部が影となった画像が得られる。

[0056] 本発明の染色方法にあっては蛍光標識物質として化合物（Ｉ）を使用しているので、電子顕微鏡観察用の処理を経た後であっても、充分に蛍光観察を行うことができる。このため、同一の切片試料について、蛍光顕微鏡による観察と電子顕微鏡による観察とを連続的に行うことができる。例えば、公知のＣＬＥＭ法を適用することができる。

同一の切片試料について、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察の両方を連続的に行えることは、病理検査の分野において極めて大きなメリットとなる。つまり、病理検査を行う切片試料において、蛍光顕微鏡の観察により着目した部位について、切片を変更せずに、同一切片の同一部位を電子顕微鏡で観察することができる。

[0057] なお、従来の病理検査においては、切片試料についてまずは蛍光染色を行い、精査すべき箇所が特定された場合には、電子顕微鏡観察するために、その切片試料について固定処理及びエポキシ樹脂包埋処理を行った後、さらに

薄い切片を切り出す処理が行われている。この従来方法であると、蛍光観察した切片試料の厚さと電子顕微鏡観察した切片試料の厚さが異なり、切片を薄く切り出す際にせん断応力やねじれ応力が加わるため、厚さ以外の物理的な状態も厳密には変化してしまう。このため、蛍光観察用の切片試料に含まれる物質又は生物学的な構造情報が、電子顕微鏡用の切片試料には含まれていない、という事態が起こりうる。このため、従来方法では必ずしも正確な病理診断を行えない懸念があった。

[0058] ≪顕微鏡観察方法≫

本発明の第二態様は、第一態様の染色方法により得た切片試料について、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の両方を用いて観察する、顕微鏡観察方法である。

使用する蛍光顕微鏡は、化合物（Ｉ）を励起する光源を備え、化合物（Ｉ）の蛍光を受光する検出器を備えた公知のものを適用できる。使用する電子顕微鏡は、公知の透過型電子顕微鏡を適用できる。具体的な観察方法は公知の方法を適用できる。

前記切片を観察する順序は、蛍光顕微鏡観察を行った後で電子顕微鏡観察を行ってもよいし、電子顕微鏡観察を行った後で蛍光顕微鏡観察を行ってもよいし、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を同時に行うことが可能な装置があれば、同時に行ってもよい。例えば、相対的に倍率が低い蛍光顕微鏡観察を行い、より詳細に観察したい箇所を特定した後で、その特定箇所について電子顕微鏡観察を行う観察方法が挙げられる。

[0059] 蛍光顕微鏡観察で得た画像と電子顕微鏡観察で得た画像を重ね合わせた画像を得ると、電子顕微鏡の画像における化合物（Ｉ）の分布や局在に関する情報が得られる。画像の重ね合わせは、各画像の観察領域（座標）を揃えることにより行われる。具体的な画像の重ね合わせは、公知の画像処理を適用できる。

[0060] 以上の顕微鏡観察方法において、顕微鏡の操作や画像処理は、公知のＣＬＥＭ法と同様に実施することができる。

従来のＣＬＥＭ法では、同一の切片試料について蛍光顕微鏡観察と電子顕

微鏡観察の両方を行うことができなかった。これに対して、本発明では、同一の切片試料について、何ら追加の処理を加えることなく、蛍光顕微鏡観察と電子顕微鏡観察の両方を行うことができる。

[0061] ≪染色剤≫

本発明の第三態様は、前記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素（化合物（Ｉ））を含む染色剤である。本態様の染色剤は、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される。

本発明の第四態様は、前記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素（化合物（Ｉ））が有する反応性基が化学結合した標識体を含む染色剤である。本態様の染色剤は、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される。

第三～第四態様の染色剤を用いることにより、第一態様の染色方法及び第二態様の顕微鏡観察方法を実施することができる。

第三～第四態様の化合物（Ｉ）の説明は第一態様の化合物（Ｉ）の説明と同様であるので、ここで重複する説明は省略する。

[0062] 前記染色剤に含まれる化合物（Ｉ）は１種でもよいし、２種以上でもよい。

前記染色剤の形態は、化合物（Ｉ）を含む粉末又は錠剤等の固体であってもよいし、化合物（Ｉ）が、任意の溶媒に、任意の濃度で溶解又は分散された液体であってもよい。

前記溶媒は化合物（Ｉ）を溶解又は分散可能なものであれば特に限定されず、例えば、精製水、メタノール、エタノール、イソプロパノール等の第１級アルコール、アセトニトリル、ＤＭＳＯ、ヘキサン等のその他の有機溶媒等が挙げられる。

[0063] 第四態様において、化合物（Ｉ）が有する反応性基が化学結合した標識体としては、例えば、前述したように、１種以上の化合物（Ｉ）が一次抗体又は二次抗体に化学結合したもの、１種以上の化合物（Ｉ）がアビジン又はストレプトアビジンに化学結合したもの、１種以上の化合物（Ｉ）がチラミド

基質に化学結合したもの等が挙げられる。

[0064]≪染色キット≫

本発明の第五態様は、第三態様又は第四態様の染色剤を備えた染色キットである。

具体的には、例えば、次の染色キットＡ、染色キットＢが挙げられる。

染色キットＡは、第三態様の染色剤と、生物学的試料に結合する任意の一次抗体に直接的又は間接的に化合物（Ｉ）を結合させる１種以上の試薬と、を含む、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料の染色キットである。

染色キットＢは、第四態様の染色剤と、生物学的試料に結合する任意の一次抗体に間接的に前記染色剤に含まれる前記標識体を結合させる１種以上の試薬と、を備えた染色キットである。

染色キットＢにおいて、前記試薬として、ビオチンを有し、前記一次抗体に結合する二次抗体と、化合物（Ｉ）の反応性基が化学結合したアビジンまたはストレプトアビジンとを含むことが好ましい。前記二次抗体がビオチンを有するとは、前記二次抗体がビオチンによってラベル化されていること、すなわち前記二次抗体にビオチンが結合していることを意味する。ビオチンと抗体の結合は、公知の方法によってなされる。

また、染色キットＢにおいて、前記試薬として、ペルオキシダーゼを有し、前記一次抗体に結合する二次抗体と、化合物（Ｉ）の反応性基が化学結合したチラミド化合物と、過酸化水素とを含むことが好ましい。前記二次抗体がペルオキシダーゼを有するとは、前記二次抗体にペルオキシダーゼが結合していることを意味する。ペルオキシダーゼと抗体とが結合する形態は特に制限されず、公知のコンジュゲーション（ｃｏｎｊｕｇａｔｉｏｎ）方法を適用できる。例えば、前記二次抗体にビオチンが結合されており、前記ペルオキシダーゼにアビジン又はストレプトアビジンが結合されている場合、「二次抗体－ビオチン－アビジン又はストレプトアビジン－ペルオキシダーゼ」という結合の形態が可能である。

また、染色キットＡ及び染色キットＢは、前記生物学的試料に結合する任

意の一次抗体を含んでいてもよい。

実施例

[0065] ［試薬の調製］

＜蛍光染色剤（１）＞

逆浸透膜処理で精製した水（ＲＯ水）（５０ｍｌ）に１ｍｏｌ／Ｌ塩酸（１０μｌ）を溶解した。得られた溶液（約５０ｍｌ）に対して、ＤＭＳＯ（０．１ｍｌ）に、前記式（１）で表されるＮＫＸ－４０２３（０．０１ｇ）を溶解した溶液（２．５μｌ）を添加し、蛍光染色剤（１）を調製した。

[0066] ＜蛍光染色剤（２）＞

ＲＯ水（５０ｍｌ）に１ｍｏｌ／Ｌ塩酸（１０μｌ）を溶解した。得られた溶液（約５０ｍｌ）に対して、ＤＭＳＯ（０．１３ｍｌ）に、７－アミノ－４－メチルクマリン（ＡＭＣ）（０．０１３ｇ）を溶解した溶液（２５μｌ）とＤＭＳＯ（２ｍｌ）に２－ピコリンボラン（０．０５ｇ）を溶解した溶液（０．５ｍｌ）を添加し、蛍光染色剤（２）を調製した。

[0067] ＜蛍光染色剤（３）＞

前記式（４）で表されるＮＫＸ－４１９０の１ｍｇを２１２μｌのＤＭＳＯに溶解し、色素ＤＭＳＯ溶液を調製した。

抗ウサギＩｇＧ抗体ＰＢＳバッファー溶液（２ｍｇ／ｍｌ溶液、メーカー：Ｊａｃｓｏｎ　Ｉｍｍｎｏ　Ｒｅｓｅｒｃｈ、品番：１１１－００５－００３）２００μｌを、遠心式限外濾過フィルターカートリッジ（Ａｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ－０．５、ＮＭＷＬ：５０Ｋ）に移し、１４，０００Ｇで５分間遠心し、約２０μｌに濃縮した。

１．５ｍｌエッペンドルフチューブに濃縮液を移し、０．１Ｍ炭酸水素ナトリウムバッファー（ｐＨ８．４）を加えて、液量を２００μｌに合わせた。そこに、前記の色素ＤＭＳＯ溶液を２μｌ添加し、３７℃で３０分間インキュベートしてＮＫＸ－４１９０を抗体に結合させた。

反応液を遠心式限外濾過フィルターカートリッジに移し、１４，０００Ｇで１０分間遠心して、濃縮し、ＰＢＳバッファーを２００μｌ加えて、再度

、１４，０００Ｇで１０分間遠心して濃縮液を得た。ＰＢＳバッファーで平衡化したゲルろ過カラム（マイクロバイオスピン　カラム６、メーカー：Ｂｉｏ－Ｒａｄ、品番：７３２－６２２１）に前記濃縮液をチャージし、ＰＢＳバッファーで溶出して、抗体に結合しなかった余剰のＮＫＸ－４１９０を除去して、ＮＫＸ－４１９０蛍光標識抗体溶液を得た。

[0068] ＜四酸化オスミウム水溶液＞

２％四酸化オスミウム水溶液（２．５ｍｌ）と、０．２Ｍリン酸緩衝液（５ｍｌ）と、蒸留水（２．５ｍｌ）とを混合して、０．５％四酸化オスミウム／０．１Ｍリン酸緩衝液（１０ｍｌ）を得た。

[0069] ［実施例１］

定法により準備した人体組織のパラフィン包埋切片について、キシレン、エタノール、イオン交換水の順に浸漬する公知方法によって脱パラフィン処理を行った組織切片を得た。

０．５％過ヨウ素酸ナトリウム水溶液に前記組織切片を１０分間室温で浸漬した後、水洗した。この酸化処理により、前記組織切片中の多糖類が有する水酸基の少なくとも一部がアルデヒド基に変化した。

蛍光染色剤（１）５０ｍｌに、前記組織切片を５分間室温で浸漬した後、水洗した。この蛍光染色により、アルデヒド基が形成された前記多糖類に対してＮＫＸ－４０２３が結合した蛍光染色試料を得た。

次に、ドラフト内で、四酸化オスミウム水溶液１０ｍｌに、蛍光染色試料を１０分間氷上で浸漬して、後固定を行った。その後、上昇系列エタノールに３分間ずつ室温で浸漬して脱水した後、プロピレンオキサイドに５分間室温で浸漬した。その後、試料をエポキシ樹脂に包埋し、この蛍光染色試料を６０℃の恒温槽に２４時間置くことにより、エポキシ樹脂が硬化してなる包埋された包埋試料を得た。

次に、ウルトラミクロトームを用いた定法により、包埋試料から、厚さ１００ｎｍに薄片化した切片試料を切り出した。最後に、酢酸ウラニルと鉛染色液を用いて染色を行った。

[0070] 上記で得た切片試料をＣＬＥＭ法で観察し、蛍光顕微鏡で観察した画像Ａ１と、電子顕微鏡で観察した画像Ｂ１と、画像Ａ１と画像Ｂ１を重ね合わせた画像Ｃ１を、それぞれ図１、図２、図３に示す。

図示したように、上記で得た切片試料は、電子顕微鏡観察用の固定処理等が施されているにも関わらず、ＮＫＸ－４０２３に由来する充分な蛍光が、粘液や糖鎖を含む細胞に検出された。これは、固定処理等によってＮＫＸ－４０２３が構造変化していないことを意味する。

蛍光顕微鏡観察により蛍光が観察された領域は、電子顕微鏡観察により、粘液や特定の細胞であることが確かめられ、高倍率で詳細な細胞構造等が明らかになった。これらの画像は、病理診断等に有用な情報を抽出することが可能な程度に高品質であった。

[0071] ［実施例２］

パラフィン包埋切片に代えて、組織をスクロースに浸漬した後に凍結して切片化した凍結切片を使用し、蛍光染色剤（１）に代えて、蛍光染色剤（２）を使用したこと以外は、実施例１と同様に、切片試料を得た。この切片試料をＣＬＥＭ法で観察し、蛍光顕微鏡で観察した画像Ａ２と、電子顕微鏡で観察した画像Ｂ２と、画像Ａ２と画像Ｂ２を重ね合わせた画像Ｃ２を、それぞれ図４、図５、図６に示す。

図示の通り、実施例１と同様に優れた品質の画像が得られた。

[0072] ［参考実験］

前記式（１）で表されるＮＫＸ－４０２３と、前記式（１４）で表されるＡＭＣと、化合物（Ｉ）に該当しない周知の蛍光物質であるＦＩＴＣ（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｉｎ ｉｓｏｔｈｉｏｃｙａｎａｔｅ ｉｓｏｍｅｒ－Ｉ）とについて、エポキシ樹脂に接触する前と後で蛍光強度がどのように変化するか、次の実験で調べた。

[0073] 参考実験１；試験管にエポキシ化合物であるプロピレンオキサイド０．５ｇをアルコール（エタノール）１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４０５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、

ＮＫＸ－４０２３溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。その結果、４６５ｎｍ付近をピークとする強い強度の蛍光が観測された（図７参照）。

また、別の試験管にアルコール（エタノール）３ｍｌとＮＫＸ－４０２３溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４０５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、４６５ｎｍ付近をピークとする強い強度の蛍光が観測された（図７参照）。

以上の結果は、ＮＫＸ－４０２３はエポキシ化合物と接触した後においても充分な蛍光強度を有することを示しており、実施例１の結果と符合している。従って、同様の参考実験において蛍光を失わないクマリン系蛍光色素は、本発明の化合物（Ｉ）として使用できると考えられる。

[0074] 図７のグラフにおいて、プロピレンオキサイドをアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を実線で示した。ＮＫＸ－４０２３をプロピレンオキサイドが含まれるアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を破線で示した。ＮＫＸ－４０２３をアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を２点鎖線で示した。縦軸は蛍光強度（任意の単位：Ａｒｂｉｔｒａｒｙ　ｕｎｉｔ）であり、横軸は蛍光波長（ｎｍ）である。

[0075] 参考実験２；試験管にエポキシ化合物であるプロピレンオキサイド０．５ｇをアルコール（エタノール）１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長３６５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、ＡＭＣ溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。その結果、４３０ｎｍ付近をピークとする強い強度の蛍光が観測された（図８参照）。

また、別の試験管にアルコール（エタノール）３ｍｌとＡＭＣ溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長３６５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、４３０ｎｍ付近をピークとする強い強度の蛍光が観測された（図８参照）。

以上の結果は、ＡＭＣはエポキシ化合物との接触した後においても充分な蛍光強度を有することを示しており、実施例２の結果と符合している。従って、同様の参考実験において蛍光を失わないクマリン系蛍光化合物は、本発明の化合物（Ｉ）として使用できると考えられる。

[0076] 図８のグラフにおいて、プロピレンオキサイドをアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を実線で示した。ＡＭＣをプロピレンオキサイドが含まれるアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を破線で示した。ＡＭＣをアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を２点鎖線で示した。縦軸は蛍光強度（任意の単位）であり、横軸は蛍光波長（ｎｍ）である。

[0077] 参考実験３；試験管にエポキシ化合物であるプロピレンオキサイド０．５ｇをアルコール（エタノール）１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４８８ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、ＦＩＴＣ溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、３５０ｎｍから６００ｎｍの範囲にＦＩＴＣに由来する蛍光の明確なピークは観測されなかった（図９参照）。

また、別の試験管にアルコール（エタノール）３ｍｌとＦＩＴＣ溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４８８ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、５２０ｎｍ付近をピークとする充分な強度の蛍光が観測された（図９参照）。

[0078] 図９のグラフにおいて、プロピレンオキサイドをアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を実線で示した。ＦＩＴＣをプロピレンオキサイドが含まれるアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を破線で示した。ＦＩＴＣをアルコール（エタノール）に溶解した溶液を測定した結果を２点鎖線で示した。縦軸は蛍光強度（任意の単位）であり、横軸は蛍光波長（ｎｍ）である。

[0079] 以上の結果から、化合物（Ｉ）に該当するクマリン系蛍光色素は、エポキ

シ化合物による構造変化を受けず、化合物（Ｉ）に該当しないＦＩＴＣはエポキシ化合物によって構造変化を受け（又は分解され）、蛍光が失活することが分かった。

[0080] 参考実験４；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長３２４ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０１）で表される参考化合物１０１の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、３８０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１０参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０１の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長３２４ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、３８０ｎｍ付近をピークとする強い強度の蛍光が観測された（図１０参照）。

以上の結果は、参考化合物１０１はエポキシ化合物との接触によって蛍光強度が低下する何らかの影響を受けたが、蛍光強度を失うには至らなかったことを示す。従って、参考化合物１０１は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0081] 図１０のグラフにおいて、エタノールのみを測定した結果を２点鎖線で示した。エポキシ化合物であるプロピレンオキサイドをエタノールに溶解した溶液を測定した結果を破線で示した。試料である参考化合物をエタノールに溶解した溶液を測定した結果を実線で示した。試料である参考化合物をプロピレンオキサイドが含まれるエタノールに溶解した溶液を測定した結果を１点鎖線で示した。縦軸は蛍光強度（任意の単位）であり、横軸は蛍光波長（ｎｍ）である。図１１～図２０においても同様に各測定結果を示した。

[0082] 参考実験５；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４３７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０２）で表される参考化合

物１０２の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、４９０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１１参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０２の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４３７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、４９０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１１参照）。

以上の結果は、参考化合物１０２はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０２は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0083] 参考実験６；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４６０ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０３）で表される参考化合物１０３の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、５２０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１２参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０３の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４６０ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、５２０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１２参照）。

以上の結果は、参考化合物１０３はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０３は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0084] 参考実験７；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４５９ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０４）で表される参考化合

物１０４の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、５０５ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１３参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０４の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４５９ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、５０５ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１３参照）。

以上の結果は、参考化合物１０４はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０４は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0085] 参考実験８；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長３８７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０５）で表される参考化合物１０５の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、４６０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１４参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０５の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長３８７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、４６０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１４参照）。

以上の結果は、参考化合物１０５はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０５は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0086] 参考実験９；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４５７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０６）で表される参考化合

物１０６の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、５００ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１５参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０６の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４５７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、５００ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１５参照）。

以上の結果は、参考化合物１０６はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０６は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0087] 参考実験１０；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４５５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０７）で表される参考化合物１０７の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、４９５ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１６参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０７の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４５５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、４９５ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１６参照）。

以上の結果は、参考化合物１０７はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０７は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0088] 参考実験１１；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４５９ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０８）で表される参考化

合物１０８の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、５１０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１７参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０８の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４５９ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、５１０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１７参照）。

以上の結果は、参考化合物１０８はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０８は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0089] 参考実験１２；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長４３５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１０９）で表される参考化合物１０９の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、４７５ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１８参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１０９の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長４３５ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、４７５ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１８参照）。

以上の結果は、参考化合物１０９はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１０９は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0090] 参考実験１３；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長３７７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１１１）で表される参考化

合物１１１の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、４５０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１９参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１１１の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長３７７ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、４５０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図１９参照）。

以上の結果は、参考化合物１１１はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１１１は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0091] 参考実験１４；試験管にプロピレンオキサイド０．５ｇをエタノール１０ｍｌに溶解した溶液３ｍｌを注ぎ、励起波長５２８ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その後、試験管中の溶液に、前記式（１１２）で表される参考化合物１１２の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）を３μＬ添加して、同様に蛍光スペクトルを測定した。

その結果、５７０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図２０参照）。

また、別の試験管にエタノール３ｍｌと上記の参考化合物１１２の溶液（１ｍｇ／ｍｌ）３μＬを注ぎ、励起波長５２８ｎｍで蛍光スペクトルを測定した。その結果、５７０ｎｍ付近をピークとする蛍光が観測された（図２０参照）。

以上の結果は、参考化合物１１２はエポキシ化合物と接触した後においても強い蛍光強度を有することを示す。従って、参考化合物１１２は、前記反応性基が導入されれば、本発明の化合物（Ｉ）として使用できる。

[0092] 上記の参考実験は、電子顕微鏡観察に供する切片試料をエポキシ樹脂に包埋処理する際に、前記切片試料に含まれる蛍光色素がエポキシ化合物によって構造変化を受けるか否かを簡易的に調べる有用な方法である。試験管中で

、蛍光色素とエポキシ化合物とを接触させた後、前記蛍光色素が蛍光を発する構造を維持しているならば、前記蛍光色素は、電子顕微鏡観察に供する切片試料において、エポキシ樹脂包埋処理に対する耐性を有すると考えられる。つまり、その耐性を有する蛍光色素は、本発明の顕微鏡観察方法において使用可能な好ましい蛍光色素である。

[0093] ＜皮膚組織の切片試料の作製＞

ヒトの皮膚組織のパラフィン包埋切片を定法により２つ準備した。これら２つの皮膚切片は、皮膚組織においてほぼ同じ位置から切り出されたものである。

後で詳しく説明するように、一方の皮膚切片については前記蛍光染色剤（３）の標識抗体溶液を用いて蛍光免疫染色を行った。他方の皮膚切片については、市販のペルオキシダーゼ酵素で標識された抗体を用いてＤＡＢ染色を行った。

[0094] ［実施例３］

（蛍光免疫染色）

定法により準備したヒト皮膚組織試料のパラフィン包埋切片について、キシレン、エタノール、イオン交換水の順に浸漬する公知方法によって脱パラフィン処理を行った組織切片を得た。さらに、温浴で９５℃に加熱した１０ｍＭクエン酸バッファー（ｐＨ６．０）に前記組織切片を浸漬し、４５分間インキュベートし、室温で３０分間静置して、抗原賦活化を行った。

組織における非特異反応を防止する目的で、ブロッキング剤（メーカー：ＤＳファーマバイオメディカル、品番：ＵＫ－Ｂ８０）４ｇをＰＢＳバッファー１００ｍｌに溶解して調製したブロッキング試薬に、前記の組織切片を室温にて３０分間浸漬した。

抗サイトケラチン抗体溶液（メーカー：ＤＡＫＯ、品番：Ｚ０６２２）を上記ブロッキング試薬にて５００倍希釈した１次抗体溶液を得た。この溶液に、前記ブロッキング処理を施した組織切片を４℃で終夜浸漬し、１次抗体を反応後、ＰＢＳバッファーにて前記組織切片を洗浄した。前記の蛍光染色

剤（３）の標識抗体溶液を上記ブロッキング試薬にて１００倍希釈した２次抗体溶液を得た。この溶液に、前記組織切片を室温で４時間浸漬し、２次抗体を反応後、ＰＢＳバッファーにて前記組織切片を洗浄して、蛍光免疫染色試料を得た。

次に、ドラフト内で、前記蛍光免疫染色試料を、０．５％グルタルアルデヒド水溶液１０ｍｌに室温で５分間浸漬し、ＰＢＳバッファーにて洗浄後、０．５％四酸化オスミウム水溶液１０ｍｌに室温で２分間浸漬し、水洗した。この一連の処理（後固定）を行った蛍光免疫染色試料を、上昇系列エタノールに３分間ずつ室温で浸漬して脱水した。その後、脱水した蛍光免疫染色試料をプロピレンオキサイドに５分間室温で浸漬し、プロピレンオキサイドが浸透した蛍光免疫染色試料を６０℃の恒温槽に２４時間置くことにより、プロピレンオキサイドが硬化してなるエポキシ樹脂に包埋された試料（包埋試料）を得た。

次に、ウルトラミクロトームを用いた定法により、包埋試料から厚さ５００ｎｍの薄片化した切片試料を切り出した。

[0095] この切片試料を蛍光顕微鏡で観察した画像Ａ３を図２１に示す。この際、公知の色素であるＤＡＰＩの蛍光観察に使用されるフィルター等を用い、励起波長：３８５ｎｍで観察した。この結果、ケラチンが存在すると考えられる領域に強い青色の蛍光が示され、組織の形態が浮き彫りとなった。青色の蛍光は、標識抗体に結合したＮＫＸ－４１９０に由来する。

上記と同様にして、厚さ１００ｎｍで切り出した超薄切片を蛍光顕微鏡で観察した。図示しないが、ケラチンが存在すると考えられる領域に青色の蛍光が示され、組織の形態を確認することができた。

[0096] ［比較例１］

＜ＤＡＢ染色＞

前記他方の皮膚切片を用い、定法に従って自動免疫染色装置（Ｌｅｉｃａ社製：ＢＯＮＤ　ＭＡＸ）にてＤＡＢ染色を行った。この際、発色キット（ＢＯＮＤ　Ｐｏｌｙｍｅｒ　Ｒｅｆｉｎｅ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ、製品コー

ド：ＤＳ９８００）を用いた。要約すると、前記皮膚切片に対して、抗ケラチン抗体を反応させた後、抗ケラチン抗体に結合する酵素標識抗体を２次抗体として反応させる。このようにして得た切片試料に対して、酵素の基質であるＤＡＢを接触させると、抗ケラチン抗体及び酵素標識抗体が存在する領域が褐色に染まる。

ＤＡＢ染色した切片試料を顕微鏡で観察した画像Ｂ３を図２２に示す。抗ケラチン抗体がケラチン特異的に結合することは公知なので、ケラチノサイト（ケラチンを有する角化細胞）が存在する領域が褐色に染まっていることが明らかである。

[0097] ＜蛍光免疫染色とＤＡＢ染色の重ね合わせ＞

図２１に示す蛍光観察画像Ａ３と、図２２に示すＤＡＢ染色の観察画像Ｂ３とを重ね合わせた画像Ｃ３の結果を図２３に示す。この画像Ｃ３において、蛍光が観察される領域と、褐色が観察される領域が非常に良く一致している。従って、皮膚組織の切片試料において、ＮＫＸ－４１９０で標識された二次抗体が抗ケラチン抗体に結合することにより、ケラチノサイトが存在する領域を蛍光で示していることが確認された。

また、この蛍光観察に使用した切片試料は、電子顕微鏡観察を行うための前処理（グルタルアルデヒドを用いた固定、四酸化オスミウムを用いた後固定、エポキシ樹脂への包埋）を既に施してあるので、別の前処理を行うことなく、電子顕微鏡で観察することができる。

また、ＮＫＸ－４１９０は、電子顕微鏡観察を行うための上記の前処理を経た後においても、構造変化せず、蛍光が失活しないことが確認された。

[0098] 以上の結果から、化合物（Ｉ）で標識された抗体が蛍光免疫染色に有用であり、かつ、化合物（Ｉ）の蛍光は電子顕微鏡観察を行うための前処理によって失活しないことが確認されたので、化合物（Ｉ）はＣＬＥＭ法に使用する色素として有用であることは明らかである。

[0099] 以上で説明した各実施形態における各構成及びそれらの組み合わせ等は一例であり、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で、公知の構成の付加、省略、置

換、およびその他の変更が可能である。

産業上の利用可能性

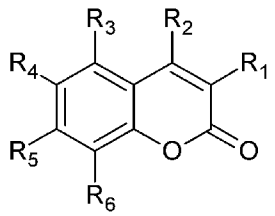
[0100] 本発明は、細胞や組織切片を染色する技術分野、例えば、病理診断や細胞組織学の研究などの医学及び医療分野に広く適用できる。

請求の範囲

[請求項1] 下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素を用いて生物学的試料を染色した蛍光染色試料を得て、

前記蛍光染色試料を四酸化オスミウムに接触させ、さらにエポキシ樹脂内に包埋した後、切片化することにより、前記蛍光染色試料を含んだ切片試料を得る、染色方法。

[化1]



・・・（Ｉ）

［式中、Ｒ$_1$～Ｒ$_6$はそれぞれ独立に、水素原子または任意の置換基であり、

Ｒ$_1$、Ｒ$_2$及びＲ$_5$から選択される少なくとも１つは反応性基を含み、

前記反応性基は、アルデヒド、アミン、チオールと化学結合を形成しうる官能基であり、

Ｒ$_1$は芳香環を有してもよく、前記芳香環に結合する１つ以上の水素原子は、リンカーを介して前記反応性基によって置換されていてもよく、

前記芳香環が炭素原子以外のヘテロ原子を有する芳香族複素環である場合、前記ヘテロ原子にリンカーを介して前記反応性基が結合していてもよく、

Ｒ$_4$及びＲ$_6$はそれぞれ独立にＲ$_5$と環を形成していてもよい。］

[請求項2] 前記生物学的試料を予め酸化処理することによって、前記生物学的試料に含まれる多糖類が有する水酸基の少なくとも一部をアルデヒド基に変化させる酸化処理を行う、請求項１に記載の染色方法。

[請求項3] 前記多糖類に形成した前記アルデヒド基の一部に前記クマリン系蛍

光色素を結合させ、前記蛍光染色試料を得る、請求項２に記載の染色方法。

[請求項4] 前記生物学的試料に対して、前記クマリン系蛍光色素を有する一次抗体を結合させる、請求項１に記載の染色方法。

[請求項5] 前記生物学的試料に対して一次抗体を結合させた後、前記一次抗体に対して間接的に前記クマリン系蛍光色素を結合させる、請求項１に記載の染色方法。

[請求項6] 前記一次抗体がビオチンを有しており、

前記ビオチンに対して、前記クマリン系蛍光色素を複数有するアビジン又はストレプトアビジンを結合させる、請求項５に記載の染色方法。

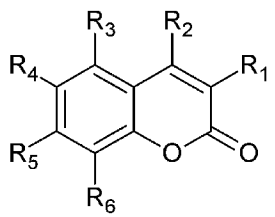
[請求項7] 前記生物学的試料に対してペルオキシダーゼを有する一次抗体もしくは二次抗体を結合させ、過酸化水素存在下で、前記クマリン系蛍光色素を有するチラミド化合物を前記ペルオキシダーゼの触媒作用によりラジカル化し、前記一次抗体もしくは前記二次抗体の近傍にある蛋白質に前記チラミド化合物を結合させ、前記蛍光染色試料を得る、請求項１に記載の染色方法。

[請求項8] 請求項１～７に記載の何れか一項に記載の染色方法により得た切片試料について、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の両方を用いて観察する、顕微鏡観察方法。

[請求項9] 前記蛍光顕微鏡で観察した画像と、前記電子顕微鏡で観察した画像を重ね合わせた画像を得る、請求項８に記載の顕微鏡観察方法。

[請求項10] 下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素を含む、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される、染色剤。

[化2]



・・・（Ｉ）

［式中、R_1～R_6はそれぞれ独立に、水素原子または任意の置換基であり、

R_1、R_2及びR_5から選択される少なくとも１つは反応性基を含み、

前記反応性基は、アルデヒド、アミン、チオールと化学結合を形成しうる官能基であり、

R_1は芳香環を有してもよく、前記芳香環に結合する１つ以上の水素原子は、リンカーを介して前記反応性基によって置換されていてもよく、

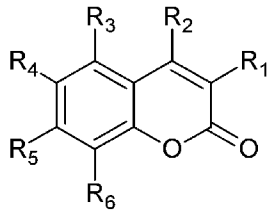
前記芳香環が炭素原子以外のヘテロ原子を有する芳香族複素環である場合、前記ヘテロ原子にリンカーを介して前記反応性基が結合していてもよく、

R_4及びR_6はそれぞれ独立にR_5と環を形成していてもよい。］

［請求項11］ 前記生物学的試料が、染色された後に蛍光顕微鏡観察にも供されるものである、請求項１０に記載の染色剤。

［請求項12］ 下記式（Ｉ）で表されるクマリン系蛍光色素が有する反応性基が化学結合した標識体を含む、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される、染色剤。

［化3］



・・・（Ｉ）

［式中、R_1～R_6はそれぞれ独立に、水素原子または任意の置換基であり、

R_1、R_2及びR_5から選択される少なくとも１つは反応性基を含み、

前記反応性基は、アルデヒド、アミン、チオールと化学結合を形成

しうる官能基であり、

R_1は芳香環を有してもよく、前記芳香環に結合する１つ以上の水素原子は、リンカーを介して前記反応性基によって置換されていてもよく、

前記芳香環が炭素原子以外のヘテロ原子を有する芳香族複素環である場合、前記ヘテロ原子にリンカーを介して前記反応性基が結合していてもよく、

R_4及びR_6はそれぞれ独立にR_5と環を形成していてもよい。］

［請求項13］ 前記標識体が、抗体、アビジン、ストレプトアビジン、及びチラミド化合物からなる群から選択される１種以上である、請求項１２に記載の染色剤。

［請求項14］ 前記生物学的試料が、染色された後に蛍光顕微鏡観察にも供されるものである、請求項１２又は１３に記載の染色剤。

［請求項15］ 請求項１０～１４の何れか一項に記載された染色剤を備えた、電子顕微鏡観察に供される生物学的試料を染色する用途に使用される、染色キット。

［請求項16］ 請求項１２～１４の何れか一項に記載された１種以上の標識体を含む染色剤と、生物学的試料に結合する任意の一次抗体に間接的に前記標識体を結合させる１種以上の試薬と、を含んでなる、請求項１５に記載の染色キット。

［請求項17］ 前記試薬として、ビオチンを有し、前記一次抗体に結合する二次抗体を含み、

前記標識体として、前記クマリン系蛍光色素が有する前記反応性基が化学結合したアビジンまたはストレプトアビジンを含んでなる、請求項１６に記載の染色キット。

［請求項18］ 前記試薬として、ペルオキシダーゼを有し、前記一次抗体に結合する二次抗体を含み、

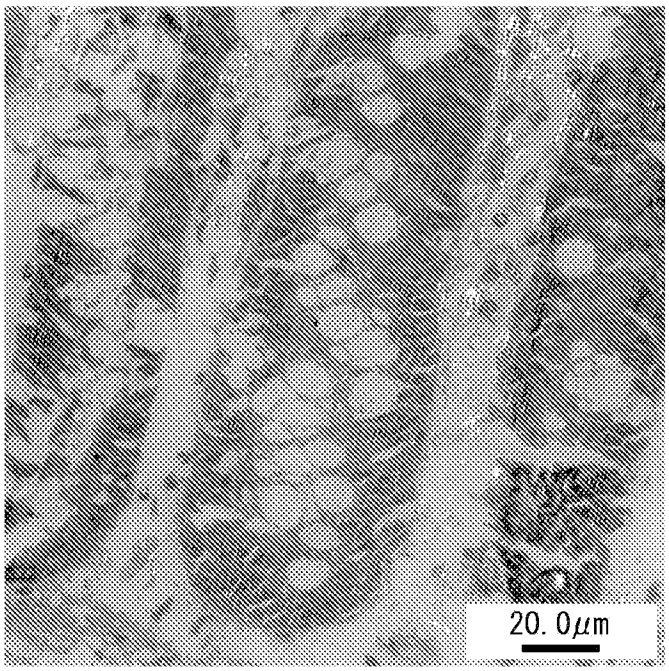
前記標識体として、前記クマリン系蛍光色素が有する前記反応性基

が化学結合したチラミド化合物と、過酸化水素と、を含んでなる、請求項１６に記載の染色キット。

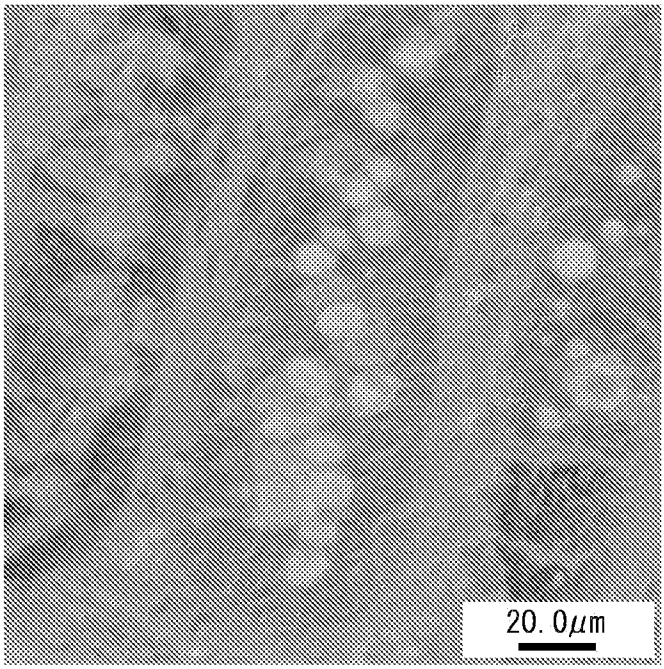
[請求項19] 前記生物学的試料が、染色された後に蛍光顕微鏡観察にも供されるものである、請求項１５～１８の何れか一項に記載の染色キット。

[図1]

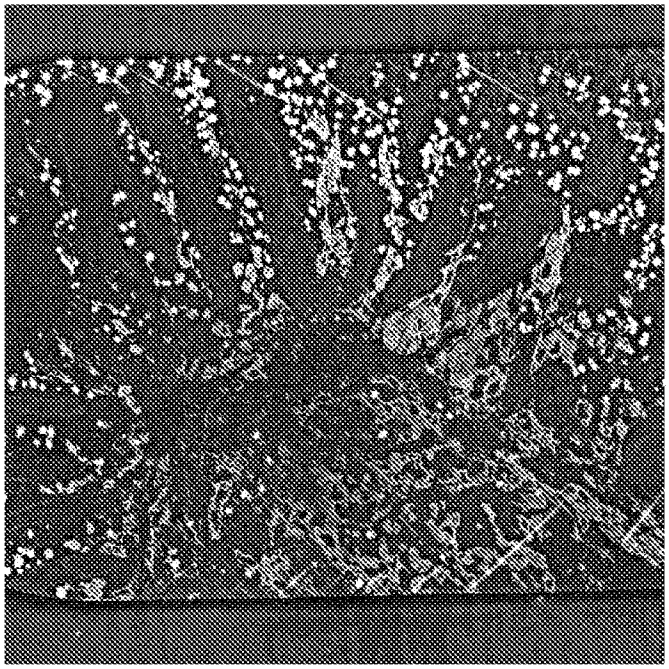
[図2]



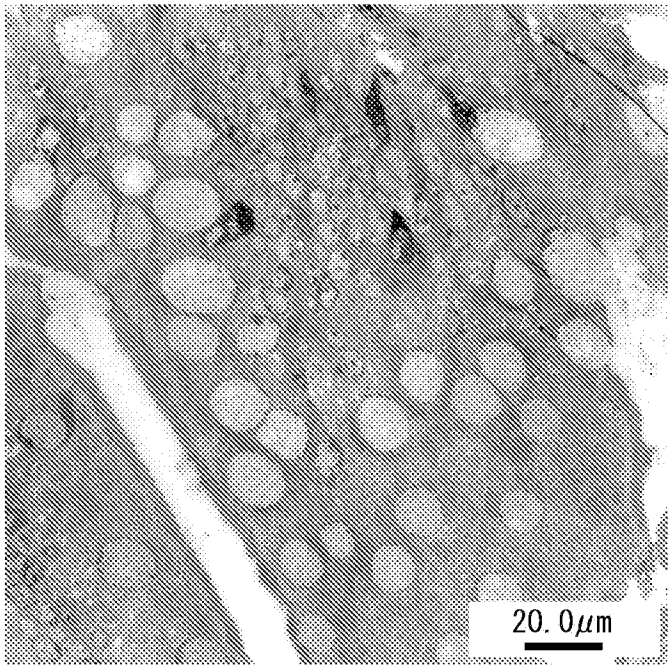
[図3]



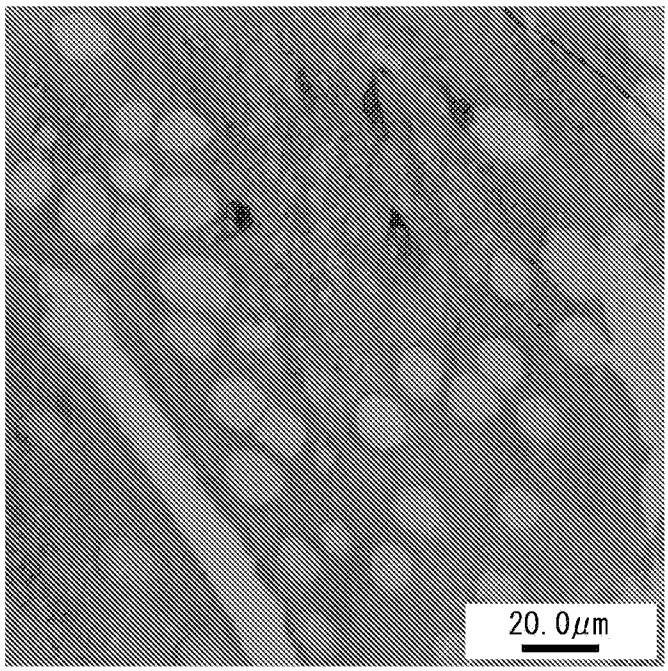
[図4]



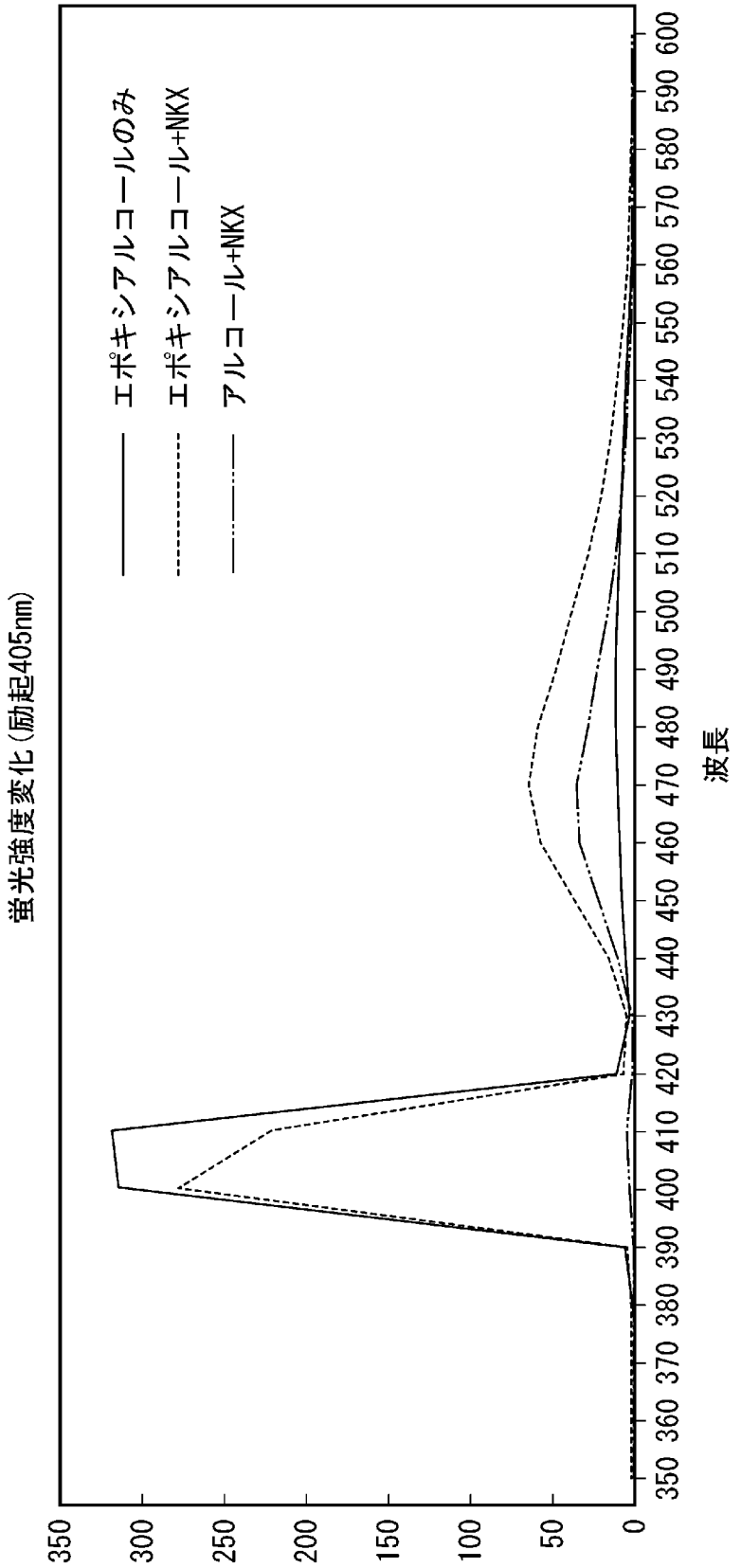
[図5]



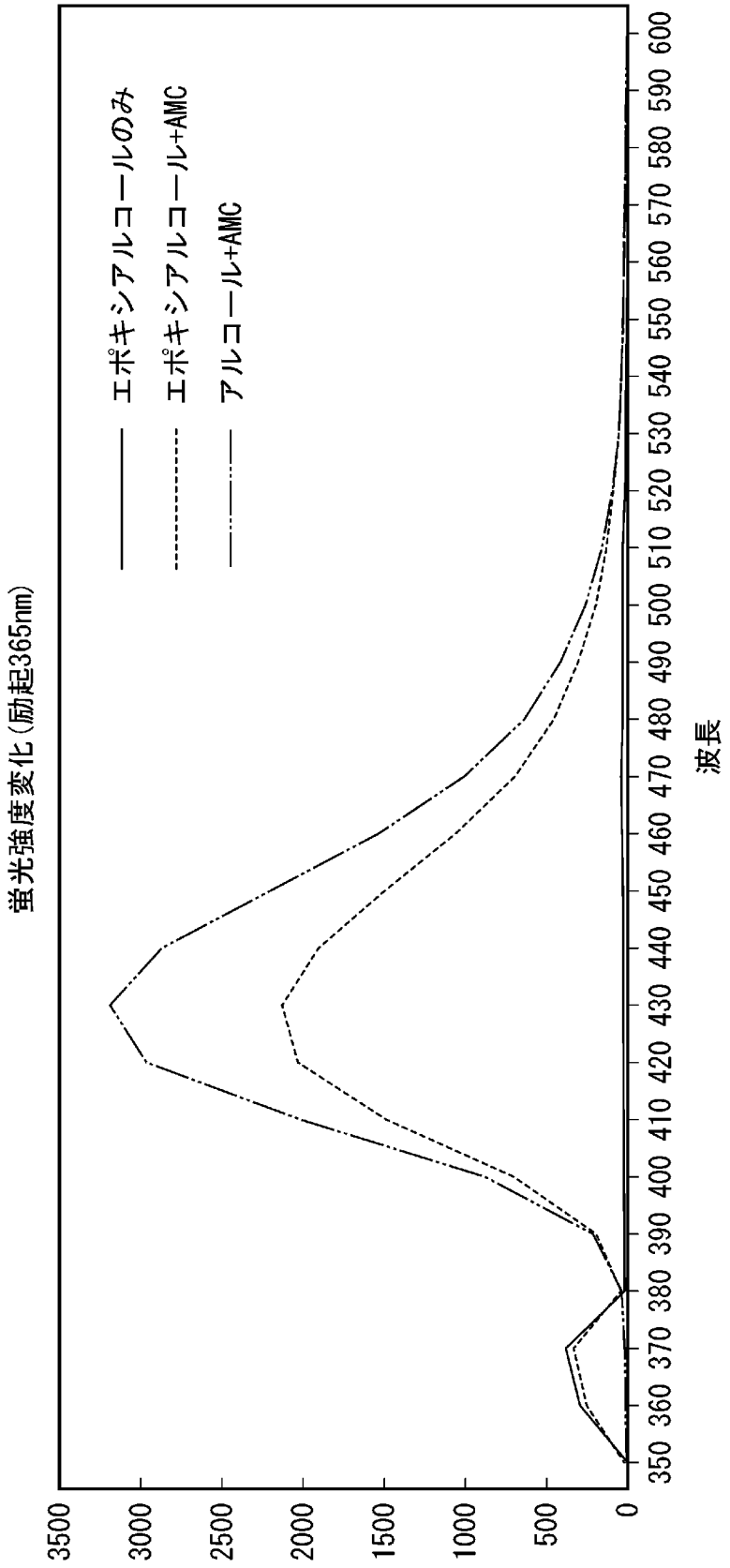
[図6]



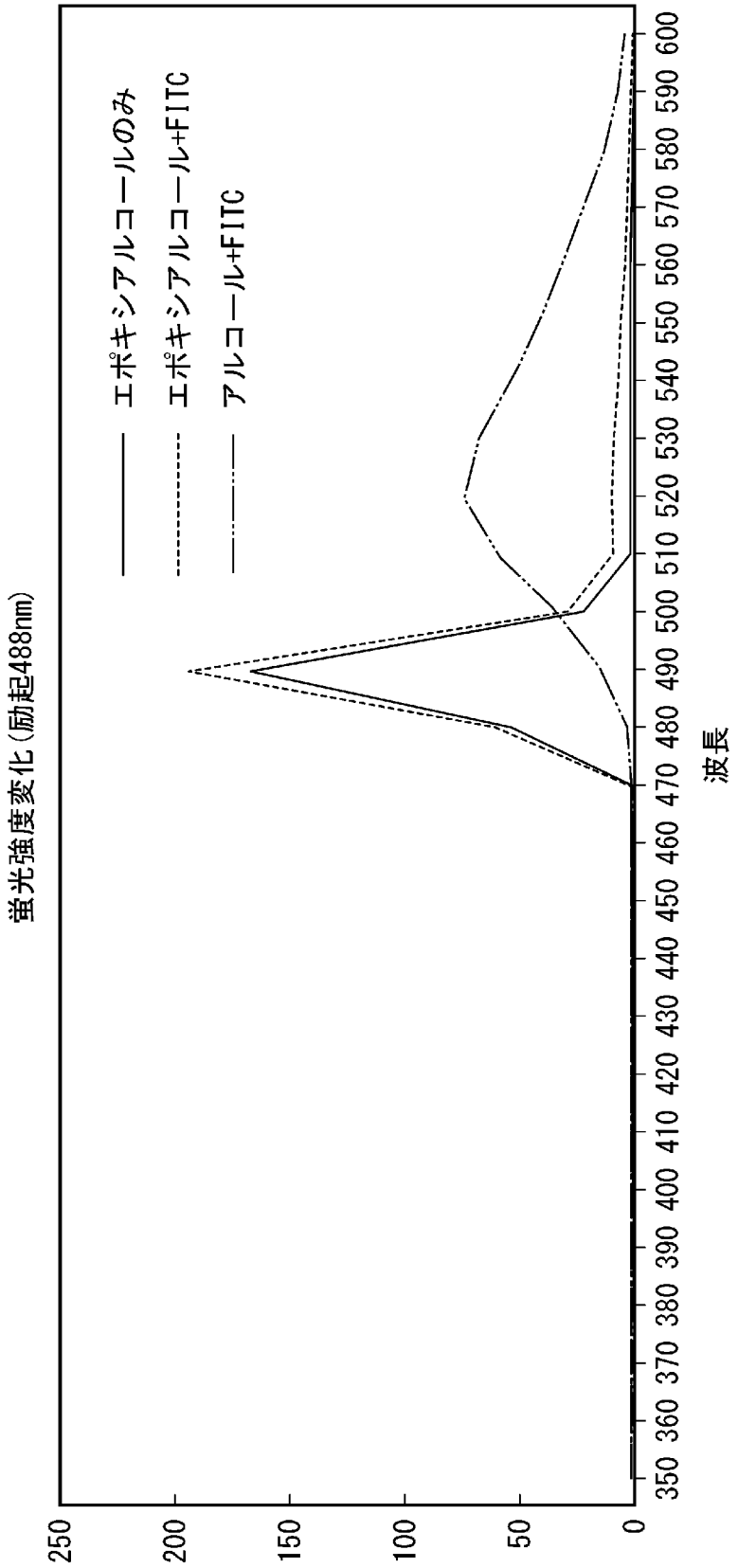
[図7]


蛍光強度変化（励起405nm）
350
300
250
200
150
100
50
0
350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
波長
エポキシアルコールのみ
エポキシアルコール+NKX
アルコール+NKX

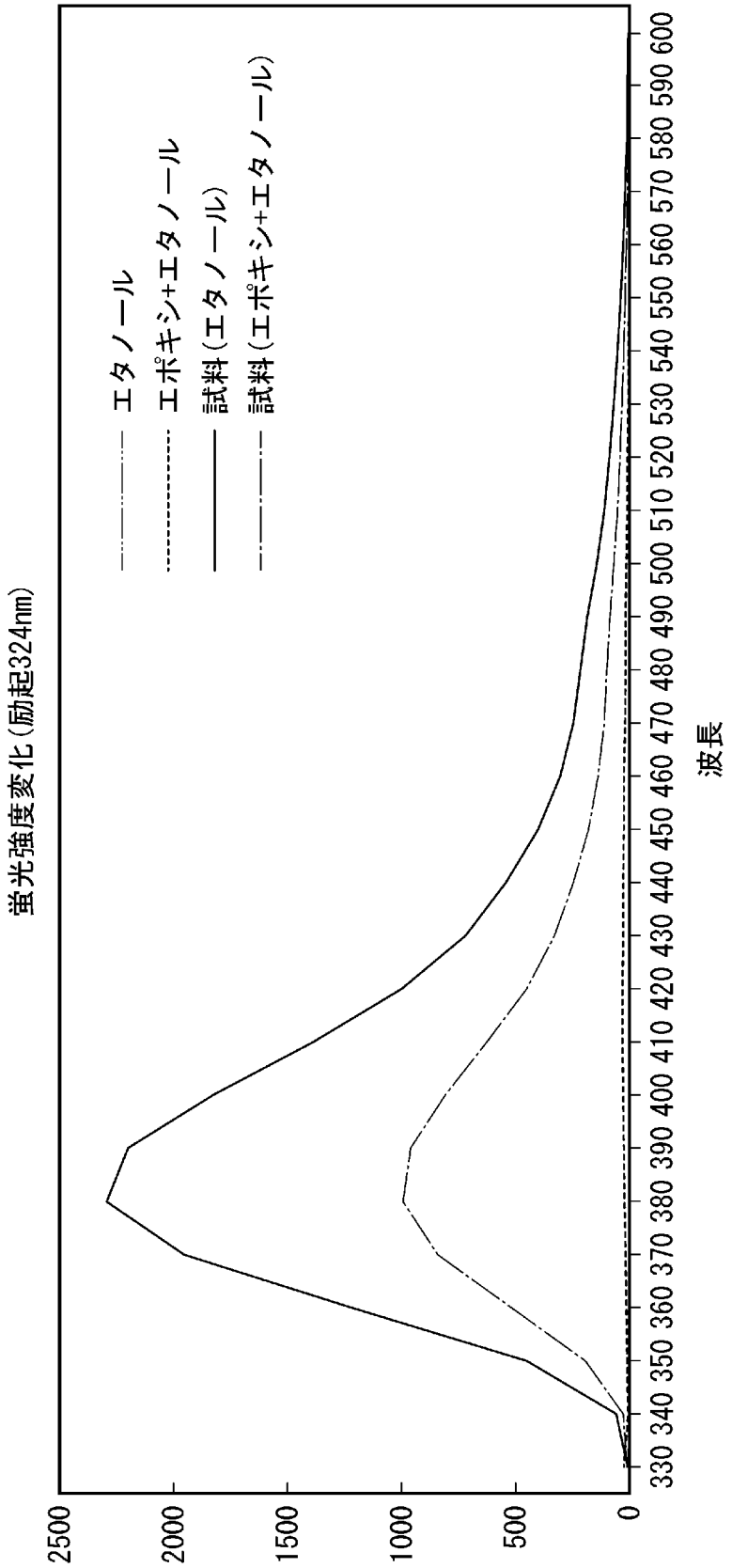
[図8]


蛍光強度変化（励起365nm）
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
波長
エポキシアルコールのみ
エポキシアルコール+AMC
アルコール+AMC

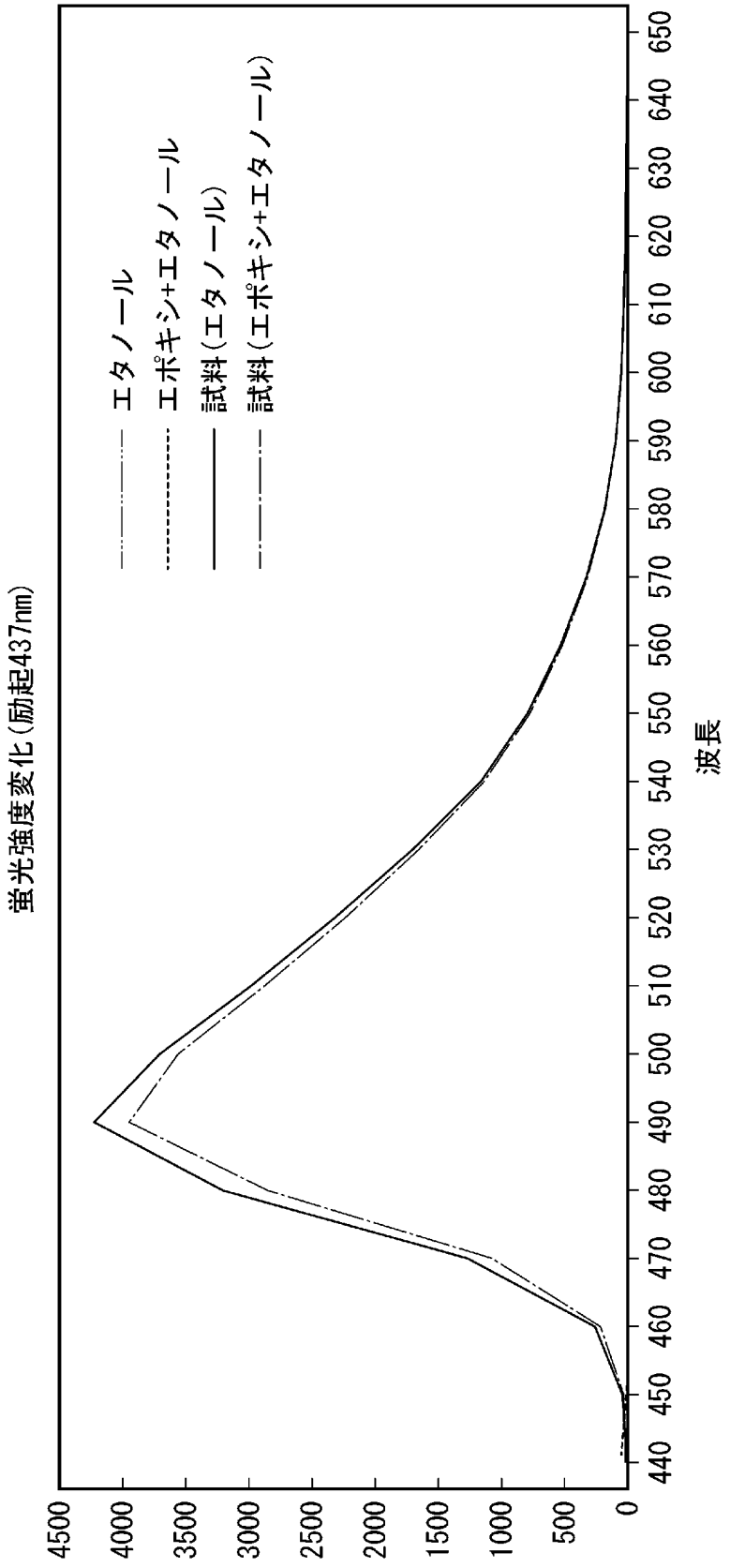
[図9]


エポキシアルコールのみ
エポキシアルコール+FITC
アルコール+FITC
蛍光強度変化（励起488nm）
波長
0
50
100
150
200
250
350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

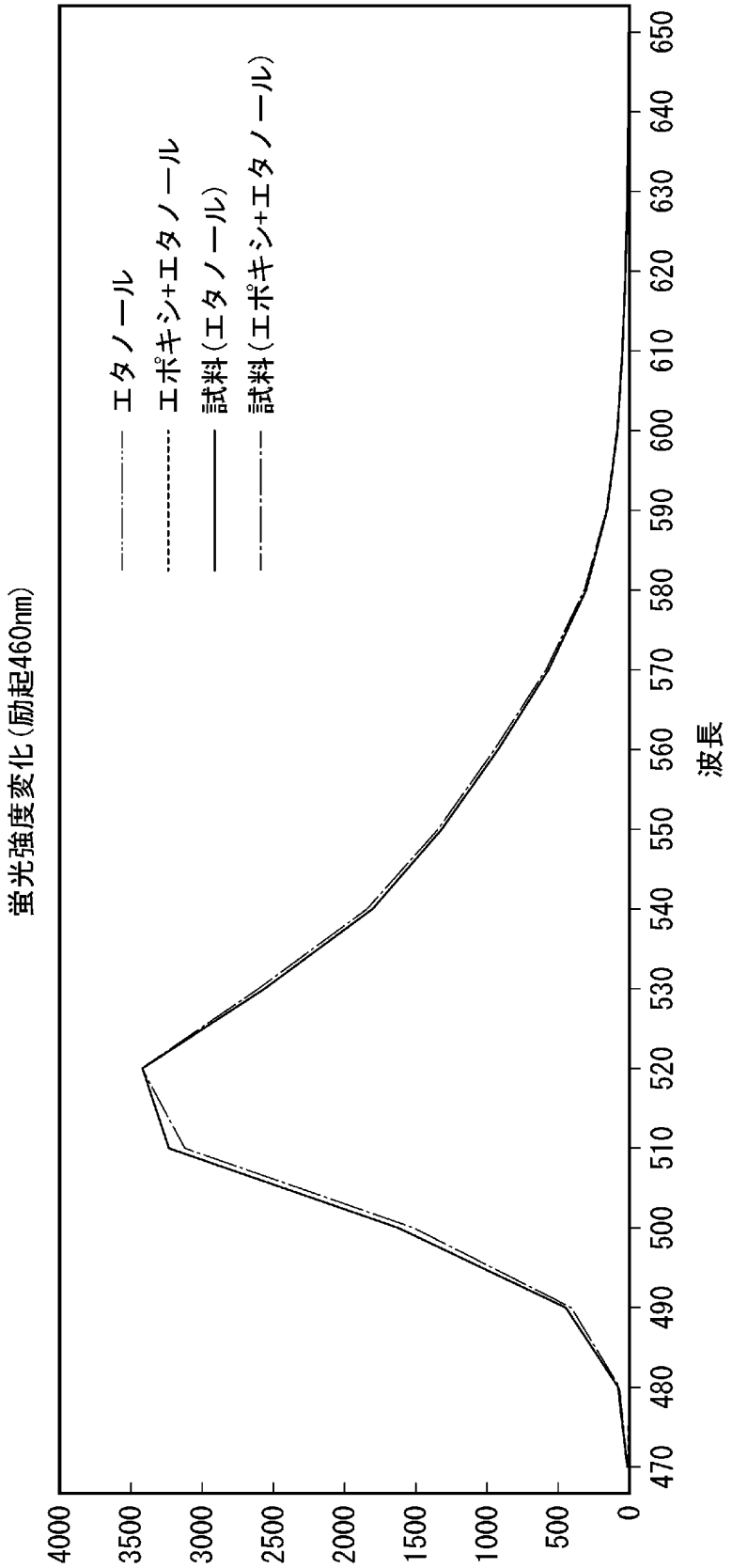
[図10]


蛍光強度変化（励起324nm）
2500
2000
1500
1000
500
0
330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

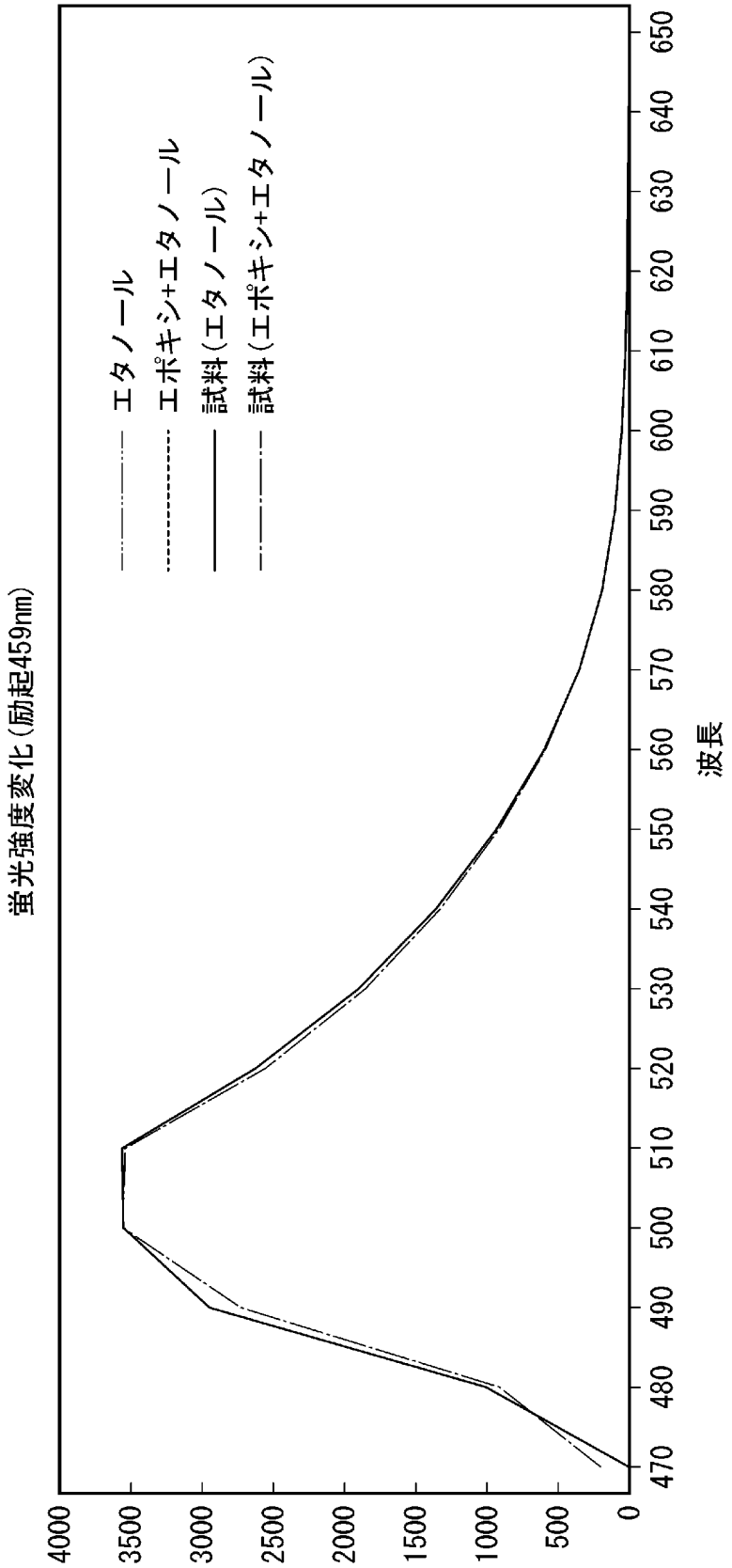
[図11]


蛍光強度変化（励起437nm）
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

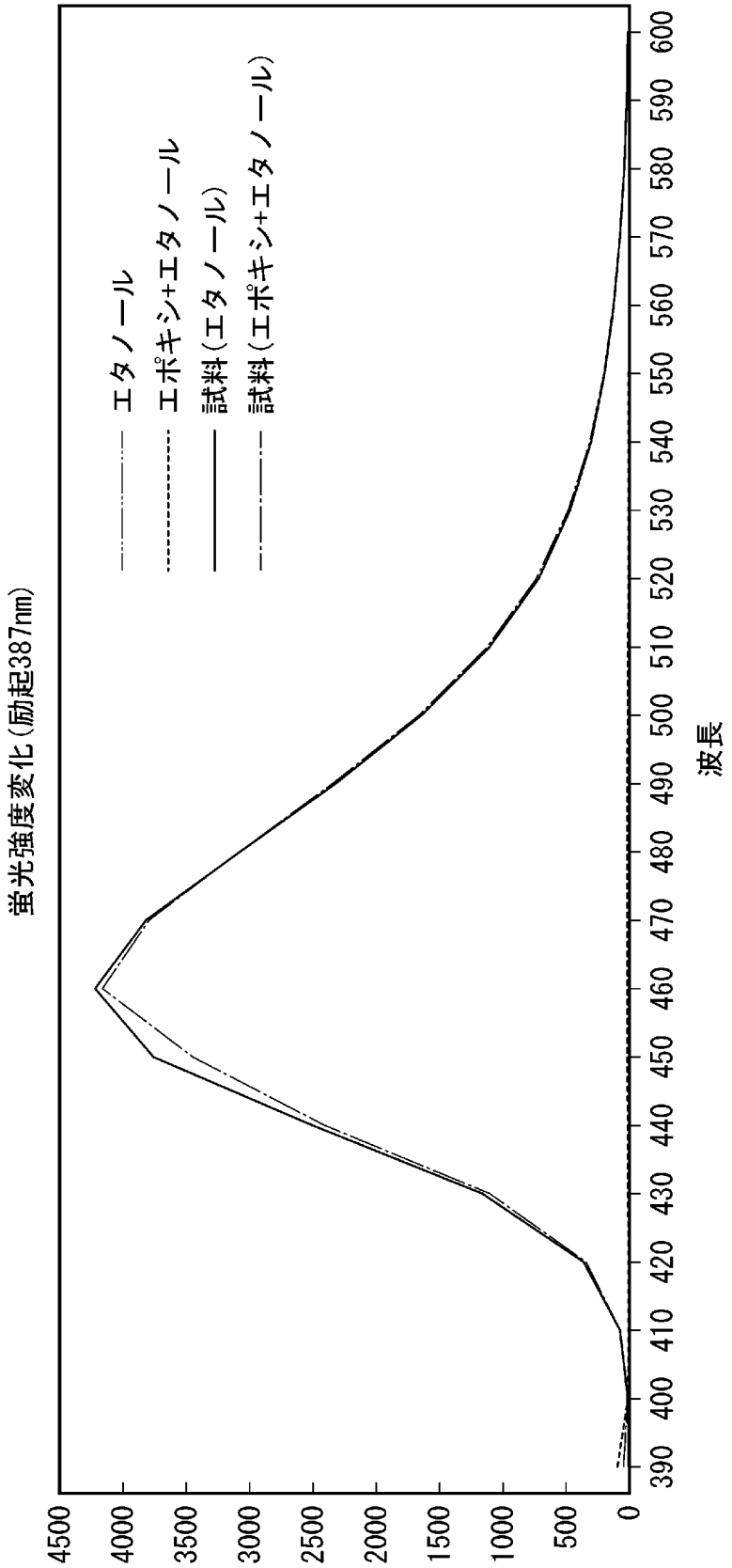
[図12]


蛍光強度変化（励起460nm）
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

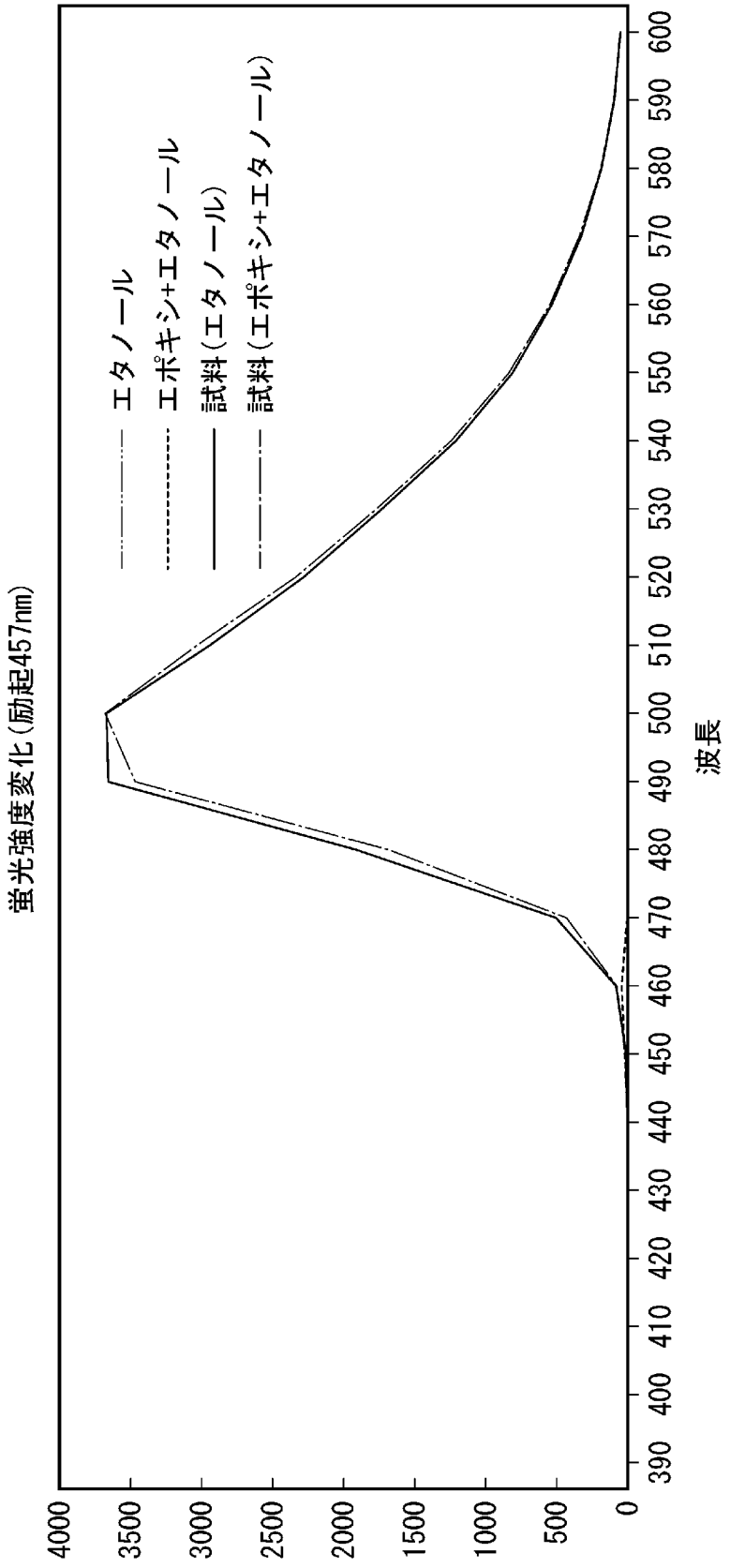
[図13]


蛍光強度変化（励起459nm）
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

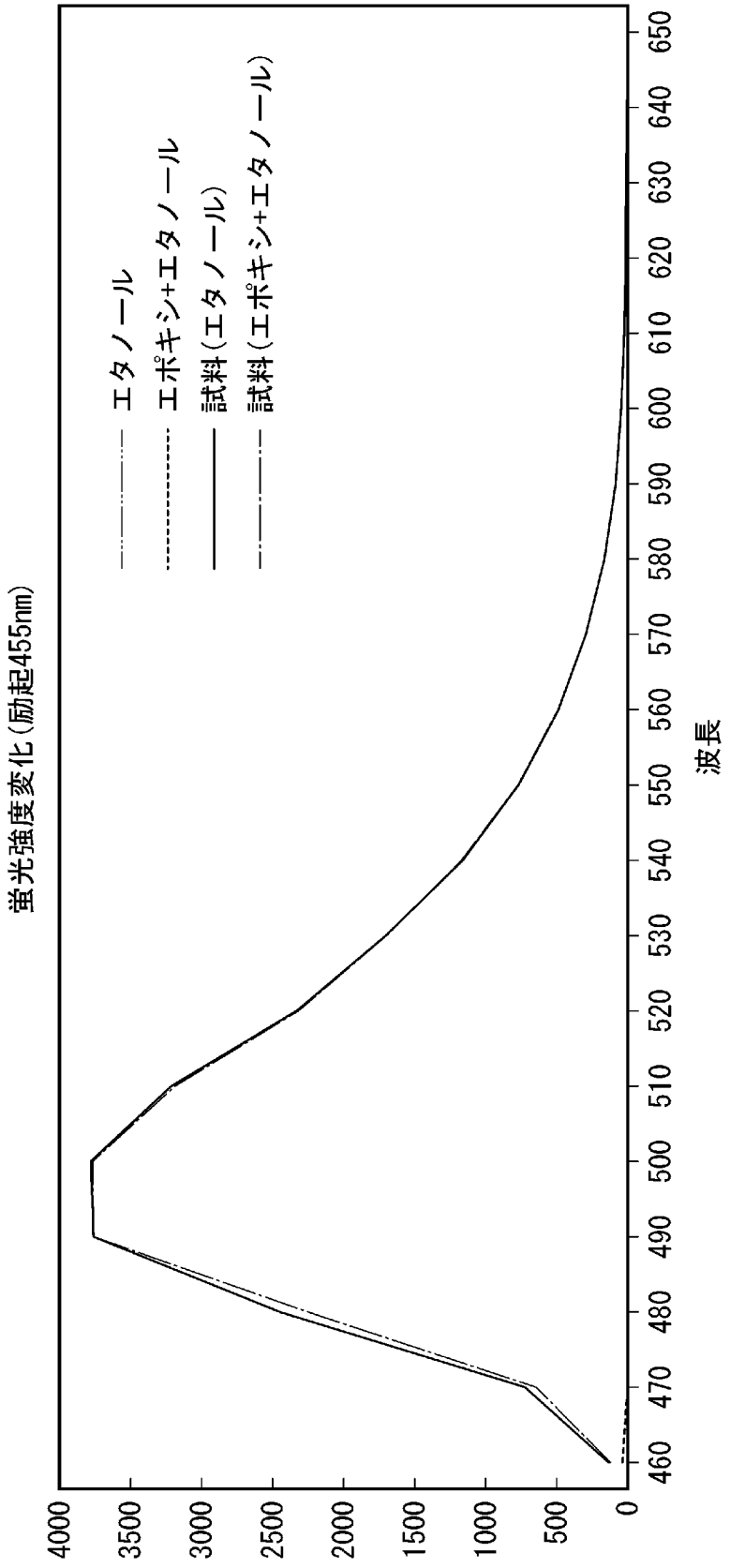
[図14]


蛍光強度変化（励起387nm）
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

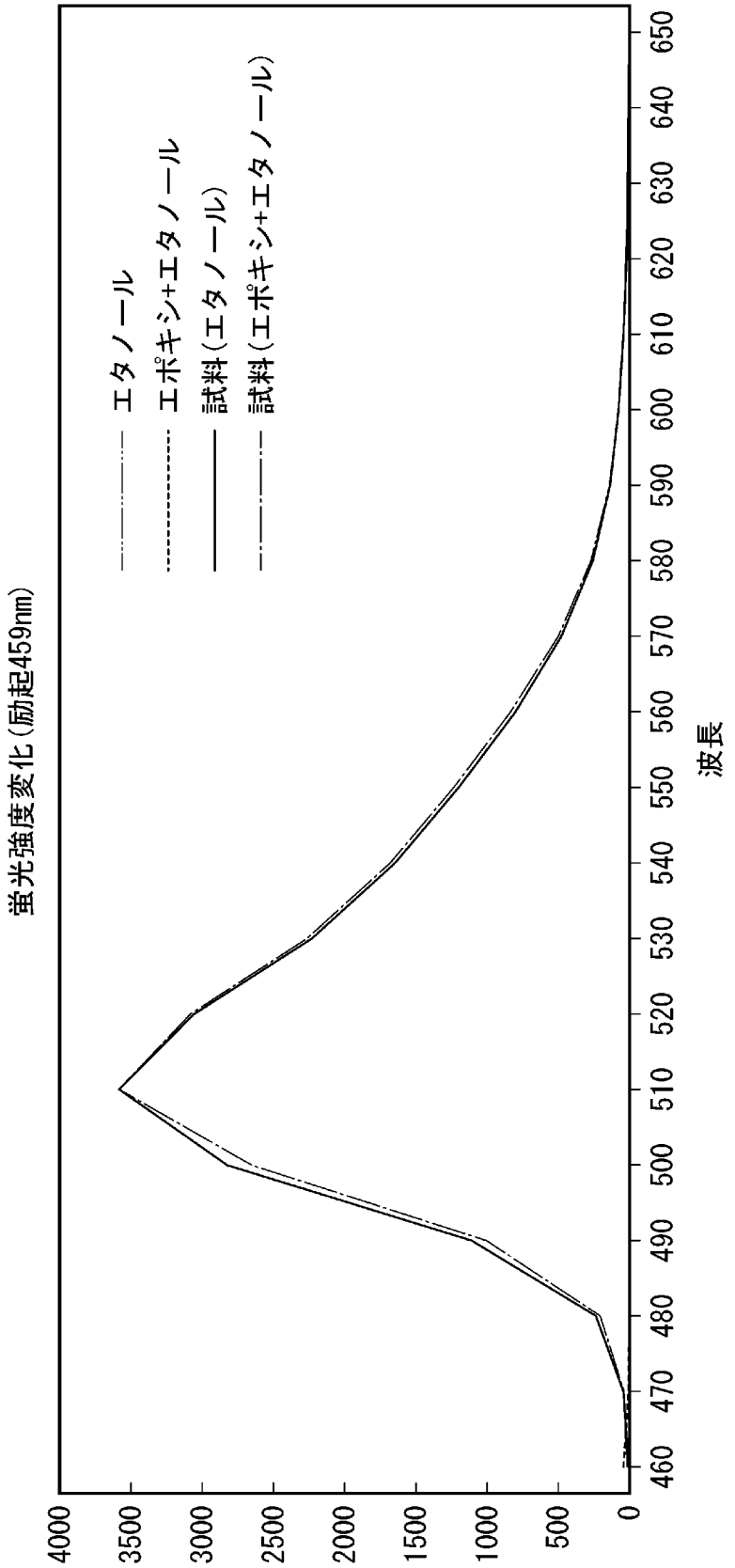
[図15]


蛍光強度変化(励起457nm)
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料(エタノール)
試料(エポキシ+エタノール)

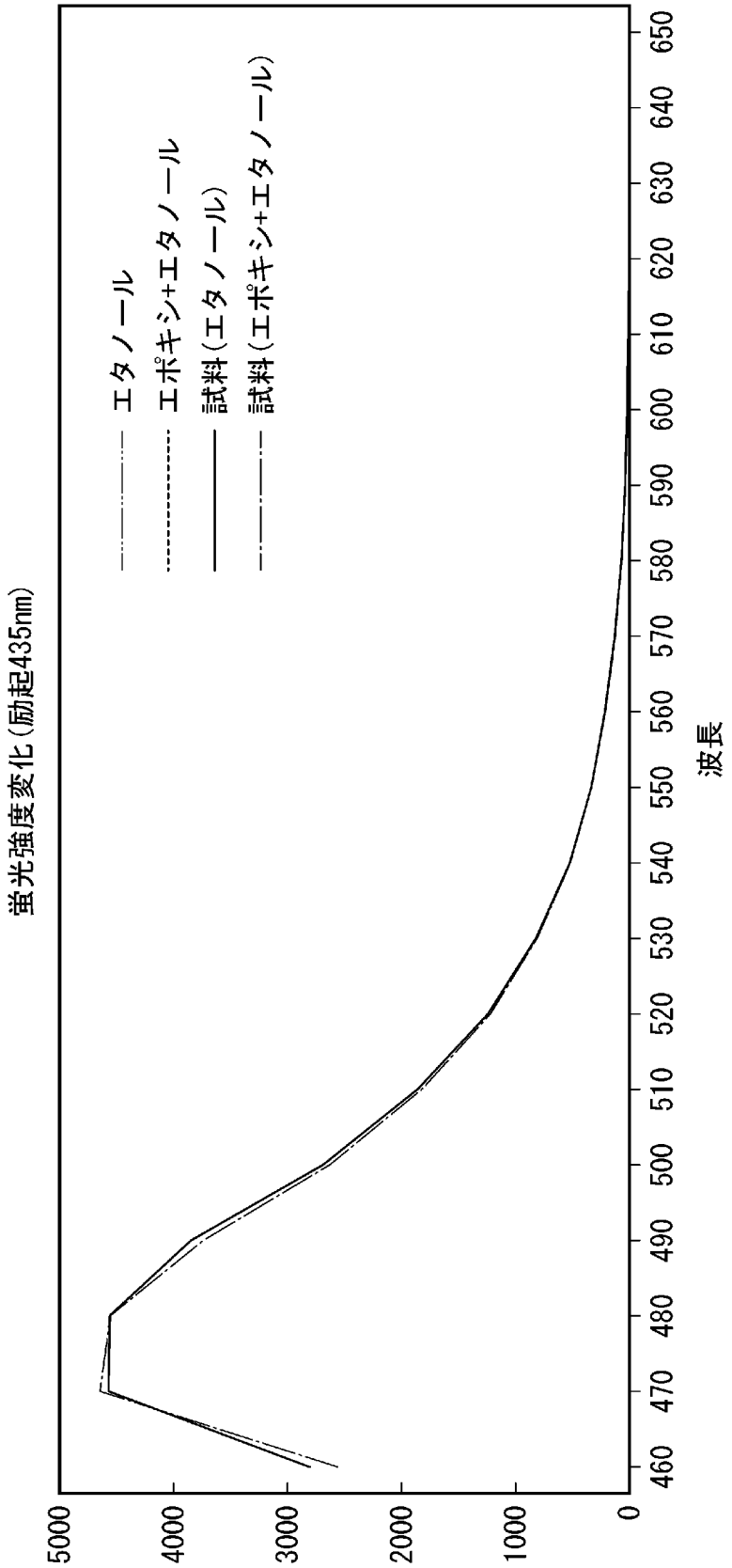
[図16]


蛍光強度変化（励起455nm）
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

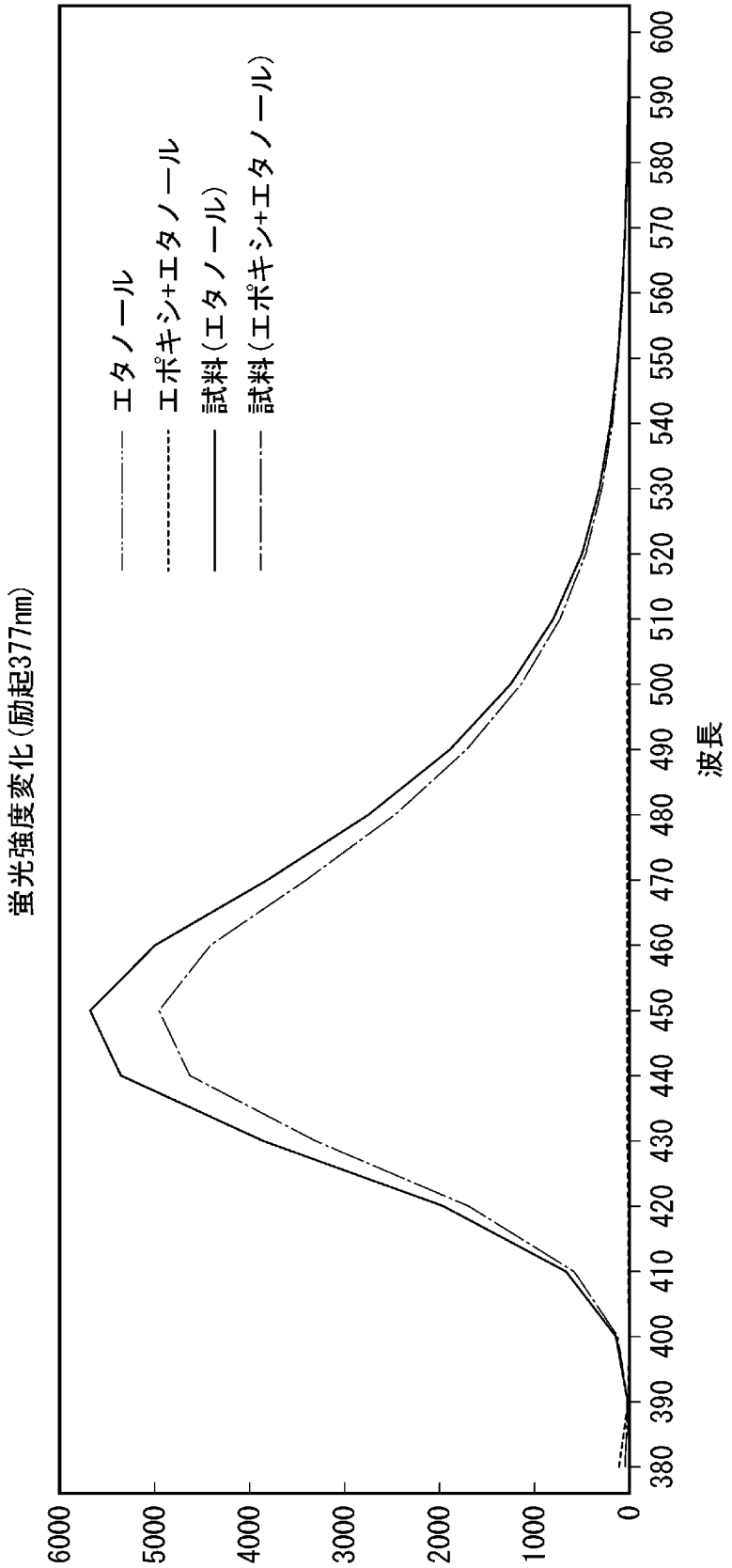
[図17]


蛍光強度変化（励起459nm）
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

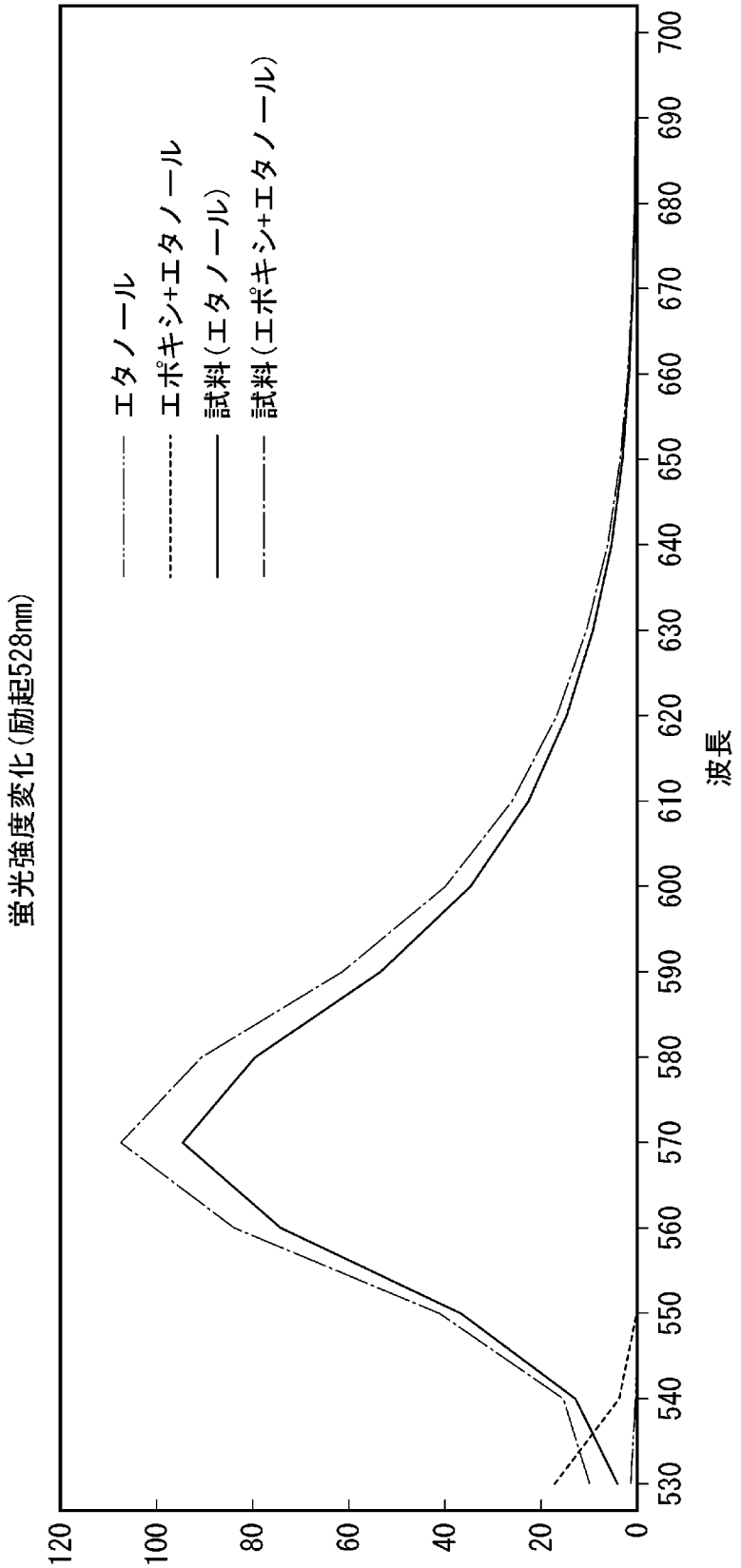
[図18]


蛍光強度変化（励起435nm）
5000
4000
3000
2000
1000
0
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

[図19]


蛍光強度変化（励起377nm）
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
波長
エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）

[図20]


エタノール
エポキシ+エタノール
試料（エタノール）
試料（エポキシ+エタノール）
蛍光強度変化（励起528nm）
波長
120
100
80
60
40
20
0
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700

[図21]

[図22]

[図23]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/014173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q 1/28(2006.01)i; G01N 1/28(2006.01)i; G01N 1/30(2006.01)i; G01N 1/36(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i; G01N 33/536(2006.01)i; G01N 33/58(2006.01)i
FI: G01N33/48 P; G01N33/536 D; G01N33/536 C; C12Q1/28; G01N33/58 Z; G01N1/28 F; G01N1/30; G01N1/36

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)
C12Q1/28; G01N1/28; G01N1/30; G01N1/36; G01N33/48; G01N33/536; G01N33/58

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

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.
A	JP 2018-162986 A (NAGOYA CITY UNIVERSITY) 18 October 2018 (2018-10-18) claims 1-2, 12, paragraphs [0018]-[0021], [0027]-[0030]	1-19
A	JP 2010-528292 A (BECTON, DICKINSON AND COMPANY) 19 August 2010 (2010-08-19) claims, abstract	1-19
A	JP 10-500409 A (TRUSTEES OF BOSTON UNIVERSITY) 13 January 1998 (1998-01-13) claims, table 4, fig. 21	1-19
A	JP 6-271599 A (BAYER AG) 27 September 1994 (1994-09-27) claims, paragraphs [0049], [0067]	1-19
A	US 2010/0040554 A1 (BOARD OF REGENTS) 18 February 2010 (2010-02-18) claims, figures	1-19

☒ 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
07 June 2021 (07.06.2021)	15 June 2021 (15.06.2021)

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/JP2021/014173

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-309872 A (NITTO DENKO CORP.) 29 November 2007 (2007-11-29) claims	1-19
A	JP 2015-227831 A (JEOL LTD.) 17 December 2015 (2015-12-17) claims, paragraphs [0038]-[0041]	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/014173

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2018-162986 A	18 Oct. 2018	(Family: none)	
JP 2010-528292 A	19 Aug. 2010	US 2008/0311675 A1 claims, abstract WO 2008/147805 A2	
JP 10-500409 A	13 Jan. 1998	US 5643722 A claims, table 4, fig. 21 WO 1995/031429 A1 EP 1415995 A2	
JP 6-271599 A	27 Sep. 1994	US 5547860 A claims, examples 3, 8 EP 608737 A1	
US 2010/0040554 A1	18 Feb. 2010	(Family: none)	
JP 2007-309872 A	29 Nov. 2007	(Family: none)	
JP 2015-227831 A	17 Dec. 2015	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/014173

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12Q 1/28(2006.01)i; G01N 1/28(2006.01)i; G01N 1/30(2006.01)i; G01N 1/36(2006.01)i;
G01N 33/48(2006.01)i; G01N 33/536(2006.01)i; G01N 33/58(2006.01)i
FI: G01N33/48 P; G01N33/536 D; G01N33/536 C; C12Q1/28; G01N33/58 Z; G01N1/28 F; G01N1/30; G01N1/36

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））

C12Q1/28; G01N1/28; G01N1/30; G01N1/36; G01N33/48; G01N33/536; G01N33/58

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１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
A	JP 2018-162986 A (公立大学法人名古屋市立大学) 18.10.2018 (2018-10-18) [請求項1]-[請求項2],[請求項12],[0018]-[0021],[0027]-[0030]	1-19
A	JP 2010-528292 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 19.08.2010 (2010-08-19) [特許請求の範囲],[要約]	1-19
A	JP 10-500409 A (トラスティーズ、アヴ、ボースタン、ユーニヴァーサティ) 13.01.1998 (1998-01-13) [特許請求の範囲],[表4],図21	1-19
A	JP 6-271599 A (バイエル・アクチエンゲゼルシヤフト) 27.09.1994 (1994-09-27) [特許請求の範囲],[0049],[0067]	1-19
A	US 2010/0040554 A1 (BOARD OF REGENTS) 18.02.2010 (2010-02-18) claims, figures	1-19
A	JP 2007-309872 A (日東電工株式会社) 29.11.2007 (2007-11-29) [特許請求の範囲]	1-19

☑ 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抵触するものではなく、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
07.06.2021	15.06.2021

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
大瀧　真理 2J 9812
電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
A	JP 2015-227831 A (日本電子株式会社) 17.12.2015 (2015-12-17) [特許請求の範囲],[0038]-[0041]	1-19

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/014173

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-162986 A	18.10.2018	（ファミリーなし）	
JP 2010-528292 A	19.08.2010	US 2008/0311675 A1 claims, abstract WO 2008/147805 A2	
JP 10-500409 A	13.01.1998	US 5643722 A claims, table4, fig.21 WO 1995/031429 A1 EP 1415995 A2	
JP 6-271599 A	27.09.1994	US 5547860 A claims, example 3, example 8 EP 608737 A1	
US 2010/0040554 A1	18.02.2010	（ファミリーなし）	
JP 2007-309872 A	29.11.2007	（ファミリーなし）	
JP 2015-227831 A	17.12.2015	（ファミリーなし）	