

(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  
2015年4月2日(02.04.2015)



(10) 国際公開番号  
WO 2015/045962 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)  
G01N 21/64 (2006.01) G01N 33/536 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/074420
- (22) 国際出願日: 2014年9月16日(16.09.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2013-199782 2013年9月26日(26.09.2013) JP
- (71) 出願人: コニカミノルタ株式会社(KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 Tokyo (JP). 国立大学法人東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: 岡田 文徳(OKADA, Fuminori); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 相宮 拓司(AIMIYA, Takuji); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 権田 幸祐(GONDA, Kohsuke); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 大内憲明(OHUCHI, Noriaki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 渡邊 みか(WATANABE, Mika); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 S S I N P A T (SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目13番6号 五反田山崎ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING QUANTITY OF BIOLOGICAL MATERIAL IN TISSUE SECTION

(54) 発明の名称: 組織切片における生体物質の定量法

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a method for detecting a specific tissue/cell in a sampled tissue section and accurately specifying an expression position and expression amount of a biological material of interest that is expressed on the specific tissue/cell. This method for determining the quantity of a biological material in a tissue section includes (1) performing immunostaining (first immunostaining) capable of bright field observation, for specifically staining a first biological material in the tissue section, (2) performing immunostaining (second immunostaining) through use of nanoparticles encapsulating a phosphor for specifically staining a second biological material in the tissue section, (3) specifying the expression position of the second biological material in the tissue section by comparing the position of a staining image of the first immunostaining and the position of a staining image of the second immunostaining, and (4) specifying the expression amount of the second biological material by measuring the amount of fluorescence of the staining image of the second immunostaining.

(57) 要約: 本発明の課題は、採取した組織切片において、特定の組織・細胞を検出し、その特定の組織・細胞上に発現している目的の生体物質の発現位置と発現量の両者を正確に特定する方法を提供することにある。本発明の組織切片における生体物質の定量法は、(1) 前記組織切片における第一の生体物質を特異的に染色する明視野観察可能な免疫染色(第一の免疫染色)を行い、(2) 前記組織切片における第二の生体物質を特異的に染色する蛍光物質内包ナノ粒子による免疫染色(第二の免疫染色)を行い、(3) 第一の免疫染色の染色像の位置と第二の免疫染色の染色像の位置を比較することによって、前記組織切片における第二の生体物質の発現位置を特定し、(4) 第二の免疫染色の染色像の蛍光量を測定することによって、第二の生体物質の発現量を特定する、ことを含む。

WO 2015/045962 A1

## 明 細 書

発明の名称：組織切片における生体物質の定量法

### 技術分野

[0001] 本発明は、組織切片における生体物質の定量法に関する。詳しくは、本発明は、免疫染色を用いた組織切片における生体物質の定量法に関する。

### 背景技術

[0002] 病理診断の分野においては、採取した組織切片の標本から特定の細胞や組織を検出し、その特定の細胞や組織上に病変と関連性を有する物質がどの程度発現しているかを定量することは有用であり、このために免疫組織化学を用いた方法が検討されている。

[0003] 免疫組織化学（Immunohistochemistry；IHC）は、抗体を用いて組織サンプル中の抗原を検出する組織学（組織化学）的手法として広く知られている。この免疫組織化学は、本来不可視である抗原抗体反応を可視化するために発色操作を行う観点から、「免疫染色」などと呼ばれることがある（以下、本明細書においては、この免疫組織化学に対して「免疫組織化学染色」という語を用いることもある。）。抗原抗体反応の所在を可視化するという特徴により、免疫組織化学は、組織サンプル中の生体物質の所在を検出する目的で、医学及び生命化学の分野において広く用いられている。

[0004] IHC法では、抗原抗体反応の所在を可視化する方法として、明視野観察可能な染色方法が広く用いられており、具体的には、酵素によって色素沈着性の物質に変換される基質を用いる手法が一般的に用いられている。例えば、臨床現場においては、組織サンプル中の対象とする抗原に結合した抗体を、ペルオキシダーゼ（Peroxidase；POD）とジアミノベンジジン（Diaminobenzidine；DAB）を用いて染色して、可視化し、この可視化された抗体を通じて特定の抗原の発現量を、明視野観察により検出することが広く行われている。この明視野観察によれば、後述の発

光物質を用いる方法に比べ、その染色の色味等のアナログ的に得られる情報を総合的に判断することにより、標的とする分子についてより詳細な情報が得られるという利点がある。この免疫染色方法を用いて細胞腫の判別や標本における細胞腫の位置を特定する方法として、細胞に特異的に発現するマーカーを標的にした免疫染色が汎用技術となっている。

[0005] 免疫組織化学を用いて、組織切片における目的の生体物質の発現レベルを高精度に評価する方法として、蛍光物質内包ナノ粒子を用いて免疫染色し、発生する蛍光の輝点ドットを検出して、生体物質の発現レベルを評価する方法が知られている（特許文献1）。この方法では、蛍光物質内包ナノ粒子を用いることで目的の生体物質に対応する輝度分布を計測することができるが、組織切片の中の特定の組織・細胞と目的の生体物質との位置関係を特定することは難しく、特定の組織・細胞上に発現した目的の生体物質を選択して輝度分布を計測することは困難であった。

[0006] また、同一組織切片について、酵素抗体法（酵素反応を用いたDAB染色）による明視野観察可能な染色と蛍光抗体法（蛍光色素を用いた染色）による蛍光色素染色の同時染色を行う方法も報告されている（非特許文献1及び2）。この方法では、蛍光色素を用いて目的の生体物質を定量しているが、生体物質の発現量が少ない箇所においては、十分な蛍光強度を得ることができないため、目的の生体物質を定量することが難しい場合がある。例えば、酵素抗体法でKi-67陽性細胞を染色し、蛍光抗体法でサイトケラチンを蛍光染色した例では、蛍光量が不足しサイトケラチンの蛍光観察が困難な例が報告されている（非特許文献2）。

[0007] なお、蛍光多重染色によるタンパク質定量法として、定量の目的蛋白質と対照蛋白質をそれぞれ異なる蛍光色素で標識した抗体を用いて染色し、それぞれの蛋白質の総蛍光強度を測定し、両者の比から目的蛋白質を定量する方法も提案されている（特許文献2）。

[0008] 以上の通り、採取した組織切片の中の特定の組織や細胞を検出し、その特定の組織・細胞上に発現している目的の生体物質を定量する方法については

、発現位置と発現量の両者を更に正確に特定する方法が望まれている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0009] 特許文献1：特開2013-088296号公報

特許文献2：特開2008-268167号公報

### 非特許文献

[0010] 非特許文献1：Tuominen, V.; Ruotoisteumaki, S.; Viitanen, A.; Jumppanen, M. and Isola, J; Breast Cancer Research 2010, 12:R56, "ImmunoRatio

-F: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67"

非特許文献2：「URL: <http://mitel.dimi.uniud.it/tp2012/presentations/A8-Isola.pdf>」 Vilppu Tuominen, Sofia Heinonen, Jorma Isola, "ImmunoRatio-F: image analysis of Ki-67 using cytokeratin immunofluorecence correction"

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、採取した組織切片において、特定の組織・細胞を検出し、その特定の組織・細胞上に発現している目的の生体物質の発現位置と発現量の両者を正確に特定する方法を提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、同じ組織切片について、特定の組織・細胞を特定するための生体物質（第一の生体物質）と発現量を定量する目的の生体物質（第二の生体物質）を別々の方法で染色し、両者の染色像の位置を比較することによって目的の生体物質（第二の生体物質）の発現位置を正確に特定することができ、また、目的の生体物質（第二の生体物質）を蛍光物質内包ナノ粒子で染色することによって発現量が少ない場合でも正確に定量できることを見出し、本発明を完成させた。

[0013] すなわち、本発明は以下の項の通りである。

[0014] [1]

組織切片における生体物質の定量法であって、

(1) 前記組織切片における第一の生体物質を特異的に染色する明視野観察可能な免疫染色（第一の免疫染色）を行い、

(2) 前記組織切片における第二の生体物質を特異的に染色する蛍光物質内包ナノ粒子による免疫染色（第二の免疫染色）を行い、

(3) 第一の免疫染色の染色像の位置と第二の免疫染色の染色像の位置を比較することによって、前記組織切片における第二の生体物質の発現位置を特定し、

(4) 第二の免疫染色の染色像の蛍光量を測定することによって、第二の生体物質の発現量を特定する、

ことを含む定量法。

[0015] [2]

前記の第一の免疫染色の染色像と前記の第二の免疫染色の染色像の重なった位置について、前記の第二の免疫染色の染色像の蛍光量を測定する、[1]に記載の定量法。

[0016] [3]

前記の第一の免疫染色と前記の第二の免疫染色を同一の組織切片について行う、[1]又は[2]に記載の定量法。

### 発明の効果

[0017] 本発明によれば、組織切片の特定の組織・細胞を検出し、その特定の組織・細胞上に発現している目的の生体物質の発現位置と発現量の両者を正確に特定する方法を提供することができる。

[0018] すなわち、第一の生体物質の明視野観察可能な染色像によって、特定の組織・細胞を検出し、第一の生体物質の染色像の位置と第二の生体物質の蛍光染色像（輝点数、輝度分布）の位置の重なった部分について、第二の生体物質の蛍光染色像の輝点、輝度分布を測定することによって、特定の組織・細

胞上に発現している第二の生体物質（目的の生体物質）を選択して定量することができる。そして、第二の生体物質の染色は、蛍光物質内包ナノ粒子を用いて染色していることから、第二の生体物質の発現量が少なくても、高い検出力（感度）が得られる。

### 図面の簡単な説明

[0019] [図1]本発明の実施例2の明視野観察可能な免疫染色の染色画像である（組織切片：ヒト肝臓組織、免疫染色：CD31抗体、色素：DAB）。

[図2]本発明の実施例2の蛍光物質内包ナノ粒子による免疫染色の染色画像である（組織切片：上記の図1と同じヒト肝臓組織、免疫染色：VEGFR2抗体、色素：SulfoRhodamine101内包ナノ粒子）。

### 発明を実施するための形態

[0020] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0021] 1. 検出対象物質、定量対象物質

本発明は、採取した組織切片において、特定の組織・細胞（以下、検出対象物という）を検出し、検出対象物上に発現している目的の生体物質（以下、定量対象物質という）の発現位置と発現量の両者を正確に特定する方法である。本発明で対象とする組織切片、検出対象物、定量対象物の組合せは、検査の目的に応じて選べばよく、例えば、肝臓組織切片における血管内皮細胞上に発現したVEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3等の定量、食道組織切片におけるリンパ管内皮細胞上に発現したVEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3等の定量、乳房組織切片における上皮細胞上に発現したKi67の定量等が挙げられる。

[0022] 2. 組織切片

本発明における組織切片は、免疫染色方法が適用できる切片であれば特に限定されず、その作製方法は、公知の方法を用いることができる。例えば、病理切片として汎用されているパラフィン包埋切片、その他を組織切片として用いることができる。

[0023] 3. 免疫染色

本発明では、組織切片における第一の生体物質を特異的に染色する明視野観察可能な免疫染色（第一の免疫染色）と、組織切片における第二の生体物質を特異的に染色する蛍光物質内包ナノ粒子による免疫染色（第二の免疫染色）とを行う。すなわち、検出対象物は、第一の免疫染色の染色像によって検出し、定量対象物質は、第二の免疫染色の蛍光染色像の輝点、輝度分布によって定量する。

[0024] この場合、免疫染色は、第一の生体物質又は第二の生体物質（以下、標的物質という）に特異的に結合する抗体と可視化できる物質（以下、標識体という）が結合した「標識化プローブ」によって実施する。すなわち、標識化プローブは標的物質に対する抗体と標識体が結合したものである。この場合の抗体と標識体の結合方法には特に制限はなく、直接結合している場合の外に、2次抗体を介して結合している場合等も含まれる。

[0025] 以下、第一の免疫染色を行うための標識化プローブを第一の標識化プローブといい、第二の免疫染色を行うための標識化プローブを第二の標識化プローブという。

[0026] なお、本発明において、第一の標識化プローブと第二の標識化プローブは、互いに、それぞれの標的物質との抗原抗体反応を妨げないものであることが必要である。

[0027] （1）第一の標識化プローブ

（a）第一の生体物質

第一の生体物質は、検出対象物における免疫染色（第一の免疫染色）の標的物質である。検査の目的に応じた程度に検出対象物に明視野観察可能な染色がされるように、検出対象物である組織・細胞上の抗原となる物質を第一の生体物質として選べばよい。例えば、血管内皮細胞の免疫染色にはCD31やCD34等を第一の生体物質とし、リンパ管内皮細胞の免疫染色にはポドプラニン等を第一の生体物質とし、上皮細胞の免疫染色にはサイトケラチン等を第一の生体物質とすればよい。

[0028] (b) 第一の生体物質と結合する抗体

第一の生体物質と特異的に結合する抗体は、通常の方法を用いて取得することができる。

[0029] (c) 標識体

標識体は、組織切片上で標的物質に結合した標識化プローブを可視化するためのものであり、第一の標識化プローブに含まれる標識体は、明視野観察可能な染色をするための標識体である。

[0030] 本発明において、「明視野観察可能な染色」とは、外部からのエネルギーを受けて励起させることなく、通常の光学顕微鏡により目視可能な形で直接可視化されている（つまり可視光を反射する）染色をいう。「目視可能な形で直接可視化」とは、現像等の二次的な操作なしに、標的物質とプローブの間の特異的結合反応の所在を直接観察することができる状態にすることをいう。

[0031] このような第一の標識化プローブに含まれる標識体の例は次の通りである。

[0032] (色素沈着誘導標識体)

本発明の明視野観察を可能とする標識体の例としては、色素沈着を誘導する物質（色素沈着誘導標識体）、すなわち、基質を変化させて色素沈着性の化学種を生じさせる酵素が挙げられる。このような酵素として、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ（ALP）、グルコシダーゼ等の酵素を挙げることができる。

[0033] (色素沈着に用いられる基質)

上記酵素により色素沈着性の物質に変換される基質として、色原性基質変換法に基づく従来公知のアッセイ法において、色原性基質として一般的に用いられる基質を用いることができる。このような基質の例として、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）用基質などの酸化還元酵素用基質、アルカリホスファターゼ（ALP）用基質などのフォスファターゼ用基質、および、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ用基質などのグリコシダーゼ用基質が挙げられるが、



これらに限定されるものではない。

[0034] HRPによる酵素反応に用いられる基質の具体例として、3, 3'-ジアミノベンジジン (DAB)、3-p-ヒドロキシフェニルプロピオン酸 (HPPA)、ECL plus (商標)、4-クロロ-1-ナフトール/4-クロロナフタレン-1-オールなどが挙げられる。この中では、通常核染色に用いられるヘマトキシリン (青) との色味の違いや保存安定性の観点からDABが汎用されており、好ましく用いられる。

[0035] また、アルカリフォスファターゼ (ALP) による酵素反応に用いられる基質として、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート/ニトロブルーテトラゾリウム塩 (BCIP/NBT)、4-メチルウンベリフェリルフォスフェート (MUP)、6, 8-ジフルオロ-4-メチルウンベリフェリルフォスフェート (DiFMUP)、AttoPhos (登録商標)、9H-(1, 3-ジクロロ-9, 9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル) フォスフェート (DDAOP) などが挙げられる。

[0036]  $\beta$ -ガラクトシダーゼによる酵素反応に用いられる基質として、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (X-gal)、9H-(1, 3-ジクロロ-9, 9-ジメチルアクリジン-2-オン-7-イル)  $\beta$ -D-ガラクトピラノシド (DDAOG)、4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -D-ガラクトシド (MUG) などが挙げられる。

[0037] (d) 第一の標識化プローブ

第一の標識化プローブは、前記の第一の生体物質と結合する抗体と前記の標識体とを結合させることにより得られる。この場合の抗体と標識体の結合方法に特に制限はなく、直接結合している場合の外に、2次抗体を介して結合している場合等も含まれることは前記の通りである。

[0038] このような抗体と標識体の結合は、通常用いられている方法に従って、抗体に標識体を結合させることにより得ることができる。具体的な標識化方法としては、前記抗体に対して特異的な親和性を有する抗体(二次抗体)を介する方法、ビオチン-アビジン法、チオール基-マレイミド基のカップリング

反応法、既存の化学リンカーを用いる方法、架橋剤（１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（EDC）等）を用いた架橋反応法、イオン結合法等を挙げることができる（後記の実施例を参照）。

[0039] （２）第二の標識化プローブ

（a）第二の生体物質

第二の生体物質は、定量対象物質における免疫染色（第二の免疫染色）の標的物質である。検査の目的に応じた定量が行われるように、定量対象物質上の抗原となる物質を選べばよいが、一般的には定量対象物質は蛋白質であり、その場合は定量対象物質自体が第二の生体物質である。第二の生体物質の例としては、血管内皮細胞増殖因子受容体（VEGFR-1、VEGFR-2、VEGFR-3）、細胞増殖関連蛋白Ki-67等が挙げられる。

[0040] （b）第二の生体物質と結合する抗体

第二の生体物質と特異的に結合する抗体は、通常の方法を用いて取得することができる。

[0041] （c）標識体

標識体は、組織切片上で標的物質に結合した標識化プローブを可視化するためのものであり、第二の標識化プローブに含まれる標識体は、蛍光物質内包ナノ粒子である。

[0042] 蛍光物質内包ナノ粒子とは、有機物または無機物でできた粒子（母体）中に蛍光物質が２個以上（２分子以上）内包された構造を有するナノサイズの粒子をいう。本発明では、蛍光物質は蛍光色素又は蛍光ナノ粒子であり、蛍光色素内包ナノ粒子と蛍光ナノ粒子内包ナノ粒子がある。本発明で用いる蛍光物質内包ナノ粒子（蛍光色素内包ナノ粒子、蛍光ナノ粒子内包ナノ粒子）は、目的に応じて、蛍光物質としての蛍光色素又は蛍光ナノ粒子、及び粒子を形成する有機物又は無機物を原料として選択し、公知の方法により作製することができる。

[0043] 粒子を形成する有機物または無機物としては、例えば、ポリスチレン、ポリアミド、ポリ乳酸、ポリアクリロニトリル、ポリグリシジルメタクリレー

ト、ポリメラミン、ポリウレア、ポリベンゾグアナミン、ポリフラン、ポリキシレン、フェノール樹脂、多糖、シリカ等、安定的に蛍光物質を内包できるものが挙げられる。蛍光物質をこのような粒子中に内包させることにより、蛍光色素単独よりも励起光の照射による劣化が起こりにくく（耐光性が強い）、また、1粒子中に複数個の蛍光物質が内包されることにより、1個の粒子から発光する蛍光強度（輝度）を高めることができる。

[0044] （蛍光色素内包ナノ粒子）

蛍光色素内包ナノ粒子は、前記の粒子1個に蛍光色素を2分子以上内包させたものである。内包させる蛍光色素には特に制限がなく、目的とする励起光、蛍光の波長その他に応じて選べばよい。

[0045] 内包させる蛍光色素の例としては、ローダミン系色素分子、スクアリリウム系色素分子、シアニン系色素分子、芳香環系色素分子、オキサジン系色素分子、カルボピロニン系色素分子、ピロメセン系色素分子、等の中から選択することができる。あるいはAlexa Fluor（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、BODIPY（登録商標、インビトロジェン社製）系色素分子、Cy（登録商標、GEヘルスケア社製）系色素分子、DY系色素分子（登録商標、DYOMICS社製）、HiLyte（登録商標、アナスペック社製）系色素分子、DyLight（登録商標、サーモサイエンティフィック社製）系色素分子、ATTO（登録商標、ATTO-TEC社製）系色素分子、MFP（登録商標、Mobictec社製）系色素分子等の中から選択することができる。このような色素分子の総称は、化合物中の主要な構造（骨格）または登録商標に基づき命名されており、それぞれに属する蛍光色素の範囲は当業者であれば過度の試行錯誤を要することなく適切に把握できるものである。

[0046] ローダミン系色素分子の具体例としては、5-カルボキシローダミン、テキサスレッド、スルホローダミン101、その他が挙げられる。スクアリリウム系色素分子の具体例としては、SRfluor 680-Carboxylate、その他が挙げられる。シアニン系色素分子の具体例としては、

1-Butyl-2-[5-(1-butyl-1,3-dihydro-3,3-dimethyl-2H-indol-2-ylidene)-penta-1,3-dienyl]-3,3-dimethyl-3-ethyl-indolium hexafluorophosphate、その他が挙げられる。芳香環系色素分子の具体例としては、N,N-Bis-(2,6-diisopropylphenyl)-1,6,7,12-(4-tert-butylphenoxy)-perylene-3,4,9,10-tetracarboxylic diimide、その他が挙げられる。オキサジン系色素分子の具体例としては、Cresyl violet、その他が挙げられる。カルボピロニン系色素分子の具体例としては、CARBOPYRONIN 149、その他が挙げられる。ピロメセン系色素分子の具体例としては、PYRROMETHENE 650、その他が挙げられる。

[0047] また、Alexa Fluor系色素分子の具体例としては、Alexa Fluor 555 (インビトロジェン社製)、その他が挙げられる。BODIPY系色素分子の具体例としては、BODIPY FL (インビトロジェン社製)、その他が挙げられる。Cy系色素分子の具体例としては、Cy3.5 (GEヘルスケア社製)、その他が挙げられる。DY系色素分子の具体例としては、DY-590 (DYOMICS社製)、その他が挙げられる。HiLyte系色素分子の具体例としては、HiLyte 594 (アナスペック社製)、その他が挙げられる。DyLight系色素分子の具体例としては、DyLight 594 (サーモサイエンティフィック社製)、その他が挙げられる。ATTO系色素分子の具体例としては、ATTO590 (ATTO-TEC社製)、その他が挙げられる。MFP系色素分子の具体例としては、MFP590 (Mobictec社製)、その他が挙げられる。

[0048] その他色素としては、C-Phycocyanin、Phycocyanin、APC (Allophycocyanin)、APC-XL、Northern Lights 637 (R&D Systems社製)、等が挙げられる。

[0049] また、これらの誘導体（蛍光色素として機能しうるもの、例えば、公知の誘導体）も蛍光色素の具体例として挙げるができる。

[0050] 蛍光色素内包ナノ粒子の製造方法は特に限定されるものではなく、通常用いられている方法で製造される。例えば、粒子原料である樹脂のモノマーに蛍光色素分子を結合させた後に重合し粒子を合成する方法、重合した樹脂の粒子に蛍光色素を吸着又は結合させて導入する方法、樹脂のモノマーと蛍光色素とを混合して重合と蛍光色素の結合を同時に行う方法等がある。これらの方法で製造した蛍光色素内包ナノ粒子は、通常、1粒子中に複数個の蛍光色素分子が内包される。

[0051] 蛍光色素内包ナノ粒子の平均粒径は特に限定されないが、通常10～500nmであり、好ましくは50～200nmである。また、粒径のばらつきを示す変動係数も特に限定されないが、通常は20%以下であり、好ましくは5～15%である。

[0052] なお、蛍光色素内包ナノ粒子の粒径は、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて電子顕微鏡写真を撮影し、蛍光色素内包ナノ粒子の断面積を計測し、その計測値を相当する円の面積としたときの直径（面積円相当径）として測定することができる。蛍光色素内包ナノ粒子の集団の粒子サイズの平均（平均粒径）および変動係数は、十分な数（たとえば1000個）の蛍光色素内包ナノ粒子について上記のようにして粒子サイズ（粒径）を測定した後、平均粒径はその算術平均として算出され、変動係数は式： $100 \times \text{粒径の標準偏差} / \text{平均粒径}$ 、により算出される。

[0053] （蛍光ナノ粒子内包粒子）

蛍光ナノ粒子内包粒子は、前記の粒子1個に蛍光ナノ粒子を2個以上内包させたものである。内包させる蛍光ナノ粒子には特に制限がなく、目的とする励起光、蛍光の波長その他に応じて選べばよい。

[0054] 内包させる蛍光ナノ粒子は、粒子サイズが1～500nmのものであり、好ましくは10～200nmである。この蛍光ナノ粒子は、半導体または蛍光体から構成される。半導体は例えばⅢ-Ⅴ族半導体であるZnSe、

ZnTe、CdSe、CdTe、PbS、PbSe、PbTe等やIII-V族半導体であるAlAs、AlSb、GaP、GaAs、GaSb、InP、InAs、InSb等を用いることができ、毒性の観点から、GaPやInPを好適に用いることができる。蛍光体は、例えば母体に $Y_2O_3$ や $YVO_4$ 、ZnO、ZnS等を用い、発光中心にEuやNd等を用いることができる。蛍光ナノ粒子の粒子サイズ、母体組成、不純物量を調整することで観察に適した励起波長とする。

[0055] このような蛍光ナノ粒子を前記の粒子に内包させて蛍光ナノ粒子内包ナノ粒子を製造する方法は、特に限定されるものではなく、通常用いられている方法で製造される。例えば、粒子原料である樹脂のモノマーに蛍光ナノ粒子を結合させた後に重合し粒子を合成する方法、重合した樹脂の粒子に蛍光ナノ粒子を吸着又は結合させて導入する方法、樹脂のモノマーと蛍光ナノ粒子とを混合して重合と蛍光ナノ粒子の結合を同時に行う方法等がある。これらの方法で製造した蛍光ナノ粒子内包ナノ粒子は、通常、1粒子中に複数個の蛍光ナノ粒子が内包される。内包される蛍光ナノ粒子の粒子サイズ、母体組成、不純物量を調整することで観察に適した励起波長とする。蛍光ナノ粒子内包粒子のサイズは、通常10～500nmであり、好ましくは50～200nmである。

[0056] なお、蛍光ナノ粒子内包ナノ粒子の粒径の測定は、前記の蛍光色素内包ナノ粒子の粒径の測定と同様に実施することができる。

[0057] (d) 第二の標識化プローブ

第二の標識化プローブは、前記の第二の生体物質と結合する抗体と前記の標識体とを結合させることにより得られる。この場合の抗体と標識体の結合方法に特に制限はなく、直接結合している場合の外に、2次抗体を介して結合している場合等も含まれることは前記の通りである。

[0058] このような抗体と標識体の結合は、通常用いられている方法に従って、抗体に標識体を結合させることにより得ることができる。具体的な標識化方法としては、前記抗体に対して特異的な親和性を有する抗体(二次抗体)を介す

る方法、ビオチン-アビジン法、チオール基-マレイミド基のカップリング反応法、既存の化学リンカーを用いる方法、架橋剤（1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）等）を用いた架橋反応法、イオン結合法等を挙げることができる（後記の実施例を参照）。

[0059] (3) 免疫染色

本発明では、組織切片について、前記の第一の免疫染色及び前記の第二の免疫染色を実施する。この場合の両免疫染色は、それぞれの染色像の位置関係を比較して検出対象物上に発現している定量対象物質の発現位置を特定するために、同一組織切片について行うことが好ましいが、切片の切り出しにおいて隣接する組織切片についてそれぞれの免疫染色を実施することも可能である。

[0060] 免疫染色の方法は、通常用いられている方法を実施すればよい。

[0061] 4. 染色像の位置の比較

本発明では、第一の免疫染色の染色像の位置と第二の免疫染色の染色像の位置を比較することによって、組織切片における第二の生体物質の発現位置を特定する。ここで、第一の免疫染色の染色像は明視野観察可能な染色像であり、第二の免疫染色の染色像は蛍光染色の染色像であることは前記の通りである。従って、第一の免疫染色の染色像は光学顕微鏡によって観察し、第二の免疫染色の染色像は蛍光顕微鏡によって観察する。両染色像の位置の比較は、第二の免疫染色の輝点、輝度分布が第一の免疫染色の染色像のどの位置に該当するかが判断できる方法であれば特に制限はない。例えば、第一の免疫染色の染色像の画像と第二の免疫染色の染色像の画像をコンピュータに取り込み、両画像の位置関係を比較することによって、第二の免疫染色の輝点、輝度分布と第一の免疫染色の染色像との位置関係を判断することができる。このような解析ソフトとしては、例えば、市販画像解析ソフト `Image J` が挙げられる。

[0062] 第一の免疫染色によって組織切片上の検出対象物が特定されるので、前記の両染色像の位置の比較により両者の位置関係が判断できれば、組織切片上

の検出対象物上に発現している定量対象物質（第二の生体物質）の免疫染色の輝点、輝度分布を特定することができる。すなわち、第一の免疫染色の染色像と第二の免疫染色の染色像の重なった位置における第二の免疫染色の輝点、輝度分布が、検出対象物上に発現している定量対象物質（第二の生体物質）の輝点、輝度分布である。

[0063] 5. 定量対象物質（第二の生体物質）の発現量の特定

検出対象物上に発現した定量対象物質（第二の生体物質）の発現量の特定は、前記で特定した第二の免疫染色の染色像の蛍光量を測定することによって行われる。この場合の蛍光量の測定とは、特定した輝点、輝度分布について、輝点数又は蛍光輝度を測定することである。

[0064] 輝点数、蛍光輝度の測定は、通常用いられている方法で測定すればよい。例えば、コンピューターに第二の免疫染色の染色像の画像を取り込んで、前記で特定した輝点、輝度分布について、解析ソフトを用いた演算手段による画像処理を行うことによって、輝点数又は蛍光輝度が測定される。このような解析ソフトの例として、市販画像解析ソフトである「ImageJ」や（株）ジーオングストローム社製の全輝点自動計測ソフト「G-Count」等がある。

[0065] 測定された輝点数又は蛍光輝度を、検体間で、あるいは標準検体と、比較することによって、採取した組織切片上の検出対象物上に発現している定量対象物質の発現量を特定することができる。

### 実施例

[0066] 以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

[0067] [実施例1]

(1) 第一の生体物質に対する明視野観察可能な免疫染色（第一の免疫染色）

肝臓組織スライド（Biomax社製T032a）をキシレンに浸漬し、パラフィンを除去後、クエン酸緩衝液（pH 6.0）中15分間、オートクレーブ処理し



た。PBSを用いて洗浄後、10%ウサギ血清（ニチレイ社製）を添加し、室温下1時間放置した。

[0068] PBSで洗浄後、抗CD31抗体（アブカム社製マウス抗体）を添加し、室温下30分間放置した。PBSで洗浄後、デキストランポリマーペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（ニチレイ社製）を添加し、室温下で30分間放置した。DAB基質キット（ニチレイ社製）を用いて、ジアミノベンジジン（DAB）を発色基質とする酵素を用いた免疫染色を行い、PBSを用いて洗浄した。

[0069] エタノール、キシレンの順にスライドを浸漬させ、次いで封入剤（メルク社エンテランニュー）を添加した後、カバーガラスを載せ、評価スライドとした。

[0070] （2）第二の生体物質に対する蛍光色素内包ナノ粒子を用いた免疫染色（第二の免疫染色）

（a）抗体結合蛍光メラミン樹脂粒子（平均粒径150nm）の調製

Sulforhodamine 101（シグマアルドリッチ社製）14.4mgを水22mLに加えて溶解した後、エマルゲン430（花王社製）の5%水溶液を2mL加えた。ホットスターラー上で攪拌しながら70°Cに加熱した後、メラミン樹脂原料ニカラックMX-035（日本カーバイド工業社製）0.65gを加えた。ドデシルベンゼンスルホン酸（関東化学社製）の10%水溶液を680 $\mu$ L加え、70°C、50分間加熱攪拌した。その後、90°Cに昇温して20分間加熱攪拌した。得られた粒子液から余剰の樹脂原料や色素等の不純物を取り除くため、純水による洗浄を行なった。遠心分離機（クボタ社製マイクロ冷却遠心機3740）にて20000Gで15分遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射し再分散した。遠心分離機、上澄み除去、超純水への再分散を5回繰り返した。

[0071] 得られた粒子0.1mgをEtOH1.5mL中に分散し、アミノプロピルトリメトキシシランLS-3150（信越化学工業社製）2 $\mu$ Lを加えて8時間反応させて表面アミノ化処理を行なった。

[0072] 得られた色素内包ナノ粒子を、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）を2mM含有したPBS（リン酸緩衝液生理的食塩水）を用いて3nMに調整し

、この溶液に最終濃度10mMとなるようSM(PEG)12(サーモサイエンティフィック社製、succinimidyl-[N-maleimidopropionamid)-dodecaethyleneglycol]ester)を混合し、1時間反応させた。この混合液を10,000Gで20分遠心分離を行い、上澄みを除去した後、EDTAを2mM含有したPBSを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を3回行うことで末端にマレイミド基が付いた蛍光色素内包粒子を得た。

[0073] 一方、ストレプトアビジン(和光純薬工業社製)をN-succinimidyl S-acetylthioacetate(SATA)を用いてチオール基付加処理を行ったのち、ゲルろ過カラムによるろ過を行い、色素内包ナノ粒子に結合可能なストレプトアビジン溶液を得た。

[0074] 上記の蛍光ナノ粒子とストレプトアビジンとを、EDTAを2mM含有したPBS中で混合し、1時間反応させた。10mMメルカプトエタノールを添加し、反応を停止させた。得られた溶液を遠心フィルターで濃縮後、精製用ゲルろ過カラムを用いて未反応ストレプトアビジン等を除去し、ストレプトアビジン結合SulfoRhodamine101色素内包メラミンナノ粒子を得た。

[0075] (b) 病理染色液の調製

前記のストレプトアビジン結合SulfoRhodamine101色素内包メラミンナノ粒子(平均粒径150nm)をPBSにより0.06nMに調製し、病理染色液とした。

[0076] (c) 免疫染色

前記(1)の肝臓組織スライドの組織切片と隣接する組織切片の肝臓組織スライドをキシレンに浸漬し、パラフィンを除去後、クエン酸緩衝液(pH6.0)中15分間、オートクレーブ処理した。PBSで洗浄後、10%ヤギ血清(ニチレイ社製)を添加し、室温下1時間放置した。PBSで洗浄後、抗VEGFR-2抗体(アブカム社製ウサギ抗体)を添加し、室温下30分間放置

した。PBSで洗浄後、ビオチン標識抗ウサギ抗体（ニチレイ社製）を添加し、室温下で30分間放置した。これに、上記で調製した希釈後の病理染色液を添加し、室温下2時間反応させた後、PBSで洗浄を行った。

[0077] エタノール、キシレンの順にスライドを浸漬させ、次いで封入剤（メルク社エンテランニュー）を添加した後、カバーガラスを載せ、評価スライドとした。

[0078] （3）染色像の評価

上記で作製した評価スライドについて、光学顕微鏡（カールツァイス社製）を用いて第一の免疫染色の染色画像を取得し、蛍光顕微鏡（カールツァイス社製）を用いて第二の免疫染色の蛍光染色画像を取得した。蛍光染色画像取得における励起波長は575～600nm、蛍光波長は612～682nmとした。

[0079] 取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表1-1に示す。

[0080] [実施例2]

実施例1において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例1と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表1-1に示す。

[0081] [実施例3]

実施例1において、第一の免疫染色を抗CD34抗体（ニチレイ社製マウス抗体）を用いて実施した以外は、実施例1と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表1-1に示す。

[0082] [実施例4]

実施例3において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例3と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染

色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0083] [実施例 5]

実施例 1 において、第二の免疫染色を抗VEGFR-1抗体（アブカム社製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 1 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0084] [実施例 6]

実施例 5 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 5 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0085] [実施例 7]

実施例 3 において、第二の免疫染色を抗VEGFR-1抗体（アブカム社製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 3 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0086] [実施例 8]

実施例 7 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 7 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0087] [実施例 9]

実施例 1 において、第一の免疫染色を抗ポドプラニン抗体（医学生物学研究所社製マウス抗体）を用いて実施し、第二の免疫染色を抗VEGFR-1抗体（アブカム社製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 1 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0088] [実施例 10]

実施例 9 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 9 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0089] [実施例 1 1]

実施例 1 において、第一の免疫染色を抗Cytokeratin AE1/AE3抗体（ダコ社製マウス抗体）を用いて実施し、第二の免疫染色を抗Ki67抗体（ニチレイ製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 1 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0090] [実施例 1 2]

実施例 1 1 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 1 1 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0091] [実施例 1 3]

実施例 1 1 において、第二の免疫染色を抗ER抗体（ニチレイ社製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 1 1 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0092] [実施例 1 4]

実施例 1 3 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 1 3 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1 - 1 に示す。

[0093] [実施例 1 5]

実施例 1 1 において、第二の免疫染色を抗PgR抗体（ベンタナ社製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 1 1 と同様な方法を実施して評価スラ

イドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0094] [実施例 16]

実施例 15 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 13 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0095] [実施例 17]

実施例 1 において、第一の免疫染色を抗CK7抗体（アクリスアンチボディーズ社製マウス抗体）を用いて実施した以外は、実施例 1 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0096] [実施例 18]

実施例 17 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 17 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0097] [実施例 19]

実施例 17 において、第二の免疫染色を抗VEGFR-1抗体（アブカム社製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 17 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0098] [実施例 20]

実施例 19 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 19 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0099] [実施例 21]

実施例 17 において、第二の免疫染色を抗VEGFR-3抗体（アブカム社製ウサギ抗体）を用いて実施した以外は、実施例 17 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0100] [実施例 22]

実施例 21 において、第二の免疫染色を第一の免疫染色と同じ肝臓組織スライドについて行った以外は、実施例 21 と同様な方法を実施して評価スライドを作成し、取得した第一の免疫染色の染色画像及び第二の免疫染色の蛍光染色画像を評価した。結果を表 1-1 に示す。

[0101] [比較例 1]

実施例 1 において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表 1-2 に示す。

[0102] [比較例 2]

実施例 2 において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合 S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor (登録商標) 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例 2 と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は、インビトロジェン社の製品説明書の実施方法に従った。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表 1-2 に示す。

[0103] [比較例 3]

実施例 3 において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表 1-2 に示す。

[0104] [比較例 4]

実施例 4 において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合 S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以

外は、実施例4と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例2に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表1-2に示す。

[0105] [比較例5]

実施例5において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表1-2に示す。

[0106] [比較例6]

実施例6において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合Sulforhodamine 101色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例6と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例2に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表1-2に示す。

[0107] [比較例7]

実施例7において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表1-2に示す。

[0108] [比較例8]

実施例8において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合Sulforhodamine 101色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例6と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例2に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表1-2に示す。

[0109] [比較例9]

実施例9において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施



し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表 1 - 2 に示す。

[0110] [比較例 1 0]

実施例 1 0 において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合 S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例 1 0 と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例 2 に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表 1 - 2 に示す。

[0111] [比較例 1 1]

実施例 1 1 において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表 1 - 2 に示す。

[0112] [比較例 1 2]

実施例 1 2 において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合 S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例 1 0 と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例 2 に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表 1 - 2 に示す。

[0113] [比較例 1 3]

実施例 1 3 において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表 1 - 2 に示す。

[0114] [比較例 1 4]

実施例 1 4 において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合 S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例 1 0 と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Strept

tavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例2に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表1-2に示す。

[0115] [比較例15]

実施例15において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表1-2に示す。

[0116] [比較例16]

実施例16において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合Sulforhodamine101色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例16と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例2に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表1-2に示す。

[0117] [比較例17]

実施例17において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表1-2に示す。

[0118] [比較例18]

実施例18において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合Sulforhodamine101色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例18と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例2に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表1-2に示す。

[0119] [比較例19]

実施例19において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表1-2に示す。

## [0120] [比較例 20]

実施例 20 において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合 S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例 20 と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例 2 に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表 1 - 2 に示す。

## [0121] [比較例 21]

実施例 21 において、第一の免疫染色は実施せず、第二の免疫染色のみ実施し、評価スライドした。取得した染色画像の評価結果を表 1 - 2 に示す。

## [0122] [比較例 22]

実施例 22 において、第二の免疫染色をストレプトアビジン結合 S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1 色素内包メラミンナノ粒子の代わりにStreptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いて実施した以外は、実施例 22 と同様な方法を実施して評価スライドを作製した。Streptavidin, Alexa Fluor 594 conjugate (インビトロジェン社製)を用いた第二の免疫染色の実施方法は比較例 2 に記載した通りである。得られた評価スライドを評価した。評価結果を表 1 - 2 に示す。

## [0123] [評価スライドの評価結果]

表 1 に示すように、隣接する別の組織切片の評価スライドを使用した場合であっても、第一の免疫染色の染色像と第二の組織切片の染色像を比較することにより、特定の組織、細胞上の第二の生体物質の発現位置（第二の免疫染色の蛍光染色画像の輝点、輝度分布の位置）を特定することができた（実施例）。また、同一の組織切片の評価スライドを使用した場合には、スライドを変えることなく、第二の生体物質の発現位置を容易かつ正確に特定することができた（実施例）。なお、第一の免疫染色を行わない場合は、特定の組織、細胞に対する第二の生体物質の発現位置を特定することは困難であっ

た（比較例）。

[0124] また、第二の生体物質の発現量（第二の免疫染色の蛍光染色画像の輝点、輝度分布の算出）については、第二の免疫染色に蛍光色素を用いた場合は蛍光量が少なく、蛍光輝度分布の算出は困難であったが（比較例）、蛍光色素内包ナノ粒子を用いた場合は十分な蛍光量が得られ、蛍光輝度分布の算出に問題はなかった（実施例）。

[0125]

[表1-1]

	第一の免疫染色	第二の免疫染色	組織切片 スライド	第二の生体 物質の発現 位置の特定 (注1)	第二の生体 物質の輝度 分布の算出 (注2)
実施例1	CD31-DAB	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例2	CD31-DAB	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例3	CD34-DAB	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例4	CD34-DAB	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例5	CD31-DAB	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例6	CD31-DAB	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例7	CD34-DAB	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例8	CD34-DAB	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例9	ポドプラニン-DAB	VEGFR3-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例10	ポドプラニン-DAB	VEGFR3-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例11	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	Ki67-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例12	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	Ki67-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例13	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	ER-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例14	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	ER-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例15	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	PgR-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例16	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	PgR-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例17	CK7-DAB	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例18	CK7-DAB	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例19	CK7-DAB	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例20	CK7-DAB	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎
実施例21	CK7-DAB	VEGFR3-蛍光色素内包ナノ粒子	隣接	○	◎
実施例22	CK7-DAB	VEGFR3-蛍光色素内包ナノ粒子	同一	◎	◎

[0126]

[表1-2]

	第一の免疫染色	第二の免疫染色	組織切片 スライド	第二の生体 物質の発現 位置の特定 (注1)	第二の生体 物質の輝度 分布の算出 (注2)
比較例1	なし	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例2	CD31-DAB	VEGFR2-蛍光色素	同一	◎	×
比較例3	なし	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例4	CD34-DAB	VEGFR2-蛍光色素	同一	◎	×
比較例5	なし	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例6	CD31-DAB	VEGFR1-蛍光色素	同一	◎	×
比較例7	なし	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例8	CD34-DAB	VEGFR1-蛍光色素	同一	◎	×
比較例9	なし	VEGFR3-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例10	ポドブラニン-DAB	VEGFR3-蛍光色素	同一	◎	×
比較例11	なし	Ki67-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例12	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	Ki67-蛍光色素	同一	◎	×
比較例13	なし	ER-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例14	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	ER-蛍光色素	同一	◎	×
比較例15	なし	PgR-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例16	Cytokeratin AE1/ AE3-DAB	PgR-蛍光色素	同一	◎	×
比較例17	なし	VEGFR2-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例18	CK7-DAB	VEGFR2-蛍光色素	同一	◎	×
比較例19	なし	VEGFR1-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例20	CK7-DAB	VEGFR1-蛍光色素	同一	◎	×
比較例21	なし	VEGFR3-蛍光色素内包ナノ粒子	—	×	○
比較例22	CK7-DAB	VEGFR3-蛍光色素	同一	◎	×

(注1) 第一の免疫染色の染色像と第二の組織切片の染色像を比較することによる、特定の組織、細胞上の第二の生体物質の発現位置（第二の免疫染色の蛍光染色画像の輝点、輝度分布の位置）：◎正確かつ容易に特定可能、○特定可能、×特定不可能

(注2) 第二の生体物質の発現量 (第二の免疫染色の蛍光染色画像の輝点、輝度分布の算出) : ◎輝度分布の算出が可能であり、かつその位置も特定可能、○輝度分布の算出は可能であるが、その位置の特定は不可能、×輝度分布の算出は不可能

### 符号の説明

[0127] 1 . . . 血管内皮細胞

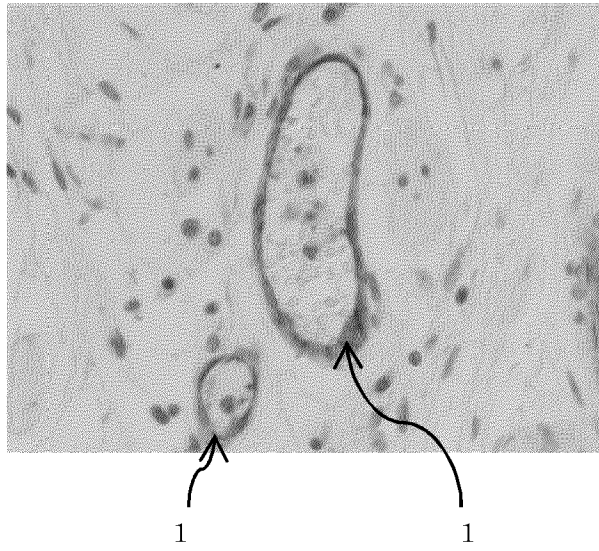
2 . . . VEGFR2

## 請求の範囲

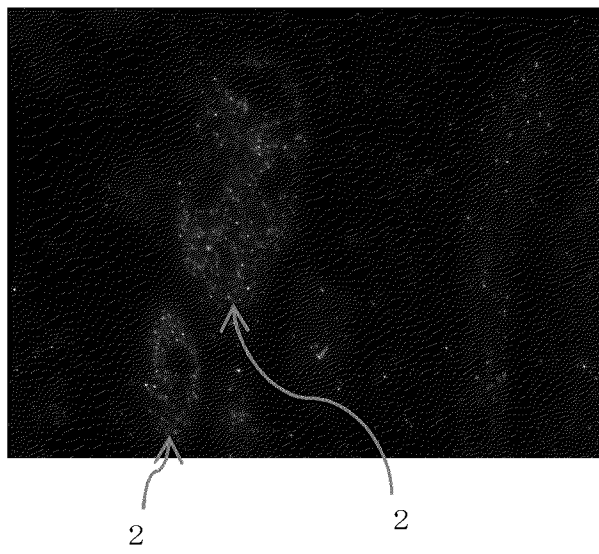
- [請求項1] 組織切片における生体物質の定量法であって、
- (1) 前記組織切片における第一の生体物質を特異的に染色する明視野観察可能な免疫染色（第一の免疫染色）を行い、
  - (2) 前記組織切片における第二の生体物質を特異的に染色する蛍光物質内包ナノ粒子による免疫染色（第二の免疫染色）を行い、
  - (3) 第一の免疫染色の染色像の位置と第二の免疫染色の染色像の位置を比較することによって、前記組織切片における第二の生体物質の発現位置を特定し、
  - (4) 第二の免疫染色の染色像の蛍光量を測定することによって、第二の生体物質の発現量を特定する、  
ことを含む定量法。
- [請求項2] 前記の第一の免疫染色の染色像と前記の第二の免疫染色の染色像の重なった位置について、前記の第二の免疫染色の染色像の蛍光量を測定する、請求項1に記載の定量法。
- [請求項3] 前記の第一の免疫染色と前記の第二の免疫染色を同一の組織切片について行う、請求項1又は2に記載の定量法。



[図1]



[図2]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/074420

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

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

**B. FIELDS SEARCHED**

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

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Vilppu Tuominen et al, ImmunoRatio-F: image analysis of Ki-67 using cytokeratin immunofluorescence correction, [online], 11th European Congress on Telepathology and 5th International Congress on Virtual Microscopy, 2012.06.08, [retrieval date: 2014.11.08], Internet, <a href="http://mitel.dimi.uniud.it/tp2012/presentations/A8-Isola.pdf">http://mitel.dimi.uniud.it/tp2012/presentations/A8-Isola.pdf</a>	1-3
Y	WO 2012/029752 A1 (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 08 March 2012 (08.03.2012), entire text & US 2013/0157287 A1 & EP 2613138 A1	1-3

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

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

Date of the actual completion of the international search 28 November, 2014 (28.11.14)	Date of mailing of the international search report 09 December, 2014 (09.12.14)
---	--

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2014/074420

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Vilppu J Tuominen et al, ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor(PR), and Ki-67, Breast Cancer Research, 2010, 12, R56	1-3

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/536(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53, G01N21/64, G01N33/48, G01N33/536		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Vilppu Tuominen et al, ImmunoRatio-F: image analysis of Ki-67 using cytokeratin immunofluorescence correction, [online], 11th European Congress on Telepathology and 5th International Congress on Virtual Microscopy, 2012.06.08, [検索日:2014.11.08], インターネット <a href="http://mitel.dimi.uniud.it/tp2012/presentations/A8-Isola.pdf">http://mitel.dimi.uniud.it/tp2012/presentations/A8-Isola.pdf</a>	1-3
Y	WO 2012/029752 A1 (コニカミノルタエムジー株式会社) 2012.03.08, 全文 & US 2013/0157287 A1 & EP 2613138 A1	1-3
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 28.11.2014	国際調査報告の発送日 09.12.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 赤坂 祐樹 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J   3316

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Vilppu J Tuominen et al, ImmunoRatio: a publicly available web application for quantitative image analysis of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Ki-67, Breast Cancer Research, 2010, 12, R56	1-3