

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6619271号
(P6619271)

(45) 発行日 令和1年12月11日(2019.12.11)

(24) 登録日 令和1年11月22日(2019.11.22)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N	33/48	M	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53	D	
GO 1 N 1/04	(2006.01)	GO 1 N	33/53	M	
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	GO 1 N	1/04	H	
C 1 2 N 5/09	(2010.01)	C 1 2 Q	1/02		

請求項の数 11 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-57313 (P2016-57313)
 (22) 出願日 平成28年3月22日 (2016. 3. 22)
 (65) 公開番号 特開2016-180753 (P2016-180753A)
 (43) 公開日 平成28年10月13日 (2016. 10. 13)
 審査請求日 平成30年10月1日 (2018. 10. 1)
 (31) 優先権主張番号 特願2015-60034 (P2015-60034)
 (32) 優先日 平成27年3月23日 (2015. 3. 23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 日本国 (JP)

(73) 特許権者 000141897
 アークレイ株式会社
 京都府京都市南区東九条西明田町57
 (74) 代理人 110000040
 特許業務法人池内アンドパートナーズ
 (72) 発明者 ▲高▼木 英紀
 京都市上京区岩栖院町59番地 擁翠園内
 アークレイ株式会社内

審査官 磯田 真美

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 稀少細胞を分離又は検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液検体をフィルターを用いてフィルター処理して血液検体中の稀少細胞を分離又は検出することを含み、

前記フィルターは、短軸径が5 μm以上8 μm以下であり、長軸径が40 μm以上である孔を、孔密度が40個/mm²以上2000個/mm²以下で、かつ、長軸径w(μm)と短軸径側の孔間の余白z(μm)との比(w/z)が7.0以上130以下で含む、稀少細胞の分離又は検出方法。

【請求項2】

フィルターの孔1個当たりに対するフィルター処理容量が、フィルターの孔面積当たりの処理容量に換算して0.1nl/μm²以上3nl/μm²以下となるように血液検体をフィルター処理する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

前記フィルターの開口率が、10%以上60%以下である、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記フィルター処理における濾過圧力は、0.1kPa以上2.6kPa以下である、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】

前記フィルター処理する際のフィルター上面と下面との圧力差が、100Pa以下であ

る、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

前記血液検体を、前記フィルターの孔あたり 1 mm/min 以上 600 mm/min 以下の平均流速で前記フィルターに送液することを含む、請求項 1 から 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

前記稀少細胞が、がん細胞、循環腫瘍細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、がん幹細胞、上皮細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胎児細胞、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される細胞である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法で稀少細胞を分離又は検出した後、該細胞の動態の観察若しくは活性測定を含む方法で分析すること又は該細胞の遺伝子分析することを含む、血液検体中の稀少細胞の分析方法。

【請求項 9】

請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法に使用する、短軸径が $5\text{ }\mu\text{m}$ 以上 $8\text{ }\mu\text{m}$ 以下であり、長軸径が $40\text{ }\mu\text{m}$ 以上である孔を、孔密度が 40 個/mm^2 以上 2000 個/mm^2 以下で、かつ長軸径 $w\text{ (}\mu\text{m)}$ と短軸径側の孔間の余白 $z\text{ (}\mu\text{m)}$ との比 (w/z) が 7.0 以上 130 以下で含むフィルター。

【請求項 10】

供給口と、排出口と、前記供給口と前記排出口を連通する流路と、分離部と有し、前記分離部は、前記流路の一部に相当する位置に配置され、かつ請求項 9 記載のフィルターと前記フィルターの保持部とを含む、検体中に含まれる稀少細胞を捕捉するための稀少細胞捕捉装置。

【請求項 11】

請求項 9 記載のフィルターと、前記フィルターを保持する保持部とを含み、流路に対して着脱可能な、稀少細胞の分離キットまたは分離デバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、血液検体中の稀少細胞を分離又は検出する方法、血中循環腫瘍細胞の分析方法、及びそれらに用いられるフィルターならびに稀少細胞捕捉装置に関する。

【背景技術】

【0002】

血液の細胞成分は、主に赤血球、白血球、血小板であるが、血液中には稀少ではあるがこれら以外の細胞が存在することがある。このような稀少細胞の一例として、血中循環腫瘍細胞 / CTC (Circulating Tumor Cell) が挙げられる。CTC は、原発腫瘍組織又は転移腫瘍組織から遊離し、血液に浸潤した細胞である。がんの転移はがん細胞が血管やリンパ管を通して体内の他の部位に運ばれて増殖することにより起こると考えられていることから、血液中の CTC 数と、がんの転移の可能性及び予後に関係があることが報告されている。このため、がん (特に乳がんなどの転移性のがん) の診断、予後診断、また治療効果の予測又は判定の指標とするための研究で、血液中の CTC 数の計数、CTC の核酸を測定することが知られている。このため、血液中の CTC の分離・濃縮について様々な手法が提案・研究されている (特許文献 1 ~ 5、非特許文献 1 ~ 6 など)。

【特許文献 1】特開 2013 - 17429 号公報

【特許文献 2】特表 2010 - 530234 号公報

【特許文献 3】特許第 5141919 号

【特許文献 4】特開 2013 - 42689 号公報

【特許文献 5】特開 2011 - 163830 号公報

【非特許文献 1】Vona G, Sabile A, Louha M, Sitruk V, Romana S, Schutze K, Capron

10

20

30

40

50

F, Franco D, Pazzagli M, Vekemans M, Lacour B, Brechot C, Paterlini-Brechot P. Isolation by Size of Epithelial Tumor Cells: A New Method for the Immunomorphological and Molecular Characterization of Circulating Tumor Cells, *Am J Pathol.* 2000 Jan; 156(1):57-63.

【非特許文献 2】 Coumans FA, van Dalum G, Beck M, Terstappen LW. (2013) Filter Characteristics Influencing Circulating Tumor Cell Enrichment from Whole Blood, April | Volume 8 | Issue 4 | e61770

【非特許文献 3】 Park S, Ang RR, Duffy SP, Bazov J, Chi KN, Black PC, Ma H (2014) Morphological differences between circulating tumor cells from prostate cancer patients and cultured prostate cancer cells, *PLOS ONE* January 2014 | Volume 9 | Issue 1 | e85264

【非特許文献 4】 Xu W, Mezencev R, Kim B, Wang L, McDonald J, Sulchek T. (2012) October 2012 | Volume 7 | Issue 10 | e46609 Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells

【非特許文献 5】 Zhang W, Kai K, Choi DS, Iwamoto T, Nguyen YH, Wong H, Landis MD, Ueno NT, Chang J, Qin L. (2012) Microfluidics separation reveals the stem-cell-like deformability of tumor-initiating cells.

【非特許文献 6】 R. Negishi et al. Development of the automated circulating tumor cell recovery system with microcavity array, *Biosensors and Bioelectronics* (2014)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

10 ml の血液中には、通常、赤血球が数百億個、白血球は数千万個が含まれているが、CTC等の稀少細胞は0～数個程度、多い場合に数千個程度である。また、これらの稀少細胞の中には、上述のがんの転移との関係性が考えられる細胞や免疫細胞等といった医学的に重要な細胞が含まれているため、血液中の稀少細胞の分析は、今後さらに盛んに行われることが予想され、より簡便でロスが少ない方法が求められている。CTCをそのまま解析するには技術的課題が多く、例えば、分離濃縮などの処理が必要となる。そのため、血液の中から、より効率的にCTCを分離濃縮する技術の開発が期待されている。

【0004】

CTCを分離濃縮する技術はいくつか方法があり、その中には抗体を使った分離濃縮の技術や、フィルターを利用した分離濃縮の技術が報告されている(非特許文献1)。非特許文献1には、8 μmの孔をもつフィルターを用いて、大多数の血球はフィルターを通過させ、CTCをフィルター上に残す分離濃縮技術が開示されている。非特許文献1に開示された方法のようにフィルターを利用した分離濃縮方法は、抗体を使った分離濃縮方法とは異なり、CTCの表面抗原に依存しない方法として期待されている。

【0005】

CTCは、医療の発展に非常に有望な細胞であるが、前述のとおり血液10 ml中で数個しかいないといわれている。10 ml中にCTCが2個しかいない場合、ポワソン分布によると、1 mlの血液の処理で、100%漏れなく捕捉できたとしても最高20%の検出率しか期待できないが、血液を多く処理できた場合、8 mlでは1個以上のCTCが存在する確率は約90%近くになる。血液処理量を増やしてフィルターの枚数が増えれば煩雑になるため、1度により多くの血液を適切に処理できるフィルターが望まれる。

【0006】

特許文献2には、CTCは血球よりもサイズが大きく、血球よりも変形能が低いことが開示されている。一方、CTCの中には、8 μmの孔よりもサイズが小さいがん細胞(例えば、非特許文献1、2)や、変形能の高いがん細胞が存在し、これらの細胞は転移性の高い可能性があることが報告されている(例えば、非特許文献4、5)。CTCを用いて高い精度でがんの診断及び解析等を行うには、これらの細胞についても分離することが求められる。

10

20

30

40

50

【0007】

そこで、本開示は、一又は複数の実施形態において、血液検体中に稀少細胞が含まれている場合に、小型の稀少細胞と変形能の高い稀少細胞の双方を効率よく簡便に捕捉できるフィルター及び血液検体の処理方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本開示は、一又は複数の実施形態において、短軸径が $5\ \mu\text{m}$ 以上 $8\ \mu\text{m}$ 以下であり、長軸径が $40\ \mu\text{m}$ 以上である孔を、孔密度が $40\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上 $2000\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下で、かつ、長軸径 $w\ (\mu\text{m})$ と短軸径側の孔間の余白 $z\ (\mu\text{m})$ との比 (w/z) が 7.0 以上 130 以下で含むフィルターを用いて、血液検体をフィルター処理して血液検体中の稀少細胞を分離又は検出することを含む、稀少細胞の分離又は検出方法に関する。

10

【0009】

本開示は、その他の一又は複数の実施形態において、短軸径が $5\ \mu\text{m}$ 以上 $8\ \mu\text{m}$ 以下であり、長軸径が $40\ \mu\text{m}$ 以上である孔を、孔密度が $40\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上 $2000\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下で、かつ長軸径 $w\ (\mu\text{m})$ と短軸径側の孔間の余白 $z\ (\mu\text{m})$ との比 (w/z) が 7.0 以上 130 以下で含むフィルターに関する。

【0010】

本開示は、その他の一又は複数の実施形態において、供給口と、排出口と、前記供給口と前記排出口を連通する流路と、分離部とを有し、前記分離部は、前記流路の一部に相当する位置に配置され、かつ上記のフィルターとフィルター保持部とを含む、検体中に含まれる稀少細胞を捕捉するための稀少細胞捕捉装置に関する。

20

【発明の効果】

【0011】

本開示によれば、一又は複数の実施形態において、血液検体中に稀少細胞が含まれている場合に、小型の稀少細胞と変形能の高い稀少細胞の双方効率よく簡便に捕捉できる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1A及びBはフィルターの写真を示し、図1Aは本開示のフィルター（孔形状がスリット形状）の一例であり、図1Bは比較例のフィルター（孔形状が楕円）の一例である。

30

【図2】図2は、本開示の稀少細胞捕捉装置の一例を示す。

【図3】図3は、実施例1の結果を示すグラフであり、図3は短軸径における小型の細胞のSW620の捕捉率の結果である。

【図4】図4は、実施例2の結果を示すグラフである。

【図5】図5は、実施例3の結果を示すグラフである。

【図6】図6は、実施例4の結果を示すグラフである。

【図7】図7A及びBは、実施例5の結果を示すグラフであり、図7Aは系全体のろ過圧 (P_1) が $0.4\ \text{kPa}$ の結果であり、図7Bは系全体のろ過圧 (P_1) が $1.3\ \text{kPa}$ の結果である。

40

【図8】図8は、実施例8の結果を示すグラフである。

【図9】図9は、実施例9の結果を示すグラフである。

【図10】図10は、実施例10の結果を示すグラフである。

【図11】図11は、実施例11の結果を示すグラフである。

【図12】図12は、実施例12の結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明者は、特許文献1～4及び非特許文献1～5の方法において、以下の問題を見出している。

非特許文献1に開示されているフィルターは、孔密度が不均一で、孔が連結し、細胞よりも大きな穴になっているものもあるため、細胞が抜けやすく高い捕捉率が得られないと

50

という問題がある。

特許文献1及び非特許文献2では、小型の細胞を捕捉する為に孔径を小さくすることで捕捉の向上を試みられているが、 $5\mu\text{m}$ 以下になると目詰まりが起きやすくなり、高い圧力による細胞へのダメージ、血球を減らすための溶血操作、フィルターのろ過サイズが大きくなるなど煩雑になるという問題がある。

特許文献2は、細胞の粘弾性の違いを利用して稀少細胞を分離することを開示する。しかし、特許文献2に記載された条件では、分離時の濾過膜の両側生じる差圧が 20kPa ~ 190kPa と高く、分離時に稀少細胞にダメージを与えることが懸念されるとともに、変形能の高い稀少細胞の捕捉が困難になるという問題がある。

特許文献3は、テーパ部、狭窄部及び逆テーパ部を備えるスリットフィルターを用いてCTCを捕捉することを開示する。

特許文献4及び非特許文献5には、スリット状の孔をもつフィルターでの稀少細胞の分離濃縮を記載している。しかしながら特許文献4及び非特許文献5に記載のフィルターでは、多くの血液を処理させつつ、変形能の大きい細胞と小型のがん細胞の捕捉の両立は困難であるという問題がある。特に特許文献4の実施例に記載されたフィルターでは、血液 $8\sim 10\text{ml}$ を処理する場合に、小型のがん細胞や変形能の大きいがん細胞の捕捉率は低下し、多くの血液量を処理できない課題がある。

【0014】

本開示は、フィルターの孔径を小さくすると変形能の高い細胞の捕捉が難しく、また、変形能の高い細胞の捕捉率に合わせて孔径を大きくすると小型の細胞が抜けやすくなり、さらに、真円孔のフィルターでは小型と変形能の高いがん細胞の両立は困難である、との知見に基づく。本開示は、一又は複数の実施形態において、短軸径が $5\mu\text{m}$ 以上 $8\mu\text{m}$ 以下であり、長軸径が $40\mu\text{m}$ 以上である孔を、孔密度が $40\text{個}/\text{mm}^2$ 以上 $2000\text{個}/\text{mm}^2$ 以下で、かつ、長軸径 $w(\mu\text{m})$ と短軸径側の孔間の余白 $z(\mu\text{m})$ との比 (w/z) が 7.0 以上 130 以下で含むフィルターを用いて血液検体のフィルター処理を行うことにより、血液検体中に含まれうる小型の稀少細胞と変形能の高い稀少細胞との双方を効率よく簡便に捕捉することができる、との知見に基づく。本開示は、一又は複数の実施形態において、上記のフィルターを用いて血液検体のフィルター処理を行うことにより、フィルター処理時における濾過圧力条件(系全体における濾過圧力又はフィルター処理する際のフィルター上面と下面との圧力差)を低くすることができ、その結果、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上でき、好ましくは細胞捕捉時に細胞に与えるダメージを低減でき、生きたままの状態で稀少細胞の回収が可能になりうる、との知見に基づく。本開示は、一又は複数の実施形態において、上記のフィルターを用いて血液検体のフィルター処理を行うことにより、例えば、特にフィルターの孔1個当たりに対するフィルター処理容量が多い場合に、楕円孔や真円孔のフィルターと比較して、検体間差による稀少細胞の捕捉率のばらつきを低減でき、好ましくはヘマトクリットや白血球の濃度が高濃度の検体であっても高い捕捉率で稀少細胞を捕捉できる、との知見に基づく。本開示は、一又は複数の実施形態において、 $8\sim 10\text{ml}$ 程度の多量の血液を処理する場合に、稀少細胞の捕捉率が低下することがあるが、上記の本開示のフィルターを用い、かつ、フィルターの孔1個当たりに対するフィルター処理容量が、フィルターの孔面積当たりの処理容量に換算して $0.1\text{nl}/\mu\text{m}^2$ 以上 $3\text{nl}/\mu\text{m}^2$ 以下となるように血液検体をフィルター処理することにより、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上できる、との知見に基づく。ここで「孔1個当たりに対するフィルター処理容量」は、1個の孔によって処理可能な血液検体の量をいう。

【0015】

本開示の方法は、フィルターを用いた方法であるため、一又は複数の実施形態において、フィルターに捕捉された血球成分及びCTC等といった細胞を判別するために、例えば、細胞の染色及び洗浄等を容易に行うことができ、またフィルターに捕捉された細胞を容易に観察することができる。フィルター上で細胞の染色及び洗浄や、細胞の観察を行う場合、ろ過面積が大きくなると、試薬量及び洗浄量並びに観察範囲が増大して煩雑となるこ

10

20

30

40

50

とから、ろ過面積を抑えたフィルター又は容積を抑えたフィルターハウジングが望まれる。本開示の方法によれば、一又は複数の実施形態において、血液処理量に対しフィルターのろ過面積を抑えることができるという効果を奏しうる。

【0016】

[稀少細胞]

本開示において、血液中又は血液検体中に含まれる「稀少細胞」とは、ヒト又はヒト以外の動物の血液に含まれ得る細胞成分（赤血球、白血球、及び血小板）以外の細胞をいう。稀少細胞としては、一又は複数の実施形態において、腫瘍細胞及び/又はがん細胞が挙げられる。一般に血液中に循環する腫瘍細胞やがん細胞をCTCという。血液中の稀少細胞数としては、検体にもよるが血液10ml中に数個～数十個、多くて数百～千個含まれている場合がある。「稀少細胞」は、一又は複数の実施形態において、がん細胞、循環腫瘍細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、がん幹細胞、上皮細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胎児細胞、幹細胞及びこれらの組み合わせからなる群から選択される細胞である。

10

【0017】

[小型の稀少細胞]

本開示において「小型の稀少細胞」とは、稀少細胞の中でも径の小さい細胞をいい、一又は複数の実施形態において、直径約10µmの真円孔では抜けてしまう大きさの稀少細胞が挙げられる。

【0018】

[変形能の高い稀少細胞]

本開示において「変形能の高い稀少細胞」とは、細胞サイズが10µm以上であって、かつ、直径が5µm以上6.5µm以下の円形の孔を通り抜けることが可能な細胞をいう。変形能の高い稀少細胞としては、一又は複数の実施形態において、孔あたり血液検体処理量が14nl以上で、かつ孔あたり5nl/min以上20nl/min以下で、直径が5µm以上6.5µm以下の真円孔を備えるフィルターに、全血を送液した場合に、同程度のサイズの稀少細胞と比較して孔を抜けやすい（孔を通過する細胞の割合が多い）稀少細胞があげられる。変形能の高いがん細胞としては、一又は複数の実施形態において、SNU-1等があげられる。

20

【0019】

[血液検体]

本開示において「血液検体」とは、本開示の処理方法に適用されうる、血液を構成する成分を含有する試料を意味し、血液、赤血球成分を含む血液由来物、血液又は血液由来物が混在する体液や尿、及び、これらから調製された試料等が挙げられる。血液としては、生体から採取された血液が挙げられ、前記生体としては、ヒト又はヒト以外の動物（例えば、哺乳類）が挙げられる。赤血球成分を含む血液由来物としては、血液から分離又は調製されたものであって赤血球成分を含むもの又はそれらの希釈/濃縮物が挙げられ、例えば、血漿が除かれた血球画分や、血球濃縮物、血液又は血球の凍結乾燥物、全血を溶血処理し、赤血球の成分を除去した試料又は溶血試料、遠心分離血液、自然沈降血液、洗浄血球、特定の画分などを含む。これらの中でも、限定されない一又は複数の実施形態においては、簡便かつ迅速な処理の観点及び血液中の稀少細胞に対するダメージ抑制の観点から、前記血液を含む試料としては血液又は血球成分を含む血液由来の血球が好ましい。

30

40

本開示において、フィルターの孔1個あたりに通過させる血液検体の容量は、人体から採血された血液、すなわち、1µlあたり、1000～20000個の白血球細胞を含む血液を基準とする。よって、希釈した血液検体を使用する場合、当該希釈血液検体を白血球数に基づき希釈前の血液検体容量に換算できる。すなわち、例えば、10倍希釈の血液検体を処理する場合、「X」µl/孔の容量の前記希釈血液検体を処理することは、「X/10」µl/孔の容量の前記希釈前の血液検体を処理することに相当する。

【0020】

[血液検体の処理方法]

50

本開示は、一態様において、血液検体をフィルター処理することを含む方法（以下、「本開示にかかる処理方法」ともいう）に関する。

【0021】

<フィルター>

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理に使用するフィルターは、一又は複数の実施形態において、複数の貫通孔を有するスリット状のフィルターであって、各孔の短軸径が $5\ \mu\text{m}$ 以上 $8\ \mu\text{m}$ 以下であり、かつ長軸径が $40\ \mu\text{m}$ 以上である。フィルターに形成された複数の貫通孔は、一又は複数の実施形態において、その大きさが実質的に均一であることが好ましく、より好ましくは短軸径及び長軸径が実質的に同じである。短軸径が実質的に同じであるとしては、一又は複数の実施形態において、フィルターに含まれる貫通孔の短軸径が、下記の方法により得られた短軸径の平均値 $\pm 1\ \mu\text{m}$ 以内、 $\pm 0.5\ \mu\text{m}$ 以内、 $\pm 0.4\ \mu\text{m}$ 以内、 $\pm 0.3\ \mu\text{m}$ 以内又は $\pm 0.2\ \mu\text{m}$ 以内に含まれていることが挙げられる。また、長軸径が実質的に同じであるとしては、一又は複数の実施形態において、前記同様に得られた長軸径の平均値 $\pm 3\ \mu\text{m}$ 以内、 $\pm 2\ \mu\text{m}$ 以内、 $\pm 1\ \mu\text{m}$ 以内、 $\pm 0.5\ \mu\text{m}$ 以内、 $\pm 0.3\ \mu\text{m}$ 以内又は $\pm 0.2\ \mu\text{m}$ 以内に含まれていることが挙げられる。

10

【0022】

短軸径は、小型の稀少細胞の捕捉率を向上させる観点から、一又は複数の実施形態において、 $5\ \mu\text{m}$ 以上、 $5\ \mu\text{m}$ より大きい、 $5.5\ \mu\text{m}$ 以上、 $6\ \mu\text{m}$ 以上又は $6.5\ \mu\text{m}$ 以上であり、同様の観点から、 $8\ \mu\text{m}$ 以下、 $8\ \mu\text{m}$ 未満、 $7.5\ \mu\text{m}$ 以下、 $7\ \mu\text{m}$ 以下又は $6.5\ \mu\text{m}$ 以下である。短軸径が $5\ \mu\text{m}$ 以上であるため、変形能の高い稀少細胞の捕捉率を向上でき、また目詰まりを低減でき、その結果、高い捕捉率で稀少細胞を回収できる。本開示において「短軸径」とは、孔に外接する長方形の短辺（図1A参照）をいう。短軸径は、例えば、金属顕微鏡、レーザー顕微鏡などの市販の光学顕微鏡又は電子顕微鏡を用い、前記顕微鏡に付属するソフト、又は市販は画像解析ソフトにより公知の方法で測定し（50個以上）、その平均を求めることにより得ることができる。具体的には、実施例に記載の方法により求めることができる。

20

【0023】

長軸径は、変形能の高い稀少細胞の捕捉率を向上させる観点から、一又は複数の実施形態において、 $40\ \mu\text{m}$ 以上、 $50\ \mu\text{m}$ 以上、 $60\ \mu\text{m}$ 以上、 $70\ \mu\text{m}$ 以上、又は $80\ \mu\text{m}$ 以上であり、フィルターのたわみやよれ等の発生を抑制し、稀少細胞の捕捉率を向上させる観点から、 $5000\ \mu\text{m}$ 以下、 $4000\ \mu\text{m}$ 以下、 $3000\ \mu\text{m}$ 以下、 $2000\ \mu\text{m}$ 以下、 $1000\ \mu\text{m}$ 以下、 $970\ \mu\text{m}$ 以下、 $900\ \mu\text{m}$ 以下、 $800\ \mu\text{m}$ 以下、 $700\ \mu\text{m}$ 以下、 $600\ \mu\text{m}$ 以下、 $500\ \mu\text{m}$ 以下、 $400\ \mu\text{m}$ 以下、 $300\ \mu\text{m}$ 以下、 $200\ \mu\text{m}$ 以下、 $150\ \mu\text{m}$ 以下、 $120\ \mu\text{m}$ 以下、 $100\ \mu\text{m}$ 以下、 $90\ \mu\text{m}$ 以下又は $80\ \mu\text{m}$ 以下である。本開示において「長軸径」とは、孔に外接する長方形の長辺をいう（図1A参照）。長軸径は、例えば、金属顕微鏡、レーザー顕微鏡などの市販の光学顕微鏡又は電子顕微鏡を用い、前記顕微鏡に付属するソフト、又は市販は画像解析ソフトにより公知の方法で測定し（50個以上）、その平均を求めることにより得ることができる。具体的には、実施例に記載の方法により求めることができる。

30

40

【0024】

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理に使用するフィルターは、上記の短軸径及び長軸径を有する孔を、 $40\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上 $2000\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下の孔密度で含む。孔密度（ $1\ \text{mm}^2$ あたりの孔数）は、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上する観点、及び濾過面積抑制の観点から、 $45\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $60\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $70\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $90\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $200\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $300\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $400\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $500\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上、 $600\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上又は $700\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上であり、同様の観点から、 $1500\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下、 $1000\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下、 $900\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下又は $800\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下である。孔密度は、公知の方法で測定できる。例えば市販の光学顕微鏡で対物レンズ10倍～100倍を用いて撮影した画像を前記顕微鏡に付属す

50

るソフト、または市販は画像解析ソフトを用い画像から算出できる。

フィルターのろ過面に含まれる孔の総数は、ろ過面積を孔の中心間のピッチで除算することにより求めることができる。また、その他には、孔密度にろ過面積を乗算することにより求めることができる。具体的には、実施例に記載の方法により求めることができる。

【0025】

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理に使用するフィルターにおいて、上記の短軸径及び長軸径を有する孔は、長軸径 w (μm)と短軸径側の孔間の余白 z (μm)との比(w/z)が7.0以上130以下となるように形成されている。 w/z は、小型の稀少細胞と変形能の高い稀少細胞との双方の捕捉率を向上する観点、及び検体間差のばらつきを低減できる観点から、7.3以上、7.3を超え、7.5以上、8.0以上、8.5以上、9.0以上又は10以上であり、フィルターのたわみやよれ等の発生を抑制し、稀少細胞の捕捉率を向上させる観点から、130以下、129以下、120以下、100以下、90以下、80以下又は70以下である。

10

【0026】

本開示において「短軸径側の孔間の余白(z)」とは、短軸径方向に隣接する孔それぞれに外接する長方形同士を結ぶ直線の中で最も短いものをいう。短軸径側の孔間の余白(z)は小型の稀少細胞と変形能の高い稀少細胞との双方の捕捉率を向上する観点、及び検体間差のばらつきを低減できる観点から、60 μm 以下、50 μm 以下、40 μm 以下、30 μm 以下、20 μm 以下、10 μm 以下であり、フィルターのたわみやよれ等の発生を抑制し、稀少細胞の捕捉率を向上させる観点から、4 μm 以上、5 μm 以上、6 μm 以上、7 μm 以上、7.5 μm 以上、8 μm 以上、9 μm 以上、10 μm 以上である。

20

短軸径側の孔間の余白(z)は、例えば、市販の金属顕微鏡、レーザー顕微鏡などの光学顕微鏡や電子顕微鏡などに付属する、または市販の画像解析ソフトにより公知の方法で画像を解析、測定し(50個以上)、その平均を求めることにより得ることができる。具体的には、実施例に記載の方法により求めることができる。

【0027】

フィルター処理に使用するフィルターにおける孔1個の面積は、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上する観点、及びろ過面積抑制の観点から、一又は複数の実施形態において、200 μm^2 以上7000 μm^2 以下である。孔1個の面積は、同様の観点から、250 μm^2 以上、260 μm^2 以上、300 μm^2 以上、350 μm^2 以上、390 μm^2 以上、400 μm^2 以上、500 μm^2 以上、又は550 μm^2 以上であり、同様の観点から、6800 μm^2 以下、6500 μm^2 以下、6300 μm^2 以下又は6000 μm^2 以下である。

30

【0028】

フィルターの開口率は、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上する観点及びろ過面積抑制の観点から、一又は複数の実施形態において、10%以上60%以下である。ここで「開口率」は、フィルター表面積に対する孔が形成された表面積の割合をいう。フィルターの開口率は同様の観点から、15%以上、20%以上、25%以上、30%以上、31%以上、35%以上又は40%以上であり、同様の観点から、55%以下又は45%以下である。開口率は、公知の方法で測定できる。例えば市販の光学顕微鏡で対物レンズ10倍~100倍を用いて撮影した画像を、前記顕微鏡に付属するソフト、または市販は画像解析ソフトを用い画像から求めることができる。

40

【0029】

フィルターの厚みは、小型の稀少細胞と変形能の高い稀少細胞との双方の捕捉率を向上する観点から、一又は複数の実施形態において、1 μm 以上100 μm 以下である。フィルターの厚みは、フィルターの目詰まりを低減しつつ、稀少細胞の捕捉率を向上させる観点から、60 μm 以下、50 μm 以下、40 μm 以下、30 μm 以下、20 μm 以下、15 μm 以下又は10 μm 以下であり、同様の観点から2 μm 以上、3 μm 以上、4 μm 以上、5 μm 以上である。

【0030】

50

フィルターの材質としては、特に制限されないが、一又は複数の実施形態において、主成分がポリカーボネート（PC）、パリレンメンブレンフィルター、ヤング率1GPa以上のプラスチック素材、ニッケル（Ni）、SUS、金、銀、銅、アルミニウム、タングステン、クロム等の金属、又はガラス素材が挙げられる。またフィルター上での細胞を観察する際は、観察する際に使用する色素や蛍光染色などに応じてプラスチック、金属、ガラス素材を選択することが望ましく、これらの組合せから成るものであってもよい。

【0031】

本開示にかかる処理方法に使用するフィルターは、フィルターを作製するための従来公知の方法、例えば、エッチング、電鍍加工、レーザー加工、スパッタリング加工等を用いて作製できる。フィルターは、孔が全面又は部分的にパターニングされたシートから、目的に応じて適切にサイズを切り出すことで作製してもよい。1枚のフィルターを鋳造で製造してもよい。

10

【0032】

<フィルター処理条件>

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理は、一又は複数の実施形態において、上述したフィルターを流路内に組み込み、流路に血液検体を導入することによりCTC等の稀少細胞を捕捉することができる。

【0033】

本開示にかかる処理方法は、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上させる観点から、フィルターの孔1個当たりに対するフィルター処理容量が、フィルターの孔の単位面積あたりの処理容量に換算して $0.1 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以上 $3.0 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以下となるように血液検体をフィルター処理することを含む。フィルターの孔の単位面積あたりに対するフィルター処理容量は、濾過面積を抑える観点から、 $0.1 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以上又は $0.2 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以上であり、変形能の高いがん細胞を捕捉する観点から、 $2.5 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以下、 $2 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以下、 $1.5 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以下又は $1 \text{ n l} / \mu \text{ m}^2$ 以下である。

20

【0034】

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理の濾過圧力（ P_1 ）は、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上させる観点、及びフィルター処理時に捕捉する細胞に与えるダメージを低減する観点から、 0.1 k P a 以上 2.6 k P a 以下である。濾過圧力は、同様の観点から、 0.1 k P a 以上又は 0.2 k P a 以上であり、同様の観点から、 2.0 k P a 以下、 1.5 k P a 以下、 1.3 k P a 以下、 1.0 k P a 又は 0.5 k P a 以下である。本開示における「フィルター処理の濾過圧力」とは、系の入口から出口までの系全体の圧力差をいい、例えば、血液検体を配置したタンクから廃液タンクまでを含む流路を含めた系の圧力差をいう。このため流路構造によっては記載以上の圧力であってもよい。フィルター処理の濾過圧力（系の圧力差）は、公知の方法で市販の圧力計を用いて測定でき、又は流量と流路構造の関係から算出される。

30

【0035】

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理する際のフィルター上面と下面との圧力差（ P_2 ）は、変形能の高い稀少細胞の捕捉率をさらに向上させる観点、及びフィルター処理時に捕捉する細胞に与えるダメージを低減する観点から、一又は複数の実施形態において、 100 P a 以下である。 P_2 は、同様の観点から、一又は複数の実施形態において、 0.1 P a 以上又は 1 P a 以上であり、同様の観点から、 70 P a 以下、 50 P a 以下、 30 P a 以下、 15 P a 以下又は 10 P a 以下である。本開示における「フィルター上面と下面との圧力差（ P_2 ）」とは、フィルターを境に上下で生じる圧力差をいう（図2参照）。圧力差は、周知の計算式から算出できる。スリットフィルターの圧力差の算出方法としては、 Q ：全孔合算平均流量、 h ：短軸径、 w ：長軸径、 L ：孔の流路長、 η ：送液する液体の粘性、 N_0 ：孔数として、 $P_2 = Q / N_0 \times 12 L / \{ (1 - 0.63) (h / w) \} \times (1 / h^3 w)$ で求められる。血液は非ニュートン性液体であり、また系が同じ圧力差であっても、ヘマトクリット（Hct）の違いによる粘性によって平均流速が変わる。このため平均流速は一定の範囲をもつ。全血を使用する際の圧力差の

40

50

P_2 設定においては、便宜上 $= 4 \cdot 5 \text{ mPa} \cdot \text{S}$ を用いて、計算上前記 P_2 に入るように送液や圧力の設定をすればよい。希釈等で血液検体のヘマトクリット値(Hct)が20未満の場合、 $= 1 \sim 2 \text{ mPa} \cdot \text{S}$ の値を用いて計算上前記 P_2 に入るようにすれば設定すればよい。もしくは血漿やHctによる粘性影響が小さくなるまで希釈する場合(たとえば全血を4~10倍希釈する場合)は、その希釈液の粘性に合わせて計算し送液してもよい。シリンジポンプ等を用いて定流量送液をする場合は、前記 P_2 に入るように送液すればよい。このような送液条件は、当業者に周知の一定の圧で送液可能な機構や、一定流量で送液可能な機構を用いて実現できる。

【0036】

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理におけるろ過面積は、特に限定されるものではない。ろ過面積は、一又は複数の実施形態において、孔数(孔面積)と血液の処理量によって設定できる。ろ過面積を抑制しフィルター処理後の染色操作・標識操作の試薬使用量を低減できる観点、観察操作の点及び稀少細胞を効率よく捕捉する観点から、一又は複数の実施形態において、 5 mm^2 以上 200 mm^2 以下である。ろ過面積は、同様の観点から、 10 mm^2 以上であり、同様の観点から、 150 mm^2 以下、 100 mm^2 以下又は 80 mm^2 以下である。また、血液処理量に対しフィルターのろ過面積を抑える観点から、ろ過面積は、 100 mm^2 以下、 80 mm^2 以下、 50 mm^2 以下、 40 mm^2 以下、 30 mm^2 以下又は 25 mm^2 以下である。

【0037】

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理において流路への血液検体の送液は、特に規定はないが送液可能な駆動力があればよい。流路への血液検体の導入としては、一又は複数の実施形態において、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、シリンジポンプや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。流路への血液検体の導入のため、例えば、フィルターの孔(1個)あたり、 1 mm/min 以上 600 mm/min 以下の平均流速で血液検体を送液することで、従来例と比較して適切に稀少細胞を捕捉することが可能である。血液検体の送液条件は、一又は複数の実施形態において、 2 mm/min 以上 300 mm/min 以下の流速、 3 mm/min 以上 100 mm/min 以下の流速、 4 mm/min 以上 80 mm/min 以下の流速又は 4 mm/min 以上 40 mm/min 以下の流速である。また平均流量から換算して送液条件を設定してもよい。算出方法としては、単位時間あたりのろ過廃液出口の流量(全孔合算平均流量)又は単位量あたりの濾過時間を測定して平均流量を求め、これを孔数で割ることで、各孔あたりの平均流量が得られる。またその平均流量を孔面積で割ることで平均流速を求めることができる。そして前述した孔あたりの平均流速、又は平均流量の範囲に収まるように送液すればよい。一又は複数の実施形態において、ろ過廃液出口の流量(全孔合算平均流量)を全孔面積で割って算出してもよい。

【0038】

[血液検体中の稀少細胞の分離又は検出方法]

本開示にかかる処理方法におけるフィルター処理を行うことにより、血液検体をろ過した後のフィルター上に、稀少細胞(もし存在すれば)が残ることとなり、稀少細胞が分離又は検出できる。したがって、本開示は、その他の態様において、本開示にかかる処理方法で血液検体を処理して稀少細胞を分離又は検出することを含む、血液検体中の稀少細胞を分離又は検出する方法に関する。

【0039】

[血液中の稀少細胞に対する標識処理]

本開示にかかる処理方法において、血液中の稀少細胞に対する標識処理を行ってもよい。標識処理は、一又は複数の実施形態において、フィルター分離前や分離に並行して行ってもよいし、分離後に行ってもよい。稀少細胞の標識は、上述した本開示にかかる分離又は検出方法、及び、後述するCTC数測定方法に有用であり、また、分離後の稀少細胞の分析に有用となりうる。したがって、本開示にかかる処理方法は、一又は複数の実施形態において、標識処理を含む。また、稀少細胞の標識は、後述するCTC数測定方法に有用

10

20

30

40

50

であり、また、分離後の稀少細胞の分析に有用となりうる。したがって、本開示にかかる分離又は検出方法は、一又は複数の実施形態において、標識処理を含む。

【0040】

標識処理は、一又は複数の実施形態において、公知の標識試薬を稀少細胞に接触することにより行うことができ、典型的には、前記標識試薬を血液検体と混合することにより行うことができる。標識としては、特に限定されないが、一又は複数の実施形態において、放射性標識、蛍光色素標識、色素染色又は標識、磁氣的標識、電荷的標識、及びこれらの組み合わせが挙げられ、それぞれに適した標識試薬により行うことができる。

【0041】

すなわち、標識処理は、稀少細胞について、放射性物質を利用した検出方法、発光現象を利用した検出方法、色素を用いた検出方法、磁性を利用した検出方法、電気的検出方法、光学的検出方法、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される検出方法に使用可能な標識方法を用いて行うことができる。

10

【0042】

本開示における処理方法において、稀少細胞の分離又は検出は、また、前記フィルターの変化を電気的、重量的、光学的に検出することでも達成できる。

【0043】

[血液検体中の稀少細胞の分析方法]

本開示は、その他の態様において、本開示にかかる分離又は検出方法で稀少細胞を分離又は検出した後、該細胞の動態の観察若しくは活性測定を含む方法で分析すること又は該細胞の遺伝子分析することを含む、血液検体中の稀少細胞の分析方法に關しうる。すなわち、本開示によれば、細胞を生きたまま捕捉できるため、本開示にかかる分離又は検出方法で稀少細胞を分離又は検出した後、該細胞の動態の観察若しくは活性測定を含む方法で分析すること又は該細胞の遺伝子分析することが可能である。また分離後に回収し、培養も可能である。これら以外に目的の細胞に対し、フィルター上で遺伝子を分析してもよいし、又はフィルターから目的の細胞を回収して遺伝子を分析してもよい。たとえば染色体の解析や一塩基変異の解析などがあり、公知の技術を利用して遺伝子を分析できる。

20

【0044】

[CTC数測定方法]

血液中のCTC数と、がんの転移や予後に関係することが報告されており、がんの診断、予後診断、及び治療効果の予測又は判定の指標とするために研究が進められ、血中CTC数を測定することが知られている。本開示にかかる処理方法及び/又は本開示にかかる分離又は検出方法によれば、稀少細胞であるCTCへのダメージを抑制して分離することができる。したがって、本開示はその他の態様において、血液検体を本開示にかかる処理方法で処理して稀少細胞を分離又は検出すること、及び/又は、本開示にかかる分離又は検出方法により前記血液検体からCTCを分離することを含む、前記血液検体中のCTC数の測定方法に關する。なお、CTC数の計測又はCTCの核酸の測定は、例えば、がん細胞の形態学的観点からの測定や、適切な標識処理をした後にフローサイトメトリーにより分離と同時に進めてもよいし、分離した細胞を顕微鏡下で観察して測定してもよい。

30

【0045】

[フィルター]

本開示は、さらにその他の態様において、本開示にかかる処理方法、本開示にかかる分離又は検出方法、及び/又は本開示にかかるCTC数測定方法に用いるフィルターであって、短軸径が5 μm 以上8 μm 以下であり、長軸径が40 μm 以上である孔を、孔密度が40個/ mm^2 以上2000個/ mm^2 以下で、かつ長軸径 w (μm)と短軸径側の孔間の余白 z (μm)との比(w/z)が7.0以上130以下で含むフィルターに關する。本開示にかかるフィルターの孔の形状等は、上述した本開示にかかる処理方法に用いられるフィルターと同様である。

40

【0046】

[稀少細胞捕捉装置]

50

本開示は、さらにその他の態様において、検体中に含まれる稀少細胞を捕捉するための稀少細胞捕捉装置に関する。本開示にかかる稀少細胞捕捉装置は、一又は複数の実施形態において、供給口と、排出口と、前記供給口と前記排出口を連通する流路と、分離部とを有し、前記分離部は、前記流路の一部に相当する位置に配置され、かつ本開示のフィルターとフィルター保持部を含む。本開示にかかる稀少細胞捕捉装置によれば、本開示にかかるフィルターを用いて本開示にかかる血液検体の処理方法を行うことができる。

【0047】

本開示にかかる稀少細胞捕捉装置の一例を図2に示す。図2に示す稀少細胞捕捉装置は、検体や洗浄液、染色液等をフィルターに供給するための供給口1、排出口2、供給口1と排出口2とを連通する流路3、及び流路3の一部に相当する位置に配置された分離部を有する。分離部は、フィルター4とフィルター4を保持するフィルターホルダー5を含む。フィルターホルダー5は、フィルター4を設置可能な支持部(ベース)6、フィルター4を固定するOリング7及びカバー8により構成される。支持部(ベース)6にフィルター4を設置し、フィルター4の上面にOリング7及びカバー8を載せ、フィルター4を固定することにより、孔を有するフィルターを備える分離部(フィルターデバイス)が形成される。供給口1と分離部及び分離部と排出口2をつなぐ流路3は、分離部の両端にサイドチューブ(テルモ社製)を接続することにより形成される。供給口1と分離部をつなぐ流路3には、分離部の上部に接続部(図示せず)及び液の切り替えが可能な三方活栓(図示せず)を配置してもよい。また、供給口1と分離部とを接続する流路3には(一定の圧で送液可能な機構又は一定流量で送液可能な機構としての)加圧手段9を配置して

10

20

【0048】

本開示にかかる稀少細胞の分離キット又は分離デバイスは、本開示のフィルターと、前記フィルターを保持する保持部とを含み、流路に対して着脱可能に構成されている。一又は複数の実施形態において、本開示にかかる稀少細胞の分離キット又は分離デバイスは、稀少細胞捕捉装置に用いられる稀少細胞の分離キット又は分離デバイスであって、本開示のフィルターと、前記フィルターを保持する保持部と、接続部とを備え、前記接続部は、前記保持部と前記稀少細胞捕捉装置の流路とを接続可能であり、前記稀少細胞捕捉装置からの血液検体を前記保持部及び前記フィルターに流通可能であり、前記分離キット又は分離デバイスは、前記稀少細胞捕捉装置に対して着脱可能に構成されている。よって、本開示にかかる稀少細胞捕捉装置の一又は複数の実施形態において、流路が、本開示にかかる稀少細胞の分離キット又は分離デバイスを着脱可能な接続部を備えていてもよい。図2の稀少細胞捕捉装置を例にとり説明すると、本態様の稀少細胞捕捉装置は、流路3における、加圧手段9と分離部との間、及び分離部と排出口2との間のそれぞれに接続部を備え、接続部によって分離部が流路3から着脱可能である。なお、このように流路3に対して着脱可能に形成された分離部は、本開示にかかる稀少細胞の分離キット又は分離デバイスの一例である。ただし、本開示の稀少細胞の分離キット又は分離デバイスは、このような構成に限定されない。

30

【0049】

本開示は、以下の一又は複数の実施形態に關しうる。

〔1〕 血液検体をフィルターを用いてフィルター処理して血液検体中の稀少細胞を分離又は検出することを含み、

前記フィルターは、短軸径が $5\ \mu\text{m}$ 以上 $8\ \mu\text{m}$ 以下であり、長軸径が $40\ \mu\text{m}$ 以上である孔を、孔密度が $40\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以上 $2000\ \text{個}/\text{mm}^2$ 以下で、かつ、長軸径 $w\ (\mu\text{m})$ と短軸径側の孔間の余白 $z\ (\mu\text{m})$ との比 (w/z) が 7.0 以上 130 以下で含む、稀少細胞の分離又は検出方法。

〔2〕 フィルターの孔1個当たりに対するフィルター処理容量が、フィルターの孔面積当たりの処理容量に換算して $0.1\ \text{n l}/\mu\text{m}^2$ 以上 $3\ \text{n l}/\mu\text{m}^2$ 以下となるように血液検体をフィルター処理する、〔1〕記載の方法。

40

50

〔 3 〕 前記フィルターの開口率が、10%以上60%以下である、〔 1 〕又は〔 2 〕に記載の方法。

〔 4 〕 前記フィルター処理における濾過圧力は、0.1kPa以上2.6kPa以下である、〔 1 〕から〔 3 〕のいずれかに記載の方法。

〔 5 〕 前記フィルター処理する際のフィルター上面と下面との圧力差が、100Pa以下である、〔 1 〕から〔 4 〕のいずれかに記載の方法。

〔 6 〕 前記血液検体を、前記フィルターの孔あたり1mm/min以上600mm/min以下の平均流速で前記フィルターに送液することを含む、〔 1 〕から〔 5 〕のいずれかに記載の方法。

〔 7 〕 前記稀少細胞が、がん細胞、循環腫瘍細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、がん幹細胞、上皮細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、胎児細胞、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される細胞である、〔 1 〕から〔 6 〕のいずれかに記載の方法。

〔 8 〕 〔 1 〕から〔 7 〕のいずれかに記載の方法で稀少細胞を分離又は検出した後、該細胞の動態の観察若しくは活性測定を含む方法で分析すること又は該細胞の遺伝子分析することを含む、血液検体中の稀少細胞の分析方法。

〔 9 〕 〔 1 〕から〔 7 〕のいずれかに記載の方法に使用する、短軸径が5 μ m以上8 μ m以下であり、長軸径が40 μ m以上である孔を、孔密度が40個/mm²以上2000個/mm²以下で、かつ長軸径w(μ m)と短軸径側の孔間の余白z(μ m)との比(w/z)が7.0以上130以下で含むフィルター。

〔 10 〕 供給口と、排出口と、前記供給口と前記排出口を連通する流路と、分離部とを有し、前記分離部は、前記流路の一部に相当する位置に配置され、かつ〔 9 〕記載のフィルターと前記フィルターの保持部とを含む、検体中に含まれる稀少細胞を捕捉するための稀少細胞捕捉装置。

〔 11 〕 〔 9 〕記載のフィルターと、前記フィルターを保持する保持部と、を含み、流路に対して着脱可能な、稀少細胞の分離キット又は分離デバイス。

〔 12 〕 稀少細胞捕捉装置に用いられる稀少細胞の分離キット又は分離デバイスであって、〔 9 〕のフィルターと、前記フィルターを保持する保持部と、接続部とを備え、前記接続部は、前記保持部と前記稀少細胞捕捉装置の流路とを接続可能であり、前記稀少細胞捕捉装置からの血液検体を前記保持部及び前記フィルターに流通可能であり、前記分離キット又は分離デバイスは、前記稀少細胞捕捉装置に対して着脱可能に構成されている、

〔 13 〕 前記稀少細胞捕捉装置は、〔 10 〕記載の稀少細胞捕捉装置である、〔 12 〕記載の分離又は分離デバイス。

【実施例】

【0050】

以下に、実施例及び比較例を用いて本開示をさらに説明するが、これらは例示的なものであって、本開示は以下の実施例に限定して解釈されるものではない。

【0051】

(フィルターの作製)

表1に示す各種フィルターを作製した。#3~14のフィルターの孔の形状は図1Aに示すスリット状であり、#2のフィルターの孔の形状は図1Bに示す形状である。表1におけるwは孔の長軸径(μ m)であり、zは短軸径側の孔間の余白(μ m)である(図1A参照)。

【0052】

10

20

30

40

【表1】

(表1)

(表1)	フィルター										
	フィルター #	孔の 形状	短径(μm) \times 長径(μm)	孔面積 (μm^2)	w/z	孔の中心間の ピッチ (短径側 \times 長径側)	孔密度 (個/ mm^2)	開口率 (%)	膜厚 (μm)	材質	ろ過面積 mm^2
1	円	6.5x6.5	33	0.9	14X19	3759	12	5	ニッケル (金属)	20	73816
2	楕円	6.5 \times 9.8	50	1.3	14X19	3759	19	5	ニッケル (金属)	20	73816
3	スリット	5x88	440	9.8	14X100	714	31	5	ニッケル (金属)	20	14025
4	スリット	6.5x88	572	7.3	18.5X100	541	31	5	ニッケル (金属)	20	10613
5	スリット	8x88	704	6.1	22.5X100	444	31	5	ニッケル (金属)	20	8727
6	スリット	6.5x40	260	5.3	16X52	1202	31	5	ニッケル (金属)	20	23600
7	スリット	6.5x200	1300	15.4	19.5X212	242	31	5	ニッケル (金属)	20	4750
8	スリット	6.5x500	3250	35.7	20.5X512	95	31	5	ニッケル (金属)	20	1871
9	スリット	6.5x88	572	11.7	14X100	714	41	5	ニッケル (金属)	20	14025
10	スリット	6.5x968	6292	129.1	14 \times 1133	63	41	5	ニッケル (金属)	20	1238
11	スリット	6.5 \times 88	572	11.7	14 \times 100	714	41	5	ニッケル (金属)	79	56100
12	スリット	6.5 \times 88	572	11.7	14 \times 130	549	31	5	ニッケル (金属)	20	10788
13	スリット	6.5 \times 88	572	11.7	14 \times 100	714	41	3	ニッケル (金属)	79	56100
14	スリット	6.5 \times 88	572	11.7	14 \times 100	714	41	15	ニッケル (金属)	79	56100

【0053】

フィルターの長軸径(w)及び短軸径は、市販のレーザー顕微鏡VK-8510(キーンズ)で対物レンズ10倍~100倍を用いて、フィルター中央部及び端(上、下、左、右)の孔を顕微鏡用のカメラで撮影し、その撮影した画像を顕微鏡付属するソフト又は市販の画像解析ソフトを用いて各孔に外接する長方形の長辺及び短辺を計測し(孔50個以上)、その平均を求めることにより得た。またレーザー顕微鏡以外に金属顕微鏡や倒立顕微鏡、マイクロスコープにおいても同様に測定でき、1 μm 以下も測定可能な倍率で撮影することが望ましい。

孔間の余白(z)は、市販の光学顕微鏡で対物レンズ10倍~100倍を用いてフィル

10

20

30

40

50

ターを撮影し、その撮影した画像から顕微鏡に付属するソフトを用いて、短軸径方向に隣接する孔の外接する長方形同士を結ぶ直線の中で最も短い長さを計測した(50箇所)。又は、孔間の余白は実質均一であるため、長軸径の長さの中間点の短軸径の長さを計測し(50箇所)、その平均を求めることにより得た。

総孔数は、市販の光学顕微鏡で対物レンズ10倍~100倍を用いてフィルターを撮影し、フィルターに含まれる孔の数を直接カウントした。もしくは、単位面積あたりの孔密度にろ過面積を乗算して総孔数を求めた。

孔密度は、各孔の中心間のピッチの長さを計測し、その平均値から1mm²あたりの孔数を計算により求めた。

【0054】

(小型のがん細胞試料の調製)

[SW620試料]

常法に従い、接着細胞であるヒト結腸癌(細胞株名 SW620)をシャーレで培養した後、培地を除去し、ついでPBS(-)を添加し洗浄して培地成分を除去後、トリプシン(インビトロジェン社)処理(37、3分)を行った。これに血清入り培地を加えて15ml遠沈管に回収した。これを遠心機(CR20F:日立)で遠心し、上清を除去した。再度血清入り培地に懸濁して回収した。調製したがん細胞懸濁液を培養液から回収した後、遠心機(CR20F/日立製)で1500rpm、室温(24)、3分間遠心した。上清を除去し、PBS(-)を添加して細胞を懸濁する。このPBS(-)に懸濁した細胞を、染色試薬Cell Tracker(インビトロジェン)を用いて蛍光染色した。Cell Trackerは、10mMとなるようにDMSOに溶解させた後、反応時の濃度が最終濃度0.5~0.25µMになるように細胞懸濁液に添加した。そして反応後、細胞懸濁液を遠心して上清を除去し、再度PBSに懸濁した。この操作を繰り返し行うことにより未反応液の除去と細胞の洗浄とを行った。その後細胞の懸濁液の濃度を任意の濃度(10³個/mL~5x10⁴個/mL程度)になるように培地またはPBS(-)を用いて懸濁した。

ついで、採血管(EDTA-2K)に採血した血液(白血球含有数3000~10000個/µl)の一部を濾過デバイスと連通する血液濾過用検体容器にいった後、染色したがん細胞懸濁液10µlを同血液濾過用検体容器内の血液に添加し、残りの血液を加えて混合して血液検体を調製した。SW620は径が13µm程度であるため、小さい細胞の

【0055】

(変形能の高いがん細胞試料の調製)

[SNU-1試料]

浮遊系であるヒト胃癌細胞株(細胞株名 SNU-1)は、トリプシン処理を行うことなく、15ml遠沈管に回収した。回収したがん細胞懸濁液を用いた以外は、SW620試料の調製と同様に、蛍光染色及び血液への添加を行い、血液検体を調製した。SNU-1の細胞径は16.8µmであるが、SW620に比べ、直径6.5µmの孔に対して容易に抜けやすかった。

[Colo320DM試料]

ヒト大腸癌(細胞株名 Colo320DM)は、浮遊細胞と一部接着している細胞があるため、浮遊している細胞は、15ml遠沈管に回収し、接着している細胞は、SW620と同様にトリプシン処理後、同遠沈管に回収した。回収したがん細胞懸濁液を用いた以外は、SW620試料の調製と同様に、蛍光染色及び血液への添加を行い、血液検体を調製した。Colo320DMの細胞径は14µmであるが、SW620に比べ、直径6.5µmの孔に対して容易に抜けやすかった。

以下の実施例及び比較例では、SNU-1及びColo320DMを変形して抜けやすい細胞(変形能の高い細胞)のモデルとして使用した。

【0056】

(比較例1)

フィルター# 1 (長軸径: 6.5 μm、短軸径: 6.5 μm、w/z: 0.9) を図 2 に示す稀少細胞捕捉装置に配置し、SW620 試料、SNU-1 試料及び Colo320DM 試料を用い、下記濾過条件で濾過を行い、細胞の分離回収を行った。濾過終了後、PBS(-) 等の buffer を P1 = 0.4 kPa で送液してフィルターの洗浄を行い、分離部の上で接続されている接続部をゆっくり取りはずし、フィルター上部にガラススライドをゆっくり乗せて、観察面を作製した。これを蛍光顕微鏡に設置し、フィルター上に残っている蛍光染色されたがん細胞を計数した。また別途、血液に添加した量と同量の前記がん細胞懸濁液をマイクロプレートウェルに添加し、蛍光顕微鏡でがん細胞数をカウントした。マイクロプレートウェル内の細胞数を分母とし、フィルター上に残ったものを分子として計算し捕捉率を算出した。その結果を下記表 2 に示す。

10

< 濾過条件 >

トータル血液検体処理量: 1 ml、4 ml、8 ml

系全体のろ過圧 (P1) 検体ろ過時: 1.3 kPa

【 0057 】

【表 2】

(表2)	トータル血液処理量	1ml	4ml	8ml
小型の細胞	SW620	100%	93%	101%
変形能の高い細胞	SNU1	56%	46%	29%
	Colo320DM	-	73%	37%

20

【 0058 】

特許文献 5 (特開 2011-163830 号公報) には、10 μm 径のサイズ選択マイクロキャピタレイを用いた場合、SW620 の平均回収率が 38% であることが開示されている。これに対し、直径が 6.5 μm の円形の孔を備えるフィルター# 1 によれば、90% を超える高い捕捉率で SW620 を捕捉できることがわかる。一方、SW620 よりも細胞径が大きいが変形能の高いがん細胞である SNU-1 及び Colo320DM は、SW620 よりも捕捉率が低かった。そして血液量処理量が増えると特に変形能の高い細胞の捕捉率がさらに低下することがわかる。直径が 6.5 μm の円形の孔を備えるフィルターでは変形能の高いがん細胞を十分に捕捉できないことが分かった。

30

フィルター 1 で両方の高捕捉率を維持するためにはさらに血液処理量をさらに減らすか、又はろ過面積を大きくすることが考えられる。その他にも孔密度を大きくする方法もあるが、フィルターの耐久性に影響を与えるため、望ましくない。

【 0059 】

(実施例 1)

小型のがん細胞の捕捉性能を確認するため、開口率と長軸径 (w) が同じで短軸径が異なるフィルター# 3、4 又は 5 を図 2 に示す稀少細胞捕捉装置に配置し、SW620 試料を用いて下記の濾過条件 1 又は 2 で濾過を行い細胞の分離回収を行い、SW620 の捕捉率を求めた。分離回収及び捕捉率の算出は比較例 1 と同様にした。その結果を図 3 に示す。なお、フィルター上下の圧力差 (P2) は、 $P_2 = Q / N_0 \times 12 L / \{ (1 - 0.63) (h / w) \} \times (1 / h^3 w)$ により、前述のとおり = 4.5 mPa として計算した。

40

< フィルター >

フィルター# 3 (短軸径: 5.0 μm、長軸径: 88 μm、w/z: 9.8)

フィルター# 4 (短軸径: 6.5 μm、長軸径: 88 μm、w/z: 7.3)

フィルター# 5 (短軸径: 8.0 μm、長軸径: 88 μm、w/z: 6.1)

< 濾過条件 >

【表 3】

	濾過条件1	濾過条件2
トータル血液検体処理量	2ml	8ml
系全体のろ過圧 ($\Delta P 1$)	1.3kPa	0.4kPa
トータル平均流量	1ml/min~ 1.3ml/min	0.09ml/min~ 0.13ml/min
孔の面積 $1\mu m^2$ あたりの処理量	0.33nl/ μm^2	1.3nl/ μm^2
フィルター上下の圧力差 (計算値) ($\Delta P 2$)	12Pa~40Pa	1Pa~4Pa
孔あたりの平均流速	160mm/min~ 220mm/min	14mm/min~ 22mm/min

10

【0060】

図3は孔の短軸径と小型の細胞(SW620)の捕捉率との関係を示すグラフである。図3に示すように、径が比較的小さい細胞であるSW620は、処理量が2mlの場合、いずれのフィルターでも80%を超える捕捉率で回収でき、中でも短軸径が $6.5\mu m$ のフィルター#4の捕捉率が最も高かった。一方で、処理量が8mlの場合、短軸径が $6.5\mu m$ のフィルター#4の捕捉率が最も高かったが、短軸径が $8\mu m$ であるフィルター#

20

5において捕捉率が80%を下ることが確認された。
変形しやすい細胞であるSNU-1を用いて同様の測定を行ったところ、短軸径 $5\mu m$ のフィルター#3の捕捉率が最も低かった(data not shown)。

【0061】

(実施例2)

短軸径及び開口率が同じであるフィルター#6、4、7又は8(開口率:31%)を使用し、下記の濾過条件とした以外は、実施例1と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。試料は、SNU-1試料を使用した。その結果を図4に示す。

<フィルター>

フィルター#6(短軸径: $6.5\mu m$ 、長軸径: $40\mu m$ 、w/z:5.3)フィルター#4(短軸径: $6.5\mu m$ 、長軸径: $88\mu m$ 、w/z:7.3)フィルター#7(短軸径: $6.5\mu m$ 、長軸径: $200\mu m$ 、w/z:15.4)フィルター#8(短軸径: $6.5\mu m$ 、長軸径: $500\mu m$ 、w/z:35.7)

30

<濾過条件>

【表4】

トータル血液検体処理量	4ml
系全体のろ過圧 ($\Delta P 1$)	0.4kPa
トータル平均流量	0.11ml/min ~ 0.16ml/min
孔の面積 $1\mu m^2$ あたりの処理量	0.7nl/ μm^2
フィルター上下の圧力差 (計算値) ($\Delta P 2$)	2Pa~3Pa
孔あたりの平均流速	18mm/min~26mm/min

40

【0062】

図4はw/zと捕捉率の関係を示すグラフである。図4に示す通り、w/zが7.0以上であるフィルターはいずれも80%を超える高い捕捉率でSNU-1を回収できた。ま

50

た、同じ開口率でも、 w/z の値が大きくなるほど高い捕捉率で回収できることが確認できた。また、フィルター処理時における系全体のろ過圧 ($P1$)は0.4kPa (フィルター上下の圧力差 ($P2$)の計算値: 2Pa ~ 3Pa)と低い圧力で回収できたことから、回収した稀少細胞へのダメージも低減できると考えられる。

【0063】

(実施例3)

短軸径と z (短軸径側の孔間の余白)が同じであるフィルター#9又は10(短軸径: 6.5 μ m、 z : 7.5 μ m)を使用し、濾過条件を下記3又は4とした以外は、実施例2と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図5に示す。なお、参考例として、孔の形状が円であるフィルター#1(短軸径側の孔間の余白(z)=7.5 μ m)及び孔の形状が楕円形であるフィルター#2(短軸径側の孔間の余白(z)=7.5 μ m)を用い、下記の参考濾過条件1又は2とした以外は同様に行った。

10

<フィルター>

- フィルター#1(短軸径: 6.5 μ m、長軸径: 6.5 μ m、 w/z : 0.9)
- フィルター#2(短軸径: 6.5 μ m、長軸径: 9.8 μ m、 w/z : 1.3)
- フィルター#9(短軸径: 6.5 μ m、長軸径: 88 μ m、 w/z : 11.7)
- フィルター#10(短軸径: 6.5 μ m、長軸径: 968 μ m、 w/z : 129.1)

<濾過条件>

【表5】

	実施例		参考例	
	濾過条件3	濾過条件4	参考濾過条件1	参考濾過条件2
フィルターの種類	#9	#10	#1	#2
w/z	11.7	129.1	0.9	1.3
トータル血液検体処理量	8ml	8ml	8ml	8ml
系全体のろ過圧($\Delta P1$)	0.4kPa	0.4kPa	0.4kPa	0.4kPa
トータル平均流量	0.07ml/min~ 0.13ml/min	0.07ml/min~ 0.13ml/min	0.07ml/min~ 0.13ml/min	0.07ml/min~ 0.13ml/min
孔の面積1 μ m ² あたりの処理量	1nl/ μ m ²	1nl/ μ m ²	3.3nl/ μ m ²	2.2nl/ μ m ²
フィルター上下の圧力差(計算値)($\Delta P2$)	1Pa~2Pa	1Pa~2Pa	8Pa~15Pa	4Pa~8Pa
孔あたりの平均流速	11mm/min~ 17mm/min	11mm/min~ 17mm/min	27mm/min~ 54mm/min	24mm/min~ 36mm/min

20

30

【0064】

図5は w/z と捕捉率の関係を示すグラフである。図5に示す通り、フィルター#9及び10(w/z が7以上)はいずれも90%を超える高い捕捉率でSNU-1を回収できた。特に、フィルター#9(長軸径: 88 μ m、 w/z : 11.7)は、フィルター#10(長軸径: 968 μ m、 w/z : 129.1)と比較してたわみやよれの発生が低減され、100%近い捕捉率で回収できた。

40

【0065】

(実施例4)

短軸径及び長軸径(w)が同じであるフィルター#4又は9を使用し、濾過条件を下記5~8のいずれかとした以外は、実施例2と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図6に示す。

<フィルター>

- フィルター#4(短軸径: 6.5 μ m、長軸径: 88 μ m、 w/z : 7.3)
- フィルター#9(短軸径: 6.5 μ m、長軸径: 88 μ m、 w/z : 11.7)

<濾過条件>

50

【表 6】

	濾過条件5	濾過条件6	濾過条件7	濾過条件8
フィルターの種類	# 4		# 9	
w/z	7.3	7.3	11.7	11.7
トータル血液検体処理量	2ml	8ml	2ml	8ml
系全体のろ過圧 ($\Delta P 1$)	0.4kPa	0.4kPa	0.4kPa	0.4kPa
トータル平均流量	0.15ml/min ~0.25ml/min	0.07ml/min ~0.13ml/min	0.15ml/min ~0.25ml/min	0.07ml/min ~0.13ml/min
孔の面積 $1\mu m^2$ あたりの処理量	0.33nl/ μm^2	1.3nl/ μm^2	0.25nl/ μm^2	1nl/ μm^2
フィルター上下の圧力差 (計算値) ($\Delta P 2$)	2Pa~5Pa	1Pa~3Pa	2Pa~4Pa	1Pa~3Pa
孔あたりの平均流速	27mm/min ~41mm/min	11mm/min ~22mm/min	21mm/min ~31mm/min	11mm/min ~17mm/min

10

【0066】

図6はw/zと捕捉率の関係を示すグラフである。図6において白塗りのグラフがトータル血液検体処理量2ml(濾過条件5又は7)の結果を示すグラフであり、黒塗りのグラフがトータル血液検体処理量8ml(濾過条件6又は8)の結果を示すグラフである。図6に示す通り、w/zが7.3であるフィルター#4は、トータルの血液検体処理量を8mlとした場合に捕捉率の低下がみられたものの、2mlの場合は高い捕捉率が得られた。驚いたことにw/zが11.7であるフィルター#9は、トータルの血液検体処理量に関わらず100%に近い高い捕捉率でSNU-1を捕捉できた。

20

【0067】

開口率、短軸径、長軸径及びzのうち1つ又は2つを固定し、w/zを変動させた実施例1~4の結果から、w/zを7以上にすることによって、変形能の高い細胞の捕捉率を向上でき、さらには、トータル血液処理量を増加させた場合であっても捕捉率を向上できることが確認できた。

30

【0068】

(実施例5)

フィルター#9(短軸径:6.5 μm 、長軸径:88 μm 、w/z:11.7)を使用し、トータルの血液検体処理量を変化させた以外は、実施例2と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。濾過時の圧力は以下の通りとした。その結果を表7に示す。

<濾過条件>

系全体のろ過圧($P 1$):0.4kPa

【0069】

【表7】

(表7)

添加量 (トータル血液検体 処理量)	1ml	4ml	8ml	10ml	12ml	25ml
孔あたりの血液量 (nl)	71	285	570	713	856	1783
孔面積あたりの血液量 (nl/ μm^2)	0.1	0.5	1.0	1.2	1.5	3.1
捕捉率	-	92%	100%	90%	92%	72%

40

【0070】

表7に示す通り、いずれも70%を超える捕捉率でSNU-1を回収できた。また、孔

50

面積当たりの処理量を $0.1 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$ を超え $3.1 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$ 以下の範囲にすることにより、より高い捕捉率で SNU-1 を回収できることが確認できた。

【0071】

(実施例6)

フィルター#9又は10を使用し、トータル血液検体処理量を8mlとし、濾過条件を下記9~12のいずれかとした以外は、実施例2と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図7に示す。なお、参考例として、孔の形状が楕円形であるフィルター#2を用い、下記の参考濾過条件3又は4で同様に行った。

<フィルター>

フィルター#2 (短軸径: $6.5 \mu\text{m}$ 、長軸径: $9.8 \mu\text{m}$ 、w/z: 1.5)

フィルター#9 (短軸径: $6.5 \mu\text{m}$ 、長軸径: $88 \mu\text{m}$ 、w/z: 11.7)

フィルター#10 (短軸径: $6.5 \mu\text{m}$ 、長軸径: $968 \mu\text{m}$ 、w/z: 129.1)

<濾過条件>

【表8】

	参考例	実施例		参考例	実施例	
	参考濾過条件3	濾過条件9	濾過条件10	参考濾過条件4	濾過条件11	濾過条件12
フィルターの種類	#2	#9	#10	#2	#9	#10
w/z	1.3	11.7	129.1	1.3	11.7	129.1
トータル血液検体処理量	8ml	8ml	8ml	8ml	8ml	8ml
系全体のろ過圧 (ΔP_1)	0.4kPa	0.4kPa	0.4kPa	1.3kPa	1.3kPa	1.3kPa
トータル平均流量	0.07ml/min ~0.13ml/min	0.07ml/min ~0.13ml/min	0.07ml/min ~0.13ml/min	0.3ml/min ~0.6ml/min	0.3ml/min ~0.6ml/min	0.3ml/min ~0.6ml/min
孔の面積 $1 \mu\text{m}^2$ あたりの処理量	$2.2 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$	$1 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$	$1 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$	$2.2 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$	$1 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$	$1 \text{ nl} / \mu\text{m}^2$
フィルター上下の圧力差 (計算値) (ΔP_2)	4Pa~8Pa	1Pa~2Pa	1Pa~2Pa	40Pa ~60Pa	4Pa ~9Pa	4Pa ~9Pa
孔あたりの平均流速	18mm/min ~36mm/min	11mm/min ~17mm/min	11mm/min ~17mm/min	90mm/min ~170mm/min	40mm/min ~80mm/min	40mm/min ~80mm/min

【0072】

図7は、各フィルターの捕捉率のばらつきを示すグラフであって、図7Aは系全体のろ過圧が (P_1) が 0.4 kPa (濾過条件9及び10並びに参考濾過条件3) の結果を示し、図7Bは系全体のろ過圧が (P_1) が 1.3 kPa (濾過条件11及び12並びに参考濾過条件4) の結果を示す。図7A及びBに示すように、いずれの圧力条件でもフィルター#9及び10は、フィルター#2と比較して、ばらつきが小さく検体間差が小さいことが確認できた。特に、フィルター#9は、いずれの圧力条件でも、高い捕捉率を示すとともに、ばらつきが非常に小さいことが確認できた。

【0073】

SNU-1 試料に代えて SW620 試料を用いて、実施例2~6と同様の実験を行ったところ、いずれのフィルター及び条件においても90%近い又は90%以上の高い捕捉率でSW620を捕捉できた (data not shown)。

【0074】

(実施例7)

がん細胞試料として、SNU-1、SW620、Colo320DM、ヒト肺癌 (細胞株名 NCI-H1703)、ヒト肺癌 (細胞株名 A549)、ヒト肺癌 (細胞株名 NCI-H1975)、ヒト肺癌 (細胞株名 NCI-H69) 及びヒト肺癌 (細胞株名 HCI-H1603) を用い、細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。血液検体試料の調製は、上記の小型のがん細胞試料の調製と同様に行った。また凝集塊の多い細胞 (例え

ば、NCI-H69)については、細胞の計数にバラつきが生じるため、分散試薬FACSmax(Genlantis)とプロトコルに従い細胞を分散させた後、20 μ m孔のナイロンメッシュフィルター(ミリポア)でろ過面積13mmのフィルターを用い、分散せずに残った凝集塊を除いて濾液中の細胞懸濁液を用いた。フィルターは、ろ過面積が異なる以外は、短軸径、長軸径及びw/zが同じであるフィルター#9及び#11(w/z=11.7、長軸径=88 μ m、短軸径=6.5 μ m)を使用した。濾過条件は以下のとおりとした。その結果を下記表10及び11に示す。

<濾過条件>

【表9】

フィルターの種類	#9	#11
w/z	11.7	11.7
トータル血液検体処理量	8ml	8ml
系全体のろ過圧 (ΔP_1)	0.4kPa	定流量送液 (シリンジポンプ送液)
トータル平均流量	0.07ml/min ~0.13ml/min	0.25ml/min
孔の面積1 μ m ² あたりの処理量	1nl/ μ m ²	0.25nl/ μ m ²
フィルター上下の圧力差 (計算値)(ΔP_2)	1Pa~2Pa	1Pa
孔あたりの平均流速	11mm/min ~17mm/min	8mm/min

10

【0075】

【表10】

(表10) フィルター#9	肺がん				大腸がん		胃がん
	NCI-H1703	A549	NCI-H1975	NCI-H69	Colo320DM	SW620	SNU-1
細胞のサイズ	16.2 μ m	16.2 μ m	18.1 μ m	12.4 μ m	14 μ m	13 μ m	16.8 μ m
捕捉率	98.8%	96.5%	96.4%	87.7%	97.5%	95%	99.6%
SD	-	-	-	8%	12%	6%	7%

20

30

【表11】

(表11) フィルター#11	肺がん					大腸がん	胃がん
	NCI-H1703	A549	NCI-H1975	NCI-H69	NCI-H1650	SW620	SNU-1
細胞のサイズ	16.2 μ m	16.2 μ m	18.1 μ m	12.4 μ m	18.6 μ m	13 μ m	16.8 μ m
捕捉率	98%	103%	94%	95%	91%	95%	94%
SD	10%	3%	3%	3%	5%	6%	7%

40

【0076】

表10はフィルター#9(ろ過面積:20mm²)の捕捉率を示し、表11はフィルター#11(ろ過面積:79mm²)の捕捉率を示す。上記表10及び11に示すように、浮遊細胞及び接着細胞に関わらず多様な細胞を効率的に捕捉できた。また、ろ過面積に関わらず、多様な細胞を効率的に捕捉できた。

【0077】

(実施例8)

高Hct(Hct値が高い)検体を用いてがん細胞の捕捉を行った。

まず、高Hct試料の調製を行った。採血した血液を2本の15ml遠沈管にそれぞれ

50

分け、遠心機を用い1500×gで10分ほど遠心した。遠心後、分離した血漿の層を別途15mlの遠沈管にわけた。血球層のみになった2本の遠沈管うち、一本の遠沈管の赤血球層をもう一方の遠沈管に加え、ついでHct値が60以上になるように取り分けた血漿を加え高Hct血液検体を調製した。ついで、血液に代えて調製した高Hct血液検体を使用した以外は、上記のSNU-1試料と同様にして高Hct試料を調製した。なお、調製した高Hct血液試料のHct値は、血球計数測定装置SB-1440（アークレイ）を用いて求めた。

調製した高Hct試料（3種）及びフィルター#9又は11を使用し、濾過条件を下記13～15のいずれかとした以外は、実施例1と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図8に示す。

【表12】

	濾過条件13	濾過条件14	濾過条件15
Hct	62%	65%	63%
フィルターの種類	#9	#11	#11
w/z	11.7	11.7	11.7
トータル血液検体処理量	8ml	8ml	8ml
系全体のろ過圧 (ΔP_1)	0.4kPa	0.75kPa	シリンジポンプを用いた定流量送液
トータル平均流量	0.05ml/min	0.13ml/min	0.25ml/min
孔の面積 $1\mu m^2$ あたりの処理量	1nl/ μm^2	0.25nl/ μm^2	0.25nl/ μm^2
フィルター上下の圧力差 (計算値) (ΔP_2)	0.5Pa	0.6Pa	1Pa
孔あたりの平均流速	6mm/min	4mm/min	8mm/min

【0078】

図8に示すように、Hctが60%を超える高Hct試料であっても90%を超える又は90%に近い高い捕捉率でSNU-1を捕捉できた。

【0079】

(実施例9)

高白血球数（白血球数が多い）検体を用いてがん細胞の捕捉を行った。

まず、高白血球数試料の調製を行った。HetaSep（STEMCELL Technologies）を用いて分離回収した白血球を血液と混合し高白血球数の血液検体を調製した。ついで、血液に代えて調製した高白血球数の血液検体を使用した以外は、上記のSNU-1試料と同様にして高白血球数試料を調製した。なお、調製した高白血球数試料の白血球数は、血球計数測定装置SB-1440（アークレイ）を用いて求めた。

調製した高白血球数試料及びフィルター11を使用し、濾過条件を下記条件とした以外は、実施例1と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図9に示す。

< 濾過条件 >

10

20

30

40

【表 1 3】

白血球数	174x10 ² 個/μL
フィルターの種類	# 1 1
w/z	11.7
トータル血液検体処理量	8ml
系全体のろ過圧 (ΔP 1)	0.75kPa
トータル平均流量	0.4ml/min
孔の面積1μm ² あたりの処理量	0.25nl/μm ²
フィルター上下の圧力差 (計算値) (ΔP 2)	1.4Pa
孔あたりの平均流速	12mm/min

10

【 0 0 8 0 】

図 9 に示すように、白血球数が 1 0 , 0 0 0 個 / μ L を超える高白血球数試料であっても、8 0 % を超える高い捕捉率で S N U - 1 細胞を捕捉できた。

20

【 0 0 8 1 】

(比較例 2)

非特許文献 6 に記載されたフィルターと同様の孔配置のフィルター (短径 8 μ m × 長径 1 0 0 μ m 、 w / z = 6 . 7 、 ろ過面積 2 0 m m ²) を用い、 S W 6 2 0 試料、 S N U - 1 試料及び N C I - H 6 9 試料を用いて捕捉率の評価を行った。濾過条件は、各血液検体試料 8 m l を 0 . 4 k P a で送液し、実施例 1 と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。得られた捕捉率を下記表 1 4 に示す。また、同じ濾過条件でフィルター 9 を用いて捕捉実験を行った。その結果を合わせて下記表 1 4 に示す。

【 0 0 8 2 】

【表 1 4】

(表14)	大腸がん SW620	胃がん SNU-1	肺がん NCI-H69
比較例2のフィルター	75%	65%	46%
フィルター#9(実施例)	95%	98%	93%

30

【 0 0 8 3 】

上記表 1 4 に示すように、フィルター 9 (短軸径 : 6 . 5 μ m 、 長軸径 : 8 8 μ m 、 w / z : 1 1 . 7) は、9 割以上の捕捉率が得られ、非特許文献 6 に開示されたフィルターと比較して、大腸がん細胞、胃がん細胞及び肺がん細胞のいずれの細胞についても高い捕捉率を示した。したがって、フィルター 9 のような本開示のフィルターを用いることにより、非特許文献 6 のフィルターと比較して小型のがん細胞及び変形しやすい細胞の捕捉率の向上を実現できるといえる。

40

【 0 0 8 4 】

(実施例 1 0)

開口率、短軸径及び長軸径 (w) が同じであるフィルター # 4 又は 1 2 を使用し、 S W 6 2 0 試料及び S N U - 1 試料を用いて、下記濾過条件 1 6 とした以外は、実施例 1 と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図 1 0 に示す。

< フィルター >

50

フィルター# 4 (短軸径: $6.5 \mu\text{m}$ 、長軸径: $88 \mu\text{m}$ 、 w/z : 7.3)

フィルター# 12 (短軸径: $6.5 \mu\text{m}$ 、長軸径: $88 \mu\text{m}$ 、 w/z : 11.7)

< 濾過条件 >

【表 15】

	濾過条件16
トータル血液検体処理量	4ml
系全体のろ過圧 ($\Delta P 1$)	0.4kPa
トータル平均流量	0.11ml/min ~ 0.16ml/min
孔の面積 $1 \mu\text{m}^2$ あたりの処理量	0.7nl/ μm^2
フィルター上下の圧力差 (計算値) ($\Delta P 2$)	2Pa~3Pa
孔あたりの平均流速	18mm/min~26mm/min

10

【0085】

図10は w/z と捕捉率の関係を示すグラフである。図10において白塗りのグラフがSW620試料の結果を示すグラフであり、黒塗りのグラフがSNU-1試料の結果を示すグラフである。図10に示す通り、 w/z が7以上であればSW620及びSNU-1を80%以上の捕捉率で捕捉でき、特に w/z が11以上であれば90%を超える高い捕捉率でSW620及びSNU-1を捕捉できた。

20

【0086】

(実施例11)

フィルターの厚みが異なるフィルター#11、13又は14を使用し、SW620試料及びSNU-1試料を用いて、下記濾過条件17とした以外は、実施例1と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図11に示す。

<フィルター>

フィルター#11 (長軸径: $88 \mu\text{m}$ 、 w/z : 11.7 、厚み: $5 \mu\text{m}$)

フィルター#13 (長軸径: $88 \mu\text{m}$ 、 w/z : 11.7 、厚み: $3 \mu\text{m}$)

フィルター#14 (長軸径: $88 \mu\text{m}$ 、 w/z : 11.7 、厚み: $15 \mu\text{m}$)

< 濾過条件 >

【表 16】

	濾過条件17
w/z	11.7
トータル血液検体処理量	8ml
系全体のろ過圧 ($\Delta P 1$)	0.75kPa
トータル平均流量	0.25ml~0.5ml/min
孔の面積 $1 \mu\text{m}^2$ あたりの処理量	0.25nl/ μm^2
フィルター上下の圧力差 (計算値) ($\Delta P 2$)	1Pa~2Pa
孔あたりの平均流速	8mm/min~16mm/min

30

40

50

【 0 0 8 7 】

図 1 1 はフィルターの厚みと捕捉率の関係を示すグラフである。図 1 1 において白塗りのグラフが S W 6 2 0 試料の結果を示すグラフであり、黒塗りのグラフが S N U - 1 試料の結果を示すグラフである。図 1 1 に示す通り、いずれの厚みであっても 9 0 % を超える高い捕捉率で S W 6 2 0 及び S N U - 1 を捕捉できた。

【 0 0 8 8 】

(実施例 1 2)

フィルター # 9 を使用し、含まれる細胞の数が異なる複数の S N U - 1 試料を用いて、下記濾過条件 1 8 とした以外は、実施例 1 と同様にして細胞の捕捉及び捕捉率の算出を行った。その結果を図 1 2 に示す。

< 濾過条件 >

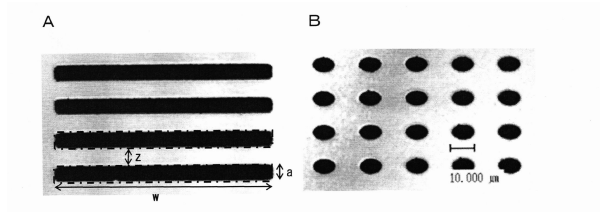
【 表 1 7 】

	濾過条件 18
w/z	11.7
トータル血液検体処理量	8ml
系全体のろ過圧 ($\Delta P 1$)	0.4kPa
トータル平均流量	0.07ml/min~ 0.13ml/min
孔の面積 $1 \mu m^2$ あたりの処理量	1nl/ μm^2
フィルター上下の圧力差 (計算値) ($\Delta P 2$)	1Pa~2Pa
孔あたりの平均流速	11mm/min~ 17mm/min

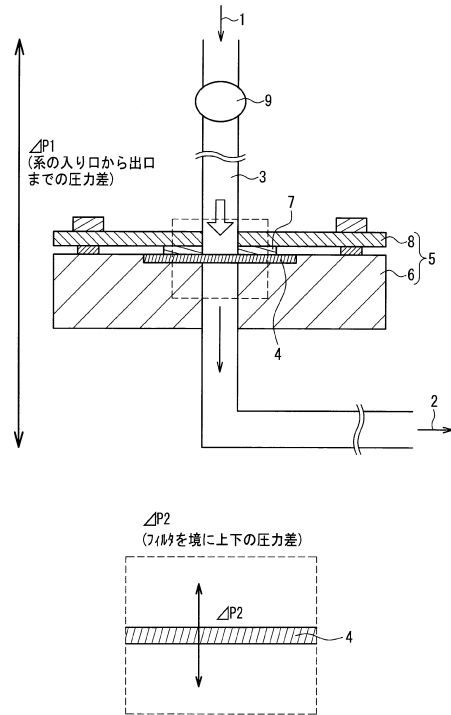
【 0 0 8 9 】

図 1 2 は、試料に含まれる細胞数と捕捉した細胞数との関係を示すグラフである。図 1 2 に示す通り、試料に含まれる細胞の数に関わらず、高い捕捉率で S N U - 1 細胞を捕捉できた。

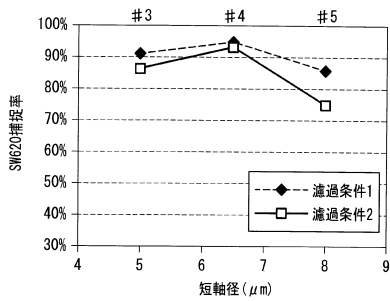
【図1】



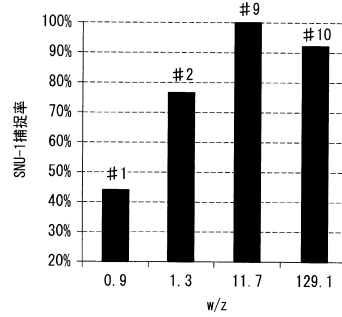
【図2】



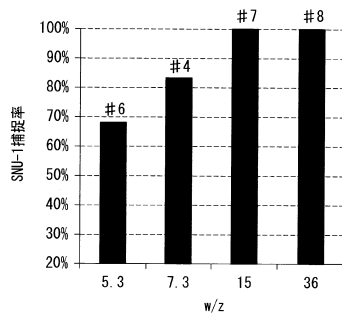
【図3】



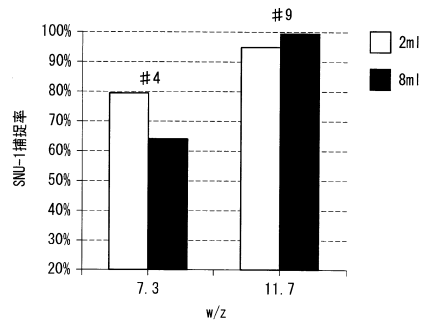
【図5】



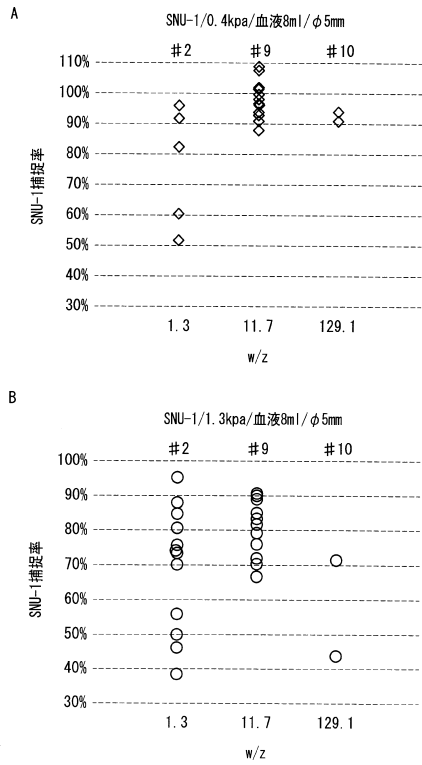
【図4】



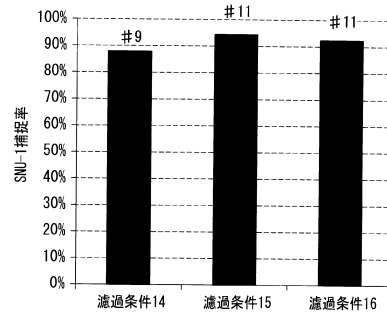
【図6】



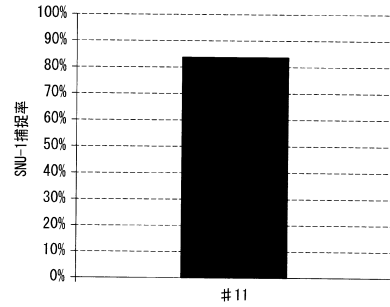
【図7】



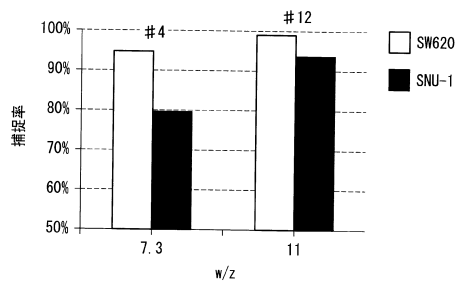
【図8】



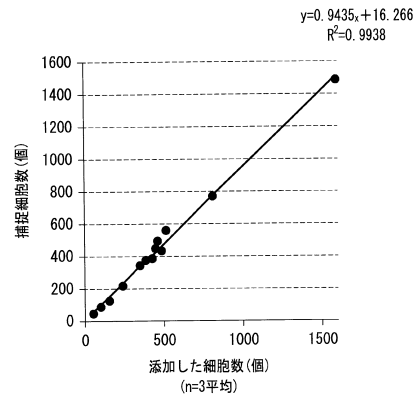
【図9】



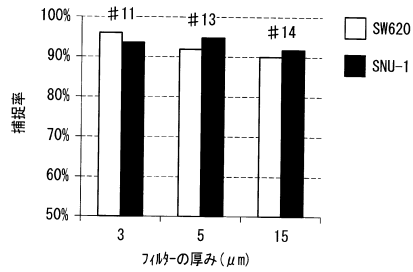
【図10】



【図12】



【図11】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
 C 1 2 M 1/34 (2006.01) C 1 2 N 5/09
 C 1 2 M 1/34 B

(56) 参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 7 8 0 9 7 (U S , A 1)
 特開 2 0 1 3 - 2 5 5 4 8 7 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 2 9 2 5 2 (U S , A 1)
 国際公開第 2 0 1 4 / 1 4 2 7 5 4 (W O , A 1)
 特開 2 0 1 3 - 0 4 2 6 8 9 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 0 8 2 1 0 (U S , A 1)
 中国特許出願公開第 1 0 3 4 6 8 5 6 8 (C N , A)
 特表 2 0 0 0 - 5 0 1 3 3 8 (J P , A)
 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 0 5 3 1 5 2 (U S , A 1)
 SAJAY, B.N.G. et al., Optimization of Breast Tumor Cells Isolation Efficiency and Purity by Membrane Filtration, International Scholarly and Scientific Research & Innovation, 2 0 1 2 年, Vol. 6, No. 9, pp. 451-454

(58) 調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8

G 0 1 N 1 / 0 0 - 1 / 4 4

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)

专利名称(译)	分离或检测稀有细胞的方法		
公开(公告)号	JP6619271B2	公开(公告)日	2019-12-11
申请号	JP2016057313	申请日	2016-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	爱科来株式会社		
申请(专利权)人(译)	ARKRAY公司		
当前申请(专利权)人(译)	ARKRAY公司		
[标]发明人	高木英紀		
发明人	▲高▼木 英紀		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N1/04 C12Q1/02 C12N5/09 C12M1/34		
CPC分类号	B01D27/00 B01L3/502715 B01L3/502753 B01L2200/0652 B01L2300/0681 G01N1/4077 G01N15/0625 G01N2001/4088 G01N2015/0065 G01N2015/1486		
FI分类号	G01N33/48.M G01N33/53.D G01N33/53.M G01N1/04.H C12Q1/02 C12N5/09 C12M1/34.B		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BB06 2G045/CA25 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 2G052/AA30 2G052/AA33 2G052/AD09 2G052/AD29 2G052/AD52 2G052/BA21 2G052/BA22 2G052/EA03 4B029/AA07 4B029/AA09 4B029/BB11 4B029/FA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ08 4B063/QS12 4B063/QS39 4B063/QX01 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BD18 4B065/CA46		
优先权	2015060034 2015-03-23 JP		
其他公开文献	JP2016180753A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在血液样本中包含稀有细胞的情况下，可以改善处理血液样本的方法，通过该方法可以改善小的稀有细胞和具有高变形能力的稀有细胞的捕获率。分离或检测稀有细胞的方法包括使用过滤器处理血液样本以分离或检测血液样本中的稀有细胞。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6619271号 (P6619271)
(45) 発行日 令和1年12月11日(2019.12.11)	(24) 登録日 令和1年11月22日(2019.11.22)	
(51) Int. Cl.	F I	
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 M	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 1/04 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	G O 1 N 1/04 H	
C 1 2 N 5/09 (2010.01)	C 1 2 Q 1/02	
請求項の数 11 (全 28 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号 特願2016-57313(P2016-57313)	(73) 特許権者 000141897 アークレイ株式会社 京都府京都市南区東九条西明田町5-7 11000040	
(22) 出願日 平成28年3月22日(2016.3.22)	(74) 代理人 特許業務法人池内アンドパートナーズ ▲高▼木 英紀 京都市上京区岩倉院町5-9番地 福源園内 アークレイ株式会社内	
(65) 公開番号 特願2016-180753(P2016-180753A)		
(43) 公開日 平成28年10月13日(2016.10.13)		
審査請求日 平成30年10月1日(2018.10.1)		
(31) 優先権主張番号 特願2015-60034(P2015-60034)		
(32) 優先日 平成27年3月23日(2015.3.23)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)		
	審査官 磯田 真美	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 稀少細胞を分離又は検出する方法