

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5048215号
(P5048215)

(45) 発行日 平成24年10月17日(2012.10.17)

(24) 登録日 平成24年7月27日(2012.7.27)

(51) Int.Cl.

F I

A O 1 N 1/02 (2006.01)

G O 1 N 1/28 (2006.01)

G O 1 N 1/30 (2006.01)

A O 1 N 1/02

G O 1 N 1/28

G O 1 N 1/28

G O 1 N 1/28

G O 1 N 1/30

J

F

U

請求項の数 5 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2004-507795 (P2004-507795)
 (86) (22) 出願日 平成15年5月27日(2003.5.27)
 (65) 公表番号 特表2005-527631 (P2005-527631A)
 (43) 公表日 平成17年9月15日(2005.9.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2003/002029
 (87) 国際公開番号 W02003/100384
 (87) 国際公開日 平成15年12月4日(2003.12.4)
 審査請求日 平成18年3月23日(2006.3.23)
 (31) 優先権主張番号 02425337.9
 (32) 優先日 平成14年5月28日(2002.5.28)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)
 (31) 優先権主張番号 02028892.4
 (32) 優先日 平成14年12月23日(2002.12.23)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者 504436376
 ディアパト ソシエタ ア レスポンサビ
 リタ リミタータ
 イタリア国 イー24057 マルティネ
 ンゴ ヴィア サヴォルディーニ 71
 (74) 代理人 100060759
 弁理士 竹沢 莊一
 (74) 代理人 100087893
 弁理士 中馬 典嗣
 (72) 発明者 ジャンフィリッポ モスコーニ
 イタリア国 イー60039 スタフォロ
 ヴィア プレチオーネ 17
 (72) 発明者 モニカ ビアンキ
 イタリア国 イー24060 カザツァ
 ヴィア ナツィオナーレ 102
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプルの調製用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプルを調製する方法であって、該サンプルを、室温及び大気圧下で、オクタン60容量%、イソプロピルアルコール10容量%及びエチルアルコール30容量%を含む組成物で処理することを特徴とする方法。

【請求項 2】

中間試薬によるサンプルの洗浄を、前記組成物による前記サンプルの処理の前に行うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記中間試薬が95%エチルアルコールであることを特徴とする請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプルを処理するために使用する組成物であって、オクタン60容量%、イソプロピルアルコール10容量%及びエチルアルコール30容量%を含み、室温及び大気圧下で使用することを特徴とする組成物。

【請求項 5】

組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプルを処理するために、請求項 4 に記載の組成物を使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

10

20

本発明は、組成物、及び検査用の組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプル及び同様のサンプルの調製における前記組成物の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

知られているように、組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプル及び同様のサンプルの分析は、多数の病状の正確かつ迅速な診断を行うことができるのと理由だけでなく、当該分野における進歩に貢献する複雑な研究を実行できるとの理由により、近代医学において、基本的に重要なものである。当然ながら、最善の保存、分析再現性及び結果の信頼性を保証するため、分析に供されるサンプルは、正確なプロトコルに従って処理及び調製されなければならない。

10

【0003】

現在、手術された器官から又は既に固定された死体解剖から取り出されたサンプル（例えば、組織サンプル）の場合、検査用サンプルの調製における第1段階は、ブレードによるカッティングに必要な剛性を付与するために、好適なコンシステンシーの媒体における封入のためのサンプルを調製することを目的とする、いわゆる、プロセッシングフェーズからなる。今日、これらの特性を最もよく満足する封入材料はパラフィンであるが、パラフィンは、使用される多くの固定剤とは混合されない。この理由により、組織をパラフィンに封入し、要求に従ってカットするためには、組織は各種の処理を受けなければならない。これらの処理は、いずれも、プロセッシングフェーズに関連するもので、下記のように要約される：

20

- 脱水フェーズ：サンプルに含有された水が、無水の試薬によって置き換えられる、
- 清澄化フェーズ：無水の試薬が、無水の試薬及び封入媒体の両方と混合される成分（清澄化媒体）によって置き換えられる、
- 含浸フェーズ：清澄化媒体が、含浸媒体（又は封入媒体）によって置き換えられる。

【0004】

第1フェーズは、採取後直ちにサンプルを固定するための初期フェーズにおいて使用された水性媒体の除去を提供する。多数の脱水剤を使用できるが、好ましくは、エチルアルコールが漸増する濃度で使用される。サンプルは、初めに70%エチルアルコール、ついで95%エチルアルコールで処理され、及びさらに100%で処理される。最も一般的に使用される脱水剤は、パラフィン（サンプルが封入される媒体）に溶解性ではないため、これらは、脱水剤及び含浸剤の両方に溶解性である成分によって置き換えられなければならない。このフェーズでは、キシレン（又はキシロール、ジメチルベンゼン）が一般的に使用され、これは、可燃性液体であり、高度に揮発性かつ潜在的に高度に有毒性であるオルト、メタ及びパラ異性体の混合物からなる芳香族炭化水素である。キシレンの潜在的な毒性は、ユーザーにとって不変の問題点である。中枢神経系に対する特有の作用は、初めに、吐き気及び胃腸障害として現れ、中毒症状が持続すると、めまい、昏迷及び嘔吐として現れる。吸入すると、呼吸粘膜の炎症及び肺水腫の原因となる。慢性的にさらされる場合には、中枢神経系、白血球組成（leucocytic formula）、心臓機能、及び、中でも、潜在的な発癌性について変性が観察される。

30

【0005】

さらに、公知技術によれば、一般に、プロセッシングフェーズの後には、パラフィンへの封入フェーズ、カッティングフェーズ及び染色フェーズが行われる。この技術は、キシレンでの処理、変化する力価（100%，95%，70%）のアルコールによる再水和、サンプルの染色、他の脱水段階（70%，95%，100%）及び最後に脱水剤を排除するためのキシレンによる処理によって、パラフィン（カッティング用の支持体としてのみ使用されている）の排除を提供する。

40

【0006】

細胞学的サンプルの分析（パラフィンへの封入が行われたい又は不要である）の場合、サンプルが多数の水和及び脱水フェーズを受けるため、これらの場合にも、キシレンを繰り返し使用することが要求される。従って、検査用の組織学的及び/又は解剖学的サンプ

50

ルの調製に関する手続におけるキシレンの繰り返しの使用は、手続の多くが自動システムによって行われる場合においても、オペレーターにとって、ある種の危険を含む。

【 0 0 0 7 】

キシレンの代用物を検索するために、多くの研究が行われてきた。ヨーロッパ特許公開第1195594号は、顕微鏡分析用サンプルの標本化方法であって、有機溶媒中に少なくとも1のメタクリレート樹脂を含有する溶液を使用することを包含するサンプルの標本化法を開示している。有機溶媒は、有利には、飽和炭化水素から選ばれ、必要であれば、1以上のアルコールと混合される。処理媒体は、特に、顕微鏡分析用スライドへのカバーの適用のために及びアーカイブに保管された材料の保存を改善するために使用される。

【 0 0 0 8 】

ヨーロッパ特許公開第0822403号は、分析用有機組織のプロセッシング法を開示している。この方法は、脱水剤及び清澄化剤からなる混合物を同時に使用して行われるサンプルの脱水及び清澄化を提供する。その記載によれば、脱水剤は、例えば、エタノール及びイソプロパノールの混合物であり、清澄化剤は、オクタンの如き脂肪族炭化水素である。サンプルの同時脱水及び清澄化フェーズは、例えば、300～500ミリバールの圧力下、温度70～90において行われる。このヨーロッパ特許公開第0822403号は、好適な圧力及び温度条件下で上記のフェーズを行うためのマイクロ波装置の使用を開示している。また、マイクロ波加熱装置を包含する、上記方法を実施するための装置も開示している。

【 0 0 0 9 】

参照した発明によれば、同時脱水及び清澄化フェーズにおける被分析サンプルの特定温度への加熱は、処理サイクルの終了時点で良好な結果を提供する圧力を生ずるに充分である。しかし、サンプルの加熱は、上記の温度よりも高い温度で行われなければならない、そうでなければ、サンプルは乾燥し、その細胞は破壊されること；同様に、同じ理由から、高すぎる圧力下で行われてはならないことが明らかである。一方、上記の値よりも低い温度及び圧力では、サンプルの効果的なプロセッシングを行うことができず、不満足な結果を生じ、分析が困難で、信頼できない結果を生ずるサンプルが形成される。プロセッシングフェーズの成功に必須の特殊なマイクロ波装置の使用に加えて、ヨーロッパ特許公開第0822403号に記載された方法は、オペレーターが、操作及びサンプル処理を行う際の圧力及び温度条件に格別の注意を払うことを要求する。

【 発明の開示 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は、発癌性ではなく、毒性レベルが低く及び使用が迅速かつ容易である、組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプル及び同様のサンプルを調製するための組成物を利用できるようにすることにある。

【 0 0 1 1 】

本発明の他の目的は、これまでは検査用サンプルの調製において必須であった多くの段階を排除し、伝統的な方法と比べて、各種の追加の器具の使用を含まず、いくつかのケースでは、調製時間を節約することを可能にする、組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプル及び同様のサンプルを調製するための組成物を利用できるようにすることにある。

【 0 0 1 2 】

本発明のさらに他の目的は、オペレーターの混乱及び従ってエラーの危険性を低減するように各種の試薬を置き換え、加熱フェーズ又は脱水及び清澄化フェーズにおける追加の器具によるサンプルの処理を含まない、組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプル及び同様のサンプルを調製するための組成物を利用できるようにすることにある。

【 0 0 1 3 】

本発明の他の目的は、迅速、有効かつ信頼性であり、オペレーターに対する危険を含まず、しかも、サンプルの最適な保存を可能にして、サンプルの検査によって得られる結果の再現性及び信頼性を保証する、検査用の組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプルを調製するための組成物を利用できるようにすることにある。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0014】

これらの及び他の目的及び下記の記載によって良好に説明される関連する利点は、少なくとも1の $C_5 \sim C_{20}$ アルカン及び少なくとも1の脂肪族アルコールを含む、検査用の組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプル及び同様のサンプルの調製に使用される組成物によって達成される。

【0015】

本発明によれば、上記アルキル及び少なくとも1の脂肪族アルコールを含む上記組成物は、少なくとも1の $C_7 \sim C_{17}$ アルキルを含む。

【0016】

さらに詳しくは、本発明によれば、上記アルキルは $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルである。

【0017】

本発明によれば、上記アルキルはオクタンである。

【0018】

本発明によれば、上記 $C_5 \sim C_{20}$ アルキルは、 $C_5 \sim C_{20}$ アルキルから選ばれるシグナル化合物又は $C_5 \sim C_{20}$ アルキルの混合物、例えば、オクタン及び $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルの混合物である。

【0019】

本発明によれば、組成物は、オクタン、イソプロピルアルコール及びエチルアルコールを含む。本発明によれば、組成物は、少なくとも1の $C_5 \sim C_{20}$ アルキル、及び、例として、オクタン及び $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルの混合物又は $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルを含む。

【0020】

上記エチルアルコールは無水アルコール(99.9%)である。詳しくは、上記組成物は、少なくとも1の $C_5 \sim C_{20}$ アルキル又はその混合物40～70容量%、イソプロピルアルコール5～40容量%及びエチルアルコール5～40容量%を含む。組成物の百分率は、組成物全体を100としたものである。

【0021】

本発明によれば、上記組成物は、少なくとも1の $C_{10} \sim C_{13}$ アルキル又はその混合物40～70容量%、イソプロピルアルコール5～40容量%及びエチルアルコール5～40容量%を含む。組成物の百分率は、組成物全体を100としたものである。

【0022】

本発明による組成物は、オクタン及び $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルの混合物40～70容量%、イソプロピルアルコール5～40容量%及びエチルアルコール5～40容量%を含む。組成物の百分率は、組成物全体を100としたものである。

【0023】

本発明によれば、上記組成物は、少なくともオクタン40～70容量%、イソプロピルアルコール5～40容量%及びエチルアルコール5～40容量%を含む。組成物の百分率は、組成物全体を100としたものである。

【0024】

好適な形態では、本発明による組成物は、 $C_5 \sim C_{20}$ アルキル及び/又は $C_7 \sim C_{14}$ アルキル及び/又は $C_{10} \sim C_{13}$ アルキル及び/又はオクタン60容量%、イソプロピルアルコール10容量%及びエチルアルコール30容量%からなる。組成物の百分率は、組成物全体を100としたものである。

【0025】

この場合、組成物は、追加の器具の使用を必要とすることなく、かつサンプルを上記の特別な温度及び/又は圧力条件にする必要なく、被分析サンプルの脱水及び清澄化を可能にする。実際、上記濃度では、本発明による組成物は、周囲温度及び大気圧下で使用され、完全に処理されるサンプルを提供し、これにより、結果の高度の信頼性及び使用のかなりの利便性及び簡素化が得られる。追加の器具の使用がないため、フェーズは実施が容易であり、熟練していない者であっても、分析用のサンプルのプロセッシングを容易にかつ良

10

20

30

40

50

好に実施することができる。

【0026】

具体例の他の形態によれば、本発明による組成物は、 $C_5 \sim C_{20}$ アルキル及び/又は $C_7 \sim C_{14}$ アルキル及び/又は $C_{10} \sim C_{13}$ アルキル及び/又はオクタン50容量%、イソプロピルアルコール25容量%及びエチルアルコール25容量%からなり、特に、この場合、脂肪族アルコールの量は他のアルコールの量と同じであり、アルコールの量の合計は $C_5 \sim C_{20}$ アルキルの量と同じである。成分の百分率は、組成物全体を100としたものである。

【0027】

例として、本発明による組成物は、 $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルの混合物、又はオクタンと $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルとの混合物を含み、ここで、 $C_{10} \sim C_{13}$ アルキルの混合物は、「METRYL I 103」として市場で入手でき、本願の出願時、例えば、BRENNTAG SPA (VIA KULISCIOFF 22, MILANO MI) によって販売されているものである。

【0028】

本発明による組成物の調製法は、各成分が十分にブレンドされるまで、成分を混合することによって達成される。

【0029】

本発明による上記組成物は、各種の力価のエチルアルコール及びキシレン（上述のように、高度に有毒性であり、潜在的に発癌性である）に代わって、組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプル及び同様のサンプルの調製において有利に使用される。本発明による組成物の成分は高度の有毒性ではなく、発癌性であることを推定させる指摘はない。実際に、例えば、解剖学的及び/又は組織学的サンプルの調製の場合、本発明による組成物は、各種力価の一連のエチルアルコールの代わりに、及びサンプルの調製における全てのフェーズにおいてキシレンに代わって使用され、当該組成物のみを使用することによって、脱水及び清澄化フェーズを実施できる。さらに、上述のように、本発明による組成物の使用は、追加の器具又は特別の温度及び/又は圧力条件の使用を必要としない。脱水及び清澄化フェーズは、追加の処理を必要とすることなく、大気圧及び周囲温度で実施され、従って、いかなる作業環境においても、特別に熟練した者ではない者によっても容易に実施される。さらに、特別な温度及び圧力をかける必要がないため、エラーの危険が低減され、結果が、より信頼できるものとなる。

【0030】

さらに、本発明によれば、イソプロピルアルコールは、本発明の目的組成物において必須の成分であることが強調されなければならない。

【0031】

特にプロセッシングフェーズについては、いわゆる「大きい」サンプルのプロセッシングに関する下記の表から、本発明による組成物の使用から得られる利点を強調することができる。

【0032】

下記の表では、本発明の目的組成物を「組成物A」と表示する。

【0033】

組成物Aは、本発明に従って、上記の成分（ $C_5 \sim C_{20}$ アルキル及び/又は $C_7 \sim C_{14}$ アルキル及び/又は $C_{10} \sim C_{13}$ アルキル及び/又はオクタン、イソプロピルアルコール及びエチルアルコール）を混合することによって得られる。下記の実施例において、組成物Aと表示する場合、本発明に従って、上記成分を混合することによって得られる各種の組成物を意味する。

【0034】

表を参照すると、表1は、公知の技術に従って、サンプルのプロセッシングに関して一般的に採用される手続を示し、一方、表2は、組成物Aを使用する同じ手続を表し、及び表2Aは、本発明による手続の変形例を表す。

【0035】

【表 1】

標準プロセッシングプロトコル

試薬	時間	温度	真空／圧力
アルコール 70°	1 時間	周囲温度	大気圧
アルコール 95°	1 時間	周囲温度	大気圧
アルコール 95°	1 時間	周囲温度	大気圧
アルコール 95°	1 時間	周囲温度	大気圧
アルコール 100°	1 時間	周囲温度	大気圧
アルコール 100°	1 時間	周囲温度	大気圧
アルコール 100°	1 時間	周囲温度	大気圧
キシレン	1 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
キシレン	1 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
パラフィン 52-54°	1 時間	55 °C	大気圧
パラフィン 52-54°	1 時間	55 °C	真空／圧力
パラフィン 52-54°	1 時間	55 °C	真空／圧力
	1 3 時間		

10

20

30

【 0 0 3 6 】

【表 2】

組成物Aによるプロセッシングプロトコル（第1のケース）

試薬	時間	温度	真空／圧力
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
パラフィン52-54°	1 時間	55℃	大気圧
パラフィン52-54°	1 時間	55℃	真空／圧力
パラフィン52-54°	1 時間	55℃	真空／圧力
	1 3 時間		

【 0 0 3 7 】

【表 2 A】

組成物Aによるプロセッシングプロトコル（第2のケース）

試薬	時間	温度	真空／圧力
中間試薬	2 分	周囲温度	大気圧
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
組成物 A	2 時間 3 0 分	周囲温度	大気圧
パラフィン52-54°	1 時間	55℃	大気圧
パラフィン52-54°	1 時間	55℃	真空／圧力
パラフィン52-54°	1 時間	55℃	真空／圧力
	約 1 3 時間		

【 0 0 3 8 】

理解されるように、サンプルの調製に必要な全体の時間は変わらないが、異なった濃度の各種アルコール溶液における段階及び続くキシレンにおける段階は、組成物 A における段階のみで置き換えられる。あるいは、本発明によるプロセッシングプロトコルは、脱水及び清澄化前に、中間試薬（サンプルの固定フェーズからの残留する過剰のホルマリンを集

めるものであり、その極微量は、なおサンプル中に存在しうる）中での洗浄を含む非常に迅速な初期段階を提供する。本発明によれば、上記中間試薬は 95 % エチルアルコールである。

【0039】

従って、本発明による組成物は、周囲温度及び圧力において、1つのシングル成分にて脱水及び清澄化を行うことを可能にする。このように、プロセッシングフェーズは、公知技術による手続では必要であったキシレンとは対照的に、非毒性、非発癌性物質を使用してより少ない段階で実行される。さらに、脱水及び清澄化操作を、高い温度及び/又は圧力又は少なくとも周囲温度及び大気圧とは異なる温度及び/又は圧力において実施する必要はなく、従って、追加の器具を使用する必要がない。

10

【0040】

さらに、上述のように、検査用の組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプルの調製に関する手続を参照すると、サンプルは、検査に適する切片にカットされるように支持体内に封入されなければならない。安価であるとの理由及び取扱が容易であり、組織の非常に細かい切片が得られるとの理由の両方から、一般的に使用される封入媒体はパラフィンである。

【0041】

パラフィン中へのサンプルの封入、所望の切片へのカット、支持するパラフィンの除去及び被分析サンプルの染色からなる続く段階を下記に記載する。これらの連続するフェーズに関しても、本発明による組成物の使用は、各種力価のアルコール及びキシレンによるサンプルの処理を含む段階の置換えにおける基本である。

20

【0042】

封入

被検査サンプルをプロセスした後、鋼製の型によって、これらを、融点 56 ~ 58 のパラフィンブロック内に封入する。

【0043】

カッティング

マイクロトームを使用することによってカットして、厚さ 3 ~ 5 μm の切片を得る。組織のこれら切片をブラシにて集め、35 の水を収容する浴に入れて、これらを膨張させる。

30

【0044】

続いて、切片をスライド上で集める。

【0045】

これを、ストーブにおいて、続いて行われる染色プロトコルに応じて変動する時間及び変動する温度で乾燥させる。

【0046】

パラフィンの除去

被染色組織切片のためには、各種の試薬が組織に対して直接に作用できるように、組織を封入するパラフィンの層を除去しなければならない。

【0047】

この理由により、下記のプロトコルを採用した。表 3 は、公知の技術に従って一般的に行われる手続を示し、表 4 は、本発明による組成物 A を使用する手続を示し、及び表 4 A は、本発明による手続の変形例を示す。

40

【0048】

【表 3】

試薬	時間
キシレン	10分
キシレン	10分
無水アルコール	5分
無水アルコール	5分
アルコール 95°	2分
アルコール 95°	2分
水	5分
	39分

10

20

【 0 0 4 9 】

アルコール及びキシレン処理を置き換えることによって、本発明による組成物は、2つの段階のみでパラフィンの除去を可能にする。

【 0 0 5 0 】

【表 4】

試薬	時間
組成物 A	10分
組成物 A	10分
水	3分
水	3分
	26分

30

40

【 0 0 5 1 】

【表 4 A】

試薬	時間
組成物 A	10分
組成物 A	10分
中間試薬	2分
水	3分
水	3分
約26分	

10

【 0 0 5 2 】

この変形例では、パラフィンは、3つの段階のみで除去され、その内の1つ（中間試薬段階）は迅速かつ簡単である。

20

【 0 0 5 3 】

ディアファナイゼーション (diaphanisation)

各種の染色プロトコルを行った後、樹脂性マウンティング媒体によるカバーの適用のため、切片をさらに脱水しなければならない。これは、保存された切片の長い寿命を保証する。

【 0 0 5 4 】

このさらなる段階を行うため、表 6 に示されたフェーズ（本発明による組成物 A が使用される）に匹敵する、通常、下記のプロトコル（公知の技術による手続を示す）が使用される。

30

【 0 0 5 5 】

【表 5】

試薬	時間
アルコール70°	10秒
アルコール80°	10秒
アルコール95°	1分
アルコール95°	1分
無水アルコール	2分
無水アルコール	2分
キシレン	5分
キシレン	5分
	16分20秒

10

20

【0056】

アルコール及びキシレンを置き換えることによって、本発明による組成物も、2つの段階のみでディアファナイゼーションフェーズの実施を可能とする。

【0057】

【表 6】

試薬	時間
組成物 A	5分
組成物 A	5分
	10分

30

【0058】

上記に加えて、本発明による組成物は、キシレンによる処理と平行して、異なった割合のアルコール中での中間段階を必要とするいずれの組織学的染色プロトコルにおいても使用され、時には、段階期間が同じではあっても、方法の手動態様及び実行の容易性について明白な改善を保证する。

40

【0059】

表7、8及び8Aは、公知の技術による、及び本発明による組成物を2つの異なる変形例で使用するHematoxylin/Eosin染色法を示す。

【0060】

【表 7】

従来のシステムによるプロトコル

染色プロトコル	時間 (分)
キシレン中への切片の浸漬	10
キシレン中への切片の浸漬	10
無水アルコール中への切片の浸漬	2
無水アルコール中への切片の浸漬	2
95° アルコール中への切片の浸漬	2
80° アルコール中への切片の浸漬	2
蒸留水中での段階	5
HEMATOXYLIN 中への切片の浸漬	5
流水下での変色	5
アルコール性 EOSIN 中への切片の浸漬	1
70° アルコール中への切片の浸漬	1
80° アルコール中への切片の浸漬	1
95° アルコール中への切片の浸漬	1
無水アルコール中への切片の浸漬	2
無水アルコール中への切片の浸漬	2
キシレン中への切片の浸漬	5
キシレン中への切片の浸漬	5
スライドへのマウンティング媒体のマウント	
	61分

10

20

30

40

【表 8】

組成物 A を使用するプロトコル

染色プロトコル	時間 (分)
組成物 A 中への切片の浸漬	10
組成物 A 中への切片の浸漬	10
蒸留水中での段階	5
HEMATOXYLIN 中への切片の浸漬	5
流水下での変色	5
アルコール性 EOSIN 中への切片の浸漬	1
組成物 A 中への切片の浸漬	5
スライドへのマウンティング媒体のマウント	
	41 分

【 0 0 6 2 】

【表 8 A】

組成物 A を使用するプロトコル

染色プロトコル	時間 (分)
組成物 A 中への切片の浸漬	10
組成物 A 中への切片の浸漬	10
中間試薬	2
蒸留水中での段階	5
HEMATOXYLIN 中への切片の浸漬	5
流水下での変色	5
アルコール性 EOSIN 中への切片の浸漬	1
中間試薬	30 秒
組成物 A 中への切片の浸漬	5
スライドへのマウンティング媒体のマウント	
	約 43 分

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

このケースでは、既に述べた利点に加えて、本発明による組成物を使用して手続を行う場合に、時間をかなり節約できる。さらに、表 8 A に示す変形例によれば、中間試薬中での簡単な洗浄によって、過剰な染色が回避される。

【 0 0 6 4 】

細胞学的サンプル

本発明による組成物は、例えば、アルコール及びエーテル中において固定され、パラフィン又は他の封入剤中には封入されていない、尿、スミアテスト、痰及び他の液体の如き組織学的サンプル又は他のタイプのサンプル調製においても使用される。

【 0 0 6 5 】

本発明による組成物は、

- 1 . 洗浄全体の時間を同一に維持したまま、又は必要であれば、短い時間で、要求に応じて、異なった濃度のアルコールでの全ての洗浄プロセス、
 - 2 . 最終のディアファニゼーション
- を置き換える。

【 0 0 6 6 】

表 9、10 及び 10 A は、公知の技術による、及び本発明による組成物を 2 つの異なった変形例で使用する PAPANICOLAOU 染色法を表す。

【 0 0 6 7 】

【表 9】

公知技術による従来のプロトコル

染色プロトコル	時間 (分)
好適な固定剤によるスミアの固定後、 95° アルコール中への切片の浸漬	1
80° アルコール中への切片の浸漬	1
70° アルコール中への切片の浸漬	1
50° アルコール中への切片の浸漬	1
真水中への切片の浸漬	5
蒸留水中への切片の浸漬	1
HEMATOXYLIN 中への切片の浸漬	5
流水下での変色	5
70° アルコール中への切片の浸漬	1
95° アルコール中への切片の浸漬	1
95° アルコール中への切片の浸漬	1
オレンジ G 中への切片の浸漬	3
95° アルコール中への切片の浸漬	30 秒
95° アルコール中への切片の浸漬	30 秒
E A 5 0 中への切片の浸漬	5
95° アルコール中への切片の浸漬	30 秒
95° アルコール中への切片の浸漬	30 秒
無水アルコール中への切片の浸漬	2
無水アルコール中への切片の浸漬	2
キシレン中への切片の浸漬	5
キシレン中への切片の浸漬	5
スライドへのマウンティング媒体のマウント	
	47 分

【表 1 0】

組成物Aを使用するプロトコル

染色プロトコル	時間 (分)
好適な固定剤によるスミアの固定後、 組成物A中へのサンプルの浸漬	5
真水中へのサンプルの浸漬	5
蒸留水中へのサンプルの浸漬	1
HEMATOXYLIN 中へのサンプルの浸漬	5
流水下での変色	5
組成物A中への切片の浸漬	3
オレンジG中への切片の浸漬	3
組成物A中への切片の浸漬	1
E A 5 0 中への切片の浸漬	5
組成物A中への切片の浸漬	5
スライドへのマウンティング媒体のマウント	
	38分

10

20

【 0 0 6 9 】

【表 10A】

組成物Aを使用するプロトコル

染色プロトコル	時間 (分)
好適な固定剤によるスミアの固定後、 組成物A中へのサンプルの浸漬	5
真水中へのサンプルの浸漬	5
蒸留水中へのサンプルの浸漬	1
HEMATOXYLIN 中へのサンプルの浸漬	5
流水下での変色	5
組成物A中への切片の浸漬	3
オレンジG中への切片の浸漬	3
組成物A中への切片の浸漬	1
E A 5 0 中への切片の浸漬	5
中間試薬	30秒
組成物A中への切片の浸漬	5
スライドへのマウンティング媒体のマウント	
	約38分

【0070】

このケースにおいても、中間試薬中での迅速な洗浄によって、過剰な染色が回避される。

【0071】

このケースでは、顕著な時間の節約がないとしても、行われる段階の数が少ない及び使用する試薬が少ないとの点での節約が明白である。

【0072】

表に例示した上記ケースの全てにおいて、用語「中間試薬」は、95%エチルアルコールを示す。

【0073】

上記の如く、本発明による組成物は、キシレン及びアルコール段階を必要とすることなく、組織学的、解剖学的及び細胞学的サンプルの調製を可能にし、従って、異なった時点で及び特定の順序に従って異なった試薬を繰り返し使用することを回避できる。オペレーターが、予めセットされた順序に従って多くの異なった試薬を使用しなければならない場合、オペレーターは、容易に混乱を生ずることがあり、分析の最終結果に影響を及ぼすエラーを犯すことがある。本発明による組成物は、組成物自体、パラフィン及び使用した他の試薬との間の親和性のため、対応する段階でのパラフィン除去の時間を短縮することが可能である。この組成物は、組織（該組成物によって明度が付与される）の形態学的特性及び抗原性の発現を変化させない。

【0074】

上記のように、本発明による組成物を使用することによって、周囲温度及び圧力においてフェーズを行うことが可能であり、従って、特殊な装置又は追加のプロセスを必要としない。

【0075】

好適なサンプルについて調製が行われると、使用された及び手続の各フェーズに由来する組成物は回収され、適正な精製の後、必要であれば再使用される。当然ながら、精製後の再循環は、組成物の潜在的な汚染のタイプ（主に、サンプルが採取された対象における病状に左右され、当該サンプルは、本発明による組成物を使用して調製され、この組成物を接触している）に適合していなければならない。

フロントページの続き

審査官 前田 恵彦

- (56)参考文献 特表平 1 1 - 5 1 3 1 2 3 (J P , A)
欧州特許出願公開第 0 1 1 9 5 5 9 4 (E P , A 1)
特開平 0 3 - 0 6 8 8 6 6 (J P , A)
米国特許第 0 3 4 9 8 8 6 0 (U S , A)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A01N 1/00
G01N 1/00
CA/REGISTRY(STN)