(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-531987
(P2013-531987A)
(43)公表日　平成25年8月15日(2013.8.15)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12Q	1/00	(2006.01)	C12Q	1/00	C	4B029
C12Q	1/68	(2006.01)	C12Q	1/68	Z	4B063
C12M	1/34	(2006.01)	C12M	1/34	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 26 頁）

(21)出願番号　特願2013-514674 (P2013-514674)
(86)(22)出願日　平成23年6月14日 (2011.6.14)
(85)翻訳文提出日　平成24年11月28日 (2012.11.28)
(86)国際出願番号　PCT/EP2011/059777
(87)国際公開番号　WO2011/157678
(87)国際公開日　平成23年12月22日 (2011.12.22)
(31)優先権主張番号　10165797.1
(32)優先日　平成22年6月14日 (2010.6.14)
(33)優先権主張国　欧州特許庁 (EP)

(71)出願人　507214038
キアゲン　ゲーエムベーハー
ドイツ国　４０７２４　ヒルデン，　キアゲン　シュトラーセ　１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(72)発明者　グレルツ，　ダニエル
ドイツ国　４０７２４　ヒルデン，　キアゲン　シュトラーセ　１，　キアゲン　ゲーエムベーハー　気付

Fターム(参考)　4B029 AA09　AA27　BB11　CC03　CC08
HA02　HA10

最終頁に続く

(54)【発明の名称】固定生物学的試料から生体分子を抽出するためのターゲット細胞または組織を決定するための方法

(57)【要約】
本発明は、固定生物学的試料から生体分子を単離または抽出するためのターゲット細胞または組織を決定するための方法、固定生物学的試料から生体分子を抽出、単離および／または精製するための方法における試料の調製、ならびに前記ターゲット細胞または組織からの生体分子の抽出、単離および／または精製のために固定生物学的試料中のターゲット細胞または組織を可視化するためのキットに関する。一局面において、本発明の方法は：（１）前記固定生物学的試料の少なくとも１つの部分を少なくとも１つの支持体に載置する工程、（２）必要に応じて、前記試料の少なくとも１つの部分を試料処理剤で処理する工程などを包含する。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
固定生物学的試料からの生体分子の単離、抽出または精製のためのターゲット細胞または組織を決定するための方法であって、前記方法は：
（１）前記固定生物学的試料の少なくとも１つの部分を少なくとも１つの支持体に載置する工程、
（２）必要に応じて、前記試料の少なくとも１つの部分を試料処理剤で処理する工程であって、前記処理を工程（６）より前の手順の任意の段階で実行することができる、工程、
（３）少なくとも１つの支持体に載置された前記固定生物学的試料の少なくとも１つの部分を染色する工程、
（４）工程３において染色された前記少なくとも１つの部分を検討して、対象となる生体分子を含むターゲット細胞または組織を決定する工程、
（５）相応のターゲット細胞または組織を、前記支持体に載置された前記固定試料の残部から分離する工程、
（６）分離された前記細胞または組織から前記生体分子を単離する工程
を包含する、方法。
【請求項２】
前記生体分子がＲＮＡを含む、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記固定生物学的試料が、蝋包埋試料、好ましくはパラフィン包埋試料、好ましくは非ホルマリン固定パラフィン包埋試料（非ＦＦＰＥ－試料）であり、かつ前記試料処理剤が、以下：脱蝋剤、好ましくは、トルエン、キシレン、線状C_6～C_{16}アルカン、分岐C_6～C_{16}アルカンおよび環式C_6～C_{16}アルカン、線状ジアルキルエーテル、分岐ジアルキルエーテルおよび環式ジアルキルエーテル（ここで、各アルキル鎖は６から１６個の炭素原子を含む）および室温（２３±２℃）で液体の油を含む群から選択される、さらに好ましくはC_{13}～C_{16}アルカン、一般式Ｏ（C_nH_{2n+1}）$_2$（式中のｎは８から１２の整数である）のジアルキルエーテル、室温より下の融点を有する、好ましくは室温より下の融点を有する、鉱油、シリコン油およびパラフィンを含む群から選択される、ならびに最も好ましくはキシレンまたは市販のキシレン代用品またはヘキサデカン、ジオクチルエーテル、ヘプタンまたはそれらの混合物を含む群から選択される脱パラフィン剤から選択される、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記支持体が透明である、好ましくは、前記支持体がガラスまたは透明ポリマーから作製されている、請求項１から３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
工程（４）における前記試料（単数または複数）が、ライトまたはバックライトのもとで、好ましくは顕微鏡のもとで検討される、請求項１から４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
前記ターゲット細胞または組織が、工程（５）において顕微解剖、レーザー捕捉顕微解剖、擦過または切り出しによって分離される、請求項１から５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７】
固定生物学的試料、好ましくは蝋包埋非ホルマリン固定パラフィン包埋試料（非ＦＦＰＥ－試料）、さらに好ましくは非ホルマリン固定パラフィン包埋試料の０，５から１２μｍ厚の少なくとも１つの切片、を染色するための方法であって、前記方法は：
前記試料を６０秒以下、好ましくは４５秒未満、さらに好ましくは３０秒未満、最も好ましくは１５秒未満、少なくとも１つの組織染色剤と接触させる工程、
前記試料を水ですすぐ工程、およびその後、

必要に応じて、前記試料を１０秒未満、さらなる組織染色剤と接触させる工程を包含する、方法。
【請求項８】
前記試料を、３０秒以下ヘマトキシリンと接触させ、かつ３秒未満、好ましくは１秒、エオシンと接触させる、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
請求項１から６のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、
固定生物学的試料を０，５から１２μｍ厚の切片に分割し、かつ
工程（１）において、元の試料中では互いに隣接していた前記切片のうちの少なくとも２つをそれぞれ別々の透明支持体上に載置する、
蝋包埋試料を使用した場合には、必要に応じて、前記手順の任意の段階において、互いに独立して、前記切片を工程（２）に従って脱蝋剤で処理する、
工程（３）において、前記切片のうちの少なくとも１つを少なくとも１つの組織染色剤と接触させ、隣接切片を染色しない、
工程（４）において、染色された前記試料切片中の対象となる細胞または組織を決定して印を付け、染色していない前記試料切片を有する前記透明支持体を、染色されかつ印が付けられた前記試料切片の頂部に前記元の試料の場合と同じ配向で積み重ねる、
工程（５）において、染色された前記試料の印の付いたエリアの頂部にある染色していない前記試料の前記細胞または組織を、染色していない前記試料の残部から分離し、前記残部を捨て、そして染色された前記試料の印の付いた前記エリアに対応する細胞／組織を保持する、
工程（６）において、工程（５）において保持された前記細胞から核酸を単離または抽出する、
方法。
【請求項１０】
請求項１から６のいずれか一項に記載の方法であって、ここで、
固定生物学的試料を０，５から１２μｍ厚の切片に分割し、かつ
工程（１）において、前記切片のうちの少なくとも１つを透明支持体に載置する、
工程（２）において、蝋包埋試料を使用した場合には前記切片を脱蝋剤で処理する、
工程（３）において、請求項７または８に記載の方法に従って前記切片を少なくとも１つの組織染色剤で処理する、
工程（４）において、染色された前記試料切片中の対象となる細胞または組織を決定する、
工程（５）において、対象となる前記細胞または組織を、染色された前記試料の残部から分離し、前記残部を捨てる、
工程（６）において、工程（５）において得られた前記細胞から核酸を単離または抽出する、
方法。
【請求項１１】
請求項７または８に記載の方法に従って染色された組織の使用であって、前記使用は、前記組織の少なくとも一部分から生体分子を単離するためのものである、使用。
【請求項１２】
前記生体分子の単離が、ＲＮＡ単離を含む、請求項１から６、９もしくは１０のいずれか一項に記載の方法または請求項１１に記載の使用。
【請求項１３】
固定生物学的試料中のターゲット細胞または組織を含む生体分子を、前記ターゲット細胞または組織から生体分子を抽出、単離および／または精製するための方法の間、視覚化するためのキットであって、前記キットは：
ｂ．任意選択の、少なくとも１つの透明支持体
ｃ．任意選択の、少なくとも１つの組織染色剤

ｄ．任意選択の、少なくとも１つの請求項３に記載の試料処理剤
ｅ．請求項７、８、９または１０に記載の方法のための指示書
ｆ．生体分子、好ましくは核酸、最も好ましくはＲＮＡを含むもの、を単離するための少なくとも１つの緩衝液および／または器具
を含む、キット。
【請求項１４】
生物学的試料から生体分子を抽出、単離および／または精製するためのキットであって、前記キットは：
（ｉ）任意選択の、前記生物学的試料を固定するための指示書
（ｉｉ）任意選択の、ホルマリンを含まない固定剤または混合物
（ｉｉｉ）任意選択の、少なくとも１つの透明支持体
（ｉｖ）任意選択の、少なくとも１つの組織染色剤
（ｖ）任意選択の、少なくとも１つの請求項３に記載の試料処理剤
（ｖｉ）請求項７、８、９または１０に記載の方法のための指示書
（ｖｉｉ）生体分子、好ましくは核酸、最も好ましくはＲＮＡを含むもの、を単離するための少なくとも１つの緩衝液および／または器具
を含む、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、固定生物学的試料から生体分子を単離または抽出するためのターゲット細胞または組織の決定方法、固定生物学的試料から生体分子を抽出、単離および／または精製するための方法における試料の調製、ならびに前記ターゲット細胞または組織からの生体分子の抽出、単離および／または精製のために固定生物学的試料中のターゲット細胞または組織を可視化するためのキットに関する。
【０００２】
本発明につながる研究は、欧州共同体第７次フレームワークプログラム（ＦＰ７／２００７－２０１３）から助成金契約番号２２２９１６により資金供与を受けた。
【背景技術】
【０００３】
その天然の環境から取り出された生体物質の生体分子の状態は、試料採集とその分析の間の経過時間が長ければ長いほど、ますます変化する。特に、リボ核酸（ＲＮＡ）は、遍在するＲＮａｓｅのため急速に分解する。また、核酸の分解に加えて、例えばストレス遺伝子（ｓｔｒｅｓｓ　ｇｅｎｅ）が誘導され、新たなｍＲＮＡ分子の合成をもたらし、これらの分子もまたその試料の転写パターンを激しく改変する。従って、遺伝子発現プロファイルを保持するために、検査中の試料を直ちに安定させなければならない。
【０００４】
タンパク質の化学分析および分子分析は、医療および臨床診断分野以外のエリア、例えば法医学、薬学、食品分析、農業、環境分析においても、ならびに多くの研究エリアにおいても、ますます使用されるようになってきているので、従って、試料の分子構造の完全性の保持およびその結果としてそれらの即時安定化は、これらすべての分野における必要要件である。
【０００５】
それ故、何年にもわたって、多数の最も多彩な安定化試薬および安定化方法が、広範な最も多彩な生体物質の安定化のために開発されてきた。
【０００６】
組織の組織学的検査のためのホルマリンによる安定化および安定化された試料のその後の包埋は、かねてから公知である。しかし、生体分子の非常に不十分な安定化をもたらす結果にしかならず、そのため生体分子、特に、存在する核酸または核酸フラグメントの定量表示ではなく、よくても定性表示しか可能でないので、このタイプの安定化は、分子生

物学プロセスでの使用に大抵は不適切である。さらに、ホルマリンなどの架橋安定剤での安定化は、組織からの核酸またはタンパク質の抽出性低減をもたらす。ホルマリンはまた、毒素学的に無害でない。

【０００７】

カチオン性洗剤などの安定化試薬は、特許文献１、特許文献２、特許文献３および特許文献４に記載されており、これらを用いて核酸の非常に良好な定性的同定を達成することができる。例えば高濃度の硫酸アンモニウムを含む他の安定剤（例えば米国特許第６，２０４，３７５号参照）は、様々な組織における核酸の安定化に非常に適している。

【０００８】

一つのおよび同じ生体物質の中に、例えば細胞構造、細胞完全性（ｃｅｌｌ ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ）および生体分子の発現パターンが異なる、非常に多様な組織および／または細胞タイプが含まれる場合がある。

【０００９】

形態学的な構造の保存のための組織固定剤は、二つの群に分けることができる。群一は、ホルムアルデヒド、パラホルムアルデヒドまたはグリオキサールのような架橋剤を含有する。これらからは、４％緩衝化ホルムアルデヒドが最も広く用いられている固定剤である。Ｆ．Ｂｌｕｍによる１８９６年のその導入以来唯一なされた変更は、生理学的なｐＨでのホルマリンの中性緩衝化（ＮＢＦ、中性緩衝化ホルマリン）である。完全に判ってはいないが、アルデヒドはタンパク質間の架橋を形成すると考えられる。これにより、酵素的活性は停止され、可溶性タンパク質は構造タンパク質に固定される。ホルムアルデヒドは核酸とも反応するので、ＮＢＦ固定は、低収率、核酸の分解および、ＰＣＲ（ポリメラーゼ連鎖反応）またはＲＴ－（逆転写）ＰＣＲのような下流の反応の阻害をもたらす。

【００１０】

第二の群は、架橋剤を含有せず、アルコールを主成分として含有する。非架橋、アルコール系固定剤は、有害なホルムアルデヒド固定を避けるために、ならびに免疫組織化学法のために組織高分子およびとりわけタンパク質エピトープをより良好に保存するために、導入された。アルコールは、組織を透過しなければならず、タンパク質の沈殿および変性のために一定の局所濃度に達しなければならない。カーノイズ（Ｃａｒｎｏｙ’ｓ）（６０％エタノール、３０％クロロホルム、１０％酢酸）またはメタカーン（Ｍｅｔｈａｃａｒｎ）（エタノールをメタノールで置換したカーノイズ）のような一部のアルコール固定剤は、アルデヒドと比較して核酸固定剤として優れた結果を生じさせることが見出されている（Ｃｏｘら、Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐａｔｈｏｌｏｇｙ ２００６；８０：１８３－１９１）。アルコールに基づく他の発表された固定剤は、７０％エタノール（Ｇｉｌｌｅｓｐｉｅら、Ａｍ．Ｊ．Ｐａｔｈｏｌ．２００２；１６０（２）：４４９－４５７）、５６％エタノールおよび２０％ ＰＥＧ（ポリエチレングリコール、Ｂｏｓｔｗｉｃｋら、Ａｒｃｈ．Ｐａｔｈｏｌ．Ｌａｂ．Ｍｅｄ．１９９４；１１８：２９８－３０２）または９０％メタノールおよび１０％ ＰＥＧ３００（Ｖｉｎｖｅｋら、Ｌａｂ．Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ ２００３；８３（１０）：１４２７－３５）から成る。

【００１１】

さらに幾つかの特許出願に改善された非架橋固定剤が記載されている。ドイツ特許第１９９ ２８８２０号明細書には、異なるアルコールとアセトンとＰＥＧと酢酸の混合物を含有する固定剤が開示されている。米国特許出願公開第２００３／０２１１４５２号明細書には、少なくとも８０％のメタノールと２０％までのＰＥＧ３００とを含有する、ＲＮＡ、ＤＮＡおよび形態の保存のための、「Ｕｍｆｉｘ」として商品化されている固定剤が記載されている。分子の含量（ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｃｏｎｔｅｎｔ）および形態の保存のためのエタノールに基づく固定剤は、米国特許出願公開第２００５／００７４４２２号明細書（「Ｆｉｎｅｆｉｘ」）、国際公開第２００４／０８３３６９号（「ＲＣＬ２」）および国際公開第０５／１２１７４７号（「Ｂｏｏｎｆｉｘ」）に記載されている。米国特許出願公開第２００３／１１９０４９号明細書には、水ベースであり、かつ緩衝剤成分

と一種類のアルコールと固定剤成分と分解を阻害するための薬剤とを含む、汎用収集媒体が記載されている。

【００１２】

架橋固定剤およびアルコール固定剤に加えて、両方の群の固定剤を組み合わせる公知の薬剤が多数存在する。一例は、形態、免疫原性ならびにＲＮＡおよびＤＮＡ完全性の保存のための、米国特許第５，９７６，８２９号Ａ明細書に記載されている「Ｇｅｎｏｆｉｘ」である。ホルムアルデヒドが一成分であるので、「Ｇｅｎｏｆｉｘ」もまた、架橋剤のすべての欠点を示す。

【００１３】

欧州特許出願公開第１９６５１９０号明細書には、最大９０％のメタノールと追加の添加剤とを含む非水性組成物と試料を接触させ、その後、最大９９％のエタノールを含む第二の組成物とその試料を接触させることにより試料を固定する、生物学的試料の固定の概念が記載されている。この方法を用いて、生物学的試料中に含有される生体分子の非常に良好な安定化が達成される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１４】

【特許文献１】米国特許第５，０１０，１８４号明細書
【特許文献２】米国特許第５，３００，５４５号明細書
【特許文献３】国際公開第０２／００５９９号
【特許文献４】国際公開第０２／００６００号

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１５】

本出願の目的は、固定生物学的試料から生体分子を抽出および単離するための方法を提供することであり、取得可能な生体分子は、該試料の対象となる細胞または組織（「ターゲット細胞」）の生体分子パターンを表示している。

【課題を解決するための手段】

【００１６】

この目的は、固定生物学的試料からの生体分子の単離、抽出または精製のためのターゲット細胞または組織を決定および／または選択するための方法によって達成され、この方法は、以下の工程を含む：

（１）固定生物学的試料の少なくとも１つの部分を少なくとも１つの支持体に載置する（ｍｏｕｎｔ）工程、

（２）必要に応じて、前記試料の少なくとも１つの部分を試料処理剤で処理する工程であって、該処理を工程（６）より前の手順の任意の段階で実行することができる、工程、

（３）少なくとも１つの支持体に載置された前記固定生物学的試料の少なくとも１つの部分を染色する工程、

（４）工程２において染色された少なくとも１つの部分を検討して、対象となる生体分子を含むターゲット細胞または組織を決定する工程、

（５）相応の（ａｃｃｏｒｄｉｎｇ）ターゲット細胞または組織を、前記支持体に載置された前記固定試料の残部から分離する工程、

（６）分離された細胞または組織から生体分子を単離する工程。

【００１７】

好ましくは、本発明に従って前記工程を提供した順序で実行し、ここで、工程（２）を工程（１）より後かつ工程（６）より前の任意の段階で実行する。好ましくは、工程（２）を工程（３）の前に実行する。工程（１）から（５）、特に工程（３）から（５）は、主として、－好ましくは染色された試料の視覚的検討により－対象となる生体分子をおそらく含む細胞の決定および／または選択を可能にすることに役立ち、その後、工程（６）に従って前記生体分子を単離する。本発明によると、生体分子を単離する前にターゲット

細胞の決定／選択を実行することが特に好ましい。

【００１８】

前記生物学的試料は、生物全体であってもよく、生物の一部分、特に、ヒト、動物または植物に由来する組織断片または組織切片または培養細胞もしくは組織であってもよく、あるいは微生物であってもよい。細胞培養物から単離された包埋細胞も使用することができる。適する生物学的試料は、例えば、細胞含有体液、例えば血液、精子、脳脊髄液、唾液、痰もしくは尿、白血球画分、バフィーコート、糞便、表面生検材料、吸引液、皮膚断片、生物全体、後生動物の、好ましくは昆虫および哺乳類の、特にヒトの、器官および組織、例えば剖検材料、生検材料、微細針吸引液または組織切片の形態のもの、単離された細胞、例えば付着または浮遊細胞培養物の形のもの、植物、植物の部分、植物組織または植物細胞、細菌、ウイルス、酵母および真菌などの、固定に適するすべての生物学的試料である。

【００１９】

用語「固定すること」、「固定」または「固定された」は、生物学的試料が、形態学的および／または組織学的構造の安定化、特に、該試料に含有されている生体分子の安定化をもたらす結果となる薬剤または組成物で処理されることを意味する。当該技術水準から公知のそのような薬剤または組成物の例を上に記載している。好ましい実施形態では、ホルマリンを含まない組成物で生物学的試料を固定した。本発明によると、この試料を「非ホルマリン固定試料」と記述する。好ましくは、上に記載したような市販の非架橋組成物、例えば「カーノイズ」、「メタカーン」、「Ｕｍｆｉｘ」、「Ｆｉｎｅｆｉｘ」、「ＲＣＬ２」、「Ｂｏｏｎｆｉｘ」、またはドイツ特許出願公開第１９９２８８２０号明細書に記載されているような固定剤で、生物学的試料を固定した。特に好ましい実施形態では、欧州特許出願公開第１９６５１９０号明細書に記載されている手順に従って、市販の「ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ」キット（ＰｒｅＡｎａｌｙｔｉｘ　ＧｍｂＨ、スイス、Ｈｏｍｂｒｅｃｈｔｉｋｏｎ）によって固定されている生物学的試料を用いて、本発明の方法を実行する。固定により、生物学的構造を生きているような様式で実質的に保存して、「現実的な評価（ｒｅａｌ　ａｓｓｅｓｓｍｅｎｔ）」を可能にすることを意図している。固定のさらなる利点は、検体を長期間、記録として保管することができることである。さらに、多くの形態学的調査は、固定された材料に基づいてのみ可能である。

【００２０】

用語「生体分子」は、生物学的試料の任意のタイプの核酸およびタンパク質を含む。本発明による好ましい生体分子は、核酸である。前記生体分子について、「安定化」は、好ましくは、該生体分子の分解、修飾または誘導の阻害を意味することを意図したものである。生体物質の組織学的分析の場合、用語「安定化」は、好ましくは、試料の形態の有意な変化の防止を意味することを意図したものである。

【００２１】

本方法による「核酸」は、当業者に公知のすべての核酸、例えば、天然または合成核酸を含み、ならびに人工的に試料に導入された核酸、一本鎖および二本鎖核酸、直鎖、分岐または環式核酸、特に、任意のタイプのＤＮＡおよびＲＮＡ、好ましくはＲＮＡ、特にｍＲＮＡ、ｔＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、ｓｎＲＮＡまたはリボザイム、およびＤＮＡ、特に、ゲノムもしくはプラスミドＤＮＡまたは細胞小器官からのＤＮＡも含み、ならびにまたは感染源の核酸も含む。好ましくは、本発明によると、核酸は、前に述べたタイプのうちの少なくとも１つのタイプのＲＮＡを含む。核酸含有試料であって、該試料からＲＮＡを単離するのに十分に安定化された試料からは、通常、ＤＮＡの単離も可能である。なぜなら、ＲＮＡと比較してＤＮＡはより安定しており、従って、分解されにくいからである。

【００２２】

用語「タンパク質」は、例えば構造タンパク質、受容体タンパク質、酵素、細胞質の可溶性タンパク質、膜タンパク質、抗体、ホルモンまたは任意のさらなるタンパク質のよう

な、生物学的試料中に天然に存在するまたは人工的に含められた、グリコシル化されたまたはグリコシル化されていない、任意のタンパク質またはペプチドを意味する。

【００２３】

本発明について、生物学的試料の固定後にその固体された材料を蝋、通常はパラフィン、に包埋する工程（いわゆる「固定、パラフィン包埋」（ＦＰＥ）材料）が続くことは、必須ではないが、長期保存のために非常に一般的である。前記包埋媒体の主目的は、顕微鏡適用および／または組織化学的適用のために天然の状態での検体の切片作製および載置を可能にすることである。しかし、多くの適用について、試料から、例えば該試料の組織学的染色の前に、包埋媒体を除去することが必要である、または少なくとも有利である。

【００２４】

本発明については、公知の包埋材料のいずれを使用してもよく、特に、任意の蝋、寒天、エステルまたはポリエステル蝋、樹脂、例えばエポキシ樹脂またはニトロセルロースを使用することができ、ならびに寒天－パラフィン、寒天－エステル蝋またはニトロセルロース－パラフィン蝋での二重包埋法を用いてもよい。そのような蝋は、通常、高級炭化水素の複合混合物から成り、さらなる成分、例えば、高級脂肪酸のエステルおよび／またはグリコールならびにこれらに類するものを含むこともある。前記蝋は、天然および／または合成由来のもの、例えばポリエステル蝋（ポリエチレングリコールジステアラートと１－ヘキサデカノールの混合物）であることもあり、その試料包埋特性を強化する添加剤、例えばＤＭＳＯまたは高級ポリオレフィンなど、を追加で含有することもある。好ましくは、前記蝋は、パラフィンであって、室温で固体の主として飽和炭化水素の混合物であり、典型的には石油の蒸留によって調製されるものであるパラフィンを表すだろう。必要に応じて、前記パラフィン蝋は、任意の添加剤を含有することがある。

【００２５】

本方法の工程（１）に従って、固定生物学的試料の少なくとも１つの部分を少なくとも１つの支持体に載置する。前記生物学的試料を、例えばガラスまたは任意の透明ポリマーから作製された透明支持体に載置することが好ましい。そのような支持体は、例えば、ガラスプレート、例えば顕微鏡スライド、プレキシグラス製もしくは透明ポリマー（例えば、ＰＥＴ）製のプレート、細胞培養皿またはこれに類するものである。勿論、試料の幾つかの部分もしくは切片を１つの支持体に載置してもよく、または幾つかの切片もしくは部分を幾つかの支持体に載置してもよい。

【００２６】

例えば細胞培養物の細胞のように試料自体がそれ相応の厚みを有さないまたはそれより薄い厚みを有する場合には、好ましくは、固定されたおよび場合により包埋された生物学的試料を、０，５から１２μｍの厚みを有する部分で切片を作製する。ライトまたはバックライトのもとで、例えば顕微鏡のもとで、詳細に検討することができるほど透明である切片に試料を薄切りにするまたは切断することが特に好ましい。好ましくは、厚みは、１から１０μｍであり、２から８μｍがさらに好ましく、および４から６μｍが最も好ましい。

【００２７】

本発明において蝋包埋試料を使用する場合、好ましくは、該試料を試料処理剤を使用して工程（２）に従って処理する。前記試料処理剤は、好ましくは脱蝋剤（ｄｅ－ｗａｘｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）または組成物、さらに好ましくは脱パラフィン剤（ｄｅ－ｐａｒａｆｆｉｎｉｚｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）または組成物である。伝統的に、脱蝋または脱パラフィンは、芳香族溶媒、例えばトルエンおよび特にキシレン、の使用を伴う。一方、水と不混和性の少なくとも１つの有機溶媒／化合物を含む非毒性薬剤または組成物を使用することができる。この蝋可溶化剤（ｗａｘ－ｓｏｌｕｂｉｌｉｚｉｎｇ　ａｇｅｎｔ）は、少なくともそれを試料と接触させる瞬間は、液体であり得る。好ましくは、前記溶媒は、線状、分岐および環式C_6～C_{16}アルカン、線状、分岐および環式ジアルキルエーテル（この場合の各アルキル鎖は６から１６個の炭素原子を含む）、ならびに室温（２３±２℃）で液体の油を含む群から選択することができ、さらに好ましくは、C_7～C_{16}アルカン

、一般式Ｏ（$C_nH_{2n+1})_2$（式中のｎは８から１２の整数である）のジアルキルエーテル、室温より低い、好ましくは１５℃より低い融点を有する鉱油、シリコーン油（ｓｉｌｉｃｏｎ　ｏｉｌ）およびパラフィンを含む群から選択することができ、ならびに最も好ましくは、キシレンまたは市販キシレン代用品、例えばＳｈａｎｄｏｎキシレン代用品（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｆｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、米国Ｗａｌｔｈａｍ）など、ヘプタン、ヘキサデカン、ジオクチルエーテル、またはそれらの混合物を含む群から選択することができる。純粋な形態でのまたは溶媒の混合物としてのいずれかでそれぞれ蝋包埋試料に適用される任意の溶媒の融点は、２５℃より下、好ましくは室温より下であり得る。本明細書において、用語「純粋な形態」は、事前に希釈されることなく、および／または他の溶媒と混合されることなく、蝋を溶解するために蝋包埋試料に適用される溶媒を指す。しかし、この用語は、溶媒に相当しないさらなる化合物の存在に関して、特定の純度グレードには言及しない。溶媒が純粋な形態で試料に適用される場合、その溶媒は、好ましくは、室温より下の融点を有する。しかし、室温より上の融点を有する「溶媒」を、それらが室温で液体である溶媒の混合物の状態で存在する場合には、蝋包埋試料に適用することができる。上記溶媒のすべてが、室温で数秒以内にまたは長くとも数分（好ましくは約１５秒から約１５分）以内に固体パラフィンを溶解することができる。

【００２８】

典型的には、脱蝋剤または脱パラフィン剤または組成物が入っている浴、例えばキシレン浴など、に、パラフィンが可溶化されるまで支持体載置試料を浸漬する。その後の工程で、その脱パラフィンされた試料を、水を使用する最終洗浄の前に、漸減アルコール濃度の一連のアルコール溶液によって洗浄して脱蝋剤を除去して、水性の反応物／試薬の溶液、例えば染色溶液または溶解緩衝液など、がその試料に接近できるようにすることができる。

【００２９】

固定包埋生物学的試料の少なくとも１つの部分を、本発明の方法の間に工程（３）に従って染色すること、およびそのために染色前に脱蝋することが好ましい。一方、生体分子を単離する前に試料の一部分または切片を染色しない場合には、その試料のその部分の脱蝋を本方法の工程（３）、（４）または（５）のいずれの後に実行してもよい。

【００３０】

染色された切片または部分を生体分子単離には使用しないが、生体分子単離に使用される切片または部分の参照として使用する場合、その試料の少なくとも１つの部分または切片の染色を任意の公知組織学的染色法によって実行することができる。　もう一方で、染色された切片を、その後、生体分子単離に使用することとなっている場合には、特にＲＮＡ分解を最小にするために「迅速染色法」として下で説明する染色方法を使用することが特に好ましい。

【００３１】

標準的な染色法によると、支持体に載置された試料を、脱蝋ならびにアルコール溶液および水でのすすぎ後、染色剤の供給業者の指示書に従って染色溶液中でインキュベートする。標準的な染色法についての一例は、試料を１分間～３分間、例えばヘマトキシリン（Ｍｅｒｃｋ）のような第一の染色剤中で染色すること、その後、前記試料を３分間～５分間、水道水ですすぐこと、前記試料を１分間～２分間、例えばエオシン（Ｍｅｒｃｋ）のような第二の染色溶液中で染色すること、前記試料を３分間～５分間、水道水ですすぐこと、その染色された試料を１分間８０％エタノールと、２分間９６％エタノールと、３分間１００％エタノールと、および５分間キシレンと接触させることである。このまたは任意の匹敵する方法によって染色された試料を、下で説明するような生体分子単離に使用する試料の参照として使用することができる。

【００３２】

新たに開発された「迅速染色法」によると、試料を、場合により脱蝋およびアルコール溶液でのすすぎおよび水中での短期インキュベーション（好ましくは、数秒、例えば５秒またはほんの１秒間だけ）の後、６０秒以下、好ましくは４５秒未満、さらに好ましくは

３０秒未満、最も好ましくは１５秒未満、少なくとも１つの細胞染色剤または組織染色剤で染色し、前記試料を水で（好ましくは、数秒、例えば、５秒またはほんの１秒間だけ）すすぎ、その後、場合により前記試料を６０秒以下、好ましくは４５秒未満、最も好ましくは１０秒未満、さらなる細胞染色剤または組織染色剤と接触させる。

【００３３】

好ましくは、この方法では、第一の染色剤を試料と最長１５秒間接触させ、第二の染色剤を試料と最長３秒間、例えば１秒間、接触させる。水での試料のすすぎは、好ましくは、試料を水に１秒間～２秒間、「浸すこと」によって実行する。染色剤の例は、第一の染色剤についてはヘマトキシリン（Ｍｅｒｃｋ）（７，１１ｂ－ジヒドロインデノ［２，１－ｃ］クロメン－３，４，６ａ，９，１０（６Ｈ）－ペントール、$C_{16}H_{14}O_6$）および第二の染色剤についてはエオシン（Ｍｅｒｃｋ）である。さらなる適する染色剤は、トルイジンブルー、アザン、ＰＡＳ（過ヨウ素酸シッフ染色）であるが、ヘマトキシリン／エオシンでの染色のほうが好ましい。（エオシンＹ：２’，４’，５’，７’－テトラブロモ－３’，６’－ジヒドロキシスピロ［２－ベンゾフラン－３，９’－キサンテン］（－１－オン－二ナトリウム塩。$C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$）。

【００３４】

好ましい実施形態では、前記固定試料は、ホルマリンを含まない組成物で固定された蝋包埋試料（「非ホルマリン固定パラフィン包埋」非ＦＦＰＥ試料）であり、従って、「迅速法」は、好ましくは、支持体に載置された試料を脱蝋する工程、および脱蝋後、染色前に、漸減量のアルコールを含む一連の組成物でその試料をすすぐ工程をさらに含む。

【００３５】

この新たな方法によって染色された試料をＲＮＡ単離に使用することになっている場合、すべての組成物（染色組成物、アルコール含有組成物）の調製に、およびすすぐ工程に、ＲＮａｓｅ不含水を使用することが好ましい。

【００３６】

この迅速染色法を用いることにより、染色された試料（切片）から生体分子、特に核酸、を抽出／単離することが可能である。詳細には、染色に基づいて核酸の単離のために、目的の細胞または組織領域を選択すること、およびその後、前記の選択された細胞または領域から核酸を単離することが可能である。

【００３７】

本発明の工程（４）において、工程（３）に従って染色された試料の少なくとも１つの部分を、好ましくはライトまたはバックライトのもとで、例えば顕微鏡のもとで、詳細に検討する。染色された試料を、例えば視覚的に、検討することによって、異なる組織または細胞タイプを区別および同定すること、ならびにその試料が特定の対象となる細胞もしくは組織領域、例えば腫瘍細胞、対象となる細胞もしくは組織区画、外来組織または類似物を含むかどうかを決定することが可能である。そのような細胞または組織は、生体分子単離のためのターゲット細胞または組織として役立つ。

【００３８】

本発明の方法により、２つの特定の実施形態を実行することができる。生体分子を染色していない試料から単離する；染色された試料はそのための参照として役立つ。または、生体分子を染色された試料から単離する；そのとき、好ましくは迅速染色法を使用するべきである。

【００３９】

最初の場合では、前記方法を次の手順によって実行することが好ましい：

固定生物学的試料を０，５から１２μｍ厚の切片（薄片）に分割する、

工程（１）において、元の試料中では互いに隣接していた前記切片のうちの少なくとも２つをそれぞれ別々の透明支持体に載置する、

蝋包埋試料を使用した場合、場合によっては、前記手順の任意の工程において、互いに独立して、前記切片を工程（２）に従って脱蝋剤で処理する、

工程（３）において、前記切片のうちの少なくとも１つを少なくとも１つの組織染色剤

で染色し、隣接切片は染色しない、
工程（４）において、染色された試料切片中の対象となる細胞または組織を決定して印を付け、染色していない試料切片を有する透明支持体を、その染色され印が付けられた試料切片の頂部に元の試料と同じ配向で積み重ねる、
工程（５）において、前記染色された試料の印の付いたエリアの頂部の染色していない試料の細胞または組織を該染色していない試料の残部から分離し、該残部を捨て、該染色された試料の印の付いたエリアに対応する細胞／組織を保持する、
工程（６）において、工程（５）において保持された細胞から核酸を単離または抽出する。

【００４０】
後者の場合では、前記方法を次の手順に従って実行することが好ましい：
固定生物学的試料を０，５から１２μｍ厚の切片（薄片）に分割する、
工程（１）において、前記切片のうちの少なくとも１つを透明支持体に載置する、
工程（２）において、蝋包埋試料を使用した場合には前記切片を脱蝋剤で処理する、
工程（３）において、上で説明したような「迅速染色」法に従って前記切片を少なくとも１つの組織染色剤で染色する、
工程（４）において、染色された試料切片の中の対象となる細胞または組織を決定する、
工程（５）において、対象となる細胞または組織をその染色された試料の残部から分離し、該残部を捨てる、
工程（６）において、工程（５）において得られた細胞から核酸を単離または抽出する。

【００４１】
このように、ターゲット細胞または組織の検討を、生体分子の単離にさらに使用される試料に関して行うか、参照試料（隣接または対応する試料）において、この場合、対象となる細胞または組織を決定することができ、および非染色試料における対応する細胞を見つけ、細胞または組織の残部から分離することができる。その後、分離されたターゲット細胞または組織から生体分子を単離する。

【００４２】
工程（５）による細胞の分離は、当該技術水準の任意の公知の方法、例えば、非選択細胞もしくは組織の擦過除去、ターゲット細胞もしくは組織の切り出し、ターゲット細胞のピッキング、ターゲット細胞の吸引、顕微解剖、レーザー切開（例えば、レーザー捕捉顕微解剖）または任意の同様の方法によって実行することができる。ターゲット細胞または組織を分離するための好ましい方法は、ターゲット細胞または組織の顕微解剖、および非選択細胞または組織の擦過除去または拭き取り（ｗｉｐｉｎｇ　ａｗａｙ）である。

【００４３】
分離された選択細胞または組織から生体分子を抽出／単離する工程を公知の生体分子単離法のいずれによって実行してもよい。用いる単離方法は、有効な方法を用いて有効な様式での前記生体分子の単離が可能である限り、本発明を制限するものではない。しかし、小試料からの核酸の単離に適する単離方法の使用が好ましい。

【００４４】
前記単離方法の最初の工程で、選択された細胞または組織を溶解するための溶液、好ましくは水溶液を、細胞または組織に添加する。溶解溶液として、細胞含有材料中の細胞を溶解／破壊することができる、従って、生体分子を溶液中に放出させることができる、任意の溶液、好ましくは任意の水溶液、を使用することができる。本発明の方法に使用することができる多くの水性の溶解緩衝液または消化緩衝液が、当該技術水準から公知である。試料の選択部分が依然として支持体に載置されている（例えば、非選択部分を顕微解剖後に擦過除去した）場合、溶解溶液を支持体上で直接ターゲット細胞または組織と接触させることができる（例えば、該溶液を該ターゲット試料の頂部にピペッティングすることにより）。ターゲット細胞または組織を、例えばピッキング、吸引または擦過によって、

支持体から剥離させた場合、例えばカップまたはチューブの中で、溶解溶液を該ターゲット試料部分と接触させることができる。

【００４５】

ターゲット細胞または組織を溶解溶液と接触させた後、その混合物を、例えばピペットに吸い上げて吐出す（ｐｉｐｅｔｔｉｎｇ ｕｐ ａｎｄ ｄｏｗｎ）ことにより、ボルテックスにかけることにより、または任意の他の適する方法により、均質化することができる。ターゲット試料部分を支持体上で溶解溶液と接触させた場合、ターゲット試料部分と溶解溶液の混合物全体を、好ましくはインキュベーション後、さらなる加工処理に適する容器、例えばカップまたはチューブなど、に移す。

【００４６】

公知溶解溶液のどれがターゲット細胞または組織の溶解に適切であるかは、主として、溶解すべき細胞に左右される。使用する溶解溶液は、例えば、カオトロピック（ｃｈｏａｔｒｏｐｉｃ）塩含有溶解緩衝液、界面活性剤含有溶解緩衝液、タンパク質分解化合物を含む溶解緩衝液、または前記化合物の幾つかもしくは混合物を含む溶解緩衝液であり得るが、これらに限定されない。

【００４７】

本発明の方法は、当該技術水準から公知の広範な溶解溶液および溶解プロトコルを用いて実行することができる。溶解溶液は、例えば、緩衝剤、好ましくはＴｒｉｓ、Ｍｏｐｓ、Ｍｅｓ、Ｈｅｐｅｓおよびクエン酸塩を含む群から選択される緩衝剤、場合により洗剤、好ましくは非イオン性、カチオン性、アニオン性および両性イオン性洗剤を含む群から選択される洗剤、さらに好ましくはアニオン性洗剤、最も好ましくはドデシル硫酸ナトリウムを含む群から選択される洗剤を含み得る。非イオン性洗剤は、例えば、多価アルコールのエトキシル化脂肪酸エステルなどのエチレンオキシド縮合生成物であり得る。好ましい非イオン性洗剤は、Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．から商品名ＴＷＥＥＮ（登録商標）２０で販売されているポリオキシエチレンソルビタンモノラウラートである。他のＴＷＥＥＮ（登録商標）洗剤も適する。Ｔｒｉｔｏｎ洗剤（オクチルフェノキシポリエトキシエタノール）の群からの他の適する洗剤、有利にはＴｒｉｔｏｎ Ｘ－１００（同じくＳｉｇｍａから入手できる）、を採用してもよい。前記洗剤は、細胞を溶解するために有効な量で含まれ、１．５～２０％（ｖ／ｖ）の範囲が代表的に有効である。前記洗剤は、核酸とミセルおよび他の複合体を形成することもあり、それによって、他のメカニズムによってＤＮＡを保護する。

【００４８】

前記溶解溶液は、１つ以上の追加の物質を含むことがあり、該物質は、好ましくは、キレート剤、還元剤、無機塩を含む群から選択され、かつ好ましくは、５から１１の、好ましくは６から８の、最も好ましくは６から７の、範囲のｐＨを有し得る。

【００４９】

溶解溶液に加えて、タンパク質分解剤を溶解溶液とターゲット細胞または組織の混合物に添加してもよい。タンパク質分解剤は、試料に添加される溶解溶液に既に含まれていることもあり、または細胞もしくは組織を溶解溶液と接触させた後に添加されることもある。前記タンパク質分解剤は、好ましくは、プロテアーゼおよび非酵素的タンパク質分解化合物を含む群から選択することができ、好ましくは、プロテイナーゼＫ、トリプシン、キモトリプシン、パパイン、ペプシン、プロナーゼ、エンドプロテイナーゼＬｙｓ－Ｃ、ブロモシアン（ｂｒｏｍｏｃｙａｎｅ）またはそれらの混合物を表し得る。

【００５０】

試料へ溶解溶液を添加した後に得られた混合物をインキュベートする工程を、好ましくは、２℃～９５℃の、好ましくは１５℃～７０℃の、および最も好ましくは室温～６０℃の、範囲の温度で実行することができる。このインキュベーションを、好ましくは１０秒間～１０時間、さらに好ましくは４５秒間～５時間、および最も好ましくは１分間～２時間、実行することができる。しかし、インキュベーションの温度および時間の両方は、試料の種類、量および生じてからの時間（ａｇｅ）、ならびに利用される溶解溶液によって

様々であり得る。これは当業者には周知であり、特にインキュベーション時間および温度に関する最適な溶解条件を当業者は慣例的実験によって容易に決定することができる。

【００５１】

ターゲット細胞または組織から放出されて、その後溶解混合物に含まれている生体分子を単離および／または精製する工程を、好ましくは、当該技術水準の公知方法のいずれかによって実行することができる。

【００５２】

好ましくは、シリカビーズまたは膜へのカオトロープまたは非カオトロープ媒介吸着、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィーおよびカオトロープなしの親和性結合（吸着）を含む群から好ましくは選択される少なくとも１つのクロマトグラフィーおよび／または固相ベースの方法によって、核酸を単離する。

【００５３】

ＤＮＡおよびＲＮＡを含む生体分子の単離のための幾つかの市販キットが、市場で入手できる。さらに、固定生物学的試料から核酸を単離するための幾つかのキットが開発されており、それらの大部分が、脱パラフィン剤、溶解緩衝液、ならびに核酸を抽出、単離および精製するためのさらなる緩衝液および器具を含む。そのような市販キットの例は、ＰｒｅＡｎａｌｙｔｉｘ（スイスＨｏｍｂｒｅｃｈｔｉｃｏｎ）からのＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅキット、ＱＩＡＧＥＮ（ドイツＨｉｌｄｅｎ）からのＲＮｅａｓｙ、ＡｌｌＰｒｅｐ、ＤＮｅａｓｙおよびＱＩＡａｍｐキット、Ｒｏｃｈｅ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｓｃｉｅｎｃｅ（ドイツＭａｎｎｈｅｉｍ）からのＨｉｇｈ Ｐｕｒｅ Ｋｉｔｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（米国Ｃａｒｌｓｂａｄ）からのＰｕｒｅＬｉｎｋ Ｋｉｔｓ、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（米国Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ）からのＲｅｃｏｖｅｒＡｌｌ Ｋｉｔｓである。

【００５４】

本発明の特に好ましい実施形態では、試料の固定、場合により試料の脱蝋および核酸単離のためにＰＡＸｇｅｎｅ Ｔｉｓｓｕｅ Ｃｏｎｔａｉｎｅｒの化合物および組成物をＰｒｅＡｎａｌｙｔｉｘからのＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ ＲＮＡ、ｍｉＲＮＡまたはＤＮＡキットと組み合わせて使用することができ、試料（部分）の染色をヘマトキシリンおよびエオシンで実行し、そしてＲＮＡ単離のために試料部分を本明細書中で説明する迅速染色法によって染色する。ＤＮＡはＲＮＡより安定しているので、ほんの少ししか分解されていないＲＮＡのみが単離可能な試料からは良好な結果でＤＮＡを単離できることが特に指摘される。

【００５５】

本発明に従って、固定生物学的試料中のターゲット細胞または組織を含む生体分子を、該ターゲット細胞または組織から生体分子を抽出、単離および／または精製するための方法の間、視覚化するためのキットも提供し、このキットは、以下のものを含む：

ａ．任意選択の、少なくとも１つの透明支持体

ｂ．任意選択の、少なくとも１つの組織染色剤

ｃ．任意選択の、少なくとも１つの、上で説明したような、試料処理剤

ｄ．請求項７、８または９に記載の方法のための指示書

ｅ．生体分子、好ましくは核酸、最も好ましくはＲＮＡを含むもの、を単離するための少なくとも１つの緩衝液および／または器具。

【００５６】

好ましい実施形態において、前記キットは、構成要素（ｄ）および（ｅ）と組み合わせて、構成要素（ａ）、（ｂ）および（ｃ）のうちの少なくとも１つ、好ましくは少なくとも２つ、より好ましくは３つすべてを含む。

【００５７】

さらに、本発明に従って、上で説明したような方法を用いることにより生物学的試料から生体分子を抽出、単離および／または精製するためのさらなるキットを提供し、このキ

ットは、以下のものを含む：
（ｉ）任意選択の、生物学的試料を固定するための指示書
（ｉｉ）任意選択の、ホルマリンを含まない固定剤または混合物
（ｉｉｉ）任意選択の、少なくとも１つの透明支持体
（ｉｖ）任意選択の、少なくとも１つの組織染色剤
（ｖ）任意選択の、少なくとも１つの、上で説明したような、試料処理剤
（ｖｉ）ターゲット細胞または組織を場合により染色および選択するための方法についての指示書
（ｖｉｉ） 生体分子、好ましくは核酸、最も好ましくはＲＮＡを含むもの、を単離するための少なくとも１つの緩衝液および／または器具。

【００５８】
好ましい実施形態において、前記キットは、構成要素（ｖｉ）および（ｖｉｉ）と組み合わせて、構成要素（ｉ）、（ｉｉ）、（ｉｉｉ）、（ｉｖ）および（ｖ）のうちの少なくとも１つ、好ましくは少なくとも２つ、より好ましくは少なくとも３つ、さらに好ましくは少なくとも４つ、そして最も好ましくはすべてを含む。

【図面の簡単な説明】

【００５９】
【図１】図１は、実施例１に従ってスライドに載置した漸減面積の６μｍ切片からのＲＮＡ収量を示す。参照：１つの切片を微量遠心管に直接移した；スライド上：異なる面積の元の切片（５０％、２５％および１０％）をＲＮＡ抽出に使用した；すべての抽出を三連で行った。
【図２】図２は、実施例１に従ってスライドに載置した漸減面積の６μｍ切片および参照から単離したＲＮＡについてのＲＮＡ完全性を示す。ＲＩＮ－ＲＮＡ　Ｉｎｔｅｇｒｉｔｙ　Ｎｕｍｂｅｒ－として測定した完全性。
【図３】図３は、定量的ＲＴ－ＰＣＲにおける実施例１に従って単離したＲＮＡの性能を示す。ＴａｑＭａｎ　７４００でのβ－アクチンプライマー／プローブアッセイを用いる一工程ＲＴ－ＰＣＲのためのテンプレートとして１μＬの溶離液を使用した。
【図４】図４は、実施例２によるパラフィン包埋組織の１つの４μｍ切片からのＲＮＡ収量を示す。参照：ＲＮＡ単離のために微量遠心管に移した切片；染色１および２：迅速染色後のスライドからのＲＮＡ抽出；すべての抽出を三連で行った。
【図５】図５は、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｂｉｏａｎａｌｙｓｅｒを使用してＲＩＮ値として測定した、実施例２に従って単離したＲＮＡについてのＲＮＡ完全性を示す。パラフィン包埋組織の１つの４μｍ切片からＲＮＡを単離した。参照：ＲＮＡ単離のために微量遠心管に移した切片；染色１および２：迅速染色後のスライドからのＲＮＡ抽出；すべての抽出を三連で行った。
【図６】図６は、定量的リアルタイムＲＴ－ＰＣＲにおける実施例２に従って単離したＲＮＡの性能を示す。ＴａｑＭａｎ　７４００でのβ－アクチンプライマー／プローブアッセイを用いる一工程ｑＲＴ－ＰＣＲのためのテンプレートとして２μＬの溶離液を使用した。パラフィン包埋組織の１つの４μｍ切片からＲＮＡを単離した。参照：ＲＮＡ単離のために微量遠心管に移した切片；染色１および２：迅速染色後のスライドからのＲＮＡ抽出；すべての抽出を三連で行った。
【図７】図７は、実施例２によるラット腎臓組織のヘマトキシリンおよびエオシン迅速染色を示す。Ａ：染色１、Ｂ：染色２。

【発明を実施するための形態】

【００６０】
実施例
実験手順：
組織固定：
ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　Ｆｉｘ（ＰｒｅＡｎａｌｙｔｉｘ）による固定：検討する組織検体を５ｍＬの固定試薬に沈めた。室温で２～４時間インキュベーシ

ョンを行い、その後、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　Ｓｔａｂｉｌｉｚｅｒ溶液に移した。

【００６１】

ホルマリンによる固定：室温で保持した５ｍＬの中性緩衝化ホルマリンに組織を沈め、室温で２４時間、固定した。

【００６２】

組織加工処理およびパラフィン包埋：

固定組織検体を固定溶液から標準ヒストカセット（ｓｔａｎｄａｒｄ　ｈｉｓｔｏｃａｓｅｔｔｅ）に移した。生体分子の保存のために、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　Ｃｏｎｔａｉｎｅｒハンドブックにおいて推奨されているようなプロトコル（１５分７０％、３０分８０％、６０分９０％そして２回９９％エタノール、２回６０分１００％イソプロパノール、２回６０分１００％キシレン、その後、５０℃で６０分キシレン－パラフィン（５０－５０％）、そして５６℃で２回６０分パラフィンでの脱水）を用いて、Ｌｅｉｃａ組織プロセッサＴＰ１０２０で加工処理を行った。パラフィンとして、低融点Ｐａｒａｐｌａｓｔ－ＸＴＲＡ（ＳＰＩが供給）を使用した。加工処理後、前記インキュベーションについてのものと同じパラフィンを使用して、パラフィンブロックに組織を包埋した。

【００６３】

スライドガラスに載置した組織のヘマトキシリンおよびエオシン染色：

スライドに載置した４～６μｍ切片の、キシレン中で５分間、続いて９６％、８０％、７０％、６０％エタノール中で各３分間のインキュベーション、水道水中で３分間のインキュベーション、ヘマトキシリン（Ｍｅｒｃｋ、使用準備済み）中で１分間のインキュベーション、３分水道水、エオシン（Ｍｅｒｃｋ、使用準備済み）中で１分間のインキュベーション、３分水道水、１分８０％、２分９６％、３分１００％エタノールそして５分１００５キシレンにより、手作業でヘマトキシリンおよびエオシン染色を行った。最後に、それらの切片にエンテラン（Ｍｅｒｃｋ）を上塗りし、カバーガラスをかぶせた。

【００６４】

スライドガラスに載置した組織を染色するためのヘマトキシリンおよびエオシンを使用する改変された迅速染色法：

スライドに載置した４～６μｍ切片のキシレン中で５分、続いて９６％、８０％、７０％エタノール中で各１～３分間のインキュベーション、ＲＮａｓｅ不含水中で２～１０秒間のインキュベーション、ヘマトキシリン（Ｇｉｌｌに従って調製したもの）中で３０秒間のインキュベーション、ＲＮａｓｅ不含水中で１秒間タッピング、　エオシン（ＲＮａｓｅ不含水中０．５％）中で１秒間のインキュベーション、ＲＮａｓｅ不含水中で１秒間タッピング、１分８０％、２分９６％、３分１００％エタノールおよび５分キシレンにより、手作業でヘマトキシリンおよびエオシン染色を行った。顕微鏡検査だけのために、それらの切片を５分キシレン中でさらにインキュベートし、エンテラン（Ｍｅｒｃｋ）を上塗りし、カバーガラスで封止した。

【００６５】

新鮮な染色溶液の調製：

Ｇｉｌｌによるヘマトキシリン溶液

２ｇヘマトキシリン、０．２ｇヨウ素酸ナトリウムおよび１７．６ｇ硫酸アルミニウム（・１８H_2O）を２５０ｇエチレングリコールと７３０ｍＬ　ＲＮａｓｅ不含水の混合物に溶解した。２０ｍＬ氷酢酸を添加し、２時間、室温で攪拌した。

【００６６】

Ｈａｒｒｉｓによるヘマトキシリン溶液

１００ｇカリウムミョウバン（ａｌａｕｎ）を攪拌および加熱により９５０ｍＬ　ＲＮａｓｅ不含水に溶解した。水浴中で加熱しながら５ｇヘマトキシリンを５０ｍＬエタノールに溶解した。そのヘマトキシリン溶液を前記高温ミョウバン（ａｌａｕｎ）溶液に添加し、沸騰させた。熱から外した後、３７０ｍｇヨウ素酸ナトリウムを添加した。４ｍＬ氷

酢酸を添加し、得られた溶液を使用前に濾過した。

【００６７】

エオシンＹ溶液　０．５％水溶液

５ｇエオシンＹを１０００ｍＬ　ＲＮａｓｅ不含水に添加し、２時間、室温で攪拌した。攪拌しながら２ｍＬ氷酢酸を添加した。

【００６８】

ＤＥＰＣ処理水

水１００ｍＬあたり０．１ｍＬ　ＤＥＰＣ（ピロ炭酸ジエチル）を添加した。ＤＥＰＣを溶液にするために、それを激しく攪拌し、１２時間３７℃でインキュベートし、１５分間オートクレーブ処理して残留ＤＥＰＣを低減させた。

【００６９】

参照試料からのＲＮＡ抽出：

ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　ＲＮＡプロトコル「Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｔｏｔａｌ　ＲＮＡ　ｆｒｏｍ　Ｓｅｃｔｉｏｎｓ　ｏｆ　ＰＡＸｇｅｎｅ　Ｔｒｅａｔｅｄ，Ｐａｒａｆｆｉｎ－Ｅｍｂｅｄｄｅｄ　Ｔｉｓｓｕｅ」に述べられているようにキシレンおよびエタノール中でのインキュベーションにより、４～６μｍ厚を有する切片からパラフィンを除去した（Ｌｅｉｃａ　ＲＭ２２４５　Ｍｉｃｒｏｔｏｍで行った）。キシレンおよびエタノールの除去後、ペレットを溶解緩衝液ＴＲ１、水で溶解し、１０分間、５５℃で消化した。ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｓｈｒｅｄｄｅｒを使用して、均質化を行った。前記プロトコルに従って、エタノールを添加した後、溶解産物をＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）ＭｉｎＥｌｕｔｅカラムに移し、緩衝液ＴＲ２で洗浄し、そのカラム上でＤＮａｓｅと共にインキュベートし、ＴＲ３および８０％エタノールで洗浄した。ＲＮＡを１５μＬ～４０μＬの緩衝液ＴＲ４で溶離した。

【００７０】

スライドガラスに載置した組織の全切片または精査するエリアからのＲＮＡ抽出：

スライドガラスに載置した組織切片を５分間キシレン中および３分間１００％エタノール中でのインキュベーションによって脱パラフィンした。組織の染色および／または望ましくないエリアの除去後、そのスライド上の選択された組織に、プロテアーゼ、水および緩衝液ＴＲ１（１５０μＬ　ＴＲ１、１０μＬプロテアーゼ、２９０μＬ水）を含有する１５０μＬの溶解用混合物を上塗りした。室温での１０分のインキュベーションの後、ピペッティングによってその混合物および組織を微量遠心管に移した。残りの溶解用混合物を添加し、その後、１０分、５５℃でのインキュベーションを行った。ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）－Ｓｈｒｅｄｄｅｒを使用して、均質化を行った。前記プロトコルに従って、エタノールを添加した後、溶解産物をＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）ＭｉｎＥｌｕｔｅカラムに移し、緩衝液ＴＲ２で洗浄し、そのカラム上でＤＮａｓｅと共にインキュベートし、ＴＲ３および８０％エタノールで洗浄した。ＲＮＡを１５μＬ～４０μＬの緩衝液ＴＲ４で溶離した。

【００７１】

ＲＮＡ分析：

ＲＮＡを１５μＬ～４０μＬの緩衝液ＴＲ４で溶離した。純度および収量の分光光度分析をＮａｎｏｄｒｏｐ光度計で行った。ＲＮＡ　６０００　Ｎａｎｏアッセイを用いてＡｇｉｌｅｎｔ　ＢｉｏａｎａｌｙｚｅｒでＲＮＡ完全性を測定した。Ｑｕａｎｔｉｔｅｃｔ　Ｐｒｏｂｅ　ＲＴ　Ｍｉｘ（ＱＩＡＧＥＮ）と、ヒトベータアクチン遺伝子の２９４ｂｐフラグメントを増幅および検出するためのプライマーおよびプローブとを使用して、一工程アプローチでのＴａｑＭａｎ　７７００（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）上でリアルタイムＲＴ－ＰＣＲを行った。

【００７２】

実施例１　スライドに載置した肝臓組織からのＲＮＡ単離

最大３ｍｍ厚の小片に切断したラット肝臓を３時間、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　Ｆｉｘ中でおよび５２時間、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　Ｓｔ

ａｂｉｌｉｚｅｒ中で固定した。加工処理およびパラフィン包埋後、６μｍ切片を、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　ＲＮＡキットハンドブックに従って微量遠心管の中での直接ＲＮＡ抽出に使用したか、スライドガラスに載置した。スライドガラスに載置した切片を脱パラフィンし、漸増する試料の部分（切片の５０％、７５％および９０％）をセルスクレーパで除去した。スライドに載置した切片からのＲＮＡ抽出のために改変したプロトコルでＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　ＲＮＡキットを使用して、残りの組織（元の切片の５０％、２５％、１０％）からＲＮＡを精製した。前記プロトコルは、スライドガラスに載置された（残りの）試料の頂部への溶解緩衝液の少なくとも一部の直接添加、そして１０分のインキュベーション後、全組織を含む溶解用混合物の微量遠心管への移入、その後、前記キットハンドブックによるさらなる加工処理によって改変した。

【００７３】

ＲＮＡを、収量についてはＮａｎｏｄｒｏｐ（登録商標）Ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、米国Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ）で分光光度法によって、完全性についてはＲＮＡ　６０００　Ｎａｎｏ　Ａｓｓａｙを用いるＡｇｉｌｅｎｔ（登録商標）Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、米国Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ）で、および定量的ＲＴ－ＰＣＲにおいてＴａｑＭａｎ　７７００（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でのβ－アクチンについてのプライマー／プローブアッセイを使用して分析した。分析の結果を図１（収量）、２（完全性）および３（定量的ＲＴ－ＰＣＲにおける性能）に示す。

【００７４】

この実施例は、スライドに載置されたＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ処理試料の切片から高品質ＲＮＡを単離できることを実証する。脱パラフィン後、ターゲット組織または細胞を、例えば切片の望ましくないエリアを除去することによって、選択することができる。このＲＮＡを、切片を微量遠心管に直接移し、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　ＲＮＡプロトコルに従って加工処理した参照と、品質および収量に関して比較できる。リアルタイムＲＴ－ＰＣＲのような要求の厳しい下流での適用にＲＮＡを使用することができる。ＣＴ値は、参照と比較できる、すなわち、ＣＴ値は、ＲＮＡ投入量減少と相関して線形に増加する（図３参照）。

【００７５】

実施例２　ヘマトキシリンおよびエオシンでの染色後の組織の切片からのＲＮＡ単離および組織形態学的分析

ラット腎臓を最大４ｍｍ厚の小片に切断し、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅシステムで処理した。加工処理およびパラフィン包埋後、１つの４μｍ切片の三連の試料を、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　ＲＮＡキットを使用する直接ＲＮＡ抽出に使用した、またはスライドガラスに載置してヘマトキシリンおよびエオシンで染色した。染色中のＲＮＡ分解を避けるために、ヘマトキシリンでの６０秒染色およびエオシンでの１秒染色（染色１）またはヘマトキシリンでの３０秒染色およびエオシンでの１秒染色（染色２）を含む、迅速染色法を用いた。染色後、染色された切片からＲＮＡを直接単離した。

【００７６】

ＲＮＡを、収量についてはＮａｎｏｄｒｏｐ（登録商標）Ｓｐｅｃｔｒｏｐｈｏｔｏｍｅｔｅｒ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、米国Ｗｉｌｍｉｎｇｔｏｎ）で分光光度法によって、完全性についてはＲＮＡ　６０００　Ｎａｎｏ　Ａｓｓａｙを用いるＡｇｉｌｅｎｔ　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒ（Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、米国Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ）で、および定量的ＲＴ－ＰＣＲにおいてＴａｑＭａｎ　７７００（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）でのβ－アクチンについてのプライマー／プローブアッセイを使用して分析した。標準的な方法に従ってヘマトキシリンおよびエオシンで４μｍ切片を染色することにより、組織形態を評価した。

【００７７】

【表１】

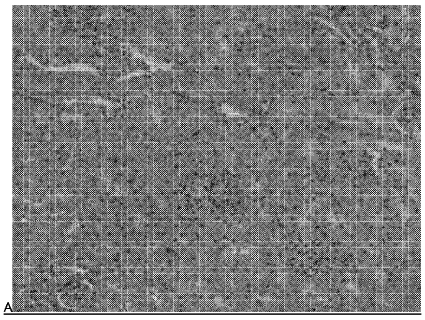
表1. 包埋試料のためのH＆E迅速染色プロトコル

工程	媒体	インキュベーション時間
1	キシレン	5分間
2	キシレン	3分間
3	100%エタノール	3分間
4	95%エタノール	3分間
5	80%エタノール	3分間
6	70%エタノール	3分間
7	DEPC処理水	2秒間
8	ヘマトキシリン溶液	最長60秒間または最長30秒間
9	DEPC処理水	1秒間
10	エオシンY溶液	1秒間
11	80%エタノール	1分間
12	95%エタノール	1分間
13	100%エタノール	使用まで

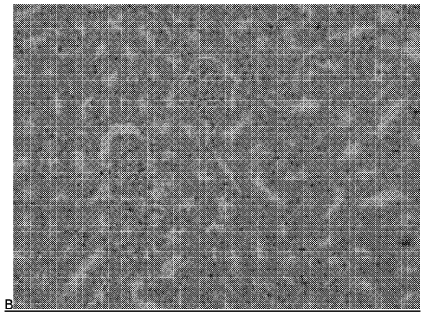
【００７８】

この実施例は、ＰＦＰＥ（ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）固定パラフィン包埋）組織切片の好酸性特性に起因して、ヘマトキシリンでの６０秒間または３０秒間およびエオシンでの１秒間だけの染色で十分であることを実証する。細胞質および核のようなすべての関連細胞構造が見えるようになり、それらを使用して精査のための特別な細胞または組織エリアを選択することができる。染色された切片中のＲＮＡは、依然として保存されており、上で説明したような改変型プロトコルでＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　ＲＮＡキットを使用してそれらを単離することができる。このＲＮＡを、切片を微量遠心管に直接移し、ＰＡＸｇｅｎｅ（登録商標）Ｔｉｓｓｕｅ　ＲＮＡプロトコルに従って加工処理した参照と、品質および収量に関して比較できる。リアルタイムＲＴ－ＰＣＲのような要求の厳しい下流での適用にＲＮＡを使用することができ、かつＣＴ値は、参照と比較できる。

【図７Ａ】

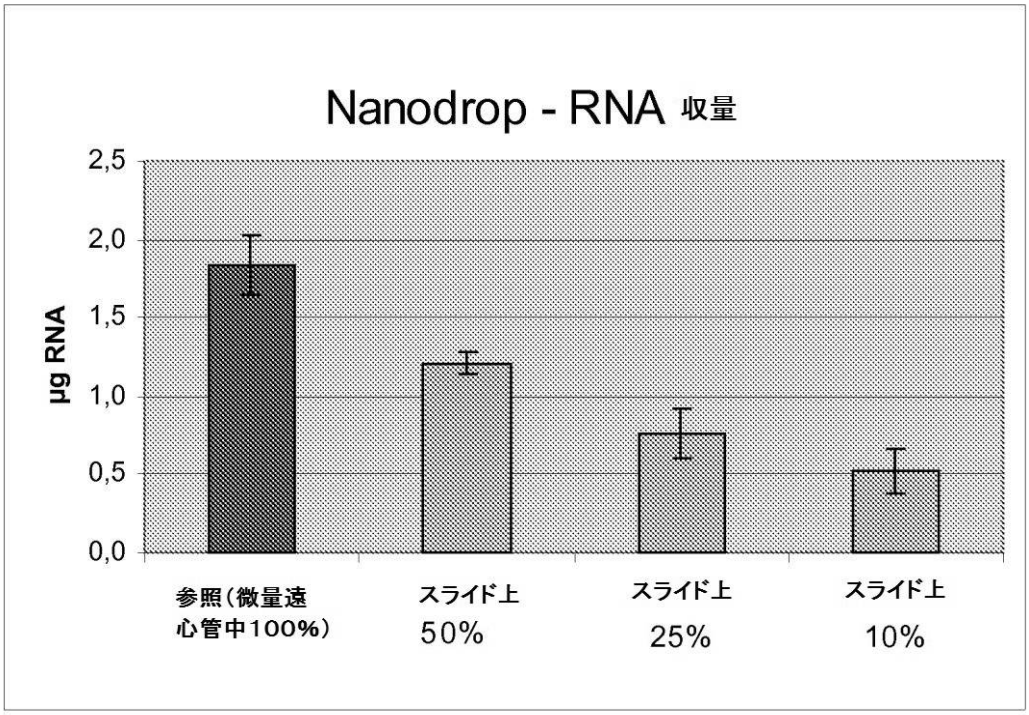


【図７Ｂ】

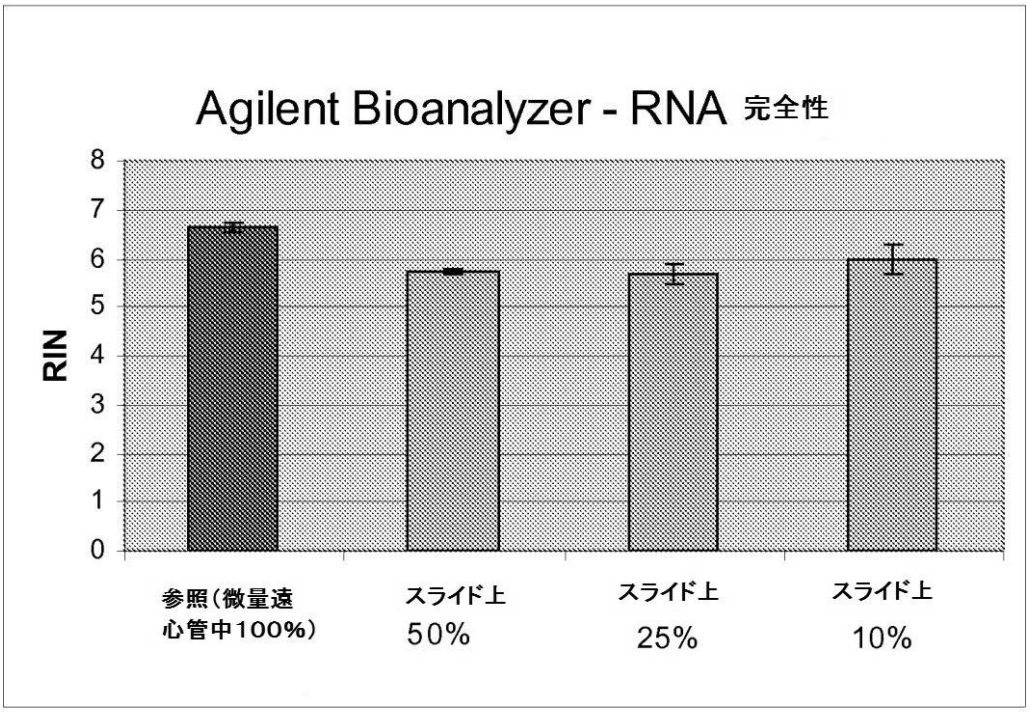


【図１】

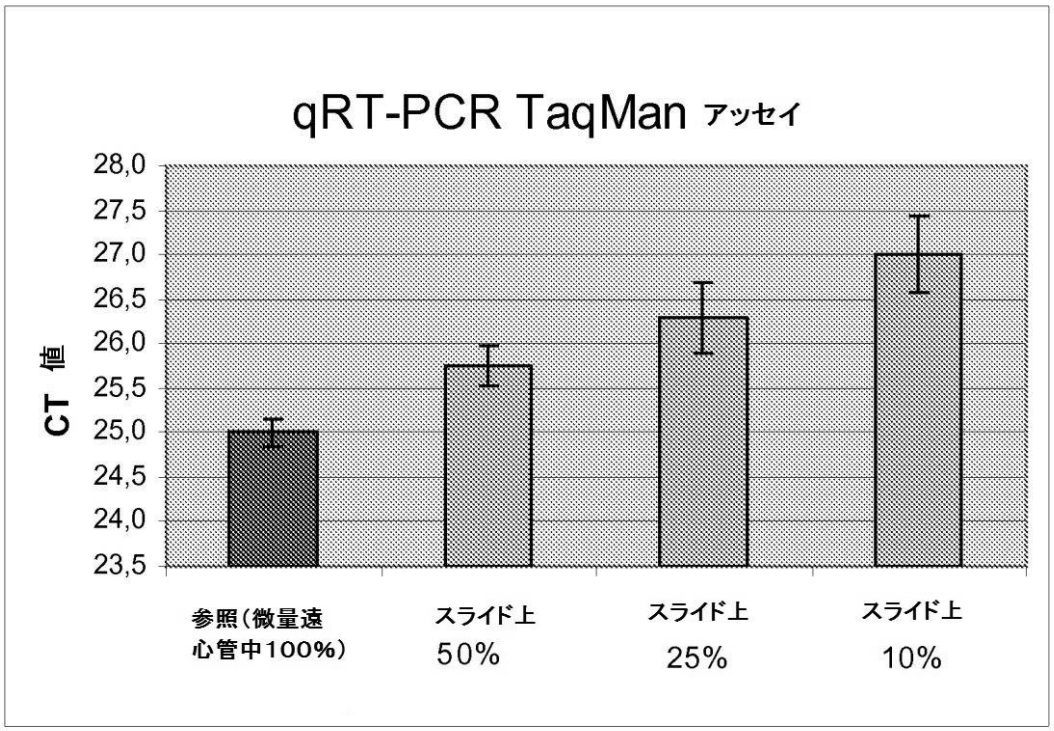
Figure 1



【図２】
Figure 2

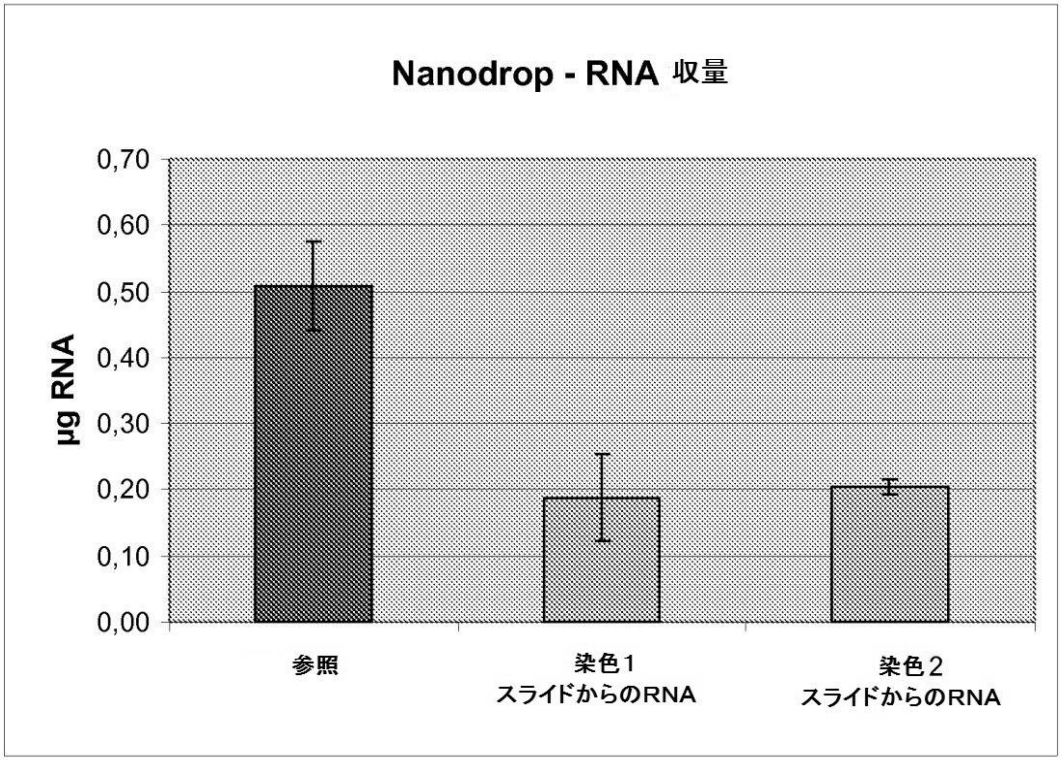


【図３】
Figure 3



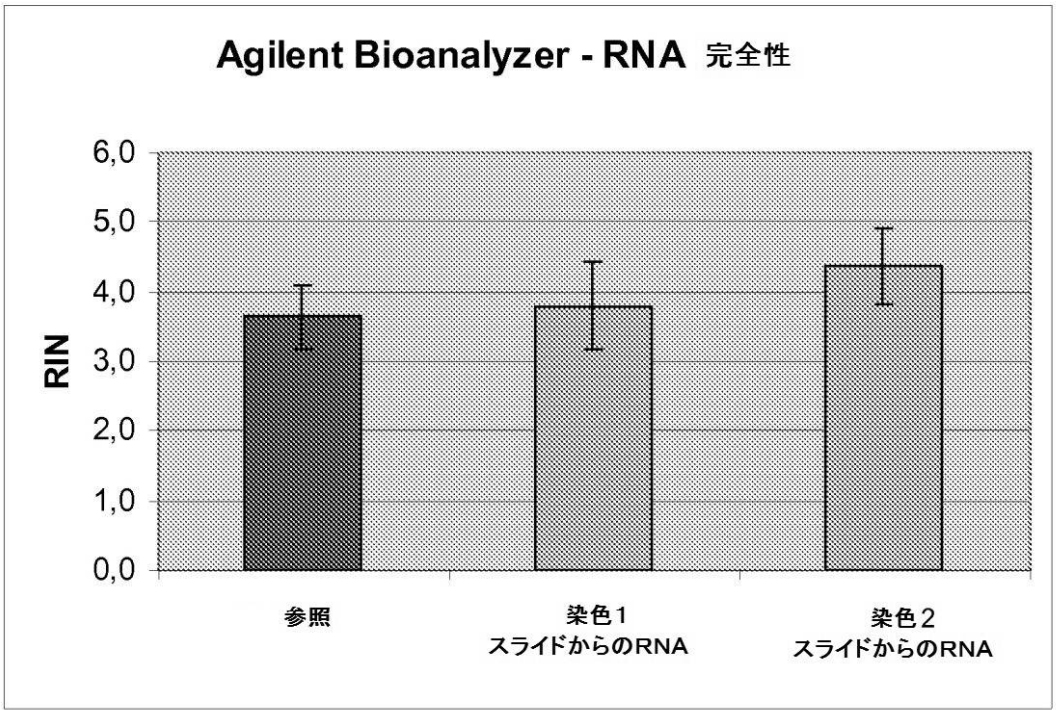
【図４】

Figure 4



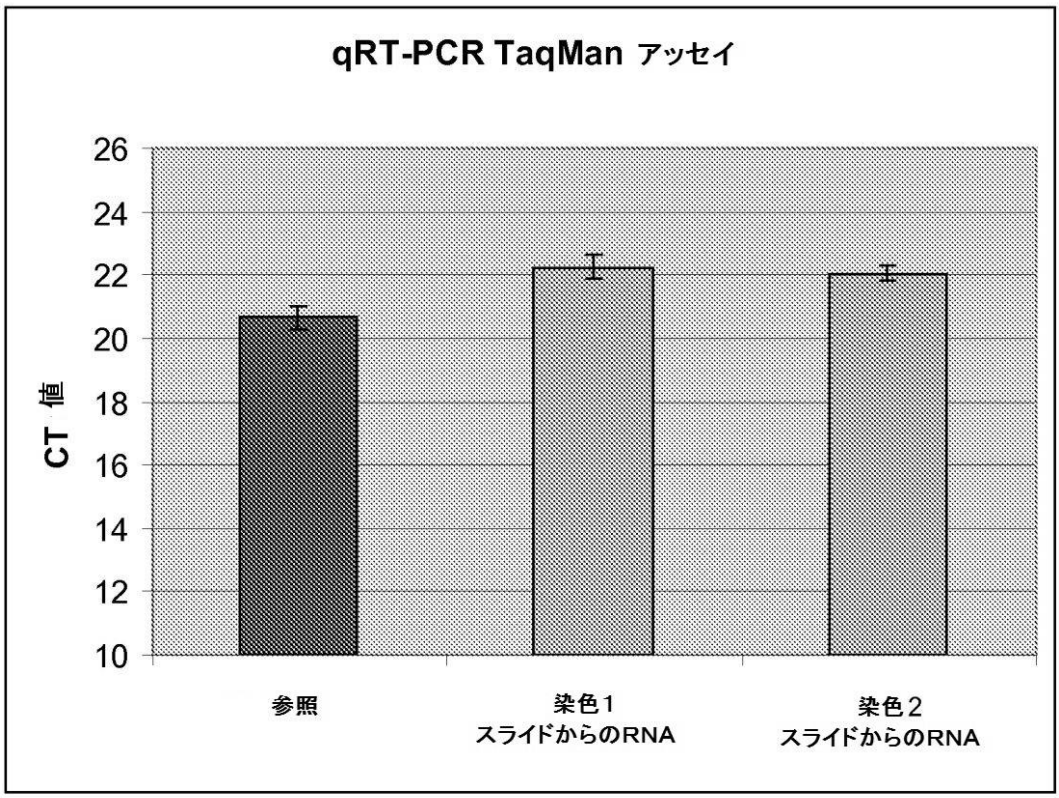
【図５】

Figure 5



【図６】

Figure 6


qRT-PCR TaqMan アッセイ
CT 値
26
24
22
20
18
16
14
12
10
参照
染色1
スライドからのRNA
染色2
スライドからのRNA

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/059777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/68 G01N33/50
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 506 105 A (HAYDOCK PAUL V [US]) 9 April 1996 (1996-04-09) column 3, line 25 - column 5, line 55; claims 1, 2; examples 3, 4	1-14
X	WO 02/055985 A2 (ROCHE DIAGNOSTICS CORP [US]) 18 July 2002 (2002-07-18) examples 1, 3	1-14
A	US 2002/142340 A1 (WAGGONER ALAN S [US]) 3 October 2002 (2002-10-03) paragraph [0007] - paragraph [0023]; example 6	1-14
A	US 5 589 333 A (BAGASRA OMAR [US] ET AL) 31 December 1996 (1996-12-31) claims 1-11; example 1	1-14

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
30 August 2011	07/09/2011

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Stachowiak, Olaf

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/059777

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 03/031591 A2 (SUPERARRAY INC [US]) 17 April 2003 (2003-04-17) paragraphs [0133], [0180] - [0189]	1-14
A	WO 2005/068610 A1 (ADVANCED CELL TECH INC [US]; WEST MICHAEL D [US]; CHAPMAN KAREN B [US]) 28 July 2005 (2005-07-28) example 1	1-14

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2011/059777

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5506105 A	09-04-1996	NONE	
WO 02055985 A2	18-07-2002	AU 2002243263 A1	24-07-2002
		CA 2428757 A1	18-07-2002
		EP 1368369 A2	10-12-2003
US 2002142340 A1	03-10-2002	US 2002146736 A1	10-10-2002
		US 6956032 B1	18-10-2005
US 5589333 A	31-12-1996	NONE	
WO 03031591 A2	17-04-2003	AU 2002360272 A1	22-04-2003
WO 2005068610 A1	28-07-2005	AU 2005205516 A1	28-07-2005
		CA 2552288 A1	28-07-2005
		EP 1711594 A1	18-10-2006
		NZ 548623 A	30-04-2010
		US 2006112438 A1	25-05-2006
		US 2006031955 A1	09-02-2006
		US 2007067860 A1	22-03-2007

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

Ｆターム(参考) 4B063 QA13 QA18 QQ08 QQ53 QR36 QR77 QS39 QX01