(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3604389号
(P3604389)
(45)発行日　平成16年12月22日(2004.12.22)　(24)登録日　平成16年10月8日(2004.10.8)

(51)Int.Cl.[7]	F I		
B01J 19/16	B01J	19/16	
// C12Q 1/68	G01N	1/28	U
G01N 1/28	C12Q	1/68	A
G01N 33/531	G01N	33/531	B

請求項の数 27　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平7-514474
(86)(22)出願日　平成6年11月2日(1994.11.2)
(65)公表番号　特表平9-506291
(43)公表日　平成9年6月24日(1997.6.24)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/012627
(87)国際公開番号　WO1995/013987
(87)国際公開日　平成7年5月26日(1995.5.26)
審査請求日　平成13年8月13日(2001.8.13)
(31)優先権主張番号　155,935
(32)優先日　平成5年11月15日(1993.11.15)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ヴェンタナ・メディカル・システムズ、インコーポレイテッド
アメリカ合衆国８５７０５アリゾナ州トゥーソン、ノース・ビジネス・センター・ドライブ３８６５番
(74)代理人
弁理士　青山　葆
(74)代理人
弁理士　柴田　康夫
(72)発明者　ゼーブ、ロン
アメリカ合衆国８５７３７アリゾナ州トゥーソン、ダブリュ・ロードストーン・プレイス１２５１番

最終頁に続く

(54)【発明の名称】高温における蒸発を抑制する液体

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
水性媒体の蒸発を抑制する方法であって、炭素数少なくとも６のアルカンと不揮発性油との混合物から成る蒸発抑制液体で水性媒体を覆うことを含んで成り、アルカンは、混合物を水性媒体表面上に浮き易い密度とするのに充分な量で混合物中に存在し、不揮発性油は、高温における混合物の蒸発を抑制するのに充分な量で混合物中に存在する方法。
【請求項２】
アルカンの炭素数が10～20である請求項１記載の方法。
【請求項３】
アルカンはオクタデカンである請求項１記載の方法。
【請求項４】
アルカンは、炭素数15～20のアルカンの混合物である請求項１記載の方法。
【請求項５】
アルカン混合物は、分枝鎖アルカンおよびシクロアルカンから成る請求項４記載の方法。
【請求項６】
アルカン混合物の３分の２は分枝鎖アルカンから成り、３分の１はシクロアルカンから成る請求項５記載の方法。
【請求項７】
不揮発性油は植物油である請求項１記載の方法。
【請求項８】

植物油は精製食用植物油である請求項７記載の方法。
【請求項９】
植物油は、キャノーラ、ダイズ、ベニバナ、ヒマワリ、トウモロコシ、綿実およびオリーブから成る群から選択する請求項８記載の方法。
【請求項１０】
植物油はキャノーラ油である請求項９記載の方法。
【請求項１１】
アルカンは混合物の２０～80％を占め、不揮発性油は混合物の８０～20％を占める請求項１記載の方法。
【請求項１２】
アルカンは混合物の４０～60％を占め、不揮発性油は混合物の４０～60％を占める請求項11記載の方法。
【請求項１３】
アルカンと不揮発性油とが等量存在する請求項12記載の方法。
【請求項１４】
蒸発抑制液体の密度は０.90g/ml以下である請求項１記載の方法。
【請求項１５】
蒸発抑制液体の密度は０.88g/ml以下である請求項14記載の方法。
【請求項１６】
混合物は、蒸発抑制液体と水性媒体との接触面積を最大するのに充分な量で存在する界面活性剤を更に含有する請求項１記載の方法。
【請求項１７】
界面活性剤はポリオキシエチレンエーテルである請求項16記載の方法。
【請求項１８】
界面活性剤はポリオキシエチレン10オレイルエーテルである請求項17記載の方法。
【請求項１９】
水性媒体の蒸発を抑制する方法であって、オクタデカン、および３分の２が分枝鎖アルカンで、３分の１がシクロアルカンである炭素数15～20アルカン混合物から成る群から選択するアルカン４０～60％；植物油４０～60％；並びに蒸発抑制液体と水性媒体との接触面積を最大にするのに充分な量で存在する界面活性剤から成る蒸発抑制液体で、水性媒体を覆うことを含んで成る方法。
【請求項２０】
植物油はキャノーラ油である請求項19記載の方法。
【請求項２１】
混合物はアルカンおよびキャノーラ油を等量含有し、ポリオキシエチレン10オレイルエーテルを０.1％含有する請求項19記載の方法。
【請求項２２】
炭素数少なくとも６のアルカンと不揮発性油との混合物から成る蒸発抑制液体であって、アルカンは、混合物を水性媒体表面上に浮き易い密度とするのに充分な量で混合物中に存在し、不揮発性油は、高温における混合物の蒸発を抑制するのに充分な量で混合物中に存在し、混合物は蒸発抑制液体と水性媒体との接触面積を最大にするのに充分な量で存在する界面活性剤を更に含有する蒸発抑制液体。
【請求項２３】
界面活性剤はポリオキシエチレンエーテルである請求項22記載の蒸発抑制液体。
【請求項２４】
界面活性剤はポリオキシエチレン10オレイルエーテルである請求項23記載の蒸発抑制液体。
【請求項２５】
オクタデカン、および３分の２が分枝鎖アルカンで、３分の１がシクロアルカンである炭素数15～20のアルカン混合物から成る群から選択するアルカン４０～60％；植物油４０～

60％；並びに蒸発抑制液体と水性媒体との接触面積を最大にするのに充分な量で存在する界面活性剤から成る蒸発抑制液体。
【請求項２６】
植物油はキャノーラ油である請求項25記載の蒸発抑制液体。
【請求項２７】
混合物はアルカンおよびキャノーラ油を等量含有し、ポリオキシエチレン10オレイルエーテルを０.1％含有する請求項25記載の蒸発抑制液体。
【発明の詳細な説明】
発明の分野
本発明は、改善された、高温において使用する蒸発抑制液体に関する。
発明の背景
免疫組織化学またはin situハイブリダイゼーション反応において、スライド上の反応混合物がインキュベーション中に蒸発するのを防止しなければならない。このことは、反応混合物が少量であって、とりわけ加熱により反応速度を調節または増大する場合に、特に重要である。蒸発が起これば、試薬濃度が変化し、組織切片が乾燥し得る。いずれの状況も、誤った結果をもたらす。
蒸発の抑制のために、従来は、スライドを加湿室内に置くか、またはスライドにガラスもしくはプラスチック製のカバースリップを載せ、カバースリップ側部を封止している。しかし、いずれの方法も煩雑で時間がかかり、自動化が容易でない。しかも、カバースリップを使用すると、組織切片を損傷するか、またはカバースリップを外す際に組織切片もスライドから取り去ってしまう恐れがある。
国際特許出願PCT/US91/01108（1991年９月５日公開；公開番号WO91/13336）に記載の改善された方法によると、水相と非混和性で、水相よりも密度の小さい蒸発抑制液体で、水性反応混合物を覆うことによって、蒸発を抑制する。好ましい態様においては、蒸発抑制液体は、炭素数６～18の非芳香族炭化水素、好ましくはペンタデカン（鉱油）である。蒸発抑制液体が反応混合物表面を覆い、試薬の蒸発が防止される。
上記方法は、周囲温度が約70℃未満である場合に適用できる。しかし、70℃およびそれ以上の温度では、鉱油の保護層が蒸発し、その結果、保護効果が低下する。この低下は、100℃では非常に急速（５分未満）であり得る。ある種の検出化学手段は、そのような高温（名目上95℃;68～110℃の範囲）で行う必要があるので、所期の化学的手段の温度条件下に蒸発に対して抵抗性で、他にも好ましい性質を有する保護被覆が望まれる。
発明の概要
本発明は、高温（例えば70～110℃）での使用に適当な、液体の蒸発抑制剤を提供する。
本発明の蒸発抑制液体は、アルカン（直鎖、分枝鎖もしくはシクロアルカン、またはそれらの混合物）および不揮発性油、並びに、好ましい態様においては界面活性剤の混合物から成る。アルカンは好ましくは、炭素数10～20の鉱油または蝋である。不揮発性油は好ましくはシリコーン油、または好ましくは植物油、最も好ましくはキャノーラ油である。混合物が水性媒体表面上に浮く密度となるよう、充分量でアルカンが混合物中に存在する。不揮発性油は、70℃を越える温度で混合物の蒸発を抑制するのに充分な量で、混合物中に存在する。界面活性剤が存在する場合、蒸発抑制液体と水性媒体との接触面積を最大とするのに充分な量で混合物中に存在する。
発明の説明
本発明は、高温で使用する液体の蒸発抑制剤を提供する。本発明の蒸発抑制液体は、アルカンおよび不揮発性油の混合物から成る。アルカンは、混合物が水性媒体表面上に浮くのを促進するよう、混合物密度を水密度よりも充分小さくするのに充分な量で、混合物中に存在する。不揮発性油は、高温における混合物の蒸発を抑制するのに充分な量で、混合物中に存在する。好ましい態様においては、界面活性剤が、蒸発抑制液体と水性媒体との間の接触面積を最大とするのに充分な量で、混合物中に存在する。
本発明の蒸発抑制液体は、少量の試薬を高温（室温よりも高い温度）に保ってスライド上で行うアッセイに、特に有用である。本発明の蒸発抑制液体は、例えばin situハイブリ

ダイゼーションおよび加熱による抗原脱マスキング処理のように、処理を高温で行い、試薬濃度が重要である場合に、特に有用である。本発明の蒸発抑制液体は、20～70℃で行う試薬濃度の重要なアッセイ、例えば、中程度の温度で行うELISAアッセイ、免疫組織化学およびin situハイブリダイゼーション（例えばRNA標的の検出）にも適当である。

本発明の蒸発抑制液体は、次のような性質を有する：蒸発抑制液体は、水相中で起こる反応を妨害しない。蒸発抑制液体は、反応の実施温度よりも明らかに高い沸点を有する。蒸発抑制液体の沸点は、好ましくは150℃を越え、より好ましくは200℃を越える。蒸発抑制液体は好ましくは、適用容易な低粘度を有する。

アルカン

本発明において、「アルカン」とは、脂肪族炭化水素であって、炭素数が１ないし50を越える直鎖（式C_nH_{2n+2}で示される、ｎ－パラフィン系炭化水素）、もしくは分枝鎖、または環式炭素鎖を有するものを意味する。本発明において有用なアルカンは、炭素数が少なくとも約６である。好ましい直鎖アルカンは、C6～C17炭化水素（通常、鉱油と称される）、およびC18～C20炭化水素（室温で固体であり、通常、蝋と称される）を包含する。より好ましい直鎖アルカンは、炭素数10（デカン）ないし20（イコサン）の中程度の鎖長のアルカンであり、蝋のオクタデカン（C18）が特に好ましい。アルカンが分枝状または環式である場合は、好ましいアルカンは、炭素数が20を越えるものであり得る。アルカン混合物を使用してもよい。最も好ましいアルカンは、約３分の２が分枝鎖アルカンで、約３分の１がシクロアルカンであるC15～C20アルカン混合物であり、これはイソパー（ISOPAR）Ｖ［CAS番号64742－46－7;テキサス州ヒューストンのエクソン・ケミカル・アメリカズ（Exxon Chemical Americas）］の名称で市販されている。

前記のようなアルカンは、免疫組織化学およびin situハイブリダイゼーション反応において蒸発を抑制するのに有用な、次のような性質を有する：アルカンは、免疫組織化学およびin situハイブリダイゼーションにおいて使用する水性反応混合物中で実質的に不活性で、非混和性である。従って、アルカンは、水相中の化学反応を妨害しない。アルカンは、水よりも明らかに小さい密度を有するので（0.73～0.86）、水相上に容易に浮く。アルカンは、免疫組織化学またはin situハイブリダイゼーションに必要な温度範囲よりも充分高い沸点を有する（沸点174～320℃）。

前記アルカンはいずれも、前記のような不可欠な性質に加えて、前記反応において使用するために望ましい更なる性質を有する：液体アルカンは、融点が室温よりも低く、適用が容易である。アルカンは、容易な適用に寄与する比較的低い粘度をも有する。蝋は、溶融するまで加熱してから、油と混合することによって使用する。得られる混合物（蝋が40重量％までの混合物を試験した）は、室温で液体で、適当な粘度を有する。アルカンはまた、安価であり、高純度のものを入手し得る。

しかし、前記アルカンは、単独で使用すると、90℃またはそれ以上の温度で発煙する。発煙は、アルカンの保護層が高温で蒸発し、その結果、保護効果が低下することを意味する。

不揮発性油

本発明において、「不揮発性油」とは、顕著な蒸発無く、水の沸点まで加熱し得る油を意味する（例えば、100℃における損失が、30分間で１％未満）。不揮発性油は、シリコーン油、植物油、および同様の性質を有する他の油を包含する；そのような性質は、詳細に後述し、第１表に示す。植物油が最も好ましい。

本発明において、「植物油」とは、一般的な意義を有し、野菜または果実から油が誘導されるいずれの植物の油をも意味する。植物油は好ましくは精製食用油であり、例えばナタネ（キャノーラ）、ダイズ、ベニバナ、ヒマワリ、トウモロコシ、綿実およびオリーブから誘導し得る。後述の性質を有するいずれの植物油も適当である。より好ましい植物油は、揚物に適した植物油である。エルカ酸含量の低いキャノーラ油は、耐酸化性に優れ、熱分解にも抵抗性であるので、最も好ましい。

前記のように、適当な不揮発性油は、顕著な蒸発無く、水の沸点まで加熱できるものでなければならない。好ましくは、不揮発性油を100℃に30分間加熱した場合の蒸発による損

失は、出発重量の１％未満である。不揮発性油は好ましくは、200℃を越える沸点を有する。不揮発性油は、アルカンと均一な混合物を形成し得る。
そのような性質を有する好ましい不揮発性油は、シリコーン油である。シリコーン油は、多くの供給源、例えばミズーリ州セントルイスのシグマ・ケミカル社（Sigma Chemical Company）（製品番号M6884、CAS番号8020－83－５）から市販されている。
より好ましい不揮発性油は、植物油または植物油の混合物である、本発明の蒸発抑制液体混合物中に使用するのに適した不揮発性油の性質を、下記第１表に挙げる。油の密度および粘度を除いては、シリコーン油も同様の性質を有する。

第１表

性質	適当な範囲	特に適当な範囲
引火点	２５０～３５０℃	＞３００℃
発煙点	１７５～２５０℃	＞２２５℃
密度	０.８９～０.９６g／ml	＜０.９２g／ml
粘度	１５～１９cP	＜１７cP
水溶性	不溶	不溶
水性媒体被覆能	部分的～完全	完全
アルカンに対する溶解性	部分的～可溶	可溶

好ましい植物油は、高温における油の変質を防止するトコフェロールまたは他の適当な抗酸化性物質を高濃度に含有する。しかし、植物油の実際の化学組成は、それによって必要な物理的性質が達成される限り、特に重要ではない。植物油の更なる利点は、ほぼ完全に安全（無毒性）であり、同様の物理的性質を有する他の化合物が有し得る問題が無いということである。しかも、植物油は大量に入手容易であり、比較的安価である。好ましい植物油のおよその化学組成を、第２表に示す。

第２表

脂肪酸(トリグリセリドとして)	% （範 囲）
１６:０	３ （１－１２）
１８:０	１ （０.５－６）
１８:１	６０ （１０－７０）
１８:２ n－６	２０ （１０－７０）
１８:３ n－３	１３ （０.５－１５）
２０:０	１ （０.５－１０）
２０:１	１ （０.５－１０）
２２:０	＜１ （＜１－５）
２２:１	＜１ （＜１－５０）
ステロール	０.５（０－４）
	mg／kg(範囲)
トコフェロール	８７３（５０－１５００）

界面活性剤

前記のように、本発明の混合物は、好ましくは界面活性剤を含有する。界面活性剤を意味して使用する他の用語は、例えば、湿潤剤、洗剤、可溶化剤、および石鹸を包含する。界面活性剤の性質は、分子の親水性部分と親油性部分との全体的なバランスに、ある程度影響される。そのようなバランスは、HLB値と呼ばれる一つの数値で表すことができ、水溶液または油溶液中の界面活性剤の挙動の指標となる。HLB値が10よりも大きい界面活性剤は概ね親水性であり、10よりも小さい（ただし０よりも大きい）界面活性剤は概ね親油性である。

本発明においては、中程度のHLB値（好ましくは約５～15のHLB値）に対応する性質を有する界面活性剤が好ましい。しかし、水／油界面において所望の分離効果をもたらす界面活性剤はいずれも、本発明の目的に適当である。

界面活性剤は、in situハイブリダイゼーションのための試薬、免疫組織化学染色試薬、および免疫化学試薬全般と適合性であるべきであり、生化学者がタンパク質および膜成分の可溶化に使用するノニオン性生物的洗剤のいずれであってもよい。ポリオキシエチレンソルビタンおよびポリオキシエチレンエーテルが好ましい。ブリッジ（BRIJ）の名称で市販されている界面活性剤が、より好ましい。最も好ましいのは、HLB値約12.4のポリオキシエチレン10オレイルエーテル（ブリッジ96の名称で市販されている;CAS番号9004－98－2;ミズーリ州セントルイスのシグマ・ケミカル社）である。

混合物

本発明の蒸発抑制液体は、アルカン、不揮発性油、および好ましくは界面活性剤の混合物である。アルカンは、混合物が撹拌下に水性媒体と混じらない密度となり、また、水性媒体を覆うように、充分な量で混合物中に存在する。不揮発性油は、高温における混合物の蒸発を抑制するのに充分な量で、混合物中に存在する。高温における混合物の蒸発抑制とは、95℃で30分後に混合物の蒸発が35％以下、好ましくは25％以下であるように、充分な濃度で不揮発性油が存在することを意味する。（この測定条件に関しては、実施例４参照）。

アルカンは、単独で蒸発抑制液体として使用すると、高温で発煙および蒸発するという欠

点を有する。この蒸発の問題は70℃を越える温度で起こり、90℃またはそれ以上の温度では、より深刻である。発煙は、蒸発による油の損失の目に見える兆候である。発煙は、油の燃焼を意味しない。不揮発性油は、20～100℃の温度で、目に見える発煙を顕著に減少する。蒸発抑制液体が水性媒体上に途切れのない連続相を形成する有用時間が、高温において不揮発性油によって延長される。

不揮発性油を単独で使用すると、水性媒体上のフィルムに、小さい孔が生じる傾向がある。しかも、不揮発性油は水性媒体密度に非常に近い比較的高い密度（約0.92～0.96g/ml）を有するので、既にスライド上で不揮発性油で覆ってある水性媒体に水性試薬を追加しようとしても、油が妨げとなる。更に、不揮発性油は、比較的適用し難い粘度を有する（25℃において、植物油約15～19cP、シリコーン油約175～225cP）。

適当な比率で使用すると、アルカンは不揮発性油の密度を低下し、混合物は、蒸発抑制液体の水相上での一様な広がりを促進するような密度を有することとなる。更に、アルカンを加えることにより、組織切片に水性媒体を、蒸発抑制液体を通して追加適用し易くなる。アルカンは混合物の粘度をも低下するので、適用がより容易になる。不揮発性油は、混合物に、70℃を越え、100または110℃までの温度における蒸発に対する抵抗性を付与する。すなわち、不揮発性油に対するアルカンの寄与は、アルカンを加えない不揮発性油と比較して、全体としての粘度の低下、全体としての密度の低下、および混合物の水性媒体上の展延性の向上である。

本発明の混合物のもう一つの性質は、水性媒体の表面積：体積比を大幅に高めるように、水性媒体を覆ってそれを圧し広げるという傾向である。この効果は、界面活性添加剤の存在により、向上する。このような性質が有用なのは、スライド上にガラス製カバースリップを配置する従来の方法と同様に、蒸発抑制液体が水性媒体を蒸発から保護すると共に、非常に少量の水性媒体をスライド上で大きい面積に広げるので（界面活性剤の作用による）、水性試薬の費用を大幅に削減し得るからである。

好ましくは、アルカンと不揮発性油とを、アルカン80％（v/v）ないし不揮発性油80％（v/v）の比率で混合する。そのような混合物の密度は、約0.80～0.89g/mlの範囲である。混合物は、アルカンを好ましくは約30～70％、より好ましくは40～60％含有する。実質的に等体積のアルカンおよび不揮発性油（すなわち、アルカン：不揮発性油＝1:1）から成る、25℃における密度が約0.87g/mlの混合物が最も好ましい。

界面活性剤を使用する場合、界面活性剤は、蒸発抑制液体と水性媒体との接触面積を最大にするのに充分な量で、混合物中に存在する。界面活性剤のこのような作用は、界面活性剤が１分子中に２つの領域を有することによる。一方の領域は親水性であり、それ故水性媒体中に分配される。もう一方の領域は親油性であり、それ故、蒸発抑制液体中に分配される。従って、それぞれの界面活性剤分子が同時に、蒸発抑制液体と、その下の水相との両方に引き付けられる。この化学的誘引により、２つの液体が近接する。この効果が、水性媒体全体の上に途切れのない滑らかな保護層を形成すること、水性媒体が表面積の大きい薄いフィルムとなって展延することを促進する。好ましくは、界面活性剤は、0.01～3.0重量％の量で存在する。より好ましくは、界面活性剤は0.05～0.5重量％の量で存在する。最も好ましい態様においては、界面活性剤は0.1重量％の量で混合物中に存在する（アルカン／不揮発性油混合物100mlに対し、0.1g加える）。

２種の油を適当な比率で混合すると、所望の高温における耐蒸発性、低密度、および良好な表面性（水相を覆う、途切れのない均一な保護油層の形成を可能にする）を包含する好ましい性質が、混合物に付与される。このような好ましい性質は、非常に広い温度範囲にわたって保たれるので、本発明の新規混合物は、低温（例えば20～40℃）および中程度の温度（例えば41～69℃）でも、高温（例えば70～100℃）でも使用し得る。界面活性剤を加えると、混合物の表面性が改善される。

蒸発抑制液体の調製

蒸発抑制液体は、アルカンおよび不揮発性油を適当な比率で混合することによって調製する。界面活性剤を使用する場合は、次いで、適量の界面活性剤を加え、界面活性剤がアルカン／不揮発性油混合物に充分溶解するまで混合を続ける。混合後、蒸発抑制液体を、透

明または不透明のガラスまたはプラスチック製ボトルに入れて、室温で貯蔵し得る。

蒸発抑制液体の使用

蒸発抑制液体は、スライドまたは他のアッセイ面上に、水性媒体または組織切片を覆うのに充分な量で適用することによって使用する。in situ適用には、約800μｌの使用が好都合である。免疫組織化学染色適用には、組織切片上の水性試薬を有利に覆うのに、500～800μｌまたはそれ以下の量で充分であり得る。しかし、水性媒体の量が約300μｌよりも多い場合は、その表面を覆うのに1000μｌまたはそれ以上の量を使用することが必要であり得る。通例、蒸発抑制液体の量が多過ぎてはならない。組織片および試薬が覆われれば、それで蒸発抑制液体の適用量は充分である。

蒸発抑制液体の使用は、ガラスもしくはプラスチック製のカバースリップ、または加湿室を使用する従来の方法よりも有効かつ有利である。本発明の蒸発抑制液体は、数滴をスライドに適用するだけで、容易に水相上に浮く。蒸発抑制液体は、スライドを少量の水で洗うことにより、容易に除去できる。更に、蒸発抑制液体相の動的性質の故に、水相は蒸発抑制液体相を通って沈むので、水相試薬をどのような順序で加えることもでき、従来の方法におけるようにカバースリップを載せるか、または加湿室内に入れるよりも、確実に蒸発を抑制することができる。

蒸発抑制液体を適所に配置して、水相を混合し得る。スライドを従来の撹拌機上に置くことによって、水相を混合し得る。ヴェンタナ（VENTANA）320［アリゾナ州トゥーソンのヴェンタナ・メディカル・システムズ社（Ventana Medical Systems,Inc.）］の名称で市販されている好ましい自動装置は、スライドにエアジェットを当てることによって、水相を混合する。蒸発抑制液体は、混合中にスライド上の適所に水相試薬を有効に保持する。in situハイブリダイゼーション反応に対しては、DNAを通例、約95℃で変性することに注意すべきである。本発明の蒸発抑制液体は、95℃で充分有効である。従来の反応において蒸発抑制のために使用する加湿室は通例、内部の蒸気圧が蒸発を抑制するほど充分高くはないので、効果的でない。

以下の実施例によって本発明を更に説明するが、実施例は本発明を制限するものではない。構成上実施する手順は現在形で、実験室で行った手順は過去形で記載する。

実施例１

蒸発抑制液体の調製

本発明の好ましい一態様において、本発明の蒸発抑制液体を次のように調製した。

好ましいアルカンであるイソパーＶ油（CAS番号64742－46－7;テキサス州ヒューストンのエクソン・ケミカル・アメリカズ）（50ml）と、好ましい不揮発性油であるキャノーラ油［CAS番号8002－13－9;カリフォルニア州フラートンのハント－ウェソン社（Hunt－Wesson,Inc.）］（50ml）とを混合した。この製剤を、褐色の高密度ポリエチレンボトルに入れて、室温で貯蔵した。

実施例２

蒸発抑制液体の調製

本発明の好ましい一態様において、本発明の蒸発抑制液体を次のように調製した。

実施例１に記載したように、イソパーＶ油とキャノーラ油との混合物を調製した。混合後、アルカン／不揮発性油混合物に、界面活性剤であるポリオキシエチレン10オレイルエーテル（CAS番号9004－98－2;ブリッジ96の名称で市販されている；ミズーリ州セントルイスのシグマ・ケミカル社）（0.1g）を加え、界面活性剤が全部完全に溶解するまで、室温で混合を続けた（約10分間）。この製剤を、褐色の高密度ポリエチレンボトルに入れて、室温で貯蔵した。

実施例３

in situハイブリダイゼーションアッセイ

実施例１に記載のように、蒸発抑制液体を調製した。

ヒト頸管生検のホルマリン固定し、パラフィン包埋した組織切片中のヒト乳頭腫ウイルスを検出するために、下記のような手順を行った。

1.　スライドを58±２℃で約17時間ベーキング後、室温に冷却する。

2. 組織切片を、キシレンで５分間ずつ２回、脱パラフィンする。
3. 切片を、無水エタノールで５分間ずつ２回洗う。
4. 切片を風乾する（約５～10分間）。
5. 消化溶液［50％プロピレングリコール;0.025Mトリス（Tris）/HCl、pH7.4;0.3mMメタ重亜硫酸ナトリウム;5mM塩化カルシウム;0.05％チメロサール（Thimerosal）;0.025u/mlタイプVIIIアルカリ性プロテアーゼ］（200μｌ）を、各スライドに適用する。
6. 蒸発抑制液体（600μｌ）を、各スライドに適用する。
7. スライドを37℃に加温し、15分間インキュベートする。
8. 消化溶液および蒸発抑制液体を、各スライドから除去する。
9. １×SSC（150mM塩化ナトリウム;15mMクエン酸ナトリウム）（200μｌ）、および蒸発抑制液体（600μｌ）を、各スライドに適用し、37℃で４分間インキュベートする。
10. 液体をスライドから除去する。
11. ステップ９および10を３回繰り返す。
12. プレハイブリダイゼーション溶液［溶液5.0ml当たり、ホルムアミド（シグマ番号7508）2.5ml;25％デキストランスルフェート（シグマ番号Ｄ－8906）1.5ml;20×SSC0.5ml;PBS 0.5mlを使用］（200μｌ）、および蒸発抑制液体（600μｌ）を適用し、37℃で４分間インキュベートする。
13. 液体をスライドから除去する。
14. ステップ12および13を繰り返す。
15. プローブ溶液［HPVオムニプローブ（OmniProbe）セット；ダイジーン・ダイアグノスティクス社（Digene Diagnostics,Inc.）；カタログ番号4206－1032］（100μｌ）、および蒸発抑制液体（600μｌ）を、各スライドに適用する。
16. スライドを95℃に加温し、５分間温度を保つ。
17. スライドを37℃に温度低下し、２時間温度を保つ。
18. 液体をスライドから除去する。
19. ウォッシュ・ソリューション（Wash Solution）番号２［１×SSC;2％w/vウシ血清アルブミン（BSA）;0.05％プロクリン（PROCLIN）－300抗生物質（スペルコ（Supelco）、カタログ番号４－8127、pH7）］（800μｌ）を予め37℃に加温したものを適用する。４分間インキュベートする。
20. 液体をスライドから除去する。
21. ステップ19および20を４回繰り返す。
22. 検出試薬［0.5Mトリズマ（Trizma）塩基;0.3％（w/v）ヤギグロブリン（シグマ・ケミカル社、カタログ番号G5640）;0.05％（w/v）プロクリン－300抗生物質;0.014％（w/v）$ZnCl_2$;0.125％（v/v）ストレプトアビジン－アルカリ性ホスファターゼ（タゴ（TAGO）、カタログ番号6567）］（200μｌ）、および蒸発抑制液体（600μｌ）を、各スライドに適用する。
23. スライドを、37℃で30分間インキュベートする。
24. 液体をスライドから除去する。
25. 基質緩衝液（100mMトリス;100mM NaCl;50mM $MgCl_2$;pH9.5）（800μｌ）を適用する。37℃で４分間インキュベートする。
26. 液体をスライドから除去する。
27. ステップ25および26を３回繰り返す。
28. 基質溶液［基質１（５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリルホスフェート色素のジメチルホルムアミド溶液）および基質２（ニトロブルーテトラゾリウム色素のジメチルホルムアミド溶液；ダイジーン・キット・カタログ番号4206－0100）を0.1mlずつ含有する基質緩衝液40ml］（200μｌ）、および蒸発抑制液体（600μｌ）を、各スライドに適用する。
29. 37℃で30分間インキュベートする。
30. 加温を止め、液体をスライドから除去する。
31. 洗浄緩衝液（800μｌ）を適用し、37℃で４分間インキュベートする。

32. 液体をスライドから除去する。
33. ステップおよび32を３回繰り返す。
34. 対比染色剤［ヌクレアー・ファスト・レッド・ステイン（Nuclear Fast Red Stain）］（200μｌ）、および蒸発抑制液体（600μｌ）を適用する。
35. １分間インキュベートする。
36. 液体をスライドから除去する。
37. 洗浄溶液（800μｌ）を適用し、４分間インキュベートする。
38. 液体をスライドから除去する。
39. ステップ37および38を３回繰り返す。
40. 洗浄緩衝液（0.05%プロクリン－300抗生物質を含有する100mMトリズマ塩基）の容器にスライドを浸す。
41. 切片を、95%エタノール中で１分間、次いで無水エタノール中で１分間、脱水する。
42. 切片をキシレンで１分間洗う。
43. 切片に永久封入剤を載せ、結果を光学顕微鏡で観察する。

実施例４

RNA in situハイブリダイゼーションアッセイ

実施例２に記載のように、蒸発抑制液体を調製した。

SCID（重症複合型免疫不全症候群）のマウスにおいて増殖したヒトＢ細胞リンパ腫の、ホルマリン固定したパラフィン包埋組織切片中における、エプスタイン－バールウイルス（EBV）コード化RNA（EBER－２）を検出するために、下記手順を行った。

1. スライドを、58±２℃のオーブン内で少なくとも１時間ベーキング後、室温に冷却した。
2. スライドを、キシレンで５分間ずつ２回、脱パラフィンし、次いで、無水エタノールで５分間ずつ２回洗った。
3. スライドを風乾した（約５～10分間）。
4. 切片を１×SSC（150mM NaCl;15mMクエン酸ナトリウム;pH7.0）（500μｌ）で湿潤した後、各スライドの端を吸収体であるペーパータオルに軽く当てて、過剰のSSCを除去した。
5. 消化試薬［0.1Mトリズマ塩基、5mM EDTA、pH7.5;プロテイナーゼＫ（ストラタジーン（Stratagene）カタログ番号300140）２μg/ml含有］（400μｌ）、および蒸発抑制液体（800μｌ）を、各スライドに適用し、スライドを40℃に５分間加温した。
6. スライドを、１×SSC（約3.0mlずつ）で３回洗った。
7. 各スライドの端を吸収体であるペーパータオルに軽く当てることによって、液体を除去した。
8. プレハイブリダイゼーション溶液［10.0ml当たり、ホルムアミド2.5ml;20×SSC2.0ml;1Mリン酸ナトリウム0.5ml;200mM EDTA0.5ml;30%デキストランスルフェート3.33ml;滅菌脱イオン水0.52ml;100μg/mlサケ精子DNA0.1ml;50×デンハルト溶液（50×デンハルト溶液は、フィコール5g、ポリビニルピロリドン5gおよびBSA5gを脱イオン水500mlに加え、溶解するまで混合することによって調製する）1.0ml］（200μｌ）を、各スライドに適用し、スライドを40℃で４分間インキュベートした。
9. ステップ７に記載のようにして、液体を除去した。
10. ハイブリダイゼーション溶液（プレハイブリダイゼーション溶液に、ジゴキシゲニン標識した一本鎖EBER－２特異的オリゴヌクレオチドを、終濃度１μg/mlで加えたもの）（200μｌ）、および蒸発抑制液体（800μｌ）を、各スライドに適用し、スライドを75℃に５分間加温した。
11. スライドを40℃にし、15分間インキュベートした。
12. ステップ７に記載のようにして、液体を除去した。
13. バッファー（Buffer）番号２［ベーリンガー・マンハイム（Boehringer Mannheim）、カタログ番号1175－041］（400μｌ）を、各スライドに適用し、スライドを40℃で４

分間インキュベートした。
14．ステップ７に記載のようにして、液体を除去した。
15．検出試薬［0.33%抗ジゴキシゲニンアルカリ性ホスファターゼを含有するバッファー番号２（ベーリンガー・マンハイム、カタログ番号1175－041）］（400μｌ）および蒸発抑制液体（800μｌ）を、各スライドに適用し、スライドを40℃で15分間インキュベートした。
16．ステップ７に記載のようにして、液体を除去した。
17．スライドを、１×SSC（約3.0mlずつ）で３回洗った。１×SSCの最後の適用の後、蒸発抑制液体（800μｌ）を各スライドに適用し、スライドを40℃で４分間インキュベートした。
18．ステップ17を繰り返した。
19．ステップ７に記載のようにして、液体を除去した。
20．バッファー番号３（ベーリンガー・マンハイム、カタログ番号1175－041）（400μｌ）、および蒸発抑制液体（800μｌ）を、各スライドに適用し、スライドを40℃で４分間インキュベートした。
21．ステップ７に記載のようにして、液体を除去した。
22．基質溶液［Ｘ－ホスフェート35μｌおよびNBT45μｌを含有するバッファー番号３（ベーリンガー・マンハイム、カタログ番号1175－041）］（400μｌ）、および蒸発抑制液体（800μｌ）を、各スライドに適用し、スライドを40℃で30分間インキュベートした。
23．ステップ７に記載のようにして、液体を除去した。
24．ステップ17に記載のようにして、スライドを洗った。
25．ステップ６に記載のようにして、スライドを洗った。
26．スライドを、95%エタノール中で１分間、次いで無水エタノール中で１分間、脱水した。
27．スライドをキシレンに１分間浸すことによって、切片を洗った。
28．切片に永久封入剤を載せ、結果を光学顕微鏡で観察した。

実施例４

蒸発試験

この試験は、アルカンと不揮発性油との混合物の使用が、どちらか一方のみの使用よりも有利であることを示すものである。
予め重量測定した標準的な顕微鏡スライドガラスに、好ましい不揮発性油であるキャノーラ油、もしくはアルカンであるペンタデカン、またはその油とアルカンとの混合物（キャノーラ：ペンタデカン＝1:1）を、500μｌの量で適用した。スライドを再度重量測定し、その総重量からスライド重量を差し引いて、油の初期重量を求めた。次いで、予め所定の温度に調節しておいたホットプレートに、スライドを載せた。スライドを所定の温度のホットプレート上に30分間放置した後、ホットプレートから外し、室温に冷却し、重量測定した。その加熱後の総重量からスライド重量を差し引いて、油の残留量を求めた。油の初期重量と、加熱後の残留重量との対比により、損失率（%）を計算した。いずれの試験も３標本に対して行い、データは、平均損失率±標準偏差（重量%）として表す。油の損失率（重量%）を、第４表に示す。

第４表

	サンプル		
温度(℃)	ペンタデカン	キャノーラ油	混合物
４０	１．９±．９	０．１±．１	１．４±．４
６０	７．７±１	０．４±．１	３．３±．５
８０	２５．４±５	０．７±．２	７．９±．６
１００	５０．６±６	０．４±．１	２５．７±．７
１１０	８３　±９	０．１±０	３２　±２

第４表からわかるように、不揮発性油をアルカンに加えると、その混合物の高温における蒸発は顕著に軽減される。

実施例５

界面活性剤の使用

実施例１に記載のように、蒸発抑制液体を調製した。スライド上の水性媒体（１×SSC 100μｌ）に蒸発抑制液体（500μｌ）を適用すると、水性媒体はそれ自体収縮して、外面全部（液滴底部はスライドと接触するので、それ以外の面）が蒸発抑制液体で包囲された小さい球状の液滴を形成した。水性媒体は、蒸発に対して保護されていた。しかし、球状構造を形成する傾向の故に、一定量の水性媒体が覆うことのできる組織の量は少量に過ぎなかった。

実施例１に記載のように調製した蒸発抑制液体に、界面活性剤であるポリオキシエチレン10オレイルエーテル（CAS番号9004－98－2;ブリッジ96の名称で市販されている；ミズーリ州セントルイスのシグマ・ケミカル社）（0.1g）を加えた。この界面活性剤含有混合物を、前記のように水性媒体に適用した。界面活性剤含有混合物を使用した場合は、水性媒体の挙動は大きく異なっていた。水性媒体は、球状とならずに平らになって、薄く平らなパンケーキ状の形状となった。このことは、一定量の水性媒体で、より大きい組織面を覆うことができ、蒸発抑制液体による保護も充分であるので、非常に好都合である。

フロントページの続き

(72)発明者　ロジャーズ、ポーラ・マリー
アメリカ合衆国８５７１１アリゾナ州トゥーソン、イー・ホイットマン４３３８番

審査官　中野　孝一

(56)参考文献　特表平５－５０５２３９（ＪＰ，Ａ）
特表平５－５０４６２７（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－１２２２０２（ＪＰ，Ａ）
特開昭５６－９７５３８（ＪＰ，Ａ）
特公昭４８－３３１５６（ＪＰ，Ｂ１）
特公昭３５－１１１７５（ＪＰ，Ｂ１）
特公昭３４－９９５６（ＪＰ，Ｂ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.^{7}，ＤＢ名)
B01J 19/16