

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6194882号
(P6194882)

(45) 発行日 平成29年9月13日(2017.9.13)

(24) 登録日 平成29年8月25日(2017.8.25)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 0 1 J
GO 1 N 33/533 (2006.01) GO 1 N 33/533
 GO 1 N 33/543 5 7 5

請求項の数 3 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2014-507869 (P2014-507869)	(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25年3月25日(2013.3.25)	(74) 代理人	110001070 特許業務法人SSINPAT
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/058607	(72) 発明者	星野 秀樹 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) 国際公開番号	W02013/146694	(72) 発明者	郷田 秀樹 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25年10月3日(2013.10.3)	(72) 発明者	高梨 健作 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
審査請求日	平成28年3月7日(2016.3.7)		
(31) 優先権主張番号	特願2012-74216 (P2012-74216)		
(32) 優先日	平成24年3月28日(2012.3.28)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生体物質の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

特定の生体物質を検出する方法であって、
上記生体物質が、組織切片を構成するものであり、
上記方法が、発色剤として、特定の生体物質を特異的に認識する生体物質認識分子が表面に結合した蛍光体内包ナノ粒子を使用する蛍光染色を含み、
上記蛍光染色において、
 該蛍光体内包ナノ粒子が特定の生体物質以外の生体物質に非特異的に吸着するのを防止するためのブロック剤が、蛍光体を内包しないナノ粒子であり、
上記蛍光体内包ナノ粒子および上記蛍光体を内包しないナノ粒子の粒子表面の少なくとも一部が、それぞれ、生体物質に吸着しづらい同じ有機分子で被覆されており、
前記有機分子が、ポリエチレングリコール、ポリメチルメタクリレート、またはポリビニルアルコール(PVA)である、

検出方法。

【請求項2】

上記蛍光体内包ナノ粒子の母体と、上記の蛍光体を内包しないナノ粒子の母体とが、同じ組成を有する、請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】

上記蛍光体内包ナノ粒子の平均粒径と、上記蛍光体を内包しないナノ粒子の平均粒径との差が、25%以内である、請求項1または2に記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体物質の検出方法に関する。さらに詳細には、本発明は、蛍光体内包ナノ粒子と蛍光体を内包しないナノ粒子とを併用する生体物質の検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

がんは、心筋梗塞や脳梗塞に代表される血管系疾患とともに、成人の死亡原因を二分する疾患である。例えば、乳がん罹患率は、日本人では欧米諸国に比べて低いが、近年では増加傾向にあり、1998年には胃がんの罹患率を抜いて女性罹患率の第1位となった。最近の報告である2005年の厚生労働省統計によれば、乳がんの年間罹患数は5万人を超えている。世界でも同様にその数は年々増加しており、2008年のWHOの報告によれば、乳がんは男女合わせても第1位の罹患率となっており、その年間罹患数は138万人を超え、女性のがん全体の約23%を占めている。

【0003】

がんの診断にはX線CTやMRI等の画像診断のほか、特定のがんに特異的に発現するがんマーカーや、血液、組織中に漏出するがんマーカー等を検出する方法も汎用されている。乳がんの一般的なスクリーニング検査としては、問診、触診、軟X線乳房撮影（マンモグラフィ）、超音波検査等が実施され臨床的に疑いが生じると、細胞診や生検が実施され病理学的診断によりがんかどうか判別される。がん治療や予後の経過を判定するために、病理学診断は重要であり、この診断の中心となるのは「形態観察を行うためのHE〔ヘマトキシリン・エオジン〕染色法」と「がんマーカー因子に対する抗体を用いた免疫組織化学法」である。特に近年の抗体医薬の登場により、免疫組織化学の重要性は著しく高まっている。例えば、がんの増殖に関与する因子であるヒト上皮成長因子受容体2〔human epidermal growth factor receptor-2; HER2〕を標的とした抗体医薬であるハーセプチン〔Herceptin; 登録商標〕として市販されているトラスツズマブ〔Trastuzumab〕は、乳がんの代表的な抗がん剤であることが知られている。この薬剤投与の有効性の判定方法として、HER2タンパク質等の発現を解析する免疫組織化学〔Immunohistochemistry; IHC〕法と、HER2遺伝子等の増幅を解析するFISH〔Fluorescence in situ hybridization〕法とが臨床の場で広く用いられている。IHC法により、HER2抗原部位に結合したHER2抗体をDAB〔Diaminobenzidine; ジアミノベンジジン〕を用いて染色し、可視化することでHER2の発現量を検出することができる。しかし、その判定基準は染色レベルをスコア0~3とした四段階のみによる大雑把な判定基準であるため、定量性に欠けており、さらに病理医の熟練度により判定基準が左右されることから、臨床的に問題となっている。他方、FISH法は、HER2遺伝子を検出するプローブと、17番染色体セントロメアを検出するプローブを用いて行われ、このFISH法により解析された17番染色体1本あたりのHER2の遺伝子コピー数を基に、HER2遺伝子の増幅の有無を判定することができる。FISH法は定量的検査法ではあるが、HER2タンパク質量やHER2の細胞内局在を直接評価する方法ではない。かかる事情から、高精度な抗体を成分として含む医薬品の有効性を判定する方法の開発が必要とされている。

【0004】

このような状況から蛍光色素や半導体ナノ粒子等の蛍光体を抗体に結合し標的分子の有無を判断する方法も為されてきた。蛍光染色はDAB染色と比べて定量性に優れるという特徴がある（非特許文献1）。しかしながら、一般的な蛍光色素や半導体ナノ粒子は蛍光量が少ないため、自家蛍光をきちんと分離除去しないと、蛍光による標的分子の判断ができず、形態情報は依然として、別切片でのHE染色が必要であった。

【0005】

このような理由から、蛍光色素や半導体ナノ粒子を包含させて一標識体当たりの蛍光量を多くする方法が考えられた。例えば、特許文献1には、逆ミセル法と、ガラスの前駆体として分子の末端に半導体ナノ粒子への吸着性が良い有機官能基を有する有機アルコキシ

10

20

30

40

50

シランとアルコキシドの混合物を用いたゾル-ゲル法とを組み合わせることにより、半導体ナノ粒子を内部に分散固定したガラス蛍光体ナノ粒子が開示されている。しかしながら、このような手段では蛍光量が多くなり、標的分子の判断が可能になるものの、わずかな非特異的な結合があってもバックグラウンドノイズが高くなる原因となるため、高感度に定量検出する為の大きな課題となっていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2005-281019号公報

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】「病理と臨床 Vol.25 2007年臨時増刊号 診断に役立つ免疫組織化学」,2007年3月12日発行,文光堂

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、上記課題に鑑みてなされたものであり、高輝度の蛍光標識材料を用いてもバックグラウンドノイズが高くならず、S/N比が向上した定量性の高い免疫組織染色法に好適な検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者等は、上記目的を達成すべく鋭意検討した結果、発色剤として蛍光体内包ナノ粒子を使用する免疫組織染色法において、通常ブロッキング剤として使用するウシ血清アルブミン〔BSA〕より、蛍光体を内包しないナノ粒子の方が、ブロッキング能が有意に優れることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0010】

すなわち、上述した目的の少なくとも1つを実現するために、本発明の一側面を反映した検出方法は、

特定の生体物質を特異的に認識する生体物質認識分子がその粒子表面に結合した蛍光体内包ナノ粒子を発色剤として使用する、特定の生体物質を検出する方法であって、該蛍光体内包ナノ粒子が特定の生体物質以外の生体物質に非特異的に吸着するのを防止するためのブロッキング剤として、蛍光体を内包しないナノ粒子を使用することを含む。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、特定の生体物質の検出において、高輝度の蛍光体内包ナノ粒子を発色剤として、蛍光体を内包しないナノ粒子をブロッキング剤として使用することによって、S/N比の向上した組織染色画像が観察でき、病理医の診断精度の向上を図ることができる。

【0012】

なお、本発明において蛍光体を内包しないナノ粒子がブロッキング剤として好ましく機能することの理由としては、例えば、従来のBSA等のタンパク質のブロッキング剤が抗原抗体反応に関する非特異的吸着を防止するためのものである（従って蛍光体内包ナノ粒子に結合された抗体等の非特異的吸着は防止できる）のに対し、本発明では上記のブロッキング剤によって、ナノ粒子を構成する母体の組成、ナノ粒子の表面を被覆する有機分子、ナノ粒子のサイズ等に依存して起きる非特異的吸着を防止することができるためであると考えられる。

【発明を実施するための形態】

【0013】

以下、本発明に係る特定の生体物質を検出する方法について詳細に説明する。

本発明は、特定の生体物質を特異的に認識する生体物質認識分子がその粒子表面に結合

10

20

30

40

50

した蛍光体内包ナノ粒子を発色剤として使用する、特定の生体物質を検出する方法であって、該蛍光体内包ナノ粒子が特定の生体物質以外の生体物質に非特異的に吸着するのを防止するためのブロッキング剤として、蛍光体を内包しないナノ粒子を使用する。

【0014】

< 特定の生体物質を検出する方法 >

本発明に係る特定の生体物質を検出する方法として、具体的には、従来公知であるイムノクロマト法、イムノアッセイ、ウエスタンブロットング法、ノーザンブロットング法、サザンブロットング法、DNAアレイ（またはDNAマイクロアレイもしくはDNAチップ）を使用するハイブリダイゼーション法、免疫組織化学法、免疫細胞化学法などを例示できる。これらのうち、組織切片を蛍光染色する方法が好ましく、特に免疫組織化学法が好ましい。

10

【0015】

< 蛍光体 >

本発明で用いられる蛍光体としては、蛍光有機色素および半導体ナノ粒子を包含する蛍光物質を挙げることができる。200~700nmの波長範囲である紫外~近赤外光により励起されたときに、400~900nmの波長範囲である可視~近赤外光の発光を示す蛍光体が好ましい。

【0016】

（有機蛍光色素）

有機蛍光色素としては、フルオレセイン系色素分子、ローダミン系色素分子、Alexa Fluor（インビトロジェン社製）系色素分子、BODIPY（インビトロジェン社製）系色素分子、カスケード系色素分子、クマリン系色素分子、エオジン系色素分子、NBD系色素分子、ピレン系色素分子、Texas Red系色素分子、シアニン系色素分子等を挙げることができる。

20

【0017】

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、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、および、Alexa Fluor 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、BODIPY FL、BODIPY TMR、BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665（以上インビトロジェン社製）、メトキシクマリン、エオジン、NBD、ピレン、Cy5、Cy5.5、Cy7等を挙げることができる。一種単独でも二種以上を併用してもよい。

30

40

【0018】

（半導体ナノ粒子）

本発明に用いる半導体ナノ粒子とは、コア/シェル構造を有するものであり、後述する半導体を形成する材料（素材）を含有するナノサイズ（1~1,000nm）の粒径を有する粒子であって、コア部（芯部）とそれを被覆するシェル部（被覆部）で構成される多重構造を有する粒子をいう。II-VI族化合物、III-V族化合物またはIV族元素を成分として含有する半導体ナノ粒子（それぞれ「II-VI族半導体ナノ粒子」「III-V族半導体ナノ粒子」「IV族半導体ナノ粒子」ともいう。）のいずれかを用いることができ、一種単独でも

50

二種以上併用してもよい。

【0019】

コア部（「コア粒子」ともいう。）を形成するための素材としては、例えば、ケイ素〔Si〕、ゲルマニウム〔Ge〕、窒化インジウム〔InN〕、リン化インジウム〔InP〕、ヒ素化ガリウム〔GaAs〕、セレン化アルミニウム〔AlSe〕、セレン化カドミウム〔CdSe〕、ヒ素化アルミニウム〔AlAs〕、リン化ガリウム〔GaP〕、テルル化亜鉛〔ZnTe〕、テルル化カドミウム〔CdTe〕、ヒ素化インジウム〔InAs〕、インジウム - ガリウム - リン〔InGaP〕などの半導体またはこれらを形成する原料を用いることができる。本発明においては、特に、InP、CdTeまたはCdSeがより好ましく用いられる。

10

【0020】

シェル部を形成するための素材としては、II - VI族、III - V族、IV族の無機半導体を用いることができる。例えば、Si、Ge、InN、InP、GaAs、AlSe、CdSe、AlAs、GaP、ZnTe、CdTe、InAsなどの各コア部形成無機材料よりバンドギャップが大きく、毒性を有さない半導体またはこれらを形成する原料が好ましい。より好ましくは、InP、CdTeまたはCdSeのコア部に対してZnSをシェル部として適用される。

【0021】

以下、本明細書において、半導体ナノ粒子の表記法として、例えば、コア部がCdSeであり、シェル部がZnSである場合、「CdSe/ZnS」と表記することがある。

20

半導体ナノ粒子としては、例えば、CdSe/ZnS、CdS/ZnS、InP/ZnS、InGaP/ZnS、Si/SiO₂、Si/ZnS、Ge/GeO₂、Ge/ZnSなどが挙げられるが、本発明はこれらに限定されない。

【0022】

半導体ナノ粒子は、必要に応じて、有機ポリマーなどにより表面処理が施されているものを用いてもよい。このような半導体ナノ粒子としては、例えば、表面カルボキシ基を有するCdSe/ZnS（インビトロジェン社製）や表面アミノ基を有するCdSe/ZnS（インビトロジェン社製）などが挙げられる。

【0023】

< 蛍光体内包ナノ粒子・蛍光体を内包しないナノ粒子 >

30

本発明で用いる蛍光体内包ナノ粒子とは、蛍光体がナノ粒子の内部に分散されたものを言い、ナノ粒子を構成する材料（本発明において「母体」と称することがある。）と蛍光体とは、化学的に結合していても、していなくてもよい。一方、本発明でブロッキング剤として用いる蛍光体を内包しないナノ粒子とは、蛍光体をナノ粒子の内部に含まないナノ粒子、典型的には上記のような母体のみからなるナノ粒子を言う。

【0024】

ナノ粒子を構成する材料は特に限定されるものではなく、例えば、シリカ、メラミン、ポリスチレン、ポリ乳酸などが挙げられ、一種単独で用いても二種以上を併用してもよい。なお、本明細書において、例えば、母体がシリカからなる場合のナノ粒子を、単に「シリカナノ粒子」と称することがある。

40

【0025】

蛍光体内包ナノ粒子がその母体の組成によって非特異吸着を起こす可能性のある部位を、蛍光体を内包しないナノ粒子を用いてブロッキングするという作用効果を考慮すると、蛍光体内包ナノ粒子の母体と、蛍光体を内包しないナノ粒子の母体とは、組成が同じである（同じ原料を用いて合成される）ことが好ましいが、同等のブロッキング能、あるいはより高いブロッキング能が得られる場合は、それらの母体の組成は同じである必要はない。また、異なる複数の組成を用いても何ら問題はなく、さらにはBSAなどの従来使用されているブロッキング剤と併用しても構わない。

【0026】

本発明で用いる蛍光体内包ナノ粒子は、公知の方法により作製することができる。有機

50

蛍光色素を内包したシリカナノ粒子は、例えば、ラングミュア,8巻,2921頁(1992年)に記載されているF I T C内包シリカナノ粒子の合成を参考にして作製することができる。F I T Cの代わりに所望の有機蛍光色素を用いることによって、種々の有機蛍光色素内包シリカナノ粒子を合成できる。

【 0 0 2 7 】

半導体ナノ粒子を内包したシリカナノ粒子は、ニュー・ジャーナル・オブ・ケミストリー,33巻,561頁(2009年)に記載されているC d T e内包シリカナノ粒子の合成を参考にして作製することができる。

【 0 0 2 8 】

有機蛍光色素を内包したメラミンナノ粒子は、例えば、公開特許公報昭62-68811(1987年)に記載されている蛍光増白剤を用いたメラミンナノ粒子の合成を参考にして作製することができる。蛍光増白剤の代わりに所望の有機蛍光色素を用いることによって、種々の有機蛍光色素内包メラミンナノ粒子を合成することができる。

10

【 0 0 2 9 】

有機蛍光色素を内包したポリスチレンナノ粒子は、例えば、米国特許第4326008号(1982年)に記載されている重合性官能基を有する有機色素を用いた共重合法や、米国特許第5326692号(1992年)に記載されているポリスチレンナノ粒子への有機蛍光色素の含浸法などを用いて作製することができる。

【 0 0 3 0 】

また、半導体ナノ粒子を内包したポリマーナノ粒子は、例えば、ネイチャー バイオテクノロジー,19巻,631頁(2001年)に記載のポリスチレンナノ粒子への半導体ナノ粒子の含浸法などを参考にして作製することができる。

20

【 0 0 3 1 】

このような含浸法において、溶剤中でポリスチレンナノ粒子を膨潤させて蛍光体を含浸させた後、水中で収縮させることを行うため、ポリスチレンナノ粒子内に一旦取り込まれた蛍光体は、他の水中(水溶液中)に分散させても、蛍光体はポリスチレンナノ粒子外に拡散することはほとんどない。

【 0 0 3 2 】

一方、蛍光体を内包しないナノ粒子の製造方法としては、例えば、上述した蛍光体内包ナノ粒子の製造方法において、蛍光体を使用しない(添加しない)以外は、蛍光体内包ナノ粒子の製造方法と同様の製造方法などが挙げられる。

30

【 0 0 3 3 】

蛍光体内包ナノ粒子と蛍光体を内包しないナノ粒子とで用いるナノ粒子において、それら粒子表面の少なくとも一部、望ましくは全部が、生体物質に吸着しづらい同じ有機分子で被覆されていることが好ましい。生体物質に吸着しづらい有機分子とは、少なくともそれぞれ自身が何らかの生体物質に特異的に結合する能力を有さず、非特異的にも結合しないか、吸着しづらい有機分子(好ましくは有機高分子)を言い、例えば、ポリエチレングリコール〔 P E G 〕、ポリメチルメタクリレート(P M M A)、ポリビニルアルコール(P V A)などが挙げられる。

【 0 0 3 4 】

蛍光体内包ナノ粒子がその表面を被覆する有機分子によって非特異吸着を起こす可能性がある部位を、蛍光体を内包しないナノ粒子を用いてブロッキングするという作用効果を考慮すると、蛍光体内包ナノ粒子を被覆する有機分子と蛍光体を内包しないナノ粒子を被覆する有機分子とは、同じである(同じ物質を用いて被覆処理をする)ことが好ましいが、同等のブロッキング能、あるいはより高いブロッキング能が得られる場合は、それらの有機分子は同じである必要はない。なお、後述するように、蛍光体内包ナノ粒子は粒子表面を修飾するこのような有機分子(例えば P E G)の一部に生体物質認識分子(例えば抗体)を結合させている場合もあるが、「生体物質認識分子が結合した有機分子」は、上記の記載における「生体物質に吸着しづらい有機分子」とは区別される存在である。

40

【 0 0 3 5 】

50

蛍光体内包ナノ粒子と蛍光体を内包しないナノ粒子とで用いるナノ粒子において、その平均粒径は特に限定されないが、約30～800nm程度である。また、粒径のばらつきを示す変動係数は特に限定されないが、20%程度以下が好ましい。

【0036】

なお、本発明において、ナノ粒子の平均粒径とは、走査型電子顕微鏡〔SEM〕を使用して電子顕微鏡写真を撮影し、1,000個のナノ粒子について断面積を計測し、その計測値を相当する円の面積としたときの直径を粒径として求め、その算術平均を平均粒径とした。変動係数も、1,000個の粒子の粒径分布から算出される値とした。

【0037】

蛍光体内包ナノ粒子がそのサイズによって非特異吸着を起こす可能性がある部位を、蛍光体を内包しないナノ粒子を用いてブロッキングするという作用効果を考慮すると、蛍光体内包ナノ粒子と蛍光体を内包しないナノ粒子とで用いるナノ粒子それぞれの平均粒径の差は、好ましくは25%以内、より好ましくは5%以内である。なお、当該平均粒径の差は、蛍光体内包ナノ粒子の平均粒径をX(nm)とし、蛍光体を内包しないナノ粒子の平均粒径をY(nm)とすると、 $|X - Y| / X \times 100(\%)$ の式から算出することができる。

【0038】

<生体物質認識分子・蛍光体内包ナノ粒子との結合>

本発明で用いる生体物質認識分子とは、標的とする特定の生体物質を認識し、該生体物質に特異的に結合および/または反応する分子を言う。

【0039】

本発明において標的となりうる生体物質としては、例えば、生体由来のヌクレオチド鎖、タンパク質、脂質、糖鎖などが挙げられる。従って、生体物質認識分子としては、それらの生体物質と特異的に結合および/または反応する分子、例えば、ヌクレオチド鎖（生体物質が相補的な塩基配列を有するヌクレオチド鎖等である場合）、抗体（生体物質が抗原となるタンパク質等である場合）、レクチン（同じく糖鎖等である場合）、等が挙げられる。より具体的には、細胞表面に存在するタンパク質であるHER2に特異的に結合する抗HER2抗体、細胞核に存在するエストロゲン受容体〔ER〕に特異的に結合する抗ER抗体、細胞骨格を形成するアクチンに特異的に結合する抗アクチン抗体などが挙げられる。なかでも抗HER2抗体および抗ER抗体は乳がんの投薬選定に用いることができるという観点から好ましい。

【0040】

生体物質認識分子と蛍光体内包ナノ粒子との結合の態様としては特に限定されず、共有結合、イオン結合、水素結合、配位結合、物理吸着、化学吸着などが挙げられる。結合の安定性から共有結合などの結合力の強い結合が好ましい。

【0041】

また、スペーサーとして、生体物質認識分子と蛍光体内包ナノ粒子との間を連結する有機分子があってもよい。例えば生体物質との非特異的な吸着を抑制するためポリエチレングリコール鎖を用いることができ、具体的には、ThermoScientific社製の「SM(PEG)12」などの市販品が例示できる。なお、生体物質認識分子と結合していないポリエチレングリコール〔PEG〕鎖それ自身は、上述したような「生体物質に吸着しづらい有機分子」としての機能も有する。

【0042】

蛍光体内包シリカナノ粒子に生体物質認識分子を結合させる際、蛍光体として有機蛍光色素を使用する場合であっても、半導体ナノ粒子を使用する場合であっても、同様の方法を適用することができる。例えば、無機物と有機物とを結合させるために広く用いられる化合物であるシランカップリング剤を使用することができる。このシランカップリング剤は、分子の一端に加水分解でシラノール基を与えるアルコキシシリル基を有し、他端に、カルボキシル基、アミノ基、エポキシ基、アルデヒド基などの官能基を有する化合物であり、上記シラノール基の酸素原子を介して無機物と結合する。具体的には、メルカプトブ

10

20

30

40

50

ロピルトリエトキシシラン、グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、アミノプロピルトリエトキシシラン、ポリエチレングリコール鎖を有するシランカップリング剤（例えば G e l e s t 社製「P E G - s i l a n e n o . S I M 6 4 9 2 . 7」）などが挙げられる。シランカップリング剤として、一種単独で用いても二種以上を併用してもよい。

【 0 0 4 3 】

蛍光体内包シリカナノ粒子とシランカップリング剤との反応手順は、公知のものを用いることができる。具体例として、得られた蛍光体内包シリカナノ粒子を純水中に分散させ、アミノプロピルトリエトキシシランを添加し、室温で12時間反応させる。反応終了後、遠心分離またはろ過により、表面がアミノプロピル基で修飾された蛍光体内包シリカナノ粒子を得ることができる。続いてアミノ基と抗体中のカルボキシル基とを反応させることで、アミド結合を介し抗体を蛍光体内包シリカナノ粒子と結合させることができる。必要に応じて、E D C [1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride] (P i e r c e 社製) のような縮合剤を用いることもできる。

10

【 0 0 4 4 】

必要により、有機分子修飾された蛍光体内包シリカナノ粒子に直接結合し得る部位と、生体物質認識分子に結合し得る部位とを有するリンカー化合物を用いることができる。具体例として、アミノ基に選択的に反応する部位とメルカプト基に選択的に反応する部位の両方を有する s u l f o - S M C C [Sulfosuccinimidyl 4[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate] (P i e r c e 社製) を用いると、アミノプロピルトリエトキシシランにより修飾された蛍光体内包シリカナノ粒子のアミノ基と、抗体中のメルカプト基とを結合させることで、抗体が結合した蛍光体内包シリカナノ粒子を作製できる。

20

【 0 0 4 5 】

蛍光体内包メラミンナノ粒子に生体物質認識分子を結合させる場合、蛍光体として有機蛍光色素を使用する場合であっても、半導体ナノ粒子を使用する場合であっても、同様の手順を適用することができる。例えば、メラミンナノ粒子上のアミノ基を介して E D C または s u l f o - S M C C を用いることで、抗体が結合した蛍光体内包メラミンナノ粒子を作製できる。

【 0 0 4 6 】

蛍光体内包ポリスチレンナノ粒子に生体物質認識分子を結合させる場合、蛍光体として有機蛍光色素を使用する場合であっても、半導体ナノ粒子を使用する場合であっても、同様の手順を適用することができる。例えば、上述の含浸法を用いてアミノ基などの官能基を有するポリスチレンナノ粒子中に有機蛍光色素または半導体ナノ粒子を含浸することにより、アミノ基などの官能基を有する蛍光体内包ポリスチレンナノ粒子を得ることができ、以降 E D C または s u l f o - S M C C を用いることで、抗体が結合した蛍光体内包ポリスチレンナノ粒子ができる。

30

【 0 0 4 7 】

< 検出方法の手順 >

本発明は、上述のとおり、特定の発色剤とブロック剤とを併用する検出方法であり、組織切片を蛍光染色する従来公知の方法に好適である。組織切片は生体物質から構成されるが、病理組織切片には限定されず、また、細胞染色にも適用することができる。

40

【 0 0 4 8 】

本発明に係る検出方法が適用可能な組織切片の作製方法は特に限定されず、公知の方法により作製されたものを使用することができる。

以下、本発明の検出方法に含まれる下記の工程を順に説明する。

【 0 0 4 9 】

(1) 脱パラフィン工程：

キシレンを入れた容器に、組織切片を浸漬させ、パラフィン除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3~30分間であることが好ましい。また必要により浸漬途中でキシレンを交換してもよい。

【 0 0 5 0 】

50

次いで、エタノールを入れた容器にこの切片を浸漬させ、キシレン除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3～30分間であることが好ましい。また必要により浸漬途中でエタノールを交換してもよい。

【0051】

次いで、水を入れた容器に、この切片を浸漬させ、エタノール除去する。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3～30分間であることが好ましい。また必要により浸漬途中で水を交換してもよい。

【0052】

(2) 賦活化処理工程：

公知の方法にならい、特定の生体物質の賦活化処理を行う。賦活化条件に特に定めはないが、賦活液としては、0.01Mのクエン酸緩衝液（pH6.0）、1mMのEDTA溶液（pH8.0）、5%の尿素、0.1Mのトリス塩酸緩衝液などを含有する溶液を用いることができる。加熱機器はオートクレーブ、マイクロウェーブ、圧力鍋、ウォーターバスなどを用いることができる。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。温度は50～130、時間は5～30分間で行うことができる。

10

【0053】

次いで、水とPBSを入れた容器に、賦活処理後の切片を浸漬させ、洗浄を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3～30分間であることが好ましい。また必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

【0054】

20

(3) 生体物質認識分子を結合した蛍光体内包ナノ粒子（発色剤）による染色工程：

この組織化学染色工程(3)において、まず、生体物質認識分子を結合した蛍光体内包ナノ粒子のリン酸緩衝液生理的食塩水〔PBS〕分散液を調整し、切片に乗せ、特定の生体物質との反応を行う。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。反応時間は、5分間～24時間であることが好ましい。特定の生体物質と生体物質認識分子との反応に適した環境を安定して維持するための溶媒として、上記ではPBSを例示したが、PBS以外に、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、MES緩衝液、クエン酸-リン酸緩衝液なども用いることができる。

【0055】

本発明においては、蛍光体内包ナノ粒子による染色を行う前に、ブロッキング剤を滴下する。ブロッキング剤として、蛍光特性を持たないナノ粒子、すなわち蛍光体を内包しないナノ粒子を使用する。好ましい態様としては、蛍光体包含ナノ粒子と当該蛍光特性を持たないナノ粒子の母体組成が同一である。より好ましくは、さらに双方の平均粒径の差が25%以下であり、特に好ましくは、さらに蛍光特性を持たないナノ粒子表面がポリエチレングリコールで覆われていることである。

30

【0056】

ブロッキング剤の使用量は特に限定されないが、一般的には発色剤の0.5～10倍量が好適である。本発明に係るブロッキング剤は、一種単独で用いてもよいし、BSAやスキムミルク等の公知のブロッキング剤と併用してもよい。

【0057】

40

次いで、PBSを入れた容器に染色後の切片を浸漬させ、未反応の蛍光体内包ナノ粒子の除去を行う。PBS溶液にはTween20等の界面活性剤を含有させてもよい。温度は特に限定されるものではないが、室温で行うことができる。浸漬時間は、3～30分間であることが好ましい。また必要により浸漬途中でPBSを交換してもよい。

【0058】

(4) 固定処理工程：

本発明において所要の固定処理工程は、上記の染色工程(3)により導入された標識化プローブ生体物質を、組織切片に固定化する工程である。

【0059】

本発明で用いられる固定処理溶液としては、例えば、ホルマリン、パラホルムアルデヒ

50

ド、グルタルアルデヒド、アセトン、エタノール、メタノール等の架橋剤、細胞膜透過物質などが挙げられる。

【0060】

本発明において、固定処理は、従来公知の手法により行うことができる。固定処理は、具体的には、このような固定処理溶液に、組織化学染色工程(3)により得られた染色組織切片を浸漬することにより行うことができる。例えば、稀パラホルムアルデヒド水溶液中に、組織化学染色工程(3)により得られた染色組織切片を数分から数時間程度浸漬することにより行うことができる。

【0061】

(5) 蛍光顕微鏡下の観察工程：

このようにして得られる切片に対し蛍光顕微鏡を用いて、特定の生体物質の発現レベルを輝点数または発光輝度を基に計測することができる。用いた蛍光体の吸収極大波長および蛍光波長に対応した励起光源および蛍光検出用光学フィルターは、当業者であれば適宜選択することができる。

【0062】

輝点数または発光輝度の計測は、画像解析ソフト、例えば公開解析ソフトであるImageJ、(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などを用いて行うことができる。

【実施例】

【0063】

以下、本発明について実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

< ブロッキング剤の製造 >

ブロッキング剤として「蛍光体を内包しないナノ粒子」を、以下のようにして数種類製造した。これらの粒子は、母体の組成・平均粒径・ポリエチレングリコール〔PEG〕で被覆されているか否かの点で種類が異なるものである。

【0064】

[製造例1] PEGで被覆されたポリスチレンナノ粒子

工程(1-1)：ポリスチレンナノ粒子(Micromod社製「micromer(登録商標)01-01-102」；平均粒径：100nm)1mgに対して、エチレンジアミン四酢酸〔EDTA〕を2mM含有したリン酸緩衝液生理的食塩水〔PBS〕を用いて3nMに調整した。

【0065】

工程(1-2)：工程(1-1)で調整した溶液に、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のsuccinimidyl-[(N-maleimidopropionamid)-dodecaethyleneglycol]ester)を混合し、3時間反応した。

【0066】

工程(1-3)：工程(1-2)の反応混合液を10,000×gで60分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。

工程(1-4)：工程(1-3)の沈殿物に、EDTAを2mM含有したPBSを加え、分散させて、再度遠心分離を行い、上澄みを除去するという洗浄を行った。同様の手順による洗浄を、さらに二回行った。その後、500μLのPBSで再分散させた。その結果、PEGで被覆された、蛍光体を内包しないポリスチレンナノ粒子が得られた。

【0067】

[製造例2] メラミンナノ粒子

工程(2-1)：メラミン15gと37%ホルマリン29gと28%アンモニア水溶液1.5gとを混合して、pH8に調整した。

【0068】

工程(2-2)：工程(2-1)の混合溶液を攪拌しながら70℃に昇温して30分間反応させて、初期縮合物を得た。

工程(2-3)：「ネオペレックスG-15」(花王(株)製)0.12mLを水22mL中に溶解して

10

20

30

40

50

、90 に昇温したサンプルを四本準備した。

【0069】

工程(2-4)：工程(2-2)で得られた初期縮合物1gを、工程(2-3)の各サンプルに投入した後、ドデシルベンゼンスルホン酸0.5mL、0.7mL、0.85mL、0.9mLをそれぞれに添加して、6時間攪拌した。

【0070】

工程(2-5)：工程(2-4)の各反応混合物を10,000×gで60分間遠心分離を行い、上澄みを除去した後、エタノールを加え、沈降物を分散させて、再度遠心分離を行った。同様の手順でエタノールによる洗浄と純水による洗浄をさらに一回ずつ行った。

【0071】

このようにして得られた、蛍光体を内包しないメラミンナノ粒子それぞれを走査型電子顕微鏡〔SEM〕（(株)日立製作所製S-800型）で観察したところ、平均粒径（変動係数）がそれぞれ72nm（10.5%）、83nm（11.3%）、91nm（9.5%）、98nm（9.3%）であった。

【0072】

〔製造例3〕PEGで被覆されたメラミンナノ粒子

製造例1において、ポリスチレンナノ粒子の代わりに、製造例2で得られた平均粒径が98nmのメラミンナノ粒子を用いた以外は、製造例1と同様にして、PEGで被覆されたメラミンナノ粒子を製造した。

【0073】

〔製造例4〕シリカナノ粒子

工程(4-1)：エタノール40mLと14%アンモニア水9.7mLとを混合した。

工程(4-2)：工程(4-1)の混合液を室温で攪拌しているところに、テトラエトキシシラン400μL（1.796mmol）を添加した。添加開始から7時間攪拌を行った。

【0074】

工程(4-3)：工程(4-2)の反応混合物を10,000×gで60分間遠心分離を行い、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による洗浄と純水による洗浄とをさらに一回ずつ行った。

【0075】

このようにして得られた、蛍光体を内包しないシリカナノ粒子について、SEM観察を行ったところ、平均粒径が69nm、変動係数は17%であった。

また、工程(4-1)において、14%アンモニア水の配合量を9.7mLから、それぞれ10mL、11.5mL、13mLに変更した以外は、工程(4-1)～(4-3)と同様にして、それぞれ平均粒径の異なる三種類のシリカナノ粒子を製造した。得られたシリカナノ粒子の平均粒径（変動係数）はそれぞれ、79nm（10%）、88nm（12.6%）、99nm（11.3%）であった。

【0076】

〔製造例5〕PEGで被覆されたシリカナノ粒子

工程(5-1)：製造例4で得られた平均粒径が99nmのシリカナノ粒子1mgを、純水5mLに分散させた。アミノプロピルトリエトキシシラン100μLを添加し、室温で12時間攪拌した。

【0077】

工程(5-2)：工程(5-1)の反応混合物を10,000×gで60分遠心分離を行い、上澄みを除去した。

工程(5-3)：工程(5-2)の沈殿物にエタノールを加えて、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による洗浄と純水による洗浄とをさらに一回ずつ行った。

【0078】

得られたアミノ基修飾シリカナノ粒子のFT-IR測定を行ったところ、アミノ基由来する吸収が観測でき、アミノ基により修飾されていることが確認された。

以下、製造例1において、ポリスチレンナノ粒子の代わりに、工程(5-3)で得られたアミノ基修飾シリカナノ粒子を用いた以外は、製造例1と同様にして、PEGで被覆された、

10

20

30

40

50

蛍光体を内包しないシリカナノ粒子を製造した。

【0079】

< 発色剤の製造 >

発色剤として「特定の生体物質を特異的に認識する生体物質認識分子がその粒子表面に結合した蛍光体内包ナノ粒子」を四種類製造した。それらは、いずれもPEGで被覆され、その粒子表面に抗HER2抗体が結合しているが、蛍光体の種類・母体の組成・平均粒径の点で異なるものである。

【0080】

[製造例6] 発色剤 A

工程(6-1)：ポリスチレンナノ粒子(Micromod社製「micromer(登録商標)01-01-102」;平均粒径:100nm)10gを、水:エタノール=2:8の混合溶媒中に分散し、室温で3時間攪拌した。

10

【0081】

工程(6-2)：工程(6-1)の分散液中にCy5(GEヘルスケア・ジャパン(株)製)1mg(0.00126mmol)を加えて、60℃で12時間攪拌した。

工程(6-3)：工程(6-2)の反応混合物を10,000×gで60分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。そこにエタノールを加え、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による洗浄と純水による洗浄をさらに一回ずつ行った。その結果、蛍光体内包ポリスチレンナノ粒子が得られた。

【0082】

20

工程(6-4)：工程(6-3)の蛍光体内包ポリスチレンナノ粒子1mgに対して、EDTAを2mM含有したPBSを用いて3nMに調整した。

工程(6-5)：工程(6-4)の溶液に、最終濃度10mMとなるよう「SM(PEG)12」を混合し、3時間反応した。

【0083】

工程(6-6)：工程(6-5)の反応混合液を10,000×gで60分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。

工程(6-7)：工程(6-6)の沈殿物に、EDTAを2mM含有したPBSを加えて分散させ、再度遠心分離を行った。同様の手順による洗浄を三回行った。最後に500μLのPBSを用いて再分散させることによって、PEGで被覆されたポリスチレンナノ粒子の粒子分散液が得られた。

30

【0084】

工程(6-8)：抗HER2抗体100μgを100μLのPBSに溶解させたところに、1Mジチオスレイトール(DTT)を添加し、30分間反応させた。

工程(6-9)：工程(6-8)の反応混合物について、ゲルろ過カラムで過剰のDTTを除去し、還元化抗HER2抗体溶液を得た。

【0085】

工程(6-10)：工程(6-7)の粒子分散液と、工程(6-9)の還元化抗HER2抗体溶液とをPBS中で混合し、1時間反応させた。

工程(6-11)：工程(6-10)の反応液に、10mMメルカプトエタノール4μLを添加し、反応を停止させた。

40

【0086】

工程(6-12)：工程(6-11)の反応混合物を10,000×gで60分間遠心分離を行い、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三回行った。最後に500μLのPBSを用いて再分散させて、抗HER2抗体が結合しPEGで被覆された蛍光体(Cy5)内包ポリスチレンナノ粒子(すなわち発色剤A)の粒子分散液が得られた。

【0087】

[製造例7] 発色剤 B

工程(7-1)：メラミン15gと37%ホルマリン29gと28%アンモニア水溶液1.5gとを混合

50

して、pH8に調整した。

【0088】

工程(7-2)：工程(7-1)の混合物を攪拌しながら70℃に昇温して30分間反応させて、初期縮合物を得た。

工程(7-3)：「ネオベレックスG-15」を0.12mLと、Cy5を1mg(0.00126mmol)とを水22mL中に溶解して90℃に昇温した。

【0089】

工程(7-4)：工程(7-2)の初期縮合物1gを工程(7-3)の溶液に投入した後、ドデシルベンゼンスルホン酸0.93mLを添加して、6時間攪拌した。

工程(7-5)：工程(7-4)の反応混合物を10,000×gで60分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。そこにエタノールを加え、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による洗浄と純水による洗浄をさらに一回ずつ行った。このようにして得られた蛍光体内包メラミンナノ粒子をSEMにより観察したところ、平均粒径が97nm、変動係数が10%であった。

10

【0090】

以下、工程(6-4)において蛍光体内包ポリスチレンナノ粒子の代わりに、蛍光体内包メラミンナノ粒子を用いた以外は工程(6-4)～(6-12)と同様にして、抗HER2抗体が結合しPEGで被覆された蛍光体内包メラミンナノ粒子(すなわち発色剤B)の粒子分散液を製造した。

【0091】

[製造例8]発色剤C

工程(8-1)：Cy5のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル誘導体(GEヘルスケア・ジャパン(株)製)1mg(0.00126mmol)をテトラエトキシシラン420μL(1.796mmol)と混合した。

【0092】

工程(8-2)：エタノール40mLを14%アンモニア水13.8mLと混合した。

工程(8-3)：工程(8-2)の混合液を室温下で攪拌しているところに、工程(8-1)の混合液を添加した。添加開始から12時間攪拌を行った。

【0093】

工程(8-4)：工程(8-3)の反応混合物を10,000×gで60分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。そこにエタノールを加え、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による洗浄と純水による洗浄をさらに一回ずつ行った。このようにして得られた蛍光体内包シリカナノ粒子をSEMにより観察したところ、平均粒径が99nm、変動係数が12%であった。

30

【0094】

工程(8-5)：工程(5-1)において、蛍光体を内包しないシリカナノ粒子の代わりに、工程(8-4)の蛍光体内包シリカナノ粒子を用いた以外は、工程(5-1)～(5-3)と同様にしてアミノ基が修飾された蛍光体内包シリカナノ粒子を製造した。

【0095】

工程(8-6)：製造例1において、ポリスチレンナノ粒子の代わりに、上記のように製造されたアミノ基修飾蛍光体内包シリカナノ粒子を用いた以外は製造例1と同様にして、PEGで被覆された蛍光体内包シリカナノ粒子を製造した。

40

【0096】

工程(8-7)：工程(8-6)の粒子分散液と、工程(6-9)の還元化抗HER2抗体溶液とをPBS中で混合し、1時間反応させた。

工程(8-8)：工程(8-7)の反応液に、10mMメルカプトエタノール4μLを添加し、反応を停止させた。

【0097】

工程(8-9)：工程(8-8)の反応混合物を10,000×gで60分間遠心分離を行い、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

50

行った。同様の手順による洗浄を三回行った。最後に500 μ LのPBSを用いて再分散させて、抗HER2抗体が結合しPEGで被覆された蛍光体(Cy5)内包シリカナノ粒子(平均粒径:135 nm)(すなわち発色剤 C)の粒子分散液が得られた。

【0098】

[製造例9]発色剤 D

工程(9-1): 発光波長655 nmを有するCdSe/ZnSのデカン分散液(インビトロジェン(株)製「Qdot655」)10 μ Lとテトラエトキシシラン40 μ Lとを混合した。

【0099】

工程(9-2): エタノール4 mLと14%アンモニア水2.5 mLとを混合した。

工程(9-3): 工程(9-2)の混合液を室温下で攪拌しているところに、工程(9-1)の混合液を添加した。添加開始から12時間攪拌を行った。

10

【0100】

工程(9-4): 反応混合物を10,000 \times gで60分間遠心分離を行い、上澄みを除去した。そこにエタノールを加え、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による洗浄と純水による洗浄とをさらに一回ずつ行った。得られた蛍光体内包シリカナノ粒子のSEM観察を行ったところ、平均粒径が130 nm、変動係数が13%であった。

【0101】

以下、工程(8-5)において、工程(8-4)の蛍光体内包シリカナノ粒子の代わりに、工程(9-4)の蛍光体内包シリカナノ粒子を用いた以外は、工程(8-5)~(8-9)と同様にして、抗HER2抗体が結合しPEGで被覆された蛍光体(CdSe/ZnS)内包シリカナノ粒子(平均粒径:101 nm)(すなわち発色剤 D)の粒子分散液を製造した。

20

【0102】

<HER2の免疫組織染色における検出方法の実施>

[比較例]ブロッキング剤としてBSAを使用

発色剤として、製造例6~9で得られた発色剤 A ~ D それぞれを使用して、DAB染色により判定結果が既知のヒト乳房組織の隣接切片を用い、下記の工程に従って免疫組織染色を行った。該切片として、コスモ・バイオ(株)製の組織アレイスライド「CB-A712」を用いた。

【0103】

工程(C-1): キシレンを入れた容器に、上記切片を30分間浸漬させた。途中三回キシレンを交換した。

30

工程(C-2): この切片を、エタノールを入れた容器に30分間浸漬させた。途中三回エタノールを交換した。

【0104】

工程(C-3): この切片を、水を入れた容器に30分間浸漬させた。途中三回水を交換した。

工程(C-4): この切片を、10 mMクエン酸緩衝液(pH6.0)に30分間浸漬させた。

【0105】

工程(C-5): 121 で10分間オートクレーブ処理を行った。

工程(C-6): PBSを入れた容器に、オートクレーブ処理後の切片を30分間浸漬させた。

40

【0106】

工程(C-7): ブロッキング剤として1% BSA含有PBSを組織に乗せて、1時間放置した。

工程(C-8): 1% BSA含有PBSで0.05 nMに希釈した発色剤 A ~ D それぞれを各切片に乗せて、3時間放置した。

【0107】

工程(C-9): PBSを入れた容器に、染色後の切片をそれぞれ30分間浸漬させた。

工程(C-10): Merck Chemicals社製「Aquatex」を滴下後、カバーガラスを乗せ封入した。

50

【0108】

蛍光顕微鏡下の観察：続いて、染色した切片に対し、オリンパス(株)製の蛍光顕微鏡「B X53」を用いて、目的とする生体物質、すなわちHER2の発現を輝点数から特定し、イメージJを用いた二値処理およびノイズ除去処理後に輝点計測を行い、10細胞当たりの輝点数を計測した。輝点の計測はスライド上の20のスポットについて行った。

【0109】

[実施例1]ブロッキング剤としてポリスチレンナノ粒子(平均粒径:70nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、ポリスチレンナノ粒子(Thermo Fisher Scientific社製「3070A」;平均粒径:70nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

10

【0110】

[実施例2]ブロッキング剤としてポリスチレンナノ粒子(平均粒径:80nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、ポリスチレンナノ粒子(Thermo Fisher Scientific社製「3080A」;平均粒径:80nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0111】

[実施例3]ブロッキング剤としてポリスチレンナノ粒子(平均粒径:90nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、ポリスチレンナノ粒子(Thermo Fisher Scientific社製「3090A」;平均粒径:90nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

20

【0112】

[実施例4]ブロッキング剤としてポリスチレンナノ粒子(平均粒径:100nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、ポリスチレンナノ粒子(Micromod社製「micromer(登録商標)01-01-102」;平均粒径:100nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0113】

[実施例5]ブロッキング剤としてPEG被覆ポリスチレンナノ粒子(平均粒径:100nm) 比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例1で得られたPEG被覆ポリスチレンナノ粒子含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

30

【0114】

[実施例6]ブロッキング剤としてメラミンナノ粒子(平均粒径:72nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例2で得られたメラミンナノ粒子(平均粒径:72nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0115】

[実施例7]ブロッキング剤としてメラミンナノ粒子(平均粒径:83nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例2で得られたメラミンナノ粒子(平均粒径:83nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

40

【0116】

[実施例8]ブロッキング剤としてメラミンナノ粒子(平均粒径:91nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例2で得られたメラミンナノ粒子(平均粒径:91nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0117】

[実施例9]ブロッキング剤としてメラミンナノ粒子(平均粒径:98nm)

比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例2で得られたメラミンナノ粒子(平均粒径:98nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

50

【0118】

[実施例10]ブロッキング剤としてPEG被覆メラミンナノ粒子(平均粒径:98nm)比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例3で得られたPEG被覆メラミンナノ粒子含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0119】

[実施例11]ブロッキング剤としてシリカナノ粒子(平均粒径:69nm)比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例4で得られたシリカナノ粒子(平均粒径:69nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

10

【0120】

[実施例12]ブロッキング剤としてシリカナノ粒子(平均粒径:79nm)比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例4で得られたシリカナノ粒子(平均粒径:79nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0121】

[実施例13]ブロッキング剤としてシリカナノ粒子(平均粒径:88nm)比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例4で得られたシリカナノ粒子(平均粒径:88nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

20

【0122】

[実施例14]ブロッキング剤としてシリカナノ粒子(平均粒径:99nm)比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例4で得られたシリカナノ粒子(平均粒径:99nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

【0123】

[実施例15]ブロッキング剤としてPEG被覆シリカナノ粒子(平均粒径:99nm)比較例において、1%BSA含有PBSの代わりに、製造例5で得られたPEG被覆シリカナノ粒子(平均粒径:99nm)含有PBS分散液を用いた以外は、比較例と同様にして切片を免疫組織染色し、蛍光顕微鏡下で観察した。

30

【0124】

これらの結果を表1に示す。なお、表1において、ブロッキング剤がPEGで被覆されている場合を「+」、されていない場合を「-」として示し、平均粒径の差は、発色剤の平均粒径をX(nm)とし、ブロッキング剤の平均粒径をY(nm)とするとき、 $\{(X - Y) / X\} \times 100(\%)$ の式から算出し、輝点数は、比較例の発色剤 A ~ D それぞれの陰性を1とした相対値で表わす。

【0125】

【表 1】

ブロッキング剤		発色剤 (抗HER2抗体結合・PEG被覆・蛍光体内包ナノ粒子)											
		〈A〉			〈B〉			〈C〉			〈D〉		
比較例	実施例	蛍光体=	ポリスチレン	Cy5	蛍光体=	Cy5	メラミン	Cy5	蛍光体=	Cy5	シリカ	蛍光体=	CdSe/ZnS
		母体=	平均粒径=	100 nm	母体=	平均粒径=	97 nm	母体=	平均粒径=	99 nm	母体=	平均粒径=	101 nm
		平均粒径の差	輝点数	陽性	陰性	平均粒径の差	輝点数	陽性	陰性	平均粒径の差	輝点数	陽性	陰性
	(BSA)	-	8.5	1	11	1	-	9.2	1	-	3.5	1	
1		30 %	14.0	0.93	12.5	0.77	28 %	14.5	0.92	31 %	4.5	0.97	
2	-	20 %	16.0	0.91	13.1	0.77	18 %	14.5	0.88	21 %	4.6	0.95	
3		10 %	17.3	0.80	13.2	0.73	7 %	14.6	0.85	11 %	4.8	0.94	
4		0 %	18.1	0.78	14	0.72	-3 %	15.0	0.82	1 %	5.0	0.87	
5	+		19.2	0.72	14.5	0.70		15.2	0.78		5.2	0.77	
6		28 %	17.8	0.59	16.0	0.33	26 %	16.0	0.65	29 %	6.0	0.77	
7		17 %	18.0	0.55	16.2	0.30	14 %	16.5	0.55	18 %	6.2	0.72	
8	-	9 %	18.6	0.52	16.5	0.22	6 %	16.7	0.45	10 %	6.4	0.68	
9		2 %	19.7	0.37	16.8	0.18	-1 %	17.0	0.41		6.8	0.48	
10	+		21.0	0.31	16.9	0.15		17.2	0.32	3 %	7.0	0.45	
11		31 %	14.0	0.40	12.4	0.42	29 %	15.7	0.32	32 %	5.2	0.41	
12		21 %	14.8	0.38	12.5	0.38	19 %	15.9	0.29	22 %	5.3	0.38	
13	-	12 %	15.9	0.33	12.9	0.37	9 %	16.2	0.28	13 %	5.5	0.33	
14		1 %	16.7	0.26	13.2	0.33	-2 %	17.0	0.24	2 %	6.0	0.28	
15	+		17.7	0.20	13.5	0.32		17.0	0.15		6.8	0.25	

《考察》

表1から、ブロッキング剤として通常使用するBSAより、蛍光体を内包しないナノ粒子の方が有意にブロッキング能に優れていることがわかった。これは、おそらくBSAが抗原抗体反応に関する非特異吸着を防止しているのに対して、蛍光体を内包しないナノ粒

10

20

30

40

50

子は、抗原抗体反応に関する非特異吸着のみならず、ナノ粒子のサイズ等に依存して起きる非特異的吸着についても、粒子どうしの立体的な障害によって防止することができるためであろうと考えられる。

フロントページの続き

(出願人による申告)平成24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

- (72)発明者 中野 寧
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
- (72)発明者 権田 幸祐
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
- (72)発明者 大内 憲明
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
- (72)発明者 渡邊 みか
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

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特開2010-112748(JP,A)
特開2009-115822(JP,A)
国際公開第2012/029752(WO,A1)
米国特許出願公開第2004/101822(US,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	检测生物材料的方法		
公开(公告)号	JP6194882B2	公开(公告)日	2017-09-13
申请号	JP2014507869	申请日	2013-03-25
[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 国立大学法人东北大学		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	星野秀樹 郷田秀樹 高梨健作 中野寧 権田幸祐 大内憲明 渡邊みか		
发明人	星野 秀樹 郷田 秀樹 高梨 健作 中野 寧 権田 幸祐 大内 憲明 渡邊 みか		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/54346 G01N33/54393 G01N33/57415 G01N33/57492 G01N33/582 G01N33/587		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/533 G01N33/543.575		
优先权	2012074216 2012-03-28 JP		
其他公开文献	JPWO2013146694A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种检测方法，其中即使使用高亮度荧光标记材料也不增加背景噪声，并且其具有改善的S/N比和高定量性，并且有利于免疫组织染色。方法。本发明提供一种检测方法，该检测方法是使用荧光物质包封的纳米颗粒作为成色剂来检测特定生物物质的方法，所述纳米颗粒的颗粒表面特异性地识别特定生物物质的生物物质识别分子已被结合，并且具有改善的S/N比和高定量性并且有利于免疫组织染色方法，因为包封无荧光物质的纳米颗粒用作阻断剂以防止荧光物质包封的纳米颗粒非特异性地吸附在生物物质上。比具体的生物物质。

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6194882号 (P6194882)
(45) 発行日 平成29年9月13日 (2017. 9. 13)	(24) 登録日 平成29年8月25日 (2017. 8. 25)	
(51) Int. Cl. G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/533 (2006.01)	F 1 G01N 33/543 501 J G01N 33/533 G01N 33/543 575	
請求項の数 3 (全 19 頁)		
(21) 出願番号 特願2014-507869 (P2014-507869)	(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25年3月25日 (2013. 3. 25)	(74) 代理人 110001070 特許業務法人SSINPAT	
(86) 国際出願番号 PCT/JP2013/058607	(72) 発明者 星野 秀樹 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) 国際公開番号 W02013/146694	(72) 発明者 郷田 秀樹 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25年10月3日 (2013. 10. 3)	(72) 発明者 高梨 健作 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	
審査請求日 平成28年3月7日 (2016. 3. 7)	(72) 発明者 渡邊 みか 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	
(31) 優先権主張番号 特願2012-74216 (P2012-74216)		
(32) 優先日 平成24年3月28日 (2012. 3. 28)		
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)		