

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/078386

発行日 平成23年4月28日 (2011. 4. 28)

(43) 国際公開日 平成21年6月25日 (2009. 6. 25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 1/36 (2006.01)	GO 1 N 1/28 R	2 G O 4 5
GO 1 N 1/28 (2006.01)	GO 1 N 1/28 J	2 G O 5 2
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 1/28 K	4 B O 2 4
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	GO 1 N 33/48 R	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2009-546258 (P2009-546258)	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2008/072787	(71) 出願人	502423691 ファーマロジカルズ・リサーチ プライベート リミテッド シンガポール 138667 ヘリオス #05-08/09 バイオポリス・ウェイ 11
(22) 国際出願日	平成20年12月15日 (2008. 12. 15)	(74) 代理人	100140109 弁理士 小野 新次郎
(31) 優先権主張番号	特願2007-322944 (P2007-322944)	(74) 代理人	100089705 弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成19年12月14日 (2007. 12. 14)	(74) 代理人	100075270 弁理士 小林 泰
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織形態保持および核酸品質保持に優れた新規標本作製法

(57) 【要約】

組織形態の保持と核酸（特にRNA）の質の保持を両立する標本作製方法を開発することを目的とする。さらに該方法で作製された標本よりマイクロダイセクション法によって所望の細胞を採取し、所望の細胞の遺伝子発現を解析することを目的とする。

以下の工程を含む凍結または未凍結の全身諸臓器又は組織（硬組織を除く）の標本作製方法：

- 1) 目的とする臓器または組織をPFA液で固定する；
- 2) AMeX法によるパラフィン包埋を行う。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む凍結または未凍結の全身諸臓器又は組織（硬組織を除く）の標本作製方法：

- 1) 目的とする臓器または組織をPFA液で固定する；
- 2) AMeX法によるパラフィン包埋を行う。

【請求項 2】

PFA液による固定を浸漬により行う請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

AMeX法によるパラフィン包埋を行った後に、薄切切片を作製する工程をさらに含む請求項 10 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

得られた薄切切片の脱パラフィンおよび親水化の工程をさらに含む請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

組織染色、免疫組織化学的染色又は酵素組織化学的染色をさらに行う請求項 4 記載の方法。

【請求項 6】

前立腺組織の標本作製方法である請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前立腺癌組織の標本作製方法である請求項 1～5 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 8】

請求項 1～5 のいずれかに記載の方法によって得られる、全身諸臓器又は組織（硬組織を除く）の標本。

【請求項 9】

前立腺組織標本である請求項 8 記載の標本。

【請求項 10】

前立腺癌組織標本である請求項 8 記載の標本。

【請求項 11】

以下の工程を含む臓器又は組織標本中の細胞における mRNA の品質検定方法：

- 1) 請求項 1～7 のいずれかに記載の方法によって得られる臓器又は組織標本より所望の 30 細胞を採取する；
- 2) 採取した所望の細胞から total RNA を抽出する；
- 3) 抽出された total RNA より逆転写反応を行い cDNA を合成する；
- 4) 合成した cDNA を鋳型として β -アクチンの 5 末端側と 3 末端側の領域を PCR により増幅する；
- 5) 増幅された β -アクチンの 5 末端側と 3 末端側の領域の産物量比を算出して、3 末端側領域 / 5 末端側領域の PCR 産物の比が一定値以下となるものを良好な mRNA の品質を有すると判断する。

【請求項 12】

臓器又は組織標本より所望の細胞をマイクロダイセクションによって採取する請求項 11 40 記載の方法。

【請求項 13】

以下の工程を含む DNA マイクロアレイ用サンプルの作製方法：

- 1) 請求項 1～7 のいずれかに記載の方法によって得られる臓器又は組織標本より所望の細胞を採取する；
- 2) 採取した所望の細胞から以下の方法によって細胞中の mRNA の品質検定を行う；
 - a) 採取した所望の細胞から total RNA を抽出する；
 - b) 抽出された total RNA より逆転写反応を行い cDNA を合成する；
 - c) 合成した cDNA を鋳型として β -アクチンの 5 末端側と 3 末端側の領域を PCR により増幅する；

d) 増幅された β -アクチンの5末端側と3末端側の領域の産物量比を算出して、3末端側領域/5末端側領域のPCR産物の比が一定値以下となるものを良好なmRNAの品質を有すると判断する；

3) ステップ2)の方法で良好なmRNAの品質を有すると判断された細胞からtotal RNAを抽出し、これからcDNAを合成し、さらにcRNAを合成する。

【請求項14】

請求項13の方法で得られたサンプルを用いて、DNAマイクロアレイで階層的クラスタリング解析を行う方法。

【発明の詳細な説明】

【発明の属する技術分野】

10

【0001】

本発明は、組織形態の保持および核酸の品質保持に優れた、組織の標本作製法に関する。さらに詳しくは、本発明は、PFA液による固定とAMeX法によるパラフィン包埋法を併用した組織の標本作製法に関する。本発明はまた上記作製法で得られる組織標本、該組織標本中の細胞におけるmRNAの品質検定方法、および該組織標本を用いる、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析に適したサンプルの作製方法に関する。

【背景技術】

【0002】

臨床サンプルあるいは動物実験サンプルを用いたGene Chip(DNAマイクロアレイ)による遺伝子発現解析を行う場合、ある程度の大きさの組織片から核酸を抽出し、解析に用いるのが一般的であった。しかし組織片中には標的とする細胞以外の種々の細胞が含まれるため、これら種々の細胞を包括した解析となっていた。この点を改善するため、病理組織学的手法によって作製された薄切切片上から標的とする特定の細胞を採取(マイクロダイセクション)し用いる方法が開発された。近年では複数のメーカーから専用の機器が販売され、広く用いられるようになって来ている。

20

【0003】

マイクロダイセクションには、OCTコンパウンドなどに包埋された凍結組織サンプルを薄切して用いる方法が一般的である。凍結組織サンプルによる薄切切片(凍結切片)は新鮮な組織片に凍結処理を加えただけであり、核酸の質の保持に優れている。しかしながら、凍結切片は組織形態の保持が悪く、使用する組織あるいは標的とする細胞の種類によっては細胞識別能が不十分である場合が多い。例えば、前立腺癌組織のように正常部位、過形成部位、前癌部位(PIN; prostatic intraepithelial neoplasia)、癌部位が混在する場合、癌細胞のみを識別して採取する事は非常に困難であった。一方、従来から行われてきたホルマリン固定パラフィン切片では良好な組織形態の保持を実現できる反面、固定およびプロセッシング過程における核酸の分解・劣化が甚だしく、質の良い核酸(RNA)を用いた精度の高い遺伝子発現解析が不可能であった。

30

【0004】

組織を固定する行為は、タンパクや核酸を変性させる方法でもあることから、組織形態の保持と核酸の劣化の防止はいわば相反する課題となる。発明者らは以前、組織形態の保持と抗原タンパクの維持という相反する課題を、長年研究を重ねPLP-AMeX法を開発する事で解決した(特許文献1、非特許文献1、非特許文献2)。PLP(Periodate-lysine-parafomaldehyde)固定液は、免疫反応への影響を最小限にして組織形態を保持するため、免疫組織化学的染色を目的とした凍結切片を作製するために開発されたものである(非特許文献3、非特許文献4、非特許文献5)。ここで、PLP固定液は、過ヨウ素酸塩-リジン-パラホルムアルデヒドからなる固定液をいい、一般的組成は、0.01M NaIO₄ - 0.075M リジン - 0.0375M リン酸緩衝液 - 2% パラホルムアルデヒドである。パラホルムアルデヒド濃度は適宜調節することができ、一般には1 - 6%の範囲で使用される。一方AMeX(acetone, methyl benzoate and xylene method)法は、Satoらにより開発された比較的新しいパラフィン包埋法(非特許文献6、非特許文献7)で、通常のパラフィン切片では検出が困難な抗原も可能である事が報告されている。

40

50

【特許文献 1】 特開 2002-82026

【非特許文献 1】 Suzuki M et al., *Histol Histopathol* 1999; 46: 679-86

【非特許文献 2】 Suzuki M et al., *Exp Anim* 1998; 47: 211-14

【非特許文献 3】 McLean IW et al., *J Histochem Cytochem* 1974; 22: 1077-83

【非特許文献 4】 Sisson Sp et al., *J Histochem Cytochem* 1980; 28: 441-52

【非特許文献 5】 Rantala I et al., *J Histochem Cytochem* 1982; 30: 932-37

【非特許文献 6】 Sato Y et al., *Am J Pathol* 1986; 125: 431-35

【非特許文献 7】 Sato Y et al., *Am J Pathol* 1992; 140: 775-79

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0005】

以上に述べた従来の標本作製法では組織形態の保持と核酸の質の保持を両立することは困難であった。本発明は組織形態の保持と核酸（特にRNA）の質の保持を両立する標本作製方法を開発することを目的とする。さらに該方法で作製された標本よりマイクロダイセクション法によって所望の細胞を採取し、所望の細胞の遺伝子発現を解析することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記目的を達成するために鋭意研究した結果、PFA(paraformaldehyde)固定法とAMeX法によるパラフィン包埋法を併用することによって、組織形態の保持と核酸（特にRNA）の質の保持に優れた標本作製できることを発見した。

20

【0007】

さらに本発明者らは組織バンクの組織の利用において大変意義のある技術開発を行った。一般的な組織バンクにおいて、組織サンプルは凍結保存されたもの（SNAP-Frozenサンプル）が主流であり、これらは主に核酸やタンパク質の抽出に用いられてきた。またSNAP-Frozenサンプルを用いた凍結切片の作製が一般的には可能であるが、通常のパラフィン切片に比べて組織形態の保持が悪く細胞識別が充分に行えないことが多くある。本発明者らは、SNAP-FrozenサンプルをPFA-AMeX-Paraffin法によって処理する事で、核酸（特にRNA）の品質を損なうことなく、組織形態の保持にも優れたパラフィンブロックの作製が行えることも発見した。

30

【0008】

すなわち、本発明は以下のものを提供する。

（1）以下の工程を含む凍結または未凍結の全身諸臓器又は組織（硬組織を除く）の標本作製方法：

1) 目的とする臓器または組織をPFA液で固定する；

2) AMeX法によるパラフィン包埋を行う。

（2）PFA液による固定を浸漬により行う（1）記載の方法。

（3）AMeX法によるパラフィン包埋を行った後に、薄切切片を作製する工程をさらに含む

（1）または（2）記載の方法。

（4）得られた薄切切片の脱パラフィンおよび親水化の工程をさらに含む（3）記載の方法。

40

（5）組織染色、免疫組織化学的染色又は酵素組織化学的染色をさらに行う（4）記載の方法。

（6）前立腺組織の標本作製方法である（1）～（5）のいずれかに記載の方法。

（7）前立腺癌組織の標本作製方法である（1）～（5）のいずれかに記載の方法。

（8）（1）～（5）のいずれかに記載の方法によって得られる、全身諸臓器又は組織（硬組織を除く）の標本。

（9）前立腺組織標本である（8）記載の標本。

（10）前立腺癌組織標本である（8）記載の標本。

（11）以下の工程を含む臓器又は組織標本中の細胞におけるmRNAの品質検定方法：

50

- 1) (1) ~ (7) のいずれかに記載の方法によって得られる臓器又は組織標本より所望の細胞を採取する；
- 2) 採取した所望の細胞から total RNA を抽出する；
- 3) 抽出された total RNA より逆転写反応を行い cDNA を合成する；
- 4) 合成した cDNA を鋳型として β -アクチンの 5 末端側と 3 末端側の領域を PCR により増幅する；
- 5) 増幅された β -アクチンの 5 末端側と 3 末端側の領域の産物量比を算出して、3 末端側領域 / 5 末端側領域の PCR 産物の比が一定値以下となるものを良好な mRNA の品質を有すると判断する。

(12) 臓器又は組織標本より所望の細胞をマイクロダイセクションによって採取する (1011) 記載の方法。

(13) 以下の工程を含む DNA マイクロアレイ用サンプルの作製方法：

1) (1) ~ (7) のいずれかに記載の方法によって得られる臓器又は組織標本より所望の細胞を採取する；

2) 採取した所望の細胞から以下の方法によって細胞中の mRNA の品質検定を行う；

a) 採取した所望の細胞から total RNA を抽出する；

b) 抽出された total RNA より逆転写反応を行い cDNA を合成する；

c) 合成した cDNA を鋳型として β -アクチンの 5 末端側と 3 末端側の領域を PCR により増幅する；

d) 増幅された β -アクチンの 5 末端側と 3 末端側の領域の産物量比を算出して、3 末端側領域 / 5 末端側領域の PCR 産物の比が一定値以下となるものを良好な mRNA の品質を有すると判断する；

3) ステップ 2) の方法で良好な mRNA の品質を有すると判断された細胞から total RNA を抽出し、これから cDNA を合成し、さらに cRNA を合成する。

(14) (12) の方法で得られたサンプルを用いて、DNA マイクロアレイで階層的クラスタリング解析を行う方法。

【発明の効果】

【0009】

PFA 固定法と AMeX 法によるパラフィン包埋法を併用した PFA-AMeX-Paraffin 法は組織の形態保持と核酸の質の保持の両方に優れた標本作製方法であり、本方法は凍結組織では細胞の識別が不十分であるような組織（例えば前立腺癌組織）において、組織の形態観察を行いマイクロダイセクション法により目的とする細胞を採取し、さらにそれらの細胞の遺伝子発現解析を DNA マイクロアレイを用いて行う際に、極めて有用であることが示された。

【0010】

さらに本発明者らは凍結保存されたサンプル (SNAP-Frozen サンプル) を PFA-AMeX-Paraffin 法によって処理することにより、核酸の品質を損なうことなく、組織形態の保持にも優れたパラフィンブロックの作製が行えることを見出した。これにより PFA-AMeX-Paraffin 法は一般的な組織バンク（組織サンプルは通常凍結保存されている）の凍結組織から核酸の質を損なうことなく、組織形態保持に優れたパラフィンブロック作製に極めて有用であることが示された。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図 1】 ヒト前立腺癌臨床組織凍結組織標本よりの薄切切片の HE 染色組織像を顕微鏡で観察した写真である。

【図 2】 ヒト前立腺癌臨床組織 PFA-AMeX-Paraffin 標本よりの薄切切片の HE 染色組織像を顕微鏡で観察した写真である。

【図 3】 前立腺癌および前立腺過形成組織における遺伝子発現プロファイルの階層的クラスタリング解析の結果と各検体の組織形態観察の結果を示した図である。組織形態観察は、前立腺癌取扱い規約第 3 版（日本泌尿器学会、日本病理学会（編）、金原出版、2001）に記載の基準をもとに判断した。デンドグラム中 128、112、133 および 140 は前立腺患者の

組織由来のサンプルであったが、組織形態観察した結果、前立腺過形成に該当した。

【図4】 SNAP-Frozen(凍結)ヒト前立腺癌組織からPFA-AMeX-Paraffin法によって作製された標本よりの薄切切片のHE染色組織像を顕微鏡で観察した写真である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の標本作製法が使用できる動物は、その種類を問わず、両生類、爬虫類、鳥類、哺乳類など幅広く使用でき、特に哺乳類が好ましい。

【0013】

本発明において、「全身諸臓器又は組織(硬組織を除く)」とは、上記動物の全身に分布するあらゆる臓器又は組織であって骨組織などの硬組織を除いたものをいう。本発明の方法に特に適した臓器又は組織は、前立腺組織である。 10

【0014】

本発明の方法は、凍結または未凍結の臓器又は組織に用いることができる。したがって、SNAP-Frozenサンプルなどの組織バンクから得られる凍結保存された組織サンプルを含む。

【0015】

本発明の方法では、動物から摘出した臓器又は組織をまずPFA液で固定する。PFA液とはパラホルムアルデヒドの1~6%水溶液にリン酸緩衝液などの緩衝液を加えた細胞固定溶液であり、好ましくは4% PFA固定液(4%パラホルムアルデヒド/0.01M PBS(pH7.4))を用いる。 20

【0016】

本発明におけるPFA固定液による固定は、目的とする臓器又は組織を1~6%、好ましくは4%のパラホルムアルデヒドを含むPFA固定液に、0~8℃、好ましくは約4℃の温度で、2~40時間、好ましくは6~30時間浸漬することにより行うことができる。

【0017】

次いで、固定した臓器又は組織をリン酸緩衝食塩水などで洗浄する。このとき、観察したい臓器又は組織の部分を切り出した後、洗浄してもよい。

【0018】

このようにして調製した臓器又は組織を次にAMeX法でパラフィン包埋を行う。AMeX法は、冷アセトン固定、アセトンによる脱水、安息香酸メチルとキシレンによる透徹及びパラフィン包埋を一連の操作とする、パラフィン包埋法である。具体的には、-25~8℃、好ましくは-20~6℃のアセトンに2~24時間、好ましくは4~16時間浸漬し、次に組織を入れたアセトンを室温に戻す、あるいは室温のアセトンに臓器又は組織を移した後、室温で0.5~5時間、好ましくは1~4時間脱水する。次に、安息香酸メチル中に室温で0.5~3時間、好ましくは0.5~2時間浸漬、キシレン中に室温で0.5~3時間、好ましくは0.5~2時間浸漬して透徹を行い、その後55~65℃、好ましくは58~62℃のパラフィンに1~4時間、好ましくは1~3時間浸透して包埋する。このようにしてPFA-AMeX法で得られた臓器又は組織のパラフィンプロックは使用時まで低温で保存する。 30

【0019】

使用時には、上記で得られたパラフィンプロックを、ミクロトームなどを用いて薄切切片を作製し、さらに薄切切片の脱パラフィン及び親水化を行う。脱パラフィン及び親水化は公知の方法により実施することができる。例えば、脱パラフィンはキシレン、トルエンにより実施し、また親水化はアルコール、アセトンにより実施することができる。 40

【0020】

このようにして得られた薄切切片はさらに必要に応じて組織染色、免疫組織化学的染色又は酵素組織化学的染色を行って観察に供する。

【0021】

本発明の方法で作製した標本を組織染色(特殊染色)するときには、通常のパラフィン包埋切片で可能な染色は何でも使用することができる(例えば、PAS染色、ギムザ染色、 50

トルイジンブルー染色など)。また、免疫組織化学的染色に適した抗体は全て使用可能である(例えば、細胞表面抗原、細胞骨格、細胞外マトリックス、サイトカイン、接着分子などに対する各種抗体)。酵素組織化学的染色は、切片上で可能な染色が使用できる(例えば、ALP、ACP、TRAP、エステラーゼなどの種々の染色)。また、病理組織を染色するには、一般染色として、ヘマトキシリン、エオジン(Hematoxylin-Eosin)染色; 膠原線維用として、ワン・ギーソン(Van Gieson)染色、アザン(Azan)染色、マッソントリクローム(Masson Trichrome)染色; 弾性線維用として、ワイゲルト(Weigert)染色、エラスチカワンギーソン(Elastica Van Gieson)染色; 細網線維・基底膜用として、渡辺の鍍銀染色、PAM染色(Periodic acid methenamine silver stain)などを用いることができる。

10

【0022】

本発明はまた、上記方法により得られる全身諸臓器又は組織(硬組織を除く)の標本を提供する。特に好ましい標本は、前立腺組織、前立腺癌組織であるが、これに限定されない。

【0023】

本発明の方法で得られる臓器または組織標本は、臓器または組織標本中の細胞におけるtotal RNAの定量とmRNA品質の検定に用いることができる。組織標本から所望の細胞を採取するにはマイクロダイセクション法、特にレーザーマイクロダイセクション(LMD)法を用いることが好ましい。LMD法は、顕微鏡にレーザー照射装置が接続された機器を使って、顕微鏡下で組織切片を観察しながら、切片上の標的とする細胞塊をレーザーによって切り出し、採取、回収することのできる新しい研究ツールである。この手法は、生体組織から標的細胞群を採取することができるため、生体内において特定の遺伝子が、組織を構成する様々な細胞のうち、どの細胞にどれだけ発現しているのかを正確に知ることができる。マイクロダイセクションを行う機器として、例えばAS-LMDシステム(Leica Microsystems社製)を用いることができる。

20

【0024】

次いで採取した所望の細胞から公知の方法によりtotal RNAを抽出してこれを定量することができる。また、RNA定量後、オリゴdTプライマーと逆転写酵素を用いてmRNAを逆転写し、cDNAを合成する。合成したcDNAを鋳型として β -アクチンの5末端側と3末端側の領域をPCRにより増幅して、増幅された β -アクチンの5末端側と3末端側の領域の産物量比を算出することにより、total RNAの劣化を検定したり、あるいはmRNA品質の検定を行うことができる。 β -アクチンは、どの組織・細胞でも多量に発現している遺伝子であるため、いろいろな組織・細胞に含まれるRNAの品質を比べる際の、指標として用いることができる。本発明では、3末端側領域/5末端側領域のPCR産物の比が一定値以下となるものを良好なmRNAの品質を有すると判断する。3末端側領域/5末端側領域のPCR産物の比は好ましくは、20以下、より好ましくは10以下、さらに好ましくは5以下である。

30

【0025】

本発明はさらに、上記方法によってmRNA品質が良好であると判断されたサンプルを用いてDMAマイクロアレイ用サンプルを作製することができる。mRNA品質が良好であると判断されたサンプルのtotal RNAから、例えばAffymetrix社の提供する標準的な方法でラベリングcRNAプローブを作製し、DMAマイクロアレイを用いて遺伝子発現データを取得して、クラスタリング解析を行うことができる。

40

【0026】

例えば、階層的クラスタリング(階層的クラスタ解析手法)では、類似度でデータを階層的に分類し、その結果は樹形図で表現することができる。この手法を用いると細かい分類から大まかな分類までクラスタ間の包含関係が理解しやすい。後述する実施例に示すように、PFA-AMeX-Paraffin法で作製した標本から得られた細胞を用いた場合には、前立腺癌検体間と前立腺過形成検体間では、遺伝子発現パターンが異なっており、前立腺癌検体群と前立腺過形成検体群が独立のクラスタとして分かれた。一方、前立腺癌検体同士、また前立腺過形成検体同士では類似性の高い遺伝子発現パターンであった。さらに、前立

50

腺癌の中でも形態的観察より低分化型腺癌、中分化型腺癌と判定された検体において、低分化型腺癌検体同士、あるいは中分化型腺癌検体同士のほうが、遺伝子発現パターン類似性がより高いことが判り、形態観察で低分化と判定された検体が先にクラスターを形成する結果となっており、形態観察の結果を忠実に反映する遺伝子発現パターンが得られていた。

【0027】

一般的な組織バンクにおいて、組織サンプルは凍結保存されたもの (SNAP-Frozenサンプル) が主流であり、これらは主に核酸やタンパク質の抽出に用いられてきた。また組織形態観察についてはSNAP-Frozen サンプルを用いた凍結切片の作製が一般的には可能であるが、通常のパラフィン切片に比べて組織形態の保持に難点があった。このため、SNAP-Frozenサンプル(凍結組織)についてPFA-AMeX-Paraffin法により標本作製し、該標本の組織形態保持およびmRNA品質について評価を行った。その結果、SNAP-Frozen(凍結)サンプルからPFA-AMeX-Paraffin法によって作製された標本のパラフィン薄切切片では、未凍結組織より作製されたPFA-AMeX-Paraffin標本のパラフィン薄切切片とほぼ同等の組織形態識別が可能であり、また未凍結サンプルより作製された標本とほぼ同等の品質のmRNAが保持されていることが確認できた。

【実施例】

【0028】

本発明を以下の実施例によりさらに詳しく説明するが、実施例の態様に限定されず、さまざまな変更、修飾が当業者には可能である。本発明はこれらの変更、修飾を含むことを意図する。

【0029】

なお、以下の実施例においては、全ての検体に関して、患者からのIC(Informed Consent)が得られ、研究目的の利用が同意されたものを用いた。

実施例1：標本作製

(1) PLP-AMeX Paraffin法もしくはPFA-AMeX Paraffin法による標本作製および組織形態の観察

摘出した組織を研究目的に使用することを同意した前立腺癌もしくは前立腺肥大症の患者の組織を使用した。入手したサンプルは、約5mm³大にトリミングし、4℃のPLP固定液(0.01 M 過ヨウ素酸塩, 0.075 M リジン, 0.0375M リン酸緩衝液、4%パラホルムアルデヒド)、もしくは4% PFA固定液(4%パラホルムアルデヒド/0.01M PBS(pH7.4)) 中で16時間から24時間固定した。固定したサンプルは、0.01M PBS溶液で洗浄処理(4℃、2時間)した後、アセトンによる脱水処理(4℃、overnightおよび室温、30分4回)を行い、メチルベンゾエートによる処理(室温、30分2回)、キシレンによる透徹処理(室温、30分2回)を行った。その後、60℃のパラフィン液に浸漬(40分3回)し、パラフィン包埋処理を行い、4℃で保存した。

(2) PFA-Paraffin法による標本作製

摘出した組織を研究目的に使用することを同意した前立腺癌もしくは前立腺肥大症の患者の組織を使用した。入手したサンプルは、約5mm³大にトリミングし、4℃のPFA固定液中で16時間から24時間固定した。固定したサンプルは、エタノールによる段階的な脱水処理(70% エタノール 室温2時間、80% エタノール 室温1.5時間、90% エタノール 室温1.5時間、95% エタノール 室温1.5時間、100% エタノール 室温2時間3回)およびキシレンによる透徹処理(キシレン 室温1時間2回、室温1.5時間1回)を行った。その後、60℃のパラフィン液に浸漬(1.5時間1回、2時間2回)し、パラフィン包埋処理を行い、室温で保存した。

(3) NBF-Paraffin法による標本作製

摘出した組織を研究目的に使用することを同意した前立腺癌もしくは前立腺肥大症の患者の組織を使用した。入手したサンプルは、約5mm³大にトリミングし、4℃の20%NBF固定液(20%ホルマリン/0.1M PB(pH7.4)) 中で16時間から24時間固定した。固定したサンプルは、エタノールによる段階的な脱水処理(70% エタノール 室温2時間、80% エタノール

ル 室温1.5 時間、90% エタノール 室温 1.5 時間、95% エタノール 室温1.5 時間、100% エタノール 室温2 時間3回) およびキシレンによる透徹処理 (キシレン 室温1時間2回、室温1.5時間1回) を行った。その後、60℃のパラフィン液に浸漬 (1.5時間1回、2時間2回) し、パラフィン包埋処理を行い、室温で保存した。

(4) 凍結標本作製

摘出した組織を研究目的に使用することを同意した前立腺癌もしくは前立腺肥大症の患者の組織を使用した。入手したサンプルは、約5mm³大にトリミングし、プラスチック製皿 (クリオモルド (登録商標)、サクラファインテック社製) に充たしたOCTコンパウンド (サクラファインテック社製) 中に埋め、ドライアイスおよびアセトンで周囲を満たし冷却したヘキサン液面に浮かべ、OCTコンパウンドを冷却し固めた。作製した凍結ブロックはプラスチック製皿ごとヘキサンを入れたプラスチック製容器に移し、-80℃に保管した。

10

(5) ヒト前立腺癌培養細胞(LNCaP細胞)組織よりの標本作製

超免疫不全マウス (NOG マウス) にLNCaP細胞 (ヒト前立腺癌 *in vitro/in vivo* 細胞株) を移植し、移植後54日から67日目にマウスより採取し、約5mm³にトリミングした後、前述の4つの標本作製方法 (PFA-AMeX-Paraffin法、PFA-Paraffin法、NBF-Paraffin法、未固定凍結法) に従って処理を行い、それぞれの標本作製した。

実施例2：組織形態の観察

PFA-AMeX-paraffin法により作製したパラフィンブロックよりの薄切切片作製および染色には市販されている一般的な機器、試薬類を使用した。具体的にはパラフィン薄切切片は、一般的な方法に従ってパラフィンブロックより4 μm厚のパラフィン切片を作製し、AS-LMDシステム (Leica Microsystems社製) 用のフォイル付フレームにマウント後、乾燥させた。キシレンによる脱パラフィン処理 (室温15 秒 2回) およびアセトンによる親水処理 (室温15 秒2回) を行った後、RNase-free水で水洗し、マイヤー・ヘマトキシリン液 (室温 10秒) に浸漬した。再度RNase-free水で水洗し、エオジン液 (室温10秒) に浸漬後、エタノールによる脱水処理 (100% エタノール、室温10秒) を行った。ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色を行った切片を乾燥後に、AS-LMDシステムの顕微鏡下で組織形態を観察した。

20

【0030】

未固定凍結法により作製したOCT-compound包埋凍結組織ブロックよりの薄切切片作製、染色には、一般的な機器、試薬類を使用した。具体的には凍結薄切切片は、一般的な方法に従って凍結ブロックより6 μm厚の凍結切片を作製し、AS-LMDシステム (Leica Microsystems社製) 用のフォイル付フレームにマウントした。メタノールによる固定処理 (室温5分) を行った後、RNase-free水で水洗し、マイヤー・ヘマトキシリン液 (室温 30秒) に浸漬した。再度RNase-free水で水洗し、エオジン液 (室温30秒) に浸漬後、エタノールによる脱水処理 (100% エタノール、室温10秒) を行った。HE染色を行った凍結切片を乾燥後にAS-LMDシステムの顕微鏡下で組織形態を観察した。

30

【0031】

凍結切片およびPFA-AMeX法によるパラフィン切片の前立腺癌の組織形態を比較したところ、凍結切片では (図1)、前立腺上皮細胞の核および核仁の形態、基底細胞の識別が難しく、前立腺癌とそれ以外の病変 (PIN、過形成病変) との識別が困難であった。それに対し、PFA-AMeX法によるパラフィン切片では (図2)、上記所見が明瞭に確認できるため、前立腺癌の識別が可能であった。

40

実施例3：4種の標本作製法により作製した標本からのtotal RNA抽出、定量およびmRNA品質の比較

NOGマウスに移植したヒト前立腺癌培養細胞 (LNCaP細胞) の同一腫瘍組織を用いて前述の4つの標本作製方法 (未固定凍結法、PFA-AMeX-Paraffin法、PFA-Paraffin法、NBF-Paraffin法) で標本作製し、その薄切切片からtotal RNAを抽出し、mRNA品質の比較を行った。

(1) 薄切切片よりのtotal RNAの抽出

50

PFA-AMex-Paraffin法、PFA-Paraffin法、NBF-Paraffin法で作製した標本のパラフィン薄切切片をそれぞれ別々のチューブ(0.2mL)に回収し、脱パラフィン処理(キシレン、室温15秒3回)および親水処理(100%エタノール、室温15秒)を行った後、薄切切片を乾燥させた。その後Lysis buffer 205 μ L(溶解バッファー、20 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1% SDS, 500 μ g/mL Proteinase K)を加え、採取組織を回収したチューブを加熱処理(60°C、16時間および95°C、10分)をした後に、冷却し、45 μ LのRNase-free waterを加え、さらに750 μ LのTrizol-LS(invitrogen社)を加えた。Trizol-LS添加後、室温で5分間放置し、200 μ LのChloroform-Isoamyl alcohol液を加え、10分間室温で放置後遠心した。上清を回収し、50 μ Lの3M NaOAcと4 μ Lの5 mg/mLのグリコーゲンを加え、攪拌後500 μ Lのイソプロピルアルコールを加え、10分間室温で放置後、遠心した。上清を除き、1 mLの75 10 %エタノールを加えペレットをリンスした。さらに100%エタノールでリンスした後、ペレットを風乾後、14 μ LのRNase-free waterを加え、RNAペレットを融解し、-80°Cで保存した。

【0032】

凍結法により作製した標本の薄切切片からはRNeasy MinElute Kit(QIAGEN社)を用いてtotal RNAを抽出し、-80°Cで保存した。

(2) total RNAの定量とmRNA品質の検定

total RNA量はRiboGreen RNA Quantification Kit (Molecular Probes社)を用いて定量した。RNA定量後、5 ngのRNAを別のチューブへ小分けしDNase処理し混入しているDNAを分解した後、オリゴdTプライマーと逆転写酵素(Superscript II RNase H- reverse Tran 20 scriptase; Invitrogen社)を用いてmRNAを逆転写し、ヒト β -actin mRNA(X00351,1761 bp)(cDNAの配列を配列番号1に示す)の5プライムサイド(増幅領域:1369位-1521位,153bp)と3プライムサイド(増幅領域:1600位-1758位,159bp)のプライマーを用いて増幅し、サイバークリーンを用いて双方のPCR産物を定量した。

【0033】

5'側(1369-1521、153bp)のPCRを行うプライマーとして以下のものを用いた。

【0034】

5'-ACAATGTGGCCGAGGACTTT-3' (1369-1388, 20mer) (配列番号:2)

5'-TGTGTGGACTTGGGAGAGGA-3' (1521-1502, 20mer) (配列番号:3)

3'側(1600-1758、159bp)のPCRを行うプライマーとして以下のものを用いた。 30

【0035】

5'-TTGTTTTATTTTGAATGATGAGCCTTCGT-3' (1600-1628, 29mer) (配列番号:4)

5'-GGTGTGCACTTTTATTCAACTGGTC-3' (1758-1734, 25mer) (配列番号:5)

基礎検討から、5プライム領域の増幅産物が1ユニット以上、3プライム領域の増幅産物が15 ユニット以上、3 プライム領域/5 プライム領域のPCR産物の比が20以下のRNAサンプルは信頼性の高いGene Chipデータ(Affymetrix Human X3P arrayで% present-call 値(array上に搭載されている遺伝子のうち何%の遺伝子が“発現している”と判断されたかを示す値)が30%以上となるもの)が取得できる事が確認されており、これらの値を基準値として、サンプルの良否を判定した。

(3) 4種の標本作製方法で作製した標本におけるmRNA品質の比較 40

4種の標本作製方法で作製した標本におけるmRNA品質の比較の結果を表1に示す。

【0036】

【表 1】

Fresh Frozen				
Sample name	RNA conc (ng/ul)	β -actin 3' FW & RV (Set A)(unit)	β -actin 5' FW & RV (Set B)(unit)	Ratio (SetA/SetB)
M05-0458-01	27.14	44.690	58.520	0.76
M05-0463-01	8.20	10.920	7.262	1.50
M05-0464-01	29.09	26.940	19.170	1.41
M06-0016-01	14.19	18.660	14.110	1.32
M06-0017-01	7.72	4.072	3.367	1.21
M06-0018-01	9.18	14.460	23.570	0.61
average	15.92	19.96	21.00	1.14

PFA-AMeX-Paraffin				
Sample name	RNA conc (ng/ul)	β -actin 3' FW & RV (Set A)(unit)	β -actin 5' FW & RV (Set B)(unit)	Ratio (SetA/SetB)
M05-0458-21	74.31	7.325	2.570	2.85
M05-0463-21	42.47	19.810	7.361	2.69
M05-0464-21	54.18	24.050	9.525	2.52
M06-0016-21	28.59	24.920	10.290	2.42
M06-0017-21	75.62	35.050	11.650	3.01
M06-0018-21	59.05	36.750	11.500	3.20
average	55.70	24.65	8.82	2.78

PFA-Paraffin				
Sample name	RNA conc (ng/ul)	β -actin 3' FW & RV (Set A)(unit)	β -actin 5' FW & RV (Set B)(unit)	Ratio (SetA/SetB)
M05-0458-11	49.35	not amplified	0.955	N/A
M05-0463-11	37.48	not amplified	1.342	N/A
M05-0464-11	14.47	not amplified	1.053	N/A
M06-0016-11	53.93	not amplified	1.321	N/A
M06-0017-11	157.46	not amplified	1.102	N/A
M06-0018-11	86.78	not amplified	1.061	N/A
average	66.58	not amplified	1.14	N/A

NBF-Paraffin				
Sample name	RNA conc (ng/ul)	β -actin 3' FW & RV (Set A)(unit)	β -actin 5' FW & RV (Set B)(unit)	Ratio (SetA/SetB)
M05-0458-31	86.19	85.240	21.890	3.89
M05-0463-31	76.18	31.760	7.252	4.38
M05-0464-31	15.94	15.170	3.723	4.07
M06-0016-31	21.82	21.340	4.751	4.49
M06-0017-31	50.18	35.740	8.082	4.42
M06-0018-31	17.20	38.110	8.801	4.33
average	44.59	37.89	9.08	4.27

Criteria >15 >1 <20

【0037】

3プライム領域/5プライム領域のPCR産物の比の平均値は、凍結切片では1.14、PFA-AMeX-Paraffin法で処理したサンプルでは2.78、NBF-Paraffin法で処理したサンプルは4.27となった。PFA-Paraffin法で処理したサンプルは、3プライムサイドが劣化によりPCR産物が増幅されずPCR産物の比が取れなかった。なお、PCR反応におけるゲノムDNA混入の可能性を除外するため、逆転写反応を行わずにPCRを行ったところ、逆転写反応を行わなかったサンプルではPCR増幅産物は得られず、PCR増幅産物が逆転写反応で作られたcDNA由来であることが確認された。

【0038】

この結果、4種の標本作製法で作製した標本におけるmRNAの質は、凍結処理法が最も良く、次いでPFA-AMeX-Paraffin法、その次がNBF-Paraffin法であり、PFA-Paraffin法が最も悪いことが判った。

実施例4：PFA-AMeX-Paraffin法とPFA-Paraffin法で作製したヒト前立腺癌組織標本のmRNA品質の比較

PFA-AMeX-Paraffin法またはPFA-Paraffin法により作製されたヒト前立腺癌組織標本のmRNA

10

20

30

40

50

RNA品質比較を行うため、ヒト前立腺癌組織PFA-AMeX-Paraffin標本79検体、ヒト前立腺癌組織PFA-Paraffin69検体より薄切切片を作製し、実施例3に記載の方法でtotal RNAの抽出、定量およびmRNA品質の検定を行った。その結果を表2に示す。

【0039】

【表2】

標本作製方法	実施検体総数	基準クリア検体数
PFA-Paraffin 法	69	15 (21.7%)
PFA-AMeX-Paraffin 法	79	53 (67.1%)

10

【0040】

PFA-Paraffin法で作製されたヒト前立腺癌組織標本ではmRNA品質を検定した全検体のうち21.7%のみ(69検体中15検体)が良いmRNA品質であると判定されたのに対し、PFA-AMeX-paraffin法で作製されたヒト前立腺癌組織標本ではmRNA品質を検定した全サンプルのうち67.1%(79サンプル中53サンプル)が良いmRNA品質であると判定された。すなわち、PFA-paraffin組織標本に比べてPFA-AMeX-paraffin組織標本では良いmRNA品質と判定される検体の割合が45.4%向上するという大幅なmRNA品質の改善が確認された。

20

実施例5：薄切切片からのAS-LMDシステムによる組織の採取および採取組織からのtotal RNA抽出、定量、mRNA品質の検定およびGeneChipデータの取得

(1) AS-LMDシステムによる組織の採取

ヒト前立腺組織については実施例2に記載の方法でPFA-AMeX-paraffin標本を作成し、H E染色を行った薄切切片を乾燥後にAS-LMDシステム(Leica Microsystems社製)によるサンプル採取を行い目的とする細胞を採取した。具体的には、AS-LMDシステムのモニター上に映し出される画像から前立腺癌部および前立腺過形成部を識別し、レーザーで癌部および過形成部をそれぞれ別々のチューブ(0.2 mL)に回収した。チューブにはサンプル(採取組織)よりのtotal RNA抽出のために、サンプル回収前に30 μ LのLysis buffer(溶解バッファ、20 mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 1% SDS, 500 μ g/mL Proteinase K)を加えておき、サンプル回収後にさらに175 μ Lの溶解バッファを加えた。

30

(2) 採取組織からのtotal RNA抽出、定量およびmRNA品質の検定

マイクロダイセクションにより採取した組織からのtotal RNA抽出、定量およびmRNA品質の検定は実施例3に記載の方法と同様に行った。

(3) GeneChipデータの取得

mRNA品質検定において5プライム領域の増幅産物が1ユニット以上、3プライム領域の増幅産物が15ユニット以上、3プライム領域/5プライム領域のPCR産物の比が20以下のRNAサンプルは信頼性の高いGene Chipデータ(Affymetrix Human X3P arrayで% present-call値が30%以上となるもの)が取得できる事が基礎検討より確認されており、これらの値を基準値として、サンプルの良否を判定した。基準値を満たし、良い品質のmRNAが含まれることを確認したサンプルのtotal RNAからAffymetrix社の提供する標準的な方法でラベル化cRNAプローブを作製し、Human X3P array(Affymetrix社)を用いて遺伝子発現データを取得した。取得した遺伝子発現データのうちPresent-call値が30%以上となるデータを信頼性の高いデータとし、これらについてクラスタリング解析を行った。

40

実施例6：前立腺癌組織および前立腺過形成組織における遺伝子発現データの解析

実施例5において取得された前立腺癌および前立腺過形成組織における遺伝子発現データについて階層的クラスタリング解析(Hierarchical clustering)を行ない、遺伝子発現パターンの類似性を検討した。具体的にはGeneChipの遺伝子発現においてpresent-call値が30%以上を示した前立腺癌組織11検体および前立腺過形成組織42検体の遺伝子発現データについてGC-RMA法で、シグナル値(遺伝子の発現量を示す値)を算出し、これを対

50

数値に変換し、mean center化（平均化：平均化とはデータセットの中心にプロットの原点を移動することであり、つまり各変数の平均値はゼロとなる。）を行った後、階層的クラスタリングを行なった。階層的クラスタリングはRパッケージ（Rは統計的な計算およびグラフィックのためのフリーソフトウェア）のpvclustパッケージを用いて行った。

【0041】

クラスタリング解析の結果を図3に示す。図3の樹形図(デンドグラム)で示されるように前立腺癌検体間と前立腺過形成検体間では、遺伝子発現パターンが異なっており、前立腺癌検体群と前立腺過形成検体群が独立のクラスターとして分かれた。一方、前立腺癌検体同士、また前立腺過形成検体同士では類似性の高い遺伝子発現パターンであった。

【0042】

さらに、前立腺癌の中でも形態的観察より低分化型腺癌、中分化型腺癌と判定された検体において、低分化型腺癌検体同士、あるいは中分化型腺癌検体同士のほうが、遺伝子発現パターンの類似性がより高く、形態観察により低分化型と判定された検体が先にクラスターを形成する結果となっており、形態観察結果を忠実に反映する遺伝子発現パターンが得られていた。同様の実験およびデータ解析を前立腺凍結組織標本を用いて行った場合、PFA-AMeX-Paraffin前立腺組織標本を用いた時のように組織形態観察結果を遺伝子発現パターンが忠実に反映するという結果は得られていない。

実施例7：PFA-AMeX法により処理したSNAP-Frozenサンプルの組織形態およびRNA品質

一般的な組織バンクにおいて、組織サンプルは凍結保存されたもの（SNAP-Frozenサンプル）が主流であり、これらは主に核酸やタンパク質の抽出に用いられてきた。また組織形態観察についてはSNAP-Frozenサンプルを用いた凍結切片の作製が一般的には可能であるが、通常のパラフィン切片に比べて組織形態の保持に難点があった。このため、SNAP-Frozenサンプル(凍結組織)についてPFA-AMeX-Paraffin法により標本作製し、該標本の組織形態保持およびmRNA品質について評価を行った。

(1) SNAP-Frozen組織からのPFA-AMeX-Paraffin標本作製

摘出した組織を研究目的に使用することを同意した前立腺癌もしくは前立腺肥大症の患者の凍結組織(SNAP-Frozen組織)を使用した。SNAP-Frozenサンプルは、約5mm³大にトリミングし、実施例1のPFA-AMeX-Paraffin法により、標本作製した。

(2) 組織形態の比較

SNAP-Frozen(凍結)サンプルからPFA-AMeX-Paraffin法によって作製された標本のパラフィン薄切切片では、HE染色後の形態観察においてわずかに核の空胞化が認められたものの、未凍結組織より作製されたPFA-AMeX-Paraffin標本のパラフィン薄切切片とほぼ同等の組織形態識別が可能であった。(図4)

(3) mRNAの品質検定

SNAP Frozen(凍結)サンプルからPFA-AMeX-Paraffin法で作製された標本より、実施例4に記載の方法でtotal RNA抽出、定量およびmRNAの品質検定を行った。その結果を表3に示す。

【0043】

【表3】

	実施総数	基準クリア数
SNAP-Frozen PFA-AMeX 法	10	7 (70.0%)

【0044】

mRNA品質検定を行った10検体中7検体(70.0%)が良い品質のmRNAであると判定された。未凍結組織サンプルから作製されたPFA-AMeX-Paraffin標本では67.1%の検体(79検体中53検体)が良い品質のmRNAであると判定されており(実施例4、表2)、SNAP Frozen(凍結)サンプルより作製されたPFA-AMeX-Paraffin標本においても未凍結サンプルより作製され

10

20

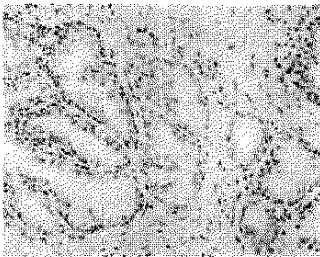
30

40

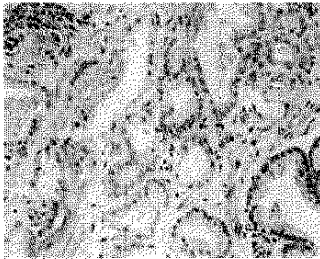
50

た標本とほぼ同等の品質のmRNAが保持されていることが確認できた。

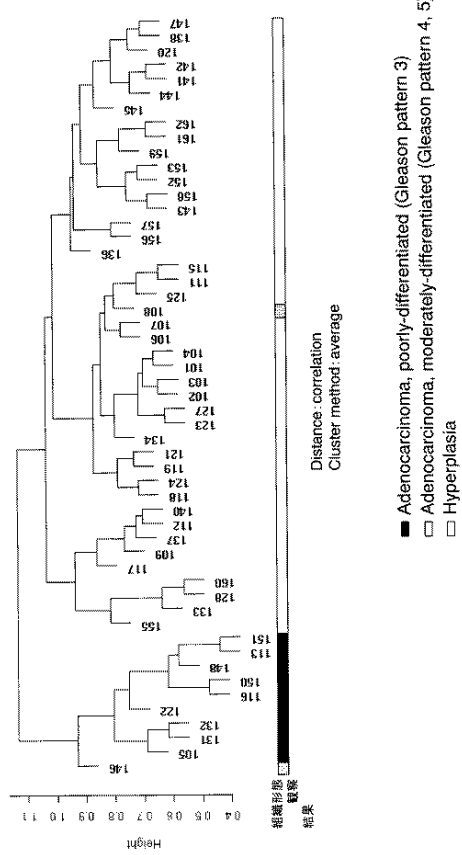
【図 1】



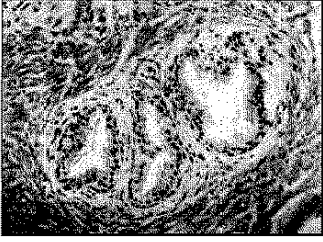
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】
2009078386000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2008/072787
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N1/36(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i 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) G01N1/36, C12N15/09, C12Q1/68, G01N1/28, G01N33/48, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Suzuki M. et al., PLP-AMeX Method, Fixation Using PLP Fixative and Embedding in Paraffin by the AMeX Method, is Useful not only for Histochemistry but also In Situ Hybridization, J. Toxicol. Pathol., 2004, Vol. 17, pp. 171-176	1-10
X	JP 2002-082026 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 22 March, 2002 (22.03.02), Par. Nos. [0007] to [0024] (Family: none)	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 application or patent 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 05 March, 2009 (05.03.09)		Date of mailing of the international search report 17 March, 2009 (17.03.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/072787

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The inventions according to claims 1 to 10 relate to a method of preparing a specimen or a specimen which is prepared by the preceding preparation method, while the inventions according to claims 11 to 14 relate to a method of examining the qualities of mRNA or a method of preparing a sample for DNA microarrays which comprises a quality examination step using the preceding quality examination method.

The matter common to the inventions according to claims 1 to 14 is "a method of preparing a specimen from various frozen or unfrozen organs or tissues (excluding hard tissues) of the whole body which comprises the following steps: 1) fixing a target organ or tissue with a (continued to extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Claims 1 to 10.

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2008/072787

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

PFA solution; and 2) embedding the same in paraffin by the AMeX method".

However, it has been clarified as the results of the search that the above-described common matter is not novel because of having been disclosed in Suzuki M. et al., J. Toxicol. Pathol., 2004, Vol. 17, pp. 171-176 or JP 2002-082026 A. As a result, the common matter as described above falls within the category of prior art and, therefore, cannot be considered as a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2. Thus, there is no matter common to all of the inventions according to claims 1 to 14. Since there is no other common matter seemingly being a special technical feature in the meaning within the second sentence of PCT Rule 13.2, no technical relevancy can be found out among these inventions differing from each other in the meaning within PCT Rule 13.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 7 2 7 8 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N1/36(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N1/36, C12N15/09, C12Q1/68, G01N1/28, G01N33/48, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2009年 日本国実用新案登録公報 1996-2009年 日本国登録実用新案公報 1994-2009年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	Suzuki M. et al., PLP-AMeX Method, Fixation Using PLP Fixative and Embedding in Paraffin by the AMeX Method, is Useful not only for Histochemistry but also In Situ Hybridization, J. Toxicol. Pathol., 2004, Vol. 17, pp. 171-176	1-10	
X	JP 2002-082026 A (中外製薬株式会社) 2002.03.22, 【0007】-【0024】 (ファミリーなし)	1-10	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 05.03.2009		国際調査報告の発送日 17.03.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 長谷 潮	2 J 3907
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 8 / 0 7 2 7 8 7

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

- 1. 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
- 2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
- 3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるときの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-10に係る発明は、標本の作製方法又は当該作製方法によって作製された標本に関し、請求の範囲1-14に係る発明は、mRNAの品質検定方法又は前記品質検定方法による品質検定工程を含むDNAマイクロアレイ用サンプルの作製方法に関する。

請求の範囲1-14に係る発明の共通の事項は、「以下の工程を含む凍結または未凍結の全身臓器又は組織(硬組織を除く)の標本作製方法: 1) 目的とする臓器又は組織をPFA液で固定する; 2) AMeX法によるパラフィン包埋を行う。」である。

しかしながら、調査の結果、前記共通の事項は、Suzuki M. et al., J. Toxicol. Pathol., 2004, Vol. 17, pp. 171-176 又は JP 2002-082026 Aに記載されているから、新規でないことが明らかとなった。結果として、前記共通の事項は、先行技術の域を出ないから、PCT規則13.2の第2文の意味において、特別な技術的特徴ではない。それ故、請求の範囲1-14に係る発明すべてに共通の事項はない。PCT規則13.2の第2文の意味において特別な技術的特徴と考えられる他の共通の事項は存在しないので、それらの相違する発明の間にPCT規則13の意味における技術的な関連を見いだすことができない。

- 1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
- 2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
- 3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
- 4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1-10

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 Z N A A
 C 1 2 N 15/00 A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),
 EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,T
 R),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,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,K
 G,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,PG,PH,PL,PT
 ,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

(74)代理人 100096013
 弁理士 富田 博行

(74)代理人 100091638
 弁理士 江尻 ひろ子

(72)発明者 渡邊 剛
 シンガポール 1 3 8 6 6 7 ヘリオス ナンバー05-08/09 バイオポリス・ウェイ 1
 1 ファーマロジカルズ・リサーチ プライベート リミテッド内

(72)発明者 ヤンティン ファン
 シンガポール 1 3 8 6 6 7 ヘリオス ナンバー05-08/09 バイオポリス・ウェイ 1
 1 ファーマロジカルズ・リサーチ プライベート リミテッド内

(72)発明者 松原 亨一
 シンガポール 1 3 8 6 6 7 ヘリオス ナンバー05-08/09 バイオポリス・ウェイ 1
 1 ファーマロジカルズ・リサーチ プライベート リミテッド内

(72)発明者 鈴木 雅実
 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 寺島 弘道
 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内

(72)発明者 水野 英明
 神奈川県鎌倉市梶原200番地 中外製薬株式会社内

F ターム(参考) 2G045 BA14 BB14 BB22 BB24 BB46 BB50 BB51 CB02 DA13 DA20
 DA36 FA16 FB01 FB03 FB11 GB01 GC12
 2G052 AA28 AB16 AD14 AD34 AD52 FA01
 4B024 AA11 CA04 CA11 HA08 HA12
 4B063 QA18 QQ02 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR42 QR55
 QR62 QR72 QR77 QR82 QS03 QS10 QS12 QS25 QS28 QS34
 QS36 QS39 QX01

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	新的样品制备方法具有优异的组织形状保留和优异的核酸质量保留		
公开(公告)号	JPWO2009078386A1	公开(公告)日	2011-04-28
申请号	JP2009546258	申请日	2008-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	制药逻辑的研究私人有限公司		
申请(专利权)人(译)	中外制药有限公司 制药逻辑的研究私人有限公司		
[标]发明人	渡邊剛 ヤンテインファン 松原亨一 鈴木雅実 寺島弘道 水野英明		
发明人	渡邊 剛 ヤンテイン ファン 松原 亨一 鈴木 雅実 寺島 弘道 水野 英明		
IPC分类号	G01N1/36 G01N1/28 G01N33/53 G01N33/48 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N1/36 C12Q1/6806		
FI分类号	G01N1/28.R G01N1/28.J G01N1/28.K G01N33/53.Y G01N33/48.R C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BA14 2G045/BB14 2G045/BB22 2G045/BB24 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB02 2G045/DA13 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/FA16 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB11 2G045/GB01 2G045/GC12 2G052/AA28 2G052/AB16 2G052/AD14 2G052/AD34 2G052/AD52 2G052/FA01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA11 4B024/HA08 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QR82 4B063/QS03 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	2007322944 2007-12-14 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明旨在开发一种用于样本制备的方法，该方法确保维持组织形态和核酸质量（特别是RNA质量）。本发明的进一步目的是通过这种方法制备样品，然后通过显微切割从中收集所需细胞并分析基因表达。一种从全身各种冷冻或未冷冻的器官或组织（不包括硬组织）制备标本的方法，包括以下步骤：1）用PFA固定剂固定靶器官或组织；2）通过AMeX方法将其嵌入石蜡中。

NBF-Paraffin

Sample name	RNA conc (ng/ul)	β -actin 3' FW & RV (Set A)(unit)	β -actin 5' FW & RV (Set B)(unit)	Ratio (Set A/Set B)
M05-0458-31	86.19	85.240	21.890	3.89
M05-0463-31	76.18	31.760	7.252	4.38
M05-0464-31	15.94	15.170	3.723	4.07
M06-0016-31	21.82	21.340	4.751	4.49
M06-0017-31	50.18	35.740	8.082	4.42
M06-0018-31	17.20	38.110	8.801	4.33
average	44.59	37.89	9.08	4.27