

(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2019-507342

(P2019-507342A)

(43) 公表日 平成31年3月14日(2019.3.14)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|------------------------|----------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 Y | 2 G 0 4 5 |
| GO 1 N 33/48 (2006.01) | GO 1 N 33/48 R | 2 G 0 5 2 |
| GO 1 N 1/36 (2006.01) | GO 1 N 1/36 | 4 B 0 2 9 |
| C 1 2 M 1/00 (2006.01) | C 1 2 M 1/00 G | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2018-543152 (P2018-543152)
 (86) (22) 出願日 平成29年2月10日 (2017. 2. 10)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年9月27日 (2018. 9. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/053041
 (87) 国際公開番号 W02017/140596
 (87) 国際公開日 平成29年8月24日 (2017. 8. 24)
 (31) 優先権主張番号 102016000016894
 (32) 優先日 平成28年2月18日 (2016. 2. 18)
 (33) 優先権主張国 イタリア (IT)

(71) 出願人 518284673
 アダックス ビオサイエンスィズ エス.
 アール. エル.
 イタリア国 1 0 1 2 3 トリノ, コルソ
 ヴィットリオ エマヌエーレ セコンド
 1 2
 (74) 代理人 100091683
 弁理士 ▲吉▼川 俊雄
 (74) 代理人 100179316
 弁理士 市川 寛奈
 (72) 発明者 ブッソラティ, ジョヴァンニ
 イタリア国 1 0 1 2 6 トリノ, ストラ
 ーダ モングレーノ 2 4 7
 Fターム(参考) 2G045 AA25 CB01
 2G052 FA02 FD02

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織標本用固定剤としての無酸グリオキサー

(57) 【要約】

本発明は市販のグリオキサーに通常存在する酸が除去されているグリオキサー溶液を含む、組織標本の固定用組成物である。本発明の組成物は組織における構造、抗原成分及び核酸の保存用の最適な固定剤を提供する。無酸グリオキサーは毒性が限られ、発がん物質と見なされず、組織及び細胞固定用ホルマリンの有効な代替物となる。

【選択図】 図 1

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
組織固定のための無酸グリオキサール水溶液の使用。
- 【請求項 2】
前記グリオキサール溶液が 0.1% から 90% の重量濃度を有する、請求項 1 に記載の使用。
- 【請求項 3】
前記グリオキサール溶液が 2% の重量濃度を有する、請求項 2 に記載の使用。
- 【請求項 4】
前記溶液の pH が 7.1 から 8.0 である請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の使用 10
- 【請求項 5】
前記溶液がグリオキサール市販溶液をイオン交換樹脂を用いて処理することにより得られる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 6】
組織学的、細胞学的、免疫組織化学的評価のため、及び遺伝子分析のために、ヒト、動物及び植物細胞及び組織を固定及び保存するための、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 7】
前記溶液が空気接触を防止することにより酸化及び酸性化から保護される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の使用。 20
- 【請求項 8】
前記溶液が「バグインボックス」容器及び/又は真空容器への分配、並びに/あるいはエタノール又はメタノールなどの抗酸化剤の任意の添加により、酸化及び酸性化から保護される、請求項 7 に記載の使用。
- 【請求項 9】
前記溶液が使用時まで -1 から -80 の温度で凍結される、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の使用。
- 【請求項 10】
請求項 1 から 8 に示された前記溶液、及び組織学で用いられる他の従来の試薬を含有する「バグインボックス」型の気密容器を含む、組織学的サンプルの組織固定用キット。 30
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】
本発明は、酸を含有しないグリオキサールの溶液を含む、組織及び細胞標本の固定用組成物に関する。
- 【背景技術】
- 【0002】
現在、組織学的組織の保存及び固定は、ホルムアルデヒドを含有する水溶液、詳細にはホルマリンとして知られる、水に 4% ホルムアルデヒドを含有する溶液を用いて行われる 40
- 【0003】
ホルマリンは製造業においては樹脂の製造、及び皮革の固定のため、医療分野では組織の移動、その保管（例えば博物館において）、組織学においては固定のため、非常に広範囲に用いられている。これは組織学的診断に顕微鏡検査を行うため、組織標本のパラフィン包埋、薄切及び染色より前に行う必要がある（Fox et al. Formaldehyde fixation. J. Histochem. Cytochem, 33, 845 - 853, 1985）。
- 【0004】
ホルマリンの使用は世界中に広まっており、イタリアのみでその消費は何百万リットル 50

ほどである。従って、ホルマリンの使用は、ホルマリンを使用し、ホルムアルデヒド蒸気を吸入する技術者及び看護師並びに病理医に影響を与える。

【0005】

ホルムアルデヒドの毒性は昔から知られている。皮膚湿疹及び呼吸器ぜんそくを引き起こすことがあるアレルギー性及び毒性物質であり、発がん性に分類される。ホルムアルデヒドはいまだ最適な固定剤と見なされているが (Buesa R J . Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 387 - 396)、その使用は問題を伴う。

【0006】

環境局はこの揮発性試薬の毒性を次第に懸念しており、従ってEC規則第1272/2008号を修正している2014年6月5日のEC規則第605/2014号の結果として、2016年からホルマリン禁止令が欧州諸国で提案されている。この試薬が発がん物質 (区分1B/2) 及び突然変異原として定義されていることにより正当化されているが、この決定は診断病理学に対して重く、おそらく受け入れがたい影響を与えたかもしれない。現在この状況に対する反応は、ホルムアルデヒド蒸気への過剰な暴露を防止するために策定された保護手順の採用に限定されているが、ホルマリンに代わる非毒性固定剤の採用によってのみ、この状況を解決することができることは間違いない。

【0007】

ホルマリンに代わる多くの固定剤が提案されている (上記引用したBuesa R J . ; Zanini et al . Environmental Health 2012 , 11 : 59) が、これらのいずれも速く十分な固定を行うことはいまだ判明していない。

【0008】

組織固定用ホルマリン代替物としてのグリオキサール (オキサールアルデヒド) の使用は、Wicks及びSuntzeff (Wicks LF and Suntzeff V . Science , 98 , 204 , 1943) により最初に提案された。このような二官能性試薬は溶液中でポリマーを形成し、タンパク質で分子内及び分子間架橋を形成する傾向がある (Hopwood D . Histochemie , 20 , 127 - 132 , 1969) 。溶液中、グリオキサールは様々な水和形態となり、最も一般的なものは室温で形成される環状二量体の1,3ジオキサランである (Dapson RW . Biotech n ic & Histochem istry 2007 , 82 (3) : 161__166) 。グリオキサールは非常に低い蒸気圧を有し、比較的高温 (25~60) でも蒸気とならないため、蒸気吸引のリスクがない (Anon . 1986 , Glyoxal , a Techn ical Brochure . American Cynamid Company , Wayne , NJ . 50pp .) 。

【0009】

組織固定剤としてのこの物質の使用に関して、多数の研究が行われている (Sabatini et al . , J Cell Biol . 1963 Apr ; 17 : 19 - 58) 。組織固定の結果を改善するため、グリオキサールの亜鉛塩又はアルコールとの混合物の使用が、それぞれ米国特許第7368132号明細書及びカナダ国特許発明第2119554号明細書に記載された。

【0010】

しかしながら、グリオキサールがホルマリンによるものに類似する満足のいく形態学的保存を保証しないことが、いくつかの研究により確認された (Buesa R J . , Annals of Diagnostic Pathology 12 (2008) 387 - 396 ; Marcon et al . , Annales de Pathologie 29 , 460 - 467 ; 2009) 。ホルマリンに代わる固定剤として市販される多数の製剤は、エタノール、メタノール又は金属 (亜鉛) など他の物質に添加されたグリオキサールを含有し、これらの製剤でさえ満足のいく結果ではなく、このいずれも組織学者の支持を得られなかった。Marconらの研究では、筆者らはグリオキサールに基づく様々な溶液の固定特性を、基準としてホルムアルデヒド溶液と比較した。評価段階で様々な

10

20

30

40

50

パラメータ（形態学的保存、核酸保存など）に関する結果を比較して、グリオキサルに基づく溶液はホルマリンよりはるかに悪い結果となった。著者らは赤血球の溶解（Buesa、2008；Maconら、2009）又は微小石灰化の溶解（Umlas J. and Tulecke MT., Human Pathology 35, 1058-62, 2004）などの有害作用のため、グリオキサル系溶液を推奨することはできないと結論付けた。また、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション（FISH）分析は技術的に許容できない結果となり（Tubbs RR, Hsi ED, Hicks D, Goldblum J. Am J Surg Pathol 2004; 28(3): 417-419; Willmore-Payne C, Metzger K, Layfield LJ. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2007; 15(1): 84-87）、核酸の抽出及び配列決定は不十分であることが判明した（Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, et al. Am J Pathol 2002; 160(2): 449-457）。このような結果は商業的グリオキサル系固定剤により示される。これらの試薬の正確な組成は公知ではないが、グリオキサル、エタノール、メタノール及び亜鉛を含む。

【0011】

すべての登録商標をもつ固定剤（Glyo-Fix（登録商標）、シャンドン；Histo-Fix（登録商標）、バイオワールド；Histo-CHOICE（登録商標）、アムレスコ；Preserve（登録商標）、アナテック、及びSafe-Fix II（登録商標）、フィッシャーサイエンティフィック）は酸性であると報告されている（pH 4の範囲内）。Maconら（2009）及びGehin-Macon N.（2008年6月13日に論じられた論文、ナンシー大学）は異なるpHの異なるグリオキサールのリン酸バッファ溶液を試したが、この研究は主にpH 4のグリオキサール溶液について行われた。詳細には、Gehin-Macon（2008）は彼女の論文において、「我々は初期の研究（試験）により、pH 7の4%グリオキサールが組織固定剤として不良であり、微小解剖学の良好な保存を行うことができないことを確認している。低パーセントのエタノール（10%）の添加及び溶液の酸性化（pH 4）は、より優れた結果を得ることができる」と言及している（Discussion、142～143ページ）。なお、この論文は、市販の4%グリオキサールをpH 7のバッファに添加することにより調製される固定剤が調製直後又はその後用いられるかどうか、固定剤の最終pHが確認されるかどうか（溶液は時間と共に不安定となる）を明確にしていない。さらに、使用時の溶液のpHについて何の情報もない。また、酸がグリオキサール溶液から除去されていなかった。この問題は本発明の明細書、特に実施例5で検討される。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】米国特許第7368132号明細書

【特許文献2】カナダ国特許発明第2119554号明細書

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Fox et al. Formaldehyde fixation. J. Histochem. Cytochem, 33, 845-853, 1985

【非特許文献2】Buesa RJ. Annals of Diagnostic Pathology 12(2008)387-396

【非特許文献3】Zanini et al. Environmental Health 2012, 11:59

【非特許文献4】Wicks LF and Suntzef V. Science, 98, 204, 1943

【非特許文献5】Hopwood D. Histochemie, 20, 127-132

10

20

30

40

50

, 1969

【非特許文献6】Dapson RW. *Biotechnic & Histochemistry* 2007, 82(3): 161-166

【非特許文献7】Anon. 1986, *Glyoxal, a Technical Brochure*. American Cynamid Company, Wayne, NJ. 50pp.

【非特許文献8】Sabatini et al., *J Cell Biol.* 1963 Apr; 17: 19-58

【非特許文献9】Buesa RJ., *Annals of Diagnostic Pathology* 12(2008) 387-396

10

【非特許文献10】Marcon et al., *Annales de Pathologie* 29, 460-467; 2009

【非特許文献11】Umlas J. and Tulecke MT., *Human Pathology* 35, 1058-62, 2004

【非特許文献12】Tubbs RR, Hsi ED, Hicks D, Goldblum J. *Am J Surg Pathol* 2004; 28(3): 417-419

【非特許文献13】Willmore-Payne C, Metzger K, Layfield LJ. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007; 15(1): 84-87

【非特許文献14】Gillespie JW, Best CJ, Bichsel VE, Cole KA, Greenhut SF, Hewitt SM, et al. *Am J Pathol* 2002; 160(2): 449-457

20

【非特許文献15】Zhiyong Zhang, Dishun Zhao and Baoyun Xu, *Journal of Chromatographic Science* 2013; 51: 893-898

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

現在、驚くべきことに、以前の研究に反して、固定剤としてのグリオキサールの特性は酸内容物を除去することにより著しく改善することができることを見出されている。

30

【0015】

純粋試薬として現在利用できるグリオキサール（グリオキサール、40wt%水溶液、製品番号128465、シグマアルドリッチ、ミラノ）は、グリオキサールの調製中及び調製後徐々に、アルデヒド部分が分解及び酸化する結果として形成されるグリオキシル酸、シュウ酸、グリコール酸、酢酸及びギ酸の存在により、実際には強酸pH（pH4付近）を有する（Zhiyong Zhang, Dishun Zhao and Baoyun Xu, *Journal of Chromatographic Science* 2013; 51: 893-898）。これらの酸は強塩基（NaOH）を用いて中和することができる、又はイオン交換樹脂を用いて除去することができる。このようにして得られた試薬は明白な濃度を有するグリオキサール無酸（G.A.F）水溶液としてここで定義され、細胞及び組織の保存に優れた品質を有する組織固定剤であることが分かった。

40

【課題を解決するための手段】

【0016】

従って、本発明は組織固定剤としての無酸グリオキサールの使用に関する。

【0017】

また、本発明は本発明の固定剤又は他の試薬（組織学で一般的に使用される染料、バッファ及び他の試薬）を含有する「バッグインボックス」型の容器、あるいは真空下のバッグを含む組織学的組織固定用キットである。

【0018】

ホルマリンと比較して、本発明の固定剤は（ホルムアルデヒドとは反対に）毒性蒸気を

50

放出しないだけでなく、素早く、組織に直ちに浸透し、生命条件で存在するのと同様に組織及び細胞の特徴を保存する。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】結腸がん。無酸グリオキサルで固定。ヘマトキシリン・エオシンで染色。細胞及び組織のより優れた保存が明らかである。

【図2】結腸がん。上記と同じ例であるが、ホルマリンで規定通りに固定した。固定及び構造保存の相似は明らかである。

【図3】結腸がんの肝転移。2%無酸グリオキサル含有pH7.3、0.1Mのリン酸バッファで固定。構造の最適な保存が明らかである。赤血球は肝類洞で確認でき、溶解は見られない。

【図4】結腸がん。無酸グリオキサールの固定。赤血球及び好酸球は間質で確認できる。

【図5】サンプルの吸収スペクトル。

【発明を実施するための形態】

【0020】

「無酸グリオキサル」という語は、0.1から90%、好ましくは1.5から50%、より好ましくは2から20%の重量濃度、7.1から8.0、好ましくは7.2~7.4のpHを有するグリオキサル水溶液を意味する。pH7.3±0.2の2%溶液が特に好ましい。

【0021】

組織及び細胞固定剤として用いられる本発明にかかる溶液は、イオン交換樹脂を用いた酸内容物の除去により、あるいはアンモニア、NaOH、KOHなどのアルカリ水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸カルシウム、炭酸亜鉛、炭酸バリウムなどの炭酸塩、又は重炭酸塩を用いた中和により、市販の40%グリオキサル溶液から調製することができる。

【0022】

酸を除去する手順の例を説明する。

【0023】

イオン交換樹脂による酸の除去

イオン交換樹脂バイオラッドAG501-X8(バイオラッド;ミラノ)30gを市販の40%グリオキサールの溶液(シグマ)150mlに添加した。60分後、複合物をろ過して、150mlの透明溶液が得られた。蒸留水又は生理食塩水(0.9%NaCl)をこの液体に添加して、2%w/w濃度のグリオキサルとした。この溶液のpHは中性付近となり、従ってイオン交換樹脂による酸の除去が確認された。

【0024】

無酸グリオキサルを0.1M、pH7.2のリン酸バッファに添加することにより、pHが7.2で保持された2%グリオキサル溶液が得られた。

【0025】

同様に、強塩基性イオン交換樹脂(アンバーライト(登録商標)IRA-400塩化物形;シグマ、ミラノ)を用い、上記手順に従って、グリオキサル溶液から酸を完全に除去した。この2%グリオキサル溶液含有生理食塩水又はリン酸バッファを、組織固定剤として使用される試薬とした。

【0026】

反対に、市販の強酸性グリオキサル(シグマ)をpH7.0又は7.2の0.1Mリン酸バッファに添加して最終濃度2%又は4%にすると、得られる溶液は中性をはるかに下回り、強酸となった。

【0027】

イオン交換樹脂により酸を除去した40%グリオキサル溶液100mlを室温で保持した。1週間後、この溶液のpHは最初は中性付近であったが、グリオキサールのグリオキシル酸への酸化の結果として徐々に低下し、pH4.8に達した。

【0028】

10

20

30

40

50

この酸性化のプロセスにより、組織の構造及び成分の保存に不十分な固定剤となった。

【0029】

これは、グリオキサール溶液から酸を除去した後、酸形成を引き起こす試薬の酸化を防止する必要があることを意味する。

【0030】

これは以下の手順を用いることにより行うことができる（任意で組み合わせる）：a）溶液が空気と接触するのを防止する容器を使用する、あるいはb）使用するまで溶液を凍結する、あるいはc）抗酸化物質、例えばアスコルビン酸又は硫化物又はエタノールなどのアルコールを添加する。

【0031】

a）ワインを保存するため、空気暴露を防止するのに現在用いられる「バッグインボックス」の技術は、1955年にWilliam Scholleにより提案された。液体をプラスチック箱に入れた後、バッグの栓を閉じ、存在する空気を完全に除去する。その後バッグをボックスに入れ、栓を外に出す。液体の使用によりバッグの体積は低減するが、空気の流入は防止する。

【0032】

例として、pH 7.1の2%無酸グリオキサール溶液3リットルを「バッグインボックス」に入れた（Ondulati e Imballaggi del Friulisp a、ヴィレッセ、ゴリツィア）。液体を固定剤としてこの容器から抜き取り、pHを常に確認した。6ヶ月後、溶液のpHはまだ7超で保持され、従って酸化による酸性化を受けていないことを確認した。

【0033】

空気との接触、従ってグリオキサールの酸化を防止する目的を常に有する代替物として、2%無酸グリオキサール溶液（pH 7.3）1000mlをプラスチックバッグのSeal-SAFE（マイルストーン、Soresole（BG）、イタリア）に入れた後、真空手順をTissue-SAFE（マイルストーン）の装置を用いて適用した。6ヶ月後、pHは未だ7超であり、酸化による酸性化を受けていないことを確認した。

【0034】

b）無酸グリオキサール溶液はpH 7.2~7.4、優先的に7.3のリン酸バッファなどの緩衝溶液に添加されていてもいなくても、-1 から -80、優先的に -20の温度で凍結されていれば安定を維持する。一度凍結した液体は酸化及び酸性化を受けず、解凍すれば固定に用いることができる。

【0035】

c）グリオキサールの酸化、従ってその酸性化（中性未満のpHに低下して、固定の質を悪化させる）を防止するため、アスコルビン酸（シグマ）などの酸化防止剤を0.01から20%、好ましくは1%の割合で、及び/又はトリメチルフェノール（シグマ）を0.01から20%、好ましくは0.1%の割合で、又はエタノール（カルロエルバ、ミラノ）などのアルコールを1%から90%の割合で添加した。

【0036】

詳細には、20%無酸グリオキサールの50%エタノール溶液は数ヶ月間中性付近のpHを維持する。

【0037】

また我々は、0.1から50%、優先的には5%濃度のエチレングリコール及びポリエチレングリコールなどの他の試薬が、経時的なグリオキサール溶液の酸性化を防止するのに有効であることも観察している。

【0038】

以下の実施例は本発明をより詳細に説明する。

【実施例1】

【0039】

（大腸壁、結腸がん、乳がんの20症例から）組織サンプルを診断目的より多く採取し

10

20

30

40

50

た。

【0040】

手術室から出た直後の断片は3～4mmの厚みを有し、診断目的に現在利用されるものと同様であった。カセットに包埋したサンプルを室温で固定液に浸漬した。

【0041】

同じ症例から、同時に採取したサンプルを3つの異なる種類の固定剤に浸漬した：1)リン酸緩衝ホルマリン(PBF)(Diapath、ベルガモ)、2)pH7.2のリン酸バッファに溶解した市販の2%グリオキサール(シグマ、ミラノ)(その後、この溶液のpHを確認し、最終pHは6.5であった)；3)2%無酸グリオキサール含有pH7.3のリン酸バッファ。

10

【0042】

室温で3又は24時間固定した後、ライカプロセッサ(ライカ、ミラノ)を用いて、カセットをアルコール脱水及びパラフィン包埋により規定通りに処理した。

【0043】

組織切片をパラフィンブロックから得、ヘマトキシリン・エオシンで同時に染色した。

【0044】

免疫組織化学的染色を以下の抗原：サイトケラチン広範囲；サイトケラチン19；CDX2及びKi67に対して、ホルマリン(製剤1)及び無酸グリオキサール(製剤3)で固定した断片の切片に行った。類似切片で、ALK及びHER2遺伝子に対するFISH染色も行った。

20

【0045】

結果

顕微鏡検査で、製剤2、すなわち最終pH6.5の市販2%グリオキサール溶液で固定した組織は、文献(Dapson、2007年；Buesa、2008年；Maconra、2009年)に記載されるようなグリオキサールを用いた固定に関連する欠点、つまり上皮及び間質の縮みを伴う組織の収縮、赤血球溶解、核物質を欠損した透明な核、を示した。

【0046】

反対に、無酸グリオキサール(製剤3)で固定した組織は、上記の欠陥が無く、ホルマリン(製剤1)で固定した組織で得られるものに類似する最適な固定を示した。

30

【0047】

ホルマリン及び無酸グリオキサールで固定した組織に同時に実施したサイトケラチンL:S、サイトケラチン19、CDX2及びKi67に対する免疫組織化学的反応は、基本的に同じ結果となった。

【0048】

すべての類似点において、ALK及びHER2に対するFISH反応は同様の結果であった。

【実施例2】

【0049】

記載した手順に従って、イオン交換樹脂(「アンバーライト」IRA-400塩化物形)を用いて酸を除いた40%グリオキサールを調製し、-20で直ちに凍結させた。代替物として、グリオキサールをpH7.4のリン酸バッファと混合し、-20で凍結した。

40

【0050】

これらのサンプルを3ヶ月間凍結させた後、解凍し、0.1M、pH7.3のリン酸バッファに2%無酸グリオキサールを含有する固定溶液を調製するために用いた。この試薬を実施例1に記載したように、組織を固定するために用いた。この結果は非常に優れた固定を確認し、従って固定特性を悪化させる固定剤の酸性化は凍結により防止されることを確認した。

【実施例3】

50

【0051】

実施例1のように結腸がんの組織サンプルを選択し、以下の液体；1) 4%ホルムアルデヒド含有pH7.4、0.1Mのリン酸バッファ(Diapat、ベルガモ)、2) 2%無酸グリオキサル含有pH7.3、0.1Mのリン酸バッファ、3) 2%無酸グリオキサル含有0.9%、pH7.2~7.4のNaCl；4) 「バグインボックス」容器で保存した2%無酸グリオキサル含有pH7.3、0.1Mのリン酸バッファ；5) 「Seal-SAFEバッグ」で保存した2%無酸グリオキサル含有pH7.3、0.1Mのリン酸バッファ、で固定した。

【0052】

固定剤2及び3は調製後、直ちに使用したが、固定剤4及び5は気密条件で3ヶ月まで保持した。

10

【0053】

結果

異なる種類の固定剤で固定したサンプルの組織学的検査は、固定剤2及び3で固定した組織において、ホルマリン(固定剤1)で固定した組織で得られるものと類似する最適な保存を確認し、バグインボックス又は真空手順を用いた空気暴露の防止が、酸化及びグリオキシル酸の形成を防止することにより無酸グリオキサル固定剤の固定特性を保持することを示した。

【実施例4】

【0054】

グリオキサルから酸を除去して無酸グリオキサル(GAF)を得るため、以下の手順を行った：強塩基性イオン交換樹脂である「アンバーライト」IRA-400塩化物形(シグマアルドリッチ)250gを脱イオンH₂Oで湿らせた後、1MのNaOHで素早く洗浄することにより活性化させた。水で数回洗浄して水酸化ナトリウムを除去した後、グリオキサル150mlを添加した。樹脂を室温で30分間作用させた後、フィルタを通して除去した。得られた中性付近のpHを有する無色透明の液体は酸が除去された40%グリオキサル(GAF)であった。GAFの2%溶液を最適な固定剤として用いた。

20

【0055】

pH7.3の0.1Mリン酸バッファの2%GAF溶液は数週間安定しており、その後徐々に酸化を受け、最適ではない固定特性を有する酸性反応物を産生する。安定性の問題を克服するため、50%エタノール(カルロエルバ、ミラノ、イタリア)に20%GAFを含有する母液を調製し、この溶液(母液)100mlに炭酸カルシウム(シグマアルドリッチ)0.1gを添加した。あるいは、エタノールをメタノールなど別のアルコールで置換した。pH7.3の0.1Mリン酸バッファに母液を1:10で希釈することにより、GAF固定剤として使用する最終(使用)溶液を得た。

30

【0056】

この研究は、複数のサンプリングを同時に行うため、手術室から出て直後の、及び適当な寸法(>2cm)の病変を含む一連の外科的サンプルを含む。結腸直腸腺がんの8症例を標準法によりサンプリングし、リン酸緩衝ホルマリン(PBF)及びGAF(使用溶液)で同時に固定した。

40

【0057】

室温で一晩固定した後、アルコール脱水及びパラフィン包埋を自動プロセッサ(ライカASP300、ライカマイクロシステムズ、ヴェッツラー、ドイツ)を用いてパラフィン包埋の標準手順に従って行った。8症例の切片をヘマトキシリン・エオシン(H&E)で染色し、分子解析用に処理した。

【0058】

DNA配列研究のため、9枚の切片(5µm厚)を25の結腸直腸腺がんのパラフィン包埋組織ブロックから得た。同時に選択し処理した試料をGAF及びPBFで固定した。キシレン1mlを用いて、切片を脱パラフィンした。56でプロテインゼンKで一晩インキュベーションした後、MagCore Genomic DNA FFPEキットを

50

用い、MagCore自動抽出装置（RBCバイオサイエンス、新北市、台湾）で、メーカーのプロトコルに従って、DNAを5枚の切片から単離した。

【0059】

DNA抽出物をQubitフルオロメーター（インビトロジェン、カールスバッド、カリフォルニア州、米国）及びNanoDrop分光光度計（サーモフィッシャーサイエンティフィック）でQubitBRアッセイにより定量した。

【0060】

DNAの完全性をDNA HSチップでDNA高感度試薬を用い、アジレント2100バイオアナライザ（アジレントテクノロジー、サンタクララ、カリフォルニア州）により評価した。サンプルを2 ng / μ Lに希釈し、DNA長分析をメーカーの取扱説明書に従って実施した。

10

【0061】

DNA直接配列決定のため、合計50 ngのDNAをKRAS（246 bp）のエクソン2に対して以下のPCR条件を用いて増幅させた：1xバッファ、2.5 mMのMgCl₂、0.4 μ Mのフォワード及びリバースプライマ（フォワード：5' - GGTGGA GTATTTGATAGTGTATTAACC - 3' 及びリバース：5' - AGAATGGTCCTGCACCAAGTAA - 3'）、並びにTaqポリメラーゼ0.2単位、最終体積25 μ L。PCR反応を以下のタッチダウンプログラムに従って行った：94 2分、次に94 15秒、64 30秒、及び70 30秒の3サイクル；94 15秒、61 30秒及び72 30秒の3サイクル；94 15秒、58 30秒、及び72 30秒の3サイクル；94 15秒、57 30秒、72 30秒の35サイクル、最終伸長70 5分。PCRテンプレートを3%アガロースゲルの電気泳動により可視化し、続く配列解析のため、ExoProStar（GEヘルスケア、ミラノ、イタリア）を用いて精製した。最終PCR産物15 ngをExoProStarで精製し、配列解析に用いた。サイクルシーケンスPCR反応をBigDyeTerminator v3.1サイクルシーケンスキット（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて設定し、同じ増幅プライマを20 μ Lの体積に最終濃度5 pmol / μ Lで添加した。サイクル条件は96 10秒、50 5秒、及び60 4分で25サイクルであり、反応を4 で終了した。サイクルシーケンス産物をAgencourt CleanSEQ（ベックマンコーラルター、カリフォルニア、米国）を用いて精製し、DNAの配列を自動16キャピラリーシーケンサ（3730 DNAアナライザ、アプライドバイオシステムズ、カリフォルニア州、米国）を用いて決定した。

20

30

【0062】

ピロシーケンスのため、KRASエクソン2を増幅し、配列決定して、ピロシーケンスにより、コドン12及び13の状態を評価した。ピロシーケンスはPSQ96（キアゲン、ヒルデン、ドイツ）を用い、「合成による配列決定」原理に基づく方法である。DNA増幅は以下のプライマを用いて実施した：フォワード5' - GGCCCTGCTGAAAA TCACG - 3'、リバース5' - ビオチン - GCTCTATCGTCATGGCTCT - 3'（サイズ80 bp）。DNAサンプルを94 5分間変性後、94 45秒、57 45秒及び72 1分で40サイクル、最終伸長72 5分に付した；5' - ビオチン化PCR産物をストレプトアビジン被覆常磁性ビーズ（GEヘルスケア）に結合させ、0.1 mol / lのNaOHにより変性させ、PyroMarkVacuumPrepWorkstation（キアゲン）を用い、メーカーの取扱説明書に従って単離した。これらの反応はPyroGoldReagents（キアゲン）を用いて96ウェルプレートで実施した。出発物質の一本鎖DNAテンプレートをシーケンスプライマ5' - CTTGTGGTAGTTGTAGCT - 3'を用いて、コドン12及び13を含む領域のリアルタイム配列決定を行った。得られたピログラムをPyroMark ID Software v1.0（キアゲン）を用いて分析した。

40

【0063】

この研究で採取した8つの結腸直腸腺がんのPBF固定サンプルに規定通りにシーケノ

50

ムマスアレイ（登録商標）を行い、KRAS変異をスクリーニングし、6個がKRAS変異を有することを見出した。結腸直腸がん8例（前の試験によるKRAS6変異体及び2つの野生型）の相似するPBF及びGAF固定サンプルに相当するDNAに対して、その後直接配列決定、ピロシーケンス及び「シーケノムマスアレイ」を行った。PBF固定試料で前に特定されたコドン12に影響する病原性KRAS変異は、すべてGAF固定サンプルで確認された。両方の技術により、各試料で検出された特定のKRAS変異は、PBF固定ミラーサンプルで検出されるものに匹敵する突然変異対立遺伝子頻度を示した（表1）。

【0064】

【表1】

表 対応するサンプル（GAF固定及びPBF固定）に対して異なる技術を用いたKRASエクソン2配列解析

| サン プル ID | KRASエクソン2サンガー | | | | KRASエクソン2ピロシーケンス | | KRASエクソン2シーケノム | |
|----------------|---------------|-----------|-----------|-----------|------------------|-----------|----------------|----------|
| | GAF | | PBF | | GAF | PBF | GAF | PBF |
| | フォワード | リバース | フォワード | リバース | | | | |
| 1 | WT | WT | WT | WT | WT | WT | WT | WT |
| 2 | G12 S | G12 S | G12 S | G12 S | G12 S | G12 S | G12 S | G12 S |
| 3 | G12 C | G12 C | G12 C | G12 C | G12 C | G12 C | G12 C | G12 C |
| 4 | G12 D* | G12 D | G12 D* | WT | G12 D | G12 D* | G12 D | G12 D |
| 5 | G12 V | G12 V | G12 V | N. A. | G12 V | G12 V | G12 V | G12 V |
| 6 | G12 D | G12 D* | G12 D* | G12 D* | G12 D | G12 D | G12 D | G12 D |
| 7 | G12 A | G12 A | G12 A | G12 A | G12 A* | G12 A | G12 A | G12 A |
| 8 | WT | WT | WT | WT | WT | WT | WT | WT |

GAF：グリオキサル無酸；PBF：リン酸緩衝ホルマリン；N. A.：評価なし；WT：野生型；*：低突然変異対立遺伝子頻度

【実施例5】

【0065】

市販のグリオキサル溶液はグリオキサールの産生及び保存中の酸化及び分解プロセスに由来する多数の酸を含有する（Zhiyong Zhang, Dishun Zhao and Baoyun Xu, Journal of Chromatographic Science 2013; 51: 893 - 898）。これらの酸はイオン交換樹脂の通過後完全に除去されるが、この通過後間もなく、空気暴露の結果として、又は分解プロセスのため、保存中の固定剤で新しい酸が漸次形成される。

【0066】

これらの酸の1つ（及び最も反応性の高い）、すなわちグリオキシル酸のこれらの固定剤における含有量の分析的評価が行われている。

【0067】

この分析は市販の2%グリオキサル（原溶液：40%グリオキサル、シグマ）を添加した0.1M、pH7.4のリン酸バッファを含有する水溶液で実施した。

【0068】

この少量のグリオキサールの添加は、グリオキサールの強酸性のため、存在するバッファにも関わらず希釈溶液のpHの低下を伴う（溶液1：分析1週間前に調製した）。

2) 上述と全く同様の溶液であるが、分析6ヶ月前に調製した。この溶液のpHは酸化

10

20

30

40

50

及び分解による酸形成の進行の結果として、強酸性である (pH 4.5)。

3) イオン交換樹脂の通過により調製した2%無酸グリオキサルを添加したpH 7.4、0.1Mのリン酸バッファを含有する水溶液。この溶液は分析2ヶ月前に調製し、-20で凍結保持した。

4) pH 7.4、0.1Mのリン酸バッファを含有する水溶液を、イオン交換樹脂の通過及び10%エタノール(カルコエルパ)により調製した2%無酸グリオキサル溶液に添加した。酸化防止活性を有するエタノールの存在は、試薬の酸化、従って酸性化を防止するように仕上げられる。

【0069】

分析条件

4サンプルにおけるグリオキシル酸の含有量は、電気伝導度測定を用いたイオンクロマトグラフィで測定した。

【0070】

グリオキシル酸に分類されるシグナルの同定は標準グリオキシル酸(シグマ)であるコントロールの前に確認した。グリオキサールの直接酸化に由来することがあるグリオキシル酸の濃度を測定する同じ手順を用いた。

【0071】

分析に用いた装置はダイオネクスDX500イオンクロマトグラフであった。データを可視UVスペクトルも用いて記録した。

【0072】

B. 結果の要約

表: 4サンプル中のグリオキシル酸含有量の測定結果

サンプル1 0.67 ± 0.07 mM < LOD [i]

サンプル2 37.8 ± 1.2 mM 1.7 ± 0.2

サンプル3 0.28 ± 0.05 mM < LOD [i]

サンプル4 0.21 ± 0.03 mM < LOD [i]

[i] グリオキシル酸の検出限界(LOD)は約1 - 2 × 10⁻³ mMの範囲である。

【0073】

2% w/w グリオキサル溶液が約380 mMの濃度を有することを考慮し、サンプル2のグリオキシル酸濃度は、最初に存在するグリオキサールの約10%である。

【0074】

C) 結論

1) 溶液中のグリオキサルは進行する酸化及び酸性化を伴う変性を受ける。酸性化は市販のグリオキサル溶液の実際のpHであるpH 4 ~ 4.5付近で平衡に達する。2%グリオキサルを含有するサンプル2においては、6ヶ月後、pHがpH 4.5まで低下し、非常に高いグリオキシル酸含有量を示した。

【0075】

2) イオン交換樹脂(アンバーライト)の通過は酸を除去したが、間もなくグリオキシル酸が新規に形成される。しかし、そのレベルはサンプル1(市販のグリオキサルを含有する)よりもはるかに低い。これは2%グリオキサル溶液(固定剤で使用されるものとして)において、0.3 mMより低いグリオキシル酸濃度はイオン交換樹脂で酸を除去することのみにより得ることができることを示す。実際、サンプル1のグリオキシル酸濃度は上記限界よりも高い。

【0076】

3) グリオキシル酸形成を引き起こす酸化及び変性プロセスは、溶液を凍結すること(サンプル3)、又は酸化防止剤として作用するエタノールなどのアルコールを添加すること、により防止することができる。

10

20

30

40

【 図 1 】

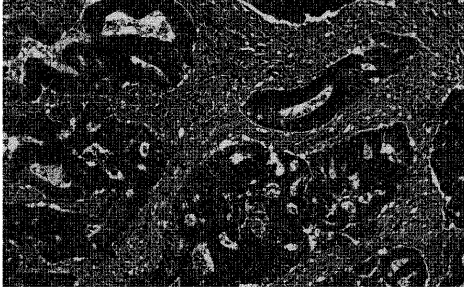


Fig. 1

【 図 3 】

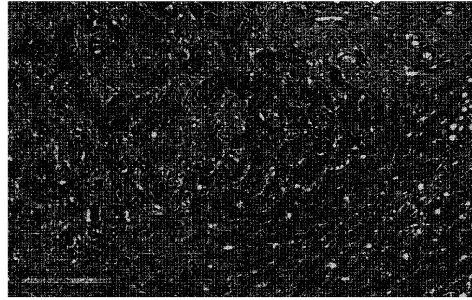


Fig. 3

【 図 2 】



Fig. 2

【 図 4 】

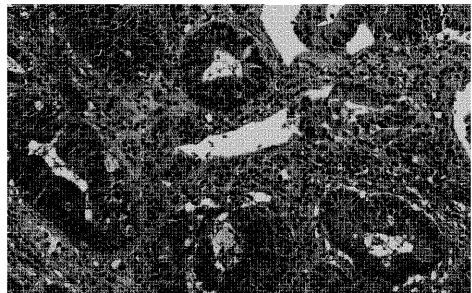
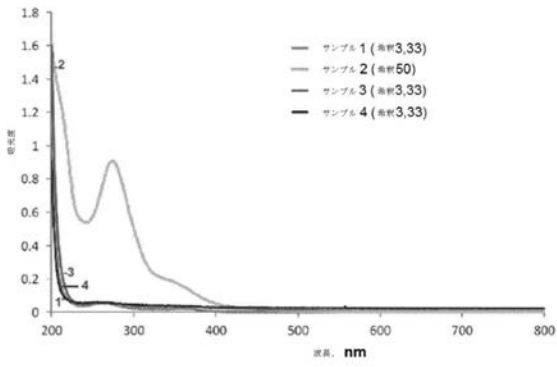


Fig. 4

【 図 5 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2017/053041

| | | |
|--|---|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER | | |
| INV. | A01N1/00 | G01N1/30 G01N33/48 |
| 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) | | |
| A01N 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 practicable, search terms used) | | |
| EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, COMPENDEX | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | Nathalie Gehin: "Le glyoxal: un possible substitut du formaldéhyde en anatomie pathologique? - Thèse doctorale", 13 June 2008 (2008-06-13), pages 1-207, XP055283404, Nancy (France) Retrieved from the Internet: URL: http://docnum.univ-lorraine.fr/public/SCDMED_T_2008_GEHIN_MARCON_NATHALIE.pdf [retrieved on 2016-06-24] Introduction; page 30 - page 31 point 1.2.1; page 70 point 4.2.3; page 76 point 7; page 83 - page 84 -/-- | 1-9 |
| <input checked="" 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 | | Date of mailing of the international search report |
| 2 May 2017 | | 14/07/2017 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Bueno Torres, Pilar |

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/053041

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | <p>point 4.1.1; page 96 point 4.3; page 116 point 7; page 129 - page 131 -----</p> <p>D. D. SABATINI ET AL: "CYTOCHEMISTRY AND ELECTRON MICROSCOPY: The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation", THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY : JCB, vol. 17, no. 1, 1 April 1963 (1963-04-01), pages 19-58, XP055283416, US ISSN: 0021-9525, DOI: 10.1083/jcb.17.1.19 abstract; table 1 -----</p> | 1-9 |
| A | <p>YN WANG ET AL: "Histomorphometric comparison after fixation with formaldehyde or glyoxal", BIOTECHNIC AND HISTOCHEMISTRY., vol. 86, no. 5, 21 September 2010 (2010-09-21), pages 359-365, XP055283253, US ISSN: 1052-0295, DOI: 10.3109/10520295.2010.520275 abstract -----</p> | 1-9 |
| A | <p>RW DAPSON: "Glyoxal fixation: how it works and why it only occasionally needs antigen retrieval", BIOTECHNIC AND HISTOCHEMISTRY., vol. 82, no. 3, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 161-166, XP055283259, US ISSN: 1052-0295, DOI: 10.1080/10520290701488113 abstract -----</p> | 1-9 |

1

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2017/053041**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:

see additional 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 an 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.:

1-9

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the 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 Application No. PCT/ EP2017/ 053041

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-9

Use of an aqueous solution of acid free glyoxal for the fixation of tissues

2. claim: 10

A kit for the histologic fixation of histologic samples comprising an air-tight container of the type "bag-in-box" containing the solutions defined in the claims 1-8 and other conventional reagents for use in histology

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

Fターム(参考) 4B029 GA02 GB07

| | | | |
|-----------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 无酸乙二醛作为组织标本的固定剂 | | |
| 公开(公告)号 | JP2019507342A | 公开(公告)日 | 2019-03-14 |
| 申请号 | JP2018543152 | 申请日 | 2017-02-10 |
| 发明人 | ブッソラティ, ジョヴァンニ | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/48 G01N1/36 C12M1/00 | | |
| CPC分类号 | A01N1/00 A01N1/0231 G01N1/30 G01N33/48 G01N2001/307 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.Y G01N33/48.R G01N1/36 C12M1/00.G | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/CB01 2G052/FA02 2G052/FD02 4B029/GA02 4B029/GB07 | | |
| 优先权 | 102016000016894 2016-02-18 IT | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

本发明是用于固定组织样本的组合物，其包含乙二醛溶液，已经从其中除去了通常存在于市售乙二醛中的酸。本发明的组合物提供了用于在组织中保存结构，抗原成分和核酸的最佳固定剂。无酸的乙二醛毒性有限，不被认为是致癌物，使其成为替代福尔马林的有效组织和细胞固定方法。[选型图]图1

| | | |
|--|--|--|
| (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2019-507342 (P2019-507342A) (43) 公表日 平成31年3月14日 (2019.3.14) |
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/53 Y | 2G045 |
| GO1N 33/48 (2006.01) | GO1N 33/48 R | 2G052 |
| GO1N 1/36 (2006.01) | GO1N 1/36 G | 4B029 |
| C12M 1/00 (2006.01) | C12M 1/00 | |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁) | | |
| (21) 出願番号 特願2018-543152 (P2018-543152) | (71) 出願人 518284673 アダックス ビオサイエンス エス. アル.エル. イタリア国 10123 トリノ, コルソ ヴィットリオ エマヌエーレ セcond 12 | |
| (86) (22) 出願日 平成28年2月10日 (2017.2.10) | (74) 代理人 100091683 弁理士 ▲吉▼川 俊雄 | |
| (85) 翻訳文提出日 平成30年9月27日 (2018.9.27) | (74) 代理人 100179316 弁理士 市川 寛奈 | |
| (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/053041 | (72) 発明者 ブッソラティ, ジョヴァンニ イタリア国 10126 トリノ, ストラ ーダ モングレーノ 247 | |
| (87) 国際公開番号 W02017/140586 | Fターム (参考) 20045 AA25 CB01 20052 FA02 FD02 | |
| (87) 国際公開日 平成28年8月24日 (2017.8.24) | | 最終頁に続く |
| (31) 優先権主張番号 102016000016894 | | |
| (32) 優先日 平成28年2月18日 (2016.2.18) | | |
| (33) 優先権主張国 イタリア (IT) | | |
| (54) 【発明の名称】 組織標本用固定剤としての無酸グリオキサール | | |