

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6143765号
(P6143765)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int.Cl.	F I
D 2 1 H 17/24 (2006.01)	D 2 1 H 17/24
D 2 1 H 13/40 (2006.01)	D 2 1 H 13/40
G O 1 N 1/28 (2006.01)	G O 1 N 1/28 J

請求項の数 10 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2014-538753 (P2014-538753)	(73) 特許権者	597064713
(86) (22) 出願日	平成24年10月29日(2012.10.29)		ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス
(65) 公表番号	特表2014-535011 (P2014-535011A)		・アクチボラダ
(43) 公表日	平成26年12月25日(2014.12.25)		スウェーデン国エスエー 7 5 1 8 4
(86) 国際出願番号	PCT/SE2012/051168		ウプサラ ビヨルクガタン 30
(87) 国際公開番号	W02013/066249	(74) 代理人	100137545
(87) 国際公開日	平成25年5月10日(2013.5.10)		弁理士 荒川 聡志
審査請求日	平成27年10月16日(2015.10.16)	(74) 代理人	100105588
(31) 優先権主張番号	1118731.7		弁理士 小倉 博
(32) 優先日	平成23年10月31日(2011.10.31)	(74) 代理人	100129779
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 黒川 俊久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 試料保存方法及び試料保存基材

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

40 ~ 800 g / m²の表面重量を有し、セルロース繊維又はガラス繊維を含有し、さらに4 ~ 30重量%、例えば10 ~ 25重量%の親水性分枝状炭水化物ポリマーを含有する、生体試料の保存用の紙であって、炭水化物ポリマーが前記繊維に共有結合又は架橋している、紙。

【請求項 2】

分枝状炭水化物ポリマーがF i c o l lなどのショ糖とエピクロロヒドリンのポリマーである、請求項1記載の紙。

【請求項 3】

前記紙の水抽出可能物の含量が0 ~ 25重量%、例えば0.1 ~ 5重量%又は3 ~ 20重量%である、請求項1又は請求項2記載の紙。

【請求項 4】

さらに、負荷電基又は正荷電基、例えばカルボキシレート基又はアミン基を5 ~ 300 μmol / g含有する、請求項1乃至請求項3のいずれか1項記載の紙。

【請求項 5】

1つ以上の生体試料を保存する方法であって、

- a) 生体試料を用意する工程と、
- b) 請求項1乃至請求項4のいずれか1項記載の紙に生体試料を適用する工程と、
- c) 生体試料を含有する紙を乾燥する工程と

10

20

を含む方法。

【請求項 6】

乾燥した、生体試料を含有する紙を 1 週間以上保存する工程 d) を含んでいて、任意には工程 d) における保存温度が 0 以上、例えば 0 ~ 40 又は 20 ~ 40 である、請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

さらに、保存後の紙から 1 種以上のタンパク質、例えば保存の影響を受けやすいタンパク質を抽出し、タンパク質を分析する工程 e) を含んでいて、任意には工程 e) における生物活性状態の前記タンパク質の回収率が 60 % 以上、例えば 80 % 以上である、請求項 5 又は請求項 6 記載の方法。

10

【請求項 8】

生体試料の保存用の紙の製造方法であって、

- a) 40 ~ 800 g / m² の表面重量を有し、セルロース繊維又はガラス繊維を含有するベース紙を用意する工程と、
 - b) ベース紙に、2 ~ 60 重量 % の水溶性分枝状炭水化物ポリマーを含有する溶液を含浸する工程と、
 - c) 含浸した紙を乾燥する工程と
- を含んでおり、繊維又はベース紙が化学的に活性化されており、この繊維又はベース紙を分枝状炭水化物ポリマーと反応させる工程を含む、方法。

20

【請求項 9】

前記溶液が分枝状炭水化物ポリマーを 2 ~ 60 重量 %、例えば 2 ~ 15 重量 % 含有し、及び / 又は分枝状炭水化物ポリマー溶液の粘度が 20 で 1 ~ 20 mPa · s、例えば 1 ~ 10 mPa · s である、請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】

活性繊維又はベース紙がエポキシ基を含有する、請求項 8 又は請求項 9 記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料保存方法、特に紙基材上への試料保存方法に関する。本発明はまた、試料保存用の紙基材及びこのような基材の製造方法に関する。

30

【背景技術】

【0002】

生体物質の分析及び / 又は保存において紙基材の使用が増加している。1 つの使用分野は、薬物動態研究、例えば創薬プログラムで大量の血液試料を迅速に分析する必要性が増加していることに関係するものである。このような使用には、紙が、十分な機械的特性と保存後に分析及び / 又はさらに処理することができるように対象となる生体物質を保持する能力とを兼ね備えることが明らかに望ましい。このような紙の例には、F T A 及び F T A E l u t e (G E H e a l t h c a r e 社の一部である W h a t m a n 社製) として知られているものがあり、例えば米国特許第 5 7 5 6 1 2 6 号及び第 5 9 3 9 2 5 9 号に記載されている。これらの紙は、化学物質を含浸して細胞を溶解したり、核酸を保存したり、核酸のさらなる処理を容易にしたりしている。

40

【0003】

しかしながら、これらの紙は核酸分析用に特別に設計されている。タンパク質を分析する試料の処理にも紙基材を用いることに強い関心がもたれている。タンパク質は、乾燥及び保存時に変性し、結果的に生物活性が低下しやすい点で核酸とは異なる。分析するタンパク質、例えば血液中のバイオマーカー又は薬物は、しばしば非常に少量で存在し、添加剤によりマスクされやすい。特に、質量分析、イムノアッセイなどの分析技術は化学添加剤によって影響を受けるおそれがある。903 又は 31 E T F 紙 (G E H e a l t h c a r e 社の一部である W h a t m a n 社製) などのプレーンの未処理セルロース紙を血液

50

試料の保存に用いて、その後タンパク質分析を行うが、これらは、例えば敏感なタンパク質の所望の添加回収率及び生物活性を必ずしも与えない。タンパク質を安定化させる方法として、ポリビニルアルコール、F i c o l l、糖類などの様々なフィラーを添加することが、例えば米国特許出願公開第2010/0209957号及びWO2003/020924に言及されている。しかし、これらの組成物も、敏感なタンパク質の回収率と活性において限界がある。

【0004】

分析用途での安定化に加えて、治療及び診断環境、例えば医薬品製剤又は診断試薬の乾燥状態での保存においてもタンパク質及び他の敏感な生体分子の安定化が必要とされている。

10

【0005】

したがって、優れた試料保存方法及び優れた性能をもつ試料保存基材が必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許第3070486号

【発明の概要】

【0007】

本発明の1態様は、液体生体試料などの試料を受け入れ、乾燥及び保存後の生物活性タンパク質の回収率を向上できる試料適用基材を提供することである。これは請求項1に記載した紙により実現される。

20

【0008】

1つの利点は、敏感なタンパク質の回収率を向上できることである。さらなる利点は、均一な円形試料スポットを得ること、かつ液体試料が基材に良好に吸収されることである。

【0009】

本発明の他の態様は、試料を受け入れ、乾燥及び保存後の生物活性タンパク質の回収率を向上できる試料回収装置を提供することである。これは請求項12に記載した試料回収装置により実現される。

30

【0010】

本発明の第3の態様は、乾燥及び保存後の生物活性タンパク質の回収率を向上する、試料適用基材への試料の適用方法を提供することである。これは請求項14に記載した方法により実現される。

【0011】

本発明の第4の態様は、試料を受け入れ、乾燥及び保存後の生物活性タンパク質の回収率を向上できる紙基材の製造方法を提供することである。これは請求項21及び22に記載した方法により実現される。

【0012】

従属請求項に、本発明のさらなる適当な実施形態を記載する。

40

【0013】

定義

ここで用いる用語「紙」は繊維ウェブ又はシート材料を意味する。紙は繊維、例えばセルロース又はガラス繊維及び所望により他の成分、例えば粒状フィラー、湿潤紙力又は乾燥紙力増強剤、保持剤などを含有する。

【0014】

ここで用いる用語「炭水化物ポリマー」は、炭水化物部分（糖類部分ともいう）を含む主鎖を有するポリマーを意味する。炭水化物ポリマーは、多糖類（即ち、結合した炭水化物／糖類部分からなる主鎖をもつポリマー）、修飾多糖類（即ち、置換基又はグラフトされた側鎖を有する多糖類）又は炭水化物部分が合成結合単位により互いに結合されている

50

合成炭水化物ポリマーとすることができる。本発明の文脈では親水性炭水化物ポリマーは水溶性又は膨潤性のどちらかであり、後者の場合、ポリマーを架橋したり、1つ又は2つ以上の表面に結合したりすることにより水への溶解を防止することができる。

【0015】

ここで用いる用語「被分析物」は、検出、定量化、分析、同定及び/又は評価を受ける物質又は検出、定量化、分析、同定及び/又は評価を受ける予定である物質を意味する。

【0016】

ここで用いる用語「汚染物質」は、1つ又は2つ以上の被分析物の検出、定量化、分析、同定又は評価を妨害する可能性がある物質を意味する。被分析物は、別の被分析物の検出、定量化、分析、同定又は評価を妨害する可能性があるならば、汚染物質にもなりえる。

10

【0017】

ここで用いる用語「試料」は、流体、液体、半固体又は固体材料の一部を意味する。

【0018】

ここで用いる用語「リガンド」は、化学種であって、他の化学種と結合したり、他の化学種を引きつけたりできるものを意味する。リガンドが固体表面に結合している場合、溶解した物質が、各物質に対するリガンドの選択性に依拠して、表面に結合するか、表面に保持される。

【発明を実施するための形態】

【0019】

20

1態様では、本発明は、生体試料の保存用試料適用基材として有効な紙を開示する。紙は、 $40 \sim 800 \text{ g/m}^2$ の表面重量をもち、セルロース繊維及び/又はガラス繊維を含有し、さらに4～30重量%の親水性又は水溶性分枝状炭水化物ポリマーを含有する。表面重量は、紙の所定領域(例えば、 $10.0 \times 10.0 \text{ cm}$)の風乾シートを計量し、シート領域(m^2)をその重量(g)で除することにより求める。分枝状炭水化物ポリマーの枝分れ度は、例えば $0.05 \sim 1$ 、具体的に $0.10 \sim 1$ 、 $0.20 \sim 1$ 又は $0.30 \sim 1$ とすることができる。枝分れ度(DB)は $DB = nD / (nD + L)$ と定義され、式中Dはポリマー分子中の分枝点モノマー単位の数であり、nは各分枝点から伸びている枝の平均数であり、Lはポリマー分子中の直鎖状(非分枝状)モノマー単位の数である。枝分れ度は、当業界で既知の方法、例えばNMR分光法、劣化解析及び光散乱又は粘度検出器を用いたゲル濾過法(K Granath: J Coll Sci 13, 308 1958; J Smit et al: Macromolecules 25, 3585 1992)によって求めることができる。分枝状炭水化物ポリマーには、デキストラン、Ficoll、キシランなどの分枝状ヘミセルロースがある。紙に炭水化物ポリマーを含有させる利点は、タンパク質に対する保護効果をおそらく変性を防止することにより与えることである。分枝状炭水化物ポリマーは、特に良好な保護効果を有し、また、低粘度であるため適用しやすい。紙に含有するポリマーを4%以上にすると利点は、このレベル以上で良好な保護が得られることである。紙に含有するポリマーを30%以下にする利点は、このレベル以下で血液などの液体生体試料の適用により紙に形成したスポットが円形で均一になることである。ポリマー含量が高すぎると、スポット形状が不規則になり、その後の紙からのサンプリングに支障をきたす。紙への試料の吸収もポリマー含量が30%を超えない場合良好である。ポリマー含量が高すぎると、血液スポットが完全に紙に吸収されず、乾燥血液のフィルムが紙表面に形成する。これは、乾燥血液の一部が保存ポリマーと接触せず、乾燥血液の破片を失う危険もあるため定量的なサンプリングが可能でないことを意味する。紙中の分枝状炭水化物ポリマーの量が10～25重量、例えば12～25重量%の場合、保護効果及びスポット形状/均一性/吸収性の組合せが特に良好となる。分枝状炭水化物ポリマーは、それがアミロース、セルロースなどの直鎖状炭水化物ポリマーより簡単に水に溶解するという溶解性の観点からも有利である。分枝状炭水化物ポリマーはまた、ポリビニルアルコールなどの合成非炭水化物ヒドロキシポリマーより簡単に溶解する。溶解しやすいことは、紙からのタンパク質抽出時に明らかに有利とな

30

40

50

る。

【0020】

ある実施形態では、親水性又は水溶性分枝状炭水化物ポリマーの平均分子量は、15～800kDa、例えば20～500kDaである。具体的には、ポリマーの平均分子量は、70～400kDa、例えば約70kDa又は約400kDaである。分子量は低すぎない場合に保護効果が高いが、非常に高い分子量では、紙の含浸時及び紙からのタンパク質の抽出時の両方で粘度が問題となるおそれがある。

【0021】

ある実施形態では、分枝状炭水化物ポリマーはデキストランを含む。デキストランは、分枝状 1 6 結合グルカンであり、最も一般的な種類であり、*Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512 (F) バクテリアによってショ糖溶液から産生され、骨格グルコース単位の3つの位置に側鎖が結合しており、分枝点を形成するグルコース単位を約5%含む。これは、上記で定義されたように枝分れ度0.05を与える。10重量%のデキストラン水溶液は、ニュートン流動性をもち、粘度が約2mPa・s (Mw 10kDa)、4mPa・s (40kDa) 及び10mPa・s (70kDa) である。B-512 (F) デキストランは、例えば *Pharmacosmos A/S* (デンマーク) 又は *TdB Consultancy AB* (スウェーデン) から市販されている。デキストラン誘導体、例えば硫酸デキストラン、カルボキシメチル (CM) デキストラン又はジエチルアミノエチル (DEAE) デキストランを用いることも可能である。このような誘導体は、例えば *TdB Consultancy AB* から入手できる。別の実施形態では、分枝状炭水化物ポリマーはデキストランを含まない。

【0022】

実施形態によっては、分枝状炭水化物ポリマーが単又は二糖類と二官能性エポキシド試薬との共重合体を含む。このようなポリマーは、単/二糖類それぞれの数多くの反応性ヒドロキシル基のために高度分枝状になる。用いる反応条件に依存して、枝分れ度は約0.2～約1となることができる。これらのポリマーの具体例は、ショ糖とエピクロロヒドリンのポリマーであり、例えば米国特許第3300474号の方法にしたがって形成される。市販のショ糖とエピクロロヒドリンのポリマーは、*Ficoll* (登録商標) であり、ポリスクロース (CAS No. 25702-74-3) ともいう。これは、平均分子量の70～400kDaのものが *GE Healthcare* 社 (スウェーデン) から入手できる。10重量%の *Ficoll* 水溶液は、ニュートン流動性をもち、粘度が約3mPa・s (70kDa) 及び約5mPa・s (400kDa) である。おそらくポリマー分子の高度分枝状構造のために粘度が低い。CM *Ficoll*、DEAE *Ficoll* などの *Ficoll* の荷電種は、例えば *TdB Consultancy AB* (スウェーデン) から入手することができる。

【0023】

ある実施形態では、10重量%の分枝状炭水化物ポリマー水溶液の粘度は20 で1～10mPa・s、例えば1～5mPa・sである。低い粘度は、いくつかの観点で有利である。低い粘度は、ベース紙の含浸を容易にし、紙中のポリマーの分布を確実に均一にする。低い粘度はまた、抽出や抽出溶液のさらなる取り扱いも容易にする。低い粘度は、試料が紙により簡単に吸収される点や紙がべとつかない点でも有益である。

【0024】

実施形態によっては、上記紙中の水抽出可能物含量は0～25重量%、例えば0.1～5重量%又は3～20重量%である。水抽出可能物の量は以下のように決定する。まず、紙片を水 (水/紙の体積比20/1以上) に浸漬し、室温で2時間おだやかに攪拌する。その後、紙を、例えばガラスフィルター上に集め、乾燥し、計量する。水抽出可能物は重量減少%として計算する。約1%未満の水抽出可能物量は、抽出可能物の存在しないガラス繊維フィルターで濾過した水抽出物を、例えば全有機炭素分析することにより求めることができる。炭水化物ポリマー又は他の抽出可能物の存在に敏感な分析方法をタンパク質の分析に用いる場合、水抽出可能物の量が少ないと有利になることがある。治療用途でも

10

20

30

40

50

、抽出可能物の量が少ないことが望ましい。炭水化物ポリマーを紙繊維に共有結合及び／又はそれ自体架橋する場合、抽出可能物を非常に少量にできる。

【 0 0 2 5 】

ある実施形態では、上記紙は、 $5 \sim 300 \mu\text{mol/g}$ 、例えば $5 \sim 50$ 、 $5 \sim 100$ 又は $50 \sim 300 \mu\text{mol/g}$ の負荷電基又は正荷電基を含有する。負荷電基は、例えばカルボキシレート、スルホネート又は硫酸基とすることができ、一方、正荷電基は、例えばアミン又は4級アンモニウム基とすることができる。これらの基の存在が分枝状炭水化物ポリマーの保護効果を向上するようである。負荷電基又は正荷電基は、炭水化物ポリマーに共有結合することができたり、ベース紙のセルロース又はガラス繊維に共有結合できたりする。負荷電基が、繊維或いは繊維に架橋又は共有結合する炭水化物ポリマーに結合する場合、荷電基は水抽出可能ではない。これは、質量分析が分析法として用いられる場合や治療環境でも有利となることができる。負荷電基又は正荷電基の量は、例えば周知の滴定法により求めることができる。さらに、非荷電硫黄又は窒素を含有する種が存在しないという条件を満たせば、スルホネート、硫酸、アミン及び4級アンモニウム基は元素分析によって測定することができる。

10

【 0 0 2 6 】

実施形態によっては、紙は少なくとも1つの乾燥生体試料、例えば乾燥血液試料を含有する。血液及び他の生体物質、例えば血清、血漿、尿、脳脊髄液、骨髓、生検材料を紙に適用し、保存やその後の分析又は他の用途のために乾燥することができる。乾燥した生体試料は、1つ以上のタンパク質又は別の敏感な生体分子を含有する医薬品製剤又は診断試薬にすることもできる。

20

【 0 0 2 7 】

1 態様では、本発明は、上記の紙を含有する試料回収装置を開示する。試料回収装置は、紙カードとすることができ、印刷するか別の方法でカードに示した1つ又は2つ以上の試料適用領域を有する。指示薬色素をこれらの領域に存在させて非着色試料が適用されたかどうかを示してもよい。装置は、例えばラックでの自動化管理を容易にするカードホルダーを含んでもよいし、試料回収を容易にする様々な形態のサンプリング機能を含むこともできる。

【 0 0 2 8 】

1 態様では、本発明は、以下の工程を含む1つ以上の生体試料の保存方法を開示する。

30

工程 a) 生体試料を用意する。

工程 b) 前述の紙に生体試料を適用する。

工程 c) 生体試料を含有する紙を乾燥する。

生体試料は、生体液、例えば血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液、骨髓とすることができるが、試料はまた、固体又は半固体、例えば組織生検物などでもよい。生体試料は、1つ以上のタンパク質又は別の敏感な生体分子を含有する医薬品製剤又は診断試薬にすることもできる。

流体試料を適用する利点は、流体試料が紙構造によって吸収され、保護分枝状炭水化物ポリマーと直接接触した状態になることである。乾燥は、受動的に行うことができ、即ち試料／製剤／試薬を含有する紙を単純に乾燥するまでそのままにしておく場合であり、或いは能動的に行うことができ、即ち適度に高い温度、赤外線及び／又は空気又はその他の気体の流れにさらす場合である。乾燥は $15 \sim 35$ 、例えば $15 \sim 25$ の温度で行うのが有利である。乾燥後、紙又は試料を含有する試料適用領域の残留水分含量は約 20 重量 % 未満、例えば約 10 重量 % 未満とすることができる。

40

【 0 0 2 9 】

実施形態によっては、本方法は、生体試料を含有する紙を乾燥後、1週間以上、例えば1ヶ月間以上又は1年間以上保存する工程 d) を含む。工程 d) の保存温度は、0 以上、例えば $0 \sim 40$ 又は $20 \sim 40$ とすることができる。敏感なタンパク質の構造及び生物活性を冷凍の必要性或いは冷蔵さえなしで長期間維持できることは本発明の方法の利点である。試料を含有する紙は、 $0 \sim 70\%$ 、例えば $0 \sim 50\%$ 又は $0 \sim 20\%$ の相対湿

50

度で保存するのが有利である。相対湿度は、例えば試料を含有する紙を密閉プラスチックバッグなどの密閉容器に乾燥剤とともに保存することによって制御することができる。

【0030】

ある実施形態では、本方法は、1つ以上のタンパク質を保存後の上記紙から抽出し、タンパク質を分析する工程e)を含む。抽出は、例えば乾燥試料を含有する紙から小さな部分をパンチで打ち抜き、これらをバッファなどの水性液体に、例えば1時間～48時間浸漬することにより行うことができる。浸漬は攪拌下で行い、温度は、例えば0～30とすることができる。浸漬時間が1～2時間を超える場合、溶液中の敏感なタンパク質の分解をできるだけ少なくするのに浸漬温度を0～8とすれば有利である。

【0031】

ある実施形態では、本発明は、保存した上記紙から抽出し、抽出物を医薬として用いる工程e')を含む。この場合、紙に保存される生体試料は医薬品製剤が適当であり、医薬品製剤の紙への適用、乾燥、保存及び抽出は無菌状態で行うことができる。

【0032】

実施形態によっては、タンパク質は、保存の影響を受けやすいタンパク質であって、ブレーン紙で37～1週間乾燥剤とともに保存した生物活性状態のタンパク質の回収率が60%未満又は約40%未満のタンパク質と定義されるものである。この値は、紙の乾燥血液スポット(DBS)に存在するタンパク質で求めることが好ましい。保存の影響を受けやすいタンパク質の1例はC反応性タンパク質(CRP)であるが、アポリポタンパク質A-1、IgEなどのタンパク質もDBSでの保存の影響を受けやすいと報告されている(T. Mc Dade et al.: Demography 44, 899-2007)。

【0033】

ある実施形態では、本方法の工程e)で、生物活性状態のタンパク質の回収率が60%以上、70%以上、80%以上、90%以上又は95%である。

【0034】

ある実施形態では、タンパク質は、イムノアッセイ、質量分析法又は酵素活性アッセイにより工程e)で分析する。イムノアッセイ、例えばELISAを通常用いて特定のタンパク質の濃度を決定する。それらは、タンパク質の抗体結合特性に頼っているので、タンパク質が生物活性(即ち、変性なし)であることが必須であり、特に立体構造エпитープに対する抗体でのアッセイを用いる場合はそうである。酵素は一般に変性に敏感であり、変性した酵素はアッセイで活性を示さないか非常に低い活性を示す。質量分析法(MS)が別の通常のタンパク質分析法であり、これには、質量分析器に適用する試料が紙からの浸出可能物、例えば洗浄剤を含有しないことが要求される。使用する分枝状多糖類ポリマーは、MS分析のための従来の精製分離作業、例えば逆相クロマトグラフィーによって試料から容易に除去することができるため、妨害とならない。

【0035】

1態様では、本発明は、生体試料の保存用の紙の製造方法を開示する。本方法は以下の工程を含む。

工程a) 水性懸濁液状又はベース紙の形態のどちらかのセルロース繊維又はガラス繊維を用意する。

工程b) 懸濁液状又はベース紙としてのどちらかの繊維を、水溶性分枝状炭水化物ポリマーを2～60重量%含有する溶液と接触させる。

工程c) 繊維が水性懸濁液状の場合、繊維から紙シートを形成する。

工程d) 紙を乾燥する。

【0036】

繊維懸濁液とポリマー溶液との接触は、単に懸濁液とポリマー溶液を攪拌するか、懸濁液にポリマーを溶解することにより行うことができる。ベース紙とポリマー溶液との接触は、以下に示す含浸工程のように行うことができる。ポリマーが共有結合する場合、溶液のポリマー濃度は、例えば20～60重量%とすることができ、一方、共有結合しない条

10

20

30

40

50

件下、ベース紙に分枝状炭水化物ポリマーを含浸する場合、濃度は、例えば2～15重量%又は4～10重量%とすることができる。紙シートの形成は、手抄きシート形成か、モールド、フォードリニア機などの抄紙機での形成のどちらかにより当業界で周知の方法にしたがって行うことができる。乾燥は、受動的に行うことができ、即ち試料を含有する紙を単純に乾燥するまでそのままにしておく場合であり、或いは能動的に行うことができ、即ち高い温度、赤外線及び/又は空気又はその他の気体の流れにさらす場合である。乾燥は20～100、例えば20～60の温度で行うのが有利である。乾燥後、紙の残留水分含量は約20重量%未満、例えば約10重量%未満とすることができる。製造状況では、乾燥は、例えば浸漬コーター又は抄紙機の形成ユニット後に設けたオンラインの乾燥機中で行うのが適当である。

10

【0037】

1態様では、本発明は、生体試料の保存用の紙を製造する方法を開示する。本方法は以下の工程を含む。

工程a) 40～800 g/m²の表面重量を有し、セルロース繊維又はガラス繊維を含有するベース紙を用意する。

工程b) ベース紙に15～800 kDaの平均分子量をもつ水溶性分枝状炭水化物ポリマーを2～60重量%含有する溶液を含浸する。

工程c) 含浸した紙を乾燥する。

【0038】

含浸は、ベース紙シートを溶液に浸漬することにより行われるか、浸漬コーターなどの当業界で既知の種々の含浸装置を用いてロール・ツー・ロールプロセスで行われる。ポリマーが共有結合する場合、溶液のポリマー濃度は、例えば20～60重量%とすることができる。一方、共有結合しない条件下、分枝状炭水化物ポリマーを含浸する場合、濃度は、例えば2～15重量%又は4～10重量%とするのが適当である。乾燥は、受動的に行うことができ、即ち試料を含有する紙を単純に乾燥するまでそのままにしておく場合であり、或いは能動的に行うことができ、即ち高い温度、赤外線及び/又は空気又はその他の気体の流れにさらす場合である。乾燥は20～100、例えば20～60の温度で行うのが有利である。乾燥後、紙の残留水分含量は約20重量%未満、例えば約10重量%未満とすることができる。製造環境では、乾燥は、浸漬コーター後に設けたオンラインの乾燥機中で行うのが適当である。

20

30

【0039】

実施形態によっては、分枝状炭水化物ポリマーは、上述のようにデキストラン又は単又は二糖類と二官能性エポキシド試薬との共重合体を含む。分枝状炭水化物ポリマーは、具体的にはFicollなどのショ糖とエピクロロヒドリンのポリマーとすることができる。分枝状炭水化物ポリマーの平均分子量は、20～500 kDa又は70～400 kDa、例えば20 kDa、70 kDa又は400 kDaとすることができる。

【0040】

ある実施形態では、分枝状炭水化物ポリマー溶液の粘度は、20で1～20 mPa・s、例えば1～10 mPa・sである。上述のように低粘度溶液は、含浸を容易にし、さらに機能上の利点ももたらす。

40

【0041】

実施形態によっては、ベース紙は5～300 µmol/gのカルボキシレート基などの負荷電基を含有する。負荷電基は、多糖類ベースのカチオン交換体を生成する既知の方法にしたがって、例えば酸化プロセスにより、或いはクロロ酢酸、ブromo酢酸、ビニルスルホン酸ナトリウムなどの荷電種の共有結合により紙に導入することができる。

【0042】

実施形態によっては、繊維又はベース紙は化学的に活性化され、本方法は、その繊維又はベース紙を分枝状炭水化物ポリマーと反応させる工程を含む。活性繊維/ベース紙を用いる利点は、炭水化物ポリマーの共有結合が実現できることである。これは、分析法への抽出ポリマーの妨害を回避することができるという利点をもつ。共有結合ポリマーを含有

50

するとタンパク質の保存にも有益となることができる。活性化はいくつかの異なる方法、例えばエピハロヒドリン（例えば、エピクロロヒドリン）又はジエポキシドとの反応により行うことができ、この場合、活性繊維又は活性紙が反応性エポキシ基を含有する。また、繊維／紙は、トシル化、トレシル化又はメシル化により活性化して対応する反応性脱離基を形成したり、ジビニルスルホンを用いて、或いはアリル化とそれに続くアリル基の臭素化又はアリル基への直接結合により活性化したりすることができる。活性基は、分枝状炭水化物ポリマーのヒドロキシル基に対して反応性であれば有利であるが、活性基が、分枝状炭水化物ポリマーに導入される特定の官能基に反応性であってもよい。官能基としては、例えばアミン又はアミノオキシ基（例えば、アルデヒドに対して反応性）又はカルボキシル基（カルボジイミドに対して反応性）がある。ガラス繊維は、エポキシシランなどのシランとの反応により活性化することができる。炭水化物ポリマーと活性繊維／紙の反応は、懸濁液中で直接起こり、所望により加熱及び／又はpHを調節して反応を加速することができる。反応は、紙の乾燥時又は乾燥後、例えば高い温度で起こることもある。

【0043】

実施形態によっては、本方法は繊維又はベース紙を反応工程後に洗浄する工程も含む。この工程は、未反応ポリマーを系から取り除き、ポリマーが浸出して分析法を妨害することがないようにするさらなる方法である。洗浄工程は上記の反応後に行うのが適当である。

【実施例】

【0044】

材料

31ETFベース紙（GE Healthcare社の一部であるWhatman社製）

903ベース紙（GE Healthcare社の一部であるWhatman社製）
デキストランT3.5（3.5kDa）、デキストラン20（20kDa）、デキストラン70（70kDa）、デキストラン110（110kDa）（GE Healthcare社製）

Ficoll PM20（20kDa）、Ficoll PM70（70kDa）、Ficoll PM400（400kDa）（GE Healthcare社製）
DEAE Ficoll PM70（70kDa）、CM Ficoll PM70（70kDa）（TdB Consultancy AB製）

実施例1 - Ficoll及びデキストラン溶液への浸漬

ストリップを選択した紙から切り、風乾重量を記録し、紙ストリップを2つずつ90mmのプラスチック製ペトリ皿に置いた。Ficoll又はデキストランの所望の水溶液（25mL）を添加し、ペトリ皿を振盪機に置き、100rpmで1時間45分攪拌した。プロトタイプをペトリ皿から取り出し、Whatman903 Dry Rakに水平に置き、室温で終夜乾燥させた。重さを記録し、増加量を計算した。最後に、プロトタイプにプラスチックラベルを付け、それをその後のDBS分析のために90mmのペトリ皿に保存した。

【0045】

【表 1】

表 1 調製したプロトタイプ (二重) の重量増加

化合物	溶液中の濃度 (wt %)	紙の重量増加 (wt %)
Ficoll PM400	10	25
Ficoll PM400	7	15
Ficoll PM400	5	12
Ficoll PM400	2	4
Ficoll PM70	10	26
Ficoll PM70	7	16
Ficoll PM70	5	11
Ficoll PM70	2	3
Ficoll PM70	1	1
デキストラン 110	10	27
デキストラン 110	7	17
デキストラン 110	5	12
デキストラン 110	2	4
デキストラン 110	1	1
デキストラン 20	10	26
デキストラン 20	7	18
デキストラン 20	5	12
デキストラン 20	2	4
デキストラン 20	1	2
デキストラン T3.5	10	26
デキストラン T3.5	7	18
デキストラン T3.5	5	12
デキストラン T3.5	2	4
デキストラン T3.5	1	2

全てのプロトタイプの重量増加は非常に類似しており、例えば 10 重量 % 溶液を用いた場合、重量増加は、用いたポリマーにかかわらず 25 ~ 27 % である。

【 0 0 4 6 】

実施例 2 - F i c o l l 及びデキストランの共有結合

F i c o l l P M 7 0 のエピクロロヒドリン (E C H) 結合

典型的な実験では、紙ストリップを 31 E t f 紙から切り取り、それを実験前に少なくとも終夜 60 の温度に置き、乾燥させた。プラスチック網を切って 150 m L のガラス反応器の内部を覆い、紙ストリップをその間に挟んだ。反応器に 103 . 2 m L の水、10 . 6 m L の 50 % N a O H 及び 16 . 1 m L の E C H を添加し、溶液を 120 分間 30 で攪拌した。反応混合物をデカンテーションし、130 m L の水を添加し、攪拌を 20 分間継続した。これを 2 回繰り返した。

【 0 0 4 7 】

100 m L の所望の濃度の F i c o l l P M 7 0 溶液を反応器に添加し、溶液を 15 分間攪拌した後、2 . 916 m L の 50 % N a O H を添加した。反応混合物を 30 で終夜攪拌した。20 時間後、反応混合物をデカンテーションし、130 m L の水を添加し、攪拌を 20 分間継続した。紙プロトタイプを反応器から取り出し、600 m L のガラスビーカーに入れ、300 m L の水を紙プロトタイプを完全に覆うように添加した。ビーカーを振盪機により約 80 r p m で 20 分間ゆっくり攪拌し、その後、水をデカンテーションし、新しい水を添加した。これを 3 回繰り返した。紙プロトタイプが確実に平らになるようにプラスチック網上に置き、紙プロトタイプを終夜ドラフト内で乾燥させた。紙プロト

タイプをその後の分析までジップロックバッグに保存した。

【 0 0 4 8 】

再パルプ化繊維への F i c o l l P M 7 0 の E C H 結合

典型的な実験では、約 1 5 g の 3 1 E T F 紙を、小片に裂き、約 5 0 0 m l の水とともにブレンダーに投入し、約 3 分間激しく混合してパルプにした。パルプスラッシュをガラス濾過器 (P 2) に注ぎ、水をほとんど除去した。重量 (約 8 0 g) を記録し、若干湿気を含んだパルプを 5 0 0 m l の丸底フラスコ (R B F) に移した。R B F に 1 4 2 m l の水及び 2 5 m l の 5 0 % N a O H を添加し、混合物を縦型攪拌機を用いて 1 5 分間攪拌した。攪拌しながら 3 0 m l の E C H を添加し、水浴を 3 0 ° にセットした。その後、混合物をさらに 2 時間攪拌した。

10

【 0 0 4 9 】

パルプをガラス濾過器に移し、それを水で 5 回洗浄することにより反応を終了させた。各洗浄後にパルプを攪拌し、ガラス濾過器から水がしたたり始めたときに吸引を始めた。その後、水を切ったパルプを新しい 5 0 0 m l の R B F に移し、2 5 m l の F i c o l l P M 7 0 溶液を仕込んだ。混合物を約 2 0 分間攪拌した後、8 . 7 5 m l の 5 0 % N a O H を添加した。3 0 ° で攪拌を終夜継続した。

【 0 0 5 0 】

約 2 0 時間後、反応を終了させ、繊維プロトタイプをガラスフィルター上で水で 5 回洗浄した。特に高濃度繊維の場合、これはかなり冗長な操作となることがわかった。最後の洗浄工程で、まだかなり湿っている繊維をジップロックバッグに移し、手抄きシート紙製造に用いた。無修飾 3 1 E t f 繊維も形成し、手抄きシート製造に用いた。

20

F i c o l l P M 2 0 の浸漬及び E C H 結合及びデキストラン 7 0 の浸漬

上記のような実験を結合 F i c o l l P M 2 0 プロトタイプのためにいくつか変更して行った。

【 0 0 5 1 】

より小型のガラス反応器 (1 0 0 m l) を用い、反応体積を減少させ、2 3 . 8 3 m l の活性化水、2 . 4 5 m l の 5 0 % N a O H 及び 3 . 7 2 m l の E C H を用いた。結合は、3 0 m l の F i c o l l P M 2 0 溶液及び 7 4 4 . 8 µ l の 5 0 % N a O H を用いて行った。

【 0 0 5 2 】

結合した D E A E - F i c o l l P M 7 0 プロトタイプを元素分析 (% N) に送った (表 2) 。 T d B C o n s u l t a n c y 社が出した分析証明書によれば D E A E - F i c o l l P M 7 0 の窒素含量は 3 . 6 % であり、したがって、紙の N 含量 0 . 0 8 6 % は 2 . 4 重量 % の D E A E - F i c o l l P M 7 0 含量に相当する。

30

【 0 0 5 3 】

【表 2】

表 2 DEAE-Ficoll プロトタイプの元素分析 (%N)

プロトタイプ	紙	リガンド	カップリング液 (wt%)	N% (g/g)
U2612068E	31Etf	DEAE-Ficoll PM70	20	<0.01
U2612068F	31Etf	DEAE-Ficoll PM70	50	0.086

40

実施例 3 - 乾燥血液スポットからの C 反応性タンパク質の回収

血液試料 (4 µ l / スポット) を、浸漬及び共有結合した様々な種類のプロトタイプ及び対照紙にスポットした。乾燥後、スポットをパンチで打ち抜き、前試験 (セクション 2) で用いた条件にしたがって抽出した。C 反応性タンパク質 (C R P) 及びタンパク質の総量はそれぞれ E L I S A 及び A 2 8 0 で求めた。回収率は対照血液試料 (n = 3) の量

50

から計算する。

【 0 0 5 4 】

スポットとDBS試料の保存

4 μ l 血液アリコート異なるプロトタイプ上に3つスポットし、DBSを室温で4時間乾燥し、乾燥剤とともに使用まで密封バッグに保存（ - 2 0 ）した。対照とするために4 μ l 血液アリコートを0.5 ml 管に保存した（ - 2 0 保存）。

【 0 0 5 5 】

DBS抽出

血液スポットを3つパンチプライヤーで打ち抜き、寸法はスポット全部をパンチできるように選択した（直径5 mm）。ディスクを96ウェルプレートに入れ、100 μ l のP
B S - Tで振盪（約400 r p m）しながら、1時間室温、終夜4、1時間室温で抽出した。そのプレートを、インキュベーション時に密封し、試料分析前にプレート遠心分離機により3700 r p mで遠心分離した。

【 0 0 5 6 】

CRP ELISA / A280測定

ヒトCRP ELISAキットを製造業者の取り扱い説明にしたがって使用した。対照血液アリコート（n = 3）を100 μ l のP B S - Tで希釈した。その後、さらに対照及び抽出試料をUVプレート中で最終体積200 μ l になるようにCRP洗浄バッファで1 : 10に希釈した。CRP分析前にタンパク質回収率計算のために280 nmでの吸光度を測定した。CRP ELISAアッセイにおいて、DBS試料を1つの試料として
分析し、血液対照を反復分析した。

【 0 0 5 7 】

A280測定において、スクリーニング試験の第2部ではDBS試料及び血液対照は1つの試料として分析した。この試験の第1部では血液対照を反復分析した。

【 0 0 5 8 】

CRP回収

【 0 0 5 9 】

【数1】

表3 Ficoll改質紙からのDBS抽出物中の平均CRP回収率（三重）

紙	浸漬溶液中の濃度 (wt %)	CRP 回収率 (%)
プレーン 31ETF 紙 (対照)	-	81.2
31ETF + Ficoll PM400	7	102.6
31ETF + Ficoll PM70	7	98.5
31ETF + Ficoll PM70	5	100.5
31ETF + Ficoll PM20	10	104.0
31ETF + Ficoll PM20	7	105.1
31ETF + Ficoll PM20	5	100.2

タンパク質回収

抽出試料の全タンパク質の回収率の尺度として280 nmでの吸光度を用いた。

【 0 0 6 0 】

【数2】

$$\text{回収率 \%} = \left(\frac{\text{試料のA280}}{\text{血液対照のA280 (平均)}} \right) \times 100$$

プロトタイプスクリーニングの第1の部（表3）は、F i c o l l PM400、PM

70及びPM20で浸漬したプロトタイプが含まれた。全ての浸漬プロトタイプは対照紙に比べて回収率が約20%高かった。

【0061】

【表3】

表3 Ficoll改質紙からのDBS抽出物中の平均CRP回収率(三重)

紙	浸漬溶液中の濃度 (wt %)	CRP 回収率 (%)
プレーン 31ETF 紙 (対照)	-	81.2
31ETF + Ficoll PM400	7	102.6
31ETF + Ficoll PM70	7	98.5
31ETF + Ficoll PM70	5	100.5
31ETF + Ficoll PM20	10	104.0
31ETF + Ficoll PM20	7	105.1
31ETF + Ficoll PM20	5	100.2

10

【0062】

【表4】

表4 DBS紙プロトタイプからのDBS抽出物中の平均CRP回収率(三重)

紙	浸漬/カップリング液中の濃度(wt %)	CRP 回収率 (%)
プレーン 31ETF 紙 (対照)	-	73.4
プレーン 903 紙 (対照)	-	70.6
ECH処理した再パルプ化 31ETF の手抄きシート	-	61.1
Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	7	86.8
Ficoll PM70 で浸漬した 903	5	84.2
Ficoll PM70 で浸漬した 903	7	100.1
ECH-結合 Ficoll PM70 処理した再パルプ化 31ETF の手抄きシート	30	81.9
ECH-結合 Ficoll PM70 処理した再パルプ化 31ETF の手抄きシート	50	84.8
CM Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	5	92.1
CM Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	7	93.0
31ETF with ECH-結合 CM Ficoll PM70	50	70.3
DEAE Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	5	107.2
DEAE Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	7	102.4
31ETF with ECH-結合 DEAE Ficoll PM70	50	75.6
デキストラン 70 で浸漬した 31ETF	5	91.0
デキストラン 70 で浸漬した 31ETF	7	90.1
ECH-結合デキストラン 70 処理した 31ETF	30	62.2
ECH-結合デキストラン 70 処理した 31ETF	50	62.6
デキストラン 70/Ficoll PM70 (1:4)で浸漬した 31ETF	7	94.6
デキストラン 70/Ficoll PM70 (4:1)で浸漬した 31ETF	7	95.5

20

30

40

プロトタイプスクリーニングの第2の部(表4)は、Ficollを主とした多様なプロトタイプが含まれた。この試験でも概して浸漬プロトタイプは、結合プロトタイプに比べて明らかに回収率が高かった。紙繊維への結合が行われた場合も高いCRP回収率が得られた。

【0063】

50

F i c o l l とデキストランとの混合物も C R P 分子への安定化効果を有しているようである。F i c o l l とデキストランの比は重要ではなかった。

【 0 0 6 4 】

荷電基を含有する F i c o l l プロトタイプでさえ、この試験で良好に作用した。

【 0 0 6 5 】

荷電 F i c o l l 誘導体で浸漬したプロトタイプは E L I S A 用途で良好に作用した。M S 用途では、荷電ポリマーを最初に試料から除去する必要がある。

【 0 0 6 6 】

全てのプロトタイプからのタンパク質総量の回収率は（示さず）は良好であり、認められた差違は、スポット体積での差違に反映している可能性が高い。

10

【 0 0 6 7 】

実施例 4 - 乾燥血液スポット中の C 反応性タンパク質、レプチン及び 2 グリコプロテイン - 1 の安定性

乾燥血液スポット（D B S）試料に照準を合わせた修飾 / 改質セルロース紙の強制安定性試験を行った。D B S 試料を、浸漬及び共有結合した F i c o l l プロトタイプにスポットして - 2 0 及び 3 7 それぞれでの 1 週間保存後の C 反応性タンパク質（C R P）、レプチン及び 2 グリコプロテイン - 1（2 G P 1）への安定化効果を追跡した。市販の E L I S A キットを評価に用いた。目標は、既に高い回収率（対照紙と比べて）が確立された C R P 以外のタンパク質に有利な修飾 / 改質を見出すことであった。

【 0 0 6 8 】

20

結果より、浸漬紙プロトタイプからの C R P の回収率は共有結合で修飾されたプロトタイプに比べて 1 0 ~ 2 0 % 高いが、レプチンの回収率には効果がないことがわかった。浸漬 F i c o l l P M 4 0 0 は、2 G P 1 に対して未処理紙とほぼ同程度に良好であり、高い温度での保存時、別のプロトタイプに比べて回収率の低下が少なく、C R P と 2 G P 1 の両方に有益であった。

【 0 0 6 9 】

結果をまとめると、F i c o l l P M 4 0 0 で浸漬した紙は、D B S としての保存時、特定のタンパク質に有益のようであると結論づけることができる。

【 0 0 7 0 】

スポットと D B S 試料の保存

30

1 5 μ l 血液アリコートを異なるプロトタイプ上に 3 つスポットし、D B S を室温で 4 時間乾燥し、その後、紙を乾燥剤の小さい包みとともに密封バッグに 3 7 で 1 週間保存した。対照とするために 1 5 μ l 血液アリコートを 0 . 5 m l 管に保存した（- 2 0 保存）。

【 0 0 7 1 】

D B S 抽出

スポットをパンチで打ち抜き（直径 9 m m）、2 4 ウェルプレート中 4 0 0 μ l のバッファで 1 時間室温（混合約 5 0 0 r p m）、終夜 4、1 時間室温（混合約 5 0 0 r p m）で抽出した。プレートをインキュベーション時に密封し、試料分析前にプレート遠心分離機により 3 7 0 0 r p m で遠心分離した。C R P 及び A 2 8 0 分析用の試料を取り出し、試料プレートを - 2 0 で保存した。抽出後のディスクは、レプチン及び 2 G P 1 分析用の試料の取り出し前に除去した。

40

【 0 0 7 2 】

C R P E L I S A / A 2 8 0 測定

ヒト C R P E L I S A キットを推奨希釈（血清を 1 : 4 0 0 0 に希釈）以外製造業者の取り扱い説明にしたがって使用した。試料を上記の試験のように 1 : 2 7 0 に希釈した。

【 0 0 7 3 】

対照血液アリコート（n = 3）を 3 8 5 μ l の P B S - T で希釈した。その後、さらに対照及び抽出試料を U V プレート中で最終体積 2 0 0 μ l になるように C R P 洗浄バッフ

50

アで 1 : 10 に希釈した。

【 0 0 7 4 】

タンパク質回収率計算のために C R P 分析前に 2 8 0 n m での吸光度を測定した。

【 0 0 7 5 】

C R P E L I S A アッセイ及び A 2 8 0 測定において、D B S 試料を 1 つの試料として分析し、血液対照を反復分析した。

【 0 0 7 6 】

レプチン E L I S A

ヒトレプチン E L I S A キットを推奨希釈（血清をキット同梱のバッファで 1 : 3 に希釈）以外製造業者の取り扱い説明にしたがって使用した。スパイクした試料は別の希釈が必要であったので、予備試験で 3 種類の希釈（1 : 5 0、1 : 8 0 0 及び 1 : 4 0 0 0）をテストした。対照及び試料が検量線の直線部分にくる 1 : 8 0 0 を選択した。D B S 試料を 1 つの試料として分析し、血液対照を反復分析した。

10

【 0 0 7 7 】

2 G P 1 E L I S A

ヒト 2 G P 1 E L I S A キットを推奨希釈（血清を 1 : 5 0 0 0 に希釈）以外製造業者の取り扱い説明にしたがって使用した。予備試験で 3 種類の希釈（1 : 5 0、1 : 5 0 0 及び 1 : 2 5 0 0）をテストした。希釈 1 : 5 0 0 が検量線の下部 3 分の 1 となり、したがって 1 : 2 5 0 が最終試験で良好に作用すると考え、これを使用した。D B S 試料を 1 つの試料として分析し、血液対照を反復分析した。

20

【 0 0 7 8 】

C R P / レプチン / 2 G P 1 回収

【 0 0 7 9 】

【数 3】

$$\text{回収率 \%} = \left(\frac{\text{試料中の CR / レプチン / } \beta 2 \text{GP1 濃度}}{\text{血液対照中の CCR / レプチン / } \beta 2 \text{GP1 濃度 (平均)}} \right) \times 100$$

タンパク質回収

抽出試料の全タンパク質の回収率の尺度として 2 8 0 n m での吸光度を用いた。

30

【 0 0 8 0 】

【数 4】

$$\text{回収率 \%} = \left(\frac{\text{試料の A280}}{\text{血液対照の A280 (平均)}} \right) \times 100$$

紙プロトタイプの D B S 中の 3 つの異なるタンパク質の安定性を E L I S A で追跡した。表 2 にこの試験の結果の概要を示す。

40

【 0 0 8 1 】

【表 5】

表 5. DBS 紙プロトタイプで回収して 37°C で 1 週間保存した DBS から抽出することによって得られた 3 種類のタンパク質の平均回収率 (n=3) を ELISA で分析した。回収率は血液対照試料で得られた量に対する%として計算した (n=3, 重複分析).

DBS 紙プロトタイプ	CRP 回収率 %	標準偏差	レプチン回収率 %	標準偏差	β2 GP1 回収率 %	標準偏差	タンパク質回収率 %	標準偏差
31 ETF	52.0	0.9	65.9	6.5	75.9	0.8	74.6	2.4
31 ETF 繊維	51.1	1.7	57.9	1.5	76.8	1.3	77.2	2.5
PM20 5%	55.1	6.7	60.5	9.9	85.7	12.4	77.2	6.0
PM20 ECH 50%	55.7	5.3	53.8	5.7	88.6	11.6	87.1	14.9
PM70 5%	67.1	3.4	68.2	4.2	70.0	15.8	76.9	2.6
PM70 ECH 50%	61.5	2.8	50.6	22.3	74.3	19.4	89.2	1.6
PM70 ECH 繊維	64.3	4.7	64.8	2.2	83.5	15.0	88.0	6.9
PM400 5%	87.9	6.5	69.9	10.6	96.8	6.0	90.0	6.6
DEAE PM70 5%	70.9	0.9	76.5	9.4	75.8	9.1	82.3	0.8
DEAE PM70 ECH 50%	53.5	4.1	69.8	1.9	60.2	10.8	84.1	5.0
CM PM70 5%	68.5	5.9	74.2	14.3	48.9	10.9	81.3	15.2
CM PM70 ECH 50%	60.9	0.8	66.9	9.4	69.6	1.9	88.2	5.4
血液対照	100.0	5.7	100.0	10.4	100.0	8.9	100.0	9.4

浸漬プロトタイプは、上記試験と同じように C R P の回収率が高かった。分子の大きさが大きい F i c o l l である P M 7 0 及び P M 4 0 0 では、P M 4 0 0 で浸漬した紙の 3 7 での 1 週間保存後の C R P 回収率が 2 5 % 高かった。共有結合で修飾した紙は F i c o l l が紙繊維に直接結合した場合に最も効果がある。これはおそらく高度の修飾によるものである。

【 0 0 8 2 】

分子量 (M w) の大きい F i c o l l で浸漬した紙でレプチンの回収率への好ましい効果がいくらか見出されたが、この E L I S A においては不確実性が高く、3 つの結果の標準偏差が 2 ~ 2 2 % の範囲にわたった。

【 0 0 8 3 】

2 G P 1 アッセイでも標準偏差は大きかった (最大 2 7 %) 。 F i c o l l P M 4 0 0 の 3 7 での保存後の回収率は、対照紙より高く、このメディアの安定化効果を示した。

【 0 0 8 4 】

3 つのタンパク質の E L I S A アッセイを用いて D B S ワークフロー時の安定性を評価した。結果の解釈の際、高い回収率が良好な安定性に反映すると仮定した。しかし、アッセイに用いた抗体に依存して、部分的に分解及び変性したタンパク質でさえ全体の結果に影響を与えることがあり、これを制御することが不可能であった。この試験で用いた全ての E L I S A キットは血清試料を対象とするものであった。

【 0 0 8 5 】

E L I S A アッセイでは標準偏差が概して大きいため D B S 回収率の詳細評価は困難であった。血清試料からアッセイを行うことに比べて多くの工程が D B S ワークフローに含まれる。

【 0 0 8 6 】

結果をまとめると、F i c o l l P M 4 0 0 で浸漬した紙は、D B S としての保存時、特定のタンパク質に有益であると結論づけることができる。

浸漬 F i c o l l P M 4 0 0 は、2 G P 1 に対して未処理紙とほぼ同程度に良好であ

り、高い温度での保存時、別のプロトタイプに比べて回収率の低下が少なく、C R P と 2 G P 1 の両方に有益であった。

【 0 0 8 7 】

実施例 5 - 乾燥血液スポット中のアルカリホスファターゼの安定性

アルカリホスファターゼ (A L P) は、アルカリ性環境でリン酸エステルの加水分解の触媒となる。この試験では、A L P 活性を基質 p - ニトロフェニルリン酸 (p N P P) で測定した。反応の 1 つの生成物である p - ニトロフェノールがアルカリ性条件下で黄色 (4 0 5 n m に吸収極大) を示す。反応速度は直接酵素活性に比例する。

【 0 0 8 8 】

3 7 で 1 週間保存した、D B S を含有するプロトタイプで A L P 活性を測定した。

10

【 0 0 8 9 】

血液試料を 2 0 μ g / m l の A L P でスパイクし、1 5 μ l のスパイク済みの血液を紙にスポットした。溶液を 2 時間以上風乾した。1 セット 1 2 枚の D B S を含有するプロトタイプ紙全てを - 2 0 、別のセットを 3 7 で 1 週間保存した。各プロトタイプ及び各温度につき 2 スポットずつ作製した。

【 0 0 9 0 】

保存後、紙を室温に置いた。スポットをスチール製穿孔器、ハンマー及びプラスチック製カッティングボードを用いて 1 0 m m ディスクに打ち抜いた。ディスクを U n i p l a t e の 1 0 m L ウェルに置き、4 0 0 μ L の溶出 P B S - T バッファ (0 . 0 5 % T w e e n 2 0 含有 P B S) を添加した。プレートを振盪機に置き、5 0 0 r p m で 1 時間振盪し、冷蔵庫で終夜保存し、再度振盪機で 1 時間振盪した。A L P 活性測定のために 5 μ l の抽出溶液を 1 9 5 μ l の基質 p N P P 溶液と混合し、4 0 5 n m での吸光度を追跡した。

20

【 0 0 9 1 】

【表 6】

表 6. プロトタイプからの抽出溶液の ALP 活性回収率

紙	浸漬/カップリング液中の濃度(wt %)	ALP 活性回収率 (%)
プレーン 31ETF 紙 (対照)	-	88
再パルプ化 31ETF の手書きシート	-	85
DEAE Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	5	83
CM Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	5	104
Ficoll PM20 で浸漬した 31ETF	5	85
Ficoll PM70 で浸漬した 31ETF	5	89
Ficoll PM400 で浸漬した 31ETF	5	98
ECH-結合 Ficoll PM20 で処理した 31ETF	50	107
ECH-結合 Ficoll PM70 で処理した 31ETF	50	99
ECH-結合 DEAE Ficoll PM70 で処理した 31ETF	50	96
ECH-結合 CM Ficoll PM70 で処理した 31ETF	50	92
ECH-結合 Ficoll PM70 処理した再パルプ化 31ETF の手書きシート	50	95

30

40

F i c o l l 分子が共有結合したプロトタイプを用いたときに A L P 分析で最もよい結果が認められた。3 7 での保存後の活性は、これらのプロトタイプだけでなく F i c o l l P M 4 0 0 で浸漬した紙でも良好なようである。これらの結果より、酵素活性が血液スポット紙の 3 7 での 1 週間保存後でさえ良好であることがわかる。

【 0 0 9 2 】

本明細書では、具体例を挙げて、最良の形態を含む本発明を開示するとともに、当業者

50

が装置又はシステムの製造及び使用並びに方法の実行を含めて本発明を実施できるようにしている。本発明の要旨は、特許請求の範囲に規定された通りで、当業者が想起できる他の例を含むことができる。このような他の例は、特許請求の範囲の文言と異なる構造要素を有するか、特許請求の範囲の文言と実質的に異なる均等な構造要素を含むならば、特許請求の範囲に含まれる。

フロントページの続き

- (72)発明者 アルゴットソン, マティアス
スウェーデン、エス - 7 5 1 8 4、ウプサラ、ビヨルクガタン 3 0 番、ジーイー・ヘルスケア
・バイオサイエンス・アクチボラグ
- (72)発明者 バロウズ, マイルズ・ダブリュー
英国、サウスグラモーガン・シーエフ 1 4 7ワイティー、カーディフ、エムシー 0 5 エム、ホイ
ットチャーチ、ザ・メイナード・センター・フォレスト・ファーム・エステート
- (72)発明者 ヘディン・ダールストロム, ジミー
スウェーデン、エス - 7 5 1 8 4、ウプサラ、ビヨルクガタン 3 0 番、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 ローリン, イルヴァ
スウェーデン、エス - 7 5 1 8 4、ウプサラ、ビヨルクガタン 3 0 番、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 パルムグレン, ロニー
スウェーデン、エス - 7 5 1 8 4、ウプサラ、ビヨルクガタン 3 0 番、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 ツォ, ジンユ
スウェーデン、エス - 7 5 1 8 4、ウプサラ、ビヨルクガタン 3 0 番、ジーイー・ヘルスケア

審査官 平井 裕彰

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 0 / 0 2 0 9 9 5 7 (U S , A 1)
特開平 0 1 - 2 9 1 1 6 4 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 0 / 0 7 4 7 7 3 (W O , A 1)
特表平 0 3 - 5 0 3 2 1 2 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

D 2 1 B 1 / 0 0 ~ D 2 1 J 7 / 0 0
D 0 6 M 1 3 / 0 0 ~ 1 5 / 7 1 5
G 0 1 N 1 / 0 0 ~ 1 / 3 4
3 3 / 0 0 ~ 3 3 / 4 6