

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 10 月 8 日(08.10.2015)



(10) 国際公開番号
WO 2015/152227 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/060100
- (22) 国際出願日: 2015 年 3 月 31 日(31.03.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-074018 2014 年 3 月 31 日(31.03.2014) JP
- (71) 出願人: 積水メディカル株式会社(SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 1 3 番 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 城下 友義(SHIROSHITA, Tomoyoshi); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 1 3 番 5 号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 井手野晃(IDENO, Akira); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 1 3 番 5 号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP). 大原 利成(OH-HARA, Toshinari); 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目 1 3 番 5 号 積水メディカル株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所(MOEGI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目 7 番 7 号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: INTERNAL STANDARD SUBSTANCE REAGENT

(54) 発明の名称: 内部標準物質試薬

(57) Abstract: Provided is an internal standard substance reagent for mass spectrometry, that has excellent storage stability at room temperature and can be used by using a simple operation. A stable isotope-labelled compound indicated by formula (1) is caused to be held by a porous member, in a state in which said compound can be eluted in a solution and is dried. Formula 1: $(CH_3)_3N^+CH_2CH(OR^1)CH_2COO^-$ (In formula 1, R^1 indicates a hydrogen atom or a C2-30 saturated or unsaturated fatty acid residue and hydrogen atoms that bond with the fatty acid residue are substitutable by an oxygen atom or a hydroxy group.)

(57) 要約: 室温での保存安定性に優れ、かつ簡便な操作で使用する事ができる質量分析用内部標準物質試薬の提供。安定同位体標識された式 1 の化合物を、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で、多孔性部材に保持させる。式 1: $(CH_3)_3N^+CH_2CH(OR^1)CH_2COO^-$ (式 1 中、 R^1 は水素原子、又は炭素数 2 ~ 30 の飽和もしくは不飽和の脂肪酸残基を表し、該脂肪酸残基に結合する水素原子は、酸素原子又はヒドロキシ基で置換されていてもよい。)



WO 2015/152227 A1

明 細 書

発明の名称： 内部標準物質試薬

技術分野

[0001] 本発明は、質量分析法を利用した試料中のアミノ酸分析に用いられる内部標準物質試薬に関する。より詳細には、安定同位体標識されたアシルカルニチンを有効成分とする内部標準物質試薬に関する。また、安定同位体標識されたアシルカルニチンを有効成分とする内部標準物質試薬の室温保存での安定化方法に関する。

背景技術

[0002] アシルカルニチンは、生体内において脂肪酸がミトコンドリア内膜へ運搬される際に、脂肪酸とカルニチンとが結合して生成される化合物である。より詳しくは、ミトコンドリア外膜に存在するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼⅠの作用によりアシルC o Aとカルニチンからアシルカルニチンが生成される。アシルカルニチンは、その脂肪酸部分の炭素鎖長、直鎖であるか分岐鎖である、不飽和結合の有無と数、炭素鎖に結合する水素原子の酸素原子又はヒドロキシ基への置換などにより、アセチルカルニチン、プロピオニルカルニチン、イソ吉草酸カルニチン、ステアロイルカルニチン、オレイルカルニチン、リノレイルカルニチン、マロニルカルニチン、3-ヒドロキシカルニチンなどに細分化されるが、本明細書においては、それらを総称してアシルカルニチンと記述する。また、本明細書においては脂肪酸が結合していない遊離カルニチンも、アシルカルニチンに含めるものとする。

[0003] 医療の分野において代謝異常の評価を行うために、血液や尿などの生物試料中のアシルカルニチンを分析することは極めて有用であり、例えば新生児を対象とした先天性代謝異常スクリーニングの必須分析項目とされている。

[0004] 特許文献1には、質量分析法により血漿中のアシルカルニチンを測定し、アシルカルニチンのプロファイルを得ることで、脂肪酸酸化障害（MCAD、VLCAD、SCAD、MAD、LCHAD、及びCPTⅠⅡ）に加え、

一部の有機酸血症（プロピオン酸血症、メチルマロン酸血症、イソ吉草酸血症、1型グルタル酸血症、3-メチルクロトニルCoAカルボキシラーゼ欠損症、 β -ケトチオラーゼ欠損症など）の診断に利用できると記載されている。

[0005] 上記したように生物試料中のアシルカルニチンの分析方法としては、質量分析法が広く普及しているが、質量分析法により生物試料中のアシルカルニチンを定量的に分析する場合には、内部標準物質として安定同位体標識されたアシルカルニチンを使用する必要がある。安定同位体標識されたアシルカルニチン内部標準物質は、試薬メーカーから個別に購入するか、あるいは非特許文献1に示されるNeoBase非誘導体化MSMSキット（PerkinElmer社製）のようなキットを購入することにより入手可能である。しかしながら、これらの内部標準物質は凍結乾燥品でのみ供給されており、使用前に適切な液体を添加して完全に溶解させる工程が必須であった。

[0006] 一方、非特許文献2には、アシルカルニチンを溶液とし液体状態で保存した場合、加水分解を受けるため長期保存ができないことが記載されている。また、非特許文献3には、アシルカルニチンを添加したろ紙血を室温保存した場合、14日後から測定値に影響がでることが記載されており、これを踏まえた非特許文献2では、ろ紙血検体であっても常温（21℃）ではなく、冷凍（-30℃）での保管の徹底を結論している。このようにアシルカルニチンを室温で安定保存する方法は確立されていなかった。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特表2007-503818号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：「3040-0010 NeoBase Non-derivatized MSMS kit（PerkinElmer社）」の使用説明書

非特許文献2：「液体サンプル中のアシルカルニチンの安定性について」、平

成 2 3 年度厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）分担研究報告書、研究課題名「タンデムマス導入による新生児マスキリーニング体制の整備と質的向上に関する研究」、山口清次ら、40-43頁 厚生労働省 2012年

非特許文献3: Fingerhut R., et al., Anal Chem, 2009 May 11; 81 (9) : 3571-3575

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明者らは、アシルカルニチンの室温保存での安定化方法について、鋭意検討を行ったところ、驚くべきことに、アシルカルニチンそれ自体をろ紙に含浸させ乾燥させた状態で保存した場合には、室温で長期間保存した場合でも、加水分解をうけることなく安定に保存できることを見出し、本発明を完成させた。

課題を解決するための手段

- [0010] 本発明は、以下の構成を有する。

（１）安定同位体標識された式１の化合物が、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で、多孔性部材に保持されていることを特徴とする、質量分析用内部標準物質試薬。

式１： $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}(\text{OR}^1)\text{CH}_2\text{COO}^-$

（式１中、 R^1 は水素原子、又は炭素数２～３０の飽和もしくは不飽和の脂肪酸残基を表し、該脂肪酸残基に結合する水素原子は、酸素原子又はヒドロキシ基で置換されていてもよい。）

（２）安定同位体が、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 及び ^{18}O からなる群より選ばれる安定同位体である、上記（１）に記載の試薬。

（３）多孔性部材が、ろ紙、不織布、織布及びシート状発泡体からなる群より選ばれる部材である、上記（１）又は（２）に記載の試薬。

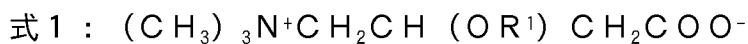
（４）さらに安定同位体標識された検査対象アミノ酸が溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で当該多孔性部材に保持されている、上記（１）～（３）に記載

の試薬。

(5) 上記(1)に記載の質量分析用内部標準物質試薬、及びメタノールを含有する試料抽出液又は安定同位体標識された検査対象アミノ酸を溶液中に溶出可能かつ乾燥状態に保持している多孔性部材を含む質量分析用試料前処理キット。

(6) 上記(1)に記載の質量分析用内部標準物質試薬がマイクロプレートのウェル(well)中に収納されている、上記(5)に記載の前処理キット。

(7) 安定同位体標識された式1の化合物を、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で、多孔性部材に保持させることを特徴とする、質量分析用内部標準物質試薬の室温保存での安定化方法。



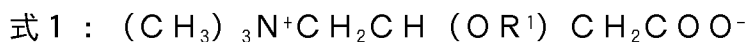
(式1中、R¹は水素原子、又は炭素数2～30の飽和もしくは不飽和の脂肪酸残基を表し、該脂肪酸残基に結合する水素原子は、酸素原子又はヒドロキシ基で置換されていてもよい。)

発明の効果

[0011] 本発明によれば、使用時に溶解の必要が無く、かつ室温での保存が可能なアシルカルニチン内部標準物質試薬が提供される。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明において、アシルカルニチンとは、式1で表される化合物群をいう。



(式1中、R¹は水素原子、又は炭素数2～30の飽和もしくは不飽和の脂肪酸残基を表し、該脂肪酸残基に結合する水素原子は、酸素原子又はヒドロキシ基で置換されていてもよい。)

[0013] 飽和又は不飽和の脂肪酸残基としては、表1に記載の脂肪酸のカルボキシ基から水素原子が脱離した残基が挙げられ、これらのうち、炭素数2～18の脂肪酸残基が、好適に使用される。該脂肪酸残基は、直鎖又は分岐鎖のい

ずれであってもよい。

[0014] [表1]

脂肪酸名	略号
ギ酸	1 : 0
酢酸	2 : 0
プロピオン酸	3 : 0
酪酸	4 : 0
吉草酸	5 : 0
カプロン酸	6 : 0
エナント酸	7 : 0
カプリル酸	8 : 0
ペラルゴン酸	9 : 0
カプリン酸	10 : 0
ラウリン酸	12 : 0
ミリスチン酸	14 : 0
ペンタデシル酸	15 : 0
パルミチン酸	16 : 0
パルミトレイン酸	16 : 1
マルガリン酸	17 : 0
ステアリン酸	18 : 0
オレイン酸	18 : 1 (9)
バクセン酸	18 : 1 (11)
リノール酸	18 : 2 (9, 12)
(9, 12, 15)-リノレン酸	18 : 3 (9, 12, 15)
(6, 9, 12)-リノレン酸	18 : 3 (6, 9, 12)
エレオステアリン酸	18 : 3 (9, 11, 13)
アラキジン酸	20 : 0
8, 11-エイコサジエン酸	20 : 2 (8, 11)
5, 8, 11-エイコサトリエン酸	20 : 3 (5, 8, 11)
アラキドン酸	20 : 4 (5, 8, 11, 14)
エイコペンタエン酸	20 : 5
ベヘン酸	22 : 0
ドコサヘキサエン酸	22 : 6
リグノセリン酸	24 : 0
ネルボン酸	24 : 1
セロチン酸	26 : 0
モンタン酸	28 : 0
メリシン酸	30 : 0

[0015] 本発明で好適なアシルカルニチンは、臨床での分析項目とされているアシルカルニチンである。それらを表2に記載した。本発明ではこれらの1種類以上を多孔性部材に保持させる。

[0016]

[表2]

化合物名	略号
遊離カルニチン	C 0
アセチルカルニチン	C 2
プロピオニルカルニチン	C 3
マロニルカルニチン	C 3 D C
ブチリルカルニチン	C 4
3-ヒドロキシ-ブチリルカルニチン	C 4 O H
イソ吉草酸カルニチン	C 5
チグリルカルニチン	C 5 : 1
グルタリルカルニチン	C 5 D C
3-ヒドロキシ-イソ吉草酸カルニチン	C 5 O H
ヘキサノイルカルニチン	C 6
アジピルカルニチン	C 6 D C
オクタノイルカルニチン	C 8
オクテノイルカルニチン	C 8 : 1
デカノイルカルニチン	C 1 0
デセノイルカルニチン	C 1 0 : 1
デカジエノイルカルニチン	C 1 0 : 2
ドデカノイルカルニチン (ラウロイルカルニチン)	C 1 2
ドデセノイルカルニチン	C 1 2 : 1
テトラデカノイルカルニチン (ミリストイルカルニチン)	C 1 4
テトラデセノイルカルニチン	C 1 4 : 1
テトラデカジエオニルカルニチン	C 1 4 : 2
3-ヒドロキシ-テトラデカノイルカルニチン	C 1 4 O H
ヘキサデカノイルカルニチン (パルミトイルカルニチン)	C 1 6
ヘキサデセノイルカルニチン	C 1 6 : 1
3-ヒドロキシ-ヘキサデカノイルカルニチン	C 1 6 O H
3-ヒドロキシ-ヘキサデセノイルカルニチン	C 1 6 : 1 O H
オクタデカノイルカルニチン (ステアロイルカルニチン)	C 1 8
オクタデセノイルカルニチン (オレイルカルニチン)	C 1 8 : 1
オクタデカジエノイルカルニチン (リノレイルカルニチン)	C 1 8 : 2
3-ヒドロキシ-オクタデカノイルカルニチン	C 1 8 O H
3-ヒドロキシ-オクタデセノイルカルニチン	C 1 8 : 1 O H

[0017] 本発明は、上記安定同位体標識された式1の化合物を含む質量分析用内部標準物質試薬であって、該化合物が溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で、多孔性部材に保持されていることを特徴としている。

式1の化合物の多孔性部材への保持は、該化合物の溶液に多孔性部材を浸漬し、これを乾燥させる方法、該化合物1の溶液を滴下して多孔性部材に浸み込ませ、これを乾燥する方法、多孔性部材に該化合物の溶液をインジェクションすることにより浸み込ませ、これを乾燥する方法、など周知の方法により保持させることが可能である。

式1の化合物の多孔性部材への保持は、部材の全体への保持でもよく、そ

の一部への保持であってもよい。一部への保持の場合、他の一部に化合物 1 以外で同時に溶出させたい物質を保持させることもできる。

多孔性部材に保持されている式 1 の化合物量は、特に限定されていないが 10 ng 以上、1000 ng 以下が好ましい。保持させる化合物量が 10 ng 未満であると、該化合物のろ紙への吸着により、該化合物溶出液の濃度に影響を及ぼす場合がある。逆に保持させる化合物量が 1000 ng より多いと、ろ紙への含浸許容量の上限を超え、該化合物が析出する場合がある。また該化合物溶出液の希釈操作が必要になるなど、かえって操作が煩雑となる場合がある。

安定同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素等の放射性同位体による標識が挙げられ、具体的には、 ^2H 、 ^{13}C 、 ^{15}N 及び ^{18}O からなる群から選ばれる安定同位体が挙げられる。

[0018] 本発明において多孔性部材とは、アシルカルニチンを室温で保存した場合の安定性を損なわないことを限度として、試料抽出液に不溶性で、かつアシルカルニチンを溶液中に溶出可能でかつ乾燥状態で保持できる能力を有していれば制限なく使用することができる。

[0019] 多孔性部材としては公知のものが使用でき、例えばろ紙、不織布、織布又はシート状発泡体等からなる多孔性部材が挙げられる。材質としては、公知の天然高分子及び合成高分子等が使用でき、例えば、綿、羊毛、セルロース、ポリスチレン、ポリオレフィン、ポリウレタン、ニトロセルロース、セルロースアセテート、ポリエステル、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、絹、フィブロイン、リグニン、ヘミセルロース、キチン、エボナイト、ゴム、ガラス、石英及びセラミックス等が挙げられる。これらのうち、天然高分子が好ましく、さらに好ましくはセルロース及び綿であり、特に好ましくはセルロースである。

[0020] ろ紙としては、例えば、JIS P3801 (1995 年) 又は TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry) T205 に規定されるろ紙等が挙げられる。不

織布としては、例えば、ポリオレフィン不織布、ニトロセルロース不織布、セルロースアセテート不織布、ポリエステル不織布、エポキシ不織布、ガラス不織布及びセラミックス不織布等が挙げられる。織布としては、例えば、綿布、羊毛布、セルロース布、ポリオレフィン布、ニトロセルロース布、セルロースアセテート布、エポキシ布、ガラス布及びセラミックス布等が挙げられる。シート状発泡体としては、例えば、発泡ポリスチレン、発泡ポリオレフィン、発泡ポリウレタン、発泡ポリエステル、発泡エポキシ樹脂、発泡ガラス及び発泡セラミックス等が挙げられる。これらのうち、単位体積又は単位面積あたりに吸収する液体の量が一定になりやすいという（定量精度向上）観点から、ろ紙、不織布及びシート状発泡体が好ましく、さらに好ましくはろ紙及び不織布、特に好ましくはろ紙である。

[0021] 多孔性部材の厚さ（mm）は、適宜選択することができるが、0.1以上が好ましく、さらに好ましくは0.2以上、特に好ましくは0.3以上である。また3.0以下が好ましく、さらに好ましくは1.0以下、特に好ましくは0.6以下である。多孔性部材の大きさ（面積）（cm²）は、保管及び輸送時などの操作性を考慮して自由に設定できる。

また、多孔性部材の孔径は自由に設定選択できる。

[0022] 本発明は、内部標準物質試薬は、以下のようにして使用することができる。

検査対象の個体より適宜な方法で採血を行い、ろ紙に血液を浸み込ませ、ろ紙血を作製し乾燥させる。該乾燥したろ紙血をマイクロプレートのウェル（well）に入れた後、本発明の内部標準物質試薬を同じwellに入れ、メタノールを含む試料抽出液をwellに添加し、試料の抽出を行う。検査対象であるアシルカルニチンが抽出された測定試料を質量分析する。

[0023] 上記、試料抽出液は、メタノールを軽水で希釈したものが好適であり、メタノールの濃度は80%以上が好適である。

[0024] 本発明の内部標準物質試薬にはさらに、安定同位体標識された検査対象アミノ酸を溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で前記多孔性部材に保持させること

ができる。こうすることにより、いわゆる有機酸代謝異常の検出とアミノ酸代謝異常の検出に同時に使用することができるので、利便性を向上させることができる。なお、アシルカルニチンと検査対象アミノ酸は、汎用性を考慮し、別々の多孔性部材に保持させ、両多孔性部材を同時に使用することも可能である。

[0025] 本発明において、検査対象アミノ酸とは、アミノ酸代謝異常スクリーニングでの分析項目とされているアミノ酸をいい、表3に記載の1以上をいう。検査対象アミノ酸の多孔性部材への含浸量は、特に限定されず、検出可能な範囲で適宜設定することができる。また、検査対象アミノ酸それぞれで異なる含浸量であってもよい。好ましい含浸量の範囲としては、溶出された時の濃度が $10\mu\text{mol/L}$ 以上 $1000\mu\text{mol/L}$ 以下であり、溶出のために添加する溶媒量に応じて、適宜設定することができる。

[0026] [表3]

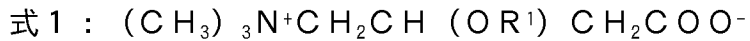
化合物名	略号
Alanine	Ala
Arginine	Arg
Citrulline	Cit
Leucine	Leu
Methionine	Met
Ornithine	Orn
Phenylalanine	Phe
Tyrosine	Tyr
Valine	Val
Serine	Ser
Glycine	Gly
Proline	Pro
Aspartic acid	Asp
Glutamic acid	Glu
Glutamin	Gln
Argininosuccinic acid	—

[0027] 本発明は、上記（1）に記載の質量分析用内部標準物質試薬を含む質量分析用試料前処理キットも提供する。キットの組み合わせとしては、メタノールを含有する試料抽出液、及び／又は安定同位体標識された検査対象アミノ酸が挙げられる。検査対象アミノ酸は、存在形態を問わないが、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で多孔性部材に保持されている状態が好ましい。

[0028] また、本発明は、上記（1）に記載の質量分析用内部標準物質試薬がマイ

クロプレートのウェル中に収納されている、上記（６）に記載の前処理キットも提供する。

[0029] さらにまた、本発明は、安定同位体標識された式１の化合物を、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で、多孔性部材に保持させることを特徴とする、質量分析用内部標準物質試薬の室温保存での安定化方法も提供する。



（式１中、 R^1 は水素原子、又は炭素数２～３０の飽和もしくは不飽和の脂肪酸残基を表し、該脂肪酸残基に結合する水素原子は、酸素原子又はヒドロキシ基で置換されていてもよい。）

実施例

[0030] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0031] 実施例 1

〔内部標準物質溶液：ＩＳ液の調製〕

^2H 標識アセチルアシルカルニチン：Ｃ２（Larodan Fine社、カタログ番号 71-1732）を軽水に溶解し、 $9.12\mu\text{mol/L}$ のＩＳ液を調製した。

〔内部標準物質を保持する担体：ＩＳ試薬の調製〕

上記ＩＳ液 0.03 mL を、ろ紙（アドバンテック東洋社、新生児マスキューニング用）にスポット状に添加し、ドライヤーで乾燥させＩＳ試薬を調製した。調製したＩＳ試薬は、アルミ袋中に、乾燥剤スティックと一緒に密封封入した。

[0032] 〔安定性確認試験〕

上記アルミ袋に封入されたＩＳ試薬を、 45°C で２４時間保存後、後述する性能試験を実施し、保存直前のピーク面積との相対比（残存率％）を求めた。

〔性能試験〕

ＩＳ試薬をパンチにより直径 0.3 cm の円盤状に切断した。該切断した

IS試薬の1片を、マイクロプレートの1wellに投入した。そこに80%メタノールを含む軽水100 μ Lを添加し、45分間静置後、後述するタンデムマス分析を行いピーク面積を算出した。

〔タンデムマス分析方法〕

- (1) タンデムマス装置：4000 Q Trap (AB SCIEX社)
- (2) Ionization mode:ESI
- (3) Ion source:Turbo Ion Spray
- (4) スキャンタイプ:MRM
- (5) Polarity:Positive
- (6) 注入サンプル量：5 μ L

〔比較試験：比較例1〕

上記IS液を、ガラス容器に気密封入し、45℃で、24時間保存後、タンデムマス分析を行いピーク面積を算出し、保存直前のピーク面積との相対比（残存率%）を求めた。成績と比較した。

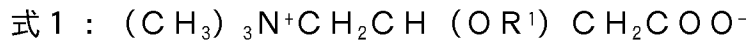
[0033] 実施例1のIS試薬の45℃、24時間保存後の残存率は100%であったが、比較例1のIS液の45℃、24時間保存後の残存率は8%であった。本発明の内部標準物質試薬は、温度安定性に優れていることが確認された。

産業上の利用可能性

[0034] 本発明によれば、使用時に溶解の必要が無く、かつ室温での保存が可能なアシルカルニチン内部標準物質試薬が提供させる。

請求の範囲

[請求項1] 安定同位体標識された式1の化合物が、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で、多孔性部材に保持されていることを特徴とする、質量分析用内部標準物質試薬。



(式1中、R¹は水素原子、又は炭素数2～30の飽和もしくは不飽和の脂肪酸残基を表し、該脂肪酸残基に結合する水素原子は、酸素原子又はヒドロキシ基で置換されていてもよい。)

[請求項2] 安定同位体が、²H、¹³C、¹⁵N及び¹⁸Oからなる群より選ばれる安定同位体である、請求項1に記載の試薬。

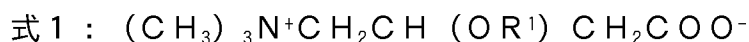
[請求項3] 多孔性部材が、ろ紙、不織布、織布及びシート状発泡体からなる群より選ばれる部材である、請求項1又は2に記載の試薬。

[請求項4] さらに、安定同位体標識された検査対象アミノ酸が、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で当該多孔性部材に保持されている、請求項1乃至3のいずれか1項に記載の試薬。

[請求項5] 請求項1に記載の質量分析用内部標準物質試薬、及びメタノールを含有する試料抽出液もしくは安定同位体標識された検査対象アミノ酸を溶液中に溶出可能かつ乾燥状態に保持している多孔性部材を含む質量分析用試料前処理キット。

[請求項6] 質量分析用内部標準物質試薬がマイクロプレートのウェル(well)中に収納されている、請求項5に記載の前処理キット。

[請求項7] 安定同位体標識された式1の化合物を、溶液中に溶出可能かつ乾燥状態で、多孔性部材に保持させることを特徴とする、質量分析用内部標準物質試薬の室温保存での安定化方法。



(式1中、R¹は水素原子、又は炭素数2～30の飽和もしくは不飽和の脂肪酸残基を表し、該脂肪酸残基に結合する水素原子は、酸素原子又はヒドロキシ基で置換されていてもよい。)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/060100

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/62(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N27/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Ichushi WEB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2008-547031 A (Biocrates Life Sciences AG.), 25 December 2008 (25.12.2008), paragraphs [0020] to [0037], [0071] to [0081], [0089] to [0095]; fig. 1 & JP 2008-547030 A & US 2007/0003965 A1 & US 2007/0004044 A1 & WO 2007/003344 A2 & WO 2007/003343 A1 & EP 1875401 A2 & EP 1897014 A1 & CA 2608963 A1 & CA 2608965 A1 & AU 2006265381 A1 & KR 10-2008-0025092 A & CN 101208697 A & ZA 200709815 A & IL 187470 A & RU 2008102835 A & BR PI0613478 A2 & NZ 563431 A & ES 2452025 T3 & NO 20080559 A & DK 1897014 T3 & DK 1875401 T3	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
19 June 2015 (19.06.15)

Date of mailing of the international search report
30 June 2015 (30.06.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/060100

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/0199102 A1 (PerkinElmer Life Sciences, Inc.), 23 October 2003 (23.10.2003), paragraphs [0018] to [0027] & WO 2001/047470 A2 & EP 1113269 A2 & DE 60031357 T2 & AU 4524601 A & AT 343130 T	1-7
A	Masaki TAKAYANAGI, "Abnormalities of carnitine metabolism in human diseases", Journal of Analytical Bio-science, 30 September 2012 (30.09.2012), vol.35, no.4, pages 281 to 292	1-7

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N27/62(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N27/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2015年
日本国実用新案登録公報	1996-2015年
日本国登録実用新案公報	1994-2015年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
医中誌 WEB (Ichushi WEB)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2008-547031 A (バイオクラテス ライフ サイエンシズ アク チェンゲゼルシャフト) 2008.12.25, 段落 [0020]-[0037], [0071]-[0081], [0089]-[0095], 第 1 図 & JP 2008-547030 A & US 2007/0003965 A1 & US 2007/0004044 A1 & WO 2007/003344 A2 & WO 2007/003343 A1 & EP 1875401 A2 & EP 1897014 A1 & CA 2608963 A1 & CA 2608965 A1 & AU 2006265381 A1 & KR 10-2008-0025092 A & CN 101208697 A & ZA 200709815 A & IL 187470 A & RU 2008102835 A & BR PI0613478 A2 & NZ 563431 A & ES 2452025 T3	1-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.06.2015

国際調査報告の発送日

30.06.2015

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

藤田 都志行

2W

3014

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	& NO 20080559 A & DK 1897014 T3 & DK 1875401 T3 US 2003/0199102 A1 (PerkinElmer Life Sciences, Inc.) 2003.10.23, 段落 [0018]-[0027] & WO 2001/047470 A2 & EP 1113269 A2 & DE 60031357 T2 & AU 4524601 A & AT 343130 T	1-7
A	高柳 正樹, 「カルニチンの臨床」, 生物試料分析, 2012.09.30, Vol. 35, No. 4, p. 281-292	1-7