

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-540407
(P2023-540407A)

(43)公表日 令和5年9月22日(2023.9.22)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/49 (2006.01)	G 0 1 N 33/49	4 B 0 6 3
C 1 2 N 5/071(2010.01)	C 1 2 N 5/071	4 B 0 6 5

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全17頁)

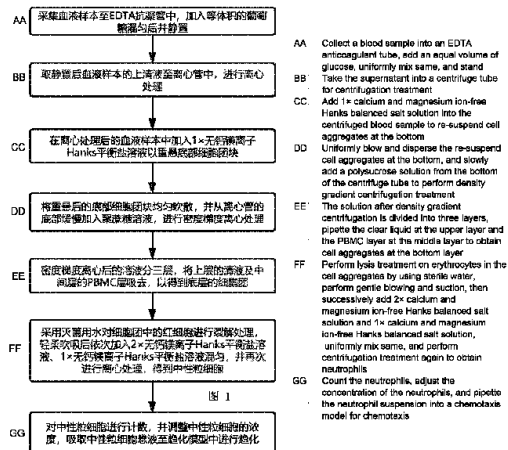
(21)出願番号	特願2023-532113(P2023-532113)	(71)出願人	523103996 蘇州市立医院
(86)(22)出願日	令和2年9月23日(2020.9.23)		中華人民共和國 2 1 5 0 0 0 江蘇省蘇州市 ソウ 浪区道前街 2 6 号
(85)翻訳文提出日	令和5年3月22日(2023.3.22)	(74)代理人	100207561 弁理士 柳元 八大
(86)国際出願番号	PCT/CN2020/117066	(72)発明者	孫 工 偉 中華人民共和國 2 1 5 0 0 0 江蘇省蘇州市 ソウ 浪区道前街 2 6 号
(87)国際公開番号	WO2022/061570	F ターム(参考)	2G045 AA02 BB07 BB10 CA12 GC30 4B063 QA01 QQ03 QR44 QR50 QS13 QX01 4B065 AA90X BD15 BD36 BD50 CA46
(87)国際公開日	令和4年3月31日(2022.3.31)		
(81)指定国・地域	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,A T,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,G N,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG), AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,B		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 好中球走化性の検出方法

(57)【要約】

好中球走化性の検出方法は、血液サンプルを採集して抗凝固チューブに入れ、グルコースを加えて均一に混合した後に静置するステップと、上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離するステップと、遠心分離処理後の前記血液サンプルに1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて底部細胞集塊を再懸濁するステップと、均一に吹き飛ばし、前記遠心分離管の底部からポリスクロース溶液をゆっくりと加え、密度勾配遠心分離処理を行うステップと、密度勾配遠心分離後の前記溶液を3層に分け、上層の澄液及び中間層のPBMC層を吸引して、底層の細胞集塊を得るステップと、滅菌用水を用いて前記細胞集塊における赤血球を分解処理し、柔らかく吹いて吸引した後に順に2×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液、1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて均一に混合し、再び遠心分離処理を行い、好中球を得るステップと、前記好中球を計数し、前記好中球の懸濁液を走化性モデルに吸い取って走化を行うステップとを含む。当該方法は、好中球の抽出速度を



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液サンプルを採集して E D T A 抗凝固チューブに入れ、血液サンプルと等体積のグルコースを加えて均一に混合した後に静置するステップと、

静置された前記血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行うステップと、

遠心分離処理が行われた後の前記血液サンプルに 1 x カルシウム・マグネシウムイオンのない H a n k s 平衡塩溶液を加えて底部細胞集塊を再懸濁するステップと、

再懸濁された前記底部細胞集塊を均一に吹き飛ばし、前記遠心分離管の底部からポリスクロス溶液をゆっくりと加え、密度勾配遠心分離処理を行うステップと、

密度勾配遠心分離が行われた後の前記溶液が 3 層に分割され、上層の澄液及び中間層の P B M C 層を吸引して、底層の細胞集塊を得るステップと、

滅菌用水を用いて前記細胞集塊における赤血球を分解処理し、柔らかく吹いて吸引した後に順に 2 x カルシウム・マグネシウムイオンのない H a n k s 平衡塩溶液、1 x カルシウム・マグネシウムイオンのない H a n k s 平衡塩溶液を加えて均一に混合し、再び遠心分離処理を行い、好中球を得るステップと、

前記好中球を計数し、前記好中球の濃度を調整し、前記好中球の懸濁液を走化性モデルに吸い取って走化を行うステップとを含む、
ことを特徴とする好中球走化性の検出方法。

【請求項 2】

静置された前記血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行うステップでは、

前記血液サンプルを室温で 20 分間静置した後に前記上澄液を前記遠心分離管に入れ、400 g の遠心分離力で、20 の条件下で 10 分間遠心分離する、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項 3】

密度勾配遠心分離処理では、

400 g の遠心分離力で、20 の条件下で 35 分間遠心分離する、
ことを特徴とする請求項 1 に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項 4】

前記細胞集塊における赤血球を 2 回分解する、

ことを特徴とする請求項 1 に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項 5】

再び遠心分離処理を行うステップでは、

400 g の遠心分離力で、20 の条件下で 7 分間遠心分離する、
ことを特徴とする請求項 1 に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項 6】

前記走化性モデルは、培養皿であり、

前記培養皿は、好中球の遷移運動を直接観察可能な透明培養皿である、
ことを特徴とする請求項 1 に記載の好中球走化性の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、好中球走化性の検出方法に関し、医療検出応用の技術分野に属する。

【背景技術】

【0002】

好中球は、人体が病原体の侵入に抵抗する重要な先天性免疫細胞であり、骨髄造血幹細胞から生成され、骨髄において分化して発育し、血液又は組織に入り、生体末梢血における数が最も多い白血球であり、正常な生理学的状態で白血球の総数の 40% ~ 75% を占める。好中球は、ライト染色血液塗抹標本において、細胞質が無色又は極めて浅い淡赤色

10

20

30

40

50

を呈し、細胞核がロッド状又は2～5分葉状を呈し、葉と葉との間にフィラメントが接続されるため、常に多形核白血球 (*polymorphonuclear leukocyte*、PMN) と呼ばれ、走化性、貪食、殺菌の機能を有する。人体が病原体の侵襲を受ける場合、好中球は、感染部位に走化し、細菌を細胞内に飲み込み、かつ様々な方法で細菌を死滅させることができ、人体が細菌感染に抵抗する防御の第一線であり、人体の非特異的免疫システムにおいて非常に重要な役割を果たす。

【0003】

近年、中国国内外の大量の研究によると、感染、重症、腫瘍及び糖尿病などの様々な疾患は、いずれも好中球と密接に関連しており、患者の好中球の走化性が異常になると、好中球が感染部位に到達して病原微生物を除去することができないだけでなく、多く過ぎる好中球が非炎症部位に集まって器官の損傷を引き起こす。したがって、好中球の走化性機能に対する検出及び分析は、患者の免疫状況の正確な診断及び治療に新たな方向を提供し、非常に重要な臨床的意義を有する。

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明は、好中球の抽出の時間を節約し、抽出された好中球に高い走化性機能を持たせる好中球走化性の検出方法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記目的を達成するために、本発明は、以下の技術手段を提供する。好中球走化性の検出方法は、

20

血液サンプルを採集してEDTA抗凝固チューブに入れ、血液サンプルと等体積のグルコースを加えて均一に混合した後に静置するステップと、

静置された前記血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行うステップと、

遠心分離処理が行われた後の前記血液サンプルに1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて底部細胞集塊を再懸濁するステップと、

再懸濁された前記底部細胞集塊を均一に吹き飛ばし、前記遠心分離管の底部からポリスクロス溶液をゆっくりと加え、密度勾配遠心分離処理を行うステップと、

30

密度勾配遠心分離が行われた後の前記溶液が3層に分割され、上層の澄液及び中間層のPBM層を吸引して、底層の細胞集塊を得るステップと、

滅菌用水を用いて前記細胞集塊における赤血球を分解処理し、柔らかく吹いて吸引した後に順に2×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液、1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて均一に混合し、再び遠心分離処理を行い、好中球を得るステップと、

前記好中球を計数し、前記好中球の濃度を調整し、前記好中球の懸濁液を走化性モデルに吸い取って走化を行うステップとを含む。

【0006】

更に、静置された前記血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行うステップでは、

40

前記血液サンプルを室温で20分間静置した後に前記上澄液を前記遠心分離管に入れ、400gの遠心分離力で、20の条件下で10分間遠心分離する。

【0007】

更に、密度勾配遠心分離処理では、

400gの遠心分離力で、20の条件下で35分間遠心分離する。

【0008】

更に、前記細胞集塊における赤血球を2回分解する。

【0009】

更に、再び遠心分離処理を行うステップでは、

50

400gの遠心分離力で、20の条件下で7分間遠心分離する。

【0010】

更に、前記走化性モデルは、培養皿であり、前記培養皿は、好中球の遷移運動を直接観察可能な透明培養皿である。

【発明の効果】

【0011】

本発明の有益な効果は、以下のとおりである。血液サンプルを遠心分離し、分解するなどの処理により、好中球を迅速に取得し、抽出速度を向上させ、検出時間を短縮し、そして当該方法は、使用しやすく、高効率で迅速であり、好中球の性能を向上させる。

【0012】

上記説明は、本発明の技術手段に対する概要に過ぎず、本発明の技術手段をより明確に理解し、明細書の内容に基づいてそれを実施するために、以下、本発明の好ましい実施例を用いて図面を参照して以下のように詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本願の好中球走化性の検出方法のフローチャートである。

【図2】本願で抽出された好中球の走化概略図である。

【発明を実施するための形態】

【0014】

以下、図面を参照しながら、本発明の技術手段を明確かつ完全に説明し、明らかに、説明される実施例は、本発明の実施例の一部であり、全てではない。本発明の実施例に基づいて、当業者が創造的な労力を行わない前提で得られる他の全ての実施例は、いずれも本発明の保護範囲に属する。

【0015】

なお、本発明の説明において、用語「中心」、「上」、「下」、「左」、「右」、「垂直」、「水平」、「内」、「外」などで示す方位又は位置関係は、図面に示す方位又は位置関係に基づくものであり、本発明を容易に説明し説明を簡略化するためのものに過ぎず、示された装置又は部品が特定の方位を有するとともに、特定の方位で構成されて動作しなければならないことを示すか又は示唆するものではないため、本発明を限定するものであると理解すべきではない。また、用語「第1」、「第2」、「第3」は、説明の目的のためのみに用いられ、相対的な重要性を示すか又は示唆するものと理解すべきではない。

【0016】

なお、本発明の説明において、別に明確な規定及び限定がない限り、用語「取り付け」、「連結」、「接続」は、広義に理解されるべきであり、例えば、固定接続、着脱可能な接続又は一体的な接続であってもよく、機械的な接続、電気的な接続であってもよく、直接的な接続、中間媒体を介した接続であってもよく、2つの部品の間で連通であってもよい。当業者であれば、具体的な状況に応じて本発明における上記用語の具体的な意味を理解することができる。

【0017】

また、以下に説明する本発明の異なる実施形態に係る技術的特徴は、互いの間に衝突がない限り互いに結合することができる。本発明の説明において、軸線方向は、高さ方向と一致する。

【0018】

図1に示すように、本発明の好ましい実施例における好中球走化性の検出方法は、以下を含む。

【0019】

血液サンプルを採集してEDTA抗凝固チューブに入れ、血液サンプルと等体積のグルコースを加えて均一に混合した後に静置する。本実施例では、EDTA抗凝固チューブの色は、紫色であり、そして血液サンプルとグルコースの体積は、2mlであり、グルコースの濃度は、3%である。当然のことながら、他の実施例では、血液サンプルとグルコー

10

20

30

40

50

スの体積が他であってもよく、グルコースの濃度が他であってもよく、ここで具体的に限定せず、実際の状況に応じて決定される。

【0020】

静置された血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行う。具体的には、血液サンプルを室温で20分間静置し沈殿させる必要があり、その後上澄液を遠心分離管に入れ、400gの遠心分離力で、20の条件下で10分間遠心分離する。当然のことながら、他の実施例では、遠心分離処理の条件は、他であってもよく、ここで具体的に限定せず、実際の状況に応じて決定される。

【0021】

遠心分離処理後の血液サンプルに1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて底部細胞集塊を再懸濁する。1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液は、予め調製された原液であり、この場合、当該原液に対して任意の希釈を行う必要がなく、遠心分離処理後の血液サンプルに当該原液を直接的に加えればよい。上記のように、1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液の体積は、3mlである。

10

【0022】

再懸濁された底部細胞集塊を均一に吹き飛ばし、遠心分離管の底部からポリスクロース溶液をゆっくりと加え、密度勾配遠心分離処理を行う。前記「密度勾配遠心分離処理」では、具体的には、400gの遠心分離力で、20の条件下で35分間遠心分離する。

【0023】

密度勾配遠心分離が行われた後の溶液が3層に分割され、上層の澄液及び中間層のPBM層を吸引して、底層の細胞集塊を得る。PBM層は、(Peripheral Blood Mononuclear Cell、末梢血単球)層であり、大量の単球及びリンパ球などを含み、底部に赤血球及び成熟した好中球がある。

20

【0024】

滅菌用水を用いて細胞集塊における赤血球を分解処理し、本実施例では、前記細胞集塊における赤血球を2回分解する必要があり、そして滅菌用水の体積は、3mlである。柔らかく吹いて吸引した後に順に2×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液、1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて均一に混合し、再び遠心分離処理を行い、好中球を得て、前記「再び遠心分離処理を行う」ステップでは、具体的には、400gの遠心分離力で、20の条件下で7分間遠心分離する。

30

【0025】

図2に示すように、好中球を計数し、好中球の濃度を調整し、好中球の懸濁液を走化性モデルに吸い取って走化を行う。前記走化性モデルは、培養皿であり、前記培養皿は、好中球の遷移運動を直接観察可能な透明培養皿である。具体的には、当該培養皿は、中国特許CN105062865Bに開示された細胞透過膜移動試験用装置及び製造用ダイであり、ここで説明を省略する。

【0026】

好中球を抽出するのに必要な時間は、一般的に約2hであり、上記方法に従って好中球を抽出するのに必要な時間を半分短縮し、ステップを簡略化し、抽出速度を向上させ、検出時間を短縮するという効果を達成する。

40

【0027】

図2に示すように、そして、最後に走化試験結果に示すように、本方法で採取された好中球の走化性モデルにおける走化結果を利用して国際的に初めて正確な分析の指標を確立し、各指標は、以下のとおりである。

1、走化距離 (Chemotaxis Distance、CD) は、好中球がアガロースの走化性モデルにおいて2時間走化して到達できる最遠距離であり、当該最遠距離は、1755.85µm以上である。

2、走化細胞の百分率 (Chemo Cell Ratio、CCR) は、全ての走化

50

細胞数が走化細胞総数（ 10^5 個）に占める百分率であり、当該百分率は、3.34%以上である。該百分率の計算式は、以下のとおりである。

$$CCR = (\text{全ての走化細胞数} / \text{走化細胞総数}) \times 100\%$$

3、走化指数（Chemotaxis Index、CI）は、I領域とII領域の走化細胞数が全ての走化細胞数に占める比の値であり、当該比の値は、39.63以上であり、かつ当該比の値の公式は、以下のとおりである。

$$CI = [(\text{I領域の細胞数} + \text{II領域の細胞数}) / \text{全ての走化細胞数}] \times 100$$

4、最大走化速度（Maximum Speed of Chemotaxis、 V_{max} ）は、好中球が2時間走化して到達できる最遠距離と走化時間（120min）との比の値であり、当該比の値は、14.63 $\mu\text{m}/\text{min}$ 以上であり、計算式は、以下のとおりである。

$$V_{max} = \text{走化距離} / \text{走化時間} = CD / 120$$

【0028】

以上より、血液サンプルを遠心分離し、分解するなどの処理により、好中球を迅速に取得し、抽出速度を向上させ、検出時間を短縮し、そして当該方法は、使用しやすく、高効率で迅速であり、好中球の性能を向上させる。

【0029】

上述した実施例の各技術的特徴を任意に組み合わせることができ、説明を簡潔にするために、上記実施例における各技術的特徴の全ての可能な組み合わせについて記載しないが、これらの技術的特徴の組み合わせに矛盾がない限り、いずれも本明細書に記載の範囲であると考えられるべきである。

【0030】

上述した実施例は、本発明のいくつかの実施形態を示し、その説明が具体的で詳細であるが、本発明の特許範囲を限定するものと理解すべきではない。なお、当業者にとっては、本発明の構想から逸脱しない前提で、さらにいくつかの変形及び改善を行うことができ、これらは、いずれも本発明の保護範囲に属する。したがって、本発明の特許の保護範囲は、添付された特許請求の範囲を基準とすべきである。

10

20

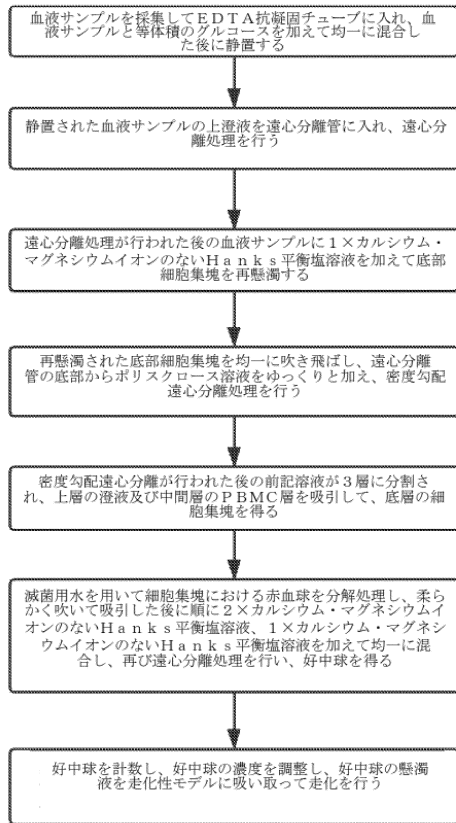
30

40

50

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 】

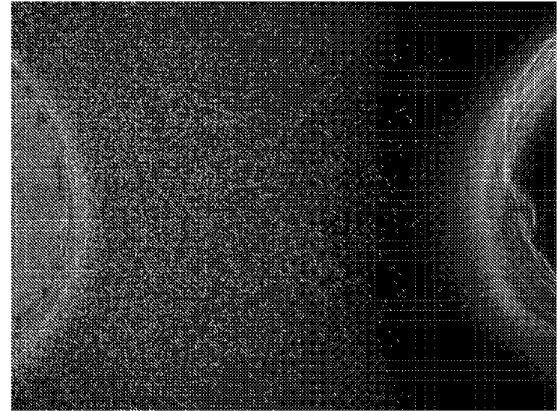


图 2

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年3月22日(2023.3.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液サンプルを添加してEDTA抗凝固チューブに入れ、血液サンプルと等体積のグルコースを加えて均一に混合した後に静置するステップと、

静置された前記血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行うステップと、

遠心分離処理が行われた後の前記血液サンプルに1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて底部細胞集塊を再懸濁するステップと、

再懸濁された前記底部細胞集塊を均一に吹き飛ばし、前記遠心分離管の底部からポリスクロス溶液をゆっくりと加え、密度勾配遠心分離処理を行うステップと、

密度勾配遠心分離が行われた後の前記溶液が3層に分割され、上層の澄液及び中間層のPBM層を吸引して、底層の細胞集塊を得るステップと、

滅菌用水を用いて前記細胞集塊における赤血球を分解処理し、柔らかく吹いて吸引した後に順に2×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液、1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて均一に混合し、再び遠心分離処理を行い、好中球を得るステップと、

前記好中球を計数し、前記好中球の濃度を調整し、前記好中球の懸濁液を走化性モデルに吸い取って走化を行うステップとを含む、
ことを特徴とする好中球走化性の検出方法。

【請求項2】

静置された前記血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行うステップでは、

前記血液サンプルを室温で20分間静置した後に前記上澄液を前記遠心分離管に入れ、400gの遠心分離力で、20の条件下で10分間遠心分離する、
ことを特徴とする請求項1に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項3】

密度勾配遠心分離処理では、

400gの遠心分離力で、20の条件下で35分間遠心分離する、
ことを特徴とする請求項1に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項4】

前記細胞集塊における赤血球を2回分解する、

ことを特徴とする請求項1に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項5】

再び遠心分離処理を行うステップでは、

400gの遠心分離力で、20の条件下で7分間遠心分離する、
ことを特徴とする請求項1に記載の好中球走化性の検出方法。

【請求項6】

前記走化性モデルは、培養皿であり、

前記培養皿は、好中球の遷移運動を直接観察可能な透明培養皿である、
ことを特徴とする請求項1に記載の好中球走化性の検出方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0001

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0001】

本発明は、好中球走化性の検出方法に関する。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

上記目的を達成するために、本発明は、以下の技術手段を提供する。診断及び治療を目的としない好中球走化性の検出方法は、

血液サンプルを添加してEDTA抗凝固チューブに入れ、血液サンプルと等体積のグルコースを加えて均一に混合した後に静置するステップと、

静置された前記血液サンプルの上澄液を遠心分離管に入れ、遠心分離処理を行うステップと、

遠心分離処理が行われた後の前記血液サンプルに1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて底部細胞集塊を再懸濁するステップと、

再懸濁された前記底部細胞集塊を均一に吹き飛ばし、前記遠心分離管の底部からポリスクロス溶液をゆっくりと加え、密度勾配遠心分離処理を行うステップと、

密度勾配遠心分離が行われた後の前記溶液が3層に分割され、上層の澄液及び中間層のPBM層を吸引して、底層の細胞集塊を得るステップと、

滅菌用水を用いて前記細胞集塊における赤血球を分解処理し、柔らかく吹いて吸引した後に順に2×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液、1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて均一に混合し、再び遠心分離処理を行い、好中球を得るステップと、

前記好中球を計数し、前記好中球の濃度を調整し、前記好中球の懸濁液を走化性モデルに吸い取って走化を行うステップとを含む。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

血液サンプルを添加してEDTA抗凝固チューブに入れ、血液サンプルと等体積のグルコースを加えて均一に混合した後に静置する。本実施例では、EDTA抗凝固チューブの色は、紫色であり、そして血液サンプルとグルコースの体積は、2mlであり、グルコースの濃度は、3%である。当然のことながら、他の実施例では、血液サンプルとグルコースの体積が他であってもよく、グルコースの濃度が他であってもよく、ここで具体的に限定せず、実際の状況に応じて決定される。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

滅菌用水を用いて細胞集塊における赤血球を分解処理し、本実施例では、前記細胞集塊における赤血球を2回分解する必要がある。そして滅菌用水の体積は、3mlである。柔らかく吹いて吸引した後に順に2×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液、1×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液を加えて均

10

20

30

40

50

一に混合し、再び遠心分離処理を行い、好中球を得て、前記「再び遠心分離処理を行う」ステップでは、具体的には、400gの遠心分離力で、20 の条件下で7分間遠心分離する。ここでは、2×カルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液とは、2倍浸透圧のカルシウム・マグネシウムイオンのないHank's平衡塩溶液である。

【手続補正6】

【補正対象書類名】図面

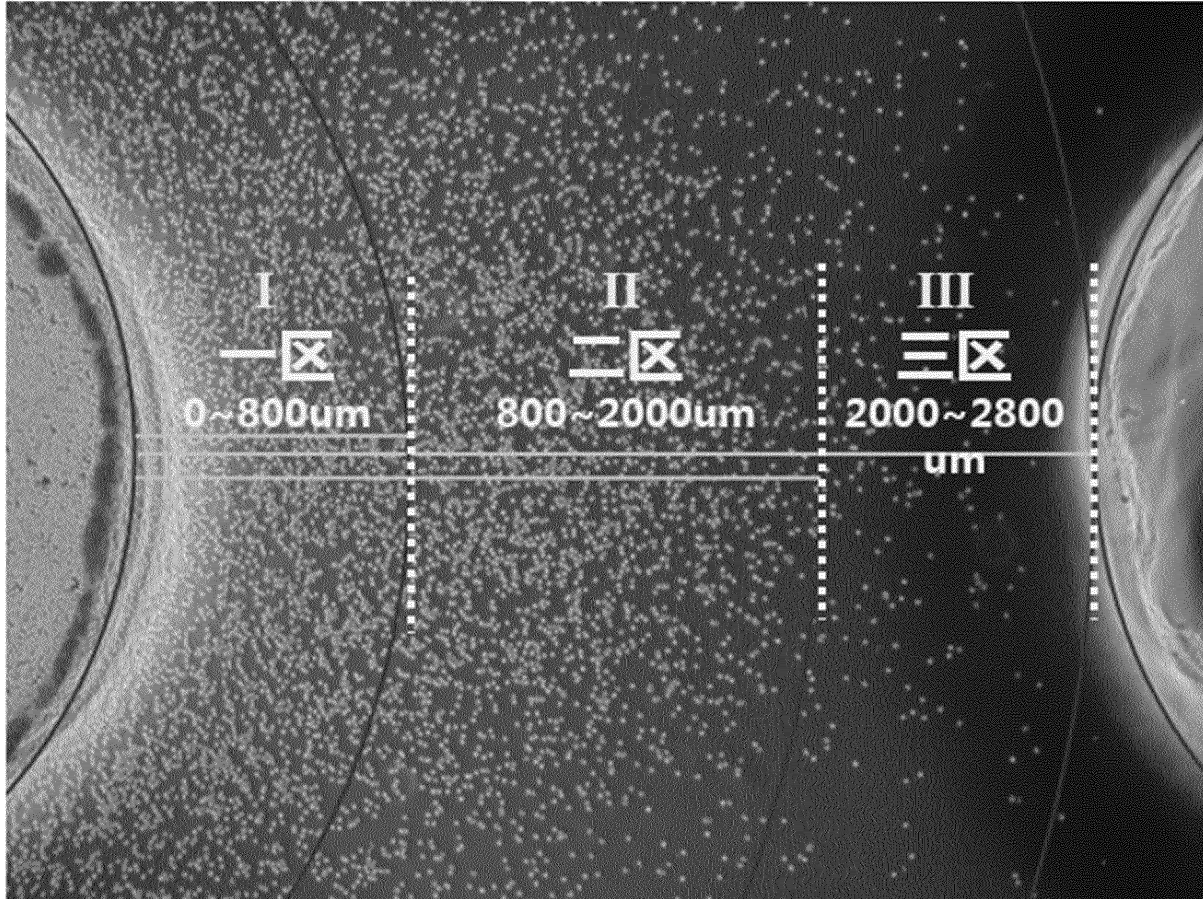
【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図2】

10



20

30

40

50

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2020/117066
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/071(2010.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N 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 practicable, search terms used) CNPAT, CNKI, WPI, EPODOC, PUBMED: 苏州市立医院, 孙炳伟, 杨云稀, 刘璐, 中性粒细胞, 粒细胞, (多核 3w 白细胞), 趋化, 提取, 富集, 纯化, 分离, 葡萄糖, 葡糖, 静置, 离心, Hanks, Hank's, granulocyte?, neutrophil?, polymorphonuclear leukocyte?, PMN, chemotaxis, extract+, enrich+, purify+, purificat+, separate+, isolat+, glucose, standing, stewing, centrifug+		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109971819 A (JIANGSU LIFT BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 05 July 2019 (2019-07-05) claims 7 and 8	1-6
A	CN 104513807 A (BGI ARK BIOTECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 15 April 2015 (2015-04-15) entire document	1-6
A	CN 108676776 A (PEARL RIVER FISHERY RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF FISHERY SCIENCES) 19 October 2018 (2018-10-19) entire document	1-6
A	CN 102321582 A (CONSTANCE SHENZHEN SINO BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 18 January 2012 (2012-01-18) entire document	1-6
A	CN 103160465 A (NINGBO HIGH-NEW DISTRICT GCB BIOLOGICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 19 June 2013 (2013-06-19) entire document	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 March 2021		Date of mailing of the international search report 26 March 2021
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/117066

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2007064379 A2 (ATWATER, Ilani) 07 June 2007 (2007-06-07) entire document	1-6
A	WO 2015132774 A1 (INSTITUT PASTEUR et al.) 11 September 2015 (2015-09-11) entire document	1-6
A	WO 2008109816 A1 (GAHAGA BIOSCIENCES, INC. et al.) 12 September 2008 (2008-09-12) entire document	1-6
A	DODEK, Peter M. et al. "ONE-STEP ISOLATION OF NEUTROPHILS USING AN ELUTRIATOR" <i>In Vitro Cell. Dev. Biol.</i> , Vol. 27A, 31 March 1991 (1991-03-31), ISSN: 0883-8364, pp. 211-214	1-6
A	LOWENTHAL, R.M. "The Use of Dextran as an Adjunct to Granulocyte Collection with the Continuous-Flow Blood Cell Separator" <i>TRANSFUSION</i> , Vol. 15, No. 1, 28 February 1975 (1975-02-28), ISSN: 0041-1132, pp. 23-27	1-6
A	GLASSER, L. et al. "Granulocyte concentrates. Glucose concentrations and glucose utilization during storage at 22°C" <i>TRANSFUSION</i> , Vol. 25, No. 1, 28 February 1985 (1985-02-28), ISSN: 0041-1132, pp. 68-69	1-6

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/117066

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109971819	A	05 July 2019	None			
CN	104513807	A	15 April 2015	CN	104513807	B	12 January 2018
CN	108676776	A	19 October 2018	None			
CN	102321582	A	18 January 2012	None			
CN	103160465	A	19 June 2013	None			
WO	2007064379	A2	07 June 2007	EP	1954801	A2	13 August 2008
				US	2007128584	A1	07 June 2007
				US	2010203636	A1	12 August 2010
				CA	2631500	A1	07 June 2007
WO	2015132774	A1	11 September 2015	US	2019017026	A1	17 January 2019
				EP	3502239	A1	26 June 2019
				EP	2915878	A1	09 September 2015
				US	2017051253	A1	23 February 2017
				EP	3114216	A1	11 January 2017
WO	2008109816	A1	12 September 2008	US	2010041009	A1	18 February 2010
				US	8673547	B2	18 March 2014

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/117066

A. 主题的分类 C12N 5/071 (2010.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNPAT, CNKI, WPI, EPDOC, PUBMED: 苏州市立医院, 孙炳伟, 杨云稀, 刘璐, 中性粒细胞, 粒细胞, (多核 3w 白细胞), 趋化, 提取, 富集, 纯化, 分离, 葡萄糖, 葡糖, 静置, 离心, Hanks, Hank' s, granulocyte?, neutrophil?, polymorphonuclear leukocyte?, PMN, chemotaxis, extract+, enrich+, purify+, purificat+, separate+, isolat+, glucose, standing, stewing, centrifug+		10
C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 109971819 A (江苏粒福特生物科技有限公司) 2019年 7月 5日 (2019 - 07 - 05) 权利要求7、8	1-6
A	CN 104513807 A (深圳华大方舟生物技术有限公司 等) 2015年 4月 15日 (2015 - 04 - 15) 全文	1-6
A	CN 108676776 A (中国水产科学研究院珠江水产研究所) 2018年 10月 19日 (2018 - 10 - 19) 全文	1-6
A	CN 102321582 A (深圳市中美康士生物科技有限公司) 2012年 1月 18日 (2012 - 01 - 18) 全文	1-6
A	CN 103160465 A (宁波高新区世纪开元生物技术有限公司) 2013年 6月 19日 (2013 - 06 - 19) 全文	1-6
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 2021年 3月 16日	国际检索报告邮寄日期 2021年 3月 26日	
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 苗君叶 电话号码 86-(10)-53962365	

PCT/ISA/210 表(第2页) (2015年1月)

10

20

30

40

50

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/117066

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2007064379 A2 (ATWATER, Iilani) 2007年 6月 7日 (2007 - 06 - 07) 全文	1-6
A	WO 2015132774 A1 (INSTITUT PASTEUR 等) 2015年 9月 11日 (2015 - 09 - 11) 全文	1-6
A	WO 2008109816 A1 (GAHAGA BIOSCIENCES, INC. 等) 2008年 9月 12日 (2008 - 09 - 12) 全文	1-6
A	DODEK, Peter M. 等. "ONE-STEP ISOLATION OF NEUTROPHILS USING AN ELUTRIATOR" In Vitro Cell. Dev. Biol., 第27A卷, 1991年 3月 31日 (1991 - 03 - 31), ISSN: 0883-8364, 第211-214页	1-6
A	LOWENTHAL, R. M. "The Use of Dextran as an Adjunct to Granulocyte Collection with the Continuous-Flow Blood Cell Separator" TRANSFUSION, 第15卷, 第1期, 1975年 2月 28日 (1975 - 02 - 28), ISSN: 0041-1132, 第23-27页	1-6
A	GLASSER, L. 等. "Granulocyte concentrates. Glucose concentrations and gluco- se utilization during storage at 22°C" TRANSFUSION, 第25卷, 第1期, 1985年 2月 28日 (1985 - 02 - 28), ISSN: 0041-1132, 第68-69页	1-6

10

20

30

40

50

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/117066

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	109971819	A	2019年 7月 5日	无	
CN	104513807	A	2015年 4月 15日	CN	104513807 B 2018年 1月 12日
CN	108676776	A	2018年 10月 19日	无	
CN	102321582	A	2012年 1月 18日	无	
CN	103160465	A	2013年 6月 19日	无	
WO	2007064379	A2	2007年 6月 7日	EP	1954801 A2 2008年 8月 13日
				US	2007128584 A1 2007年 6月 7日
				US	2010203636 A1 2010年 8月 12日
				CA	2631500 A1 2007年 6月 7日
WO	2015132774	A1	2015年 9月 11日	US	2019017026 A1 2019年 1月 17日
				EP	3502239 A1 2019年 6月 26日
				EP	2915878 A1 2015年 9月 9日
				US	2017051253 A1 2017年 2月 23日
				EP	3114216 A1 2017年 1月 11日
WO	2008109816	A1	2008年 9月 12日	US	2010041009 A1 2010年 2月 18日
				US	8673547 B2 2014年 3月 18日

10

20

30

40

PCT/ISA/210 表(同族专利附件) (2015年1月)

50

フロントページの続き

G,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE
,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

【要約の続き】

向上させ、検出時間を短縮することができる。

【選択図】 図 1