

(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
2012年12月20日(20.12.2012)



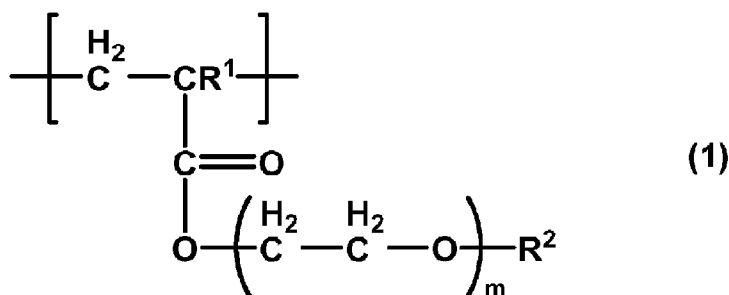
(10) 国際公開番号
WO 2012/173097 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/48 (2006.01) G01N 1/00 (2006.01)
B01D 29/01 (2006.01) G01N 1/28 (2006.01)
B01D 39/14 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/064932
- (22) 国際出願日: 2012年6月11日(11.06.2012)
- (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 2011-131241 2011年6月13日(13.06.2011) JP
特願 2012-123228 2012年5月30日(30.05.2012) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 日立化成工業株式会社(HITACHI CHEMICAL COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1630449 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人山形大学(Yamagata University) [JP/JP]; 〒9908560 山形県山形市小白川町一丁目4番12号 Yamagata (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 上原 寿茂(KANBARA Hisashige) [JP/JP]; 〒1630449 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 日立化成工業株式会社内 Tokyo (JP). 田中 賢(TANAKA Masaru) [JP/JP]; 〒9928510 山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学内 Yamagata (JP). 八木 理美(YAGI Satomi) [JP/JP]; 〒9928510 山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学内 Yamagata (JP). 干場 隆志(HOSHIBA Takashi) [JP/JP]; 〒9928510 山形県米沢市城南4丁目3-16 国立大学法人山形大学内 Yamagata (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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

[続葉有]

(54) Title: AGENT FOR IMPROVING CANCER CELL ADHESIVENESS

(54) 発明の名称: 癌細胞接着性向上剤



(57) Abstract: When used on the surface of a cancer cell enrichment filter, a polymer having the structural units represented by general formula (1) is useful for improving the adhesiveness of cancer cells to a filter surface and raising the percentage enrichment of cancer cells. In the formula, R¹ is a hydrogen atom or methyl group, R² is a methyl group or ethyl group, and m is between 1 and 3.

(57) 要約: 下記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーは、癌細胞濃縮フィルターの表面に適することにより、癌細胞のフィルター表面への接着性を高め、癌細胞の濃縮率を向上させることができるため有用である。式中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは1~3である。

WO 2012/173097 A1

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類:

— 國際調查報告 (條約第 21 條(3))

明 細 書

発明の名称：癌細胞接着性向上剤

技術分野

[0001] 本発明は、癌細胞接着性向上剤に関する。より詳細には、癌細胞接着性向上剤、癌細胞濃縮フィルター及び癌細胞の検査方法に関する。

背景技術

[0002] 癌細胞濃縮の研究・臨床的意義は極めて大きく、血液中の癌細胞を濃縮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、癌の予後および治療の最も重要な要因は、初診時およ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、場合により「CTC」という。）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。

[0003] しかしながら、転移が始まった一般的な癌患者の場合、血液中100億個の血球細胞あたり、CTCはおよそ1個程度存在しているに過ぎない。これに対し、血液中には、赤血球や白血球等の血液成分が圧倒的に多く存在する。したがって、極低濃度のCTCを濃縮し、高感度、高効率及び高特異的に解析することは非常に困難である。例えば、磁気ビーズ、密度勾配遠心分離、マイクロ流路、フローサイトメータを用いた方法でCTCを濃縮する場合、煩雑な処理が必要であるうえ、回収率が悪い場合がある。

[0004] CTCを分離・濃縮する他の技術として、ポリカーボネートフィルターを用いた方法が提案されている（例えば、非特許文献1及び2を参照）。また、サイズの違いを利用してCTCを分離・濃縮する技術も提案されている（例えば、非特許文献3～5及び特許文献1を参照）。

[0005] ところで、人工心肺等の医療用材料表面に血液が接触すると、補体系の活性化や血小板の活性化による血栓形成の誘発や溶血等の副作用が生じることが知られている。この問題を解決するために、所定の化合物で医療用材料表

面を被覆することが有効であることが報告されている（例えば、特許文献2を参照）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：米国特許出願公開第2001/0019029号明細書

特許文献2：国際公開第2004/087228号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Vona G, et al., “Enrichment, immunomorphological, and genetic characterization of fetal cells circulating in maternal blood”, *Am J Pathol.* 160 (1) :51-8 (2002)

非特許文献2：Kahn HJ, et al., “Enumeration of circulating tumor cells in the blood of breast cancer patients after filtration enrichment: correlation with disease stage”, *Breast Cancer Res Treat*; 86 (3) :237-47 (2004)

非特許文献3：Wilding P, et al., “Integrated Cell Isolation and Polymerase Chain Reaction Analysis Using Silicon Microfilter Chambers”, *Anal Biochem.* 257 (2) :95-100 (1998)

非特許文献4：Yuen PK, et al., “Microchip module for blood sample preparation and nucleic acid amplification reactions”, *Genome Res.* 11 (3) :405-1

2 (2001)

非特許文献5: Mohamed H, et al., "Development of a rare cell fractionation device: application for cancer detection.", IEEE Trans Nanobioscience 3 (4): 251-6 (2004)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] CTC等の癌細胞は、血液中の血球細胞、例えば赤血球や白血球、あるいは血小板等に比べてサイズが一回り大きい。したがって、理論的には、機械的濾過法を適用してこれらの血球成分を除去し、癌細胞を濃縮することが可能である。

[0009] しかしながら、非特許文献1及び2のメンブレンフィルターは、ランダムに分布する孔を含み、孔径が不均一なため、癌細胞の回収率が悪い場合があった。また、非特許文献3～5及び特許文献1の、孔径や厚みが正確に制御されたフィルターであっても、正確に解析可能な精度で癌細胞を濃縮することは困難な場合があった。

[0010] 本発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであり、癌細胞の接着性を向上させることができる、癌細胞接着性向上剤を提供することを目的とする。本発明はまた、上記の癌細胞接着性向上剤で表面が被覆された癌細胞濃縮フィルターを提供することを目的とする。本発明はさらに、上記の癌細胞濃縮フィルターで末梢血を濾過する工程を含む、癌細胞の検査方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

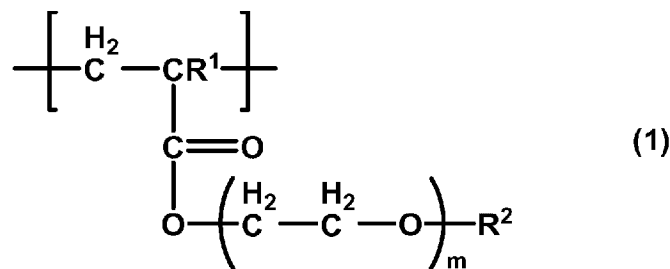
[0011] 従来、人工心肺等の医療用材料表面に血液が接触すると、補体系の活性化や血小板の活性化による血栓形成の誘発や溶血等の副作用が生じることが問題となっていた。そして、下記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーで医療用材料表面を被覆すると、血液が接触した場合であっても、医療

用材料表面への血球成分の接着性が低下し、血栓形成の誘発や溶血等の副作用が抑制されることが知られている。このような、血栓形成や溶血を抑制する性質のことを血液適合性という。

[0012] 本発明者らは、意外なことに、下記一般式（１）で表される構造単位を含むポリマーで被覆した材料表面は、血球成分の接着性が低下する一方で癌細胞の接着性が向上することを初めて見出し、本発明を完成した。

[0013] すなわち、本発明は、下記一般式（１）で表される構造単位を含むポリマーからなる癌細胞接着性向上剤を提供する。

[0014] [化1]



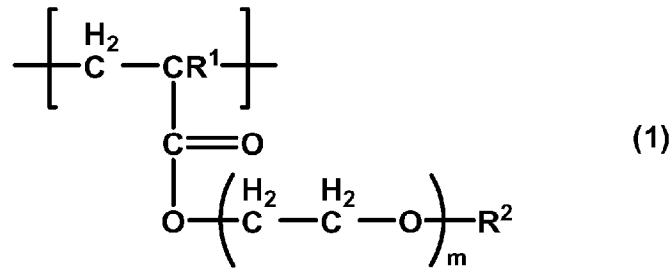
[0015] 一般式（１）中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは１～３である。

[0016] 上記本発明の癌細胞接着性向上剤は、癌細胞濃縮フィルターの表面に適用することにより、癌細胞のフィルター表面への接着性を高め、癌細胞の濃縮率を向上させることができる。

[0017] 癌細胞の濃縮率を向上させるために、癌細胞濃縮フィルターの表面に、細胞の接着性を向上させるような表面処理を施すと、CTC等の癌細胞だけでなく、血球成分の接着性も向上するのが通常である。このため、結果として癌細胞の濃縮率は向上せず、所望の濃縮性能が得られない。これに対し、上記本発明の癌細胞接着性向上剤は、血球成分の非接着性と、癌細胞の接着性というトレードオフの関係にある特性を同時に満たすことができる。

[0018] 本発明はまた、基板を下記一般式（１）で表される構造単位を含むポリマーで被覆する工程、を含む、癌細胞の基板への接着性を向上させる方法を提供する。

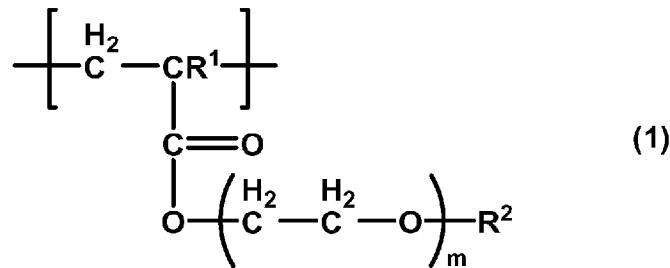
[0019] [化2]



[0020] 一般式(1)中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは1～3である。

[0021] 本発明はまた、下記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーの、癌細胞接着性向上のための使用を提供する。

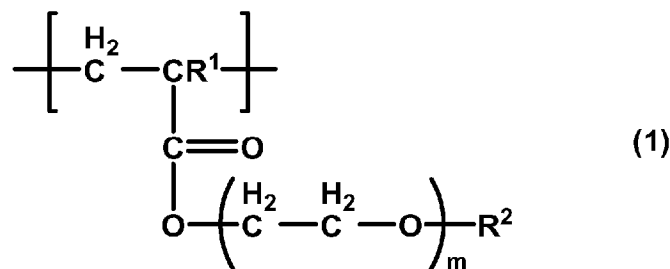
[0022] [化3]



[0023] 一般式(1)中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは1～3である。

[0024] 本発明はまた、下記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーの、癌細胞接着性向上のための応用を提供する。

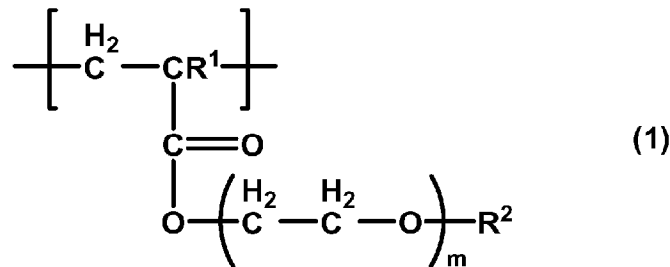
[0025] [化4]



[0026] 一般式(1)中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは1～3である。

[0027] 本発明はまた、下記一般式（１）で表される構造単位を含むポリマーの、癌細胞接着性向上剤の製造のための応用を提供する。

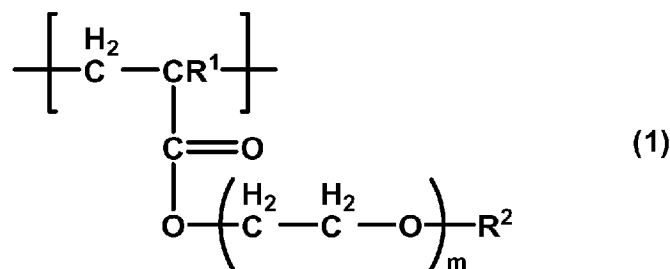
[0028] [化5]



[0029] 一般式（１）中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは１～３である。

[0030] 本発明はまた、複数の貫通孔が形成された基板からなり、基板の少なくとも一部が下記一般式（１）で表される構造単位を含むポリマーで被覆されている、癌細胞濃縮フィルターを提供する。

[0031] [化6]



[0032] 一般式（１）中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは１～３である。

[0033] 上記のポリマーは、上記一般式（１）で表される構造単位からなるものであってもよい。また、R¹が水素原子であり、R²がメチル基であり、mが１であることが好ましい。また、R¹が水素原子であり、R²がエチル基であり、mが２であってもよく、R¹がメチル基であり、R²がメチル基であり、mが２であってもよい。また、上記のポリマーは、数平均分子量が１０，０００～３００，０００であることが好ましい。

[0034] このようなポリマーは、さらに癌細胞の接着性を向上させることができる

- 。
- [0035] 本発明はまた、複数の貫通孔が形成された基板からなり、当該基板の少なくとも一部が上記のポリマーで被覆されている、癌細胞濃縮フィルターを提供する。
- [0036] 上記本発明の癌細胞濃縮フィルターによれば、血液サンプル中の癌細胞を、高い濃縮率で濃縮することができる。
- [0037] 上記の貫通孔は、平均孔径が5 μ m以上30 μ m未満であり、平均開口率が5%以上50%未満であることが好ましく、電気鋳造法によって形成されたものであることが好ましい。また、上記の基板は金属からなることが好ましい。さらに、上記の金属は、銅、ニッケル、銅及びニッケルの合金並びにこれらの表面が金めっきされたものからなる群より選択されるものであることが好ましい。
- [0038] このような癌細胞濃縮フィルターによれば、血液サンプル中の癌細胞を、更に高い濃縮率で濃縮することができる。
- [0039] 本発明はまた、上記の癌細胞濃縮フィルターで末梢血を濾過する濾過工程を含む、癌細胞の存在を検出する方法を提供する。
- [0040] 上記本発明の方法によれば、患者から採取された末梢血中におけるCTC等の癌細胞の存在を容易に検出することができる。
- [0041] 上記の検査方法は、上記の濾過工程で濃縮された細胞の遺伝子を解析する工程を更に含んでもよく、上記の濾過工程で濃縮された細胞を培養する工程を更に含んでもよい。
- [0042] 上記の濾過工程は、細胞に対するダメージが小さいため、濃縮された細胞の遺伝子を解析する工程や、細胞を培養する工程を行うことが可能である。本発明の癌細胞の存在を検出する方法は、これらの工程を更に含むことにより、末梢血中におけるCTC等の癌細胞の存在をより正確に検出することができる。

発明の効果

- [0043] 本発明により、癌細胞接着性向上剤、癌細胞接着性向上剤で表面が被覆さ

れた癌細胞濃縮フィルター、及び、当該癌細胞濃縮フィルターで末梢血を濾過する工程を含む癌細胞の検査方法が提供される。

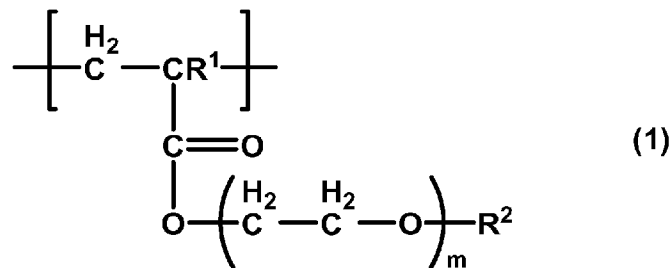
図面の簡単な説明

- [0044] [図1] 図1は、癌細胞濃縮フィルターの一実施形態を示す概略図である。
- [図2] 図2は、実験例1-3の結果を示すグラフである。A：ポリマー溶液を1回塗布した結果、B：ポリマー溶液を2回塗布した結果、C：陽性対照。
- [図3] 図3は、実験例1-4の結果を示すグラフである。
- [図4] 図4は、実験例1-5の結果を示すグラフである。
- [図5] 図5は、実験例11-4の結果を示すグラフである。
- [図6] 図6は、実験例111-4の結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

- [0045] 以下、場合により図面を参照しながら、好適な実施形態を説明する。なお、図面の説明において同一要素には同一符号を付し、重複する説明を省略する。また、図面は理解を容易にするため一部を誇張して描いており、寸法比率は説明のものとは必ずしも一致しない。
- [0046] 一実施形態において、癌細胞接着性向上剤は、下記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーからなる。

[0047] [化7]

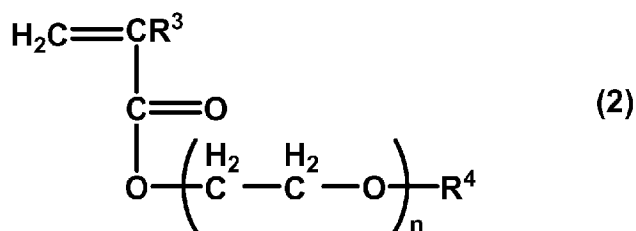


- [0048] 上記一般式(1)中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは1~3である。上記のポリマーの数平均分子量は10,000~300,000であることが好ましい。数平均分子量が10,000以下の場合、上記のポリマーは液状となり、取り扱いが困難になる場合がある。また、通常のラジカル重合によって、上記のポリマーの数平均

分子量を300,000以上とすることは困難な場合がある。

[0049] 上記のポリマーは、典型的には、下記一般式(2)で表されるモノマーの溶液に適切な開始剤を添加し、一般的な方法によって重合させることにより製造することができる。重合反応を行う温度は、40℃～100℃が好ましく、60℃～90℃がより好ましく、70℃～80℃が更に好ましい。重合反応を行う圧力は常圧であることが好ましい。

[0050] [化8]



[0051] 上記一般式(2)中、R³は水素原子又はメチル基であり、R⁴はメチル基又はエチル基であり、nは1～3である。

[0052] 重合反応において、溶媒としては、上記一般式(2)で表されるモノマーを溶解可能な溶媒を使用できる。例えば脂肪族又は芳香族の有機溶媒であり、より具体的には、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等のエーテル系溶媒、o-ジクロロベンゼン等のハロゲン化芳香族炭化水素、N,N-ジメチルホルムアミド等のアミド、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素、ヘキサン、ペンタン等の脂肪族炭化水素が挙げられ、ジオキサン等のエーテル系溶媒が好ましい。

[0053] 一実施形態において、癌細胞接着性向上剤は、上記一般式(1)で表される構造単位からなるポリマーからなる。

[0054] 癌細胞接着性向上剤は、上記一般式(1)中のR¹、R²及びmが以下の(a)～(h)のいずれかの組合せであることが好ましい。

(a) R¹が水素原子であり、R²がメチル基であり、mが1～2である。

(b) R¹が水素原子であり、R²がメチル基であり、mが3である。

(c) R¹が水素原子であり、R²がエチル基であり、mが1～2である。

(d) R¹が水素原子であり、R²がエチル基であり、mが3である。

(e) R¹がメチル基であり、R²がメチル基であり、mが1～2である。

(f) R¹がメチル基であり、R²がメチル基であり、mが3である。

(g) R¹がメチル基であり、R²がエチル基であり、mが1～2である。

(h) R¹がメチル基であり、R²がエチル基であり、mが3である。

[0055] R¹、R²及びmが上記の組合せであることにより、癌細胞接着性向上剤で被覆された基板への血球成分の接着性が低下すると共に癌細胞の接着性が向上する効果を更に高めることができる。

[0056] 一実施形態において、癌細胞接着性向上剤は、上記一般式(2)で表されるモノマーと他の重合可能なモノマーとのランダムコポリマー若しくはブロックコポリマー若しくはグラフトコポリマーである。

[0057] 上記一般式(2)で表されるモノマーと重合可能なモノマーとしては、アクリルアミド、*t*-ブチルアクリルアミド、*n*-ブチルアクリルアミド、*i*-ブチルアクリルアミド、ヘキシルアクリルアミド、ヘプチルアクリルアミド等のアルキルアクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド等のN,N-ジアルキルアクリルアミド、アミノメチルアクリレート、アミノエチルアクリレート、アミノイソプロピルアクリレート等のアミノアルキルアクリレート、ジアミノメチルアクリレート、ジアミノエチルアクリレート、ジアミノブチルアクリレート等のジアミノアルキルアクリレート、メタクリルアミド、N,N-ジメチルメタクリルアミド、N,N-ジエチルメタクリルアミド等のN,N-ジアルキルメタクリルアミド、アミノメチルメタクリレート、アミノエチルメタクリレート等のアミノアルキルメタクリレート、ジアミノメチルメタクリレート、ジアミノエチルメタクリレート等のジアミノアルキルメタクリレート、メチルアクリレート、エチルアクリレート、イソプロピルアクリレート、ブチルアクリレート、ヘキシルアクリレート、2-エチルヘキシルアクリレート等のアルキルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、ヘキシルメタクリレート等のアルキルメタクリレート、メトキシ(メタ)アクリレート等のアルコキシ(メタ)アクリレート、メトキシエ

チル（メタ）アクリレート等のアルコシアルキル（メタ）アクリレート、グリシジルメタクリレート、プロピレン等が挙げられる。

[0058] 上記一般式（２）で表されるモノマーと重合させるモノマーは、アルキルアクリレート、アルキルメタクリレート、アルコシ（メタ）アクリレート、アルコシアルキル（メタ）アクリレート、グリシジルメタクリレート及びプロピレンからなる群より選ばれる１種以上のモノマーであってもよい。

[0059] 上記一般式（２）で表されるモノマー及び上記の重合可能なモノマーとのコポリマーは、ランダムコポリマー、ブロックコポリマー、グラフトコポリマーのいずれでもよく、ランダム重合、イオン重合、マクロマーを利用した重合等の方法で製造できる。

[0060] 上記一般式（２）で表されるモノマーと、上記の重合可能なモノマーとを共重合させる場合、上記一般式（２）で表されるモノマーは、コポリマー中の３０～９９質量％であることが好ましく、５０～９９質量％であることが更に好ましい。

[0061] 上記一般式（１）で表される構造単位を含むポリマーは、典型的には、上記一般式（２）で表されるモノマーの溶液に適切な開始剤、及び、場合により上記の重合可能な１種以上のモノマーを添加し、ランダム重合、イオン重合、光重合、マクロマーを利用した重合等の方法によって重合させることにより製造することができる。重合反応を行う温度は、４０℃～１００℃が好ましく、６０℃～９０℃がより好ましく、７０℃～８０℃が更に好ましい。重合反応を行う圧力は常圧であることが好ましい。

[0062] 重合反応において、溶媒としては、上記一般式（２）で表されるモノマー及び上記の重合可能なモノマーを溶解可能な溶媒を使用できる。このような溶媒は、例えば脂肪族又は芳香族の有機溶媒であり、より具体的には、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジエチルエーテル等のエーテル系溶媒、オージクロロベンゼン等のハロゲン化芳香族炭化水素、N，N-ジメチルホルムアミド等のアミド、ジメチルスルホキシド等のスルホキシド、ベンゼン、トルエン等の芳香族炭化水素、ヘキサン、ペンタン等の脂肪族炭化水素が挙げ

られ、ジオキサン等のエーテル系溶媒が好ましい。

- [0063] 癌細胞接着性向上剤を癌細胞濃縮フィルター等の基板の表面に適用すると、血液適合性が付与されるため、血液の接触時に血液成分の活性化が抑制でき、血球成分のフィルターへの付着を低減することが可能となる。また、癌細胞接着性向上剤を適用した癌細胞濃縮フィルターは、種々の癌細胞に対する接着性が良好なため、癌細胞を効率よく濃縮させることができる。
- [0064] 上記一般式（1）で表される構造単位を含むポリマーは、分子内に極性基としてエーテル結合及びエステル結合を有するが、これらの極性基は窒素原子（アミノ基、イミノ基）やカルボキシル基等と異なり、生体成分と強い静電相互作用を持たない。また、大きな疎水性基を持たないため、疎水性相互作用も小さい。このため、上記一般式（1）で表される構造単位を含むポリマーは、血液に対して活性が低く、優れた血液適合性を発現するものと推測される。
- [0065] 医療用材料表面と生体内組織や血液中のタンパク質との接触においては、タンパク質の吸着変性や活性化が起こらないことが好ましく、このためには、物質間に働く大きな相互作用である疎水性相互作用や静電的相互作用を小さくすることが有用であると考えられている。この点からも、癌細胞接着性向上剤が適用された表面は好適な表面構造を備え得る。
- [0066] また、癌細胞接着性向上剤が適用された表面は、適度な親水性を有しているため、血液と接触した場合においても血小板の接着が軽微であり、優れた血液適合性を発現する。また、水酸基に起因した水素結合による生体成分との相互作用や吸着タンパク質の変性等も抑制されると考えられる。
- [0067] 癌細胞接着性向上剤を癌細胞濃縮フィルター等の基板の表面に適用することにより、赤血球、白血球、血小板等の血球成分のフィルターへの接着が軽減され、同時に癌細胞を選択的に効率良く捕獲することが可能となる。この機能の発現メカニズムについての詳細は明らかになっていないが、発明者らは、中間水概念により説明できるものと推測している。
- [0068] すなわち、癌細胞接着性向上剤が適用された基板と接触している水には、

(1) 癌細胞接着性向上剤と弱い相互作用をしており0℃で融解する自由水、(2) 癌細胞接着性向上剤と強い相互作用をしており-100℃でも凍結しない不凍水、(3) 自由水と不凍水の間間的な相互作用をしており0℃より低温で凍結する中間水、が存在すると考えられる。正常な血球細胞は、癌細胞接着性向上剤と接触している不凍水、中間水、自由水等と水和殻を持ち、この水和構造によって安定化しているが、中間水によって、癌細胞接着性向上剤の構造を強く反映した不凍水がカモフラージュされ、基板表面への接着が抑制されると考えられる。一方、癌細胞は、細胞表面の糖鎖の発現が正常細胞とは異なるので、正常な血球細胞と比較して、水和構造が乱れていると考えられる。これにより、基板表面の中間水の構造をかく乱し、基板表面への接着性が向上すると考えられる。

[0069] 癌細胞接着性向上剤は、あらゆる種類の癌細胞に適用可能であるが、血管への浸潤を起こしやすい上皮性細胞由来の癌に適用することが好ましく、その中でもCTCが多いとされている、肺癌、大腸癌若しくは胃癌若しくは食道癌等の消化器癌、乳癌、前立腺癌に適用することが特に好ましい。

[0070] 一実施形態において、本発明は、複数の貫通孔が形成された基板からなり、当該基板の少なくとも一部が癌細胞接着性向上剤で被覆されている、癌細胞濃縮フィルターを提供する。このフィルターは、血液中のCTC等の癌細胞を濃縮することができる。貫通孔の開口形状としては、円、楕円、長方形、角丸長方形、多角形等が例示できる。角丸長方形とは、2つの等しい長さの長辺と2つの半円形からなる形状である。効率良く癌細胞を捕獲できる観点からは、円、長方形又は角丸長方形が好ましい。また、フィルターの目詰まり防止の観点からは、角丸長方形が特に好ましい。

[0071] 図1は、癌細胞濃縮フィルターの一実施形態を示す概略図である。フィルター100は、複数の貫通孔10が形成された基板20からなる。貫通孔10の開口形状は角丸長方形である。基板20の面30の表面にCTCが捕獲される。少なくとも面30の一部は癌細胞接着性向上剤で被覆されている。癌細胞接着性向上剤は、面30の全体を被覆していることが好ましい。面3

0とは反対側の面の一部若しくは全体は、癌細胞接着性向上剤で被覆されていてもよい。

[0072] 癌細胞濃縮フィルター等の基板の表面に癌細胞接着性向上剤を適用する方法としては、被覆が最も一般的である。被覆は、上記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーの溶液を、浸漬法、スプレー法、スピコート法等により基板表面に付着させた後、溶媒を除去(乾燥)することにより行われる。乾燥後の膜厚は、 $0.01\mu\text{m}\sim 1.0\text{mm}$ が好ましく、 $0.1\sim 100\mu\text{m}$ がより好ましく、 $0.5\sim 50\mu\text{m}$ が更に好ましい。膜厚が $0.01\mu\text{m}$ 未満であると血球成分との非接着性や癌細胞との接着性が十分発現しない場合がある。また膜厚が 1.0mm を超えるとこれらの接着特性のバランスが崩れる場合がある。

[0073] 基板に癌細胞接着性向上剤をより強固に固定化させるために、癌細胞接着性向上剤を被覆した後、基板に熱を加えてもよい。また、上記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーを架橋してもよい。架橋する方法として、予めポリマーの材料に架橋性モノマーを添加することが例示できる。架橋には、電子線、 γ 線、光照射を用いてもよい。

[0074] プラズマグラフト重合により基板の表面に上記一般式(1)で表される構造単位を含むポリマーの層を形成するには、約 $1.3\times 10^{-1}\text{Pa}$ 、好ましくは $1.3\sim 133.3\text{Pa}$ の減圧下で、アルゴン、窒素、空気、種々のモノマー等の雰囲気下に低温プラズマを $1\sim 300$ 秒間、好ましくは $2\sim 30$ 秒間照射した後、上記一般式(2)で表されるモノマーを供給してプラズマ開始重合を行えばよい。

[0075] 一実施形態において、基板の材質や形状は特に制限されることなく、例えば多孔質体、繊維、不織布、フィルム、シート、チューブを使うことができる。基板の材質としては、木綿、麻等の天然高分子、ナイロン、ポリエステル、ポリアクリロニトリル、ポリオレフィン、ハロゲン化ポリオレフィン、ポリウレタン、ポリアミド、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリ(メタ)アクリレート、ハロゲン化ポリオレフィンエチレン-ポリビニルアル

コール共重合体、ブタジエン-アクリロニトリル共重合体等の合成高分子あるいはこれらの混合物が挙げられる。また、金属、セラミックス及びこれらの複合材料等も例示でき、複数の基板より構成されていてもよい。

[0076] 金属としては、金、銀等の貴金属、銅、アルミニウム、タングステン、ニッケル、クロム等の卑金属、及びこれらの金属の合金が例示できるがこれらに限定するものではない。金属は単体で用いてもよく、機能性を付与するために他の金属との合金又は金属の酸化物として用いてもよい。価格や入手の容易さの観点から、ニッケル、銅及びこれらを主成分とする金属を用いることが好ましい。ここで、主成分とは、上記基板を形成する材料のうち50重量%以上を占める成分をいう。これらの金属にフォトリソグラフィーなどの方法を使って、貫通孔を形成してスクリーンフィルターとすることもできる。

[0077] 一般的なCTCの大きさは、直径10 μm 以上である。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点を結ぶ直線のうち最も長い直線の長さをいう。血液の透過性とCTCの捕捉性能の観点から、癌細胞濃縮フィルターは、貫通孔の平均孔径が5 μm 以上30 μm 未満であり、平均開口率が5%以上50%未満であることが好ましい。また、平均孔径が5 μm 以上15 μm 未満であり、平均開口率が10%以上40%未満であることが更に好ましく、平均孔径が5 μm 以上10 μm 未満であり、平均開口率が20%以上40%未満であることが特に好ましい。ここで、開口率とは、フィルター全体の面積に対する貫通孔が占める面積をいう。平均開口率は、目詰まり防止の観点から、大きいほど好ましいが、上記上限値を超えると、フィルターの強度が低下したり、加工が困難になる場合がある。また5%より小さいとフィルターの癌細胞濃縮性能が低下する場合がある。

[0078] 本明細書において、開口形状が楕円、長方形、多角形等の円以外の形状における孔径とは、それぞれの貫通孔を通過できる球の直径の最大値とする。貫通孔の孔径は、例えば開口形状が長方形の場合には、その長方形の短辺の長さとなり、開口形状が多角形の場合には、その多角形の内接円の直径とな

る。開口形状が長方形や角丸長方形の場合、CTCや白血球が貫通孔に補足された場合であっても、開口部において、開口形状の長辺方向に隙間ができる。この隙間を通して液体が通過可能であるため、フィルターの目詰まりを防止することが可能になる。

[0079] フィルターの基板の厚さは3～100 μm であることが好ましく、5～50 μm であることがより好ましく、10～30 μm であることが特に好ましい。基板の厚さが3 μm より薄いと、フィルターの強度が低下し、取り扱いが困難になる場合がある。また、基板の厚さが100 μm を超えると、必要以上の材料を消費したり、加工に長時間かかったりするため、コスト的に不利になったり、精密加工そのものが困難になる場合がある。

[0080] 続いて、本実施形態の癌細胞濃縮フィルターの製造方法を説明する。本実施形態のフィルターの製造方法は、特に制限されるものではないが、例えば電気鋳造法（電鋳法）によって形成される。電気鋳造法とは、母型に厚い電気めっきを施した後に剥離する方法である。まず、ステンレス等からなる支持体上に感光性のレジストフィルム（感光層）を貼り合わせる。次に、フィルターの貫通孔の開口形状のパターンを有するマスクを感光層上に固定する。続いて、マスク上から光（活性光線）を照射する。光照射後、感光層上に支持体がある場合にはこれを除去し、アルカリ性水溶液、水系現像液及び有機溶剤等の現像液によるウエット現像、又はドライ現像等で未露光部を除去することによって現像し、レジストパターンを形成する。続いて、現像されたレジストパターンをマスクとして、マスクされずに露出している基板上にめっきを行う。めっきの方法としては、例えば、銅めっき、はんだめっき、ニッケルめっき、金めっきなどが挙げられる。めっき処理後、めっき層を支持体及び感光層から剥離すると、めっき層が得られる。上記の方法により、このめっき層の少なくとも一部を癌細胞接着性向上剤で被覆することにより、癌細胞濃縮フィルターが得られる。

[0081] 一実施形態において、本発明は、上記の癌細胞濃縮フィルターで試料を濾過する濾過工程を含む、癌細胞の存在を検出する方法を提供する。CTC等

の癌細胞を濃縮する試料としては、骨髄、脾臓、肝臓等にプールされている血液、リンパ、組織液、臍帯血等を利用することも可能であるが、体内を循環している末梢血を使うことが最も簡便である。末梢血中のCTCの存在を検出することは、癌の病状進行を判断する有用な手段である。

[0082] 本実施形態の癌細胞の存在を検出する方法は、例えば上記の癌細胞濃縮フィルターを流路内に組み込み、流路に末梢血を導入することによりCTCを含む細胞を濃縮し、濃縮された細胞の中にCTCが存在するか否かを確認することにより実施することができる。流路への血液の導入には、流路の入り口方向からの加圧を用いる方法、流路の出口方向からの減圧を用いる方法、ペリスタルティックポンプを使用する方法等が例示できる。また、使用するフィルターの面積は、例えば1 mLの血液からCTCを濃縮する場合、1～10 cm²が適している。

[0083] 上記の方法でCTCを濃縮した場合、CTCだけでなく白血球等の血球細胞も同時に濃縮される。このため、回収された細胞に癌細胞が含まれているか否かを確認することが必要である。例えば、上記の方法でCTCを濃縮した後、蛍光標識された癌マーカーに対する抗体で染色し、癌細胞であることを確認することができる。癌マーカーに対する抗体としては、抗EpCAM抗体等が例示できる。

[0084] また、上記の方法で濃縮された細胞の遺伝子を解析することにより、癌細胞であることを確認することもできる。例えば、p53、K-RAS、H-RAS、N-RAS、BRAF、APC等の遺伝子における変異を解析し、癌細胞であることを確認できる。また、これらの遺伝子解析の結果は、その後の患者の治療方針の決定等にも利用することができる。あるいは、上記の方法で濃縮した細胞のテロメラーゼ活性等を測定することにより、癌細胞であることを確認することもできる。

[0085] 上記の濾過工程は、細胞に対するダメージが小さいため、濃縮された細胞を培養し、更に詳細な解析を行うこともできる。

実施例

[0086] 以下、本発明を実施例に基づいて説明する。ただし、本発明は下記の実施例に制限されるものではない。

[0087] (実験例 I-1)

(ポリメトキシエチルアクリレートの合成)

上記一般式(1)において、 R^1 が水素であり、 R^2 がメチル基であり、 m が1である、ポリメトキシエチルアクリレートを合成した。具体的には、メトキシエチルアクリレート15gを1,4-ジオキサン60g中でアゾビスイソブチロニトリル(0.1質量%)を開始剤として、窒素バブリングしながら75°Cで10時間重合を行った。重合反応終了後、 n -ヘキサンに滴下し沈殿させ、生成物を単離した。生成物をテトラヒドロフランに溶解し、さらに n -ヘキサンを用いて2回精製を行い、一昼夜減圧乾燥した。無色透明で高粘度のポリマーが得られた。収率は76%であった。得られたポリマーをゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により解析した結果、数平均分子量が15,000で、分子量分布(M_w/M_n)が3.4であった。

[0088] ポリマーの分子量は、下記GPCの測定条件にて標準ポリスチレン換算分子量で算出した。

ポンプ: PU Intelligent HPLC Pump (Jasco製)

カラム: GPC K804 (昭和電工製、Shodex)

溶離液: クロロホルム

測定温度: 室温

流量: 1.0 mL/分

検出器: Jasco RI-1530型RI (Jasco製)

[0089] (実験例 I-2)

(ニッケル基板の作製)

市販のチタン板上に、チタン板を陰極として電解ニッケルめっき用の電解浴(スルファミン酸ニッケル450g/L、塩化ニッケル5g/L、ホウ酸30g/Lの水溶液、55°C)中に浸し、陽極を同電解浴中に浸した。両極

に電圧をかけて10 μ m厚になるようにニッケルめっきを行い、ニッケル基板を作製した。

[0090] (実験例1-3)

(ニッケル基板の被覆及び確認)

実験例1-1で合成したポリマーをクロロホルムに溶解し、0~5質量%の範囲で濃度の異なる複数のポリマー溶液を得た。各ポリマー溶液を、実験例1-2で作製したニッケル基板上に塗布(キャスト)し、溶媒を乾燥させて、ニッケル基板の表面を被覆した。ポリマーの塗布を1回行った基板と、2回行った基板を作製した。陽性対照として、ポリエチレンテレフタレート基板に、40 μ Lのポリマー溶液を塗布したものを使用した。これらの基板上で水の接触角を測定し、ポリマーで被覆されていることを確認した。接触角の測定には、接触角測定装置(エルマ、MODEL G-1-100)を使用した。純水2 μ lを各基板の表面に滴下し、30秒後の静的接触角を測定した。図2は、実験例1-3の結果を示すグラフである。横軸はポリマーの濃度を示し、縦軸は水の接触角を示す。図2中、Aはポリマー溶液を1回塗布した結果であり、Bはポリマー溶液を2回塗布した結果であり、Cは陽性対照である。

[0091] (実験例1-4)

(基板の準備)

実験例1-1で合成したポリマーを、クロロホルムに溶解し4質量%溶液を得た。この溶液を、実験例1-2で作製したニッケル基板上に塗布し、溶媒を乾燥させて、ニッケル基板の表面をポリマーで被覆し、実施例1-1のニッケル基板を作製した。ポリマー溶液の塗布は2回行った。X線光電子分光(島津製作所、ESCA-1000)により、ニッケル基板由来のニッケルのピークが観測されず、ポリマー由来の炭素と酸素のピークが検出されたことから、ニッケル基板がポリマーで被覆されていることを確認した。また、実験例1-2で作製したニッケル基板を比較例1-1のニッケル基板として使用した。

[0092] (癌細胞の接着性試験)

実施例 1-1 及び比較例 1-1 のニッケル基板上に、血清を 10% 添加した培地で 10,000 個/mL に調整した癌細胞懸濁液 1.0 mL をピペットで滴下し、37°C で 60 分間静置した。癌細胞として、ヒト線維肉腫細胞株 HT-1080 を使用した。続いて、生理緩衝食塩水を用いてリンスし、基板に接着した細胞の数をカウントした。カウントを容易にするために、ホルムアルデヒドで細胞を固定化後、4,6-diamino-2-phenylidole (DAPI) で細胞核を染色した。細胞核の数を、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス FV-1000) を用いてカウントし、細胞の数とした。

[0093] 図 3 は、実験例 1-4 の結果を示すグラフである。実験は 5 回ずつ行い、結果を平均値 ± 標準偏差で示した。実施例 1-1 のニッケル基板は、比較例 1-1 のニッケル基板と比較して、接着した癌細胞数が向上した。多数の他の癌細胞においても同様の結果が確認された。

[0094] (実験例 1-5)

(基板の準備)

実験例 1-4 と同様に、実施例 1-1 及び比較例 1-1 のニッケル基板を使用して実験を行った。

[0095] (血小板の接着性試験)

実施例 1-1 及び比較例 1-1 のニッケル基板上に、クエン酸ナトリウムで抗凝固したヒト新鮮多血小板血漿 0.2 mL をピペットで滴下し、37°C で 60 分間静置した。続いてリン酸緩衝溶液でリンスし、グルタルアルデヒドで固定した後、基板を走査型電子顕微鏡で観察し、 $1 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ の面積に接着した血小板数をカウントした。

[0096] 図 4 は、実験例 1-5 の結果を示すグラフである。実験は 5 回ずつ行い、結果を平均値 ± 標準偏差で示した。実施例 1-1 のニッケル基板は、比較例 1-1 のニッケル基板と比較して、接着した血小板数が少ないことが示された。

[0097] 実験例 1-4 及び 1-5 の結果から、実施例 1-1 のニッケル基板は、癌細胞の接着性が向上しているにもかかわらず、血球成分の接着性は小さいことが明らかとなった。したがって、本発明の癌細胞接着性向上剤は、癌細胞濃縮フィルターの表面に適用することにより、癌細胞のフィルターへの接着性を高め、癌細胞の濃縮率を向上させることができる。

[0098] (実験例 11-1)

(ポリ [2- (2-エトキシエトキシ) エチルアクリレート] の合成)

上記一般式 (1) において、 R^1 が水素であり、 R^2 がエチル基であり、 m が 2 である、ポリ [2- (2-エトキシエトキシ) エチルアクリレート] を合成した。具体的には、2- (2-エトキシエトキシ) エチルアクリレート 15 g を 1, 4-ジオキサン 60 g 中でアゾビスイソブチロニトリル (0.1 質量%) を開始剤として、窒素バブリングしながら 75°C で 10 時間重合を行った。重合反応終了後、 n -ヘキサンに滴下し沈殿させ、生成物を単離した。生成物をテトラヒドロフランに溶解し、さらに 2 回 n -ヘキサンを用いて精製を行った。精製物を一昼夜減圧乾燥した。無色透明で水飴状のポリマーが得られた。収量 (収率) は 11.4 g (76.0%) であった。得られたポリマー構造は、 1H -NMR によって確認した。GPC の分子量分析の結果、数平均分子量 (M_n) が 12,000 であり分子量分布 (M_w/M_n) が 3.9 であった。ポリマーの分子量は、実験例 1-1 と同様の GPC の測定条件にて標準ポリスチレン換算分子量で算出した。

[0099] (ポリ [2- (2-メトキシエトキシ) エチルメタクリレート] の合成)

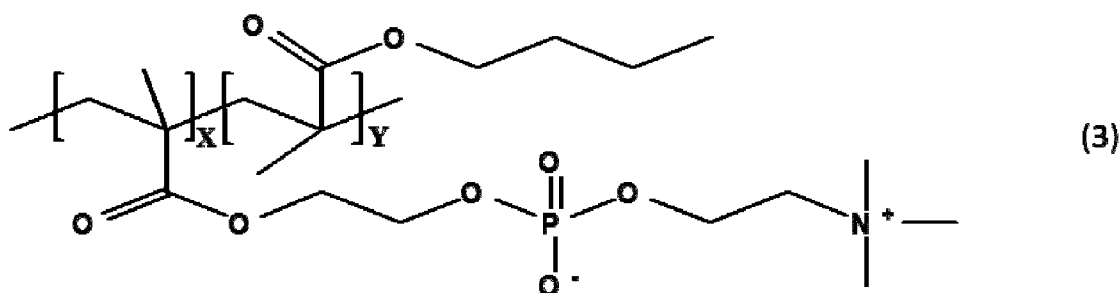
上記一般式 (1) において、 R^1 がメチル基であり、 R^2 がメチル基であり、 m が 2 である、ポリ [2- (2-メトキシエトキシ) エチルメタクリレート] を合成した。具体的には、2- (2-メトキシエトキシ) エチルメタクリレート 10 g を 1, 4-ジオキサン 50 g 中でアゾビスイソブチロニトリル (0.1 質量%) を開始剤として、窒素バブリングしながら 80°C で 8 時間重合した。重合反応終了後、 n -ヘキサンに滴下し沈殿させ、生成物を単離した。生成物をテトラヒドロフランに溶解し、さらに 2 回 n -ヘキサンを

用いて精製を行った。精製物を一昼夜減圧乾燥した。無色透明で水飴状のポリマーが得られた。収量（収率）は8.2 g（82.0%）であった。得られたポリマー構造は、¹H-NMRによって確認した。GPCの分子量分析の結果、数平均分子量（M_n）が104,000であり分子量分布（M_w/M_n）が4.6であった。ポリマーの分子量は、実験例1-1と同様のGPCの測定条件にて標準ポリスチレン換算分子量で算出した。

[0100]（ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-コ-ブチルメタクリレート）の合成）

下記一般式（3）で表される、ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-コ-ブチルメタクリレート）を合成した。ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-コ-ブチルメタクリレート）は、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）とブチルメタクリレート（BMA）の共重合体であり、MPC：BMA=40：60モル%～1：99モル%であった。

[0101] [化9]



[0102] 上記一般式（3）中、X及びYは1～10,000であり、X：Yは40：60モル%～1：99モル%である。

[0103] 具体的には、エタノールにモノマーを溶解し、アゾビスイソブチロニトリル（0.1質量%）を開始剤として、窒素バブリングしながら75℃で10時間重合を行った。重合反応終了後、ジエチルエーテルに滴下し沈殿させ、生成物を単離した。生成物をエタノールに溶解し、さらにジエチルエーテルを用いて2回精製を行い、一昼夜減圧乾燥した。白色パウダー状のポリマーが得られた。収率は51%であった。得られたポリマーをゲル浸透クロマト

グラフィー（GPC）により解析した結果、数平均分子量が240,000で、分子量分布（ M_w/M_n ）が2.9であった。ポリマーの分子量は、溶解液をエタノール／クロロホルム（2／8）にした点以外は、実験例1-1と同様のGPCの測定条件にて標準ポリオキシエチレン換算分子量で算出した。

[0104]（実験例11-2）

（ニッケル基板の作製）

実験例1-2と同様の処理を行ってニッケル基板を作製した。

[0105]（実験例11-3）

（実験例1-3）と同様の処理を行ってニッケル基板にポリマーを被覆したときの水の静的接触角を測定した。その結果、ポリ〔2-（2-エトキシエトキシ）エチルアクリレート〕については、0.2wt/vol%以上で接触角が25°でほぼ安定した。また、ポリ〔2-（2-メトキシエトキシ）エチルメタクリレート〕については、0.5wt/vol%以上で接触角が38°でほぼ安定した。また、ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-コブチルメタクリレート）については、0.1wt/vol%以上で接触角が104°でほぼ安定した。

[0106]（実験例11-4）

（基板の準備）

実験例1-1及び実験例11-1で合成したポリマー4種を、それぞれクロロホルムに溶解し4質量%溶液を得た。これらの溶液を、実験例11-2で作製したニッケル基板上に塗布し、溶媒を乾燥させて、ニッケル基板の表面をポリマーで被覆し、それぞれ、実施例11-1（ポリメトキシエチルアクリレート）、実施例11-2（ポリ〔2-（2-エトキシエトキシ）エチルアクリレート〕）、実施例11-3（ポリ〔2-（2-メトキシエトキシ）エチルメタクリレート〕）及び比較例11-1（ポリ（2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-コブチルメタクリレート））のニッケル基板を作製した。ポリマー溶液の塗布は2回行った。X線光電子分光（島

津製作所、E S C A - 1 0 0 0) により、ニッケル基板由来のニッケルのピークが観測されず、ポリマー由来の炭素と酸素のピークが検出されたことから、ニッケル基板がポリマーで被覆されていることを確認した。

[0107] (癌細胞の接着性試験)

実施例 11-1~3 及び比較例 11-1 のニッケル基板上に、血清を 10% 添加した培地で 10,000 個/mL に調整した癌細胞懸濁液 1.0 mL をピペットで滴下し、37°C で 60 分間静置した。癌細胞として、ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を使用した。続いて、生理緩衝食塩水を用いてリンスし、基板に接着した細胞の数をカウントした。カウントを容易にするために、ホルムアルデヒドで細胞を固定化後、4,6-diamino-2-phenylidole (DAPI) で細胞核を染色した。細胞核の数を、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス FV-1000) を用いてカウントし、細胞の数とした。

[0108] 図 5 は、実験例 11-4 の結果を示すグラフである。実験は 5 回ずつ行い、結果を平均値 ± 標準偏差で示した。実施例 11-1 のニッケル基板は、2000 個以上の癌細胞を捕捉した。実施例 11-2 のニッケル基板は、1500 個以上の癌細胞を捕捉した。また、実施例 11-3 のニッケル基板は、500 個以上の癌細胞を捕捉した。これらに比べて、比較例 11-1 のニッケル基板は、140 個程度しか癌細胞を捕捉できなかった。

[0109] (実験例 111-1)

(ポリ [2-(2-エトキシエトキシ) エチルメタクリレート] の合成)

上記一般式 (1) において、R¹ がメチル基であり、R² がエチル基であり、m が 2 である、ポリ [2-(2-エトキシエトキシ) エチルメタクリレート] を合成した。具体的には、2-(2-エトキシエトキシ) エチルメタクリレート 15.0 g (7.4 × 10⁻² mol) を、1,4-ジオキサン 58.2 mL に溶解し、2 時間 N₂ パージを行った。開始剤アゾビスイソブチロニトリル 15.1 mg (9.2 × 10⁻² mmol) を少量の 1,4-ジオキサンに溶解して加え、窒素雰囲気下 75°C で 2 時間 10 分重合した。精製はヘキ

サンを用いて行った。反応液を貧溶媒であるヘキサン1500 mL中に滴下し、デカンテーションによって溶媒を除いた。この粗ポリマーにテトラヒドロフラン（THF）約50 mLを加えて溶解し、再びヘキサン1000 mLに滴下して析出させたあと、デカンテーションによって溶媒を除いた。この操作をもう一度繰り返し、ポリマー中に含まれるモノマー及び開始剤を完全に除去した。一晩減圧乾燥し、質量を測定した。無色透明・水飴状のポリマー、ポリ〔2-（2-エトキシエトキシ）エチルメタクリレート〕が得られ、収量は5.36 g、収率は35.7%であった。GPCの分子量分析の結果から、数平均分子量（ M_n ）が142,000であり分子量分布（ M_w/M_n ）が6.06であった。ポリマーの分子量は、実験例1-1と同様のGPCの測定条件にて標準ポリスチレン換算分子量で算出した。

[0110]（実験例111-2）

（ニッケル基板の作製）

実験例1-2と同様の処理を行ってニッケル基板を作製した。

[0111]（実験例111-3）

（実験例1-3）と同様の処理を行ってニッケル基板にポリマーを被覆したときの水の静的接触角を測定した結果、ポリ〔2-（2-エトキシエトキシ）エチルメタクリレート〕については、0.5 wt/vol%以上で接触角が78°でほぼ安定した。

[0112]（実験例111-4）

（基板の準備）

実験例1-1、実験例11-1及び実験例111-1で合成したポリマー5種を、クロロホルムに溶解し4質量%溶液を得た。これらの溶液を、実験例111-2で作製したニッケル基板上に塗布し、溶媒を乾燥させて、ニッケル基板の表面をポリマーで被覆し、実施例111-1（ポリメトキシエチルアクリレート）、実施例111-2（ポリ〔2-（2-エトキシエトキシ）エチルアクリレート〕）、実施例111-3（ポリ〔2-（2-メトキシエトキシ）エチルメタクリレート〕）、比較例111-1（ポリ（2-メタ

クリロイルオキシエチルホスホリルコリン-コブチルメタクリレート))
及び実施例 111-4 (ポリ [2-(2-エトキシエトキシ) エチルメタクリレート]) のニッケル基板を作製した。ポリマー溶液の塗布は2回行った。X線光電子分光 (島津製作所、ESCA-1000) により、ニッケル基板由来のニッケルのピークが観測されず、ポリマー由来の炭素と酸素のピークが検出されたことから、ニッケル基板がポリマーで被覆されていることを確認した。

[0113] (癌細胞の接着性試験)

実施例 111-1~4 及び比較例 111-1 のニッケル基板上に、血清を 10% 添加した培地で 10,000 個/mL に調整した癌細胞懸濁液 1.0 mL をピペットで滴下し、37°C で 60 分間静置した。癌細胞として、肺癌細胞株 A549 を使用した。続いて、生理緩衝食塩水を用いてリンスし、基板に接着した細胞の数をカウントした。カウントを容易にするために、ホルムアルデヒドで細胞を固定化後、4,6-diamino-2-phenylidole (DAPI) で細胞核を染色した。細胞核の数を、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパス FV-1000) を用いてカウントし、細胞の数とした。

[0114] 図 6 は、実験例 111-4 の結果を示すグラフである。実験は 5 回ずつ行い、結果を平均値±標準偏差で示した。実施例 111-1 及び実施例 111-4 のニッケル基板は、6000 個/cm² 以上の癌細胞を捕捉した。実施例 111-2 のニッケル基板は、5000 個/cm² 以上の癌細胞を捕捉した。また、実施例 111-3 のニッケル基板は、2000 個/cm² 以上の癌細胞を捕捉した。一方、比較例 111-1 のニッケル基板は、130 個/cm² 程度しか癌細胞を捕捉できなかった。

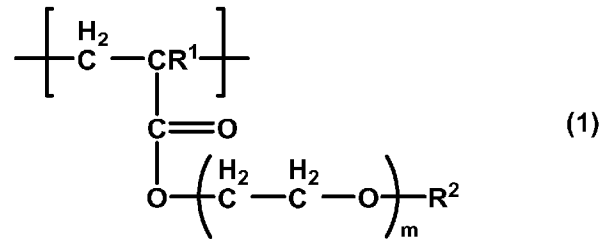
符号の説明

[0115] 10…貫通孔、20…基板、30…面、100…フィルター。

請求の範囲

[請求項1] 下記一般式（1）で表される構造単位を含むポリマーからなる癌細胞接着性向上剤。

[化1]



[式中、R¹は水素原子又はメチル基であり、R²はメチル基又はエチル基であり、mは1～3である。]

[請求項2] 前記一般式（1）で表される構造単位からなるポリマーからなる、請求項1に記載の癌細胞接着性向上剤。

[請求項3] R¹が水素原子であり、R²がメチル基であり、mが1である、請求項1又は2に記載の癌細胞接着性向上剤。

[請求項4] R¹が水素原子であり、R²がエチル基であり、mが2である、請求項1又は2に記載の癌細胞接着性向上剤。

[請求項5] R¹がメチル基であり、R²がメチル基であり、mが2である、請求項1又は2に記載の癌細胞接着性向上剤。

[請求項6] 数平均分子量が10,000～300,000である、請求項1～5のいずれか一項に記載の癌細胞接着性向上剤。

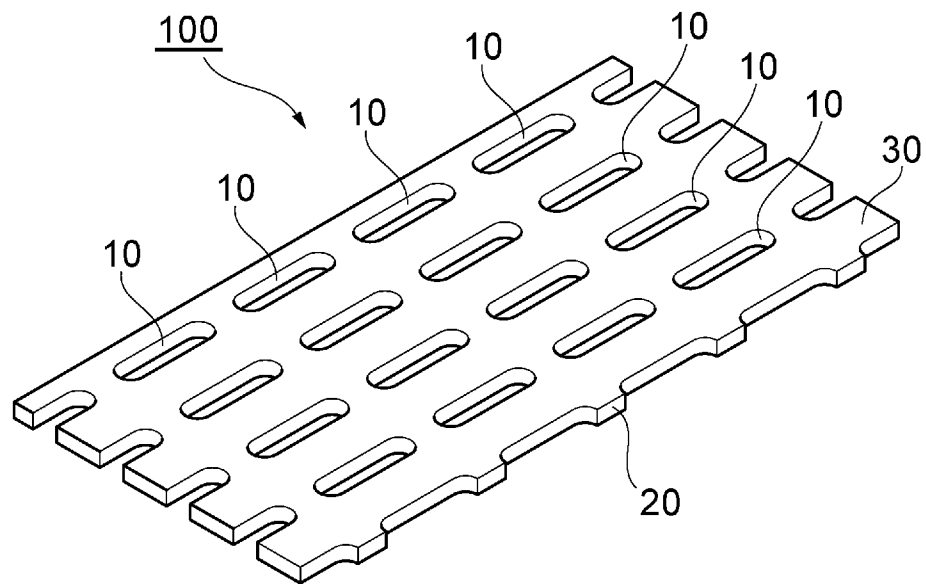
[請求項7] 複数の貫通孔が形成された基板からなり、当該基板の少なくとも一部が請求項1～6のいずれか一項に記載の癌細胞接着性向上剤で被覆されている、癌細胞濃縮フィルター。

[請求項8] 前記貫通孔は、平均孔径が5 μm以上30 μm未満であり、平均開口率が5%以上50%未満である、請求項7に記載の癌細胞濃縮フィルター。

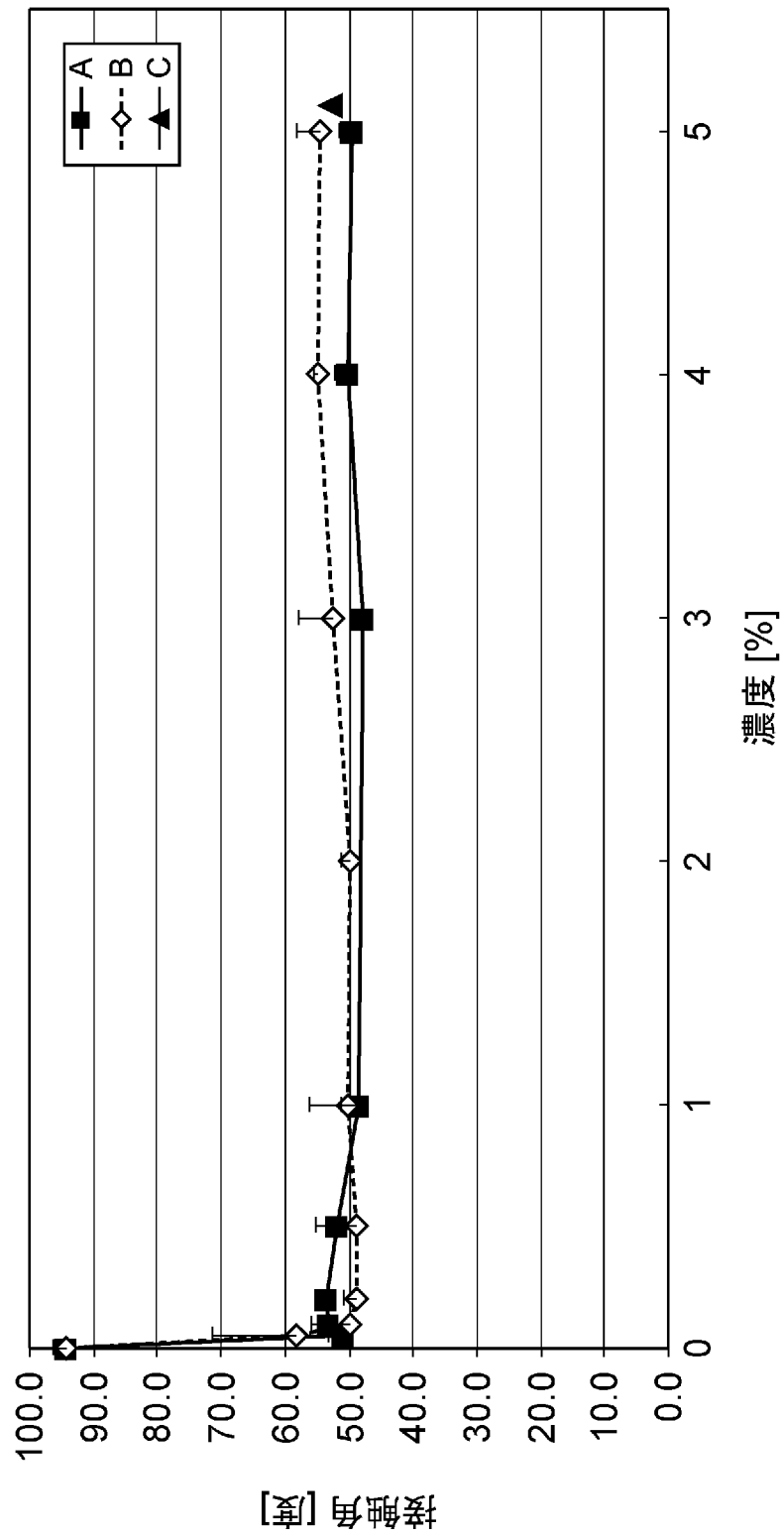
[請求項9] 前記基板は金属からなる、請求項7又は8に記載の癌細胞濃縮フィルター。

- [請求項10] 前記金属は、銅、ニッケル、銅及びニッケルの合金並びにこれらの表面が金めっきされたものからなる群より選択されるものである、請求項9に記載の癌細胞濃縮フィルター。
- [請求項11] 前記貫通孔は、電気鋳造法によって形成されたものである、請求項9又は10に記載の癌細胞濃縮フィルター。
- [請求項12] 請求項7～11のいずれか一項に記載の癌細胞濃縮フィルターで末梢血を濾過する濾過工程を含む、癌細胞の存在を検出する方法。
- [請求項13] 前記濾過工程で濃縮された細胞の遺伝子を解析する工程を更に含む、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 前記濾過工程で濃縮された細胞を培養する工程を更に含む、請求項12又は13に記載の方法。

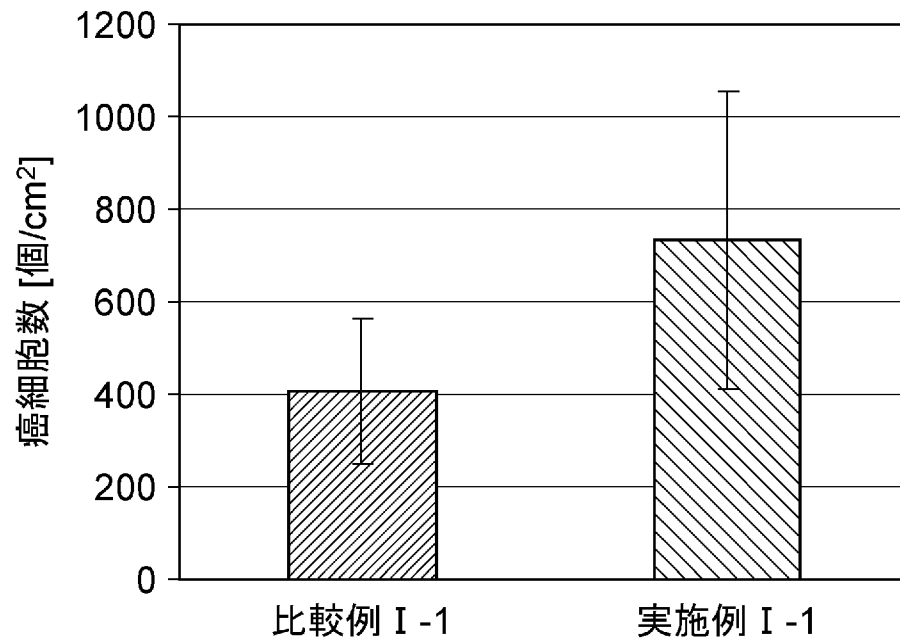
[図1]



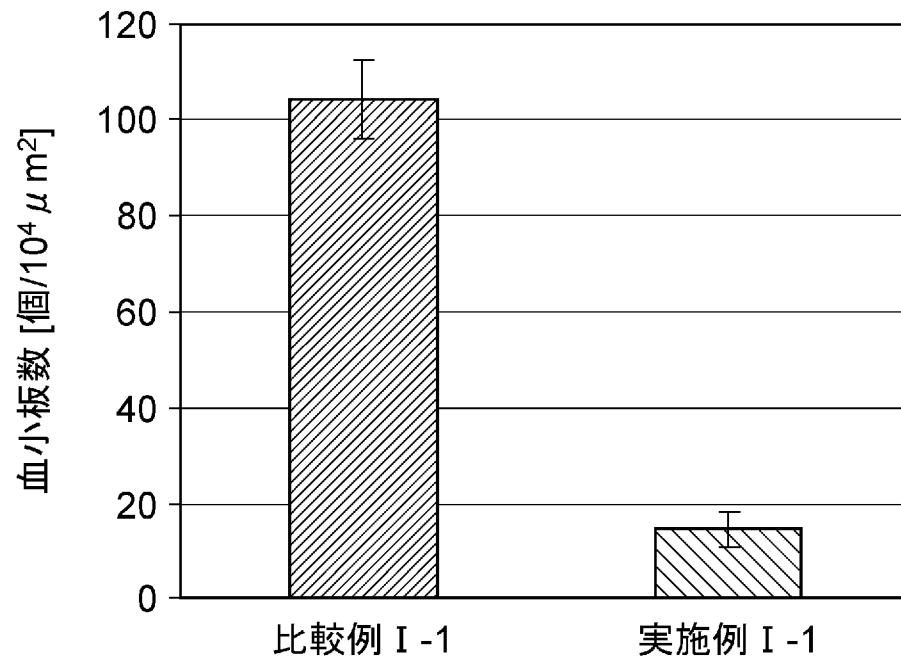
[図2]



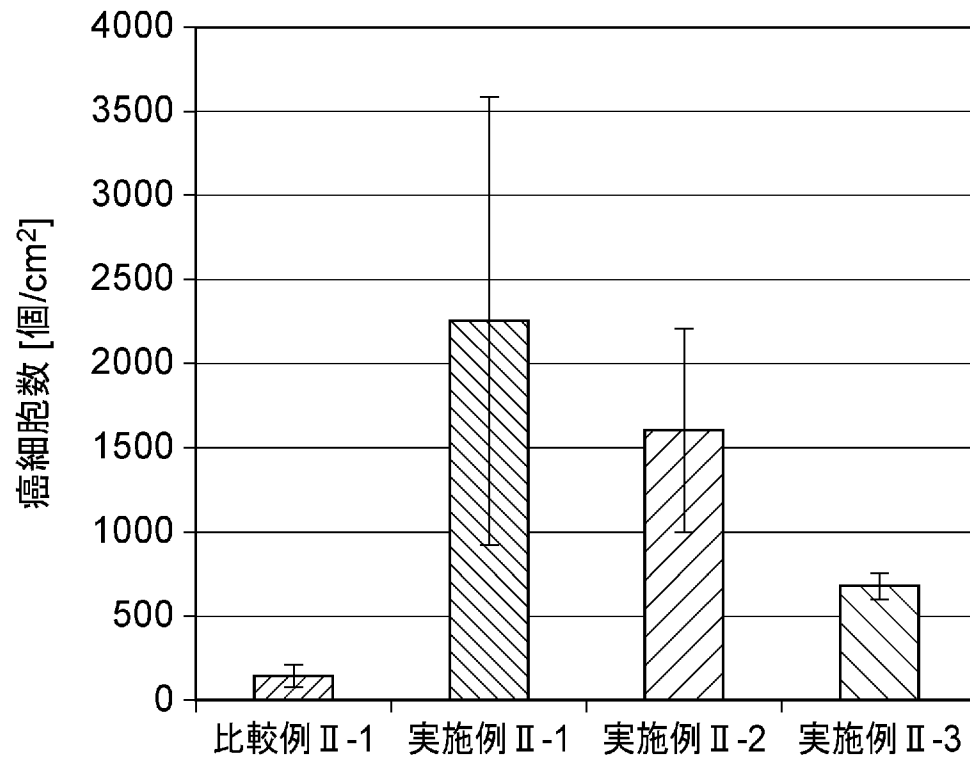
[図3]



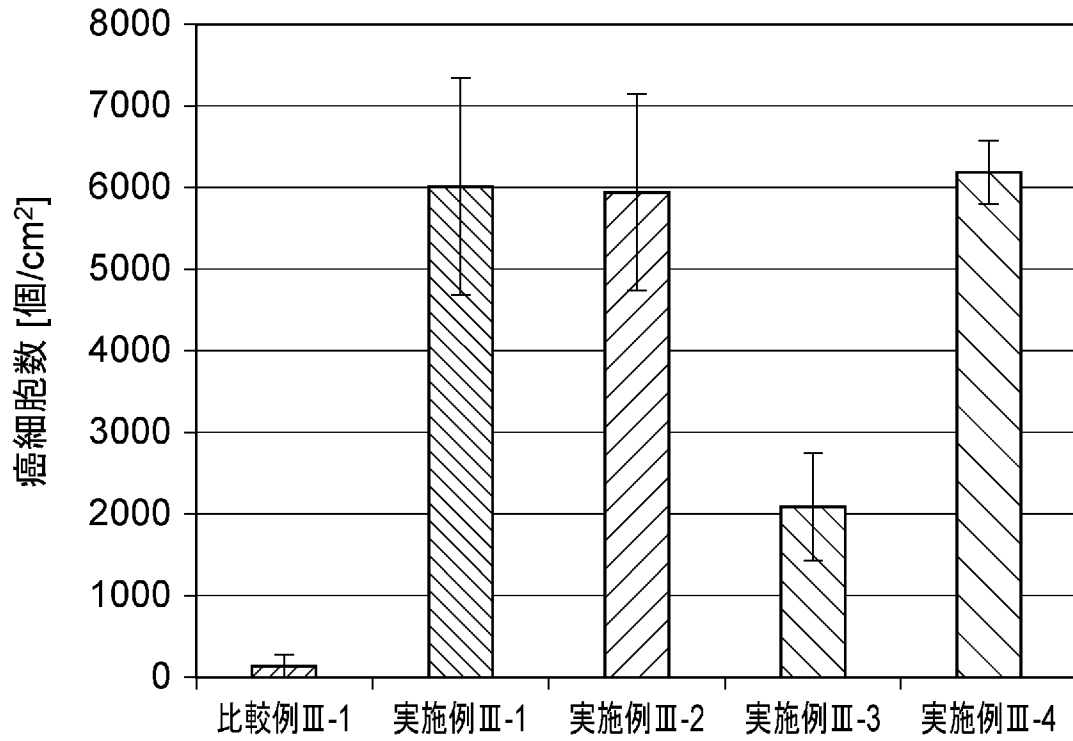
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/064932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/48(2006.01)i, B01D29/01(2006.01)i, B01D39/14(2006.01)i, G01N1/00(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)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)
G01N33/48, B01D29/01, B01D39/14, G01N1/00, G01N1/28

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 1996-2012
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), CAPLUS/REGISTRY (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	Satomi YAGI et al., "Ketsueki Tekigosei Kobunshi Hyomenjo deno Hito Gan Saibo no Sentakuteki Secchaku", Polymer Preprints, Japan (CD-ROM), 10 May 2011 (10.05.2011), vol.60, no.1, Disk 1, 1PC147	1-3, 6/7-14/4, 5
X/Y/A	Satomi YAGI et al., "Kekkyu Saibo no Hi Secchakusei to Gan Saibo no Secchakusei o Awasemotsu Kobunshi Hyomen no Sosei", Regenerative Medicine, 01 February 2011 (01.02.2011), vol.10, special extra issue, page 264	1-3, 6/7-14/4, 5
Y/A	Masato HOSOKAWA et al., "Development of microfluidic device for rapid detection of circulating tumor cells", Chem. Sens., vol.26, no.Supplement B, 02 September 2010 (02.09.2010), pages 40 to 42	7-14/1-6

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
07 September, 2012 (07.09.12)

Date of mailing of the international search report
25 September, 2012 (25.09.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/064932

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	Masato HOSOKAWA et al., "Zenketsu kara no Junkan Shuyo Saibo Kokoritsu Kenshutsu Device no Kaihatsu", CSJ: The Chemical Society of Japan Koen Yokoshu, vol.90th, no.3, 12 March 2010 (12.03.2010), page 659	7-14/1-6
A	WO 2004/087228 A1 (Japan Science and Technology Agency), 14 October 2004 (14.10.2004), (Family: none)	1-14
A	ZHENG S. et al., 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC)enrichment from blood, Biomed. Microdevices, 2011.02, Vol.13, No.1, P.203-213	1-14
P,X	Takashi HOSHIBA et al., "Ketsueki Tekigosei Kobunshi Kibanjo eno Gan Saibo no Secchaku Kiko no Kaiseki", Polymer Preprints, Japan (CD-ROM), 15 May 2012 (15.05.2012), vol.61, no.1, 3H20	1-3,6
P,X	Satomi YAGI et al., "Poly (2-methoxyethylacrylate) Hyomenjo deno Hito Gan Saibo no Sentakuteki Secchaku", The Annual Meeting of the Japanese Society for Biomaterials Yokoshu, 21 November 2011 (21.11.2011), vol.33rd, page 306	1-3,6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, B01D29/01(2006.01)i, B01D39/14(2006.01)i, G01N1/00(2006.01)i, G01N1/28(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/48, B01D29/01, B01D39/14, G01N1/00, G01N1/28

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

日本国实用新案公報	1922-1996年
日本国公開实用新案公報	1971-2012年
日本国实用新案登録公報	1996-2012年
日本国登録实用新案公報	1994-2012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(JDreamII), CAplus/REGISTRY(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	八木理美ほか, 血液適合性高分子表面上でのヒト癌細胞の選択的接着, 高分子学会予稿集(CD-ROM), 2011.05.10, Vol.60 No.1 Disk1 IPC147	1-3, 6/7-14/4, 5
X/Y/A	八木理美ほか, 血球細胞の非接着性と癌細胞の接着性を併せ持つ高分子表面の創製, 再生医療, 2011.02.01, Vol.10 増刊号, P.264	1-3, 6/7-14/4, 5

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

07.09.2012

国際調査報告の発送日

25.09.2012

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

海野 佳子

2 J 3 9 0 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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/A	細川正人ほか, 循環腫瘍細胞の迅速検出に向けたマイクロデバイスの開発, Chem. Sens., Vol. 26 No. Supplement B, 2010. 09. 02, P. 40-42	7-14/1-6
Y/A	細川正人ほか, 全血からの循環腫瘍細胞高効率検出デバイスの開発, 日本化学会講演予稿集, Vol. 90th No. 3, 2010. 03. 12, P. 659	7-14/1-6
A	WO 2004/087228 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2004. 10. 14, (ファミリーなし)	1-14
A	ZHENG S. et al., 3D microfilter device for viable circulating tumor cell (CTC) enrichment from blood, Biomed. Microdevices, 2011. 02, Vol. 13, No. 1, P. 203-213	1-14
P, X	干場隆志ほか, 血液適合性高分子基板上への癌細胞の接着機構の解析, 高分子学会予稿集(CD-ROM), 2012. 05. 15, Vol. 61 No. 1 3H20	1-3, 6
P, X	八木理美ほか, ポリ(2-メトキシエチルアクリレート)表面上でのヒト癌細胞の選択的接着, 日本バイオマテリアル学会大会予稿集, 2011. 11. 21, Vol. 33rd, P. 306	1-3, 6