(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
2023年9月28日(28.09.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/181468 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/48 (2006.01) *C12N 1/02* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *C12N 5/09* (2010.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/038554

(22) 国際出願日： 2022年10月17日(17.10.2022)

(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 2022-049652 2022年3月25日(25.03.2022) JP

(71) 出願人: 積水メディカル株式会社(**SEKISUI MEDICAL CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋二丁目１番３号 Tokyo (JP).

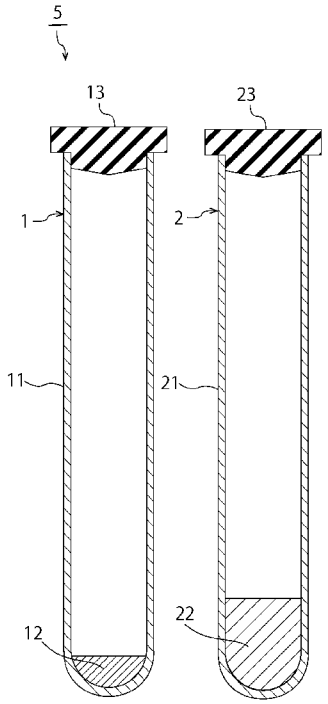
(72) 発明者: 内山 嵩也(**UCHIYAMA, Takaya**); 〒7460006 山口県周南市開成町４５６０ 徳山積水工業株式会社内 Yamaguchi (JP). 神田 まりか(**KANDA, Marika**); 〒7460006 山口県周南市開成町４５６０ 徳山積水工業株式会社内 Yamaguchi (JP). 駒井 邦哉(**KOMAI, Kuniya**); 〒7460006 山口県周南市開成町４５６０ 徳山積水工業株式会社内 Yamaguchi (JP). 井上 智雅(**INOUE, Tomonori**); 〒7460006 山口県周南市開成町４５６０ 徳山積水工業株式会社内 Yamaguchi (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人大阪フロント特許事務所 (**OSAKA FRONT**); 〒5400028 大阪府大阪市中央区常盤町１丁目３番８号 中央大通ＦＮビル 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH,

(54) **Title:** KIT FOR ISOLATING CIRCULATING TUMOR CELLS, CONTAINER FOR ISOLATING CIRCULATING TUMOR CELLS, AND METHOD FOR ISOLATING CIRCULATING TUMOR CELLS

(54) 発明の名称： 循環腫瘍細胞分離キット、循環腫瘍細胞分離容器及び循環腫瘍細胞の分離方法



(57) **Abstract:** Provided is a kit for isolating circulating tumor cells, the kit being capable of increasing the recovery rate of circulating tumor cells, not only when a specimen, which has been stored for not a long period of time after collection, is used, but also when a specimen, which has been stored for several days after the collection of blood, is used. The kit for isolating circulating tumor cells according to the present invention is used for isolating circulating tumor cells in the blood, and comprises a blood collection container in which an aqueous solution is contained and a predetermined amount of blood is collected, and a cell isolation container in which a cell isolation material having a specific gravity of 1.065-1.080 at 25 °C is contained, wherein: the aqueous solution contains an anticoagulant, and a low-molecular compound having a molecular weight of 75-500 or a high-molecular compound having a number-average molecular weight of 2,000-200,000 (exclusive of 200,000); and when a physiological saline, of an equal amount as a predetermined amount of the blood collected in the blood collection container, is collected into the blood collection container and a mixed solution, in which the physiological saline and the aqueous solution are mixed, is obtained, the osmotic pressure of the mixed solution is 270-350 mOsm/L.

WO 2023/181468 A1

［続葉有］

PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (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, ME, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約:採血してからそれほど時間が経過していない検体を用いた場合だけでなく、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、循環腫瘍細胞の回収率を高めることができる循環腫瘍細胞分離キットを提供する。 本発明に係る循環腫瘍細胞分離キットは、血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられるキットであり、水溶液が収容されており、かつ所定量の血液が採取される血液採取容器と、２５℃での比重が１．０６５～１．０８０の細胞分離材が収容された細胞分離容器とを備え、前記水溶液が、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５～５００の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含み、前記血液採取容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を血液採取容器内に採取して、前記生理食塩水と前記水溶液とが混合された混合液を得たときに、前記混合液の浸透圧が２７０～３５０ｍＯｓｍ／Ｌである。

明　細　書

発明の名称 ：

循環腫瘍細胞分離キット、循環腫瘍細胞分離容器及び循環腫瘍細胞の分離方法

技術分野

[0001] 本発明は、血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる循環腫瘍細胞分離キット及びそれを用いた循環腫瘍細胞の分離方法に関する。また、本発明は、血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる循環腫瘍細胞分離容器及びそれを用いた循環腫瘍細胞の分離方法に関する。

背景技術

[0002] 循環腫瘍細胞（Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ　ｔｕｍｏｒ　ｃｅｌｌｓ、以下「ＣＴＣ」と記載することがある）は、腫瘍組織から遊離して血液中へ浸潤したがん細胞であり、がん転移の形成過程に深く関与すると考えられている。例えば、ＣＴＣは、肺がんにおける予後予測因子及び進展度のマーカー、並びに、乳がんの再発リスクの層別化マーカーとなり得る可能性が報告されている。

[0003] しかしながら、ＣＴＣは、患者の血液１ｍＬあたり数個～数十個程度しか存在しないため、血液中のＣＴＣを分離することは容易ではない。

[0004] 血液中のＣＴＣを分離するために、下記の非特許文献１に示すように、様々な方法が試みられている。

[0005] また、下記の特許文献１には、アルデヒドを放出可能な成分と、抗凝固剤と、シクロデキストリン又はその官能化誘導体とを含む組成物が開示されている。特許文献１には、上記組成物で安定化されたＣＴＣを分離できる場合があることが記載されている。例えば、特許文献１には、血漿を単離した後、バフィーコートからＣＴＣ及び白血球を分離できる場合があることが記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特表２０２１－５００５８５号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Zeina Habli, Walid AlChamaa, Raya Saab, Humam Kadara and Massoud L. Khraiche. Circulating Tumor Cell Detection Technologies and Clinical Utility: Challenges and Opportunities. Cancers 2020, 12, 1930; doi:10.3390/cancers12071930

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 血液中のＣＴＣを分離する方法の一例として、非特許文献１及び特許文献１にも記載のように、細胞の比重差を利用する遠心分離法（密度勾配遠心分離法）が知られている。遠心分離法は、低コストであり、簡便であるという利点がある。

[0009] ところで、臨床現場では、患者から採血した検体が検査に供されるまでに、ある程度の時間が経過することがある。例えば、検体を検査施設に輸送したり、検査施設において検査待ちの検体が多量に存在していたりする場合には、採血してから検体が検査に供されるまでに、数日程度の時間が経過することがある。

[0010] 従来の遠心分離法では、採血してからそれほど時間が経過していない検体を用いてＣＴＣを分離した場合に、ＣＴＣの回収率をある程度高くすることができたとしても、採血後に数日間保管された検体を用いてＣＴＣを分離した場合に、ＣＴＣの回収率が低下しやすい。

[0011] 本発明の目的は、採血してからそれほど時間が経過していない検体を用いた場合だけでなく、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、循環腫瘍細胞の回収率を高めることができる循環腫瘍細胞分離キット及び循環腫瘍細胞分離容器を提供することである。また、本発明は、上記循環腫瘍細胞分離キットを用いた循環腫瘍細胞の分離方法、及び、上記循環腫瘍細胞分離

容器を用いた循環腫瘍細胞の分離方法を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明の広い局面では、血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる循環腫瘍細胞分離キットであり、水溶液が収容されており、かつ所定量の血液が採取される血液採取容器と、２５℃での比重が１．０６５以上１．０８０以下の細胞分離材が収容された細胞分離容器とを備え、前記水溶液が、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含み、前記血液採取容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を血液採取容器内に採取して、前記生理食塩水と前記水溶液とが混合された混合液を得たときに、前記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である、循環腫瘍細胞分離キット（以下、「ＣＴＣ分離キット」と記載することがある）が提供される。

[0013] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記水溶液が、前記低分子化合物を含む。

[0014] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記水溶液が、前記高分子化合物を含む。

[0015] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記水溶液が、前記低分子化合物と前記高分子化合物とを含む。

[0016] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記低分子化合物が、トレハロース、又は硫酸アンモニウムを含む。

[0017] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記高分子化合物が、細胞膜保護作用を有する化合物を含む。

[0018] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記高分子化合物が、デキストラン、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドンである。

[0019] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記細胞分離材が、細胞分離用組成物である。

[0020] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記細胞分離用組成物が、２５℃で流動性を有する有機成分と、無機微粉末とを含み、前記有機成分が、樹脂を含み、前記無機微粉末が、微粉末シリカを含む。

[0021] 本発明に係るＣＴＣ分離キットのある特定の局面では、前記ＣＴＣ分離キットは、血球凝集剤をさらに備える。

[0022] 本発明の広い局面では、上述した循環腫瘍細胞分離キットを用いて、血液中の循環腫瘍細胞を分離する方法であって、前記水溶液が収容された前記血液採取容器に血液を採取して、前記血液と前記水溶液とが混合された検体を得る血液採取工程と、前記細胞分離材が収容された前記細胞分離容器に、前記検体を添加する添加工程と、前記検体が添加された前記細胞分離容器を遠心分離する遠心分離工程と、血漿中に分離された循環腫瘍細胞を回収する回収工程とを備える、循環腫瘍細胞の分離方法（以下、「ＣＴＣの分離方法」と記載することがある）が提供される。

[0023] 本発明に係るＣＴＣの分離方法のある特定の局面では、前記遠心分離工程において、血球凝集剤と前記検体とが混合された液が収容された細胞分離容器を遠心分離する。

[0024] 本発明の広い局面では、血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる循環腫瘍細胞分離容器であり、所定量の血液が採取される循環腫瘍細胞分離容器であり、容器本体と、前記容器本体内に収容された水溶液と、前記容器本体内に収容された２５℃での比重が１．０６５以上１．０８０以下の細胞分離材とを備え、前記水溶液が、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含み、前記循環腫瘍細胞分離容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を循環腫瘍細胞分離容器内に採取して、前記生理食塩水と前記水溶液とが混合された混合液を得たときに、前記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である、循環腫瘍細胞分離容器（以下、「ＣＴＣ分離容器」と記載することがある）が提供される。

[0025] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記水溶液が、前記低分子化合物を含む。

[0026] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記水溶液が、前記高分子化合物を含む。

[0027] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記水溶液が、前記低分子化合物と前記高分子化合物とを含む。

[0028] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記低分子化合物が、トレハロース、又は硫酸アンモニウムを含む。

[0029] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記高分子化合物が、細胞膜保護作用を有する化合物を含む。

[0030] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記高分子化合物が、デキストラン、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドンである。

[0031] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記細胞分離材が、細胞分離用組成物である。

[0032] 本発明に係るＣＴＣ分離容器のある特定の局面では、前記細胞分離用組成物が、２５℃で流動性を有する有機成分と、無機微粉末とを含み、前記有機成分が、樹脂を含み、前記無機微粉末が、微粉末シリカを含む。

[0033] 本発明の広い局面では、上述した循環腫瘍細胞分離容器と、血球凝集剤とを備える、循環腫瘍細胞分離キットが提供される。

[0034] 本発明の広い局面では、上述した循環腫瘍細胞分離容器を用いて、血液中の循環腫瘍細胞を分離する方法であって、前記循環腫瘍細胞分離容器に血液を採取して、前記血液と前記水溶液とが混合された検体を得る血液採取工程と、前記検体が収容された前記循環腫瘍細胞分離容器を遠心分離する遠心分離工程と、血漿中に分離された循環腫瘍細胞を回収する回収工程とを備える、循環腫瘍細胞の分離方法（以下、「ＣＴＣの分離方法」と記載することがある）が提供される。

[0035] 本発明に係るＣＴＣの分離方法のある特定の局面では、前記遠心分離工程

において、血球凝集剤と前記検体とが混合された液が収容された循環腫瘍細胞分離容器を遠心分離する。

発明の効果

[0036] 本発明によれば、採血してからそれほど時間が経過していない検体を用いた場合だけでなく、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、循環腫瘍細胞の回収率を高めることができる循環腫瘍細胞分離キット及び循環腫瘍細胞分離容器を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0037] [図1]図１は、本発明の一実施形態に係る循環腫瘍細胞分離キットを模式的に示す正面断面図である。

[図2]図２は、本発明の一実施形態に係る循環腫瘍細胞分離容器を模式的に示す正面断面図である。

発明を実施するための形態

[0038] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0039] 本発明に係る循環腫瘍細胞分離キット（以下、「ＣＴＣ分離キット」と記載することがある）は、血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる。本発明に係るＣＴＣ分離キットは、水溶液が収容されており、かつ所定量の血液が採取される血液採取容器と、２５℃での比重が１．０６５以上１．０８０以下の細胞分離材が収容された細胞分離容器とを備える。本発明に係るＣＴＣ分離キットでは、上記水溶液が、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含む。本発明に係るＣＴＣ分離キットでは、上記血液採取容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を血液採取容器内に採取して、上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された混合液を得たときに、上記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である。

[0040] 本発明に係る循環腫瘍細胞分離容器（以下、「ＣＴＣ分離容器」と記載することがある）は、血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる。本

発明に係るＣＴＣ分離容器は、所定量の血液が採取される循環腫瘍細胞分離容器である。本発明に係るＣＴＣ分離容器は、容器本体と、上記容器本体内に収容された水溶液と、上記容器本体内に収容された２５℃での比重が１．０６５以上１．０８０以下の細胞分離材とを備える。本発明に係るＣＴＣ分離容器では、上記水溶液が、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含む。本発明に係るＣＴＣ分離容器では、上記ＣＴＣ分離容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水をＣＴＣ分離容器内に採取して、上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された混合液を得たときに、上記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である。

[0041] 本発明に係るＣＴＣ分離キット及びＣＴＣ分離容器では、上記の構成が備えられているので、採血してからそれほど時間が経過していない検体を用いた場合だけでなく、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）の回収率を高めることができる。

[0042] 本発明に係るＣＴＣ分離キットでは、血液を血液採取容器に採取すると、上記血液と上記水溶液とが混合された混合液（検体）が得られる。混合液の浸透圧は適度に小さいため、ＣＴＣが安定化しやすい。また、上記水溶液に含まれる上記低分子化合物又は上記高分子化合物の作用により、ＣＴＣが安定化しやすい。このため、本発明に係るＣＴＣ分離キットでは、採血してからそれほど時間が経過していない検体を用いた場合だけでなく、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率を高めることができる。なお、本発明に係るＣＴＣ分離容器でも、同様の作用により、採血してからそれほど時間が経過していない検体を用いた場合だけでなく、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率を高めることができる。

[0043] また、遠心分離により血液中のＣＴＣを分離する従来の方法では、血液を採取してから遠心分離操作を行うまでの間に検体が保管された場合に、保管

中に細胞死及び細胞形態の変化が進行する。そのため、保管時間が長くなるにつれて、遠心分離後に、分離材により形成される隔壁上に混入する赤血球数及び白血球数が増加する。蛍光顕微鏡による観察やＮＧＳによる分析では、癌細胞の純度が高いことが好ましいため、混入する血球数が増えると、ＣＴＣの検出感度が低下する。さらに、上記特許文献１のように、遠心分離後にバフィーコートからＣＴＣを分離する場合には、ＣＴＣと共に白血球等の不要な細胞も一緒に回収されるため、セルソーター等を用いて、不要な細胞の除去が必要になり、操作が煩雑になる。

[0044] これに対して、本発明に係るＣＴＣ分離キット及びＣＴＣ分離容器では、上記の構成が備えられているので、保管中の細胞死及び細胞形態の変化を抑えることができ、また、白血球の混入も抑えることができる。そのため、本発明に係るＣＴＣ分離キット及びＣＴＣ分離容器では、ＣＴＣを簡便かつ安定的に、しかも高い回収率で分離することができる。

[0045] 図面を参照しつつ、本発明の具体的な実施形態を説明する。

[0046] 図１は、本発明の一実施形態に係る循環腫瘍細胞分離キットを模式的に示す正面断面図である。

[0047] 図１に示すＣＴＣ分離キット５は、血液採取容器１と、細胞分離容器２とを備える。

[0048] 血液採取容器１は、血液採取容器本体１１と、水溶液１２と、栓体１３とを備える。血液採取容器本体１１は、一端に開口を有し、他端に閉じられている底部を有する。水溶液１２は、血液採取容器本体１１内に収容されている。水溶液１２は、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含む。栓体１３は、血液採取容器本体１１の開口に挿入されている。

[0049] 細胞分離容器２は、細胞分離容器本体２１と、細胞分離材２２と、栓体２３とを備える。細胞分離容器本体２１は、一端に開口を有し、他端に閉じられている底部を有する。細胞分離材２２は、細胞分離容器本体２１内に収容

されている。細胞分離材２２の２５℃での比重は１．０６５以上１．０８０以下である。栓体２３は、細胞分離容器本体２１の開口に挿入されている。

[0050] 図２は、本発明の一実施形態に係る循環腫瘍細胞分離容器を模式的に示す正面断面図である。

[0051] 図２に示すＣＴＣ分離容器６は、容器本体６１と、水溶液６２と、細胞分離材６３と、栓体６４とを備える。容器本体６１は、一端に開口を有し、他端に閉じられている底部を有する。水溶液６２及び細胞分離材６３は、容器本体６１内に収容されている。水溶液６２は、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含む。細胞分離材６３の２５℃での比重は１．０６５以上１．０８０以下である。栓体６４は、容器本体６１の開口に挿入されている。

[0052] 次に、本発明で用いられる上記水溶液及び上記細胞分離材について説明する。

[0053] （水溶液）

上記水溶液は、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物（以下、「低分子化合物（Ａ）」と記載することがある）又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物（以下、「高分子化合物（Ｂ）」と記載することがある）を含む。したがって、上記水溶液は、抗凝固剤を含み、かつ、低分子化合物（Ａ）又は高分子化合物（Ｂ）を含む。上記水溶液は、抗凝固剤と、水とを含むことが好ましい。上記水溶液に含まれる溶質は、抗凝固剤を含む。上記水溶液に含まれる溶質は、低分子化合物（Ａ）又は高分子化合物（Ｂ）を含む。本発明の効果をより一層効果的に発揮させる観点からは、上記水溶液は、低分子化合物（Ａ）と高分子化合物（Ｂ）とを含むことが好ましい。

[0054] ＜抗凝固剤＞

上記水溶液は、抗凝固剤を含む。上記抗凝固剤として、従来公知の抗凝固剤を用いることができる。上記抗凝固剤は、１種のみが用いられてもよく、

２種以上が併用されてもよい。

[0055] 上記抗凝固剤としては、ヘパリン、ヘパリンの金属塩、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）、ＥＤＴＡの金属塩及びクエン酸等が挙げられる。

[0056] 抗凝固性能を良好に発揮させる観点から、上記抗凝固剤は、ＥＤＴＡ、ＥＤＴＡの金属塩、ヘパリン、ヘパリンの金属塩又はクエン酸ナトリウムであることが好ましい。

[0057] 上記水溶液における上記抗凝固剤の濃度は、好ましくは２ｍＭ以上、より好ましくは５ｍＭ以上、更に好ましくは１０ｍＭ以上、好ましくは２０００ｍＭ以下、より好ましくは１０００ｍＭ以下、より一層好ましくは５００ｍＭ以下、更に好ましくは２５０ｍＭ以下、更により一層好ましくは１００ｍＭ以下、特に好ましくは５０ｍＭ以下である。上記抗凝固剤の濃度が上記下限以上及び上記上限以下であると、抗凝固性能を良好に発揮させることができる。

[0058] ＜分子量が７５以上５００以下の低分子化合物＞

上記水溶液は、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物（低分子化合物（Ａ））を含むことが好ましい。低分子化合物（Ａ）は、抗凝固剤とは異なる化合物である。低分子化合物（Ａ）を用いることにより、浸透圧が調整しやすくなる。低分子化合物（Ａ）は、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0059] 低分子化合物（Ａ）の分子量は、９０以上であってもよく、２００以上であってもよく、３５０以下であってもよく、２５０以下であってもよい。

[0060] 低分子化合物（Ａ）の分子量は、該低分子化合物（Ａ）の構造式が特定できる場合は、当該構造式から算出できる分子量を意味し、該低分子化合物（Ａ）の構造式が特定できない場合は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（ＧＰＣ）により測定されるポリスチレン換算での数平均分子量を示す。

[0061] 低分子化合物（Ａ）は、細胞膜保護作用を有する化合物を含むことが好ましい。この場合には、ＣＴＣの安定性をより一層高めることができるので、

採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。

[0062] 低分子化合物（Ａ）としては、無機塩、糖類、糖アルコール、硫酸アンモニウム、アデニン、及びプロピレングリコール等が挙げられる。

[0063] 上記無機塩としては、リン酸水素ナトリウム等のナトリウム塩、及び炭酸水素カリウム等のカリウム塩等が挙げられる。

[0064] 上記糖類としては、グルコース、トレハロース、ジヒドロキシアセトン、フルクトース、ガラクトース、スクロース、マルトース、及びラクツロース等が挙げられる。なお、トレハロースは、細胞膜保護作用を有する化合物である。

[0065] 上記糖アルコールとしては、イノシトール、Ｄ－マンニトール及びＤ－ソルビトール等が挙げられる。

[0066] 低分子化合物（Ａ）は、トレハロース、硫酸アンモニウム、グルコース、アデニン、又はイノシトールを含むことが好ましく、トレハロース、又は硫酸アンモニウムを含むことがより好ましく、トレハロースと、硫酸アンモニウムとを含むことが更に好ましい。低分子化合物（Ａ）は、トレハロースを含むことが好ましく、硫酸アンモニウムを含むことも好ましい。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0067] 上記水溶液１００重量％中、低分子化合物（Ａ）の含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０．１重量％以上、更に好ましくは１重量％以上、好ましくは１０重量％以下、より好ましくは９．５重量％以下、更に好ましくは７重量％以下、特に好ましくは５重量％以下である。低分子化合物（Ａ）の含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0068] 上記水溶液がトレハロースを含む場合に、上記水溶液１００重量％中、トレハロースの含有量は、好ましくは０．５重量％以上、より好ましくは１重量％以上、更に好ましくは２重量％以上、好ましくは９重量％以下、より好ましくは８重量％以下、更に好ましくは６重量％以下である。上記トレハロ

ースの含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣをより一層安定化させることができ、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。

[0069] 上記水溶液が硫酸アンモニウムを含む場合に、上記水溶液１００重量％中、硫酸アンモニウムの含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０．１重量％以上、更に好ましくは１重量％以上、好ましくは９重量％以下、より好ましくは８重量％以下、更に好ましくは６重量％以下である。上記硫酸アンモニウムの含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣをより一層安定化させることができ、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。

[0070] 上記水溶液がグルコースを含む場合に、上記水溶液１００重量％中、グルコースの含有量は、好ましくは０．１重量％以上、より好ましくは０．３重量％以上、好ましくは１０重量％以下、より好ましくは５重量％以下である。上記グルコースの含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。特に、上記グルコースの含有量が上記下限以上であると、ＣＴＣへ栄養源が供給されるので、ＣＴＣの生存率を高めることができ、その結果、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。

[0071] 上記水溶液がアデニンを含む場合に、上記水溶液１００重量％中、アデニンの含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０．０５重量％以上、好ましくは９重量％以下、より好ましくは５重量％以下である。上記アデニンの含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。特に、上記アデニンの含有量が上記下限以上であると、ＣＴＣへ栄養源が供給されるので、ＣＴＣの生存率を高めることができ、その結果、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。

[0072] 上記水溶液がイノシトールを含む場合に、上記水溶液１００重量％中、イノシトールの含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０

．０５重量％以上、好ましくは９重量％以下、より好ましくは５重量％以下である。上記イノシトールの含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。特に、上記イノシトールの含有量が上記下限以上であると、ＣＴＣへ栄養源が供給されるので、ＣＴＣの生存率を高めることができ、その結果、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。

[0073] 上記水溶液１００重量％中、低分子化合物（Ａ）と水との合計含有量は、好ましくは７５重量％以上、より好ましくは８０重量％以上、更に好ましくは８５重量％以上、好ましくは９９．５重量％以下である。上記合計含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0074] ＜数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物＞

上記水溶液は、数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満（２千以上２０万未満）の高分子化合物（高分子化合物（Ｂ））を含むことが好ましい。高分子化合物（Ｂ）は、抗凝固剤とは異なる化合物である。高分子化合物（Ｂ）を用いることにより、本発明の効果が発揮される理由は、高分子化合物（Ｂ）がＣＴＣの細胞膜を効果的に保護することによって、ＣＴＣを安定化させるためであると推察されるが、これに限定されない。高分子化合物（Ｂ）は、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0075] 高分子化合物（Ｂ）の数平均分子量は、好ましくは３，０００以上、より好ましくは１０，０００以上、更に好ましくは２０，０００以上、好ましくは１５０，０００以下、より好ましくは１００，０００以下である。高分子化合物（Ｂ）の数平均分子量が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣをより一層安定化させることができ、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。

[0076] 高分子化合物（Ｂ）の数平均分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（ＧＰＣ）により測定されるポリスチレン換算での数平均分子量を示す。

[0077] 高分子化合物（Ｂ）は、赤血球凝集作用を有さない化合物であることが好ましい。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0078] 高分子化合物（Ｂ）は、細胞膜保護作用を有する化合物を含むことが好ましい。この場合には、ＣＴＣの安定性をより一層高めることができるので、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。

[0079] 高分子化合物（Ｂ）は、数平均分子量が１０，０００以上２００，０００未満の高分子化合物（以下、高分子化合物（Ｂ１）と記載することがある）を含むことが好ましい。高分子化合物（Ｂ）は、高分子化合物（Ｂ１）と、数平均分子量が２，０００以上１０，０００未満の高分子化合物（以下、高分子化合物（Ｂ２）と記載することがある）とを含むことがより好ましい。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0080] 高分子化合物（Ｂ１）の数平均分子量は、１０，０００以上２００，０００未満であり、好ましくは２０，０００以上、より好ましくは３０，０００以上、好ましくは１５０，０００以下、より好ましくは１００，０００以下である。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0081] 高分子化合物（Ｂ２）の数平均分子量は、２，０００以上１０，０００未満であり、好ましくは３，０００以上、好ましくは８，０００以下、より好ましくは５，０００以下である。この場合には、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0082] 高分子化合物（Ｂ）としては、デキストラン、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース及びコーンスターチ等が挙げられる。

[0083] 高分子化合物（Ｂ）は、デキストラン、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドンであることが好ましい。高分子化合物（Ｂ１）は、デキストラン、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドンであること

が好ましい。高分子化合物（Ｂ２）は、デキストラン、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドンであることが好ましい。この場合には、ＣＴＣをより一層安定化させることができ、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。

[0084] 上記水溶液１００重量％中、高分子化合物（Ｂ）の各含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０．１重量％以上、更に好ましくは１重量％以上、好ましくは１５重量％以下、より好ましくは１０重量％以下、更に好ましくは８重量％以下である。高分子化合物（Ｂ）の各含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣをより一層安定化させることができ、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。なお、上記「高分子化合物（Ｂ）の各含有量」とは、上記水溶液が１種類の高分子化合物（Ｂ）を含む場合に、該高分子化合物（Ｂ）の含有量を意味し、上記水溶液が２種類以上の高分子化合物（Ｂ）を含む場合に、高分子化合物（Ｂ）それぞれの含有量を意味する。

[0085] 上記水溶液１００重量％中、高分子化合物（Ｂ）の含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０．１重量％以上、更に好ましくは１重量％以上、好ましくは２０重量％以下、より好ましくは１５重量％以下、更に好ましくは１０重量％以下である。高分子化合物（Ｂ）の含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣをより一層安定化させることができ、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。

[0086] 上記水溶液１００重量％中、高分子化合物（Ｂ）と水との合計含有量は、好ましくは７５重量％以上、より好ましくは８０重量％以上、更に好ましくは８５重量％以上、特に好ましくは９０重量％以上、好ましくは９９．５重量％以下である。上記合計含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0087] 上記水溶液１００重量％中、低分子化合物（Ａ）と高分子化合物（Ｂ）と水との合計含有量は、好ましくは８０重量％以上、より好ましくは９０重量

％以上、更に好ましくは９５重量％以上、特に好ましくは９８重量％以上、好ましくは９９．５重量％以下である。上記合計含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0088] ＜他の成分＞

上記水溶液は、本発明の効果を損なわない限り、上述した成分（抗凝固剤、低分子化合物（Ａ）及び高分子化合物（Ｂ））以外の他の成分を含んでいてもよい。

[0089] （細胞分離材）

上記細胞分離材として、従来公知の細胞分離材を用いることができる。細胞分離材は、遠心分離後に、ＣＴＣを含む血漿と、赤血球等の血球細胞との間に隔壁を形成可能な比重を有する。上記細胞分離材としては、細胞分離用組成物、及び細胞分離用冶具等が挙げられる。細胞分離材の作製が容易であることから、上記細胞分離材は、上記細胞分離用組成物であることが好ましい。

[0090] 遠心分離後にＣＴＣと血球細胞との間に隔壁を形成し、ＣＴＣと血球細胞とを良好に分離する観点から、上記細胞分離材の２５℃での比重は、１．０６５以上１．０８０以下である。

[0091] 上記細胞分離材の２５℃での比重は、好ましくは１．０６７以上、より好ましくは１．０７０以上、好ましくは１．０７９以下、より好ましくは１．０７８以下、更に好ましくは１．０７７以下、特に好ましくは１．０７５以下、最も好ましくは１．０７３以下である。上記細胞分離材の２５℃での比重が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣと血球細胞とをより一層良好に分離することができ、また、血漿中への血球細胞の混入をより一層効果的に抑えることができる。

[0092] ＜細胞分離用組成物＞

上記細胞分離用組成物は、遠心分離時に血漿層と血球層との間に移動して隔壁を形成する組成物である。上記細胞分離用組成物は、チクソトロピー性

を有することが好ましい。

[0093] 上記細胞分離用組成物は、２５℃で流動性を有する有機成分と、無機微粉末とを含むことが好ましい。上記２５℃で流動性を有する有機成分、及び上記無機微粉末はそれぞれ、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0094] ２５℃で流動性を有する有機成分：

上記「２５℃で流動性を有する」とは、２５℃での粘度が５００Ｐａ・ｓ以下であることを意味する。

[0095] 上記有機成分の２５℃での粘度は、好ましくは１０Ｐａ・ｓ以上、より好ましくは３０Ｐａ・ｓ以上、好ましくは３５０Ｐａ・ｓ以下、より好ましくは２００Ｐａ・ｓ以下である。上記粘度が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞分離用組成物の流動性が高められ、遠心分離操作により形成される隔壁の強度を高めることができる。

[0096] 上記有機成分の２５℃での粘度は、Ｅ型粘度計（例えば、東機産業社製「ＴＶＥ－３５」）を用いて、２５℃及びせん断速度１．０秒$^{-1}$の条件で測定される。

[0097] 上記有機成分としては、樹脂、及び樹脂と可塑剤等の有機化合物との混合物等が挙げられる。したがって、上記有機成分は、上記樹脂を含むことが好ましく、上記樹脂と上記有機化合物とを含むことがより好ましい。上記有機成分が、上記樹脂と上記有機化合物との混合物である場合に、該混合物（上記有機成分）として流動性を有していればよく、該樹脂又は該有機化合物が流動性を有していなくてもよい。上記有機成分が、上記樹脂と上記有機化合物との混合物である場合に、該樹脂は、例えば、２５℃で固体の樹脂であってもよい。上記樹脂及び上記有機化合物はそれぞれ１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0098] 上記樹脂としては、石油樹脂、シクロペンタジエン系樹脂、ポリエステル樹脂、ポリウレタン樹脂、（メタ）アクリル系樹脂、シリコーン樹脂、α－オレフィン－フマル酸エステル共重合体、セバシン酸と２，２－ジメチル－

１，３－プロパンジオールと１，２－プロパンジオールとの共重合体、ポリエーテルポリウレタン系樹脂、及びポリエーテルポリエステル系樹脂等が挙げられる。上記樹脂は、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0099] 上記樹脂は、石油樹脂、シクロペンタジエン系樹脂、ポリエステル樹脂又は（メタ）アクリル系樹脂を含むことが好ましい。

[0100] 上記石油樹脂の市販品としては、イーストマンケミカル社製「リガライトＳ５０９０」等が挙げられる。

[0101] 上記シクロペンタジエン系樹脂としては、シクロペンタジエン系モノマーの重合体、シクロペンタジエン系モノマーと芳香族系モノマーとの共重合体、及びジシクロペンタジエン樹脂等が挙げられる。上記シクロペンタジエン系樹脂は、水素添加されていてもよい。上記シクロペンタジエン系モノマーの重合体及び上記シクロペンタジエン系モノマーと芳香族系モノマーとの共重合体は、オリゴマーであってもよい。

[0102] 上記シクロペンタジエン系モノマーとしては、シクロペンタジエン、ジシクロペンタジエン、及びシクロペンタジエンのアルキル置換誘導体等が挙げられる。

[0103] 上記芳香族系モノマーとしては、スチレン、メチルスチレン、インデン、及びメチルインデン等が挙げられる。

[0104] 上記ジシクロペンタジエン樹脂の市販品としては、コロン社製「スコレッツＳＵ５００」及び「スコレッツＳＵ９０」等が挙げられる。

[0105] 上記ポリエステル樹脂としては、ポリアルキレンテレフタレート樹脂、及びポリアルキレンナフタレート樹脂等が挙げられる。上記ポリアルキレンテレフタレート樹脂としては、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート及びポリ－１，４－シクロヘキサンジメチレンテレフタレート等が挙げられる。

[0106] 上記ポリウレタン樹脂としては、ポリオール化合物とイソシアネート化合物との反応物等が挙げられる。

[0107] 上記（メタ）アクリル系樹脂としては、少なくとも１種の（メタ）アクリル酸エステル単量体を重合することにより得られる樹脂、及び少なくとも１種の（メタ）アクリル酸エステル単量体と少なくとも１種の該（メタ）アクリル酸エステル単量体以外の単量体とを重合することにより得られる樹脂が挙げられる。

[0108] 上記（メタ）アクリル酸エステル単量体としては、（メタ）アクリル酸アルキルエステル、（メタ）アクリル酸ポリアルキレングリコールエステル、（メタ）アクリル酸アルコキシアルキルエステル、（メタ）アクリル酸ヒドロキシアルキルエステル、（メタ）アクリル酸グリシジルエステル、（メタ）アクリル酸ジアルキルアミノアルキルエステル、（メタ）アクリル酸ベンジルエステル、（メタ）アクリル酸フェノキシアルキルエステル、（メタ）アクリル酸シクロヘキシルエステル、（メタ）アクリル酸イソボルニルエステル、及び（メタ）アクリル酸アルコキシシリルアルキルエステル等が挙げられる。上記（メタ）アクリル酸エステル単量体がアルキル基を有する場合に、該アルキル基の炭素数は、好ましくは１以上、好ましくは２０以下である。上記（メタ）アクリル酸アルキルエステルは、炭素数が１以上２０以下であるアルキル基を有する（メタ）アクリル酸アルキルエステルであることが好ましい。上記（メタ）アクリル酸エステル単量体は、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0109] 上記有機化合物としては、ベンゼンポリカルボン酸アルキルエステル誘導体等が挙げられる。上記有機化合物は、ベンゼンポリカルボン酸アルキルエステル誘導体であることが好ましい。したがって、上記有機成分は、上記樹脂と、上記ベンゼンポリカルボン酸アルキルエステル誘導体との混合物であることが好ましい。

[0110] 上記ベンゼンポリカルボン酸アルキルエステル誘導体としては、フタル酸エステル、トリメリット酸エステル、及びピロメリット酸エステル等が挙げられる。上記ベンゼンポリカルボン酸アルキルエステル誘導体は、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0111] 上記トリメリット酸エステルとしては、トリメリット酸トリｎ－オクチル、トリメリット酸トリイソオクチル、及びトリメリット酸トリイソデシル等が挙げられる。

[0112] 上記ピロメリット酸エステルとしては、ピロメリット酸テトライソオクチル等が挙げられる。

[0113] 上記トリメリット酸エステルの市販品としては、ＤＩＣ社製「モノサイザーＷ７００」、及び「モノサイザーＷ－７５０」、新日本理化社製「サンソサイザーＴＯＴＭ」及び「サンソサイザーＴＩＴＭ」等が挙げられる。

[0114] 上記ピロメリット酸エステルの市販品としては、ＤＩＣ社製「モノサイザーＷ－７０１０」等が挙げられる。

[0115] 上記ベンゼンポリカルボン酸アルキルエステル誘導体は、フタル酸エステル、トリメリット酸エステル、又はピロメリット酸エステルであることが好ましく、トリメリット酸エステルであることがより好ましい。

[0116] 上記細胞分離用組成物１００重量％中、上記有機成分の含有量は、好ましくは８０重量％以上、より好ましくは８５重量％以上、更に好ましくは９０重量％以上、好ましくは９７重量％以下である。

[0117] 無機微粉末：

上記無機微粉末としては、微粉末シリカ、酸化チタン粉末、炭酸カルシウム粉末、酸化亜鉛粉末、アルミナ粉末、ガラス微粉末、タルク粉末、カオリン粉末、ベントナイト粉末、チタニア粉末、及びジルコニウム粉末等が挙げられる。

[0118] 細胞分離用組成物の比重とチクソトロピー性との双方を共に好適な範囲に維持する観点からは、上記無機微粉末は、微粉末シリカを含むことが好ましい。細胞分離用組成物の比重を効果的に大きくする観点からは、上記無機微粉末は、微粉末シリカと、微粉末シリカ以外の無機微粉末（第２の無機微粉末）とを含むことがより好ましい。上記無機微粉末、上記微粉末シリカ及び上記第２の無機微粉末はそれぞれ、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0119] 上記微粉末シリカとしては、天然シリカ及び合成シリカが挙げられる。合成シリカとしては、親水性シリカ及び疎水性シリカが挙げられる。親水性シリカは、例えば、粒子表面の水酸基同士が水素結合することにより、細胞分離用組成物にチクソトロピー性を付与すると共に、比重を調整する作用を有する。一方、疎水性シリカは、親水性シリカに比べてチクソトロピー性の付与効果は小さい。

[0120] 細胞分離用組成物の比重とチクソトロピー性との双方を共に好適な範囲に維持する観点からは、上記微粉末シリカは、親水性シリカを含むことが好ましく、親水性シリカと疎水性シリカとを含むことがより好ましい。

[0121] 上記第２の無機微粉末は、微粉末シリカよりも比重が大きい無機微粉末であることが好ましく、酸化亜鉛粉末、酸化チタン粉末、アルミナ粉末等の比重が２．５以上である無機微粉末であることがより好ましい。

[0122] 上記第２の無機微粉末の比重は、好ましくは２．５以上、より好ましくは３以上、更に好ましくは３．５以上、特に好ましくは４以上である。上記第２の無機微粉末の比重は大きいほどよい。上記比重が上記下限以上であると、細胞分離用組成物の比重を効果的に大きくすることができる。

[0123] 上記無機微粉末、上記微粉末シリカ及び上記第２の無機微粉末の平均粒子径は、特に限定されない。上記無機微粉末、上記微粉末シリカ及び上記第２の無機微粉末の平均粒子径は、１ｎｍ以上であってもよく、１０ｎｍ以上であってもよく、５００ｎｍ以下であってもよく、１００ｎｍ以下であってもよい。

[0124] 上記無機微粉末、上記微粉末シリカ及び上記第２の無機微粉末の平均粒子径は、体積基準で測定される平均径であり、５０％となるメディアン径（Ｄ５０）の値である。上記体積平均粒子径（Ｄ５０）は、レーザー回折・散乱法、画像解析法、コールター法、及び遠心沈降法等により測定可能である。上記体積平均粒子径（Ｄ５０）は、レーザー回折・散乱法又は画像解析法による測定により求めることが好ましい。

[0125] 上記微粉末シリカの比表面積は、特に限定されない。上記微粉末シリカの

比表面積は、２０ｍ^2／ｇ以上であってもよく、１００ｍ^2／ｇ以上であってもよく、５００ｍ^2／ｇ以下であってもよく、３００ｍ^2／ｇ以下であってもよい。

[0126] 上記微粉末シリカの比表面積は、ＢＥＴ法により測定される。

[0127] 上記細胞分離用組成物１００重量％中、上記親水性シリカの含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０．１０重量％以上、更に好ましくは０．３０重量％以上、好ましくは２．５０重量％以下、より好ましくは２．００重量％以下である。上記親水性シリカの含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞分離用組成物の比重とチクソトロピー性との双方をより一層好適な範囲に維持することができる。

[0128] 上記細胞分離用組成物１００重量％中、上記微粉末シリカの含有量は、好ましくは０．１重量％以上、より好ましくは０．５重量％以上、好ましくは１０重量％以下、より好ましくは７重量％以下である。上記微粉末シリカの含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞分離用組成物の比重とチクソトロピー性との双方をより一層好適な範囲に維持することができる。

[0129] 上記細胞分離用組成物１００重量％中、上記第２の無機微粉末の含有量は、好ましくは０．０１重量％以上、より好ましくは０．１重量％以上、好ましくは１０重量％以下、より好ましくは７重量％以下である。上記第２の無機微粉末の含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞分離用組成物の比重を効果的に大きくすることができる。

[0130] 上記細胞分離用組成物１００重量％中、上記無機微粉末の含有量は、好ましくは０．１重量％以上、より好ましくは０．５重量％以上、好ましくは１０重量％以下、より好ましくは７重量％以下である。上記無機微粉末の含有量が上記下限以上及び上記上限以下であると、細胞分離用組成物の比重を効果的に大きくすることができる。

[0131] 他の成分：

上記細胞分離用組成物は、本発明の効果を損なわない限り、上述した成分

以外の他の成分を含んでいてもよい。上記他の成分としては、有機ゲル化剤、熱可塑性エラストマー、ポリアルキレングリコール、シリコーンオイル、補助溶媒、酸化防止剤、着色剤及び水等が挙げられる。上記他の成分はそれぞれ、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0132] 上記細胞分離用組成物の２５℃での比重は、１．０６５以上１．０８０以下である。上記細胞分離用組成物の２５℃での比重は、好ましくは１．０６７以上、より好ましくは１．０７０以上、好ましくは１．０７９以下、より好ましくは１．０７８以下、更に好ましくは１．０７７以下、特に好ましくは１．０７５以下、最も好ましくは１．０７３以下である。上記細胞分離用組成物の２５℃での比重が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣと赤血球等の血球細胞とをより一層良好に分離することができ、また、血漿中への血球細胞の混入をより一層効果的に抑えることができる。

[0133] 上記細胞分離用組成物の２５℃での比重は、細胞分離用組成物１滴を、比重を０．００２の間隔で段階的に調整した２５℃の食塩水中に順次滴下し、食塩水中における浮沈により測定される。

[0134] 上記細胞分離用組成物の２５℃での粘度は、好ましくは５０Ｐａ・ｓ以上、より好ましくは７０Ｐａ・ｓ以上、好ましくは５００Ｐａ・ｓ以下、より好ましくは４００Ｐａ・ｓ以下である。上記粘度が上記下限以上及び上記上限以下であると、本発明の効果をより一層効果的に発揮させることができる。

[0135] 上記細胞分離用組成物の２５℃での粘度は、Ｅ型粘度計（例えば、東機産業社製「ＴＶＥ－３５」）を用いて、２５℃及びせん断速度１．０秒$^{-1}$の条件で測定される。

[0136] ＜細胞分離用冶具＞

上記細胞分離用冶具は、遠心分離時に血漿層と血球層との間に移動して隔壁を形成する冶具である。

[0137] 上記細胞分離用冶具としては、例えば、ＷＯ２０１０／１３２７８３Ａ１等に記載の機械的セパレータ（細胞分離用冶具）等が挙げられる。

[0138] 上記細胞分離用冶具の材料としては、例えば、エラストマー等が挙げられる。

[0139] （循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）分離キット）

上記ＣＴＣ分離キットは、血液採取容器と、細胞分離容器とを備える。上記ＣＴＣ分離キットは、後述するように、血球凝集剤をさらに備えることが好ましい。

[0140] ＜血液採取容器＞

上記血液採取容器は、血液採取容器本体と、上記血液採取容器本体内に収容された上記水溶液とを備える。したがって、上記血液採取容器には、上記水溶液が収容されている。また、上記血液採取容器には、所定量の血液が採取される。

[0141] 上記血液採取容器本体内に収容されている水溶液の量は、血液採取容器本体のサイズ、及び採取される血液量等により適宜変更される。上記血液採取容器本体内に収容されている水溶液の量は、好ましくは０．１ｍＬ以上、より好ましくは０．５ｍＬ以上、更に好ましくは０．７ｍＬ以上、好ましくは５ｍＬ以下、より好ましくは３ｍＬ以下、更に好ましくは２．５ｍＬ以下である。上記水溶液の量が上記下限以上及び上記上限以下であると、血液が過度に希釈されることなく、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0142] 上記血液採取容器は、所定量の血液が採取される血液採取容器である。上記血液の上記所定量は、血液採取容器のサイズ及び内圧等により適宜変更される。上記血液の上記所定量は、１ｍＬ以上であってもよく、２ｍＬ以上であってもよく、４ｍＬ以上であってもよく、１２ｍＬ以下であってもよく、１１ｍＬ以下であってもよく、１０ｍＬ以下であってもよい。

[0143] 上記血液採取容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を上記血液採取容器内に採取して、上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された混合液を得る。例えば、５ｍＬの血液が採取される血液採取容器では、５ｍＬの生理食塩水を該血液採取容器内に採取して、転倒混和するなどして、上記生

理食塩水と上記水溶液とを混合し、混合液を得る。本発明の効果を発揮させる観点から、上記ＣＴＣ分離キットでは、上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された上記混合液の浸透圧は、２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である。上記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下であるとは、血液採取容器内に採取された血液と上記水溶液とが混合された検体の浸透圧が過度に小さくなくかつ過度に大きくないことを意味する。上記混合液の浸透圧が上記下限以上及び上記上限以下であることにより、ＣＴＣの細胞死を抑えることができ、かつＣＴＣの細胞形態を維持でき、また、白血球の混入も抑えることができる。そのため、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率を高めることができる。

[0144] 上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された上記混合液の浸透圧は、好ましくは２７５ｍＯｓｍ／Ｌ以上、より好ましくは２８０ｍＯｓｍ／Ｌ以上、更に好ましくは２８５ｍＯｓｍ／Ｌ以上、特に好ましくは２９０ｍＯｓｍ／Ｌ以上、好ましくは３４０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、より好ましくは３３０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、より一層好ましくは３２０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、更に好ましくは３１０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、特に好ましくは３００ｍＯｓｍ／Ｌ以下である。上記混合液の浸透圧が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣの細胞死をより一層抑えることができ、かつＣＴＣの細胞形態をより一層良好に維持することができる。そのため、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。

[0145] 上記混合液の浸透圧は、浸透圧計（例えば、アークレイ社製「ＯＭ－６０６０」）を用いて、氷点降下法により測定される。

[0146] 上記血液採取容器では、収容されている上記水溶液１ｍＬに対して、血液が３ｍＬ以上採取されることが好ましく、４ｍＬ以上採取されることがより好ましく、１１ｍＬ以下採取されることが好ましく、１０ｍＬ以下採取されることがより好ましい。この場合には、血液が過度に希釈されることなく、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0147] 上記血液採取容器本体の形状は特に限定されない。上記血液採取容器本体は、有底の管状容器であることが好ましい。

[0148] 上記血液採取容器本体の素材は特に限定されない。上記血液採取容器本体の素材としては、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリロニトリル等の熱可塑性樹脂；不飽和ポリエステル樹脂、エポキシ樹脂、エポキシ－アクリレート樹脂等の熱硬化性樹脂；酢酸セルロース、プロピオン酸セルロース、エチルセルロース、エチルキチン等の変性天然樹脂；ソーダ石灰ガラス、リンケイ酸ガラス、ホウケイ酸ガラス等のケイ酸塩ガラス、石英ガラス等のガラスが挙げられる。上記血液採取容器本体の素材は、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0149] 容器強度、酸素バリア性及び内容物の視認性を良好にする観点からは、上記血液採取容器本体の素材は、ポリエチレンテレフタレートであることが好ましい。

[0150] 上記血液採取容器は、栓体を備えることが好ましい。上記栓体は、血液採取容器本体の開口に取り付けられていることが好ましい。上記栓体として、従来公知の栓体を用いることができる。上記栓体は、血液採取容器本体の開口に、気密的かつ液密的に取付けることが可能な素材及び形状からなる栓体であることが好ましい。上記栓体は、採血針が刺通され得るように構成されていることが好ましい。

[0151] 上記栓体としては、血液採取容器本体の開口に嵌合する形状を有する栓体、及びシート状のシール栓体等が挙げられる。

[0152] また、上記栓体は、ゴム栓等の栓本体と、プラスチック等で構成されたキャップ部材とを備える栓体であってもよい。この場合には、血液採取後に、血液採取容器本体の開口から栓体を引き抜く際に、血液が人体と接触するリスクを抑えることができる。

[0153] 上記栓体（又は上記栓本体）の材料としては、例えば、合成樹脂、エラストマー、ゴム、金属箔等が挙げられる。上記ゴムとしては、ブチルゴム、及

びハロゲン化ブチルゴム等が挙げられる。上記金属箔としては、アルミニウム箔等が挙げられる。密封性を高める観点からは、上記栓体の材料は、ブチルゴムであることが好ましい。上記栓体（又は上記栓本体）は、ブチルゴム栓であることが好ましい。

[0154] 上記血液採取容器の内圧は特に限定されない。上記血液採取容器は、内部が排気された上で、上記栓体によって密閉された真空採血管として用いることもできる。真空採血管である場合、採血者の技術差によらず一定量の血液採取を簡便に行うことができる。

[0155] ＜細胞分離容器＞

上記細胞分離容器は、細胞分離容器本体と、上記細胞分離容器本体内に収容された上記細胞分離材とを備える。したがって、上記細胞分離容器には、上記細胞分離材が収容されている。

[0156] 上記細胞分離材の収容箇所は、上記細胞分離容器本体内であれば特に限定されない。上記細胞分離材は、上記細胞分離容器本体の底部に配置されていてもよく、上記細胞分離容器本体の内壁面上に配置されていてもよい。本発明の効果をより一層効果的に発揮する観点から、上記細胞分離材は、上記細胞分離容器本体の底部に収容されていることが好ましい。

[0157] 上記細胞分離容器本体の形状は特に限定されない。上記細胞分離容器本体は、有底の管状容器であることが好ましい。

[0158] 上記細胞分離容器本体の素材は特に限定されない。上記細胞分離容器本体の素材としては、上記血液採取容器本体の素材の欄に記載したものを用いることができる。

[0159] 細胞吸着を効果的に抑え、ＣＴＣの回収率をより一層向上させる観点からは、上記細胞分離容器本体の素材は、ポリプロピレンであることが好ましい。

[0160] 上記細胞分離容器は、栓体を備えることが好ましい。上記栓体は、細胞分離容器本体の開口に取り付けられていることが好ましい。上記栓体として、従来公知の栓体を用いることができる。上記栓体は、細胞分離容器本体の開

口に、気密的かつ液密的に取付けることが可能な素材及び形状からなる栓体であることが好ましい。上記栓体は、針が刺通され得るように構成されていてもよい。

[0161] 上記栓体としては、上記血液採取容器の栓体の欄に記載したものを用いることができる。

[0162] ＜血球凝集剤＞

上記ＣＴＣ分離キットは、血球凝集剤を備えることが好ましい。上記血球凝集剤は、容器に収容されていることが好ましい。すなわち、上記ＣＴＣ分離キットは、血球凝集剤が収容された第３の容器を備えることが好ましい。血球凝集剤を用いることにより、細胞分離容器を遠心分離した際に、赤血球及び白血球などの不要な血球細胞が細胞分離材よりも下方に移動しやすくなり、ＣＴＣと血球細胞とをより一層良好に分離させることができる。

[0163] 上記血球凝集剤は、ＣＴＣ以外の血球細胞を選択的に凝集させ、遠心分離操作により血球細胞を沈降させやすくすることでＣＴＣの純度を高めることができる薬剤である限り特に限定されない。また、上記血球凝集剤は、１種のみが用いられてもよく、２種以上が併用されてもよい。

[0164] 上記血球凝集剤は、白血球表面に特有な抗原に結合する抗原認識部位を有する抗体を含んでいてもよく、赤血球表面に特有な抗原に結合する抗原認識部位を有する抗体を含んでいてもよい。上記血球凝集剤は、白血球表面に特有な抗原に結合する抗原認識部位と、赤血球表面に特有な抗原に結合する抗原認識部位との双方を有する抗体複合体を含んでいてもよい。上記血球凝集剤は、これらの混合物であってもよい。

[0165] 上記血球凝集剤は、白血球表面に特有な抗原に結合する抗原認識部位と、赤血球表面に特有な抗原に結合する抗原認識部位との双方を有する抗体複合体であることが好ましい。上記血球凝集剤は、抗白血球抗体と抗赤血球抗体との抗体複合体であることが好ましい。

[0166] 上記血球凝集剤の市販品としては、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製「ＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ ｈｕｍａｎ ＣＤ４５ ｄｅｐｌｅ

ｔｉｏｎ　ｃｏｃｋｔａｉｌ」等が挙げられる。

[0167] また、別の凝集作用を有する血球凝集剤としては、比重の大きい担体に、抗白血球抗体又は抗赤血球抗体を物理結合又は化学結合させた血球凝集剤や、マイクロビーズ等の不溶性担体に血球細胞を物理吸着させることが可能な血球凝集剤等が挙げられる。

[0168] （循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）の分離方法（１））

以下、上述したＣＴＣ分離キットを用いて、血液中のＣＴＣを分離する方法について説明する。

[0169] ＜血液採取工程＞

上記ＣＴＣの分離方法（１）は、上記水溶液が収容された上記血液採取容器に血液を採取して、上記血液と上記水溶液とが混合された検体を得る血液採取工程を備える。上記ＣＴＣの分離方法（１）では、上記検体の浸透圧を適度に小さくすることができるので、本発明の効果が効果的に発揮される。上記血液と上記水溶液との混合方法としては、転倒混和等が挙げられる。

[0170] 上記血液採取工程後、検体を血液採取容器内で保管してもよく、保管することなく、次の工程に進んでもよい。なお、保管温度は、好ましくは１℃以上、好ましくは４０℃以下である。

[0171] ＜添加工程＞

上記ＣＴＣの分離方法（１）は、上記細胞分離材が収容された上記細胞分離容器に、上記検体を添加する添加工程を備える。

[0172] 上記添加工程では、上記血液採取容器中の検体の全量を上記細胞分離容器に添加してもよく、上記血液採取容器中の検体の一部を上記細胞分離容器に添加してもよい。上記添加工程で細胞分離容器に添加される検体量は、例えば、１ｍＬ以上、１１ｍＬ以下とすることができる。

[0173] 上記添加工程では、上記細胞分離容器に、上記血液採取容器から採取された上記検体を、フィルターを通して添加することが好ましい。フィルターを通して添加することにより、検体中に存在している凝集物を効果的に取り除くことができる。

[0174] 上記フィルターの孔径は、好ましくは２０μｍ以上、より好ましくは４０μｍ以上、好ましくは１００μｍ以下、より好ましくは７０μｍ以下である。上記孔径が上記下限以上及び上記上限以下であると、検体中に存在している凝集物を効果的に取り除くことができ、かつ、ＣＴＣを良好に細胞分離容器に添加することができる。

[0175] 上記フィルターの市販品としては、pluriSelect Life Science UG&Co,KG社製「pluriSelect」等が挙げられる。

[0176] 上記添加工程後、検体を細胞分離容器内で保管してもよく、保管することなく、次の工程に進んでもよい。なお、保管温度は、好ましくは１℃以上、好ましくは４０℃以下である。

[0177] ＜遠心分離工程＞

上記ＣＴＣの分離方法（１）は、上記検体が添加された上記細胞分離容器を遠心分離する遠心分離工程を備える。遠心分離工程により、細胞分離材によって形成された隔壁よりも下側に血球成分が移動し、上側に血漿及びＣＴＣが移動する。

[0178] 上記遠心分離工程では、血球凝集剤と上記検体とが混合された液が収容された細胞分離容器を遠心分離することが好ましい。上記遠心分離工程では、上記検体が収容された上記細胞分離容器に上記血球凝集剤を添加した後、該細胞分離容器を遠心分離することが好ましい。血球凝集剤を用いることにより、赤血球及び白血球などの不要な血球細胞が細胞分離材よりも下方に移動しやすくなり、ＣＴＣと血球細胞とをより一層良好に分離させることができる。

[0179] 上記遠心分離工程における上記遠心分離条件としては、例えば、４００Ｇ以上４０００Ｇ以下で１０分間以上１２０分間以下遠心分離する条件等が挙げられる。

[0180] ＜回収工程＞

上記ＣＴＣの分離方法（１）は、血漿中に分離された循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を回収する回収工程を備える。遠心分離工程後、ＣＴＣは細胞分離材に

より形成された隔壁上に堆積したり、血漿中に存在したりしている。そのため、ピペッティングにより緩やかに血漿を撹拌して、隔壁上に堆積したＣＴＣを懸濁してから回収することが好ましい。

[0181] （循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）分離容器）

上記ＣＴＣ分離容器は、容器本体と、上記容器本体内に収容された上記水溶液と、上記容器本体内に収容された上記細胞分離材とを備える。したがって、上記ＣＴＣ分離容器には、上記水溶液と、上記細胞分離材とが収容されている。また、上記ＣＴＣ分離容器には、所定量の血液が採取される。

[0182] 上記容器本体内に収容されている水溶液の量は、容器本体のサイズ、及び採取される血液量等により適宜変更される。上記容器本体内に収容されている水溶液の量は、好ましくは０．１ｍＬ以上、より好ましくは０．５ｍＬ以上、更に好ましくは０．７ｍＬ以上、好ましくは５ｍＬ以下、より好ましくは３ｍＬ以下、更に好ましくは２．５ｍＬ以下である。上記水溶液の量が上記下限以上及び上記上限以下であると、血液が過度に希釈されることなく、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0183] 上記ＣＴＣ分離容器は、所定量の血液が採取されるＣＴＣ分離容器である。上記血液の上記所定量は、ＣＴＣ分離容器のサイズ及び内圧等により適宜変更される。上記血液の上記所定量は、１ｍＬ以上であってもよく、２ｍＬ以上であってもよく、４ｍＬ以上であってもよく、１２ｍＬ以下であってもよく、１１ｍＬ以下であってもよく、１０ｍＬ以下であってもよい。

[0184] 上記ＣＴＣ分離容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を上記ＣＴＣ分離容器内に採取して、上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された混合液を得る。例えば、５ｍＬの血液が採取されるＣＴＣ分離容器では、５ｍＬの生理食塩水を該ＣＴＣ分離容器内に採取して、転倒混和するなどして、上記生理食塩水と上記水溶液とを混合し、混合液を得る。本発明の効果を発揮させる観点から、上記ＣＴＣ分離容器では、上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された上記混合液の浸透圧は、２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である。上記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５

０ｍＯｓｍ／Ｌ以下であるとは、ＣＴＣ分離容器内に採取された血液と上記水溶液とが混合された検体の浸透圧が過度に小さくなくかつ過度に大きくないことを意味する。上記混合液の浸透圧が上記下限以上及び上記上限以下であることにより、ＣＴＣの細胞死を抑えることができ、かつＣＴＣの細胞形態を維持でき、また、白血球の混入も抑えることができる。そのため、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率を高めることができる。

[0185] 上記生理食塩水と上記水溶液とが混合された上記混合液の浸透圧は、好ましくは２７５ｍＯｓｍ／Ｌ以上、より好ましくは２８０ｍＯｓｍ／Ｌ以上、更に好ましくは２８５ｍＯｓｍ／Ｌ以上、特に好ましくは２９０ｍＯｓｍ／Ｌ以上、好ましくは３４０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、より好ましくは３３０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、より一層好ましくは３２０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、更に好ましくは３１０ｍＯｓｍ／Ｌ以下、特に好ましくは３００ｍＯｓｍ／Ｌ以下である。上記混合液の浸透圧が上記下限以上及び上記上限以下であると、ＣＴＣの細胞死をより一層抑えることができ、かつＣＴＣの細胞形態をより一層良好に維持することができる。そのため、採血後に数日間保管された検体を用いた場合でも、ＣＴＣの回収率をより一層高めることができる。

[0186] 上記混合液の浸透圧は、浸透圧計（例えば、アークレイ社製「ＯＭ－６０６０」）を用いて、氷点降下法により測定される。

[0187] 上記ＣＴＣ分離容器では、収容されている上記水溶液１ｍＬに対して、血液が３ｍＬ以上採取されることが好ましく、４ｍＬ以上採取されることがより好ましく、１１ｍＬ以下採取されることが好ましく、１０ｍＬ以下採取されることがより好ましい。この場合には、血液が過度に希釈されることなく、本発明の効果をより一層効果的に発揮することができる。

[0188] 上記細胞分離材の収容箇所は、上記容器本体内であれば特に限定されない。上記細胞分離材は、上記容器本体の底部に配置されていてもよく、上記容器本体の内壁面上に配置されていてもよい。本発明の効果をより一層効果的に発揮する観点から、上記細胞分離材は、上記容器本体の底部に収容されて

いることが好ましい。

[0189] 上記容器本体の形状は特に限定されない。上記容器本体は、有底の管状容器であることが好ましい。

[0190] 上記容器本体の素材は特に限定されない。上記容器本体の素材としては、上記血液採取容器本体の素材の欄に記載したものを用いることができる。

[0191] 上記ＣＴＣ分離容器は、栓体を備えることが好ましい。上記栓体は、ＣＴＣ分離容器本体の開口に取り付けられていることが好ましい。上記栓体として、従来公知の栓体を用いることができる。上記栓体は、ＣＴＣ分離容器本体の開口に、気密的かつ液密的に取付けることが可能な素材及び形状からなる栓体であることが好ましい。上記栓体は、針が刺通され得るように構成されていてもよい。

[0192] 上記栓体としては、上記血液採取容器の栓体の欄に記載したものを用いることができる。

[0193] 上記ＣＴＣ分離容器の内圧は特に限定されない。上記ＣＴＣ分離容器は、内部が排気された上で、上記栓体によって密閉された真空採血管として用いることもできる。真空採血管である場合、採血者の技術差によらず一定量の血液採取を簡便に行うことができる。

[0194] なお、上記ＣＴＣ分離容器は、上述した血球凝集剤と共に用いることもできる。すなわち、本明細書では、上記ＣＴＣ分離容器と、上記血球凝集剤とを備える循環腫瘍細胞分離キット（ＣＴＣ分離キット）も提供する。上記ＣＴＣ分離容器を備えるＣＴＣ分離キットは、血球凝集剤が収容された第２の容器を備えることが好ましい。血球凝集剤を用いることにより、ＣＴＣ分離容器を遠心分離した際に、赤血球及び白血球などの不要な血球細胞が細胞分離材よりも下方に移動しやすくなり、ＣＴＣと血球細胞とをより一層良好に分離させることができる。

[0195] （循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）の分離方法（２））

以下、上述したＣＴＣ分離容器を用いて、血液中のＣＴＣを分離する方法について説明する。

[0196] ＜血液採取工程＞

上記ＣＴＣの分離方法（２）は、上記ＣＴＣ分離容器に血液を採取して、上記血液と上記水溶液とが混合された検体を得る血液採取工程を備える。上記ＣＴＣの分離方法（２）では、上記検体の浸透圧を小さくすることができるので、本発明の効果が効果的に発揮される。上記血液と上記水溶液との混合方法としては、転倒混和等が挙げられる。

[0197] 上記血液採取工程後、検体をＣＴＣ分離容器内で保管してもよく、保管することなく、次の工程に進んでもよい。なお、保管温度は、好ましくは１℃以上、好ましくは４０℃以下である。

[0198] ＜遠心分離工程＞

上記ＣＴＣの分離方法（２）は、上記検体が収容された上記ＣＴＣ分離容器を遠心分離する遠心分離工程を備える。遠心分離工程により、細胞分離材によって形成された隔壁よりも下側に血球成分が移動し、上側に血漿及びＣＴＣが移動する。

[0199] 上記遠心分離工程では、血球凝集剤と上記検体とが混合された液が収容されたＣＴＣ分離容器を遠心分離することが好ましい。上記遠心分離工程では、上記検体が収容された上記ＣＴＣ分離容器に上記血球凝集剤を添加した後、該ＣＴＣ分離容器を遠心分離することが好ましい。血球凝集剤を用いることにより、赤血球及び白血球などの不要な血球細胞が細胞分離材よりも下方に移動しやすくなり、ＣＴＣと血球細胞とをより一層良好に分離させることができる。

[0200] 上記遠心分離工程における上記遠心分離条件としては、例えば、４００Ｇ以上４０００Ｇ以下で１０分間以上１２０分間以下遠心分離する条件等が挙げられる。

[0201] ＜回収工程＞

上記ＣＴＣの分離方法（２）は、血漿中に分離された循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）を回収する回収工程を備える。遠心分離工程後、ＣＴＣは細胞分離材により形成された隔壁上に堆積したり、血漿中に存在したりしている。そのた

め、ピペッティングにより緩やかに血漿を撹拌して、隔壁上に堆積したＣＴＣを懸濁してから回収することが好ましい。

[0202] （循環腫瘍細胞（ＣＴＣ）の検出方法）

上記ＣＴＣの分離方法（１）又は（２）によって分離されたＣＴＣを検出する方法としては、ＣＴＣを蛍光標識したのち、蛍光標識されたＣＴＣを検出機器を用いて検出する方法等が挙げられる。

[0203] すなわち、上記ＣＴＣの検出方法は、血液からＣＴＣを分離する工程と、分離されたＣＴＣを蛍光標識する工程と、蛍光標識されたＣＴＣを検出する工程とを備えることが好ましい。上記血液からＣＴＣを分離する工程には、上述したＣＴＣの分離方法（１）又は（２）が用いられていることが好ましい。

[0204] ＣＴＣを蛍光標識する方法は特に限定されず、従来公知の方法を用いることができる。例えば、ＣＴＣが有する抗原と特異的に結合する標識抗体と、ＣＴＣとを接触させることで、ＣＴＣを蛍光標識することができる。また、ＣＴＣに感染してＣＴＣに特有のテロメラーゼ活性で反応して増殖し、蛍光を発するウイルスを含む試薬を用いて、ＣＴＣを蛍光標識することもできる。

[0205] 蛍光標識されたＣＴＣは、蛍光顕微鏡及びフローサイトメーター等の検出機器を用いて検出すことができる。

[0206] 以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。本発明は以下の実施例のみに限定されない。

[0207] 水溶液の溶質として、以下を用意した。

[0208] （抗凝固剤）

エチレンジアミン四酢酸二カリウム二水和物（ＥＤＴＡ２Ｋ・２H_2O）

[0209] （低分子化合物（Ａ）に相当しない化合物）

塩化ナトリウム

[0210] （低分子化合物（Ａ））

硫酸アンモニウム

トレハロース２H_2O

[0211] （高分子化合物（Ｂ））

デキストラン（数平均分子量：４０，０００）

ポリエチレングリコール（数平均分子量：４，０００）

[0212] 細胞分離用組成物の材料として、以下を用意した。

[0213] （２５℃で流動性を有する有機成分の材料）

（メタ）アクリル系樹脂：

アクリル酸－２－エチルヘキシルとアクリル酸ブチルとをアゾ系重合開始剤の存在下で溶液重合法によりラジカル重合させ、２５℃で流動性を有する（メタ）アクリル酸エステル系重合体を得た。

[0214] （無機微粉末）

親水性シリカ（微粉末シリカ、日本アエロジル社製「２００ＣＦ」）

疎水性シリカ（微粉末シリカ、日本アエロジル社製「ＲＸ２００」）

炭酸カルシウム粉末（ＩＭＥＲＹＳ社製「Ｓｏｃａｌ　ＵＰ－Ｇ」）

[0215] （その他の成分）

シリコーンオイル（東レダウコーニング社製「ＳＦ８４１０」）

[0216] 細胞分離用組成物Ａの作製：

（メタ）アクリル系樹脂９１．９重量部と、親水性シリカ１．００重量部と、疎水性シリカ５．０重量部と、炭酸カルシウム粉末１．９５重量部と、シリコーンオイル０．１５重量部とを混合し、細胞分離用組成物Ａを作製した。

[0217] 細胞分離用組成物Ｂの作製：

（メタ）アクリル系樹脂９２．４重量部と、親水性シリカ０．５５重量部と、疎水性シリカ６．９重量部と、シリコーンオイル０．１５重量部とを混合し、細胞分離用組成物Ｂを作製した。

[0218] 得られた細胞分離用組成物１滴を、比重を０．００２の間隔で段階的に調整した２５℃の食塩水中に順次滴下し、食塩水中における浮沈により比重を測定した。得られた細胞分離用組成物の２５℃での比重は下記の表に示した

。

[0219] ＣＴＣ分離キットにおける血液採取容器本体及びＣＴＣ分離容器における容器本体として、以下を用意した。

[0220] 長さ１００ｍｍ、開口部の内径１４ｍｍのＰＥＴ有底管（ポリエチレンテレフタレート管）

[0221] ＣＴＣ分離キットにおける細胞分離容器本体として、以下を用意した。

[0222] 長さ１１９ｍｍ、開口部の内径１４ｍｍのＰＰ有底管（ポリプロピレン管）

[0223] （実施例１）

（１）血液採取容器の作製

表１に示す成分を水（注射用水）に溶解して水溶液を得た。得られた水溶液の成分の種類及び濃度を表１に示す。

[0224] 得られた水溶液１ｍＬを血液採取容器本体内に添加した。血液採取容器内部を、血液採取量が５ｍＬとなるように減圧し、ブチルゴム栓により密封した。このようにして血液採取容器を作製した。

[0225] （２）細胞分離容器の作製

１．８ｇの細胞分離用組成物Ａを、細胞分離容器本体の底部に収容し、スクリューキャップにより密封した。このようにして細胞分離容器を作製した。

[0226] このようにして、血液採取容器と細胞分離容器とを備えるＣＴＣ分離キットを得た。

[0227] （実施例２～５及び比較例１，２）

水溶液の組成及び細胞分離用組成物の種類を表１，２のように変更したこと以外は、実施例１と同様にして、血液採取容器と細胞分離容器とを備えるＣＴＣ分離キットを得た。

[0228] （比較例３）

（１）血液採取容器の作製

抗凝固剤３３重量部を、水６７重量部に溶解して、混合液を得た。また、

得られた混合液２３ｍｇを、血液採取容器本体の内壁面に塗布し、乾燥させた。血液採取容器内部を、血液採取量が５ｍＬとなるように減圧し、ブチルゴム栓により密封した。このようにして血液採取容器を作製した。

[0229] （２）細胞分離容器の作製

実施例１と同様にして、細胞分離容器を作製した。

[0230] このようにして、血液採取容器と細胞分離容器とを備えるＣＴＣ分離キットを得た。

[0231] （実施例６）

ＣＴＣ分離容器の作製：

表３に示す成分を水（注射用水）に溶解して水溶液を得た。得られた水溶液の成分の種類及び濃度を表３に示す。

[0232] １．８ｇの細胞分離用組成物Ａを、容器本体の底部に収容した。また、得られた水溶液１ｍＬを容器本体内に添加した。また容器内部を、血液採取量が５ｍＬとなるように減圧し、ブチルゴム栓により密封した。このようにしてＣＴＣ分離容器を作製した。

[0233] （実施例７～１０及び比較例４，５）

水溶液の組成及び細胞分離用組成物の種類を表３，４のように変更したこと以外は、実施例６と同様にして、ＣＴＣ分離容器を作製した。

[0234] （比較例６）

１．８ｇの細胞分離用組成物Ａを、容器本体の底部に収容した。抗凝固剤３３重量部を、水６７重量部に溶解して、混合液を得た。また、得られた混合液２３ｍｇを、容器本体の内壁面に塗布し、乾燥させた。容器内部を、血液採取量が５ｍＬとなるように減圧し、ブチルゴム栓により密封した。このようにしてＣＴＣ分離容器を作製した。

[0235] （評価）

（１）混合液の浸透圧

（１－１）ＣＴＣ分離キットを用いた場合の試験手順

得られた血液採取容器に生理食塩水５ｍＬを採取した。生理食塩水を採取

した後、転倒混和して、生理食塩水と血液採取容器内に収容された水溶液とを混合し、混合液を得た。得られた混合液の浸透圧を、浸透圧計（アークレイ社製「ＯＭ－６０６０」）を用いて、氷点降下法により測定した。なお、同様にして、血液採取容器内に収容された水溶液の浸透圧も測定した。

[0236] （１－２）ＣＴＣ分離容器を用いた場合の試験手順

得られたＣＴＣ分離容器に生理食塩水５ｍＬを採取した。生理食塩水を採取した後、転倒混和して、生理食塩水とＣＴＣ分離容器内に収容された水溶液とを混合し、混合液を得た。得られた混合液の浸透圧を、浸透圧計（アークレイ社製「ＯＭ－６０６０」）を用いて、氷点降下法により測定した。なお、同様にして、ＣＴＣ分離容器内に収容された水溶液の浸透圧も測定した。

[0237] （２）ＣＴＣの回収率

（２－１）ＣＴＣ分離キットを用いた場合の試験手順（血液採取工程～遠心分離工程）

得られたＣＴＣ分離キットを用いて、以下の手順でＣＴＣの回収率を求める試験を行った。なお、各実施例及び各比較例において、ＣＴＣ分離キットを２組用いた。１組目のＣＴＣ分離キットでは、血液採取工程からＣＴＣの検出の工程までを同日に行った。一方、２組目のＣＴＣ分離キットでは、血液採取工程から添加工程までを同日に行った後、４日間保管し、次いで、遠心分離工程からＣＴＣの検出の工程までを同日に行った。

[0238] ＜血液採取工程＞

血液採取容器に、血液５ｍＬを採取した。血液を採取した後、転倒混和して、血液と血液採取容器内に収容された水溶液が混合された検体を得た。

[0239] ＜添加工程＞

細胞分離容器に、得られた検体１ｍＬを添加した。

[0240] 次いで、細胞分離容器に、ＣＴＣであるＣｅｌｌ　Ｌｉｎｅ（ＭＣＦ－７）を、５０個／血液１ｍＬの量となるように添加した。なお、前述のように、１組目のＣＴＣ分離キットでは、そのまま次の工程に進んだ。一方、２組

目のＣＴＣ分離キットでは、ＣＴＣの添加後、細胞分離容器を４℃で４日間保管し、次の工程に進んだ。

[0241] ＜遠心分離工程＞

血球凝集剤として、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製「ＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ ｈｕｍａｎ ＣＤ４５ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｃｏｃｋｔａｉｌ」を用意した。実施例１～３，５及び比較例１～３では、５０μＬの血球凝集剤を、ＣＴＣが添加された細胞分離容器に添加し、２０分間静置した。次いで、細胞分離容器を２５℃で１５００Ｇ及び２０分間の条件で遠心分離した。実施例４では、血球凝集剤を使用することなく、細胞分離容器を２５℃で１５００Ｇ及び２０分間の条件で遠心分離した。遠心分離後、細胞分離用組成物により形成された隔壁よりも上方に血漿が位置しており、ＣＴＣは隔壁上に堆積していた。

[0242] （２－２）ＣＴＣ分離容器を用いた場合の試験手順（血液採取工程～遠心分離工程）

得られたＣＴＣ分離容器を用いて、以下の手順でＣＴＣの回収率を求める試験を行った。なお、各実施例及び各比較例において、ＣＴＣ分離容器を２本用いた。１本目のＣＴＣ分離容器では、血液採取工程からＣＴＣの検出の工程までを同日に行った。一方、２本目のＣＴＣ分離容器では、血液採取工程後、４日間保管し、次いで、遠心分離工程からＣＴＣの検出の工程までを同日に行った。

[0243] ＜血液採取工程＞

ＣＴＣ分離容器に、血液５ｍＬを採取した。血液を採取した後、転倒混和して、血液とＣＴＣ分離容器内に収容された水溶液が混合された検体を得た。

[0244] 次いで、ＣＴＣ分離容器に、ＣＴＣであるＣｅｌｌ Ｌｉｎｅ（ＭＣＦ－７）を、５０個／血液１ｍＬの量となるように添加した。なお、前述のように、１本目のＣＴＣ分離容器では、そのまま次の工程に進んだ。一方、２本目のＣＴＣ分離容器では、ＣＴＣの添加後、ＣＴＣ分離容器を４℃で４日間

保管し、次の工程に進んだ。

[0245] ＜遠心分離工程＞

血球凝集剤として、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製「ＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ ｈｕｍａｎ ＣＤ４５ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｃｏｃｋｔａｉｌ」を用意した。実施例６～８，１０及び比較例４～６では、２５０μＬの血球凝集剤を、ＣＴＣが添加されたＣＴＣ分離容器に添加し、２０分間静置した。次いで、ＣＴＣ分離容器を２５℃で１５００Ｇ及び２０分間の条件で遠心分離した。実施例９では、血球凝集剤を使用することなく、ＣＴＣ分離容器を２５℃で１５００Ｇ及び２０分間の条件で遠心分離した。遠心分離後、細胞分離用組成物により形成された隔壁よりも上方に血漿が位置しており、ＣＴＣは隔壁上に堆積していた。

[0246] （２－３）ＣＴＣ分離キット及びＣＴＣ分離容器を用いた場合の試験手順（共通）

＜回収工程＞

ピペッティングにより緩やかに血漿を撹拌して、隔壁上に堆積したＣＴＣを血漿中に懸濁させてから、血漿をエッペンドルフチューブに回収した。次いで、回収した血漿に、該血漿１ｍＬあたり１ｍＬの溶血剤を添加した。血漿と溶血剤との混合液を２５℃で１５分間撹拌した後、２５℃で５００Ｇ及び５分間の条件で遠心分離することにより、血漿中に混入している赤血球を溶血させた。上澄み液を除去し、ペレットをＰＢＳと１０％ＢＳＡ液との混合液で懸濁させ、再度溶血処理を行った。溶血処理後、上澄み液を除去し、ペレットを、ＰＢＳと１０％ＢＳＡ液との混合液８０μＬで懸濁して懸濁液を得た。

[0247] ＜ＣＴＣの染色及び蛍光顕微鏡観察＞

８０μＬの懸濁液に、２０μＬのＦｃＲ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｒｅａｇｅｎｔ （Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社製）を添加し、ボルテックスミキサーにより撹拌した後、４℃の暗室下で１０分間静置した。次いで、懸濁液に、２μＬのＣＤ３２６（ＥｐＣＡＭ）－ＦＩＴＣ抗体（ヒト）（Ｍｉ

ｔｅｎｙｉ　Ｂｉｏｔｅｃ社製）を添加して、軽くピペッティングし、４℃の暗室下で１０分間静置した。次いで、懸濁液を、ＰＢＳと１０％ＢＳＡ液との混合液１ｍＬで洗浄した。この液を９６ｗｅｌｌプレートに添加して、該プレートに細胞を播種した。次いで、蛍光顕微鏡観察を行うことにより、染色された細胞数をカウントした。

[0248] ＣＴＣの回収率を、以下の式により算出した。また、血液採取工程からＣＴＣの検出の工程までを同日に行った場合（保管０日）のＣＴＣの回収率と、４日間保管した場合のＣＴＣの回収率との差を、ＣＴＣの回収率の減少量とした。

[0249] ＣＴＣの回収率（％）＝Ａ／Ｂ×１００

Ａ：蛍光顕微鏡により観測されたＣｅｌｌ　Ｌｉｎｅ（ＭＣＦ－７）の数

Ｂ：血液に添加したＣｅｌｌ　Ｌｉｎｅ（ＭＣＦ－７）の数

[0250] （３）回収したＣＴＣの蛍光強度

血液採取工程からＣＴＣの検出の工程までを同日に行った場合（保管０日）に回収したＣＴＣの蛍光強度（０）と、４日間保管した場合に回収したＣＴＣの蛍光強度（４）とを、蛍光顕微鏡観察を用いて確認した。具体的には、回収した細胞に、波長４７０ｎｍの光（ＬＥＤ光源）を照射し、ＣＴＣの蛍光強度を観察した。なお、蛍光強度の強い細胞は生細胞であり、蛍光強度の弱い細胞は死細胞又は表面抗原が消失している細胞である。

[0251] ＜回収したＣＴＣの蛍光強度の判定基準＞

〇：蛍光強度（４）が、蛍光強度（０）と同等の強度を維持している

×：蛍光強度（４）が、蛍光強度（０）よりも明らかに小さい

[0252] （４）隔壁上に残存する白血球数の変化率

（４－１）ＣＴＣ分離キットにおける細胞分離容器を用いた場合の試験手順（血液採取工程～遠心分離工程）

得られたＣＴＣ分離キットを用いて、以下の手順で、細胞分離用組成物により形成された隔壁上に残存する白血球数の変化率を求める試験を行った。なお、ＣＴＣ分離キットを２組用いた。１組目のＣＴＣ分離キットでは、血

液採取工程から白血球数の測定までを同日に行った。一方、２組目のＣＴＣ分離キットでは、血液採取工程から添加工程までを同日に行った後、４日間保管し、次いで、遠心分離工程から白血球数の測定までを同日に行った。

[0253] ＜血液採取工程＞

血液採取容器に、血液５ｍＬを採取した。血液を採取した後、転倒混和して、血液と血液採取容器内に収容された水溶液が混合された検体を得た。

[0254] ＜添加工程＞

細胞分離容器に、得られた検体１ｍＬを添加した。

[0255] ＜遠心分離工程＞

血球凝集剤として、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製「ＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ ｈｕｍａｎ ＣＤ４５ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｃｏｃｋｔａｉｌ」を用意した。５０μＬの血球凝集剤を、細胞分離容器に添加し、２０分間静置した。次いで、細胞分離容器を２５℃で１５００Ｇ及び２０分間の条件で遠心分離した。遠心分離後、細胞分離用組成物により形成された隔壁よりも上方に血漿が位置しており、また、白血球は隔壁上に堆積していた。

[0256] （４－２）ＣＴＣ分離容器を用いた場合の試験手順（血液採取工程～遠心分離工程）

得られたＣＴＣ分離容器を用いて、以下の手順で、細胞分離用組成物により形成された隔壁上に残存する白血球数の変化率を求める試験を行った。なお、ＣＴＣ分離容器を２本用いた。１本目のＣＴＣ分離容器では、血液採取工程から白血球数の測定までを同日に行った。一方、２本目のＣＴＣ分離容器では、血液採取工程後、４日間保管し、次いで、遠心分離工程から白血球数の測定までを同日に行った。

[0257] ＜血液採取工程＞

ＣＴＣ分離容器に、血液５ｍＬを採取した。血液を採取した後、転倒混和して、血液とＣＴＣ分離容器内に収容された水溶液が混合された検体を得た。

[0258] ＜遠心分離工程＞

血球凝集剤として、ＳＴＥＭＣＥＬＬ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社製「ＲｏｓｅｔｔｅＳｅｐ ｈｕｍａｎ ＣＤ４５ ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｃｏｃｋｔａｉｌ」を用意した。２５０μＬの血球凝集剤を、ＣＴＣ分離容器に添加し、２０分間静置した。次いで、ＣＴＣ分離容器を２５℃で１５００Ｇ及び２０分間の条件で遠心分離した。遠心分離後、細胞分離用組成物により形成された隔壁よりも上方に血漿が位置しており、また、白血球は隔壁上に堆積していた。

[0259] （４－３）ＣＴＣ分離キット及びＣＴＣ分離容器を用いた場合の試験手順（共通）

＜回収工程＞

ピペッティングにより緩やかに血漿を撹拌して、隔壁上に堆積した白血球を血漿中に懸濁させてから、血漿をエッペンドルフチューブに回収した。

[0260] ＜白血球数の測定＞

多項目自動血球分析装置（ＳＹＳＭＥＸ社製「ＸＮシリーズ」）を用いて、回収液中の白血球数を測定した。

[0261] 血液採取工程から白血球数の測定までを同日に行った場合（保管０日）の隔壁上の白血球数（０）と、４日間保管した場合の隔壁上の白血球数（４）とから、隔壁上に残存する白血球数の変化率を、以下の式により算出した。なお、表中、「Ｎ／Ａ」は、隔壁上の白血球数が少なく、多項目自動血球分析装置での測定において白血球数が検出限界未満であったことを意味する。

[0262] 隔壁上に残存する白血球数の変化率（％）＝（Ａ－Ｂ）／Ｂ×１００

Ａ：隔壁上の白血球数（４）

Ｂ：隔壁上の白血球数（０）

[0263] 構成及び結果を下記の表１～４に示す。なお、表中、抗凝固剤の濃度は、ＥＤＴＡ２Ｋ・２H_2Oの濃度ではなく、ＥＤＴＡ２Ｋの濃度を意味する。それ以外の成分の含有量は、純分量である。

[0264]

[表1]



CTC分離キット					実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5
血液採取容器	水溶液	低分子化合物(A)	塩化ナトリウム	重量%	–	–	–	–	–
			硫酸アンモニウム	重量%	1.10	–	0.55	0.55	–
			トレハロース(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	–	8	3	3	8
		高分子化合物(B)	デキストラン(Mn:40000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	–	5	5	5	–
			ポリエチレングリコール(Mn:4000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	–	7	7	7	7
		抗凝固剤	EDTA2K・$2H_2O$	重量%	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848
		注射用水		重量%	残量	残量	残量	残量	残量
		合計		重量%	100	100	100	100	100
		水溶液の浸透圧		mOsm/L	290	330	340	340	340
		血液採取容器に収容されている水溶液の量		mL	1	1	1	1	1
	混合液の浸透圧			mOsm/L	286	293	294	294	294
細胞分離容器	細胞分離用組成物	種類		–	A	B	B	B	A
		25℃での比重		–	1.077	1.071	1.071	1.071	1.077
血球凝集剤					使用	使用	使用	未使用	使用
評価	CTCの回収率	保管0日		%	91	88	78	85	94
		保管4日		%	65	71	72	78	72
		CTCの回収率の減少量		%	26	17	6	7	22
	回収したCTCの蛍光強度			–	○	○	○	○	○
	隔壁上に残存する白血球数の変化率			%	40	30	0	25	290

[0265]

[表2]

CTC分離キット					比較例1	比較例2	比較例3
血液採取容器	水溶液	低分子化合物(A)	塩化ナトリウム	重量%	–	0.75	抗凝固剤の乾燥物層
			硫酸アンモニウム	重量%	10.00	–	
			トレハロース(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	3	–	
		高分子化合物(B)	デキストラン(Mn:40000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	5	–	
			ポリエチレングリコール(Mn:4000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	7	–	
		抗凝固剤	EDTA2K・$2H_2O$	重量%	0.7848	0.7848	
		注射用水		重量%	残量	残量	
		合計		重量%	100	100	
		水溶液の浸透圧		mOsm/L	2380	320	
		血液採取容器に収容されている水溶液の量		mL	1	1	0
	混合液の浸透圧			mOsm/L	634	291	–
細胞分離容器	細胞分離用組成物			–	A	A	A
				–	1.077	1.077	1.077
血球凝集剤					使用	使用	使用
評価	CTCの回収率		保管0日	%	52	69	76
			保管4日	%	2	45	49
			CTCの回収率の減少量	%	50	24	27
	回収したCTCの蛍光強度			–	○	×	×
	隔壁上に残存する白血球数の変化率			%	N/A	350	1300

[0266]

[表3]

					実施例6	実施例7	実施例8	実施例9	実施例10
CTC分離容器	水溶液	低分子化合物(A)	塩化ナトリウム	重量%	–	–	–	–	–
			硫酸アンモニウム	重量%	1.10	–	0.55	0.55	–
			トレハロース(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	–	8	3	3	8
		高分子化合物(B)	デキストラン(Mn:40000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	–	5	5	5	–
			ポリエチレングリコール(Mn:4000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	–	7	7	7	7
		抗凝固剤	EDTA2K・$2H_2O$	重量%	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848	0.7848
		注射用水		重量%	残量	残量	残量	残量	残量
		合計		重量%	100	100	100	100	100
		水溶液の浸透圧		mOsm/L	290	330	340	340	340
		CTC分離容器に収容されている水溶液の量		mL	1	1	1	1	1
	細胞分離用組成物		種類	–	A	B	B	B	A
			25℃での比重	–	1.077	1.071	1.071	1.071	1.077
	混合液の浸透圧			mOsm/L	286	293	294	294	294
血球凝集剤					使用	使用	使用	未使用	使用
評価	CTCの回収率		保管0日	%	80	79	90	93	78
			保管4日	%	55	60	75	72	61
			CTCの回収率の減少量	%	25	19	15	21	17
	回収したCTCの蛍光強度			–	○	○	○	○	○
	隔壁上に残存する白血球数の変化率			%	44	-100	0	21	300

[0267]

[表4]

					比較例4	比較例5	比較例6
CTC分離容器	水溶液	低分子化合物(A)	塩化ナトリウム	重量%	–	0.75	抗凝固剤の乾燥物層
			硫酸アンモニウム	重量%	10.00	–	
			トレハロース(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	3	–	
		高分子化合物(B)	デキストラン(Mn:40000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	5	–	
			ポリエチレングリコール(Mn:4000)(細胞膜保護作用を有する化合物)	重量%	7	–	
		抗凝固剤	EDTA2K・$2H_2O$	重量%	0.7848	0.7848	
		注射用水		重量%	残量	残量	
		合計		重量%	100	100	
		水溶液の浸透圧		mOsm/L	2380	320	
	CTC分離容器に収容されている水溶液の量			mL	1	1	0
	細胞分離用組成物	種類		–	A	A	A
		25℃での比重		–	1.077	1.077	1.077
	混合液の浸透圧			mOsm/L	634	291	–
血球凝集剤					使用	使用	使用
評価	CTCの回収率	保管0日		%	67	65	77
		保管4日		%	18	40	42
		CTCの回収率の減少量		%	49	25	35
	回収したCTCの蛍光強度			–	○	×	×
	隔壁上に残存する白血球数の変化率			%	N/A	300	1200

符号の説明

[0268] 1…血液採取容器

2…細胞分離容器

5…ＣＴＣ分離キット

６…ＣＴＣ分離容器

１１…血液採取容器本体

１２…水溶液

１３…栓体

２１…細胞分離容器本体

２２…細胞分離材

２３…栓体

６１…容器本体

６２…水溶液

６３…細胞分離材

６４…栓体

請求の範囲

[請求項1] 血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる循環腫瘍細胞分離キットであり、

水溶液が収容されており、かつ所定量の血液が採取される血液採取容器と、

２５℃での比重が１．０６５以上１．０８０以下の細胞分離材が収容された細胞分離容器とを備え、

前記水溶液が、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含み、

前記血液採取容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を血液採取容器内に採取して、前記生理食塩水と前記水溶液とが混合された混合液を得たときに、前記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である、循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項2] 前記水溶液が、前記低分子化合物を含む、請求項１に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項3] 前記水溶液が、前記高分子化合物を含む、請求項１に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項4] 前記水溶液が、前記低分子化合物と前記高分子化合物とを含む、請求項１に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項5] 前記低分子化合物が、トレハロース、又は硫酸アンモニウムを含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項6] 前記高分子化合物が、細胞膜保護作用を有する化合物を含む、請求項１～５のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項7] 前記高分子化合物が、デキストラン、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドンである、請求項１～６のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項8] 前記細胞分離材が、細胞分離用組成物である、請求項１～７のいず

れか１項に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項9] 前記細胞分離用組成物が、２５℃で流動性を有する有機成分と、無機微粉末とを含み、

前記有機成分が、樹脂を含み、

前記無機微粉末が、微粉末シリカを含む、請求項８に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項10] 血球凝集剤をさらに備える、請求項１～９のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項11] 請求項１～１０のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離キットを用いて、血液中の循環腫瘍細胞を分離する方法であって、

前記水溶液が収容された前記血液採取容器に血液を採取して、前記血液と前記水溶液とが混合された検体を得る血液採取工程と、

前記細胞分離材が収容された前記細胞分離容器に、前記検体を添加する添加工程と、

前記検体が添加された前記細胞分離容器を遠心分離する遠心分離工程と、

血漿中に分離された循環腫瘍細胞を回収する回収工程とを備える、循環腫瘍細胞の分離方法。

[請求項12] 前記遠心分離工程において、血球凝集剤と前記検体とが混合された液が収容された細胞分離容器を遠心分離する、請求項１１に記載の循環腫瘍細胞の分離方法。

[請求項13] 血液中の循環腫瘍細胞を分離するために用いられる循環腫瘍細胞分離容器であり、

所定量の血液が採取される循環腫瘍細胞分離容器であり、

容器本体と、

前記容器本体内に収容された水溶液と、

前記容器本体内に収容された２５℃での比重が１．０６５以上１．０８０以下の細胞分離材とを備え、

前記水溶液が、抗凝固剤を含み、かつ、分子量が７５以上５００以下の低分子化合物又は数平均分子量が２，０００以上２００，０００未満の高分子化合物を含み、

前記循環腫瘍細胞分離容器に採取される血液の所定量と等量の生理食塩水を循環腫瘍細胞分離容器内に採取して、前記生理食塩水と前記水溶液とが混合された混合液を得たときに、前記混合液の浸透圧が２７０ｍＯｓｍ／Ｌ以上３５０ｍＯｓｍ／Ｌ以下である、循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項14] 前記水溶液が、前記低分子化合物を含む、請求項１３に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項15] 前記水溶液が、前記高分子化合物を含む、請求項１３に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項16] 前記水溶液が、前記低分子化合物と前記高分子化合物とを含む、請求項１３に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項17] 前記低分子化合物が、トレハロース、又は硫酸アンモニウムを含む、請求項１３～１６のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項18] 前記高分子化合物が、細胞膜保護作用を有する化合物を含む、請求項１３～１７のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項19] 前記高分子化合物が、デキストラン、ポリエチレングリコール、又はポリビニルピロリドンである、請求項１３～１８のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項20] 前記細胞分離材が、細胞分離用組成物である、請求項１３～１９のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項21] 前記細胞分離用組成物が、２５℃で流動性を有する有機成分と、無機微粉末とを含み、

前記有機成分が、樹脂を含み、

前記無機微粉末が、微粉末シリカを含む、請求項２０に記載の循環腫瘍細胞分離容器。

[請求項22] 請求項１３～２１のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離容器と、

血球凝集剤とを備える、循環腫瘍細胞分離キット。

[請求項23] 請求項１３～２１のいずれか１項に記載の循環腫瘍細胞分離容器を用いて、血液中の循環腫瘍細胞を分離する方法であって、

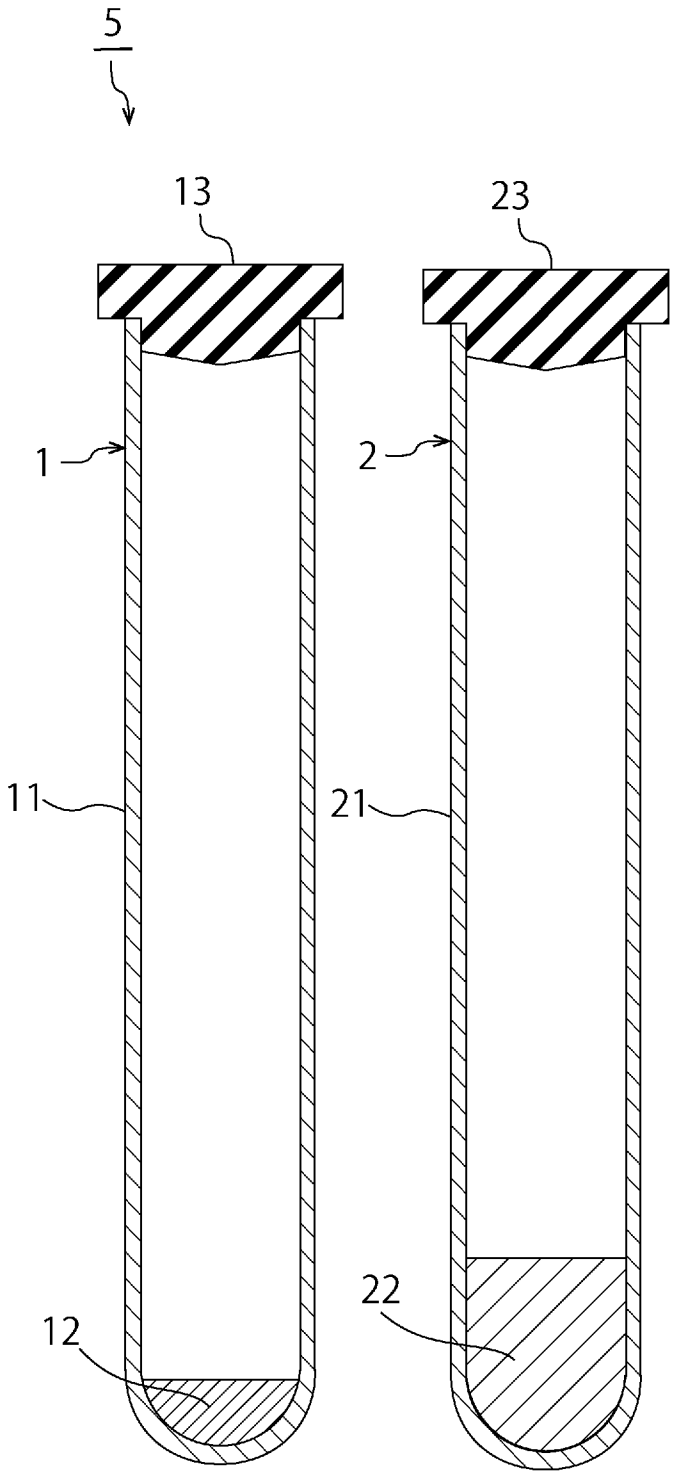
前記循環腫瘍細胞分離容器に血液を採取して、前記血液と前記水溶液とが混合された検体を得る血液採取工程と、

前記検体が収容された前記循環腫瘍細胞分離容器を遠心分離する遠心分離工程と、

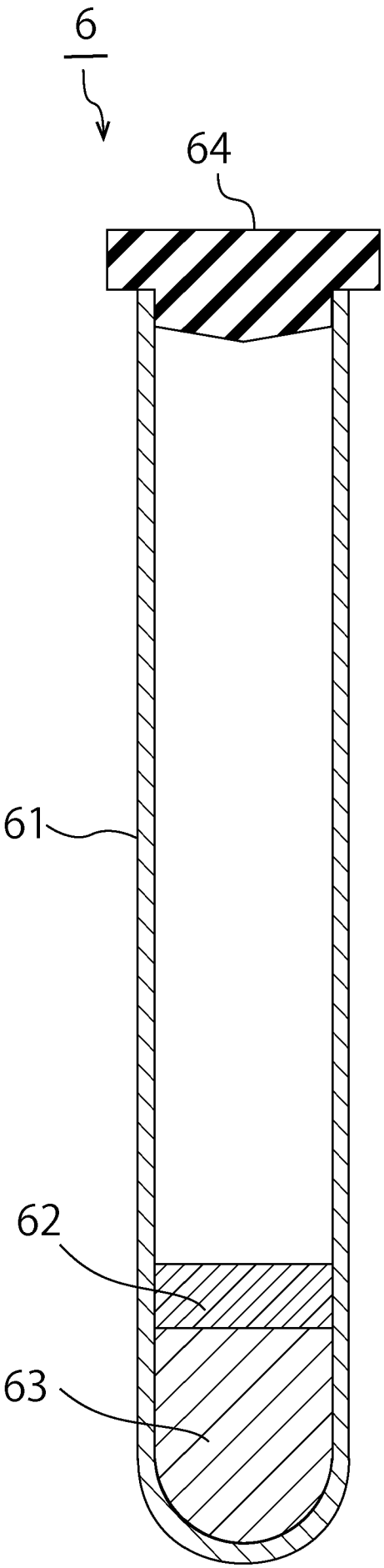
血漿中に分離された循環腫瘍細胞を回収する回収工程とを備える、循環腫瘍細胞の分離方法。

[請求項24] 前記遠心分離工程において、血球凝集剤と前記検体とが混合された液が収容された循環腫瘍細胞分離容器を遠心分離する、請求項２３に記載の循環腫瘍細胞の分離方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/038554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/48(2006.01)i; ***C12M 1/00***(2006.01)i; ***C12N 1/02***(2006.01)i; ***C12N 5/09***(2010.01)i
FI: G01N33/48 B; C12M1/00 A; C12N1/02; C12N5/09; G01N33/48 D

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)

G01N33/48-33/50; A61B5/15; C12M1/26

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2021-500585 A (STRECK INC) 07 January 2021 (2021-01-07) claims, paragraphs [0027]-[0028], [0049], [0062], [0067], [0069], [0076], [0081]	1-4, 6-16, 18-24
Y	JP 2019-211216 A (ARKRAY INC) 12 December 2019 (2019-12-12) claims, paragraphs [0010], [0050], [0064]-[0067]	1-2, 8-14, 20-24
Y	JP 2005-501236 A (IMMUNIVEST CORPORATION) 13 January 2005 (2005-01-13) claims, paragraphs [0006], [0016]	1-4, 6-16, 18-24
Y	WO 2015/046557 A1 (SEKISUI MEDICAL CO LTD) 02 April 2015 (2015-04-02) claims, paragraphs [0037]-[0041]	1-4, 6-16, 18-24
A	WO 2021/182575 A1 (SEKISUI MEDICAL CO LTD) 16 September 2021 (2021-09-16) entire text, all drawings	1-24
A	WO 2021/112119 A1 (SEKISUI MEDICAL CO LTD) 10 June 2021 (2021-06-10) entire text, all drawings	1-24
A	JP 2020-523577 A (SUN, Chung-Chin) 06 August 2020 (2020-08-06) entire text, all drawings	1-24

☑ 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
14 November 2022	**29 November 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2014-524027 A (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 18 September 2014 (2014-09-18) entire text, all drawings	1-24
A	JP 2015-506482 A (BECTON DICKINSON AND COMPANY) 02 March 2015 (2015-03-02) entire text, all drawings	1-24
A	WO 2013/168767 A1 (KONICA MINOLTA, INC) 14 November 2013 (2013-11-14) entire text, all drawings	1-24
A	JP 2007-271388 A (TSUCHIDA, Hidetoshi) 18 October 2007 (2007-10-18) entire text, all drawings	1-24
A	JP 1-199158 A (SEITETSU KAGAKU CO LTD) 10 August 1989 (1989-08-10) entire text, all drawings	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/038554

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2021-500585 A	07 January 2021	US 2021/0371848 A1 claims, paragraphs [0036]-[0037], [0058], [0071], [0076], [0078], [0085], [0090] WO 2019/079743 A1 EP 3697209 A1 CN 111372451 A CA 3079415 A1	
JP 2019-211216 A	12 December 2019	US 2019/0365304 A1 claims, paragraphs [0014]-[0015], [0159], [0198]-[0222] EP 3575791 A1 CN 110547288 A	
JP 2005-501236 A	13 January 2005	WO 2003/018757 A2 claims, p. 2, lines 5-21, p. 5, lines 5-6 EP 1425294 A2 CA 2457891 A1 BR 212124 A CN 1571634 A KR 10-2004-0030984 A AU 2008288601 A1	
WO 2015/046557 A1	02 April 2015	US 2016/0223521 A1 claims, paragraphs [0045]-[0049] EP 3054001 A1 CN 105683353 A	
WO 2021/182575 A1	16 September 2021	(Family: none)	
WO 2021/112119 A1	10 June 2021	CN 114340493 A	
JP 2020-523577 A	06 August 2020	US 2021/0059240 A1 whole document WO 2018/227359 A1	
JP 2014-524027 A	18 September 2014	US 2013/0183655 A1 whole document WO 2013/006550 A1 EP 2729068 A1 AU 2012279135 A1 CA 2841088 A1 CN 103764028 A KR 10-2014-0051281 A MX 2014000152 A NZ 619674 A RU 2014103327 A ZA 201400329 B SG 10201605495U A BR 112014000144 A2	
JP 2015-506482 A	02 March 2015	US 2013/0209985 A1 whole document WO 2013/116702 A1 EP 2809289 A1 AU 2013214866 A1 CA 2862544 A1	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/038554

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		CN 104244902 A	
		MX 2014009256 A	
		IN 6981DEN2014 A	
WO 2013/168767 A1	14 November 2013	US 2015/0148212 A1 whole document	
		EP 2848935 A1	
JP 2007-271388 A	18 October 2007	(Family: none)	
JP 1-199158 A	10 August 1989	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/038554

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/48(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12N 1/02(2006.01)i; C12N 5/09(2010.01)i
FI: G01N33/48 B; C12M1/00 A; C12N1/02; C12N5/09; G01N33/48 D

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））

G01N33/48-33/50; A61B5/15; C12M1/26

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	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２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）

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 2021-500585 A (ストレック, インコーポレイテッド) 07.01.2021 (2021-01-07) ［特許請求の範囲］，［００２７］－［００２８］，［００４９］，［００６２］，［００６７］，［００６９］，［００７６］，［００８１］	1-4,6-16,18-24
Y	JP 2019-211216 A (アークレイ株式会社) 12.12.2019 (2019-12-12) ［特許請求の範囲］，［００１０］，［００５０］，［００６４］－［００６７］	1-2,8-14,20-24
Y	JP 2005-501236 A (イムニベスト・コーポレイション) 13.01.2005 (2005-01-13) ［特許請求の範囲］，［０００６］，［００１６］	1-4,6-16,18-24
Y	WO 2015/046557 A1 (積水メディカル株式会社) 02.04.2015 (2015-04-02) 請求の範囲，［００３７］－［００４１］	1-4,6-16,18-24
A	WO 2021/182575 A1 (積水メディカル株式会社) 16.09.2021 (2021-09-16) 全文，全図	1-24
A	WO 2021/112119 A1 (積水メディカル株式会社) 10.06.2021 (2021-06-10) 全文，全図	1-24

☑ 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抵触するものではなく、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
14.11.2022	29.11.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
倉持　俊輔 2J 3209

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

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
A	JP 2020-523577 A (スン・チュン・チン) 06.08.2020 (2020-08-06) 全文，全図	1-24
A	JP 2014-524027 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 18.09.2014 (2014-09-18) 全文，全図	1-24
A	JP 2015-506482 A (ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー) 02.03.2015 (2015-03-02) 全文，全図	1-24
A	WO 2013/168767 A1 (コニカミノルタ株式会社) 14.11.2013 (2013-11-14) 全文，全図	1-24
A	JP 2007-271388 A (土田 英俊) 18.10.2007 (2007-10-18) 全文，全図	1-24
A	JP 1-199158 A (製鉄化学工業株式会社) 10.08.1989 (1989-08-10) 全文，全図	1-24

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/038554

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2021-500585 A	07.01.2021	US 2021/0371848 A1 Claims, [0036]-[0037], [0058], [0071], [0076], [0078], [0085], [0090] WO 2019/079743 A1 EP 3697209 A1 CN 111372451 A CA 3079415 A1	
JP 2019-211216 A	12.12.2019	US 2019/0365304 A1 Claims, [0014]-[0015], [0159], [0198]-[0222] EP 3575791 A1 CN 110547288 A	
JP 2005-501236 A	13.01.2005	WO 2003/018757 A2 Claims, Page2 Lines5-21, Page 5 Lines5-6 EP 1425294 A2 CA 2457891 A1 BR 212124 A CN 1571634 A KR 10-2004-0030984 A AU 2008288601 A1	
WO 2015/046557 A1	02.04.2015	US 2016/0223521 A1 Claims, [0045]-[0049] EP 3054001 A1 CN 105683353 A	
WO 2021/182575 A1	16.09.2021	（ファミリーなし）	
WO 2021/112119 A1	10.06.2021	CN 114340493 A	
JP 2020-523577 A	06.08.2020	US 2021/0059240 A1 Whole Document WO 2018/227359 A1	
JP 2014-524027 A	18.09.2014	US 2013/0183655 A1 Whole Document WO 2013/006550 A1 EP 2729068 A1 AU 2012279135 A1 CA 2841088 A1 CN 103764028 A KR 10-2014-0051281 A MX 2014000152 A NZ 619674 A RU 2014103327 A ZA 201400329 B SG 10201605495U A BR 112014000144 A2	
JP 2015-506482 A	02.03.2015	US 2013/0209985 A1 Whole Document WO 2013/116702 A1 EP 2809289 A1 AU 2013214866 A1 CA 2862544 A1	

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/038554

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
		CN 104244902 A	
		MX 2014009256 A	
		IN 6981DEN2014 A	
WO 2013/168767 A1	14.11.2013	US 2015/0148212 A1	
		Whole Document	
		EP 2848935 A1	
JP 2007-271388 A	18.10.2007	（ファミリーなし）	
JP 1-199158 A	10.08.1989	（ファミリーなし）	