

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5539724号  
(P5539724)

(45) 発行日 平成26年7月2日(2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日(2014.5.9)

(51) Int.Cl. F I  
GO 1 N 33/48 (2006.01) GO 1 N 33/48 B

請求項の数 9 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2009-538589 (P2009-538589)	(73) 特許権者	507006422
(86) (22) 出願日	平成19年11月30日(2007.11.30)		スタテンス セールム インスティトゥー ト
(65) 公表番号	特表2010-511154 (P2010-511154A)		デンマーク王国 コペンハーゲン エス 2300, アルティラリイベイ 5
(43) 公表日	平成22年4月8日(2010.4.8)	(74) 代理人	100096024
(86) 国際出願番号	PCT/DK2007/000528		弁理士 柏原 三枝子
(87) 国際公開番号	W02008/064684	(74) 代理人	100125520
(87) 国際公開日	平成20年6月5日(2008.6.5)		弁理士 高橋 剛一
審査請求日	平成22年11月30日(2010.11.30)	(74) 代理人	100155310
(31) 優先権主張番号	PA200601587		弁理士 柴田 雅仁
(32) 優先日	平成18年12月1日(2006.12.1)	(72) 発明者	ハウエン, グンナー
(33) 優先権主張国	デンマーク (DK)		デンマーク王国 ヴィルム ディーケー 2830, ウイナービューエン 14

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 濾紙上のサンプル吸着を用いたスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液又は他の生体液サンプルを試験化合物と混合するステップと、  
血液又は他の生体液サンプルに対する試験化合物の効果として、血液又は他の生体液サンプルの組成の変化を後に分析するために、該血液又は他の生体液サンプルと試験化合物を混合したものを濾紙上にスポットするステップとを含むテスト方法。

【請求項 2】

前記生体液が、脳脊髄液、腹水、嚢胞液、羊水、洗浄液、唾液、細胞抽出物又は組織抽出物である、請求項 1 に記載のテスト方法。

【請求項 3】

前記試験化合物が、血液又は他の生体液サンプルにその組成が変化を起こす影響を与える、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、炭水化物、オリゴ糖、多糖、糖タンパク質、脂質、リポタンパク質、グリコサミノグリカン、ホルモン、ステロイド、ビタミン、低分子量合成化合物の中から選択される、請求項 1 又は請求項 2 に記載のテスト方法。

【請求項 4】

前記試験化合物が、毒素、アレルゲン、自己抗原、細菌タンパク質若しくは多糖、ウイルスタンパク質、真菌タンパク質若しくは多糖、寄生虫タンパク質若しくは多糖、又は細菌リポ多糖である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のテスト方法。

【請求項 5】

前記サンプルが、サイトカイン、ケモカイン及び増殖因子並びに / 又は神経伝達物質又

10

20

は他のポリペプチド及びタンパク質の含有量に関して分析される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載のテスト方法。

【請求項 6】

前記サンプルが、CRP、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、抗原特異的な抗体、トランスフェリン、アルブミン及び/又はトランスサイレチンのような臨床パラメータの含有量に関して分析される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のテスト方法。

【請求項 7】

前記試験化合物の効果が、免疫測定法、生物検定法、質量分析法、HPLC、GC、GC-MSによって分析される、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のテスト方法。

【請求項 8】

前記分析方法が、ELISA法、FLISA法、DELFLIA法、Luminex法(登録商標)、発光アッセイ、電気化学発光アッセイ、シンチレーション近接アッセイ、放射免疫測定法、MALDI-MS、ESI-MS及びDESI-MSである、請求項 7 に記載のテスト方法。

【請求項 9】

血液又は他の生体液サンプルを試験化合物と混合するステップと、

血液、生体液又はサンプルに対する試験化合物の効果として血液又は他の生体液サンプルの組成の変化を後に分析するに先立って、貯蔵、輸送及び/又は出荷のために該血液又は他の生体液サンプルと試験化合物を混合したものを濾紙上にスポットするステップとを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液又は他の生体液若しくはサンプルを試験化合物と混合し、血液又は生体液サンプルに対する試験化合物の効果を後に分析するために、該血液を濾紙上にスポットする診断試験及び方法を開示する。

【背景技術】

【0002】

血液は、血漿及び細胞からなる複合混合物である(参考文献1~3)。血漿は、遠心分離法及び他の技術により細胞から分離され得る。血漿は、放置されると凝集により凝固し、血清が血塊から分離し得る。凝集は、EDTA、EGTA、ヘパリン、クエン酸塩及び他を含む種々の抗凝固剤を添加することにより抑制することができる。血液の細胞は、樹状細胞、マクロファージ、単球、好中球、Tリンパ球、Bリンパ球、ナチュラルキラー細胞、赤血球、及び造血性幹細胞を含む種々の幹細胞を含んでいる。加えて、巨核球由来の血小板が多数存在している。血漿は、数千種のタンパク質、原則としてヒトプロテオームの任意のタンパク質を含んでいる(参考文献4、5)。数種のタンパク質は、輸送、血液凝固又は免疫防御に関与する一方、他は血液細胞と組織細胞間の情報伝達分子として機能する。詳細には、免疫系の細胞(樹状細胞、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞)の活性は、情報伝達分子(例、インターロイキン、ケモカイン、増殖因子)、組織抗原及び受容体の複合ネットワークにより調節されている(参考文献3、6~9)。免疫系細胞の活性及び特異性は、数種の方法及びアッセイにより検査及び定量することができる。T細胞、B細胞及び他の細胞は、細胞表面マーカー分子に対する抗体を使用して蛍光活性化細胞選別により定量することができる(参考文献10、11)。特定のT細胞は、細胞毒性試験、クロム放出アッセイ及びサイトカイン放出アッセイ(例、ELISPOT)により(参考文献12~16)、並びに種々のタンパク質-主要組織適合性抗原(MHC)タンパク質構築物を使用することにより評価することができる(参考文献17、18)。B細胞の活性は、B細胞から放出される特定の抗体のレベルを測定することにより評価することができる(参考文献19、20)。

【0003】

血液細胞から放出される情報伝達分子の測定における主な問題点は、定量に関わる貯蔵

10

20

30

40

50

及び輸送である。多数の血液成分（例、サイトカイン）が不安定であり、短命なため、インキュベーション、貯蔵及び輸送中に分解する。そのため、比較分析及び診断試験は、中央研究所内で血液収集及びインキュベーションした直後に行う必要がある。理想的には、比較すべき全サンプルは、目盛り付き器具を使用して連続的に分析される必要がある。

【0004】

このことは、例えば遠隔地域で血液サンプルを採取する場合、インビトロ及びインビボでの時間研究を行う場合、又は多数の異なる個人由来のサンプルを比較する場合に、必ずしも実用的ではない。この問題に対する一つの解決法は、サンプルを輸送及び貯蔵のために冷凍することである。しかしながら、これは成分が保存されることを保証するものではなく、大きな冷凍、輸送及び貯蔵容量を必要とし、分析を行う度に解凍を必要とし、電力供給不足に関し脆弱である。そのため、信頼できる血液及び生体サンプルの保存方法が必要とされ、また信頼できるサンプル保存をサンプル操作と組み合わせて使用する診断試験が必要とされている。

10

【0005】

例えば新生児の血液サンプルを先天性代謝疾患に関して分析するなど、後に続く分析のために濾紙を使用して血液をスポットすることは周知である（21）。このことの利点は、血液成分の保存が良好で、輸送が簡単であり、長期間の貯蔵が容易なことである。しかしながら、試験化合物とのインキュベーション後に、血液サンプルを乾燥及び貯蔵するために濾紙を使用すること、及びそれと類似した方法は、おそらくそれが不可能又は非実用的と予想されるため、これまで使用又は記載されていなかった。

20

【発明の概要】

【0006】

本発明は、血液又は他の生体液を試験化合物と混合し、乾燥、貯蔵、及び以後任意の時間において血液に対する試験化合物の効果を後に分析するために、該血液を濾紙上にスポットする診断試験及び方法を開示する。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明は、血液又は他の生体液サンプルを試験化合物と混合し、血液に対する試験化合物の効果を後に分析するために、該血液を濾紙上にスポットすることを含む診断試験及び診断方法を開示する。生体液は、脳脊髄液、腹水、嚢胞液、羊水、洗浄液、唾液、細胞抽出物又は組織抽出物であってもよい。化合物は、血液にその組成が変化を起す影響を与える、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、炭水化物、オリゴ糖、多糖、糖タンパク質、脂質、リポタンパク質、グリコサミノグリカン、ホルモン、ステロイド、ビタミン、低分子量合成又は天然化合物、例えば毒素、アレルゲン、自己抗原、細菌タンパク質若しくは多糖、ウイルスタンパク質、真菌タンパク質若しくは多糖、寄生虫タンパク質若しくは多糖、細菌リボ多糖、又は疾病に関連した任意の他の化合物の中から選択される。

30

【0008】

本発明による診断試験及び診断方法は、サンプルを、サイトカイン、ケモカイン及び増殖因子並びにノ又は神経伝達物質並びに他のポリペプチド及びタンパク質、例えばCRP、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、特異的な（即ち、抗原特異的な）抗体、トランスフェリン、アルブミン及びノ又はトランスサイレチンの含有量に関して分析する。

40

【0009】

本診断試験において、試験化合物の効果は、免疫測定法、生物検定法、質量分析法、HPLC、GC、GC-MS、例えばELISA法、FLISA法、DELFI A法、Luminex法（登録商標）、発光アッセイ、電気化学発光アッセイ、シンチレーション近接アッセイ、放射免疫測定法、MALDI-MS、ESI-MS及び環境-MS（例、DESI-MS）により分析される。

【0010】

本発明は、血液又は他の生体液若しくはサンプルを試験化合物と混合し、血液、生体液又はサンプルに対する試験化合物の効果を後に分析するに先立って、貯蔵、輸送及びノ又

50

は出荷のために該混合物を濾紙上にスポットする方法も開示する。

【 0 0 1 1 】

定義：

分析物とは、分析手段により検出又は定量し得る任意の化合物を意味する。

【 0 0 1 2 】

試験化合物の効果によって、血液又は任意の他の生体液若しくはサンプルの成分と試験化合物が相互作用して、任意の種類血液組成が変化を起こすことが理解される。

【 0 0 1 3 】

乾燥は、水の除去を意味する。

【 0 0 1 4 】

濾紙は、血液の収集、乾燥及び貯蔵に適した、任意の一枚の紙、布又は他の材料を意味する。

【 0 0 1 5 】

P K U紙は、新生児由来の血液サンプルのフェニルケトン尿症候群に関するスクリーニングに使用される紙 / 濾紙を意味する。

【 0 0 1 6 】

スポット形成とは、血液サンプル又は任意の他の生体液若しくは抽出物若しくはサンプルを、正確な血液サンプル採取に適した一枚の標準化された紙に適用することを意味する。スポット形成は、固定容積の血液を一枚の紙に適用するか、又は規定面積が血液で覆われる迄、血液を紙に適用することにより行われる。続いて、紙を完全に乾燥させ、後の分析のために直ちに低湿度条件下で貯蔵するか、又は貯蔵場所に輸送する。

【 0 0 1 7 】

試験化合物とは、血液若しくは任意の他の生体液若しくはサンプルと混合され、又は血液若しくは任意の他の生体液若しくはサンプルに添加され得る、化学的、生物学的又は物理的な任意の化合物又は物質を意味する。

【 0 0 1 8 】

試験サンプルとは、試験化合物の任意の調合物又は混合物を意味する。

【 0 0 1 9 】

以下の略語が使用される：

B C Gは、カルメット・ゲラン桿菌 ( B a c i l l u s C a l m e t t e - G u e r i n ) を意味する。

B D N Fは、脳由来神経栄養因子を意味する。

B S Aは、ウシ血清アルブミンを意味する。

C R Pは、C反応性タンパク質を意味する。

D B S Sは、乾燥された血液スポットサンプルを意味する。

E G Fは、上皮増殖因子を意味する。

E L I S Aは、酵素免疫吸着測定を意味する。

E L I S P O Tは、酵素結合免疫スポット法を意味する。

E S Iは、エレクトロスプレーイオン化を意味する。

F L I S Aは、固相蛍光免疫検定を意味する。

G Cは、ガスクロマトグラフィーを意味する。

G - C S Fは、顆粒球コロニー刺激因子を意味する。

G M - C S Fは、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を意味する。

H P L Cは、高速液体クロマトグラフィーを意味する。

I F Nは、インターフェロンを意味する。

I gは、免疫グロブリンを意味する。

I G F、インスリン様増殖因子を意味する。

I l は、インターロイキンを意味する。

L P Sは、リポ多糖を意味する。

M A L D Iは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法を意味する。

10

20

30

40

50

M - C S F は、マクロファージコロニー刺激因子を意味する。  
 M C P は、単球走化性タンパク質を意味する。  
 M H C は、主要組織適合性抗原を意味する。  
 M I F は、マクロファージ遊走阻止因子を意味する。  
 M I P は、マクロファージ炎症 / 抑制タンパク質を意味する。  
 M M P は、マトリックスメタロプロテアーゼを意味する。  
 M S は、質量分析を意味する。  
 N T は、ニューロトロフィンを意味する。  
 P B S は、リン酸緩衝生理食塩水を意味する。  
 P C R は、ポリメラーゼ連鎖反応を意味する。  
 P K U は、フェニルケトン尿症を意味する。  
 P P D は、精製タンパク誘導体を意味する。  
 T G F は、トランスフォーミング増殖因子を意味する。  
 T N F は、腫瘍壊死因子を意味する。  
 T R E M は、骨髄細胞に発現する誘発性受容体を意味する。  
 V E G F は、血管内皮増殖因子を意味する。

10

## 【 0 0 2 0 】

本発明は、試験化合物と血液サンプル又は任意の他の生体液若しくはサンプル間の反応を開始させ、反応を所定時間進行させた後、試験サンプルを濾紙上にスポットし及び / 又は濾紙上で乾燥することにより停止させ、次に該濾紙を血液、生体液又はサンプル及びそれらの成分のいずれかに対する試験化合物の効果の後の分析のために使用する診断方法を開示する。

20

## 【 0 0 2 1 】

好ましい実施態様において、血液サンプル（例、10 ml）は、標準的な抗凝固 E D T A、ヘパリン又はクエン酸塩血液容器若しくはガラス製品を用いてヒトから採取される。血液サンプルを2つのアリコートに分割し、試験化合物を血液アリコートの一方向に加えるとともに、他方のアリコートを、緩衝液 / 試験化合物を溶解した溶液のみを加えた対照リファレンスとして使用する。試験化合物は、血液に直接溶解されるべき固体粉末として添加してもよい。血液サンプルを周囲室温又は規定温度（例、5、20、37）で、混合若しくは攪拌しながら、又は混合若しくは攪拌せずにインキュベートする。所定の時間間隔（例、0、1分、2分、5分、10分、20分、30分、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、10時間、15時間、20時間、24時間、48時間）にて、血液サンプルからアリコートを採取し、濾紙（例、P K U紙）上にスポットし、出来る限り急速に乾燥させる。乾燥後、濾紙を分析のために直ちに使用し又は後の分析のために貯蔵し得る。特定の実施態様において、濾紙は、研究所内で貯蔵又は分析されるに先立って、（例えば普通郵便により）ある距離を輸送されてもよい。

30

## 【 0 0 2 2 】

血液のスポット形成、乾燥及び貯蔵は、以下のように行われる：毛細管、ピペット又は同様の物を用いて血液を濾紙上に一層にてスポットし、室温にて、例えば良く換気されたフード内又は周囲場所内で乾燥する。貯蔵のために、濾紙を紙封筒、プラスチック袋又は同様の容器内、好ましくは湿度を出来る限り低く保つために気密容器内に保管し得る。- 20 以下の貯蔵温度が好ましいが、紙が乾燥した状態に保たれる限り室温も可能である。しかしながら、サンプルの劣化を避けるために、低湿度状態に保たれることを条件として、貯蔵は周囲温度又は0未満の温度（例、- 20、- 50、- 80、- 180）で実施し得る。サンプルは、延長期間（例、数か月～数年）貯蔵することができる。

40

## 【 0 0 2 3 】

試験化合物は、血液にその組成が測定可能な変化を起こす影響を与える任意の化合物（例、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、炭水化物、オリゴ糖、多糖、糖タンパク質、脂質、リポタンパク質、グリコサミノグリカン、ホルモン、ステロイド、ビタミン、低分子量合成又は天然化合物）であってもよい。

50

## 【0024】

特に有用な試験化合物は、毒素、アレルゲン、自己抗原、細菌タンパク質及び多糖、ウイルスタンパク質、真菌タンパク質及び多糖、寄生虫タンパク質及び多糖、細菌リポ多糖、並びに疾病に関連した任意の他の化合物である。これらの試験化合物の使用は、所定の化合物が細胞に、及び細胞間の情報伝達にいかに関与するかの重要な知識を導くと思われる。

## 【0025】

一実施態様において、本診断試験及び診断方法は、例えば毒性試験プログラム又は前臨床試験プログラムの一部として、血液に対する毒性化合物の効果を測定するために使用される。

10

## 【0026】

乾燥された血液サンプルは、多数の異なる技術（例、免疫測定法、生物検定法、質量分析法、HPLC、GC、GC-MS）により分析され得る。好ましい分析方法は、ELISA法、FLISA法、DELFLIA法、Luminex法（登録商標）、発光アッセイ、電気化学発光アッセイ、シンチレーション近接アッセイ、放射免疫測定法、MALDI-MS、ESI-MS、PCRである。

## 【0027】

DBSSの抽出は、任意の適切な緩衝液又は溶媒を用いて実施し得る。好ましい実施態様において、例えば直径3.2mmの濾紙円盤をDBSSから又は濾紙上の基準物質から型抜きし、マイクロタイターウェル内に共に配置する。140µl又は180µl（各々、二重又は三重測定用）の抽出緩衝液、アッセイ緩衝液（0.5% Tween 20及び1% BSAを含有するPBS）25ml当たり1錠を溶解した「エチレンジアミン四酢酸（EDTA）を含む完全プロテアーゼ阻害剤カクテル」（ロシュ、ドイツ）を含有するPBSを各ウェルに加え、分析物を光から保護しながら、室温にて600rpmに設定したプレートシェーカー上で60分間抽出する。

20

## 【0028】

本発明の一実施態様において、分析物はLuminex法（登録商標）により以下のように測定される：製造業者の指示に従い、捕捉抗体をカルボキシル化ビーズ（ルミネックス社、米国テキサス州オースティン）に結合させる：2.5×10<sup>6</sup>ビーズを活性化緩衝液（0.1mol/lリン酸ナトリウム、pH6.2）で2回洗浄し、活性化緩衝液80µl中に再懸濁し、ビーズの均質な分配が観察される迄超音波処理する。両方とも活性化緩衝液中で50mg/mlに希釈された、N-ヒドロキシルホスホスチンイミド（ピアス、米国ロックフォード製のスルホ-NHS）溶液10µlと塩酸1-エチル-3（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド（ピアス製のEDC）10µlを加えて反応を安定化し、ビーズを活性化する。混合した後、ビーズを暗所内にて室温で回転させて20分間インキュベートする。続いて、活性化ビーズを結合緩衝液（coupling buffer）（mmol/l 2（N-モルホリノエタンスルホン酸、MES）、pH5.0）で洗浄し、捕捉抗体のアジ化物フリー溶液（100µg/ml）500µlを加え、回転させながら2時間又は一夜インキュベートする。抗体からアジ化物を透析により（ピアス製のSlide-A-Lyzer（登録商標）透析カセット、MWCO=10000）4で一夜、PBS 3l中に除去する。インキュベーション後、ビーズを洗浄緩衝液（0.05% Tween 20を含有するPBS）で洗浄し、ブロッキング/貯蔵緩衝液（1%ウシ血清アルブミン（BSA）及び0.05%アジ化ナトリウムを含有するPBS）75µl中に再懸濁する。

30

40

## 【0029】

ビーズを血球計数器で計数し、ブロッキング/貯蔵緩衝液を用いて濃度20×10<sup>6</sup>ビーズ/mlに調整し、光から保護した状態で2~8で貯蔵する。

## 【0030】

アッセイ手順は、以下のように行われる：濾板（MultiScreen MABVN 1.2µm 96ウェル、ミリポア、米国パーリントン）をアッセイ緩衝液（0.5%

50

Tween 20及び1% BSAを含有するPBS)で予め湿潤させることにより準備する。各ウェルに、抽出後マイクロタイターウェルからピペットで取ったサンプル50 $\mu$ l(100 $\mu$ lを2分割、又は150 $\mu$ lを3分割)と、捕捉抗体結合ビーズの懸濁液50 $\mu$ lとを、1%モルモット/ブタ血清(1:1)を含有するアッセイ緩衝液中、分析物当たり1500ビーズで加える。捕捉抗体は、1/2時間のインキュベーション中、それらの対応する抗原と反応し、未結合材料は、それをMultiScreen Vacuum Manifold(ミリポア)を使用してウェルを通して濾過することによりビーズから除去される。ビーズをウェル当たり200 $\mu$ lの洗浄緩衝液(0.5% Tweenを含有するPBS)を用いて、2回洗浄する。今捕捉した抗原を、各々アッセイ緩衝液中で1:1000に希釈したビオチン化検出抗体の混合物(50 $\mu$ l)と1/2時間反応させる。アッセイ緩衝液中20 $\mu$ g/mlのストレプトアビジン-フィコエリスリン(モレキュラープローブ、オランダ)50 $\mu$ lをウェルに加え、インキュベーションを更に30分間継続する。ビーズを最後に洗浄緩衝液200 $\mu$ lで2回洗浄し、緩衝液125 $\mu$ l中に再懸濁する。15分間振とうした後、サンプルを製造業者の指導に従って、Luminesx 100(登録商標)上で分析する。

10

**【0031】**

好ましい実施態様において、サンプルは、サイトカイン、ケモカイン及び増殖因子(例、例えばIL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26等のインターロイキン、IFN、TNF、MCP、MIP、MMP-9、TREM、M-CSF、G-CSF、GM-CSF、例えばCC、CXC等のケモカイン、例えばTGF $\beta$ 、TGF $\beta$ 、EGF、VEGF、IGF I、IGF II等の増殖因子、インスリン、例えばヒスタミン、プロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサン等の炎症メディエータ)並びに/又は神経伝達物質の含有量に関して分析される。

20

**【0032】**

別の一実施態様において、サンプルは、例えばCRP、IgG、IgA、IgM、IgD、IgE、特異的な(即ち、抗原特異的な)抗体、トランスフェリン、アルブミン、トランスサイレチン等の標準的及び特異的な臨床パラメータに関して分析される。

30

**【0033】**

別の一実施態様において、分析されるべき生体液は、脳脊髄液、腹水、嚢胞液、羊水、洗浄液、唾液、細胞抽出物又は組織抽出物である。

**【0034】**

更に別の一実施態様において、細胞源は、細胞株又は単離された血液細胞、操作された細胞、トランスジェニック細胞、トランスフェクト細胞、又は任意の細胞型若しくは改変若しくは操作された細胞型である。

**【0035】**

本発明は、トランスジェニック動物を含む任意の種及び型の動物(例、ヒト、サル、マウス、ラット、雌ウシ、イヌ、ウマ、ネコ、トリ、魚及び任意の他の種)由来の血液及び他の体液並びに組織抽出物に適用することができる。

40

**【0036】**

特別な実施態様において、試験化合物を固体表面(例、濾紙)上に固定化し、次に血液サンプル又は生体液若しくは抽出物と共にインキュベートする。インキュベーション後、濾紙を乾燥させるか、又は血液を濾紙上にスポットし乾燥する。

**【0037】**

本発明の特定の使用において、血液、生体液又は抽出物の容積は、固定化化合物又は溶液中の化合物と一定時間相互作用するとともに、同時に濾紙上で乾燥するように調整される。

**【0038】**

50

本発明の一つの使用において、生きた被験者又は患者に試験化合物を注入し、被験者から血液サンプルを所定の時間間隔にて採取し、濾紙上にスポットし、乾燥し、後に分析する。

【0039】

血液サンプルは、標準的な針及び器具を使用して被験者から採取されてもよく、熟練した職員により行われる。しかしながら、血液の採取は、地方での個々のサンプル採取を可能にする装置により行われてもよい。

【実施例】

【0040】

実施例1 血液の採取、インキュベーション、スポット形成、乾燥及び貯蔵

10

滅菌針及び注射器を用いて、被験者から血液10mlを抗凝固剤入り試験管内に採取する。滅菌した抗凝固剤入り試験管を用いて、該血液を1mlのアリコートに分割する。一サンプルから血液サンプルを、マークした円形が満たされる迄、紙上に直接スポットする(使用した容積は、約0.2ml)。他方の試験管に、試験するべきサンプルを所定の濃度にて加え、試験管を37℃又は周囲温度で1時間インキュベートさせる。次に、各々からサンプル0.2mlを濾紙上にスポットする。毛細管、ピペット又は同様物を用いて血液サンプルを濾紙上に一層にてスポットし、室温にて、例えば良く換気されたフード内又は周囲場所内で乾燥する。次に、紙が乾燥した状態を保つように、サンプルを-20℃又は室温にて低湿度下で貯蔵する。この目的のために、通常の冷凍庫を使用してもよく、また紙を封筒又はデシケーター内に保管してもよい。

20

【0041】

実施例2 濾紙の抽出及び分析

直径3.2mmの2枚の濾紙円盤をDBSSから又は濾紙上の基準物質から型抜きし、マイクロタイターウェル内に共に配置する。140µl又は180µl(各々、二重又は三重測定用)の抽出緩衝液、アッセイ緩衝液(0.5%Tween20及び1%BSAを含有するPBS)25ml当たり1錠を溶解した「エチレンジアミン四酢酸(EDTA)を含む完全プロテアーゼ阻害剤カクテル」(ロシュ、ドイツ)を含有するPBSを各ウェルに加え、分析物を光から保護しながら、室温にて600rpmに設定したプレートシェーカー上で60分間抽出する。

【0042】

30

実施例3 LumineX法(登録商標)

抗体のビーズに対する結合:

製造業者の指示に従い、捕捉抗体をカルボキシル化ビーズ(ルミネックス社、米国テキサス州オースティン)に結合させる: 2.5×10<sup>6</sup>ビーズを活性化緩衝液(0.1mol/lリン酸ナトリウム、pH6.2)で2回洗浄し、活性化緩衝液80µl中に再懸濁し、ビーズの均質な分配が観察される迄超音波処理する。両方とも活性化緩衝液中で50mg/mlに希釈された、N-ヒドロキシスルホスクシンイミド(ピラス、米国ロックフォード製のスルホ-NHS)溶液10µlと塩酸1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(ピラス製のEDC)10µlを加えて反応を安定化し、ビーズを活性化する。混合した後、ビーズを暗所内にて室温で回転させて20分間インキュベートする。続いて、活性化ビーズを結合緩衝液(2mmol/l(N-モルホリノエタンシルホン酸、MES)、pH5.0)で洗浄し、捕捉抗体のアジ化物フリー溶液(100µg/ml)500µlを加え、回転させながら2時間又は一夜インキュベートする。抗体からアジ化物を透析により(ピラス製のSlide-A-Lyzer(登録商標)透析カセット、MWCO=10000)、4℃で一夜、PBS3l中に除去する。インキュベーション後、ビーズを洗浄緩衝液(0.05%Tween20を含有するPBS)で洗浄し、ブロッキング/貯蔵緩衝液(1%ウシ血清アルブミン(BSA)及び0.05%アジ化ナトリウムを含有するPBS)75µl中に再懸濁する。

40

【0043】

ビーズを血球計数器で計数し、ブロッキング/貯蔵緩衝液を用いて濃度20×10<sup>6</sup>ビ

50

ーズ/mlに調整し、光から保護した状態で2～8 で貯蔵する。

【0044】

実施例4 アッセイ手順：

濾板 (Multi Screen MABVN 1.2 μm 96 ウェル、ミリポア、米国パーリントン) をアッセイ緩衝液 (0.5% Tween 20 及び 1% BSA を含有する PBS) で予め湿潤させることにより準備する。各ウェルに、抽出後マイクロタイターウェルからピペットで取ったサンプル 50 μl (100 μl を 2 分割、又は 150 μl を 3 分割) と、捕捉抗体結合ビーズの懸濁液 50 μl とを、1% モルモット/ブタ血清 (1:1) を含有するアッセイ緩衝液中、分析物当たり 1500 ビーズで加える。捕捉抗体は、1 1/2 時間のインキュベーション中、それらの対応する抗原と反応し、未結合材料は、それを Multi Screen Vacuum Manifold (ミリポア) を使用してウェルを通して濾過することによりビーズから除去される。ビーズをウェル当たり 200 μl の洗浄緩衝液 (0.5% Tween を含有する PBS) を用いて、2 回洗浄する。今捕捉した抗原を、各々アッセイ緩衝液中で 1:1000 に希釈したビオチン化検出抗体の混合物 (50 μl) と 1 1/2 時間反応させる。アッセイ緩衝液中 20 μg/ml のストレプトアビジン-フィコエリスリン (モレキュラープローブ、オランダ) 50 μl をウェルに加え、インキュベーションを更に 30 分間継続する。ビーズを最後に洗浄緩衝液 200 μl で 2 回洗浄し、洗浄緩衝液 125 μl 中に再懸濁する。15 分間振とうした後、サンプルを製造業者の指示に従い、Luminex 100 (登録商標) 上で分析する。

10

20

【0045】

実施例5 Gc グロブリン、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド及びリポ多糖 (LPS) のサイトカイン放出に関する試験

以下の8種の溶液を、異なるヒト由来の血液と混合し、37 でインキュベートする：

【0046】

- 1) EDTA - 血液 (ヒト X) 1 ml + Gc バッチ 11 30 μl
- 2) EDTA - 血液 (ヒト X) 1 ml + Gc バッチ 13 30 μl
- 3) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + Gc バッチ 11 30 μl
- 4) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + Gc バッチ 13 30 μl
- 5) EDTA - 血液 (ヒト X) 1 ml + PBS 30 μl
- 6) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + PBS 30 μl
- 7) EDTA - 血液 (ヒト X) 1 ml + Gc バッチ 11 30 μl + 肺炎桿菌 (Klebsiella pneumoniae) 由来の LPS (5 mg/ml) 50 μl
- 8) EDTA - 血液 (ヒト X) 1 ml + 肺炎桿菌由来の LPS (5 mg/ml) 50 μl
- 9) EDTA - 血液 (ヒト Z) 1 ml + ジフテリアトキソイド (5.78 mg/ml) 30 μl
- 10) EDTA - 血液 (ヒト Z) 1 ml + 破傷風トキソイド (993 Lf/ml) 30 μl
- 11) EDTA - 血液 (ヒト Z) 1 ml + 肺炎桿菌由来の LPS (5 mg/ml) 30 μl
- 12) EDTA - 血液 (ヒト Z) 1 ml + ネズミチフス菌 (Salmonella typhimurium) 由来の LPS (5 mg/ml) 30 μl
- 13) EDTA - 血液 (ヒト Z) 1 ml + milliQ 水 30 μl

30

40

【0047】

1 分 (A)、2 時間 (B)、24 時間 (C) 及び 48 時間 (D) 後、8 種の溶液の各 180 μl を濾紙上にスポットし、乾燥させる。後にサンプルを (-20 で 14 日間貯蔵した後)、Luminex (登録商標) 技術を用いてサイトカイン含有量に関して分析する (22)。結果を表 1 に示す。表から、LPS は IL-1b、IL-6、IL-8、MIP-1a、MIP-1b の多大な増加を誘く一方、他の分析物に関して少量であるが統

50

計的に有意な変化が見られることが分かる。ジフテリアトキソイドは、M I P - 1 b の増加を導く。

【 0 0 4 8 】

表 1 G c グロブリン、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド及びリポ多糖 ( L P S ) のサイトカイン放出に関する試験 ( 詳細には、実施例 5 を参照 )

結果は全て、特に記載がない限り、p g / m l で表す。

【 0 0 4 9 】

【 表 1 】

Ana-lyte	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-17	IL-18	sIL-6ra ng/ml	IFN- g	TNF-a	TNF-b	MCP- 1	TGF-b
1A	120	33	18	57	62	155	297	104	188	3674	1269,4	137	137	470	1795	828
1B	71	26	14	55	52	148	289	91	138	2985	970,3	96	105	427	1462	594
1C	111	31	24	48	35	7592	289	89	191	2357	695,2	36	85	519	1339	616
1D	101	17	20	60	42	5680	279	89	156	1444	620,4	75	88	355	1296	1007
2A	10	30	11	47	35	124	232	71	140	2818	900,9	39	69	503	1442	560
2B	47	21	18	49	44	210	232	80	163	2637	902,8	60	78	427	1296	700
2C	73	25	22	61	46	8471	258	93	161	2802	874,9	119	90	503	1391	937
2D	104	34	21	45	35	7588	262	78	115	1758	799,5	84	76	412	800	789
3A	<3	9	6	20	4	25	45	12	101	1502	516,9	24	17	213	889	91
3B	45	12	8	35	36	50	258	73	147	1600	498,1	28	70	434	903	430
3C	38	17	7	30	18	1956	80	25	101	1050	395,5	11	48	293	597	282
3D	55	15	6	40	43	2882	129	53	135	732	402,8	39	72	149	737	458
4A	69	24	7	44	38	77	272	102	138	2308	769,9	107	115	358	1472	557
4B	38	16	13	39	29	69	120	17	117	2003	613,8	28	56	332	1569	255
4C	43	25	18	36	47	2456	117	64	182	1317	537,8	30	102	351	903	477
4D	8	7	16	37	17	3346	43	39	94	727	430,0	15	70	165	597	414
5A	32	21	16	19	20	84	80	60	133	2535	876,4	39	95	427	1616	490
5B	25	22	11	29	18	110	67	25	122	2581	870,3	46	65	383	1391	446
5C	1	4	12	26	<3	3695	23	<3	70	1874	636,0	<3	26	261	889	273
5D	69	19	21	43	16	6488	166	44	122	1543	735,2	25	74	204	1540	870
6A	20	15	7	25	22	94	155	69	133	1980	651,5	74	105	284	1401	479
6B	45	24	16	37	44	68	82	80	152	1980	600,3	60	86	289	1124	506
6C	30	8	8	36	20	3055	61	2	67	1058	411,7	29	48	104	889	417
6D	<3	<3	<3	<3	<3	1781	<3	<3	<3	155	138,1	<3	<3	<6	<6	<50
7A	<3	24	15	24	26	81	115	27	124	2213	802,3	11	38	332	1472	183
7B	1223	25	24	28	578	2982	84	78	165	2234	712,3	14	724	371	1172	446
7C	14429	20	23	36	14077	13606	204	115	244	2686	706,2	964	1399	418	1422	529
7D	9413	15	15	39	11048	15148	117	108	228	1567	540,9	468	1020	342	860	594
8A	901	23	15	28	40	237	103	29	152	2627	915,1	41	52	341	1597	450
8B	1584	19	19	40	789	3494	101	66	251	2380	820,7	80	997	518	1328	344
8C	11466	18	26	33	12878	13903	345	119	320	1809	620,1	339	1512	468	1391	705
8D	7402	16	12	23	11902	14428	222	95	219	878	562,9	190	1471	268	753	438
9B	148	33	20	20	21	1785	46	12	88	1058	833,4	<3	81	350	875	624
9C	138	28	23	31	17	10091	3	12	149	1272	724,8	1	95	316	652	894
10B	25	37	22	15	14	383	92	7	106	1042	820,7	4	44	303	931	357
10C	69	28	22	23	11	9921	39	<3	110	987	664,7	6	61	268	56	578
11B	2948	24	43	21	1697	58145	103	78	183	1456	442,1	68	1205	222	489	623
11C	16953	37	24	66	4215	757774	299	73	264	1070	374,1	73	983	274	91	528
12B	1665	26	19	46	1539	16428	25	28	148	1153	382,8	129	844	388	247	479
12C	12805	32	21	39	3715	541309	100	70	268	1450	339,3	80	750	274	680	907
13B	83	17	14	37	<3	252	7	51	70	1017	351,4	27	19	328	389	554
13C	60	29	17	21	<3	67105	2	44	74	1384	361,4	225	40	326	273	508

10

20

30

40

表1は次頁につづく

Analyte	MIP-1a	MIP-1b	MMP-9 µg/ml	TREM-1	BDNF ng/ml	GM-CSF	NT-4	CRP µg/ml	RANTES ng/ml	int.st.dev %
1A	286	1313	1,40	3509	16,2	63	85	0,68	188,0	32
1B	174	1285	1,19	3917	11,2	52	84	0,53	136,8	10
1C	221	1091	1,36	2609	14,2	62	43	0,43	158,3	-7
1D	210	549	1,05	2848	14,2	112	105	0,40	118,8	21
2A	254	1387	1,20	2848	11,9	65	90	0,49	153,0	-4
2B	192	1305	1,12	3001	11,6	88	57	0,53	116,7	7
2C	200	1055	1,33	2925	17,7	88	72	0,52	191,1	20
2D	219	677	1,16	3223	19,1	170	110	0,44	160,8	12
3A	73	852	1,15	2609	6,2	25	35	0,38	55,6	-8
3B	106	1067	1,15	2443	6,9	86	52	0,57	50,2	15
3C	154	627	1,26	2181	8,9	45	40	0,36	57,9	-5
3D	137	193	1,13	2690	8,9	82	47	0,38	51,7	13
4A	192	1124	1,59	3983	10,8	51	100	0,93	97,3	37
4B	112	996	1,51	2609	9,7	60	60	0,48	92,1	9
4C	201	716	1,37	2925	11,0	83	70	0,51	88,8	6
4D	96	199	1,32	1696	11,0	85	53	0,37	82,7	1
5A	192	1327	1,11	1358	11,0	41	43	0,48	127,2	-4
5B	167	1196	1,02	1800	10,9	22	57	0,44	119,8	-7
5C	88	940	1,03	2690	11,8	15	47	0,30	115,6	-6
5D	219	702	1,30	3001	17,4	76	85	0,37	176,5	3
6A	187	919	1,37	3223	9,5	68	74	0,63	84,2	18
6B	214	1087	1,31	3438	8,3	59	82	0,58	70,6	15
6C	118	495	1,19	2090	8,0	<6	42	0,36	59,9	4
6D	<6	<6	0,72	<313	2,9	<6	<3	0,03	20,3	-53
7A	51	1097	0,97	1231	9,2	48	45	0,38	118,4	-41
7B	4706	21819	1,05	<313	10,4	100	55	0,34	129,4	-1
7C	15802	32037	1,05	3076	15,6	76	67	0,34	159,3	-1
7D	15112	29767	0,74	2443	12,6	114	74	0,31	116,9	-4
8A	257	1349	1,09	3438	11,2	70	77	0,42	130,7	-3
8B	5333	24582	1,13	3368	11,8	91	105	0,42	112,4	10
8C	14303	31580	1,04	3296	10,9	100	63	0,36	144,6	2
8D	14937	28500	0,89	1476	13,4	106	30	0,28	106,3	-3
9B	591	6076	1,42	1996	22,8	59	35	0,60	161,3	-1
9C	643	5472	1,28	1476	26,2	83	55	0,55	141,6	-9
10B	96	1099	1,43	2090	20,0	82	53	0,60	154,9	-8
10C	141	950	1,26	1899	23,7	59	55	0,50	137,7	-6
11B	5992	22797	2,10	2920	30,1	14	51	1,08	240,6	10
11C	11035	26838	1,51	2087	32,8	15	63	0,83	183,0	2
12B	4055	19656	1,81	2920	18,8	10	24	0,92	163,0	5
12C	8644	26995	1,45	3257	26,2	23	15	0,76	175,0	-9
13B	142	1351	1,50	2747	16,7	12	35	0,86	159,8	-10
13C	77	1087	1,67	2920	22,9	2	13	0,76	164,7	-2

10

20

30

## 【 0 0 5 0 】

実施例 6 ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、ツベルクリン P P D 及び B C G の  
サイトカイン放出に関する試験

以下の 6 種の溶液を混合し、37 でインキュベートする：

40

## 【 0 0 5 1 】

1) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + ジフテリアトキソイド (5.78 mg/ml) 30 µl

2) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + 破傷風トキソイド (993 Lf/ml) 30 µl

3) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + B C G (4 ~ 16 × 10<sup>6</sup> cfu/ml) 30 µl

4) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + ツベルクリン P P D (0.4 µg/ml) 30 µl

5) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + milliQ 水 30 µl

50

6) EDTA - 血液 (ヒト Y) 1 ml + BCG ワクチン 溶剤 (対照) 30  $\mu$ l  
【0052】

1分 (A)、2時間 (B)、4時間 (C)、6時間 (D) 及び24時間 (E) 後、6種の溶液の各180  $\mu$ lを濾紙上にスポットし、乾燥させる。後にサンプルを(-20で30日間貯蔵した後)、Luminex (登録商標) 技術を用いてサイトカイン含有量に関して分析する(22)。結果を表2に示す。表から、BCGは、対照と比較してIL-8及びMIP-1bの多大な増加を導くことが分かる。同様に、ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド及びPPDは、IL-8及びMIP-1bの増加を導くとともに、他の分析物に関して少量であるが統計的に有意な変化が見られる。

【0053】

表2 ジフテリアトキソイド、破傷風トキソイド、ツベルクリンPPD及びBCGのサイトカイン放出に関する試験(詳細には、実施例6を参照)

結果は全て、特に記載がない限り、pg/mlで表す。

【0054】

【表2】

検体	IL-1b	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12	IL-17	IL-18
1A	47	42	9	11	161	99	477	160	73	2609
1B	54	76	11	14	130	284	394	201	69	3761
1C	90	146	27	8	115	588	637	226	87	2564
1D	97	124	26	22	217	783	706	267	111	3282
1E	106	153	17	20	135	7290	981	336	83	1745
2A	29	8	4	11	73	95	61	132	43	2233
2B	44	77	13	7	93	135	410	217	47	2202
2C	43	82	14	10	103	187	493	233	68	2726
2D	57	113	16	12	110	234	468	139	86	3265
2E	54	120	8	10	143	6335	811	185	63	1707
3A	33	26	26	33	75	113	240	213	78	2934
3B	77	93	14	2	97	268	268	158	56	2556
3C	160	155	11	18	127	998	533	252	54	2763
3D	145	<3	24	13	49	1439	378	76	54	3104
3E	113	92	3	10	67	27779	202	120	75	1597
4A	152	96	2	4	125	149	323	183	47	2461
4B	43	268	16	20	64	160	286	137	53	2512
4C	31	79	14	20	60	189	376	140	77	2567
4D	665	71	568	687	493	465	1812	746	1355	3170
4E	70	<3	8	13	81	7011	386	202	59	2432
5A	48	68	14	9	26	136	259	77	34	2660
5B	44	220	14	3	46	117	168	109	38	2461
5C	23	195	2	8	63	114	444	76	64	2221
5D	25	179	9	11	100	174	350	133	60	2982
5E	30	218	13	8	25	3558	417	146	79	1478
6A	27	121	16	10	46	126	461	154	51	2406
6B	32	95	10	3	34	128	400	149	41	2353
6C	19	101	13	24	9	131	256	91	71	2413
6D	50	102	7	22	70	163	281	183	51	2876
6E	27	97	10	11	87	5038	404	155	69	1474

表2は次頁につづく

10

20

30

40

検体	sIL-6ra ng/ml	IFN-g	TNF-a	TNF-b	MCP-1	TGF-b
1A	1016,9	78	61	1392	2869	816
1B	1218,9	118	39	1474	2288	210
1C	822,0	209	109	1569	2126	556
1D	1091,7	165	150	1872	3048	791
1E	863,0	155	136	1724	2213	852
2A	857,1	72	158	1329	1600	276
2B	839,0	57	7	1865	1760	554
2C	955,2	52	90	1390	1794	515
2D	1095,0	109	77	1599	2838	582
2E	835,5	91	34	1308	1990	551
3A	981,4	<3	69	1187	1506	671
3B	851,1	59	60	1291	2041	471
3C	985,7	153	59	1454	2543	405
3D	1045,6	67	48	1351	1500	542
3E	787,5	9	112	1183	1240	508
4A	941,4	71	60	1807	2800	623
4B	833,1	107	72	1310	1766	527
4C	937,6	165	112	1563	1211	384
4D	1186,3	93	247	2142	6253	113
4E	966,0	6	59	1012	1234	579
5A	885,7	5	35	1283	1473	305
5B	887,3	62	21	1593	2341	284
5C	735,4	229	65	1522	1262	520
5D	1042,6	154	129	1535	2441	426
5E	802,9	172	69	1602	107	256
6A	852,2	122	45	1674	1996	627
6B	758,5	41	97	1664	1189	372
6C	695,6	30	62	1492	884	378
6D	943,3	177	16	1516	736	473
6E	808,6	60	91	1305	1256	619

10

20

表2は次頁につづく

検体	MIP-1a	MIP-1b	MMP-9 μg/ml	TREM-1	BDNF ng/ml	GM- CSF	NT-4	CRP μg/ml	RAN- TES ng/ml	int,st,d ev,%
1A	85	1307	11,3	5676	8,0	21	23	0,46	56,2	6
1B	182	2534	15,6	6485	12,2	22	24	0,55	62,8	-1
1C	210	2883	14,1	6254	10,9	22	17	0,49	59,0	5
1D	224	3102	17,2	6562	13,0	26	33	0,57	71,8	9
1E	205	1053	14,3	5792	10,6	45	41	0,48	65,3	0
2A	75	1308	7,4	4821	7,1	19	16	0,38	50,0	-1
2B	116	1345	13,1	5599	8,3	24	13	0,41	55,1	3
2C	99	1163	17,7	5521	10,7	18	24	0,50	63,2	0
2D	70	1234	19,1	5521	10,7	25	20	0,53	59,3	1
2E	125	375	27,0	5985	11,4	41	23	0,45	56,9	0
3A	112	1189	12,0	7747	8,3	17	28	0,48	45,3	-4
3B	235	3717	8,1	5289	9,0	20	14	0,39	41,8	4
3C	410	7922	15,3	4860	9,2	20	26	0,45	41,5	2
3D	296	8706	10,8	7289	11,0	23	20	0,44	47,3	1
3E	281	6280	14,2	4232	12,3	33	17	0,38	42,5	-12
4A	128	1397	11,0	5715	9,1	20	20	0,47	39,6	4
4B	110	1159	10,7	5483	8,5	17	24	0,46	46,3	-1
4C	45	1122	10,0	3356	9,5	18	22	0,45	46,0	-4
4D	866	1301	15,4	21919	12,4	36	447	0,44	43,3	-5
4E	64	183	19,6	5521	8,3	37	15	0,45	47,3	-11
5A	69	993	15,3	4938	9,4	19	16	0,46	44,6	-5
5B	4	1087	10,4	4743	8,9	19	15	0,39	43,2	2
5C	60	1248	8,1	5521	8,3	23	15	0,45	45,6	2
5D	41	1296	21,3	4035	12,5	28	20	0,52	50,5	3
5E	35	388	8,7	4272	10,7	42	5	0,40	46,1	-17
6A	57	1200	11,8	6331	8,2	19	13	0,45	49,1	1
6B	98	1117	13,5	7251	8,5	21	18	0,42	48,6	0
6C	85	1228	10,1	5016	7,5	22	33	0,40	46,4	-7
6D	66	1118	20,6	6101	9,6	27	24	0,47	49,5	4
6E	83	256	11,9	4469	10,7	39	14	0,39	50,8	-9

10

20

## 【 0 0 5 5 】

## 実施例 7 延長期間におけるサンプルの貯蔵

乾燥された血液スポットサンプル (DBSS) は、乾燥状態で好ましくは約 - 20 で貯蔵する必要がある。サンプルが湿気から保護される限り、室温も使用できる。

30

## 【 0 0 5 6 】

デンマークでは、1982年以來、全ての余剰DBSSが、厚生省の規定に従って、生物試料バンクにて - 24 で貯蔵されている(23)。安定性試験のために、デンマークのDBSS試料バンクから、各々23年、3年及び1か月間貯蔵されたDBSSを匿名で取得した。各期間からの各分析物の平均濃度を10個のサンプルから計算し、研究所内にて - 20 で2週間貯蔵された、通常通り収集した匿名DBSSと比較した(表3)。23年間の貯蔵後でも、実験誤差の範囲内においてサンプルの劣化は存在しないことが理解される。

## 【 0 0 5 7 】

表3 短期間(1ヵ月)、長期間(3年)及び延長(23年)期間貯蔵したサンプルの分析。結果は、PKUバイオバンクに未だ貯蔵されていない2週齢のDBSSにて検出可能な濃度の百分率で表わす。サンプルは、実施例2~4に記載したように抽出及び分析した。

40

## 【 0 0 5 8 】

【表 3】

	23年	3年	1月	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	44	43	93	
<b>IL-2</b>	116	115	113	
<b>IL-4</b>	91	91	107	
<b>IL-5</b>	105	116	122	
<b>IL-6</b>	95	101	108	
<b>IL-8</b>	28	38	64	
<b>IL-10</b>	124	103	129	
<b>IL-12</b>	95	108	107	
<b>IL-17</b>	94	100	107	
<b>IL-18</b>	138	113	129	10
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	92	101	109	
<b>TNF-<math>\beta</math></b>	88	94	93	
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	117	119	121	
<b>RANTES</b>	87	89	90	
<b>MCP-1</b>	94	112	112	
<b>GM-CSF</b>	102	107	108	
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	85	88	98	
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	59	76	79	
<b>sIL-6ra</b>	48	101	113	
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	111	100	95	
<b>MMP-9</b>	57	49	93	
<b>TREM-1</b>	68	84	129	20
<b>CRP</b>	73	123	110	
<b>BDNF</b>	22	54	58	
<b>NT-4</b>	54	63	111	

## 【 0 0 5 9 】

## 参考文献

1. Beck WS (Ed.). Hematology. MIT Press 1985.
2. Bloom AL, Thomas, DP (Eds.). Haemostasis and thrombosis. Longman 1987.
3. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. Immunobiology. Elsevier 1999.
4. Thadikkaran L, Siegenthaler MA, Crettaz D, Queloz PA, Schneider P, Tissot JD. Recent advances in blood-related proteomics, Proteomics. 2005;5:3019-34. 30
5. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. Mol Cell Proteomics. 2002;1:845-67.
6. Steinke JW, Borish L. Cytokines and chemokines. J Allergy Clin Immunol. 2006; 117:S441-5.
7. Blach-Olszewska Z. Innate immunity: cells, receptors, and signaling pathways. Arch Immunol Ther Exp. 2005;53:245-53.
8. Lapidot T, Petit I. Current understanding of stem cell mobilization: the role s of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. Exp Hematol. 2002;30:973-81.
9. Cravens PD, Lipsky PE. Dendritic cells, chemokine receptors and autoimmune in 40  
flammatory diseases. Immunol Cell Biol. 2002;80:497-505.
10. Villas BH. Flow cytometry: an overview. Cell Vis. 1998;5:56-61.
11. Stelzer GT, Robinson JP. Flow cytometric evaluation of leukocyte function. D  
iagn Clin Immunol. 1988;5:223-31.
12. Jerome KR, Sloan DD, Aubert M. Measurement of CTL-induced cytotoxicity: the  
caspase 3 assay. Apoptosis. 2003;8:563-7.
13. Andersen MH, Schrama D, Straten TP, Becker JC. Cytotoxic T cells. J Invest D  
ermatol. 2006;126:32-41.
14. Troutt AB, Maraskovsky E, Rogers LA, Pech MH, Kelso A. Quantitative analysis  
of lymphokine expression in vivo and in vitro. Immunol Cell Biol. 1992;70:51-7. 50

15. Schmittel A, Keilholz U, Thiel E, Scheibenbogen C. Quantification of tumor-specific T lymphocytes with the ELISPOT assay. *J Immunother.* 2000;23:289-95.
16. House RV. Theory and practice of cytokine assessment in immunotoxicology. *Methods.* 1999;19:17-27.
17. Meidenbauer N, Hoffmann TK, Donnenberg AD. Direct visualization of antigen-specific T cells using peptide-MHC-class I tetrameric complexes. *Methods.* 2003;31:160-71.
18. Bousso P. Generation of MHC-peptide tetramers: a new opportunity for dissecting T-cell immune responses. *Microbes Infect.* 2000;2:425-9.
19. Hogrefe WR. Biomarkers and assessment of vaccine responses. *Biomarkers.* 2005;10:S50-7. 10
20. Manz RA, Hauser AE, Hiepe F, Radbruch A. Maintenance of serum antibody levels. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:367-86.
21. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr.* 2001;131:1631S-6S.
22. Skogstrand K, Thorsen P, Norgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sorensen LC, Hougaard DM. Simultaneous measurement of 25 inflammatory markers and neurotrophins in neonatal dried blood spots by immunoassay with xMAP technology. *Clin Chem.* 2005;51:1854-66.
23. Norgaard-Pedersen B, Simonsen H. Biological specimen banks in neonatal screening. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88:106-9. 20

## フロントページの続き

- (72)発明者 ホウガールド, デビッド エム.  
デンマーク王国 ヴィルム ディーケイ - 2 8 3 0 , パーセルヴェイ 1 3 3 ビイ
- (72)発明者 スコグストランド, クリスティン  
デンマーク王国 コペンハーゲン エス ディーケイ - 2 3 0 0 , 4 番, ペダーリクケスヴェイ  
5 4
- (72)発明者 ヨルゲンセン, シャーロット スヴェルケ  
デンマーク王国 ホルムガード ディーケイ - 4 6 8 4 , エレガーズヴェイ 2 2

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開平08 - 2 0 1 3 8 2 ( J P , A )  
特開2 0 0 3 - 2 7 0 2 5 0 ( J P , A )  
特開平0 4 - 2 9 3 5 0 6 ( J P , A )  
特表2 0 0 4 - 5 0 5 2 7 7 ( J P , A )  
特表2 0 0 2 - 5 2 0 0 7 3 ( J P , A )  
特表昭6 3 - 5 0 1 0 7 4 ( J P , A )  
特表平0 9 - 5 0 6 4 3 5 ( J P , A )  
Skogstrand K, Thorsen P, Norgaard-Pedersen B, Schendel DE, Sorensen LC, Hougaard DM. ,  
Simultaneous Measurement of 25 Inflammatory Markers and Neurotrophins in Neonatal Dried  
Blood Spots by Immunoassay with xMAP Technology , Clin Chem. , 2 0 0 5 年, Vol.51, No  
10 , Page.1854-1866  
Koal T, Burhenne H, Romling R, Svoboda M, Resch K, Kaever V. , Quantification of antire  
troviral drugs in dried blood spot samples by means of liquid chromatography/tandem ma  
ss spectrometry. , Rapid Commun Mass Spectrom. , 2 0 0 5 年, Vol.19, No.21 , Page.2995-30  
01
- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8