

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3925664号

(P3925664)

(45) 発行日 平成19年6月6日(2007.6.6)

(24) 登録日 平成19年3月9日(2007.3.9)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 1/28 (2006.01)

GO 1 N 1/28

J

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00

A

GO 1 N 33/48 (2006.01)

GO 1 N 33/48

P

請求項の数 20 (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平10-507602

(86) (22) 出願日 平成9年8月1日(1997.8.1)

(65) 公表番号 特表平11-513123

(43) 公表日 平成11年11月9日(1999.11.9)

(86) 国際出願番号 PCT/EP1997/004207

(87) 国際公開番号 W01998/005938

(87) 国際公開日 平成10年2月12日(1998.2.12)

審査請求日 平成16年4月28日(2004.4.28)

(31) 優先権主張番号 96112571.3

(32) 優先日 平成8年8月2日(1996.8.2)

(33) 優先権主張国 欧州特許庁(EP)

(73) 特許権者

ミレストーン エッセ エレ エル

イタリア国 ペルガモ イー24010

ソリソーレ ヴィア ファテベネフラテリ

1/5

(74) 代理人

弁理士 北村 欣一

(74) 代理人

弁理士 田代 作男

(74) 代理人

弁理士 町田 悦夫

(74) 代理人

弁理士 打揚 洋次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物検体の処理方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 処理すべき生物サンプルを固定し、

(ii) 該サンプルを脱水剤で脱水し、

(iii) 本質的に親油性の試薬で、該サンプルを清浄化し、および

(iv) 該サンプルを含浸する、

工程を含み、該脱水剤と該本質的に親油性の試薬との混合物を同時に、該サンプルに適用することにより、該工程(ii)および(iii)を同時に実施することを特徴とする組織の処理方法。

【請求項 2】

該サンプルが非 - 脂肪質および / または脂肪質生物検体を含む請求の範囲第 1 項に記載の方法。

【請求項 3】

該方法が、更に該工程(ii/iii)と(iv)との間に、(v) 減圧下で該サンプルを乾燥する工程をも含む請求の範囲第 1 または 2 項に記載の方法。

【請求項 4】

該脱水剤がC₁₋₈ - アルコール類、C₁₋₈ - エーテル類、ケトン類およびフェノール類、アニリン類、テトラヒドロフラン、2,2-ジメトキシプロパンおよび2,2-ジエトキシプロパンおよびクレオソートまたはこれらの混合物からなる群から選ばれる上記請求の範囲の何れかに記載の方法。

10

20

【請求項 5】

該アルコールが、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノールおよびt-ブタノールまたはこれらの混合物からなる群から選ばれる請求の範囲第4項に記載の方法。

【請求項 6】

該エーテルが、グリコールエーテル類、2-エトキシエタノール、ジオキサンおよびポリエチレングリコールまたはこれらの混合物からなる群から選ばれる請求の範囲第4項に記載の方法。

【請求項 7】

該ケトンがアセトンである請求の範囲第4項に記載の方法。

10

【請求項 8】

該本質的に親油性の試薬が、脂肪族、芳香族および塩素化された炭化水素類、アルカン類、エステル類およびテルペン類またはこれらの混合物からなる群から選ばれる上記請求の範囲の何れかに記載の方法。

【請求項 9】

該本質的に親油性の試薬が、n-オレイン、トルエン、キシレン、ベンゼン、石油、パラフィン、二硫化炭素、クロロホルム、四塩化炭素、トリクロロエタン、酢酸n-ブチル、酢酸アミル、メチルベンゾエート、メチルサリチレート、セダーウッド油、クローブ油、インヒビソール、リモネンおよびテルピネオールまたはこれらの混合物からなる群から選ばれる請求の範囲第8項に記載の方法。

20

【請求項 10】

該脱水剤がエタノールとイソプロパノールとを含む請求の範囲第1または2項に記載の方法。

【請求項 11】

該脱水剤がエタノールとイソプロパノールとを含み、かつ該本質的に親油性の試薬がアルカンを含む請求の範囲第10項に記載の方法。

【請求項 12】

該エタノール、該イソプロパノールおよび該本質的に親油性の試薬を等しい量で使用する請求の範囲第10または11項に記載の方法。

【請求項 13】

該含浸工程(iv)が、寒天、ゼラチン、ポリビニルアルコール、ポリエーテルグリコール類、ポリエチレングリコールモノステアレート、ジエチレングリコールジステアレート、エステルワックス、ポリエステルワックス、ニトロセルロース、パラフィンワックスまたはこれらの混合物からなる群から選ばれる媒体中に該サンプルを包埋する工程を含む上記請求の範囲の何れかに記載の方法。

30

【請求項 14】

該工程(ii)および(iii)を、加圧下、好ましくは0.11~1.0MPaの範囲内の圧力下で実施する上記請求の範囲の何れかに記載の方法。

【請求項 15】

該工程(ii)および(iii)を、70~90 の範囲内の温度にて実施する請求の範囲第14項に記載の方法。

40

【請求項 16】

該工程(v)を、0.01~0.05MPaの範囲内の圧力下で実施する請求の範囲第3~15項の何れかに記載の方法。

【請求項 17】

該工程(v)を、30~60 の範囲内の温度にて実施する請求の範囲第16項に記載の方法。

【請求項 18】

該方法をマイクロ波加熱デバイス中で実施する上記請求の範囲の何れかに記載の方法。

【請求項 19】

該工程(iv)を、交互の加圧および真空条件下で実施する上記請求の範囲の何れかに記載

50

の方法。

【請求項 20】

請求の範囲第 1 ～ 19 項の何れかに記載の方法を実施するための装置であって、

- (i) マイクロ波加熱デバイスと、このデバイスはその中に配置された封止可能な処理チャンバー (1, 2) を含み、
- (ii) 該処理チャンバー内に配置された、該サンプルを載せるための容器 (3) と、
- (iii) 該処理チャンバーに真空を印加するための手段と、
- (iv) 該処理チャンバーに圧力を印加するための手段と、
- (v) 該処理チャンバーに真空または圧力を印加するためのラインと、

を含み、該処理チャンバー (1, 2) は、プレート (2) および自動的に昇降可能なドーム (1) を含み、該昇降可能なドームは、該処理チャンバー内に配置された該容器 (3) を包囲し、かつ該処理チャンバーに真空または圧力を印加するための該ラインが該ドームを貫いて伸びていることを特徴とする上記装置。

10

【発明の詳細な説明】

本発明は、生物組織を処理して、これらを更なる研究のために準備することに関連する。より詳しく言えば、本発明は、マイクロ波処理、真空処理および加圧処理の組み合わせによる生物組織の処理方法に関連し、該方法は生物サンプルを固定する工程と、該サンプルを脱水しかつ清浄化する工程と、引き続き該サンプルを支持媒体中で浸潤しおよびその中に包埋して、後の光学および電子顕微鏡法による検査のために、基本的なヘマトキシリン (Haematoxylin) およびエオシンスタンス (Eosinstans) 並びに更なる技術、例えばマイ

20

クロ波染色、免疫学的染色、脱石灰化 (decalcification)、ハイブリダイゼーション等に好都合となるように処理する工程を包含する。

現時点では、診断病理学および解剖学的病理学のためのバイオプシーが、従来法により準備され、該従来法は以下の基本的諸工程に基づいている。

1. 検査すべき組織を、ホルマリンまたは塩水溶液で処理して、崩壊過程を停止させ、かつ該組織を安定化して、該処理の物理化学的に苛酷な処理に対して保護する。
2. 第二段階において、該サンプルを脱水させ、即ち該検体中に含まれる遊離水の幾分かまたは全てを、該サンプルから除去する。この手順中に、種々の細胞成分が、抽出される脂質等の脱水流体、および水性アルコール中に可溶化される水溶性のタンパクにより可溶化される。
3. 第三の段階は、もう一つの溶媒、即ち所謂清浄化剤による該組織の処理を包含する。清浄化は、脱水と該支持媒体による浸潤との間の過渡的段階である。多くの脱水剤が、該後に適用される支持媒体と不混和性であるので、該脱水剤および該包埋媒体両者に対して混和性の溶媒を使用して、該脱水段階から浸潤段階への移行を容易にする。
4. 生物検体の処理における最後の段階は、該支持物質により該組織の空洞および細胞を浸潤し、かつ最終的に、次の処理中に十分な外的支持をもたらすであろう媒体中に、該組織を包埋する工程を含む。

30

しかしながら、これらの手順は、例えばサンプル当たり 50 時間にも及ぶ可能性のある、該検体の処理時間が長い等の様々な欠点を示す。その上、莫大な量の脱水剤および清浄化剤を使用する必要がある。正常な手順において、該検体は、該脱水剤、例えばエタノールの濃度を上昇させること (100%エタノールまで) により数回処理され、かつ引き続き該脱水剤を除去するために、該清澄剤により数回処理される。大量の溶媒を使用する必要がある

40

ので、該溶媒が高純度であったとしても、このような手順のコストはかなり高い。処理時間の短縮された組織処理手順は、例えば M.E. ブーン (Boon) らによる文献「組織処理のための 2 - 段階真空 - マイクロ波法 (The Two-Step Vacuum-Microwave Method for Histoprocessing)」, European Journal of Morphology, 1995, Vol. 33, No. 4, pp. 34 9-358 により公知である。この文献に記載されている生物組織の組織処理法は、該組織を固定する段階と、該サンプルを脱水する段階と、該サンプルを清浄化する段階と、該サンプルをパラフィン中に包埋する段階とを含み、該サンプルの脱水および清浄化段階は、真空チャンバー内で 100%-イソプロパノール中で同時に実施され、かつマイクロ波で加熱さ

50

れる。この段階ではイソプロパノールを使用するが、その理由はこれが弱い脱水剤であり、かつ清浄化剤であるからである。この段階において、温度は55℃に制御され、かつ圧力は0.04MPa(400ミリバール(mbar))であり、従って該組織は悪影響を受けることなく、該処理の苛酷さに耐え得る。

他方、かなりの量の脂質を含有する生物組織(脂肪質組織)サンプルを適当に処理することは、実際上は困難であることが立証された。この場合、除去すべき遊離水が、大幅に該組織中に保持されており、このことは過剰量の脱水剤の使用を必要とし、ついには該検体の性能劣化を招く。この事実は、該各検体中に含まれる脂肪質細胞が該組織からの水の自由な移動を阻害することに起因するものと考えられた。

代替技術の一つが、研究室における該バイオプシー材料の受け取りと、更なる実験のための組織の入手性との間の時間の遅れを減じ、かつそれぞれの材料の薄層スライドを迅速に入手するために開発された。このバイオプシー材料は、液体窒素中で凍結され、次に低温にてクリオスタットミクロトーム内で裁断される。しかし、この方法により処理されるこれらの検体は、寧ろ貧弱な性能を示す。

従って、上記問題点を解消する、生物組織を処理するための改良法に対する需要が、当分野にはあった。

本発明の一局面に従えば、生物組織を処理するための方法が提供され、該方法は以下の諸工程、即ち

- (i) 処理すべき生物サンプルを固定し、
- (ii) 該サンプルを脱水剤で脱水し、
- (iii) 本質的に親油性の試薬で該サンプルを清浄化し、および
- (iv) 該サンプルを含浸する、

工程を含み、該工程(ii)および(iii)を、該脱水剤と該本質的に親油性の試薬との混合物を同時に、該サンプルに適用することにより、同時に実施することの特徴とする。

本発明のその他の局面並びに利点は、添付図を参照しつつ、請求の範囲と共に本明細書を読んだ際には、当業者には容易に明らかとなろう。

生物組織の処理における第一の工程は、各検体の固定である。本発明の方法においては、利用する固定法に関して何等特別な制限はない。従って、固定を保証するのに通常使用されている方法を使用できる。本発明の処理において適した方法は、標準的な塩水中での、バイオプシー検体のマイクロ波照射、好ましくは40~60℃の高温にて、ルーチン固定液につき1以上の変更を施した組織処理装置上での固定の継続、該組織処理装置上でのホルモル昇華物中での、または固定を完了し、かつ脱水を開始するであろうアルコール性固定液中での二次的な固定、40℃における、緩衝されたフェノール-ホルムアルデヒドのpH7.0およびpH5.5シーケンスにおける固定等を含んでいた。

本発明の方法の第二の段階では、該検体を、脱水剤と本質的に親油性の試薬、即ち清浄化剤との組み合わせにより処理する。

本発明の方法で使用する該脱水剤としては、本質的に親水性の化合物を挙げることができる。該化合物の例は、低級アルコール類、好ましくは炭素原子数1~8のアルコール類、低級エーテル類、好ましくは炭素原子1~8個を含むエーテル類、ケトン類、好ましくはアセトン、フェノール類、アニリン類、テトラヒドロフラン、2,2-ジメトキシプロパン、2,2-ジエトキシプロパンおよびクレオソートを含む。これら化合物の何れも、所定の目的に対してまたは特定の組織検体について特定の利点を示すので、当業者は各研究に対して相応しい1種、またはその混合物を選択するであろう。

特に好ましい脱水剤は、アルコール類、例えばメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、n-ブタノールおよびt-ブタノールまたはこれらの混合物を包含する。イソプロパノールまたはイソプロパノールとエタノールとの混合物が最も好ましい。

本発明の方法において、該脱水剤と共に使用する該清浄化剤としては、本質的に両親媒性のまたは親油性の化合物を挙げることができ、この試薬は、好ましくは使用したそれぞれの脱水剤と混和性であるべきである。該清浄化剤の例は、直鎖または分岐鎖であり得、またハロゲン、例えば塩素、臭素またはヨウ素で置換されていてもよい、脂肪族炭化水素を

10

20

30

40

50

包含する。芳香族炭化水素も使用でき、これらは、炭素原子数 1 ~ 4 の部分により置換されていてもよく、あるいはハロゲン、例えば塩素、臭素またはヨウ素で置換されていてもよい。同様に、アルカン類、エステル類およびテルペン類も、本発明の方法における清浄化剤として適当であることが分かっている。

具体的な例はトルエン、キシレン、ベンゼン、石油、パラフィン、二硫化炭素、クロロホルム、四塩化炭素、トリクロロエタン、酢酸n-ブチル、酢酸アミル、メチルベンゾエート、メチルサリチレート、セダーウッド油、クローブ油、インヒビソール（インヒビソールとは、1,1,1-トリクロロエタンと、その毒性を低下するように工夫された阻害剤とからなる、清浄化液体の商品名である）、リモネン、テルピネオール、およびこれらの混合物を包含する。好ましい試薬は、脂肪族および芳香族炭化水素であり、該脂肪族炭化水素類としては、炭素原子数 6 ~ 12、好ましくは 6 ~ 10 のものがより好ましく、最も好ましくはn-ヘキサン、n-ヘプタンおよびn-オクタンである。n-オレインも好ましい清浄化剤である。一般的知見および本発明の教示に基づいて、当業者は、与えられた目的に対して、該脱水剤と該清浄化剤との適当な組み合わせを選択するであろう。従って、例えば脂肪質の組織を処理する場合、脱水剤と清浄化剤との組み合わせは、脂質の迅速な抽出を可能とするように選択されるであろう。

10

脱水剤と清浄化剤との好ましい組み合わせは、脂肪族および/または芳香族炭化水素類と組み合わせられたアルコール類である。脂肪族および/または芳香族炭化水素類と、炭素原子数 1 ~ 4 のアルコール類との組み合わせがより好ましく、イソプロパノールと、1 種以上の石油、エーテル、n-ヘキサン、n-ヘプタン、n-オクタン、n-オレイン、クロロホルムおよび/またはアセトンとの組み合わせが最も好ましい。イソプロパノールを単独で使用する代わりに、エタノールとイソプロパノールとの組み合わせが、より好ましく使用される。

20

使用溶媒の組み合わせ中で用いられる該脱水剤および該清浄化剤の量は、処理すべき組織およびそれぞれの試薬に固有の特性に依存して変動し得る。20-80:80-20容量%の範囲の、脱水剤：清浄化剤の比が、本発明の範囲内に含まれる。好ましい比は50:50、より好ましくは60:40である。エタノールとイソプロパノールおよびアルカンの好ましい混合物の場合、全ての成分が、等しい容量基準での量で含まれることが好ましい。予想外のことに、該脱水剤/清浄化剤中でのイソプロパノールの使用が、後の検討のために容易に裁断されるサンプルを与えることが示された。

30

好ましくは、該脱水/清浄化段階は、大気圧乃至 1 MPa (10バール)、好ましくは幾分高い圧力、即ち0.11~0.5MPa、および 1 MPaまでの圧力下で行われる。加圧下での処理は、高温下、即ち室温乃至90 °Cまでの温度にて、好ましくは70~90 °C、より好ましくは70~85 °C、最も好ましくは80~85 °Cの温度にて、脱水剤/清浄化剤の該組み合わせの蒸発を生ずることなく、かつ該組織の構造を崩壊することなく、該サンプルを処理することを可能とする。この加圧は、僅かな圧を設定する蒸発性液体を含む閉じた容器内で、該サンプルを単に加熱することにより行うことができる。しかしながら、該容器内にガス、例えば不活性ガス、好ましくは窒素ガスまたは二酸化炭素ガスを導入することにより、該圧力を設定することが好ましい。

驚いたことに、上記の圧力および温度条件が、また該サンプル中のタンパクの変性および細胞構造の変化を生じることなく、より円滑に該サンプルの脱脂をももたらすことが分かった。従って、該細胞の形態は十分に維持される。更に、この段階は、マイクロ波デバイス中で実施することが好ましい。というのは、マイクロ波処理により、該サンプルの加熱を、円滑に実施できるからである。

40

該含浸段階を実施する前に、該サンプルを乾燥する。この工程は主として穏やかな加熱手段により、即ち該サンプルを30~60 °C、好ましくは60 °Cの温度にて加熱することにより行われる。残留する水および溶媒の除去を促進するために、該乾燥工程は減圧下、好ましくは0.01~0.05MPaの範囲、より好ましくは0.01MPaの圧力下にて実施すべきである。一般的に利用される方法は、また80%程度の高い濃度のアルコール、好ましくはエタノールによる、該湿潤組織カセットの速やかな洗浄をも含む。

50

本発明の方法の該含浸段階 (iv) では、該サンプルを媒体で浸潤し、かつその中に包埋させるが、該媒体の特性は、一般的に密度、弾性、可塑性、粘度および接着性に関連する検査すべき組織の特性に近いものであるべきであり、かつ該包埋される物質に対して無害であるべきである。一般的に、該浸潤用の媒体および該包埋用の媒体は同一であるが、これらは異なっているてもよい。浸潤および/または包埋用の媒体として使用するのに適した物質は、寒天、ゼラチン、ポリビニルアルコール、ポリエーテルグリコール類、ポリエチレングリコールモノステアレート、ジエチレングリコールジステアレート、エステルワックス、ポリエステルワックス、ニトロセルロース、パラフィンワックスまたはこれらの混合物からなる群から選ばれる化合物を包含する。添加物を、該ワックスまたはワックスのブレンドに添加でき、該添加物としては、例えばピコライト (Piccolyte) 115 (このものは熱可塑性テルペン樹脂であり、該浸潤ワックスに対して5-10%の割合で添加される)、可塑性ポリマー、例えばポリエチレンワックス、またはジメチルスルホキシド (DMSO) である。

10

該サンプルに支持媒体を適用する場合、好ましくは真空を印加して、該組織内に取り込まれている空気を除去し、かつ該先行する脱水および清浄化の組み合わせ段階において使用した溶媒残留分を除去すべきである。かくして、この含浸段階は、好ましくは真空下で行われ、約0.05~0.02MPa、好ましくは0.03~0.02MPaなる穏やかな真空から出発して、該サンプルに適用される熔融パラフィンを注意深く脱気する。次いで、次段階において、真空度を、好ましくは約0.01MPaまたは0.005MPa程度にまで低める。

また、この含浸段階は、約5分以下、好ましくは3または4分間、より好ましくは約2分間の時間に渡る、穏やかな圧力、例えば0.11~0.5MPa、好ましくは0.11~0.3MPaの印加と、ほぼ同一の時間に渡る、穏やかな真空の印加とを交互に適用することによっても、実施することができる。該適用すべき減圧は、0.01~0.08MPa、好ましくは0.01~0.05MPa、より好ましくは0.02~0.03MPaの範囲内にある。

20

本発明の方法によれば、難しい組織、例えば大量のケラチンを含む組織、高密度コラーゲン、密に充填された平滑筋繊維、出血、血栓または卵黄のコロイド領域 (硬質、高密組織)、またはミイラ化組織もしくは卵黄に富む組織および脂肪質の組織を包含する、種々の組織を処理することが可能となった。更に、該検体の処理時間が、針による生検体の処理のためには約30分までおよび標準的な型の組織検体に対しては約60~120分にまで、大幅に減ずることができた。

30

驚いたことに、それぞれの脱水剤および清浄化剤の特性が、組み合わせた場合に変更されず、従って単純かつ効果的に、脱水および清浄化を同時に実施することが可能となること が示された。脂肪質組織の場合には、更に脱水が容易に達成できることも示された。というのは、該清浄化剤は、また脂質物質を抽出する機能をも果たし、結果として処理すべき組織の構造を劣化することなく、水の円滑な除去をもたらすからである。

好ましい一態様においては、本発明の方法を、マイクロ波加熱デバイス中で実施する。マイクロ波処理は、架橋性固定液の作用を促進することが明らかにされており、また該脱水剤および該清浄化剤の除去を、より円滑に進めることを可能とする。

本発明のもう一つの局面によれば、上記方法を実施するための装置を提供し、該装置は (i) マイクロ波加熱デバイスと、このデバイスはその中に配置された封止可能な処理チャンパーを含み、

40

(ii) 該処理チャンパー内に配置された、該サンプルを載せるための容器と、(iii) 該処理チャンパーに真空を印加するための手段と、

(iv) 該処理チャンパーに圧力を印加するための手段と、

(v) 該処理チャンパーに真空または圧力を印加するためのラインと、

を含み、ここで該処理チャンパーは、プレートおよび自動的に昇降可能なドームを含み、該昇降可能なドームは、該処理チャンパー内に配置された該容器を包囲し、かつ該処理チャンパーに真空または圧力を印加するための該ラインが該ドームを貫いて伸びていることを特徴とする。

好ましい一態様においては、単一の真空/加圧ポンプユニットを使用して、該処理チャン

50

バーに真空または圧力を印加し、かつ該ドームの昇降運動を可能とする。更に、該処理チャンパーは、360°回転することができて、該マイクロ波加熱デバイス内の該サンプルを均一にマイクロ波照射することを保証する。

該装置を仕上げるための他の手段およびその好ましい態様は、継続中のPCT出願W095/19560号に示されており、その内容全体を、本発明の参考文献とする。

添付図を参照して、以下本発明を、実施例に従って更に詳しく説明するであろう。ここで、

第1図は、サンプルの脱水および清浄化段階を示す模式的な図であり、

第2図は、サンプルの乾燥段階を示す模式的な図であり、また

第3図は、サンプルの含浸段階を示す模式的な図である。

10

本発明の組織処理手順は、好ましくはマイクロ波加熱デバイス中で実施され、該デバイスは、マイクロ波発生器を備え、該発生器はその主な部材としてマグネトロンを含み、これがマイクロ波を発生し、該マイクロ波は導波管によって、該マイクロ波加熱デバイス内部で結合されている。

このマイクロ波加熱デバイスは、出し入れ用の開口を含み、かつ回転するガラス製処理チャンパー1、2が組み込まれ、該チャンパーは、ガラス容器3内に2つの同心円として配置された、好ましくはPTFE（ポリテトラフルオロエチレン）製のマイクロ波-透過性ラック内に収容された、60個までの組織カセットを収納する。

該処理チャンパー1、2は、該マイクロ波加熱デバイスの底部の回転可能な円形コンベア2とドーム1とからなり、該ドームは、空気圧式に上昇および下降することができ、その結果該ガラスチャンパー3を、該マイクロ波加熱デバイス内の出し入れ用の開口を介して、該処理チャンパーに導入できる。この処理チャンパー1、2は連結手段を介して、真空/加圧ポンプユニットと接続され、またこれは封止装置を含み、それぞれバキューム-タイト（vacuum-tight）式またはプレッシャー-タイト（pressure-tight）式に該処理チャンパーを閉じる。好ましくは、該真空/加圧ポンプユニットも、該ドーム1の昇降を生ずる。

20

このマイクロ波加熱デバイスは、更に温度センサー、例えば該ガラスドームの側面におけるIRウインドーと組み合わせられたIR温度センサーを含み、該容器3内の化学薬品溶液の温度を監視する。あるいはまた、光ファイバーセンサーを使用することもでき、このセンサーは該ドーム1の中心カラム内に配置され、また該ドームと共に昇降できるように、該ドームに接続されている。

30

該処理チャンパー1、2から排気されるガスは、好ましくは活性炭フィルタに通される。自動的溶媒検出器をこの装置に組み込んで、該活性炭の消耗を信号で知らせることができる。

該マイクロ波加熱デバイス並びに該真空/加圧ポンプユニットおよび該温度センサーは、接続手段によって、対話式のタッチスクリーンコンピュータおよび操作の一貫性と単純性を保証する専用のソフトウェアと接続され、かつこれらにより制御される。処理スケジュールのメニューは、全て該コンピュータソフトウェアにより連続的に監視され、かつ調節されるマイクロ波出力、時間、温度、真空および圧力に関する予備設定パラメータを含む、タッチスクリーンアイコンにより起動できる。本発明の組織処理手順は、該タッチスクリーンコンピュータ上の関連するアイコンを単に起動することにより開始され、また選択された手順の完了は可聴警報音によって示される。このシステムは、またキーカードによりアクセスされる、記憶されたプログラムの保護をももたらし、個別化された処理スケジュールの修正または生成の、許可されたアクセスのみを保証する。

40

以下において、組織の該処理手順を、具体的に説明する。

多数の組織ブロックを、胸部、胃、子宮および脾臓を含み、悪性および良性組織を代表する、ホルマリンで固定された広範囲の外科検体から調製した。3種のサイズの型を調製した。これらは外科病理研究室において日常的に遭遇する組織ブロックを表す。

1. 針および内視鏡による生検体 - 長さ20mmまでおよび径2.5mmにまで達する。

2. 中間的サイズ - 15×10×2.5mmにまで達する。

50

3. 大きなサイズ - 25 × 20 × 4 mmにまで達する。

汎用性のプラスチックカセット内の60個までの組織切片を、マイクロ波透過性の、好ましくはPTFEを主成分とするプラスチックラック内に配置し、次いで無水エタノールで洗浄して、該切片を覆っているホルマリンおよび水を除去することができる。次に、このラックを、無水エタノール、イソプロパノールおよびアルカンを、1:1:1の比で含む溶媒混合物、所謂「JFC溶液」（これはイタリアのミルストーン/MLSソリソール（Milestone/MLS Sorisole）の専売品の名称である）を含有する円形ガラス皿3に配置する。PTFEを主成分とするカバー（図示せず）を該容器3上に置く。

次いで、選択された適当な処理スケジュールに従って、該処理チャンバーの該ドーム1は、空気作用式に持ち上げられ、該容器3が、該マイクロ波加熱デバイスの該ガラスドーム下方に導入される。この選択された処理スケジュールは、処理すべきバッチ中の最大の組織片によって決定した。この処理全体は、3つの主な段階からなり、その各々は第1～3図に示されたような、各段階独自に予備設定されたプログラムにより制御される。

第1図に示された第一の段階において、即ち該組織の脱水および清浄化段階では、該JFC溶液が細胞から遊離する脂肪質組織からの脂質を抽出し、結果としてマイクロ波の影響下で、該細胞中の水の温度が上昇し、それによりその粘度が低下し、かつ該細胞の外周部への水の移動を生じ、該外周部から該水が該溶液（solvent solution）に移動する。このことは、生理的な温度から該組織を損傷しない温度の範囲内で起こる。

この段階を、約0.2MPaの圧力下で実施して、低沸点を有する試薬の蒸発を回避し、その濃度を一定に保つ。この理由から、温度は公知の組織処理手順における値よりも高い、即ち80℃までであり得る。

段階1の該脱水および清浄化時間は、針および内視鏡による生検組織片について、18分まで、中間的サイズの組織片に対して65分まで、および大きなサイズの組織片に対して90分までである。

上記第一の段階の終了時点において、該ドーム1は自動的に持ち上げられ、該容器3が該処理チャンバーから取り出され、かつ該マイクロ波加熱デバイスおよび該カセットを有する該ラックが、空のガラス皿3内に置かれる。この時点では、PTFE製カバーを使用しない。該容器3を、該マイクロ波加熱デバイス内の該ガラスドーム1の下方に再配置し、乾燥プログラムをコンピュータにより開始する。

第2図に示された、該組織を乾燥する該第二の段階において、該組織は最終的なワックス含浸のために準備される。即ち、該組織中に残留するJFC溶液を除去する必要がある。この段階は、約0.01MPaなる高真空下で、約60℃の温度にて実施する。この真空は該JFC試薬の沸点および蒸発点を下げ、かつ完全な組織の脱水および該JFC試薬の蒸発をもたらす。この段階2の乾燥時間は、針および内視鏡による生検組織片については3分まで、中間的サイズの組織片および大きなサイズの組織片に対しては5分までである。

上記乾燥段階の終了時点においては、該ドーム1を自動的に持ち上げ、該容器3を該処理チャンバーおよび該マイクロ波加熱デバイスから取り出す。該プラスチックカセットを含む該ラックを、約65℃の組織学的等級の溶融ワックス並びに該容器3自体の底部のウェフロロン（WEFLON）の加熱エレメントを含む、予備加熱した容器3に移す。該加熱エレメントの添加は、マイクロ波を吸収しないパラフィンの固化を回避するために必要とされる。ウェフロロンカバー（図示せず）を、該ガラス容器3上に配置し、該容器を再度該マイクロ波加熱デバイスの該ガラスドーム1の下方に配置する。

第3図に示された、ワックス含浸のためのこの第三の段階においては、該組織内のあらゆる残留する痕跡のJFC溶液を、約0.01MPaなる真空下で、溶融ワックスと置換することにより除去する。この際、温度は約65℃に設定される。

該段階3の該含浸時間は、針および内視鏡による生検組織片については9分まで、中間的サイズの組織片に対しては20分まで、および大きなサイズの組織片に対しては25分までである。

該段階3が完了したら、該ドーム1は自動的に持ち上げられ、該容器3が該処理チャンバーおよび該マイクロ波加熱デバイスから取り出される。該カセット内の該組織について、

10

20

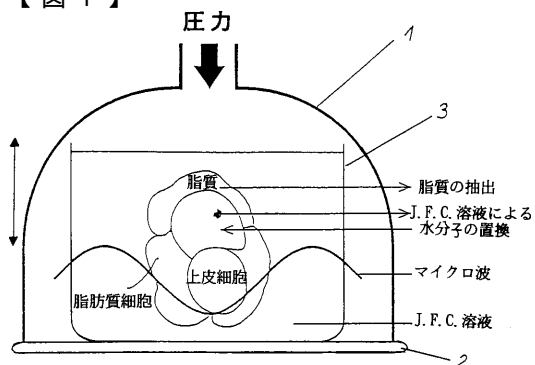
30

40

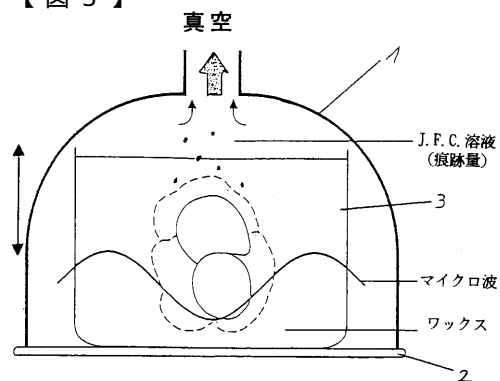
50

今やいつでもスライドを得るための公知の包埋、裁断および染色手順を行うことができる。
 。
 該検体についての、パラフィンに対する全処理時間は、針および内視鏡による生検組織片については30分、中間的サイズの組織片に対しては90分、および大きなサイズの組織片に対しては120分である。

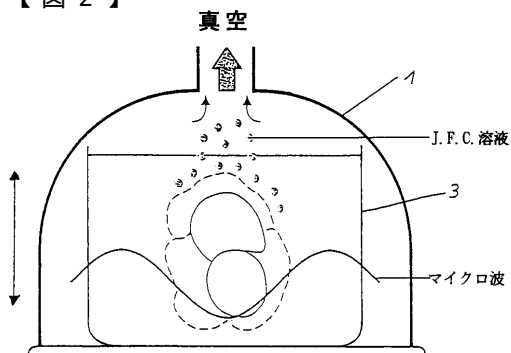
【図1】



【図3】



【図2】



フロントページの続き

- (72)発明者 ヴィシノーニ フランセスコ
イタリア国 ベルガモ イ - 2 4 0 3 0 モッツォ ヴィア エッセ ステファノ 7
(72)発明者 ラウテンシュレーゲル ヴェルネル
ドイツ連邦共和国 デー - 8 8 2 9 9 ロイトキルヒ ヴァルトシュトラッセ 1 5

審査官 福田 裕司

- (56)参考文献 米国特許第 4 9 1 1 9 1 5 (U S , A)
特開平 0 7 - 2 8 0 7 1 4 (J P , A)
国際公開第 9 5 / 3 3 2 4 0 (W O , A 1)

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 1/28 ~ 1/34
C12M 1/00
G01N 33/48