



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118284808 A

(43) 申请公布日 2024.07.02

(21) 申请号 202280077405.8

(22) 申请日 2022.10.17

(30) 优先权数据

2022-049652 2022.03.25 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.05.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2022/038554 2022.10.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/181468 JA 2023.09.28

(71) 申请人 积水医疗株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 内山嵩也 神田真理香 驹井邦哉

井上智雅

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

专利代理师 张涛

(51) Int.Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 5/09 (2006.01)

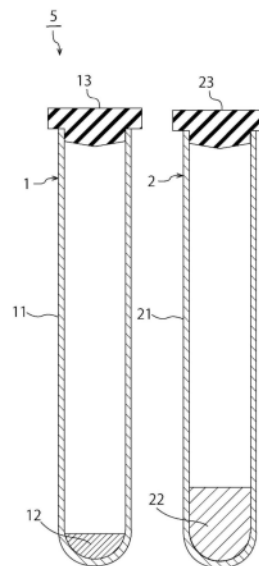
权利要求书3页 说明书28页 附图2页

(54) 发明名称

循环肿瘤细胞分离试剂盒、循环肿瘤细胞分离容器及循环肿瘤细胞的分离方法

(57) 摘要

本发明提供一种循环肿瘤细胞分离试剂盒，其不仅在使用采血后没有经过太长时间的试样的情况下，并且在使用采血后保管了数天的试样的情况下，也能够提高循环肿瘤细胞的回收率。本发明的循环肿瘤细胞分离试剂盒是用于分离血液中的循环肿瘤细胞的试剂盒，其具备：血液采集容器，其容纳有水溶液，并且待采集给定量的血液；和细胞分离容器，其容纳有25℃下的比重为1.065~1.080的细胞分离材料，所述水溶液包含抗凝剂，并且包含分子量为75~500的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物，将与待采集至所述血液采集容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至血液采集容器内，得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液时，所述混合液的渗透压为270~350mOsm/L。



1. 一种循环肿瘤细胞分离试剂盒,其为用于分离血液中的循环肿瘤细胞的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,

所述循环肿瘤细胞分离试剂盒具备:

血液采集容器,其容纳有水溶液,并且待采集给定量的血液;和

细胞分离容器,其容纳有25°C下的比重为1.065以上且1.080以下的细胞分离材料,

所述水溶液包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物,

在将与待采集至所述血液采集容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至血液采集容器内,得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液时,所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下。

2. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述水溶液包含所述低分子化合物。

3. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述水溶液包含所述高分子化合物。

4. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述水溶液包含所述低分子化合物和所述高分子化合物。

5. 根据权利要求1~4中任一项所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述低分子化合物包含海藻糖或硫酸铵。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述高分子化合物包含具有细胞膜保护作用的化合物。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述高分子化合物为葡聚糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述细胞分离材料为细胞分离用组合物。

9. 根据权利要求8所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其中,
所述细胞分离用组合物包含无机微粉和在25°C下具有流动性的有机成分,
所述有机成分包含树脂,
所述无机微粉包含微粉二氧化硅。

10. 根据权利要求1~9中任一项所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒,其还具备:
血细胞凝集剂。

11. 一种循环肿瘤细胞的分离方法,其为使用权利要求1~10中任一项所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒分离血液中的循环肿瘤细胞的方法,其中,

所述分离方法具备:

血液采集工序,其向容纳有所述水溶液的所述血液采集容器采集血液,得到混合有所述血液和所述水溶液的试样;

添加工序,其向容纳有所述细胞分离材料的所述细胞分离容器添加所述试样;

离心分离工序,其对添加有所述试样的所述细胞分离容器进行离心分离;以及

回收工序,其回收分离在血浆中的循环肿瘤细胞。

12. 根据权利要求11所述的循环肿瘤细胞的分离方法,其中,

在所述离心分离工序中,对容纳有混合有血细胞凝集剂和所述试样的液体的细胞分离容器进行离心分离。

13.一种循环肿瘤细胞分离容器,其为用于分离血液中的循环肿瘤细胞的循环肿瘤细胞分离容器,并且为待采集给定量的血液的循环肿瘤细胞分离容器,其中,

所述循环肿瘤细胞分离容器具备:

容器主体、

容纳于所述容器主体内的水溶液、以及

容纳于所述容器主体内的25°C下的比重为1.065以上且1.080以下的细胞分离材料,

所述水溶液包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物,

在将与待采集至所述循环肿瘤细胞分离容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至循环肿瘤细胞分离容器内,得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液时,所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下。

14.根据权利要求13所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述水溶液包含所述低分子化合物。

15.根据权利要求13所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述水溶液包含所述高分子化合物。

16.根据权利要求13所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述水溶液包含所述低分子化合物和所述高分子化合物。

17.根据权利要求13~16中任一项所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述低分子化合物包含海藻糖或硫酸铵。

18.根据权利要求13~17中任一项所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述高分子化合物包含具有细胞膜保护作用的化合物。

19.根据权利要求13~18中任一项所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述高分子化合物为葡聚糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。

20.根据权利要求13~19中任一项所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述细胞分离材料为细胞分离用组合物。

21.根据权利要求20所述的循环肿瘤细胞分离容器,其中,
所述细胞分离用组合物包含无机微粉和在25°C下具有流动性的有机成分,
所述有机成分包含树脂,
所述无机微粉包含微粉二氧化硅。

22.一种循环肿瘤细胞分离试剂盒,其具备:

权利要求13~21中任一项所述的循环肿瘤细胞分离容器、以及
血细胞凝集剂。

23.一种循环肿瘤细胞的分离方法,其为使用权利要求13~21中任一项所述的循环肿瘤细胞分离容器分离血液中的循环肿瘤细胞的方法,其中,

所述分离方法具备:

血液采集工序,其向所述循环肿瘤细胞分离容器采集血液,得到混合有所述血液和所述水溶液的试样;

离心分离工序,其对容纳有所述试样的所述循环肿瘤细胞分离容器进行离心分离;以及

回收工序,其回收分离在血浆中的循环肿瘤细胞。

24.根据权利要求23所述的循环肿瘤细胞的分离方法,其中,

在所述离心分离工序中,对容纳有混合有血细胞凝集剂和所述试样的液体的循环肿瘤细胞分离容器进行离心分离。

循环肿瘤细胞分离试剂盒、循环肿瘤细胞分离容器及循环肿瘤细胞的分离方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于分离血液中的循环肿瘤细胞的循环肿瘤细胞分离试剂盒及使用了所述循环肿瘤细胞分离试剂盒的循环肿瘤细胞的分离方法。此外,本发明涉及用于分离血液中的循环肿瘤细胞的循环肿瘤细胞分离容器及使用了所述循环肿瘤细胞分离容器的循环肿瘤细胞的分离方法。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells,以下有时记载为“CTC”)被认为是从肿瘤组织游离并浸润到血液中的癌细胞,与癌转移的形成过程密切相关。例如,报道了CTC可能成为肺癌的预后预测因子和进展度的标记、以及乳腺癌的复发风险的分层标记。

[0003] 然而,CTC在患者的每1mL血液中仅存在几个~几十个左右,因此不容易分离血液中的CTC。

[0004] 为了分离血液中的CTC,如下述非专利文献1所示,尝试了各种方法。

[0005] 此外,下述专利文献1中公开了一种组合物,其包含能够释放醛的成分、抗凝剂、以及环糊精或其官能化衍生物。专利文献1中记载了有时能够分离用所述组合物进行了稳定化的CTC。例如,专利文献1中记载了在分离血浆后,有时能够从血沉棕黄层分离CTC和白细胞。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:日本特表2021-500585号公报

[0009] 非专利文献

[0010] 非专利文献1:Zeina Habli,Walid AlChamaa,Raya Saab,Humam Kada ra and Massoud L.Khraiche.Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility:Challenges and Opportunities.Cancers 2020,12,1930;doi:10.3390/cancers12071930

发明内容

[0011] 发明所要解决的技术问题

[0012] 作为分离血液中的CTC的方法的一个实例,如非专利文献1和专利文献1中记载的那样,已知有使用细胞的比重差的离心分离法(密度梯度离心分离法)。离心分离法具有低成本、简便的优点。

[0013] 然而,在临床现场,在从患者采血的试样被供于检查之前,有时经过一定的时间。例如,在将试样输送到检查设施、或者在检查设施中存在大量待检查的试样的情况下,有时从采血到试样被供于检查为止,经过几天左右的时间。

[0014] 在以往的离心分离法中,即使在使用从采血起未经过太长时间的试样来分离CTC

的情况下,能够在某种程度上提高CTC的回收率,但是在使用采血后保管了数天的试样来分离CTC的情况下,CTC的回收率也容易降低。

[0015] 本发明的目的在于提供一种循环肿瘤细胞分离试剂盒及循环肿瘤细胞分离容器,其不仅在使用采血后未经过太长时间的试样的情况下,并且在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够提高循环肿瘤细胞的回收率。此外,本发明的目的还在于提供了使用了所述循环肿瘤细胞分离试剂盒的循环肿瘤细胞的分离方法、以及使用了所述循环肿瘤细胞分离容器的循环肿瘤细胞的分离方法。

[0016] 解决技术问题的手段

[0017] 在本发明的广泛方面中,提供一种循环肿瘤细胞分离试剂盒(以下,有时记载为“CTC分离试剂盒”),其为用于分离血液中的循环肿瘤细胞的循环肿瘤细胞分离试剂盒,所述循环肿瘤细胞分离试剂盒具备:血液采集容器,其容纳有水溶液,并且待采集给定量的血液;和细胞分离容器,其容纳有25°C下的比重为1.065以上且1.080以下的细胞分离材料,所述水溶液包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物,在将与待采集至所述血液采集容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至血液采集容器内,得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液时,所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下。

[0018] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述水溶液包含所述低分子化合物。

[0019] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述水溶液包含所述高分子化合物。

[0020] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述水溶液包含所述低分子化合物和所述高分子化合物。

[0021] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述低分子化合物包含海藻糖或硫酸铵。

[0022] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述高分子化合物包含具有细胞膜保护作用的化合物。

[0023] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述高分子化合物为葡聚糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。

[0024] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述细胞分离材料为细胞分离用组合物。

[0025] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述细胞分离用组合物包含无机微粉和在25°C下具有流动性的有机成分,所述有机成分包含树脂,所述无机微粉包含微粉二氧化硅。

[0026] 在本发明的CTC分离试剂盒的某特定方面,所述CTC分离试剂盒还具备血细胞凝集剂。

[0027] 在本发明的广泛方面中,提供一种循环肿瘤细胞的分离方法(以下,有时记载为“CTC的分离方法”),其是使用了所述的循环肿瘤细胞分离试剂盒来分离血液中的循环肿瘤细胞的方法,所述分离方法具备:血液采集工序,其向容纳有所述水溶液的所述血液采集容器采集血液,得到混合有所述血液和所述水溶液的试样;添加工序,其向容纳有所述细胞分离材料的所述细胞分离容器添加所述试样;离心分离工序,其对添加有所述试样的所述细胞分离容器进行离心分离;以及回收工序,其回收分离在血浆中的循环肿瘤细胞。

[0028] 在本发明的CTC的分离方法的某特定方面,在所述离心分离工序中,对容纳有混合有血细胞凝集剂和所述试样的液体的细胞分离容器进行离心分离。

[0029] 在本发明的广泛方面中,提供一种循环肿瘤细胞分离容器(以下,有时记载为“CTC分离容器”),其为用于分离血液中的循环肿瘤细胞的循环肿瘤细胞分离容器,并且为待采集给定量的血液的循环肿瘤细胞分离容器,所述循环肿瘤细胞分离容器具备:容器主体;水溶液,其容纳于所述容器主体内;以及细胞分离材料,其容纳于所述容器主体内,在25°C下的比重为1.065以上且1.080以下,所述水溶液包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物,在将与待采集至所述循环肿瘤细胞分离容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至循环肿瘤细胞分离容器内,得到混合有所述生理盐水和所述水溶液的混合液时,所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下。

[0030] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述水溶液包含所述低分子化合物。

[0031] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述水溶液包含所述高分子化合物。

[0032] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述水溶液包含所述低分子化合物和所述高分子化合物。

[0033] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述低分子化合物包含海藻糖或硫酸铵。

[0034] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述高分子化合物包含具有细胞膜保护作用的化合物。

[0035] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述高分子化合物为葡聚糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。

[0036] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述细胞分离材料为细胞分离用组合物。

[0037] 在本发明的CTC分离容器的某特定方面,所述细胞分离用组合物包含无机微粉和在25°C下具有流动性的有机成分,所述有机成分包含树脂,所述无机微粉包含微粉二氧化硅。

[0038] 在本发明的广泛方面中,提供一种循环肿瘤细胞分离试剂盒,其具备所述循环肿瘤细胞分离容器、和血细胞凝集剂。

[0039] 在本发明的广泛方面中,提供一种循环肿瘤细胞的分离方法(以下,有时记载为“CTC的分离方法”),其是使用所述的循环肿瘤细胞分离容器分离血液中的循环肿瘤细胞的方法,所述分离方法具备:血液采集工序,其向所述循环肿瘤细胞分离容器采集血液,得到混合有所述血液和所述水溶液的试样;离心分离工序,其对容纳有所述试样的所述循环肿瘤细胞分离容器进行离心分离;以及回收工序,其回收分离在血浆中的循环肿瘤细胞。

[0040] 在本发明的CTC的分离方法的某特定方面,在所述离心分离工序中,对容纳有混合有血细胞凝集剂和所述试样的液体的循环肿瘤细胞分离容器进行离心分离。

[0041] 发明效果

[0042] 根据本发明,能够提供一种循环肿瘤细胞分离试剂盒及循环肿瘤细胞分离容器,其不仅在使用采血后未经过太长时间的试样的情况下,并且在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够提高循环肿瘤细胞的回收率。

附图说明

[0043] 图1是示意性地表示本发明的一个实施方式的循环肿瘤细胞分离试剂盒的正面截面图。

[0044] 图2是示意性地表示本发明的一个实施方式的循环肿瘤细胞分离容器的正面截面图。

具体实施方式

[0045] 以下,对本发明进行详细说明。

[0046] 本发明的循环肿瘤细胞分离试剂盒(以下,有时记载为“CTC分离试剂盒”)用于分离血液中的循环肿瘤细胞。本发明的CTC分离试剂盒具备:血液采集容器,其容纳有水溶液,并且待采集给定量的血液;以及细胞分离容器,其容纳有25°C下的比重为1.065以上且1.080以下的细胞分离材料。本发明的CTC分离试剂盒中,所述水溶液包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物。在本发明的CTC分离试剂盒中,在将与待采集至所述血液采集容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至血液采集容器内,得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液时,所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下。

[0047] 本发明的循环肿瘤细胞分离容器(以下,有时记载为“CTC分离容器”)用于分离血液中的循环肿瘤细胞。本发明的CTC分离容器是待采集给定量的血液的循环肿瘤细胞分离容器。本发明的CTC分离容器具备容器主体、容纳于所述容器主体内的水溶液、以及容纳于所述容器主体内的25°C下的比重为1.065以上且1.080以下的细胞分离材料。本发明的CTC分离容器中,所述水溶液包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物。在本发明的CTC分离容器中,在将与待采集至所述CTC分离容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至CTC分离容器内,得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液时,所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下。

[0048] 在本发明的CTC分离试剂盒和CTC分离容器中,由于具备所述的构成,因此不仅在使用采血后未经过太长时间的试样的情况下,在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够提高循环肿瘤细胞(CTC)的回收率。

[0049] 在本发明的CTC分离试剂盒中,当将血液采集至血液采集容器时,得到混合有所述血液与所述水溶液的混合液(试样)。混合液的渗透压适度小,因此CTC容易稳定化。此外,通过所述水溶液中所含的所述低分子化合物或所述高分子化合物的作用,CTC容易稳定化。因此,在本发明的CTC分离试剂盒中,不仅在使用采血后未经过太长时间的试样的情况下,并且在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够提高CTC的回收率。需要说明的是,在本发明的CTC分离容器中,通过同样的作用,不仅在使用采血后未经过太长时间的试样的情况下,并且在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够提高CTC的回收率。

[0050] 此外,在通过离心分离来分离血液中的CTC的以往的方法中,在从采集血液到进行离心分离操作为止的期间对试样进行了保管的情况下,在保管中发生细胞死亡以及细胞形态的变化。因此,随着保管时间变长,离心分离后,混入由分离材料形成的隔壁上的红细胞数和白细胞数增加。在使用荧光显微镜的观察或使用NGS的分析中,优选癌细胞的纯度高,

因此,当混入的血细胞数增加时,CTC的检测灵敏度降低。此外,如所述专利文献1那样,在离心分离后从血沉棕黄层分离CTC的情况下,白细胞等不需要的细胞也与CTC一起被回收,因此需要使用细胞分选仪等除去不需要的细胞,操作变得复杂。

[0051] 与之相对,在本发明的CTC分离试剂盒和CTC分离容器中,由于具备所述的构成,因此能够抑制保管中的细胞死亡和细胞形态的变化,此外,也能够抑制白细胞的混入。因此,在本发明的CTC分离试剂盒和CTC分离容器中,能够简便且稳定地以高回收率分离CTC。

[0052] 参照附图说明本发明的具体实施方式。

[0053] 图1是示意性地示出本发明的一个实施方式的循环肿瘤细胞分离试剂盒的正面截面图。

[0054] 图1所示的CTC分离试剂盒5具备血液采集容器1和细胞分离容器2。

[0055] 血液采集容器1具备血液采集容器主体11、水溶液12以及栓体13。血液采集容器主体11在一端具有开口,在另一端具有封闭的底部。水溶液12容纳于血液采集容器主体11内。水溶液12包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物。栓体13插入于血液采集容器主体11的开口。

[0056] 细胞分离容器2具备细胞分离容器主体21、细胞分离材料22以及栓体23。细胞分离容器主体21在一端具有开口,在另一端具有封闭的底部。细胞分离材料22容纳于细胞分离容器主体21内。细胞分离材料22在25°C下的比重为1.065以上且1.080以下。栓体23插入于细胞分离容器主体21的开口。

[0057] 图2是示意性地示出本发明的一个实施方式的循环肿瘤细胞分离容器的正面截面图。

[0058] 图2所示的CTC分离容器6具备容器主体61、水溶液62、细胞分离材料63和栓体64。容器主体61在一端具有开口,在另一端具有封闭的底部。水溶液62和细胞分离材料63容纳于容器主体61内。水溶液62包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物。细胞分离材料63在25°C下的比重为1.065以上且1.080以下。栓体64插入容器主体61的开口。

[0059] 接着,对本发明中使用的所述水溶液和所述细胞分离材料进行说明。

[0060] (水溶液)

[0061] 所述水溶液包含抗凝剂,并且包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物(以下,有时记载为“低分子化合物(A)”)或数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物(以下,有时记载为“高分子化合物(B)”)。因此,所述水溶液包含抗凝剂,并且包含低分子化合物(A)或高分子化合物(B)。所述水溶液优选包含抗凝剂和水。所述水溶液中所含的溶质包含抗凝剂。所述水溶液中所含的溶质包含低分子化合物(A)或高分子化合物(B)。从更有效地发挥本发明的效果的观点出发,所述水溶液优选包含低分子化合物(A)和高分子化合物(B)。

[0062] <抗凝剂>

[0063] 所述水溶液包含抗凝剂。作为所述抗凝剂,可以使用以往公知的抗凝剂。所述抗凝剂可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0064] 抗凝剂的实例包含肝素、肝素的金属盐、乙二胺四乙酸(EDTA)、EDTA的金属盐和柠檬酸。

[0065] 从良好地发挥抗凝性能的观点出发,所述抗凝剂优选为EDTA、EDTA的金属盐、肝素、肝素的金属盐或柠檬酸钠。

[0066] 所述水溶液中的所述抗凝剂的浓度优选为2mM以上,更优选为5mM以上,进一步优选为10mM以上,优选为2000mM以下,更优选为1000mM以下,更进一步优选为500mM以下,进一步优选为250mM以下,更进一步优选为100mM以下,特别优选为50mM以下。若所述抗凝剂的浓度为所述下限以上及所述上限以下,则能够良好地发挥抗凝性能。

[0067] <分子量为75以上且500以下的低分子化合物>

[0068] 所述水溶液优选包含分子量为75以上且500以下的低分子化合物(低分子化合物(A))。低分子化合物(A)是与抗凝剂不同的化合物。通过使用低分子化合物(A),容易调节渗透压。低分子化合物(A)可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0069] 低分子化合物(A)的分子量可以为90以上,可以为200以上,可以为350以下,可以为250以下。

[0070] 关于低分子化合物(A)的分子量,在能够确定该低分子化合物(A)的结构式的情况下,是指能够由该结构式算出的分子量,在无法确定该低分子化合物(A)的结构式的情况下,表示通过凝胶渗透色谱(GPC)测定的以聚苯乙烯换算的数均分子量。

[0071] 低分子化合物(A)优选包含具有细胞膜保护作用的化合物。在该情况下,能够进一步提高CTC的稳定性,因此即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。

[0072] 作为低分子化合物(A),可举出无机盐、糖类、糖醇、硫酸铵、腺嘌呤和丙二醇等。

[0073] 作为所述无机盐,可举出磷酸氢钠等钠盐、及碳酸氢钾等钾盐等。

[0074] 作为所述糖类,可举出葡萄糖、海藻糖、二羟基丙酮、果糖、半乳糖、蔗糖、麦芽糖和乳果糖等。需要说明的是,海藻糖是具有细胞膜保护作用的化合物。

[0075] 作为所述糖醇,可举出肌醇、D-甘露醇和D-山梨糖醇。

[0076] 低分子化合物(A)优选包含海藻糖、硫酸铵、葡萄糖、腺嘌呤或肌醇,更优选包含海藻糖或硫酸铵,进一步优选包含海藻糖和硫酸铵。低分子化合物(A)优选包含海藻糖,也优选包含硫酸铵。在该情况下,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0077] 所述水溶液100重量%中,低分子化合物(A)的含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.1重量%以上,进一步优选为1重量%以上,优选为10重量%以下,更优选为9.5重量%以下,进一步优选为7重量%以下,特别优选为5重量%以下。低分子化合物(A)的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0078] 所述水溶液包含海藻糖的情况下,所述水溶液100重量%中,海藻糖的含量优选为0.5重量%以上,更优选为1重量%以上,进一步优选为2重量%以上,优选为9重量%以下,更优选为8重量%以下,进一步优选为6重量%以下。所述海藻糖的含量为所述下限以上及所述上限以下时,能够使CTC更稳定化,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0079] 在所述水溶液包含硫酸铵的情况下,在所述水溶液100重量%中,硫酸铵的含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.1重量%以上,进一步优选为1重量%以上,优选为9重量%以下,更优选为8重量%以下,进一步优选为6重量%以下。所述硫酸铵的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够使CTC更稳定化,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0080] 在所述水溶液包含葡萄糖的情况下,在所述水溶液100重量%中,葡萄糖的含量优

选为0.1重量%以上,更优选为0.3重量%以上,优选为10重量%以下,更优选为5重量%以下。所述葡萄糖的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。特别是,若所述葡萄糖的含量为所述下限以上,则向CTC供给营养源,因此能够提高CTC的生存率,其结果,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0081] 在所述水溶液包含腺嘌呤的情况下,所述水溶液100重量%中,腺嘌呤的含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.05重量%以上,优选为9重量%以下,更优选为5重量%以下。所述腺嘌呤的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。特别是,若所述腺嘌呤的含量为所述下限以上,则向CTC供给营养源,因此能够提高CTC的生存率,其结果,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0082] 在所述水溶液包含肌醇的情况下,在所述水溶液100重量%中,肌醇的含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.05重量%以上,并且优选为9重量%以下,更优选为5重量%以下。当肌醇的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。特别是,当所述肌醇的含量在所述下限以上时,由于向CTC供给营养源,因此能够提高CTC的生存率,其结果是,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0083] 所述水溶液100重量%中,低分子化合物(A)与水的合计含量优选为75重量%以上,更优选为80重量%以上,进一步优选为85重量%以上,优选为99.5重量%以下。所述合计含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0084] <数均分子量为2000以上且小于200000的高分子化合物>

[0085] 所述水溶液优选包含数均分子量为2000以上且小于200000(2千以上且小于20万)的高分子化合物(高分子化合物(B))。高分子化合物(B)是与抗凝剂不同的化合物。认为通过使用高分子化合物(B)而发挥本发明的效果的理由在于,高分子化合物(B)有效地保护CTC的细胞膜,由此使CTC稳定化,但并不限于此。高分子化合物(B)可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0086] 高分子化合物(B)的数均分子量优选为3000以上,更优选为10000以上,进一步优选为20000以上,优选为150000以下,更优选为100000以下。若高分子化合物(B)的数均分子量为所述下限以上及所述上限以下,则能够使CTC更稳定化,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。

[0087] 高分子化合物(B)的数均分子量表示通过凝胶渗透色谱(GPC)测定的以聚苯乙烯换算的数均分子量。

[0088] 高分子化合物(B)优选为不具有红细胞凝集作用的化合物。在该情况下,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0089] 高分子化合物(B)优选包含具有细胞膜保护作用的化合物。在该情况下,能够进一步提高CTC的稳定性,因此即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。

[0090] 高分子化合物(B)优选包含数均分子量为10000以上且小于200000的高分子化合物(以下,有时记载为高分子化合物(B1))。高分子化合物(B)更优选包含高分子化合物(B1)和数均分子量为2000以上且小于10000的高分子化合物(以下,有时记载为高分子化合物(B2))。在该情况下,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0091] 高分子化合物(B1)的数均分子量为10000以上且小于200000,优选为20000以上,

更优选为30000以上,优选为150000以下,更优选为100000以下。在该情况下,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0092] 高分子化合物(B2)的数均分子量为2000以上且小于10000,优选为3000以上,优选为8000以下,更优选为5000以下。在该情况下,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0093] 作为高分子化合物(B),可举出葡聚糖、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇、甲基纤维素、羟乙基纤维素及玉米淀粉等。

[0094] 高分子化合物(B)优选为葡聚糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。高分子化合物(B1)优选为葡聚糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。高分子化合物(B2)优选为葡聚糖、聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。在该情况下,能够使CTC更稳定化,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。

[0095] 所述水溶液100重量%中,高分子化合物(B)的各含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.1重量%以上,进一步优选为1重量%以上,优选为15重量%以下,更优选为10重量%以下,进一步优选为8重量%以下。高分子化合物(B)的各含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够使CTC更稳定化,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。需要说明的是,所述“高分子化合物(B)的各含量”在所述水溶液包含1种高分子化合物(B)的情况下是指该高分子化合物(B)的含量,在所述水溶液包含2种以上的高分子化合物(B)的情况下是指高分子化合物(B)各自的含量。

[0096] 所述水溶液100重量%中,高分子化合物(B)的含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.1重量%以上,进一步优选为1重量%以上,优选为20重量%以下,更优选为15重量%以下,进一步优选为10重量%以下。高分子化合物(B)的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够使CTC更稳定化,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。

[0097] 所述水溶液100重量%中,高分子化合物(B)与水的合计含量优选为75重量%以上,更优选为80重量%以上,进一步优选为85重量%以上,特别优选为90重量%以上,优选为99.5重量%以下。所述合计含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0098] 所述水溶液100重量%中,低分子化合物(A)、高分子化合物(B)和水的合计含量优选为80重量%以上,更优选为90重量%以上,进一步优选为95重量%以上,特别优选为98重量%以上,优选为99.5重量%以下。所述合计含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0099] <其他成分>

[0100] 只要不损害本发明的效果,所述水溶液也可以包含所述成分(抗凝剂、低分子化合物(A)和高分子化合物(B))以外的其他成分。

[0101] (细胞分离材料)

[0102] 作为所述细胞分离材料,可以使用以往公知的细胞分离材料。细胞分离材料具有在离心分离后能够在包含CTC的血浆与红细胞等血细胞之间形成隔壁的比重。作为所述细胞分离材料,可举出细胞分离用组合物和细胞分离用夹具等。从细胞分离材料的制备容易的方面出发,所述细胞分离材料优选为所述细胞分离用组合物。

[0103] 从离心分离后在CTC与血细胞之间形成隔壁,良好地分离CTC和血细胞的观点出

发,所述细胞分离材料的25°C下的比重为1.065以上且1.080以下。

[0104] 所述细胞分离材料的25°C下的比重优选为1.067以上,更优选为1.070以上,优选为1.079以下,更优选为1.078以下,进一步优选为1.077以下,特别优选为1.075以下,最优选为1.073以下。所述细胞分离材料的25°C下的比重为所述下限以上和所述上限以下时,能够更良好地分离CTC和血细胞,此外,能够更有效地抑制血细胞混入血浆中。

[0105] <细胞分离用组合物>

[0106] 所述细胞分离用组合物是在离心分离时在血浆层与血细胞层之间移动而形成隔壁的组合物。所述细胞分离用组合物优选具有触变性。

[0107] 所述细胞分离用组合物优选包含无机微粉和在25°C下具有流动性的有机成分。所述在25°C下具有流动性的有机成分和所述无机微粉可以分别仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0108] 在25°C下具有流动性的有机成分:

[0109] 所述“在25°C下具有流动性”是指25°C下的粘度为500Pa·s以下。

[0110] 所述有机成分的25°C下的粘度优选为10Pa·s以上,更优选为30Pa·s以上,优选为350Pa·s以下,更优选为200Pa·s以下。所述粘度为所述下限以上和所述上限以下时,细胞分离用组合物的流动性提高,能够提高通过离心分离操作形成的隔壁的强度。

[0111] 所述有机成分的25°C下的粘度使用E型粘度计(例如东机产业公司制“TV E-35”),在25°C及剪切速度1.0秒⁻¹的条件下测定。

[0112] 作为所述有机成分,可举出树脂、及树脂与增塑剂等有机化合物的混合物等。因此,所述有机成分优选包含所述树脂,更优选包含所述树脂和所述有机化合物。所述有机成分为所述树脂与所述有机化合物的混合物时,作为该混合物(所述有机成分)具有流动性即可,该树脂或该有机化合物也可以不具有流动性。在所述有机成分为所述树脂与所述有机化合物的混合物的情况下,该树脂例如可以为在25°C下为固体的树脂。所述树脂和所述有机化合物可以分别仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0113] 作为所述树脂,可举出石油树脂、环戊二烯类树脂、聚酯树脂、聚氨酯树脂、(甲基)丙烯酸类树脂、聚硅氧烷树脂、 α -烯烃-富马酸酯共聚物、癸二酸与2,3-二甲基-1,3-丙二醇与1,2-丙二醇的共聚物、聚醚聚氨酯类树脂、及聚醚聚酯类树脂等。所述树脂可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0114] 所述树脂优选包含石油树脂、环戊二烯类树脂、聚酯树脂或(甲基)丙烯酸类树脂。

[0115] 作为所述石油树脂的市售品,可举出Eastman Chemical公司制造的“Reg alite S5090”等。

[0116] 作为所述环戊二烯类树脂,可举出环戊二烯类单体的聚合物、环戊二烯类单体与芳香族类单体的共聚物、及二环戊二烯树脂等。所述环戊二烯类树脂可以进行了氢化。所述环戊二烯类单体的聚合物和所述环戊二烯类单体与芳香族类单体的共聚物可以为低聚物。

[0117] 作为所述环戊二烯类单体,可举出环戊二烯、二环戊二烯、及环戊二烯的烷基取代衍生物等。

[0118] 作为所述芳香族类单体,可举出苯乙烯、甲基苯乙烯、茛和甲基茛等。

[0119] 作为所述二环戊二烯树脂的市售品,可举出KOLON公司制“SUKOREZ SU500”和“SUKOREZ SU90”等。

[0120] 作为所述聚酯树脂,可举出聚对苯二甲酸亚烷基酯树脂和聚萘二甲酸亚烷基酯树脂等。作为所述聚对苯二甲酸亚烷基酯树脂,可举出聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚对苯二甲酸丁二醇酯和聚对苯二甲酸-1,4-环己烷二甲醇酯。

[0121] 作为所述聚氨酯树脂,可举出多元醇化合物与异氰酸酯化合物的反应物等。

[0122] 作为所述(甲基)丙烯酸类树脂,可举出通过将至少1种(甲基)丙烯酸酯单体聚合而得到的树脂、以及通过将至少1种(甲基)丙烯酸酯单体与至少1种该(甲基)丙烯酸酯单体以外的单体聚合而得到的树脂。

[0123] 作为所述(甲基)丙烯酸酯单体,可举出(甲基)丙烯酸烷基酯、(甲基)丙烯酸聚亚烷基二醇酯、(甲基)丙烯酸烷氧基烷基酯、(甲基)丙烯酸羟基烷基酯、(甲基)丙烯酸缩水甘油酯、(甲基)丙烯酸二烷基氨基烷基酯、(甲基)丙烯酸苄酯、(甲基)丙烯酸苯氧基烷基酯、(甲基)丙烯酸环己酯、(甲基)丙烯酸异冰片酯、及(甲基)丙烯酸烷氧基甲硅烷基烷基酯等。所述(甲基)丙烯酸酯单体具有烷基时,该烷基的碳原子数优选为1以上,优选为20以下。所述(甲基)丙烯酸烷基酯优选为具有碳原子数为1以上且20以下的烷基的(甲基)丙烯酸烷基酯。所述(甲基)丙烯酸酯单体可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0124] 作为所述有机化合物,可举出苯聚羧酸烷基酯衍生物等。所述有机化合物优选为苯聚羧酸烷基酯衍生物。因此,所述有机成分优选为所述树脂与所述苯聚羧酸烷基酯衍生物的混合物。

[0125] 作为所述苯聚羧酸烷基酯衍生物,可举出邻苯二甲酸酯、偏苯三酸酯和均苯四酸酯等。所述苯聚羧酸烷基酯衍生物可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0126] 作为所述偏苯三酸酯,可举出偏苯三酸三正辛酯、偏苯三酸三异辛酯、及偏苯三酸三异癸酯等。

[0127] 作为所述均苯四酸酯,可举出均苯四酸四异辛酯等。

[0128] 作为所述偏苯三酸酯的市售品,可举出DIC公司制“MONOCIZER W700”和“MONOCIZER W-750”、新日本理化公司制“SANSOCIZER TOTM”和“SAN SOCIZER TITM”等。

[0129] 作为所述均苯四酸酯的市售品,可举出DIC公司制“MONOCIZER W-7010”等。

[0130] 所述苯聚羧酸烷基酯衍生物优选为邻苯二甲酸酯、偏苯三酸酯或均苯四酸酯,更优选为偏苯三酸酯。

[0131] 所述细胞分离用组合物100重量%中,所述有机成分的含量优选为80重量%以上,更优选为85重量%以上,进一步优选为90重量%以上,优选为97重量%以下。

[0132] 无机微粉:

[0133] 作为所述无机微粉,可举出微粉二氧化硅、氧化钛粉末、碳酸钙粉末、氧化锌粉末、氧化铝粉末、玻璃微粉、滑石粉末、高岭土粉末、膨润土粉末、二氧化钛粉末和锆粉末等。

[0134] 从将细胞分离用组合物的比重和触变性这两者均维持在适宜的范围的观点出发,所述无机微粉优选包含微粉二氧化硅。从有效地增大细胞分离用组合物的比重的观点出发,所述无机微粉更优选包含微粉二氧化硅和微粉二氧化硅以外的无机微粉(第二无机微粉)。所述无机微粉、所述微粉二氧化硅和所述第二无机微粉分别可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0135] 作为所述微粉二氧化硅,可举出天然二氧化硅和合成二氧化硅。作为合成二氧化硅,可举出亲水性二氧化硅和疏水性二氧化硅。亲水性二氧化硅例如通过粒子表面的羟基

彼此形成氢键,从而对细胞分离用组合物赋予触变性,并且具有调节比重的作用。另一方面,疏水性二氧化硅与亲水性二氧化硅相比,触变性的赋予效果小。

[0136] 从将细胞分离用组合物的比重和触变性这两者均维持在合适的范围的观点出发,所述微粉二氧化硅优选包含亲水性二氧化硅,更优选包含亲水性二氧化硅和疏水性二氧化硅。

[0137] 所述第二无机微粉优选为比重比微粉二氧化硅大的无机微粉,更优选为氧化锌粉末、氧化钛粉末、氧化铝粉末等比重为2.5以上的无机微粉。

[0138] 所述第二无机微粉的比重优选为2.5以上,更优选为3以上,进一步优选为3.5以上,特别优选为4以上。所述第二无机微粉的比重越大越好。若所述比重为所述下限以上,则能够有效地增大细胞分离用组合物的比重。

[0139] 所述无机微粉、所述微粉二氧化硅和所述第二无机微粉的平均粒径没有特别限定。所述无机微粉、所述微粉二氧化硅和所述第二无机微粉的平均粒径可以为1nm以上,可以为10nm以上,可以为500nm以下,可以为100nm以下。

[0140] 所述无机微粉、所述微粉二氧化硅和所述第二无机微粉的平均粒径是以体积基准测定的平均粒径,是成为50%的中值粒径(D50)的值。所述体积平均粒径(D50)可以通过激光衍射·散射法、图像分析法、库尔特法和离心沉降法等进行测定。所述体积平均粒径(D50)优选通过使用激光衍射·散射法或图像分析法的测定来求出。

[0141] 所述微粉二氧化硅的比表面积没有特别限定。所述微粉二氧化硅的比表面积可以为 $20\text{m}^2/\text{g}$ 以上,可以为 $100\text{m}^2/\text{g}$ 以上,可以为 $500\text{m}^2/\text{g}$ 以下,可以为 $300\text{m}^2/\text{g}$ 以下。

[0142] 所述微粉二氧化硅的比表面积通过BET法测定。

[0143] 所述细胞分离用组合物100重量%中,所述亲水性二氧化硅的含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.10重量%以上,进一步优选为0.30重量%以上,优选为2.50重量%以下,更优选为2.00重量%以下。所述亲水性二氧化硅的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够将细胞分离用组合物的比重和触变性这两者维持在更合适的范围。

[0144] 所述细胞分离用组合物100重量%中,所述微粉二氧化硅的含量优选为0.1重量%以上,更优选为0.5重量%以上,优选为10重量%以下,更优选为7重量%以下。所述微粉二氧化硅的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够将细胞分离用组合物的比重和触变性这两者维持在更合适的范围。

[0145] 所述细胞分离用组合物100重量%中,所述第二无机微粉的含量优选为0.01重量%以上,更优选为0.1重量%以上,优选为10重量%以下,更优选为7重量%以下。所述第二无机微粉的含量为所述下限以上及所述上限以下时,能够有效地增大细胞分离用组合物的比重。

[0146] 所述细胞分离用组合物100重量%中,所述无机微粉的含量优选为0.1重量%以上,更优选为0.5重量%以上,优选为10重量%以下,更优选为7重量%以下。所述无机微粉的含量为所述下限以上和所述上限以下时,能够有效地增大细胞分离用组合物的比重。

[0147] 其他成分:

[0148] 只要不损害本发明的效果,所述细胞分离用组合物也可以包含所述成分以外的其他成分。作为所述其它成分,可举出有机凝胶化剂、热塑性弹性体、聚亚烷基二醇、硅油、辅助溶剂、抗氧化剂、着色剂和水等。所述其他成分可以分别仅使用1种,也可以组合使用2种

以上。

[0149] 所述细胞分离用组合物在25°C下的比重为1.065以上且1.080以下。所述细胞分离用组合物在25°C下的比重优选为1.067以上,更优选为1.070以上,优选为1.079以下,更优选为1.078以下,进一步优选为1.077以下,特别优选为1.075以下,最优选为1.073以下。若所述细胞分离用组合物在25°C下的比重为所述下限以上及所述上限以下,则能够更良好地分离CTC和红细胞等血细胞,此外,能够更有效地抑制血细胞混入血浆中。

[0150] 所述细胞分离用组合物在25°C下的比重,通过将1滴细胞分离用组合物依次滴加到以0.002的间隔阶段性地调节了比重的25°C的食盐水中,在食盐水中浮沉来测定。

[0151] 所述细胞分离用组合物在25°C下的粘度优选为50Pa·s以上,更优选为70Pa·s以上,优选为500Pa·s以下,更优选为400Pa·s以下。所述粘度为所述下限以上和所述上限以下时,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0152] 所述细胞分离用组合物在25°C下的粘度使用E型粘度计(例如东机产业公司制“TVE-35”) 在25°C及剪切速度1.0秒⁻¹的条件下测定。

[0153] <细胞分离用夹具>

[0154] 所述细胞分离用夹具是在离心分离时在血浆层与血球层之间移动而形成隔壁的夹具。

[0155] 作为所述细胞分离用夹具,例如可举出W02010/132783A1等中记载的机械分隔件(细胞分离用夹具)等。

[0156] 作为所述细胞分离用夹具的材料,例如可举出弹性体等。

[0157] (循环肿瘤细胞(CTC)分离试剂盒)

[0158] 所述CTC分离试剂盒具备血液采集容器和细胞分离容器。如后所述,所述CTC分离试剂盒优选还具备血细胞凝集剂。

[0159] <血液采集容器>

[0160] 所述血液采集容器具备血液采集容器主体和容纳于所述血液采集容器主体内的所述水溶液。因此,在所述血液采集容器容纳有所述水溶液。此外,在所述血液采集容器待采集给定量的血液。

[0161] 容纳于所述血液采集容器主体内的水溶液的量,根据血液采集容器主体的尺寸以及待采集的血液量等而适当变更。容纳于所述血液采集容器主体内的水溶液的量优选为0.1mL以上,更优选为0.5mL以上,进一步优选为0.7mL以上,优选为5mL以下,更优选为3mL以下,进一步优选为2.5mL以下。所述水溶液量为所述下限以上和所述上限以下时,血液不会被过度稀释,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0162] 所述血液采集容器是待采集给定量的血液的血液采集容器。所述血液的所述给定量,根据血液采集容器的尺寸以及内压等而适当变更。所述血液的所述给定量可以为1mL以上,可以为2mL以上,可以为4mL以上,可以为12mL以下,可以为11mL以下,可以为10mL以下。

[0163] 将与待采集至所述血液采集容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至所述血液采集容器内,得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液。例如,在待采集5mL的血液的血液采集容器中,将5mL的生理盐水采集至该血液采集容器内,进行颠倒混合等,将所述生理盐水与所述水溶液混合,得到混合液。从发挥本发明的效果的观点出发,所述CTC分离试剂盒中,混合有所述生理盐水与所述水溶液的所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上

且350mOsm/L以下。所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下是指,将采集至血液采集容器内的血液与所述水溶液混合而成的试样的渗透压不过度小且不过度大。通过使所述混合液的渗透压为所述下限以上和所述上限以下,能够抑制CTC的细胞死亡,并且能够维持CTC的细胞形态,此外,还能够抑制白细胞的混入。因此,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够提高CTC的回收率。

[0164] 混合有所述生理盐水和所述水溶液的所述混合液的渗透压优选为275mOsm/L以上,更优选为280mOsm/L以上,进一步优选为285mOsm/L以上,特别优选为290mOsm/L以上,优选为340mOsm/L以下,更优选为330mOsm/L以下,更进一步优选为320mOsm/L以下,进一步优选为310mOsm/L以下,特别优选为300mOsm/L以下。若所述混合液的渗透压为所述下限以上及所述上限以下,则能够进一步抑制CTC的细胞死亡,并且能够更良好地维持CTC的细胞形态。因此,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。

[0165] 所述混合液的渗透压使用渗透压计(例如,ARKRAY公司制“OM-6060”),通过冰点下降法测定。

[0166] 在所述血液采集容器中,相对于容纳的所述水溶液1mL,优选采集3mL以上的血液,更优选采集4mL以上,优选采集11mL以下,更优选采集10mL以下。在该情况下,血液不会被过度稀释,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0167] 所述血液采集容器主体的形状没有特别限定。优选所述血液采集容器主体是有底的管状容器。

[0168] 所述血液采集容器主体的原材料没有特别限定。作为所述血液采集容器主体的原材料,可举出聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚对苯二甲酸乙二醇酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯腈等热塑性树脂;不饱和聚酯树脂、环氧树脂、环氧-丙烯酸酯树脂等热固性树脂;乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙基纤维素、乙基甲壳素等改性天然树脂;钠钙玻璃、磷硅酸玻璃、硼硅酸玻璃等硅酸盐玻璃、石英玻璃等玻璃。所述血液采集容器主体的原材料可以仅使用一种,也可以组合使用两种以上。

[0169] 从使容器强度、氧阻隔性以及内容物的可视性良好的观点出发,所述血液采集容器主体的原材料优选为聚对苯二甲酸乙二醇酯。

[0170] 优选所述血液采集容器具备栓体。优选所述栓体安装于血液采集容器主体的开口。作为所述栓体,可使用以往公知的栓体。优选所述栓体是由能够气密且液密地安装于血液采集容器主体的开口的原材料以及形状构成的栓体。优选所述栓体构成为能够供采血针刺穿。

[0171] 作为所述栓体,可举出具有与血液采集容器主体的开口嵌合的形状的栓体、以及片状的密封栓体等。

[0172] 此外,所述栓体也可以是具备橡胶栓等栓主体和由塑料等构成的盖部件的栓体。在该情况下,在血液采集后,在从血液采集容器主体的开口拔出栓体时,能够抑制血液与人体接触的风险。

[0173] 作为所述栓体(或所述栓主体)的材料,例如可举出合成树脂、弹性体、橡胶、金属箔等。作为所述橡胶,可举出丁基橡胶和卤化丁基橡胶。作为所述金属箔,可举出铝箔等。从提高密封性的观点出发,所述栓体的材料优选为丁基橡胶。所述栓体(或者所述栓主体)优选为丁基橡胶栓。

[0174] 所述血液采集容器的内压没有特别限定。所述血液采集容器也能够的内部进行了排气的基础上,作为被所述栓体密闭的真空采血管使用。在为真空采血管的情况下,能够与采血者的技术差异无关地简便地进行给定量的血液采集。

[0175] <细胞分离容器>

[0176] 所述细胞分离容器具备细胞分离容器主体和容纳于所述细胞分离容器主体内的所述细胞分离材料。因此,在所述细胞分离容器中容纳有所述细胞分离材料。

[0177] 所述细胞分离材料的容纳部位,只要在所述细胞分离容器主体内就没有特别限定。所述细胞分离材料可以配置于所述细胞分离容器主体的底部,也可以配置于所述细胞分离容器主体的内壁面上。从更有效地发挥本发明的效果的观点出发,所述细胞分离材料优选容纳于所述细胞分离容器主体的底部。

[0178] 所述细胞分离容器主体的形状没有特别限定。所述细胞分离容器主体优选为有底的管状容器。

[0179] 所述细胞分离容器主体的原材料没有特别限定。作为所述细胞分离容器主体的原材料,可使用所述血液采集容器主体的原材料一栏所记载的原材料。

[0180] 从有效地抑制细胞吸附,进一步提高CTC的回收率的观点出发,所述细胞分离容器主体的原材料优选为聚丙烯。

[0181] 所述细胞分离容器优选具备栓体。所述栓体优选安装于细胞分离容器主体的开口。作为所述栓体,可使用以往公知的栓体。所述栓体优选为由能够气密且液密地安装于细胞分离容器主体的开口的原材料及形状构成的栓体。所述栓体也可以构成为能够被针刺穿。

[0182] 作为所述栓体,可使用所述血液采集容器的栓体一栏中记载的栓体。

[0183] <血细胞凝集剂>

[0184] 所述CTC分离试剂盒优选具备血细胞凝集剂。所述血细胞凝集剂优选容纳在容器中。即,所述CTC分离试剂盒优选具备容纳有血细胞凝集剂的第三容器。通过使用血细胞凝集剂,在对细胞分离容器进行离心分离时,红细胞和白细胞等不需要的血细胞容易向细胞分离材料的下方移动,能够使CTC和血细胞更良好地分离。

[0185] 所述血细胞凝集剂只要是选择性地使CTC以外的血细胞凝集,通过离心分离操作使血细胞容易沉降,从而能够提高CTC的纯度的药剂,就没有特别限定。此外,所述血细胞凝集剂可以仅使用1种,也可以组合使用2种以上。

[0186] 所述血细胞凝集剂可以包含具有与白细胞表面特有的抗原结合的抗原识别位点的抗体,也可以包含具有与红细胞表面特有的抗原结合的抗原识别位点的抗体。所述血细胞凝集剂也可以包含具有与白细胞表面特有的抗原结合的抗原识别位点和与红细胞表面特有的抗原结合的抗原识别位点这两者的抗体复合物。所述血细胞凝集剂可以是它们的混合物。

[0187] 所述血细胞凝集剂优选为具有与白细胞表面特有的抗原结合的抗原识别位点和与红细胞表面特有的抗原结合的抗原识别位点这两者的抗体复合物。所述血细胞凝集剂优选为抗白细胞抗体与抗红细胞抗体的抗体复合体。

[0188] 作为所述血细胞凝集剂的市售品,可举出STEMCELL Technologies公司制的“RosetteSep human CD45 depletion cocktail”等。

[0189] 此外,作为具有其他凝集作用的血细胞凝集剂,可举出使抗白细胞抗体或抗红细胞抗体与比重大的载体物理结合或化学结合而成的血细胞凝集剂、能够使血细胞物理吸附于微珠等不溶性载体的血细胞凝集剂等。

[0190] (循环肿瘤细胞(CTC)的分离方法(1))

[0191] 以下,对使用所述的CTC分离试剂盒分离血液中的CTC的方法进行说明。

[0192] <血液采集工序>

[0193] 所述CTC的分离方法(1)具备:血液采集工序,其向容纳有所述水溶液的所述血液采集容器采集血液,得到混合有所述血液与所述水溶液的试样。在所述CTC的分离方法(1)中,能够适度地减小所述试样的渗透压,因此能够有效地发挥本发明的效果。作为所述血液与所述水溶液的混合方法,可举出颠倒混合等。

[0194] 在所述血液采集工序后,可以在血液采集容器内保管试样,也可以不保管而进入下一工序。需要说明的是,保管温度优选为1°C以上,优选为40°C以下。

[0195] <添加工序>

[0196] 所述CTC的分离方法(1)具备:添加工序,其向容纳有所述细胞分离材料的所述细胞分离容器添加所述试样。

[0197] 在所述添加工序中,可以将所述血液采集容器中的试样的全部添加至所述细胞分离容器,也可以将所述血液采集容器中的试样的一部分添加至所述细胞分离容器。在所述添加工序中添加到细胞分离容器中的试样量,例如可以设为1mL以上且11mL以下。

[0198] 在所述添加工序中,优选将从所述血液采集容器采集的所述试样通过过滤器添加到所述细胞分离容器中。通过过滤器进行添加,由此能够有效地除去试样中存在的凝集物。

[0199] 所述过滤器的孔径优选为20 μm 以上,更优选为40 μm 以上,优选为100 μm 以下,更优选为70 μm 以下。若所述孔径为所述下限以上及所述上限以下,则能够有效地除去试样中存在的凝集物,并且能够将CTC良好地添加于细胞分离容器。

[0200] 作为所述过滤器的市售品,可举出pluriSelect Life Science UG&Co,KG公司制的“pluriSelect”等。

[0201] 所述添加工序后,可以在细胞分离容器内保管试样,也可以不保管而进入下一工序。需要说明的是,保管温度优选为1°C以上,优选为40°C以下。

[0202] <离心分离工序>

[0203] 所述CTC的分离方法(1)具备:离心分离工序,其对添加有所述试样的所述细胞分离容器进行离心分离。通过离心分离工序,血细胞成分向由细胞分离材料形成的隔壁的下侧移动,血浆和CTC向上侧移动。

[0204] 在所述离心分离工序中,优选对容纳有混合有血细胞凝集剂和所述试样的液体的细胞分离容器进行离心分离。在所述离心分离工序中,优选在容纳有所述试样的所述细胞分离容器中添加所述血细胞凝集剂后,对该细胞分离容器进行离心分离。通过使用血细胞凝集剂,红细胞和白细胞等不需要的血细胞容易向细胞分离材料的下方移动,能够使CTC和血细胞更良好地分离。

[0205] 作为所述离心分离工序中的所述离心分离条件,例如可举出在400G以上且4000G以下离心分离10分钟以上且120分钟以下的条件等。

[0206] <回收工序>

[0207] 所述CTC的分离方法(1)具备:回收工序,其对分离在血浆中的循环肿瘤细胞(CTC)进行回收。离心分离工序后,CTC堆积在由细胞分离材料形成的隔壁上,或存在于血浆中。因此,优选通过移液(Pipetting)缓慢地搅拌血浆,使堆积在隔壁上的CTC悬浮后回收。

[0208] (循环肿瘤细胞(CTC)分离容器)

[0209] 所述CTC分离容器具备:容器主体、容纳于所述容器主体内的所述水溶液、以及容纳于所述容器主体内的所述细胞分离材料。因此,在所述CTC分离容器中容纳有所述水溶液和所述细胞分离材料。此外,在所述CTC分离容器中待采集给定量的血液。

[0210] 容纳于所述容器主体内的水溶液的量,根据容器主体的尺寸及待采集的血液量等而适当变更。容纳于所述容器主体内的水溶液的量优选为0.1mL以上,更优选为0.5mL以上,进一步优选为0.7mL以上,优选为5mL以下,更优选为3mL以下,进一步优选为2.5mL以下。所述水溶液量为所述下限以上和所述上限以下时,血液不会被过度稀释,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0211] 所述CTC分离容器是待采集给定量的血液的CTC分离容器。所述血液的所述给定量,根据CTC分离容器的尺寸和内压等适当变更。所述血液的所述给定量可以为1mL以上,可以为2mL以上,可以为4mL以上,可以为12mL以下,可以为11mL以下,可以为10mL以下。

[0212] 将与待采集至所述CTC分离容器的血液的给定量等量的生理盐水采集至所述CTC分离容器内,得到混合有所述生理盐水与所述水溶液的混合液。例如,在待采集5mL的血液的CTC分离容器中,将5mL的生理盐水采集至该CTC分离容器内,进行颠倒混合等,将所述生理盐水与所述水溶液混合,得到混合液。从发挥本发明的效果的观点出发,在所述CTC分离容器中,混合有所述生理盐水与所述水溶液的所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下。所述混合液的渗透压为270mOsm/L以上且350mOsm/L以下是指,CTC分离容器内采集的血液与所述水溶液混合而成的试样的渗透压不过度小且不过度大。通过使所述混合液的渗透压为所述下限以上和所述上限以下,能够抑制CTC的细胞死亡,并且能够维持CTC的细胞形态,此外,还能够抑制白细胞的混入。因此,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够提高CTC的回收率。

[0213] 混合有所述生理盐水和所述水溶液的所述混合液的渗透压优选为275mOsm/L以上,更优选为280mOsm/L以上,进一步优选为285mOsm/L以上,特别优选为290mOsm/L以上,优选为340mOsm/L以下,更优选为330mOsm/L以下,更进一步优选为320mOsm/L以下,进一步优选为310mOsm/L以下,特别优选为300mOsm/L以下。若所述混合液的渗透压为所述下限以上及所述上限以下,则能够进一步抑制CTC的细胞死亡,并且能够更良好地维持CTC的细胞形态。因此,即使在使用采血后保管了数天的试样的情况下,也能够进一步提高CTC的回收率。

[0214] 所述混合液的渗透压使用渗透压计(例如,ARKRAY公司制“OM-6060”),通过冰点下降法测定。

[0215] 在所述CTC分离容器中,相对于所容纳的所述水溶液1mL,优选采集3mL以上的血液,更优选采集4mL以上,优选采集11mL以下,更优选采集10mL以下。在该情况下,血液不会被过度稀释,能够更有效地发挥本发明的效果。

[0216] 所述细胞分离材料的容纳部位只要在所述容器主体内就没有特别限定。所述细胞分离材料可以配置于所述容器主体的底部,也可以配置于所述容器主体的内壁面上。从更有效地发挥本发明的效果的观点出发,所述细胞分离材料优选容纳于所述容器主体的底

部。

[0217] 所述容器主体的形状没有特别限定。所述容器主体优选为有底的管状容器。

[0218] 所述容器主体的原材料没有特别限定。作为所述容器主体的原材料,可使用所述血液采集容器主体的原材料一栏所记载的原材料。

[0219] 所述CTC分离容器优选具备栓体。所述栓体优选安装于CTC分离容器主体的开口。作为所述栓体,可使用以往公知的栓体。所述栓体优选为由能够气密且液密地安装于CTC分离容器主体的开口的原材料以及形状构成的栓体。所述栓体也可以构成为能够被针刺穿。

[0220] 作为所述栓体,可使用所述血液采集容器的栓体一栏中记载的栓体。

[0221] 所述CTC分离容器的内压没有特别限定。所述CTC分离容器也可以在内部进行了排气的基础上,作为由所述栓体密闭的真空采血管使用。在为真空采血管的情况下,能够与采血者的技术差异无关地简便地进行给定量的血液采集。

[0222] 需要说明的是,所述CTC分离容器也可以与所述血细胞凝集剂一起使用。即,本说明书中,还提供具备所述CTC分离容器和所述血细胞凝集剂的循环肿瘤细胞分离试剂盒(CTC分离试剂盒)。具备所述CTC分离容器的CTC分离试剂盒优选具备容纳有血细胞凝集剂的第二容器。通过使用血细胞凝集剂,在对CTC分离容器进行离心分离时,红细胞和白细胞等不需要的血细胞容易移动到细胞分离材料的下方,能够使CTC和血细胞更良好地分离。

[0223] (循环肿瘤细胞(CTC)的分离方法(2))

[0224] 以下,对使用所述的CTC分离容器分离血液中的CTC的方法进行说明。

[0225] <血液采集工序>

[0226] 所述CTC的分离方法(2)具备:血液采集工序,其向所述CTC分离容器采集血液而得到混合有所述血液和所述水溶液的试样。在所述CTC的分离方法(2)中,能够减小所述试样的渗透压,因此能够有效地发挥本发明的效果。作为所述血液与所述水溶液的混合方法,可举出颠倒混合等。

[0227] 所述血液采集工序后,可以在CTC分离容器内保管试样,也可以不保管而进入下一工序。此外,保管温度优选为1°C以上,优选为40°C以下。

[0228] <离心分离工序>

[0229] 所述CTC的分离方法(2)具备:离心分离工序,其对容纳有所述试样的所述CTC分离容器进行离心分离。通过离心分离工序,血细胞成分向由细胞分离材料形成的隔壁的下侧移动,血浆和CTC向上侧移动。

[0230] 在所述离心分离工序中,优选对容纳有混合有血细胞凝集剂和所述试样的液体的CTC分离容器进行离心分离。在所述离心分离工序中,优选在容纳有所述试样的所述CTC分离容器中添加所述血细胞凝集剂后,对该CTC分离容器进行离心分离。通过使用血细胞凝集剂,红细胞和白细胞等不需要的血细胞容易向细胞分离材料的下方移动,能够使CTC和血细胞更良好地分离。

[0231] 作为所述离心分离工序中的所述离心分离条件,例如可举出在400G以上且4000G以下离心分离10分钟以上且120分钟以下的条件等。

[0232] <回收工序>

[0233] 所述CTC的分离方法(2)具备:回收工序,其对分离在血浆中的循环肿瘤细胞(CTC)进行回收。离心分离工序后,CTC堆积在由细胞分离材料形成的隔壁上,或存在于血浆中。因

此,优选通过移液缓慢地搅拌血浆,使堆积在隔壁上的CTC悬浮后回收。

[0234] (循环肿瘤细胞(CTC)的检测方法)

[0235] 作为检测通过所述CTC的分离方法(1)或(2)分离得到的CTC的方法,可举出在对CTC进行荧光标记后,使用检测设备检测经过了荧光标记的CTC的方法等。

[0236] 即,所述CTC的检测方法优选具备从血液分离CTC的工序、对分离得到的CTC进行荧光标记的工序、以及检测经过了荧光标记的CTC的工序。在从所述血液分离CTC的工序中,优选使用所述的CTC的分离方法(1)或(2)。

[0237] 对CTC进行荧光标记的方法没有特别限定,可以使用以往公知的方法。例如,通过使与CTC所具有的抗原特异性结合的标记抗体和CTC接触,能够对CTC进行荧光标记。此外,也可以使用包含感染CTC并在CTC特有的端粒酶活性下反应而增殖、发出荧光的病毒的试剂,对CTC进行荧光标记。

[0238] 经过了荧光标记的CTC可以使用荧光显微镜和流式细胞仪等检测设备进行检测。

[0239] 以下,举出实施例进一步详细说明本发明。本发明不仅限于以下的实施例。

[0240] 作为水溶液的溶质,准备以下物质。

[0241] (抗凝剂)

[0242] 乙二胺四乙酸二钾二水合物(EDTA2K·2H₂O)

[0243] (不相当于低分子化合物(A)的化合物)

[0244] 氯化钠

[0245] (低分子化合物(A))

[0246] 硫酸铵

[0247] 海藻糖2H₂O

[0248] (高分子化合物(B))

[0249] 葡聚糖(数均分子量:40000)

[0250] 聚乙二醇(数均分子量:4000)

[0251] 作为细胞分离用组合物的材料,准备以下材料。

[0252] (25°C下具有流动性的有机成分的材料)

[0253] (甲基)丙烯酸类树脂:

[0254] 使丙烯酸-2-乙基己酯和丙烯酸丁酯在偶氮类聚合引发剂的存在下通过溶液聚合法进行自由基聚合,得到在25°C下具有流动性的(甲基)丙烯酸酯类聚合物。

[0255] (无机微粉)

[0256] 亲水性二氧化硅(微粉二氧化硅,日本AEROSIL公司制“200CF”)

[0257] 疏水性二氧化硅(微粉二氧化硅,日本AEROSIL公司制“RX200”)

[0258] 碳酸钙粉末(IMERYYS公司制“Socal UP-G”)

[0259] (其他成分)

[0260] 硅油(东丽道康宁公司制“SF8410”)

[0261] 细胞分离用组合物A的制备:

[0262] 将(甲基)丙烯酸类树脂91.9重量份、亲水性二氧化硅1.00重量份、疏水性二氧化硅5.0重量份、碳酸钙粉末1.95重量份和硅油0.15重量份混合,制备细胞分离用组合物A。

[0263] 细胞分离用组合物B的制备:

[0264] 将(甲基)丙烯酸类树脂92.4重量份、亲水性二氧化硅0.55重量份、疏水性二氧化硅6.9重量份和硅油0.15重量份混合,制备细胞分离用组合物B。

[0265] 将1滴得到的细胞分离用组合物依次滴加到以0.002的间隔阶段性地调节了比重的25°C的食盐水中,通过食盐水中的浮沉测定比重。得到的细胞分离用组合物在25°C下的比重示于下述表中。

[0266] 作为CTC分离试剂盒中的血液采集容器主体以及CTC分离容器中的容器主体,准备以下物质。

[0267] 长度100mm、开口部的内径14mm的PET有底管(聚对苯二甲酸乙二醇酯管)

[0268] 作为CTC分离试剂盒中的细胞分离容器主体,准备以下物质。

[0269] 长度119mm、开口部的内径14mm的PP有底管(聚丙烯管)

[0270] (实施例1)

[0271] (1) 血液采集容器的制备

[0272] 将表1所示的成分溶解于水(注射用水)而得到水溶液。将得到的水溶液的成分的种类和浓度示于表1。

[0273] 将所得到的水溶液1mL添加到血液采集容器主体内。将血液采集容器内部减压至血液采集量为5mL,使用丁基橡胶栓进行密封。由此制备血液采集容器。

[0274] (2) 细胞分离容器的制备

[0275] 将1.8g的细胞分离用组合物A容纳于细胞分离容器主体的底部,使用螺旋盖进行密封。由此制备细胞分离容器。

[0276] 由此得到具备血液采集容器和细胞分离容器的CTC分离试剂盒。

[0277] (实施例2~5及比较例1、2)

[0278] 将水溶液的组成和细胞分离用组合物的种类变更为如表1、2所示,除此以外,与实施例1同样地得到具备血液采集容器和细胞分离容器的CTC分离试剂盒。

[0279] (比较例3)

[0280] (1) 血液采集容器的制备

[0281] 将抗凝剂33重量份溶解于水67重量份中,得到混合液。此外,将得到的混合液23mg涂布于血液采集容器主体的内壁面,并使其干燥。将血液采集容器内部减压至血液采集量为5mL,使用丁基橡胶栓进行密封。由此制备血液采集容器。

[0282] (2) 细胞分离容器的制备

[0283] 与实施例1同样地制备细胞分离容器。

[0284] 由此得到具备血液采集容器和细胞分离容器的CTC分离试剂盒。

[0285] (实施例6)

[0286] CTC分离容器的制备:

[0287] 将表3所示的成分溶解于水(注射用水)而得到水溶液。将得到的水溶液的成分的种类和浓度示于表3。

[0288] 将1.8g的细胞分离用组合物A容纳于容器主体的底部。此外,将得到的水溶液1mL添加到容器主体内。此外,将容器内部减压至血液采集量为5mL,用丁基橡胶栓密封。由此制备CTC分离容器。

[0289] (实施例7~10及比较例4、5)

[0290] 除了将水溶液的组成和细胞分离用组合物的种类变更为如表3、4所示以外,与实施例6同样地制备CTC分离容器。

[0291] (比较例6)

[0292] 将1.8g的细胞分离用组合物A容纳于容器主体的底部。将抗凝剂33重量份溶解于水67重量份中,得到混合液。此外,将得到的混合液23mg涂布于容器主体的内壁面,使其干燥。将容器内部减压至血液采集量为5mL,用丁基橡胶栓密封。由此制备CTC分离容器。

[0293] (评价)

[0294] (1)混合液的渗透压

[0295] (1-1)使用CTC分离试剂盒时的试验步骤

[0296] 在得到的血液采集容器中采集生理盐水5mL。采集生理盐水后,颠倒混合,将生理盐水与容纳于血液采集容器内的水溶液混合,得到混合液。使用渗透压计(ARKRAY公司制“OM-6060”),通过冰点下降法测定得到的混合液的渗透压。需要说明的是,同样地也测定容纳于血液采集容器内的水溶液的渗透压。

[0297] (1-2)使用CTC分离容器时的试验步骤

[0298] 在得到的CTC分离容器中采集生理盐水5mL。采集生理盐水后,颠倒混合,将生理盐水与容纳在CTC分离容器内的水溶液混合,得到混合液。使用渗透压计(ARKRAY公司制“OM-6060”),通过冰点下降法测定得到的混合液的渗透压。需要说明的是,同样地也测定了CTC分离容器内所容纳的水溶液的渗透压。

[0299] (2)CTC的回收率

[0300] (2-1)使用CTC分离试剂盒时的试验步骤(血液采集工序~离心分离工序)

[0301] 使用得到的CTC分离试剂盒,按照以下的步骤进行求出CTC的回收率的试验。需要说明的是,在各实施例和各比较例中,使用2组CTC分离试剂盒。在第一组的CTC分离试剂盒中,同一天进行从血液采集工序到CTC的检测工序。另一方面,在第二组的CTC分离试剂盒中,在同一天进行从血液采集工序到添加工序后,保管4天,接着,在同一天进行从离心分离工序到CTC的检测工序。

[0302] <血液采集工序>

[0303] 在血液采集容器中采集血液5mL。采集血液后,颠倒混合,得到血液与容纳于血液采集容器内的水溶液混合而成的试样。

[0304] <添加工序>

[0305] 在细胞分离容器中添加所得到的试样1mL。

[0306] 接着,在细胞分离容器中以成为50个/1mL血液的量的方式添加作为CTC的Cell Line(MCF-7)。需要说明的是,如上所述,在第一组的CTC分离试剂盒中,直接进入下一工序。另一方面,在第二组的CTC分离试剂盒中,添加CTC后,将细胞分离容器在4°C下保管4天,进入下一工序。

[0307] <离心分离工序>

[0308] 作为血细胞凝集剂,准备STEMCELL Technologies公司制“RosetteSep human CD45 depletion cocktail。”在实施例1~3、5及比较例1~3中,将50μL的血细胞凝集剂添加至添加有CTC的细胞分离容器中,静置20分钟。接着,将细胞分离容器在25°C、1500G和20分钟条件下离心分离。在实施例4中,不使用血细胞凝集剂,将细胞分离容器在25°C、

1500G和20分钟条件下离心分离。离心分离后,血浆位于由细胞分离用组合物形成的隔壁的上方,CTC堆积在隔壁上。

[0309] (2-2) 使用CTC分离容器时的试验步骤(血液采集工序~离心分离工序)

[0310] 使用得到的CTC分离容器,按照以下的步骤进行求出CTC的回收率的试验。需要说明的是,在各实施例和各比较例中,使用2根CTC分离容器。在第一根CTC分离容器中,在同一天进行从血液采集工序到CTC的检测工序。另一方面,在第二根CTC分离容器中,在血液采集工序后保管4天,接着,在同一天进行从离心分离工序到CTC的检测工序。

[0311] <血液采集工序>

[0312] 在CTC分离容器中采集血液5mL。采集血液后,颠倒混合,得到血液与容纳在CTC分离容器内的水溶液混合而成的试样。

[0313] 接着,在CTC分离容器中以成为50个/1mL血液的量的方式添加作为CTC的Cell Line(MCF-7)。需要说明的是,如上所述,在第一根CTC分离容器中,直接进入下一工序。另一方面,在第二根CTC分离容器中,添加CTC后,将CTC分离容器在4℃下保管4天,进入下一工序。

[0314] <离心分离工序>

[0315] 作为血细胞凝集剂,准备STEMCELL Technologies公司制“RosetteSep human CD45 depletion cocktail。”在实施例6~8、10及比较例4~6中,将250μL的血细胞凝集剂添加至添加有CTC的CTC分离容器中,静置20分钟。接着,将CTC分离容器在25℃、1500G和20分钟条件下离心分离。实施例9中,不使用血细胞凝集剂,将CTC分离容器在25℃、1500G和20分钟条件下离心分离。离心分离后,血浆位于由细胞分离用组合物形成的隔壁的上方,CTC堆积在隔壁上。

[0316] (2-3) 使用CTC分离试剂盒和CTC分离容器时的试验步骤(通用)

[0317] <回收工序>

[0318] 通过移液缓慢地搅拌血浆,使堆积在隔壁上的CTC悬浮在血浆中后,将血浆回收到微量离心管中。接着,在回收的血浆中,每1mL该血浆添加1mL的溶血剂。将血浆与溶血剂的混合液在25℃下搅拌15分钟后,在25℃下以500G及5分钟的条件进行离心分离,由此使血浆中混入的红细胞溶血。除去上清液,使粒子在PBS与10%BSA液的混合液中悬浮,再次进行溶血处理。溶血处理后,除去上清液,将粒子用80μL的PBS和10%BSA液的混合液悬浮,得到悬浮液。

[0319] <CTC的染色和荧光显微镜观察>

[0320] 在80μL的悬浮液中添加20μL的FcR Blocking Reagent(Miltenyi Biotec公司制),使用涡旋混合器进行搅拌后,在4℃的暗室下静置10分钟。接着,在悬浮液中添加2μL的CD326(EpCAM)-FITC抗体(人)(Miltenyi Biotec公司制),轻轻移液,在4℃的暗室下静置10分钟。接着,用PBS与10%BSA液的混合液1mL清洗悬浮液。将该液体添加到96孔板中,在该板上接种细胞。接着,通过进行荧光显微镜观察,对染色的细胞数进行计数。

[0321] 通过下式算出CTC的回收率。此外,将在同一天进行从血液采集工序到CTC的检测工序时(保管0天)的CTC的回收率与保管4天时的CTC的回收率之差作为CTC的回收率的减少量。

[0322] CTC的回收率(%) = A/B × 100

- [0323] A:通过荧光显微镜观察到的Cell Line (MCF-7)的数量
- [0324] B:添加到血液中的Cell Line (MCF-7)的数量
- [0325] (3)回收得到的CTC的荧光强度
- [0326] 使用荧光显微镜观察确认了在同一天进行从血液采集工序到CTC的检测工序的情况下(保管0天)回收得到的CTC的荧光强度(0)和在保管4天的情况下回收得到的CTC的荧光强度(4)。具体而言,对回收得到的细胞照射波长470nm的光(LED光源),观察CTC的荧光强度。需要说明的是,荧光强度强的细胞是活细胞,荧光强度弱的细胞是死细胞或表面抗原消失的细胞。
- [0327] <回收得到的CTC的荧光强度的判定基准>
- [0328] ○:荧光强度(4)维持与荧光强度(0)同等的强度
- [0329] ×:荧光强度(4)明显小于荧光强度(0)
- [0330] (4)隔壁上残留的白细胞数的变化率
- [0331] (4-1)使用CTC分离试剂盒中的细胞分离容器时的试验步骤(血液采集工序~离心分离工序)
- [0332] 使用得到的CTC分离试剂盒,按照以下的顺序,进行求出由细胞分离用组合物形成的隔壁上残留的白细胞数的变化率的试验。需要说明的是,使用2组CTC分离试剂盒。在第一组的CTC分离试剂盒中,同一天进行从血液采集工序到白细胞数的测定。另一方面,在第二组的CTC分离试剂盒中,在同一天进行从血液采集工序到添加工序后,保管4天,接着,在同一天进行从离心分离工序到白细胞数的测定。
- [0333] <血液采集工序>
- [0334] 在血液采集容器中采集血液5mL。采集血液后,颠倒混合,得到血液与容纳于血液采集容器内的水溶液混合而成的试样。
- [0335] <添加工序>
- [0336] 在细胞分离容器中添加所得到的试样1mL。
- [0337] <离心分离工序>
- [0338] 作为血细胞凝集剂,准备STEMCELL Technologies公司制“RosetteSep human CD45 depletion cocktail。”将50 μ L的血细胞凝集剂添加到细胞分离容器中,静置20分钟。接着,将细胞分离容器在25 $^{\circ}$ C、1500G和20分钟条件下离心分离。离心分离后,血浆位于由细胞分离用组合物形成的隔壁的上方,此外,白细胞堆积在隔壁上。
- [0339] (4-2)使用CTC分离容器时的试验步骤(血液采集工序~离心分离工序)
- [0340] 使用得到的CTC分离容器,按照以下的顺序,进行求出由细胞分离用组合物形成的隔壁上残留的白细胞数的变化率的试验。此外,使用2个CTC分离容器。在第一根CTC分离容器中,同一天进行从血液采集工序到白细胞数的测定。另一方面,在第二根CTC分离容器中,在血液采集工序后保管4天,接着,在同一天进行从离心分离工序到白细胞数的测定。
- [0341] <血液采集工序>
- [0342] 在CTC分离容器中采集血液5mL。采集血液后,颠倒混合,得到血液与容纳在CTC分离容器内的水溶液混合而成的试样。
- [0343] <离心分离工序>
- [0344] 作为血细胞凝集剂,准备STEMCELL Technologies公司制“RosetteSep human

CD45 depletion cocktail。”将250 μ L的血细胞凝集剂添加到CTC分离容器中,静置20分钟。接着,将CTC分离容器在25 $^{\circ}$ C、1500G和20分钟条件下离心分离。离心分离后,血浆位于由细胞分离用组合物形成的隔壁的上方,此外,白细胞堆积在隔壁上。

[0345] (4-3) 使用CTC分离试剂盒和CTC分离容器时的试验步骤(通用)

[0346] <回收工序>

[0347] 通过移液缓慢地搅拌血浆,使堆积在隔壁上的白细胞悬浮在血浆中,然后将血浆回收到微量离心管中。

[0348] <白细胞数的测定>

[0349] 使用多项目自动血细胞分析装置(SYSMEX公司制“XN系列”)测定回收液中的白细胞数。

[0350] 根据同一天进行从血液采集工序到白细胞数的测定时(保管0天)的隔壁上的白细胞数(0)和保管4天时的隔壁上的白细胞数(4),通过下式算出残留在隔壁上的白细胞数的变化率。需要说明的是,表中,“N/A”表示隔壁上的白细胞数少,在多项目自动血细胞分析装置的测定中白细胞数低于检测限。

[0351] 隔壁上残留的白细胞数的变化率(%) = $(A-B)/B \times 100$

[0352] A:隔壁上的白细胞数(4)

[0353] B:隔壁上的白细胞数(0)

[0354] 将构成及结果示于下述表1~4。需要说明的是,表中,抗凝剂的浓度不是EDTA2K \cdot 2H₂O的浓度,而是指EDTA2K的浓度。除此以外的成分的含量为纯分量。

[0355] [表1]

[0356]

CTC分离试剂盒		实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4	实施例 5
血液采集容器	氯化钠	-	-	-	-	-
	硫酸铵	1.10	-	0.55	0.55	-
	海藻糖 (具有细胞膜保护作用的化合物)	-	8	3	3	8
	葡聚糖(Mn: 40000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	-	5	5	5	-
	聚乙二醇(Mn: 4000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	-	7	7	7	7
	抗凝剂	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848
	注射用水	剩余量	剩余量	剩余量	剩余量	剩余量
	合计	100	100	100	100	100
	水溶液的渗透压	290	330	340	340	340
	容纳于血液采集容器的水溶液的量	1	1	1	1	1
混合液的渗透压	种类	286	293	294	294	294
	25°C下的比重	A	B	B	B	A
细胞分离容器	回收得到的CTC的荧光强度	1.077	1.071	1.071	1.071	1.077
	CTC的回收率	使用	使用	使用	未使用	使用
血细胞凝集剂	保管0天	91	88	78	85	94
	保管4天	65	71	72	78	72
	CTC的回收率的减少量	26	17	6	7	22
	回收得到的CTC的荧光强度	0	0	0	0	0
评价	隔壁上残留的白细胞数的变化率	40	30	0	25	290
	重量%					
	重量%					
	重量%					
	重量%					
	重量%					
	mOsm/L					
	mL					
	mOsm/L					
	-					
	-					
	%					
	%					
	%					
	-					
	%					

[0357]

[表2]

[0358]

CTC分离试剂盒		比较例 1	比较例 2	比较例 3
血液采集容器	氯化钠	-	0.75	
	硫酸铵	10.00	-	
	海藻糖 (具有细胞膜保护作用的化合物)	3	-	
	葡聚糖(Mn: 40000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	5	-	抗凝剂的干燥物层
	聚乙二醇(Mn: 4000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	7	-	
	EDTA2K·2H ₂ O	0.7848	0.7848	
	注射用水	剩余量	剩余量	
	合计	100	100	
	水溶液的渗透压	2380	320	
	容纳于血液采集容器的水溶液的量	1	1	0
混合液的渗透压	634	291	-	
细胞分离容器	种类	A	A	A
	25°C下的比重	1.077	1.077	1.077
血细胞凝集剂	使用	使用	使用	使用
	CTC的回收率	52	69	76
	保管0天			
	保管4天	2	45	49
	CTC的回收率的减少量	50	24	27
评价	回收得到的CTC的荧光强度	○	×	×
	隔壁上残留的白细胞的数的变化率	N/A	350	1300

[0359]

[表3]

[0360]

		实施例 6	实施例 7	实施例 8	实施例 9	实施例 10	
CTC分离器	氯化钠	-	-	-	-	-	
	硫酸铵	1.10	-	0.55	0.55	-	
	海藻糖 (具有细胞膜保护作用的化合物)	-	8	3	3	8	
	葡聚糖(Mn: 40000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	-	5	5	5	-	
	聚乙二醇(Mn: 4000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	-	7	7	7	7	
	EDTA2K·2H ₂ O	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848	
	注射用水	剩余量	剩余量	剩余量	剩余量	剩余量	
	合计	100	100	100	100	100	
	水溶液的渗透压	290	330	340	340	340	
	容纳于CTC分离容器的水溶液的量	mOsm/L	1	1	1	1	
血细胞凝集剂	种类	-	B	B	B	A	
	25°C下的比重	-	1.071	1.071	1.071	1.077	
	混合液的渗透压	mOsm/L	286	293	294	294	
评价	CTC的回收率	保管0天	使用	使用	未使用	使用	
		保管4天	80	79	90	93	78
	回收得到的CTC的荧光强度 隔壁上残留的白细胞数的变化率	CTC的回收率的减少量	55	60	75	72	61
		回收得到的CTC的荧光强度	25	19	15	21	17
隔壁上残留的白细胞数的变化率	-	0	0	0	0		
		44	-100	0	21	300	

[0361]

[表4]

[0362]

		比较例 4	比较例 5	比较例 6
CTC分离容器	氯化钠	重量%	0.75	
	硫酸铵	重量%	10.00	
	海藻糖 (具有细胞膜保护作用的化合物)	重量%	3	
	葡聚糖(Mn: 40000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	重量%	5	抗凝剂的干燥物层
	聚乙二醇(Mn: 4000) (具有细胞膜保护作用的化合物)	重量%	7	
	抗凝剂	重量%	0.7848	0.7848
	注射用水	重量%	剩余量	剩余量
	合计	重量%	100	100
	水溶液的渗透压	mOsm/L	2380	320
	容纳于CTC分离容器的水溶液的量	mL	1	1
细胞分离用组合物	种类	A	A	A
	25°C下的比重	1.077	1.077	1.077
	混合液的渗透压	mOsm/L	634	291
血细胞凝集剂	评价	使用	使用	使用
	CTC的回收率	%	67	65
	回收得到的CTC的荧光强度	%	18	40
	隔壁上残留的白细胞的比率	%	49	25
		○	×	×
		N/A	300	1200

[0363] 符号说明

- [0364] 1…血液采集容器
- [0365] 2…细胞分离容器
- [0366] 5…CTC分离试剂盒
- [0367] 6…CTC分离容器
- [0368] 11…血液采集容器主体
- [0369] 12…水溶液
- [0370] 13…栓体
- [0371] 21…细胞分离容器主体
- [0372] 22…细胞分离材料
- [0373] 23…栓体

- [0374] 61…容器主体
- [0375] 62…水溶液
- [0376] 63…细胞分离材料
- [0377] 64…栓体

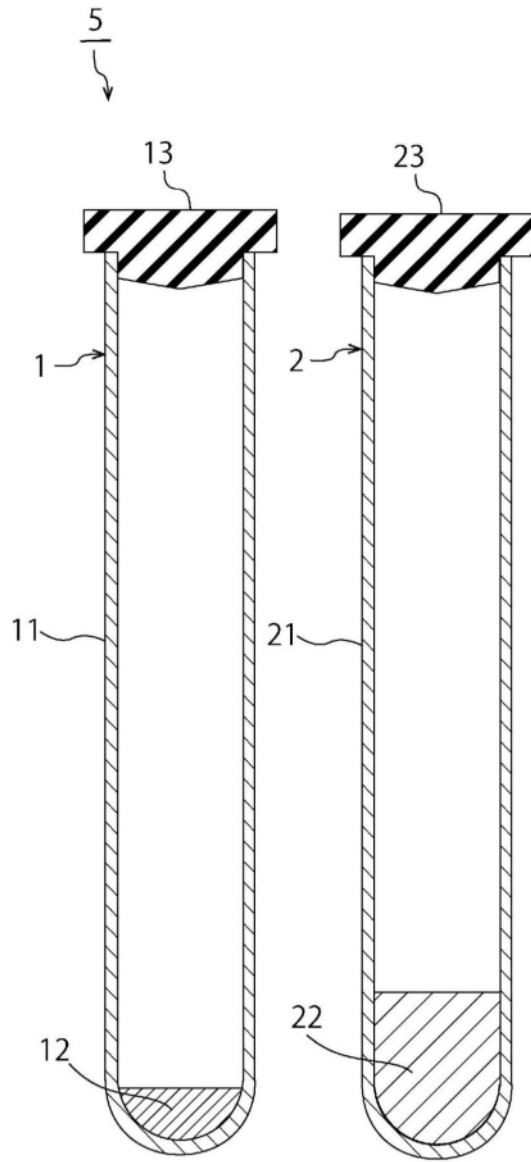


图1

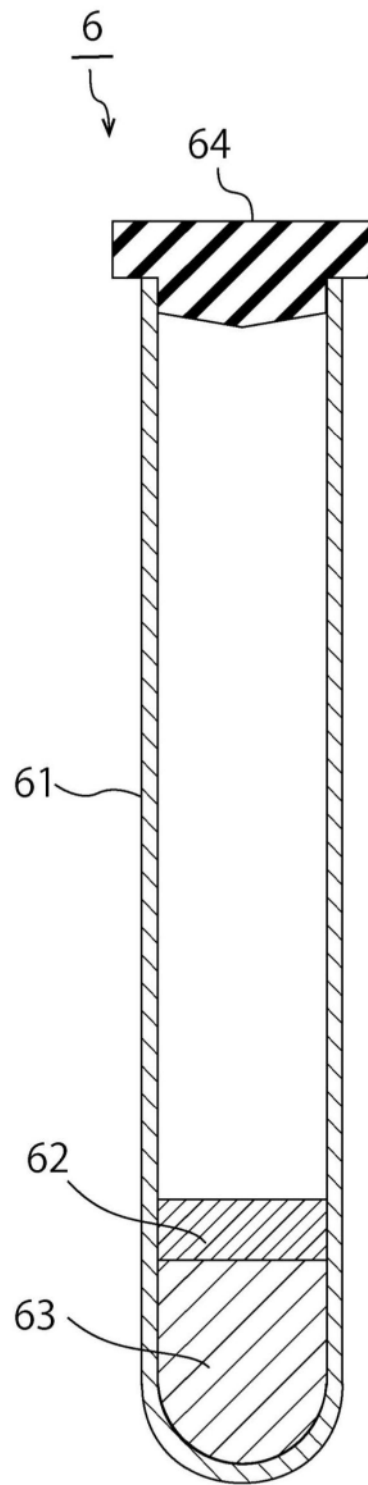


图2