(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年8月3日(03.08.2017)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2017/130563 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/09 (2010.01) *G01N 33/48* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2016/085775

(22) 国際出願日: 2016年12月1日(01.12.2016)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-011427 2016年1月25日(25.01.2016) JP

(71) 出願人: 日立化成株式会社(**HITACHI CHEMICAL COMPANY, LTD.**) [JP/JP]; 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 中村 清太(**NAKAMURA Seita**); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP). 遠藤 勝也(**ENDOH Katsuya**); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP). 樋口 雅之(**HIGUCHI Masayuki**); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP). 上原 寿茂(**KANBARA Hisashige**); 〒1006606 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 日立化成株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(**HASEGAWA Yoshiki** et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目1番1号丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ（明治安田生命ビル） 9階 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).

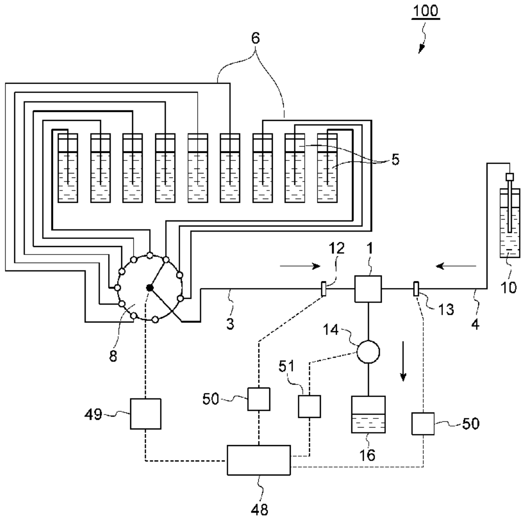
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) **Title**: METHOD FOR CAPTURING RARE CELLS

(54) 発明の名称 : 希少細胞を捕捉する方法



(57) **Abstract**: The present invention provides a method for capturing rare cells, which includes a step for adding beads to a liquid containing rare cells and contaminating cells, and a step for using a filter to filter the liquid to which the beads have been added. This method can selectively capture rare cells from a liquid containing the rare cells and contaminating cells, and thereby increase the concentration of the rare cells.

(57) 要約: 本発明は、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体にビーズを添加する工程と、該ビーズを添加した上記液体をフィルターでろ過する工程と、を含む、希少細胞を捕捉する方法を提供する。かかる方法によれば、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体から希少細胞を選択的に捕捉しつつ、希少細胞を濃縮することができる。

WO 2017/130563 A1

MZ, NA, RW, 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, 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 ： 希少細胞を捕捉する方法

技術分野

[0001] 本発明は、希少細胞を捕捉する方法に関する。

背景技術

[0002] 癌細胞濃縮の研究及び臨床的意義は極めて大きく、血液中の癌細胞を濃縮、すなわち癌細胞を選択的に捕捉、することができれば、癌の診断に応用することができる。例えば、癌の予後及び治療に最も重要な要素は、初診時及び処置時における癌細胞の転移の有無である。癌細胞の初期の拡散が末梢血中に及んだ場合、血中循環癌細胞（Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ　Ｔｕｍｏｒ　Ｃｅｌｌ、以下、「ＣＴＣ」ともいう。）を検出することは、癌の病状進行を判断する有用な手段である。しかしながら、血液中には、赤血球及び白血球等の血液成分が圧倒的に多く存在するため、極めて少量のＣＴＣの検出は困難である。血中循環内皮細胞（Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ　Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ　Ｃｅｌｌ、以下、「ＣＥＣ」ともいう。）も癌の予後及び治療のバイオマーカーとして利用されるが、血中には極めて少量しか存在せず、ＣＴＣと同様に検出は困難である。

[0003] 血液からＣＴＣ及びＣＥＣ等の希少細胞を濃縮する方法として、フィルターを用いる方法（以下、「フィルター法」ともいう。）がある。フィルター法は、細胞のサイズ及び変形能の違いで希少細胞を濃縮する方法である。

[0004] フィルター法の一例として、パリレンを用いた樹脂フィルターを使用することで、少量のＣＴＣを検出する方法が提案されている（特許文献１）。

[0005] フィルター法の他の例として、金属を用いたフィルターを使用することでフィルターの強度を向上させ、白血球と癌細胞の変形能の違いにより、これらを分離する方法が提案されている（特許文献２～４）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第２０１０／１３５６０３号
特許文献2：特開２０１３－４２６８９号公報
特許文献3：特開２０１１－１６３８３０号公報
特許文献4：国際公開第２０１５／０１２３１５号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 近年、少数の細胞から遺伝子解析が可能な次世代シークエンサー、デジタルＰＣＲ及び定量的逆転写ＰＣＲ（ｑＲＴ－ＰＣＲ）の技術が向上したことにより、希少細胞の遺伝子変異やタンパク質発現量を検出する「質的評価」に研究が移行してきている。これは、希少細胞の遺伝子解析結果を用いて、新規マーカータンパク質及び遺伝子のスクリーニングが望まれているためである。

[0008] 白血球に代表されるような夾雑細胞が存在する状況下で遺伝子解析を行った場合、希少細胞の遺伝子情報が狭雑細胞の遺伝子情報に埋もれ、希少細胞の遺伝子情報が検出されない場合、又は偽陰性の結果を生じる場合がある。しかしながら、特許文献１～４に記載されるようなフィルター法では、分離された希少細胞の純度が、上記遺伝子解析等には充分でなかった。

[0009] 本発明は、このような課題に鑑みてなされたものであり、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体から希少細胞を選択的に捕捉しつつ、希少細胞を濃縮する方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは鋭意検討した結果、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体を、ビーズの存在下、フィルターでろ過すると、希少細胞を選択的に捕捉しつつ、希少細胞を濃縮することができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] 本発明の希少細胞を捕捉する方法は、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体にビーズを添加する工程と、該ビーズを添加した上記液体をフィルターでろ過する工程と、を含む。特定の理論に拘束されるものではないが、本発明

者らは本発明におけるビーズの作用は以下のように推定している。フィルター上に残留した夾雑細胞は、層状に重なってフィルターの孔を塞ぐため、ろ過効率が低下する。ビーズは層状に重なった夾雑細胞を押し出すことにより、フィルターの詰まりを解消し、ろ過効率の低下を防ぎ、その結果、希少細胞を選択的に捕捉することを可能としている。

[0012] 上記ビーズのメディアン径は０．５μｍ～８μｍであることができる。

[0013] 上記ビーズの添加量は、上記液体１ｍＬあたり１×１０^{4}個～９×１０^{6}個であることができる。

[0014] 上記ビーズは、樹脂ビーズ又は磁気ビーズのうち少なくとも一方であることができる。

[0015] 上記夾雑細胞は白血球であることができる。

[0016] 上記希少細胞は、血中循環癌細胞又は血中循環内皮細胞であることができる。

発明の効果

[0017] 本発明によれば、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体から希少細胞を選択的に捕捉しつつ、希少細胞を濃縮することができる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]フィルターの模式図である。

[図2]ＣＴＣ捕捉装置の構成を示す模式図である。

発明を実施するための形態

[0019] 「希少細胞」とは、捕捉の対象となる細胞のことであり、その細胞数の割合が希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体に含有される全細胞の総数に対して極めて小さいものをいう。希少細胞は、例えば、ＣＴＣ等の癌細胞又はＣＥＣ等の内皮細胞である。

[0020] 「夾雑細胞」とは、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体に含有される、希少細胞以外の細胞である。通常、夾雑細胞の細胞数の割合は、希少細胞の細胞数に対して極めて大きい。本明細書において、「夾雑細胞」は、そのような細胞のうち、希少細胞と同程度の直径を有し、かつ、変形能を有する細

胞を指す場合があり、より具体的には白血球を指す場合がある。

[0021] ここで、細胞の「直径」とは、顕微鏡で観察した場合の細胞の輪郭上の任意の２点を結ぶ線分のうち最も長い線分の長さのことである。

[0022] 希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体は、例えば、血液、腹水又は胸水であることができる。

[0023] 「捕捉」とは、細胞を含有する液体をフィルターでろ過して、細胞をフィルター上に残留させることを意味する。また、「選択的に捕捉する」とは、フィルター上に残留した細胞集団における所定の細胞の割合が、ろ過前の細胞を含有する液体における割合よりも高いことを意味する。

[0024] 本発明の希少細胞を捕捉する方法は、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体にビーズを添加する工程と、該ビーズを添加した上記液体をフィルターでろ過する工程と、を含む。以下、これらの工程について図１及び図２を参照しながら、詳細に説明していく。

[0025] まず、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体にビーズを添加する工程について説明する。

[0026] ビーズの形状は、特に制限がなく、例えば、球形、直方体、三角錐又は円錐であることができる。ビーズが希少細胞に衝突した際の局所的な衝撃を低減し、希少細胞へのダメージを最小限に抑える観点から、ビーズは、略球体又は球体であることが好ましく、球体であることがより好ましい。

[0027] ビーズのメディアン径は、希少細胞及び夾雑細胞の直径並びにフィルターの孔径に応じて、適宜選択可能である。例えば、希少細胞がＣＴＣ又はＣＥＣであり、夾雑細胞が白血球である場合、フィルターの目詰まりを防止する観点、白血球を押し出す観点、及び捕捉後の希少細胞を観察する観点から、ビーズのメディアン径は、０．５μｍ～８μｍであることが好ましく、１μｍ～７．５μｍであることがより好ましく、３μｍ～７μｍであることがさらに好ましい。ここで、ビーズのメディアン径は、レーザー回折式粒度分布測定装置で測定された粒度分布における積算値が５０％となる粒子径を指す。

[0028] ビーズの材質は、特に制限がなく、例えば、樹脂（ポリスチレン、ポリメタクリレート、ポリ乳酸等）、金属若しくは金属酸化物（酸化鉄等）、多糖類（キトサン等）、シリカ又はこれらの組み合わせであってよい。これらのうち、樹脂ビーズが好ましい。

[0029] ビーズは、磁気ビーズであることが好ましい。磁気ビーズは、磁性体を含むビーズである。磁気ビーズは、例えば、磁性体が、樹脂、金属若しくは金属酸化物、多糖類、シリカ又はこれらの組み合わせによってコーティングされているものであってもよい。

[0030] ビーズの表面は、例えば、ＤＮＡ、ＲＮＡ及びタンパク質の吸着を抑える効果を有する材料でコーティングされていることができる。このようなコーティング材料として、例えば、ポリエチレングルコール（ＰＥＧ）、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、パリレン、及び２－メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンモノマー（ＭＰＣモノマー）がある。

[0031] ビーズの添加量は、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体１ｍＬに対して、1×10^{4}個～9×10^{6}個であることが好ましく、1×10^{5}個～7×10^{6}個であることがより好ましく、5×10^{5}個～5×10^{6}個であることがさらに好ましい。ビーズの添加量が上記下限値以上であれば、より効果的に夾雑細胞を押し出すことができる。ビーズの添加量が上記上限値以下であれば、ビーズがフィルターに目詰まりせず、捕捉した希少細胞の観察がより容易である。また、ビーズの添加量は、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体中の細胞数に応じて、適宜調整される。ビーズの添加量は、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体中の夾雑細胞の数の、０．００２倍～１００倍であることが好ましく、０．０２倍～７５倍であることがより好ましく、０．２倍～５０倍であることがさらに好ましい。ビーズの添加量が上記数値範囲内であれば、より効果的に夾雑細胞を押し出すことができる。

[0032] 希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体が血液である場合、通常の方法により被験者から採血することで血液サンプルを得られる。この場合、抗凝固剤及び固定剤等、血液サンプルに従来添加される添加剤がさらに添加されるこ

とができる。抗凝固剤としては、例えば、エチレンジアミン四酢酸二水素二ナトリウム二水和物（ＥＤＴＡ－２Ｎａ）、エチレンジアミン四酢酸二カリウム塩二水和物（ＥＤＴＡ－２Ｋ）、クエン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、ヘパリン及びＣＴＡＤ溶剤（クエン酸、テオフィリン、アデノシン、及びジピリダモールの混合溶液）が挙げられる。固定剤としては、例えば、パラホルムアルデヒド（ＰＦＡ）、グルタルアルデヒド及びエタノールが挙げられる。これらの添加剤は、採血する前の採血管に予め入れておくこともできるし、採血後に添加することもできる。血液サンプルは、例えば、緩衝液で希釈されることもできる。

[0033] 次に、ビーズを添加した希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体をフィルターでろ過する工程について説明する。

[0034] この工程により、希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体から夾雑細胞を取り除き、希少細胞を選択的に捕捉する。

[0035] 以下、図１を参照しながら、この工程で使用し得るフィルターの構造について説明する。フィルター２００は、プラスチック又は金属等の薄膜１２０に、多数の貫通孔１１０が形成されている構造を有する。

[0036] 貫通孔１１０の開口形状は、例えば、円、楕円、正方形、長方形、角丸長方形又は多角形であることができる。希少細胞を効率よく捕捉する観点から、開口形状は、円、長方形又は角丸長方形が好ましく、長方形又は角丸長方形がより好ましい。角丸長方形とは、長方形と、長方形の短辺と同じ長さの半径を有し長方形の２つの短辺それぞれに隣接して結合している２つの半円形と、を有する形状である。開口形状が長方形又は角丸長方形であると、貫通孔１１０が目詰まりしにくく、希少細胞をより選択的に捕捉できる。貫通孔１１０は、図１に示すような整列配置でもよく、列毎に配置がずれた千鳥配置でもよく、任意に配置されたランダム配置であってもよい。

[0037] 貫通孔１１０の孔径は、捕捉対象である希少細胞の直径に応じて設定される。希少細胞がＣＴＣのように直径１０μｍ以上である場合は、貫通孔１１０の孔径は、５μｍ～１５μｍであることが好ましく、６μｍ～１２μｍで

あることがより好ましく、７μｍ～１０μｍであることがさらに好ましい。なお、本明細書において貫通孔１１０の孔径（単に「フィルターの孔径」ともいう。）とは、貫通孔１１０を通過できる球の直径の最大値をいう。例えば、開口形状が長方形の場合、その貫通孔１１０の孔径はその長方形の短辺の長さである。開口形状が多角形の場合には、貫通孔１１０の孔径はその多角形の内接円の直径となる。開口形状が長方形又は角丸長方形の場合、希少細胞が貫通孔１１０に捕捉された状態であっても、貫通孔１１０において開口形状の長軸方向に隙間ができる。この隙間を通して夾雑細胞が通過できるため、フィルター２００の目詰まりを防止することができる。

[0038] フィルター２００の開口率は、フィルター２００の強度とフィルター２００の目詰まり防止とのバランスを保つ観点から、５～５０％であることが好ましく、１０～４０％であることがより好ましく、１０～３０％であることがさらに好ましい。なお、本明細書において、開口率とは、フィルター２００全体の面積に対する貫通孔１１０が占める面積をいう。

[0039] フィルター２００の厚みは、フィルター２００の強度とフィルター２００の目詰まり防止とのバランスを保つ観点から、３μｍ～５０μｍであることが好ましく、５μｍ～４０μｍであることがより好ましく、５μｍ～３０μｍであることがさらに好ましい。

[0040] フィルター２００は金属からなることが好ましい。金属は加工性に優れるため、フィルター２００の加工精度を高めることができ、希少細胞の捕捉率をさらに向上させることができる。また、金属はその他の材料と比べて剛直であるため、外部から力が加わった場合でも、そのサイズ及び形状が維持される。このため、夾雑細胞が貫通孔１１０よりやや大きくても、フィルター２００は変形せず、夾雑細胞が変形して貫通孔１１０を通過することができ、希少細胞をより選択的に捕捉できる。

[0041] 金属としては、例えば、ニッケル、銀、パラジウム、銅、イリジウム、ルテニウム、クロム及びこれらの合金が挙げられる。パラジウム及びイリジウムは酸化還元電位が高く、難溶性で特性が良好だが、高価である。ニッケル

は水素よりも酸化還元電位が低いため、溶解しやすいが、安価である。銀及びパラジウムは貴金属であり、パラジウム及びイリジウムに比べると安価である。

[0042] フィルター２００の作製方法は、特に限定されないが、例えば、次のように作製することができる。まず、基板上の、後にフィルター２００の貫通孔１１０となる位置にフォトレジストを配置し、この基板に、フィルター２００となる金属のめっきを施すことで、貫通孔１１０を有する金属層（薄膜１２０）を基板上に形成する。その後、金属層から基板及びフォトレジストを除去することで、フィルター２００が得られる。基板としては、例えば、表面に銅めっきが施されたものを用いることができる。銅は、薬液による化学的溶解で容易に除去可能であり、フォトレジストとの密着力も優れているため、基板の材料として好ましい。

[0043] 希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体をろ過する方法及びろ過に用いる装置は特に限定されないが、液体の通液時の流速は制御されることが好ましい。希少細胞へのダメージを最小限に抑える観点、夾雑細胞を押し出す観点及びフィルター２００の目詰まりを防止する観点から、液体の通液時の流速は、５０μＬ／分～３０００μＬ／分が好ましく、１００μＬ／分～１０００μＬ／分がより好ましく、２００μＬ／分～６００μＬ／分がさらに好ましい。

[0044] 希少細胞を捕捉後、捕捉した希少細胞を回収して、希少細胞を含有する液体を得ることができる。希少細胞の回収方法としては、例えば、逆洗、マイクロマニピュレーション及びピペッティングが挙げられる。逆洗とは、フィルターの、細胞が捕捉された面とは反対の面から液を流し、フィルター上に捕捉された細胞を取ることをいう。マイクロマニピュレーションとは、ピコピペットを用いて細胞１つ１つをフィルター上から回収することをいう。ピペッティングとは、フィルター上の液体をマイクロピペットを用いて混合し、フィルター上に捕捉された細胞をはがし取ることをいう。

実施例

[0045] 以下、実施例に基づき発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0046] （フィルターの作製）

感光性樹脂組成物（ＰＨＯＴＥＣ　ＲＤ－１２２５：厚さ２５μｍ、日立化成株式会社製）を２５０ｍｍ角の基板（ＭＣＬ－Ｅ６７９Ｆ：ＭＣＬの表面にピーラブル銅箔を貼り合わせた基板、日立化成株式会社製）の片面にラミネートした。ラミネートは、ロール温度９０℃、圧力０．３ＭＰａ及びコンベア速度２．０ｍ／分で行った。

[0047] 基板の感光性樹脂組成物をラミネートした面に、開口率６．７％で開口部を有するガラスマスクを静置した。ガラスマスクの開口部は、光の透過部であり、７．８μｍ×１００μｍ大の角丸長方形状の貫通孔が、ガラスマスクの長軸及び短軸方向に沿って、一定のピッチで同一方向を向いて整列している。なお、上記角丸長方形のサイズは、角丸長方形を形成する長方形の短辺の長さ（７．８μｍ）と長辺の長さ（１００μｍ）によって規定されている。

[0048] ６００ｍｍＨｇ以下の真空下において、紫外線照射装置を用いて、ガラスマスクを載置した基板に露光量３０ｍＪ／ｃｍ^{2}で紫外線を照射した。

[0049] 紫外線照射後の基板を１．０％炭酸ナトリウム水溶液で現像し、基板上に角丸長方形のフォトレジストが並んだレジスト層を形成した。このレジスト層付き基板を、ｐＨ４．５のニッケルめっき液で、液中温度５５℃で約２０分処理し、露出した銅箔上に厚み約２０μｍのニッケルめっきを形成した。ニッケルめっき液の組成を表１に示す。

[0050] [表1]

めっき液組成	濃度(g／L)
スルファミン酸ニッケル	450
塩化ニッケル	5
ホウ酸	30

[0051] 得られたニッケルめっき層をピーラブル銅箔とともに基板から剥離した。

このニッケルめっき層付き銅箔を、温度４０℃のエッチング薬液（メックブライトＳＦ－５４２０Ｂ、メック株式会社製）中、約１２０分間撹拌し、銅箔部分を化学的溶解によって除去することで、金属フィルターとなるニッケルの自立膜（サイズ２０ｍｍ×２０ｍｍ）を得た。

[0052] 自立膜を、温度６０℃のレジスト剥離液（Ｐ３　Ｐｏｌｅｖｅ、Ｈｅｎｋｅｌ社製）中、約４０分間超音波処理することで、自立膜内に残ったフォトレジストを除去し、微細貫通孔を有する金属フィルターを得た。完成した金属フィルターは、シワ、折れ、キズ及びカール等のダメージはなく、充分な精度の貫通孔を有していた。

[0053] 温度４０℃の酸性脱脂液Ｚ－２００（株式会社ワールドメタル製）に金属フィルターを３分間浸漬し、金属フィルター上の有機物を除去した。

[0054] 金属フィルターを水洗後、非シアン系の置換型無電解金めっき液であるＨＧＳ－１００（日立化成株式会社製）から金供給源である亜硫酸金を抜いた液に、金属フィルターを８０℃で１０分浸漬し、置換金めっき前処理を行った。次いで、金属フィルターを８０℃のＨＧＳ－１００に２０分浸漬し、置換金めっきを行った。置換金めっきの厚みは０．０５μｍであった。

[0055] めっき処理した金属フィルターを水洗後、非シアン系還元型無電解金めっき液であるＨＧＳ－５４００（日立化成株式会社製）に金属フィルターを６５℃で１０分浸漬し、金めっきを行った。その後、金属フィルターを水洗し、乾燥させた。金めっきの厚みの合計は０．２μｍであった。

[0056] （ＣＴＣ捕捉装置）

以下、本実施例で使用するＣＴＣ捕捉装置について、図２を参照しながら説明する。図２に示すＣＴＣ捕捉装置１００は、被検液となるサンプル（血液サンプル等）をフィルターによってろ過することで、サンプル中に含まれる希少細胞を捕捉する装置である。また、捕捉された希少細胞を染色液で染色し、希少細胞の特定及び希少細胞の個体数のカウント等も行うことができる。

[0057] ＣＴＣ捕捉装置１００には、フィルターを内部に備えるフィルターユニッ

ト１、フィルターユニット１に処理液を供給する処理液流路３、フィルターユニット１にサンプルを供給するサンプル流路４が設けられている。

[0058] 処理液流路３の上流側には、それぞれ異なる処理液が入った複数の処理液収納容器５が設けられている。処理液収納容器５に投入される処理液としては、例えば、希少細胞を染色するための染色液、固定剤、及びフィルターに捕捉された希少細胞等を洗浄するための洗浄液が挙げられる。各処理液収納容器５にはそれぞれ軟質チューブが挿入されて個別の処理液流路６を形成している。これらの流路は選択バルブ８に接続されており、選択バルブ８を回転させることにより処理液流路３に接続する処理液が選択される。

[0059] サンプル流路４には、リザーバー１０が接続されており、サンプルはこのリザーバー１０に供給される。フィルターユニット１には、処理液及びサンプルのいずれか一方を供給する構成となっており、処理液及びサンプルのうちいずれの液体を供給するかの制御は流路３，４のそれぞれに取り付けられたピンチバルブ１２，１３よって切り替える。

[0060] 処理液及びサンプルの供給は、フィルターユニット１の下流に設けられたペリスタルティックポンプ１４によって吸引することで行われる。サンプル又は処理液は、処理液流路３又はサンプル流路４の内部を流れてフィルターユニット１に供給され、その後廃液タンク１６に流れ込む。サンプル中の希少細胞は、フィルターユニット１内の流路上に設けられたフィルターによって捕捉され、染色液によって染色される。

[0061] 上記の各部は制御部４８により制御される。具体的には、選択バルブ８の制御は、制御部４８からの指示に基づいて選択バルブドライバ４９により行われる。ピンチバルブ１２，１３は、それぞれに接続された２つのバルブドライバ５０により制御される。ペリスタルティックポンプ１４の駆動は、ポンプドライバ５１により制御される。

[0062] （癌細胞懸濁液の調製）

非小細胞癌細胞株であるＮＣＩ－Ｈ３５８細胞を、培養フラスコ中で、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含むＲＰＭＩ－１６４０培地にて、５％CO_2

条件下、３７℃で静置培養した。トリプシン処理により細胞を剥離させて回収し、細胞をリン酸緩衝生理食塩水（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ、ＰＢＳ）で洗浄後、２ｍＭ ＥＤＴＡ及び０．５％ＢＳＡを含むＰＢＳ（以下、「洗浄液」ともいう。）に懸濁し、ＮＣＩ－Ｈ３５８細胞の懸濁液を得た。ＰＢＳは、和光純薬工業株式会社製の製品コード１６６－２３５５５のものを用いた。ＢＳＡは、Ａｌｂｕｍｉｎ ｆｒｏｍ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ－Ｌｙｏｐｈｉｌｉｚｅｄ ｐｏｗｄｅｒ，Ｂｉｏ Ｒｅａｇｅｎｔ ｆｏｒ ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）を用いた。ＥＤＴＡ－２Ｎａは、和光純薬工業株式会社製の製品コード３４５－０１８６５のものを用いた。次いで、血球計算盤を用いてＮＣＩ－Ｈ３５８細胞の懸濁液中のＮＣＩ－Ｈ３５８細胞の濃度を計測した。

[0063] （白血球由来細胞の調製）

白血球由来細胞株であるＪｕｒｋａｔ細胞を、培養フラスコ中で、１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含むＲＰＭＩ－１６４０培地にて、５％CO_2条件下、３７℃で静置培養した。次いで、培養フラスコから培養液を回収し、血球計算盤を用いてＪｕｒｋａｔ細胞の濃度を計測した。

[0064] （実施例１）

上記洗浄液に、癌細胞が1×10^3個程度、白血球由来細胞株の細胞が1×10^5個程度となる量のＮＣＩ－Ｈ３５８細胞の細胞懸濁液及び培養したＪｕｒｋａｔ細胞を加えることで、細胞懸濁液１ｍＬを調製した。該細胞懸濁液に、直径１μｍのビーズ（ポリスチレンをＰＥＧ３００でコーティングしたビーズ；商品コード０１－５４－１０３、商品名ｍｉｃｒｏｍｅｒ、ｍｉｃｒｏｍｏｄ社製）を5×10^6個添加することでサンプルを調製した。

[0065] 上記ＣＴＣ捕捉装置１００を用いて、以下の実験を行った。まず、リザーバー１０に洗浄液を入れ、フィルターユニット１の内部を洗浄液で満たした。続いて、サンプルをリザーバー１０に導入し、流速６００μＬ／分で約５分間送液した。処理液収納容器５から洗浄液３ｍＬを送液してフィルターを

洗浄した。

[0066]　ＰＢＳに固定剤である４％ＰＦＡを溶かした液をフィルターユニット１に送液し、細胞が捕捉されたフィルターを１５分浸した。フィルターを洗浄液で洗浄後、ＰＢＳに０．２％Ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社製）を溶かした液をフィルターユニット１に送液し、フィルターを１０分浸した。

[0067]　洗浄液でフィルターを洗浄後、２ｍＬの細胞染色液（ＦＩＴＣ（フルオレセインイソチオシアネート）標識抗Ｃｙｔｏｋｅｒａｔｉｎ抗体、ＰＥ（Ｒ－フィコエリスリン）標識抗ＣＤ４５抗体、１μｇ／ｍＬ　Ｈｏｅｃｈｓｔ　３３３４２）をフィルターユニット１に送液し、フィルター上の細胞を３０分間蛍光染色した。その後、洗浄液３ｍＬで細胞を洗浄した。

[0068]　コンピューター制御式電気ステージ及び冷却デジタルカメラ（ＡｘｉｏＣａｍ　５０６　ｍｏｎｏ、カールツァイスマイクロスコピー社製）を装備した蛍光顕微鏡（Ａｘｉｏ　Ｉｍａｇｅｒ　Ｍ２、カールツァイスマイクロスコピー社製）でフィルターを観察した。ＦＩＴＣ、ＰＥ、及びＨｏｅｃｈｓｔ　３３３４２由来の蛍光を観察するために、蛍光顕微鏡にそれぞれＦｉｌｔｅｒ　ｓｅｔ　３８、Ｆｉｌｔｅｒ　ｓｅｔ　４３ＨＥ、及びＦｉｌｔｅｒ　ｓｅｔ　３４（いずれもカールツァイスマイクロスコピー社製）を使用し、観察視野の画像を取得した。画像の取得及び解析にはＺＥＮ（カールツァイスマイクロスコピー社製）を用いた。ＦＩＴＣ陽性細胞を癌細胞、ＰＥ陽性細胞を白血球としてそれぞれの細胞数を計測し、捕捉された癌細胞の純度（％）を、癌細胞純度＝捕捉された癌細胞数／比較例１で捕捉された癌細胞と白血球の合計細胞数×１００、として算出した。

[0069]（実施例２）

　細胞懸濁液に添加するビーズを、直径３μｍの樹脂ビーズ（商品コード０１－５４－３０３、商品名ｍｉｃｒｏｍｅｒ、ｍｉｃｒｏｍｏｄ社製）に変更した以外は実施例１と同様にして実験を行い、捕捉された癌細胞の純度を求めた。

[0070] （実施例３）

細胞懸濁液に添加するビーズを、直径５μｍの樹脂ビーズ（商品コード０１－５４－５０３、商品名ｍｉｃｒｏｍｅｒ、ｍｉｃｒｏｍｏｄ社製）に変更した以外は実施例１と同様にして実験を行い、捕捉された癌細胞の純度を求めた。

[0071] （実施例４）

細胞懸濁液に添加するビーズを、直径７μｍの樹脂ビーズ（商品コード０１－５４－７０３、商品名ｍｉｃｒｏｍｅｒ、ｍｉｃｒｏｍｏｄ社製）に変更した以外は実施例１と同様にして実験を行い、捕捉された癌細胞の純度を求めた。

[0072] （比較例１）

細胞懸濁液にビーズを添加しなかったこと以外は実施例１と同様にして実験を行い、捕捉された癌細胞の純度を求めた。

[0073] （評価）

各実施例及び比較例の結果を表２に示す。ビーズを添加した実施例１～４では、ビーズを添加しなかった比較例１と比べて、より選択的に癌細胞を捕捉することができた。

[0074] [表2]

実施例	癌細胞添加量	白血球添加量	ビーズ直径	ビーズ添加量	癌細胞純度
実施例1	1×10^{3}個	1×10^{5}個	1μm	5×10^{6}個	9.9%
実施例2	1×10^{3}個	1×10^{5}個	3μm	5×10^{6}個	10.8%
実施例3	1×10^{3}個	1×10^{5}個	5μm	5×10^{6}個	11.8%
実施例4	1×10^{3}個	1×10^{5}個	7μm	5×10^{6}個	10.7%
比較例1	1×10^{3}個	1×10^{5}個	－	－	7.3%

[0075] （実施例５）

健常者の血液を採血チューブ（Ｃｅｌｌ－Ｆｒｅｅ　ＤＮＡ　ＢＣＴ、Ｓｔｒｅｃｋ社製）に採血し、７２時間以上経過後、癌細胞が１×１０^{３}個となる量のＮＣＩ－Ｈ３５８細胞の懸濁液を加え、血液サンプル１ｍＬを得た。細胞懸濁液の代わりに血液サンプルを用いたこと、及び、添加するビーズを

直径５μｍの樹脂ビーズ（商品コード０１－５４－５０３、商品名ｍｉｃｒｏｍｅｒ、ｍｉｃｒｏｍｏｄ社）とし、その添加量を１×１０^{5}個としたこと以外は実施例１と同様にして実験を行い、捕捉された癌細胞の純度を求めた。

[0076] （実施例６）

血液サンプルに添加するビーズの添加量を１×１０^{6}個に変更した以外は実施例５と同様にして実験を行い、捕捉された癌細胞の純度を求めた。

[0077] （比較例２）

血液サンプルにビーズを添加しなかったこと以外は実施例５と同様にして実験を行い、捕捉された癌細胞の純度を求めた。

[0078] （評価）

各実施例及び比較例の結果を表３に示す。血液サンプル１ｍＬあたり１×１０^{5}個又は１×１０^{6}個のビーズを添加した実施例５～６では、ビーズを添加しなかった比較例２と比べて、より選択的に癌細胞を捕捉することができた。

[0079] [表3]

実施例	ビーズ添加量	癌細胞純度
実施例5	1×10^{5}個	4．9%
実施例6	1×10^{6}個	6．2%
比較例2	－	4．6%

符号の説明

[0080] １…フィルターユニット、３、６…処理液流路、４…サンプル流路、５…処理液収納容器、８…選択バルブ、１０…リザーバー、１２，１３…ピンチバルブ、１４…ペリスタルティックポンプ、１６…廃液タンク、４８…制御部、４９…選択バルブドライバ、５０…バルブドライバ、５１…ポンプドライバ、１００…ＣＴＣ捕捉装置、１１０…貫通孔、１２０…薄膜、２００…フィルター。

請求の範囲

[請求項1] 希少細胞及び夾雑細胞を含有する液体にビーズを添加する工程と、
該ビーズを添加した前記液体をフィルターでろ過する工程と、
を含む、希少細胞を捕捉する方法。

[請求項2] 前記ビーズのメディアン径が０．５μｍ～８μｍである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記ビーズの添加量が、前記液体１ｍＬあたり１×１０^{4}個～９×１０^{6}個である、請求項１又は２に記載の方法。

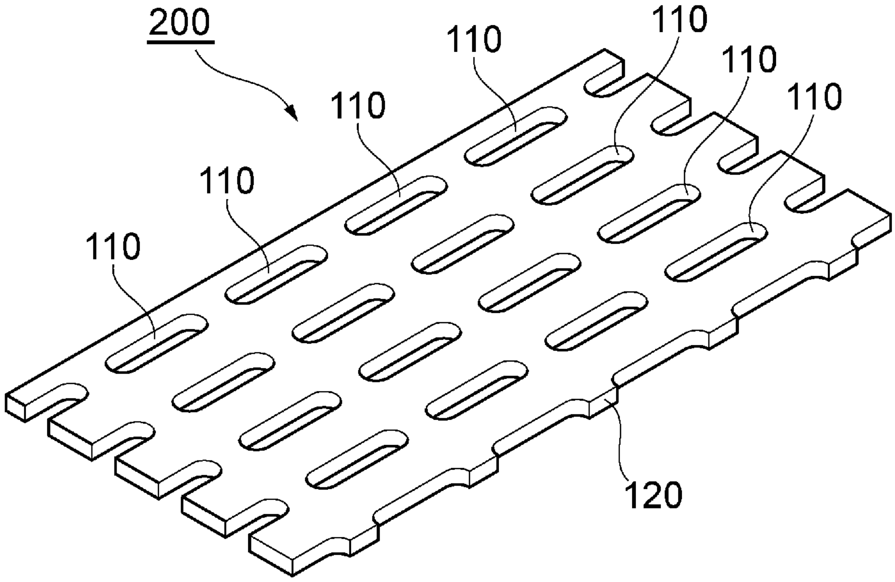
[請求項4] 前記ビーズが、樹脂ビーズ又は磁気ビーズのうち少なくとも一方である、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。

[請求項5] 前記夾雑細胞が白血球である、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。

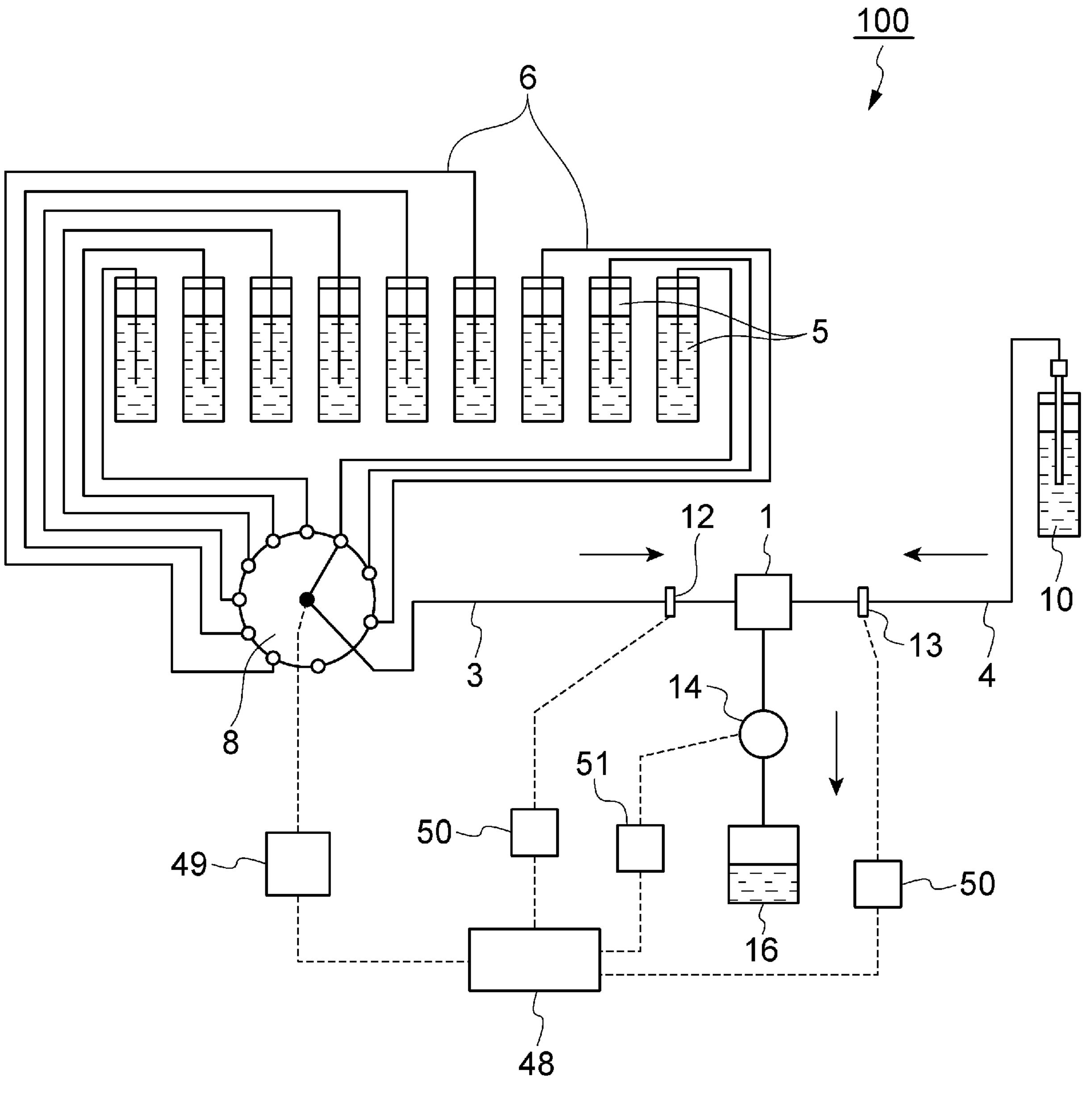
[請求項6] 前記希少細胞が、血中循環癌細胞又は血中循環内皮細胞である、請求項１～５のいずれか一項に記載の方法。

WO 2017/130563 PCT/JP2016/085775

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2016/085775

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/09(2010.01)i, *C12Q1/04*(2006.01)n, *G01N33/48*(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/09, C12Q1/04, G01N33/48

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

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM Y. J., et al., "A microchip filter device incorporating slit arrays and 3-D flow for detection of circulating tumor cells using CAV1-EpCAM conjugated microbeads", Biomaterials (2014) Vol.35, pp.7501-7510, ISSN: 0142-9612, page 7501, paragraph of 'abstract', page 7502, left column, 2nd paragraph, page 7502, left column, paragraph of '2.', page 7502, right column to page 7503, left column, paragraphs of '2.6' to '2.8', page 7503, fig. 1, page 7503, right column to page 7504, right column, paragraph of '3.1', page 7504, right column to page 7506, left column, paragraphs of '3.2', '3.3'	1-6

[X] 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
17 February 2017 (17.02.17)	28 February 2017 (28.02.17)

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

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE H. J., et al., "Efficient isolation and acuurate in situ analysis of circulating tumor cells using detachable beads and a high-pore-density filter", Angew. Chem. Int. Ed., (2013) Vol.52, pp.8337-8340, ISSN: 1521-3773, page 8337, left column, lines 18 to 20, page 8337, right column, lines 40 to 47, page 8338, right column, 1st paragraph, page 8338, scheme 1, page 8339, fig. 2	1-6
X	LIN M. X., et al., "Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation", Biosensors and Bioelectronics (2013) Vol.40, pp.63-67, ISSN: 0956-5663, page 63, paragraph of 'abstract', page 64, fig. 1, page 63, right column, lines 5 to 14, page 64, right column to page 65, left column, paragraph of '2.2', page 66, fig. 3	1-6
X	WO 2015/012315 A1 (Aichi-Ken), 29 January 2015 (29.01.2015), claims; example 6 & US 2016/0136552 A1 claims; example 6 & EP 2857495 A1	1-6

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１６／０８５７７５

Ａ． 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12N5/09(2010.01)i, C12Q1/04(2006.01)n, G01N33/48(2006.01)n

Ｂ． 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C12N5/09, C12Q1/04, G01N33/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

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

Ｃ． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	KIM Y. J., et al., “A microchip filter device incorporating slit arrays and 3-D flow for detection of circulating tumor cells using CAV1-EpCAM conjugated microbeads”, Biomaterials (2014) Vol.35, pp.7501-7510, ISSN: 0142-9612, 第 7501 頁「要約」の項, 第 7502 頁左欄第 2 段落, 第 7502 頁左欄「2.」の項, 第 7502 頁右欄－第 7503 頁左欄「2.6」-「2.8」の項, 第 7503 頁図 1, 第 7503 頁右欄-第 7504 頁右欄「3.1」の項, 第 7504 頁右欄-第 7506 頁左欄「3.2」,「3.3」の項	1-6

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー

「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献

「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１７．０２．２０１７	２８．０２．２０１７

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｂ	５８０２
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	藤澤 雅樹 電話番号 ０３－３５８１－１１０１ 内線 ３４４８		

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	LEE H. J., et al., “Efficient isolation and acuurate in situ analysis of circulating tumor cells using detachable beads and a high-pore-density filter”, Angew. Chem. Int. Ed., (2013) Vol.52, pp.8337-8340, ISSN: 1521-3773, 第 8337 頁左欄第 18 行-20 行, 第 8337 頁右欄第 40 行-47 行, 第 8338 頁右欄第 1 段落, 第 8338 頁スキーム１, 第 8339 頁図２	1-6
X	LIN M. X., et al., “Continuous labeling of circulating tumor cells with microbeads using a vortex micromixer for highly selective isolation”, Biosensors and Bioelectronics (2013) Vol.40, pp.63-67, ISSN: 0956-5663, 第 63 頁「要約」の項, 第 64 頁図１, 第 63 頁右欄第 5 行-14 行, 第 64 頁右欄-第 65 頁左欄「2.2」の項, 第 66 頁図３	1-6
X	WO 2015/012315 A1 (愛知県) 2015.01.29, 特許請求の範囲, 実施例６ & US 2016/0136552 A1, 特許請求の範囲, 実施例６ & EP 2857495 A1	1-6