

(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  
2024年10月3日(03.10.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/204325 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/48 (2006.01)

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2024/012221

(22) 国際出願日:

2024年3月27日(27.03.2024)

(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 2023-050776 2023年3月28日(28.03.2023) JP

(71) 出願人: 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 井戸 隆喜 (IDO Takayoshi); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 岡

野 文義 (OKANO Fumiyo); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広6丁目10番1号 東レ株式会社 基礎研究センター内 Kanagawa (JP).

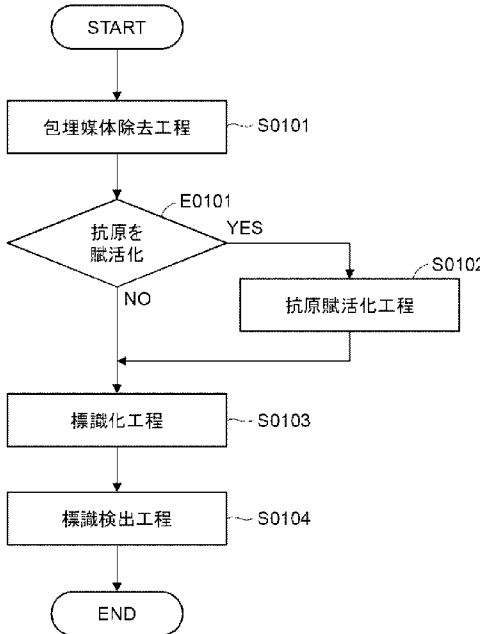
(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ MORIタワー32階 Tokyo (JP).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING CELL MEMBRANE PROTEIN

(54) 発明の名称: 細胞膜タンパク質を検出する方法

[図15]



E0101 Activate antigen  
S0101 Embedded medium removal step  
S0102 Antigen activation step  
S0103 Labeling step  
S0104 Label detection step

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for staining a cell membrane protein with high accuracy. Provided is a method for detecting a cell membrane protein in an embedded fixed tissue, said method comprising an embedded medium removal step for bringing a fixed tissue including a solid embedded medium into contact with a removal solution without baking the fixed tissue, thereby removing the embedded medium.

[続葉有]

WO 2024/204325 A1

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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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 :

一 国際調査報告 (条約第21条(3))

---

(57) 要約 : 本発明は、精度の高い細胞膜タンパク質の染色方法を提供することを課題とする。固体状態の包埋媒体を含む固定組織をベーキングせずに除去溶液に接触させて包埋媒体を除去する包埋媒体除去工程を含む、包埋された固定組織において細胞膜タンパク質を検出する方法を提供する。

## 明 細 書

発明の名称：細胞膜タンパク質を検出する方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、包埋された固定組織において細胞膜タンパク質を検出する方法およびこれを用いた固定組織が由来する個体に対する治療法を決定する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 癌細胞上の特異的細胞膜タンパク質は、その癌特異性から、癌を検出するための疾患マーカーとして利用できるだけでなく、当該タンパク質を標的抗原にした各種抗体医薬は、副作用が少ない癌治療薬として癌治療に適用されている。例えば、多くの癌細胞の細胞膜表面には、C y t o p a s m i c - a c t i v a t i o n a n d p r o l i f e r a t i o n - a s s o c i a t e d p r o t e i n 1 (CAPRIN-1) タンパク質が発現しており、癌の疾患マーカーとして有望であることが知られている（特許文献1）。また、CAPRIN-1タンパク質に対する抗体は、癌の治療および／または予防用医薬用途として有望であることが知られている（特許文献2）。

[0003] 近年、これら抗体医薬の薬効を増強する検討が進められ、特に、細胞に対して直接的に強い殺傷能力を有する薬物と抗体をコンジュゲートした、抗体-薬物複合体（ADC）の開発が盛んに進められている（非特許文献1および2）。このように、抗体医薬は活発に開発され、様々な種類の医薬が上市されている。

[0004] しかし、これら抗体医薬を含む分子標的薬を使用した処置において、個体によって薬効に大きな差が出るのが大きな技術的課題の一つとされている。これには、癌細胞などの疾患細胞における、抗体医薬の抗原である細胞膜タンパク質の存在比率や種類が個体によって異なることが大きく関与している。このことから、近年、患者から得た検体から得た情報から、その患者に

特に有効な治療法を選択するコンパニオン診断が重要視されている。特に、抗体医薬の抗原として細胞膜タンパク質が多く利用されることから、検体における細胞膜タンパク質の存在を正確に把握することは重要である。

[0005] 検体におけるタンパク質発現の解析では、しばしば免疫組織化学染色が利用される。一般的な免疫組織化学染色では、まず、雰囲気下で検体を加熱するベーキング（焼成などとも称される）という手法により包埋媒体（パラフィンなど）を融解し、その後、有機溶媒などに溶解させることによって包埋媒体を除去する（特許文献3および4）。さらに、包埋媒体が除去された検体を抗体とインキュベートすることにより染色が行われる。しかしながら、精度の高い細胞膜タンパク質の染色方法はいまだ確立されていない。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0006] 特許文献1：WO2010/016527  
特許文献2：WO2010/016526  
特許文献3：WO2011/025442  
特許文献4：WO2004/077057

### 非特許文献

- [0007] 非特許文献1：Lancet Oncol 2016；17：e256-62  
非特許文献2：Pharm Res. 2015 Nov；32（11）：35  
26-40

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の課題は、精度の高い細胞膜タンパク質の染色方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は鋭意研究の結果、これまで結果に悪影響を及ぼすものと考えられていなかったベーキングの操作をなくすことによって、細胞膜タンパク質

の染色の精度が顕著に改善されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0010] 具体的には、本発明は以下の [1] ~ [21] の特徴を有する。

[1-1] 包埋された固定組織において細胞膜タンパク質を検出する方法であって、固体状態の包埋媒体を含む前記固定組織を除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する包埋媒体除去工程、前記除去工程後に、前記固定組織中の前記細胞膜タンパク質を賦活化する抗原賦活化工程、前記固定組織の前記細胞膜タンパク質と前記細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する一次抗体を反応させる一次抗体反応工程、前記一次抗体反応工程後の前記固定組織に、前記一次抗体と免疫学的反応性を有する標識化二次抗体を反応させる二次抗体反応工程、および前記二次抗体反応工程後、前記一次抗体を介して前記細胞膜タンパク質と結合した前記標識化二次抗体を検出する標識検出工程を含む、前記方法。

[1-2] 包埋された固定組織から包埋媒体を除去して細胞膜タンパク質を検出する方法であって、固体状態の包埋媒体を含む前記固定組織を除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する包埋媒体除去工程、前記包埋媒体除去工程後の固定組織の前記細胞膜タンパク質と標識化抗体を結合させる標識化工程、および前記標識化工程後、前記細胞膜タンパク質と結合した標識化抗体を検出する標識検出工程を含む、前記方法。

[1-3] 前記包埋媒体除去工程後に、前記固定組織中の前記細胞膜タンパク質を賦活化する抗原賦活化工程を含む、[1-2]に記載の方法。

[1-4] 前記標識化工程が、前記包埋媒体除去工程後の固定組織の前記細胞膜タンパク質と前記細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する一次抗体を反応させる一次抗体反応ステップ、および、前記一次抗体反応工程後の前記固定組織に、前記一次抗体と免疫学的反応性を有する標識化二次抗体を反応させる二次抗体反応ステップ、を含む、[1-2]または[1-3]に記載の方法。

[2-1] 前記包埋媒体除去工程が、前記固定組織をベーキングせずに前記

除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する工程である、[1-1]～[1-4]のいずれかに記載の方法。

[2-2] 前記包埋媒体除去工程が、前記固定組織を包埋媒体の融点未満で前記除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する工程である、[1-1]～[2-1]のいずれかに記載の方法。

[3] 前記除去溶液が界面活性剤および／または有機溶媒を含む溶液である、[1-1]～[2-2]のいずれかに記載の方法。

[4] 前記包埋媒体除去工程における接触が浸漬である、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記抗原賦活化工程が90～130℃での加熱処理ステップを含む、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 前記抗原賦活化工程後に、前記固定組織を冷却する冷却工程を含む、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] 前記標識化二次抗体が、前記一次抗体と免疫学的反応性を有する抗体およびペルオキシダーゼがポリマー担体上結合した複合体である、[1]～[6]のいずれかに記載の方法。

[8] 前記標識検出工程が、前記ペルオキシダーゼと反応性を有する発色試薬により発色した前記細胞膜タンパク質を検出する工程である、[7]に記載の方法。

[9] 発色試薬が3, 3'-diaminobenzidine (DAB)である、[8]に記載の方法。

[10-1] 前記包埋媒体がパラフィンである、[1]～[9]のいずれかに記載の方法。

[10-2] 前記包埋媒体除去工程が、前記固定組織を45℃未満に維持しながら前記除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する工程である、[10-1]に記載の方法。

[11-1] 前記細胞膜タンパク質が癌細胞表面に発現する細胞膜タンパク質である、[1]～[10-2]のいずれかに記載の方法。

[11-2] 前記細胞膜タンパク質が疾患マーカーである、[1]～[11-1]のいずれかに記載の方法。

[12] 前記疾患が癌である、[11-2]に記載の方法。

[13] 前記疾患マーカーがCAPRIN-1タンパク質である、[11-2]または[12]に記載の方法。

[14] 固定組織が由来する個体に対する治療法を決定する方法であって、[11]～[13]のいずれかに記載の方法を用いて包埋された固定組織中の疾患マーカーを検出する工程、および前記工程によって検出された疾患マーカーに基づいて、前記個体に対する治療法を決定する治療法決定工程を含む、前記方法。

[15] 包埋された固定組織において細胞膜タンパク質を検出する装置であって、固体状態の包埋媒体を含む前記固定組織を除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する包埋媒体除去部、前記包埋媒体除去部を経た固定組織の前記細胞膜タンパク質と標識化抗体を結合させる標識化反応部、および、前記標識化反応部を経た固定組織において前記細胞膜タンパク質と結合した標識化抗体を検出する標識検出部を備える、前記装置。

[16] 前記包埋媒体除去部が、前記固定組織を包埋媒体の融点未満とする調温手段を備える、[15]に記載の装置。

[17] 前記包埋媒体除去部を経た固定組織中の前記細胞膜タンパク質を賦活化する抗原賦活化反応部をさらに備える、[15]または[16]に記載の装置。

[18] 前記細胞膜タンパク質が癌細胞表面に発現する細胞膜タンパク質である、[15]～[17]のいずれかに記載の装置。

[19] 前記細胞膜タンパク質が疾患マーカーである、[15]～[18]のいずれかに記載の装置。

[20] 前記疾患が癌である、[19]に記載の装置。

[21] 前記疾患マーカーがCAPRIN-1タンパク質である、[19]または[20]に記載の装置。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2023-050776号の開示内容を包含する。

## 発明の効果

[0011] 本発明の検出方法によれば、包埋された固定組織において細胞膜タンパク質を高い精度で検出することができる。

[0012] 本発明の治療法決定方法によれば、高い精度で検出される細胞膜タンパク質の発現情報に基づいて適切な治療法を決定することができる。

## 図面の簡単な説明

[0013] [図1]実施例1の染色方法による卵巣癌組織の例示的な染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、矢印は細胞膜が適切に染色された細胞を示し、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図2]比較例1の染色方法による卵巣癌組織の例示的な染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、矢頭は細胞質まで不適切に染色された細胞を示し、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図3]スコア0（CAPRIN-1陰性）と判定された胃癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図4]スコア1（CAPRIN-1陰性）と判定された胃癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図5]スコア2（CAPRIN-1陽性）と判定された胃癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図6]スコア3 (CAPRIN-1陽性)と判定された胃癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図7]スコア0 (CAPRIN-1陰性)と判定された腎臓癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図8]スコア1 (CAPRIN-1陰性)と判定された腎臓癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図9]スコア2 (CAPRIN-1陽性)と判定された腎臓癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図10]スコア3 (CAPRIN-1陽性)と判定された腎臓癌組織の染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図11]実施例1の染色方法による卵巣癌組織の例示的な染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図12]実施例3の染色方法による卵巣癌組織の例示的な染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図13]実施例4の染色方法による卵巣癌組織の例示的な染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図14]実施例5の染色方法による卵巣癌組織の例示的な染色像を示す。Aは、細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。Bは、細胞核のシグナルを除外した染色像を示す。図中、スケールバーは50 $\mu$ mを示す。

[図15]細胞膜タンパク質の検出方法の例示的な実施形態を示すフローチャートである。

[図16]第3態様に記載の細胞膜タンパク質の検出装置の例示的な機能ブロック図である。

[図17]細胞膜タンパク質の検出装置に係る制御部のハードウェア構成例を示す図である。

## 発明を実施するための形態

### [0014] 1. 細胞膜タンパク質の検出方法

#### 1-1. 概要

本発明の第1の態様は細胞膜タンパク質の検出方法である。本態様の方法は、包埋媒体除去工程、標識化工程および標識検出工程を必須工程として含み、抗原賦活化工程、冷却工程、非特異的反応抑制工程、および発色工程を任意工程として含む。本態様の方法によれば、細胞膜タンパク質を特異性高く検出することができる。

#### [0015] 1-2. 定義

「包埋媒体」とは、包埋に使用される試薬をいう。「包埋」とは、生体試料に試薬を浸透させ、生体試料を硬化させる処理をいう。

[0016] 「固定組織」とは、固定された組織を含む生体試料をいう。「固定」とは、生体試料中のタンパク質を変性および／または沈殿させることにより、生体試料を自己分解や腐敗による劣化から保護するために行われる処理をいう

。本明細書における固定には、架橋剤、凝固沈殿剤またはその組合せを利用した固定処理のいずれも含まれる。

[0017] 「生体試料」とは、生物の細胞により構成された試料をいう。特に、本明細書における「生体試料」には、生物個体から単離された試料および生体外で調製された細胞を含む試料のいずれも含まれる。ここで、本明細書における生物個体は、真核生物個体であれば特に限定しないが、例えば、霊長類、ペット動物、家畜類、競技用動物などを含む哺乳動物の個体を含む。また、好ましい生物としては、ヒト、ウマ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、イヌおよびネコなどの個体が挙げられる。

[0018] 「細胞膜タンパク質」とは、細胞膜上に存在するタンパク質をいう。本発明における「細胞膜タンパク質」には、膜貫通タンパク質、細胞膜表在性タンパク質および脂質修飾タンパク質のいずれも含む。細胞膜表在性タンパク質および脂質修飾タンパク質はいずれも膜貫通ドメインを有さないタンパク質である。

[0019] 「膜貫通ドメイン」とは、細胞膜を構成する脂質二重層に対する親和性を有し、脂質二重膜を貫通するタンパク質ドメインである。これに対し、細胞膜タンパク質のうち、細胞外側に露出しているタンパク質ドメインを細胞外ドメイン、細胞内側に露出しているタンパク質ドメインを細胞内ドメインと称する。例えば、脂質修飾タンパク質および細胞膜表在性タンパク質の一部はその全体が細胞膜に埋め込まれておらず、タンパク質全体が細胞外ドメインまたは細胞内ドメインとすることができる。

[0020] 「固体状態」とは、流動性がない状態をいう。本明細書における固体状態は、好ましくはゲルの様な半固体状態を含まない。

[0021] 本明細書において「免疫学的反応性を有する」とは、生体内で抗体と抗原またはその部分ポリペプチドとが結合する特性を意味する。例えば、抗原抗体反応に基づいて抗原に結合する活性を有することを指す。ここでの抗原への結合は、特異的な結合および非特異的な結合のいずれも含む。

[0022] 「抗体」とは、別の分子に特異的に結合する免疫グロブリンまたはその抗

原結合性断片をいう。本明細書における「抗体」は、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体ならびにその抗原結合性断片のいずれも含む。

[0023] 「標識」とは、その存在が検出可能である物質をいう。本明細書において、ある物質を「標識化」するとは、その物質を共有結合により標識に連結することを指す。

[0024] 「ベーキング」とは、雰囲気下で加熱する処理をいう。本明細書における「ベーキング」は特に、雰囲気下で固定組織を包埋媒体の融点以上の温度に加熱する処理を指す。この処理は通常、包埋媒体を部分的に融解させると共に、組織をスライドガラスなどに付着させるために行われる。

[0025] 「疾患マーカー」とは、疾患の罹患または発症リスクの有無を判定するための指標となる生体分子（例えば、核酸分子やタンパク質分子）をいう。本明細書においては、特に疾患の罹患または発症リスクの有無を判定するための指標となるタンパク質を指す。

[0026] 「癌」とは、悪性新生物を意味し、「腫瘍」と互換的に用いられる。本明細書における「癌」には、原発の癌、転移性の癌、転移した癌および再発した癌のいずれも含まれる。

[0027] 「CAPRIN-1 (Cytoplasmic-activation and proliferation-associated protein 1) タンパク質」とは、主に癌細胞において細胞膜上に発現する細胞膜タンパク質をいう。本明細書におけるCAPRIN-1タンパク質には、ヒトCAPRIN-1タンパク質と生物学的機能が同等であるタンパク質、例えば同族体（すなわち、ホモログもしくはオーソログ）、遺伝子多型などの変異体、および誘導体も包含される。

[0028] 「治療」とは、既に症状を有する個体において、疾患もしくは状態またはこれに伴う症状を完全もしくは部分的に治癒もしくは軽減する、またはその進行を防止もしくは遅延するための処置をいう。「予防」とは、疾患もしくは状態を罹患する可能性を有する個体において発症を防止または遅延するための処置をいう。「治療方法」または「予防方法」とは、治療または予防の

処置に使用される方法をいう。

[0029] 1-3. 方法

本態様の方法は、包埋媒体除去工程、標識化工程および標識検出工程を必須工程として含み、抗原賦活化工程、冷却工程、非特異的反応抑制工程および発色工程を任意工程として含む。各工程について以下に詳細に説明する。

[0030] 1-3-1. 包埋媒体除去工程 (S O 1 0 1)

「包埋媒体除去工程 (S O 1 0 1)」は必須工程であり、固体状態の包埋媒体を含む固定組織を除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する工程である。

[0031] <包埋媒体>

包埋媒体は、組織を包埋し硬化することが可能な媒体であれば特に限定しない。例えば、対象となる固定組織の種類や包埋の温度条件、標識検出工程で使用する検出方法などに従って適宜選択することができる。

[0032] 例えば、0℃を超える温度で包埋する場合、具体的な包埋媒体としては、例えば、ワックス、パラフィン（例えば、Paraplast、BroloidおよびTissuecanなど）、パラフィンワックス、アクリル樹脂、メタクリル酸樹脂（例えば、エチレングリコールジメタクリレート、グリコールメタクリレート、ブチルメタクリレート、ヒドロキシプロピルメタクリレート、メチルメタクリレートなど）、ダンマル樹脂、エポキシ樹脂、ジビニルベンゼン、その他のプラスチック樹脂（例えば、スーパープラスチック、Lowicryl（登録商標）、Epon、Araldite、LR WhiteおよびDurcupanなど）など、およびこれらの組合せコポリマーなどが挙げられる。本明細書における好ましい包埋媒体は、パラフィンおよびパラフィンワックスである。

[0033] 例えば、0℃以下の温度で包埋する場合、具体的な包埋媒体としては、例えば、Optimum Cutting Temperature (OCT) コンパウンド（例えば、Tissue-Tek（登録商標）O. C. T. コンパウンドまたはTissue-plus（登録商標）O. C. T. コン

パウンド)、PELCO(登録商標)凍結包埋コンパウンド、PolarStat(商標)、PolarStat Plus(商標)包埋媒体、およびTissue Freezing Medium(TFM(商標))などが挙げられる。これらの包埋媒体は、水溶性グリコールおよび樹脂を含んでもよい。具体的には、例えば、5~15%のポリビニルアルコールおよび1~10%のポリエチレングリコールを含む。

[0034] 包埋媒体は所望の硬度を達成するために、有機溶媒や水溶液で適宜希釈されてもよい。

[0035] <固定組織>

本工程で使用される固定組織は本態様の方法により細胞膜タンパク質を検出する対象の生体試料である。

[0036] 固定組織の由来する個体、器官および組織は特に限定しない。例えば、個体としては、健常個体、疾患に罹患している可能性がある個体、疾患に罹患している個体のいずれであってもよい。

[0037] 本明細書において「健常個体」とは、健常状態にある個体をいう。本明細書において「健常状態」とは、少なくとも検査対象の疾患に罹患していない状態、好ましくはあらゆる疾患や障害のない健全な状態を意味する。

[0038] 固定組織は病変組織を含んでもよく、病変組織を含む可能性があってもよく、正常な組織のみを含んでもよい。

[0039] 本態様の方法では、固定組織として単一個体に由来するものを使用してもよく、複数個体に由来するものを同時に使用してもよい。各個体に由来する固定組織は、単一の器官に由来するものであっても、複数の器官に由来するものであってもよい。

[0040] 疾患の種類は特に限定しない。例えば、癌、炎症などが挙げられ、固定組織が由来する組織としては、例えば、癌組織、炎症組織などが挙げられる。本態様の方法で検出される細胞膜タンパク質は、例えば、疾患細胞表面に発現する細胞膜タンパク質であってよく、そのような細胞膜タンパク質としては、例えば、炎症細胞表面に発現する細胞膜タンパク質、癌細胞表面に発現

する細胞膜タンパク質などが挙げられる。

[0041] 本発明において対象となる癌は特に限定しない。例えば、CAPRIN-1タンパク質を細胞膜表面上に発現している癌であってもよい。好ましい癌としては、基底細胞癌、バジェット病、皮膚癌、乳癌、腎癌、膵臓癌、大腸癌、肺癌、脳腫瘍、胃癌、子宮癌、卵巣癌、前立腺癌、膀胱癌、食道癌、白血病、リンパ腫、肝臓癌、胆嚢癌、肉腫、肥満細胞腫、副腎皮質癌、ユーイング腫瘍、ホジキンリンパ腫、中皮腫、多発性骨髄腫、睾丸癌、甲状腺癌、頭頸部癌、ボーエン病、メラノーマ、有棘細胞癌、乳房外バジェット病、菌状息肉症、Sezary症候群、皮膚T/NK細胞リンパ腫、皮膚のみに病変を有するT細胞白血病・リンパ腫、皮膚B細胞リンパ腫（indolent群）、皮膚T細胞リンパ乳線癌、複合型乳腺癌、乳腺悪性混合腫瘍、乳管内乳頭状腺癌、肺腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、神経上皮組織性腫瘍である神経膠腫、膠芽腫、神経芽腫、脳室上衣腫、神経細胞性腫瘍、胎児型の神経外胚葉性腫瘍、神経鞘腫、神経線維腫、髄膜腫、慢性型リンパ球性白血病、消化管型リンパ腫、消化器型リンパ腫、小～中細胞型リンパ腫、盲腸癌、上行結腸癌、下行結腸癌、横行結腸癌、S状結腸癌、直腸癌、卵巣上皮癌、胚細胞腫瘍、間質細胞腫瘍、膵管癌、浸潤性膵管癌、膵臓癌の腺癌、腺房細胞癌、腺扁平上皮癌、巨細胞腫、膵管内乳頭粘液性腫瘍、粘液性嚢胞腺癌、膵芽腫、膵頭細胞腫、Frants腫瘍、漿液性嚢胞腺癌、固体乳頭状癌、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、インスリノーマ、多発性内分泌腺腫症1（Wermer症候群）、非機能性島細胞腫、ソマトスタチノーマ、VIP産生腫瘍、子宮頸癌、子宮体癌、線維肉腫、骨・関節肉種、ユーイング肉腫、ウィルムス腫瘍、肝芽腫、軟部肉腫、急性白血病、慢性白血病、脊髄腫瘍、軟部悪性腫瘍、奇形腫群腫瘍、頭頸部癌には、下咽頭癌、中咽頭癌、舌癌、上咽頭癌、口腔癌、口唇癌、副鼻腔癌、喉頭癌などが挙げられるが、これらに限定されない。また上記癌を原発とする触診可能な癌、皮下に存在する癌、皮内に存在する癌、表在性の癌、真皮に存在する癌あるいは非実質臓器に存在する癌が包含される。

- [0042] 本態様の方法により検出される細胞膜タンパク質の種類は特に限定しない。膜貫通タンパク質、細胞膜表在性タンパク質および脂質修飾タンパク質のいずれであってもよく、特定の条件において細胞膜上に局在するタンパク質であってもよい。例えば、膜貫通ドメインを有さない細胞膜タンパク質であってもよく、細胞外側に全部または一部が露出する細胞膜タンパク質であってもよい。
- [0043] 本明細書における細胞膜タンパク質としては、例えば、癌マーカーなどの疾患マーカーを挙げることができる。具体的な癌マーカーとしては、例えば、CAPRIN-1、HER2、CD20、癌胎児性抗原（CEA）、CA-125、CA19-9、CD117、ALK、BCR-ABL1、BRAF、CFTR、EGFR、IL2RA、RAS、Claudin8などのタンパク質が挙げられる。
- [0044] 固定組織の固定方法は特に限定せず、当該技術分野において公知の方法を使用することができる。例えば、Hopwood D. “Fixatives and fixation: a review.” *Histochem J.* 1969; 1 (4) : 323-60に記載される方法や、「*Immunohistochemical Staining Methods*」第6版（2013）（DAKO North America, Inc.）に記載される方法などを使用することができる。固定に使用される試薬は、特に限定しない。例えば、架橋剤、凝固沈殿剤またはその組合せなどのいずれであってもよい。具体的な固定試薬としては、例えば、架橋剤であるグルタルアルデヒド、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒド-ピクリン酸、過ヨウ素酸-リシン-パラホルムアルデヒド、亜鉛イオン-ホルムアルデヒドを含む溶液；凝固沈殿剤であるメタノール、エタノール、アセトン、酢酸-塩化亜鉛、メタノール-アセトン混合物；またはその混合物（例えば、ホルマリン溶液）などを挙げることができる。固定試薬は、必要に応じて緩衝液などに希釈して使用することができる。
- [0045] 固定の条件は特に限定しない。固定の温度としては、例えば、0℃以下、

4℃～45℃、4℃～37℃、4℃～30℃、4℃～25℃などが挙げられる。また、固定の時間は特に限定しない。例えば、30秒～48時間、10分～36時間、20分～24時間、30分～20時間などが挙げられる。固定の回数は特に限定しない。例えば、1回以上、2回以上、3回以上行うことができる。固定を複数回行う場合は、各回の固定の方法、使用する試薬および条件は同じであっても互いに異なってもよい。

[0046] 固定後に必要に応じて脱水処理や置換処理を行うことができる。それぞれの条件は特に限定せず、当該技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。例えば、本工程の洗浄ステップにおいて記載される方法などを使用することができる。

[0047] 本態様の方法に使用される固定組織は、固定後の組織を上述の包埋媒体により包埋した組織片、またはその切片のいずれであってもよい。好ましくは、固定組織は切片である。

[0048] 切片の作製方法は特に限定しない。当該技術分野において公知の方法を使用して、例えば、手作業で断層することにより、または薄切装置（ミクロトーム、バイブラトームまたはクライオスタットなど）を用いて切片を作製することができる。

[0049] 切片の厚さは特に限定しない。具体的な厚さとしては、例えば、0.5 μm以上、1 μm以上、2 μm以上、3 μm以上または4 μm以上の厚さが挙げられる。また、例えば、300 μm以下、200 μm以下、150 μm以下、100 μm以下、80 μm以下、60 μm以下、50 μm以下、30 μm以下、20 μm以下、15 μm以下、10 μm以下、8 μm以下、7 μm以下、6 μm以下、5 μm以下とすることができる。例えば、切片の厚さは1 μm～300 μm、1 μm～100 μm、1 μm～50 μm、1 μm～20 μm、1 μm～10 μm、2 μm～100 μm、2 μm～50 μm、2 μm～20 μm、2 μm～10 μmなどの範囲内であればよい。

[0050] 切片は、スライドガラスなどの支持体に配置されていてもよく、支持体に配置されておらず、例えば、溶液中に浮遊した状態であってもよい。好まし

くは、切片はスライドガラスなどの支持体に配置されている。支持体の材質は特に限定しないが、例えば、高分子材料、ガラス材料、プラスチック材料または金属材料を含むことができる。ガラス材料としては、例えば、ソーダ石灰ガラス、ホウケイ酸ガラス、クラウンガラスおよびそれらの組合せなどが挙げられる。支持体の形状は特に限定しない。例えば、メンブレン、マイクロタイタープレート、ビーズ、フィルター、試験条片、スライド、カバーガラスおよび試験管などを支持体として使用することができる。支持体は必要に応じて表面加工がされていてもよい。切片は支持体に付着させることができる。付着の方法は特に限定しないが、シラン、ゼラチン、ポリーレーリジンなどのマトリックスを使用する方法などが挙げられる。

[0051] 固定組織は固体状態の包埋媒体を含む。包埋媒体が固体状態であるとは、包埋媒体が融解していないことを指す。つまり、本態様の方法に使用される固定組織において、包埋媒体はその全部または一部が融解していない。

[0052] 固定組織中の包埋媒体全体に対する、固体状態の包埋媒体の割合は特に限定しない。例えば、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上または100%であればよい。

[0053] 好ましくは、本工程で使用される固定組織はベーキングしておらず、雰囲気下における包埋媒体の融点以上の加熱を受けていない。

[0054] 「融点」とは、加熱によって固体状態の物質が液体状態へと融解する転移温度をいう。

[0055] ここでの加熱の温度は使用する包埋媒体の種類によって異なる。凍結切片用の包埋媒体であれば、例えば、製品により異なるものの、一般的なO.C.T.コンパウンドの融点は $-15^{\circ}\text{C}$ ～ $-5^{\circ}\text{C}$ であるため、それを使用する場合には、この温度を超える温度が該当する。具体的な温度としては、例えば、 $-20^{\circ}\text{C}$ 以上、 $-15^{\circ}\text{C}$ 以上、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以上、 $-5^{\circ}\text{C}$ 以上または $0^{\circ}\text{C}$ 以上の雰囲気下に一定時間以上曝露されていないことが好ましい。それ以外の包埋媒体であれば、例えば、製品により異なるものの、一般的なパラフィン

ワックスの融点は45℃～75℃であるため、それを使用する場合には、この温度を超える温度が該当する。40℃以上、45℃以上、50℃以上、55℃以上、60℃以上または62℃以上の温度の雰囲気下に一定時間以上曝露されていないことが好ましい。

[0056] ここでの曝露の時間は、固定組織中の包埋媒体が融解し始めるのに十分な時間であれば特に限定しない。例えば、1分以上、2分以上、3分以上、5分以上、6分以上、7分以上、8分以上、9分以上、10分以上、11分以上、12分以上、14分以上または15分以上の時間、包埋媒体の融点以上の温度の雰囲気下に曝露されていないことが好ましい。例えば、50℃以上の温度の雰囲気下に5分以上、55℃以上の温度の雰囲気下に10分以上、60℃以上の温度の雰囲気下に15分以上曝露されていないことが好ましい。

[0057] <除去溶液>

本明細書において「除去溶液」とは、包埋媒体を溶解可能な溶液を指す。除去溶液の種類は特に限定しない。包埋媒体が親油性の物質である場合には、例えば、界面活性剤および／または有機溶媒を含む溶液を使用することができる。好ましくは、有機溶媒を含む溶液が使用される。一方、包埋媒体が親水性の物質である場合には、例えば、水および／または水溶液（スクロースなどの糖を含む水溶液、緩衝液など）を使用することができる。

[0058] 本工程で使用する有機溶媒は特に限定しない。例えば、炭素数が4～16で直鎖、分岐鎖および環式のアルカン（ヘプタン、ヘキサデカンなど）；炭素数が4～16で直鎖、分岐鎖および環式のジアルキルエーテル（ジエチルエーテル、ジオクチルエーテルなど）；トルエンおよびキシレンなどの芳香族炭化水素；メタノール、エタノールおよびイソプロピルアルコールなどのアルコール；クロロホルムなどのハロゲン化アルキル；リモネンなどのモノテルペン；柑橘油およびココナッツ油などの植物油脂；またはこれらの混合物を使用することができる。あるいは、これらの代用品（例えば、キシレン代用品など）や自動染色装置に付属の除去溶液（Artisan Clean

ning Solution (Agilent社製)など)を使用することもできる。具体的には、例えば、キシレン代用品として、Tissue Clearキシレン代替品、Shandonキシレン代用品、ヘプタン、ヘキサデカンなどの脂肪族炭化水素、ジオクチルエーテルなどの脂肪族炭化水素の誘導体、およびこれらの混合物などが挙げられる。

[0059] 除去溶液に含まれる有機溶媒の濃度は特に限定しない。例えば、重量パーセント濃度で70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上または100%とすることができる。例えば、キシレンおよび一以上の濃度のエタノール水溶液を除去溶液として使用することができる。

[0060] 本工程において使用される除去溶液は、好ましくはキシレンまたはキシレン代用品(例えば、脂肪族炭化水素を含むもの)である。

[0061] <接触ステップ>

本工程では、固定組織中を除去溶液に接触させることにより、固定組織中の包埋媒体の全部または一部を除去溶液に溶解させる。

[0062] 接触の方法は、除去溶液と固定組織中の包埋媒体が接触する方法であれば特に限定しない。例えば、除去溶液を固定組織に噴霧、散布、塗布することができ、または固定組織を除去溶液に浸漬することができる。本工程における接触は、好ましくは浸漬である。固定組織における除去溶液との接触場所は、固定組織の全部または一部のいずれであってもよいが、固定組織の一部と除去溶液が接触する場合、少なくとも固定組織中の包埋媒体のほとんどと除去溶液が接触するように留意する。例えば、包埋媒体の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上または100%と除去溶液が接触するように本工程を行うことができる。

[0063] 本工程における接触の条件は、包埋媒体が除去溶液に溶解可能であれば特に限定しない。

[0064] 例えば、除去溶液の凝固点より高く包埋媒体の融点未満という比較的低い温度で比較的長い時間にわたり接触させることができる。

- [0065] 「凝固点」とは、冷却によって液体状態の物質が固体状態へと凝固する転移温度をいう。
- [0066] この場合の時間は特に限定しないが、例えば、3分以上、5分以上、6分以上、8分以上、10分以上、11分以上、12分以上、13分以上、14分以上、15分以上、17分以上、19分以上、20分以上の時間で接触させることができる。時間の上限は特に限定しない。例えば、48時間以下、36時間以下、30時間以下、24時間以下、20時間以下、18時間以下、16時間以下、15時間以下、12時間以下、8時間以下、6時間以下、3時間以下、2時間以下、90分以下、60分以下、30分以下、25分以下または20分以下の時間で接触させることができる。
- [0067] この場合の温度の下限は、除去溶液の凝固点より高ければ特に限定しない。この温度は使用する除去溶液の種類によって変動する。例えば、除去溶液としてキシレンを使用する場合は、キシレンの凝固点である $-25^{\circ}\text{C}$ を超える温度であればよく、エタノールを使用する場合はエタノールの凝固点である $-114.5^{\circ}\text{C}$ を超える温度であればよい。具体的な温度としては、例えば、 $-100^{\circ}\text{C}$ 以上、 $-50^{\circ}\text{C}$ 以上、 $-24^{\circ}\text{C}$ 以上、 $-10^{\circ}\text{C}$ 以上、 $0^{\circ}\text{C}$ 以上、 $1^{\circ}\text{C}$ 以上、 $5^{\circ}\text{C}$ 以上、 $10^{\circ}\text{C}$ 以上、 $15^{\circ}\text{C}$ 以上、 $20^{\circ}\text{C}$ 以上、 $25^{\circ}\text{C}$ 以上の温度で行うことができる。また、この場合の温度の上限は、包埋媒体の融点未満であれば特に限定しない。この温度は使用する包埋媒体の種類により変動する。例えば、包埋媒体としてパラフィンを使用する場合は、パラフィンワックスの融点である $45^{\circ}\text{C}$ ～ $75^{\circ}\text{C}$ を下回る温度であればよい。具体的な温度としては、例えば、 $75^{\circ}\text{C}$ 未満、 $70^{\circ}\text{C}$ 未満、 $65^{\circ}\text{C}$ 未満、 $60^{\circ}\text{C}$ 未満、 $55^{\circ}\text{C}$ 未満、 $50^{\circ}\text{C}$ 未満、 $45^{\circ}\text{C}$ 未満、 $40^{\circ}\text{C}$ 未満、 $37^{\circ}\text{C}$ 未満、 $35^{\circ}\text{C}$ 未満、 $30^{\circ}\text{C}$ 未満または $27^{\circ}\text{C}$ 未満の温度で行うことができる。例えば、室温（ $1\sim 30^{\circ}\text{C}$ ）または常温（ $15^{\circ}\text{C}$ ～ $25^{\circ}\text{C}$ ）で行うことができる。具体的には、例えば、キシレンなどの芳香族炭化水素との接触を常温で20分以上行うことができる。
- [0068] 温度は、接触の間一定水準に維持されてもよいが、接触の最中に適宜変更

しても、自然に変化してもよい。例えば、接触の間、包埋媒体の融点未満の温度を維持することが好ましく、具体的には、例えば、包埋媒体としてパラフィンを使用する場合、固定組織をパラフィンワックスの融点未満（例えば45℃未満）に維持することが好ましい。

[0069] 複数回に分けて接触を行ってもよい。この場合、各接触に使用される除去溶液および接触条件は毎回同じであってもよいし、接触ごとに異なってもよい。例えば、各接触ごとに除去溶液を更新することもできる。

[0070] また、例えば、包埋媒体の融点以上、除去溶液の沸点未満の比較的高い温度で比較的短い時間にわたり行うことができる。

[0071] 「沸点」とは、液体の蒸気圧が系の圧力と等しくなる温度をいう。本明細書における「沸点」は特に、液体の蒸気圧が一気圧と等しくなる温度を指す。

[0072] この場合の時間は特に限定しないが、例えば、3秒以上、5秒以上、10秒以上、15秒以上、20秒以上、25秒以上、30秒以上とすることができる。時間の上限は、固定組織に過度な負荷とならない範囲であれば特に限定しない。例えば、1分以下、55秒以下、50秒以下、45秒以下、40秒以下、35秒以下または30秒以下の時間で接触させることができる。

[0073] この場合の温度の下限は、包埋媒体の融点以上であれば特に限定しない。この温度は使用する包埋媒体の種類により変動する。例えば、包埋媒体としてパラフィンを使用する場合は、パラフィンワックスの融点である45℃～75℃と同じか、それを超える温度であればよい。具体的な温度としては、例えば、45℃以上、50℃以上、55℃以上、60℃以上、65℃以上、70℃以上、72℃以上または75℃以上の温度で行うことができる。また、この場合の温度の上限は、除去溶液の沸点未満であれば特に限定しない。例えば、除去溶液としてキシレンを使用する場合は、キシレンの沸点である138℃～144℃を下回る温度であればよく、エタノールを使用する場合はエタノールの沸点である78.37℃を下回る温度であればよい。具体的な温度としては、例えば、140℃以下、130℃以下、120℃以下、1

10℃以下、100℃以下、90℃以下、85℃以下、80℃以下、78℃以下または75℃以下の温度で行うことができる。

[0074] 本工程により除去される包埋媒体の割合は、一次抗体などを用いた抗原抗体反応を阻害しなければ特に限定しない。例えば、本工程により包埋媒体の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上または100%が除去される。

[0075] 本ステップの間、除去溶液を適宜流動させることができる。この場合の流動は、攪拌などの操作により人為的に行っても、対流などにより自然に行われてもよい。また、固定組織の配置を変更するなど、固定組織を適宜移動させることができる。

[0076] <分離ステップ>

必要に応じて、除去溶液との接触の後に、溶解した包埋媒体と固定組織を分離する分離ステップを行うことができる。

[0077] 分離の方法は特に限定しない。溶解した包埋媒体は液体であり、固定組織は固体であるため、当該技術分野において公知の固体と液体の分離方法を使用することができる。例えば、脱水装置などを用いた遠心分離法により分離することができる。

[0078] 接触ステップにおいて、大過剰の除去溶液を用いた場合、除去溶液を流動させた場合、および除去溶液の更新を行った場合などには分離ステップが不要な場合がある。

[0079] <洗浄ステップ>

必要に応じて、固定組織に残存した除去溶液などを洗浄する洗浄ステップを行うことができる。洗浄は、洗浄液を固定組織と接触させることにより行われる。この際の接触は接触ステップについて上述した方法や条件により行うことができる。

[0080] 洗浄液は、固定組織の表面に残存する溶解した包埋媒体、包埋媒体が溶解した除去溶液および／または固定組織中の除去溶液などを除去可能であれば特に限定しない。例えば、除去溶液として例示した溶媒のうち、接触ステッ

プにおいて使用した溶媒と異なる溶媒を洗浄液として使用してもよい。好ましくは、除去溶液として有機溶媒や界面活性剤を使用した場合は、水溶性の溶媒が洗浄液として使用される。具体的な洗浄液としては、例えば、水、任意の緩衝液（リン酸緩衝液など）、アルコール（メタノールおよびエタノールなど）、またはこれらの混合物を使用することができる。好ましくは、アルコールおよび／または緩衝液、より具体的には、エタノールおよび／またはリン酸緩衝液を使用することができる。

[0081] 洗浄は複数回行うことができる。この場合、各洗浄に使用される洗浄液および洗浄条件は毎回同じであってもよいし、洗浄ごとに異なってもよい。例えば、除去溶液としてキシレンを使用した場合、エタノールなどのアルコールによる洗浄を行い、さらにリン酸緩衝液などの緩衝液による洗浄を行うことができる。このように、本工程では、キシレンおよびエタノールをそれぞれ独立して使用することができ、例えば、固定組織をキシレンに接触させた後、エタノールに接触させることができる。この場合のエタノール水溶液の濃度は特に限定しない。例えば、重量パーセントで70%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、98%以上、99%以上または100%の濃度のうち、一以上を使用することができる。例えば、3種類の濃度のエタノール溶液に、順に濃度が低くなるように接触させることができる。具体的には、例えば、100%、90%および80%のエタノール溶液に順に接触させることにより洗浄を行うことができる。

[0082] 本ステップの間、洗浄液を適宜流動させることができる。この場合の流動は、攪拌などの操作により人為的に行っても、対流などにより自然に行われてもよい。また、固定組織の配置を変更するなど、固定組織を適宜移動させることができる。

洗浄は、他の任意の工程でも行うことができる。

[0083] 1-3-2. 抗原賦活化工程 (S0102)

「抗原賦活化工程 (S0102)」は任意工程であり、固定組織中の細胞膜タンパク質を賦活化する工程である。本工程は、前記除去工程 (S010

1) の後に行うことができる。任意により、本工程を除去工程 (S 0 1 0 1) と同時に行ってもよい。

[0084] 抗原賦活化は、加熱処理、酵素処理またはその組合せにより行われる。具体的な抗原賦活化の方法は特に限定せず、当技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。例えば、本工程では、Shira (J Histochemistry & Cytochemistry, 2011, 59:13-32)、D'Amicoら (J Immunological Methods, 2009, 341:1-18)、およびMcNicollおよびRichmond (Histopathology, 1998, 32:97-103) などに記載されている方法を使用することができる。本工程の要否、および本工程を実施する場合に行う処理は、抗原の種類や固定組織の性質などにより適宜選択することができる。

[0085] 本工程は、例えば、酵素処理ステップおよび／または加熱処理ステップを含み、好ましくは、本工程は加熱処理ステップを含む。

[0086] <酵素処理ステップ>

酵素処理としては、例えば、トリプシン、DNase、プロテイナーゼK、ペプシン、プロナーゼおよびフィシンなどのプロテアーゼを用いて処理することができる。処理条件は酵素が活性を示すことができれば特に限定しない。例えば、酵素の至適温度および至適pHなどに基づいて処理条件を決定することができる。

[0087] <加熱処理ステップ>

加熱処理ステップは、加熱した抗原賦活化溶液を固定組織に適用することにより実施することができる。抗原賦活化溶液の種類は特に限定しないが、例えば、クエン酸緩衝液、EDTAなどの二価イオンのキレート剤を含む溶液、トリス(ヒドロキシメチル)メチルアミン(TRIS)緩衝液、4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸(HEPES)緩衝液、2-{[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]アミノ}エタンスルホン酸(TESS)緩衝液、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(TAPS

) 緩衝液、N, N-ビス(2-ヒドロキシエチル)グリシン(Bicine)  
) 緩衝液、N-トリス(ヒドロキシメチル)メチルグリシン(Tricine)  
e) 緩衝液、グリシン-HCl 緩衝液、過ヨウ素酸溶液、尿素溶液、チオシアン酸鉛溶液などが挙げられる。緩衝液には、例えば、リン酸二水素カリウム、ホウ酸、ジエチルバルビツール酸、ピペラジン-N, N'-ビス(2-エタンスルホン酸)、ジメチルアルシン酸、2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸またはこれらの組合せなどの酸性化合物を含めることができる。

[0088] pHは特に限定しないが、例えば、6~11、7~10、7.5~9.5、8~9の範囲とすることができる。

[0089] 加熱処理の温度は特に限定しないが、例えば、90℃~130℃の温度範囲とすることができる。具体的には、例えば、90℃~130℃、92℃~128℃、95℃~125℃、99℃~121℃の範囲とすることができる。加熱時間は特に限定しない。例えば、10分以上、20分以上、25分以上、30分以上、35分以上または40分以上の時間処理することができる。また、例えば、3時間以下、2時間以下、90分以下、60分以下、50分以下または45分以下の時間とすることができる。

[0090] 本工程の間、条件は一定であっても、断続的に、または連続的に変化してもよい。条件が変化する場合、その変化は人為的に変更したものであっても、自然に変化したものであってもよい。また、溶液は適宜流動させることができる。この場合の流動は、攪拌などの操作により人為的に行っても、対流などにより自然に行われてもよい。また、固定組織の配置を変更するなど、固定組織を適宜移動させることができる。

[0091] また、本工程は複数回に分けて行うことができる。この場合、各抗原賦活化は異なる条件で行われても、同じ条件で行われてもよい。

[0092] 1-3-3. 冷却工程

「冷却工程」は任意工程であり、固定組織を冷却する工程である。本工程は前記抗原賦活性化工程の後に行うことができる。

[0093] 例えば、抗原賦活化を加熱処理によって行った場合、または酵素処理のた

めに温度を上げた場合に、本工程を行うことができる。

[0094] 冷却方法は、固定組織の温度を一定の温度まで低下させられれば特に限定しない。例えば、低温の雰囲気下または溶液中に静置する方法、冷蔵庫や冷凍庫などの冷却器を用いた方法およびこれらの組合せを使用することができる。

[0095] 冷却後の温度は特に限定しない。例えば、冷凍温度（0℃以下）、冷蔵温度（0℃～5℃）、室温（1℃～30℃）または常温（15℃～25℃）などとすることができる。好ましくは、室温または常温へと冷却される。

[0096] 冷却速度および冷却時間は特に限定しない。本工程における冷却時間は、固定組織が目的の温度まで低下するのに要する時間を指す。したがって、温度が低下した後に平衡に達し、そのまま維持された場合、平衡に達するまでの時間を本工程の時間とする。必要に応じて、本工程をはじめ、各工程の後に静置するなどして、固定組織を任意の時間にわたり保管することができる。

[0097] 一般に、冷却開始時の温度と固定組織の置かれた環境の温度の温度差が大きい程、冷却速度は速くなり、冷却時間は短くなる。冷却時間としては、例えば、10分～24時間、20分～16時間、30分～12時間、35分～6時間、40分～3時間、40分～2時間または40分～1時間とすることができる。

[0098] 本工程において、溶液や雰囲気は適宜流動させることができる。また、この場合の流動は、攪拌などの操作により人為的に行っても、対流などにより自然に行われてもよい。また、固定組織の配置を変更するなど、固定組織を適宜移動させることができる。

[0099] 1-3-4. 非特異的反応抑制工程

「非特異的反応抑制工程」は任意工程であり、固定組織を反応抑制剤と接触させ、抗体反応および／または発色反応における非特異的な反応を抑制する工程である。本工程は前記包埋媒体除去工程の後に行うことができる。前記抗原賦活化工程を行う場合には、それと同時またはその後に行うことがで

きる。冷却工程を行う場合は、それと同時またはその後に行うことができる。

[0100] 本工程は、抗体の非特異的な結合を抑制するブロッキングステップ、および非特異的な発色反応を抑制する内因性反応抑制ステップに大別される。これらのステップはいずれか一方のみを行ってもよく、両方のステップを行ってもよい。各ステップはそれぞれ独立に複数回行うことができ、各ステップの間に一または複数の他の工程が行われてもよい。

[0101] <ブロッキングステップ>

ブロッキングステップでは、固定組織をブロッキング溶液と接触させ、使用する抗体の非特異的な結合を抑制する。

[0102] 本ステップを行うタイミングは、包埋媒体除去工程の後であれば特に限定しない。抗原賦活化工程を行う場合には、それと同時またはその後に行うことができる。例えば、後述する標識化工程前、それと同時またはその後に行ってもよい。例えば、一次抗体反応ステップおよび二次抗体反応ステップの前、それと同時またはその後に行ってもよい。本ステップは複数回行ってもよく、その場合、本ステップは互いに連続して行われてもよく、その間に一または複数の工程が含まれてもよい。

[0103] ブロッキングの方法としては、当該技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。通常、本ステップは、固定組織をブロッキング溶液に接触させた状態で一定時間インキュベートすることによって行われる。例えば、固定組織がスライドガラスに配置されている場合、固定組織に上ブロッキング溶液を載せて一定時間インキュベートすることができる。また、例えば、固定組織が溶液中に浮遊している場合、溶液をブロッキング溶液に置換して一定時間インキュベートすることができる。

[0104] ブロッキング溶液は、一般にタンパク質を含む。ブロッキング溶液に含まれるタンパク質の種類は特に限定しない。例えば、動物血清タンパク質、免疫グロブリンタンパク質、スキムミルクやノンファットミルク、カゼインおよびこの混合物などが挙げられる。

- [0105] 例えば、血清タンパク質が由来する動物は特に限定しない。例えば、ヤギ、ウマ、ヒト、マウス、ウサギ、ラットまたはブタの血清タンパク質などが挙げられる。具体的には、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清、ウマ血清、ヤギ血清などを使用することができる。
- [0106] ブロッキング溶液の溶媒は特に限定しないが、通常は緩衝液である。具体的な緩衝液の種類は特に限定しない。例えば、リン酸緩衝液（PBSなど）、特定の実施形態では、緩衝液は、トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン（TRIS）緩衝液、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（TAPS）緩衝液、N,N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン（Bicine）緩衝液、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチルグリシン（Tricine）緩衝液、4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸（HEPES）緩衝液、2-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕アミノエタンスルホン酸（TES）緩衝液、酢酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液およびそれらの組合せを使用することができる。
- [0107] 溶媒には適宜添加物を含んでもよい、例えば、Tween 20、Triton X-100などの界面活性剤を添加することができる。例えば、PBS-T（0.05% Tween 20を含むPBS）など、これらの添加物が予め添加されている緩衝液を使用することができる。
- [0108] 溶媒のpHは特に限定しない。具体的なpHとしては、例えば、6~8、7~8、7.2~7.8、7.3~7.6、7.4~7.5などが挙げられる。
- [0109] タンパク質の濃度は特に限定しない。例えば、重量体積パーセントで0.1%~30%、1%~30%、5%~30%、10%~20%の濃度とすることができる。
- [0110] <内因性反応抑制ステップ>  
内因性反応抑制ステップでは、固定組織を発色反応の反応抑制剤と接触させて非特異的な反応を抑制する。
- [0111] 本ステップを行うタイミングは、包埋媒体除去工程の後で、後述する発色

工程の前であれば特に限定しない。例えば、抗原賦活化工程を行う場合には、それと同時またはその後で、後述する発色工程の前に行うことができる。例えば、ブロッキングステップを行う場合には、その前、それと同時またはその後に行ってもよく、後述する標識化工程の前、それと同時またはその後に行ってもよい。例えば、一次抗体反応ステップおよび二次抗体反応ステップの前、それと同時またはその後に行ってもよい。本ステップは複数回行ってよく、その場合、本ステップは互いに連続して行われてもよく、その間に一または複数の工程が含まれてもよい。

[0112] 内因性反応の抑制方法は、発色反応に関与して後述する一次抗体に結合した標識の検出を阻害し得る固定組織の内因性の反応を抑制できる限り特に限定しない。例えば、使用する標識の種類や、使用する発色反応によって適宜決定することができる。

[0113] 具体的には、例えば、標識として蛍光物質を使用する場合は、固定組織が有する自家蛍光を抑制するためにクエンチング剤を固定組織に適用することができる。

[0114] また、例えば、標識としてペルオキシダーゼを使用する場合は、固定組織が有するペルオキシダーゼの活性を抑制するために、 $H_2O_2$ （例えば、3%  $H_2O_2$ ）、ペルオキシダーゼ抑制因子またはペルオキシダーゼ抑制試薬（*Peroxidase Block*（DAKO社製）など）などを適用することができる。

[0115] 例えば、標識としてビオチンを使用する場合は、固定組織が有するビオチンを減少させるために、例えば、過剰量のアビジンおよびビオチンを固定組織に適用することができる。

[0116] 例えば、標識としてフォスファターゼを使用する場合は、固定組織が有するフォスファターゼの活性を抑制するために、例えば、フォスファターゼ阻害剤（例えば、レバミゾールなど）を固定組織に適用することができる。

[0117] あるいは、これらのうち2以上の活性を有する試薬を使用して本ステップを行うことができる。

- [0118] 本工程の時間は特に限定しない。例えば、15分以上、30分以上、40分以上、60分以上とすることができる。また、例えば、24時間以下、16時間以下、12時間以下、6時間以下、3時間以下、2時間以下とすることができる。
- [0119] 本工程の温度は特に限定しない。例えば、冷凍温度（0℃以下）、冷蔵温度（0℃～5℃）、室温（1℃～30℃）または常温（15℃～25℃）などの温度条件で実施することができる。
- [0120] 本工程の間、条件は一定であっても、断続的に、または連続的に変化してもよい。条件が変化する場合、その変化は人為的に変更したものであっても、自然に変化したものであってもよい。
- [0121] 1-3-5. 標識化工程（S0103）  
「標識化工程（S0103）」は必須工程であり、固定組織の細胞膜タンパク質と標識化抗体を結合させる工程である。本工程は、包埋媒体除去工程（S0101）の後に行うことができる。抗原賦活化工程（S0102）を行う場合には、本ステップは前記抗原賦活化工程（S0102）と同時またはその後に行うことができる。非特異的反応抑制工程を行う場合には、特にブロッキングステップと同時またはその後に行うことができる。
- [0122] 本工程において標識化抗体と固定組織の細胞膜タンパク質を反応させる方法は、固定組織中の細胞膜タンパク質に直接的にまたは間接的に標識化抗体を結合させることが可能な方法であればよく、特に限定しない。
- [0123] 例えば、細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する標識化抗体を使用することにより行ってもよく、細胞膜タンパク質と結合する結合分子（例えば、細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体）と細胞膜タンパク質の複合体に対して免疫学的反応性を有する標識化抗体を使用することによって行ってもよい。
- [0124] 細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する標識化抗体を使用する場合、標識化を行うためには、標識化抗体を細胞膜タンパク質と結合させるステップが行われる。このステップは前記包埋媒体除去工程の後に行うことができ

る。例えば、抗原賦活化工程を行う場合には、このステップは前記抗原賦活化工程と同時またはその後に行うことができる。非特異的反応抑制工程を行う場合には、特にブロッキングステップと同時またはその後に行うことができる。

[0125] このステップにおける抗体、抗体溶液および抗体の適用方法についての具体的な内容は、「一次抗体反応ステップ」に関して後述する内容に準ずる。また、標識についての具体的な内容は、「二次抗体反応ステップ」に関して後述する内容に準ずる。

[0126] 細胞膜タンパク質と結合する結合分子を使用する場合、典型的には、標識化を行うためには、結合分子（例えば、細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体）を膜タンパク質と結合させる第1結合ステップと、結合分子と細胞膜タンパク質の複合体に対して免疫学的反応性を有する標識化抗体を前記複合体に結合させる第2結合ステップが行われる。

[0127] 第1結合ステップは前記包埋媒体除去工程の後に行うことができる。例えば、抗原賦活化工程を行う場合には、第1結合ステップは前記抗原賦活化工程と同時またはその後に行うことができる。非特異的反応抑制工程を行う場合には、特にブロッキングステップと同時またはその後に行うことができる。第2結合ステップは通常、第1結合ステップの後に行うことができる。任意により、本ステップを第2結合ステップと同時に行ってもよい。

[0128] 結合ステップは3回以上行ってもよい。その場合、2回目以降の結合ステップは、それ以前の結合ステップにて形成された複合体に結合可能な結合分子を使用して行われる。この場合、最後の結合ステップ（第2の結合ステップに対応する）以外の結合ステップで使用される結合分子は標識されていてもよく、非標識結合分子であってもよい。

[0129] 結合分子の種類は特に限定しないが、好ましくは、細胞膜タンパク質と特異的に結合する結合分子である。例えば、抗体、アプタマー、環状ペプチド、細胞膜タンパク質の受容体またはリガンド、またはそれらの組合せなどを使用することができる。結合分子と細胞膜タンパク質の結合態様は特に限定

しない。例えば、結合分子は、細胞膜タンパク質の膜貫通ドメイン、細胞膜タンパク質の膜貫通ドメイン以外の部分、例えば、細胞膜に埋め込まれていない部分、細胞膜タンパク質の細胞内ドメインまたは細胞外ドメインに結合する。結合分子の結合特性、反応溶液および適用方法についての具体的な内容は、「一次抗体反応ステップ」に関して後述する内容に準ずる。

[0130] 結合分子と細胞膜タンパク質の複合体に対して免疫学的反応性を有する標識化抗体と複合体の結合態様は特に限定しない。例えば、標識化抗体は、前記複合体が形成されてはじめて結合可能であってもよいし、複合体の構成因子（細胞膜タンパク質または結合分子）のいずれか一方に結合可能であってもよい。標識化抗体についての具体的な内容は、「二次抗体反応ステップ」に関して後述する内容に準ずる。

[0131] 結合分子として細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する一次抗体を使用し、複合体に対して免疫学的反応性を有する標識化抗体として一次抗体と免疫学的反応性を有する標識化二次抗体を使用する場合、第1結合ステップを一次抗体反応ステップと称し、第2結合ステップを二次抗体反応ステップと称する。

[0132] 以下、一次抗体反応ステップおよび二次抗体反応ステップを行う場合を例にとり、本工程の詳細な内容を説明するが、上述した通り本工程はこれらのステップを行うことに限定されない。

[0133] <一次抗体反応ステップ>

「一次抗体反応ステップ」は、固定組織の細胞膜タンパク質と細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する一次抗体を反応させるステップである。本ステップは前記包埋媒体除去工程の後に行うことができる。例えば、抗原賦活化工程を行う場合には、本ステップは前記抗原賦活化工程と同時またはその後に行うことができる。非特異的反応抑制工程を行う場合には、特にブロッキングステップと同時またはその後に行うことができる。

[0134] 本ステップにおいて使用される一次抗体は検出対象の細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する抗体であれば特に限定しない。例えば、対象となる

細胞膜タンパク質と結合可能な抗体または特異的に結合可能な抗体などが挙げられる。

[0135] 具体的な抗体は、検出対象の細胞膜タンパク質の種類に基づいて適宜決定することができる。例えば、細胞膜タンパク質の膜貫通ドメインに結合可能な抗体であってもよく、細胞膜タンパク質の膜貫通ドメイン以外の部分、例えば、細胞膜に埋め込まれていない部分に結合可能な抗体であってもよく、細胞膜タンパク質の細胞内ドメインまたは細胞外ドメインに結合可能な抗体であってもよい。

[0136] 例えば、細胞膜タンパク質がCAPRIN-1タンパク質である場合、抗CAPRIN-1抗体、またはその抗原結合性断片を使用することができる。具体的な抗CAPRIN-1抗体は特に限定しない。例えば、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2011/096535、WO2013/018886、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640、WO2013/147169、WO2013/147176、WO2015/020212、WO2018/079740およびWO2019/189780などに記載の抗CAPRIN-1抗体が挙げられる。

[0137] 本ステップにおいて使用される一次抗体は、細胞膜タンパク質との結合親和性が高いほうが、より検出が容易になる場合がある。例えば、結合定数（親和定数） $K_a$  ( $k_{on}/k_{off}$ ) が、好ましくは、少なくとも $10^7M^{-1}$ 、少なくとも $10^8M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^8M^{-1}$ 、少なくとも $10^9M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^9M^{-1}$ 、少なくとも $10^{10}M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{10}M^{-1}$ 、少なくとも $10^{11}M^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^{11}M^{-1}$ 、少なくとも $10^{12}M^{-1}$ 、あるいは、少なくとも $10^{13}M^{-1}$ である抗体を使用することができる。

- 。
- [0138] 抗体の種類は特に限定しない。例えば、IgA、IgD、IgE、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3およびIgMなどのいずれのクラスおよびアイソタイプであってもよい。抗体として抗原結合性断片を使用することができる。抗原結合性断片としては、例えば、Fab、Fv、F(ab')<sub>2</sub>およびFab'などが挙げられる。さらに、免疫グロブリンまたはそれらの抗原結合性断片の凝集体、高分子およびコンジュゲートも、細胞膜タンパク質との免疫学的反応性が実質的に維持される限り、適切な場合には使用することができる。
- [0139] 本ステップにおいて使用される抗体は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれであってもよい。
- [0140] 抗体の由来は特に限定しない。例えば、ヒト抗体、非ヒト動物抗体、組換え抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体などが挙げられる。抗体の全部または一部が非ヒト動物抗体に由来する場合、その非ヒト動物は特に限定しない。例えば、マウス、ハムスター、ラット、モルモット、ウサギ、フェレット、ヤギ、サルなどに由来する抗体を使用することができる。
- [0141] 本ステップにおいて使用される抗体の作製方法や精製方法は特に限定せず、当該技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。例えば、抗CAPRI N-1抗体について例示した文献に記載の作製方法や精製方法を使用してもよい。
- [0142] 一次抗体反応の方法としては、当該技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。通常、本ステップは、固定組織を一次抗体溶液に接触させた状態で一定時間インキュベートすることによって行われる。
- [0143] 抗体溶液の組成は、抗体を含み、その抗体が変性しないものであれば特に限定しない。
- [0144] 抗体溶液の溶媒は特に限定しないが、例えば、任意の緩衝液および市販の抗体希釈液などを使用することができる。具体的な緩衝液の種類は特に限定しない。例えば、ブロッキングステップについて例示した緩衝液を利用する

ことができ、必要に応じて添加物を含めることができる。添加物には、当該技術分野において公知の任意の物質を使用することができるが、例えば、動物の血清および血清タンパク質（ウシ血清アルブミン、ウシ胎児血清、ヤギ血清など）、界面活性剤（Tween 20、Triton X-100など）などが挙げられる。添加物は複数含むことができ、例えば、ウシ胎児血清、ヤギ血清およびTween 20を含むことができる。添加物の濃度は特に限定しない。例えば、重量体積パーセントで0.1%~30%、1%~30%、5%~30%、10%~20%の濃度とすることができる。

[0145] 溶媒のpHは特に限定しない。具体的なpHとしては、例えば、6~8、7~8、7.2~7.8、7.3~7.6、7.4~7.5などが挙げられる。

[0146] 溶媒は、ブロッキング溶液と同じ組成のものを使用してもよく、異なる組成のものを使用してもよい。

[0147] 抗体液の濃度は、細胞膜タンパク質が検出可能であれば特に限定しない。例えば、固定組織中の抗原の量や、二次抗体に連結した標識の種類などに応じて適宜設定することができる。具体的には、例えば、0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、0.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上、0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上または0.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度とすることができる。また、例えば、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下または2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度とすることができる。

[0148] 通常、冷蔵温度で12時間~24時間または常温で15分~40分の条件でインキュベートするが、インキュベートの条件として、当該技術分野において公知の任意の条件を使用することができ、特に限定しない。

[0149] インキュベートの温度としては、例えば、冷凍温度（0℃以下）、冷蔵温度（0℃~5℃）、室温（1℃~30℃）または常温（15℃~25℃）などの温度条件でインキュベートすることができる。

- [0150] インキュベートの時間としては、例えば、15分以上、30分以上、40分以上、60分以上などが挙げられる。また、例えば、24時間以下、16時間以下、12時間以下、6時間以下、3時間以下、2時間以下とすることができる。
- [0151] インキュベート中の湿度条件は、インキュベート中に抗体溶液と固定組織が接触し続けることができれば特に限定しない。好ましくは、湿度が100%の環境下（例えば、モイストチャンバー中）でインキュベートされる。
- [0152] 本ステップの間、条件は一定であっても、断続的に、または連続的に変化してもよい。条件が変化する場合、その変化は人為的に変更したものであっても、自然に変化したものであってもよい。
- [0153] <二次抗体反応ステップ>
- 「二次抗体反応ステップ」は、固定組織に、一次抗体と免疫学的反応性を有する標識化二次抗体を反応させるステップである。本ステップは通常、前記一次抗体反応ステップの後に行うことができる。任意により、本ステップを一次抗体反応ステップと同時に行ってもよい。
- [0154] 一次抗体の代わりに標識化二次抗体を使用する以外は一次抗体反応ステップに準じて行うことができる。
- [0155] 抗体溶液の溶媒は、一次抗体反応ステップと同じ組成のものを使用してもよく、異なる組成のものを使用してもよい。
- [0156] 二次抗体の種類は、一次抗体と免疫学的反応性を有するものであれば特に限定しない。例えば、一次抗体が定常領域を有する場合、二次抗体として、一次抗体の定常領域に結合可能な抗体を使用することができる。二次抗体が由来する動物は特に限定しないが、好ましくは、二次抗体は一次抗体が由来する動物とは異なる動物に由来する。
- [0157] 標識の種類は特に限定しない。例えば、発光物質、蛍光物質、酵素、放射性物質、ビオチン、アビジン、量子ドット、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、色素または金属イオンなどが挙げられる。
- [0158] 発光物質としては、例えば、アクリジニウムエステル、3-(2'-スビ

ロアダマンタン) - 4 - メトキシ - 4 - (3" - ホスホリルオキシ) フェニール - 1, 2 - ジオキセタン (AMPPD)、ルミノールおよびその修飾体、4 - アミノフタルヒドラジド、各種セレンテラジン、およびルシフェリンなどが挙げられる。

[0159] 蛍光物質としては、例えば、FITC、Texas、Cy3、Cy5、Cy7、FAM、HEX、VIC、JOE、Rox、TET、Bodipy493、NBD、TAMRA、Alexa-Fluor色素などの蛍光色素；GFP、EGFP、BFP、YFPなどの蛍光タンパク質などが挙げられる。

[0160] 酵素としては、例えば、プロテアーゼ、ペルオキシダーゼ、フォスファターゼ（例えば、アルカリフォスファターゼ）、スルファターゼ、ペプチダーゼ、グリコシダーゼ、ヒドロラーゼ、オキシドレダクターゼ、リアーゼ、トランスフェラーゼ、イソメラーゼ、リガーゼまたはシンテターゼなどが挙げられる。好ましくは、西洋ワサビペルオキシダーゼなどのペルオキシダーゼや、仔ウシ小腸アルカリフォスファターゼなどのアルカリフォスファターゼが使用される。

[0161] 放射性物質としては、例えば、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $\text{Tc } 99\text{m}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、または $^3\text{H}$ などが挙げられる。

[0162] 標識は、抗体に直接結合していても、リンカーなどを介して結合していてもよく、ポリマー担体などを介して抗体と複合体を形成していてもよい。具体的なリンカーやポリマー担体の種類は特に限定しない。例えば、ペプチドリンカーなどの当該技術分野において公知のリンカーを使用することができる。例えば、本明細書における二次抗体として、標識としての酵素と抗体がポリマー担体を介して形成した複合体を使用することができる。また、例えば、標識としてのペルオキシダーゼと抗体がポリマー担体を介して形成した複合体（例えば、*Peroxidase Labelled Polymer Conjugated* (DAKO社製) など)を使用することができる。

[0163] 適用方法は特に限定しない。例えば、ブロッキングステップにおけるブロッキング溶液の適用方法などに準じて行うことができる。

[0164] 1-3-6. 発色工程

「発色工程」は任意工程であり、固定組織を反応剤に曝露して標識を検出可能にする工程である。本工程は標識化工程と同時またはその後に行うことができる。例えば、二次抗体反応ステップと同時またはその後に行うことができる。内因性反応抑制ステップを行う場合は、その後に行うことができる。

[0165] 発色反応とは、標識を検出可能な状態にする反応を指す。

[0166] 反応剤は、使用される標識の発色反応を惹起する薬剤であれば特に限定しない。例えば、標識に対する抗体を含む薬剤、標識が酵素の場合には基質を含む薬剤、標識がビオチンの場合にはアビジンを含む薬剤、アビジンの場合にはビオチンを含む薬剤などを使用することができる。

[0167] 基質は標識として使用する酵素に基づいて適宜決定することができる。例えば、標識としてペルオキシダーゼを使用する場合の基質としては、例えば、3, 3'-diaminobenzidine (DAB)、2, 2'-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic Acid) (ABTS)、3-amino-9-ethylcarbazole (AEC)、3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB)、Bajoran PurpleおよびVina Greenなどの発色試薬が挙げられる。標識としてペルオキシダーゼが使用される場合、好ましい発色試薬はDABである。また、例えば、標識としてペルオキシダーゼを使用する場合の基質としては、例えば、5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP)、Nitro Blue Tetrazolium Chloride (NBT)、ナフトールASホスフェート、フクシン、Ferangi Blue、Vulcan Fast RedおよびWarp Redなどの発色試薬が挙げられる。

- [0168] 必要に応じて、発色反応を促進する物質や薬剤を追加で使用することができる。例えば、DABを使用する場合は、 $Ni^{2+}$ や $Co^{2+}$ などの二価イオンを使用してもよく、その他の市販の酵素反応促進剤を使用してもよい。また、例えば、ナフトールASホスフェートを使用する場合は、ナフトールの酵素活性によりアゾ色素を形成するためのジアゾニウム塩をあわせて使用することができる。
- [0169] 反応剤は複数種類を組合せて使用することができる。例えば、標識としてビオチンを使用した場合、アビジンとビオチン化ペルオキシダーゼを使用し、さらにペルオキシダーゼの基質を追加で使用することができる。
- [0170] 本工程の反応条件は特に限定しない。例えば、使用した抗体の濃度や想定される固定組織中の抗原量に従って適宜決定することができる。
- [0171] 反応時間は特に限定しない。例えば、5秒以上、10秒以上、15秒以上、16秒以上、19秒以上または20秒以上の時間行うことができる。また、例えば、60分以下、50分以下、30分以下、25分以下、20分以下、10分以下、9分以下、8分以下または7分以下の時間処理することができる。
- [0172] 温度は特に限定しない。例えば、冷凍温度（0℃以下）、冷蔵温度（0℃～5℃）、室温（1～30℃）または常温（15℃～25℃）などとすることができる。好ましくは、室温または常温で処理される。
- [0173] 必要に応じて、発色反応の後に脱水処理を行うことができる。脱水処理の方法は特に限定しない。例えば、エタノールを使用して徐々に脱水した後にキシレンなどの有機溶媒を用いてさらに脱水を行うことができる。具体的には、例えば、70%、80%、90%、95%、100%濃度のエタノール水溶液に順番に浸漬することができる。また、さらにキシレンによる脱水を行うことができる。
- [0174] 1-3-7. 標識検出工程（S0104）

「標識検出工程（S0104）」は必須工程であり、細胞膜タンパク質と結合した標識を検出する工程である。本工程は標識化工程（S0103）の

後に行うことができる。発色工程を行う場合は、本工程はそれと同時またはその後に行うことができる。任意により、本工程を標識化工程（S O 1 0 3）と同時、例えば、二次抗体反応ステップと同時に行ってもよい。

[0175] 検出に先立って、他の任意の染色をあわせて行うことができる。例えば、細胞核の染色などを行うことができる。他の染色の種類は特に限定しないが、例えば、D A P I 染色、ヘマトキシリンーエオシン（H E）染色、G o m o r i メテナミン銀染色（G M S）、過ヨウ素酸ーシッフ（P A S）染料、トリクロムブルー染色、マッソントリクロム染色、プルシアンブルー染色、ギムザ染色、グラム染色、ムチカルミン染色、V e r h o e f f - v a n G i e s o n 染色、エラスチカ染色、カルボールフクシン染色、ゴルジ染色およびこれらの組合せなどが挙げられる。

[0176] 検出に先立って、封入作業を行うことができる。使用される封入方法および封入剤は特に限定しない。

[0177] 検出に使用する方法は特に限定しない。使用する標識および試薬、および固定組織の性質などに応じて検出方法を適宜選択し、その検出方法に必要な機器を使用することができる。例えば、目視検査によって、顕微鏡（例えば、実体顕微鏡、共焦点顕微鏡、蛍光顕微鏡などの光学顕微鏡）を用いて、検出器（例えば、蛍光活性化セルソーティング（F A C S）、発光光度計、吸光光度計など）を用いて、またはその組合せにより検出することができる。放射性物質を標識として使用した場合は、例えば、オートラジオグラフィ、シンチレーションカウンター、陽電子放出断層撮影（P E T）またはその組合せにより検出することができる。

[0178] 発色試薬（例えば、ペルオキシダーゼと反応性を有する発色試薬）により発色して標識を可視化した場合、好ましくは光学顕微鏡を用いて明視野において検出される。

[0179] 必要に応じて、他の種類の染色処理をあわせて行うことができる。例えば、標識の位置を把握するために一以上の細胞小器官を染色することができる。

[0180] 1-4. 効果

本態様の検出方法によれば、細胞膜上に存在する目的の細胞膜タンパク質（例えば、CAPRIN-1タンパク質）を高い感度および特異度で検出することができる。

[0181] 本態様の方法は、手動で行うこともできるが、自動染色装置などを使用して自動で行うこともできる。

[0182] 2. 治療法の決定方法

2-1. 概要

本発明の第2の態様は治療法を決定する方法である。本態様の方法は、疾患マーカー検出工程および治療法決定工程を必須工程として含む。本態様の方法によれば、固定組織が由来する個体に対する治療法を決定することができる。

[0183] 2-2. 方法

2-2-1. 疾患マーカー検出工程

「疾患マーカー検出工程」は、包埋された固定組織中の疾患マーカーを検出する工程である。

[0184] 本工程は第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法に準じて行うことができる。第1態様に記載の方法と本工程では、本工程で検出される細胞膜タンパク質が疾患マーカーである点が異なる。

[0185] 疾患マーカーについては第1態様の包埋媒体除去工程において詳述したため、ここでの説明は省略する。

[0186] 本態様の固定組織が由来する個体は特に限定しない。例えば、検出される疾患マーカーと相関する疾患を有する個体、その疾患を有する可能性がある個体または健常個体のいずれであってもよい。

[0187] 2-2-2. 治療法決定工程

「治療法決定工程」は、疾患マーカー検出工程によって検出された疾患マーカーに基づいて、前記個体に対する治療法を決定する工程である。本工程は疾患マーカー検出工程と同時またはその後に行うことができる。

[0188] 治療法の決定方法は、疾患マーカーと治療法の対応関係に基づいて行われればよく、特に限定しない。例えば、固定組織において疾患マーカーが検出されたか否かを判定し、疾患マーカーと治療法の対応関係に基づいて、得られた判定結果から治療法を決定することができる。

[0189] <疾患マーカーが検出されたか否かの判定>

疾患マーカーが検出されたか否かの判定方法は特に限定しない。例えば、標識が検出された場合に疾患マーカーが検出されたと判定してもよく、検出された標識が一定の条件を満たしている場合に疾患マーカーが検出されたと判定してもよい。

[0190] ここでの条件は特に限定しない。例えば、固定組織中の標識の量を定量化し、それが一定以上であることを条件とすることができる。

[0191] 定量化の方法は特に限定しない。例えば、染色状態を反映させたスコア値を割り出して数値化することができる。スコア値の設定は、例えば2段階以上、好ましくは4段階で分類される。細胞膜上（例えば、細胞表面）に発現する細胞膜タンパク質の染色状態を反映させたスコア値を4段階に分類する場合の各スコアの設定例を以下に示す。

[0192] ・スコア0：陽性細胞率（細胞膜に標識が検出される細胞の割合）が10%に満たないもの

・スコア1：陽性細胞率が10%以上であるが、標識が疾患細胞（例えば、癌細胞）の細胞膜の一部に限局し、弱い染色強度を示すもの

・スコア2：陽性細胞率が10%以上であり、標識が疾患細胞（例えば、癌細胞）の細胞膜に局在し、中程度の染色強度を示すもの

・スコア3：陽性細胞率が10%以上であり、標識が疾患細胞（例えば、癌細胞）の細胞膜に局在し、強い強度の染色強度を示すもの

[0193] このようなスコア値の設定は、癌マーカーに関して米国 American Society of Clinical Oncology において定められたものであり、国内においては日本病理学会が認定している。また、癌抗原の1つである Her 2 の患者試料中の存在量を定量する「ハーセプテ

スト」にも適用されており、H e r 2の定量についてはA S C O / C A P H e r 2検査ガイドラインに定められており、国内においてもトラスツマブ病理部会が本スコアの設定を含めたH e r 2検査ガイドを定めている。例えば、疾患に基づいて細胞膜上の存在量が上昇するタンパク質を疾患マーカーとして検出する場合には、この例に準じてスコア値を設定することができる。また、特に限定しないが、例えば、スコアが1以上の場合、2以上の場合または3以上の場合に、疾患マーカーが検出されたと判定することができる。好ましくは、スコアが2以上（スコア2および3）の場合に、疾患マーカーが検出されたと判定する。

[0194] 各スコア値に記載している、標識が検出される疾患細胞の割合は、光学顕微鏡の感度を4倍、10倍または20倍に上げて、視野に入っている細胞を最低500数え、各スコア値に記載の細胞膜に染色像を示す細胞を計測して、以下の式を利用して試算することができる。

$$\text{陽性細胞数} / \text{全細胞数 (約500前後)} \times 100 (\%)$$

[0195] また、例えば検出対象である固定組織において検出された標識の量と、対照組織（例えば、その疾患を有さない固定組織、またはその疾患を有する固定組織）における標識の量とを比較することによって、疾患マーカーが検出されたと判定してもよい。例えば、疾患に基づいて発現が上昇する疾患マーカーである場合には、その疾患を有さない固定組織における標識の量より多くまたは統計的に有意に多く標識が検出された場合に、疾患マーカーが検出されたと判定することができる。この場合、逆に、例えば、その疾患を有する固定組織における標識の量より少なくまたは統計的に有意に少なく標識が検出された場合に、疾患マーカーが検出されなかったと判定することができる。

[0196] 本明細書において「統計学的に有意」とは、二者間の量的差異を統計学的に処理したときに有意差があることをいう。具体的には、例えば、危険率（有意水準）が5%、1%または0.1%より小さい場合が挙げられる。検定方法は、有意性の有無を判断可能な公知の方法であれば、特に限定しない。

例えば、スチューデント t 検定法、多重比較検定法を用いることができる。

[0197] また、例えば、疾患マーカーが検出されたと判定するためのカットオフ値に基づいて決定してもよい。例えば、疾患に基づいて発現が上昇する疾患マーカーである場合には、カットオフ値を上回る量の標識が検出された場合に疾患マーカーが検出されたと判定することができる。

[0198] <治療法の決定>

治療法を決定する方法は、特に限定しない。例えば、各種疾患マーカーの検出の有無と治療法の対応関係の情報に、検出された疾患マーカーの情報を照合することにより、治療法を決定することができる。この場合、複数の疾患マーカーの情報を利用することができ、例えば、本態様の疾患マーカー検出工程によらずに検出された疾患マーカー（例えば、細胞膜タンパク質以外の疾患マーカー、固定組織以外から取得された疾患マーカーなど）の情報とあわせて治療法を決定することができる。

[0199] 疾患マーカーの検出の有無と治療法の対応関係の情報としては、当該技術分野において公知の任意の情報を利用することができる。

[0200] 本工程における、疾患マーカーが検出されたとの判定および治療法の決定については、両方または一方をコンピュータなどの電子計算機が行うことができる。

[0201] 2-3. 効果

本態様の方法によれば、固定組織から疾患マーカーが検出されるか否かに基づいて精度よく固定組織が由来する個体に対する治療法を決定することができる。

[0202] 3. 細胞膜タンパク質の検出装置

3-1. 概要

本発明の第3の態様は細胞膜タンパク質の検出装置（0200）である。本態様の装置は、包埋媒体除去部（0210）、標識化反応部（0230）および標識検出部（0240）を必須の構成として含み、抗原賦活化反応部（0220）、冷却部、非特異的反応抑制部、発色反応部および制御部（0

250) を任意の構成として含む。本態様の方法によれば、細胞膜タンパク質を特異性高く検出することができる。

[0203] 3-2. 構成

本発明の製造装置の構成例の機能ブロック図を図16に示す。包埋媒体、固定組織、疾患、細胞膜タンパク質などについては、第1態様にて記載した通りである。以下、本態様の検出装置を構成する各部について説明する。

[0204] なお、本態様の装置における細胞膜タンパク質は、第1態様に記載の通り、例えば、癌細胞表面に発現する細胞膜タンパク質であってよく、好ましくは、癌マーカー等の疾患マーカー、具体的には、CAPRIN-1タンパク質などであってよい。

[0205] 3-2-1. 包埋媒体除去部(0210)

「包埋媒体除去部(0210)」は、本態様の装置における必須の構成要素であって、固体状態の包埋媒体を含む固定組織を除去溶液に接触させて包埋媒体を除去可能なように構成される。包埋媒体除去部により、第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法における包埋媒体除去工程(S0101)が実施される。例えば、除去溶液の貯留手段(0211)、固定組織と除去溶液の接触手段(0212)、固定組織の保持手段(0213)を含む。

[0206] <貯留手段(0211)>

貯留手段(0211)は除去溶液を貯留可能なように構成された容器である。除去溶液の貯留手段の具体的な構成は特に限定しない。

[0207] 貯留手段の全体形状は、内部に溶液を収容できる形状であれば特に限定しない。例えば、多角柱形状(正多角柱形状、略多角柱形状を含む)、楕円柱形状(円柱液状、略楕円柱形状を含む)、球体形状(略球体形状を含む)などの形状のいずれであってもよい。

[0208] 容器の容積は、特に限定はされず、本態様の装置によって一度の実施で使用される溶液の量に応じて適宜定めればよく特に限定しない。例えば、本態様の装置を研究室規模で用いる場合には、容積は10mL~200mL程度で足りるが、工場的規模で用いる場合や、一定期間の反復実施に堪えるよう

に構成する場合には数L以上または数十L以上などとすることができる。

[0209] 容器を構成する素材は特に限定はしないが、内部に溶液を収容することを鑑みれば、それらを収容可能な強度と収容時に形状を保持できる剛性を有し、また溶液が外に浸透せず、かつ少なくとも内壁は溶液により分解または変性しない素材であることが好ましい。例えば、金属、合成樹脂（プラスチック）、ガラス、磁器などが挙げられるが、これに限定はされない。

[0210] 接触手段の構成にもよるが、貯留手段中で固定組織を溶液に接触させる場合には、固定組織のうち少なくとも反応に供する部分を収納可能な形状および大きさであれば特に限定はされない。

[0211] 容器は、場合により、固定組織を通す開口の他、液体を通す開口（排出口および／または入水口など）、流路、流水弁、攪拌翼などの流動機構、固定組織由来の固形物を除去する濾過機構などを追加で備えることができる。

[0212] 包埋媒体除去部で使用される貯留手段の構成は、一以上の他の部で使用される貯留手段と同じであってもよく、他の部で使用されるいずれの貯留手段とも異なってもよい。

[0213] <接触手段（0212）>

接触手段（0212）は保持手段（0213）に保持された固定組織と貯留手段（0211）に貯留された除去溶液を接触させることが可能なように構成される。接触手段の具体的な構成は特に限定しない。例えば、除去溶液を固定組織に噴霧、散布、塗布することが可能な手段であってもよく、固定組織を除去溶液に浸漬することが可能な手段であってもよい。

[0214] 保持手段の貯留手段が離れて位置している場合、その距離を減少させる任意の機構を備えることができる。このような機構としては、例えば、保持手段および／または貯留手段の移動機構、貯留手段から保持手段の近くへと除去溶液を運搬可能な流路、またはその組合せなどが挙げられる。

[0215] 包埋媒体除去部で使用される接触手段の構成は、一以上の他の部で使用される接触手段と同じであってもよく、他の部で使用されるいずれの接触手段とも異なってもよい。また、二以上の部で共通して使用可能なように構成さ

れてもよい。

[0216] <保持手段 (0213)>

保持手段 (0213) は、固体状態の包埋媒体を含む固定組織を保持可能なように構成される。固定組織の保持手段の具体的な構成は特に限定しない。例えば、固定組織の免疫化学的染色の際に通常使用される保持手段を使用することができる。例えば、固定組織を把持、挟持、または載置可能なように構成しても、固定組織をその内部の収容可能なように構成してもよい。

[0217] 把持可能な構成には、互いに一体化した構成、および例えば、永久磁石または一時磁石などの磁力による保持手段、フックまたは紐などの掛止手段、チャックなどの拘止手段またはこれらの組合せなどの着脱可能な構成のいずれも包含され、特に限定しない。

[0218] 挟持可能な構成には、固定組織の全体を挟む構造（仕切りで挟まれた空間に固定組織を配置するような構造など）および固定組織の一部を挟む構造（低い仕切りの間に固定組織を立てて配置するような構造など）のいずれも包含され、特に限定しない。

[0219] 載置可能な構成には、固定組織を載せることが可能な任意の構成が包含され、特に限定しない。載置面の表面形状は特に限定されず、固定組織の位置を制限可能なような構成であっても、固定組織の位置が制限されないような構成であってもよい。また、その表面に一以上の孔を有する形状（互いに交差する、または交差しない線状の構造で構成される形状など）であっても、孔を有さない形状であってもよい。孔を有する場合、孔の大きさ、数および形状は、固定組織が脱落しなければよく、特に限定しない。

[0220] 内部に固定組織を収容可能な構成には、内部に固定組織を収容可能であり、かつ、内部空間が外部空間と連通する任意の構成が包含され、特に限定しない。内部空間が外部空間と連通している構成は、外部空間との連通が常時維持される構成、および特定の条件下でのみ外部空間と連通する構成のいずれも包含する。外部空間との連通が常時維持される構成としては、例えば、網状、布状、フィルター状またはその組合せなどの孔を有する材料により固

定組織を包囲、またはその内部に固定組織を収容する構成などが挙げられる。特定の条件下でのみ外部空間と連通する構成としては、例えば、薬剤が侵入可能な穴を有さない材料により構成される空間の内部に固定組織を収容する構成（例えば、容器など）が挙げられる。この場合、条件に応じて開閉可能な開口などを追加で含むことができる。

[0221] 保持手段の材料は特に限定しない。例えば、繊維材料、有機樹脂、ガラス系材料、金属材料またはこれらの組合せを使用することができる。また、保持手段は剛体により構成されてもよく、少なくとも一部が軟体により構成されてもよい。

[0222] 保持手段が薬剤と接触する部分を有する場合、その部分は、薬剤により分解または変性しない材料であることが好ましい。

[0223] 図16においては、固定組織が標識検出部（0240）に至るまで一の保持手段により保持される実施形態が例示されているが、保持手段の構成の異同にかかわらず、各部は他の部と独立に保持手段を備えることができ、異なる部の保持手段の間で固定組織を受け渡し可能なように構成することができる。また、包埋媒体除去部で使用される保持手段の構成は、一以上の他の部で使用される保持手段と同じであってもよく、他の部で使用されるいずれの保持手段とも異なってもよい。

[0224] <調温手段>

調温手段は固定組織の温度を調節可能なように構成される。特に、ここでの調温手段は固定組織を包埋媒体の融点未満に維持可能なように構成される。調温手段の具体的な構成は特に限定しない。

[0225] 例えば、固定組織自体の温度を直接調節可能なように構成されてもよく、固定組織周囲の溶液の温度を調節可能なように構成されてもよい。調温手段は、保温可能なように構成されてもよく、温度を改変可能なように構成されてもよい。保温可能な構成としては、例えば、断熱材、気体の層、真空層またはその組合せを利用した構成などが挙げられる。温度を改変可能な構成の場合、一つで加温および冷却をいずれも可能なように構成されてもよく、い

いずれか一方のみ可能なように構成されてもよい。具体的には、例えば、サーモスタット、液体または固体用のヒーターおよびクーラー、化学反応による発熱剤および吸熱剤、高温または低温の溶液の貯留槽などが挙げられる。保持手段（0213）、接触手段（0212）および貯留手段（0211）のいずれか一以上に調温手段を備え付けてもよく、それらとは別に調温手段を備えてもよい。

[0226] 好ましくは、調温手段により固定組織は包埋媒体の融点未満に維持される。調節される温度は包埋媒体の種類によって適宜設定することができ、特に限定しない。温度については、第1態様における記載に準ずる。

[0227] <洗浄手段>

洗浄手段は固定組織表面を洗浄することが可能なように構成される。洗浄手段の具体的な構成は特に限定しない。例えば、第1態様に記載の洗浄溶液を貯留または供給可能なように構成することができる。例えば、貯留可能な構成は、貯留する液体が除去溶液でなく洗浄溶液であること以外は上述した貯留手段（0211）に準ずる。

[0228] 包埋媒体除去部で使用される洗浄手段の構成は、一以上の他の部で使用される洗浄手段と同じであってもよく、他の部で使用されるいずれの洗浄手段とも異なってもよい。また、二以上の部で共通して使用可能なように構成されてもよい。

[0229] 3-2-2. 抗原賦活化反応部（0220）

抗原賦活化反応部（0220）は本態様の装置における任意の構成要素であって、包埋媒体除去部（0210）を経た固定組織中の細胞膜タンパク質を賦活化可能なように構成される。抗原賦活化反応部（0220）により、第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法における抗原賦活化工程（S0102）が実施される。抗原賦活化反応部（0220）は、通常、抗原賦活化手段（0221）、接触手段（0222）、固定組織の保持手段および洗浄手段を備える。

[0230] 接触手段（0222）、保持手段および洗浄手段については包埋媒体除去

部（0210）における各手段の記載に準ずる。

[0231] <抗原賦活化手段（0221）>

抗原賦活化手段（0221）は固定組織の細胞膜タンパク質を賦活化するように構成される。抗原賦活化手段（0221）の具体的な構成は、実施される抗原賦活化処理の種類によって適宜選択することができ、特に限定しない。

[0232] 例えば、抗原賦活化処理が酵素処理ステップに基づく場合には、第1態様に記載の酵素液の貯留手段を、抗原賦活化処理が加熱処理ステップに基づく場合には、第1態様に記載の抗原賦活化溶液の貯留手段を採用することができる。各種液体の貯留手段については、貯留される溶液が酵素液や抗原賦活化溶液であること以外は除去溶液の貯留手段（0211）に準ずる。

[0233] 抗原賦活化手段は、液体の温度が調整可能なように構成されることが好ましい。具体的な構成は特に限定しない。調整される温度が第1態様に記載の抗原賦活化工程における温度であること以外は包埋媒体除去部（0210）における調温手段に準ずる。一回の実施で一方のステップのみを行う場合であっても、両方のステップに対応する溶液の貯留手段を備えることができ、また、酵素液や抗原賦活化溶液のそれぞれに関し複数種類の溶液についての貯留手段を備えることができる。

[0234] 3-2-3. 冷却部

冷却部は本態様の装置における任意の構成要素であって、抗原賦活化反応部（0220）を経た固定組織を冷却可能なように構成される。冷却部により、第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法における冷却工程が実施される。冷却部は、通常、冷却手段および固定組織の保持手段を備え、場合により、さらに接触手段および洗浄手段を備える。

[0235] 保持手段、接触手段および洗浄手段については包埋媒体除去部（0210）における各手段の記載に準ずる。

[0236] <冷却手段>

冷却手段は、接触させた固定組織の温度を低下させることができるように

構成される。固定組織の温度を低下可能であれば具体的な構成は特に限定しないが、例えば、固定組織が放熱可能なように構成されても、固定組織から吸熱可能なように構成されてもよい。具体的な構成は特に限定されず、冷却が目的であり、調節される温度が第1態様の冷却工程における温度であること以外は、基本的に包埋媒体除去部（0210）における調温手段に準ずる。加温も可能な手段の冷却機能のみを使用してもよい。

[0237] 特にここでの冷却では、固定組織を任意の固体、溶液、気体またはその組合せと接触することができる。したがって、冷却手段は、固定組織より低温の固体、溶液、気体などと固定組織を接触させることができるように構成されてもよい。

[0238] 3-2-4. 非特異的反応抑制部

非特異的反応抑制部は本態様の装置における任意の構成要素であって、包埋媒体除去部（0210）を経た固定組織を反応抑制剤と接触させることが可能なように構成される。場合により、抗原賦活化反応部（0220）および／または冷却部を経た固定組織を処理可能なように構成されてもよい。非特異的反応抑制部により、第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法における非特異的反応抑制工程が実施される。非特異的反応抑制部は、通常、反応抑制剤貯留手段、接触手段および固定組織の保持手段を備え、場合により、さらに洗浄手段を備える。

[0239] 接触手段、保持手段および洗浄手段については包埋媒体除去部（0210）における各手段の記載に準ずる。

[0240] 反応抑制剤貯留手段の具体的な構成は、実施される非特異的反応抑制処理の種類によって適宜選択することができ、特に限定しない。例えば、非特異的反応抑制処理がブロッキングステップに基づく場合には、第1態様に記載のブロッキング溶液の貯留手段を、非特異的反応抑制処理が内因性反応抑制ステップに基づく場合には、第1態様に記載の発色反応の反応抑制剤の貯留手段を採用することができる。各種液体の貯留手段については、貯留される溶液が反応抑制剤であること以外は除去溶液の貯留手段に準ずる。一回の実

施で一方のステップのみを行う場合であっても、両方のステップに対応する溶液の貯留手段を備えることができ、また、複数種類の反応抑制剤についての貯留手段を備えることができる。

[0241] 3-2-5. 標識化反応部 (0230)

標識化反応部 (0230) は本態様の装置における必須の構成要素であって、包埋媒体除去部 (0210) を経た固定組織の前記細胞膜タンパク質と、前記細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する標識化抗体を反応させることが可能なように構成される。場合により、抗原賦活化反応部 (0220)、冷却部および／または非特異的反応抑制部を経た固定組織を処理可能なように構成されてもよい。標識化反応部 (0230) により、第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法における標識化工程 (S0103) が実施される。標識化反応部 (0230) は、通常、標識化抗体貯留手段 (0233)、その接触手段 (0234) および固定組織の保持手段を備え、場合により、さらに結合分子貯留手段 (0231)、その接触手段 (0232)、洗浄手段を備える。

[0242] 接触手段 (0232、0234)、保持手段および洗浄手段については包埋媒体除去部 (0210) における各手段の記載に準ずる。

[0243] 複数回の結合ステップが行われる場合には、各結合ステップにて使用される結合分子を貯留する結合分子貯留手段 (0231) を備えることができる。具体的には、例えば、一次抗体反応ステップおよび二次抗体反応ステップが行われる場合には、結合分子貯留手段 (0231) として、第1態様に記載の一次抗体溶液の貯留手段を備え、標識化抗体貯留手段 (0233) として、第1態様に記載の二次抗体溶液の貯留手段を備えることができる。

[0244] 各溶液の貯留手段については、貯留される溶液が第1態様に記載の抗体溶液または結合分子の溶液であること以外は除去溶液の貯留手段 (0211) に準ずる。一回の実施で標識化抗体による結合反応のみを行う場合であっても、結合分子の溶液の貯留手段を備えることができ、また、複数種類の抗体または結合分子についての貯留手段を備えることができる。

[0245] 3-2-6. 発色反応部

発色反応部は本態様の装置における任意の構成要素であって、標識が検出可能になるように、標識化反応部（0230）を経た固定組織の反応剤への曝露が可能ないように構成される。発色反応部により、第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法における発色工程が実施される。発色反応部は、通常、反応剤貯留部、接触手段および固定組織の保持手段を備え、場合により、さらに洗浄手段を備える。

[0246] 接触手段、保持手段および洗浄手段については包埋媒体除去部（0210）における各手段の記載に準ずる。反応剤の貯留手段については、貯留される溶液が第1態様に記載の反応剤であること以外は除去溶液の貯留手段（0211）に準ずる。

[0247] 3-2-7. 標識検出部（0240）

標識検出部（0240）は本態様の装置における必須の構成要素であって、標識化反応部を経た標識化抗体結合固定化組織の標識化抗体を検出可能なように構成される。標識検出部（0240）により、第1態様に記載の細胞膜タンパク質の検出方法における標識検出工程（S0104）が実施される。標識検出部は、通常、検出手段（0241）、解析手段（0242）および固定組織の保持手段を備える。

[0248] 保持手段については包埋媒体除去部（0210）における保持手段（0213）の記載に準ずる。

[0249] <検出手段（0241）>

検出手段（0241）は、固定組織における細胞膜タンパク質に結合された標識を検出可能なように構成される。検出手段（0241）の構成は、使用する標識および試薬、および固定組織の性質などに応じて適宜選択することができ、特に限定しない。

[0250] 具体的には、例えば、顕微鏡（例えば、実体顕微鏡、共焦点顕微鏡、蛍光顕微鏡などの光学顕微鏡）、検出器（例えば、蛍光活性化セルソーティング（FACS）、発光光度計、吸光光度計など）、オートラジオグラフィ、シ

ンチレーションカウンター、陽電子放出断層撮影（PET）またはその組合せなどを備えることができる。必要に応じて複数種類の検出手段を備えてもよい。

[0251] <解析手段（0242）>

解析手段（0242）は、検出手段（0241）により検出された標識のシグナルデータを解析可能なように構成される。解析手段（0242）の構成は、使用される検出手段（0241）に応じて適宜選択することができ、特に限定しない。

[0252] 例えば、各検出手段を用いたシグナルデータの解析に通常使用される解析手段を備えてもよく、使用する検出手段に内蔵される解析機構を本態様の解析手段として使用してもよい。典型的には、解析手段はコンピュータを含む。解析手段がコンピュータを含む場合のハードウェア手段とソフトウェア手段の具体的な構成は特に限定しないが、例えば、制御部について後述する構成を採用することができる。

[0253] ここで行われる解析処理の具体的な内容は特に限定しない。例えば、シグナルの画像データへの変換処理、シグナルデータからのノイズの除外処理などを行うことができる。必要に応じて、さらに第2態様に記載の疾患マーカーが検出されたか否かの判定処理を実行可能なように構成されてもよい。

解析手段は、さらに解析結果をユーザに表示する出力機構を備えてもよい。

[0254] 3-2-8. 制御部（0250）

制御部（0250）は本態様の装置における任意の構成要素であって、各部と固定組織の連絡および各部における処理条件を調整可能なように構成される。例えば、制御部（0250）により、固定組織は所定のタイミングで所定の部へと連絡され、所定の時間にわたり、所定の処理条件（反応溶液の種類や温度条件など）により処理を受ける。

[0255] 制御部は、本態様の装置により第1態様に記載の一連の方法を実行可能なように構成されてもよく、第1態様に記載の方法の一部の工程を実行可能な

ように構成されてもよい。典型的には、制御部はコンピュータを含む。

[0256] 制御部は、ハードウェア手段、またはハードウェア手段とソフトウェア手段によって構成され、ハードウェア手段はその構成要件として、CPU（0251）、揮発性メモリ（0252）、不揮発性メモリ（0253）、インターフェース（0254）、これらを接続するシステムバス（0255）および周辺装置などで構成されている。周辺装置は、限定はしないが、例えば、時計、水量センサなどが挙げられる。ソフトウェア手段は、ハードウェアのメモリ上で実行可能なプログラムなどで構成されている。

[0257] 制御部では、例えば、ハードウェア手段の不揮発性メモリ（0253）内などに格納された各種プログラム（例えば、連絡制御プログラムや処理条件制御プログラム）を揮発性メモリ（0252）上に展開させて、そのプログラムを順次実行することで、メモリ上のデータや、インターフェース（0254）を介して入力されるデータの加工、保存、出力などにより各部の機能が実現される。例えば、プログラムされた所定の時間に達したときに接触手段を作動させることで、固定組織と目的の薬剤などを接触させ、一定時間の経過後に再び接触手段を作動させて接触を止めることができる。また、例えば、プログラムされた所定の時間に達したとき調温手段や冷却手段を作動させることで、固定組織を所定の温度に調節し、一定時間の経過後に再び接触手段を作動させて接触を止めることができる。さらに、各部における反応中に、目的の条件と乖離しているという情報が温度センサやpHセンサなどの各種センサからインターフェース（0254）を介して入力された場合、揮発性メモリ（0252）上に展開された反応条件制御プログラムを実行し、条件を目的の範囲内に調整するように薬剤を追加したり、調温手段を作動させることができる。

[0258] 必要に応じて、ユーザに情報を提示する表示部を備えることができ、その内容は表示制御部により制御される。表示部のハードウェアは特に限定しないが、例えば、ディスプレイなどが挙げられる。

[0259] また、必要に応じて、ユーザが情報を入力する入力デバイスを備えること

ができ、入力デバイスとしては、例えば、キーボード、マウス、タッチパネル、タッチペンなどが挙げられる。入力デバイスから入力された情報は、入出力制御部により制御される。入出力制御部は、入力デバイスからのデータや命令の入力の他、処理装置から出力される各種データの出力を制御する。ユーザに入力を求める情報は特に限定しないが、例えば、各工程の時間や反応条件の設定の他、実施する工程の指定、貯留手段にて溶液の更新を行う基準（例えば、濁度や期間など）の指定をユーザに求めることができる。

## 実施例

[0260] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって制限されないものとする。

[0261] 実施例 1：免疫組織化学的染色による CAPRI N-1 タンパク質検出 1  
(パラフィン除去工程)

厚さ 4  $\mu\text{m}$  のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片（乳癌組織、肺癌組織、膵臓癌組織、腎臓癌組織、大腸癌組織、胃癌組織、卵巣癌組織および前立腺癌組織；US BIOMAX 社製；各 1361 人の異なる検体由来の切片を使用）からキシレンを用いて 20 分間かけてパラフィンを除去した。キシレンは 5 分ごとに 3 回交換した。次にキシレンの代わりに 100%、90%、80% エタノール水溶液を用いて、同様の手順で各 5 分間かけて洗浄を行った。これらの工程は室温で行った。その後、PBS-T (0.05% Tween 20 を含むリン酸緩衝液 (PBS)、pH 7.4) を用いて 5 分間ずつ 3 回の洗浄を行った。

[0262] (抗原賦活化工程)

0.05% Tween 20 を含む 10mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を満たした染色瓶にパラフィン除去工程を経た各種ヒト癌組織切片を入れ、99°C で 40 分間の加熱処理をした。その後、室温で 40 分以上静置することにより冷却した。

[0263] (非特異的抑制反応工程)

(ペルオキシダーゼの内因性反応抑制工程)

抗原賦活化工程を経た各種ヒト癌組織切片周囲の余分な水分を除去し、Peroxidase Block (DAKO社製)を適量滴下して室温で5分間静置した。

[0264] (タンパク質のブロッキング)

PBS-Tでの5分間ずつ3回の洗浄を行った後、ブロッキング液として、10% FBSを含むPBS-T溶液を添加し、モイストチャンバー内において室温で1時間インキュベートした。

[0265] (標識化工程：一次抗体反応ステップ)

非特異的抑制反応工程を経た各種ヒト癌組織切片に、WO2013/018891で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を含む一次抗体液を添加し、モイストチャンバー内において4℃で一晩インキュベートした。一次抗体液は、5% FBSおよび20% normal goat serumを含むPBS-T溶液に上述のマウス抗CAPRIN-1抗体を終濃度2 $\mu$ g/mLとなるように添加して調製した。

[0266] (標識化工程：二次抗体反応ステップ)

一次抗体反応ステップを経た各種ヒト癌組織切片をPBS-Tで10分間3回洗浄した後、切片にPeroxidase Labelled Polymer Conjugated (BIOCARE社製)を適量滴下し、モイストチャンバー内において室温で30分間インキュベートした。

[0267] (発色工程)

二次抗体反応ステップを経た各種ヒト癌組織切片をPBS-Tで10分間3回洗浄した後、切片にDAB発色液(BIOCARE社製)を添加し、室温で20秒程度静置して発色させた。その後、発色液を捨て、PBS-Tで10分間3回の洗浄を行った後、蒸留水でリンスした。その後、70%、80%、90%、95%、100%濃度の各エタノール水溶液に順番に1分間ずつ浸漬し、キシレン中で一晩インキュベートすることで脱水処理を行った。

[0268] (封入)

発色工程を経た各種ヒト癌組織切片を、カバーガラスと、封入剤として Glycer gel Mounting Medium (BIO CARE 社製) を用いて封入した。

[0269] (観察)

光学顕微鏡の4倍対物レンズを使用して、封入した切片の癌組織内の癌細胞における CAPRIN-1 タンパク質染色像を観察した。

[0270] 卵巣癌組織について得られた染色像を図1に示す。図中、Aは細胞核およびCAPRIN-1タンパク質の染色像を示し、Bは細胞核のシグナルを除外したCAPRIN-1タンパク質の染色像を示す。図中矢印で示した通り、細胞膜上に局在するCAPRIN-1タンパク質のシグナルが細胞を縁取るように観察された(図1B)。

[0271] このことから、この染色方法によって、細胞膜タンパク質の細胞膜上のシグナルを精度高く検出できることがわかった。

[0272] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640およびWO2015/020212で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様に細胞膜タンパク質の細胞膜上のシグナルを精度高く検出できることがわかった。

[0273] 比較例1：免疫組織化学染色によるCAPRIN-1タンパク質検出

実施例1と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片(BIOMAX社製)について、パラフィン除去工程でのパラフィン除去の前に62℃で15分間の加熱処理(ベーキング)を実施すること、および抗原賦

活化工程における加熱処理を121℃で実施すること以外は実施例1の記載の工程に従って免疫組織化学的染色を実施した。

[0274] 卵巣癌組織について得られた染色像を図2に示す。図中矢頭で示した通り、CAPRIN-1タンパク質は細胞膜上に局在するにもかかわらず、CAPRIN-1タンパク質のシグナルが細胞膜のみならず細胞質中にも見られ、細胞が塗りつぶされたようにシグナルが観察された(図2B)。

[0275] このことから、実施例1の染色方法と異なり、ベーキングを行うことにより、細胞膜タンパク質の細胞膜上のシグナルの検出精度が著しく低下することがわかった。

[0276] 実施例2：CAPRIN-1陽性癌細胞の判定

まず、光学顕微鏡の4倍対物レンズを使用して、実施例1および比較例1で封入した切片の癌組織内の癌細胞におけるCAPRIN-1タンパク質染色像、陽性染色のシグナル強度を観察した。次に、対物レンズを10倍または20倍に切り替え、各検体由来の全ての切片における癌組織の全細胞に対する、細胞膜に特異的に発色が見られる癌細胞の比率(CAPRIN-1陽性細胞率)を算出した。

[0277] CAPRIN-1陽性細胞率およびCAPRIN-1シグナルの局在に基づいて、各癌組織検体を以下のスコア0~3に分類した。これらスコアのうち、スコア2および3をCAPRIN-1陽性癌組織検体であると判定した。

[0278] ・スコア0 (CAPRIN-1タンパク質過剰発現なし) : CAPRIN-1陽性細胞率(細胞膜特異的にシグナルを呈している細胞の割合)が10%に満たないもの

・スコア1 (CAPRIN-1タンパク質過剰発現なし) : CAPRIN-1陽性細胞率が10%以上であるが、癌細胞膜の一部に限局したシグナルを示し、弱い染色強度を示すもの

・スコア2 (CAPRIN-1タンパク質過剰発現あり) : CAPRIN-1陽性細胞率が10%以上であり、癌細胞の膜に局在したシグナルを示し、

中程度の染色強度を示すもの

・スコア3（CAPRIN-1タンパク質過剰発現あり）：CAPRIN-1陽性細胞率が10%以上であり、癌細胞の膜に局在したシグナルを示し、染色強度が強い強度の染色強度を示すもの

・スコア2および3の組織検体をCAPRIN-1陽性の癌組織検体と判定する。

[0279] 各スコアの例示的な染色像を図3～10に示す。例えば胃癌組織においては、図2に示すようなスコア0の検体（図3）およびスコア1の検体（図4）はCAPRIN-1陰性の検体と判定された。これらの検体では、細胞膜上のシグナルが弱く、細胞同士の境目が判然としなかった。一方、胃癌組織でも、図5および6に示すようなスコア2の検体（図5）およびスコア3の検体（図6）はCAPRIN-1陽性の検体と判定された。これらの検体では、細胞膜上のシグナルが強く観察され、細胞同士の境目が明確であった。

[0280] 他の癌組織においても同様の判定を行った。例えば腎臓癌組織においては、細胞膜上のシグナルが弱い図7および8に示すようなスコア0の検体（図7）およびスコア1の検体（図8）はCAPRIN-1陰性の検体と判定された。一方、細胞膜上のシグナルが強く観察された図9および10に示すようなスコア2の検体（図9）およびスコア3の検体（図10）はCAPRIN-1陽性の検体と判定された。

[0281] 判定の結果、実施例1で染色を行った検体におけるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合、すなわち各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で75%、肺癌組織で65%、膵臓癌組織で70%、腎臓癌組織で70%、大腸癌組織で60%、胃癌組織で60%、卵巣癌組織で65%、前立腺癌組織で90%であった。

[0282] 一方、比較例1で染色を行った検体に基づいて判定を行った結果、CAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で52%、肺癌で54%、膵臓癌58%、腎臓癌55%、大腸癌49%、胃癌40%、卵巣癌45%、前立腺癌54%であり、実施例1の染色に基づく判定結果と大きく異なる結

果となった。

[0283] このことから、パラフィン除去工程にてベーキングすることによる染色の精度の低下が判定結果にも大きな影響を及ぼすことがわかった。

[0284] なお、本比較例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640およびWO2015/020212で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様の染色の精度の低下が見られた。

[0285] 実施例3：免疫組織化学的染色によるCAPRIN-1タンパク質検出2

実施例1と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片（BIOMAX社製）について、一次抗体反応ステップで使用する一次抗体液の抗体濃度を $0.8\mu\text{g}/\text{mL}$ とすること、および発色工程での発色時間を7分程度で実施すること以外は実施例1の記載に従って免疫組織化学的染色を実施し、実施例2と同様にCAPRIN-1陽性癌組織検体を判定した。

[0286] 卵巣癌組織について得られた染色像を図12に示す。抗体濃度および発色時間を変更しても、卵巣癌組織について実施例1で得られた染色像（図11）と同等の精度での染色が可能であることがわかった。

[0287] 判定の結果、CAPRIN-1陽性の癌組織の割合は、乳癌組織で80%、肺癌で70%、膵臓癌80%、腎臓癌80%、大腸癌70%、胃癌55%、卵巣癌55%、前立腺癌80%であり、実施例1の染色に基づく判定結果と概ね一致した。

[0288] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO201

1/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640およびWO2015/020212で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様の各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合が得られた。

[0289] 実施例4：免疫組織化学的染色方法によるCAPRIN-1タンパク質検出3

実施例1と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織（BIO MAX社製）について、抗原賦活化工程における加熱処理を121℃で実施すること以外は実施例1の記載に従って免疫組織化学的染色を実施し、実施例2と同様にCAPRIN-1陽性癌組織検体を判定した。

[0290] 卵巣癌組織について得られた染色像を図13に示す。抗原賦活化工程における加熱温度を変更しても、実施例1で得られた染色像（図11）と同等の精度での染色が可能であることがわかった。

[0291] 判定の結果、CAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で77%、肺癌で67%、膵臓癌75%、腎臓癌75%、大腸癌65%、胃癌60%、卵巣癌60%、前立腺癌85%であり、実施例1の染色に基づく判定結果と概ね一致した。

[0292] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、W

WO 2013/125654、WO 2013/125630、WO 2013/125640 および WO 2015/020212 で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様の各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合が得られた。

[0293] 実施例5：免疫組織化学的染色によるCAPRIN-1タンパク質検出4

実施例1と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片（BIOMAX社製）について、抗原賦活化工程における加熱処理を121℃で実施すること、一次抗体反応ステップで使用する一次抗体液の抗体濃度を0.8 μg/mL とすること、および発色工程での発色時間を7分程度で実施すること以外は実施例1の記載に従って免疫組織化学的染色を実施し、実施例2と同様にCAPRIN-1陽性癌組織検体を判定した。

[0294] 卵巣癌組織について得られた染色像を図14に示す。抗原賦活化工程における加熱温度、抗体濃度および発色時間を変更しても、実施例1で得られた染色像（図11）と同等の精度での染色が可能であることがわかった。

[0295] 判定の結果、CAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で79%、肺癌で68%、膵臓癌77%、腎臓癌76%、大腸癌62%、胃癌62%、卵巣癌61%、前立腺癌86%であり、実施例1の染色に基づく判定結果と概ね一致した。

[0296] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO 2010/016526、WO 2011/096517、WO 2011/096528、WO 2011/096519、WO 2011/096533、WO 2011/096534、WO 2013/018894、WO 2013/018892、WO 2013/018891、WO 2013/018889、WO 2013/018883、WO 2013/125636、WO 2013/125654、WO 2013/125630、WO 2013/125640 および WO 2015/020212 で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクロー

ナル抗体を適用しても、上記と同様の各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合が得られた。

[0297] 実施例6：免疫組織化学的染色によるCAPRIN-1タンパク質検出5

実施例1と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片（BIOMAX社製）について、パラフィン除去工程を以下の通り実施する以外は実施例1の記載に従って免疫組織化学的染色を実施し、実施例2と同様にCAPRIN-1陽性癌組織検体を判定した。

[0298] （パラフィン除去工程）

パラフィン包埋された各種ヒト癌組織（BIOMAX社製）を、Artisan Cleaning Solution（Agilent社製）を用いて15分間かけてパラフィンを除去した。Artisan Cleaning Solutionは5分ごとに2回交換した。この工程は室温で行った。次にPBS-Tで5分間ずつ3回洗浄を行った。

[0299] 判定の結果、CAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で78%、肺癌で66%、膵臓癌76%、腎臓癌79%、大腸癌63%、胃癌64%、卵巣癌62%、前立腺癌88%であり、実施例1の染色に基づく判定結果と概ね一致した。

[0300] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640およびWO2015/020212で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様の各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合が得られた。

[0301] 実施例 7 : 免疫組織化学染色によるCAPRIN-1タンパク質検出6

実施例 1 と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片 (BIOMAX社製) について、一次抗体反応ステップで使用する一次抗体液の抗体濃度を  $0.8 \mu\text{g}/\text{mL}$  とすること、および発色工程での発色時間を 7 分程度で実施すること以外は実施例 6 と同様に免疫組織化学的染色を実施し、実施例 2 と同様にCAPRIN-1陽性癌組織検体を判定した。

[0302] 判定の結果、CAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で 77%、肺癌で 67%、膵臓癌 72%、腎臓癌 72%、大腸癌 68%、胃癌 58%、卵巣癌 64%、前立腺癌 82%であり、実施例 1 の染色に基づく判定結果と概ね一致した。

[0303] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640およびWO2015/020212で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様の各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合が得られた。

[0304] 実施例 8 : 免疫組織化学染色方法によるCAPRIN-1タンパク質検出7

実施例 1 と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片 (BIOMAX社製) について、抗原賦活化工程における加熱処理を  $121^{\circ}\text{C}$  で実施すること以外は実施例 6 と同様に免疫組織化学的染色を実施し、実施例 2 と同様にCAPRIN-1陽性癌組織検体を判定した。

[0305] 判定の結果、CAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で 80%、肺癌で 70%、膵臓癌 70%、腎臓癌 78%、大腸癌 69%、胃癌 5

5%、卵巣癌60%、前立腺癌90%であり、実施例1の染色に基づく判定結果と概ね一致した。

[0306] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640およびWO2015/020212で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様の各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合が得られた。

[0307] 実施例9：免疫組織化学染色によるCAPRIN-1タンパク質検出8

実施例1と同じ検体由来のパラフィン包埋された各種ヒト癌組織切片（BIOMAX社製）について、抗原賦活化工程における加熱処理を121℃で実施すること、一次抗体反応ステップで使用する一次抗体液の抗体濃度を0.8μg/mLとすること、および発色工程での発色時間を7分程度で実施する以外は実施例6と同様に免疫組織化学的染色を実施し、実施例2と同様にCAPRIN-1陽性癌組織検体を判定した。

[0308] 判定の結果、CAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合は、乳癌組織で75%、肺癌で65%、膵臓癌80%、腎臓癌80%、大腸癌62%、胃癌55%、卵巣癌65%、前立腺癌80%であり、実施例1の染色に基づく判定結果と概ね一致した。

[0309] また、本実施例にて、一次抗体反応ステップにおいて使用する抗体として、WO2010/016526、WO2011/096517、WO2011/096528、WO2011/096519、WO2011/096533、WO2011/096534、WO2013/018894、WO2

013/018892、WO2013/018891、WO2013/018889、WO2013/018883、WO2013/125636、WO2013/125654、WO2013/125630、WO2013/125640およびWO2015/020212で作製したマウス抗CAPRIN-1モノクローナル抗体またはウサギ抗CAPRIN-1モノクローナル抗体を適用しても、上記と同様の各癌組織検体数に占めるCAPRIN-1陽性の癌組織検体の割合が得られた。

[0310] 以上の結果から、本発明の染色方法は、除去溶液の種類やその他の条件を多少変更した場合であっても、細胞膜タンパク質を高い精度で検出可能であることがわかった。

[0311] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

### 符号の説明

- [0312] S0101 包埋媒体除去工程  
S0102 抗原賦活化工程  
S0103 標識化工程  
S0104 標識検出工程  
O210 包埋媒体除去部  
O211 除去溶液貯留手段  
O212、O222、O232、O234 接触手段  
O213 保持手段  
O220 抗原賦活化反応部  
O221 抗原賦活化手段  
O230 標識化反応部  
O231 結合分子貯留手段  
O233 標識化抗体貯留手段  
O240 標識検出部  
O241 検出手段

- 0 2 4 2 解析手段
- 0 2 5 0 制御部
- 0 2 5 1 C P U
- 0 2 5 2 揮発性メモリ
- 0 2 5 3 不揮発性メモリ
- 0 2 5 4 インターフェース
- 0 2 5 5 バス

## 請求の範囲

- [請求項1] 包埋された固定組織から包埋媒体を除去して細胞膜タンパク質を検出する方法であって、
- 固体状態の包埋媒体を含む前記固定組織を除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する包埋媒体除去工程、
- 前記包埋媒体除去工程後の固定組織の前記細胞膜タンパク質と標識化抗体を結合させる標識化工程、および
- 前記標識化工程後、前記細胞膜タンパク質と結合した標識化抗体を検出する標識検出工程を含む、前記方法。
- [請求項2] 前記包埋媒体除去工程が、前記固定組織を包埋媒体の融点未満で前記除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する工程である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記包埋媒体がパラフィンである、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] 前記包埋媒体除去工程が、前記固定組織を45℃未満に維持しながら前記除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する工程である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記除去溶液が界面活性剤および／または有機溶媒を含む溶液である、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記包埋媒体除去工程における接触が浸漬である、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記包埋媒体除去工程後に、前記固定組織中の前記細胞膜タンパク質を賦活化する抗原賦活化工程を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] 前記抗原賦活化工程が90～130℃での加熱ステップを含む、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記抗原賦活化工程後に、前記固定組織を冷却する冷却工程を含む、請求項7または8に記載の方法。

- [請求項10] 前記標識化工程が、前記包埋媒体除去工程後の固定組織の前記細胞膜タンパク質と前記細胞膜タンパク質と免疫学的反応性を有する一次抗体を反応させる一次抗体反応ステップ、および、前記一次抗体反応工程後の前記固定組織に、前記一次抗体と免疫学的反応性を有する標識化二次抗体を反応させる二次抗体反応ステップ、を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項11] 前記標識化二次抗体が、前記一次抗体と免疫学的反応性を有する抗体およびペルオキシダーゼがポリマー担体上結合した複合体である、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] 前記標識検出工程が、前記ペルオキシダーゼと反応性を有する発色試薬により発色した前記細胞膜タンパク質を検出する工程である、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 発色試薬が3, 3'-diaminobenzidine (DAB)である、請求項11または12に記載の方法。
- [請求項14] 前記細胞膜タンパク質が癌細胞表面に発現する細胞膜タンパク質である、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項15] 前記細胞膜タンパク質が疾患マーカーである、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項16] 前記疾患が癌である、請求項15に記載の方法。
- [請求項17] 前記疾患マーカーがCAPRIN-1タンパク質である、請求項15または16に記載の方法。
- [請求項18] 固定組織が由来する個体に対する治療法を決定する方法であって、請求項15～17のいずれか一項に記載の方法を用いて包埋された固定組織中の疾患マーカーを検出する工程、および  
前記工程によって検出された疾患マーカーに基づいて、前記個体に対する治療法を決定する治療法決定工程を含む、前記方法。
- [請求項19] 包埋された固定組織において細胞膜タンパク質を検出する装置であ

って、

固体状態の包埋媒体を含む前記固定組織を除去溶液に接触させて前記包埋媒体を除去する包埋媒体除去部、

前記包埋媒体除去部を経た固定組織の前記細胞膜タンパク質と標識化抗体を結合させる標識化反応部、および、

前記標識化反応部を経た固定組織において前記細胞膜タンパク質と結合した標識化抗体を検出する標識検出部を備える、前記装置。

[請求項20] 前記包埋媒体除去部が、前記固定組織を包埋媒体の融点未満とする調温手段を備える、請求項19に記載の装置。

[請求項21] 前記包埋媒体除去部を経た固定組織中の前記細胞膜タンパク質を賦活化する抗原賦活化反応部をさらに備える、請求項19または20に記載の装置。

[請求項22] 前記細胞膜タンパク質が癌細胞表面に発現する細胞膜タンパク質である、請求項19～21のいずれか一項に記載の装置。

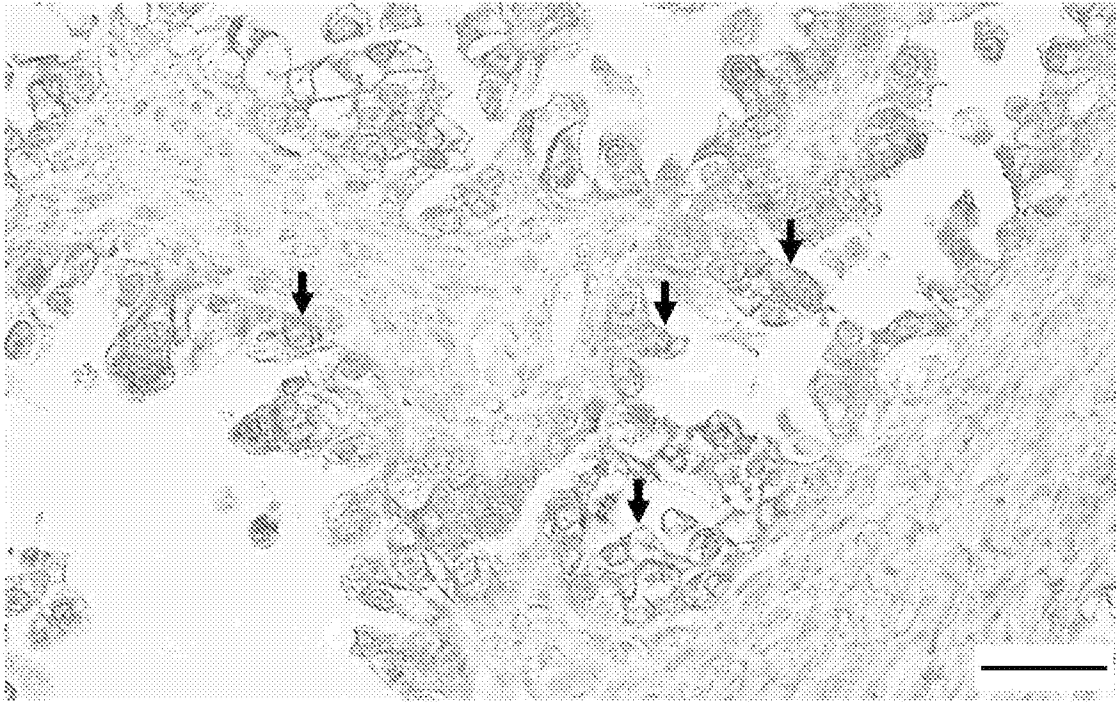
[請求項23] 前記細胞膜タンパク質が疾患マーカーである、請求項19～22のいずれか一項に記載の装置。

[請求項24] 前記疾患が癌である、請求項23に記載の装置。

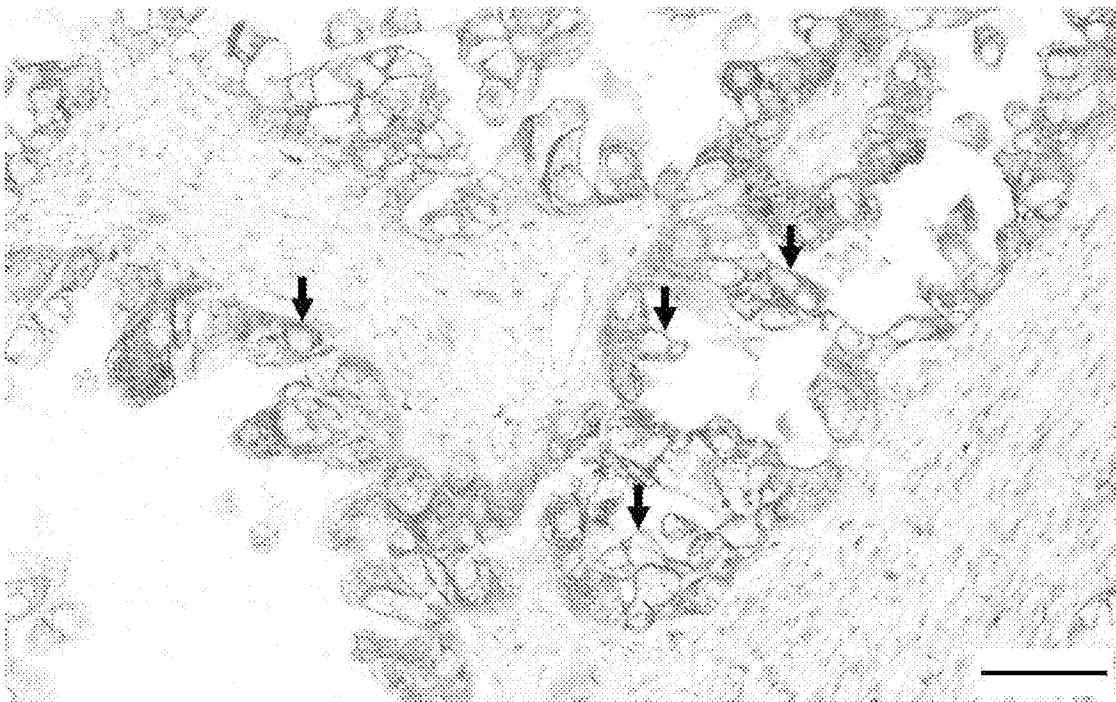
[請求項25] 前記疾患マーカーがCAPRIN-1タンパク質である、請求項23または24に記載の装置。

[図1]

A

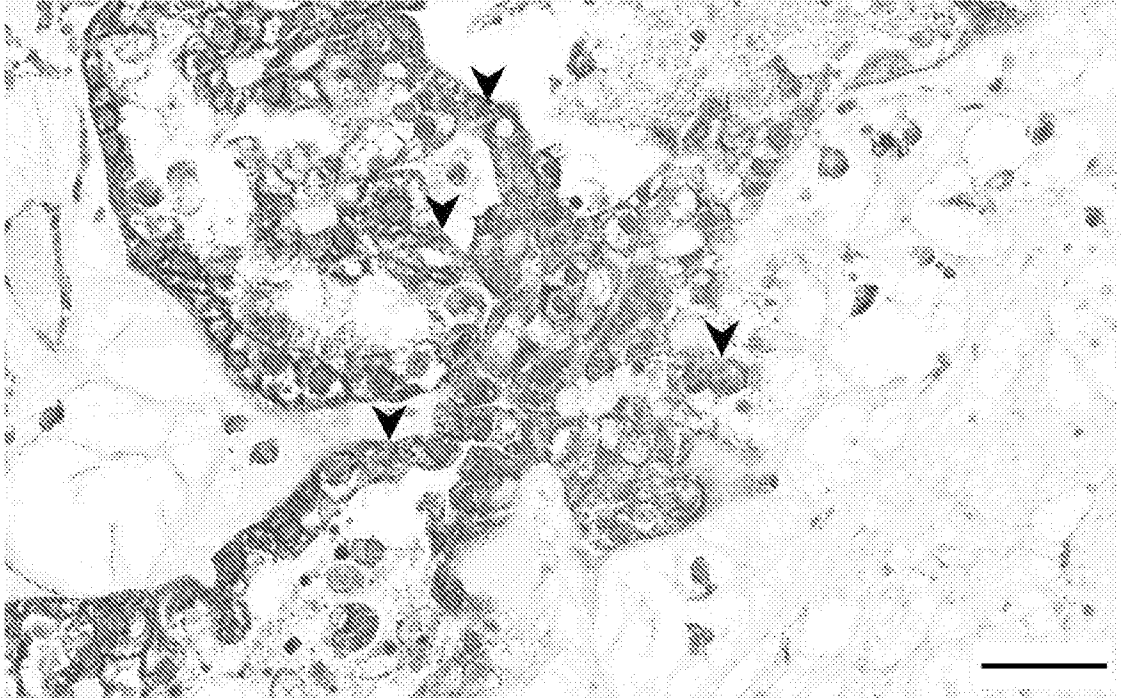


B

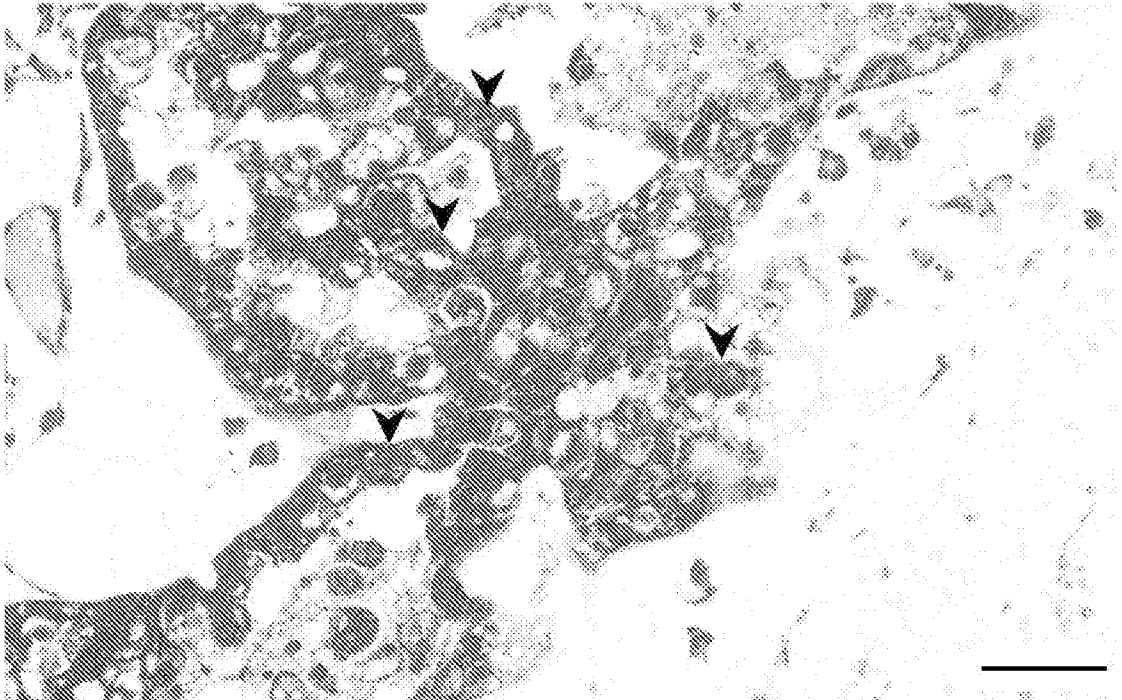


[図2]

A

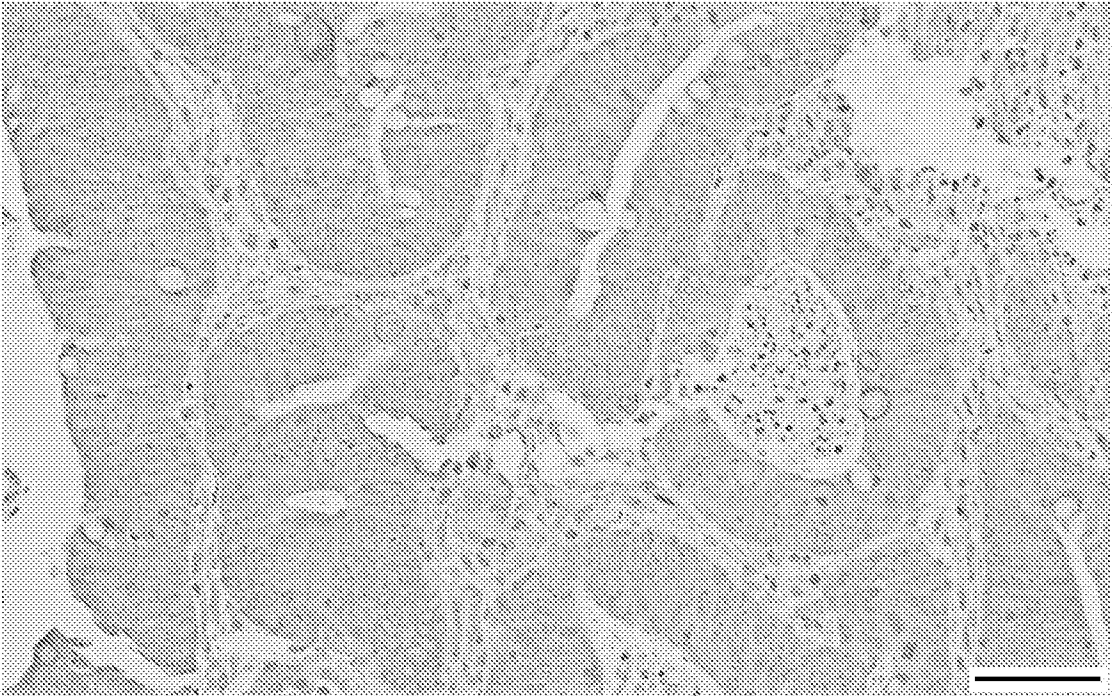


B

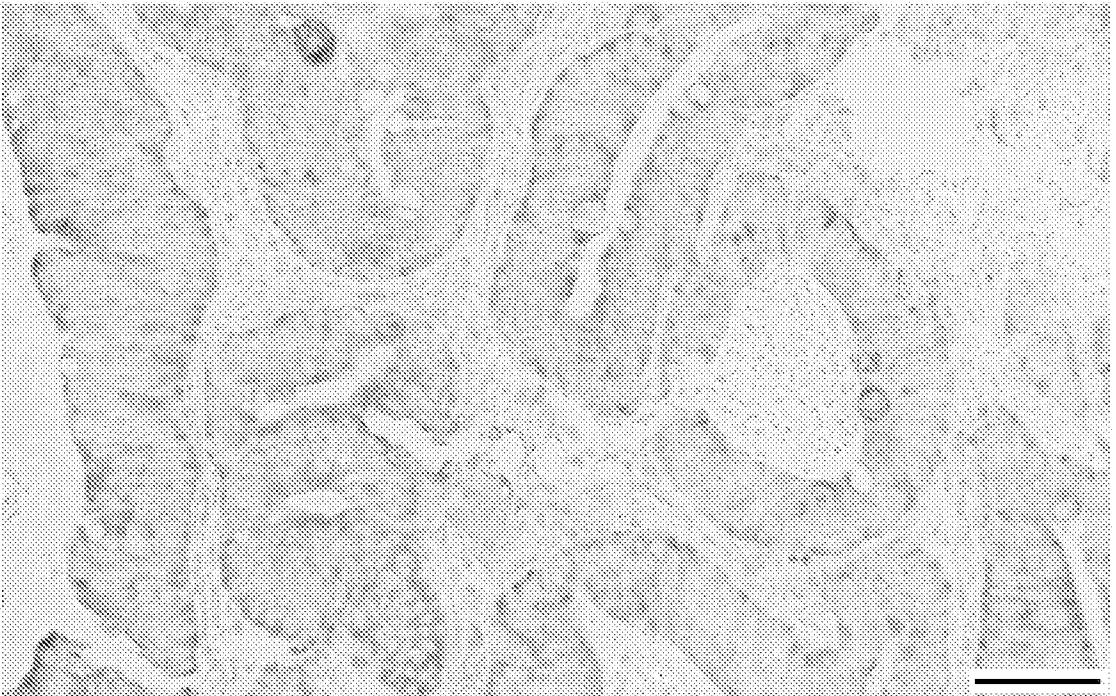


[図3]

A

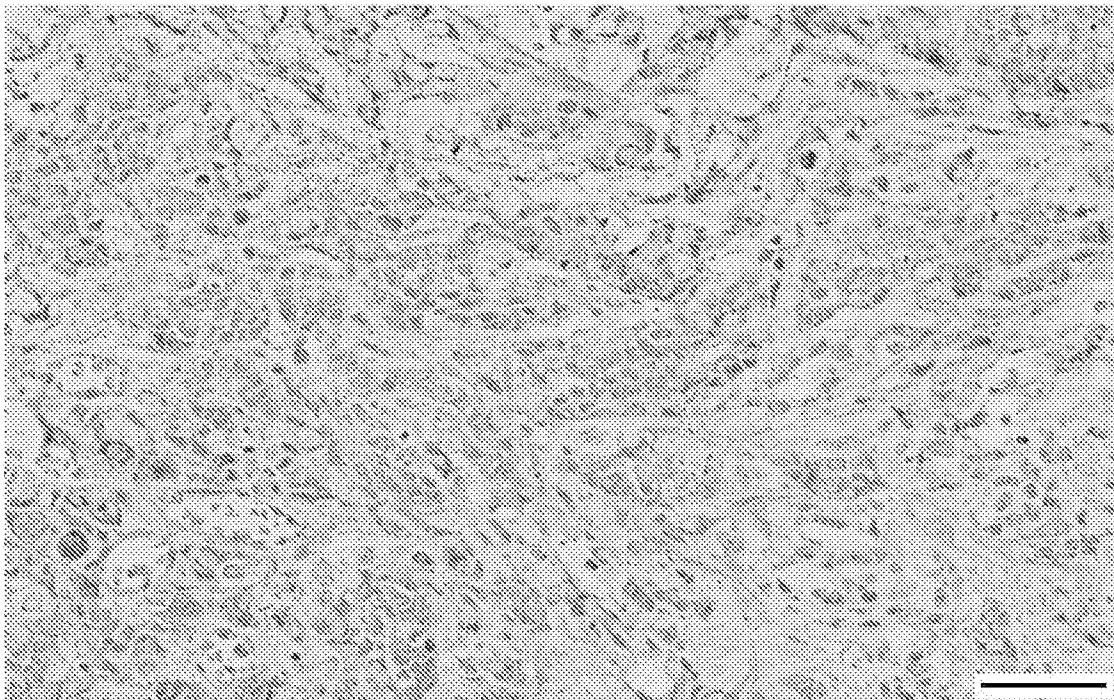


B

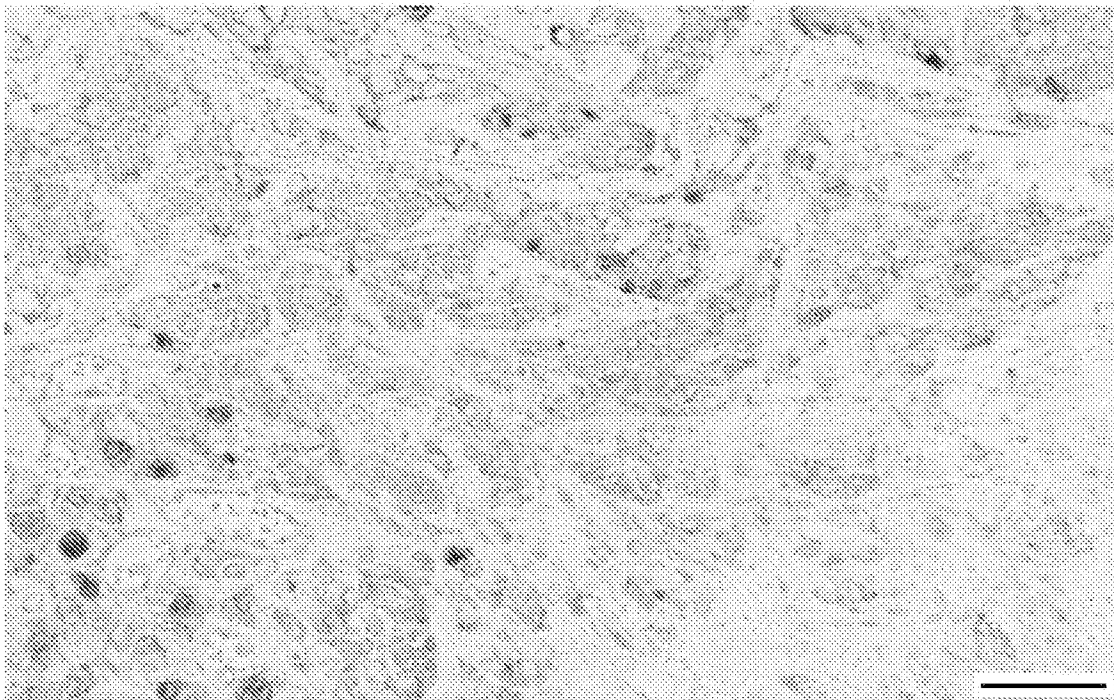


[図4]

A

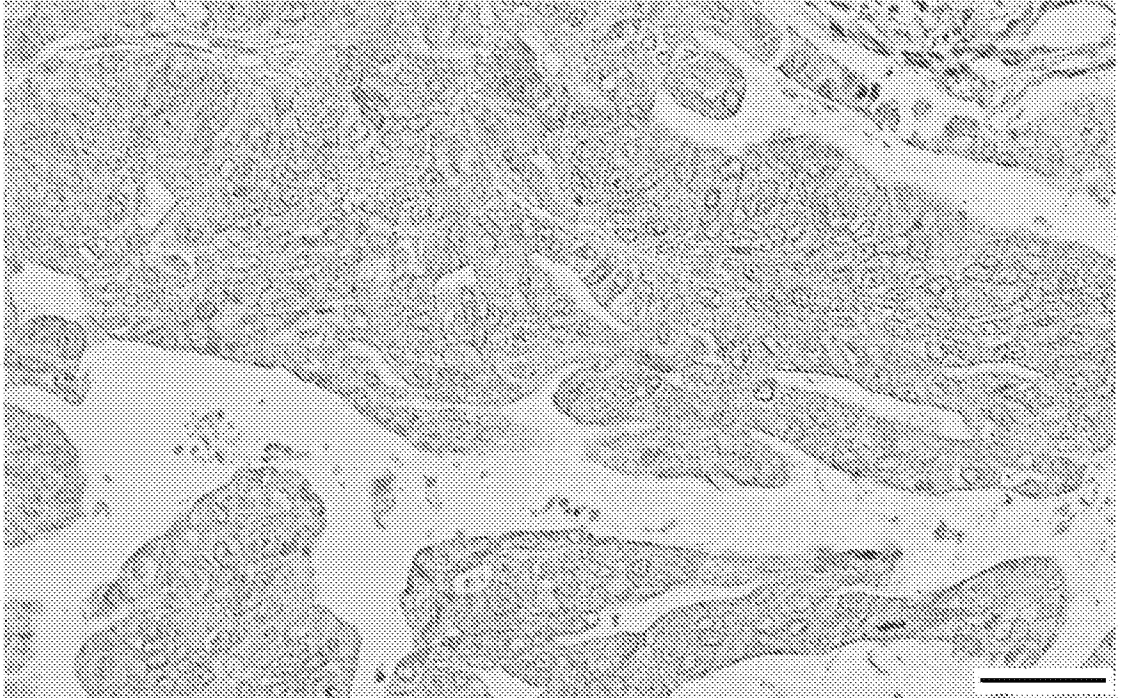


B

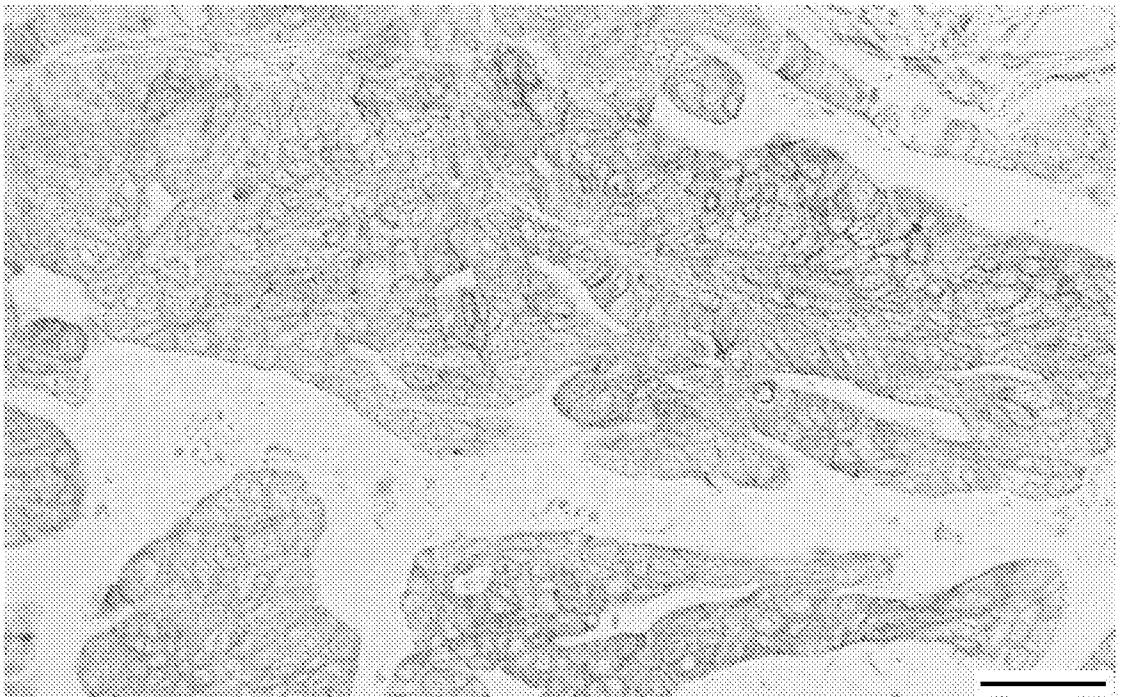


[図5]

A

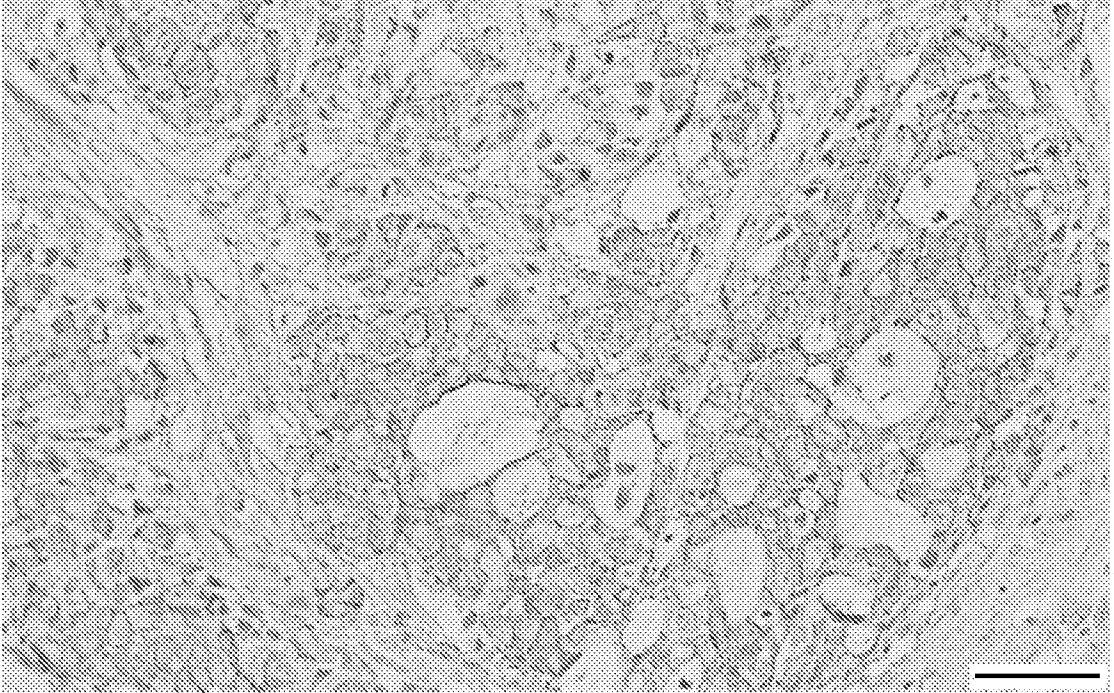


B

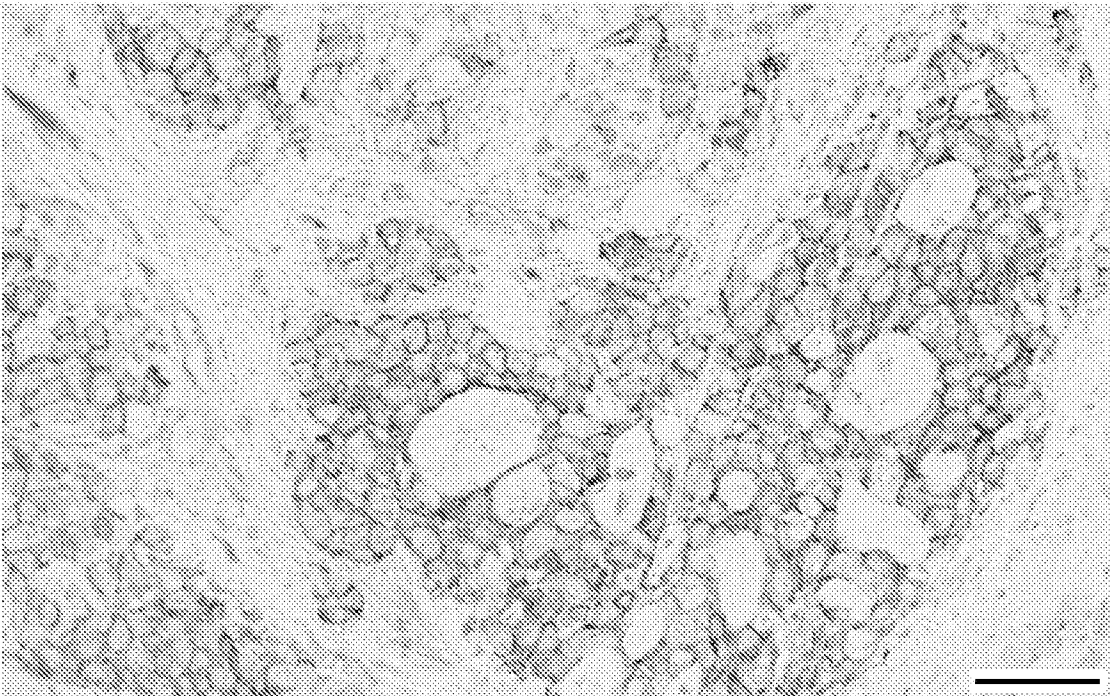


[図6]

A

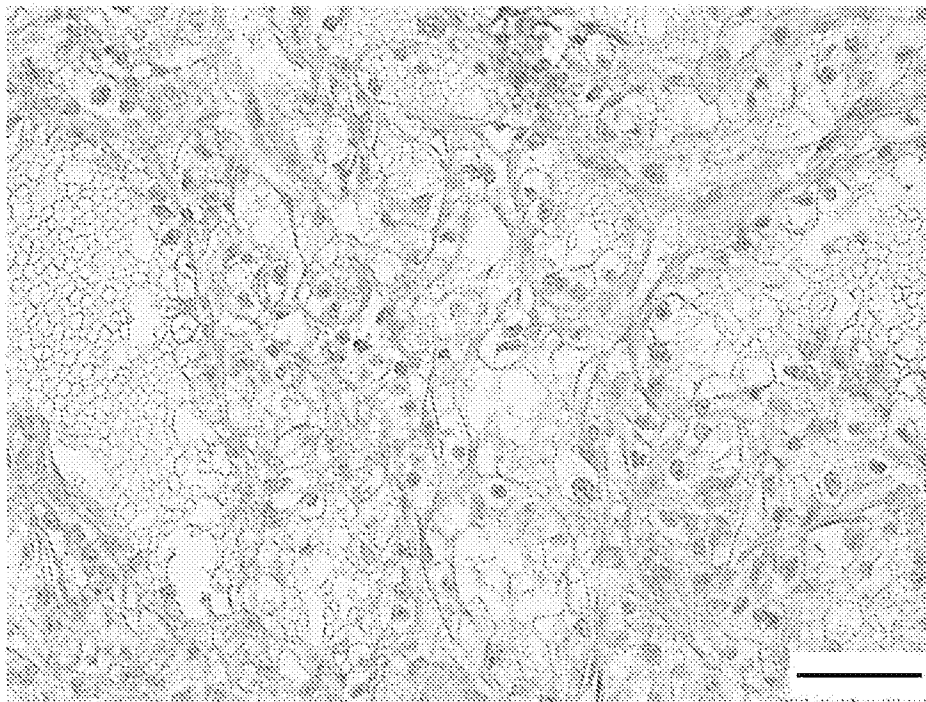


B

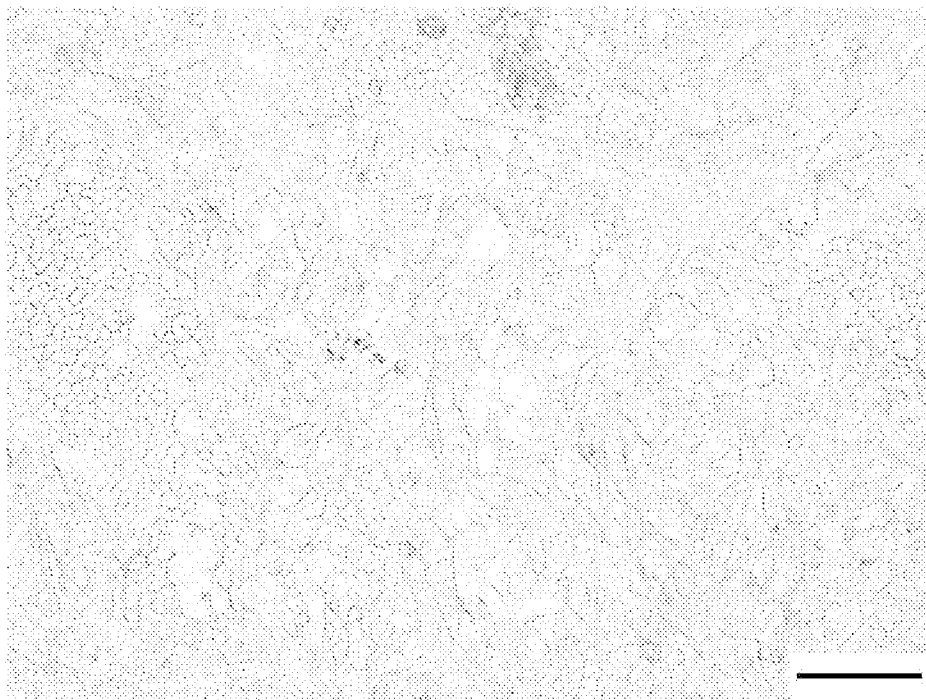


[図7]

A

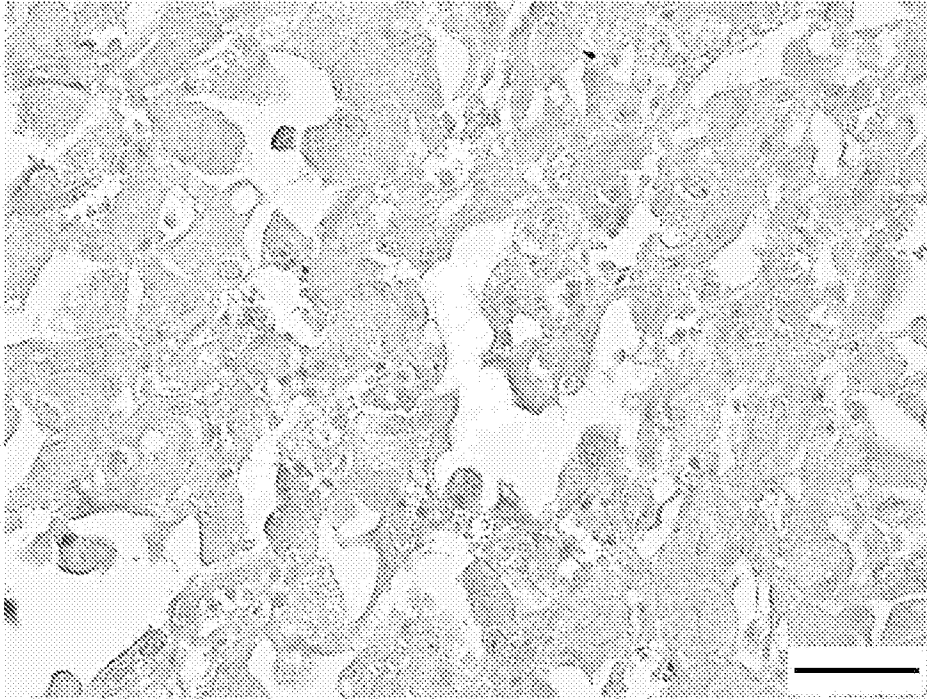


B

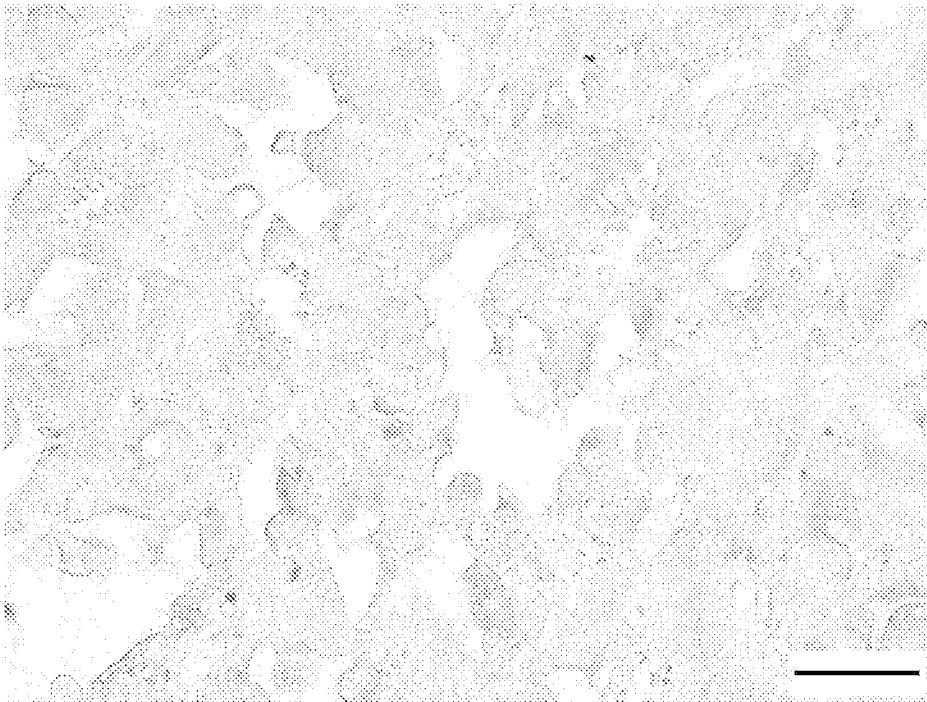


[図8]

A

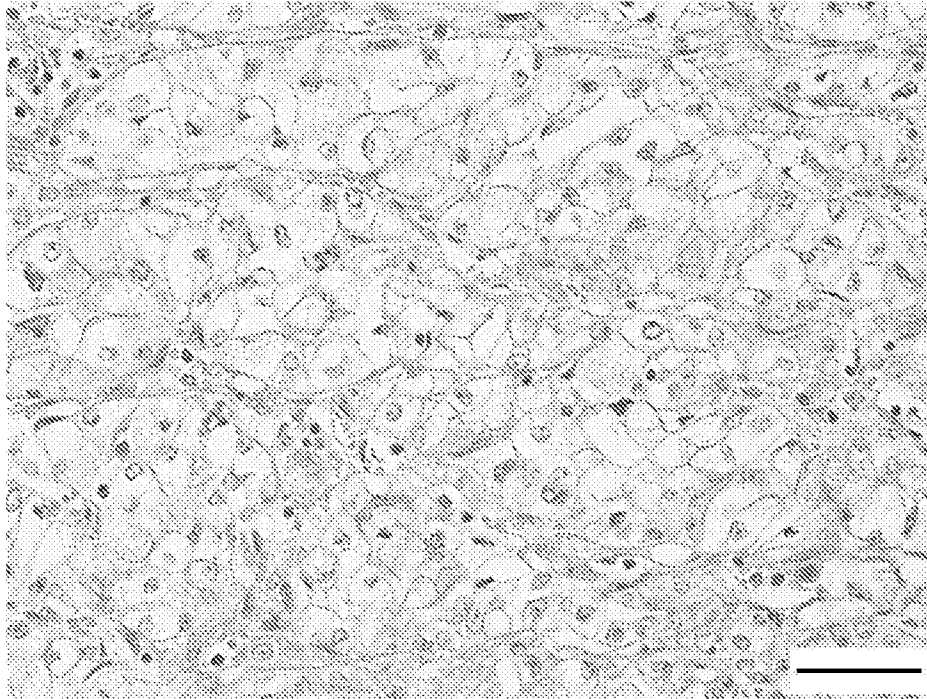


B

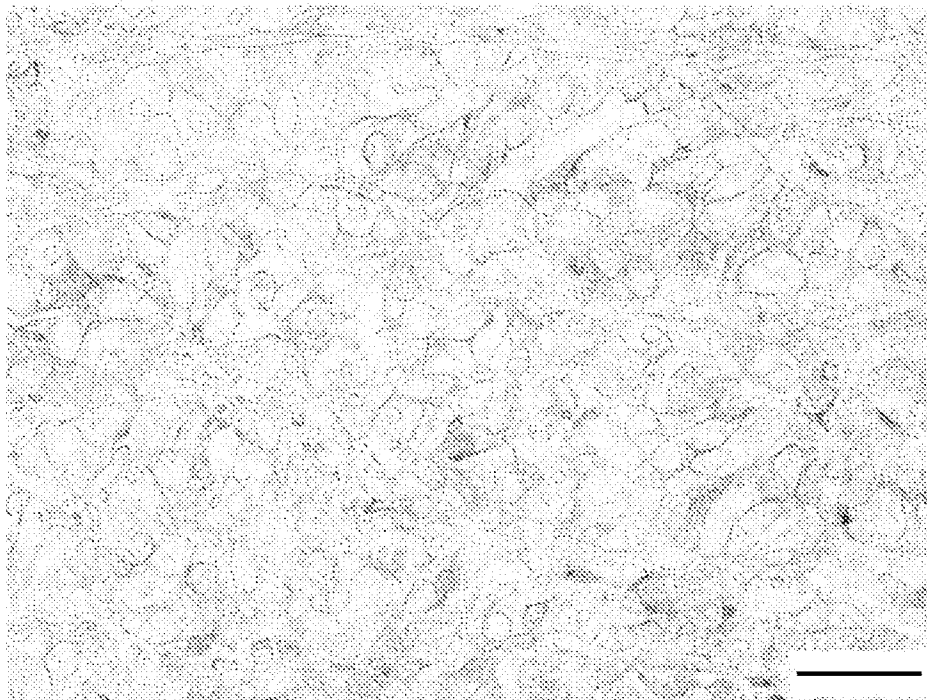


[図9]

A

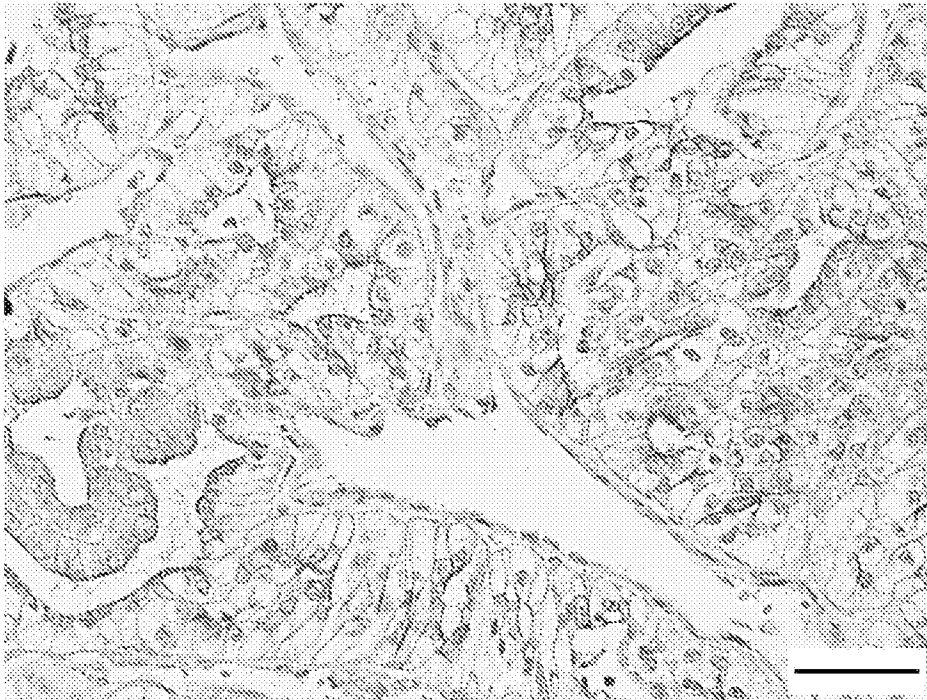


B

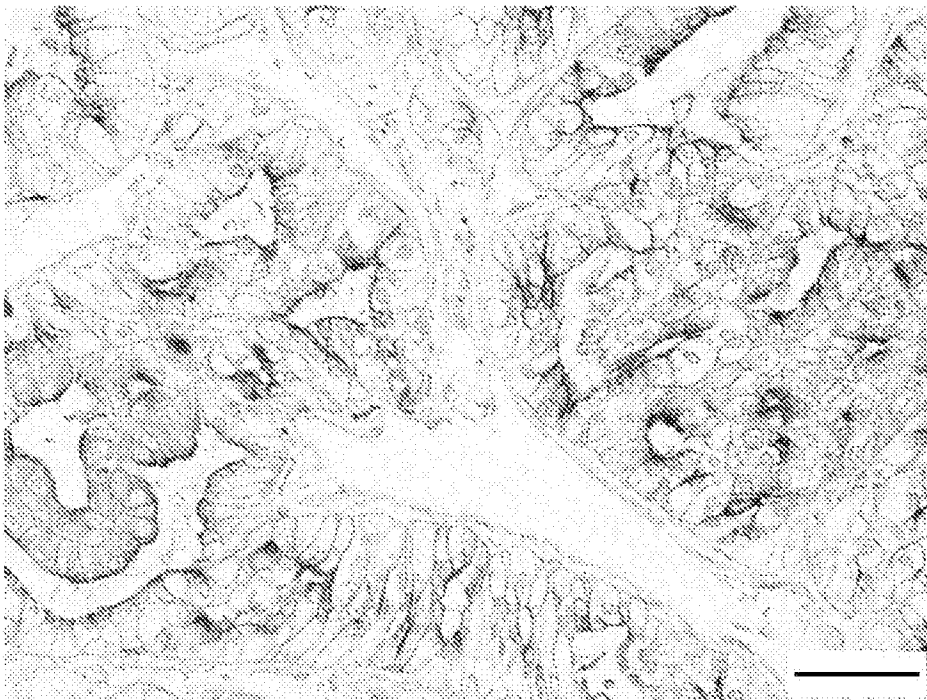


[図10]

A

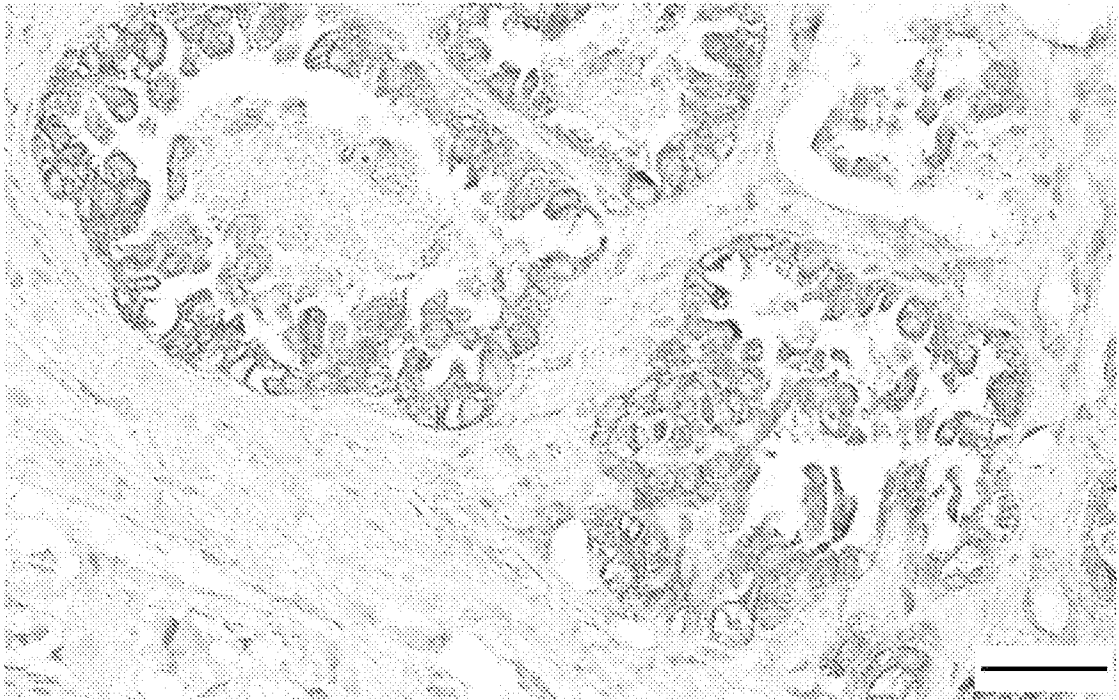


B

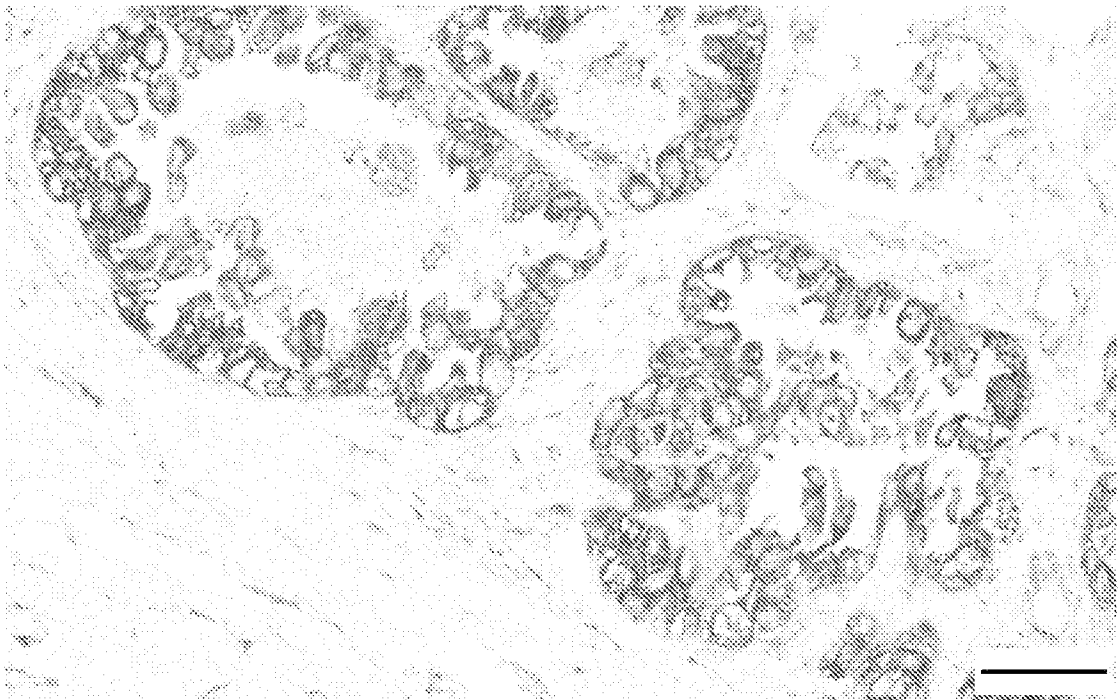


[図11]

A

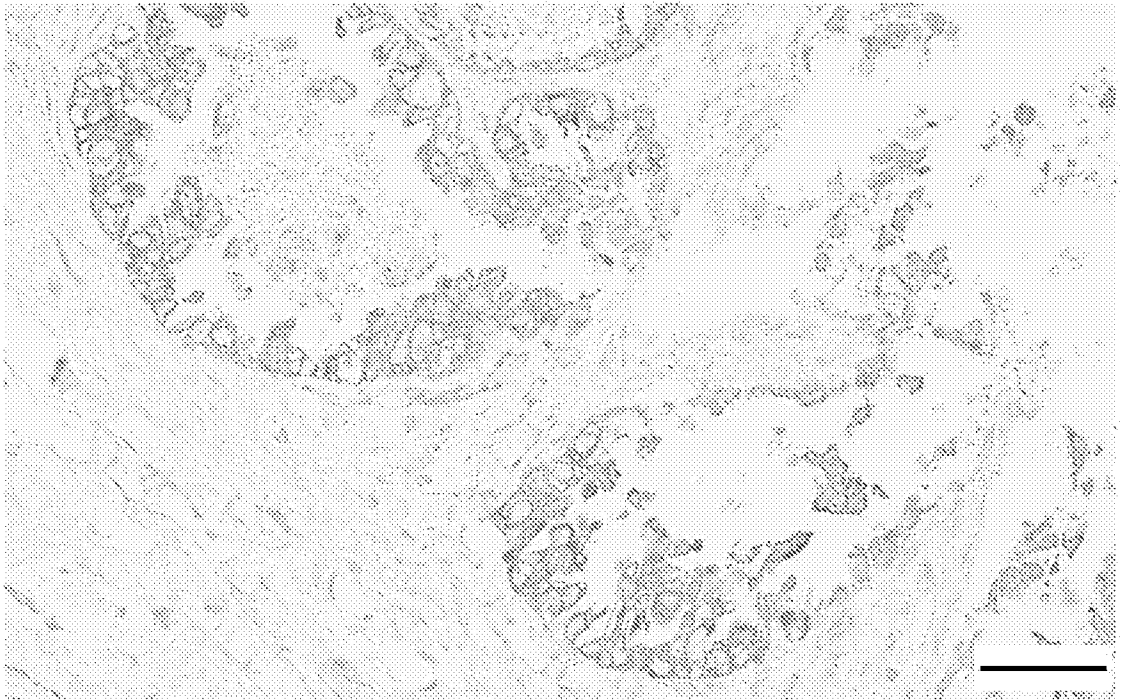


B

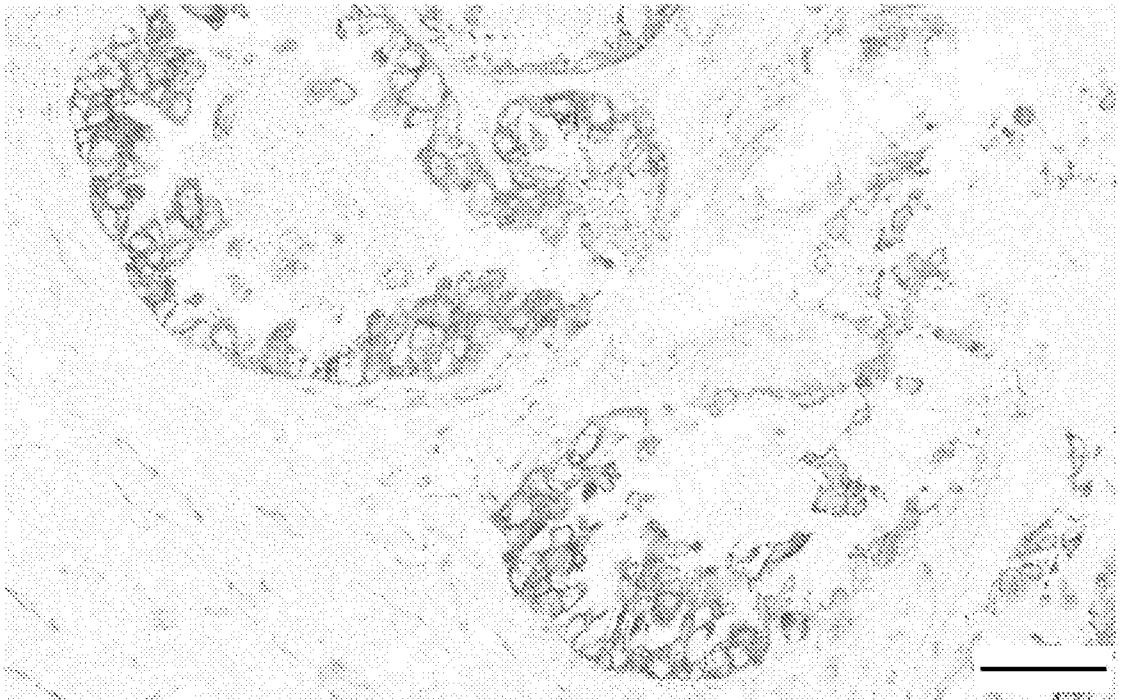


[図12]

A

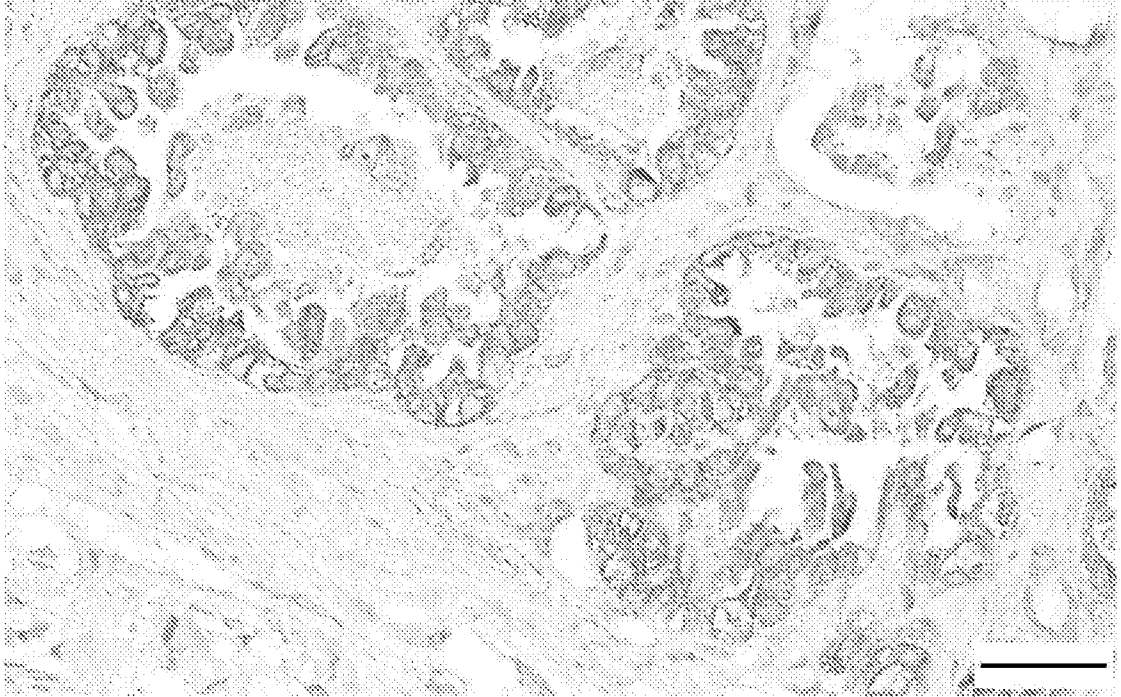


B

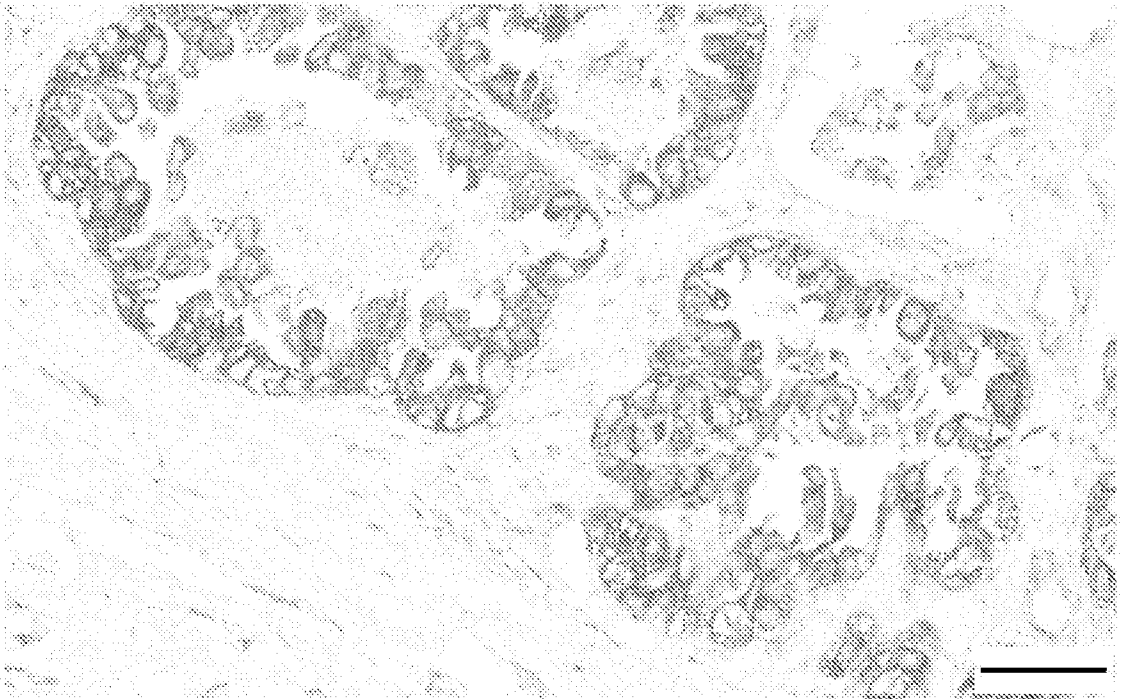


[図13]

A

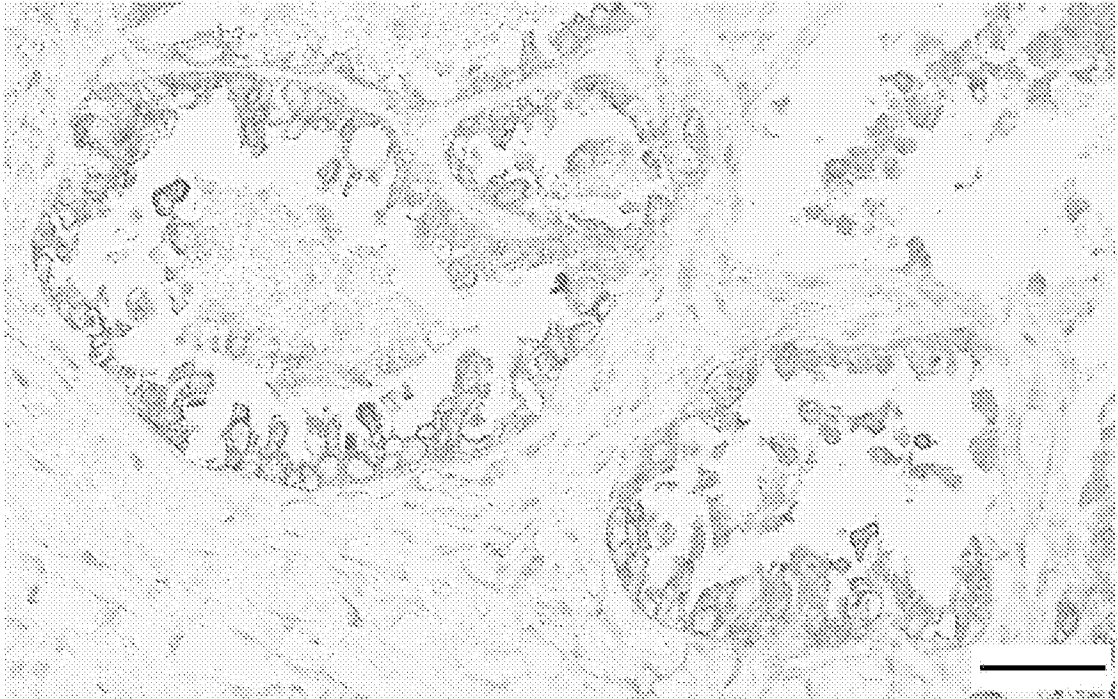


B

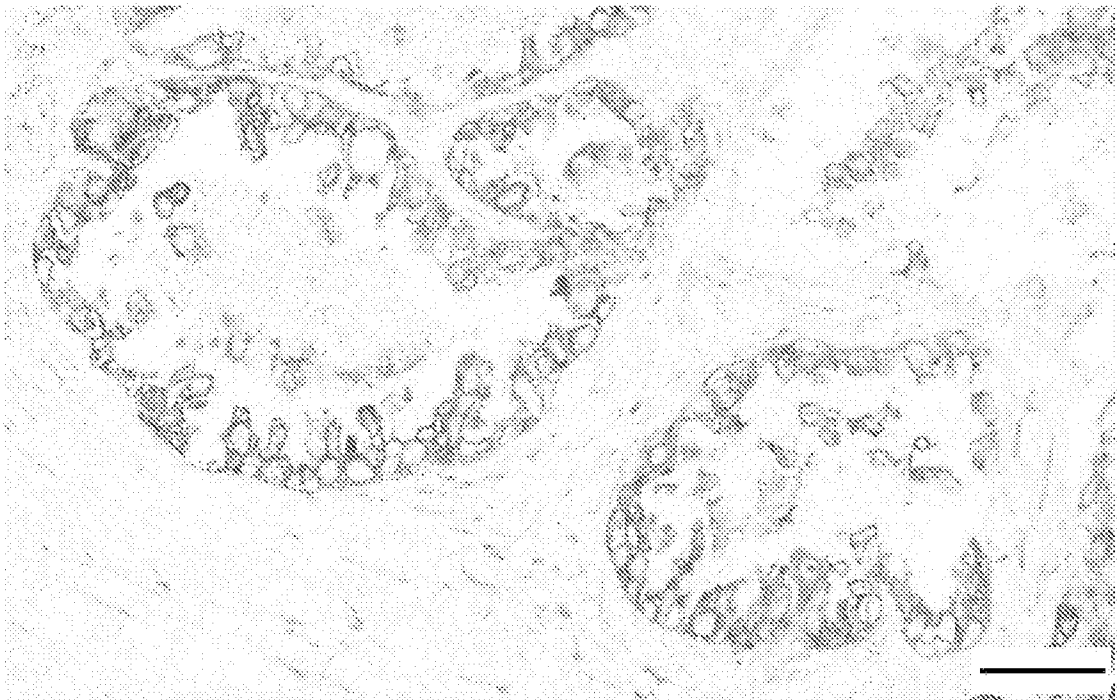


[図14]

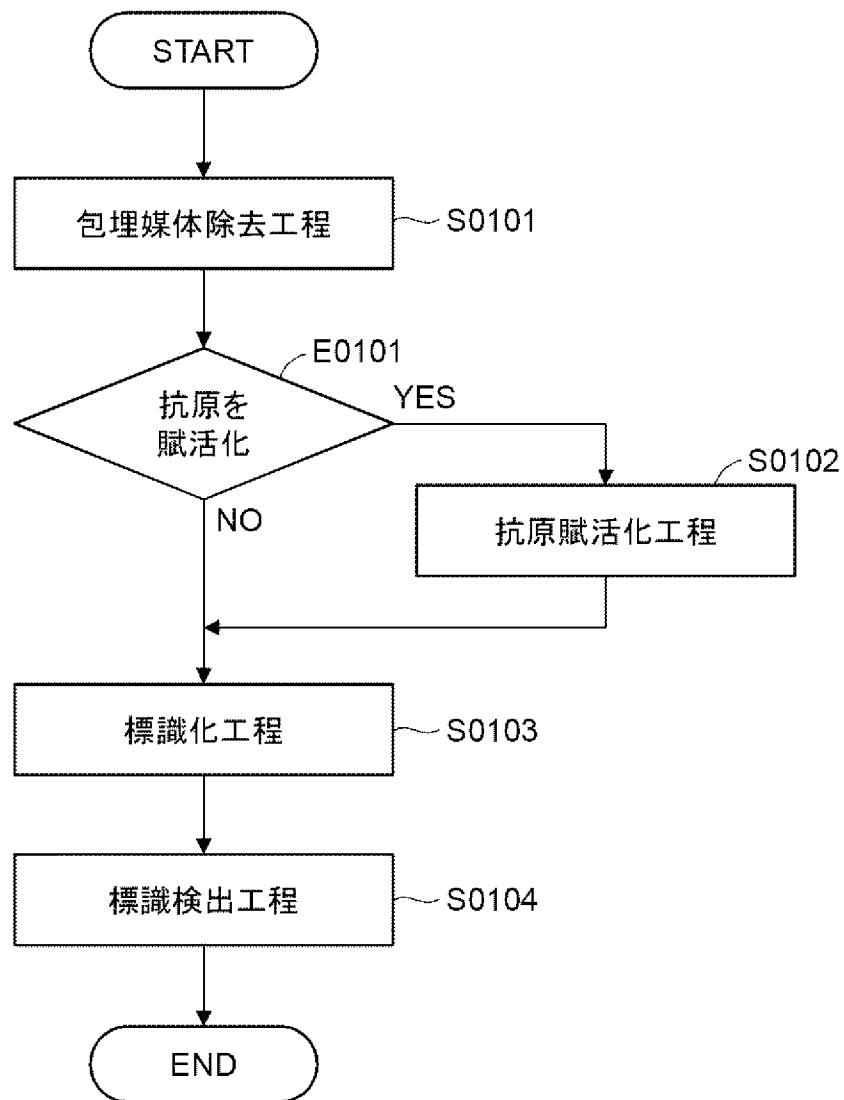
A



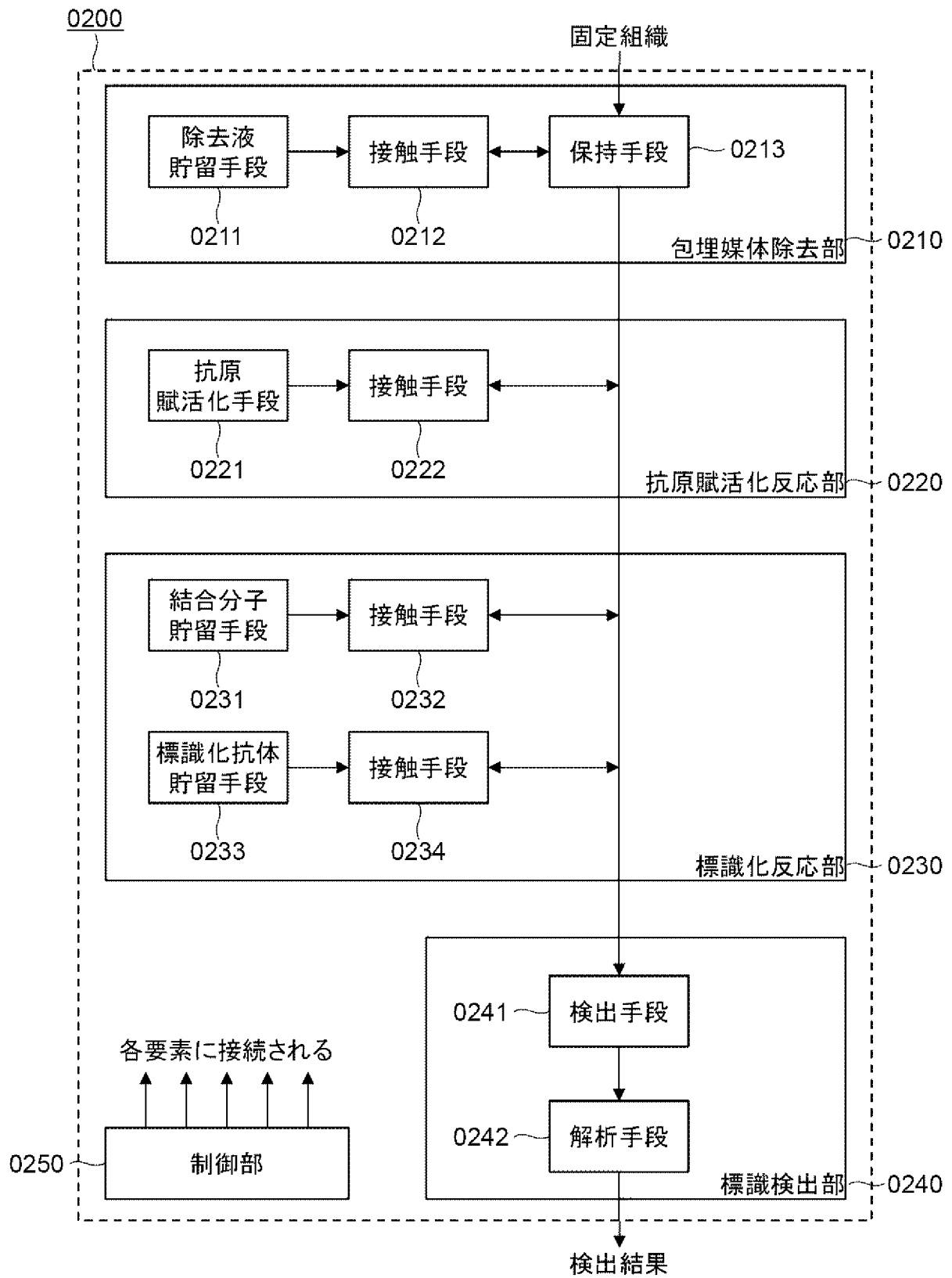
B



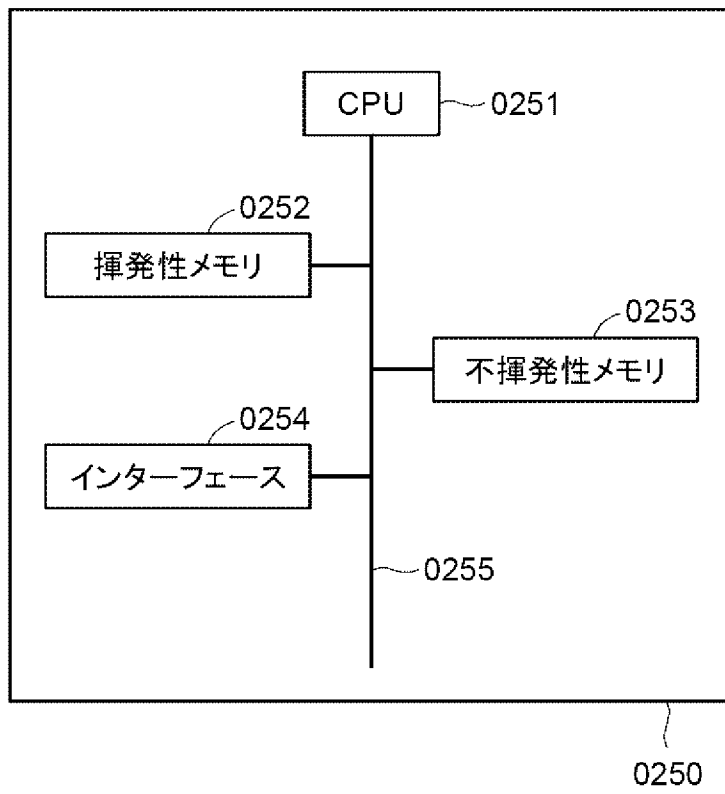
[図15]



[図16]



[図17]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/012221

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
G01N 33/48(2006.01)i FI: G01N33/48 P; G01N33/48 R		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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 Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-527330 A (VENTANA MEDICAL SYST INC.) 24 July 2008 (2008-07-24) claims, paragraph [0003], example 3	1-6, 10, 14-16, 18-20, 22-24
Y		7-9, 11-13, 17, 21, 25
X	WO 2014/014086 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 23 January 2014 (2014-01-23) paragraph [0119]	1, 3, 5-19, 21-25
Y		2, 4, 7-9, 11-13, 17, 20-21, 25
X	JP 2010-501549 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 21 January 2010 (2010-01-21) paragraph [0065]	1-10, 14-16, 18-24
Y		2, 4, 7-9, 11-13, 20-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 <b>16 May 2024</b>		Date of mailing of the international search report <b>28 May 2024</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2024/012221**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2020/138427 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 02 July 2020 (2020-07-02) paragraphs [0081]-[0083]	1-10, 14-16, 18-24
Y		2, 4, 7-9, 11-13, 20-21

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No. <b>PCT/JP2024/012221</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2008-527330 A	24 July 2008	US 2006/0252025 A1 claims, paragraph [0005], example 3	
WO 2014/014086 A1	23 January 2014	US 2015/0185222 A1 paragraph [0118] EP 2876447 A1 CN 104471404 A KR 10-2015-0037752 A	
JP 2010-501549 A	21 January 2010	US 2010/0196350 A1 paragraph [0086] WO 2008/023947 A1 KR 10-2008-0018149 A CN 101605560 A	
WO 2020/138427 A1	02 July 2020	US 2022/0073641 A1 paragraph [0111] EP 3903790 A1 CN 113226329 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） G01N 33/48(2006.01)i FI: G01N33/48 P; G01N33/48 R		
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）） 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 - 2024年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2024年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2024年		
国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2008-527330 A (ベンタナ・メディカル・システムズ・インコーポレーテッド) 24.07.2008 (2008 - 07 - 24) [特許請求の範囲], [0003], [実施例3]	1-6, 10, 14-16, 18-20, 22-24
Y		7-9, 11-13, 17, 21, 25
X	WO 2014/014086 A1 (東レ株式会社) 23.01.2014 (2014 - 01 - 23) [0119]	1, 3, 5-19, 21-25
Y		2, 4, 7-9, 11- 13, 17, 20-21, 25
X	JP 2010-501549 A (コリア リサーチ インスティテュート オブ バイオサイエンス アンド バイオテクノロジー) 21.01.2010 (2010 - 01 - 21) [0065]	1-10, 14-16, 18-24
Y		2, 4, 7-9, 11-13, 20-21
X	WO 2020/138427 A1 (国立大学法人 東京大学) 02.07.2020 (2020 - 07 - 02) [0081]-[0083]	1-10, 14-16, 18-24
Y		2, 4, 7-9, 11-13, 20-21
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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 16.05.2024	国際調査報告の発送日 28.05.2024	
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	

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/JP2024/012221

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2008-527330 A	24.07.2008	US 2006/0252025 A1 [特許請求の範囲], [0005], [実施例3]	
WO 2014/014086 A1	23.01.2014	US 2015/0185222 A1 [0118] EP 2876447 A1 CN 104471404 A KR 10-2015-0037752 A	
JP 2010-501549 A	21.01.2010	US 2010/0196350 A1 [0086] WO 2008/023947 A1 KR 10-2008-0018149 A CN 101605560 A	
WO 2020/138427 A1	02.07.2020	US 2022/0073641 A1 [0111] EP 3903790 A1 CN 113226329 A	