

(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
2015年1月29日(29.01.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/012315 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 3/06 (2006.01) C12M 1/26 (2006.01)
A61M 1/36 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/069469
- (22) 国際出願日: 2014年7月23日(23.07.2014)
- (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 2013-153717 2013年7月24日(24.07.2013) JP
- (71) 出願人 (アルバニア、オーストリア、ボスニア・ヘルツェゴヴィナ、ベルギー、ブルガリア、スイス、中国、キプロス、チェッコ、ドイツ、デンマーク、エストニア、スペイン、フィンランド、フランス、英国、ギリシャ、クロアチア、ハンガリー、アイルランド、アイスランド、イタリア、韓国、リトアニア、ルクセンブルグ、ラトヴィア、モナコ、マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国、マルタ、オランダ、ノールウェー、ポーランド、ポルトガル、ルーマニア、セルビア、スウェーデン、スロヴェニア、スロヴァキア、サン・マリノ、トルコを除く全ての指定国について): 愛知県(AICHI PREFECTURE) [JP/JP]; 〒4600001 愛知県名古屋市中区三の丸三丁目1番2号 Aichi (JP).
- (71) 出願人: 株式会社オプトニクス精密(OPTNICS PRECISION CO., LTD.) [JP/JP]; 〒3260037 栃木県足利市富士見町2-6 Tochigi (JP).
- (71) 出願人 (アルバニア、オーストリア、ボスニア・ヘルツェゴヴィナ、ベルギー、ブルガリア、スイス、中国、キプロス、チェッコ、ドイツ、デンマーク、エストニア、スペイン、フィンランド、フランス、英国、ギリシャ、クロアチア、ハンガリー、アイル

ランド、アイスランド、イタリア、韓国、リトアニア、ルクセンブルグ、ラトヴィア、モナコ、マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国、マルタ、オランダ、ノールウェー、ポーランド、ポルトガル、ルーマニア、セルビア、スウェーデン、スロヴェニア、スロヴァキア、サン・マリノ、トルコ、米国を除く全ての指定国について): 公益財団法人科学技術交流財団(AICHI SCIENCE AND TECHNOLOGY FOUNDATION) [JP/JP]; 〒4700356 愛知県豊田市八草町秋合1-2-6 7番1 Aichi (JP). 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).

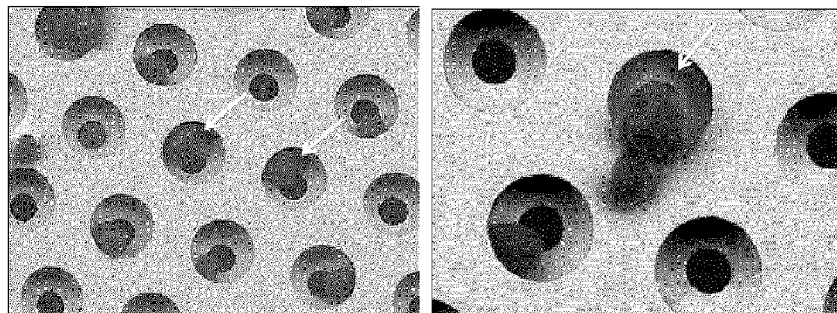
- (72) 発明者: 中西 速夫(NAKANISHI, Hayao); 〒4648681 愛知県名古屋市千種区鹿子殿1番1号 愛知県がんセンター内 Aichi (JP). 伊藤 誠二(ITO, Seiji); 〒4648681 愛知県名古屋市千種区鹿子殿1番1号 愛知県がんセンター内 Aichi (JP). 絹田 精鎮(KINUTA, Seichin); 〒3260037 栃木県足利市富士見町2-6 株式会社オプトニクス精密内 Tochigi (JP). 市野沢 義行(ICHINOSAWA, Yoshiyuki); 〒3260037 栃木県足利市富士見町2-6 株式会社オプトニクス精密内 Tochigi (JP). 遊佐 亜希子(YUSA, Akiko); 〒4700356 愛知県豊田市八草町秋合1-2-6 7番1 公益財団法人科学技術交流財団内 Aichi (JP). 本多 裕之(HONDA, Hiroyuki); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 大河内 美奈(OKOCHI, Mina); 〒4648601 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).

- (74) 代理人: 中島 淳, 外(NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号

[続葉有]

(54) Title: DEVICE FOR ISOLATING PERIPHERAL CIRCULATING TUMOR CELLS OR RARE CELLS, AND METHOD FOR ISOLATING PERIPHERAL CIRCULATING TUMOR CELLS OR RARE CELLS

(54) 発明の名称: 末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス、及び末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法



(57) Abstract: This device for isolating peripheral circulating tumor cells or rare cells is provided with depressions in which peripheral circulating tumor cells or rare cells in a bodily fluid can be trapped, and metal filters formed in the depressions and having apertures through which bodily fluid cells other than peripheral circulating tumor cells or rare cells are able to pass.

(57) 要約: 末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイスは、体液中の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞を捕捉することができる窪みと、該窪みに形成され末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞以外の体液細胞を通過させることができる孔とを有する金属フィルターを備える。

WO 2015/012315 A1



H K 新宿ビル 7 階 太陽国際特許事務所 Tokyo (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス、及び末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法

技術分野

[0001] 本発明は、体液中の末梢循環腫瘍細胞(Circulating Tumor Cell;以下「CTC」とも称する)又は希少細胞を分離するための、特定の多孔性金属フィルター(以下、単に「CTC分離フィルター」とも称する)を備えた末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス(以下、単に「CTC分離デバイス」とも称する)に関する。

[0002] 本発明はさらに、前記デバイスを用いて、がん患者の血液等の体液からCTC又は希少細胞を分離することを含む、体液からの末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法に関する。

背景技術

[0003] がん患者の血液中を循環する腫瘍細胞又はがん細胞はCTCと呼ばれている。CTCは、転移がんの原因の一つであると考えられており、CTC検出が転移がんの早期診断に有効であるかもしれないという示唆がされている。しかし、CTCは、希少細胞の1つであり、血中に極めて少なく、例えば血球成分 $10^8 \sim 10^9$ 個あたり約1個であり、このため、いくつかのCTCの分離法が提案されてきた。例えば、分離法には、抗EpCAM(上皮細胞接着分子)抗体を固定化した磁性粒子、又は柱状構造などの樹脂表面にキャプチャー抗体を結合させたマイクロ流体デバイスを利用する方法、さらにCTCと血球細胞のサイズの違いを利用してフィルターを用いて分離する方法などが知られている(Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology, Sunitha Nagrath et al. Nature, 2007, 450: 1235-1239)、(特開2011-163830号公報、特開2013-42689号公報、特開2005-10177号公報、特表2007-525642号公報、特開2009-106936号公報)。

[0004] フィルターを利用するCTC分離方法では、フィルターの材質が、パリレン(parylene) (米国特許出願第20110111412 A1号)、ポリカーボネート (F. Farace et al., Br. J. Cancer, 2011, 105: 847-853) などのポリマー、シリコン、金属 (特開2013-42689号公報) などからなり、その表面上に7~10 μm の孔を多数有するマイクロフィルターが使用される。原理的には、フィルターは、血液細胞を通過させ、CTCをフィルター上に捕捉する孔サイズを有する。

[0005] 特開2013-42689号公報に記載される金属フィルターでは、好ましい金属として、金、銀、銅、アルミニウム、タングステン、ニッケル、クロム、ステンレス又はこれらの合金から選択され、また、好ましくは、貫通孔の短辺の長さが5.0~15.0 μm であり、平均開口率が0.1~50%であり、フィルターの厚さが3~100 μm である。その実施例では、ニッケルフィルター (平均開口率: 1.4%、孔の大きさ: 8×30 μm 、孔の形状: 角丸長方形) を使用して、血液中にスパイクしたヒト小細胞肺癌細胞株を回収している。その実験において、がん細胞回収率が74.9±10.5%であり、残存白血球数が697±84であると記載されている。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 上記の背景技術に記載したような、フィルターを用いたサイズ選択性CTC濃縮装置は、磁気ビーズ方式と比べて、簡便、低コストなどの利点を有する。しかしながら、検体である血液を溶血する前処理を必要としたり、濾過の駆動力としてポンプを使用するため、CTCに細胞ストレスを与えたり、細胞の固定や、流路の閉鎖性のために生細胞の1細胞分取が困難であった。

[0007] 本発明は、上記事実を考慮して、生きたCTC又は希少細胞の高率な回収を達成し、さらに簡便、ソフトな1生細胞分取を可能にすることを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明は、以下の特徴を包含する。

[1] 体液中の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞を捕捉することができる窪みと、該窪みに形成され前記末梢循環腫瘍細胞又は前記希少細胞以外の体液細

胞を通過させることができる孔とを有する金属フィルターを備えた末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。

[2] 前記フィルターの金属材質が、パラジウム又はパラジウム・ニッケル合金である[1]に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。

[3] 前記窪みの直径は $20\sim 30\mu\text{m}$ であり、前記窪みの深さは $5\sim 15\mu\text{m}$ である[1]又は[2]に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。

[4] 前記孔の直径は $7\sim 10\mu\text{m}$ である[1]～[3]のいずれか1つに記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。

[5] 前記窪み及び前記孔の孔密度は 1cm^2 あたり $1\times 10^4\sim 2\times 10^5$ 個である[1]～[4]のいずれか1つに記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。

[6] 前記金属フィルターの厚さは、 $10\sim 40\mu\text{m}$ である[1]～[5]のいずれかに記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。

[7] 前記金属フィルターを装着するためのフィルターカセットを有する[1]～[6]のいずれかに記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。

[8] [1]～[7]のいずれかに記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイスに、がん患者の血液、腹水又は腹腔洗浄液から選択される体液を注入して、該体液中の前記末梢循環腫瘍細胞又は前記希少細胞を、前記金属フィルターの前記窪みで捕捉した後、生きたまま回収する末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。

[9] 前記末梢循環腫瘍細胞又は前記希少細胞を特異的に染色することをさらに含む、[8]に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。

[10] 前記体液を希釈又は前処理することを含む、[8]又は[9]に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。

[11] 前記前処理が、前記体液を磁性ナノ粒子含有カチオン性リポソームと混合して、前記体液中の前記末梢循環腫瘍細胞又は前記希少細胞及び白血球細胞中に前記磁性ナノ粒子を取り込ませたのち、前記金属フィルターに通じる流路に流し込み、前記金属フィルターの前に配置された磁石で磁性ナノ粒子を取り込まない赤血球等の細胞を該体液から除去することを含む、[10]に

記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、生きたCTC又は希少細胞の高率な回収を達成し、さらに簡便、ソフトな1生細胞分取を可能にすることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1A]金属フィルター小片を含む培地中で、MK N-4 5細胞を3日間培養し、金属フィルターの細胞毒性を調べた。対照、パラジウム (Pd) ・ニッケル (Ni) 合金 (80 : 20) フィルター存在下、及びニッケル (Ni) フィルター存在下の細胞増殖曲線を示す。Pd ・Ni フィルター存在下のMK N-4 5細胞は、対照とほぼ同じ増殖速度 (低細胞毒性) を示した。Pd ・Ni フィルターは、Ni フィルターと比べると、細胞毒性が明らかに低かった。

[図1B]金属フィルター小片を含む培地中で、MK N-4 5細胞を3日間培養し、細胞の形態を観察した。3日目の細胞の形態を示す。Ni フィルター存在下のMK N-4 5細胞は、対照やPd ・Ni フィルター存在下に比べて形態が丸くなり、一部にA p o p t o t i cな細胞も見られた。

[図2A]3 D Pd ・Ni フィルターのSEM像である。窪みの直径30 μ m、窪みの深さ10 μ m、孔の直径8 μ m、孔密度99, 178 / cm^2 (超高孔密度)、千鳥格子配列

[図2B]3 D Pd ・Ni フィルターのSEM像である。窪みの直径30 μ m、窪みの深さ10 μ m、孔の直径8 μ m、孔密度71, 656 / cm^2 (高孔密度)、千鳥格子配列

[図2C]2 D Pd ・Ni フィルターフィルターのSEM像である。窪みの直径30 μ m、窪みの深さ1 μ m、孔の直径8 μ m、孔密度40, 000 / cm^2 、格子配列

[図2D]市販のポリカーボネートフィルター (孔径8 μ m、Whatman社) のSEM像である。

[図2E]図2Aに示される金属フィルターを模式的に示す断面図である。

[図3A]デバイスの外観の模式図である。デバイスは、例えば、幅15cm、奥行き12cm、高さ22cmである。

[図3B]デバイスの構成部品の模式図である。

[図3C]各ユニットを組み立てたデバイスを模式的に示す正面図である。

[図4A]窪みにがん細胞（矢印）を捕捉した3DフィルターのSEM像である（右は左の拡大図）。

[図4B]10倍希釈した健常人血液2mLに培養がん細胞（COLM5-EGFP）500個を混ぜPBSで10倍に希釈した試料を、3D Pd・Niフィルター（窪みの直径30 μ m、窪みの深さ10 μ m、孔の直径8 μ m、孔密度99, 178/cm²、千鳥格子配列）で濾過し、細胞をPE標識抗CD45抗体で染色した。左上は、GFP蛍光像（がん細胞検出）、右上は、PE標識抗CD45抗体の染色像（白血球検出）である。白血球は少数しか認められず、がん細胞と白血球が同一の窪みに共在する像は認められない。右下は、フィルターカセット上でマニピュレーター（ガラスキャピラリー）を手動で操作し、がん細胞を1細胞分取しているときの明視野像である。矢印はマニピュレーターである。

[図5A]健常人血液2.5mLに培養がん細胞（COLM5-EGFP）500個を混ぜPBSで10倍に希釈した試料を、3D Pd・Niフィルターを用いて濾過し、デバイスの流速を変えてがん細胞の回収率（%）を調べた。

[図5B]健常人血液2.5mLに培養がん細胞（COLM5-EGFP）を混ぜPBSで10倍に希釈した試料を、3D Pd・Niフィルターを用いて濾過し、がん細胞数を変えてがん細胞の回収率（%）を調べた。デバイスの流速は2ml/minである。

[図6A]培養がん細胞（COLM5-EGFP）を皮下移植したヌードマウスから移植3か月後に採血した血液を、3D Pd・Niフィルターで濾過し、GFP蛍光を観察した。左はGFP蛍光像、右は位相差顕微鏡の明視野像である。矢印はCTCである。

[図6B]培養がん細胞（COLM5-EGFP）を皮下移植したヌードマウス

から、移植 1 ～ 2 か月後及び 2 ～ 3 か月後に採血した血液を、3 D P d ・ N i フィルターで濾過し、C T C 数を測定した。

[図7A] 胃がん患者の末梢血を 3 D P d ・ N i フィルターで濾過し、細胞を蛍光標識抗体で染色した。左上は A l e x a 4 8 8 標識抗 E p C A M 抗体の染色像、右上は P E 標識抗 C D 4 5 抗体の染色像、左下は H o e c h s t 3 3 3 4 2 の染色像、右下は明視野像である。矢印は C T C である。

[図7B] 乳がん患者の末梢血を 3 D P d ・ N i フィルターで濾過し、細胞を蛍光標識抗体で染色した。左から順に、A l e x a 4 8 8 標識抗 E p C A M 抗体の染色像、P E 標識抗 C D 4 5 抗体の染色像、A l e x a 3 5 0 標識抗 C K O s c a r 抗体の染色像、明視野像である。矢印は C T C である。

[図7C] 進行乳がん患者（6 名）、進行胃がん患者（4 名）、及び健常人（4 名）の末梢血 5 m L 中の C T C 数を測定した。

[図8A] X 線又は紫外線によるリソグラフィー、及び電鍍を利用したパラジウム・ニッケルフィルターの作製方法を説明する模式図である。

[図8B] X 線又は紫外線によるリソグラフィー、及び電鍍を利用したパラジウム・ニッケルフィルターの作製方法を説明する模式図である。

[図8C] X 線又は紫外線によるリソグラフィー、及び電鍍を利用したパラジウム・ニッケルフィルターの作製方法を説明する模式図である。

[図8D] X 線又は紫外線によるリソグラフィー、及び電鍍を利用したパラジウム・ニッケルフィルターの作製方法を説明する模式図である。

[図8E] X 線又は紫外線によるリソグラフィー、及び電鍍を利用したパラジウム・ニッケルフィルターの作製方法を説明する模式図である。

[図8F] X 線又は紫外線によるリソグラフィー、及び電鍍を利用したパラジウム・ニッケルフィルターの作製方法を説明する模式図である。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明の実施形態について詳細に説明する。

[0012] 1. 末梢循環腫瘍細胞(CTC)又は希少細胞を分離する金属フィルター

本明細書中の「CTC」とは、がん患者の血液に含まれる循環腫瘍細胞であり

、血液細胞等の体液細胞に比べて非常に細胞数が少ない希少な細胞をいう。

[0013] 本明細書中の「希少細胞」とは、がん患者の腹水、腹腔洗浄液、リンパ液、髄液などの体液に含まれる希少な腫瘍細胞（「希少がん細胞」）をいう。

[0014] 本実施形態の金属フィルター17は、特定の金属からなる極薄板に非常に多数の孔（孔密度 1×10^4 /cm²以上）が均一に又は規則的に形成された多孔性金属フィルターである。従来公知のCTC分離フィルターは、パリレン(parylene)、ポリカーボネートなどの樹脂（又はポリマー）、シリコンから形成されたものである。これに対し、本実施形態のCTC分離フィルターは、金属フィルター17であり、以下に記載するような、樹脂フィルター等と異なる優れた特性を有している。

[0015] 金属フィルター17の材質は、例えばパラジウム(Pd)、白金(Pt)、金(Au)、銀(Ag)、イリジウム(Ir)、ロジウム(Rh)又はルテニウム(Ru)の少なくともいずれか1つを含む。この材質は、パラジウム(Pd)、白金(Pt)、金(Au)、銀(Ag)、イリジウム(Ir)、ロジウム(Rh)又はルテニウム(Ru)の単体金属でもよく、又は例えば、パラジウム(Pd)・ニッケル(Ni)合金、白金(Pt)・ニッケル(Ni)合金、又は金(Au)・ニッケル(Ni)合金等でもよい。合金の場合、好ましくは、ニッケルなどの相手金属に対し、上記の金属の比率が多い。これらの金属は、例えばニッケル(Ni)などの金属と比べると、CTC、希少細胞などの細胞に対する毒性が非常に低い（図1）。理由としては、パラジウム(Pd)自体の毒性が低いことと、Pdとニッケル(Ni)の合金は固溶体を形成することによりニッケル(Ni)の溶出を防ぐことができるからである。これらのうち、金属コスト、低毒性の点で、パラジウム又はパラジウム(Pd)・ニッケル(Ni)の合金が好ましく、Pd・Ni合金の場合、Pdが50%（重量）超である合金、例えばPd80%・Ni20%の合金が好ましい。PdとNiの合金フィルター、Pdフィルターなどの本実施形態の金属フィルターは、耐酸性、耐熱性であり、フィルターのままFISH法などの種々の染色が可能であり、そのまま（正立）顕微鏡観察することができる。また、硬性かつ耐久性が高く、表面処理なしでも細胞が接着しにくいためフィルター上のガラスキャピラリーによるマイクロマニピュレ

ーション(micromanipulation)が容易である(図4B)。そのため、本実施形態の金属フィルター17は、1細胞分取の自動化に直に対応可能であるという優れた利点を有している。

[0016] 金属フィルター17の形状は、CTC分離デバイスの濾過ユニットに装着されるフィルターリング(カセット)に配置可能であれば特に限定されないが、例えば円形、方形などの形状を含み、好ましくは、円形である。また、金属フィルター17のサイズは、サンプル(血液)量、孔径、時間、流速、耐圧などの物理的ファクター、操作性、コストなどを考慮して適宜決定されうる。例えば血液5mLを処理する場合、直径(円形の場合)、又は、縦、横の長さ(方形の場合)が、通常、約10~15mmであるが、血液量に応じてサイズを、非限定的に、例えば約5~20mmの範囲とすることもできる。また、金属フィルター17の厚さは、孔密度、耐圧、コストなどとの関係を考慮して適宜決定されるものとし、通常、10~40 μ m、好ましくは約15~40 μ mである。

[0017] 図2A、図2B、図2Eに示されるように、金属フィルター17は、均一で規則的に配置された孔101を多数有する。この孔101は、後述する窪み102に形成されている。フィルター表面積1cm²あたりの孔101の密度は、格子配列、千鳥配列など配列の形態により異なるが、通常 $1 \times 10^4 \sim 2 \times 10^5/\text{cm}^2$ 、好ましくは $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5/\text{cm}^2$ である。また、孔101の孔径は、CTC又は希少細胞を通過させない、かつ、血球等の血液成分等、CTC又は希少細胞以外の体液細胞を通過させることができるサイズを有するものである。ヒト血球成分の大きさ(長径)は、ヒストグラム解析の結果、赤血球で約6~7 μ mであり、白血球で約7~9 μ mであり、血小板で5 μ m未満であるのに対して、CTC又は希少細胞で約10~20 μ mである。したがって、孔101の窪み102への開口位置での孔径は、通常約7~10 μ m、好ましくは約7.5~9 μ m、さらに好ましくは約7.5~8.5 μ mである。

[0018] 金属フィルター17はさらに、CTC又は希少細胞を捕捉することができる大きさの窪み102(又は凹部)を有している。窪み102のサイズは、CTC又は希少細胞が捕捉可能なサイズであればよく、非限定的に、例えば直径20~30 μ m及び深さ5~15 μ m、好ましくは直径25~30 μ m及び深さ10 μ mである。前記の窪み1

02は、上記の全部又は一部の孔101の上部に形成してもよく、高い孔密度を維持するためには、このような形態が好ましい。深さが5 μ m未満では、CTCが入り込めない。CTCがほぼ完全に入り込むようにするには、少なくとも約5~15 μ mの深さが必要である。このような窪み102の数は、孔101の数に対して好ましくは80~100%、さらに好ましくは100%（すなわち、すべての孔101の上部に窪み102が存在する）である。

[0019] 金属フィルター17において孔101が「規則的に配置」されているとは、できるかぎり高密度になるような配置であって、すべての孔101が、特定の規則性をもって配列されていることを指す。そのような規則性には、例えば格子状の配列、千鳥格子の配列、放射状の配列、同心円状の配列などが包含される（図2 A、図2 B及び図2 C）。図2 A、図2 B（千鳥格子配列）は、孔101の上部に深さ10 μ mの窪み102が形成されており、全体的に立体構造となっているため、本明細書では、このような形態のフィルターを3Dフィルターと称する。一方、図2 C（格子配列）は、孔101の上部に深さ1 μ mの窪みが存在するが、全体的に平面に近い構造を有するため、本明細書では、このような窪みの深さが5 μ m未満の形態のフィルターを2Dフィルターと称する。この2Dフィルターは、特開2011-163830号公報の図5に記載のサイズ選択マイクロキャビティアレイに相当する。この2Dフィルターの窪みは、CTC又は希少細胞の大きさに対して浅すぎるため、孔にトラップされた該CTC又は希少細胞を周囲の残存血液細胞から隔離することができない。これに対し、本実施形態の金属フィルター17は、3Dフィルターであり、窪み102を設けることによって、1) 血球細胞のコンタミネーションなく、CTCを1個ずつ配列（パターンニング）できること、2) 一定の条件下で発生する重力とは逆向きの流れを利用し、水圧とのバランスを最適化することにより、細胞が孔101にトラップされる強さを制御できること、などの理由によりマニピュレーションによる正確かつ簡便で、ソフトな1細胞ピッキングが可能となる（図4 A）。ただし、窪み102の深さが深いと（15 μ mを超えると）、CTCの回収率や濾過速度には影響はないものの、逆に1細胞パターンニングが不完全になったり、ピッキングに際し抵

抗となるなど不具合が生じうる。

[0020] 金属フィルター17の周縁は、孔なしに縁取りされていることが好ましい。縁部が存在することによって、CTC計測が正確になり、また金属フィルター17を傷つけることなしにピンセットでつまむことが可能になる。また窪み102を設けることによって電鍍の条件によっては金属フィルター17に若干反りが生じる場合があるが、ポリカーボネートなどのサポート材を上下から超音波溶着するなどによって縁取りすれば、反りの矯正は可能である。

[0021] 本実施形態の金属フィルター17は、例えばLIGA(Lithographie Galvanoformung Abformung)技術を利用することによって作製することができる(服部正、表面技術、Vol. 62, No. 12, 619-624, 2011; W. Elufeld and H. Lhe, Radiat. Phys. Chem., 45(3): 340-365, 1995)。1つの例として、基板上にレジスト、吸収材(任意成分)、マスクを積層し、紫外線、X線又はシンクロトロン放射光を照射してレジストパターンを形成したのち、基板を電極として電鍍を行う金属メッキを行い、所定の開孔を残すところで電鍍を終え、さらにレジストの除去を行うことを含む方法により電鍍フィルターを作製することができる(図8A～図8F参照)。

[0022] 2. 末梢循環腫瘍細胞(CTC)又は希少細胞分離用デバイス

本実施形態はさらに、多孔性の金属フィルター17を備えたことを特徴とする、血液等の体液からCTC又は希少細胞を分離するためのデバイスを提供する。

[0023] 多孔性の金属フィルター17は、上記1節で説明したとおりである。コストなどの面で、好ましいフィルターは、パラジウム(Pd)フィルターまたはパラジウム(Pd)・ニッケル(Ni)合金フィルターである。

[0024] 本実施形態のデバイスでは、金属フィルター17に対して流路が垂直となるように該金属フィルター17を装着する。金属フィルター17は、通常、フィルターカセット16に脱着可能に又は脱着不能にセットされ、該フィルターカセット16がデバイスに固定される。フィルターカセット16は、金属フィルター17を固定するための適当な幅をもつ縁を有し、かつ、内側が開放スペースとな

っている、上下2枚の部材（フィルターリング上、下）で構成されており、該部材間に金属フィルター17が固定される。必要により、該部材と金属フィルター17の間には、パッキング（例えば、テフロン（登録商標）、ゴム、紙など）を挟んでもよく、これにより、金属フィルター17の変形と液漏れの防止を可能にする（図3B～図3C）。フィルターカセット16の部材は、樹脂（ポリマー）、ゴム、金属などの材質からなり、2つの部材には、フィルターを固定するための手段が施されている。そのような手段には、例えばネジ溝などが挙げられる。或いは、フィルターカセット16は、単純に上下からの圧力で金属フィルター17を固定する（圧入）ような構造であってもよい。或いは、金属フィルター17とフィルターカセット16が一体となるようにフィルターカセット16を作製してもよく、この場合、金属フィルター17は、取り外せないようにフィルターカセット16に固定される。

[0025] デバイスは、金属フィルター17が装着されたフィルターカセット16を含む濾過ユニット11の他に、リザーバーユニット10、流量調節ユニット12、及び排液回収ユニット14（液だめベース）をさらに含むことができる（図3A）。

[0026] リザーバーユニット10は、血液等の体液サンプルを入れる容器であり、ガラス、ポリマーなどの液面が判別可能な（例えば透明な）材質からなり、必要に応じて、液量（すなわち、計量）目盛りを有していてもよい。

[0027] 濾過ユニット11は、上で説明したとおりであり、金属フィルター17を脱着可能に装着するためのフィルターカセット16を含む。

[0028] 流量調節ユニット12は、リザーバーユニット10、フィルターカセット16を含む濾過ユニット11を通して自重（すなわち、重力）により自然流下する血液等の体液の流量又は流速を調節するための装置を有する。そのような装置は、例えば、鋭角構造の先端を有するネジ込み式の凸型ネジであり、ネジを締めこむとき、廃液チューブを圧迫し、流量が減少するか又はゼロ（停止）となり、一方、ネジを開放するとき、流量が増加する。ネジは、例えば金属、樹脂、ポリマーなどの材質からなる。

[0029] 排液回収ユニット14は、濾過した後の血液等の体液や、デバイスを洗浄したときの排液などを回収する容器（液だめベース）を含む。該排液回収ユニット14は、例えばガラス、樹脂、ポリマー、金属などの材質からなる。

[0030] 各ユニット間の固定は、例えば回転による取付け又は取外しが行われるねじ機構9（図3A）を利用して固定してもよいし、差込み式の隙間はめ18（図3C）で行ってもよいし、或いは、その他の慣用の固定具で行ってもよい。さらに、上記の各ユニットに加えて、ユニットを組み立てた構造体を設置するためのスタンドを設けることができる。

[0031] デバイスの一例を、図3A（外観）、図3B（構成部品）、及び図3C（組み立て時のデバイスの正面図）に示す。図中、濾過ユニット11は、フィルターカセット16を含んでいる。流量調節ユニット12は、液量調節ねじ8を含んでいる。排液回収ユニット14は、その上面に液だめフタ13、その側面上部に空気孔7が設けられている。デバイスには、さらにスタンド15が含まれている。

[0032] デバイスは、加工のしやすさやコストの面で、その全体についてアクリルなどの樹脂又はポリマーで形成されているのが好ましい。透明な材質であれば、液体の流下速度を監視できるので好ましい。デバイスの大きさは、スタンド15を除く組み立て構造体の場合、横幅約10～15cm、高さ約20～30cmであり、約5～7.5 mLの血液サンプルを濾過するのに適するサイズであるが、サンプルの容量が大きい場合でも小分けしてアプライすることにより本サイズで十分対応ができる。

[0033] なお、以上の記載は試作機の仕様であって、量産型は別途、本試作機をもとに金型を作製し、例えば樹脂、プラスチック等の材料により作製するため、低コストな使い捨て型デバイスの生産が可能である。

[0034] 本実施形態のデバイスは、自重（重力）で濾過のための流速を得るポンプレス（すなわち、ポンプ不使用）方式であり、従って解放系である。これは、公知のフィルター型CTC分離デバイスで採用されるポンプ方式又は陰圧チューブ方式の駆動力と異なる。これら従来の方式では、細胞にストレスを与えた

り、細胞の固定や、流路の閉鎖性のために生細胞の1細胞分取が困難であるなどの課題があったが、本実施形態のデバイスは、このような課題を解消することができる。

[0035] 本実施形態のデバイスは、細胞への毒性が非常に低いパラジウム等の金属フィルター17への適用、該金属フィルター17の超高孔密度、平坦表面加工および金属フィルター17の3D化により、血液等の体液の前処理なしでもCTC或は稀少細胞が孔101にトラップされる流速を比較的低速に維持したままで血液細胞の高速濾過を可能とした。具体的には、5mlの全血を洗浄も含めて30分程度での高速濾過が可能でありながら、孔101を通過する流速は比較的遅い。また、きわめて平滑な孔101の表面性状を有するため、細胞に与えるストレスや傷害性が低い。

その結果、血球細胞などのコンタミネーションが少ない状態で、CTC又は稀少細胞を整列させることができる。しかも孔101の上に窪み102を設けることにより、一定の条件下では流体力学的に重力と逆方向の流れが発生すると考えられる。このため、CTCが孔101に深くトラップされることなく、従ってCTCにかかる剪断応力を最小限に抑えることができる。このため、CTC又は稀少細胞の細胞傷害を最小限に抑えることができ、CTC又は稀少細胞をほぼ100%の生存率でかつ約80%以上の回収率で分離することが可能である。

[0036] 3. 末梢循環腫瘍細胞(CTC)又は稀少細胞分離方法

本実施形態はさらに、上で説明した金属フィルター17を装着したデバイスを使用してがん患者の体液からCTC又は稀少細胞を分離する方法を提供する。

[0037] 具体的には、この方法は、本実施形態のデバイスにがん患者の、例えば血液、腹水、腹腔洗浄液、髄液又はリンパ液から選択される体液を注入すること、及び、重力のみに頼った流速により、CTC又は稀少細胞を金属フィルター17の上部に分離することを含む、体液からCTC又は稀少細胞を分離する方法である。

[0038] 検体としてのがん患者の体液は、CTC又は稀少細胞を含有する又はCTC又は稀少細胞が含有することが疑われる体液であり、主として血液又はリンパ液

である。

[0039] CTC又は希少細胞の分離に使用する体液の量（体積）は、通常1～20mL、好ましくは3～7mLである。通常、体液（特に血液）はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)（目的に応じて0.25～1 mM EDTA含有のPBS）で、例えば2～20倍に希釈した後に濾過する。特に血液量や血球数の多い場合には、以下の前処理を行ってもよい。

[0040] 前処理は、例えば、体液を磁性ナノ粒子含有カチオン性リポソーム(MCL)と混合して、体液中のCTC又は希少細胞及び白血球中に該磁性ナノ粒子を取り込ませたのち、本実施形態の金属フィルター17に通じる流路に流し込み、流路の途中に配置された磁石で磁性化されない赤血球等の細胞を予め該体液から除去することを含む（プレフィルター）。これは、通常、赤血球細胞には、磁性ナノ粒子は取り込まれないこと、一方、CTC又は希少細胞や白血球には、磁性ナノ粒子が取り込まれることの性質を利用したものである。赤血球を、このプレフィルターを通して除去し、磁気を解除してCTC又は希少細胞及び白血球細胞を本フィルターデバイスに導くことにより、金属フィルター17の流速を大幅に遅くした状態で白血球を除去することができるため、CTC又は希少細胞は孔101に強くトラップされずに金属フィルター17の窪み102に残留する。このような前処理と本実施形態の金属フィルター17による処理を併用する場合、金属フィルター17による処理を単独で行う場合に比べ、CTC又は希少細胞にかかる剪断応力が軽減され、より高い回収率(80～90%)で回収することができる（図5 A，図5 B）。

[0041] 本方法は、体液をデバイスに注入し、重力での流速により濾過を行うという単純な方法であるが、超高孔密度（例えば、 $5 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^5 / \text{cm}^2$ ）の3D金属フィルター17を使用することによって許容可能な十分な迅速処理を達成できる。例えば、検体(全血)約5.0mLは洗浄を含めて約30分で処理することができる。洗浄液にはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いるが、必要によりEDTAを含んでもよい。

[0042] 次に、金属フィルター17上のCTC又は希少細胞の数を計測するために、CTC

又は希少細胞に特異的に結合する蛍光標識抗体、例えばAlexa488標識抗EpCAM抗体や白血球に特異的に結合するPE標識抗CD45抗体などの抗体混合物を用いて、CTC又は希少細胞を染色し、顕微鏡によりCTC又は希少細胞の個数などを計測する。このとき染色は、デバイスに固定された金属フィルター17上で直接行うことができる。

[0043] 染色後、フィルターカセット16をデバイスから取り外し、フィルターカセット16のまま正立型蛍光顕微鏡下でCTC数をカウントし、さらにCTC又は希少細胞を金属フィルター17の窪み102から1個ずつ微細なガラスキャピラリーからなるマニピュレーターを用いて回収することができる。また遺伝子増幅の有無を調べるFISH法は金属フィルター17をフィルターカセット16から取り出し、そのまま固定して行うことができる。

[0044] また、本実施形態の3D Pd・Ni合金フィルターデバイスは、担がんマウスの末梢血中のCTCの測定にも用いることができる。本発明者らは、GFP導入大腸がん細胞株(COLM5-EGFP)や胃がん細胞株(GCIY-EGFP)などの皮下移植自然転移モデルを用いてCTCを再現性よく検出できるCTCモデル(マウス)を複数株作製した。移植1〜3か月後のマウス後大静脈血を採血し、本実施形態の3D Pd・Ni合金フィルターデバイスで濾過を行い、GFP蛍光を指標にCTC数を測定した。その結果、転移の程度に相関して、マウス血液中にCTCが検出されることを確認した(図6A, 図6B)。さらに、回収したCTC数個からRNA, DNAを抽出し、特定の遺伝子の発現や遺伝子変異を解析可能なことを確認した。

[0045] さらに、乳がん患者及び胃がん患者などの実際の臨床検体(末梢血)でも、本実施形態の3D Pd・Ni合金フィルターデバイスで濾過を行い、CTC染色の後CTC数を測定したところ、マウスCTCモデルと同様に、転移性患者検体では健常人の血液に比べ、有意に多くのCTCを検出し、本実施形態の臨床検体における有効性も確認した(図7A, 図7B, 図7C)。

[0046] 以上のことから、本実施形態の方法は、転移再発の早期診断、コンパニオン診断や薬剤の治療効果の評価など、転移がんの診断と治療法の両面で今後重要な役割を担うことが期待できる。また、本実施形態のデバイス及び方法

によって、CTCの生体内における動態など転移メカニズムの解明など基礎的研究にも多いに役立つと予想される。

実施例

[0047] 以下に実施例を示して本実施形態をさらに詳細に説明するが、本実施形態の技術的範囲は、これらの具体例によって制限されないものとする。

[0048] [実施例 1]

[パラジウム・ニッケルフィルターの製作方法]

図 8 A に示すように、基板 19 に感光性レジスト 20 を所定の厚さに塗布した。尚、基板 19 として、導電性のないシリコン基板やガラス基板を用いる場合は導電膜層（例えば銅）を付加するが、ステンレス基板、ニッケル基板、銅基板などの導電性を有するものでもよい。

[0049] 次に図 8 B に示すように、所定のパターンが描画された Cr マスク 21 を介して紫外線 22 を照射することで露光を実施した。ここで、紫外線 22 の代わりに X 線を光源とする場合は Cr マスク 21 の代わりに X 線マスクを用いることになる。

[0050] 次に、図 8 C に示すように、現像工程を経ることで基板 19 上に感光性レジスト 20 をパターン化した。

[0051] 次に図 8 D に示すように、基板 19 の表面から電鍍によってパラジウム・ニッケル合金 (Pd・Ni) (Pd:Ni 重量比、例えば 80:20) の析出成膜 23 を析出させ、パターン化した感光性レジスト 20 を覆いかぶさるように電鍍による Pd・Ni の析出成膜 23 の析出を連続的に実施し、所定の開孔 24 を残すところで電鍍を終了させた。

[0052] 次には図 8 E に示すように、形成した感光性レジスト 20 を有機溶媒により除去した。この感光性レジスト 20 の除去は酸素プラズマによるドライエッチングを利用してもよい。

[0053] 最後に図 8 F に示すように、基板 19 を剥離、もしくはエッチング除去した。

このような工程を経て、パラジウム・ニッケルフィルター（「3D フィルター」又は「Pd・Ni フィルター」ともいう）を製作した。

[0054] [実施例 2]

[パラジウム・ニッケルフィルターの特徴づけ]

本パラジウム・ニッケルフィルターは、独自かつ高度の電鍍技術で微細加工して作製されるため、他のポリカーボネート、パリレンまたはシリコン製のフィルターにくらべて100,000/cm²以上の高孔密度、10%以上、通常50%以上の高開口率を達成できる。これにより全血の高速濾過が可能になり、目詰まりもなく、CTCの高率かつ迅速な回収が可能となった(図2 Aおよび図2 B)。また、平滑な表面性状や孔の均一性など高精度な加工と細胞毒性の少ないパラジウムを材質とすることが相まって細胞障害も大幅に低減しうる(図1 A, 図1 B)。

[0055] さらにまた、本パラジウム・ニッケルフィルターは、121℃、30分の熱処理(Autoclave)が可能で、さらに次亜塩素酸(市販の1%ハイター)や1規定塩酸による化学薬品耐性試験(1時間)において、なんら形状に変化なく、またCTC回収率など機能的にも変化は認めなかった。これにより滅菌処理が可能となり医療分野での利用や再利用など低コスト化を達成できる。

[0056] [実施例 3]

[培養がん細胞を用いたCell Spike実験]

ヒト胃がん細胞MKN-45、GC1Yおよびヒト大腸がん細胞COLM-5を、10%牛胎児血清を含むRPMI培地に、 1.0×10^6 個/10 cm dishとなるように播種し、37℃/5%CO₂下で静置培養した。培養3~4日後、培地を吸引除去し、PBS(pH7.2)で洗浄した後、0.2%トリプシン/2 mM EDTAを添加し、37℃/5%CO₂下で3~5分インキュベートした。検鏡し細胞がdishから剥離していることを確認して、血清を含むRPMI培地を加え、トリプシンの作用を停止させた後ピペティングし、細胞を回収した。回収した細胞は遠心分離(1200 rpm、3分)し、上清を吸引除去して新鮮なRPMI培地に再懸濁した。トリパンブルーを用いた色素排除法により生細胞数を計数し、 1×10^6 細胞/mlに調製後、新しいdishに播種した。

[0057] 細胞捕捉 (Cell Spike) 実験には、ヒト大腸がん細胞COLM-5およびヒト胃がん細胞GC1Yに、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を強制的に発現させた細胞株であるCOLM5-EGFP細胞、GC1Y-EGFP細胞を用いた。上記のように調製した細胞懸濁液を用い、健常人からEDTA2Na入り真空採血管に採血した血液2~2.5mlに50、500、又は5000個の培養がん細胞を混合しサンプルを用意した。

[0058] [フィルターデバイスによる培養がん細胞の分離方法と検出操作]

3Dフィルターを装着したCTC分離デバイスのリザーバーユニットに1mM EDTA/0.5%BSAを含むPBSを5ml導入してリザーバーおよびフィルターを洗浄した後、GFP導入あるいは非導入培養がん細胞 (50、500、又は5000個) を添加した血液 (2~2.5ml) をPBSで5~10倍に希釈し導入した。約10分間の濾過後、残留する血球成分を洗浄するためPBSを5ml導入した。GFP非導入培養がん細胞の場合、PBS洗浄液を流しきった後、液量調節ねじを締め、流路を閉じた後、5000 μ lの細胞染色液 (Alexa488標識抗EpCAM抗体、PE標識抗CD45抗体およびHoechst33342。それぞれ0.5 μ g/ml) を導入した。GFP導入培養がん細胞の場合、後2者からなる細胞染色液を導入した。遮光して30分室温で反応させた後、液量調節ねじを開放し、細胞染色液を排出した。リザーバーに5mlの1mM EDTA/0.5%BSAを含むPBSを導入してフィルター上の細胞を洗浄した。この作業をPBSのみでもう1回行い、液量調節ねじを締めた後、CTC分離デバイスからフィルターカセットを直に取り出し、フィルターカセット上部の液貯めに100~200 μ lのPBSを添加し、顕微鏡ステージに載せ、そのまま蛍光顕微鏡観察を行った。

[0059] 光透過性のない金属フィルター上に捕捉、回収されたがん細胞を観察するために、冷却CCDカメラ (Ri-1; Nikon) を装備した正立反射蛍光顕微鏡 (Eclipse LV100ND; Nikon) を用い、Hoechst33342、Alexa488、PE由来の蛍光を観察するためにU

V-1A、FITC、Cy3フィルターを用いてそれぞれ画像を取得した。画像取得および解析ソフトウェアにはNIS-Elements (Nikon) を用いた。

[0060] [フィルターデバイスを用いた培養がん細胞の回収率の検討]

3Dフィルターを装着したCTC分離デバイスには液量調節ねじがあり、自重によって流れる液量を調節することにより、流速を制御することができる。培養がん細胞500個を混合した10倍希釈血液(2.5mlの血液をPBSで10倍に希釈)を用いて、2ml/min、4ml/min、又は8ml/minに流速を変化させた場合の回収率を検討した。3Dフィルターは、窪みの直径30 μ m、窪みの深さ10 μ m、孔の直径8 μ m、孔密度99, 178/cm²、千鳥格子配列のPd・Niフィルターを使用した。その結果、2ml/min、4ml/minでは各々約90%、80%と高い回収率を示したが、8ml/minでは70%以下であった。2~4ml/minの流速であれば、80~90%の回収率を得られることが分かったので、以降の実験はこの範囲の流速で行うこととした(図5A)。

[0061] 次に、2.5mlの血液をPBSで10倍に希釈し、10、50、500、又は5000個の培養がん細胞を混合し、がん細胞の回収率を検討した。デバイスの流速は2ml/minである。50、500、5000個の細胞を混合した希釈血液からの回収率は85~95%であった(図5B)。わずか10個の細胞を混合した希釈血液からの回収率は平均70%であり、細胞数のカウントのバラツキを考慮すると少数の細胞であっても高い回収効率を有することが示された。

[0062] [回収した細胞の生存率の検討結果]

5000個の培養がん細胞を混合した希釈血液(2.5mlの血液をPBSで10倍に希釈)を3Dフィルターで分離し、捕捉した細胞の生存率についてトリパンブルーを用いた色素排除法により計数した。3Dフィルターは、窪みの直径30 μ m、窪みの深さ10 μ m、孔の直径8 μ m、孔密度99, 178/cm²のPd・Niフィルターを使用した。回収した細胞の生存率

は99%で、非常に細胞傷害性の低い回収方法であることが示された。ただし、1 mM以上のEDTA存在下で濾過した場合、回収したがん細胞の増殖性を見ると、対照（EDTA無添加）に比べて有意に低かった。しかし、抗凝固剤としてヘパリンを用い、コラーゲンコートdishを用いて接着を促進させると増殖性は有意に回復した。従って、EDTA存在下で濾過した場合の回収がん細胞の増殖性の低下はフィルターデバイスからのストレスよりも長時間のEDTA処理が原因と考えられた。

[0063] [3Dフィルターを用いた培養がん細胞の1細胞回収の検討]

がん細胞の捕捉、整列および回収の効率を向上させる目的で、金属フィルターは図2Aに示すように貫通孔の上部に窪みを設けた3D形状に加工している。この形状は直径20~30 μm 、深さ5~15 μm が望ましいが、先端径を40 μm 程度に加工したガラスキャピラリーを用いて捕捉した細胞を吸引回収する場合、窪みの直径は30 μm の場合が最も回収しやすかった。窪みの深さ5 μm と10 μm とを比較すると、深さは5 μm よりも10 μm の方が、マニピュレーション等により液面が動いても細胞は捕捉された窪みから移動しにくいため、安定して、しかもコンタミネーションなく、目標とする1細胞の回収が可能であった（図4Bに、マニピュレーターでがん細胞1個を回収しているときの明視野像を示す。）。抗凝固剤としてヘパリンを用いると、細胞の金属フィルターへの接着性が増し（なお、EDTA存在下では細胞は金属フィルターへの接着性を殆ど示さない）、マニピュレーターによる細胞の回収率が低下した。従って、抗凝固剤は目的に応じて使い分ける必要があると考えられる。

[0064] [実施例4]

[CTCモデルマウスからのCTCの分離]

*in vitro*の培養細胞と*in vivo*のCTCでは細胞の生存環境が著しく異なるため、健常人血液に培養がん細胞を添加するCell Spike実験だけではCTC分離デバイスの性能を正確に評価することは難しい。一方、患者の臨床検体では、がんの進行度（Stage）の異なる多数の

症例を収集し、これを測定し、統計的に解析しないとデバイスの性能を評価することは難しい。これらに対し、がん細胞移植後、経時的に再現性をもってCTCが出現するマウス（以下「CTCモデルマウス」と呼ぶ）が存在すれば、CTC分離デバイスの性能の迅速かつ正確な評価が期待できる。また、CTCモデルマウスは、CTCの生体内におけるダイナミックスの解析など、CTCの基礎的な研究にも極めて有用である。そこで独自にCTCモデルマウスの作製を行った。

[0065] [CTCモデルマウスの作製とそれを用いたフィルターデバイスの評価]

GFP遺伝子が導入されたことにより高輝度の緑色蛍光を発する転移性の高い、胃がん細胞株（GC1Y-EGFP）と大腸がん細胞株（COLM5-EGFP）をそれぞれ、ヌードマウスの皮下に移植した。経時的にマウスを屠殺し、後大静脈から0.5～1.0mlの血液を採取し、PBSで10倍希釈後にCTC分離デバイスでCTCを測定した。同時に倒立型蛍光顕微鏡で肺、肝、腎などの微小転移の有無を検討した。大腸がんCOLM5-EGFP皮下移植モデルでは、移植後1～2ヶ月までは肺転移は少数の微小転移に限られ、CTC数もほとんど0（ゼロ）で、稀に1～2個のCTCが検出された程度であった。一方、移植後2～3ヶ月では、肉眼的にも肺転移が認められ、少数ながら肝、腎にも転移が認められ、このとき10～100個程度のCTCが検出され、多いときには1000個以上のCTCが検出された（図6A及び図6Bに結果を示す）。胃がんGC1Y-EGFP皮下移植モデルでも、肉眼的転移および全身転移の出現に合わせてCTCが検出された。同様に本デバイスを用いてマウスLewis肺がん細胞株（Lewis-GFP）を用いた肺がんモデルでも実験を行い、CTCの出現が肝、腎などへの多臓器転移と同期することを明らかにした。CTCが肉眼的転移や全身的転移と同期して出現することから、CTC検出は、がん転移の早期診断に有用である可能性が示唆された。また、CTCモデルマウスを用いた検討から、本デバイスはCTCの生体内動態を正確にとらえることができる十分な感度と精度を備えていることが示された。

[0066] モデルマウスから分離したCTCに対し、各種の遺伝子解析を行った。免疫蛍光染色では金属フィルター上で直接染色が可能であり、HER2陽性胃がん担がんマウスCTCにおいてはHER2の過剰発現を検出し得た。マニピュレーターを用いて回収したCTCの遺伝子解析を行ったところ、1～数個のCTCがあれば、それからRNAやDNAを抽出・増幅し、RT-PCR法によるHER2等の遺伝子発現の解析や、ダイレクトシーケンス法によるKRAS等の遺伝子配列の解析などが可能であることを確認した。

[0067] [実施例5]

[胃がん患者及び乳がん患者の末梢血からのCTC分離]

胃がん患者4名、乳がん患者6名、健常人4名の肘静脈からEDTA2Na入り採血管で5mlの採血を行った。胃がん患者4名および乳がん患者6名は、愛知県がんセンター中央病院（日本、名古屋）に入院した患者である。患者からの採血は、愛知県がんセンター倫理委員会（日本、名古屋）で承認され、患者から同意書を取得した上で行われた。

[0068] 各人から採血後、1時間以内にPBSで10倍に希釈し、CTC分離デバイスにアプライし、濾過を行った。CTC分離デバイスの金属フィルターは、窪みの直径 $24\mu\text{m}$ 、窪みの深さ $10\mu\text{m}$ 、孔の直径 $8\mu\text{m}$ 、孔密度136, 325/cm²の3D Pd・Niフィルターを用いた。濾過は流速2.5ml/minで行った。フィルターカセット上の細胞をPBSで洗浄し、10%ホルマリンで室温で10分間固定し、洗浄後、Alexa488標識抗EpCAM抗体、PE標識抗CD45抗体、また場合によりAlexa350標識抗CKOscar抗体を含む細胞染色液をフィルターカセット上に添加し、室温で30分間反応させた。さらにPBSで洗浄後、Hoechst33342で核染色を行った。PBSで洗浄後、フィルターカセットごと正立型蛍光顕微鏡に移し、EpCAM⁺/(CKOscar⁺)/CD45⁻/Hoechst33342⁺細胞をCTCとして判定し、CTC数を計測した。その結果、健常人では4名ともCTCは0個であったのに対し、進行胃がん患者4名ではそれぞれ0、2、4、11個、進行乳がん患者6名ではそ

れぞれ1、3、4、11、15、22個であった。胃がん患者の染色像を図7Aに、乳がん患者の染色像を図7Bに、CTC数の測定結果を図7Cに示す。

[0069] [実施例6]

[磁性ナノ粒子による細胞の磁気分離の併用]

胃がん細胞N87を用いて、CTCの全回収を目指し、磁性ナノ粒子を用いた磁気分離（前処理）と、3D Pd・Niフィルターを用いた大きさによる分離とを併用し、回収率の向上を試みた。Magnetic Cationic Liposome（直径150nm）100pg／細胞をN87細胞100個の細胞懸濁液に2時間作用させ、白血球細胞20万個を含むウシ血清に混和させた後、磁気分離流路とフィルターを組み合わせたデバイスで捕捉した。約80～90%の細胞を捕捉回収することができ、フィルター単独に比べて回収率の向上が認められた。

産業上の利用可能性

[0070] 本発明の金属フィルターを装着したデバイスは、血液などの体液中のCTC又は希少細胞の分離を高い回収率で実現するとともに、CTC又は希少細胞を無傷（intact）に近い状態で回収できるため、CTC数の評価ばかりではなく、単一CTC細胞の遺伝子解析に使用することを可能にし、転移性再発の早期診断、治療効果のモニターやLiquid biopsy（体液生検）などに有効に使用できる可能性が高い。

[0071] （符号の説明）

7・・・空気孔

8・・・液量調節ねじ

9・・・ねじ機構（固定用）

10・・・リザーバーユニット

11・・・濾過ユニット（中にフィルターカセットを含む）

12・・・流量調節ユニット

13・・・液だめフタ

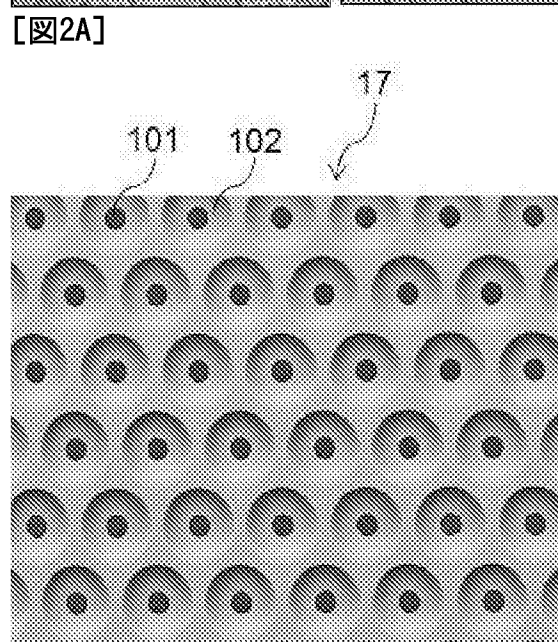
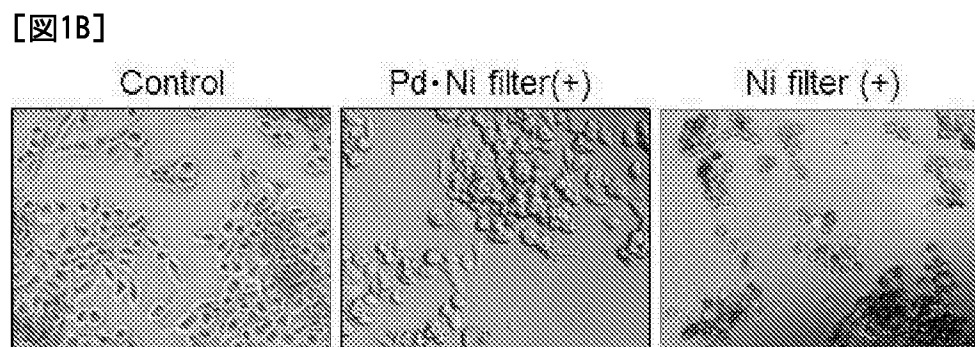
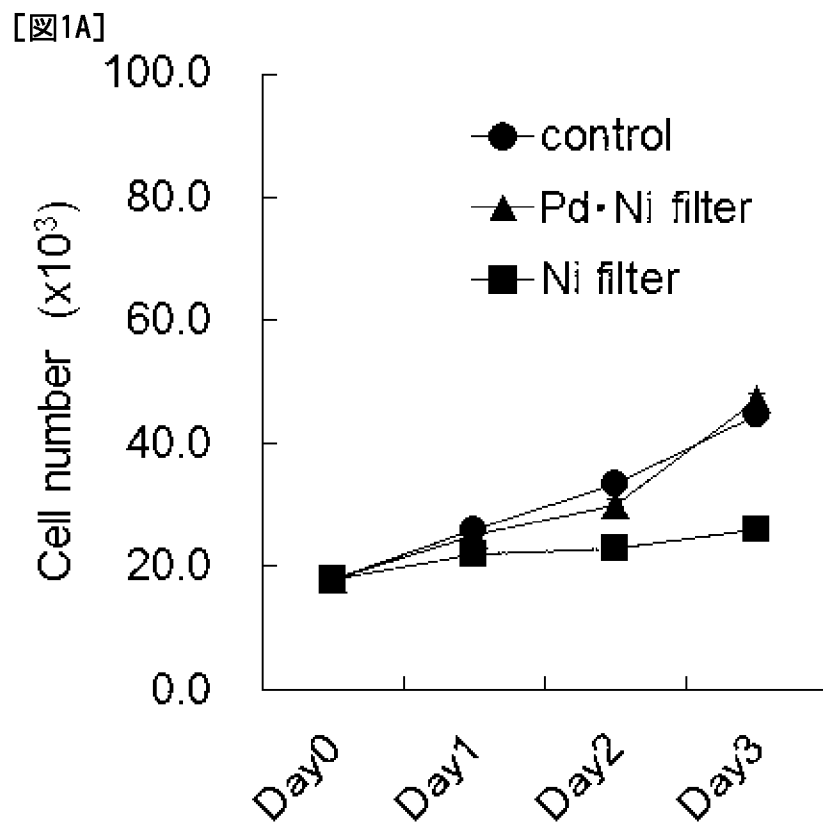
- 14．・排液回収ユニット（液だめベース）
- 15．・スタンド
- 16．・フィルターカセット（フィルターリングとも呼ぶ）
- 17．・金属フィルター
- 18．・隙間はめ（差込み式）
- 19．・基板
- 20．・感光性レジスト
- 21．・Crマスク
- 22．・紫外線
- 23．・パラジウム(Pd)・ニッケル(Ni)合金の析出成膜
- 24．・開孔

請求の範囲

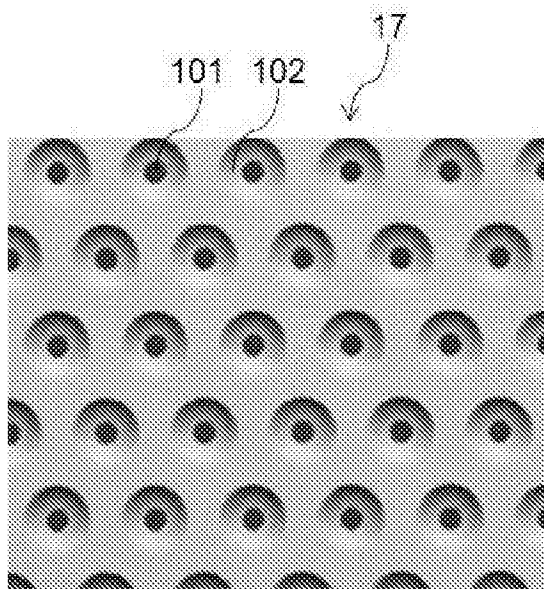
- [請求項1] 体液中の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞を捕捉することができる窪みと、該窪みに形成され前記末梢循環腫瘍細胞又は前記希少細胞以外の体液細胞を通過させることができる孔とを有する金属フィルターを備えた末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。
- [請求項2] 前記金属フィルターの材質が、パラジウム又はパラジウム・ニッケル合金である請求項1に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。
- [請求項3] 前記窪みの直径は $20\sim 30\mu\text{m}$ であり、前記窪みの深さは $5\sim 15\mu\text{m}$ である請求項1又は請求項2に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。
- [請求項4] 前記孔の直径は $7\sim 10\mu\text{m}$ である請求項1～請求項3のいずれか1項に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。
- [請求項5] 前記窪み及び前記孔の孔密度は、 1cm^2 あたり $1\times 10^4\sim 2\times 10^5$ 個である請求項1～請求項4のいずれか1項に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。
- [請求項6] 前記金属フィルターの厚さは、 $10\sim 40\mu\text{m}$ である請求項1～5のいずれか1項に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。
- [請求項7] 前記金属フィルターを装着するためのフィルターカセットを有する請求項1～請求項6のいずれか1項に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイス。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれか1項に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離用デバイスに、がん患者の血液、腹水又は腹腔洗浄液から選択される体液を注入して、該体液中の前記末梢循環腫瘍細胞又は前記希少細胞を、前記金属フィルターの前記窪みで捕捉した後、生きたまま回収する末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。
- [請求項9] 前記末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞を特異的に染色することをさらに含む、請求項8に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。

[請求項10] 前記体液を希釈又は前処理することを含む、請求項8又は請求項9に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。

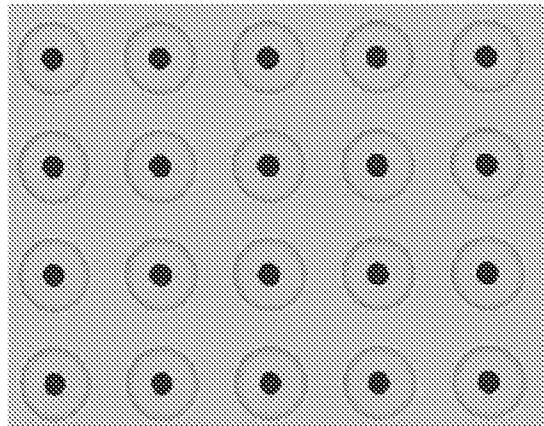
[請求項11] 前記前処理が、前記体液を磁性ナノ粒子含有カチオン性リポソームと混合して、前記体液中の前記末梢循環腫瘍細胞又は前記希少細胞及び白血球細胞中に前記磁性ナノ粒子を取り込ませたのち、前記金属フィルターに通じる流路に流し込み、前記金属フィルターの前に配置された磁石で磁性ナノ粒子を取り込まない赤血球等の細胞を該体液から除去することを含む、請求項10に記載の末梢循環腫瘍細胞又は希少細胞分離方法。



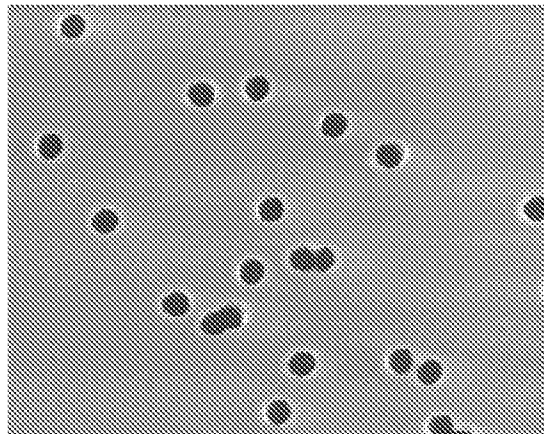
[図2B]



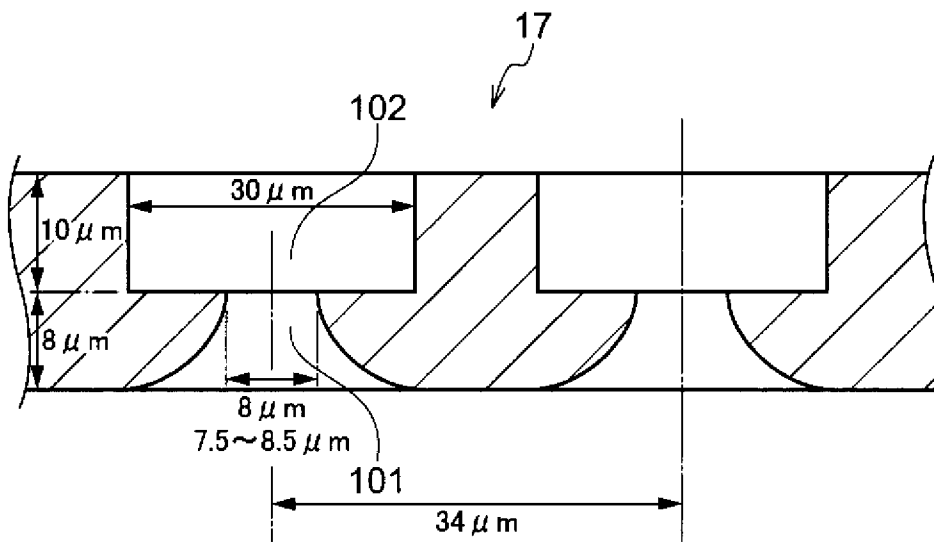
[図2C]



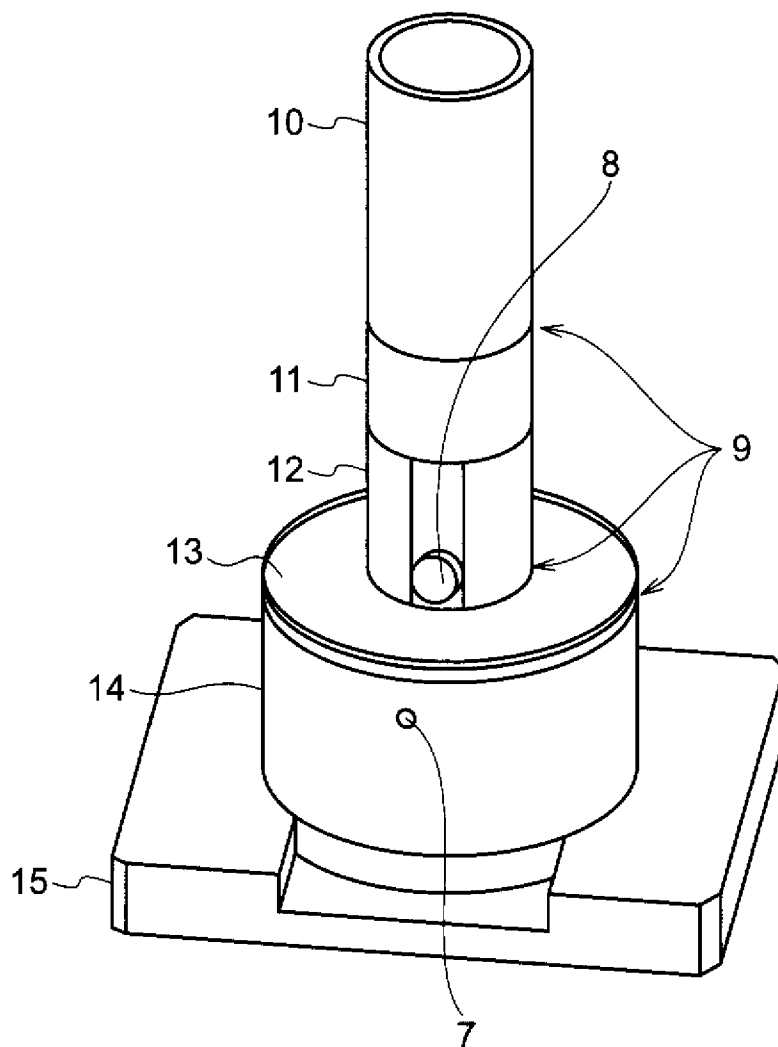
[図2D]



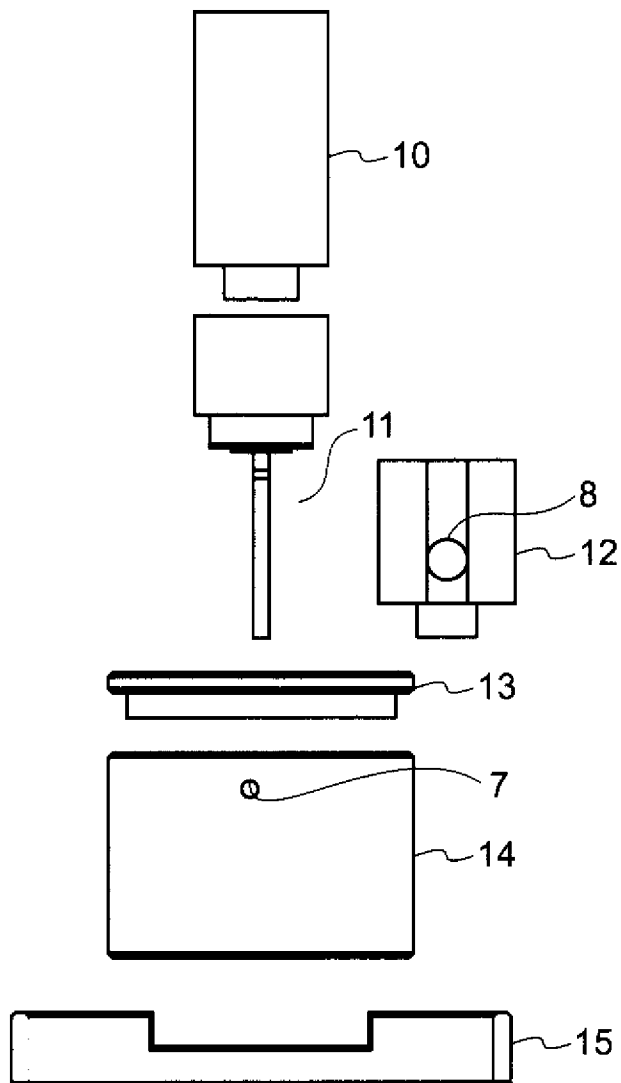
[図2E]



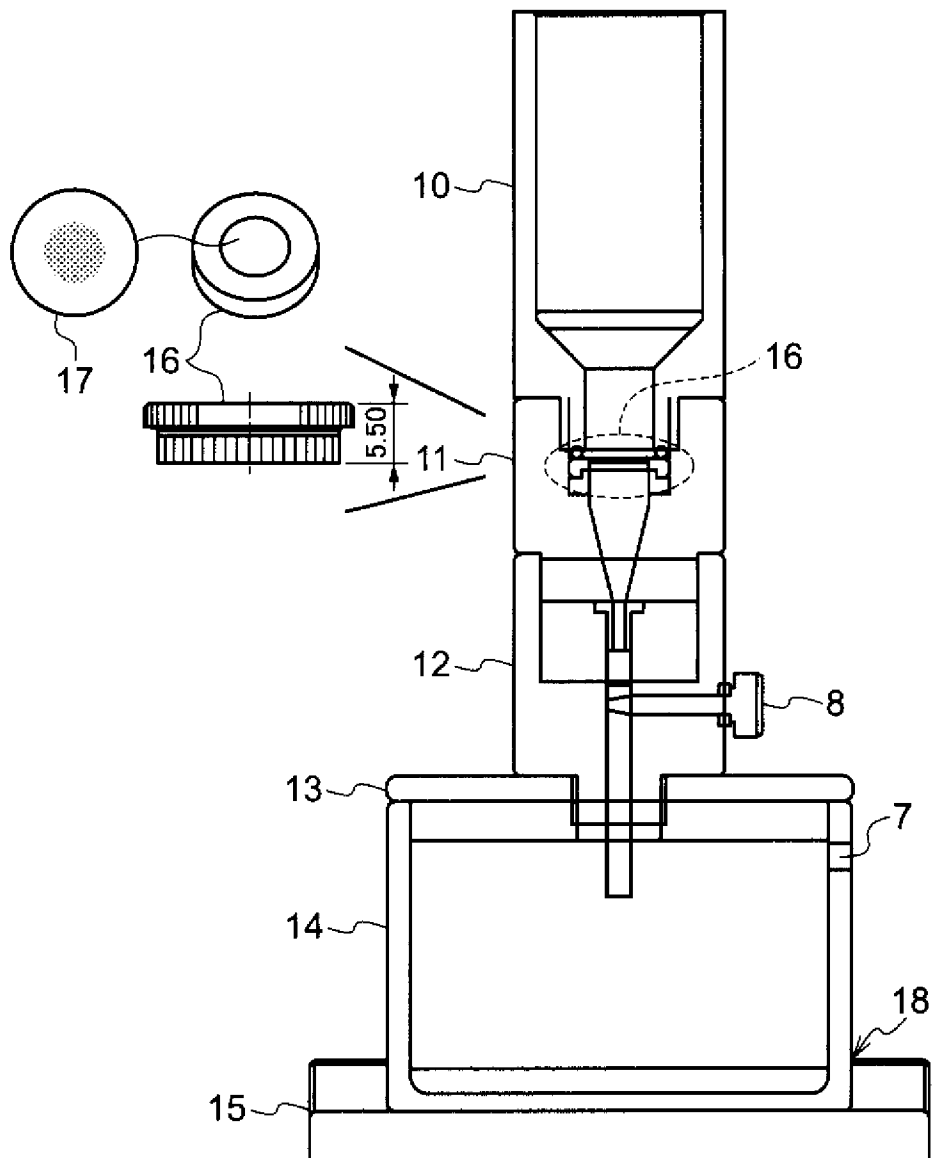
[図3A]



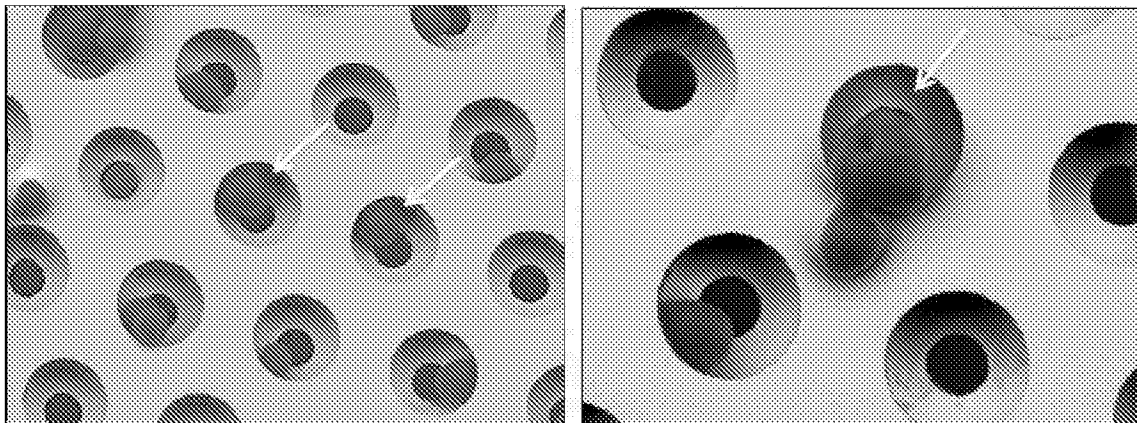
[図3B]



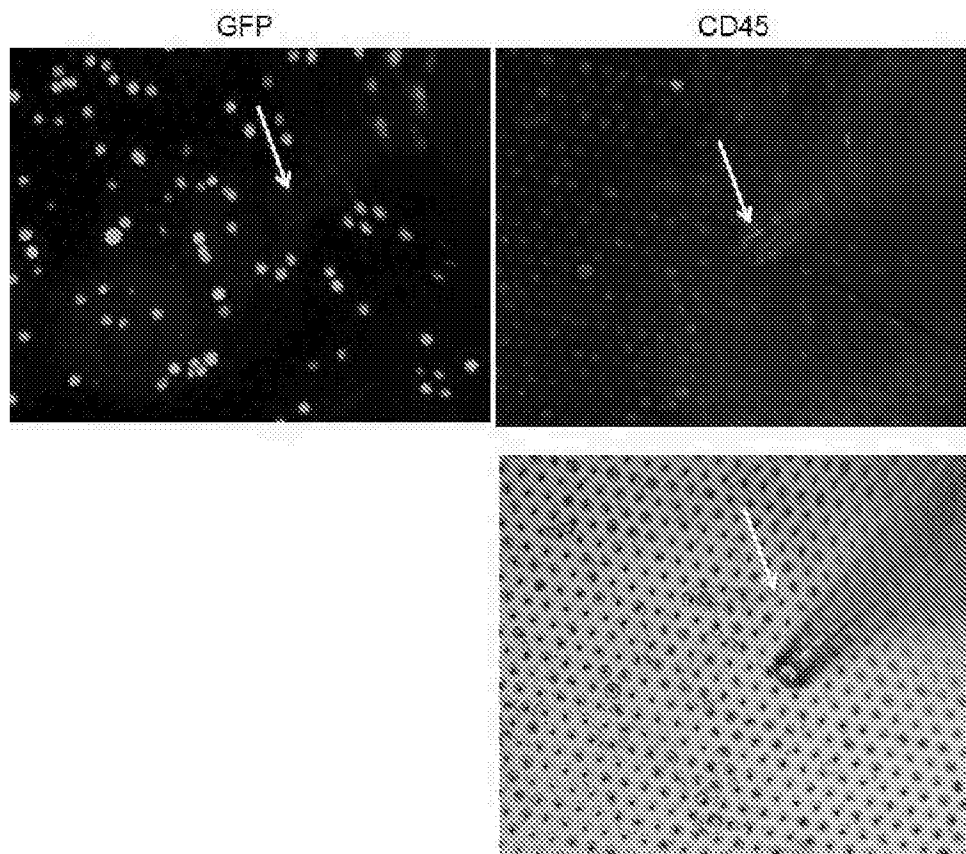
[図3C]



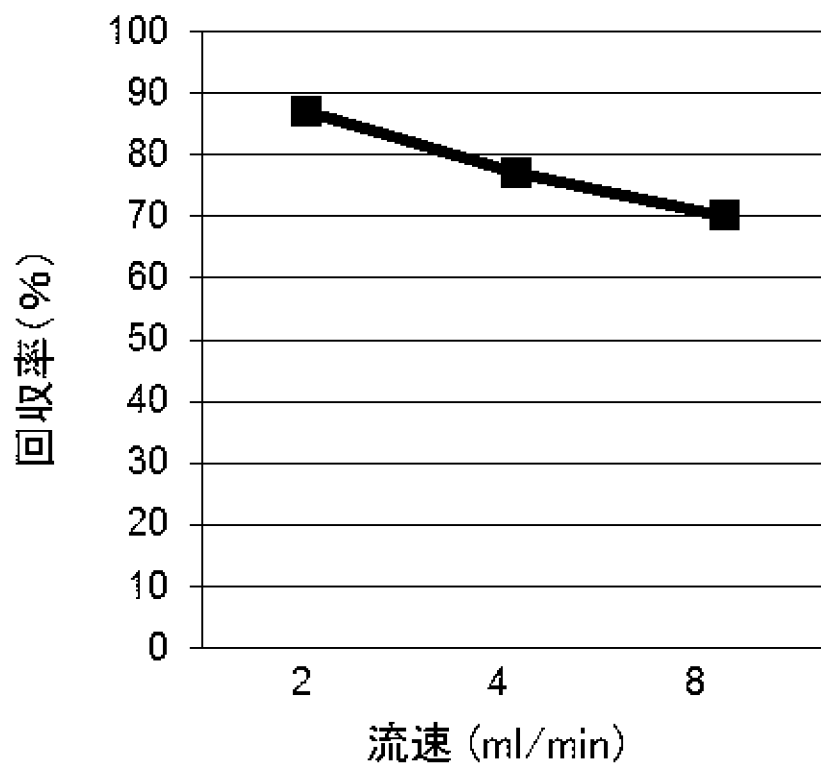
[図4A]



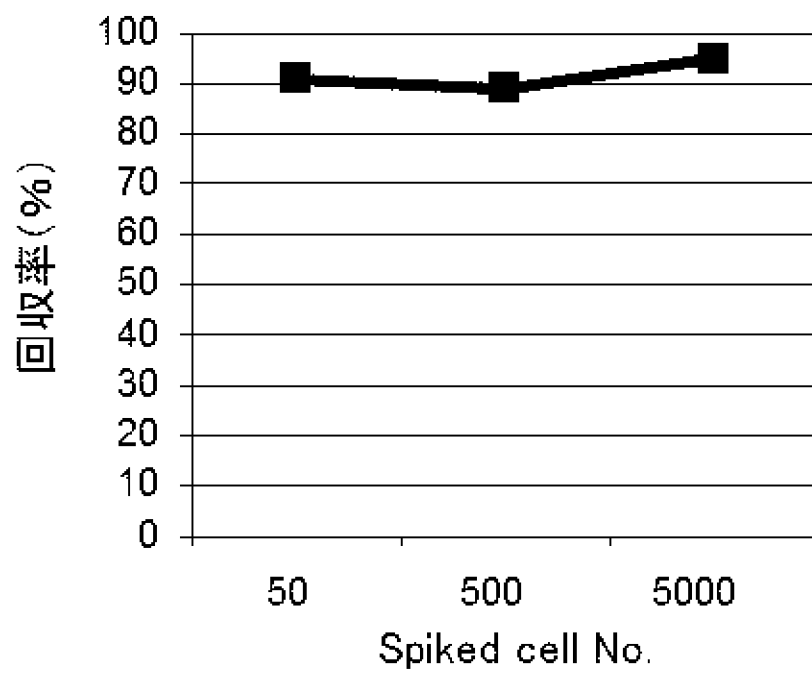
[図4B]



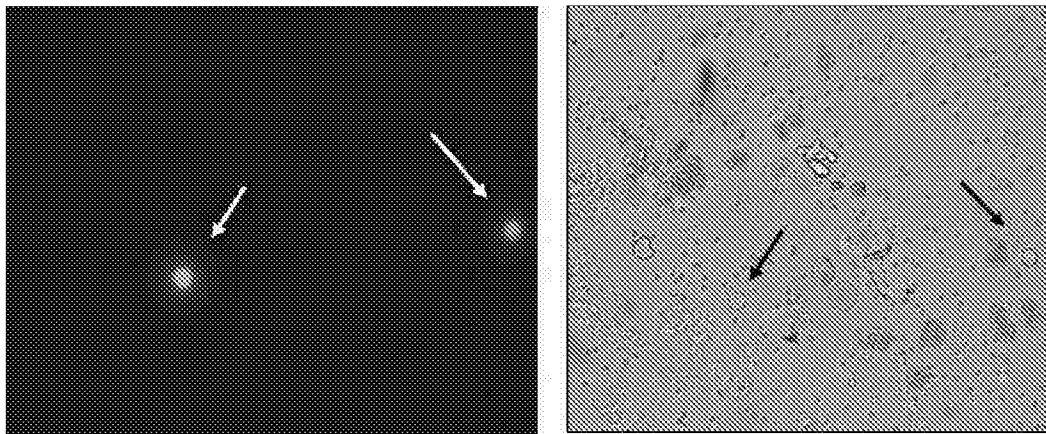
[図5A]



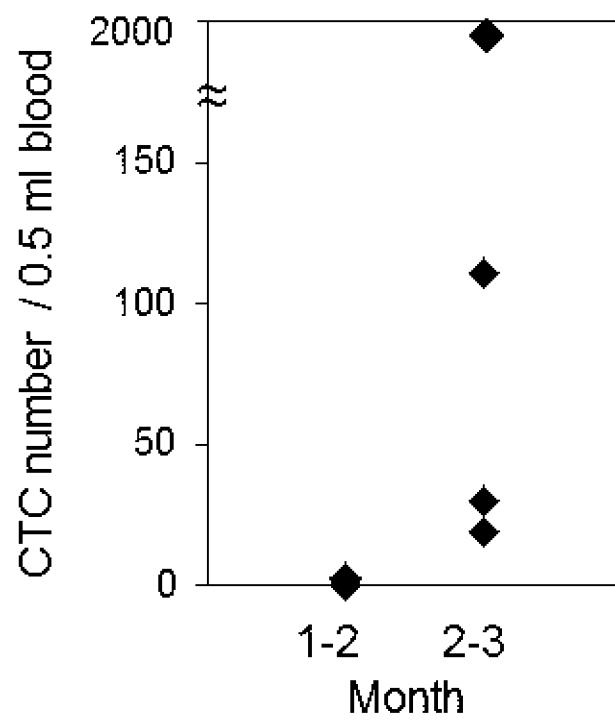
[図5B]



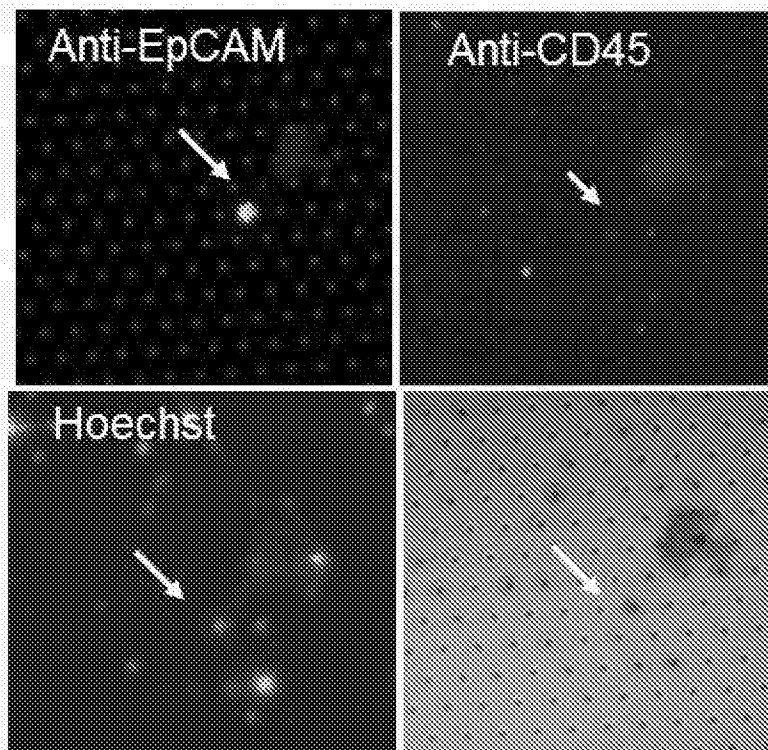
[図6A]



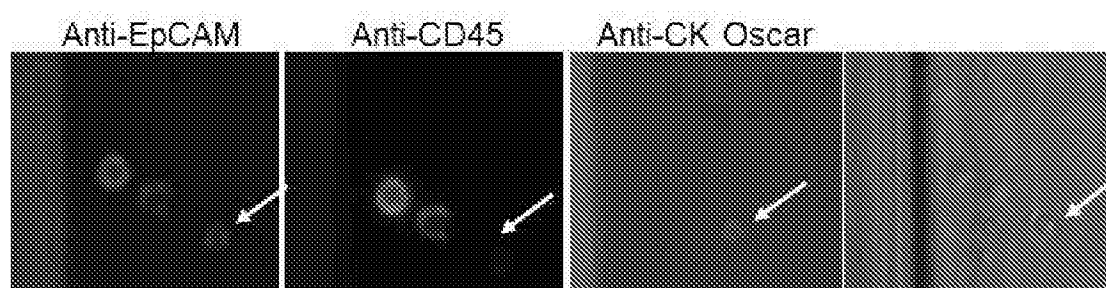
[図6B]



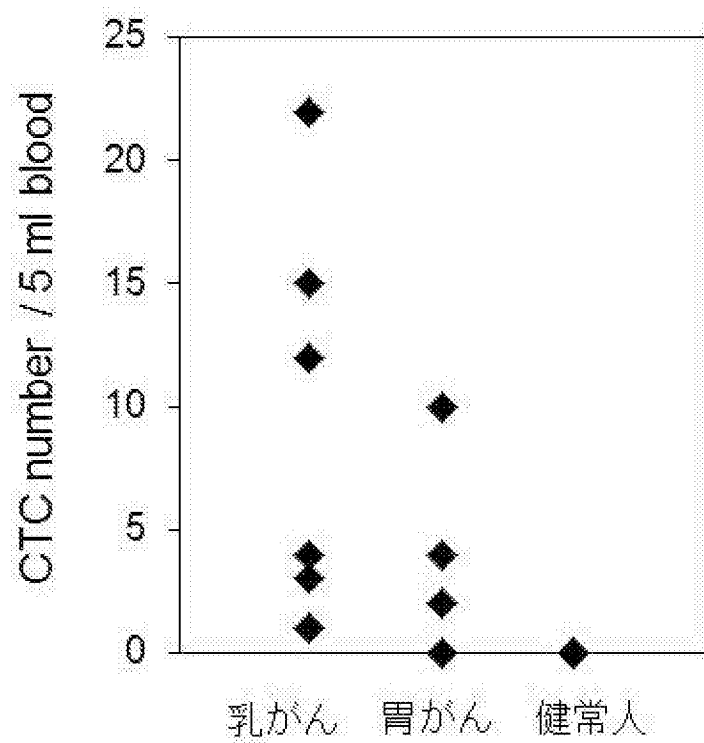
[図7A]



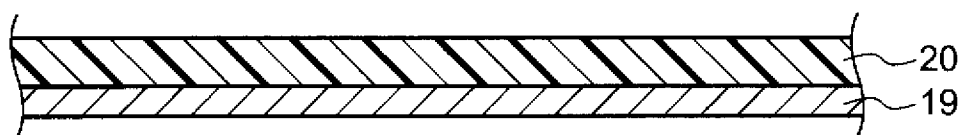
[図7B]



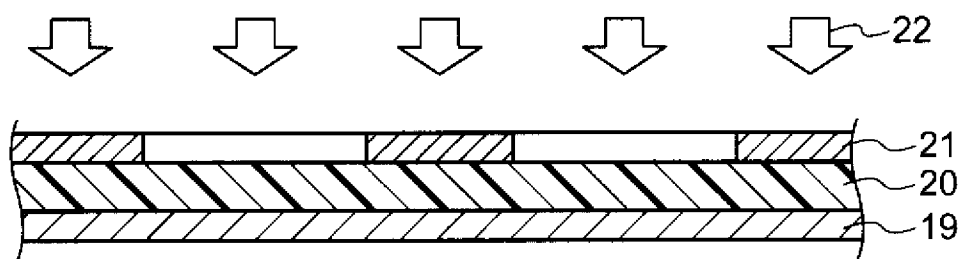
[図7C]



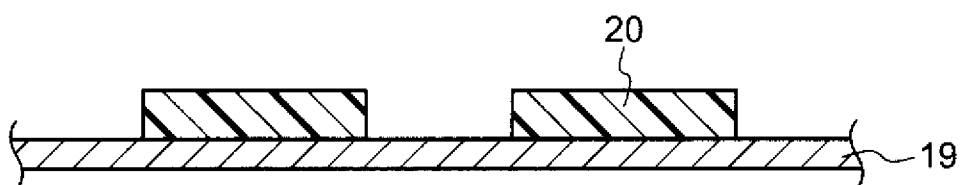
[図8A]



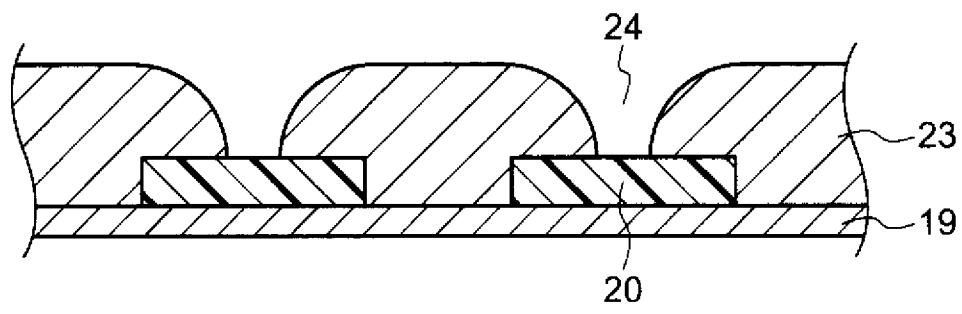
[図8B]



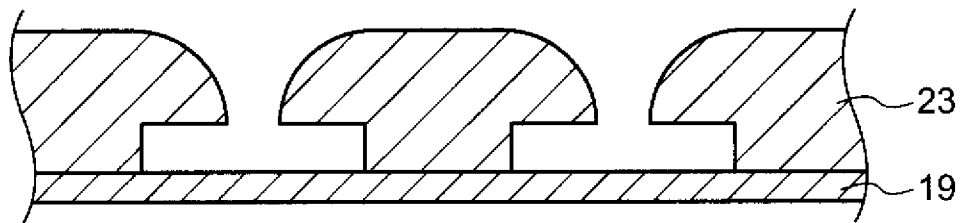
[図8C]



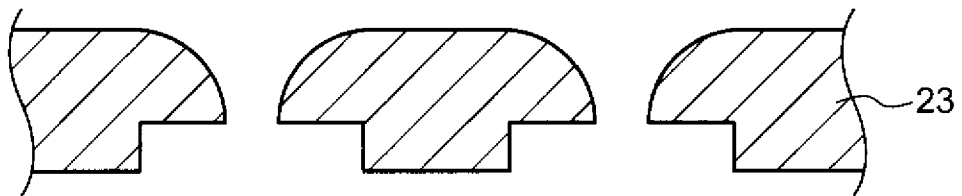
[図8D]



[図8E]



[図8F]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/069469

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12M3/06(2006.01)i, A61M1/36(2006.01)i, C12M1/26(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12M3/06, A61M1/36, C12M1/26, C12N5/071

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	JP 2011-163830 A (Tokyo University of Agriculture and Technology), 25 August 2011 (25.08.2011), paragraphs [0002] to [0004], [0013], [0028]; fig. 1 to 2, 4 to 5 (Family: none)	1, 3-9/10-11/ 2
Y/A	JP 2013-501574 A (Duke University), 17 January 2013 (17.01.2013), paragraph [0023] & US 2012/0141562 A1 & EP 2464392 A2 & WO 2011/019401 A2	10-11/1-9
Y	JP 2010-110272 A (Nagoya University), 20 May 2010 (20.05.2010), paragraph [0008] (Family: none)	10-11/1-9

☒ 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
14 October, 2014 (14.10.14)

Date of mailing of the international search report
28 October, 2014 (28.10.14)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/069469

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 3142031 U (Yoshihisa NAMIKI), 14 May 2008 (14.05.2008), paragraphs [0010], [0018] (Family: none)	10-11/1-9
A	JP 2013-042689 A (Hitachi Chemical Co., Ltd.), 04 March 2013 (04.03.2013), paragraph [0002]; examples 1 to 2 & DE 202012003212 U1 & CN 202730123 U	1-11
A	JP 2011-510656 A (California Institute of Technology), 07 April 2011 (07.04.2011), paragraphs [0002], [0059] to [0061], [0081] to [0082] & JP 5343092 B & US 2009/0188864 A1 & US 2012/0097610 A1 & EP 2238232 A1 & WO 2009/097247 A1	1-11
A	JP 6-288672 A (Goldstar Co., Ltd.), 18 October 1994 (18.10.1994), paragraph [0009] & KR 20-1995-0001540 Y	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M3/06(2006.01)i, A61M1/36(2006.01)i, C12M1/26(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12M3/06, A61M1/36, C12M1/26, C12N5/071

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 4 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 4 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 4 年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y/A	JP 2011-163830 A（国立大学法人東京農工大学） 2011.08.25, 段落【0002】－【0004】、【0013】、【0028】、図1－2、 4－5 (ファミリーなし)	1, 3-9 /10-11/2
Y/A	JP 2013-501574 A（デューク ユニバーシティー） 2013.01.17, 段落【0023】 & US 2012/0141562 A1 & EP 2464392 A2 & WO 2011/019401 A2	10-11/1-9

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 4 . 1 0 . 2 0 1 4

国際調査報告の発送日

2 8 . 1 0 . 2 0 1 4

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

高山 敏充

4 B

4 1 5 3

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2010-110272 A (国立大学法人名古屋大学) 2010.05.20, 段落【0008】 (ファミリーなし)	10-11/1-9
Y	JP 3142031 U (並木 禎尚) 2008.05.14, 段落【0010】、【0018】 (ファミリーなし)	10-11/1-9
A	JP 2013-042689 A (日立化成株式会社) 2013.03.04, 段落【0002】、実施例1-2 & DE 202012003212 U1 & CN 202730123 U	1-11
A	JP 2011-510656 A (カリフォルニア インスティテュート オブ テ クノロジー) 2011.04.07, 段落【0002】、【0059】-【0061】、段落【0081】-【0082】 & JP 5343092 B & US 2009/0188864 A1 & US 2012/0097610 A1 & EP 2238232 A1 & WO 2009/097247 A1	1-11
A	JP 6-288672 A (株式会社金星社) 1994.10.18, 段落【0009】 & KR 20-1995-0001540 Y	1-11