

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6947410号
(P6947410)

(45) 発行日 令和3年10月13日 (2021. 10. 13)

(24) 登録日 令和3年9月21日 (2021. 9. 21)

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 Y
GO 1 N 33/48 (2006. 01)	GO 1 N 33/48 R
GO 1 N 1/36 (2006. 01)	GO 1 N 1/36
C 1 2 M 1/00 (2006. 01)	C 1 2 M 1/00 G

請求項の数 7 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2018-543152 (P2018-543152)	(73) 特許権者	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 10123 トリノ, コルソ ヴィットリオ エマヌエーレ セコンド 12
(86) (22) 出願日	平成29年2月10日 (2017. 2. 10)	(74) 代理人	100091683 弁理士 ▲吉▼川 俊雄
(65) 公表番号	特表2019-507342 (P2019-507342A)	(74) 代理人	100179316 弁理士 市川 寛奈
(43) 公表日	平成31年3月14日 (2019. 3. 14)	(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
(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)		
審査請求日	令和2年2月10日 (2020. 2. 10)		
(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・地域又は機関	イタリア (IT)		
		審査官	草川 貴史
			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ル

(57) 【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であって、前記無酸グリオキサール水溶液が 2 % の重量濃度を有する、使用。

【請求項 2】

前記無酸グリオキサール水溶液の pH が 7 . 1 から 8 . 0 である請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記無酸グリオキサール水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 又は 2 に記載の使用。

【請求項 4】

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 3 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 5】

前記無酸グリオキサール水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 4 のいずれか一項に記載の使用。

【請求項 6】

前記無酸グリオキサール水溶液が使用時まで - 1 から - 80 の温度で凍結される、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の使用。

10

20

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の無酸グリオキサル水溶液、及び組織学で用いられる他の従来の試薬を含有する気密容器を含む、組織学的サンプルの組織固定用キット。

【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】

10

【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。

【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）。

20

【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）、

30

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。

40

【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ル（オキサールアルデヒド）の使用は、Wicks 及び Suntzeff（Wicks L F 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, 19

50

69)。溶液中、グリオキサ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. *Biotechnology & Histochemistry* 2007, 82(3):161-166)。グリオキサ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 Technical 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 RJ., *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; Marcon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(pH4の範囲内)。Marconら(2009)及びGehin-Marcon 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pH4のグリオキサル溶液について行われた。詳細には、Gehrin-Marcon(2008)は彼女の論文において、「我々は初期の研究(試験)により、pH7の4%グリオキサ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。低バ

10

20

30

40

50

ーセントのエタノール（１０％）の添加及び溶液の酸性化（ｐＨ４）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ｐＨ７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に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】

10

【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

20

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

【非特許文献５】Hopwood D. Histochemie, 20, 127 - 132, 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. 50 pp.

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

30

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

【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

40

【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

【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】

50

【 0 0 1 4 】

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が見出されている。

【 0 0 1 5 】

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、40 wt % 水溶液、製品番号 1 2 8 4 6 5、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（pH 4 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、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。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 6 】

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。

【 0 0 1 7 】

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「バグインボックス」型の容器、あるいは真空下のバグを含む組織学的組織固定用キットである。

20

【 0 0 1 8 】

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】

【 0 0 1 9 】

【図 1】結腸がん。無酸グリオキサールで固定。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。

30

【図 3】結腸がんの肝転移。2 % 無酸グリオキサール含有 pH 7 . 3、0 . 1 M 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】

【 0 0 2 0 】

「無酸グリオキサール」という語は、0 . 1 から 9 0 %、好ましくは 1 . 5 から 5 0 %、より好ましくは 2 から 2 0 % 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ール水溶液を意味する。pH 7 . 3 ± 0 . 2 の 2 % 溶液が特に好ましい。

40

【 0 0 2 1 】

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 4 0 % グリオキサール溶液から調製することができる。

【 0 0 2 2 】

酸を除去する手順の例を説明する。

【 0 0 2 3 】

50

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濃度のグリオキサールとした。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】

無酸グリオキサールを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%グリオキサール溶液が得られた。

【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、グリオキサール溶液から酸を完全に除去した。この2%グリオキサー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ール（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%グリオキサール溶液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】

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、バグの栓を閉じ、存在する空気を完全に除去する。その後バグをボックスに入れ、栓を外に出す。液体の使用によりバ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、pH7.1の2%無酸グリオキサール溶液3リットルを「バグインボックス」に入れた（Ondulatie Imballaggi del Friulispas、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を常を確認した。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（pH7.3）1000mlをプラスチックバグの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。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

b) 無酸グリオキサル溶液は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。

【 0 0 3 5 】

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。

10

【 0 0 3 6 】

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。

【 0 0 3 7 】

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。

【 0 0 3 8 】

以下の実施例は本発明をより詳細に説明する。

20

【 実施例 1 】

【 0 0 3 9 】

(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た。

【 0 0 4 0 】

手術室から出た直後の断片は3 ~ 4 mm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。

【 0 0 4 1 】

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) pH 7.2のリン酸バッファに溶解した市販の2%グリオキサル(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%無酸グリオキサル含有pH 7.3のリン酸バッファ。

30

【 0 0 4 2 】

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。

【 0 0 4 3 】

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

【 0 0 4 4 】

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。

40

【 0 0 4 5 】

結果

顕微鏡検査で、製剤2、すなわち最終pH 6.5の市販2%グリオキサル溶液で固定した組織は、文献(Dapson、2007年; Buesa、2008年; Macconr、2009年)に記載されるようなグリオキサルを用いた固定に関連する欠点、つまり上皮及び間質間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。

50

【 0 0 4 6 】

反対に、無酸グリオキサル（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。

【 0 0 4 7 】

ホルマリン及び無酸グリオキサ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、CDX 2 及び Ki 67 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。

【 0 0 4 8 】

すべての類似点において、ALK 及び HER 2 に対する FISH 反応は同様の結果であった。

10

【実施例 2】

【 0 0 4 9 】

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、グリオキサルを pH 7.4 のリン酸バッファと混合し、- 20 で凍結した。

【 0 0 5 0 】

これらのサンプルを 3 ヶ月間凍結させた後、解凍し、0.1 M、pH 7.3 のリン酸バッファに 2 % 無酸グリオキサ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。

20

【実施例 3】

【 0 0 5 1 】

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 pH 7.4、0.1 M のリン酸バッファ（Diapath、ベルガモ）、2) 2 % 無酸グリオキサル含有 pH 7.3、0.1 M のリン酸バッファ、3) 2 % 無酸グリオキサル含有 0.9 %、pH 7.2 ~ 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 pH 7.3、0.1 M 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 pH 7.3、0.1 M のリン酸バッファ、で固定した。

30

【 0 0 5 2 】

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。

【 0 0 5 3 】

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。

40

【実施例 4】

【 0 0 5 4 】

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）250 g を脱イオン H₂O で湿らせた後、1 M 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 150 ml 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。

50

【 0 0 5 5 】

pH 7.3 の 0.1 M リン酸バッファの 2 % G A F 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 % G A F を含有する母液を調製し、この溶液（母液）100 ml に炭酸カルシウム（シグマアルドリッチ）0.1 g 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。pH 7.3 の 0.1 M リン酸バッファに母液を 1 : 10 で希釈することにより、G A F 固定剤として使用する最終（使用）溶液を得た。

【 0 0 5 6 】

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（> 2 cm）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（P B F）及び G A F（使用溶液）で同時に固定した。

【 0 0 5 7 】

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 A S P 300、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。

【 0 0 5 8 】

DNA 配列研究のため、9 枚の切片（5 μm 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 G A F 及び P B F で固定した。キシレン 1 ml を用いて、切片を脱パラフィンした。56 でプロテインゼ K と一晩インキュベーションした後、Mag Core Genomic DNA FFPE キットを用い、Mag Core 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ールに従って、DNA を 5 枚の切片から単離した。

【 0 0 5 9 】

DNA 抽出物を Q u b i t 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 N a n o D r o p 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 Q u b i t B R アッセイにより定量した。

【 0 0 6 0 】

DNA の完全性を DNA H S 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 / μL 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。

【 0 0 6 1 】

DNA 直接配列決定のため、合計 50 ng の DNA を K R A S（246 bp）のエクソン 2 に対して以下の P C R 条件を用いて増幅させた：1 x バッファ、2.5 mM の M g C l 2、0.4 μM のフォワード及びリバースプライマ（フォワード：5' - G G T G G A G T A T T T G A T A G T G T A T T A A C C - 3' 及びリバース：5' - A G A A T G G T C C T G C A C C A G T A A - 3'）、並びに T a q ポリメラーゼ 0.2 単位、最終体積 25 μL。P C R 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。P C R テンプレート 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、E x o P r o S t a r（G E ヘルスケア、ミラノ、イタリア）を用いて精製した。最終 P C R 産物 15 ng を E x o P r o S t a r で精製し、配列解析に用いた。サイクルシーケンス P C R 反応を B i g D y e T e r m i n a t o r v 3.1 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 μL の体積に最終濃度 5 pmol / μL で添加した。サイクル条件

10

20

30

40

50

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。

【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' - GGCCCTGCTGAAAAATCACG - 3'、リバース5' - ビオチン - GCTCTATCGTCAATGGCTCTCT - 3'（サイズ80bp）。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、0.1mol/lのNaOHにより変性させ、PyroMark Vacuum Prep Works station（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PyroGold Reagents（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。

【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	G12S	G12S	G12S	G12S	G12S	G12S	G12S	G12S
3	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C	G12C
4	G12D*	G12D	G12D*	WT	G12D	G12D*	G12D	G12D
5	G12V	G12V	G12V	N. A.	G12V	G12V	G12V	G12V
6	G12D	G12D*	G12D*	G12D*	G12D	G12D	G12D	G12D
7	G12A	G12A	G12A	G12A	G12A*	G12A	G12A	G12A
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 0.1 M、pH 7.4 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、0.1 M 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、0.1 M 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 (カルロエルバ) 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】

10

20

30

40

50

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ーで測定した。

【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。

10

【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 $0.67 \pm 0.07 \text{ mM}$ $< \text{LOD} [i]$

サンプル2 $37.8 \pm 1.2 \text{ mM}$ 1.7 ± 0.2

サンプル3 $0.28 \pm 0.05 \text{ mM}$ $< \text{LOD} [i]$

サンプル4 $0.21 \pm 0.03 \text{ mM}$ $< \text{LOD} [i]$

[i] グリオキシル酸の検出限界（LOD）は約 $1 - 2 \times 10^{-3} \text{ mM}$ の範囲である。

【0073】

2% w/w グリオキサール溶液が約 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。

20

【0074】

C) 結論

1) 溶液中のグリオキサー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ール溶液の実際の pH である pH 4 ~ 4.5 付近で平衡に達する。2% グリオキサー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（市販のグリオキサールを含有する）よりもはるかに低い。これは2% グリオキサール溶液（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。

30

【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。

【図 1】

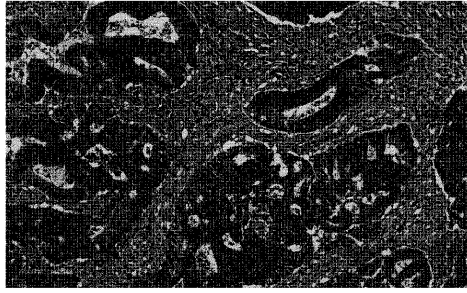


Fig. 1

【図 3】

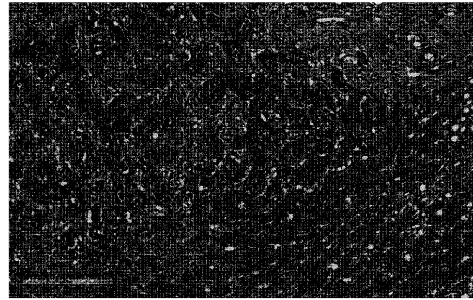


Fig. 3

【図 2】



Fig. 2

【図 4】

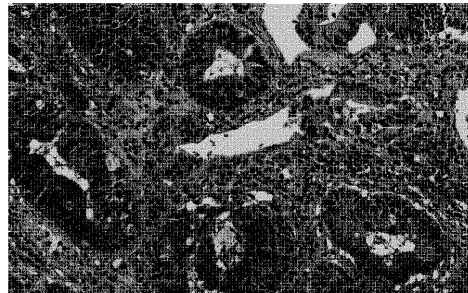
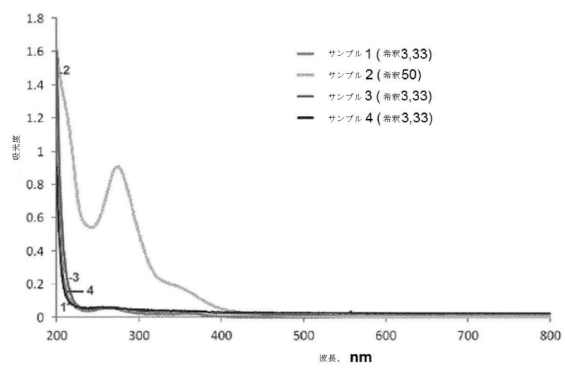


Fig. 4

【図 5】



フロントページの続き

(56)参考文献 特表平07-507266(JP,A)

米国特許出願公開第2015/0226650(US,A1)

R.W.DAPSON、外2名, Glyoxal Fixation and Its Relationship to Immunohistochemistry, Journal of Histotechnology, 2016年10月27日, Vol.29, No.2, Page.65-76

PS THOMAS, Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose, PNAS, 1980年09月01日, Vol.77, No.9, Page.5201-5205

C TOHYAMA、外4名, Induction of metallothionein and its localization in the nucleus of rat hepatocytes, Hepatology, 1993年11月, Page.1193-1201

FJ DUTKO、外1名, Genomic and Biological Variation among Commonly Used Lymphocytic Choriomeningitis, Journal of General Virology, 1983年08月01日, Vol.64, No.8, Page.1689-1698

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

G01N 1/36

C12M 1/00