(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017 年 8 月 24 日(24.08.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/141789 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/00 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12N 1/02 (2006.01) *G01N 33/533* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/004595

(22) 国際出願日: 2017 年 2 月 8 日(08.02.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-030055 2016 年 2 月 19 日(19.02.2016) JP

(71) 出願人: コニカミノルタ株式会社(KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 増渕　茉奈美(MASUBUCHI, Manami); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 荒木　淳吾(ARAKI, Jungo); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号　コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人ＳＳＩＮＰＡＴ(SSINPAT PATENT FIRM); 〒1410031 東京都品川区西五反田七丁目１３番６号　五反田山崎ビル６階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

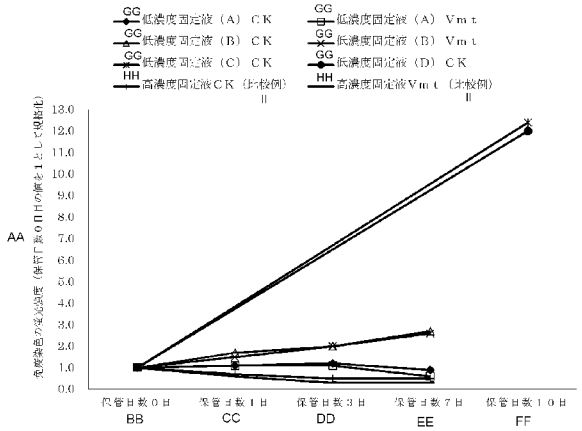
(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR STORING BLOOD-DERIVED SPECIMENS AND METHOD FOR DETERMINING RARE CELLS

(54) 発明の名称 : 血液由来検体の保管方法および希少細胞の判定方法

[図1]



AA Fluorescence intensity of immunostaining (standardized taking the value on day 0 of storage as 1)
BB After 0 days of storage
CC After 1 day of storage
DD After 3 days of storage
EE After 7 days of storage
FF After 10 days of storage
GG Low-concentration fixing solution
HH High-concentration fixing solution
II (comparative example)

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing a method with which it is possible to store blood-derived specimens in a state in which appropriate test results are obtained even several days after blood sampling. This method for storing blood-derived specimens includes a separation step for removing red blood cells from a blood-derived specimen to create a cell specimen, and a storage step for adding a cell-fixing solution to the cell specimen and storing the cell specimen in a state in which the formaldehyde concentration thereof falls within a range of 0.001-0.4 v/v%.

(57) 要約: 本発明は、採血後数日間経過しても適切な検査結果が得られる状態に血液由来検体を保管できる方法を提供することを課題とする。本発明の血液由来検体の保管方法は、血液由来検体から赤血球を除去して細胞検体を生成する分離工程と、前記細胞検体に細胞固定液を添加し、ホルムアルデヒド濃度が０．００１～０．４ｖ／ｖ％の範囲内となった状態で細胞検体を保管する保管工程とを有する。

WO 2017/141789 A1

ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 血液由来検体の保管方法および希少細胞の判定方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞検体を固定または保管する方法に関する。

背景技術

[0002] 血液中には、通常、赤血球、白血球（例えば、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球など）等の血液細胞が含まれているが、更に循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）、循環血管内皮細胞（ＣＥＣ）、循環血管内皮前駆細胞（ＣＥＰ）、又は各種幹細胞等の希少細胞が存在する場合もある。ＣＴＣとは、乳癌、肺癌、前立腺癌、膵臓癌等の患者の病態に応じて末梢血中に存在する細胞であり、血液中からＣＴＣを検出することは、例えば癌に罹患しているか否か、又は患者に対する治療の効果を判断することができ、臨床的に有用である。しかしながら、血液中のＣＴＣの存在数は極めて希少（例えば、全血１０ｍＬあたり１～１０個程度）である、その検出及び計数は容易ではない。

[0003] 希少細胞を検出するには、例えば、先行文献１及び２においては、対象細胞に特異的に磁性粒子を付加することにより対象細胞を血液由来検体から分離し、分離した当該対象細胞が特徴的に発現しているタンパク質に蛍光標識を付加して観察する検査方法が開示されている。タンパク質に蛍光標識を付加する方法として、蛍光標識された抗体を用いる免疫染色法が一般的に用いられている。免疫染色を適切に行うには、対象細胞の形態及び抗原性を保持することが重要であり、その達成手段として、多くの先行文献では、細胞固定液（非特許文献１では４％、非特許文献２では１％ホルムアルデヒド）を添加して細胞と反応させることで細胞固定を行うことが必須とされている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Wen Xu, Lu Cao, Lei Chen, Jing Li, Xiao-Feng Zhang, Hai-Hua Qian, Xiao-Yan Kang, Yu Zhang, Jian Liao, Le-Hua Shi, Ye-Fa Yang,

Meng-Chao Wu and Zheng-Feng Yin. Isolation of Circulating Tumor Cells in Patients with Hepatocellular Carcinoma Using a Novel Cell Separation Strategy. Clinical Cancer Research. 2011, vol. 17, p. 3783-3793.
非特許文献2：Zhian Liu, Alberto Fusi, Eva Klopocki, Alexander Schmittel, Ingeborg Tinhofer, Anika Nonnenmacher and Ulrich Keilholz. Negative enrichment by immunomagnetic nanobeads for unbiased characterization of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients. Journal of Translational Medicine. 2011, vol. 9.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 前述の通り、癌の診断又は治療効果を評価するには、血液中の希少細胞を観察、又は計数するような検査が臨床的に有用である。一般的に、当該検査において採血作業と検査作業は、その間には時間を置かずに連続して行われる。しかしながら、採血を行った病院等の医療機関の設備や技術が不十分な場合、医療機関から離れた検査施設に血液由来検体を輸送して、当該検査施設にて希少細胞を観察、又は計数するような検査を実施することもある。施設間の距離によって輸送時間が異なるが、一般的には数日間を要する。その場合、血液由来検体の輸送により細胞の形態や抗原性等が変化し、適切な検査結果を得ることができない。

[0006] また、検査施設においては、検査待ちの検体が大量にある、或いは１検体についての検査項目が多いためその準備に時間を要する等、検査施設の都合により検査をすぐに実施できない場合がある。このような場合においても、採血から検査が実施されるまで数時間から数日間の待機期間が生じてしまい、施設間の輸送と同様に血液由来検体中の細胞の形態や抗原性等が変化し適切な検査結果を得ることができない。

[0007] 上述の通り、いずれの場合においても、施設間の輸送中又は施設内の待機期間中に血液由来検体中の細胞には、アポトーシスや腐敗が起きる可能性がある。よって、これらの発生を防止若しくはなるべく遅延させるため、採血

から長期間保管後に検査作業を行ったとしても適切な検査結果を得ることができるよう、血液由来検体を保管する方法が必要である。

課題を解決するための手段

[0008] 上記課題を解決するために、本発明は一つの側面において、血液由来検体の保管方法であって、前記血液由来検体から赤血球を除去して細胞検体を生成する分離工程と、前記細胞検体に細胞固定液を添加し、ホルムアルデヒド濃度が０．００１～０．４ｖ／ｖ％の範囲内となった状態で細胞検体を保管する保管工程とを有する保管方法を提供する。

[0009] また、本発明はさらなる側面において、希少細胞の判定方法であって、血液由来検体から生成された細胞検体を保管する保管工程を含む前処理工程と、前記血液由来検体に含まれている対象細胞に特異的に結合する蛍光標識を付加する染色工程と、前記対象細胞に特異的に付加された前記蛍光標識の蛍光強度に基づいて前記対象細胞であるか否かを判定して前記対象細胞を特定する判定工程と、を有する判定方法を提供する。この判定方法において、前記保管工程には、前述した本発明の保管方法が用いられる。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、採血後数日間経過しても適切な検査結果が得られる状態に、血液由来検体を保管することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図１は、実施例２及び比較例２の保管方法により保管された細胞検体の保管０日から保管１０日までの免疫染色蛍光強度の推移を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] ＜保管方法＞

本発明の血液由来検体の保管方法は、少なくとも、分離工程および保管工程を含み、必要に応じてさらに、固定工程、その他の処理工程を含んでいてもよい。以下、本発明の血液由来検体の保管方法に含まれる各工程について

、より詳細に説明する。

[0013] （血液）

本明細書に記載の「血液」は、赤血球細胞、白血球細胞、血小板、内皮細胞、中皮細胞又は上皮細胞等を含んだ、全血の任意の成分を含むことを意図する。また、タンパク質、脂質、核酸、炭水化物等の血漿成分、及び、妊娠、臓器移植、感染、外傷又は疾患によって血液中に存在する可能性のある任意の他の細胞（例えば、ＣＴＣ、ＣＥＣ、ＣＥＰ、その他の前駆細胞等の希少細胞等）をも含む。

[0014] （白血球）

本明細書に記載の「白血球」は、白血球、または網状赤血球若しくは血小板ではない造血系列の細胞である。白血球は、Ｔ細胞、Ｂ細胞及びナチュラルキラー（ＮＫ）細胞等のリンパ球を含む。白血球はまた、単球、マクロファージ、顆粒球等の貪食細胞及びマスト細胞を含む。

[0015] （赤血球）

本明細書に記載の「赤血球」は、赤血球であり、特に非有核赤血球細胞を意味する。

（血液由来検体）

癌の診断または治療効果を評価するためには、血液中のＣＴＣ等の希少細胞の観察、又はその計数等の検査が有用である。本明細書に記載の「血液由来検体」は、血液中のＣＴＣ等の希少細胞の観察、又はその計数等の検査を行うために、本明細書に記載の「血液」から採取される検体である。

[0016] 血液由来検体には、癌の診断上必要となる血液成分であり、検出の対象となるＣＴＣ等の希少細胞（対象細胞）、及び癌の診断上必要ではない血液成分であり、検出の対象とならない赤血球・白血球等の対象細胞以外の細胞（非対象細胞）が含まれている。

[0017] （抗凝固処理）

体外に取り出された血液（全血）は、そのまま空気に触れると時間の経過とともにゲル状になり、そこに含まれる細胞を回収して観察することができ

なくなってしまう。そのため、採取された血液は直ちに抗凝固処理することが好ましい。

[0018] 全血用の抗凝固剤として、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）やクエン酸（ナトリウム塩等の塩を含む）に代表される、キレート作用によりカルシウムイオンと結合し反応系から除去することによって凝固を阻止するタイプの抗凝固剤と、ヘパリンに代表される、血漿中のアンチトロンビンＩＩＩと複合体を形成しトロンビンの産生を抑制することにより凝固を阻止するタイプの抗凝固剤とが公知のものであり、一般的な濃度、処理時間等の条件に従って用いることができる。また、前述のような抗凝固剤が予め収容された採血管を利用しても良い。ただし、本発明において抗凝固剤はこれらに限定されるものではない。

[0019] ［分離工程］

分離工程は、血液由来検体から赤血球等を除去して、後述の細胞検体を生成する工程である。分離工程は、血液由来検体の中に含まれている対象細胞以外の細胞等の血液成分（赤血球等の非対象細胞）を除去して、観察の障害を軽減するために行われる処理であり、ＣＴＣ等の対象細胞の検出性を高めることができる。

[0020] （赤血球除去）

観察の障害を軽減するために、血液由来検体の中に含まれている対象細胞以外の細胞（非対象細胞）等の血液成分をなるべく除きたい。本来であれば、対象細胞を血液由来検体から特異的に取り出すのが好ましいが、対象細胞を血液由来検体から取り出そうとすると、対象細胞の取りこぼしが生じる恐れがある。そのため、本発明においては、対象細胞を血液由来検体から取り出すのではなく、血液由来検体の中に含まれている観察の障害になり得る物質（例えば血中に大量に存在する赤血球、その他診断上に必要としない成分等）を除去する方法を採用する。

[0021] 赤血球を除去する方法としては、塩化アンモニウム等を用いて赤血球を溶血させる方法と、遠心分離処理によって赤血球とそれ以外の細胞を分離させ

、少なくとも対象細胞を含む細胞画分を精製する密度勾配遠心法とが挙げられるが、本発明においては、それらに限定されるものではない。なお、前述の方法により赤血球の除去を行ったとしても、必ずしも血液由来検体の中に含まれている赤血球が完全に除去されるわけではなく、微少量の赤血球が血液由来検体中に残る可能性はある。本発明は、このような状況下においても適用できるものである。

[0022] 本来であれば、対象細胞には含まれない細胞である白血球も除去するのが好ましい。対象細胞がＣＴＣ等のがん細胞である場合、非有核細胞である赤血球は、その形態、密度及び表面性状ががん細胞と大きく異なるため除去することは可能である。一方、がん細胞と同様に有核細胞に属する白血球は、その形態、密度等が、がん細胞と類似していることから、溶血や密度勾配遠心分離法により除去しようとすると対象細胞も除去され取りこぼしが生じてしまい、不正確な計数により誤診等が発生する恐れがある。また、白血球特異的な抗体（例えば抗ＣＤ４５抗体）による除去を試行した場合、確率的に非特異的な反応の発生により希少ながん細胞の取りこぼしが発生する可能性が高い。そのため、このような場合においては、血液由来検体の中に含まれている希少細胞をなるべく全て捕捉して取りこぼしを最低限に抑える観点から、白血球の除去を行わないことが好ましい。

[0023] （細胞検体）

本明細書に記載の「細胞検体」は、前処理が施された対象細胞を含む細胞群のことを言う。例えば、培養細胞の場合は培養容器から剥がされ、洗浄された細胞群のことである。また、血液由来検体の場合は赤血球除去及び洗浄処理が施された主に白血球からなる細胞群のことであり、本細胞群には白血球だけでなく、ＣＴＣ等のがん細胞が含まれる場合もある。なお、本明細書に記載の実施例において、培養細胞の前処理としては洗浄作業、血液由来検体の前処理としては赤血球除去及び洗浄作業を行ったが、前処理はこれに限定されるものではない。

[0024] ［保管工程］

保管工程は、細胞検体に適切な濃度のホルムアルデヒド溶液からなる細胞固定液を添加し、細胞固定液中で、細胞検体を保管する工程である。

[0025] 保管工程を行うことにより、採血から長期間経過した細胞検体の血液中のＣＴＣ等の希少細胞を観察、又は計数する検査を行っても、細胞の形態や抗原性の変化、アポトーシスや腐敗を防止して、適切な検査結果を得ることができる。

[0026] （細胞固定液）

本発明において「細胞固定液」とは、ホルムアルデヒド等の細胞固定剤をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）等の適切な溶媒に溶解した（あるいはホルマリンのような元から水溶液で市販されているものを希釈した）水溶液をいう。

[0027] 保管工程において使用される細胞固定液としては、ホルムアルデヒド溶液が好ましい。

細胞検体を、従来の高濃度細胞固定液（例えば、ホルムアルデヒド濃度が１％又は４％）中で長期間保管した場合、細胞検体の免疫染色性が低下してしまう問題があった。そのために本発明では、保管工程において、細胞固定液中のホルムアルデヒドの濃度が希薄な低濃度細胞固定液を用いて保管を行う。つまり、本発明では、保管工程において、最終濃度が０．００１ｖ／ｖ％～０．４ｖ／ｖ％（０．００１ｖ／ｖ％以上、かつ０．４ｖ／ｖ％以下）となる量のホルムアルデヒドを添加するようにする。保管工程中の細胞固定液中のホルムアルデヒドの最終濃度が０．００１ｖ／ｖ％～０．４ｖ／ｖ％の範囲内であることにより、その後に行われる染色工程における細胞検体の免疫染色性を低下させないようにすることができる。

[0028] 本発明の一側面において、保管工程における細胞固定液中のホルムアルデヒドの最終濃度は、免疫染色時の蛍光強度の経時変化を少なくし、ほぼ一定に維持できるという観点から、０．１～０．４ｖ／ｖ％とすることが好ましい。そのようにして蛍光強度をほぼ一定に維持できれば、保管日数が異なる細胞同士であっても、細胞画像処理条件の標準化や異なるデータ間の比較が

容易になり、自動化計測において１種類の対象細胞の判定を、あらかじめ設定した１つの閾値に基づいて行うことが可能になる。

[0029] 本発明の別の側面において、保管工程における細胞固定液中のホルムアルデヒドの最終濃度は、免疫染色時の蛍光強度を高める観点から、０．００１ｖ／ｖ％以上、０．１ｖ／ｖ％未満とすることが好ましい。ホルムアルデヒドの最終濃度がこのような範囲にある細胞固定液中で細胞を保管すると、保管日数が短いときよりも長いときの方が、免疫染色時の蛍光強度が高くなる傾向を示す。したがって、免疫染色時の蛍光強度を高める必要があるとき、または高めることが好ましいときは、その細胞固定液中で比較的長期間、細胞を保管すればよい。

[0030] 細胞固定液と細胞検体との接触時間（検体保管時間）も、検査等の目的に応じて適宜調節することができるが、例えば、室温で、１日～１４日程度である。

なお、本発明の保管工程では、細胞検体を低濃度細胞固定液中で保管するが、細胞のアポトーシスや腐敗を遅延させる面でも一定の効果を有するので、固定工程の機能も兼ねることができる。したがって本発明では、工程数削減のために、保管工程の前に、細胞検体に高濃度固定液を添加して細胞固定を行う固定工程を実施しなくともよい。ただし、より確実に細胞のアポトーシスや腐敗を遅延させる効果を得るためには、保管工程の前に固定工程を行ってもよい。

[0031] （免疫染色）

対象細胞を検出する方法として、色素が修飾された抗体（以下、標識抗体）をＣＴＣ等のがん細胞が有する標的抗原に結合させて染色する免疫染色が一般的に用いられている。当該免疫染色の結果によって遺伝子やタンパク質の発現異常等の診断が行なわれている。当該免疫染色においては、通常、以下に説明するように、固定工程、染色工程及び判定工程が行われている。

[0032] ［固定工程］

固定工程は、細胞のアポトーシスや腐敗を遅延させるために、細胞染色の

前に、後述する細胞固定剤を用いて調製した細胞固定液を使用した細胞固定が行われる工程である。また、細胞のアポトーシスや腐敗を遅延させるという観点から、本発明の保管方法において、前記保管工程を行う前に、固定工程を行うことが好ましい。特に、生細胞と同様な形態及び抗原性の保持の観点から、細胞を採取した時点で細胞固定を行うことが好ましい。

[0033] 細胞固定剤として、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、グリオキサール等のアルデヒド類、アセトン、メチルエチルケトン等のケトン類、エタノール、メタノール等のアルコール類が一般的に用いられている。このうち、ホルムアルデヒド等のアルデヒド類及びアセトン等のケトン類は、アルデヒド基及びケトン基が特定のアミノ酸残基と反応して共有結合を形成し、架橋剤として作用する固定剤であり、タンパク質構造を安定化するとともに細胞の原形質をゲル化して酵素活性を抑えることができるため、本発明における好ましい固定化剤である。ただし、本発明において細胞固定剤はこれらに限定されるものではない。

[0034] また、それ自体が固定剤として直接作用するものではないが、加水分解等を受けることにより固定剤を遊離する供与体（例えばホルムアルデヒド供与体）を固定剤の一形態として用いることもできる。

[0035] 細胞固定は、適切な濃度の固定化剤を適切な時間、細胞検体に接触させることで行うことができる。細胞固定液中の固定化剤の濃度は適宜調節することができるが、例えば０．１～１０ｖ／ｖ％の範囲内である。細胞固定液と細胞検体との接触時間（細胞固定時間）も適宜調節することができるが、例えば、室温で、６時間以下で行うのが好ましい。

[0036] ［染色工程］

染色工程は、血液由来検体から赤血球を除去して生成された細胞検体に対して、色素で修飾された抗体（標識抗体）を対象細胞又は非対象細胞に特異的に結合させてそれらの細胞を特異的に染色する工程である。

[0037] 当該標識抗体としては、公知の蛍光色素等によって標識された抗体を用いることができる。蛍光色素を用いた場合には、対象細胞を染色する標識抗体

の蛍光色素と、非目的細胞を染色する標識抗体の蛍光色素とを分離して測定できるように、それぞれ異なる励起波長、蛍光波長を有する蛍光色素を用いることが好ましい。

[0038] 対象細胞を特異的に染色する方法としては、対象細胞が有する標的抗原に特異的に結合する標識抗体を含む溶液と細胞検体とを接触させることで対象細胞に特異的に蛍光標識を付加することができる。対象細胞が有する抗原と特異的な反応を示す抗体として、抗サイトケラチン抗体、抗ＥｐＣＡＭ抗体、抗ビメンチン抗体等を用いることが可能であるが、本発明においては特に限定されるものではない。

[0039] 非対象細胞を特異的に染色する方法としては、非対象細胞が有する標的抗原に特異的に結合する標識抗体を含む溶液と細胞検体とを接触させることで行うことができる。非対象細胞が有する抗原と特異的な反応を示す抗体としては、抗ＣＤ４５抗体、抗ＣＤ２抗体、抗ＣＤ１３抗体、抗ＣＤ１４抗体、抗ＣＤ１５抗体、抗ＣＤ１６抗体、抗ＣＤ１９抗体、抗ＣＤ２０３ｃ抗体等を用いることが可能であるが、本発明においては特に限定されるものではない。

[0040] また、全細胞（対象細胞、非対象細胞ともに）に対して染色を施す方法としては、細胞核を染色することで行うことができる。全細胞の細胞核を染色する色素の例として、ＤＡＰＩ（4',6-diamidino-2-phenylindole）、Ｈｏｅｃｈｓｔ系色素（Hoechst 33342、Hoechst 33258等）、Acridine Orange、ＤＡＭＯ、Ethidium Bromide（臭化エチジウム）、Ethidium Homodimer、Propidium Iodide等が挙げられる。

[0041] ［判定工程］

判定工程は、染色工程において付加した、血液由来検体に含まれている対象細胞に特異的に結合する蛍光標識の蛍光強度に基づいて、血液由来検体に含まれる細胞が前記対象細胞であるか否かを判定して、前記対象細胞を特定（検出）する工程である。

[0042] （細胞検出）

対象細胞を検出する方法として、染色後の細胞の細胞撮影を行って、その後画像解析により対象細胞を検出する方法がある。

[0043] 例えば、蛍光色素が標識された抗体を用いて染色を行った場合には、まず、蛍光標識が付加された細胞検体に対して、対象細胞を染色する標識抗体の蛍光色素と、非対象細胞を染色する標識抗体の蛍光色素、全細胞を染色する蛍光色素のそれぞれを励起する励起光を順次照射し、それぞれの蛍光色素から発光する蛍光に基づく細胞画像を撮影する。その後、撮影して得られた対象細胞を特異的に染色した細胞画像、非対象細胞を特異的に染色した細胞画像、全細胞を染色した細胞画像等の画像解析を行い、予め設定された蛍光強度の閾値に基づいて対象細胞を検出する。

[0044] ＜判定方法＞

本発明の希少細胞の判定方法は、前記保管工程を含む前処理工程、前記染色工程および前記判定工程を含み、必要に応じてさらに、前記固定工程、その他の処理工程を含んでいてもよい。

[0045] 前処理工程は、少なくとも、前記保管工程を含む。検体として培養細胞を使用する場合は洗浄処理、血液由来検体を使用する場合は赤血球除去及び洗浄処理等が前処理工程で実施される処理工程に含まれるが、必要に応じてさらに、その他の処理工程を含んでいてもよい。

実施例

[0046] 以下、本発明について実施例を挙げて更に詳細に説明する。

［実施例１］

実施例１の保管方法は、血液由来検体から赤血球を除去して生成した細胞検体に高濃度固定液を用いた細胞固定を施した後に、細胞固定が施された当該細胞検体を低濃度固定液の中で数日保管することを特徴とする。

[0047] （細胞）

実施例１においては、ヒト乳がん培養細胞株（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１）と、抗凝固剤が予め充填された市販の採血管（テルモ社）で採血した健常者ボランティア血液由来の細胞との２種類の細胞を用いた。ＭＤＡ－ＭＢ－２３

１は、トリプシン処理及びリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）による後述する洗浄処理を２回施した培養細胞を用いた。血液由来の細胞は、赤血球を除去する操作が施された主に白血球からなる細胞検体を用いた。血液由来検体から赤血球を除去するために、以下に説明するように赤血球除去処理を行った。

[0048] ［分離工程］

（赤血球除去）

免疫染色において、後述する細胞固定液を使用して細胞固定を行うが、血液由来検体の中に対象細胞以外の細胞（例えば赤血球など）が大量に存在すると、それと比べるとＣＴＣの個数は極めて少ないため、細胞固定の効果が十分に現れない場合がある。更に、細胞固定ができている場合においても、細胞固定が施された血液由来検体は、細胞膜の性状、形態及び比重が変化することから、赤血球等の成分を密度勾配遠心法により分離することは困難であり、事前に赤血球を除去することが望ましい。そのため、本実施形態においては赤血球を除去してから細胞固定を行うようにしている。

[0049] 赤血球を除去するために、まずは、採血管で採取した血液のうち２ｍＬを、密度勾配遠心用分離液（Ｆｉｃｏｌｌ、比重１．０７７）を３ｍＬ予め充填した遠沈管（ベクトンディッキンソン社）の該分離液の上から重層し、室温、４００×ｇで４０分間遠心分離を行った。遠心後、赤血球が多く含まれる層以外の層を全て採取し、０．１％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含有するＰＢＳを用いて、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行い、細胞ペレットの上清液を取り除き、ＰＢＳを１ｍＬ加えて洗浄する洗浄処理を２回実施した。洗浄後、ＰＢＳで細胞検体の懸濁液を作製した。

[0050] （細胞固定液）

高濃度固定液として、２０％ホルマリン液（８％ホルムアルデヒドを含有するもの）（和光純薬工業）をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で、ホルムアルデヒド濃度が４ｖ／ｖ％になるように希釈して調製したものを用いた。低濃度固定液としては、後述するように、同材料で遠心管（プロテオセーブ

）の中でのホルムアルデヒド濃度が約０．００８ｖ／ｖ％になるように調製した。

[0051] ［固定工程］

（細胞固定方法）

プロテオセーブ（住友ベークライト）に細胞検体の懸濁液をそれぞれ１ｍＬ入れて、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行った。遠心後、細胞ペレットの上清液を取り除き、高濃度固定液を１ｍＬ加え、ローテーターで回転させながら室温で２０分間反応させた。高濃度固定液は、理想的にはプロテオセーブに加えてからも再度、所定の濃度になるように微調整を行った方が好ましい。ただし、高濃度固定液はホルムアルデヒド濃度が高いため、プロテオセーブに添加後、濃度の微調整を行わなくとも、上清液を取り除いた細胞ペレットの中に含まれるＰＢＳの量によるホルムアルデヒド濃度への影響は僅かである。

[0052] ［保管工程］

（検体保管方法）

細胞固定反応終了後、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行った。遠心後、高濃度固定液が２０μＬ程度残るように細胞ペレットの上清液を取り除き、最終的に低濃度固定液のホルムアルデヒド濃度が約０．００８ｖ／ｖ％となるようにＰＢＳを加えた。一方、高濃度固定液とは異なり、低濃度固定液はホルムアルデヒド濃度が低いため、上清液を取り除いた細胞ペレットの中に含まれるＰＢＳの量によってホルムアルデヒド濃度が大きく左右される場合がある。そのため、本実施形態においては、微調整をしながらＰＢＳを加えるようにしている。目安として、高濃度固定液を２０μＬ残した細胞ペレットに対して約１０００μＬのＰＢＳを加えた。

[0053] ホルムアルデヒド濃度の微調整後、低濃度固定液の中で、固定日を０日目として細胞検体を０、３、又は７日間保管した。細胞検体を、前述のような従来の高濃度固定液（ホルムアルデヒド濃度が１％又は４％のもの）中で長期間にわたって保管した場合、その後細胞の免疫染色性（蛍光輝度）が低下

してしまうため、本実施形態においては、ホルムアルデヒド濃度が極めて希薄な低濃度固定液を敢えて用いて検体保管を行った。このことにより、固定液の中で長期間にわたって検体保管を行った後でも、細胞検体の免疫染色性が低下することはない。

[0054] なお、前述した固定工程及び保管工程において、対象細胞の取りこぼしを最低限に抑えるために、細胞検体を遠心管から移動させず当該遠心管に高濃度固定液又は低濃度固定液を添加して細胞固定及び検体保管を行ったが、細胞固定及び検体保管の進め方はこれらに限定されない。例えば、固定液が収容されている容器に細胞検体を移動させても良く、固定液と細胞検体とを接触させて反応を進めることができれば良い。

[0055] （免疫染色）

保管工程後の細胞の免疫染色性を評価するために、以下に説明するように免疫染色を行った。

[0056] 先ずは、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行い、遠心後、細胞ペレットの上清液を取り除き、PBSを添加後、再度室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行い、細胞ペレットの上清液を取り除いた。次いで、１次抗体反応液を添加し１次抗体反応を行った。１次抗体反応液として、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞検体には抗サイトケラチン（ＣＫ）抗体（ベクトンディッキンソン社）、健常者の血液由来検体から生成された細胞検体には抗ＣＤ４５抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社）を添加して室温で３０分間反応させた。

[0057] １次抗体反応後、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行い、細胞ペレットの上清液を取り除き、ＰＢＳを１ｍＬ加えて洗浄する洗浄処理を３回実施した。

洗浄後、２次抗体反応を行った。２次抗体反応を行うには、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞検体には１次抗体反応にて使用した抗ＣＫ抗体に特異的に結合するＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７標識抗マウスＩｇＧ２ａ抗体（インビトロジェン社）、血液由来検体から生成された細胞検体には１次抗体反応にて使用した抗ＣＤ４５抗体に特異的に結合するＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ４８８標識

抗マウスＩｇＧ１抗体（インビトロジェン社）を添加した。そして、細胞核を染色するために、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞検体及び血液由来検体から生成された細胞検体に、細胞核中のＤＮＡに結合し染色するＨｏｅｃｈｓｔ３３３４２（インビトロジェン社）を添加して室温で３０分間反応させた。

[0058] ２次抗体反応後、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行い、細胞ペレットの上清液を取り除き、ＰＢＳを１ｍＬ加えて洗浄する洗浄処理を２回実施し、最後にＰＢＳを加えて10^5～10^6ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞懸濁液を作製した。

[0059] （免疫染色性評価）

免疫染色後、以下に説明するように蛍光顕微鏡にて免疫染色性の評価を行った。

先ずは、免疫染色後の細胞検体懸濁液から２０μＬを血球計算盤に充填して蛍光顕微鏡にて細胞画像の撮影を行った。

[0060] 次に、撮影して得られた細胞画像の画像解析を行い、個々の細胞について、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞についてはＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７の蛍光強度、血液由来検体の細胞についてはＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ４８８の蛍光強度を、下記の式１により算出した。そして、それぞれの細胞検体において、３０細胞の蛍光強度の平均値を、該当細胞検体の免疫染色性の指標として算出した。保管日数０日目の値を１として規格化したものを表１に示す。

[0061] （式１）

［（１細胞についての蛍光強度の最大値）－（バックグラウンドの蛍光強度の平均値）］／（バックグラウンドの蛍光強度の標準偏差）

［比較例１］

実施例１において、検体保管方法を実施しなかった以外は実施例１と同様にして各細胞検体の免疫染色性を評価した。すなわち、実施例１において、細胞固定後には遠心分離を行わず、高濃度固定液のままで細胞検体を０、３、又は７日間保管した後に免疫染色や蛍光強度の算出等を行った。その結果を表１に示す。

[0062] [表1]

各細胞検体の各保管日数における免疫染色の蛍光強度（保管日数０日目の値を１として規格化した値を示している。）

		保管日数０日	保管日数３日	保管日数７日
実施例１	ＭＤＡ－ＭＢ－２３１	１	０．９５	０．８１
	血液由来細胞	１	０．９１	０．９１
比較例１	ＭＤＡ－ＭＢ－２３１	１	０．６０	０．６０
	血液由来細胞	１	０．８５	０．８０

[0063] 表１からも分かるように、実施例１の方法によって固定及び保管された検体は、比較例１と比較して、保管日数７日後でも蛍光強度の低下はほとんどなく、特に細胞質に存在する抗原に対する抗体（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞検体に使用した抗ＣＫ抗体）で顕著であった。この結果から、血液由来検体から赤血球が除去された状態で保管する、及び、低濃度固定液中で保管するといった本発明の構成により、免疫染色性が低下することなく、細胞検体を保管できることが分かる。

[0064] ［実施例２］

実施例２の保管方法は、血液由来検体から赤血球を除去して生成した細胞検体に高濃度固定液を用いた細胞固定を施さず、当該細胞検体を低濃度固定液の中に保存することで、細胞固定の目的も兼ねて細胞検体をそのまま放置して保管日数まで保管することを特徴とする。

[0065] （細胞）

実施例１と同様の状態のヒト乳がん培養細胞株（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１）を用いた。

（細胞固定液）

実施例２においては、２０％ホルマリン液（８％ホルムアルデヒドを含有するもの）（和光純薬工業）をリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で、ホルムアルデヒド濃度が（Ａ）０．４ｖ／ｖ％、（Ｂ）０．０４ｖ／ｖ％、（Ｃ）０．０１ｖ／ｖ％、（Ｄ）０．００１ｖ／ｖ％になるように希釈して調製し

た４種類の低濃度固定液（Ａ）～（Ｄ）を用いた。

[0066] ［保管工程］

（細胞固定を兼ねた検体保管方法）

プロテオセーブ（住友ベークライト）に細胞検体を１．５ｍＬずつ入れて、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行った。遠心後、細胞ペレットの上清液を取り除き、前記低濃度固定液（Ａ）～（Ｄ）をそれぞれ１ｍＬ加えてローテーターで回転させながら室温で２０分間反応させた。前述したように、低濃度固定液はホルムアルデヒド濃度が低いため、上清液を取り除いた細胞ペレットの中に含まれるＰＢＳの量によってホルムアルデヒド濃度が大きく左右される場合がある。そのため、実施例２においても、プロテオセーブに添加後のホルムアルデヒド濃度の微調整を行うようにしている。

[0067] 細胞固定を兼ねた検体保管において低濃度固定液（Ａ）、（Ｂ）を添加後、細胞検体をそのまま放置し、固定液を添加した日を０日目として０、１、３、又は７日間保管した。また、低濃度固定液（Ｃ）、（Ｄ）を添加後、細胞検体をそのまま放置し、固定液を添加した日を０日目として０又は１０日間保管した。

[0068] （免疫染色）

保管日数経過後、細胞検体の免疫染色性を評価するために、以下に説明するように免疫染色を行った。

[0069] 先ずは、１次抗体反応として、抗サイトケラチン抗体（ＣＫ）又はフィコエリスリン（ＰＥ）標識抗ビメンチン（Ｖｍｔ）抗体（ＣＳＴジャパン株式会社）を添加して室温で３０分間反応させた。なお、低濃度固定液（Ｃ）、（Ｄ）を用いて固定及び保管された細胞検体には、抗ＣＫ抗体による標識のみを行った。

[0070] １次抗体反応後、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行い、細胞ペレットの上清液を取り除き、ＰＢＳを１ｍＬ加えて洗浄する洗浄処理を３回実施した。

洗浄後、２次抗体反応として、抗ＣＫ抗体結合ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞

検体には抗ＣＫ抗体に特異的に結合するＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７標識抗マウスＩｇＧ２ａ抗体（インビトロジェン社）、及び、細胞核中のＤＮＡに結合し染色するＨｏｅｃｈｓｔ３３３４２（インビトロジェン社）を添加して室温で３０分間反応させた。抗Ｖｍｔ抗体結合ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞検体にはＨｏｅｃｈｓｔ３３３４２（インビトロジェン社）のみを添加して室温で３０分間反応させた。

[0071] ２次抗体反応後、室温、３００×ｇで１分間遠心分離を行い、細胞ペレットの上清液を取り除き、ＰＢＳを１ｍＬ加えて洗浄する洗浄処理を２回実施し、最後にＰＢＳを加えて10^5～10^6ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞懸濁液を作製した。

[0072] （免疫染色性評価）

免疫染色後、以下に説明するように蛍光顕微鏡にて免疫染色性の評価を行った。

先ずは、免疫染色後の細胞検体懸濁液から２０μＬを血球計算盤に充填して蛍光顕微鏡にて撮影を行った。

[0073] 次に、前述したように、式１を用いて、個々の細胞についてのＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ６４７又はＰＥの蛍光強度を算出し、３０細胞の蛍光強度の平均値を該当細胞検体の免疫染色性の指標として算出した。保管日数０日目の値を１として規格化したものを表２に示す。

[0074] ［比較例２］

実施例２において、低濃度固定液の代わりに高濃度固定液（ホルムアルデヒド濃度が４ｖ／ｖ％）を使用した以外は実施例２と同様にして各細胞検体の免疫染色性及び免疫染色割合を評価した。すなわち、比較例２において、各細胞検体は高濃度固定液で固定され、そのまま保管日数７日間まで放置された。その後に免疫染色を行い、免疫染色性の評価を行った。その結果を表２に示す。また、実施例２及び比較例２のデータをまとめて図１に示す。

[0075]

[表2]

各細胞検体の各保管日数における免疫染色の蛍光強度(保管日数０日目の値を１として規格化した値を示している。)

	固定液種類	固定液濃度（ｖ／ｖ％）	検体種類※	保管日数０日	保管日数１日	保管日数３日	保管日数７日	保管日数１０日
実施例２	低濃度固定液(A)	０．４	ＣＫ	１	１．１	１．２	０．９	－
			Ｖｍｔ	１	１．１	１．１	０．６	－
	低濃度固定液(B)	０．０４	ＣＫ	１	１．７	２．０	２．７	－
			Ｖｍｔ	１	１．５	２．０	２．６	－
	低濃度固定液(C)	０．０１	ＣＫ	１	－	－	－	１２．４
	低濃度固定液(D)	０．００１	ＣＫ	１	－	－	－	１２．０
比較例２	高濃度固定液	４	ＣＫ	１	０．７	０．５	０．５	－
			Ｖｍｔ	１	０．６	０．３	０．３	

※ＣＫ：抗ＣＫ抗体結合ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞検体、Ｖｍｔ：抗Ｖｍｔ抗体結合ＭＤＡ－ＭＢ－２３１細胞検体

[0076] 表２からも分かるように、実施例２の方法によって固定を兼ねた検体保管処理を行った細胞検体は、低濃度固定液（Ａ）～（Ｄ）のいずれについても、比較例２と比較して、保管日数７日後でも蛍光強度が維持され、若しくは向上した。特に、低濃度固定液（Ａ）で固定及び保管された細胞検体は、保管日数０日目からの蛍光強度変化が少なく、その値がほぼ一定に維持された。また、低濃度固定液（Ｃ）及び（Ｄ）で固定及び保管された細胞検体は、保管日数１０日で保管日数０日の約１２倍と、蛍光強度が顕著に向上した。

[0077] この結果から、予め従来の高濃度固定液を用いた細胞固定を行わなくても、血液由来検体から赤血球が除去された状態で、且つ、低濃度固定液中で細胞検体を保管すれば、細胞固定が有効に進行し、免疫染色性が低下することなく検体を保管できることが明らかである。特に、低濃度固定液（Ａ）で固定及び保管された細胞検体は、蛍光強度がほぼ一定値に維持されるため、細胞画像処理条件の標準化や異なるデータ間の比較が可能となる。

[0078] 例えば、免疫染色においては対象細胞に特異的に結合する抗体を使用しており、理想的には非対象細胞は染色されないのが好ましいが、非特異的吸着

等により非対象細胞が染色されることもある。このような状況においては、染色された細胞の蛍光強度に基づいて対象細胞であるか否かを判定して対象細胞を特定する必要がある。蛍光強度の閾値を予め設定し、当該蛍光強度の閾値に基づいて前述した対象細胞の特定の自動化を図る場合、検査ごとに蛍光強度が変わると、当該閾値に基づいた対象細胞であるか否かの判定を適切に行うことができなくなってしまう。すなわち、予め設定した１つの閾値に基づいて対象細胞であるか否かの判定を行う場合に、異なる蛍光強度を示す細胞を同じ細胞として判断することは困難である。一方、保管日数等によって変化する蛍光強度に対応して対象細胞の自動検出を行おうとするのであれば、検査ごとにキャリブレーションを行い異なる閾値を設定する必要がある。

[0079] しかしながら、本発明によれば、保管日数０日目からの蛍光強度変化が少ないため、自動化計測において１種類の対象細胞の判定を、予め設定した１つの閾値に基づいて行うことが可能となる。

[0080] また、低濃度固定液中で保管することにより、輸送の途中でも細胞固定が進行するため、工数削減の効果も得られる。

請求の範囲

[請求項1] 血液由来検体の保管方法であって、

前記血液由来検体から赤血球を除去して細胞検体を生成する分離工程と、

前記細胞検体に細胞固定液を添加し、ホルムアルデヒド濃度が０．００１～０．４ｖ／ｖ％の範囲内となった状態で細胞検体を保管する保管工程と、

を有する保管方法。

[請求項2] 前記細胞検体に細胞固定液を添加し、ホルムアルデヒド濃度が０．１～１０ｖ／ｖ％の範囲内となった状態で細胞検体を固定する固定工程を更に有し、

前記保管工程を行う前に前記固定工程を行うことを特徴とする請求項１に記載の保管方法。

[請求項3] 前記保管工程は、前記細胞検体に細胞固定液を添加し、ホルムアルデヒド濃度が０．１～０．４ｖ／ｖ％の範囲内となった状態で細胞検体を保管する保管工程であることを特徴とする請求項１に記載の保管方法。

[請求項4] 前記固定工程は、細胞検体を６時間以下固定することを特徴とする請求項２に記載の保管方法。

[請求項5] 前記保管工程は、前記細胞検体に細胞固定液を添加し、ホルムアルデヒド濃度が０．００１ｖ／ｖ％以上、０．１ｖ／ｖ％未満の範囲内となった状態で保管する保管工程であることを特徴とする請求項１、２又は４のいずれか一項に記載の保管方法。

[請求項6] 血液由来検体から生成された細胞検体を保管する保管工程を含む前処理工程と、

前記血液由来検体に含まれている対象細胞に特異的に結合する蛍光標識を付加する染色工程と、

前記対象細胞に特異的に付加された前記蛍光標識の蛍光強度に基づ

いて前記対象細胞であるか否かを判定して前記対象細胞を特定する判定工程と、

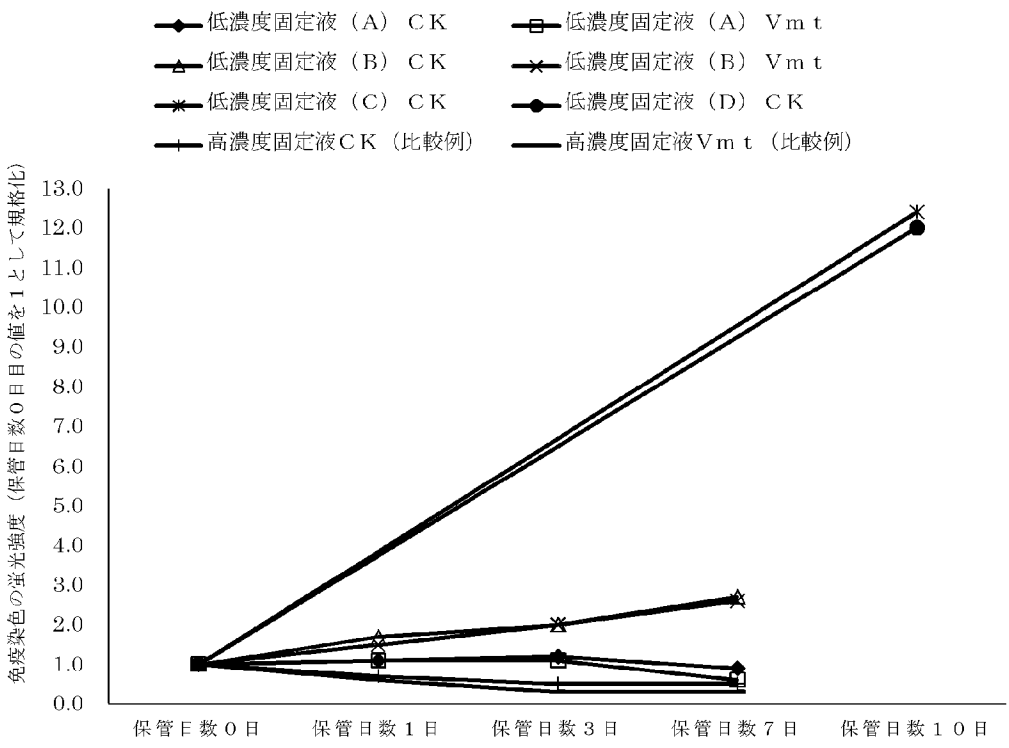
を有する希少細胞の判定方法であって、

前記保管工程は、請求項１から５のいずれか一項に記載の保管方法が用いられていることを特徴とする判定方法。

[請求項7] 前記判定工程は、前記蛍光強度と、前記対象細胞の種類に応じて予め設定された特定の閾値とを比較して前記対象細胞であるか否かを判定することを特徴とする請求項６に記載の判定方法。

WO 2017/141789 PCT/JP2017/004595

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/004595

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/00(2006.01)i, *A01N1/02*(2006.01)i, *C12N1/02*(2006.01)i, *G01N33/48*(2006.01)i, *G01N33/53*(2006.01)i, *G01N33/533*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/00-3/00, A01N1/00-65/48, A01P1/00-23/00, G01N1/00-1/34, G01N33/48-33/98

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), DWPI(Thomson Innovation), Japio-GPG/FX

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/185151 A1 (Konica Minolta, Inc.), 20 November 2014 (20.11.2014), claims; paragraphs [0001] to [0003], [0010], [0017], [0018], [0025] to [0027], [0031]; example 2 & US 2016/0123851 A1 claims; paragraphs [0001] to [0003], [0011], [0039], [0040], [0051] to [0053], [0059]; example 2 & EP 2998738 A1	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 April 2017 (04.04.17)	09 May 2017 (09.05.17)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/004595

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2014/061675 A1 (Konica Minolta, Inc.), 24 April 2014 (24.04.2014), claims; paragraphs [0007], [0021], [0056], [0057], [0105]; example 1 & US 2015/0276564 A1 claims; paragraphs [0007], [0028], [0066], [0067], [0116]; example 1 & EP 2910642 A1 & JP 2014-061675 A1	1-4,6-7 5
A	WO 2014/007190 A1 (Konica Minolta, Inc.), 09 January 2014 (09.01.2014), claims; paragraphs [0037], [0038], [0043]; example 1 & US 2015/0337355 A1 claims; paragraphs [0048], [0049], [0057]; example 1 & EP 2871232 A1 & JP 2014-007190 A1	1-7
A	WO 2013/168767 A1 (Konica Minolta, Inc.), 14 November 2013 (14.11.2013), claims; paragraphs [0010], [0029], [0034]; table 1 & US 2015/0148212 A1 claims; paragraphs [0011], [0037], [0044]; table 1 & EP 2848935 A1 & JP 2013-168767 A1	1-7
A	US 2003/0104629 A1 (STRECK LABORATORIES, INC.), 05 June 2003 (05.06.2003), whole document & WO 2004/003568 A1 & AU 2002368012 A	1-7
A	JP 2002-148255 A (Immunotech), 22 May 2002 (22.05.2002), entire text & US 2002/0115118 A1 whole document & EP 1189061 A1	1-7
A	NICHOLSON, Janet K.A. et al., Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry, Journal of Immunological Methods, 1993, Vol.160, p.215-218	1-7

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１７／００４５９５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/00(2006.01)i, A01N1/02(2006.01)i, C12N1/02(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N33/533(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/00-3/00, A01N1/00-65/48, A01P1/00-23/00, G01N1/00-1/34, G01N33/48-33/98

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１７年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Thomson Innovation), Japio-GPG/FX

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2014/185151 A1（コニカミノルタ株式会社）2014.11.20, 請求の範囲, [0001]－[0003], [0010], [0017], [0018], [0025]－[0027], [0031], 実施例２ & US 2016/0123851 A1, Claims, [0001]－[0003], [0011], [0039], [0040], [0051]－[0053], [0059], example 2 & EP 2998738 A1	1-7

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

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０４．０４．２０１７	０９．０５．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４８７２
中村　勇介
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X A	WO 2014/061675 A1（コニカミノルタ株式会社）2014.04.24, 請求の範囲，［0007］，［0021］，［0056］，［0057］，［0105］， 実施例１ & US 2015/0276564 A1, Claims, ［0007］, ［0028］, ［0066］, ［0067］, ［0116］, example 1 & EP 2910642 A1 & JP 2014-061675 A1	1-4,6-7 5
A	WO 2014/007190 A1（コニカミノルタ株式会社）2014.01.09, 請求の範囲，［0037］，［0038］，［0043］，実施例１ & US 2015/0337355 A1, Claims, ［0048］, ［0049］, ［0057］, example 1 & EP 2871232 A1 & JP 2014-007190 A1	1-7
A	WO 2013/168767 A1（コニカミノルタ株式会社）2013.11.14, 請求の範囲，［0010］，［0029］，［0034］，表１ & US 2015/0148212 A1, Claims, ［0011］, ［0037］, ［0044］, Table 1 & EP 2848935 A1 & JP 2013-168767 A1	1-7
A	US 2003/0104629 A1 (STRECK LABORATORIES, INC.) 2003.06.05, Whole document & WO 2004/003568 A1 & AU 2002368012 A	1-7
A	JP 2002-148255 A（イミュノテク）2002.05.22, 全文 & US 2002/0115118 A1, Whole document & EP 1189061 A1	1-7
A	NICHOLSON, Janet K.A. et al., Inactivation of HIV-infected H9 cells in whole blood preparations by lysing/fixing reagents used in flow cytometry, Journal of Immunological Methods, 1993, Vol.160, p.215-218	1-7