

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6451845号
(P6451845)

(45) 発行日 平成31年1月16日(2019.1.16)

(24) 登録日 平成30年12月21日(2018.12.21)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	Y
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	R
GO 1 N 21/64	(2006.01)	GO 1 N 33/48	P
GO 1 N 1/30	(2006.01)	GO 1 N 21/64	F
		GO 1 N 1/30	

請求項の数 9 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2017-524794 (P2017-524794)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月1日(2016.6.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2016/066197
 (87) 国際公開番号 W02016/203952
 (87) 国際公開日 平成28年12月22日(2016.12.22)
 審査請求日 平成30年9月27日(2018.9.27)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-120955 (P2015-120955)
 (32) 優先日 平成27年6月16日(2015.6.16)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000001270
 コニカミノルタ株式会社
 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
 (74) 代理人 110001070
 特許業務法人 S S I N P A T
 (72) 発明者 渡辺 泰宏
 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
 審査官 赤坂 祐樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 病理標本の蛍光画像の取得方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

病理標本の蛍光画像の取得方法であって、
 前記病理標本は、

免疫染色法または F I S H 法に基づき、暗視野において観察可能な蛍光粒子で目的生体物質を蛍光標識する処理(免疫染色/F I S H 染色処理)がなされた組織切片、当該組織切片を被覆する充填層、および当該充填層を被覆する保護層を含む病理標本であって、前記蛍光粒子、充填層および保護層の屈折率(いずれも測定波長 = 5 8 9 n m、測定温度 = 2 0) が下記式(1)および(2)の条件を満たす病理標本であり、

$$|n_1 - n_2| \leq 0.20 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$|n_2 - n_3| \leq 0.15 \quad \dots \text{式(2)}$$

n 1 : 前記蛍光粒子の屈折率
 n 2 : 前記充填層の屈折率
 n 3 : 前記保護層の屈折率

前記病理標本における前記充填層の厚さ(m 2)と前記保護層の厚さ(m 3)を測定し、m 2 とm 3 の和の面内平均値(M (m 2 + m 3))を算出するステップ、および当該面内平均値に基づいて、蛍光粒子の輝点像の球面収差を補正するステップを含む、病理標本の蛍光画像の取得方法。

【請求項2】

前記充填層および保護層の厚さが下記式(3)の条件を満たす、請求項1に記載の病理

10

20

標本の蛍光画像の取得方法：

$$C V (m 2 + m 3) \quad 2 0 \% \quad \dots \text{式 (3)}$$

m 2 : 充填層の厚さ

m 3 : 保護層の厚さ

C V (m 2 + m 3) : m 2 と m 3 の和の面内変動係数

【請求項 3】

前記充填層および保護層の厚さが下記式 (4) および (5) の条件を満たす、請求項 1 または 2 に記載の病理標本の蛍光画像の取得方法：

$$1 0 \mu m \quad M (m 2) \quad 5 0 \mu m \quad \dots \text{式 (4)}$$

$$1 0 0 \mu m \quad M (m 3) \quad 2 0 0 \mu m \quad \dots \text{式 (5)}$$

m 2 : 充填層の厚さ

m 3 : 保護層の厚さ

M (m 2) : m 2 の面内平均値

M (m 3) : m 3 の面内平均値

【請求項 4】

前記蛍光粒子が樹脂を母体とする蛍光体集積ナノ粒子である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の病理標本の蛍光画像の取得方法。

【請求項 5】

前記充填層がアクリル樹脂を含有する封入剤から形成された層である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の病理標本の蛍光画像の取得方法。

【請求項 6】

前記保護層が珪酸ガラスからなるカバーガラスである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の病理標本の蛍光画像の取得方法。

【請求項 7】

前記組織切片の厚さが下記式 (6) の条件を満たす、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の病理標本の蛍光画像の取得方法。

$$2 \mu m \quad M (m 1) \quad 6 \mu m \quad \dots \text{式 (6)}$$

m 1 : 組織切片の厚さ

M (m 1) : m 1 の面内平均値

【請求項 8】

前記蛍光粒子の発光波長が下記式 (7) の条件を満たす、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の病理標本の蛍光画像の取得方法。

$$5 5 0 n m \quad 1 \quad 6 5 0 n m \quad \dots \text{式 (7)}$$

1 : 蛍光粒子の極大発光波長

【請求項 9】

前記組織切片が、さらに、明視野において観察可能な染色剤で細胞を染色する処理 (明視野染色処理) がなされたものである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の病理標本の蛍光画像の取得方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、病理標本から作製される目的生体物質の発現を蛍光輝点で表す画像 (蛍光画像、暗視野画像) を用いて、典型的には同じ病理標本から作製される細胞の形態を表す画像 (細胞形態画像、明視野画像) と重ね合わせて、病理標本中の各細胞領域に発現している目的生体物質の位置や量を計測する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

病理診断では、患者から採取した組織切片を薄切して載置したスライドを用意し、所定の方法で染色して病理標本を作製した後、その病理標本の染色画像を撮影し、得られた染色画像から病理診断のための情報を取得するといった、一連の工程が行われる。病理標本

10

20

30

40

50

から取得した染色画像を用いて、細胞または組織の形態を観察するとともに、特定の生体分子の発現レベルを定量、評価することにより、その患者が特定の疾患に罹患しているか否か、あるいは特定の治療薬が奏功するか否かといった様々な事象を診断することができる。

【0003】

病理診断の一例として、癌組織を採取して作製された組織切片を用いて、癌遺伝子の一種であるHER2遺伝子（HER2/neu、c-erbB-2）および/またはHER2遺伝子から産生される膜タンパク質であって癌細胞増殖因子の受容体として機能していると推定されるHER2タンパク質を定量し、評価することによって、乳癌患者の予後を診断したり、分子標的治療薬「トラスツズマブ」（商品名「ハーセプチン」（登録商標）、抗HER2モノクローナル抗体）による治療効果を予測したりする病理診断が広く行われている。ヒト乳癌症例では、15～25%でHER2遺伝子の増幅とHER2タンパク質の過剰発現が認められるが、癌細胞におけるHER2の過剰発現は基本的にDNAレベルの遺伝子増幅に伴って起きている。癌組織を対象としたHER2の検査法は、DNAレベルの増幅をみる方法、RNAレベルでの過剰発現をみる方法、そしてタンパク質レベルでの過剰発現をみる方法に分類される。タンパク質レベルとDNAレベルでの検査法として代表的なものが、それぞれ免疫染色法ないし免疫組織化学（IHC）法と蛍光in situ ハイブリダイゼーション（FISH）法である。このようなHER2検査は臨床的に重要視されており、免疫染色法（IHC法）およびFISH法それぞれによるHER2検査の標準的な手順および判定基準（スコア）は、2007 ASCO/CAPガイドラインによって規定されている。

【0004】

免疫染色法ないし免疫組織化学（IHC）法は、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片上で、蛍光標識された抗HER2抗体を用いて、細胞膜に発現しているHER2タンパク質の量を検出する方法である。従来の免疫染色法（本来のIHC法）は、所定の基質を添加したときに色素を生成する酵素で標識した抗HER2抗体を利用する方法（酵素抗体法、例えばDAB法）が採用されていたが、より識別性に優れる蛍光体で標識した抗HER2抗体を利用する免疫染色法（蛍光抗体法）も利用されるようになってきている。免疫染色法では、一般的に、薄切されたホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を載せたスライド（標本）を準備し、脱パラフィン処理等を行って免疫染色に適した状態にした後、蛍光標識抗体を反応させて細胞膜のHER2タンパク質に結合させる。このようにして免疫染色された組織切片は、必要に応じて褪色防止剤を含有する封入剤を用いて封入処理をし、さらにカバーガラスを載せた後、暗視野において、所定の励起光を照射しながら蛍光画像が撮影される。そして、HER2タンパク質を標識する蛍光体が輝点として表れている蛍光画像（暗視野画像）と、参照用に明視野で撮影された、細胞膜が染色剤で染色されている細胞形態画像（明視野画像）とを重ねあわせ、一細胞あたりの細胞膜領域内に観察される輝点の数を計測し、その値によってHER2タンパク質が異常発現しているか否かが判定される。

【0005】

上記のような免疫染色法（蛍光抗体法）の実施形態、特に蛍光体として蛍光体集積ナノ粒子を用いた方法は、例えば、特許文献1（国際公開WO2013/035703号パンフレット）、特許文献2（国際公開WO2013/147081号パンフレット）、特許文献3（国際公開WO2014/136776号パンフレット）などを参照することができる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開WO2013/035703号パンフレット

【特許文献2】国際公開WO2013/147081号パンフレット

【特許文献3】国際公開WO2014/136776号パンフレット

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述したような蛍光画像は、病理診断に利用できる情報を抽出するように処理される。例えば、「蛍光画像」から輝点領域が抽出された画像を生成し、輝点領域ごと「輝度プロファイル」を作成し、蛍光輝点源となる蛍光粒子1個分の「蛍光プロファイル」(基準プロファイル)に基づき、輝点領域における蛍光粒子が抽出された「蛍光粒子画像」を生成する、という処理が施される。すなわち、輝点領域ごとに、基準プロファイルとその輝点領域の輝度プロファイルとを比較することにより、その輝点領域における蛍光粒子の数と各蛍光粒子の位置とを算出することができる。なお、基準プロファイルは、病理標本につ

10

【0008】

このような画像処理を行うにあたって、輝度プロファイルおよび基準プロファイルを作成するためには、蛍光画像からの情報の取り出し精度を高める、そのためには例えば、蛍光粒子から発せられる蛍光が弱くても確実にシグナルに変換できるよう"高感度化"したり、一定の強度の蛍光は一定の強度のシグナルに変換されるよう"安定化"したりすることが求められる。従来は、蛍光画像の取得および処理において、低発現量のタンパク質の判別、病理標本(組織切片)の面内のバラツキ、病理標本間のバラツキなどの問題が見られることがあり、高感度化および安定化に改善の余地があった。

20

【0009】

本発明は、病理標本の蛍光粒子から発せられる蛍光のシグナルを高感度化および安定化し、蛍光画像からの情報の取り出し精度を向上させることができる手段を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

30

【0010】

発明者らは、一般的に、蛍光粒子を用いて免疫染色がされた組織切片、組織切片を被覆する充填層(封入剤で形成された層)、および充填層を被覆する保護層(カバーガラス)によって構成される病理標本について、蛍光粒子の屈折率と充填層の屈折率が特定の式を満たす関係にあり、かつ充填層の屈折率と保護層の屈折率が特定の式を満たす関係にある場合、それらの式を満たさない場合に比べて、蛍光粒子から発せられる蛍光のシグナルを高感度化および安定化させることができることを見出した。特に、蛍光粒子の屈折率に着目し、充填層の屈折率との間で特定の関係を満たすようにすることが蛍光シグナルの高感度化および安定化に貢献することを見出したことには意外性がある。本発明は、このような知見に基づいて達成されたものである。

40

【0011】

すなわち、本発明は一つの側面において、下記のような技術的特徴を有する病理標本を提供する：

免疫染色法またはFISH法に基づき、暗視野において観察可能な蛍光粒子で目的生体物質を蛍光標識する処理(免疫染色/FISH染色処理)がなされた組織切片、当該組織切片を被覆する充填層、および当該充填層を被覆する保護層を含む病理標本であって、

前記蛍光粒子、充填層および保護層の屈折率(いずれも測定波長 = 589 nm、測定温度 = 20)が下記式(1)および(2)の条件を満たす病理標本：

$$|n_1 - n_2| \quad 0.20 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$|n_2 - n_3| \quad 0.15 \quad \dots \text{式(2)}$$

50

- n 1 : 前記蛍光粒子の屈折率
- n 2 : 前記充填層の屈折率
- n 3 : 前記保護層の屈折率。

【0012】

本発明は別の側面において、下記のような技術的特徴を有する病理標本の作製方法を提供する：

組織切片に対して、免疫染色法またはFISH法に基づき、暗視野において観察可能な蛍光粒子で目的生体物質を蛍光標識する処理（免疫染色/FISH染色処理）を行う工程、当該組織切片を充填層で被覆する処理（充填処理）を行う工程、および当該充填層を保護層で被覆する処理（保護処理）を行う工程を含む、病理標本の作製方法であって、

前記免疫染色/FISH染色処理、充填処理および保護処理における、前記蛍光粒子、充填層および保護層の屈折率（いずれも測定波長 = 589 nm、測定温度 = 20）が下記式（1）および（2）の条件を満たす、病理標本の作製方法：

$$|n1 - n2| \leq 0.20 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$|n2 - n3| \leq 0.15 \quad \dots \text{式(2)}$$

- n 1 : 前記蛍光粒子の屈折率
- n 2 : 前記充填層の屈折率
- n 3 : 前記保護層の屈折率。

【0013】

本発明はさらなる側面において、下記のような技術的特徴を有する蛍光画像の取得方法を提供する：

本発明の病理標本、または本発明の作製方法によって得られた病理標本の、蛍光画像の取得方法であって、

前記病理標本における前記充填層の厚さ（m2）と前記保護層の厚さ（m3）を測定し、m2とm3の和の面内平均値（M（m2 + m3））を算出するステップ、および当該面内平均値に基づいて、蛍光粒子の輝点像の球面収差を補正するステップを含む、蛍光画像の取得方法。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、病理標本の蛍光粒子から発せられる蛍光のシグナルを高感度かつ安定的に取得することができるようになり、同一面内の複数の地点間で、またサンプル間でのバラツキを抑制し、蛍光画像からの情報の取り出し精度を向上させることができる。これにより、蛍光画像から特定の遺伝子の発現の位置および量についてより信頼性の高い情報を抽出し、病理診断において利用することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、蛍光粒子で免疫染色された組織切片、充填層および保護層を含む病理標本と、その部分拡大図の模式図である。

【図2】図2は、実施例において作製した、プレパラートA1～A6（カバーガラスに重みをかいた場合）およびプレパラートB1～B6（カバーガラスに重みをかけなかった場合）それぞれについての、充填層の厚さと保護層の厚さの和（m2 + m3）の面内平均値（左列）および蛍光強度の面内平均値（右列）を表すグラフである。同じ種類のプレパラート（封入剤の添加量）について、3サンプルずつ測定を行っている。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本明細書の記載において、「病理標本」に係る技術的事項と「病理標本の作製方法」に係る技術的事項との間で共通する事項は、特に断らない限り、「病理標本」に関する記載および「病理標本の作製方法」に関する記載を相互に参照し、同様に適用することができるものとする。本明細書における屈折率は、特に断らない限り、測定波長 = 589 nm、測定温度 = 20 の標準的な測定条件に従って測定される値である。

10

20

30

40

50

【0017】

- 病理標本 -

本発明の病理標本は、免疫染色法またはFISH法に基づき、暗視野において観察可能な蛍光粒子で目的生体物質を蛍光標識する処理（免疫染色処理）がなされた組織切片、当該組織切片を被覆する充填層、および当該充填層を被覆する保護層を含み、前記蛍光粒子、充填層および保護層の屈折率（いずれも測定波長 = 589 nm、測定温度 = 20）が下記式（1）および（2）の条件を満たす：

$$|n_1 - n_2| \leq 0.20 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$|n_2 - n_3| \leq 0.15 \quad \dots \text{式(2)}$$

n_1 ：前記蛍光粒子の屈折率

n_2 ：前記充填層の屈折率

n_3 ：前記保護層の屈折率。

10

【0018】

本発明の一実施形態において、本発明の病理標本はさらに、充填層および保護層の厚さが下記式（3）の条件を満たすことが好ましい：

$$CV(m_2 + m_3) \leq 20\% \quad \dots \text{式(3)}$$

m_2 ：充填層の厚さ

m_3 ：保護層の厚さ

$CV(m_2 + m_3)$ ： m_2 と m_3 の和の面内変動係数

なお、変動係数 = 標準偏差 / 平均値である。

20

【0019】

本発明の一実施形態において、本発明の病理標本はさらに、充填層および保護層の厚さが下記式（4）および（5）の条件を満たすことが好ましい：

$$10 \mu\text{m} \leq M(m_2) \leq 50 \mu\text{m} \quad \dots \text{式(4)}$$

$$100 \mu\text{m} \leq M(m_3) \leq 200 \mu\text{m} \quad \dots \text{式(5)}$$

m_2 ：充填層の厚さ

m_3 ：保護層の厚さ

$M(m_2)$ ： m_2 の面内平均値

$M(m_3)$ ： m_3 の面内平均値。

30

【0020】

式（1）および（2）に係る条件のみならず、式（3）に係る条件、ならびに / または式（4）および（5）に係る条件を満たすことにより、病理標本の蛍光粒子から発せられる蛍光のシグナルを高感度化および安定化し、蛍光画像からの情報の取り出し精度を向上させる効果をさらに高めることが可能となる。ここで m_2 および m_3 の「面内平均値」とは、一枚の組織切片上（充填層および保護層が設けられている領域）の複数の箇所（測定された m_2 および m_3 から算出される平均値であり、 m_2 と m_3 の和の「面内変動係数」は、そのような複数の箇所（測定された m_2 および m_3 の和から算出される変動係数である。面内の測定箇所（数）は特に限定されるものではないが、一般的には数箇所（4～6箇所）～数十箇所、例えば10～20箇所を、面内全域から選択すればよい。

【0021】

（組織切片）

病理標本を構成する組織切片は、常法に従って、病理診断の対象とする疾患に罹患している、または罹患していることが疑われる対象（ヒトまたはその他の哺乳類等の動物）から採取され、所定の前処理、染色処理および後処理が行われているものである。

40

【0022】

組織切片は、通常、厚さが数 μm 、縦横が1mm四方～数mm四方となるように調製されたものが用いられる。このような組織切片は、蛍光画像を取得する際に蛍光粒子の輝度（明るさ）がなるべく均一となるよう、面内の平均厚さが一定の範囲に収まっていることが好ましい。すなわち、本発明の一実施形態において、組織切片の厚さは、下記式（6）の条件を満たすことが好ましい：

50

$2 \mu\text{m} \leq M(m_1) \leq 6 \mu\text{m}$

・・・式(6)

m_1 : 組織切片の厚さ

$M(m_1)$: m_1 の面内平均値。

【0023】

組織切片は、典型的には、暗視野において観察可能な蛍光粒子で目的生体物質を蛍光標識する処理（免疫染色 / FISH 染色処理）に加えて、明視野において観察可能な染色剤で細胞を染色する処理（明視野染色処理）が行われている。隣接する複数枚の組織切片（それらを1枚ずつ載置した複数枚の病理標本）ではなく、1枚の組織切片を用いて、同一の視野で、免疫染色の画像（蛍光画像）および明視野染色の画像（細胞形態画像）を取得し、所定の画像処理を行うことにより、1細胞内で発現している目的生体物質の位置および量を正確に測定し、評価することができる。

10

【0024】

細胞で発現している特定のタンパク質を目的生体物質とする免疫染色を行う場合、それと組みあわせて行われる明視野染色用の染色試薬の代表例としては、細胞核、石灰部、軟骨組織、細菌、粘液等の負に荷電している物質を青藍色～淡青色に染色するヘマトキシリン、および/または、細胞質、細胞膜、間質、各種線維、赤血球、角化細胞等の正に荷電している物質を赤～濃赤色に染色するエオジンが挙げられる。特に、細胞膜に発現するタンパク質（膜タンパク質）を目的生体物質とする場合は、細胞膜を染色するエオジンを用いる（エオジン染色をする）ことが好ましく、同時にヘマトキシリンを用いる（ヘマトキシリン・エオジン染色：HE染色をする）ようにしてもよい。ヘマトキシリンおよびエオジンはどちらも水溶液として調製される。

20

【0025】

一方、核内の染色体に含まれる特定の遺伝子（特定の塩基配列を有する核酸）を目的生体物質とする FISH 染色を行う場合、それと組みあわせて行われる明視野染色用の染色試薬の代表例としては、二本鎖 DNA にインターカレートする蛍光色素である DAPI（4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドールジヒドロクロライド）およびその他の核染色剤が挙げられる。DAPI 等の核染色剤も一般的に水溶液として調製される。

【0026】

（蛍光粒子）

蛍光粒子は、暗視野において所定の励起光を照射したときに、輝点として観察可能な粒子状の蛍光体である。蛍光粒子の平均粒径は、通常 $10 \sim 500 \text{ nm}$ 、好ましくは $50 \sim 200 \text{ nm}$ であり、粒径の変動係数は、通常は 20% 以下、好ましくは $5 \sim 15\%$ である。蛍光粒子の粒径は、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて電子顕微鏡写真を撮影し、蛍光標識用樹脂粒子の断面積を計測し、その計測値を相当する円の面積としたときの直径（面積円相当径）として測定することができる。蛍光粒子の集団に含まれる十分な数（たとえば 1000 個）の蛍光粒子のそれぞれについて、上記のようにして粒径を測定した後、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。

30

【0027】

蛍光粒子は、屈折率（ n_1 ）が式（1）の条件を満たすものであれば特に限定されるものではなく、充填層の屈折率（ n_2 ）を考慮しながら適切なものを選択することができる。

40

【0028】

蛍光粒子としては、例えば、蛍光体集積ナノ粒子を使用することができる。蛍光体集積ナノ粒子は、蛍光色素や半導体ナノ粒子（量子ドット）のような蛍光体を複数個、母体となる物質に内包したり表面に付着させたりすることで集積化した、ナノサイズの（直径が $1 \mu\text{m}$ 以下の）粒子状の蛍光体である。免疫染色においてこのような蛍光体集積ナノ粒子を用いることは、蛍光体を単独で（例えば蛍光色素を一分子で、または半導体ナノ粒子を一粒子で）用いる場合と比較して、目的とするタンパク質を標識した蛍光標識体1つあたりが発する蛍光の強度が増強されており、細胞の自家蛍光等のノイズや他の（蛍光）色素

50

に対する識別性を高めることができること、また励起光の照射による褪色を抑制することができることから好ましい。また、疎水結合による非特異的吸着を抑制する等の観点から、蛍光体集積ナノ粒子は必要に応じて、親水性化合物、例えば親水性高分子で修飾されていてもよい。

【0029】

蛍光体集積ナノ粒子を構成する母体としては、樹脂やシリカなど、物理的または化学的な結合力でもって蛍光体を集積化することのできる物質を用いることができる。蛍光粒子として蛍光体集積ナノ粒子を用いる場合、樹脂やシリカなど、その蛍光体集積ナノ粒子の母体として用いられている物質の屈折率を、蛍光粒子の屈折率 n_1 とみなす。

【0030】

蛍光体集積ナノ粒子を作製するための樹脂としては、例えば、メラミン樹脂、尿素樹脂、ベンゾグアナミン樹脂、フェノール樹脂、キシレン樹脂等の熱硬化性樹脂；およびスチレン樹脂、アクリル樹脂、ポリアクリロニトリル、AS樹脂（アクリロニトリル-スチレン共重合体）、ASA樹脂（アクリロニトリル-スチレン-アクリル酸メチル共重合体）など、1種類または2種類以上のモノマーを用いて作製される各種の単独重合体および共重合体が挙げられる。いくつかの樹脂およびその屈折率を例示すれば次の通りである：

- ・メラミン樹脂，屈折率：1.48
- ・アクリル樹脂（ポリメチルメタクリレート），屈折率：1.49
- ・スチレン樹脂（ポリスチレン），屈折率：1.59。

【0031】

本発明の一実施形態において、蛍光粒子は、樹脂を母体とする蛍光体集積ナノ粒子、例えばメラミン樹脂、アクリル樹脂などを母体とする蛍光体集積ナノ粒子であることが好ましい。そのような蛍光粒子は、例えば、充填層としてアクリル樹脂を含有する封入剤を用いる場合に、式(1)を満たしやすい屈折率 n_1 を有する。なお、メラミン樹脂は、蛍光色素等の蛍光体を集積させたナノ粒子を作製しやすく、発光強度の高いナノ粒子が得られること、また親水性であるため非特異的吸着を防止しやすいこと、といった観点からも好ましい。

【0032】

一方、蛍光体集積ナノ粒子を構成する蛍光体としては、蛍光色素や半導体ナノ粒子など、1分子または1粒子で蛍光を発することのできる物質を用いることができる。撮影される染色画像において所望の波長の蛍光(色)を発する蛍光体を選択すればよい。また、蛍光標識の対象とする目的生体分子(例えば、タンパク質および/または核酸)が複数ある場合は、それぞれに対応した異なる波長の蛍光を発する、複数種類の蛍光体を組み合わせ用いればよい。

【0033】

蛍光色素としては、例えば、フルオレセイン系色素、ローダミン系色素、Alexa Fluor（登録商標、インビトロジェン社製）系色素、BODIPY（登録商標、インビトロジェン社製）系色素、カスケード（登録商標、インビトロジェン社）系色素、クマリン系色素、NBD（登録商標）系色素、ピレン系色素、シアニン系（Cy系）色素、ペリレン系色素、オキサジン系色素など、低分子有機化合物（ポリマー等の高分子有機化合物ではないもの）からなる蛍光色素が挙げられる。

【0034】

具体的には、5-カルボキシ-フルオレセイン、6-カルボキシ-フルオレセイン、5,6-ジカルボキシ-フルオレセイン、6-カルボキシ-2',4,4',5',7,7'-ヘキサクロロフルオレセイン、6-カルボキシ-2',4,7,7'-テトラクロロフルオレセイン、6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメトキシフルオレセイン、ナフトフルオレセイン（以上フルオレセイン系色素）；5-カルボキシ-ローダミン、6-カルボキシ-ローダミン、5,6-ジカルボキシ-ローダミン、ローダミン6G、テトラメチルローダミン、X-ローダミン、スルホローダミン101、スルホローダミン101酸クロリド（テキサスレッド（登録商標））（以上ローダミン系色素）；Alexa Flu

10

20

30

40

50

or 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 635、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750 (以上 Alexa Fluor 系色素) ; BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY 493 / 503、BODIPY 530 / 550、BODIPY 558 / 568、BODIPY 564 / 570、BODIPY 576 / 589、BODIPY 581 / 591、BODIPY 630 / 650、BODIPY 650 / 665 (以上 BODIPY 系色素) ; メトキシクマリン (クマリン系色素) ; エオジン、NBD (NBD 系色素) ; ピレン (ピレン系色素) ; ペリレンジイミド (ペリレン系色素) ; Cy5、Cy5.5、Cy7 (Cy 系色素) などを挙げることができる。このような蛍光色素は、何れかの種類を単独で用いても、複数の種類を組み合わせて用いてもよい。

10

【0035】

中でも、スルホローダミン101およびその塩酸塩である Texas Red (登録商標) などのローダミン系色素や、ペリレンジイミドおよびその誘導体などのペリレン系色素は、比較的耐光性が高いため好ましい。

【0036】

本発明の一実施形態において、蛍光粒子 (蛍光体集積ナノ粒子に含有される蛍光色素、または半導体ナノ粒子) の発光波長は、下記式 (7) の条件を満たすことが好ましい:

$$550 \text{ nm} < 1 < 650 \text{ nm} \quad \dots \text{式 (7)}$$

1 : 蛍光粒子の極大発光波長

20

式 (7) の条件を満たす蛍光色素は、所定の励起光を照射することにより黄色 ~ 赤色に見える蛍光を発するものであり、当業者であれば公知の蛍光色素の中から適切に選択することができる。

【0037】

一方、半導体ナノ粒子 (量子ドット) は、200 ~ 700 nm の範囲内の波長の紫外 ~ 近赤外光により励起されたときに、400 ~ 1100 nm の範囲内の波長の可視 ~ 近赤外光の発光を示すことが好ましい。そのような半導体ナノ粒子としては、例えば、II-VI 族化合物、III-V 族化合物、または IV 族元素からなる粒子 (CdSe、CdS、CdTe、ZnSe、ZnS、ZnTe、InP、InN、InAs、InGaP、GaP、GaAs、Si、Ge 等)、あるいはこれらの粒子をコアとし、その周囲をシェルとなる化合物で取り囲んだコア/シェル型の粒子 (CdSe/ZnS、CdS/ZnS、InP/ZnS、InGaP/ZnS、Si/SiO₂、Si/ZnS、Ge/GeO₂、Ge/ZnS 等) が挙げられる。このような半導体ナノ粒子は、何れかの種類を単独で用いても、複数の種類を組み合わせて用いてもよい。

30

【0038】

上記のような蛍光体集積ナノ粒子は公知の物質であり、その製造に用いられる蛍光体および母体や製造方法などの詳細、実施形態の具体例については、例えば国際公開WO2013/035703号パンフレット、国際公開WO2013/147081号パンフレット、国際公開WO2014/136776号パンフレットなどを参照することができる。

【0039】

40

蛍光粒子としては、樹脂を母体とする蛍光体集積ナノ粒子以外にも、シリカを母体とする蛍光体集積ナノ粒子を使用することもできる。シリカの屈折率は 1.44 ~ 1.50 なので、シリカを母体とすることにより、屈折率 n_1 が 1.44 ~ 1.50 の範囲にある蛍光粒子 (蛍光体集積ナノ粒子) を作製することができる。

【0040】

なお、半導体ナノ粒子 (量子ドット) 自体も蛍光粒子の一種と言えるが、樹脂およびシリカに比べて一般的に大きな屈折率を有する。例えば、InP の屈折率は 3.5 であり、GaAs の屈折率は 3.8 である。したがって、例えば後述するような屈折率 n_2 が 1.50 前後の封入剤を用いて充填層を形成する場合、蛍光粒子として半導体ナノ粒子を用いると、式 (1) の条件を満たすことはできない。しかしながら、もしも式 (1) の条件を

50

満たすことのできる充填層が存在すれば、半導体ナノ粒子を蛍光粒子として用いる実施形態も、本発明から排除されるものではない。

【0041】

(充填層)

充填層は、免疫染色/FISH染色処理がなされた組織切片を被覆する層、換言すれば当該組織切片と保護層との間に充填される層であり、典型的には封入剤から形成される層である。

そして、充填層の厚さ m_2 は、例えば、保護層とスライドガラスとの間の厚さを測定し、当該厚さから組織切片の厚さを差し引くことで求めることができる。

【0042】

充填層、すなわち充填層を形成するための封入剤は、屈折率(n_2)が式(1)および(2)の条件を満たすものであれば特に限定されるものではなく、蛍光粒子の屈折率(n_1)および保護層の屈折率(n_3)を考慮しながら適切なものを選択することができる。封入剤には固化するタイプと固化しないタイプがあり、固化するタイプは固化する前と後で屈折率が変動する場合があるが、屈折率は病理標本が完成した状態における値、すなわち固化するタイプの封入剤については通常固化した後の屈折率を n_2 とする。封入剤は脂溶性(油系、非水溶性)封入剤と水溶性(水系)封入剤に大別することができるが、どちらを用いてもよい。

【0043】

封入剤は、一般的に、樹脂と、それを溶解、希釈する溶媒との混合物であり、市販されているものでも、自家で調製したものでもよい。封入剤を自家で調製する場合は、常法に従って、適切な合成樹脂または天然樹脂と、適切な水性溶媒または油性溶媒(有機溶媒)とを混合して調製すればよい。市販の脂溶性封入剤も、必要に応じて有機溶媒を添加し、粘度を調整した上で使用するようにしてもよい。

【0044】

市販の脂溶性封入剤としては、例えば次のような商品が挙げられる：

- ・「エンテラン(登録商標)ニュー」,メルク株式会社,屈折率:1.49~1.51,主成分:アクリル樹脂,溶媒:キシレン(約60%)
- ・「パラマウント(登録商標)N」,株式会社ファルマ,屈折率:1.51,主成分:アクリル樹脂,溶媒:脂肪族炭化水素(ノンキシレン,ノントルエン)
- ・「マウントクイック」,大道産業株式会社,屈折率:1.41,主成分:アクリル樹脂
- ・「ProLong(登録商標)」,ライフテクノロジーズジャパン株式会社(サーモフィッシャーサイエンティフィック),屈折率:1.46,主成分:アクリル樹脂
- ・「マリノール」,武藤化学株式会社,屈折率:1.57,主成分:アクリル樹脂。

【0045】

市販の水溶性封入剤としては、例えば次のような商品が挙げられる：

- ・「VECTASHIELD(登録商標)」,Vector Laboratories社,屈折率:1.36,主成分:グリセリン。

【0046】

封入剤から形成される充填層の屈折率は、一般的に、封入剤に含まれる樹脂の屈折率と溶媒の屈折率の両方の影響を受ける。封入剤が固化するタイプのものであれば、溶媒は封入剤が乾燥し固化するにつれて蒸発していくので、充填層の屈折率は主に、残存する樹脂の屈折率を反映した値となる。一方、封入剤が固化しないタイプのものであれば、溶媒も一定程度残存するので、充填層の屈折率は樹脂と溶媒の両方の屈折率を反映した値(それらの屈折率の一方を上限値、他方を下限値とする範囲に含まれる値)となる。

【0047】

脂溶性封入剤に配合する有機溶媒としては、芳香族炭化水素、不飽和炭化水素カルボニルを含む化合物(ケトン)、エステル、エーテル、アルコールなどが挙げられる。芳香族炭化水素の具体例としては、ベンゼン、トルエン、キシレン等が挙げられる。不飽和炭化水素の具体例としては、リモネン、ピネン等が挙げられる。ケトンの具体例としては、シ

10

20

30

40

50

クロヘキサノン、メチルエチルケトン等が挙げられる。エステル具体例としては、酢酸ブチル等を挙げることができる。エーテル具体例としては、アニソール、1,4-ジ(2-ヒドロキシエトキシ)ベンゼン、エチレングリコールモノフェニルエーテル等が挙げられる。アルコール具体例としては、ブタノール、ペンタノール、ヘキサノール等が挙げられる。これらの化合物のうち、キシレン、トルエン、リモネンなどは、入手が容易であること、屈折率が1.5前後で式(1)および(2)の条件を満たす封入剤を調製しやすいこと、数十分程度で乾燥するため作業に適した乾燥速度を有することなどから好ましい。

【0048】

脂溶性封入剤に配合する樹脂としては、スチレン樹脂(ポリスチレンなど)、アクリル樹脂(ポリメタクリル酸メチルなど)の合成樹脂や、カナダバルサムなどの天然樹脂が挙げられる。これらの樹脂は、ガラスに近い屈折率を有すること、無色透明で、蛍光粒子の蛍光を吸収したり、自家蛍光を発したりしないことから好ましい。

10

【0049】

本発明の一実施形態において、充填層は、アクリル樹脂を含有する(脂溶性)封入剤、例えば「エンテランニュー」、「パラマウントN」、「マリノール」などの商品から形成された層であることが好ましい。そのような充填層は、例えば、蛍光粒子として樹脂を母体とする蛍光体集積ナノ粒子を用いる場合、および/または保護層として硼珪酸ガラスからなるカバーガラスを用いる場合に、式(1)および(2)を満たしやすい屈折率 n_2 を有する。

【0050】

20

封入剤は、必要に応じて、褪色防止剤(酸化防止剤、紫外線吸収剤)をさらに含有してもよい。褪色防止剤としては、例えば、フェノール系、アミン系、リン系、硫黄系および不飽和炭化水素系の褪色防止剤の中から、封入剤に用いている溶媒の溶解性に問題がないものを、1種または2種以上選択して用いることができる。このような褪色防止剤も、蛍光画像の撮影に悪影響がないよう、蛍光粒子の極大発光波長(好ましくは550~650nm)と重複する波長領域での発光がなく、その蛍光粒子の最大励起波長と重複する波長領域での吸収がないものが好ましい。

【0051】

(保護層)

保護層は、充填層を被覆する層であり、典型的にはカバーガラスによって構成される層である。

30

【0052】

保護層、すなわち保護層を構成するカバーガラスは、屈折率(n_3)が式(2)の条件を満たすものであれば特に限定されるものではなく、充填層の屈折率(n_2)を考慮しながら適切なものを選択することができる。

【0053】

本発明の一実施形態において、保護層は、硼珪酸ガラス(ソーダガラス)からなるカバーガラスであることが好ましい。そのような保護層は、例えば、充填層としてアクリル樹脂を含有する封入剤から形成された層を用いる場合に、式(2)を満たしやすい屈折率 n_3 を有する。硼珪酸ガラスからなるカバーガラスは、一般的に、屈折率は1.51~1.53であり、厚さは0.12~0.17mmである。

40

【0054】

- 病理標本の作製方法 -

本発明の病理標本の作製方法は、組織切片に対して、免疫染色法またはFISH法に基づき、暗視野において観察可能な蛍光粒子で目的生体物質を蛍光標識する処理(免疫染色/FISH染色処理)を行う工程、当該組織切片を充填層で被覆する処理(充填処理)を行う工程、および当該充填層を保護層で被覆する処理(保護処理)を行う工程を含み、前記免疫染色/FISH染色処理、充填処理および保護処理における、前記蛍光粒子、充填層および保護層の屈折率(いずれも測定波長=589nm、測定温度=20)が下記式(1)および(2)の条件を満たす：

50

$$|n_1 - n_2| = 0.20 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$|n_2 - n_3| = 0.15 \quad \dots \text{式(2)}$$

n_1 : 前記蛍光粒子の屈折率

n_2 : 前記充填層の屈折率

n_3 : 前記保護層の屈折率。

【0055】

本発明の病理標本の作製方法は、免疫染色 / FISH 染色処理、充填処理および保護処理以外にも、病理標本の一般的な作製方法に含まれる各種の処理ないし工程を含んでいてもよい。病理標本の作製方法は、一般的に、標本前処理工程、染色工程、および標本後処理工程を含む。

10

【0056】

目的生体物質の染色処理を免疫染色法に基づいて行う（すなわちタンパク質を目的生体物質とする）実施形態において、標本前処理工程には、脱パラフィン処理、抗原賦活化処理、洗浄処理などが含まれる。染色工程には、免疫染色法に基づく染色を行う処理（免疫染色処理）、すなわち目的生体物質を直接的に標識するか、間接的に標識するかに応じた、1次抗体処理、2次抗体処理、蛍光粒子処理などと、通常はさらに形態観察用染色処理（例えばヘマトキシリン・エオジンによるもの）が含まれる。標本後処理工程には、溶媒置換処理、充填処理（封入剤を用いた封入処理）、保護処理、必要に応じて溶媒置換処理の前に行われる洗浄処理および脱水処理が含まれる。

20

【0057】

目的生体物質の染色処理を FISH 法に基づいて行う（すなわち特定の塩基配列を有する核酸を目的生体物質とする）実施形態において、標本前処理工程には、脱パラフィン処理、FISH 用前処理、酵素（プロテアーゼ）処理、固定処理などが含まれる。染色工程には、FISH 法に基づく染色を行う処理（FISH 染色処理）、すなわち DNA 変性処理、ハイブリダイゼーション処理、ポストハイブリダイゼーション処理などと、通常はさらに核染色処理（例えば DAPI によるもの）が含まれる。標本後処理工程には、溶媒置換処理、充填処理（封入剤を用いた封入処理）、保護処理、必要に応じて溶媒置換処理の前に行われる洗浄処理および脱水処理が含まれる。

【0058】

以下、本発明の病理標本の作製方法を実施するために必要な処理ないし工程についてさらに説明する。病理標本の作製方法に関して、本明細書に特に記載されていない事項については、例えば特許文献 1～3 の記載事項に準じて、またはその他の公知ないし一般的な技術的事項に準じて、適切な実施形態とすることができる。

30

【0059】

<免疫染色 / FISH 染色処理>

免疫染色 / FISH 染色処理は、免疫染色法または FISH 法に基づいて目的生体物質を蛍光粒子（例えば蛍光体集積ナノ粒子）で標識する工程である。免疫染色処理では、後述する充填処理において用いられる充填層（典型的には封入剤）との間で、屈折率について式（1）の条件を満たす蛍光粒子、好ましくは樹脂を母体とする蛍光体集積ナノ粒子を用いる。また、当該蛍光粒子として、好ましくは極大発光波長（1）が前記式（7）の条件を満たす、すなわち $550 \text{ nm} < \lambda < 650 \text{ nm}$ である蛍光粒子（蛍光体集積ナノ粒子）を用いる。そのような蛍光粒子については、「病理標本」の項で前述した通りである。

40

【0060】

（免疫染色処理）

免疫染色法には様々な手法があり、目的とするタンパク質を蛍光標識して病理診断等に用いることができるよう組織切片を染色することができれば特に限定されるものではないが、代表的には次のようなものが挙げられる：

蛍光粒子と 1 次抗体を連結した蛍光標識 1 次抗体を用意し、その蛍光標識 1 次抗体で目的タンパク質を直接的に蛍光標識し染色する方法（1 次抗体法）；

50

1次抗体、および蛍光粒子と2次抗体を連結した蛍光標識2次抗体を用意し、目的タンパク質に1次抗体を反応させた後、その1次抗体に蛍光標識2次抗体を反応させることで、目的タンパク質を間接的に蛍光標識し染色する方法(2次抗体法)；

1次抗体とビオチンを連結したビオチン修飾1次抗体、および蛍光粒子とアビジンないしストレプトアビジンを連結したアビジン修飾蛍光粒子を用意し、目的タンパク質にビオチン修飾1次抗体を反応させた後、さらにアビジン修飾蛍光粒子を反応させて、アビジン-ビオチン反応を利用して目的タンパク質を間接的に蛍光標識し染色する方法(アビジン-ビオチン併用1次抗体法)；

1次抗体、2次抗体とビオチンを連結したビオチン修飾2次抗体、および蛍光粒子とアビジンないしストレプトアビジンを連結したアビジン修飾蛍光粒子を用意し、目的タンパク質に1次抗体を反応させ、次いでビオチン修飾2次抗体を反応させた後、さらにアビジン修飾蛍光粒子を反応させて、アビジン-ビオチン反応を利用して目的タンパク質を間接的に蛍光標識し染色する方法(アビジン-ビオチン併用2次抗体法)。

10

【0061】

なお、上記のアビジン-ビオチン併用1次抗体法またはアビジン-ビオチン併用2次抗体法において、ビオチンおよびアビジンの代わりに、ハプテン(免疫原性を有さないが抗原性を示し抗体と反応しうる比較的分子量の低い物質)および抗ハプテン抗体、たとえばジコキシゲニンおよび抗ジコキシゲニン抗体、FITC(フルオレセインイソチオシアネート)および抗FITC抗原、さらには同様の特異的な反応性を有するその他の物質の組み合わせを利用することもできる。

20

【0062】

免疫染色処理は、上述したような各種の手法のそれぞれにとって標準的な手順および処理条件に従って行えばよい。一般的には、検体スライドに載置した組織切片を、免疫染色法の実施形態に応じた1種類または2種類以上の試薬と接触させ(例えば、組織切片上に当該試薬を滴下するか、組織切片を当該試薬に浸漬する)、適切な温度および時間条件下で(例えば4で一晩)反応させればよい。免疫染色に必要な各種の試薬、すなわち蛍光標識された1次もしくは2次抗体、ビオチン修飾された1次もしくは2次抗体、アビジン修飾された2次抗体もしくは蛍光体などが溶解し、必要に応じてBSA等のブロッキング剤が添加された緩衝液等の溶液は、公知の方法にしたがって作製することが可能であり、市販品として入手することもできる。

30

【0063】

免疫染色の対象とする目的タンパク質は特に限定されるものではないが、典型的には、組織免疫染色法に基づく病理診断の対象とされているタンパク質、例えばHER2、TOP2A、HER3、EGFR、P53、MET、その他の各種のがん・腫瘍関連遺伝子(いわゆるバイオマーカー遺伝子)由来のタンパク質、さらにはがんの増殖因子、転写制御因子、増殖制御因子受容体、転写制御因子受容体等のがんに関連するタンパク質から選択することができる。

【0064】

目的タンパク質に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体(1次抗体)、ならびにそれらの抗体に対する抗体(2次抗体)は、公知の方法にしたがって作製することが可能であり、市販品として入手することもできる。

40

【0065】

(FISH処理)

FISH法にも様々な手法があり、目的とする遺伝子を蛍光標識して病理診断等に用いることができるよう組織切片を染色することができれば特に限定されるものではないが、代表的には次のようなものが挙げられる：

蛍光体とプローブを連結した蛍光標識プローブを用意し、その蛍光標識プローブで目的遺伝子を直接的に蛍光標識し染色する方法(直接法)；

プローブとビオチンを連結したビオチン修飾プローブ、および蛍光体とアビジンないしストレプトアビジンを連結したアビジン修飾蛍光体を用意し、目的遺伝子にビオチン修飾

50

プローブを反応させた後、さらにアビジン修飾蛍光体を反応させて、アビジン - ビオチン反応を利用して目的遺伝子を間接的に蛍光標識し染色する方法（間接法）。

【 0 0 6 6 】

なお、上記の間接法において、ビオチンおよびアビジンの代わりに、ハプテン（免疫原性を有さないが抗原性を示し抗体と反応しうる比較的分子量の低い物質）および抗ハプテン抗体、たとえばジコキシゲニンおよび抗ジコキシゲニン抗体、F I T C（フルオレセインイソチオシアネート）および抗F I T C抗原、さらには同様の特異的な反応性を有するその他の物質の組み合わせを利用することもできる。

【 0 0 6 7 】

F I S H法は、上述したような各種の手法のそれぞれにとって標準的な手順および処理条件に従って行えばよい。一般的には、組織切片を載置した検体スライドをF I S H法に応じた1種類または2種類以上の試薬に、適切な温度および時間条件の下、浸漬すればよい。F I S Hに必要な各種の試薬、すなわち蛍光標識プローブ、ビオチン修飾プローブ、アビジン修飾蛍光体などが溶解し、必要に応じてB S A等のブロッキング剤が添加された緩衝液等の溶液は、公知の方法にしたがって作製することが可能であり、市販品として入手することもできる。例えば、ニックトランスレーション法により目的遺伝子のDNAクローンのd T T Pをビオチン修飾d U T Pで置換することにより、DNAプローブに対して複数個のビオチンが導入されたビオチン修飾プローブを作製することができる。

【 0 0 6 8 】

F I S Hの対象とする目的遺伝子は特に限定されるものではないが、典型的には、F I S H法に基づく病理診断の対象とされているタンパク質、例えばH E R 2、T O P 2 A、H E R 3、E G F R、P 5 3、M E T、その他の各種のがん・腫瘍関連遺伝子（いわゆるバイオマーカー遺伝子）、さらにはがんの増殖因子、転写制御因子、増殖制御因子受容体、転写制御因子受容体等のがんに関連する遺伝子から選択することができる。

【 0 0 6 9 】

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

【 0 0 7 0 】

< 明視野染色処理 >

免疫染色 / F I S H染色処理の前もしくは後に、または免疫染色処理と同時に、組織切片に対して、明視野において観察可能な染色剤で細胞を染色する処理（明視野染色処理）を行ってもよい。

【 0 0 7 1 】

明視野染色処理は、標準的な手順および処理条件に従って行うことができる。一般的には、検体スライドに載置した組織切片を、明視野染色処理の実施形態に応じた1種類または2種類以上の試薬と接触させ（例えば、組織切片上に当該試薬を滴下するか、組織切片を当該試薬に浸漬する）、適切な温度および時間条件の下で反応させればよい。明視野染色処理のための試薬を免疫染色処理のための試薬と混合し、それを検体スライドに載置した組織切片と接触させるようにすれば、明視野染色処理を免疫染色 / F I S H染色処理と同時にすることもできる。

【 0 0 7 2 】

< 充填処理 >

充填処理（封入処理）は、免疫染色 / F I S H染色処理（および必要に応じて明視野染色処理）がなされた組織切片を充填層で被覆する処理であり、典型的には、封入剤を用いて組織切片を封入する処理である。充填処理では、前述した免疫染色 / F I S H染色処理において用いられる蛍光粒子との間で、屈折率について式（1）の条件を満たし、かつ後述する保護処理において形成される保護層との間で、屈折率について式（2）の条件を満たす、充填層を形成する。典型的には、式（1）および（2）の条件を満たす屈折率を有

10

20

30

40

50

する封入剤、好ましくはアクリル樹脂を含有する封入剤を用いる。そのような保護層（封入剤）については、「病理標本」の項で前述した通りである。

【0073】

なお、封入剤として脂溶性封入剤を用いる場合は、充填処理に先だって、染色、洗浄等に用いて組織切片に付着している水系溶媒を、乾燥により、またはアルコール等を用いて除去し、封入剤に用いられているのと同じ種類の有機溶媒で置換する処理（溶媒置換処理）を行っておくことが好ましい。

【0074】

充填処理のための手法や条件は特に限定されるものではないが、封入剤を用いる場合は一般的には、検体スライド上の組織切片に封入剤を滴下しすればよい。また、封入剤を滴下した後（充填処理の後）、例えば保護層としてカバーガラスを載せてから（保護処理において）、そのカバーガラスに重しとなる物体を載せたり、カバーガラスをピンセット等で押しついたりすることで、充填層の厚さを封入剤の滴下量によらずに一定にすると共に、厚さを均一にする、つまり面内変動係数を小さくすることができる。そのような操作をしない場合は、封入剤の滴下量によって充填層の厚さも変動し、通常、滴下量が多ければ充填層の厚さも厚くなる傾向を示す。

【0075】

充填層の厚さ（ m_2 ）は、後述する保護層の厚さ（ m_3 ）との関係において、前記式（3）の条件を満たす、すなわち m_2 と m_3 の和の面内変動係数（ $CV(m_2 + m_3)$ ）が、 $CV(m_2 + m_3) < 20\%$ であることが好ましい。また、充填層の厚さ（ m_2 ）は、前記式（4）の条件を満たす、すなわち m_2 の面内平均値（ $M(m_2)$ ）が、 $10 \mu m < M(m_2) < 50 \mu m$ であることが好ましい。そのような好ましい厚さを有する充填層は、上記のように、封入剤の滴下量を調節したり、カバーガラスに力を加えたりすることで、形成することができる。

【0076】

< 保護処理 >

保護処理は、充填処理（封入処理）がなされた組織切片を保護層で被覆する処理であり、典型的には、カバーガラスを載置する処理である。保護処理では、前述した充填処理において形成される充填層との間で、屈折率について式（2）の条件を満たす保護層を形成する。典型的には、式（2）の条件を満たす屈折率を有するカバーガラス、好ましくは珪酸ガラスからなるカバーガラスを用いる。そのような保護層（カバーガラス）については、「病理標本」の項で前述した通りである。

【0077】

保護処理のための手法や条件は特に限定されるものではないが、カバーガラスを用いる場合は一般的には、組織切片を被覆するように形成されている充填層の上にカバーガラスを載置すればよい。用いるカバーガラスの厚さが、保護層の厚さとなる。カバーガラスを載置する際に、充填層に関して前述したように、そのカバーガラスに重しとなる物体を載せたり、カバーガラスをピンセット等で押しついたりすることで、充填層の厚さを薄くすると共に、厚さを均一にする、つまり面内変動係数を小さくすることができる。

【0078】

保護層の厚さ（ m_3 ）は、前述した充填層の厚さ（ m_2 ）との関係において、前記式（3）の条件を満たす、すなわち m_2 と m_3 の和の面内変動係数（ $CV(m_2 + m_3)$ ）が、 $CV(m_2 + m_3) < 20\%$ であることが好ましい。また、保護層の厚さ（ m_3 ）は、前記式（5）の条件を満たす、すなわち m_3 の面内平均値（ $M(m_3)$ ）が、 $100 \mu m < M(m_3) < 200 \mu m$ であることが好ましい。そのような好ましい厚さを有する保護層は、適切なカバーガラスを選択して用いることで形成することができる。

【0079】

- 蛍光画像の取得方法 -

本発明の蛍光画像の取得方法は、本発明の病理標本、または本発明の作製方法によって得られた病理標本の、蛍光画像の取得方法であって、病理標本における充填層の厚さ（ m

10

20

30

40

50

2)と保護層の厚さ(m3)を測定し、m2とm3の和の面内平均値(M(m2+m3))を算出するステップ、および当該面内平均値に基づいて、蛍光粒子の輝点像の球面収差を補正するステップを含む。

【0080】

以下、本発明の蛍光画像の取得方法を実施するためのシステムおよび装置について、蛍光画像とともに明視野画像を取得する場合の一実施形態に基づいて、さらに詳細に説明する。蛍光画像および明視野画像の取得方法に関して、あるいは取得した蛍光画像および明視野画像の画像処理方法、分析方法に関して、本明細書に特に記載されていない事項については、例えば特許文献1～3の記載事項に準じて、またはその他の公知ないし一般的な技術的事項に準じて、適切な実施形態とすることができる。

10

【0081】

本実施形態において、蛍光画像および明視野画像は、公知のカメラ付き蛍光顕微鏡に準じた構成を有する、顕微鏡画像取得装置によって撮影される。顕微鏡画像取得装置は、画像処理装置と、ケーブル等のインターフェースを介してデータ送受信可能に接続されて、病理診断支援システムを構成している。これにより、スライド固定ステージ上に載置されたスライド(病理標本)上の組織切片について取得された画像データは、画像処理装置に速やかに送信され、病理診断のための画像の処理および分析のために利用することができるようになる。

【0082】

顕微鏡画像の視野は、3mm²以上であることが好ましく、30mm²以上であることがより好ましく、300mm²以上であることがさらに好ましい。この顕微鏡画像の視野が、撮影される蛍光画像および明視野画像に対応する。

20

【0083】

顕微鏡画像取得装置は、照射手段、結像手段、撮像手段、膜厚測定手段、通信I/F等を備えて構成されている。照射手段は、光源、フィルター等により構成され、スライド固定ステージに載置されたスライド上の組織切片に光を照射する。結像手段は、接眼レンズ、対物レンズ、および球面収差補正機構等により構成され、照射した光によりスライド上の組織切片から発せられる透過光、反射光、又は蛍光を結像する。撮像手段は、CCD(Charge Coupled Device)センサー等を備え、結像手段により結像面に結像される像を撮像して顕微鏡画像のデジタル画像データを生成する顕微鏡設置カメラである。通信I/Fは、生成された顕微鏡画像の画像データを画像処理装置に送信する。

30

【0084】

顕微鏡画像取得装置は、明視野観察に適した照射手段及び結像手段を組み合わせた明視野ユニット、および蛍光観察に適した照射手段及び結像手段を組み合わせた蛍光ユニットを備えており、ユニットを切り替えることにより、顕微鏡画像として明視野画像を取得するか蛍光画像を取得するかを切り替えることができる。蛍光ユニットの励起光源及び蛍光検出用光学フィルターは、免疫染色に用いた蛍光粒子の極大励起波長および極大発光波長に対応したものを選択する。

【0085】

一方、画像処理装置は、制御部、操作部、表示部、通信I/F、記憶部等を備えて構成され、各部はバスを介して接続されている。制御部は、CPU(Central Processing Unit)、RAM(Random Access Memory)等を備えて構成され、記憶部に記憶されている各種プログラムとの協働により各種処理を実行し、画像処理装置の動作を統括的に制御する。例えば、制御部は、記憶部に記憶されているプログラムとの協働により画像解析処理を実行する。操作部は、文字入力キー、数字入力キー、及び各種機能キー等を備えたキーボードと、マウス等のポインティングデバイスを備えて構成され、キーボードで押下操作されたキーの押下信号とマウスによる操作信号とを、入力信号として制御部に出力する。表示部は、例えば、LCD(Liquid Crystal Display)等のモニタを備えて構成されており、制御部から入力される表示信号の指示に従って各種画面を表示する、すなわち画像解析結果を出力するための出力手段として機能する。通信I/Fは、顕微鏡画像取得装置をは

40

50

じめとする外部機器との間でデータ送受信を行なうためのインターフェースである。通信 I / F は、明視野画像と蛍光画像の入力手段として機能する。記憶部は、例えば HDD (Hard Disk Drive) や半導体の不揮発性メモリー等で構成されている。記憶部には、前述のように各種プログラムや各種データ等が記憶されている。その他、画像処理装置は、LAN アダプターやルーター等を備え、LAN 等の通信ネットワークを介して外部機器と接続される構成としてもよい。

【0086】

明視野画像及び蛍光画像は、下記(1)～(5)の手順により取得される。

(1) 明視野染色処理および免疫染色 / FISH 染色処理がなされた病理標本(検体スライド)を、顕微鏡画像取得装置のスライド固定ステージに載せる。

(2) 明視野ユニットに設定し、撮影倍率、ピントの調整を行い、組織切片上の観察対象領域を視野に納める。

(3) 撮像手段で撮影を行って明視野画像の画像データを生成し、画像処理装置に画像データを送信する。

(4) ユニットの蛍光ユニットに変更する。

(5) 視野及び撮影倍率を変えずに撮像手段で撮影を行って蛍光画像の画像データを生成し、画像処理装置に画像データを送信する。

【0087】

本発明の好ましい実施形態において、上記手順(5)の撮像手段で撮影を行う前に、膜厚測定手段によって病理標本における充填層の厚さ(m_2)と保護層の厚さ(m_3)を測定し、 m_2 と m_3 の和の面内平均値($M(m_2 + m_3)$)を算出すること、および当該面内平均値に基づいて、球面収差補正機構によって、蛍光粒子の輝点像の球面収差を補正することが行われる。

【0088】

顕微鏡画像取得装置が備える膜厚測定手段は、共焦点方式のレーザースキャン顕微鏡、マイクロ顕微鏡(デジタルマイクロスコープ)など、公知の顕微鏡タイプの膜厚測定装置が備える当該手段に準じて構築することが可能である。組織切片、充填層および保護層が積層された状態にある地点であっても、それぞれの厚さ m_1 、 m_2 および m_3 を別個に測定することが可能である。一つの視野(面内)において複数の地点の m_1 、 m_2 および m_3 を測定することにより、面内平均値 $M(m_1)$ 、 $M(m_2)$ 、 $M(m_3)$ 、および $M(m_2 + m_3)$ と、面内変動係数 $CV(m_2 + m_3)$ を算出することができる。 m_1 、 m_2 および m_3 を個別に測定する必要がない場合、例えば式(3)を満たすか否かを判定するために、充填層および保護層の厚さの和($m_2 + m_3$)を測定すればよい場合は、充填層および保護層の二層の厚さをまとめて測定するような実施形態とすることもできる。

【0089】

m_1 、 m_2 および m_3 の測定データは、画像処理装置に送信して、画像処理装置が有する記憶部で記憶し、制御部で演算処理をするようにしてもよいし、顕微鏡画像取得装置が同様の記憶部および制御部を備える場合は、その記憶部で記憶し、制御部で演算処理をするようにしてもよい。

【0090】

なお、ある視野(面内)において、 m_1 、 m_2 および m_3 を測定した結果、式(3)～(6)のうちの一つまたは複数が満たされていないことが判明した場合は、視野を変えて、その視野における m_1 、 m_2 および m_3 を測定し、所望の式が満たされる場合に、蛍光画像を取得するようにしてもよい。

【0091】

顕微鏡画像取得装置が備える球面収差補正機構は、公知の蛍光顕微鏡またはその他の顕微鏡(走査透過型電子顕微鏡等)が備える当該手段に準じて構築することが可能である。球面収差補正機構は、膜厚測定手段で測定された膜厚データから算出された $CV(m_2 + m_3)$ の値を読み込み、その値に基づいて自動的に球面収差補正の効果が最適となるようにする。例えば、球面収差補正機構は収差補正用凹レンズを備えており、球面収差補正の

10

20

30

40

50

効果が最適となるような位置に収差補正用凹レンズを配置することができるものとして構築することが可能である。

【実施例】

【0092】

[1-1] 蛍光体集積ナノ粒子（スルホローダミン集積メラミン樹脂粒子）の作製

蛍光色素として赤色発光色素である S u l f o R h o d a m i n e 1 0 1（シグマアルドリッチ社製）（励起波長 5 8 6 n m、発光波長 6 0 5 n m）1 4 . 4 m g を水 2 2 m L に加えて溶解させた。その後、この溶液に乳化重合用乳化剤の「エマルジョン（登録商標）4 3 0」（ポリオキシエチレンオレイルエーテル、花王社製）の 5 % 水溶液を 2 m L 加えた。この溶液をホットスターラー上で攪拌しながら 7 0 ℃ まで昇温させた後、この溶液にメラミン樹脂原料「ニカラック M X - 0 3 5」（日本カーバイド工業社製）を 0 . 6 5 g 加えた。さらに、この溶液に界面活性剤としてドデシルベンゼンスルホン酸（関東化学社製）の 1 0 % 水溶液を 1 0 0 0 μ L 加え、7 0 ℃ で 5 0 分間加熱攪拌した。その後、9 0 ℃ に昇温して 2 0 分間加熱攪拌した。得られた色素樹脂粒子の分散液から、余剰の樹脂原料や蛍光色素等の不純物を除くため、純水による洗浄を行った。具体的には、遠心分離機「マイクロ冷却遠心機 3 7 4 0」（株式会社久保田製作所）にて 2 0 0 0 0 G で 1 5 分間、遠心分離し、上澄み除去後、超純水を加えて超音波照射して再分散した。遠心分離、上澄み除去および超純水への再分散による洗浄を 5 回繰り返した。最後に、上記のようにして調製された蛍光体集積ナノ粒子を遠心分離によって回収し、P B S に分散させた状態で保存した。得られたスルホローダミン集積メラミン樹脂粒子の S E M 観察を行ったところ、平均粒径 1 1 5 n m、変動係数は 1 3 % であった。

10

20

【0093】

[1-2] 蛍光体集積ナノ粒子（テトラメチルローダミン集積シリカ粒子）の作製

テトラメチルローダミン（インビトロジェン社製 T A M R A - S E）（励起波長 5 5 0 n m、発光波長 5 7 0 n m）6 . 6 m g と 3 - アミノプロピルトリメトキシシラン（信越化学工業株式会社製、K B M 9 0 3）3 μ L を D M F 中で混合、オルガノアルコキシシラン化合物を得た。得られたオルガノアルコキシシラン化合物 0 . 6 m l を 4 8 m l のエタノール、0 . 6 m l の T E O S（テトラエトキシシラン）、2 m l の水、2 m l の 2 8 % アンモニア水と 3 時間混合した。上記工程で作製した混合液を 1 0 0 0 0 G で 2 0 分遠心分離を行い、上澄みを除去した。エタノールを加え、沈降物を分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順でエタノールと純水による洗浄を 2 回ずつ行った。得られたテトラメチルローダミン集積シリカナノ粒子の S E M 観察を行ったところ、平均粒径 1 0 4 n m、変動係数は 1 2 % であった。

30

【0094】

[2-1] 模擬プレパラートの作製

[プレパレート A 1]

(1) [1-1] で作成した蛍光体集積ナノ粒子（スルホローダミン集積メラミン樹脂粒子 屈折率 (n 1) = 1 . 4 8) を 0 . 0 1 n M の濃度で含む P B S 分散液を調製した。A P S（アミノシラン）コートガラス（松浪硝子工業株式会社）に当該 P B S 分散液を 8 0 μ L 載せて、6 0 分間放置した。

40

【0095】

(2) 上記 (1) のスライドを P B S で洗浄した (5 分 × 3 回)。ヘマトキシリン染色用試薬を載せて 1 0 分間放置した。このスライドを水で洗浄した (1 0 分) 後、エタノール、脱水エタノール × 3、およびキシレン × 2 で順次処理した。

【0096】

(3) 封入剤「エンテラン（登録商標）ニュー 屈折率 (n 2) = 1 . 4 9」（メルク株式会社）をピペットマンで 2 5 μ L 滴下した。

【0097】

(4) 珪酸ガラスからなるカバーガラス (2 4 m m × 2 4 m m) (屈折率 (n 3) = 1 . 5 1) を上記 (3) の滴下した封入剤の上にそっと載せた後、ピンセットで強く押し

50

つけた。

【0098】

(5) 封入剤が乾燥するまで放置して、プレパレートA1を完成させた。同一の手順でさらに2枚、合計3枚、プレパレートA1を作製した。

上記n1～n3の値は、下記式(1)および式(2)を満たすものである。

$$|n1 - n2| = 0.20 \quad \dots \text{式(1)}$$

$$|n2 - n3| = 0.15 \quad \dots \text{式(2)}$$

【0099】

[プレパレートA2]

上記(3)において、封入剤の滴下量を50μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートA2を作製した。

10

【0100】

[プレパレートA3]

上記(3)において、封入剤の滴下量を75μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートA3を作製した。

【0101】

[プレパレートA4]

上記(3)において、封入剤の滴下量を100μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートA4を作製した。

【0102】

[プレパレートA5]

上記(3)において、封入剤の滴下量を150μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートA5を作製した。

20

【0103】

[プレパレートA6]

上記(3)において、封入剤の滴下量を200μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートA6を作製した。

【0104】

[プレパレートB1]

上記(4)において、カバーガラスを滴下した封入剤の上にそっと載せただけで、ピンセットで強く押しつけなかったこと以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートB1を作製した。

30

【0105】

[プレパレートB2]

上記(4)において、カバーガラスを滴下した封入剤の上にそっと載せただけで、ピンセットで強く押しつけなかったこと、および上記(3)において、封入剤の滴下量を50μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートB2を作製した。

【0106】

[プレパレートB3]

上記(4)において、カバーガラスを滴下した封入剤の上にそっと載せただけで、ピンセットで強く押しつけなかったこと、および上記(3)において、封入剤の滴下量を75μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートB3を作製した。

40

【0107】

[プレパレートB4]

上記(4)において、カバーガラスを滴下した封入剤の上にそっと載せただけで、ピンセットで強く押しつけなかったこと、および上記(3)において、封入剤の滴下量を100μLに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートB4を作製した。

50

【 0 1 0 8 】

[プレパレート B 5]

上記(4)において、カバーガラスを滴下した封入剤の上にそっと載せただけで、ピンセットで強く押しつけなかったこと、および上記(3)において、封入剤の滴下量を150 μ Lに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートB5を作製した。

【 0 1 0 9 】

[プレパレート B 6]

上記(4)において、カバーガラスを滴下した封入剤の上にそっと載せただけで、ピンセットで強く押しつけなかったこと、および上記(3)において、封入剤の滴下量を200 μ Lに変更した以外はプレパレートA1と同様の手順で、合計3枚のプレパレートB6を作製した。

10

【 0 1 1 0 】

[3 - 1] 充填層の厚さ、保護層の厚さおよび蛍光輝度の測定

上記のようにして作製した、それぞれ3枚ずつのプレパレートA1～A6およびB1～B6について、下記の手順で、充填層(封入剤からなる層)の厚さ、保護層の厚さおよび蛍光輝度を測定した。

【 0 1 1 1 】

[3 - 1 - 1] 充填層(封入剤からなる層)の厚さと保護層の厚さの測定

作成したサンプルの充填層の厚さおよび保護層の厚さはレーザー変位計「LT-9000」(株式会社キーエンス製)を用いて測定した。測定はカバーガラスの中心、対角線上を4点ずつ、ならびにカバーガラスの中心を通る垂直および水平方向の線上を4点ずつ、の計17点について行った。これら17点における充填層の厚さと保護層の厚さの和の平均値を、各サンプル(プレパレート)の充填層の厚さと保護層の厚さの和($m_2 + m_3$)の面内平均値(図2の左列のグラフの縦軸)とした。

20

【 0 1 1 2 】

[3 - 1 - 2] 蛍光の輝度の測定

作成したサンプルの輝度は蛍光顕微鏡を用いて測定した。正立顕微鏡「Axio Imager M2」(カールツァイス社製)を用い、対物レンズを40倍に設定し蛍光輝点画像の取得を行った。蛍光画像の取得にあたり、スルホローダミン集積メラミン樹脂粒子からなる蛍光体集積ナノ粒子に、波長580 nm、強度30 mWの励起光を照射して、当該蛍光体集積ナノ粒子から発せられる605 nmの波長を有する蛍光を結像し、上記顕微鏡に設置のカメラ(モノクロ)により顕微鏡画像(画像データ)を取得した。なお、上記カメラは画素サイズ6.4 μ m \times 6.4 μ m、縦画素数1040個、横画素数1388個(撮像領域8.9 mm \times 6.7 mm)を有している。測定点は、上述の封入剤からなる層の厚さと保護層の厚さの測定と同じ場所の17点を測定した。データの解析は、各測定点で得られた蛍光画像から蛍光強度を計算し、17点の平均値を得ることで、各サンプル(プレパレート)の蛍光輝度の面内平均値(図2に右列のグラフの縦軸)とした。各測定点で得られる蛍光強度は、撮影した画像内に点在する個々の蛍光体集積ナノ粒子の蛍光輝点の輝度信号値を読み取り、平均することにより得た。

30

40

【 0 1 1 3 】

[3 - 1 - 3] 結果

結果を図2に示す。カバーガラスに重みをかけたプレパレートA1～A6については、封入剤の添加量によらず、また同一条件で作製したサンプルの違いによらず、ほぼ均一の厚さの封入剤からなる層が形成されており(図2左上)、それによって蛍光の輝度もほぼ均一になっていることが分かる(図2右上)。一方、カバーガラスに重みをかけなかったプレパレートB1～B6については、封入剤の量が増えると厚さも増える傾向が見られ、均一にはなっておらず(図2左下)、蛍光の輝度も山形のカーブを描いていて均一にはなっておらず、しかも同一条件で作製したサンプル間であっても比較的大きなバラツキが生じることが分かる(図2右下)。

50

【 0 1 1 4 】

[2 - 2] 模擬プレパラートの作製

[プレパレート A 7]

前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 1 0 0 μ L に変更したこと以外はプレパレート A 1 と同様の手順で、プレパレート A 7 を 1 枚、作製した。

【 0 1 1 5 】

[プレパレート A 8]

前記 [2 - 1] の (1) において、前記 [1 - 2] で作成した蛍光体集積ナノ粒子 (テトラメチルローダミン集積シリカ粒子) を用い、また前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 1 0 0 μ L に変更し、それ以外はプレパレート A 1 と同様の手順で、プレパレート A 8 を 1 枚、作製した。

10

【 0 1 1 6 】

[プレパレート B 7]

前記 [2 - 1] の (1) において、量子ドット「CdSe/ZnS 610」(シグマアルドリッチ社製、粒径 5 . 2 nm) を用い、また前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 1 0 0 μ L に変更し、それ以外はプレパレート A 1 と同様の手順で、プレパレート B 7 を 1 枚、作製した。

【 0 1 1 7 】

[プレパレート B 8]

前記 [2 - 1] の (3) において、前記 [1 - 2] で作成した蛍光体集積ナノ粒子 (テトラメチルローダミン集積シリカ粒子) を用い、封入剤として紫外線硬化型含フッ素系樹脂「ディフェンサOP - 3801」(DIC 株式会社、未硬化) を用い、また前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 1 0 0 μ L に変更し、それ以外はプレパレート A 1 と同様の手順で、プレパレート B 8 を 1 枚、作製した。

20

【 0 1 1 8 】

[プレパレート B 9]

前記 [2 - 1] の (3) において、前記 [1 - 2] で作成した蛍光体集積ナノ粒子 (テトラメチルローダミン集積シリカ粒子) を用い、封入剤として - プロモナフタレン - 2 - アクリル酸メチル (未硬化) を用い、また前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 1 0 0 μ L に変更し、それ以外はプレパレート A 1 と同様の手順で、プレパレート B 9 を 1 枚、作製した。

30

【 0 1 1 9 】

[3 - 2] 面内の蛍光の輝度の測定

プレパレート A 7 ~ A 8 および B 7 ~ B 9 について、輝度を測定し、面内における輝度の変動係数を算出した。

【 0 1 2 0 】

[3 - 2 - 1] 蛍光の輝度の測定

前記 [3 - 1 - 2] と同様の手順で、面内の 1 7 点における蛍光輝度を測定し、その変動係数を算出した。なお、テトラメチルローダミン集積シリカ粒子からなる蛍光体集積ナノ粒子を用いる測定 (プレパレート A 8、B 8 および B 9) においては、波長 5 5 0 nm、強度 3 0 mW の励起光を照射して、蛍光体集積ナノ粒子から発せられる 5 7 0 nm の波長を有する蛍光を結像するようにした。また、量子ドットを用いる測定 (プレパレート B 7) においては、波長 4 9 0 nm、強度 3 0 mW の励起光を照射して、量子ドットから発せられる 6 1 0 nm の波長を有する蛍光を結像するようにした。

40

【 0 1 2 1 】

[3 - 2 - 2] 結果

結果を表 1 に示す。屈折率差が式 (1) および (2) の両方を満たしているプレパレート A 7 および A 8 については、面内における蛍光輝度の変動係数が比較的低い値であり、バラツキが抑制されていることが分かる。一方、屈折率差が式 (1) または (2) を満たさないプレパレート B 7 ~ B 9 については、面内における蛍光輝度の変動係数が比較的高

50

い値であり、同一面内であってもバラツキが生じやすいことが分かる。

【 0 1 2 2 】

【表 1】

プレパラート	屈折率			屈折率差 n1-n2 ≤0.20…式(1) n2-n3 ≤0.15…式(2)		面内の蛍光輝度 の変動係数
	蛍光粒子 n1	充填層 n2	保護層 n3	n1-n2	n2-n3	
A7	メラミン樹脂粒子 1.48	エンテランニュー 1.49	カバーガラス 1.51	0.01	0.02	13%
A8	シリカ粒子 1.49	エンテランニュー 1.49	カバーガラス 1.51	0.00	0.02	15%
B7	量子ドット 3.8	エンテランニュー 1.49	カバーガラス 1.51	2.31	0.02	23%
B8	シリカ粒子 1.49	ディフェンサOP 1.35	カバーガラス 1.51	0.14	0.16	25%
B9	シリカ粒子 1.49	エンテランニュー 1.49	α-プロモナフ タレン-2-アクリル酸メチル 1.66	0.00	0.17	21%

10

【 0 1 2 3 】

[2 - 3] 模擬プレパラートの作製

[プレパラート A 9]

前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 1 0 0 μ L に変更したこと以外はプレパラート A 1 と同様の手順で、プレパラート A 9 を 1 枚、作製した。

【 0 1 2 4 】

[プレパラート A 1 0]

前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 3 0 0 μ L に変更したこと以外はプレパラート A 1 と同様の手順で、プレパラート A 1 0 を 1 枚、作製した。

【 0 1 2 5 】

[プレパラート A 1 1]

前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 1 0 μ L に変更したこと以外はプレパラート A 1 と同様の手順で、プレパラート A 1 1 を 1 枚、作製した。

30

【 0 1 2 6 】

[プレパラート A 1 2]

前記 [2 - 1] の (3) において、封入剤の滴下量を 8 0 0 μ L に変更したこと以外はプレパラート A 1 と同様の手順で、プレパラート A 1 2 を 1 枚、作製した。

【 0 1 2 7 】

[3 - 3] 面内の蛍光の輝度の測定

プレパラート A 9 ~ A 1 2 について、下記の手順で、充填層 (封入剤からなる層) の厚さと蛍光の輝度を測定し、面内における、充填層の厚さと保護層の厚さの和の変動係数と輝度の変動係数を算出した。なお、保護層の厚さは、カバーガラス製品の規定値である 1 5 0 μ m とみなした。

40

【 0 1 2 8 】

[3 - 3 - 1] 充填層の厚さの測定

前記 [3 - 1 - 1] と同様の手順で、面内の 1 7 点における充填層の厚さを測定し、その面内平均値を算出した。一方、保護層の厚さについては、上記の通り既定値である 1 5 0 μ m を各地点の測定値および面内平均値とみなした。さらにこれらの値から、充填層の厚さと保護層の厚さの和の面内変動係数を算出した。

【 0 1 2 9 】

[3 - 3 - 2] 蛍光輝度の測定

前記 [3 - 1 - 2] と同様の手順で、面内の 1 7 点における蛍光輝度を測定し、その変

50

動係数を算出した。

【 0 1 3 0 】

[3 - 3 - 3] 結果

結果を表 2 に示す。充填層および保護層の厚さが式 (4) および (5) の条件を満たしているプレパラート A 9 および A 1 0 については、面内における蛍光輝度の変動係数が比較的低い値であり、バラツキが抑制されていることが分かる。一方、充填層および保護層の厚さが式 (4) または (5) を満たさないプレパラート A 1 1 および A 1 2 については、面内における蛍光輝度の変動係数は比較的低いながらも、プレパラート A 9 および A 1 0 と比べればやや高い値となっている。

【 0 1 3 1 】

【表 2】

プレパラート	厚さ			面内の蛍光輝度 の変動係数
	充填層の面内平均値 M(m2) [μm] 10μm ≤ M(m2) ≤ 50μm …式(4)	保護層の面内平均値 M(m3) [μm] 100μm ≤ M(m3) ≤ 200μm …式(5)	面内変動係数 CV(m2+n3) CV(m2+m3) ≤ 20% …式(3)	
A9	20	150	7%	13%
A10	30	150	8%	15%
A11	4	150	14%	18%
A12	70	150	15%	19%

【 0 1 3 2 】

以上の実験は模擬的なものであり、組織切片を蛍光染色したものではないが、上記の結果からは、蛍光体集積ナノ粒子を用いた免疫染色によって組織切片上の目的生体物質を実際に蛍光標識した場合であっても、本発明の作用効果が奏される、すなわち蛍光シグナルを高感度かつ安定的に取得することができることは明らかである。

【符号の説明】

【 0 1 3 3 】

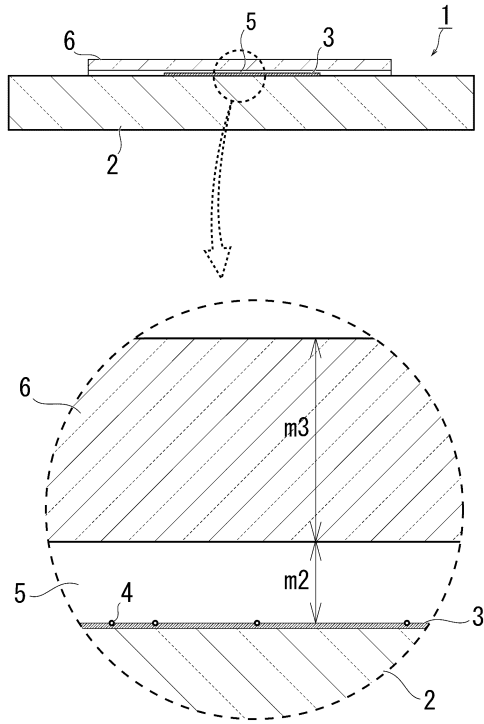
- 1 : 病理標本
- 2 : スライドガラス
- 3 : 組織切片 (厚さ : m 1)
- 4 : 蛍光粒子 (屈折率 : n 1)
- 5 : 充填層 (屈折率 : n 2 、 厚さ : m 2)
- 6 : 保護層 (屈折率 : n 3 、 厚さ : m 3)

10

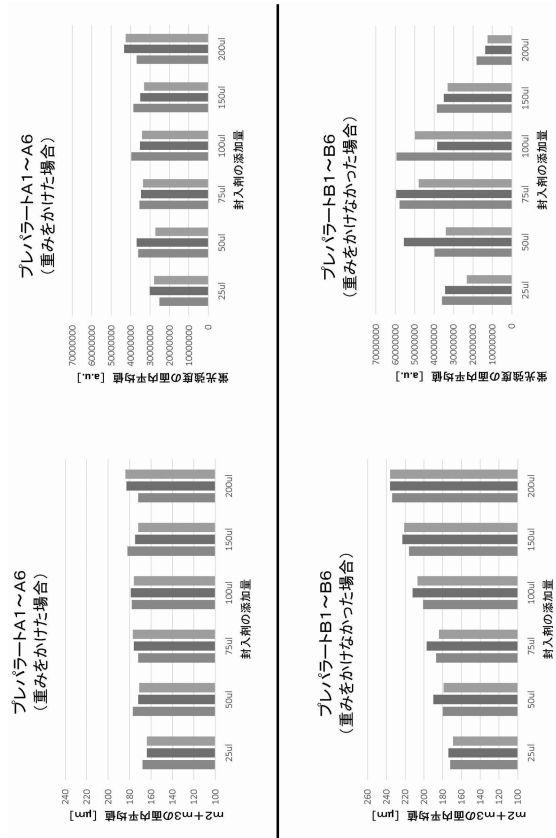
20

30

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(出願人による申告)平成26年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構「がん超早期診断・治療機器の総合研究開発/超早期高精度診断システムの研究開発:病理画像等認識技術の研究開発/病理画像等認識基礎技術の研究開発(1粒子蛍光ナノイメージングによる超高精度がん組織診断技術)」委託研究 産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

早期審査対象出願

(56)参考文献 特開2015-59806(JP,A)
国際公開第2014/136776(WO,A1)
実開平7-6747(JP,U)
特表2012-532846(JP,A)
特開2012-205572(JP,A)
国際公開第2009/86487(WO,A2)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/48-33/98
G01N 1/30

专利名称(译)	获取病理标本荧光图像的方法		
公开(公告)号	JP6451845B2	公开(公告)日	2019-01-16
申请号	JP2017524794	申请日	2016-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	渡辺泰宏		
发明人	渡辺 泰宏		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/48 G01N21/64 G01N1/30		
CPC分类号	G01N1/28 G01N1/30 G01N21/64 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/533 G01N21/6428 G01N33/587 G01N2001/302 G01N2021/6439 G01N2458/00		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/48.R G01N33/48.P G01N21/64.F G01N1/30		
优先权	2015120955 2015-06-16 JP		
其他公开文献	JPWO2016203952A5 JPWO2016203952A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

[问题]提供一种能够增强从病理标本的荧光颗粒发射的荧光信号的灵敏度和稳定性并提高从荧光图像检索信息的准确性的手段。[解决问题的手段]基于免疫染色法或FISH法，在暗场中观察到的用荧光粒子荧光标记目标生物物质的处理（免疫染色/FISH染色处理）的组织切片，并涂布组织切片病理标本包括填充床和覆盖填充床的保护层，其中荧光颗粒，填充层和保护层的折射率（测量波长= 589nm，测量温度= 20°C）的病理学样本满足以下条件（1）和（2） $|n1 - n2| \leq 0.20$ （1） $|n2 - n3| \leq 0.15$ （2） $n1$ ：荧光颗粒的折射率 $n2$ ：填充层的折射率 $n3$ ：保护层的折射率

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6451845号 (P6451845)
(45) 発行日 平成31年1月16日 (2019. 1. 16)	(24) 登録日 平成30年12月21日 (2018. 12. 21)	
(51) Int. Cl.	F I	
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 33/53	Y
G O 1 N 33/48 (2006. 01)	G O 1 N 33/48	R
G O 1 N 21/64 (2006. 01)	G O 1 N 33/48	P
G O 1 N 1/30 (2006. 01)	G O 1 N 21/64	F
	G O 1 N 1/30	
請求項の数 9 (全 25 頁)		
(21) 出願番号 特願2017-524794 (P2017-524794)	(73) 特許権者 000001270 コニカミノルタ株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号	
(86) (22) 出願日 平成28年6月1日 (2016. 6. 1)		
(86) 国際出願番号 PCT/JP2016/066197	(74) 代理人 110001070 特許業務法人 S S I N P A T	
(87) 国際公開番号 W02016/203952	(72) 発明者 渡辺 泰宏 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	
(87) 国際公開日 平成28年12月22日 (2016. 12. 22)		
審査請求日 平成30年9月27日 (2018. 9. 27)	審査官 赤坂 祐樹	
(31) 優先権主張番号 特願2015-120955 (P2015-120955)		
(32) 優先日 平成27年6月16日 (2015. 6. 16)		
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 病理標本の蛍光画像の取得方法		