

(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 1
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 0 1 N 1/28 (2006.01)	G 0 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)
(86) (22) 出願日	平成24年10月29日 (2012.10.29)
(65) 公表番号	特表2014-535011 (P2014-535011A)
(43) 公表日	平成26年12月25日 (2014.12.25)
(86) 國際出願番号	PCT/SE2012/051168
(87) 國際公開番号	W02013/066249
(87) 國際公開日	平成25年5月10日 (2013.5.10)
審査請求日	平成27年10月16日 (2015.10.16)
(31) 優先権主張番号	1118731.7
(32) 優先日	平成23年10月31日 (2011.10.31)
(33) 優先権主張国	英國 (GB)

(73) 特許権者	597064713 ジーイー・ヘルスケア・バイオサイエンス ・アクチボラグ スウェーデン国エスエー 751 84 ウプサラ ビヨルクガタン 30
(74) 代理人	100137545 弁理士 荒川 聰志
(74) 代理人	100105588 弁理士 小倉 博
(74) 代理人	100129779 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、セルロース纖維又はガラス纖維を含有し、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纖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Ficoll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

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) 40~800g/m²の表面重量を有し、セルロース纖維又はガラス纖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、纖維又はベース紙が化学的に活性化されており、この纖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。

【請求項 9】

20

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1~20mPa·s、例えば1~10mPa·sである、請求項8記載の方法。

【請求項 10】

活性纖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、FTA及びFTA Elute (GE Healthcare社の一部であるWhatmann社製)として知られているものがあり、例えば米国特許第5756126号及び第5939259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31ETF紙(GE Healthcare社の一部であるWhatmann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、Ficoll、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】

從属請求項に、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」は纖維ウェブ又はシート材料を意味する。紙は纖維、例えばセルロース又はガラス纖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ます。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応じて、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、40～800g/m²の表面重量をもち、セルロース纖維及び／又はガラス纖維を含有し、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、10.0×10.0cm）の風乾シートを計量し、シート領域（m²）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0.05～1、具体的に0.10～1、0.20～1又は0.30～1とすることができます。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

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

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產生され、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 2 mPa・s (Mw 10 kDa)、4 mPa・s (40 kDa) 及び 10 mPa・s (70 kDa) 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 3 3 0 0 4 7 4 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 Health care 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 3 mPa・s (70 kDa) 及び約 5 mPa・s (400 kDa) 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 1～10 mPa・s、例えば 1～5 mPa・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纖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纖維に共有結合及び／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。

【0025】

ある実施形態では、上記紙は、5～300 μmol/g、例えば5～50、5～100又は50～300 μmol/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る、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纖維に共有結合できたりする。負荷電基が、纖維或いは纖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。

【0026】

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、骨髄、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。

【0027】

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ます、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。

【0028】

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。

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、骨髄とすることができます、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15～35、例えば15～25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。

【0029】

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0～40又は20～40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、0～70%、例えば0～50%又は0～20%の相対湿

10

20

40

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とすることができます。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、プレーン紙で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できが好ましい。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. McDade 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を通常用いて特定な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、特に立体構造エピト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%とすることができます、一方、共有結合しない条

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%とすることができます。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ます。製造状況では、乾燥は、例えば浸漬コーティング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) 40～800g/m²の表面重量を有し、セルロース纖維又はガラス纖維を含有するベース紙を用意する。

工程b) ベース紙に15～800kDa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、浸漬コーティング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%とすることができます、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ます。製造環境では、乾燥は、浸漬コーティング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

【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单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、20～500kDa又は70～400kDa、例えば20kDa、70kDa又は400kDa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1～20mPa·s、例えば1～10mPa·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。

30

【0041】

実施形態によっては、ベース紙は5～300μmol/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、プロモ酢酸、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、纖維又はベース紙は化学的に活性化され、本方法は、その纖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。活性纖維/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

40

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、活性纖維又は活性紙が反応性エポキシ基を含有する。また、纖維／紙は、トシリ化、トレシリ化又はメシリ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。ガラス纖維は、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纖維／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、本方法は纖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 Rack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】

10

20

30

40

【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
	7	16
	5	11
	2	3
	1	1
	10	27
	7	17
	5	12
	2	4
	1	1
デキストラン 110	10	26
	7	18
	5	12
	2	4
	1	2
	10	26
	7	18
	5	12
	2	4
	1	2
デキストラン 20	10	26
	7	18
	5	12
	2	4
	1	2
	10	26
	7	18
	5	12
	2	4
	1	2
デキストラン T3.5	10	26
	7	18
	5	12
	2	4
	1	2
	10	26
	7	18
	5	12
	2	4
	1	2

10

20

30

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。

【0046】

実施例2 - Ficoll及びデキストランの共有結合

Ficoll PM70のエピクロロヒドリン(ECH)結合

典型的な実験では、紙ストリップを31Etf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150mL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103.2mLの水、10.6mLの50%NaOH及び16.1mLのECH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、130mL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。

【0047】

100mLの所望の濃度のFicoll PM70溶液を反応器に添加し、溶液を15分間攪拌した後、2.916mLの50%NaOH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、130mL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、600mLのガラスピーカーに入れ、300mL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80rpm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

40

50

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。

【0048】

再パルプ化纖維への 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 15 g の 31 E T F 紙を、小片に裂き、約 500 mL 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 80 g) を記録し、若干湿気を含んだパルプを 500 mL の丸底フラスコ (R B F) に移した。 R B F に 142 mL の水及び 25 mL の 50 % N a O H を添加し、混合物を縦型攪拌機を用いて 15 分間攪拌した。攪拌しながら 30 mL の E C H を添加し、水浴を 30 にセットした。その後、混合物をさらに 2 時間攪拌した。

10

【0049】

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 500 mL の R B F に移し、25 mL の F i c o l l P M 7 0 溶液を仕込んだ。混合物を約 20 分間攪拌した後、8.75 mL の 50 % N a O H を添加した。30 で攪拌を終夜継続した。

【0050】

約 20 時間後、反応を終了させ、纖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。特に高濃度纖維の場合、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纖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 31 E t f 纖維も形成し、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。

【0051】

より小型のガラス反応器 (100 mL) を用い、反応体積を減少させ、23.83 mL の活性化水、2.45 mL の 50 % N a O H 及び 3.72 mL の E C H を用いた。結合は、30 mL の F i c o l l P M 2 0 溶液及び 744.8 μ L の 50 % N a O H を用いて行った。

【0052】

30

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 0.086 % 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。

【0053】

【表 2】

表 2 D E A E - F i c o l l 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 280 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。

【0054】

スポットとDBS試料の保存

4 μl 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、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（-20℃）した。対照とするために4 μl 血液アリコートを0.5 ml管に保存した（-20℃保存）。

【0055】

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 μlのPBS-Tで振盪（約400 rpm）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 rpmで遠心分離した。

【0056】

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 μlのPBS-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 μl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。

【0057】

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。

【0058】

CRP回収

【0059】

【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)

30

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

40

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。

【0060】

【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、Ficoll PM400、PM

50

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/カッピング液中の濃度(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 の手書きシート	-	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 の手書きシート	30	81.9
ECH-結合 Ficoll PM70 処理した再パルプ化 31ETF の手書きシート	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。紙纖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

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

【0064】

荷電基を含有するFicollプロトタイプでさえ、この試験で良好に作用した。

【0065】

荷電Ficoll誘導体で浸漬したプロトタイプはELISA用途で良好に作用した。MS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。

【0066】

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

【0067】

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(DBS)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。DBS試料を、浸漬及び共有結合したFicollプロトタイプにスポットして-20及び37、それぞれでの1週間保存後のC反応性タンパク質(CRP)、レプチン及び2グリコプロテイン-1(2GPI)への安定化効果を追跡した。市販のELISA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CRP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。

20

【0068】

結果より、浸漬紙プロトタイプからのCRP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10~20%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Ficoll PM400は、2GPI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、CRPと2GPIの両方に有益であった。

【0069】

結果をまとめると、Ficoll PM400で浸漬した紙は、DBS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。

【0070】

スポットとDBS試料の保存

30

15 μl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、DBS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37で1週間保存した。対照とするために15 μl血液アリコートを0.5ml管に保存した(-20保存)。

【0071】

DBS抽出

スポットをパンチで打ち抜き(直径9mm)、24ウェルプレート中400 μlのバッファで1時間室温(混合約500rpm)、終夜4、1時間室温(混合約500rpm)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3700rpmで遠心分離した。CRP及びA280分析用の試料を取り出し、試料プレートを-20で保存した。抽出後のディスクは、レプチン及び2GPI分析用の試料の取り出し前に除去した。

40

【0072】

CRP ELISA/A280測定

ヒトCRP ELISAキットを推奨希釈(血清を1:4000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1:270に希釈した。

【0073】

対照血液アリコート(n=3)を385 μlのPBS-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 μlになるようにCRP洗浄バッフ

50

アで 1 : 10 に希釈した。

【0074】

タンパク質回収率計算のために C R P 分析前に 280 nm での吸光度を測定した。

【0075】

C R P E L I S A アッセイ及び A 280 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。

【0076】

レプチニ E L I S A

ヒトレプチニ 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だったので、予備試験で 3 種類の希釈（1 : 50、1 : 800 及び 1 : 4000）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 : 800 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。

【0077】

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 : 5000 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 : 50、1 : 500 及び 1 : 2500）をテストした。希釈 1 : 500 が検量線の下部 3 分の 1 となり、したがって 1 : 250 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。

【0078】

C R P / レプチニ / 2 G P 1 回収

【0079】

【数 3】

$$\text{回収率 \%} = \left(\frac{\text{試料中のCR / レプチニ / \beta2GP1濃度}}{\text{血液対照中のCCR / レプチニ / \beta2GP1濃度 (平均)}} \right) \times 100$$

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 280 nm での吸光度を用いた。

【0080】

【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。

【0081】

10

20

30

40

【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 CRP の回収率が高かった。分子の大きさが大きい Ficoll である PM70 及び PM400 では、PM400 で浸漬した紙の 37 での 1 週間保存後の CRP 回収率が 25% 高かった。共有結合で修飾した紙は Ficoll が紙纖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。

【0082】

分子量 (Mw) の大きい Ficoll 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 ELISA においては不確実性が高く、3 つの結果の標準偏差が 2 ~ 22% の範囲にわたった。

【0083】

2GP1 アッセイでも標準偏差は大きかった (最大 27%)。Ficoll PM400 の 37 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。

【0084】

3 つのタンパク質の ELISA アッセイを用いて DBS 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 ELISA キットは血清試料を対象とするものであった。

【0085】

ELISA アッセイでは標準偏差が概して大きいため DBS 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 DBS ワークフローに含まれる。

【0086】

結果をまとめると、Ficoll PM400 で浸漬した紙は、DBS 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 Ficoll PM400 は、2GP1 に対して未処理紙とほぼ同程度に良好であ

10

20

30

40

50

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。

【0087】

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 (405 nmに吸収極大) を示す。反応速度は直接酵素活性に比例する。

【0088】

37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

【0089】

血液試料を20 μg / mlのA L Pでスパイクし、15 μl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12枚のD B Sを含有するプロトタイプ紙全てを-20、別のセットを37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。

【0090】

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10 mmディスクに打ち抜いた。ディスクをUniplateの10 mLウェルに置き、400 μLの溶出P B S - Tバッファ (0.05% Tween 20含有P B S) を添加した。プレートを振盪機に置き、500 rpm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 μlの抽出溶液を195 μlの基質p N P P溶液と混合し、405 nmでの吸光度を追跡した。

20

【0091】

【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/カッピング液中の濃度(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

Ficoll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。37での保存後の活性は、これらのプロトタイプだけでなくFicoll PM400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37での1週間保存後でさえ良好であることがわかる。

【0092】

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らない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らない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-751 84、ウプサラ、ビヨルクガタン 30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14 7ワイティー、カーディフ、エムシー05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-751 84、ウプサラ、ビヨルクガタン 30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-751 84、ウプサラ、ビヨルクガタン 30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-751 84、ウプサラ、ビヨルクガタン 30番、ジーイー・ヘルスケア
- (72)発明者 ソオ, ジンユ
スウェーデン、エス-751 84、ウプサラ、ビヨルクガタン 30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2010/0209957 (US, A1)
特開平01-291164 (JP, A)
国際公開第2010/074773 (WO, A1)
特表平03-503212 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

D21B 1/00 ~ D21J 7/00
D06M 13/00 ~ 15/715
G01N 1/00 ~ 1/34
33/00 ~ 33/46