

(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5月26日(26.05.2017)

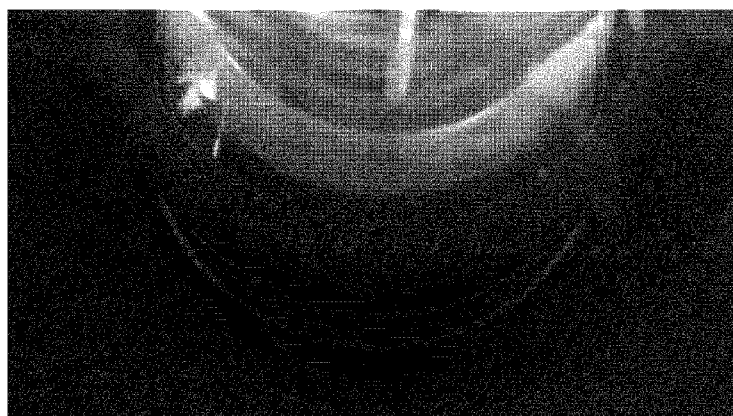


(10) 国際公開番号
WO 2017/086356 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/078 (2010.01) A61K 35/19 (2015.01)
A61K 35/16 (2015.01) C12N 5/077 (2010.01)
A61K 35/17 (2015.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/083990
- (22) 国際出願日: 2016年11月16日(16.11.2016)
- (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 2015-224075 2015年11月16日(16.11.2015) JP
- (72) 発明者: および
- (71) 出願人: 山原 研一 (YAMAHARA, Kenichi)
[JP/JP]; 〒6060805 京都府京都市左京区下鴨森本
町18-12 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 須藤 薫雄 (SUDO, Shigeo); 〒7202111 広
島県福山市神辺町上御領1711-6 有限会
社ジャパン・ラム内 Hiroshima (JP). 須藤 稔太
(SUDO, Toshita); 〒7202111 広島県福山市神辺町上
御領1711-6 有限会社ジャパン・ラム内
Hiroshima (JP). 廣島 友治 (HIROSHIMA, Tomo-
haru); 〒7202111 広島県福山市神辺町上御領17
11-6 有限会社ジャパン・ラム内 Hiroshima
(JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人前田特許事務所(MAEDA &
PARTNERS); 〒5300004 大阪府大阪市北区堂島浜
1丁目2番1号 新ダイビル23階 Osaka (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, 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
ロアジア (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))

(54) Title: BOVINE SERUM COMPOSITION AND METHOD FOR CULTURING CELLS USING SAID BOVINE SERUM COMPOSITION AS ADDITIVE

(54) 発明の名称: ウシ血清組成物及びそのウシ血清組成物を添加剤として使用する細胞の培養方法



(57) Abstract: Provided is a method for producing an inexpensive bovine serum composition that contains many factors useful for cell growth. The method includes: a step for performing anticoagulant treatment of bovine whole blood by an anticoagulant; a step for acquiring the buffy coat and a fraction having a specific gravity greater than that of the buffy coat from the anticoagulated blood; and a step for promoting the interaction of and activating acquired leukocytes and platelets by taking a certain length of time or longer at a certain temperature, thereby performing recoagulant treatment of the blood components including humoral factors by a recoagulant while causing the humoral factors to be secreted or released from the leukocytes and/or platelets.

(57) 要約: 細胞増殖に有益な因子を多数含む安価なウシ血清組成物の製造方法を提供する。ウシ全血を抗凝固剤で抗凝固処理する工程と、抗凝固処理された全血からバフィーコート及びバフィーコートより重い比重分画を取得する工程と、取得した白血球と血小板を一定の温度で一定以上時間をかけることで相互作用を促し活性化させることにより、白血球及び/又は血小板から液性因子を分泌又は放出させつつ、この液性因子を含む血液成分を再凝固剤で再凝固処理する工程と、を有する。



WO 2017/086356 A1

明 細 書

発明の名称：

ウシ血清組成物及びそのウシ血清組成物を添加剤として使用する細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、ウシ血清組成物及びそのウシ血清組成物を添加剤として使用する細胞の培養方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞の培養増殖では、培地に対しウシ血清を添加すれば効果的であることが知られている。特にウシ胎児血清は増殖因子を含む多くの液性因子を含有しており、細胞培養のスタンダードとなっている。

[0003] しかしながら、牛海綿状脳症(BSE)問題により、ウシ胎児血清はBSE発生国以外のオセアニア産が汎用されており、価格高騰に繋がっている。胎児由来ではない成獣ウシ血清も細胞培養に使用可能であるが、ウシ胎児血清ほど増殖因子を含む液性因子を含有しないことが知られている。

[0004] 一方、これまでに抗凝固処理を行ったヒト全血から遠心処理等により血小板を高濃度に濃縮した多血小板血漿 (platelet rich plasma:PRP) を調整し、これを添加した培地は細胞の培養増殖に有用であることが報告されている (非特許文献1)。

[0005] 多血小板血漿には、血小板由来のトランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β)、血小板由来成長因子-BB(PDGF-BB)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、上皮成長因子(EGF)等が多く含まれており、これらが細胞増殖を誘導している (非特許文献2)。

[0006] 血小板は、上記増殖因子の他、血小板第4因子(platelet factor 4:PF4)と呼ばれる好中球や単球に対する走化因子を含有しており、白血球の活性化を誘導する (非特許文献3)。

[0007] また、全血に含まれる血球成分には血小板以外にも白血球がある。白血球

はインターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子の他、血小板活性化因子(PAF)を分泌し、これは血小板を活性化させることが知られている（非特許文献4）。

[0008] バフィーコートは、抗凝固処理を行ったヒト全血から静置や簡単な遠心処理等により得られ、ヒトの場合、血漿や赤血球と明確に比重が異なることから、血小板や白血球両者を高濃度に含む白い層を呈する。そこで、バフィーコート層に含まれる血小板や白血球を相互に活性化させた、上記の血小板や白血球が分泌する増殖因子や走化因子、活性化因子等を含む各種液性因子を豊富に含有する血清は、細胞培養に相応しいと考えられる。

[0009] しかしながら、ウシの場合、後述するようにヒトと比べ赤血球の比重が軽いことから、白血球と赤血球の比重が重なる部分があり、結果、バフィーコートは白血球の含有が少ないことから不明瞭な層となる。従って、白血球および血小板両者を採取するには、バフィーコートより比重が重い分画（＝ウシの場合、白血球を含有）も含め取得する必要性が、本願発明において明らかとなっている。

[0010] 近年、細胞の製剤化による、再生医療製品としての治療応用が期待されている。一方、普段存在しない細胞を、例えば静脈内に投与されることは血液の凝固を誘導するとの報告がある（非特許文献5）。そこで、血液凝固を誘導しにくい細胞の培養法の確立が、再生医療の実現化に重要である。

[0011] 特許文献1には、凝固臍帯血の液性成分を含む間葉系幹細胞の増殖を促進する増殖促進剤が記載されている。特許文献1では、まず非凝固臍帯血に赤血球沈降剤を添加して、赤血球を含む画分と上清画分とに分離し、次にその上清画分に関し、造血幹細胞を含む沈降画分と血小板を含む液体画分とに分離している。そしてその血小板を含む液体画分にガラスビーズを接触させて増殖促進剤を製造している。則ち、造血幹細胞を含む白血球が存在する沈降画分は、増殖促進剤に含まれない。一方で本願発明は、後述するように、バフィーコート中の白血球と血小板との相互作用を一定の温度で一定時間以上かけ活性化させ、得られた液性成分を含む血液成分を再凝固処理させて得ら

れる血清成分であり、本願発明は特許文献1記載の発明と全く相違する。

[0012] 特許文献2には、抗凝固剤入りの血液から多血小板血漿、及び有形成分を分離した後の血漿に、ガラス材料からなる吸着部材を投入し、血漿内の繊維素原を吸着除去する血清の分離方法が記載されている。特許文献2では、繊維素原がガラス材料の表面に付着することを利用し、血漿内の繊維素原を除去する吸着材料としてガラス材料を使用している。本願発明は、後述するように、ガラス材料の添加は、バフィーコート中の白血球と血小板との相互作用を更に活性化させるものであり、本願発明は特許文献2記載の発明と全く相違する。

[0013] 特許文献3には、採取されたヒト血液を、凝固する前に抗凝固剤を入れずに遠心分離し、上清の血漿の80%を除去し血小板を含む残りの血液成分をよく懸濁し、血液凝固促進材としてガラスビーズを添加することで、血小板を活性化し、血液凝固させるとともに、前記血小板から増殖因子を放出させ濃縮血清を得ている。

[0014] また、特許文献4には、採取されたヒト血液に抗凝固剤を入れ遠心分離し、上清の血漿の80%を除去し血小板を含む残りの血液成分をよく懸濁し、血液凝固促進材として塩化カルシウム水溶液を添加することで、血小板を活性化し、血液凝固させるとともに、前記血小板から増殖因子を放出させ濃縮血清を得ている。本願発明では、後述するように、抗凝固剤の添加されたウシ血液において、バフィーコートおよびバフィーコートよりも比重の重い分画（ウシの場合、白血球を含有）を含む比較的広範囲の比重分画を取得し、白血球と血小板との相互作用を一定の温度で一定時間以上かけ活性化させ、得られた液性成分を含む血液成分を再凝固処理させて得られる血清成分であり、本願発明は特許文献3および4記載の発明と全く相違する。

先行技術文献

特許文献

[0015] 特許文献1：特開2011-160799号公報

特許文献2：特開2006-104106号公報

特許文献3：特開2014-118362号公報

特許文献4：特開2014-117347号公報

非特許文献

[0016] 非特許文献1：Tissue Eng Part C Methods, 2009 Sep;15(3):431-5.

非特許文献2：Plast Reconstr Surg, 2004;114:1502-1508.

非特許文献3：Proc Natl Acad Sci U S A, 1981 Jul;78(7):4584-7.

非特許文献4：Nature, 1974 Jun 7;249(457):581-2.

非特許文献5：Biochem Biophys Res Commun, 2013 Feb 8;431(2):203-9

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明は従来にないウシ血清組成物の製造方法を提供するものであって、具体的には、細胞増殖に有益な因子、及び細胞による血液凝固を抑制する因子を多数含む安価なウシ血清組成物の製造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

[0018] 本発明にかかるウシ血清組成物の製造方法は、ウシ全血を抗凝固剤で抗凝固処理する工程と、抗凝固処理されたウシ全血から Buffy コート及び Buffy コートより重い比重分画を取得する工程と、取得した白血球と血小板との相互作用を一定の温度で一定以上時間をかけ活性化させることにより、白血球及び／又は血小板から液性因子を分泌又は放出させつつ、この液性因子を含む血液成分を再凝固剤で再凝固処理する工程と、を有することを特徴とする。

発明の効果

[0019] 本発明にかかるウシ血清組成物の製造方法で得られるウシ血清組成物は、安価且つ細胞増殖因子を多数包含する。即ち、本発明によれば、例えばウシ全血から、ウシ胎児血清と同等以上の増殖促進作用を持つ血清組成物を製造できる。ウシ胎児血清は胎児の屠殺により血清を得ることから、感染症に関

しウインドウピリオド（検査で感染が確認できない空白期間）を考慮に入れた血液検査が後からできないが、飼育ウシであれば例えばウインドウピリオドが3ヶ月の感染症であれば、血清組成物を製造した3ヶ月後に血液検査を行い、その感染症を完全に否定することで、安全性の高い血清組成物を得ることができる。そのため、本発明により得られるウシ血清組成物は、ウシ胎児血清と比較し、安価且つ安全、細胞増殖能は同等以上であり、また、細胞による血液凝固を誘導しにくい。本発明により得られるウシ血清組成物は細胞培養の添加剤として極めて優れている。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]ヒトの各血液成分の比重を示す図である。

[図2]抗凝固処理されたウシ及びヒトの全血における、遠心分離の結果を示す図である。

[図3]抗凝固処理されたウシの各比重の全血における、遠心分離の結果を示す図である。

[図4]抗凝固処理されたウシの全血における、連続遠心分離の結果を示す図である。

[図5]ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の細胞増殖曲線を示す図である。

[図6]ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の細胞増殖曲線を示す図である。

発明を実施するための形態

[0021] （血清組成物の製造方法）

以下、添付の図面を参照して本発明の実施形態について具体的に説明するが、当該実施形態は本発明の原理の理解を容易にするためのものであり、本発明の範囲は、下記の実施形態に限られるものではなく、当業者が以下の実施形態の構成を適宜置換した他の実施形態も、本発明の範囲に含まれる。

[0022] 本実施形態にかかるウシ血清組成物は、

(i)抗凝固処理工程：抗凝固剤でウシ全血を抗凝固処理し、

(ii)白血球および血小板取得工程：抗凝固処理された全血から Buffy コート及び Buffy コートより重い比重分画を取得し、

(iii)白血球および血小板活性化・再凝固処理工程：取得した白血球と血小板との相互作用を一定の温度で一定以上時間をかけ、必要に応じガラス材料の添加及び静置により、活性化させることにより白血球及び／又は血小板により分泌・放出される液性因子を含有し、この液性因子を含む血液成分を再凝固剤により再凝固処理する

ことにより得られる。以下、各工程について説明する。

[0023] (i)抗凝固処理工程

全血は、ウシ由来であり、成獣・幼若・新生児又は胎児ウシの何れも適用可能である。全血は血管に針を刺し、針からチューブを介して採血バッグ等に採取することが可能である。全血は、血球成分（赤血球、白血球、血小板）と液体成分である血漿とからなる。血漿は凝固成分を含むのに対し、血清は凝固成分をほとんど含まないか、含んだとしても少量の液体である。

[0024] ウシ全血を採取時あるいは採取後に、抗凝固剤を用いた抗凝固処理を行う。血液内には、フィブリノーゲン（血液凝固I因子）、プロトロンビン（血液凝固II因子）、血液凝固V因子、血液凝固VIII因子等の血液凝固因子が含まれているため、後述するように全血からバフィーコートを取得する際に、血液の凝固を防止するためである。抗凝固剤は、特に限定されるものではなく、例えば、クエン酸ナトリウム、クエン酸、ヘパリン等が挙げられる。

[0025] (ii)白血球および血小板取得工程

抗凝固処理されたウシ全血からの白血球および血小板の取得は、例えば遠心機又は連続遠心機によりなされる。バフィーコートとは、凝固していない血液を遠心分離した際に、赤血球層と血漿との間に生じる白血球と血小板との層である。しかしながら、ウシの場合、後述するようにヒトと比べ赤血球の比重が軽いことから、白血球と赤血球の比重が重なる部分があり、結果、バフィーコートは白血球の含有が少ないことから不明瞭な層となる。従って、白血球および血小板両者を採取するには、バフィーコートより比重が重い分画（＝ウシの場合、白血球を含有）も含め取得する必要性が、本願発明において明らかとなっている。後述するように、ウシ血小板の比重は例えば1.0

32～1.058であり、ウシ白血球の比重は例えば1.032～1.084であり、ウシ赤血球の比重は例えば1.071～1.110である。そのためウシ全血の場合、赤血球層と血漿との間に位置するバフィーコートは比重1.032～1.071の層となるが、この層は白血球の含有が少ないためバフィーコートより比重が重い例えば1.071～1.084の分画も取得する。このようにして、抗凝固処理されたウシ全血から、例えば遠心機又は連続遠心機により、血漿および比重の重い赤血球を除いた、白血球と血小板双方を多く含む血漿が調整される。

[0026] この調整は、ヒトであれば各血液成分の比重の明確な違いにより(下記表1及び図1参照)、長時間静置や簡便な遠心操作にて各血液成分が容易に分離し、赤血球と血漿の間に浮遊し、白血球と血小板を多く含むバフィーコートを容易に得ることができる。

[0027] [表1]

	比重
血漿	1.025～1.029
血小板	1.032
白血球	1.063～1.085
赤血球	1.090～1.120

[0028] 一方、各血液成分の比重の差が乏しいウシの場合、ヒトと同様な操作では、白血球と血小板のみを採取することが難しい。例えばウシの場合、後述のように赤血球と白血球の比重の重なる部分が多く、これらを分離することが難しいが、より多くの血液を連続して遠心することができる連続遠心機を使用することで、各血液成分の比重の違いが僅かであっても、取得することが可能となる。

[0029] 遠心分離の条件は、特に限定されるものではなく、例えば、遠心加速度 $2900\sim 11760\text{ m/s}^2$ ($300\sim 1200\times g$)、温度 $4\sim 37^\circ\text{C}$ 、時間3分以上とすることが可能である。

[0030] (iii)白血球および血小板活性化・再凝固処理工程

次に、取得した白血球及び血小板を多く含有する血漿を常温～ 40°C にて一

定時間静置し、白血球と血小板との相互作用を促す。ここで常温とは10℃～30℃とする。この際、ガラス材料等が接触することにより、白血球と血小板との相互作用が更に活性化され、白血球及び／又は血小板から大量の液性因子が分泌・放出される。ガラス材料は、ソーダ石灰ガラス、鉛ガラス、ホウケイ酸ガラス、又はこれらの混合からなる成分を有するガラスである。

[0031] 白血球および血小板にガラス材料が接触するとは、(i)バフィーコートにガラス材料を投入すること、(ii)バフィーコートにガラス材料で形成されたガラス棒を投入して、そのガラス棒によってバフィーコートを攪拌すること、(iii)バフィーコートを、ガラス材料を材質として形成されたガラス材料容器中に投入すること、のいずれも包含する概念である。

[0032] 活性化の温度・時間条件は、37℃・1時間以上が望ましいが、例えば、常温～40度・5分以上とすることが可能であり、また37℃～40℃・1～3時間とすることが可能であり、更には38℃～40℃・1～3時間とすることが可能である。また、活性化の時間中に再凝固剤を添加し、次の再凝固処理工程を同時に実施することも可能である。

[0033] 投入されるガラス材料の形状は、特に限定されるものでなく、例えば、粒状物、シート、ブロック等の形状とすることが可能である。粒状物は、例えば、ガラスビーズ状、ビー玉状、おはじき玉状、サイコロ状、円柱状、角柱状、中空円筒状、ドーナツ状、涙滴状、板状等の定形状や、カレット等の不定形状とすることが可能である。好ましくはガラスビーズである。粒状物の粒径は、特に限定されるものでなく、例えば、1～20mm、好ましくは5～9mmとすることが可能である。

[0034] ガラス材料を添加させることにより濃度増加して分泌・放出される液性因子は、血小板由来、白血球由来、又はこれらの双方由来のものが含まれる。血小板由来の液性因子は、例えば、TGF-beta1、Basic FGF、G-CSF、IFN-gamma、IL-10、IL-1RA、IL-1b、IL-4、IL-6、IL-8、TNF-alpha等が挙げられる。白血球由来の液性因子は、例えば、Eotaxin、IL-12(p70)等が挙げられる。血小板及び白血球の双方由来の液性因子は、例えばIL-5、IL-9、IP-10、MCP-1

、PDGF-BB等が挙げられる。

[0035] 同時に、上澄みである血清成分を取得するために、上述した液性因子を含む血液成分を再凝固剤により再凝固処理する。再凝固剤は、特に制限されるものではなく抗凝固剤の種類に応じて適宜設定することが可能であり、例えば、塩化カルシウム、プロタミン等が挙げられる。抗凝固剤がクエン酸の場合、再凝固剤は例えば塩化カルシウム液等のカルシウム液が好ましく、抗凝固剤がヘパリンの場合、再凝固剤は例えばプロタミン等が好ましい。

[0036] 上述の工程を経て得られたウシ血清組成物は細胞増殖因子を多数含有しており、優れた細胞増殖能を有する血清組成物を得ることができる。更に、得られた細胞は血液凝固の誘導が抑制されており、より安全性が高い。

[0037] (細胞の培養方法)

本発明の細胞の培養方法は、本発明にかかるウシ血清組成物の製造方法で得られたウシ血清組成物を添加剤として含む培地にて細胞を培養することにより、細胞の増殖を促進し、血液凝固の誘導を抑制する工程を含む。

[0038] 細胞は、特に限定されるものではなく、例えば骨髄、脂肪組織、又は羊膜・臍帯を含む胎児付属物を由来とする間葉系幹細胞又は間葉系細胞である。細胞の由来は、特に限定されるものでなく、例えば、ヒト、及び、げっ歯類、家畜類、ヒトを除く霊長類等の非ヒト哺乳類等が挙げられる。

[0039] ウシ血清組成物が添加剤として包含される培地は、特に限定されるものでなく、例えば間葉系幹細胞の培養に使用可能な培地があげられ、具体的には、例えば、 α -Minimal essential medium培地(aMEM培地)、Dulbecco's modified eagle medium培地(DMEM培地)等が挙げられる。

[0040] 培地におけるウシ血清組成物の濃度は、特に限定されるものでなく、血清組成物に包含される液性因子の濃度が、例えば0.01~20 v/v%とすることが可能である。培地1 mLあたりの細胞数は、例えば1000~10万個とすることが可能である。

[0041] 細胞の培養条件は、特に限定されるものではなく、例えば、温度は37℃であり、時間は2~10日である。また培地は、例えば1~5日ごとに新し

い培地に取り換えることが好ましく、培地の取換え方法は、例えば所定時間ごとに培地交換する方法、新たな培地を連続的又は断続的に供給する方法等があげられる。後者の場合、例えば新たな培地の供給にあわせて、古い培地の一部を連続的又は断続的に廃棄することが好ましい。

実施例

[0042] (実施例1)

遠心型血液成分分離装置(コンポーネントコレクションシステム:CCS、ヘモネティクス製)を用い、抗凝固処理血液から様々な濃度の白血球・血小板分画を採取し、白血球・血小板を相互活性化後、再凝固処理により血清組成物を調整し、その液性因子を解析した。

[0043] 具体的には、同装置専用血液回路(971J、ヘモネティクス製)を装着し、抗凝固剤ACD-A液(クエン酸ナトリウム水和物2.20%、クエン酸水和物0.80%、ブドウ糖2.20%、テルモ株式会社製)と供血者血液を1:10の割合で混合することに得られた抗凝固処理血液を、同血液回路に備える遠心ボウルを用い、連続遠心により得られる様々な濃度の白血球・血小板分画を経時的に分割して採取した。得られた白血球・血小板分画(バフィーコート)は、自動血球計数装置(LC-660、フクダ電子製)にて白血球・血小板数を測定した。結果を表2に示す。

[0044] [表2]

サンプル	白血球数 (/μL)	サンプルAに 対する比率	血小板数 (/μL)	サンプルAに 対する比率
A	14,000	100%	2,910,000	100%
B	21,000	150%	3,280,000	113%
C	24,000	171%	2,830,000	97%
D	17,000	121%	1,490,000	51%

[0045] 表2に示すように、1回の抗凝固処理血液から遠心型血液成分分離装置を用いることにより、様々な濃度の白血球・血小板分画を得ることができた。

[0046] 得られた白血球・血小板分画に対し、ガラスビース(血液成分50mlあたり1

個：BZ-6、アズワン製）を加えたもの（ガラス有）、及び加えなかったもの（ガラス無）を用意し、更に最終添加濃度が10mMとなるように1M塩化カルシウム水溶液を加えて常温にて1時間以上静置した。凝固確認後、3000回転10分にて遠心し、上清（血清組成物）を回収し、 -80°C にて保存した。同血清組成物を解凍し、TGF-beta1 ELISA kit(#88-8350-22、Affimetrix製)にてTGF-beta1濃度を測定した。結果を表3に示す。

[0047] [表3]

サンプル	TGF-beta1 濃度(ng/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	178.5	100%	196.0	100%
B	185.7	104%	200.1	102%
C	168.2	94%	185.7	95%
D	87.1	49%	108.5	55%

[0048] 表3に示すように、TGF-beta1濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、表2の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のTGF-beta1は血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びTGF-beta1濃度共ほぼ同じ数字であり、TGF-beta1は血小板由来であることが強く示唆された。

[0049] 更に、血清組成物に関し、Bio-Plex Proヒトサイトカイン27-Plexアッセイ(#M50-0KCAF0Y、Bio-Rad製)を用い、網羅的サイトカイン解析(Basic FGF, Eotacin, G-CSF, GM-CSF, IFN-gamma, IL-10, IL-12(p70), IL-13, IL-15, IL-17, IL-1RA, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IP-10, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-BB, RANTES, TNF-alpha, VEGF)を行った(内、GM-CSF, IL-15, IL-17, IL-2, MIP-1aは、ほぼ全てのサンプルが検出感度以下であったため、除外)。結果を表4～25に示す。

[0050]

[表4]

サンプル	Basic FGF 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	8.3	100%	53.5	100%
B	-	-	70.0	131%
C	-	-	60.5	113%
D	16.7	200%	35.3	66%

[0051] 表4に示すように、Basic FGF濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルAガラス有に対する比率をみると、表2の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のBasic FGFは血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとC（ガラス有）を比較すると、血小板数及びBasic FGF濃度共ほぼ同じ数字であり、TGF-beta1は血小板由来であることが強く示唆された。

[0052] [表5]

サンプル	Eotaxin 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	83.2	100%	90.4	100%
B	90.6	109%	134.9	149%
C	125.7	151%	128.5	142%
D	124.4	150%	109.6	121%

[0053] 表5に示すように、Eotaxin濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、表2の白血球のデータと高い相関を認め、血清組成物中のEotaxinは白血球由来が多いことが推察された。サンプルBとC（ガラス有）を比較すると、白血球数及びEotaxin濃度共ほぼ同じ数字であり、Eotaxinは白血球由来であることが強く示唆された。

[0054]

[表6]

サンプル	G-CSF 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	43.7	100%	115.2	100%
B	18.8	43%	166.1	144%
C	37.9	87%	135.3	117%
D	62.4	143%	82.6	72%

[0055] 表6に示すように、G-CSF濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルAガラス有に対する比率をみると、表2の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のG-CSFは血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びG-CSF濃度共ほぼ同じ数字であり、G-CSFは血小板由来であることが強く示唆された。

[0056] [表7]

サンプル	IFN-gamma 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	100.9	100%	237.7	100%
B	51.6	51%	336.3	141%
C	87.7	87%	275.7	116%
D	103.5	103%	188.2	79%

[0057] 表7に示すように、IFN-gamma濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルAガラス有に対する比率をみると、表2の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のIFN-gammaは血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIFN-gamma濃度共ほぼ同じ数字であり、IFN-gammaは血小板由来であることが強く示唆された。

[0058]

[表8]

サンプル	IL-10 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	9.6	100%	25.3	100%
B	11.2	117%	36.0	142%
C	14.0	146%	29.9	118%
D	12.2	127%	18.9	75%

[0059] 表 8 に示すように、IL-10濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルAガラス有に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のIL-10は血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIL-10濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-10は血小板由来であることが強く示唆された。

[0060] [表9]

サンプル	IL-12(p70)濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	51.1	100%	84.6	100%
B	53.1	104%	128.6	152%
C	63.5	124%	109.7	130%
D	50.4	99%	84.8	100%

[0061] 表 9 に示すように、IL-12(p70)濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、表 2 の白血球数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のIL-12(p70)は白血球由来が多いことが推察された。サンプルAとDを比較すると、白血球数及びIL-12(p70)濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-12(p70)は白血球由来であることが強く示唆された。

[0062]

[表10]

サンプル	IL-13 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	8.5	100%	12.9	100%
B	6.5	76%	17.1	133%
C	9.0	106%	14.2	110%
D	8.3	98%	11.1	86%

[0063] 表 10 に示すように、IL-13 濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプル A ガラス有に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中の IL-13 は血小板由来が多いことが推察された。サンプル A と C を比較すると、白血球数及び IL-13 濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-13 は血小板由来であることが強く示唆された。

[0064] [表11]

サンプル	IL-1RA 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	106.5	100%	273.6	100%
B	45.9	43%	409.5	150%
C	80.4	75%	334.3	122%
D	98.7	93%	203.8	74%

[0065] 表 11 に示すように、IL-1RA 濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプル A (ガラス有) に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中の IL-1RA は血小板由来が多いことが推察された。サンプル A と C を比較すると、血小板数及び IL-1RA 濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-1RA は血小板由来であることが強く示唆された。

[0066]

[表12]

サンプル	IL-1b 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	1.51	100%	5.32	100%
B	0.68	45%	7.43	140%
C	1.11	74%	6.06	114%
D	1.51	100%	3.36	63%

[0067] 表 1 2 に示すように、IL-1b濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルA（ガラス有）に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のIL-1bは血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIL-1b濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-1bは血小板由来であることが強く示唆された。

[0068] [表13]

サンプル	IL-4 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	3.29	100%	7.15	100%
B	1.71	52%	10.09	141%
C	3.05	93%	8.20	115%
D	3.28	100%	5.48	77%

[0069] 表 1 3 に示すように、IL-4濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルA（ガラス有）に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のIL-4は血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIL-4濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-4は血小板由来であることが強く示唆された。

[0070]

[表14]

サンプル	IL-5 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	7.4	100%	12.3	100%
B	3.1	42%	17.0	138%
C	5.5	74%	15.2	124%
D	5.6	76%	10.3	84%

[0071] 表 1 4 に示すように、IL-5濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、ガラス有・無に関わらず、表 2 の白血球数・血小板数のデータとの相関を認めにくい。傾向としては血小板数と近い関係であるが、(1) ガラス無の場合、サンプルBは他のサンプルに比べ血小板数が多いにもかかわらず、IL-5濃度は低い。(2) ガラス有の場合、サンプルAとCを比較すると、血小板数はほぼ同じであるにも関わらず、IL-5濃度はサンプルCが最も高い。これらのことから、IL-5は白血球及び血小板両者相互由来である可能性が高い。ガラス使用による相互作用由来である根拠として、サンプルCは、白血球数が多く、血小板数はサンプルA及びBと同等、であるのに、IL-5濃度は(1) ガラス無の場合、他と比べて少ない、(2) ガラス有の場合、他と比べて比較的多い点が指摘できる。

[0072] [表15]

サンプル	IL-6 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	8.4	100%	18.5	100%
B	3.8	45%	25.6	138%
C	6.7	80%	21.5	116%
D	7.4	88%	13.6	74%

[0073] 表 1 5 に示すように、IL-6濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルA (ガラス有) に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと

高い相関を認め、血清組成物中のIL-6は血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIL-6濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-6は血小板由来であることが強く示唆された。

[0074] [表16]

サンプル	IL-7 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	21.5	100%	23.1	100%
B	20.4	95%	26.4	114%
C	24.6	114%	23.3	101%
D	15.2	71%	18.3	79%

[0075] 表 16 に示すように、IL-7濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めなかった。しかしながら、サンプルAに対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと相関を認め、血清組成物中のIL-7は血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIL-7濃度共ほぼ同じ数字であり、IL-7は血小板由来であることが示唆された。

[0076] [表17]

サンプル	IL-8 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	28.7	100%	65.0	100%
B	18.5	43%	91.0	150%
C	28.5	75%	71.8	122%
D	31.6	93%	46.7	74%

[0077] 表 17 に示すように、IL-8濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルA（ガラス有）に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデータと高い相関を認め、血清組成物中のIL-8は血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIL-8濃度共ほぼ同じ数字であり

、IL-8は血小板由来であることが強く示唆された。

[0078] [表18]

サンプル	IL-9 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	9.2	100%	22.4	100%
B	9.3	101%	32.6	146%
C	14.8	161%	27.1	121%
D	14.7	160%	18.8	84%

[0079] 表 18 に示すように、IL-9濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、ガラス有・無に関わらず、表 2 の白血球数・血小板数のデータとの相関を認めにくい。(1) ガラス無の場合、傾向としては白血球数と近い関係であるが、サンプルBはAと比べ血小板数が多いにもかかわらず、IL-9濃度は同等、(2) ガラス有の場合、血小板数に近い関係であるが、サンプルAとBを比較すると、血小板数はほぼ同じであるにもかかわらず、IL-9濃度はサンプルBが一番高い。これらのことから、IL-9は白血球及び血小板両者相互由来である可能性が高い。ガラス使用による相互作用由来である根拠として、サンプルBは、白血球数が比較的多く、血小板数は最も多い、であるのに、IL-9濃度は(1) ガラス無の場合、少ないレベル、(2) ガラス有の場合、最も多い点が指摘できる。

[0080] [表19]

サンプル	IP-10 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	855.7	100%	1053.9	100%
B	774.9	91%	1605.6	152%
C	967.0	113%	1393.2	132%
D	674.3	79%	1228.3	117%

[0081] 表19に示すように、IP-10濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、表2の白血球数・血小板数のデータとの相関を認めにくい。(1)ガラス無の場合、傾向としては血小板数と近い関係であるが、サンプルDはAと比較し血小板数は半分であるが、IP-10濃度は約8割、(2)ガラス有の場合、傾向としては白血球数と近い関係であるが、サンプルBとCを比較すると、血小板数は同等であるのに、IP-10濃度に違いを認めた。これらのことから、IP-10は白血球及び血小板両者相互由来である可能性が高い。ガラス使用による相互作用由来である根拠として、サンプルBは、白血球数が比較的多く、血小板数は最も多い、であるのに、IP-10濃度は(1)ガラス無の場合、平均以下、(2)ガラス有の場合、最も多い点が指摘できる。

[0082] [表20]

サンプル	MCP-1 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプルAに対する比率	ガラス有	サンプルAに対する比率
A	30.0	100%	59.4	100%
B	27.5	92%	83.8	141%
C	44.7	149%	74.0	125%
D	48.2	161%	56.2	95%

[0083] 表20に示すように、MCP-1濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、表2の白血球数・血小板数のデータとの相関を認めにくい。(1)ガラス無の場合、サンプルDのMCP-1濃度が最も高く、白血球数・血小板数と相関がない。(2)ガラス有の場合、傾向としては血小板数と近い関係であるが、サンプルAとCを比較すると、血小板数は同じであるにも関わらず、MCP-1濃度は25%の違いがある。これらのことから、MCP-1は白血球及び血小板両者相互由来である可能性が高い。ガラス使用による相互作用由来である根拠として、サンプルBは、白血球数が比較的多く、血小板数は最も多い、であるのに、MCP-

1濃度は（１）ガラス無の場合、最も低い、（２）ガラス有の場合、最も多い点が指摘できる。

[0084] [表21]

サンプル	MIP-1b 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	67.5	100%	56.9	100%
B	83.2	123%	95.2	167%
C	72.5	107%	81.4	143%
D	48.2	71%	64.3	113%

[0085] 表 2 1 に示すように、MIP-1b濃度は、ガラス使用で濃度増加を認めなかった。しかしながら、サンプルAに対する比率をみると、表 2 の白血球数のデータと相関を認め、血清組成物中のMIP-1bは白血球由来が多いことが推察された。サンプルAとDを比較すると、白血球数及びMIP-1b濃度共ほぼ同じ数字であり、MIP-1bは白血球由来であることが示唆された。

[0086] [表22]

サンプル	PDGF-BB 濃度(ng/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	10.8	100%	11.7	100%
B	7.9	73%	12.1	103%
C	12.9	119%	11.4	97%
D	8.9	82%	11.2	96%

[0087] 表 2 2 に示すように、PDGF-BB濃度は、ガラス無においても十分な濃度であったが、ガラス使用で濃度増加を認めた。サンプルAに対する比率をみると、表 2 の白血球数・血小板数のデータとの相関を認めにくい。（１）ガラス無の場合、サンプルBのPDGF-BB濃度が最も低く、白血球数・血小板数と相関がない。（２）ガラス有の場合、傾向としては白血球数と近い関係であるが、

サンプルAとDを比較すると、血小板数は半分にもかかわらず、PDGF-BB濃度は同等である。これらのことから、PDGF-BBは白血球及び血小板両者相互由来である可能性が高い。ガラス使用による相互作用由来である根拠として、サンプルBは、白血球数が比較的多く、血小板数は最も多い、であるのに、PDGF-BB濃度は（１）ガラス無の場合、最も低い、（２）ガラス有の場合、最も多い点が指摘できる。

[0088] [表23]

サンプル	RANTES 濃度(ng/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	2.52	100%	1.56	100%
B	2.67	106%	2.58	165%
C	4.13	164%	2.49	160%
D	4.48	178%	2.56	164%

[0089] 表 2 3 に示すように、RANTES濃度は、ガラス使用で濃度増加を認めなかった。サンプルAに対する比率をみると、表 2 の白血球数・血小板数のデータとの相関を認めない。これらのことから、RANTESは白血球及び血小板両者相互由来である可能性が否定できない。

[0090] [表24]

サンプル	TNF-alpha 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	24.3	100%	47.6	100%
B	13.8	57%	63.4	133%
C	19.7	81%	52.6	111%
D	19.4	80%	36.3	76%

[0091] 表 2 4 に示すように、TNF-alpha濃度は、ガラス使用で有意な濃度増加を認めた。サンプルA（ガラス有）に対する比率をみると、表 2 の血小板数のデー

タと高い相関を認め、血清組成物中のTNF- α は血小板由来が多いことが推察された。サンプルAとCを比較すると、血小板数及びIL-8濃度共ほぼ同じ数字であり、TNF- α は血小板由来であることが強く示唆された。

[0092] [表25]

サンプル	VEGF 濃度(pg/ml)			
	ガラス無	サンプル A に対する比率	ガラス有	サンプル A に対する比率
A	144	100%	141	100%
B	235	163%	239	170%
C	250	174%	189	134%
D	102	71%	164	116%

[0093] 表 2 5 に示すように、VEGF濃度は、ガラス使用で濃度増加を認めなかった。サンプルAに対する比率をみると、表 2 の白血球数・血小板数のデータとの相関を認めにくい。ガラス有において、傾向としては白血球数と近い関係であるが、例えばサンプルAとDを比較すると、血小板数とVEGF濃度に相関が認められず、このことは、VEGFは白血球及び血小板両者相互由来である可能性が否定できない。

[0094] これらの結果をまとめると、表 2 6 のようになる。

[0095] [表26]

		ガラスによる濃度増加
白血球由来	Eotaxin, IL-12(p70), MIP-1b	MIP-1b 以外
血小板由来	TGF-beta1, Basic FGF, G-CSF, IFN-gamma, IL-10, IL-12, IL-1RA, IL-1b, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, TNF-alpha,	IL-7 以外
白血球・血小板両者相互由来	IL-5, IL-9, IP-10, MCP-1, PDGF-BB, RANTES, VEGF	RANTES, VEGF 以外

[0096] 表 2 6 のように、白血球及び血小板を含んだ血球成分において、ガラスビーズ添加により、白血球及び血小板両者の相互作用が増強され、多くの液性

因子が分泌・放出されることが明らかとなった。

[0097] (実施例2)

更に、得られた白血球・血小板分画の相互活性化における温度・時間条件の至適化を目的とした検討を行った。

[0098] 具体的には、実施例1同様、同装置専用血液回路(971J、ヘモネティクス製)を装着し、抗凝固剤ACD-A液(クエン酸ナトリウム水和物2.20%、クエン酸水和物0.80%、ブドウ糖2.20%、テルモ株式会社製)と供血者血液を1:10の割合で混合することに得られた抗凝固処理血液を、同血液回路に備える遠心ボウルを用い、連続遠心により白血球・血小板分画を採取した。得られた白血球・血小板分画に対し、最終添加濃度が5mMとなるように塩化カルシウム水溶液を添加し、(1)4℃、20℃、37℃、40℃、50℃の各条件にて5分間静置、(2)37℃の条件にて5分、1時間、6時間静置した。凝固確認後、3000回転10分にて遠心し、上清(血清組成物)を回収し、-80℃にて保存した。同血清組成物を解凍し、TGF-beta1 ELISA kit(#88-8350-22、Affimetrix製)にてTGF-beta1濃度を測定した。結果を表に示す。

[0099] [表27]

温度	時間	TGF-beta1 濃度(ng/ml)
4℃	5分	10.5
20℃	5分	60.7
37℃	5分	67.2
40℃	5分	69.8
50℃	5分	46.5
20℃	1時間	86.9
37℃	1時間	92.1
40℃	1時間	83.4
37℃	6時間	90.2

[0100] 表27に示すように、TGF-beta1濃度は、温度に関しては20℃~40℃が高値であり、時間は1時間以上が高値であった。以上から、白血球・血小板分画の相互活性化に関する温度・時間条件は、常温~40℃・1時間以上であると考え

られた。

[0101] (実施例3)

抗凝固処理された全血からの白血球・血小板分画採取に関し、動物種による違いを検討した。

[0102] 具体的には、抗凝固剤ACD-A液（クエン酸ナトリウム水和物2.20%、クエン酸水和物0.80%、ブドウ糖2.20%、テルモ株式会社製）と、ヒトあるいはウシ血液を1：10の割合で混合することに得られた抗凝固処理血液14mlを、15mlポリプロピレン製チューブ（2325-015, AGCテクノグラス株式会社製）に添加し、200×g、常温にて、20分遠心し（ユニバーサル冷却遠心機5922、久保田商事株式会社製）、状態を写真撮影した。結果を図2に示す。

[0103] 図2において左がウシ、右がヒトである。通常の遠心では、ウシは赤血球の比重が比較的軽いと判断され、赤血球が容易に沈降しないのに対し、ヒトは赤血球比重が重く、赤血球が容易に沈降している。則ち、ウシにおいて、静置あるいは簡便な遠心操作によって、赤血球は沈降しにくく、結果、それよりも比較的軽い白血球・血小板分画が容易には出現しないことが想定される。

[0104] (実施例4)

そこで、ウシにおける各血液成分の比重検討を行った。Percoll原液(1.130 g/ml、GEヘルスケアバイオサイエンス株式会社製、17-0891-01)、1.5M NaCl、及び滅菌水を適量混合し、比重1.123, 1.110, 1.097, 1.084, 1.071, 1.058, 1.045, 1.032, 1.019, 1.006の等張Percoll液を調整した。15mlポリプロピレン製チューブ（2325-015, AGCテクノグラス株式会社製）に、これら等張Percoll液を3ml添加した。抗凝固剤ACD-A液（クエン酸ナトリウム水和物2.20%、クエン酸水和物0.80%、ブドウ糖2.20%、テルモ株式会社製）と、ウシ血液を1：10の割合で混合することに得られた抗凝固処理血液3mlを、等張Percoll液を加えた15mlポリプロピレン製チューブ（2325-015, AGCテクノグラス株式会社製）に3ml重層した。400×g、常温にて、10分遠心し（ユニバーサル冷却遠心機5922、久保田商事株式会社製）、状態を写真撮影した。結果を図

3に示す。

[0105] 上記の如く、ウシ血液には、比重1.071の等張Percoll液に浮遊する、比重1.071よりも軽い赤血球が多く存在することが分かった。

[0106] 更に、各チューブ（6ml）を、上部3ml・下部3mlに分割し、それぞれにおける血球成分を自動血球計算装置（IDEXX Laboratories製 プロサイトDx）にて測定した。結果を表28に示す。

[0107] [表28]

比重	上部			下部		
	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)
1.123	7.14	9.03	117	0.08	0.1	0
1.11	<u>6.73</u>	8.7	129	<u>0.32</u>	0.15	0
1.097	<u>6.16</u>	8.67	116	<u>1.36</u>	0.49	1
1.084	<u>4.95</u>	<u>8.01</u>	124	<u>2.45</u>	<u>1</u>	3
1.071	<u>3.23</u>	<u>7.25</u>	124	<u>4.17</u>	<u>1.75</u>	3
1.058	0.04	<u>1.76</u>	<u>108</u>	7.72	<u>7.71</u>	<u>32</u>
1.045	0.01	<u>1.42</u>	<u>78</u>	7.64	<u>7.85</u>	<u>59</u>
1.032	0.01	<u>0.19</u>	<u>71</u>	7.72	<u>9.2</u>	<u>65</u>
1019	0	0	13	7.94	9.34	97
1.0058	0	0.01	2	7.6	9.02	87

[0108] 表28の結果から、ウシの各血球成分の比重は、表29のように示された。

[0109] [表29]

	比重
ウシ血小板	1.032~1.058
ウシ白血球	1.032~1.084
ウシ赤血球	1.071~1.110

[0110] このように、図2の結果を踏まえた考察が正しいこと、則ち、ウシの場合、赤血球の比重が比較的軽いため、赤血球が静置あるいは簡便な遠心操作では、容易には赤血球が沈降しないことが明らかとなった。

[0111] 更に、ヒトの場合であれば、簡便な操作で白血球・血小板分画（いわゆる Buffyコート）が出現するが、ウシの場合、白血球と赤血球の比重が重なる部分が多いため、静置あるいは簡便な遠心操作では、すべての白血球を分離することが難しいことが明らかとなった。

[0112] （実施例5）

そこで、ウシ全血からの安定した白血球・血小板分画の採取を目指し、連続遠心機を用いた検討を行った。

[0113] 具体的には、遠心型血液成分分離装置(CCS、ヘモネティクス製)に専用血液回路(971J、ヘモネティクス製)を装着し、抗凝固剤ACD-A液(クエン酸ナトリウム水和物2.20%、クエン酸水和物0.80%、ブドウ糖2.20%、テルモ株式会社製)とウシ全血を1:10の割合で混合することに得られた抗凝固処理血液を、同血液回路に備える遠心ボウルを用い、連続遠心を行い、出現した白血球・血小板分画を写真撮影した。結果を図4に示す。

[0114] 図4に示されるように、遠心ボウルの外側に位置する赤血球と内側に位置する血漿の間に、白い帯状の円を描く Buffyコート(白血球・血小板分画)が明確に存在している。これは、連続遠心機を用いると、一度の処理血液量が多いため(>250ml)、僅かな比重の差であったとしても比較的容易に Buffyコートが出現したものと思われる。

[0115] そこで、出現した Buffyコート前後の分画を経時的に分割して採取し(サンプル1~8、各約5ml)、それぞれにおける血球成分を自動血球計算装置(IDEXX Laboratories製 プロサイトDx)にて測定した。結果を表30に示す。

[0116]

[表30]

サンプル	RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	
処理前	8.92	14.6	136	
1	0.03	0.02	22	←血小板(少量)
2	0.03	0.01	35	←血小板(少量)
3	0.03	0.01	49	←血小板(少量)
4	0.03	0	50	←血小板(少量)
5	0.07	7.74	241	←白血球+血小板
6	0.73	96.8	1107	←白血球+血小板(バフイーコート)
7	5.05	120	690	←赤血球+白血球+血小板
8	8.81	61.3	260	←赤血球+白血球+血小板

[0117] バフイーコートに位置するサンプル6は、白血球+血小板分画であることが証明された。また、バフイーコートより比重の重いサンプル6において、最も白血球が多いことが明らかとなった。結果、抗凝固処理されたウシ全血からのより多くの白血球・血小板を得るには、バフイーコートより比重が重い分画（＝ウシの場合、白血球を含有）も含め取得する必要性が確認された。

[0118] （実施例6）

そこで、抗凝固処理を行ったウシ全血に関し、遠心型血液成分分離装置(CC S、ヘモネティクス製)を用い、白血球・血小板分画を採取し、ガラスビース添加により活性化後、再凝固処理により血清組成物（以下本血清組成物）を調整し、細胞培養を目的とした添加剤としての可能性を検討した。

[0119] 具体的には、同装置専用血液回路（970E、ヘモネティクス製）を装着し、抗凝固剤チトラミン液「フソー」4%（クエン酸ナトリウム水和物4%、扶桑薬品工業株式会社製）とウシ血液を1：16の割合で混合することに得られた抗凝固処理血液を、同血液回路に備える遠心ボウルを用い、連続遠心により白血球・血小板分画を採取した。得られた白血球・血小板分画に対し、ガラスビース（血液成分50mlあたり1個：BZ-6、アズワン製）を加え、更に最終添

加濃度が5mMとなるように塩化カルシウム水溶液を加えて37℃にて6時間以上静置した。凝固確認後、3000回転10分にて遠心し、上清（血清組成物）を回収し、-20度にて保存した。本血清組成物を解凍し、aMEM培地（Life Technologies社製、41061）に10%の割合で添加し、細胞培養用培地とした。対照はウシ胎児血清（Moregate Biotech社製）を10%添加したaMEM培地とした。

[0120] 細胞培養用培地の評価として、市販ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（Lonza社製、PT-2501）、及び我々が樹立したヒト羊膜由来間葉系幹細胞を用い、増殖曲線を作成した。このヒト羊膜由来間葉系幹細胞は下記工程にて培養した。即ち、帝王切開により得られた羊膜を、コラゲナーゼとサーモリシンとにより35℃にて30分酵素処理を行い、その酵素処理した羊膜をポアサイズ100 μ mのメッシュに通すことにより細胞を回収し、回収した細胞を培養した。コラゲナーゼの濃度は500CDU/mlであり、サーモリシンの濃度は400PU/mlであった。結果をそれぞれ図5及び図6に示す。図5及び図6のように、骨髄及び羊膜由来間葉系幹細胞いずれの培養においても、本血清組成物は、通常細胞培養に用いられるウシ胎児血清と比較し、細胞増殖能に優れた血清組成物であることが分かった。

[0121] （実施例7）

また、本血清組成物が細胞径に与える影響を検討した。上記実施例6と同様、本血清組成物を10%の割合で添加したaMEM培地（対照はウシ胎児血清を10%添加したaMEM培地）を用い、我々が樹立したヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養を行い、適宜継代培養した。継代ごとに平均細胞径（ μ m）を測定し、両者の差違を検討した。結果を表31に示す。

[0122] [表31]

継代数	3	4	5	6	7
ウシ胎児血清	24.3	17.6	18.7	19.2	25.1
本血清組成物	18.7	17.1	15.3	18.1	15.9

[0123] 本血清組成物にて培養を行ったヒト羊膜由来間葉系幹細胞は、ウシ胎児血

清と比較し、細胞径が各継代において常に小さい細胞径であった。実施例6において、本血清組成物は、ウシ胎児血清と比較し細胞増殖能が高いことが示されており、細胞分裂までの時間が早いことが、その要因と考えられた。

[0124] (実施例8)

培養間葉系幹細胞を用いた細胞製剤の経静脈的投与において、しばしば投与細胞による血液凝固促進が問題になる。そこで、本血清組成物にて培養した細胞が血液凝固を誘導するかについて、検討を行った。実施例6・7同様、10%本血清組成物添加aMEM培地にて培養したヒト羊膜由来間葉系幹細胞を、 1×10^5 細胞/mlとなるように生理食塩水にて調整した。対照は10%ウシ胎児血清添加aMEM培地で培養した同細胞とした。これら細胞懸濁液160 μ Lにヒト血漿40 μ Lを添加し、37°C 5分間インキュベーションの後、20 μ M CaCl_2 を100 μ L添加し、血液凝固自動測定装置 (KC1 Delta、Tcoag社製) にて凝固時間を測定した。結果を表32に示す。

[0125] [表32]

	凝固時間 (秒)
ウシ胎児血清	24.5
本血清組成物	44.7 \pm 0.5

[0126] 本血清組成物にて培養を行ったヒト羊膜由来間葉系幹細胞は、ウシ胎児血清と比較し、凝固時間の延長を認め、血液凝固を誘導しにくい細胞であることが分かった。

[0127] (実施例9)

そこで、本血清組成物にて培養した細胞が血液凝固を誘導しにくい要因の探索を目的とした検討を行った。細胞が分泌し、細胞膜に結合している強力な凝固阻止因子である組織因子経路インヒビター (tissue factor pathway inhibitor : TFPI) に関し、10%本血清組成物添加aMEM培地にて培養したヒト羊膜由来間葉系幹細胞 (継代数4) の培養上清における濃度測定を、ELISAキット (Human TFPI Quantikine ELISA Kit) (DTFP10、R&D systems社) を用い

て行った。対照は10%ウシ胎児血清添加aMEM培地にて培養した同細胞の培養上清、及び細胞培養前のこれら培地とした。結果を表33に示す。

[0128] [表33]

	TFPI 濃度 (pg/ml)	
	なし	あり
ヒト羊膜由来間葉系幹細胞の培養	なし	あり
ウシ胎児血清	検出感度以下	45.1
本血清組成物	検出感度以下	63.1

[0129] 本血清組成物にて培養を行ったヒト羊膜由来間葉系幹細胞は、ウシ胎児血清と比較し、TFPIをより多く分泌していることから、血液凝固を誘導しにくい細胞であることが分かった。

産業上の利用可能性

[0130] 血清組成物の製造に利用できる。

請求の範囲

- [請求項1] ウシ全血を抗凝固剤で抗凝固処理する工程と、
 抗凝固処理されたウシ全血からバフィーコート及びバフィーコートより重い比重分画を取得する工程と、
 取得した白血球と血小板を一定の温度で一定以上時間をかけることで相互作用を促し活性化させることにより、白血球及び／又は血小板から液性因子を分泌又は放出させつつ、この液性因子を含む血液成分を再凝固剤で再凝固処理する工程と、
 を有することを特徴とするウシ血清組成物の製造方法。
- [請求項2] 前記バフィーコートより重い比重分画は、1.071～1.084の比重分画であることを特徴とする、請求項1に記載のウシ血清組成物の製造方法。
- [請求項3] 前記一定の温度は、常温～40℃、時間は5分以上の条件であることを特徴とする、請求項1又は2に記載のウシ血清組成物の製造方法。
- [請求項4] 前記バフィーコートの更なる活性化に、ガラス材料を添加することを特徴とする、請求項1乃至3の何れか1項に記載のウシ血清組成物の製造方法。
- [請求項5] 前記抗凝固剤は、クエン酸ナトリウム又はクエン酸であることを特徴とする請求項1乃至4の何れか1項に記載のウシ血清組成物の製造方法。
- [請求項6] 前記再凝固剤は、塩化カルシウム溶液であることを特徴とする請求項1乃至5の何れか1項に記載のウシ血清組成物の製造方法。
- [請求項7] 前記バフィーコートの取得は、遠心機又は連続遠心機によることを特徴とする請求項1乃至6の何れか1項に記載のウシ血清組成物の製造方法。
- [請求項8] 前記液性因子は、TGF-beta1、Basic FGF、Eotaxin、G-CSF、IFN-gamma、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-1RA、IL-1b、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IP-10、MCP-1、PDGF-BB、TNF-alphaであることを特徴

とする請求項1乃至7の何れか1項に記載のウシ血清組成物の製造方法。

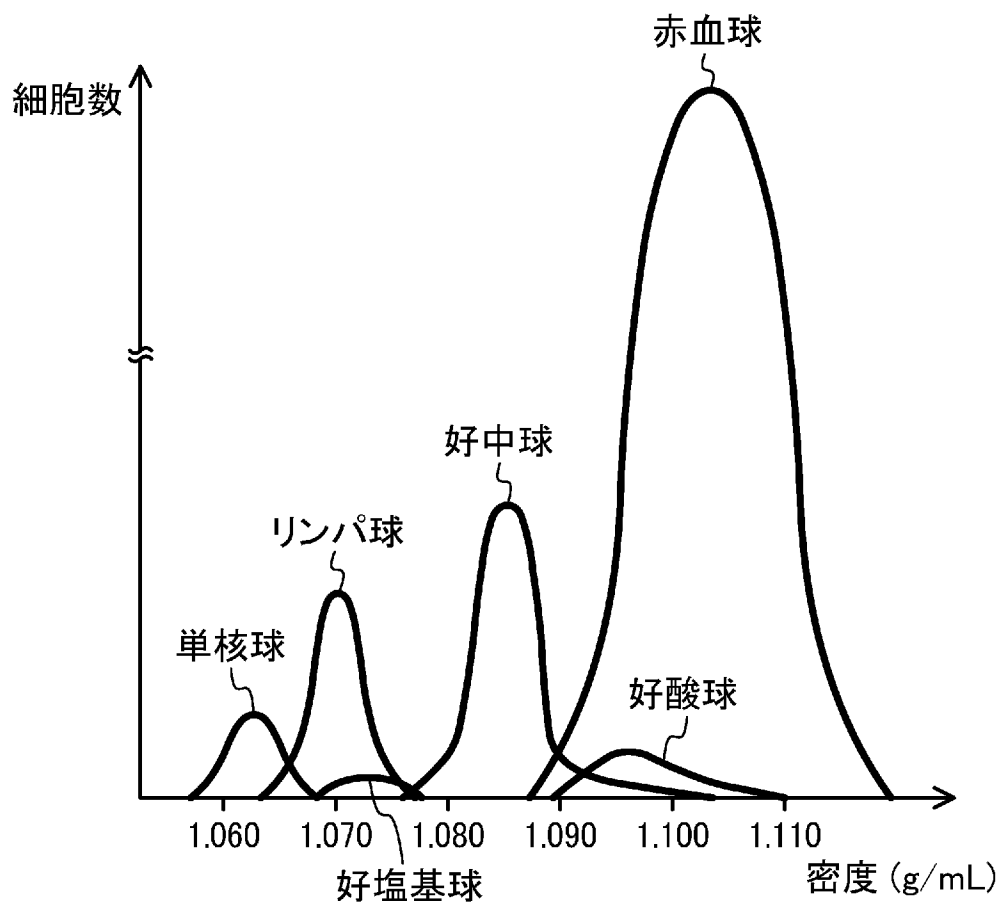
[請求項9] ウシ全血を抗凝固剤で抗凝固処理し、
 抗凝固処理された全血からバフィーコート及びバフィーコートより重い比重分画を取得し、取得した白血球と血小板を常温～40℃の温度で5分以上時間をかけることで相互作用を促し活性化させることにより白血球及び／又は血小板により分泌・放出される液性因子を含み、再凝固剤により再凝固処理することにより得られるウシ血清組成物。

[請求項10] 請求項1乃至8の何れか1項に記載のウシ血清組成物の製造方法で得られたウシ血清組成物を添加剤として使用することにより、増殖性に優れた細胞を培養する方法。

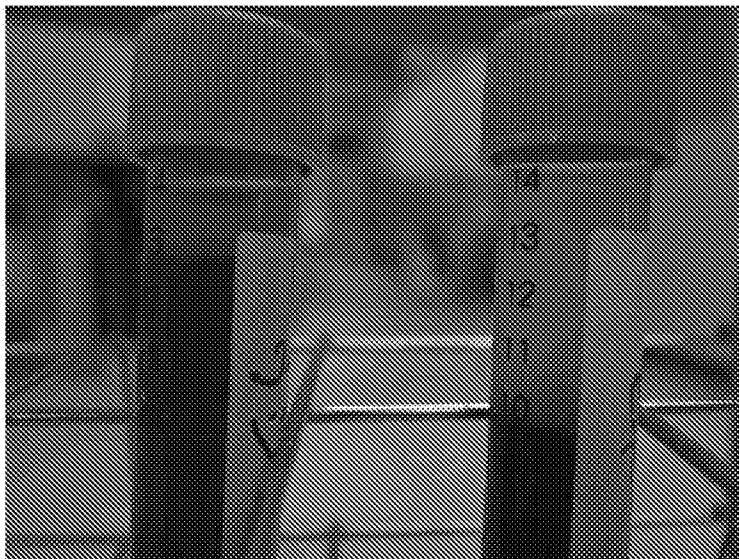
[請求項11] 請求項1乃至8の何れか1項に記載のウシ血清組成物の製造方法で得られたウシ血清組成物を添加剤として使用することにより、組織因子経路インヒビターの発現を誘導し、血液凝固を誘導しにくい細胞を培養する方法。

[請求項12] 前記細胞は、骨髓、脂肪組織、又は羊膜・臍帯を含む胎児付属物を由来とする間葉系幹細胞又は間葉系細胞であることを特徴とする請求項10又は11に記載の細胞を培養する方法。

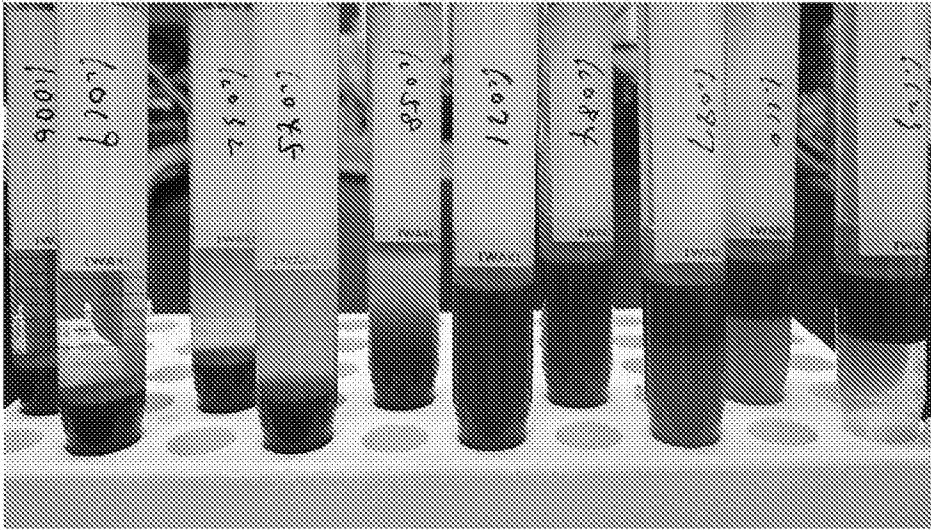
[図1]



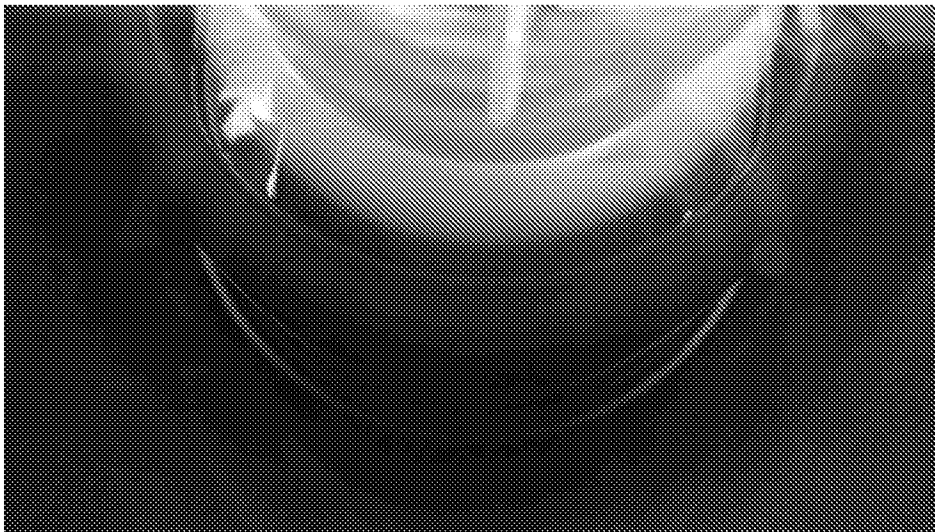
[図2]



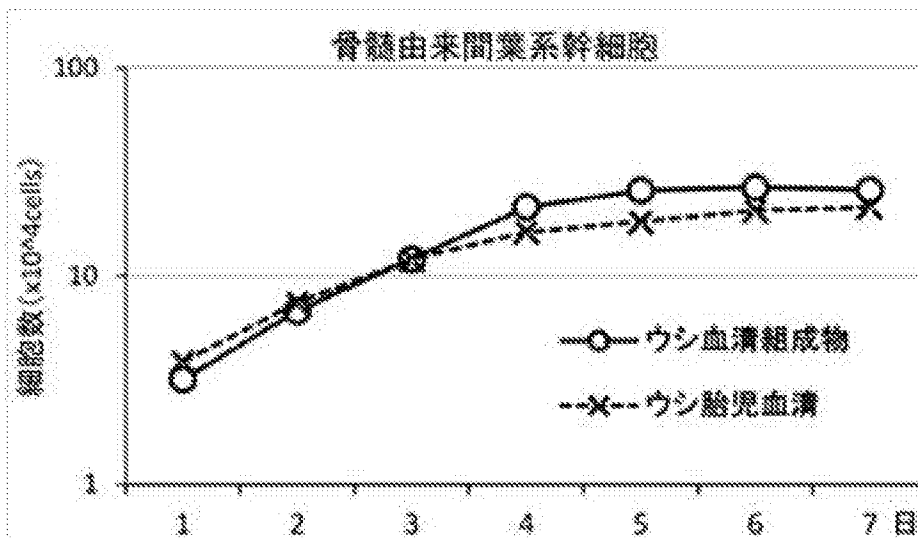
[図3]



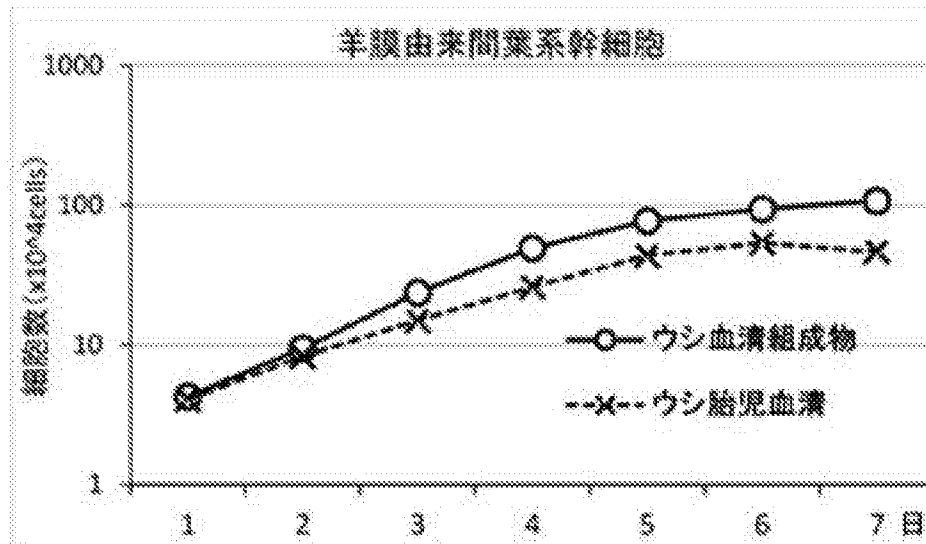
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/083990

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/078(2010.01)i, A61K35/16(2015.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61K35/19(2015.01)i, C12N5/077(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)
C12N5/078, A61K35/16, A61K35/17, A61K35/19, C12N5/077

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),
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-117347 A (JMS Co., Ltd.), 30 June 2014 (30.06.2014), claims 1 to 2; paragraphs [0016] to [0045]; fig. 1 (Family: none)	1-12
Y	JP 2001-505906 A (Hadasit Medical Research Services & Development Co., Ltd.), 08 May 2001 (08.05.2001), pages 13 to 17 & US 2002/0054916 A1 & WO 1998/025634 A1 & EP 973530 A1	1-12

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

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 01 February 2017 (01.02.17)	Date of mailing of the international search report 14 February 2017 (14.02.17)
--	---

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083990

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-506992 A (Cambridge Scientific Pty Ltd.), 19 February 2009 (19.02.2009), claims 1 to 5; paragraph [0089]; example 1 & US 2007/0048387 A1 & WO 2007/025351 A1 & EP 1933853 A1	1-12
Y	JP 2010-531142 A (Circle Biologics, LLC), 24 September 2010 (24.09.2010), paragraphs [0014], [0075] & US 2010/0260815 A1 & WO 2009/002849 A2 & EP 2164541 A2 & CN 101801431 A	1-12
Y	JP 2005-530768 A (Medigenes), 13 October 2005 (13.10.2005), paragraphs [0003] to [0010] & US 2005/0142208 A1 & WO 2003/094937 A1 & EP 1507543 A1 & CN 1668317 A	1-12
Y	JP 2008-246200 A (JMS Co., Ltd.), 16 October 2008 (16.10.2008), paragraphs [0020], [0057] & US 2010/0120150 A1 & WO 2008/108412 A1 & EP 2133086 A1 & CN 101636171 A & KR 10-2009-0118097 A	1-12
Y	JP 2011-160799 A (JMS Co., Ltd.), 25 August 2011 (25.08.2011), claims 1 to 17; paragraphs [0014] to [0034] & WO 2011/087103 A1	1-12
Y	SOUSA A.P., "VALORIZATION OF OUTDATED BLOOD PRODUCTS FOR REGENERATIVE MEDICINE", Vox Sanguinis, 2011, Vol.101, Suppl.1, p.49, Abstract No.4A-S14-05, entire document	1-12
Y	LOH Y.S., "LYSATES PRODUCED FROM IRRADIATED AND EXPIRED BUFFY COAT-DERIVED PLATELETS STORED IN ADDITIVE SOLUTION SUPPORT CELL PROLIFERATION", Vox Sanguinis, 2015.06, Vol.109, Suppl.1, p.198, Abstract No.P-328, entire document	1-12
A	WO 2014/126931 A1 (VICTOR, Steven), 21 August 2014 (21.08.2014), (Family: none)	1-12
A	JP 2013-132241 A (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), 08 July 2013 (08.07.2013), (Family: none)	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083990

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-132240 A (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), 08 July 2013 (08.07.2013), (Family: none)	1-12
A	JP 11-502435 A (Quantic Biomedical Partners), 02 March 1999 (02.03.1999), & US 5733545 A & WO 1996/027397 A1 & EP 813427 A1	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/078(2010.01)i, A61K35/16(2015.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61K35/19(2015.01)i, C12N5/077(2010.01)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. C12N5/078, A61K35/16, A61K35/17, A61K35/19, C12N5/077

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), CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

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
Y	JP 2014-117347 A (株式会社ジェイ・エム・エス) 2014.06.30, 請求項1~2、 [0016] ~ [0045]、図1 (ファミリーなし)	1-12
Y	JP 2001-505906 A (ハダジット メディカル リサーチ サービスズ アンド デ ィベラップメント カンパニー リミテッド) 2001.05.08, 13~17頁 & US 2002/0054916 A1 & WO 1998/025634 A1 & EP 973530 A1	1-12

☑ 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

01.02.2017

国際調査報告の発送日

14.02.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 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)

鳥居 敬司

4B

4045

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
Y	JP 2009-506992 A (ケンブリッジ・サイエンティフィック・ピーティール・リミテッド) 2009.02.19, 請求項1~5、[0089]、実施例1 & US 2007/0048387 A1 & WO 2007/025351 A1 & EP 1933853 A1	1-12
Y	JP 2010-531142 A (サークル バイオロジクス、エルエルシー) 2010.09.24, [0014]、[0075] & US 2010/0260815 A1 & WO 2009/002849 A2 & EP 2164541 A2 & CN 101801431 A	1-12
Y	JP 2005-530768 A (メディジーンズ) 2005.10.13, [0003] ~ [0010] & US 2005/0142208 A1 & WO 2003/094937 A1 & EP 1507543 A1 & CN 1668317 A	1-12
Y	JP 2008-246200 A (株式会社ジェイ・エム・エス) 2008.10.16, [0020]、[0057] & US 2010/0120150 A1 & WO 2008/108412 A1 & EP 2133086 A1 & CN 101636171 A & KR 10-2009-0118097 A	1-12
Y	JP 2011-160799 A (株式会社ジェイ・エム・エス) 2011.08.25, 請求項1~17、[0014] ~ [0034] & WO 2011/087103 A1	1-12
Y	SOUSA A. P., "VALORIZATION OF OUTDATED BLOOD PRODUCTS FOR REGENERATIVE MEDICINE", Vox Sanguinis, 2011, Vol.101, Suppl.1, p.49, Abstract No.4A-S14-05, entire document	1-12
Y	LOH Y. S., "LYSATES PRODUCED FROM IRRADIATED AND EXPIRED BUFFY COAT-DERIVED PLATELETS STORED IN ADDITIVE SOLUTION SUPPORT CELL PROLIFERATION", Vox Sanguinis, 2015.06, Vol.109, Suppl.1, p.198, Abstract No.P-328, entire document	1-12
A	WO 2014/126931 A1 (VICTOR, Steven) 2014.08.21, (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2013-132241 A (株式会社大塚製薬工場) 2013.07.08, (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2013-132240 A (株式会社大塚製薬工場) 2013.07.08, (ファミリーなし)	1-12
A	JP 11-502435 A (クウォンティック バイオメディカル パートナーズ) 1999.03.02, & US 5733545 A & WO 1996/027397 A1 & EP 813427 A1	1-12