(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第5996675号
(P5996675)
(45)発行日　平成28年9月21日(2016.9.21)　(24)登録日　平成28年9月2日(2016.9.2)

(51)Int.Cl.　　F I
G01N 1/30 (2006.01)　　G01N 1/30
G01N 33/48 (2006.01)　　G01N 33/48　P

請求項の数 14　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願2014-554873 (P2014-554873)
(86)(22)出願日　平成25年1月25日 (2013.1.25)
(65)公表番号　特表2015-505062 (P2015-505062A)
(43)公表日　平成27年2月16日 (2015.2.16)
(86)国際出願番号　PCT/US2013/023226
(87)国際公開番号　WO2013/112891
(87)国際公開日　平成25年8月1日 (2013.8.1)
審査請求日　平成27年3月12日 (2015.3.12)
(31)優先権主張番号　61/591,181
(32)優先日　平成24年1月26日 (2012.1.26)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　514191140
ライカ　バイオシステムズ　リッチモンド　インコーポレイテッド
ＬＥＩＣＡ　ＢＩＯＳＹＳＴＥＭＳ　ＲＩＣＨＭＯＮＤ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国　イリノイ　リッチモンド　ルート１２　５２０５
５２０５　Ｒｏｕｔｅ　１２，　Ｒｉｃｈｍｏｎｄ，　Ｉｌｌｉｎｏｉｓ　６００７１，　Ｕｎｉｔｅｄ　Ｓｔａｔｅｓ　ｏｆ　Ａｍｅｒｉｃａ
(74)代理人　100114890
弁理士　アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヘマトキシリン及びエオシン染色のための方法及び組成物

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
ヘマトキシリンで組織標本を染色する方法であって、該方法が、
（ｉ）標本と、有機酸及び多価アルコールを含むｐＨ緩衝液とを接触させる工程、ここで、ｐＨ緩衝液がｐＨ２．０～ｐＨ５．０のｐＨ緩衝範囲を有する、並びに
（ｉｉ）標本をヘマトキシリン染色液に移す工程
を含み、標本とｐＨ緩衝液とを接触させる工程を、標本をヘマトキシリン染色液に移す工程の直前に実施する、前記方法。
【請求項２】
さらに、標本とｐＨ緩衝液とを接触する前に、水で標本を洗浄することを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
標本と水との接触前からキャリーオーバーした水に曝される場合に、ｐＨ緩衝液が、ｐＨ２．０～ｐＨ５．０のｐＨを維持する、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
前記ｐＨ緩衝液が、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン及びポリエチレングリコールからなる群から選択される５％～３０％（ｖ／ｖ）の多価アルコールを含む、請求項１から３までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】
前記ｐＨ緩衝液が、５％～３０％（ｖ／ｖ）のエチレングリコールを含む、請求項１か

ら４までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記有機酸が、リンゴ酸、クエン酸、マレイン酸、酢酸、及び酒石酸からなる群から選択される、請求項１から５までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項７】
前記有機酸が、リンゴ酸、クエン酸、及び酒石酸からなる群から選択される、請求項１から６までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記有機酸が、酒石酸である、請求項１から７までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記ｐＨ緩衝液が、１０ｍＭ～１００ｍＭの濃度の有機酸を含む、請求項１から８までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項１０】
前記ｐＨ緩衝液が、１０ｍＭ～１００ｍＭの酒石酸、及び５％～３０％（ｖ／ｖ）のエチレングリコールを含む、請求項１から９までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記ｐＨ緩衝液が、さらに、少なくともｐＨ２．０～ｐＨ５．０のｐＨ範囲にわたって有効である、抗菌剤を含む、請求項１から１０までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
標本とｐＨ緩衝液との接触前からキャリーオーバーしたｐＨ緩衝液に曝される場合に、ヘマトキシリン染色液のｐＨが、０．３０ｐＨ単位未満上昇する、請求項１から１１までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記ヘマトキシリン溶液が、標本とｐＨ緩衝液との接触なしにヘマトキシリン染色を実施するよりも、染色特性における悪影響なしにより長くその染色能力を保持する、請求項１から１２までのいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記方法が、染色試薬を交換することなく標準ＨＥ染色法を使用して、染色特性における逆転なしに、少なくなくとも２７００個の標準標本スライドを染色するための容量を提供する、請求項１から１３までのいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願の参照
本出願は、２０１２年１月２６日に提出されたＵＳ仮特許出願番号第６１／５９１，１８１号の利益を請求し、参照をもって本明細書に組み込まれたものとする。
【０００２】
背景技術
ヘマトキシリン及びエオシン（“ＨＥ”）染色技術は、組織標本における病理学の視覚化のために、最も一般的に使用される組織学的技術である。典型的なＨ及びＥ染色システムは、アルミニウムを基礎とするヘマトキシリン、エオシン、分化溶液、及び青味剤を含む溶液から構成される。ヘマトキシリンは、アルミニウムイオンで錯化される場合に、デオキシリボ核酸に結合して細胞核の紫着色をもたらす負に荷電した分子を提供する天然染料である。分化溶液は、典型的に、組織及びスライドから過剰な背景染色を取り除くことにより染色したスライドのコントラストを鮮明にさせるわずかに酸性の溶液である。青味剤は、染色した試験体に適用する場合に、結合したヘマトキシリンの構造を改質して鮮やかな青／紫の着色を提供する、塩基性のｐＨの溶液である。エオシンは、細胞質及び結合組織内で正に荷電したタンパク質に結合して、核の青／紫の着色と対比させるピンク／オレンジの着色を提供する、負に荷電した染料である。
【０００３】

ＨＥ染色は、“バッチ”形式において最も一般的に実施され、その際、自動染色器は、典型的に、染色試薬容器の系列を含み、かつ１つの容器から他の容器へとスライド／ラックの連続移動のためのロボットアームを使用する。典型的に、ラック又はホルダーは、２０～３０スライドを運搬することができるが、いくつかの染色装置は、ラック毎に少数の又は多数のスライドを保持するラックを導入し、少なくとも１つの染色器の場合に、多数のラックを、同時に染色容器中に置いてよい。自動染色器を制御するソフトウェアにより、オペレーターを、それぞれの工程の継続時間及び工程の順序にプログラムすることができる。染色のバッチ形式は、単純で、経済的で、かつ比較的早い一方で、技術に関する欠点がある。

【０００４】

１つの容器から次の容器へとスライドを運搬するラックの移動は、染色試薬又は水のキャリーオーバー（ｃａｒｒｙ－ｏｖｅｒ）をもたらす。キャリーオーバーは、スライド、試料、スライドラック等への染色試薬又は水の付着によって生じる。キャリーオーバーは望ましくない。それというのも、キャリーオーバーは、いくつかの方法で下流の染色試薬の機能性に影響しうるからである。キャリーオーバーは、溶液内での染料又は機能試薬の濃度を希釈する。キャリーオーバー及び希釈は、溶剤の特徴を変化させ、かつ従ってかかるパラメータ、例えば溶剤のｐＨ及びイオン濃度に影響を及ぼすことによって染色試薬の機能性にも影響しうる。最終的に、キャリーオーバーは、染色試薬に汚染物質を導入しうる。これらのメカニズムによる作用により、キャリーオーバーは、染色システムの性能、機能性、安定性、予測精度、及び能力にネガティブに影響する。キャリーオーバーの１つの事例は、かかるネガティブな影響をもたらしてよいが、キャリーオーバーのネガティブな影響は、ネガティブな影響のとして多重染色操作の工程が、繰り返したキャリーオーバーの累積作用の結果として蓄積し又は増幅されることに関して特に問題がある。

【０００５】

キャリーオーバーのネガティブな影響のために、現在の染色システムにおける試薬の能力又は耐用年数は、かなり予測できない。試薬は、通常、過去の経験に基づいた予め決定された量の使用後に交換し、又は一度それらが不足のサインを呈し始める又は不足の点に達すると交換する。従って、現在のシステムにおける溶液は、通常、種々の割合で、すなわち種々の時間で交換する。これは、染色を連続して停止して、ただ１つの又は全体より少ない溶液を変化するためにされるために、複雑及び非効率的に付加する。一方で、全ての溶液が同時に変化した場合に、それらのいくつかは、追加のスライドを加工するための有用な能力をまだ有していても廃棄され。かつ従って費用が無駄になる。

【０００６】

典型的に、キャリーオーバーのネガティブな結果を扱う試みは、頻繁な定期的な基準で、又はそれぞれ個々の試料のためでさえ、新鮮な溶液を有する染色試薬を取り替えることが含まれる。例えば、米国特許番号第７，４６８，１６１号及び第８，０４８，３７３号において記載されている。さらに、いくつかのキャリーオーバーの作用を遅らせてよい個々の試薬化学（ヘマトキシリン、エオシン、分化因子及び青味緩衝液）における改良がある。少なくとも１つの場合において、装置（Ｄａｋｏ ＣｏｖｅｒＳｔａｉｎｅｒ）の機械的設計によるキャリーオーバーの作用を排除する試みがある。しかしながら、キャリーオーバーによる染色効果の予測不可能性及び損失は、また主な未解決の問題を残している。

【０００７】

発明の概要

本発明のある実施態様は、染色プロトコルのある点で使用する場合に、染色プロトコルにおいて有用な定義した組成物の溶液を提供する。これらの溶液の調合物は、溶液のキャリーオーバーがネガティブに影響せず、又は有利には本明細書において定義した溶液と接触する染色試薬溶液を安定化又は有利には改質するようなものである。本発明のある実施態様において、溶液は、キャリーオーバー、例えばヘマトキシリン中へのキャリーオーバーが、次の染色試薬のｐＨに著しく影響しない場合に、特定のｐＨを維持するための緩衝

液として働く。
【０００８】
本発明のある実施態様は、ＨＥ染色システムにおける溶液キャリーオーバーの望ましくない影響を低減する方法に関する。ある実施態様において、定義した溶液を、染色プロトコルの種々の工程で、例えばある染色試薬の工程の前に、キャリーオーバーの望ましくない影響を低減するために使用する。
【０００９】
特に、本発明のある実施態様は、有機酸及び多価アルコールを含むｐＨ緩衝液に関する。ある実施態様において、ｐＨ緩衝液は、約ｐＨ２．０～約ｐＨ５．０を含むｐＨ緩衝範囲を有する。ある実施態様において、ｐＨ緩衝液は、約ｐＨ１．０～約ｐＨ７．０、又は約ｐＨ１．０～約ｐＨ６．０、又は約ｐＨ１．０～約ｐＨ５．０、又は約ｐＨ２．０～約７．０、又は約ｐＨ２．０～約ｐＨ６．０のｐＨ緩衝範囲を有する。有利には、かかるｐＨ緩衝液は、約ｐＨ２．０～約ｐＨ５．０のｐＨ緩衝範囲を有する。ｐＨ緩衝液は、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリシン及びポリエチレングリコールからなる群から選択される約５％～約３０％（ｖ／ｖ）の多価アルコールを含んでよく、かつリンゴ酸、クエン酸、マレイン酸、酢酸及び酒石酸からなる群から選択される約１０ｍＭ～約１００ｍＭの有機酸を含んでよい。ある実施態様において、緩衝溶液は、少なくとも約ｐＨ２．０～約ｐＨ５．０のｐＨ範囲にわたって有効である、抗菌剤を含んでもよい。
【００１０】
本発明のある実施態様は、アルミニウム塩、並びにエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン及びポリエチレングリコールからなる群から選択される約５％～約３０％（ｖ／ｖ）の多価アルコールを含む、約ｐＨ２．０～約ｐＨ５．０のｐＨを有する溶液に関する。
【００１１】
本発明のある実施態様は、ヘマトキシリンで組織標本を染色する方法にも関し、該方法は、（ｉ）標本と本発明の定義した溶液とを接触する工程、及び（ｉｉ）標本をヘマトキシリン染色液に移す工程を含む。さらに、前記方法は、水で標本を洗浄し、そして標本と緩衝液とを接触させる工程を含んでよい。
【００１２】
本発明のある実施態様は、ヘマトキシリン及びエオシン染色を実施するためのキットに関し、該キットは、本発明の定義した溶液、並びにヘマトキシリン溶液、エオシン溶液、分化溶液、及び青味剤溶液からなる群から選択される少なくとも１つのヘマトキシリン及びエオシン染色試薬を含む。
【図面の簡単な説明】
【００１３】
【図１】図１は、典型的なヘマトキシリン及びエオシン染色プロトコルの工程を示す。
【図２】図２は、標本を有する２５００個のスライドの連続染色中のヘマトキシリン溶液のｐＨにおける変化を示す。多数のスライドの染色は、ヘマトキシリン溶液のｐＨにおける増加をもたらす（実線）。ヘマトキシリンの前に定義した組成物の緩衝液の配置は、ヘマトキシリンのｐＨにおける増加を妨げる（破線）。
【図３】図３は、２５００個のスライドの連続染色後の標本のヘマトキシリン染色の品質における変化を示す。増加した細胞質の背景染色及び細部の損失は、最初のスライドと比較して２５００番目のスライドにおいて存在する。
【図４】図４は、連続して染色した標本の最初及び２５００番目において観察された一致したヘマトキシリン染色を示す。スライドを、水道水洗浄とヘマトキシリン溶液との間で本発明の定義した組成物の緩衝液を使用するプロトコルで染色した。
【００１４】
発明の詳細な説明
表題は、本明細書において単に解釈の容易さのために提供され、制限として解釈すべきでない。

【００１５】
Ｉ．　定義
次の定義は、本発明を良好に定義するために、及び本発明の実施において当業者に通常の技術を手引きするために提供される。特に明記されない限り、用語は、関連技術における通常の技術による通常の使用に従って理解されるべきである。
【００１６】
用語が、単数形で提供される場合に、本発明は、特に示されない限り、その用語の複数形によって記載された本発明の態様も考慮する。本明細書において使用されているように、“染色試薬”は、組織学的染色プロトコルにおいて使用されるあらゆる試薬をいう。特に“染料でない染色プロトコルにおける試薬”に対する“染料である試薬”を参照することにより本発明を理解することが必要である場合に、かかる定義は、明確になる。
【００１７】
本明細書において使用されているように、“使用強さ”又は“すぐに使用できる”溶液は、溶液中の成分が、本発明の方法において使用するために所望の濃度の溶液である。“すぐに使用できる”は、溶液が、最終使用者の一部に対してあらゆる追加の操作、例えば濾過、スキミング及び／又は混合を要求しないことも含んでよい。
【００１８】
本明細書において使用されているように、広範な使用における“キシレン置換体”は、２つの分類：テルペン及び脂肪族溶媒を含む。テルペンの代表的な例は、リモネン及びテルペンチンを含む。
【００１９】
典型的に、水道水は、高容量ＨＥ染色プロトコルにおける洗浄工程として使用するために最も経済的である。従って、本明細書において使用されているように、“水”の用語は、水道水をいうが、蒸留水又は脱イオン水、又はＨＥ染色システムにおける試験体を処理又は洗浄するために使用した水溶液も含む。
【００２０】
ＩＩ．　概要
ＨＥ染色プロトコルにおける溶液キャリーオーバーの望ましくない影響が、該プロトコルのある工程の合間にある定義した溶液の使用によって改善されうることが発見されている。これらの溶液及び方法の採択は、最終使用者のための経費削減になってよい染色試料（例えば、スライド又はラックに固定したスライドに乗せたもの等）のための容量を増加すると考えられる。他の予期される効果は、使用の高められた容易さ、試薬性能におけるより良好な予測精度、及び減らされた努力及び苦労によって向上した使用者の経験を含む。さらに、本明細書において開示されている溶液及び方法は、手間を省き、かつ試薬を変更するために必要な中断時間を減らすことにより効率を上昇すると考えられる。結果の一致（質）も高められ、試薬のキャリーオーバー及び希釈によって導入された変動性が最少化され、かつ試薬性能の予測精度も向上する。
【００２１】
ＩＩＩ．　ヘマトキシリン及びエオシン（“ＨＥ”）染色
ＨＥ染色は、組織学的目的のために広く使用される染色方法である。当業者は、ＨＥ染色のための多くの変法及びプロトコルが、開発されており、かつ本発明が適用できる場合に、本発明が、あらゆる特的の変法、プロトコル、システム等に制限されないことを認識している。典型的なＨＥ染色システムは、４つのコアとなる染色試薬：ヘマトキシリン、分化溶液、青味剤及びエオシン、並びに脱パラフィン、再水和、脱水及び洗浄のために使用される必須の洗浄剤及び溶媒から構成されると定義されてよい。
【００２２】
典型的に、代表的なＨＥ染色プロトコルは、（ｉ）脱パラフィン化（キシレン又はキシレン置換体を使用する）、（ｉｉ）再水和（アルコールを使用する）、（ｉｉｉ）水洗浄、（ｉｖ）ヘマトキシリン、（ｖ）水洗浄、（ｖｉ）分化溶液、（ｖｉｉ）水洗浄、（ｖｉｉｉ）青味付け、（ｉｘ）水洗浄、（ｘ）アルコール、（ｘｉ）エオシン、（ｘｉｉ）

脱水（アルコールを使用する）、及び（ｘｉｉｉ）洗浄（キシレン又はキシレン置換体を使用する）の工程を含む(Sheenan, D.C. and Hrapchak, B.B.: Theory and Practice of Histotechnology 2nd ed. Columbus, OH, Battelle Press, 1980)（図１）。本発明のある実施態様において、定義した溶液を使用する工程は、ＨＥ染色プロトコルにおける工程の直前に実施する。溶液の組成は、溶液をキャリーオーバーから保護するために設計した染色試薬によって規定される。ある好ましい実施態様において、本発明の定義した溶液を使用する工程は、コア染色試薬工程の直前に実施する。

【００２３】

本発明のある実施態様において、定義した溶液を使用する工程は、ヘマトキシリン工程の直前に実施する。本発明のある実施態様において、定義した溶液を使用する工程は、分化溶液工程の直前に実施する。本発明のある実施態様において、定義した溶液を使用する工程は、青味剤工程の直前に実施する。本発明のある実施態様において、定義した溶液を使用する工程は、エオシン工程の直前に実施する。

【００２４】

本発明のある実施態様において、定義した組成を有する溶液を、水洗浄工程とヘマトキシリン溶液との間に置く。ある実施態様において、洗浄水は水道水である。この位置で、定義した溶液は、ヘマトキシリン溶液に対して水のいくつかの不利な効果を軽減する。ヘマトキシリン中に洗浄工程からキャリーオーバーされた水の実際の体積を低減することによって、ヘマトキシリンの染色の質又は染色能力に影響してよい水（及び特に水道水中で見出される）成分の範囲内の（例えばイオン、塩化物等）の体積が減少する。緩衝液の溶液への添加は、水の容量を減少して、ヘマトキシリンのｐＨを上昇させる（図２）。これは、ヘマトキシリンのｐＨにおける上昇が、組織の背景染色及び細部の染色の損失をもたらすために、有利である（図３及び４）。

【００２５】

キャリーオーバーの不利な効果を軽減することに加えて、定義した溶液を、溶液のキャリーオーバーに曝されたヘマトキシリンの安定性を高めるために調合してよい。多価アルコールの、ヘマトキシリンに対してキャリーオーバーされる溶液への添加は、ヘマトキシリンの沈澱の可能性を減少することができ、かつヘマトキシリンの濾過が必要でないため使用者に価値を提供できる。

【００２６】

溶液を“使用する”工程は、試料、例えばスライド上に乗せた組織標本を溶液に曝すことを意味すると解すべきである。試料は、例えば溶液中に試料を浸す又は浸漬することによって、溶液に曝されてよい。試料は、試料に溶液を通すことによって、例えば試料を保持するスライドを溶液に通すことによって、溶液に曝されてよい。試料は、例えば試料上に溶液を滴加する又は噴霧することによって、溶液に曝されてよい。当業者は、染色工程中に試料を溶液に曝す種々の変法があること、及び本発明の方法及び溶液が、試料を溶液に曝すあらゆる特定の方法に制限されないことを認識している。

【００２７】

ＩＶ．　キャリーオーバーの作用を軽減するための定義した溶液

本発明の一態様は、組織学的染色プロトコルにおける水又は染色試薬のキャリーオーバーの作用を軽減するための、定義した組成物の溶液を提供する。

【００２８】

ある実施態様において、定義した溶液は、酸を含む緩衝液であり、該緩衝液は、約ｐＨ２．０～約５．０の緩衝を可能にする。ある実施態様において、酸は、約２．０～約５．０のｐＫａを有する。ある実施態様において、溶液中の酸の濃度は、約１０ｍＭ～約１００ｍＭである。ある実施態様において、溶液中の酸の濃度は、約２０ｍＭ～約１００ｍＭである。ある実施態様において、溶液中の酸の濃度は、約１０ｍＭ～約５０ｍＭ、又は約２０ｍＭ～約５０ｍＭである。ある実施態様において、酸は有機酸である。有用な有機酸の代表的な例は、制限されることなく、リンゴ酸、クエン酸、フマル酸、酒石酸、マレイン酸、及び酢酸を含む。ある実施態様において、緩衝液は、約５％～約３０％（ｖ／ｖ）

の濃度で多価アルコールを含む。多価アルコールの代表的な例は、制限されることなく、エチレングリコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、及びグリセリンを含む。ある実施態様において、溶液は、酸及び多価アルコールの双方を本明細書において定義した量で含む。ある特定の一実施態様において、緩衝液は、２０ｍＭの酒石酸及び１５％（ｖ／ｖ）のエチレングリコールを含む溶液であり、かつ溶液のｐＨは、ｐＨ３．３に調整される。当業者は、ｐＨを調整するために使用できる多数の試薬があることを理解している。例えば、水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）、水酸化カリウム（ＫＯＨ）、又は他の水酸化物を基礎とする化合物、並びに酒石酸及びその共役塩基である。一実施態様において、ｐＨは、水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）で調整される。

【００２９】

ある実施態様において、定義した溶液は、アルミニウム塩を含む約ｐＨ２．０～約ｐＨ５．０のｐＨを有する緩衝作用のない溶液である。アルミニウム塩の代表的な例は、制限されることなく、硫酸アンモニウムアルミニウム［$AlNH_4(SO_4)_2$］、硫酸アルミニウム［$Al_2(SO_4)_3$］、及び硫酸カリウムアルミニウム$AlK(SO_4)_2$を含む。ある実施態様において、緩衝作用のないアルミニウム塩溶液は、約１５％～約３０％（ｖ／ｖ）の濃度で本明細書において記載された多価アルコールも含む。

【００３０】

ある実施態様において、定義した溶液は、分化溶液として使用される染色試薬のわずかに改質した又は改質していない調製物である。ある実施態様において、分化溶液として使用される染色試薬のわずかに改質した又は改質していない調製物は、あらゆる酸を有する緩衝作用を有する溶液であり、その際該さんは、約２，５～約４．０のｐＫａを有し、かつ約ｐＨ１．５～約５．０のｐＨの間で緩衝することができる。ある実施態様において、酸は有機酸である。有用な有機酸の代表的な例は、制限されることなく、リンゴ酸、クエン酸、フマル酸、マレイン酸、酢酸、及び酒石酸を含む。

【００３１】

本発明のあらゆる溶液又は本発明の方法を実施することにおいて有用な溶液を含む実施態様において、抗菌剤を、微生物の成長を阻害するために添加してよい。ある実施態様において、緩衝溶液は、少なくとも約ｐＨ２．０～約ｐＨ５．０のｐＨ範囲にわたって有効であるものである。抗菌剤の代表的な例は、アジ化ナトリウム、ＰＲＯＣＬＩＮ ３００（登録商標）、ＰＲＯＣＬＩＮ １５０（登録商標）、ＰＲＯＣＬＩＮ ２００（登録商標）、及びＰＲＯＣＬＩＮ ９５０（登録商標）を含む。例えば、一実施態様において、溶液は、約０．０３％～約０．０４％（ｖ／ｖ）のＰＲＯＣＬＩＮ ３００（登録商標）（Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）を、微生物の成長を阻害するために含む。通常の当業者に公知の実施例生成物又は商標名が、詳細の目的のためのみに提供され、記載された試薬の広い属の限定を意味しないことを理解すべきである。

【００３２】

本発明の定義した溶液、例えば緩衝液は、ＨＥ染色プロトコルのための作業濃度又はすぐに使用できる溶液として提供されることを考慮する。しかしながら、２つ以上の成分の濃縮溶液を製造してよく、その際使用者が、水及び／又は他の成分（例えば抗菌剤）を定義した溶液に添加して、本明細書において記載された調合物を有する作業濃度の又はすぐに使用できる溶液を製造してよいことも考慮する。従って、本発明は、本発明の定義した溶液を製造するために使用されうる濃縮溶液にも関する。提供された定義された溶液中での成分の量を得る場合に、濃縮溶液中の成分の量が、作業濃度の又はすぐに使用できる溶液を提供する必要があると定義することは、当業者の通常の技術の１つの技術の範囲内である。例えば、濃度が、水で１：１に希釈される場合に、酸、多価アルコール等の濃度は、所望の最終濃度の二倍であってよい。

【００３３】

Ｖ．　キャリーオーバーの作用を軽減する方法

本発明の一態様は、組織学的染色プロトコルにおける水又は染色試薬のキャリーオーバーの作用を軽減する方法を提供する。一般に、かかる方法は、２つの染色試薬工程の間の

、又は水洗浄工程と染色試薬工程の間の染色プロセスにおける工程として定義した溶液を使用する。

【００３４】

試料を染色試薬中で浸漬することによって染色試薬と接触させる染色プロトコルにおいて、試料を定義した溶液中で浸漬してもよい。試料を浸漬以外の方法で染色試薬と接触させる染色プロトコルにおいて、試料を、同様の方法で定義した溶液と接触させてよい。しかしながら、試料を染色試薬と接触させる方法は、試料を同様の染色プロトコル内で定義した溶液と接触してよい方法に制限されないことを理解する。

【００３５】

ＨＥ染色システムにおいて、キャリーオーバーの有害な作用は、ヘマトキシリン及び分化溶液に対して最も大きいが、しかし染色システムにおける全ての染色／試薬に影響してよい。ヘマトキシリン及び分化溶液は、ＨＥ染色スケジュールにおける水洗浄に続く。これらの２つの溶液の性能は、ｐＨに高く依存し、かつこれらの溶液への水の導入はｐＨにおける上昇をもたらす。これらの溶液に対する上昇したｐＨの１つの作用は、ヘマトキシリンの背景染色における増加である。ある実施態様において、試料を、ヘマトキシリン染色溶液と接触させる直前に定義した溶液と接触させる。ある実施態様において、試料を、水中で洗浄した直後に、及びヘマトキシリン染色溶液と接触させる直前に定義した溶液と接触させる。ある実施態様において、ヘマトキシリン溶液のｐＨは、緩衝液中での標本の浸漬前からキャリーオーバーした緩衝液に曝される場合に、０．３０ｐＨ単位未満上昇する。ある実施態様において、ヘマトキシリン溶液のｐＨは、緩衝液中での標本の浸漬前からキャリーオーバーした緩衝液に曝される場合に、０．２０ｐＨ単位未満上昇する。ヘマトキシリン溶液のｐＨが、一度前記方法の工程を実施する場合に緩衝液中で標本を浸漬する前からキャリーオーバーした緩衝液に曝される場合に、０．３０ｐＨ単位未満又は０．２ｐＨ単位未満上昇するだけでなく、本発明の特定の利点が、ヘマトキシリン溶液のｐＨが緩衝液のキャリーオーバーに対して繰り返して曝した後に増加しないことであることを理解する。

【００３６】

ある実施態様において、試料を、分化溶液と接触させる直前に定義した溶液と接触させる。ある実施態様において、試料を、水で洗浄した直後に、及び分化溶液と接触させる直前に定義した溶液と接触させる。

【００３７】

記載した方法の使用は、新たな試薬に交換する前に、２０００個までの標準標本スライドについて標準ＨＥ染色法下で加工することが可能であってよい。ある実施態様において、前記方法の使用は、新たな試薬に交換する前に、２７００個までのスライドについて加工することが可能であってよい。さらに、ある実施態様において、前記方法の使用は、新たな試薬に交換する前に、３０００個までのスライドについて加工することが可能であってよい。ある数の標本スライドを加工する能力が、スライドを染色する目的のために許容できない染色に対する不利な作用を観察することのない数を加工する能力を示すことは、当業者によって理解される。キャリーオーバーを低減する、しかし完全に除去しない機械的方法との組合せで使用される本発明の試薬及び方法の使用は、試薬の得られたセットを使用して染色してよいスライドの数を著しく増加してよいことをさらに考慮する。

【００３８】

本発明の方法は、最終作業濃度の又はすぐに使用できる定義した溶液まで濃縮溶液を希釈する、例えば水で希釈する工程も含んでよい。本発明の方法は、成分、例えば抗菌剤を添加して、すぐに使用できる定義した溶液を製造する工程も含んでよい。この工程は、ＨＥ染色プロトコルにおける定義した溶液を使用する前に実施する。

【００３９】

ＶＩ．　使用のキット及び方法

本発明の一態様は、ＨＥ染色を実施するためのキットに関する。かかるキットは、溶液キャリーオーバーの作用を軽減する少なくとも定義した溶液を含む。有用な定義した溶液

は、本明細書において詳細に記載されており、かつ緩衝液及び緩衝作用のない溶液を含む。本発明の代表的なキットは、ＨＥ染色のために使用される１つ以上の染色試薬又は他の成分を含んでもよい。ＨＥ染色のために使用される染色試薬の例は，ヘマトキシリン溶液、エオシン溶液、分化溶液、及び青味剤溶液を含む。ＨＥ染色のために使用される他の成分の例は、キシレン、キシレン置換体及びアルコールを含む。ある実施態様において、キットは、少なくとも５つの試薬：（１）ヘマトキシリン溶液、（２）エオシン溶液、（３）分化溶液、（４）青味剤溶液、及び（５）溶液キャリーオーバーの作用を軽減する定義した溶液を含む。

【００４０】

本発明の他の態様は、ＨＥ染色を実施するためのキットを使用する方法に関する。ＨＥ染色を実施するための方法は、本明細書において詳細に記載されているキャリーオーバーの作用を軽減する定義した溶液を使用することを含む。キットの使用は、多数の利益を提供する。現在のＨＥ染色法及び試薬は、しばしば溶液を異なる割合で交換することを必要とする、溶液キャリーオーバーのネガティブな作用を受ける。キットにおいてキャリーオーバーの作用を軽減する定義した溶液の含有は、キット試薬を同時に変更する必要がある、一致している全てのキット試薬の予測できる寿命を提供する。例えば、キット試薬の使用は、新たな試薬を置換する前に、２０００個までの標準標本スライドについて標準ＨＥ染色法を使用して加工することが可能であってよい。又は、キットの使用は、新たな試薬に交換する前に、２７００個までのスライドについて加工することが可能であってよい。又は、キットの使用は、新たな試薬に交換する前に、３０００個までのスライドについて加工することが可能であってよい。

【００４１】

実施例

以下で開示した実施態様は、種々の形で例示してよい、本発明の単なる代表である。従って、次の実施例において開示された特定の構造、機能、及び方法の詳細は、制限されると解釈すべきでない。

【００４２】

実施例１

全ての染色を、図１及び表１において概説されている標準ＨＥプログラムを使用してＬＥＩＣＡ（登録商標）ＳＴ－５０１０ ＡＵＴＯＳＴＡＩＮＥＲ™又はＬＥＩＣＡ（登録商標）ＳＴ－５０２０ ＭＵＬＴＩＳＴＡＩＮＥＲ™で実施した。消耗試験の目的は、多数のスライドの連続染色中に生じる、化学的及び機能的（染色）変化を評価するためであった。典型的な消耗試験（表１）において、ヘマトキシリン、分化溶液、青味剤及びエオシンを、全体の消耗試験中に交換しなかった一方で、全ての他の成分（アルコール及びキシレン）を、３００スライドの感覚で交替又は交換した。複数の組織の対照スライド上の対照組織標本の染色（機能染色）及びヘマトキシリンのｐＨの決定を、１５０スライドの感覚で実施した。標準消耗試験は、合計２７００スライド（９０　３０スライドラック）を導入した。

【００４３】

定義した組成物の追加の緩衝試薬を導入する他の染色操作は、水道水洗浄とヘマトキシリン工程との間に置かれる（表２）。この溶液を、ヘマトキシリン中への水道水のキャリーオーバーの作用を軽減するために設定した。ヘマトキシリン、分化溶液、青味剤及びエオシンのようなこの溶液を、消耗試験中に交換しなかった。前期試験のように、複数の組織の対照スライド上の対照組織標本の染色（機能染色）及びヘマトキシリンのｐＨの決定を、１５０スライドの間隔で実施した。

【００４４】

図２は、スライドを有するスライドラックがヘマトキシリンへの水道水のオーバーラップを生じる、ヘマトキシリンのｐＨにおける上昇を証明する。反対に、水道水とヘマトキシリンとの間の定義した組成物の緩衝液の置換は、ヘマトキシリン溶液中に移動する前にスライドから水道水を移動する。結果として、ヘマトキシリンのｐＨは安定したままであ

る。

【００４５】

表１は、ＬＥＩＣＡ（登録商標）ＳＴ－５０１０ＸＬ™ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｓｔａｉｎｅｒで実施した標準ＨＥプロトコルを示す。

【表１】

Leica AutoStainer ST5010 XL						回収速度
工程	位置	試薬	時間	正確	浸漬	
1	炉		0:00:00	なし	2	9
2	1	キシレン	0:03:00	なし	2	9
3	2	キシレン	0:03:00	なし	2	9
4	3	キシレン	0:02:00	なし	2	9
5	4	100% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
6	5	100% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
7	6	100% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
8	7	80% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
9	WSH 1	水洗浄	0:01:00	なし	2	9
10	8	ヘマトキシリン	0:03:00	あり	2	9
11	WSH 5	水洗浄	0:03:00	あり	2	9
12	9	分化溶液	0:00:45	あり	2	9
13	WSH 4	水洗浄	0:02:00	あり	2	9
14	10	青味剤	0:01:00	なし	2	9
15	WSH 3	水洗浄	0:02:00	あり	2	9
16	11	80% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
17	12	エオシン	0:01:00	なし	2	9
18	13	100% 試薬アルコール	0:01:00	あり	2	9
19	14	100% 試薬アルコール	0:01:00	あり	2	9
20	15	100% 試薬アルコール	0:01:00	あり	2	9
21	16	キシレン	0:01:00	あり	2	9
22	17	キシレン	0:01:00	なし	2	9
23	18	キシレン	0:01:00	なし	2	9
24	出口	キシレン				

【００４６】

表２は、ＬＥ（登録商標）ＳＴ－５０１０ＸＬ™ Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｓｔａｉｎｅｒでの水道水洗浄工程とヘマトキシリン工程（表２における工程１０）との間に置いた定義した組成物の緩衝液を使用するＨＥプロトコルを示す。

【表２】

Leica ST5010 Autostainer XL						回収速度
工程	浴－位置	試薬	時間	正確	浸漬	
1	装填	------	0:00:00	なし	2	9
2	1	キシレン	0:02:00	なし	2	9
3	2	キシレン	0:02:00	なし	2	9
4	3	キシレン	0:02:00	なし	2	9
5	4	100% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
6	5	100% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
7	6	100% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
8	7	80% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
9	WSH 1	水洗浄	0:01:00	なし	2	9
10	WSH 2	緩衝液	0:00:30	あり	2	9
11	8	ST- ヘマトキシリン	0:03:00	あり	2	9
12	WSH 5	水洗浄	0:02:00	あり	2	9
13	9	ST-分化溶液	0:00:45	あり	2	9
14	WSH 4	水洗浄	0:01:00	なし	2	9
15	10	ST-青味剤試薬	0:01:00	あり	2	9
16	WSH 3	水洗浄	0:01:00	なし	2	9
17	11	80% 試薬アルコール	0:01:00	なし	2	9
18	12	ST-エオシン	0:01:00	あり	2	9
19	13	100% 試薬アルコール	0:01:00	あり	2	9
20	14	100% 試薬アルコール	0:01:00	あり	2	9
21	15	100% 試薬アルコール	0:01:00	あり	2	9
22	16	キシレン	0:01:00	なし	2	9
23	17	キシレン	0:01:00	なし	2	9
24	18	キシレン	0:01:00	なし	2	9
25	出口	キシレン				

【００４７】

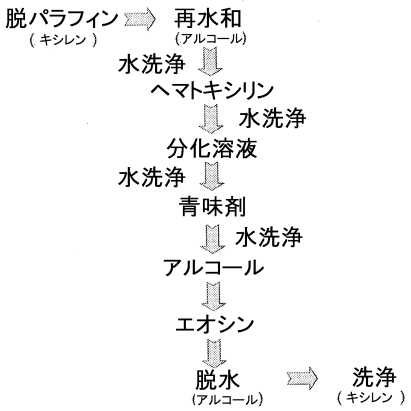
表３は、例えば標本スライドとヘマトキシリンを接触する直前に使用するための本発明の定義した組成物の緩衝液の代表的な例を示す。ｐＨを、２Ｎ ＮａＯＨで３．３３に調整する。

【表３】

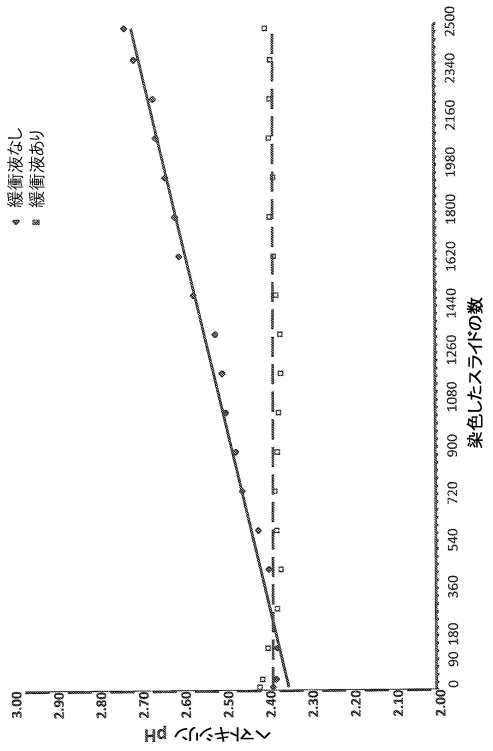
原料	1 リットル調合物
脱イオン水	850.00 ml
酒石酸	3.10 g
エチレングリコール	150.00 ml
PROCLIN 300®	0.30 ml
水酸化ナトリウム (1M 溶液)	14.00 ml

【図１】

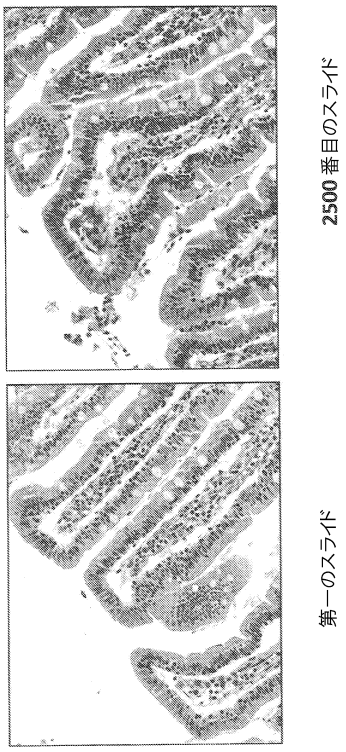
典型的なHE染色プロトコルの図式



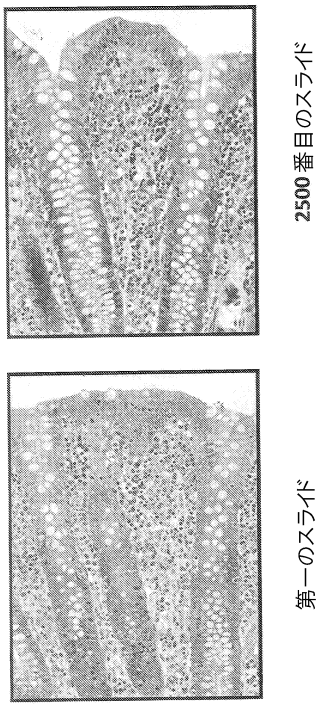
【図２】



【図３】



【図４】



フロントページの続き

(74)代理人 100099483
弁理士 久野 琢也
(72)発明者 スタンリー イー. ハンセン
アメリカ合衆国 イリノイ マッケンリー レジェンド レーン ４３２
(72)発明者 ラッセル マイアーズ
アメリカ合衆国 イリノイ リッチモンド クウェイル クロッシング １０９１０
(72)発明者 ロナルド ポール
アメリカ合衆国 モンタナ クランシー ブライドル ビット ループ ８４
(72)発明者 オードラ ラスムッセン
アメリカ合衆国 ウィスコンシン ケノーシャ セブンティース コート ６９２５ ナンバー２１０
(72)発明者 ケイト テイラー
オーストラリア国 ヴィクトリア メルボルン チェルシー ロード ２６

審査官 長谷 潮

(56)参考文献 特許第４５１２４９２（ＪＰ，Ｂ２）
特開昭５８－１７９４９９（ＪＰ，Ａ）
特表２００４－５１４８８６（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００７／０２９４３７（WO，Ａ１）
特表２０１０－５２１６７８（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２００９／１４８８８５（WO，Ａ２）
特開平０５－２５２９５４（ＪＰ，Ａ）
特開昭５９－１４４７９６（ＪＰ，Ａ）
特開平０２－２０５７７３（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５３０９４９（ＪＰ，Ａ）
特開昭５４－１３４６９４（ＪＰ，Ａ）
特開２００７－１１４０７６（ＪＰ，Ａ）
米国特許第０５４３２０５６（ＵＳ，Ａ）
GRAHAM EFFIN T., BIOTECHNIC AND HISTOCHEMISTRY, 米国, WILLIAMS AND WILKINS, １９９１年１月 １日, V66 N6, P279-281

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ １／２８
Ｇ０１Ｎ １／３０
Ｇ０１Ｎ ３３／４８