

(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2011-529173

(P2011-529173A)

(43) 公表日 平成23年12月1日 (2011.12.1)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/48</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/48		B	2 G O 4 5
<b>GO 1 N 1/28</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 1/28		K	2 G O 5 2

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2011-519087 (P2011-519087) (86) (22) 出願日 平成21年7月23日 (2009.7.23) (85) 翻訳文提出日 平成23年3月24日 (2011.3.24) (86) 国際出願番号 PCT/EP2009/005388 (87) 国際公開番号 W02010/009895 (87) 国際公開日 平成22年1月28日 (2010.1.28) (31) 優先権主張番号 08013447.1 (32) 優先日 平成20年7月25日 (2008.7.25) (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP) (31) 優先権主張番号 61/083,639 (32) 優先日 平成20年7月25日 (2008.7.25) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 511021952 ゼボ ゲゼルシャフト ミット ベシュレ ンクテル ハフツング S e B o G m b H ドイツ連邦共和国 ハイデルベルク カー プフェンガッセ 8 K a r p f e n g a s s e 8, D - 6 9 1 1 7 H e i d e l b e r g, G e r m a n y (74) 代理人 100099483 弁理士 久野 琢也 (74) 代理人 100061815 弁理士 矢野 敏雄 (74) 代理人 100112793 弁理士 高橋 佳大 最終頁に続く
--	--

(54) 【発明の名称】 体液検査における細胞性成分の崩壊

## (57) 【要約】

本発明は、細胞性成分を含む生物学的流体を、凍結 / 融解処理によって加工する方法に関する。この方法は、分析的検出のための生物学的試料を製造するのに特に適している。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

- ( i ) 細胞性成分のほぼ定量的な崩壊を提供し、かつ、  
( i i ) 流体成分の沈降、析出、変性、凝集及びゲル化をほぼ生じさせることのない条件下で、加工された生物学的流体を製造する方法において、  
a ) 細胞性成分を含む生物学的流体を提供し、  
b ) 前記生物学的流体を凍結させ、かつ、  
c ) 工程 a ) の凍結流体を融解する工程を含む、前記方法。

**【請求項 2】**

流体を凍結処理中で - 2 0 から - 1 9 6 の温度、好ましくは - 1 2 0 ~ - 1 9 0 の温度に凍結させ、かつ、その際、凍結された流体を、室温まで、好ましくは 4 0 まで及びより好ましくは 5 0 までの温度で融解処理をおこなう、請求項 1 に記載の方法。 10

**【請求項 3】**

凍結処理を、約 1 2 6 0 / 分 ~ 約 1 2 6 0 0 / 分、好ましくは約 2 0 0 0 ~ 4 0 0 0 / 分の冷却速度で実施し、その際、融解処理を、約 1 0 0 0 / 分 ~ 約 1 1 4 0 0 / 分、好ましくは 1 5 0 0 ~ 4 0 0 0 / 分の融解速度で実施する、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

生物学的流体が体液又は細胞培養液、好ましくは全血、より好ましくは、ヘマトクリット値 0 . 1 ~ 0 . 6 を有する全血である、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。 20

**【請求項 5】**

- ( i ) 沈降及び / 又は析出工程及び / 又は遠心分離工程及び / 又は  
( i i ) 凍結 / 融解工程前の化学的溶解試薬の添加  
を含まない、請求項 1 から 4 までのいずれか 1 項に記載の方法。

**【請求項 6】**

沈降化、析出化、変性化、凝集化及びゲル化生成物をほぼ含まない、ほぼ定量的に崩壊された細胞性成分を含む、未希釈の加工された生物学的流体。

**【請求項 7】**

ほぼ崩壊された赤血球、白血球及び血小板を含む、請求項 6 に記載の加工された生物学的流体。 30

**【請求項 8】**

生物学的流体を、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法によって加工し、かつ、分析物を、加工された生物学的流体中で測定する、生物学的流体試料中で分析物を測定する方法。

**【請求項 9】**

分析物を、生物学的化合物、例えば核酸、ポリペプチド、ペプチド、脂質、糖、ホルモン、代謝物質等、及び製薬学的化合物から選択し、その際、分析物は、好ましくは免疫抑制物質、例えばシクロスポリン、ラパマイシン又はタクロリムスである、請求項 8 に記載の方法。 40

**【請求項 1 0】**

全血試料中の免疫抑制物質を測定する方法において、全血を請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法によって加工し、かつ免疫抑制物質を、加工した全血中で測定する、前記方法。

**【請求項 1 1】**

新生児からの全血試料中で、臨床化学的パラメータを測定する方法において、全血を、請求項 1 から 5 までのいずれか 1 項に記載の方法により加工し、かつ臨床化学的パラメータを加工された全血中で測定する、前記方法。

**【請求項 1 2】**

細胞性成分を含む、生物学的流体を加工するための装置において、その際、装置が： 50

(a) 少なくとも部分的に凍結/加熱可能な流体加工ユニット、  
(b) 流体加工ユニットの予め定められた部分を凍結させるための冷却要素、  
(c) 流体加工ユニットの予め定められた部分を加熱するための加熱要素、  
(d) 場合によっては、流体輸送要素、例えばポンプ要素、  
(e) (i) 前記細胞性成分のほぼ定量的な崩壊を提供し、かつ、  
(ii) 流体成分の沈降、析出、変性、凝集及びゲル化をほぼ生じることのない条件下で、  
流体の凍結/加熱を調整するための制御要素、  
(f) 場合によっては清浄化要素、及び  
(g) 場合によっては、試料分析要素  
を含む、細胞性成分を含む生物学的流体を加工するための装置。

10

【請求項 13】

清浄化要素が、清浄化処理後の流体加工コンジット又はこれらの一部分における、生物学的材料の存在をモニタリングするために調整されている、請求項 14 に記載の装置。

【請求項 14】

清浄化要素が、ピシンコニン酸 (BCA) 試薬である清浄化液を含む、請求項 15 又は 16 に記載の装置。

【請求項 15】

生物学的試料と接触している装置の清浄化のための、ピシンコニン酸 (BCA) 試薬の使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、細胞性成分のほぼ定量的な崩壊を提供するための条件下で、流体成分の沈降、析出、変性、凝集及びゲル化を生じることなく、瞬間凍結/融解 (snap freezing/thawing) 処理によって、細胞性成分を含む生物学的流体を加工するための方法及び装置に関する。この方法は特に、分析物検出のための生物学的試料を製造するのに特に有用である。

【0002】

凍結の効果及び血液細胞の溶血反応は、種々の研究において検討されている。

【0003】

30

Scheiwe ら (Cryobiology 19, 1982, p. 461-477) は、小さいガラス細管中で -196℃ まで種々の直線冷却速度で、凍結保護物質ヒドロキシエチル澱粉 (HES) を用いて又はこれを用いることなく、単離及び濃縮された赤血球細胞の懸濁液の凍結を試験した。冷却速度の関数としての溶血反応のための U 形状曲線から、例えば、0.6 のヘマトクリット値 (Hct) に関しては HES の不在下で、細胞懸濁液が、100% の溶血率を達成するために約 100 / 分の冷却速度で処理すべきことが導かれる。それぞれ 0.4 及び 0.2 の低い Hct を有する赤血球細胞の懸濁液は、これらの条件下で 80 ~ 90% の溶血率を生じた。HES の存在下では、50 ~ 60% の溶血率を達成することができる。約 500 / 分の冷却速度は、約 40% の溶血率を示す。

【0004】

40

Rapatz 及び Luyet は、ヒト赤血球の保存の観点で、凍結温度、凍結速度又は保護剤、例えば凍結保護物質の全血試料における効果を試験した (Cryobiology 4, 1968, pp. 215-222)。

【0005】

それぞれの試験は、外径 1.5 + / - 0.5 mm 及び層厚 0.3 + / - 0.5 mm を有するガラス細管中で実施した。他の刊行物において、論者は、血液の急速凍結後に、いくつかの動物種における溶血反応を試験した (J. Cell. Physiol. 77, 1970, pp. 373-376)。赤血球細胞の溶血反応における近年の結果は、概要 "A review on basic researches on the cryopreservation of red blood cells" (Luyet and Rapatz, Cryobiology 6, 1970, pp. 425-482) 中にもまとめられている。

50

## 【 0 0 0 6 】

しかしながら、全血試料の凍結を取り扱う刊行物では、細胞性成分を含む生物学的試料から、血液試料中に含まれるほぼすべての細胞性成分を、流体成分の沈降、析出、変性、凝集及びゲル化をほぼ生じさせることなく定量的に崩壊させるように、加工した流体をどのようにして得るかについての示唆はない。さらに、分析において加工された全血を使用することは示されていない。

## 【 0 0 0 7 】

生物学的流体からの試料における分析物の測定は、流体試料からの細胞性成分を取り除くために、しばしば複雑かつ時間のかかる予備処理工程を必要とする。さもなければ、細胞性成分又は堆積物は、試料導入装置、細管、分離カラム等を閉塞させうる。例えば、全血は、成分、すなわち赤血球、白血球及び血小板を含む。血試料中の分析物の測定のために、これらの細胞性成分はしばしば、予備処理工程、例えば遠心分離、濾過又は沈降によって取り除かなければならない。

10

## 【 0 0 0 8 】

主要な血液画分である赤血球に関する試料の予備処理は、（生物）化学的試薬を用いての溶血反応、浸透圧性ショック、すなわち、低張液又は高張液によるもの、及び／又は機械的処理を含む。しかしながら溶血は、血漿及び赤血球から生じるいわゆるゴーストから成る溶解液を生じる。これらのゴーストは、ヘモグロビンに欠くものの、依然として本来の赤血球の大きさを有する。これは、ゴーストもまた、分析前において遠心分離、濾過又は沈降によって取り除かなければならないことを意味する。

20

## 【 0 0 0 9 】

しかしながら、これらの工程はしばしば、自動化された試験様式に取り込むのが困難である。これは、特に、標的化された分析物が、細胞質ゾル又は細胞性成分の膜の中に存在する状況、例えば赤血球中の免疫抑制物質である場合に当てはまる。

## 【 0 0 1 0 】

この場合において、細胞性成分は、溶解試薬の添加前に遠心分離及び／又は濾過によって単離又は濃縮されるか、あるいは、これらは、変性試薬、例えば  $ZnSO_4$  とアセトニトリルとの混合物を元の試料に添加することにより変性させ、引き続いて遠心分離される。

## 【 0 0 1 1 】

近年では、分析物の測定のための生物学的流体を加工するために、新規方法が提案されている。この方法は、熱処理をベースとし、かつ自動化された工程に適している (WO 2008/003451)。しかしながら、この方法は、小さい温度範囲内で強く温度に依存し、したがって、複雑化された温度制御を必要とする。さらにこの方法は、凝固が生じる温度  $t_{max}$  によって制限される。さらに、有機改質化剤、例えばメタノールの添加は、加熱プロセス及びしたがって工程パラメータに影響を与える。さらに、生物学的流体中に含まれるあらゆる分析物が、提案された加熱処理中において安定であるわけではない。したがって、この方法は、熱不安定性の分析物を測定しなければならない場合にはあまり好ましくない。

30

## 【 0 0 1 2 】

したがって、本発明の課題は、

40

- ( i ) 前記細胞性成分のほぼ定量的な崩壊を提供し、
- ( i i ) 流体成分の沈降、析出、変性、凝集及びゲル化をほぼ生じさせるものではなく、
- ( i i i ) 小さい温度範囲に限定されるものではなく、かつ、
- ( i v ) 他の流体、例えばメタノール等を、方法に影響を及ぼすことなく添加することを可能にする条件下で、細胞性成分を含む生物学的流体の新規加工方法を提供することである。

## 【 0 0 1 3 】

前記課題の解決は、特許請求の範囲に記載された実施態様を提供することによって達成される。

## 【 0 0 1 4 】

50

本発明の第 1 の実施態様によれば、

( i ) 前記細胞性成分のほぼ定量的な崩壊を提供し、かつ、  
( i i ) 流体成分の沈降、析出、変性、凝集及びゲル化をほぼ生じさせることのない条件で、加工された生物学的流体を製造する方法を提供するものであって、この場合、この方法は、

- a ) 細胞性成分を含む生物学的流体を提供し、
- b ) 前記生物学的流体を凍結させ、かつ、
- c ) 工程 a ) で凍結された流体を融解することを含む。

【 0 0 1 5 】

本発明の他の態様は、ほぼ沈降、析出、変性、凝集及び生成物のゲル化を生じない、ほぼ定量的に崩壊された細胞性成分を含む加工された生物学的流体である。好ましくは、生物学的流体は希釈されておらず、すなわち他の流体を加工中又は加工前に添加するものではない。

【 0 0 1 6 】

さらに、本発明の他の実施態様は、生物学的流体試料中の分析物を測定するための方法であり、その際、生物学的流体は、前記に示すとおり加工され、かつ分析物は、加工された生物学的流体中で測定される。

【 0 0 1 7 】

さらに、本発明の他の実施態様は、細胞性成分を含む生物学的流体を加工するための装置であり、この場合、この装置は、

- ( a ) 少なくとも部分的に凍結 / 加熱可能な流体加工ユニット、
  - ( b ) 流体加工ユニットの予め定められた部分を凍結するための冷却要素、
  - ( c ) 流体加工ユニットの予め定められた部分を加熱するための加熱要素、
  - ( d ) 場合によっては流体輸送要素、たとえばポンプ要素、
  - ( e ) ( i ) 前記細胞性成分のほぼ定量的な崩壊を提供し、かつ、
  - ( i i ) 流体成分の沈降、析出、変性、凝集及びゲル化をほぼ生じることない条件下で、流体の凍結 / 加熱を制御するための制御要素、
  - ( f ) 場合により清浄化要素及び
  - ( g ) 場合により試料分析要素
- を含む。

【 0 0 1 8 】

驚くべきことに、本発明は、生物学的試料中の細胞性成分、好ましくは高等生物からの細胞又は細胞クラスター、より好ましくは動物細胞、たとえばヒト細胞を含む哺乳類細胞及び最も好ましくは血液細胞、例えば赤血球細胞、白血球細胞及び / 又は血小板を、時間及び温度に関して予定された条件下での凍結 / 融解によって達成することができる。本発明による方法の工程 b ) 及び c ) による凍結 / 融解処理は、少なくとも 1 回、好ましくは 2 回又はそれ以上、あるいは、最も好ましくは 3 回又はそれ以上、実施することができる。

【 0 0 1 9 】

本発明による処理を用いて、生物学的流体中に含まれる細胞性成分は、ほぼ定量的に崩壊されて、流体成分の沈降、析出、変性、凝集及び / 又はゲル化をほぼ生じさせることなく、亜細胞性粒子 ( subcellular particle ) を生じる。これにより、本発明によって加工された生物学的流体は、亜細胞性粒子と同様にイオン、ガス、低分子量物質、例えば糖、及びタンパク質を含む流体成分を含む。

【 0 0 2 0 】

本発明による「生物学的流体」は、細胞性成分及び流体成分を含む生物学的懸濁液に関し、この場合、これは体液又は細胞培養液から選択される。細胞性成分は細胞、細胞クラスター又は細胞ゴーストであり、流体成分は血漿、尿、唾液等又は細胞培養液である。

【 0 0 2 1 】

体液のための特別な例は全血、尿、脳脊髄液、唾液、リンパ液であり、かつ細胞培養液

10

20

30

40

50

のための特別な例は哺乳類細胞培養液である。

【0022】

本発明において使用される「細胞性成分」は、細胞、細胞クラスター又は細胞ゴースト、特に赤血球ゴーストに関する。

【0023】

本発明の内容の範囲内で、処理された生物学的流体中に含まれる「亜細胞性粒子」は、細胞フラグメント、例えば膜小胞に関し、この場合、これは、本発明による方法によって生じ、かつ修復された膜の極めて小さい球及び／又は極めて小さい粒子から成るものであって、これらは、

- a) 少なくとも約24時間の静置において沈降することなく、かつ、
- b) 少なくとも10分に亘って、約3000Gの遠心分離後であっても、白血球ゴースト(約5~8µmのサイズ)又は損傷のない細胞とは異なって沈降することなく、かつ、
- c) 約11000Gを上回る少なくとも20分に亘っての遠心分離後に沈降することを特徴とする。

10

【0024】

本発明の内容の範囲内で、生物学的試料中に含まれる「細胞性成分のほぼ定量的な崩壊」とは、約70%、好ましくは約80%、より好ましくは約90%及びさらに最も好ましくは約100%の細胞性成分が、亜細胞性粒子に崩壊することを意味する。

【0025】

本発明の内容の範囲内で、これに関して約100%の望ましい崩壊が、本発明による処理により、例えば、天然の抗凝固性の全血を用いて達成されうるものであり、その際、この崩壊速度は、0.1~0.6で異なってもよいヘマトクリットとは無関係であることが見出された。

20

【0026】

本発明による加工された全血又は加工された溶血は、血漿及び崩壊された血液細胞、すなわち、崩壊された赤血球、白血球及び血小板を含む。

【0027】

加工された、すなわち、細胞崩壊された全血中の血漿は、イオン、例えばナトリウムイオン、塩化物イオン、カリウムイオン、マグネシウムイオン、リン酸イオン及びカルシウムイオン、低分子量物質、例えば単糖類、ホルモン、ガス、栄養物質、例えば脂質又はビタミン、代謝物質、例えば尿素又は尿酸並びに血漿タンパク質、例えばアルブミン及びグロブリンを含む。本発明による「全血」とは、血液細胞がほぼ損傷のない血液に関し、「溶血」とは、溶血反応が生じた全血に関する。

30

【0028】

溶血性試料、例えば赤血球ゴーストが、前記に示すようにほぼ崩壊することができるが見出された。さらに、全血中に存在する白血球及び／又は血小板が、前記に示すようにほぼ定量的に崩壊することができるが見出された。

【0029】

したがって、亜細胞性粒子を含む加工された生物学的流体は、流動的分離系によってさらに加工することができ、かつ、これらの系を閉塞させることはない。

40

【0030】

得られた生物学的流体は、添加された試薬を含むものではなく、その結果、希釈されていないものとして特徴付けられる。したがって、生物学的流体は、付加的な計量供給なしに、定量的な方法で加工することができる。

【0031】

したがって、処理された生物学的流体は、in situ 分析技術において、例えば固相抽出(SPE)、この場合、これはオンライン/オフラインSPE上で希釈されていないもの、あるいは、スポッティング、サンプリング又は分取を必要とする技術、例えばマイクロ流体装置上における技術において使用するのに適している。

【0032】

50

本発明による方法の範囲内における凍結は、瞬間凍結によって実施することができる。  
瞬間凍結は、

- a) 前記試料装置を、断熱槽中に含まれる低温流体中に含浸するか、
- b) 前記試料装置を、低温流体の蒸気相に含浸するか、あるいは、
- c) 前記試料装置を、試料装置と密着し、かつ、低温流体又は低温流体の蒸気相中に含浸されたスリーブ中に含浸することによって、試料装置中に含まれる試料の含浸を実施することができる。

【0033】

本発明において使用される「低温流体」は、水溶液を凍結するのに必要な温度範囲、好ましくは - 90 を下回る温度において流体である材料に関する。低温流体は、冷却ガス又は極低温液体 (cryogenic liquid) であってもよい。極低温液体は、冷却された液体、例えばアルゴン、ヘリウム、水素、窒素、酸素、メタン、二酸化炭素、亜酸化窒素、イソペンタン、ヘキサン又はエタノール及び他の液体、例えば炭化水素液体又はこれらの混合物である。好ましい実施態様において、液体窒素を使用する。

【0034】

凍結中に、生物学的流体を、本発明による方法の - 20 ~ - 196 の温度、好ましくは - 120 ~ - 190 の温度で凍結させる。それぞれの冷却速度は、約 1260 /分 ~ 約 12600 /分であり、好ましくは約 2000 /分 ~ 約 5000 /分及び最も好ましくは約 2500 ~ 3500 /分、例えば 3150 /分である。

【0035】

好ましくは、引き続いて凍結された流体を、少なくとも室温で、好ましくは少なくとも 40 で、最も好ましくは少なくとも 50 であって、かつ、60 まで又はさらに 75 までの温度で融解処理を実施する。

【0036】

融解に関して、凍結試料を含む試料装置を、試料装置と密着し、かつ加熱することができるスリーブ中に挿入しながら、熱処理を実施してもよい。熱処理は、任意の適した手段で実施することができ、かつ、例えば伝導加熱、誘電加熱、例えばマイクロ波処理、例えば US 6,605,454 中に記載されているもの、対流加熱、抵抗加熱及び / 又はレーザー励起による加熱であってもよい。

【0037】

それぞれの融解速度は、約 500 /分 ~ 約 11400 /分、好ましくは約 1000 /分 ~ 約 4000 /分及び最も好ましくは約 1500 ~ 2500 /分である。

【0038】

凍結と融解との間の時間は最小限に維持することができ、好ましくは 1 ~ 5 秒であってもよい。しかしながら、より長い時間もまた許容可能である。

【0039】

本発明による適した試料装置は、計量供給ユニットの容量装置であってもよく、かつ - 200 までの温度に耐えうる熱伝導性又は熱誘導性の材料から製造される。好ましい材料はステンレス鋼、ガラス又はプラスチックである。最も好ましくはステンレス鋼である。

【0040】

本発明の装置は、流体加工ユニットを含み、この場合、これは少なくとも部分的に凍結可能 / 加熱可能である。この加工ユニットは、好ましくはニードル、例えばインジェクションニードル、ピペットチップ、細管、例えばガラス細管、シリンジ又はコンジットを含む。最も好ましくは、流体処理系のインジェクションニードル又はピペットチップであり、例えば HPLC のためのオードサンプラー、例えば PAL - オートサンプラー (LEAP-Technologies) 又はピペッティングロボット、例えば Evoclean (Tecan) である。

【0041】

流体加工ユニットはさらに、in situ 分析のための材料を含んでいてもよく、例えば固相抽出 (SPE) のためのクロマグラフ吸着媒、例えば C18 - 変性シリカ、Oasis

10

20

30

40

50

H L B 及びその他公知技術の類似のものである。

【0042】

流体加工ユニット、特にニードル、ガラス細管又はピペットチップの内腔 / 内径は、0 . 0 1 ~ 5 mm、好ましくは 0 . 1 ~ 2 mm、さらに好ましくは 0 . 5 ~ 1 mm で異なっている。最も好ましいピペットチップ、ガラス細管又はニードルの内腔 / 内径は約 0 . 3 ~ 約 0 . 5 mm である。最も好ましいニードルの内腔 / 内径は約 0 . 3 mm である。

【0043】

流体加工ユニット、特にプラスチック又は金属から成る装置の壁厚は、特に約 0 . 0 5 ~ 0 . 5 mm の範囲である。

【0044】

崩壊の完全性は、細胞カウント、特に Neubauer カウントチャンバー中で、特定の成分のための微視的検査によって及び / 又は遠心分離後の沈降形成がないことによって決定することができる。これに関連して、約 9 5 % の細胞性血液成分が赤血球であることに留意すべきである。したがって、血液試料中の細胞カウントは、好ましくは、赤血球をカウントすることによって測定される。

【0045】

本発明によれば、試料中の細胞カウントは、好ましくは、本来の値の 0 . 1 % 又はそれ未満及びより好ましくは 0 . 0 1 % 又はそれ未満に減少する。例えば、1  $\mu$  l 当たり  $5 \times 10^6$  個の赤血球細胞を有する試料について本発明による処理をおこなう場合には、細胞カウントは好ましくは 1  $\mu$  l 当たり  $5 \times 10^3$  細胞又はそれ未満、より好ましくは 1  $\mu$  l 当たり 5 0 0 細胞又はそれ未満である。最も好ましくは、試料は、検出可能な細胞不含である。特定の成分、例えば赤血球ゴーストの不在は、光学顕微鏡による観察、例えば 1 0 0  $\times$  倍率まで、及び / 又は 3 0 0 0 g まで、好ましくは 7 4 0 0 g までの 1 0 分に亘っての遠心分離によって測定されてもよい。

【0046】

瞬間凍結のために、細管コンジット (capillary conduit) (又は、前記に示す任意の他の流体加工ユニット) に先ず試料を装入する。これは、好ましくは、一定容量のガス、例えば空気によって試料を沈降することによって達成される。例えば、ガスの最初の容量を、流体加工ユニット中に吸引し、引き続いて試料及びガスの第 2 の容量を吸引することができ。その後、試料を含有する流体加工ユニットは、

- a) 低温流体又は低温流体の蒸気相中に含浸されてもよいか、
- b) 低温流体又は低温流体の蒸気相によって冷却された表面と接触させてもよいか、あるいは、
- c) 試料装置と密着し、かつ低温流体又は低温流体の蒸気相中に含浸されたスリーブ中に挿入されてもよい。

【0047】

本発明の方法の融解処理のために、凍結試料を含む流体加工ユニットは、例えば誘電加熱、例えば US 6,605,454 中に記載されているマイクロ波処理、対流加熱、抵抗加熱及び / 又はレーザー励起による加熱を含むものであってもよい、任意の適した手段によって加熱される。

【0048】

流体加工ユニットからの抽出のために、加工された流体は、空気及び / 又は他の流体によって置換することができる。空気のみを使用する場合には、加工した流体の希釈は生じない。

【0049】

生物学的流体は、体液、例えば全血液、尿素、脳脊髄液、唾液、リンパ液等であるか、あるいは、細胞培養物、特に哺乳類細胞培養液からの流体又は細胞性成分を含む任意の他の生物学的流体、特に血液細胞を含む流体であってもよい。より好ましくは、生物学的流体は全血、例えば静脈血、動脈血又は毛細血管血、特に凝血防止処理された全血、例えば

10

20

30

40

50



EDTA - 、クエン酸塩 - 又はヘパリン処理された全血である。例えば、試料は、凝固防止剤を含む血液抜き取り装置で取り出され、かつ、以下に記載するように直接さらに加工することができる。

【0050】

試料容量は、広範囲に例えば 1 n l 又はそれ以上、好ましくは 1 0 n l 又はそれ以上及び 1 m l までで可変であってもよい。したがって、方法は、好ましくは極小化された適用、例えばチップフォーマット上のマイクロ流体装置、ナノ LC - MS、MALDI - MS 分析等に適している。

【0051】

本発明の方法は、任意の沈降及び / 又は析出及び / 又は遠心分離工程及び / 又は化学 / 生物化学的試薬の添加を必要とするものではない。したがって、処理は好ましくは、細胞性成分の予備除去及び / 又は溶解なしで実施する。方法は、任意の適した装置中で、例えば単回使用装置又は再利用可能な装置中で実施することができる。好ましくは、方法は自動化された手段であり、この場合、これは一体化された装置中で、流体試料を含む装置を輸送し、場合によっては混合後に、例えば他の流体と一緒に、予備的処理することなしに、特に細胞性成分の除去及び / 又は溶解することなしに実施することができるものである。装置の範囲内で、この試料は、好ましくは細胞性成分の予備的除去及び / 又は溶解なしで、直接処理される。処理後に、後続の工程、例えば分析物測定を実施することができる。より好ましくは、この処理は、ほぼ天然の試料、例えば、ほぼ損傷のない細胞性成分、例えば全血を含む試料を用いて実施する。

10

20

【0052】

本発明の方法は、加工前及び / 又は加工後において生物学的流体に対して他の流体を添加することを含んでもよい。他の流体は、生物学的流体と相溶性の任意の流体であってもよく、それにより、沈澱、凝集又は凝塊を生じることはない。他の流体は、有機溶剤であってもよく、好ましくは生物学的流体の容量に対して 2 0 % ( 容量 / 容量 ) まで、より好ましくは 1 0 % ( 容量 / 容量 ) までの量であってもよい。有機溶剤は、好ましくは水混和性溶剤、例えばメタノール、エタノール、アセトニトリル、ジメチルスルホキシド ( DMSO )、ジメチルホルムアミド ( DMF ) 及びこれらの組合せから選択される。

【0053】

好ましくは、他の流体は、本質的に細胞性成分の崩壊に影響を及ぼすものではない。より好ましくは、他の流体は水性液体、例えば水性緩衝溶液又は他の生物学的流体、好ましくは、 0 . 5 ~ 1 . 4 % NaCl、より好ましくは 0 . 7 ~ 1 . 2 % NaCl 及び最も好ましくは約 0 . 9 % の NaCl に相当するイオン濃度を有するものである。

30

【0054】

他の流体は、少なくとも 1 種の標準化及び / 又は較正化合物の予め定められた量を含む、標準化及び / 又は較正された流体であってもよい。標準化及び / 又は較正化合物の添加は、処理された生物学的流体が、クロマトグラフィー、分光測定及び / 又は分光分析方法によってさらに分析される場合において特に適している。標準化及び / 又は較正化合物は、適した同位体、例えば <sup>2</sup> H 及び / 又は <sup>13</sup> C を含む分析物類似体であってもよく、したがって質量分光測定によって検出することができる。適した較正物質は、例えば Clin Cal ( 登録商標 ) マトリックスキャリブレーターから選択することができる。

40

【0055】

さらに方法は、脂質、タンパク質、ペプチド、核酸及び炭水化物のための標識物質 / 染色化合物を、加工前及び / 又は加工後に生物学的流体に添加することを含んでもよい。

【0056】

加工された流体は、好ましくは 0 . 5 ~ 1 . 4 % NaCl、より好ましくは 0 . 7 ~ 1 . 2 % NaCl 及び最も好ましくは、ほぼ生理学的塩濃度に相当するイオン濃度を有する。加工された流体は、添加された試薬、例えば崩壊試薬及び / 又はデタージェントを不含であってもよい。一方で、加工された流体はさらに有機溶剤及び / 又は前記に示すような

50

添加した水性流体を含有していてもよい。最も好ましくは、加工した流体は、崩壊した全血である。

【0057】

さらに本発明は、前記に示すような処理がなされた生物学的流体試料中の分析物を測定するための方法に関する。分析物は、生物学的流体中で検出することができる任意の分析物であってもよく、例えば生物学的化合物、例えば核酸、ポリペプチド、ペプチド、脂質、糖、ホルモン、代謝物質等である。他方で、分析物は非生物学的化合物、例えば製薬学的化合物であってもよい。好ましい実施態様において、分析物は免疫抑制物質、例えばシクロスポリン、ラパマイシン又はタクロリムス又は関連する化合物である。

【0058】

加工された液体中の分析物測定は、任意の公知方法にしたがって実施することができる。例えば、分析物の測定は、化学的、生物化学的及び／又は生化学的方法にしたがって実施することができ、かつ、ハイブリダイズ反応、免疫学的反応、酵素反応、例えば核酸増幅、クロマトグラフィー分析、分光測定、例えば質量分光測定又はNMR分析及び／又は分光分析を含んでいてもよい。特に好ましい実施態様において、本発明は、全血試料中で免疫抑制物質を測定するための方法に関し、その際、全血は前記に示す処理によって加工され、かつ免疫抑制物質は、標準化された方法にしたがって、たとえば質量分光測定(MS)法によって加工された全血中で測定される。

【0059】

本発明による方法は、生物分析的及び臨床化学的分析手段、例えば固相抽出(SPE)、液-液抽出(LLE)等に特に適している。したがって、本発明による方法にしたがっての好ましい分析方法はSPE、特に全血からの標的分析物のin situ SPE、希釈されていない細胞崩壊血を用いての標的分析物のオンライン/オフライン/インライン抽出方法、例えばSPEを、HPLC又はMSを組合せるか、あるいは組み合わせることなく、あるいは細胞崩壊血のプレート上へのスポッティング、たとえばMALDI-プレート、アレイ、マイクロチップ等、希釈されていない崩壊血の適切な容器、たとえば96穴プレート、エッペンドルフチューブ等へのサンプリング、希釈されていない細胞崩壊血の分化及び加工、たとえばMALDI-MS及び希釈されていない細胞崩壊血のマイクロ流体装置へのサンプリング、例えばLab-オンチップ又はポイントオブケアテスト(POCT)である。

【0060】

他の好ましい実施態様において、分析物は臨床化学的パラメータ、たとえば先天性代謝障害、たとえばフェニルケトン尿症に関連する臨床化学的パラメータである。この実施態様において、試料は好ましくは、新生児から得ることができる毛細血管試料である。

【0061】

他の実施態様において、方法は、非ヒト動物、好ましくはマウス、モルモット及びラットからの血液試料を加工するのに適している。たとえば、試料は自動化された系により取り出すことができ、かつ直接前記に示すように加工することができる。好ましい自動化された系は、Dilab(登録商標)からのAccusampler(登録商標)である。

【0062】

本発明の装置は、さらに液体装入口を含むものであってもよく、そこで、生物学的流体の試料は、流体加工ユニット中に導入することができる。流体は、装置の範囲内で、輸送要素、たとえばポンプ要素によって輸送することができる。

【0063】

流体加工ユニットは、少なくとも部分的に凍結可能/加熱可能である。流体加工ユニットの凍結可能及び／又は加熱可能な部分は、装置の一体化された部分であるか、あるいは、装置から取り外し可能な部分であってもよい。流体加工ユニットは、好ましくは約0.1~0.8mmの内径を有する。

【0064】

したがって、生物学的流体は、本発明によって、取り外し可能なユニット、たとえばス

10

20

30

40

50

ステンレス鋼ニードル中で、あるいは、細管コンジットの形の一体化されたユニット、たとえばステンレス鋼細管中で、直接加工することができる。

【0065】

冷却要素は、流体加工ユニットと密着し、かつ低温流体又は低温流体の蒸気相中に含浸されるスリーブであってもよい。加熱要素は、任意の適した加熱要素、たとえば誘電加熱のための要素、対流加熱のための要素、抵抗加熱のための要素及び／又はレーザー励起による加熱のための要素であってもよい。たとえば、加熱要素は、流体加工ユニットの予め定められた部分又はマイクロ波放出器周囲を包囲する加熱コイルであってもよい。制御要素は、試料加工の制御、すなわち、流体の冷却及び加熱を、たとえば冷却／加熱強度及び／又は流体加工ユニットの凍結可能／加熱可能な部分における時間を制御することによって提供する。

10

【0066】

装置は、場合によっては、相当する流体加工ユニット又は少なくともその一部の清浄化及び／又は清浄化効率のモニタリングに適した清浄化要素を含むものであってもよい。

【0067】

清浄化要素は、流体加工ユニット又はその一部を、予め定められた数の生物学的流体加工サイクルの後に、清浄化を実施するのに適している。好ましくは、清浄化は、流体加工ユニット又はその一部中に清浄化液を通過させることを含む。清浄化液は、加工ユニット中で生物学的、たとえばタンパク質性の残留物を除去することができる。清浄化は、流体供給ユニット又はその一部の清浄化液での吸引及び投与又はフラッシングを含んでもよく、その際、流体加工ユニット又はその一部は、好ましくは加熱される。清浄化効率は、流体加工ユニット又はその一部において、清浄化プロセス中での生物学的材料の存在をモニタリングすることによって制御されてもよい。

20

【0068】

WO 2008/003451において、流体加工ユニットのための適した清浄化手段は、少なくとも2工程が必要であると記載されている。最初に、流体加工ユニットは、アルカリ性のNaCl溶液を用いて、好ましくは60℃又はそれ以上でフラッシングしなければならない。これらの条件下で、残留する生物学的材料を酸化する。次の工程においてこの処理の効率を、適した試薬、たとえばOPA試薬によって、340nmで測光的に検出することができる反応生成物を生じさせる目的のためにモニタリングされる。

30

【0069】

好ましい実施態様において、本発明は代替的な清浄化手段を提供し、この場合、この方法は、

- a) 1個のみの処理工程を必要とし、
- b) 清浄化プロセスの同時の実施及びモニタリングを可能にし、
- c) 金属から成る材料の腐蝕を生じさせるものではなく、かつ、
- d) 60℃未満の温度で有効である。

【0070】

この清浄化手段は、本発明の方法及び装置において使用することができる。しかしながら、さらに金属及び／又はプラスチックコンジットを介して、特にコンジットを介して、生物学的試料を輸送することを含む、種々の方法及び装置においても適用可能である。

40

【0071】

したがって、本発明の他の態様は、ピシンコニン酸(BCA)試薬(Stoscheck, Meth. Enzymol. 182 (1990), 50-69)、好ましくはアルカリ性ピシンコニン酸(BCA)/酒石酸塩/銅試薬の、生物学的試料、たとえば全血又は血漿試料と接触する装置を清浄化するための使用である。たとえばPierce Chemicalsから入手可能なBCA試薬は、タンパク質の存在下で、銅(I)-イオンとの紫色の反応生成物を形成する。この反応は、連続的に562nmでモニタリングすることができる。驚くべきことに、BCA試薬は、生物学的試料と接触する装置、たとえば試料加工装置の内部の金属及び／又はプラスチック部分に対して付着するバイオフィルムを除去することが可能である。BCA試薬は、適した条

50

件下で、たとえば60℃までの温度で、清浄化すべき装置の一部と接触させてもよい。

【0072】

したがって、本発明のもう一つ態様は、BCAを含有する清浄化試薬を提供することである。本発明による清浄化試薬は、好ましくはBCA、金属イオン、たとえば銅イオン、特に銅(I)イオン及び水性緩衝溶液を含み、かつアルカリpH、たとえば約10~12のpH、特に約pH11を有する。水性緩衝溶液は、適した緩衝剤、たとえば酒石酸塩、重炭酸塩又は炭酸塩緩衝剤、またはこのような緩衝剤の組合せを含んでいてもよい。

【0073】

さらに、装置は場合によっては試料分析要素を含む。試料分析要素は、生物学的試料中で分析物検出に適した任意の要素であってもよい。好ましくは、試料分析要素は、クロマトグラフィー要素、たとえばHPLC要素、抽出要素、たとえば固相抽出(SPE)要素、分光測定要素、例えば質量分光測定又はNMR要素、分光分析要素、酵素及び/又は免疫アッセイ要素及び/又はハイブリダイゼーションアッセイ要素を含む。

10

【0074】

最終的に、装置は、リモートコントロールユニットからデータを転送するか、及び/又は受容することができるプロセッサユニットを含んでいてもよい。データ転送は、オンライン、たとえばワイヤレス転送、たとえばGSM/GPRS/3Gデータ転送を介して生じてもよい。リモートコントロールユニットは、それぞれの装置に対して流体加工を許可するために調整されていてもよく、たとえば、実施に関する支払い後に、予め定められた数の流体加工手段が受領される(すなわち、ペイ-パー"pay-per"プロセス)。

20

【0075】

本発明の1個又は複数個の観点に関して説明されたすべての好ましい実施態様は、すべての他の観点に関するものであることに言及すべきである。

【0076】

本発明は以下の実施例によってさらに説明される。

【0077】

実施例

例1

細胞性成分、すなわち、ヒト全血中に存在する赤血球、白血球及び血小板を崩壊するための方法

30

第1工程において、20µlの周囲空気を、シリンジ/インジェクションニードル(ステンレス鋼、0.3mm内径;0.2mm壁厚)によって吸引し、引き続いて、ポランテアからの凝固防止処理された全血試料10µlを吸引した(ヘマトクリット値0.42)。

【0078】

最終的に、再度20µlの空気を吸引した。その後に、シリンジ/インジェクションニードルを、液体窒素で充填された断熱容器中に含浸し、かつ、全血試料を、液体窒素の表面下に位置するように置いた。瞬間凍結方法は、約2700/分の冷却速度に相当する記載された条件下で5秒費やした。その後に、凍結した試料を含むシリンジ/インジェクションニードルを、2秒以内に、50℃に調整された水浴中に含浸させ、かつ、凍結試料が水表面下に位置するように置いた。融解時間は8秒であり、これは、約1900/分の加熱速度に相当する。

40

【0079】

瞬間凍結/融解プロセス前後の微視的検査及びNeubauer血球計算盤を用いての細胞カウントは、処理された血液中に存在する細胞性血液成分(赤血球 $5.2 \times 10^6 / \mu l$ ;白血球 $6.5 \times 10^3 / \mu l$ ;血小板 $2.2 \times 10^5 / \mu l$ )が、定量的に崩壊したことを示す。

【0080】

例2

流体処理ユニットの洗浄及び洗浄効率の同時モニタリング

50

例 1 と同様に、全血試料の瞬間凍結及び融解の方法のために 50 回使用したステンレス鋼細管コンジット（内径 0.5 mm；長さ 10 cm）を、以下の方法で清浄化した。いわゆる BCA 試薬（0.1 N NaOH 中のピシンコニン酸、酒石酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、4 % 硫酸銅；Pierce Chemical）の溶液、この場合、この溶液は、本来タンパク質の測定に使用されるものである、を、細管コンジットを介して、200  $\mu$ l / 分の流速でポンプ汲み上げた。さらに、細管コンジットを、50 に加熱した水浴中に含浸した。溶離液を UV / VIS 検出器を介して通し、かつ吸収率を 562 nm でモニタリングした。完全な清浄化、すなわち、残留タンパク質等の除去は、シグナルが再度ベースラインに到達した後に達成され、この場合においては 9 分後であった。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/005388

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
INV. 601N33/80 A61L2/18

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)  
G01N A61L

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

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

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/003451 A (SEBO GMBH [DE]; SEIDEL DIETRICH [DE]) 10 January 2008 (2008-01-10) cited in the application	6-7
A	claims 1,16,20,29	1-5,8-14
X	SCHEIWE M W ET AL: "AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE FREEZING OF RED BLOOD CELLS WITH AND WITHOUT HYDROXYETHYL STARCH" CRYOBIOLOGY, vol. 19, no. 5, 1982, pages 461-477, XP002496701 ISSN: 0011-2240 cited in the application figure 6	1-14

☒ 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 document 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.

\*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 September 2009

Date of mailing of the international search report

16/09/2009

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pellegrini, Paolo

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2009/005388

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>FOX J D ET AL: "Miniaturization of three carbohydrate analyses using a microsample plate reader"</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC. NEW YORK, vol. 195, no. 1, 15 May 1991 (1991-05-15), pages 93-96, XP024828076 ISSN: 0003-2697 [retrieved on 1991-05-15] page 93, col.2, para.2-page 94, col.1, para.1</p>	15
A	<p>CHEN Q ET AL: "Quantitative Benedict test using bicinchoninic acid"</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC. NEW YORK, vol. 182, no. 1, 1 October 1989 (1989-10-01), pages 54-57, XP024821422 ISSN: 0003-2697 [retrieved on 1989-10-01] abstract</p>	15
A	<p>BROWN R E ET AL: "Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances"</p> <p>ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC. NEW YORK, vol. 180, no. 1, 1 July 1989 (1989-07-01), pages 136-139, XP024821771 ISSN: 0003-2697 [retrieved on 1989-07-01] abstract</p>	15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2009/005388

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008003451 A	10-01-2008	CA 2656133 A1	10-01-2008
		EP 2035836 A1	18-03-2009
		US 2008038834 A1	14-02-2008



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(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, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . G S M

(74)代理人 100128679

弁理士 星 公弘

(74)代理人 100135633

弁理士 二宮 浩康

(74)代理人 100156812

弁理士 篠 良一

(74)代理人 100114890

弁理士 アインゼル・フェリックス＝ラインハルト

(72)発明者 ディートリヒ ザイデル

ドイツ連邦共和国 フェルダフィング プショルシュトラッセ 2 1

Fターム(参考) 2G045 AA13 BA13 BB39 BB46 CA11 CA24 CA25 DA80

2G052 AA30 AA31 AD06 AD26 AD46 EB06 EB08