

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6515082号
(P6515082)

(45) 発行日 令和1年5月15日(2019.5.15)

(24) 登録日 平成31年4月19日(2019.4.19)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/48 (2006.01)

G O 1 N 33/48

P

請求項の数 26 外国語出願 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2016-248743 (P2016-248743)	(73) 特許権者	504462571
(22) 出願日	平成28年12月22日 (2016.12.22)		サクラ ファインテック ユー. エス. エー., インコーポレイテッド
(65) 公開番号	特開2017-120260 (P2017-120260A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 90501, トーランス, ウェスト 214
(43) 公開日	平成29年7月6日 (2017.7.6)		ティーエイチ ストリート 1750
審査請求日	平成29年10月19日 (2017.10.19)		
(31) 優先権主張番号	14/984, 946	(74) 代理人	110001726
(32) 優先日	平成27年12月30日 (2015.12.30)		特許業務法人綿貫国際特許・商標事務所
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	アミット ディー. シャー
(31) 優先権主張番号	15/371, 588		アメリカ合衆国 カリフォルニア 90278, リドンドビーチ, ユニットビーチ, ロックフェラー レーン 1835
(32) 優先日	平成28年12月7日 (2016.12.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		審査官	海野 佳子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 組織処理試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

身体から採取された生体サンプルを、アセタール溶媒を含む組成物を用いて処理し、該処理の後に、生体サンプルをパラフィンで包埋することを含む方法。

【請求項 2】

アセタール溶媒が、ジオキソランを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

生体サンプルを処理することが、生体サンプルを固定化することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

アセタール溶媒が、ジオキソランであり、生体サンプルを固定化することが、生体サンプルを、ジオキソラン、触媒および水を含む混合物と接触させることを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

生体サンプルを組成物を用いて処理する前に、生体サンプルを固定化することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

生体サンプルを固定化した後に、生体サンプルを脱水および透徹することを含み、生体サンプルを組成物を用いて処理することが、少なくとも 1 種の脱水および透徹の少なくとも一部として処理することを含む、請求項 5 に記載の方法。

10

20

【請求項 7】

生体サンプルを組成物を用いて処理する前に、固定化された生体サンプルを脱水することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

脱水が、固定化された生体サンプルを、アルコールを含む脱水組成物を用いて処理することを含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

脱水組成物が、アセトンおよびグリコールのうち少なくとも 1 種を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

10

脱水が、固定化された生体サンプルを、組成物を含む脱水組成物を用いて処理することを含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

生体サンプルを固定化した後に、生体サンプルを脱水、透徹することおよび浸潤させることを含み、生体サンプルを組成物を用いて処理することが、生体サンプルを浸潤させることの少なくとも一部として処理することを含む、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 12】

組成物が、パラフィンをさらに含む、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

ジオキソランが、1, 3-ジオキソランを含む、請求項 2 または 3 に記載の方法。

20

【請求項 14】

身体から採取され、固定された生物学的組織を脱水プロセス、透徹プロセスおよび浸潤プロセスで処理し、

脱水プロセス、透徹プロセスおよび浸潤プロセスの少なくとも 1 つは、固定された生物学的組織をアセタール溶媒を含む組成物と接触させることを含み、浸潤プロセスは、固定された生物学的組織に包埋剤を浸潤させることを含む方法。

【請求項 15】

アセタール溶媒が、ジオキソランを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

ジオキソランが、1, 3-ジオキソランを含む、請求項 15 に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記透徹プロセスは、固定された生物学的組織をアセタール溶媒を含む組成物と接触させることを含む、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 18】

前記透徹プロセスにおいて、組織を別の透徹剤と接触させることをさらに含む、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記別の透徹剤が、炭化水素透徹剤および酸素ベースの官能基を有する炭化水素透徹剤のうち少なくとも 1 種を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

40

前記アセタール溶媒がジオキソランを含み、

前記アセタール溶媒および前記別の透徹剤が混合物を含む、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記脱水プロセスは、固定された生物学的組織をアセタール溶媒を含む組成物と接触させることを含む請求項 14 に記載の方法。

【請求項 22】

前記脱水プロセスは、固定された生物学的組織をアルコールと接触させることをさらに含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

アセタール溶媒およびアルコールが、混合物を含む、請求項 22 に記載の方法。

50

【請求項 2 4】

前記浸潤プロセスは、固定された生物学的組織をアセタール溶媒を含む組成物と接触させることを含む請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 2 5】

固定された生物学的組織を、パラフィンを含む包埋材と接触させることをさらに含む、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記アセタール溶媒がジオキソランを含み、前記アセタール溶媒および前記包埋材が混合物を含む、請求項 2 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

組織処理。

【背景技術】

【0 0 0 2】

疾患過程の診断のために採取された身体に由来する組織は、スライド上に載せ、解析のために病理学者によって顕微鏡下で見ることができると薄い組織切片を製造するように組織学検査室において処理されることが多い。これらの解析前プロセスは、一般に、順を追って、肉眼的検査、固定、脱水、透徹、パラフィン浸潤および包埋を含む。この手順は、生検、手術で採取された大きな検体または剖検から得た組織を含めた組織を処理するために使用される。

20

【0 0 0 3】

肉眼的検査は、一般に、巨視的検体を描写し、そのすべてまたは選択された部分を、パラフィンプロックに処理されている間、組織を保持する小さいプラスチックカセットに入れることからなる。最初に、カセットを固定液中に入れる。

【0 0 0 4】

肉眼的検査後、組織は固定される。固定の目的は、自己融解による分解が起こらないようにタンパク質の構造を変化させることによって、可能な限り生きていたような状態で組織を永久に保存することである。存在する組織の種類および実証されるべき特徴に応じて、種々の固定液を利用可能である。作用機序に従って分類された固定液の主要な群として、アルデヒド、水銀、アルコール、酸化剤およびピクリン酸が挙げられる。ホルマリン固定は、ほぼ中性 pH、例えば、6～8 の範囲で最良に実施される。組織の低酸素状態は、pH を低下させる傾向があり、そのため、固定液には、過剰な酸度を防ぐための緩衝能力があるはずである。一般的なバッファーとして、リン酸、重炭酸、リンゴ酸、カコジル酸およびペロナルが挙げられる。市販のホルマリンは、例えば、pH 7 のリン酸を用いて緩衝され得る。組織の浸透は、個々の固定液各々の拡散性に依りて変わる。固定液の浸透を改善するための 1 つの方法は、組織を薄く（2～3 ミリメートル（mm））切断することである。薄い組織切片への浸透は、厚い切片についてよりも迅速に起こる。10：1 以上の比の固定液対通常標的とされる組織を用いる場合には、固定液の容量は、一般に、重要である。固定液中での検体の攪拌もまた、固定を増強することが多い。

30

40

【0 0 0 5】

ひとたび、組織が固定または固定化されると、組織は、顕微鏡検査のための薄い切片にされ得る形態に処理されることを必要とする。通常の方法で、これは、パラフィンをを用いて行われる。組織に固相支持体マトリクスを提供するパラフィンに包埋された組織は、およそ 2～20 ミクロンの厚さの切片にされることを可能にする。切片作製のために組織がパラフィン中に固定されることは、組織処理と呼ばれ、このプロセスにおける主なステップは、脱水、透徹、浸潤および包埋である。

【0 0 0 6】

水溶液中で固定された組織は、パラフィンで直接浸潤され得ない。第 1 に、脱水によって組織から水が除去されなければならない。これは、種々の濃度（例えば、70 パーセン

50

ト～95パーセント～100パーセント)の一連のアルコールを用いて行われ得る。あるいは、脱水は、ホルマリンおよびアルコールの混合物を用いて行われる。アセトンまたは種々の溶媒の混合物などのその他の脱水剤も使用され得る。

【0007】

脱水後、組織は、透徹される。「透徹」は、包埋媒体(例えば、パラフィン)と混和性となる物質を用いる脱水剤および脂質の一部の除去からなる。最も一般的な透徹剤として、キシレンがある。

【0008】

ひとたび透徹されると、組織は、パラフィンなどの包埋剤で浸潤される。最後に、カセット中の、またはそのカセットから取り出された組織は、溶融パラフィン中に入れられ、次いで、パラフィンが冷却されて、組織を包埋または被包する凝固したブロックを形成し、その結果、切片作製され得る。あるいは、組織は、切片作製可能なカセット中に処理され、カセットとともにパラフィン中に包埋され、切片作製され得る。ひとたび、組織が固体パラフィンプロック中に包埋されると、組織は、スライド上に置くことができる切片に切断され得る。これは、ミクロトームを用いて行われる。ひとたび、切片が切断されると、それらは、何らかの皴を除去するのに役立つ、温水浴に浮かべられる。次いで、パラフィン中の組織切片は、水浴から取り出され、ガラス顕微鏡スライド上に置かれる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許出願公開第2015/0050652号明細書

【0010】

一実施形態では、身体から採取された生体サンプルを処理するために操作可能であるか、または適しているアセタール溶媒を含む組成物が開示される。診断または研究のために身体から採取された組織などの生体サンプルとして、それだけには限らないが、生検、手術で採取された検体および/または剖検から得た組織が挙げられる。また、診断のために身体から採取された生体サンプルを、アセタールを含む組成物を用いて処理することを含む方法が開示される。この関連で生体サンプルを処理することは、一実施形態では、その後の検査/診断のための生体サンプルの固定、透徹および/または包埋などの解析前プロセスに重点が置かれている。

【0011】

生体サンプルを処理するための組成物にとって適した代表的なアセタールとして、メチラール、エチラール、ブチラール、ジオキソラン、グリセロールホルマール、アセトアルデヒドジエチルアセタールおよびそれらの混合物が挙げられる。ジオキソランは、1種の特に好ましいアセタール溶媒である。本明細書に記載されるようなジオキソランとして、1,3-ジオキソランならびにその付加物およびそれらの混合物が挙げられる。このような付加物として、それだけには限らないが、2-メチル-1,3-ジオキソラン、4-メチル-1,3-ジオキソラン、2,2-ジメチル-1,3-ジオキソラン、2-メチル-1,3-ジオキソラン、4-メチル-2-フェニル-1,3-ジオキソラン(ベンズアルデヒドプロピレングリコール)、1,2-ジオキソランおよびその付加物が挙げられる。1,3-ジオキソランは、その好都合な毒性プロファイルおよび商業的入手性のために、1つの特に好ましいジオキソランである。

【0012】

一実施形態では、解析のために顕微鏡下で見ることができ顕微鏡スライドを製造するための組織学検査室におけるプロセスにおいて、ジオキソランを含む組成物が使用される。一実施形態では、ジオキソランを含む組成物は、脱水剤として単独で、または例えば、アルコール、アセトン、キシレンまたはグリコールと組み合わせて(別個にまたは混合物として)使用され得る。別の実施形態では、ジオキソランを含む組成物は、固定プロセス後に脱水剤として、単独で、またはアルコールと組み合わせて(別個にまたは混合物として)使用され得る。さらに、ジオキソランを含む組成物は、組織におけるパラフィンの浸

潤を改善するために、例えば、パラフィンなどの添加剤を用いる浸潤プロセスにおいて使用され得る。

【0013】

透徹剤として、ジオキソランを含む組成物は、100パーセントの濃度で（例えば、100パーセントジオキソラン組成物）使用され得るか、またはより低い組成の（例えば、70パーセント～85パーセントのジオキソランと、残りの別の透徹剤（単数または複数））、炭化水素透徹剤（例えば、キシレン、ヘキサン、鉱油）、酸素ベースの官能基を有する炭化水素透徹剤（例えば、アルコール（例えば、エタノール）、アセテート、エーテル、アセタールなど）または透徹剤の混合物などの別の透徹剤（単数または複数）と組み合わせられ得る。

10

【0014】

以下は、診断のために身体から採取された組織を処理するための解析前プロセスにおける、ジオキソランを含む組成物の例示的使用である。

【0015】

1. 組織の脱水を達成するための、エタノール、メタノール、イソプロパノール、アセトンなどといった脱水試薬またはこのような試薬の組合せの使用と、それに続く、透徹のための、ジオキソランの、独立試薬としての、またはエタノール、キシレンなどといったその他の試薬との混合物としての使用。特定の例として、以下が挙げられる：

a) 脱水のための95～100パーセントエタノールの使用と、それに続く、透徹のための1, 3-ジオキソランの使用；

20

b) 脱水のためのエタノール-イソプロピルアルコール混合物（70：30 v/v）の使用と、それに続く、透徹のための1, 3-ジオキソランの使用；

c) 脱水のためのアセトン-イソプロピルアルコール-エチレングリコール混合物の使用と、それに続く、透徹のための1, 3-ジオキソランの使用；

d) 脱水のための70パーセント試薬エタノール（1～10パーセントイソプロパノールおよびメタノールを用いて変性された無水エタノール）の使用と、それに続く、透徹のための1, 3-ジオキソランの使用；および

e) 最大2パーセント酢酸を含む95～100パーセント試薬エタノールの使用と、それに続く、透徹のための1, 3-ジオキソランの使用。

2. 透徹のための1, 3-ジオキソラン-試薬エタノール混合物（例えば、80：20、85：15、90：10、95：5 v/v）の使用。

30

3. 組織脱水を達成するための脱水混合物の一部としてのジオキソランの使用および独立型の透徹試薬として、または上記で列挙されたものなどの透徹混合物の一部のいずれかとしての、透徹を達成するための再度のジオキソランの使用。脱水のための代表的な混合物として、試薬エタノール（例えば、エタノール）1, 3-ジオキソラン混合物（70：30；50：50および30：70 v/v）が挙げられる。

4. 組織へのワックスの浸潤を促進するための、パラフィンワックス中の添加剤（例えば、パラフィン中、最大20パーセントジオキソラン）としてのジオキソランの使用。

【0016】

脱水、透徹または浸潤プロセスのためのジオキソランを含む組成物は、一般に、数時間の長さである従来の処理プロトコールのために、またはより短い時間の短いプロトコールのために（例えば、60分以下）、従来の組織処理装置で使用され得る。ジオキソランを含む組成物はまた、最大70℃試薬処理温度の高温で実施される処理プロトコールのために従来の組織処理装置でこのようなプロセスにおいて使用され得る。例えば、ジオキソランを単独で、または透徹のための混合物の一部として組織脱水のための試薬アルコールとともに含む組成物が、処理に熱を加えない操作温度で、または60℃の高温の試薬温度で実施され得る。浸潤プロセスのためには、ジオキソランを含む組成物は、およそ65～70℃の温度でパラフィンと組み合わせられ得る。

40

【0017】

ジオキソランを含む組成物はまた、通常の大きさの組織に対して約60分の、およびよ

50

り小さい組織（生検、コアなど）に対してより短い期間の一般的な処理プロトコールのためにマイクロ波補助組織処理を用いる場合に、脱水剤、透徹剤または浸潤剤として使用するのにも適している。

【実施例】

【0018】

以下は、解析前処理におけるジオキソランを含む組成物の使用の具体例を表す。

【実施例1】

【0019】

組織を切断し、10パーセント中性緩衝ホルマリン中で6～24時間固定した。次いで、組織を、試薬アルコール（90～100パーセント）中に30分間入れた。次いで、組織を、1, 3-ジオキソラン中に40分間入れ、マイクロ波処理を用いた。最後に、組織を、約65℃の1, 3-ジオキソラン（5パーセントv/v）と混合したパラフィン中に40分間入れることによって浸潤させた。

10

【実施例2】

【0020】

組織を切断し、10パーセント中性緩衝ホルマリン中で6～24時間固定した。次いで、組織を、2種の連続した試薬アルコール（95～100パーセント）ステーション中に、各15分間（または1種の試薬アルコールステーション中に30分間）入れた。次いで、組織を、2種の連続した1, 3-ジオキソランステーション中に各15分間入れた。最後に、組織を、2種の連続したパラフィン（65℃）ステーション中に各15分間入れることによって浸潤させた。

20

【実施例3】

【0021】

組織を切断し、10パーセント中性緩衝ホルマリン中で6～24時間固定した。次いで、組織を、2種の連続した試薬アルコール（95～100パーセント）ステーション中に各30分間（または1種の試薬アルコールステーション中に30～60分間）入れた。次いで、組織を2種の連続した1, 3-ジオキソランステーション中に各30分間入れた。最後に、組織を2種の連続したパラフィン（65℃）ステーション中に各30分間入れることによって浸潤させた。

【実施例4】

30

【0022】

この実施例では、実施例2の処理プロトコールをたどり、1, 3-ジオキソランステップおよびパラフィンステップに対してマイクロ波補助によって処理を行った。

【0023】

上記の実施例は、脱水、透徹または浸潤である生体サンプルの処理におけるアセタール溶媒（例えば、ジオキソラン）の使用に主に関連していた。アセタール溶媒はまた、固定液としても使用され得る。

【0024】

1, 3-ジオキソランのビルディングブロックは、例えば、ホルムアルデヒドおよびエチレングリコールまたはエチレンオキシドである。1, 3-ジオキソランまたはホルマーグリコールは、ブレンステッド酸触媒もしくはルイス酸触媒の存在下でのホルムアルデヒドのエチレングリコールとの縮合反応によって、または四塩化スズ（ SnCl_4 ）、テトラエチルアンモニウムブロミド（ CH_3CH_2 ） $_4\text{NBr}$ もしくはトルエンスルホン酸（ TsOH ）などの触媒の存在下でのホルムアルデヒドのエチレンオキシドとの反応のいずれかによって工業的に製造される。逆に、ホルムアルデヒドは、加水分解またはその他の方法によって1, 3-ジオキソラン分子を切断することによって得ることができる。

40

【0025】

種々の文献に、アセタールからアルデヒドを形成するための方法が引用されている。1, 3-ジオキソランの加水分解は、縮合反応を逆転させて、比較的穏やかな条件でホルムアルデヒドおよびエチレングリコールを生成させる。反応は、1, 3-ジオキソラン中に

50

塩酸を添加することによって実施され得る。規定度 (N) および容量を変更することによって、反応において種々の量のホルムアルデヒドが生成し得る。6 N HCl の使用は、例えば、室温で約 4 時間で、各モルの 1, 3-ジオキソランに対して 1 モルのホルムアルデヒドを提供する。

【0026】

室温で 30 分から 8 時間の期間、触媒としてアセトンおよびインジウム (III) トリフルオロメタンスルホネート ($\text{In}(\text{OTf})_3$) の存在下で、アセタールおよびケタールの脱保護が示された。反応は、100℃でマイクロ波の使用によって加速され、反応は 5 分～15 分で完了され得る。

【0027】

湿潤ニトロメタン中、室温での環状アセタールの化学選択的切断のために、穏やかなルイス酸触媒 $\text{Er}(\text{OTf})_3$ を使用した。同様に、ほぼ中性 pH での触媒セリウム (III) トリフレートを使用することによる湿潤ニトロメタン中のアセタールの切断のための化学選択的方法は、1～24 時間の期間で高収率を提供した。

【0028】

触媒量のヨウ素の存在下、中性条件下での、数分内での優れた収率での非環式および環式アセタールの脱保護も報告されている。

【0029】

一実施形態では、触媒、温度、圧力、水の添加、マイクロ波およびそれらの組合せによって、系およびプロセスに入れられた 1 種以上の組織とともにその場で、または組織 (単数または複数) の添加の直前のいずれかで 1, 3-ジオキソランが切断される系およびプロセスが記載されている。1, 3-ジオキソランの一部は、加水分解を受けて、ホルムアルデヒドを生成し、これは、組織 (単数または複数) の固定に役立ち、系中の 1, 3-ジオキソラン残りの部分は、組織 (単数または複数) を同時に脱水および透徹することによる組織 (単数または複数) の処理で補助するために利用可能である。記載されるプロセスは、試薬アルコール、エタノール、メタノール、イソプロピルアルコール、アセトンまたは組織透徹を改善する脱水のための種々の濃度の同様の脱水剤を通して入れられる組織とともに使用され得る。

【0030】

典型的には、ヒトまたは動物組織を集め、1, 3-ジオキソランを含有する密閉可能な容器または反応チャンバー中に入れる。容器に、水および数滴の塩酸を添加する。加水分解を、温度および圧力の相対的に穏やかなまたは室内条件下で実施して、ホルムアルデヒドおよびエチレングリコールを生成する。反応において得られたホルムアルデヒドガスは水に溶解されて、ホルマリン固定液を生成する。このプロセスは、バッファー試薬を添加して実施できる。反応はまた、ルイス酸、ブレンステッド酸およびその他の市販の触媒の使用によって触媒され得る。

【0031】

1, 3-ジオキソランなどのアセタールを使用する固定は、新たに得られた、予め凍結されているか、または予め脱水されている組織で実施され得る。1, 3-ジオキソランから得られるホルムアルデヒドは、文献において入手可能な種々の方法によって得ることができる。1, 3-ジオキソランの加水分解反応は、種々のプロトンドナー酸触媒、例えば、塩酸 (HCl)、硫酸 (H_2SO_4)、トルエンスルホン酸触媒などの市販の酸をベースとする触媒ならびにそれだけには限らないが、ヨウ素、臭素、セリウム (III) トリフレートおよびインジウム (III) トリフルオロメタンスルホネートを含めたルイス酸によって達成され得る。系の pH は、リン酸などのバッファー化学物質を使用することによって制御され得る。加水分解反応において使用される酸の濃度の変動は、反応の速度およびホルムアルデヒドの収率を変更する。1, 3-ジオキソラン、脱イオン (DI) 水および触媒の割合は、反応の速度を変更するために、またホルムアルデヒドの収率を変更するために変更され得る。反応の速度は、反応温度を変更することによって変更および変化され得る。より高い温度は、反応の速度を増大し、より低い温度は、低減する。マイ

10

20

30

40

50

クロ波は、反応の速度を最適化するために使用され得る。

【実施例 5】

【0032】

組織固定液としてのジオキソランの使用の一例：

79.5 gm. の 1, 3-ジオキソランに、19.5 gm. の純水を添加する。新たに得たものであっても、予め凍結されたものであっても、脱水されたものであってもよい組織を、1, 3-ジオキソランおよび水の混合物中に入れる。この系に、数滴（例えば、2～4 滴）の 6 N 塩酸を添加し、ホルムアルデヒドガスの逸脱を避けるために反応チャンバーを閉じる。均一混合物を得るために混合が行われる。ジオキソランの酸触媒添加された加水分解反応物は、エチレングリコールおよびホルムアルデヒドを生成し、これは、未反応の水中に溶解すると予測される。新たに形成されたホルマリンは、組織中のタンパク質と反応して、固定を達成し、一方で、ジオキソランは、脂質を除去することによって組織の透徹で役立つ。

10

【0033】

実施

実施 1 は、身体から採取した生体サンプルを、アセタール溶媒を含む組成物を用いて処理することを含む方法である。

【0034】

実施 2 では、実施 1 の方法のアセタール溶媒は、ジオキソランを含む。

【0035】

20

実施 3 では、実施 1 または 2 の方法の生体サンプルの処理は、生体サンプルを固定化することを含む。

【0036】

実施 4 では、実施 3 の方法のアセタール溶媒は、ジオキソランであり、生体サンプルを固定化することは、生体サンプルを、ジオキソラン、触媒および水を含む混合物と接触させることを含む。

【0037】

実施 5 では、実施 1 の方法は、生体サンプルを組成物を用いて処理する前に、生体サンプルを固定することを含む。

【0038】

30

実施 6 では、実施 5 の方法は、生体サンプルを固定した後に、生体サンプルを脱水および透徹することを含み、生体サンプルを組成物を用いて処理することは、少なくとも 1 種の脱水および透徹の少なくとも一部として処理することを含む。

【0039】

実施 7 では、実施 6 の方法は、生体サンプルを組成物を用いて処理する前に、固定された生体サンプルを脱水することを含む。

【0040】

実施 8 では、実施 7 の方法の脱水は、固定された生体サンプルを、アルコールを含む脱水組成物を用いて処理することを含む。

【0041】

40

実施 9 では、実施 7 の方法の脱水組成物は、アセトンおよびグリコールのうち少なくとも 1 種を含む。

【0042】

実施 10 では、実施 6 の方法の脱水は、固定された生体サンプルを、組成物を含む脱水組成物を用いて処理することを含む。

【0043】

実施 11 では、実施 5 の方法は、生体サンプルを固定した後に、生体サンプルを脱水、透徹することおよび生体サンプルを浸潤させることを含み、生体サンプルを組成物を用いて処理することは、生体サンプルを浸潤させることの少なくとも一部として処理することを含む。

50

【0044】

実施12では、実施11の方法の組成物は、パラフィンをさらに含む。

【0045】

実施13では、実施2または3の方法のジオキソランは、1, 3-ジオキソランを含む。

【0046】

実施14は、固定化、脱水、透徹および浸潤プロセスの少なくとも1種として、身体から採取した組織を、アセタール溶媒を含む組成物と接触させることを含む方法である。

【0047】

実施15では、実施1～14のいずれかの方法の生体サンプルは、組織を含む。

10

【0048】

実施16では、実施14の方法のアセタール溶媒は、ジオキソランを含む。

【0049】

実施17では、実施14～16のいずれかの方法のプロセスは、固定化プロセスである。

【0050】

実施18では、実施16の方法のジオキソランは、1, 3-ジオキソランを含む。

【0051】

実施19では、実施14の方法のプロセスは、透徹プロセスである。

【0052】

実施20では、実施19の方法は、生体サンプルを別の透徹剤と接触させることをさらに含む。

20

【0053】

実施21では、実施20の方法の別の透徹剤は、炭化水素透徹剤および酸素ベースの官能基を有する炭化水素透徹剤のうち少なくとも1種を含む。

【0054】

実施22では、ジオキソランおよび実施20の方法の別の透徹剤は、混合物を含む。

【0055】

実施23では、実施12～14のいずれかの方法のプロセスは、脱水プロセスである。

【0056】

実施24では、実施20の方法は、組織をアルコールと接触させることをさらに含む。

30

【0057】

実施25では、実施24の方法のアセタール溶媒およびアルコールは、混合物を含む。

【0058】

実施26では、実施14の方法のプロセスは、浸潤プロセスである。

【0059】

実施27では、実施26の方法は、生体サンプルをパラフィンワックスと接触させることをさらに含む。

【0060】

実施28では、実施27の方法のジオキソランおよびパラフィンは、混合物を含む。

40

【0061】

実施29では、実施1～28のいずれかの方法によって作製された組織サンプルなどの固定された生体サンプル。

【0062】

上記の記載では、説明目的で、実施形態の十分な理解を提供するために多数の具体的な詳細が示されてきた。しかし、当業者には、これらの具体的な詳細の一部を伴わずに、1種以上のその他の実施形態が実行され得るということは明らかであろう。記載される特定の実施形態は、本発明を制限するために提供されるのではなく、それを例示するために提供される。本発明の範囲は、上記で提供される具体例によって決定されてはならず、以下の特許請求の範囲によってのみ決定される。その他の例では、周知の構造、装置および運

50

用は、記載の理解を不明瞭にすることを避けるために、ブロック図の形態で、または詳細は伴わずに示されている。適当と考えられる場合には、参照数字または参照数字の末端部分は、任意選択で、同様の特徴を有し得る、対応するまたは類似の要素を示すために図の間で反復されている。

【0063】

本明細書を通じて「一実施形態 (one embodiment)」、「一実施形態 (an embodiment)」、「1種以上の実施形態 (one or more embodiments)」または「種々の実施形態 (different embodiments)」への言及は、例えば、特定の特徴が、本発明の実施に含まれ得ることを意味すると理解されなければならない。同様に、当然のことではあるが、本開示内容を合理化し、種々の発明の態様の理解を補助する目的で、本記載において、種々の特徴が、単一の実施形態、図またはその説明と一緒にグループ化されることがある。しかし、この開示の方法は、本発明が各特許請求の範囲において明確に列挙されるものよりも多くの特徴を必要とするという意図を反映すると解釈されてはならない。むしろ、以下の特許請求の範囲が反映するように、発明の態様は、単一の開示された実施形態のすべての特徴より少ないものであり得る。したがって、詳細な説明の後の特許請求の範囲は、この詳細な説明にここで明確に組み込まれ、各特許請求の範囲は、本発明の別個の実施形態として独立する

。

フロントページの続き

(56)参考文献 米国特許第06177514 (US, B1)

特表平07-508706 (JP, A)

特表平07-507266 (JP, A)

RW Dapson et al., Glyoxal fixation : how it works and why in only occasionally needs an antigen retrieval., Biotechnic & Histochemistry, 2007年 2月28日, vol.82,no.3, PP .161-166

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98