

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-514756

(P2018-514756A)

(43) 公表日 平成30年6月7日(2018. 6. 7)

(51) Int.Cl.  
G 0 1 N 33/49 (2006.01)F I  
G O 1 N 33/49テーマコード (参考)  
2 G O 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2017-548931 (P2017-548931)  
 (86) (22) 出願日 平成28年4月29日 (2016. 4. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月15日 (2017. 9. 15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/030226  
 (87) 国際公開番号 W02016/176629  
 (87) 国際公開日 平成28年11月3日 (2016. 11. 3)  
 (31) 優先権主張番号 62/154, 520  
 (32) 優先日 平成27年4月29日 (2015. 4. 29)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 516002956  
 イクセラ, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O  
 1 7 3 0 ベドフォード 1 3 5 サウス  
 アールディー.  
 (74) 代理人 100098729  
 弁理士 重信 和男  
 (74) 代理人 100163212  
 弁理士 溝渕 良一  
 (74) 代理人 100204467  
 弁理士 石川 好文  
 (74) 代理人 100148161  
 弁理士 秋庭 英樹  
 (74) 代理人 100156535  
 弁理士 堅田 多恵子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液サンプルを定量するための方法及び装置

## (57) 【要約】

本発明は、血液サンプルの容積を分析する方法及び装置に関する。本発明は、血液サンプルの容積を基板上で推定する方法に関し、血液サンプルの画像を取得するステップを含んでいる。血液サンプルの被覆率又は被覆面積の近似値は血液サンプルの画像から得られ、標準検量線と比較され、血液サンプルの容積が推定される。本発明は、基板上で2以上の血液サンプルを走査する装置を開示している。本装置は3層を備え、該3層間で複数の血液サンプルが保持するように取り付けられる。本装置は、サンプルの汚染除去及び再起動のため取り外し可能な複数のラベルを備えている。

【選択図】 図2

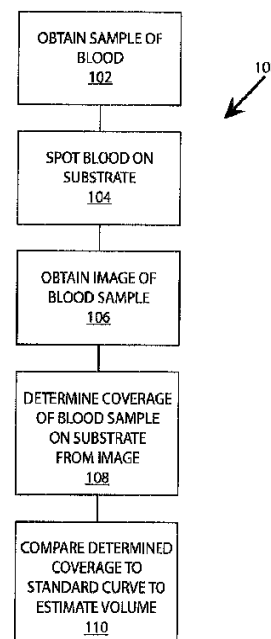


Fig. 2

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

血液サンプルを取得するステップと、  
前記血液サンプルを基板上にスポットするステップと、  
前記血液サンプルの画像を取得するステップと、  
前記サンプルの前記画像の被覆率又は被覆面積の近似値を決定するステップと、  
前記決定された被覆率又は被覆面積の近似値を検量線と比較して、前記血液サンプルの推定容積を決定するステップと、を備える、  
血液サンプルの容積を推定するための方法。

**【請求項 2】**

前記サンプルの前記画像の被覆率又は被覆面積の近似値の決定には、前記基板上の前記血液サンプルの被覆率を算出することが含まれ、前記基板上の前記血液サンプルの被覆率の算出には、好ましくは、前記血液サンプルの前記画像の画素をカウントすることが含まれる請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

前記基板上の前記血液サンプルの被覆率の算出には、ブランク基板の画像内の画素をカウントすることが含まれ、前記基板上の前記血液サンプルの被覆率の算出には、好ましくは、前記血液サンプルの前記画像内でカウントされた画素数の前記ブランク基板の前記画像内でカウントされた画素数に対する比を決定することが含まれる、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記検量線は、二種又は複数種の血液サンプルの画像から決定された前記二種又は複数種の血液サンプルの被覆率又は被覆面積の近似値のデータに対してプロットされた前記二種又は複数種の既知容積の血液サンプルからのデータを含み、前記二種又は複数種の既知容積の血液サンプルは、好ましくは、ヘマトクリット値の異なるサンプルを含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 5】**

(a) 前記血液サンプルの前記画像は、スキャナー又はカメラを用いて取得される特徴と、及び、

(b) 前記基板は、紙を含むフィルターから成る特徴、  
のうち一つ又は複数を特徴とする、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の方法。

**【請求項 6】**

一つ又は複数の透明部を含む第一の層と、  
一つ又は複数の穴を含む第二の層であって、前記一つ又は複数の穴は、前記第二の層を通して形成され、それぞれの穴は乾燥血液サンプルフィルターを受容する大きさである第二の層と、  
一つ又は複数の隆起部を含む第三の層と、を備え、  
前記第二の層を前記第一の層と前記第三の層との間に介在させて前記第一、第二、及び第三の層が互いに重なり合うように整列され積み重ねられる際に、前記第一の層の前記一つ又は複数の透明部が、前記第二の層の前記一つ又は複数の穴及び前記第三の層の前記一つ又は複数の隆起部と重なる、  
乾燥血液サンプル用のフィルターを走査するための装置。

**【請求項 7】**

前記第三の層の前記一つ又は複数の隆起部のそれぞれは、前記第二の層の前記一つ又は複数の穴のそれぞれに嵌合する、請求項 6 に記載の装置。

**【請求項 8】**

前記第二の層を前記第一の層と前記第三の層との間に介在させて前記第一、第二、及び第三の層が互いに重なり合うように整列され積み重ねられる際に、前記第三の層の前記隆起部が、乾燥血液サンプルフィルターを前記第二の層の穴内で前記第一の層に対して押し付けるような大きさである、請求項 7 に記載の装置。

10

20

30

40

50

**【請求項 9】**

前記第一、第二、及び第三の層は、前記第二の層が前記第一の層と前記第三の層との間に位置するように、互いに確実に組み立てられるように構成される、請求項 6 乃至 8 のいずれかに記載の装置。

**【請求項 10】**

前記第一、第二、及び第三の層は、一つ又は複数のネジ、一つ又は複数のボルト、一つ又は複数のクギ状物、化学接着剤、テープ、一つ又は複数のゴムバンド、及びこれらの組合せからなる群から選択される取り付け機構によって固定される、請求項 9 に記載の装置。

**【請求項 11】**

(a) 前記第一、第二、又は第三の層の少なくとも一つは、プレキシガラスから成る特徴と、

(b) 前記第一、第二、及び第三の層は、略矩形状であって、略同一の大きさである特徴と、

(c) 前記第一の層は、全体として透明である特徴と、

(d) 前記第三の層上の前記一つ又は複数の隆起部は、アクリルディスクから構成される特徴、

のうち一つ又は複数の特徴とする、請求項 6 乃至 10 のいずれかに記載の装置。

**【請求項 12】**

前記乾燥血液サンプルフィルターを特定するための一つ又は複数のラベルをさらに備える、請求項 6 乃至 11 のいずれかに記載の装置。

**【請求項 13】**

前記ラベルが、一つ又は複数の文字、単語、数字、色、バーコード、及びマトリックスバーコードを含む、一つ又は複数のコードを含む、請求項 12 に記載の装置。

**【請求項 14】**

前記一つ又は複数のラベルが取り外し可能である、請求項 12 に記載の装置。

**【請求項 15】**

前記第二の層の前記一つ又は複数の穴が、均一な大きさである及び / 又は互いに均一な間隔で配置されている、請求項 6 乃至 14 のいずれかに記載の装置。

**【発明の詳細な説明】****【技術分野】****【0001】**

本開示は、一般に血液サンプリングの方法及び装置に関し、特に血液サンプルの容積を推定するための方法及び装置に関する。より具体的には、本開示は、フィルター上又は他の基板上に採取された血液サンプルの容積を推定するための方法に関する。本開示はまた、特に採集された血液を定量するために用いられる、乾燥された血液サンプルの画像を走査するためにフィルター及び他の基板を保持するのに使用可能な装置にも関する。

**【背景技術】****【0002】**

血液サンプルは、訓練された専門家により診療所、病院、又は専門分析機関において診断目的で日常的に採取されている。従来からの静脈穿刺法に代わる、より費用効率が高くかつ侵襲性が低い方法は、指先穿刺によって濾紙上に血液を採取することである。その後、血液は乾燥され、乾燥血液スポット (DBS) として知られるサンプルを、保存又は必要に応じて処理することができる。その後、DBS を、様々な小分子、代謝産物、タンパク質、その等の分析に用いることができる。DBS 法は、いかなる時又はいかなる場所での血液採取を可能にするため、有力な血液サンプリング法である。血液採取に特別な訓練を必要とせず、採取された血液は、常温で一定期間、保存又は輸送が可能である。

**【0003】**

DBS 法に関する主要な欠点の一つは、実験室以外で濾紙上に直接投入される際には、投入される血液の容積を確認できないため、被験物質の定量が困難なことである。現場で

10

20

30

40

50

サンプルを採取する際、血液の容積測定は現実的ではない。濾紙等の基板の上での血液の広がりには、数多くの要因が影響する。血液のヘマトクリット値は、濾紙上の血液の広がり大きく影響する（ヘマトクリット値が高い血液は、ヘマトクリット値が低い血液に比べ、広がりにくい）。また、毛管効果による血液の広がり違いもある（血液は、薄い紙上で、厚い紙に比べ、より広がる）。最後に、クロマト効果は、血液成分の不均一な分布をもたらす（いくつかの血液成分が他の成分より早く移動する）。そのため、DBSの一つの領域は、他の領域とは異なる組成を有する。したがって、通常行われるように、血液スポットを特定の大きさでくり抜いても、フィルター上に採取された全血サンプル全体を精確に処理することにはならない。

#### 【0004】

DBSからの被験物質の定量における難点を克服するために、いくつかの方法が提案されている。一つの方法には、投入された血液のヘマトクリット値を算出するための、内因性カリウム濃度の定量が含まれる。この方法では、ヘマトクリット値の精確な推定が行なわれるが、血液サンプル及び濾紙の付加的な処理及び分析を必要とする。DBS中の血液のヘマトクリット値を推定するために乱反射を用いる別の方法は、サンプル量の補正を可能にする。この方法は、ヘマトクリット値は精確であるものの、DBSの分析に、付加的な高価な検査設備、サンプルの処理、及び特殊なソフトウェアを必要とする。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0005】

したがって、関連分野においては、血液容積の精確な推定を行う技術が、今すぐ必要とされている。DBS法全体の目的が、血液採取、保存、及び輸送に係る費用を低減することであるため、そのような技術は、高い費用効果で実施可能でなければならない。そのような技術はまた、被験物質を精確に定量できるように、全スポットにおける血液容積の推定を可能にしなければならない。

#### 【0006】

さらに、濾紙上の乾燥血液スポットなどの血液サンプルを走査するために使用されていると当分野において知られている現在の装置は、サンプルが汚染されるリスクが高く、多数のサンプルを系統的に管理することが難しく、サンプルをヒト暴露から隔離しにくく、多数のサンプル又は一群のサンプルを迅速、効率的、かつ一貫して処理する能力が低い等の問題を有している。したがって、関連分野においては、本明細書に開示される新規技術との併用が可能な装置を含め、従来技術のこれらの制約を克服する装置も必要とされている。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0007】

本開示の実施形態は、血液サンプルを処理するための方法及び装置を提供する。特に、本開示は、安定しかつ精確なやり方で、フィルター上及び他の基板上に採取された血液サンプルの容積を推定するための新規な方法を提供する。この方法は、実験室以外での採取など様々な状況下で採取された血液サンプル中の被験物質を定量するために不可欠である。本明細書に開示される方法は、本分野において、最小限に侵襲的かつ費用効率的なやり方で血液の採取、保存、及び輸送を可能にする、他の点では有力な血液サンプリング方法に関する定量化の主要な技術的問題に対処する。

#### 【0008】

したがって、一つの実施形態において、本開示は、血液サンプルを得る（例えば、ランセットで指を突き刺すことにより血液サンプルを得る）ステップと、前記血液サンプルを基板上にスポットするステップと、前記血液サンプルの画像を得るステップと、前記サンプルの前記画像の被覆率又は被覆面積の近似値を決定するステップと、前記決定された被覆率又は被覆面積の近似値を検量線と比較して、前記血液サンプルの推定容積を決定するステップと、を備える血液サンプルの容積を推定するための方法を提供する。

#### 【0009】

一つの実施形態において、前記サンプルの前記画像の被覆率又は被覆面積の近似値の決定には、前記基板上の前記血液サンプルの被覆率を算出することが含まれ、前記基板上の前記血液サンプルの被覆率の算出には、好ましくは、前記血液サンプルの前記画像の画素をカウントすることが含まれる。

【0010】

別の実施形態において、前記基板上の前記血液サンプルの被覆率の算出には、ブランク基板の画像内の画素をカウントすることが含まれ、前記基板上の前記血液サンプルの被覆率を算出することには、好ましくは、前記血液サンプルの前記画像内でカウントされた画素数の前記ブランク基板の前記画像内でカウントされた画素数に対する比を決定することが含まれる。

10

【0011】

一つの実施形態において、前記検量線は、二種又は複数種の血液サンプルの画像から決定された前記二種又は複数種の血液サンプルの被覆率又は被覆面積の近似値のデータに対してプロットされた前記二種又は複数種の既知容積の血液サンプルからのデータを含む。そのような実施形態において、前記二種又は複数種の既知容積の血液サンプルは、好ましくは、ヘマトクリット値の異なるサンプルを含む。

【0012】

別の実施形態において、前記血液サンプルの前記画像は、スキャナー又はカメラを用いて取得される。

【0013】

20

さらに別の実施形態において、前記基板には、紙を含むフィルターから成る。

【0014】

本開示はまた、フィルター上又は他の基板上の採取された血液サンプルを保持するための装置も提供する。本装置は、従来の装置に勝る、使いやすさ、簡素かつより効率的な除染、ヒューマンエラーによるサンプル取扱い時のミスの低減、サンプルの記録の取りやすさ及びサンプルの記録の保存しやすさ、並びに耐久性の向上という利点をもたらす。特にサンプルの走査に関して、本装置は、あらゆる既知のスキャナー又は類似の撮像装置に実質的に適合する能力、均一かつ一貫したサンプル間の間隔及び走査距離を可能にする能力、並びに異なるサンプル間での相互比較の容易さの利点をもたらす。このように、本装置は、以前から知られている装置に勝る、短縮された時間内でのより効率的かつ精確な走査の能力を提供できる。

30

【0015】

したがって、一つの実施形態において、本開示は、フィルター（乾燥血液サンプル）走査用の装置を提供し、本装置は、一つ又は複数の透明部を含む第一の層と、一つ又は複数の穴を含む第二の層であって、前記一つ又は複数の穴は、前記第二の層を通して形成され、それぞれの穴は乾燥血液サンプルフィルターを受容する大きさである第二の層と、一つ又は複数の隆起部を含む第三の層と、を備え、前記第二の層を前記第一の層と前記第三の層との間に介在させてあって、前記第一、第二、及び第三の層が互いに重なり合うように整列され積み重ねられる際に、前記第一の層の前記一つ又は複数の透明部が、前記第二の層の前記一つ又は複数の穴及び前記第三の層の前記一つ又は複数の隆起部と重なる。

40

【0016】

一つの実施形態において、前記第三の層の前記一つ又は複数の隆起部のそれぞれは、前記第二の層の前記一つ又は複数の穴のそれぞれに嵌合する。そのような実施形態において、前記第二の層を前記第一の層と前記第三の層との間に介在させて、前記第一、第二、及び第三の層が互いに重なり合うように整列され積み重ねられる際に、前記第三の層の前記隆起部が、好ましくは、乾燥血液サンプルフィルターを前記第二の層の穴内で前記第一の層に対して押し付けるような大きさである。

【0017】

一つの実施形態において、前記第一、第二、及び第三の層は、前記第二の層が前記第一の層と前記第三の層との間に位置するように、互いに確実に組み立てられるように構成さ

50

れる。そのような実施形態において、前記第一、第二、及び第三の層は、好ましくは、一つ又は複数のネジ、一つ又は複数のボルト、一つ又は複数のクギ状物、化学接着剤、テープ、一つ又は複数のゴムバンド、及びこれらの組合せからなる群から選択される取り付け機構によって固定される。

【0018】

一つの実施形態において、前記第一、第二、及び第三の層の少なくとも一つは、プレキシガラスから成る。

【0019】

一つの実施形態において、前記第一、第二、及び第三の層は、略矩形状であって、略同じ大きさである。

【0020】

一つの実施形態において、前記第一の層は、全体として透明である。

【0021】

一つの実施形態において、前記第三の層上の前記一つ又は複数の隆起部は、アクリルディスクから構成される。

【0022】

一つの実施形態において、本装置は、さらに、前記乾燥血液サンプルフィルターを特定するための一つ又は複数のラベルを備える。そのような実施形態において、前記ラベルは、好ましくは、一つ又は複数の文字、単語、数字、色、バーコード、及びマトリックスバーコードを含む、並びに／あるいは取り外し可能である、一つ又は複数のコードを含む。

【0023】

さらに別の実施形態において、前記第二の層の前記一つ又は複数の穴は、均一な大きさである及び／又は互いに均一な間隔で配置されている。

【0024】

上述の特徴、機能、及び利点は、本開示の様々な実施形態において単独で達成可能である、あるいはさらに別の実施形態において組み合わせることができ、その更なる詳細は、以下の説明及び図面を参照して理解することができる。

【0025】

本発明の他の特徴、機能、及び利点は、当業者が以下の図面及び詳細な説明を検討すれば、明らかであろう、又は明らかになるであろう。そのような付加的なシステム、方法、特徴、及び利点も、本明細書に含まれ、本開示の範囲内であって、付随する請求項によって保護されることが意図される。

【0026】

本開示の多くの態様は、以下の図面を参照することで、より良く理解できる。図面中の構成要素は、必ずしも縮尺通りではなく、むしろ本開示の原則を明確に示すことに重点が置かれている。また、これらの図面において、いくつかの図面を通して同じ参照番号は対応する部分を示している。

【図面の簡単な説明】

【0027】

【図1】濾紙上の特定既知容積を有する血液スポットを示す。

【図2】本明細書に開示される血液容積を推定するための方法の例示的实施形態のフロー図を示す。

【図3】様々な背景を用いて得られた血液スポットの画像を示す。

【図4】一つの画像においてスポット画素が選択され、他の画像において周囲の透明な画素が選択された乾燥血液スポットの二つの画像を示す。

【図5】画素被覆率対血液スポット容積の例示的なグラフを示す。

【図6】3名の異なる対象者からの血液サンプルについて作成された、画素被覆率対血液容積の例示的データ及び対応する検量線を示す。

【図7】3名の異なる対象者からの血液サンプルを組み合わせた結果から作成された画素被覆率対血液容積の例示的棒グラフを示す。

10

20

30

40

50

【図 8】3名の異なる対象者からの血液サンプルを組み合わせた結果から作成された画素被覆率対血液容積の例示的検量線を示す。

【図 9】本明細書に開示のプレートリーダー装置の第一の層の例示的实施形態の上面図を示す。

【図 10】本明細書に開示のプレートリーダー装置の第一の層の例示的实施形態の斜視図を示す。

【図 11】本明細書に開示のプレートリーダー装置の第二の層の例示的实施形態の上面図を示す。

【図 12】本明細書に開示のプレートリーダー装置の第二の層の例示的实施形態の斜視図を示す。

【図 13】本明細書に開示のプレートリーダー装置の第三の層の例示的实施形態の上面図を示す。

【図 14】本明細書に開示のプレートリーダー装置の第三の層の例示的实施形態の斜視図を示す。

【図 15】本明細書に開示のプレートリーダー装置のラベルの例示的实施形態の上面図を示す。

【図 16】本明細書に開示のプレートリーダー装置の組み立てられた第一の層及び第二の層の例示的实施形態の上面図を示す。

【図 17】本明細書に開示のプレートリーダー装置の組み立てられた第三の層及びラベルの例示的实施形態の上面図を示す。

【図 18】本明細書に開示の組み立てられたプレートリーダー装置の例示的实施形態の上面図を示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

以下の説明において、図面を参照するが、これらの図面は、本明細書の一部をなし、説明のために、本開示の様々な実施形態を示す。当然ながら、他の実施形態も利用可能であり、本開示の範囲から逸脱することなく変更することも可能である。

【0029】

血液サンプルの容積を推定する方法

好ましい実施形態において、本明細書に提示される方法は、濾紙又は他の基板上の乾燥血液スポット中の血液の容積を推定するのに使用可能である。理論に拘束されることを望むものではないが、フィルター上に広がる血液は、主に、毛管効果（すなわち、広がり、濾紙の厚さに逆比例する）、クロマト効果（すなわち、フィルターを通して広がる血液成分の早さ又は遅さ）、及びヘマトクリット値（ヘマトクリット値の高い血液は広がりにくく、ヘマトクリット値の低い血液は広がりやすい）によって影響される。好ましい実施形態において、HemaFormフィルター（Spot On Science社）が選択されたが、これは、HemaFormフィルターの特有の設計により、血液の広がりが均一であり、フィルターの厚さが一定であるためである。これにより、ヘマトクリット値の効果及びクロマト効果が低下するため、HemaFormフィルターにおいて血液サンプリングがより一貫性があると、考えられる。このフィルターを用いて得られる結果は、再現性があり、これらのフィルターで一貫しているが、この技術は、他の種類のフィルターにも使用可能である。

【0030】

本開示は、一部には、フィルター上での血液の広がりは、スポットされる血液の容積に比例するとの仮説に基づいている。この特性を血液の容積の測定に活用することができる。まず、特定容積の新鮮血を漸増しながら別々のHemaFormフィルター上にスポットし、一晚乾燥させた後に、視覚分析した。図1に、それぞれ異なる既知容積の血液がスポットされた8枚のHemaFormフィルターを図示する。具体的には、スポットされた既知容積の血液は、図1の画像において、左から右に、上から下に増加している。したがって、血液がスポットされたフィルターをざっと目視検査するだけで、フィルター上で

10

20

30

40

50

の血液の広がり、フィルター上にスポットされた血液の容積に比例することがわかる。これによって、上記の仮説の正しさが確認されたので、次のステップは、血液の広がりを実際に測定することであった。乾燥血液スポットにおける血液の広がりをスポットされた血液の容積に相関させる方法は現在ないため、血液の広がりを定量できる新規な分析ツールを開発する必要があった。

#### 【 0 0 3 1 】

我々の方法は、基板（例えば、濾紙）上に投入された血液の容積の一貫したかつ精確な推定を可能にし、実験室以外で採取された血液サンプル中の被験物質の定量に不可欠である。この方法は、本分野において、最小限に侵襲的かつ費用効率的なやり方で血液の採取、保存、及び輸送を可能にする方法であり、他の点では有力な血液サンプリング方法に関する定量化の主要な技術的問題に対処する。

10

#### 【 0 0 3 2 】

図 2 は、本発明の例示的な実施形態のフローチャートであって、血液サンプルの容積を推定するための方法 1 0 0 が提示されている。このフローチャート内のどのようなプロセスの説明又はブロックも、本開示の分野の当業者ならわかるように、このプロセスにおける特定の論理的機能を発揮する一つ又は複数の指示を含む、モジュール、セグメント、コードの一部、又はステップを表すものと理解すべきであって、関係する機能性に基づいて、実質的に同じ順番又は逆の順番を含め、示された又は記述された順番以外でも各機能が発揮される、別の実施法も本開示の範囲に含まれる。

20

#### 【 0 0 3 3 】

図 2 のブロック 1 0 2 に示されるように、血液のサンプルは、ヒト又は動物の患者から当分野で知られるあらゆる方法で得られる。この方法には、従来からの静脈穿刺法も含まれ、血液が患者の静脈から直接得られる。血液はまた、指先穿刺を介して又は患者身体のある他の部分を「刺して穴をあける」ことを介しても得ることができる。この方法を介して採取される血液は、通常、皮膚表面近傍の毛細血管からランセット又は類似の装置で皮膚を突き刺すことにより得られる。「指先穿刺」からの血液は、毛細管内に採取され、フィルター上に分注され又は濾紙上に直接スポットされる。

#### 【 0 0 3 4 】

図 2 のブロック 1 0 4 に示されるように、得られた血液のサンプル又は得られた血液のサンプルの一部は、基板上にスポットされる又は他の方法で置かれる。基板は、血液サンプルを維持できる、当分野で知られるあらゆる材料であることができる。好ましい実施形態において、濾紙を基板として使用できる。G u t h r i e カード、H e m a F o r m フィルター、その他などの濾紙は、乾燥血液スポットサンプリングにおける使用が当分野において良く知られている。いくつかの実施形態において、基板は、複合材料であることができる及び / 又は、例えばシリカで被覆されることができる。

30

#### 【 0 0 3 5 】

図 2 のブロック 1 0 6 では、配置された血液サンプルの画像が取得される。画像は、好ましくは血液が完全に乾燥した後に、当分野で知られるあらゆる撮像装置を用いて得ることができる。したがって、カメラ、スキャナー、又は他の類似した撮像装置を、開示される方法で成功裏に使用できる。好適な撮像装置の選択には、使いやすさ、多数の画像を得るための固定された台の必要性、多数のフィルターの処理能力、画質、並びに様々な撮像設定及び撮像規制の制御能力及び管理能力等の検討が含まれる。

40

#### 【 0 0 3 6 】

一つの実施形態において、画像を取得するためにカメラを使用することができる。通常、カメラは、カメラを安定に保持すると同時に一貫したかつ再現性のある画像を得るために、三脚又は他の装置に搭載される。別の実施形態において、画像を得るためにスキャナーを使用することができる。例えば、画像を得るために、H P P h o t o s m a r t（登録商標） 1 3 0 0 又は類似の機器を使用することができる。どのような撮像装置を用いる場合でも、得られる画像の解像度を好ましい解像度又は標準的な解像度に調整することは有益である。例えば、6 0 0 d p i の解像度を用いることができる。解像度は、以下で説

50



明するように、ソフトウェアを用いて制御し、調整することができる。得られる画像は、コンピューター又は他の電子機器上で閲覧できるように、デジタル形式で提供されることができる。デジタル形式での提供により、さらに、画像編集ソフトウェア又は画像分析ソフトウェアを使用して、画像の閲覧が可能となる。

#### 【0037】

図2のブロック108では、血液サンプルの基板上での被覆率又は被覆面積の近似値を、血液サンプルの画像から決定することができる。この開示の目的のために、血液サンプルの被覆率は、絶対面積に換算して、あるいはパーセント被覆率等の面積比として、測定する又は推定することができる。好ましい実施形態において、被覆率の決定は、画像中の画素をカウントすることで実施可能である。画像中の画素をカウントすることは、好ましくは、画像分析ソフトウェア又は画像編集ソフトウェアを用いて実施される。この目的のための数多くのソフトウェアプログラムが、当分野において知られている（例えば、GIMP2、Adobe Photoshop（登録商標））。

10

#### 【0038】

画素をカウントするのに先立って、ソフトウェアの様々な設定を調整して、画素をカウントするための最適な画像が得られるようにする必要がある。例えば、画像の解像度を調整することは有益である。全ての画像に一定の解像度を用いることは、精確な結果を確実に得るために有用である。他の最適化も、GIMP2画像分析プログラムによって画素選択のための正しい閾値を選択することで実施可能である。閾値が低いと、非特異的な選択になりやすく、閾値が高いと、画素の色の選択を妨げやすい。

20

#### 【0039】

画像における陰影の干渉を最小化するためにも、解像度を最適化することは有益である。基板の外縁に沿って見られる陰影（例えば、HemaFormフィルターの「花卉」に沿った陰影）は、画素を分析する及び画素数を数える際に、画素選択を妨げることがある。あるいは、又はこの目的のために走査ソフトウェアにおける設定の調整に加えて、これらの影響を最小化するため、図3に示すように、画像において様々な背景を用いることができる。

#### 【0040】

ソフトウェアを用いて、血液スポットを実際に示す画像の部分に対応する画素だけをカウントすることができる。したがって、血液スポットをカバーする又は少なくとも部分的に重複する画素をカウントすることができる。比較対象の他の画像又はデータに関して整合する限り、個別の画素がカウントされるべきか否かを決定するための他の方法も使用可能である。いくつかの実施形態において、血液スポットに対応する画素の絶対数を用いて、血液スポットの面積を決定することができる。フィルターのブランク領域（すなわち、血液が広がっていないフィルターの部分）の画素もカウントすることができる。得られたブランク領域の画素数から、画素の総数を得て、被覆面積又は被覆率の算出に使用できる、すなわち得られたブランク領域の画素数を血液スポット内でカウントされた画素数に加え、ブランクフィルター全体に対応する画素の既知の数と比較することで、画素のカウントを精確にすることができる。

30

#### 【0041】

別の実施形態において、例えば、ブランク基板（例えば、フィルター）の画像内のブランク基板の画素をさらにカウントすることで、「パーセント被覆」面積を決定することができる。ブランク基板の画像を血液スポットの画像と同じ設定（例えば、解像度）で取得することは、二つの画像を精確かつ有意義に比較する上で重要である。パーセント被覆率を得るため、血液スポット内でカウントされた画素数のブランクフィルター内でカウントされた画素数に対する比が決定される。

40

#### 【0042】

図2のブロック110に示されるように、ブロック108で決定された血液スポットの被覆率又は被覆面積を、検量線、表、チャート、又は他のデータと比較して、血液スポットの容積を算出することができる。そのような検量線、表、チャート、又は他のデータに

50

は、既知容積の血液サンプルに関するデータが含まれる。例えば、異なる既知容積の一連の血液サンプルが、別々に基板上にスポットされる。スポットされた各血液サンプルの画像が得られ、得られた画像から被覆面積又は被覆率が算出される。その後、これらの算出された被覆面積又は被覆率は、既知容積に対してプロットされるあるいは他の方法で既知容積と比較されて、検量線、表、チャート、等々が得られる。最良適合線を用いると、これらのデータの比較が容易になる。後で得られる血液サンプルについて、血液サンプルの容量の推定値は、血液サンプルのパーセント被覆率を、ブロック 110 で作成された検量線又は他のデータと比較することにより決定可能である。その精度を確保するため、必要に応じて、検量線のデータを更新することも必要である。また、他の特性、例えばヘマトクリット値による基板上での血液サンプルの広がる面積への推定される影響を補正するため、その特性が異なる既知のサンプルを検量線の作成に用いることが望ましい。

10

#### 【0043】

##### 実施例 1：検量線の作成

以下の例示的方法によって、検量線を作成できる。一連の精確な既知容積の新鮮血を、HemaForm フィルター上にスポットし、一晚乾燥させた。撮像のために、カメラを三脚上に固定した。解像度が最適となるように、カメラの設定を調整し、その設定を維持したまま、全ての画像を撮像した。画像分析プログラム GIMP 2 を用いて画素数をカウントした。このソフトウェアは、インターネットから自由に入手でき、分析の実施における成功が証明されているため、理想的な選択肢である（ただし、Adobe Photoshop（登録商標）等の他の画像分析プログラムも同様に良好に機能する）。参照用に、ブランク HemaForm フィルターの画像を取得して、その画像から、ブランクフィルターに対応する画素の総数を決定した。乾燥血液スポット内の画素及び乾燥血液スポット周りのフィルターの周囲の空（透明）領域内の画素も、図 4 に示すように、選択してカウントした。

20

#### 【0044】

次に、乾燥血液スポット内の画素数をブランクフィルター内の総画素数で割ることにより、画素被覆率を決定した。図 5 は、画素被覆率対スポット血液容積の結果を示す。図 5 に示されるように、データポイントに適合する最良適合線の勾配を決定した。図 5 の最良適合線の精度を確認するために、この最良適合線の勾配から得られる血液サンプルの容積推定値を、実際の既知の容積と比較した。容積推定値は、実際の容積に対して  $1 \mu\text{L} \sim 5 \mu\text{L}$  以内で、この方法が有効であることを示した。ただし、この分析法をさらに改善することで、より高い精度が得られるはずである。

30

#### 【0045】

##### 実施例 2：組合せ検量線の作成

以下の例示的方法によって、組合せ検量線を得ることができる。上述の考察に基づいて、スキャナー（例えば、HP Photosmart（登録商標）3100）を選択した。画素の分析及びカウントの質を改善するために、GIMP 2 画像分析プログラムによって画像の解像度を最適化した。

#### 【0046】

血液の広がりの変いの要因を説明するため、年齢、性別、及びヘマトクリット値が異なる、三名からの血液を分析した。三名の対象者からの新鮮血を、異なる既知容積でフィルター上にスポットした。これらのスポット血液サンプルの画像を取得して、画素被覆率の算出に用いた。このデータから、図 6 及び図 7 に示すように、三つの異なる検量線を作成した。図 8 に示す、組合せ検量線も作成して、勾配を決定した。この組合せ検量線は、未知容積のサンプルの容積決定に用いた。

40

#### 【0047】

本明細書に開示の方法を用いる場合、予測精度は非常に高く、推定された容積は、一般に、実際の容積に対して  $2 \mu\text{L} \sim 3 \mu\text{L}$  又はそれ以下の範囲内である。ヘマトクリット値は、得られる測定値に影響することが認められた。したがって、ヘマトクリット値が非常に低い又は非常に高い場合、算出される容積は、一般に、スポットされた実際の容積の 5

50

%以内となる。ヘマトクリット値が低い血液の場合、所定容積内の血漿量が多くなるため、より広がりやすくなる。逆に、ヘマトクリット値が高い血液の場合には、所定容積内の血漿量が少なくなるため、一般に広がりにくくなる。このように、開示される方法を用いて得られる測定値は、血液中の血漿量に直接関係する。また、全血から測定される代謝産物レベルは、疾患の状態又は進行をより精確に示し、血漿から測定される濃度との比較がより安定する。

#### 【 0 0 4 8 】

検量線の精度の検証は、フィルター上に既知容積の血液をスポットすることにより、実施可能である。このような場合、容積分析実施者にその容積が知らされない、盲検が通常実施される。表 1 は、盲検で分析された、いくつかの容積を有するサンプルを示す。表 1 からわかるように、全ての容積推定値は、実際の既知容積に対して  $0.2 \mu\text{L} \sim 3.5 \mu\text{L}$  以内となった。

【表 1】

対象者	画像分析を用いて 算出された容積 ( $\mu\text{L}$ )	フィルター上に投入された実 際の容積 ( $\mu\text{L}$ )
1	8.64	9.00
2	11.3	10.00
3	19.26	20.00
4	18.89	20.00
5	36.5	33.00
6	43.06	40.00
7	43.1	40.00
8	48.46	50.00
9	49.80	50.00
10	52.11	50.00

#### 【 0 0 4 9 】

##### 実施例 3：血液の容積を推定する方法

好ましい実施形態において、血液の容積の推定は、以下のように実施可能である。この技術は、DBS 画像中の画素の算出に基づく。スポット中の血液の容積は、その画素数を、既知容積の DBS の検量線の画素数と比較することにより、測定される。ステップ毎の手順は、下記の通りである：

##### ステップ 1：画素数の算出

###### (a) DBS の走査

DBS 中の画素をカウントするため、ステップ 1 は、DBS を走査することである。DBS サンプルは、ブランクフィルター（血液がスポットされていない）と共に、スキャナー上で走査される。走査解像度は、定められた設定値にセットされ、この定められた設定値は、いかなる設定値でも可能であるが、一旦選択されたら、全ての分析に対して同一に維持されなければならない。例えば、 $600 \text{ dpi}$  の解像度を用いることができる。

###### (b) GIMP 2 画像分析ソフトウェアを用いる画像分析

このソフトウェアは、インターネットから自由に入手できる。走査された DBS を、選択ツールを用いてトリミングし、画素を実際の血液スポット部とブランク部に分けてカウントする。ブランクフィルターの画素も同様にカウントする。

###### (c) 実際の画素の被覆率

スポット内の画素の割合を、スポット内の画素数のブランクフィルター内の総画素数に対する比を決定することにより、算出する。

##### ステップ 2：検量線の作成

異なる（理想的には異なるヘマトクリット値を有する）個人から、ヘパリン / EDTA チューブ内に血液を採取する。その後、既知容積の DBS を作成するため、 $5 \mu\text{L}$  から  $60 \mu\text{L}$  までの精確な既知容積の採取された新鮮血を、（三つのサンプル）個々にスポット

する。一晚乾燥させて、ステップ 1 に記載のように走査する。画素被覆率を算出し、画素被覆率対容積の検量線を作成する。検量線の勾配を決定する。

ステップ 3 : D B S 中の血液の容積の算出

未知容積の D B S について、ステップ 1 に記載のように、画素被覆率を算出し、ステップ 2 に記載のように決定された勾配に基づいて容積を算出する。

【 0 0 5 0 】

プレートリーダー装置

本明細書に開示されるこの装置は、血液サンプルが採取されたフィルター（例えば、D B S）を保持するのに使用できる。好ましい実施形態において、本開示は、多数の血液サンプルの走査又は撮像を、二次汚染することなく、走査に係る陰影アーチファクトを最小にして、迅速におこなうための装置を提供する。この装置はまた、サンプルを組織的に維持し、走査に備えてサンプルをしっかり保持し、かつ最大限にサンプルをヒト暴露から隔離する便益をも提供する。この装置のさらなる利点には、実質的にいかなるスキャナーにも適合すること、使用が容易であること、及び耐久性があることが含まれる。この装置は、サンプルの間隔及び走査距離を均一に保つことができるため、走査されたサンプルのバッチ毎の相互比較を可能にする。装置これにより、サンプルを精確に同じように走査するようにする、又は、血液サンプルの容積及び他の特性を算出するためのアルゴリズムを調整するための所要時間を大幅に短縮することができる。この装置は、別体の構成要素から構成され、別体の構成要素は、走査のために組立可能で、除染及びサンプル調製のために分離可能である。この装置はまた、ラベル型板を内蔵しており、走査されたサンプルの記録を保持することができるため、走査されたサンプルの記録及び識別を容易にする。

【 0 0 5 1 】

他の実施形態において、本開示は、本明細書に開示の全ての方法と共に使用可能な、フィルター上の乾燥血液スポットを走査するための装置を提供する。好ましい実施形態において、この装置は、多数の乾燥血液スポットの同時走査を可能にする。図 9 ~ 図 1 5 に示すように、この装置は、最大四つの部品を備えることができ、それらを組み立てる又は一緒に配置することができる。

【 0 0 5 2 】

図 9 ~ 図 1 0 は、この装置の第一の層 1 0 の例示的实施形態を示す。第一の層 1 0 は、一般に、平坦な又は略平坦な材料から成る。第一の層 1 0 は、第一の層 1 0 のそれぞれ反対側に、第一の面 1 4 及び第二の面 1 6 を備えることができる。好ましくは、第一の層 1 0 は、均一な厚さである。好ましい実施形態において、第一の層 1 0 は、一枚のプレキシガラスのシートから成ることができる。第一の層 1 0 は、一つ又は複数の透明部 1 2 を備えることができる。一つ又は複数の透明部 1 2 は、大きさ、形状、直径等が同一であっても異なっても良い。透明部 1 2 の間隔は、第一の層 1 0 の一つ又は複数の寸法において均一であることができる。あるいは、透明部 1 2 の間隔は、任意又は不規則でもよい。いくつかの実施形態において、第一の層 1 0 は、全体的に透明であることができる。

【 0 0 5 3 】

この装置の第二の層 2 0 を、図 1 1 ~ 図 1 2 に示す。第二の層 2 0 は、一般に、平坦な又は略平坦な材料から成る。第二の層 2 0 は、第二の層 2 0 のそれぞれ反対側に、第一の面 2 4 及び第二の面 2 6 を備えることができる。好ましくは、第二の層 2 0 は、略均一な厚さである。好ましい実施形態において、第二の層 2 0 は、一枚のプレキシガラスから成ることができる。一つ又は複数の穴 2 2 が、第二の層 2 0 に形成される。穴 2 2 は、第二の層 2 0 を貫通する（すなわち、第一の面 2 4 から第二の面 2 6 まで延在する）ことができる、あるいは、第二の層 2 0 の一部を通して延在することができる。一つ又は複数の穴 2 2 は、大きさ、形状、直径等が同じであっても異なってもよい。穴 2 2 の間隔は、第二の層 2 0 の一つ又は複数の寸法において均一であることができる。あるいは、穴 2 2 の間隔は、任意又は不規則でもよい。

【 0 0 5 4 】

好ましい実施形態において、穴 2 2 は、図 1 6 に示されるように、各穴が乾燥血液サン

ブルを受容できるように、十分大きくなければならない。通常、そのような血液サンプルは、濾紙 28 又は他の類似する基板の上に包含される。したがって、一つ又は複数の穴 22 のそれぞれは、血液サンプルを包含する濾紙 28 又は類似する基板が穴内に平坦に置かれるように、十分大きくなければならない。好ましい実施形態において、穴内でのフィルター又は基板のいかなる運動も移動も限定される又は排除されるように、穴の寸法は、フィルター又は基板の寸法に密接に適合する、あるいはフィルター又は基板の寸法よりわずかに大きい。

#### 【0055】

図 13 ~ 図 14 は、この装置の第三の層 30 を示す。第三の層 30 は、一般に、平坦な又は略平坦な材料から成る。第三の層 30 は、第三の層 30 のそれぞれ反対側に、第一の表面 34 及び第二の表面 36 を備えることができる。好ましくは、第三の層 30 は、略均一な厚さである。好ましい実施形態において、第三の層 30 は、一枚のプレキシガラスから成ることができる。第三の層 30 は、第三の層 30 の第一の面 34 から上方に延在する、一つ又は複数の隆起部 32 を備える。隆起部 32 は、いかなる大きさ、形状、又は色であっても良い。隆起部 32 は、第三の層 30 と一体に形成されることができる、あるいは、当分野で既知の何らかの付着機構を介して第三の層 30 に取り付けられる、別体の構成要素であることができる。隆起部 32 は、アクリル、プラスチック、金属等何らかの好適な材料から成ることができる。好ましい実施形態において、隆起部 32 は、アクリルディスクから構成されることができる。好ましい実施形態において、隆起部 32 は、第二の層及び第三の層を整列させて積み重ねる際に、各隆起部 32 が第二の層 20 内の穴 22 に嵌合するような、大きさであることができる。

#### 【0056】

図 15 は、この装置と共に使用できる、一つ又は複数のラベル 40 を示す。一つ又は複数のラベル 40 は、それぞれ別体であることができ、あるいは、多数のラベルを含む型板 42 上に含まれることができる。いずれにしても、ラベルは、この装置から除去可能でなければならない。したがって、一つ又は複数のラベルは、又はラベルを含む型板は、この装置の一つ又は複数の層の上に位置する又は載るように構成されることができる。あるいは、一つ又は複数のラベルは、又はラベルを含む型板は、ラベルをこの装置の一つ又は複数の層へのしっかりした固定並びにラベルのこの器具からの除去の双方を可能にする、接着剤を備えることができる。ラベル及び / 又はラベルを含む型板は、紙、トランスファープラスチック、厚紙、プレキシガラス等好適な材料から成ることができる。ラベルは、装置内に保持される試料（例えば、血液サンプル、フィルター、基板など）を識別するためのコード 44 を備えることができる。文字、単語、数字、色、バーコード、マトリックスバーコード、又はそれらの組合せを含む、一種又は複数種のコード 44 を用いることができる。

#### 【0057】

好ましい実施形態において、第一の層、第二の層、及び第三の層は、それぞれ、略同様の大きさ及び形状を有する。好ましくは、各層は、標準的なスキャナー又は他の撮像機器と共に使用可能な、大きさである。したがって、いくつかの実施形態において、各層は、タイプ用紙一枚と略同じ長さ及び幅を有することができる。そのような大きさなら、スキャナーの台にこの装置を載せて、この装置内の試料を走査することができる。各層は、同一の材料又は異なる材料から成ることができる。好ましくは、各層は、プレキシガラス又は他のプラスチックから成る。

#### 【0058】

各層及びラベルは、図 16 ~ 図 18 に示されるように、組み立てられて装置 1 を形成するように構成される。組み立てる際に、各層は、各層の長さ及び幅を他の層の長さ及び幅に合わせる、又は、略合わせるように単に整列させて積み重ねることができる。あるいは、各層を、ネジ、ボルト、クギ状物、化学接着剤、テープ、ゴムバンド、又はこれらの組合せなどの取り付け機構によって確実に組み立てられることができる。一つの実施形態において、第三の層 30 上の隆起部 32 は、第二の層 20 内の穴 22 内にしっかり嵌合して

、これらの層がぴったり保持される。組み立てられたものはまた、端をテープでしっかり保持することもできる。

#### 【 0 0 5 9 】

この装置が組み立てられて全ての部品が整列された時、各層の様々な構成要素も互いに整列されなければならない。すなわち、第一の層 1 0 の透明部 1 2 は、第二の層 2 0 の穴 2 2、第三の層 3 0 の隆起部 3 2、及びラベル 4 0 と整列しなければならない。各層は、一般に、第二の層を第一の層と第三の層との間に介在させて、積み重ねられる。したがって、第三の層 3 0 の一つ又は複数の隆起部 3 2 はそれぞれ、第二の層 2 0 の穴 2 2 内に嵌合し、第一の層 1 0 の一つ又は複数の透明部 1 2 はそれぞれ、穴を挟んで、隆起部が挿入される面とは反対側の面において穴 2 2 を覆う。さらに、この装置が組み立てられかつフ

10

#### 【 0 0 6 0 】

組み立てられると、ラベル 4 0、又はラベルを含む型板 4 2 は、一般に、図 1 8 に示されるように、第三の層に取り付けられる、又は第三の層に隣接して置かれる。しかし、レベル又は型板は、第一の層又は第二の層に取り付けられる、接着される、あるいは第一の層又は第二の層に隣接して置かれることもできる。

20

#### 【 0 0 6 1 】

##### 実施例 4：装置構成要素の例示的特性

例示的实施形態において、この装置の構成要素は、以下の特性を有することができる。第一の層は、8 インチ×11 インチの平らなプレキシガラスから成る（図 9）。第二の層は、3 / 4 インチの穴が穿設された、8 インチ×11 インチの平らなプレキシガラスから成る（図 1 1）。第三の層は、第二の層に穿設された 3 / 4 インチの穴に対応する 3 / 4 インチの着色されたアクリルディスクが取り付けられた、8 インチ×11 インチの平らなプレキシガラスから成る（図 1 3）。サンプル表示用のラベルは、取り外し可能な型板（紙及び / 又はトランスファープラスチックから成る）上に含まれる（図 1 5）。ラベルは、付番方式を有する。

30

#### 【 0 0 6 2 】

##### 実施例 5：装置の組立

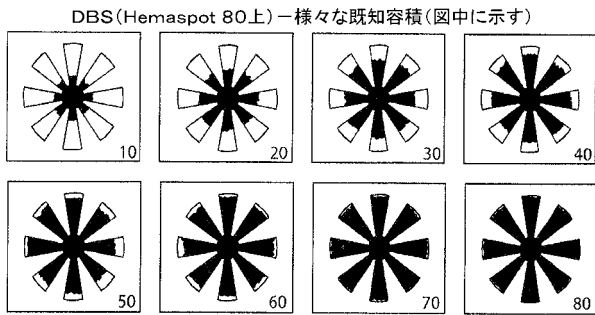
例示的实施形態において、この装置の構成要素は、以下のように組み立てられる。第一の層と第二の層を、第一の層の透明部が第二の層の穴と一致するように共に取り付けられる（図 1 6）。ブランク濾紙を第二の層の一つの穴に配置し、残りの穴に乾燥血液スポットを含むフィルターを入れる。第三の層とラベル型板を組み合わせ（図 1 7）、各ラベルがフィルター又は血液サンプルと適切に対応するように、第一の層と第二の層の上面に配置する。また、第三の層の隆起部（アクリルディスク）が各穴内で各フィルターを押し下げて、各試料の表面積が 1 0 0 % 正確に走査されるようにする。完全に組み立てられた装置（図 1 8）をスキャナー内に配置して、走査する。

40

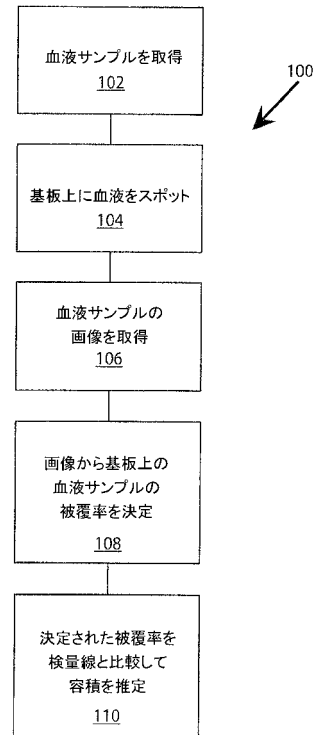
#### 【 0 0 6 3 】

本開示の上記の実施形態、特に「好ましい」実施形態は、単に実施可能な例であり、単に本開示の本質の明確な理解のために記載されていることを強調されなければならない。本開示の趣旨及び本質から実質的に逸脱しない範囲で本開示の上記の実施形態に種々変更及び修正が可能である。そのような修正及び変更の全ては、本明細書において、本開示の範囲及び本開示に含まれるものとされ、以下の請求項によって保護される。

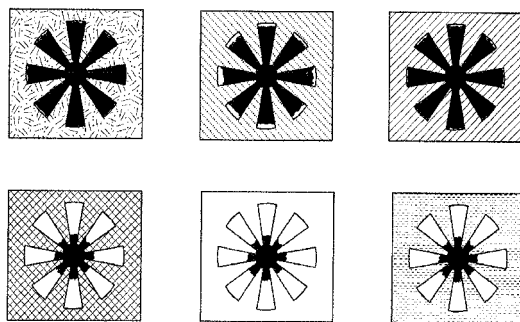
【図 1】



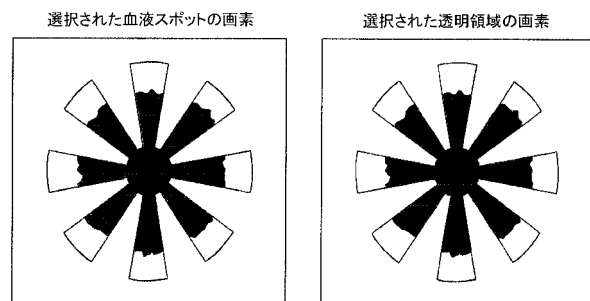
【図 2】



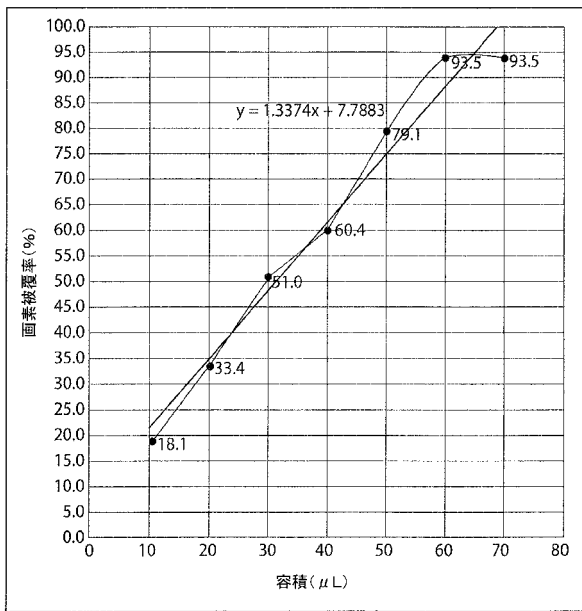
【図 3】



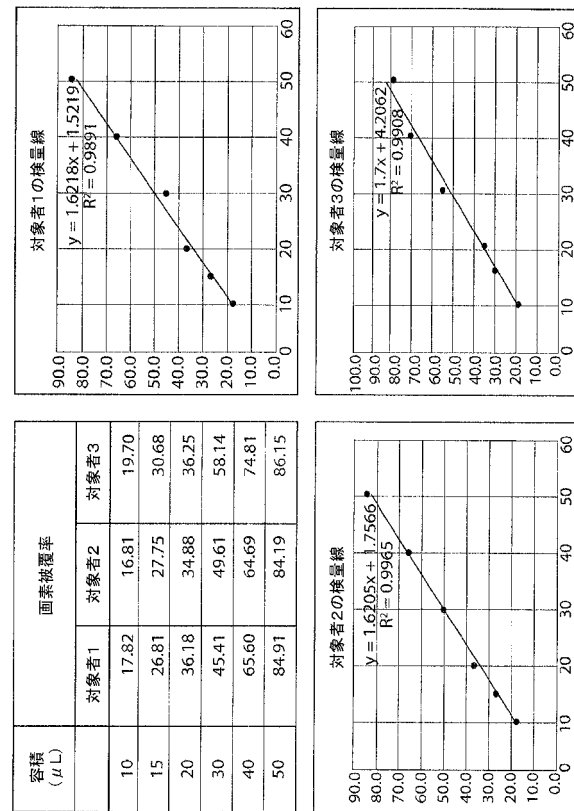
【図 4】



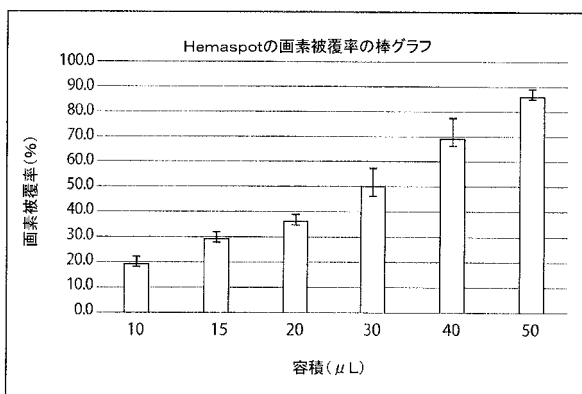
【図5】



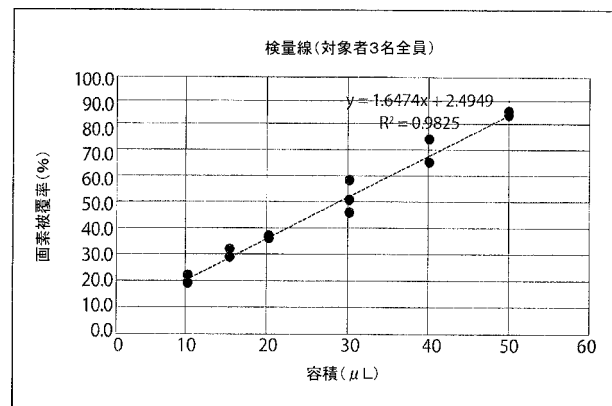
【図6】



【図7】

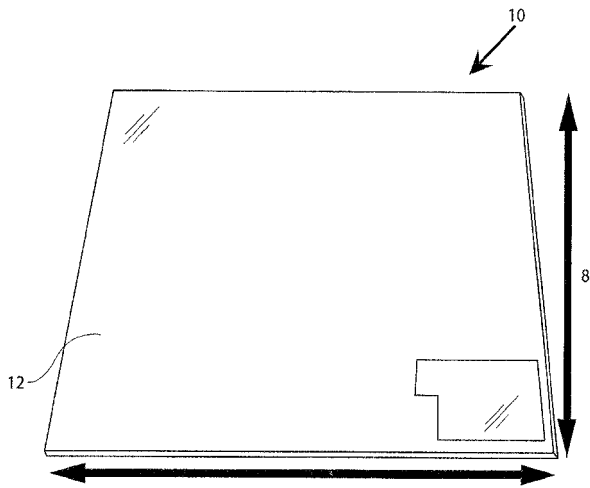


【図8】

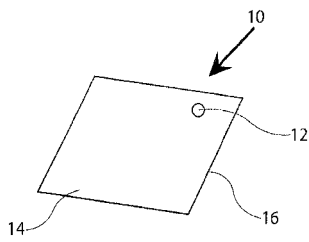




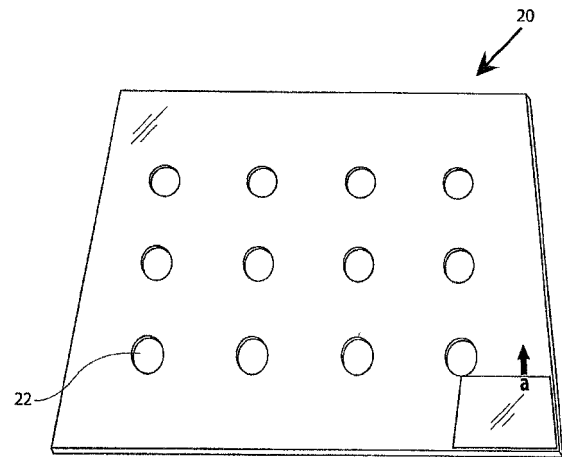
【図 9】



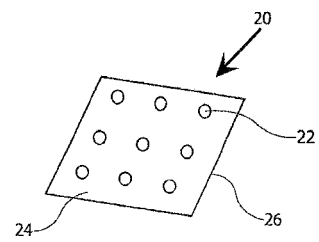
【図 10】



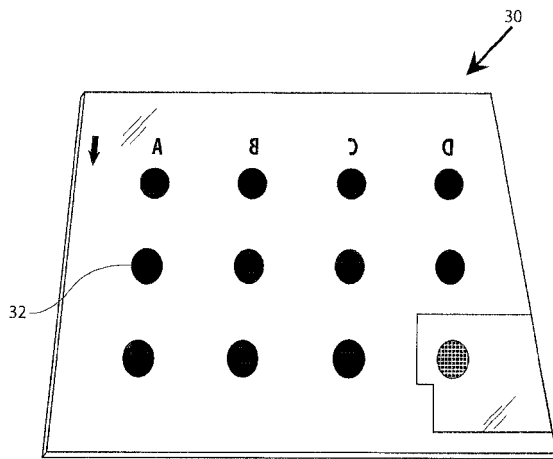
【図 11】



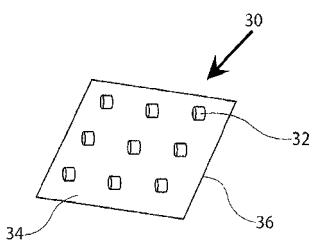
【図 12】



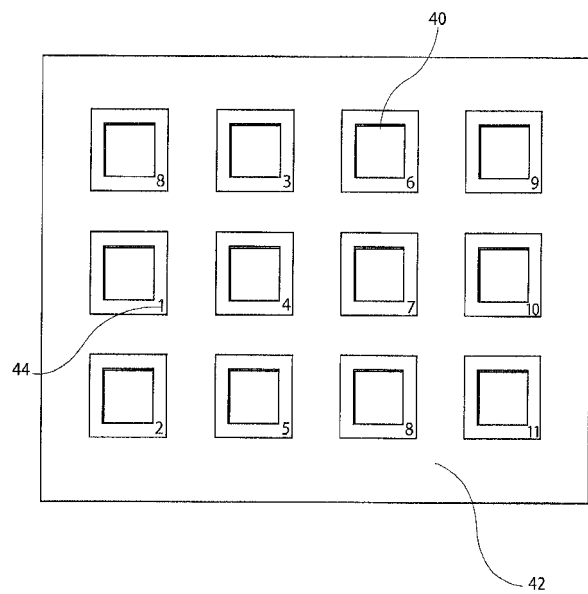
【図 13】



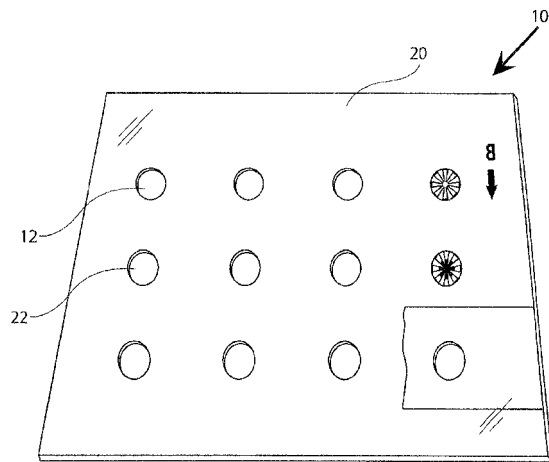
【図 14】



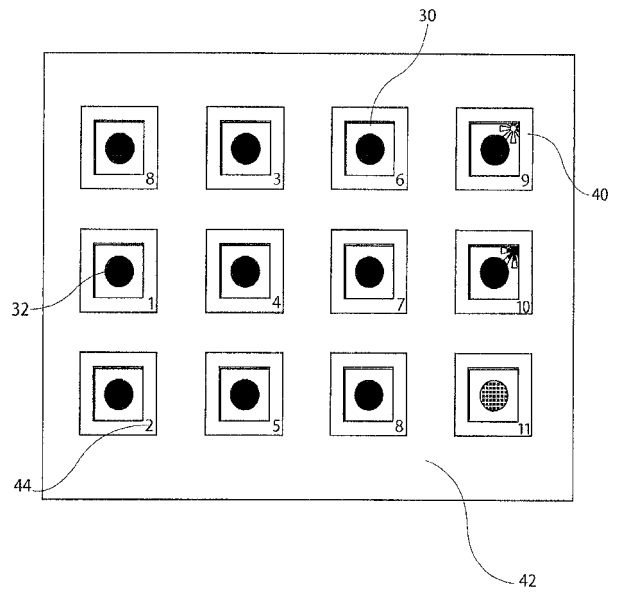
【図 15】



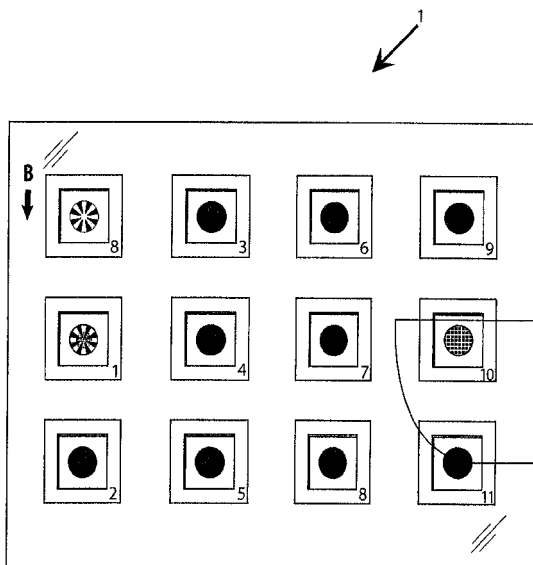
【図 16】



【図 17】



【図 18】



【 国際調査報告 】

PCT/US2016/030226 07.10.2016

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>	International application No. PCT/US 16/30226
<b>Box No. II    Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:	
2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:	
3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 5 and 11-15 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
<b>Box No. III    Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.	
Group I: Claims 1-4, directed to a method for estimating the volume of a blood sample.	
Group II: Claims 6-10, directed to a device for scanning filters for dried blood samples.	
The inventions listed as Groups I-II do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:	
**please see the continuation at the end of this form**	
1. <input checked="" type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.	
2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.	
3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:	
<b>Remark on Protest</b>	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input checked="" type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (January 2015)

PCT/US2016/030226 07.10.2016

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/30226

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - G01N 31/00 (2016.01) CPC - G01N2496/05; G06K9/00; G06T7/602; A61B5/14535; B32B7/00 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																																
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8): G01N 31/00 (2016.01) CPC: G01N2496/05; G06K9/00; G06T7/602; A61B5/14535; B32B7/00; G01N21/00; G01N33/525; G01N33/98; B01L3/50; H04N5/23222 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 36/16; 600/322; 435/11; 435/288.7; 356/433; 382/134; 356/128; 348/135; 356/440; 436/165; 382/128; 494/10; 356/246; 436/173; 435/287.1; 435/283.1; 435/4; 428/98; 264/299; 264/1.1; 422/400 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Pat Base (AU BE BR CA CH CN DE DK EP ES FI FR GB IN JP KR SE TH TW US WO), Google Patent, Google Scholar, Search terms: scanning image filter sample substrate blood dried transparent hole layer align stacked raised estimate volume known compare count pixel hematocrits varying grooves ridges paper dried powder solid transmissive pore porous voids																																
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X — Y</td> <td>US 2013/0011042 A1 (SATISH et al.) 10 January 2013 (10.01.2013) para [0019]-[0020], [0024], [0026], [0033], [0034]; abstract; claims 1 and 10</td> <td>1-2 — 3-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 2011/0115905 A1 (BEUMER et al.) 19 May 2011 (19.05.2011) para [0024]</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>US 6,006,119 A (SOLLER et al.) 21 December 1999 (21.12.1999) col 7, ln 1-4</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2008/0102535 A1 (CHACE et al.) 1 May 2008 (01.05.2008) para [0013]-[0014]; abstract</td> <td>6-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 6,255,061 B1 (MORI et al.) 3 July 2001 (03.07.2001) col 4, ln 8-16; figure 3; abstract</td> <td>6-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004/0026875 A1 (VAN RIJN et al.) 12 February 2004 (12.02.2004) para [0200]; figure 24A</td> <td>6-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013/0301901 A1 (SATISH et al.) 14 November 2013 (14.11.2013); the entire document</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2013/016038 A1 (CONSTITUTION MEDICAL, INC.) 31 January 2013 (31.01.2013); the entire document</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2012/0309636 A1 (GIBBONS et al.) 6 December 2012 (06.12.2012); the entire document</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X — Y	US 2013/0011042 A1 (SATISH et al.) 10 January 2013 (10.01.2013) para [0019]-[0020], [0024], [0026], [0033], [0034]; abstract; claims 1 and 10	1-2 — 3-4	Y	US 2011/0115905 A1 (BEUMER et al.) 19 May 2011 (19.05.2011) para [0024]	3	Y	US 6,006,119 A (SOLLER et al.) 21 December 1999 (21.12.1999) col 7, ln 1-4	4	A	US 2008/0102535 A1 (CHACE et al.) 1 May 2008 (01.05.2008) para [0013]-[0014]; abstract	6-10	A	US 6,255,061 B1 (MORI et al.) 3 July 2001 (03.07.2001) col 4, ln 8-16; figure 3; abstract	6-10	A	US 2004/0026875 A1 (VAN RIJN et al.) 12 February 2004 (12.02.2004) para [0200]; figure 24A	6-10	A	US 2013/0301901 A1 (SATISH et al.) 14 November 2013 (14.11.2013); the entire document	1-4	A	WO 2013/016038 A1 (CONSTITUTION MEDICAL, INC.) 31 January 2013 (31.01.2013); the entire document	1-4	A	US 2012/0309636 A1 (GIBBONS et al.) 6 December 2012 (06.12.2012); the entire document	1-4
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																														
X — Y	US 2013/0011042 A1 (SATISH et al.) 10 January 2013 (10.01.2013) para [0019]-[0020], [0024], [0026], [0033], [0034]; abstract; claims 1 and 10	1-2 — 3-4																														
Y	US 2011/0115905 A1 (BEUMER et al.) 19 May 2011 (19.05.2011) para [0024]	3																														
Y	US 6,006,119 A (SOLLER et al.) 21 December 1999 (21.12.1999) col 7, ln 1-4	4																														
A	US 2008/0102535 A1 (CHACE et al.) 1 May 2008 (01.05.2008) para [0013]-[0014]; abstract	6-10																														
A	US 6,255,061 B1 (MORI et al.) 3 July 2001 (03.07.2001) col 4, ln 8-16; figure 3; abstract	6-10																														
A	US 2004/0026875 A1 (VAN RIJN et al.) 12 February 2004 (12.02.2004) para [0200]; figure 24A	6-10																														
A	US 2013/0301901 A1 (SATISH et al.) 14 November 2013 (14.11.2013); the entire document	1-4																														
A	WO 2013/016038 A1 (CONSTITUTION MEDICAL, INC.) 31 January 2013 (31.01.2013); the entire document	1-4																														
A	US 2012/0309636 A1 (GIBBONS et al.) 6 December 2012 (06.12.2012); the entire document	1-4																														
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>																																
* 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 26 September 2016 (26.09.2016)		Date of mailing of the international search report 07 OCT 2016																														
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																														

**PCT/US2016/030226 07.10.2016****INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US 16/30226

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 2004/0151637 A1 (DAVIN) 5 August 2004 (05.08.2004); the entire document	6-10
A.	US 2007/0227967 A1 (SAKAINO et al.) 4 October 2007 (04.10.2007); the entire document	6-10

PCT/US2016/030226 07.10.2016

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/30226

\*\*continuation of Box III (Lack of Unity)\*\*

## Special Technical Feature:

Group I requires method for estimating the volume of a blood sample comprising the following steps: obtaining a sample of blood; spotting the sample of blood on a substrate; obtaining an image of the sample of blood; determining an approximate coverage or area of the image of the sample; and comparing the determined approximate coverage or area to a standard curve to determine an estimated volume of the sample of blood, not required by Group II.

Group II requires a device for scanning filters for dried blood samples comprising: a first layer comprising one or more transparent portions; a second layer comprising one or more holes, wherein said one or more holes are formed through the second layer and are sized to each receive a dried blood sample filter; and a third layer comprising one or more raised portions; wherein said one or more transparent portions of the first layer overlap with the one or more holes of the second layer and the one or more raised portions of the third layer when the first, second and third layers are aligned and stacked on top of each other with the second layer between the first and third layers, not required by groups I.

## Common technical features:

Groups I-II share the technical feature of a blood sample. However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is being anticipated by US 2006/0102535 A1 to Chace et al. (hereinafter "Chace"). Chace teaches a providing a test sample that was obtained by treating a dried blood sample (abstract; claim 1).

As the shared technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common technical features that would otherwise unify the groups. Therefore, Groups I-II lack unity under PCT Rule 13.

Note: claims 5 and 11-15 are determined unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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

(74)代理人 100195833

弁理士 林 道広

(74)代理人 100116757

弁理士 清水 英雄

(72)発明者 マトソン, サマンサ, エー.

アメリカ合衆国 01450 マサチューセッツ州 グロットン 64 フェアウェイ ドライブ

(72)発明者 トーマス, ビーナ, イー.

アメリカ合衆国 02148 マサチューセッツ州 モルデン エーピーティー. 201 260  
メイン ストリート

(72)発明者 バシン, スワティ

アメリカ合衆国 01720 マサチューセッツ州 アクトン 9 マディソン レーン

Fターム(参考) 2G045 AA01 AA06 CA25 FA19 GA05 GA10 GB10 GC08 HA20 JA01

JA07