明　細　書

発明の名称 ：

細胞捕捉方法、特定細胞捕捉済デバイスの製造方法、及び特定細胞含有溶液の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、フィルトレーションシステムによって２種類以上の細胞を含有する細胞含有溶液および血液から特定の細胞のみを捕捉、検出する際に、選択的に捕捉した細胞に対してダメージを与えることなく特定の細胞のみを捕捉・濃縮する、特定細胞の捕捉方法、捕捉した特定細胞を捕捉した後の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法、捕捉した特定細胞を含有する溶液の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、血液の分野において、溶液中から特定の細胞のみを捕捉・検出する技術の開発が多く進められている。輸血する際に白血球のみを除去する技術や、免疫療法において特定の白血球を取り出す技術においては多くの研究が行われている。その中でも特に注目されているのが、血中循環腫瘍細胞（以下ＣＴＣ）の検出技術である。ＣＴＣは、臨床的な意義の高さから多くの研究が行われ、近年では特に、抗がん剤のスクリーニングや、癌を早期発見する診断技術へ応用することが期待されている。

[0003] 近年、パリレンを用いた樹脂フィルタを使用することで、少量のＣＴＣを効率的に検出する方法が提案されている（特許文献１）。

[0004] 或いは、樹脂の代わりに金属を用いたフィルタを使用することで、フィルタの強度を向上させ、白血球と癌細胞変形能の違いにより分離する方法も提案されている（特許文献２）。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第２０１０／１３５６０３号

特許文献2：特開２０１３／４２６８９号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] フィルトレーション技術を用い２種類以上の細胞を含有する細胞含有溶液、及び血液中から希少細胞等の特定の細胞を取り出す過程において、選択的に捕捉する細胞に対してダメージを与えることなく特定の細胞のみを捕捉・濃縮することが望まれている。

[0007] 例えば、従来から知られているフィルタ法は血液中の白血球や赤血球、血しょう板を効率よく除去できるが、白血球はがん細胞と近い大きさであるので、すべてを除去することはできない。

[0008] フィルタ法は白血球の大きさとがん細胞の大きさの違い、変形能の違いで分離する方法である。この方法において、フィルタの材質、孔形状、孔径、開口率、流速を工夫することで、白血球とがん細胞をかなり分離可能である。

[0009] しかしながら、フィルトレーションを行い白血球とがん細胞の分離を行った後に、捕捉したがん細胞をフィルタ上から取り出すことは容易ではなく、取出し時に細胞にダメージを与える可能性があった。

[0010] 本発明は、フィルトレーションによって特定の細胞を捕捉した後、捕捉した細胞にダメージを与えることなく取り出す細胞捕捉方法、取り出すための特定細胞捕捉済デバイスを製造する方法、及び、捕捉した細胞を含有する特定細胞含有溶液を製造する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 発明者らは検討を重ねた結果、フィルトレーションにより細胞を捕捉した後から細胞を解析・検出するまでの間、カートリッジ（細胞捕捉デバイス）内の液体を一度も引き抜くことなく連続的に液置換の処理を行うことで、細胞にダメージを与えずに取り出すことを可能とした。本発明の方法によれば、細胞の孔内への挟まれと細胞の変形を防ぐことができるので、細胞の高い回収効率とよりダメージの少ない細胞の回収が期待出来る。

[0012] フィルトレーションによって細胞含有溶液から特定の細胞のみを捕捉する際に、液面をフィルタ表面から目的の捕捉細胞の平均粒径以上の高さまで残した状態で処理を行うことで、細胞の孔内への挟み込まれと細胞の変形を防ぐことにより細胞にダメージを与えずに取り出すことが可能となる。

[0013] すなわち、本発明の一形態に係る細胞捕捉方法は、所定の容積を有し、２種類以上の細胞を含む細胞含有溶液及び該細胞含有溶液中の細胞を処理するための処理液から選ばれる液体を内部に導入する導入領域と、前記液体を外部に排出するための排出流路とを含む筐体と、前記導入領域と前記排出流路との間の流路上に設けられ、前記液体が通過するための複数の貫通孔が厚み方向に形成されたフィルタと、を有する細胞捕捉デバイスを用いて前記液体をフィルトレーションすることにより、前記フィルタ表面において前記細胞含有溶液に含まれる特定の細胞を選択的に捕捉する細胞捕捉方法であって、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程をｎ回（ｎは自然数）有し、第１回目の前記液体を流す工程から第ｎ回目の前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面が所定の液面高さを維持し、第ｎ回目の前記液体を流す工程の終了時に前記フィルタに所定の高さの液面を有する状態で前記細胞捕捉デバイスからの前記液体の排出を止めることを特徴とする。

[0014] ここで、前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び前記液体の導入流路を含む態様とすることができる。

[0015] 第１回目の前記液体を流す工程の前に、予め前記筐体の前記導入領域内を含む前記フィルタよりも上流側に洗浄液を満たしている態様とすることができる。

[0016] 前記液体を流す工程が、固定液を流す工程と、透過液を流す工程、染色液を流す工程、及び洗浄液を流す工程のうちの１以上の工程と、前記細胞含有溶液を流す工程と、を含む態様とすることができる。

[0017] 前記ｎは１であり、前記液体を流す工程が前記細胞含有溶液を流す工程である態様とすることができる。

[0018] 前記液体を流す工程において、第１回目に流す前記液体が細胞含有溶液であり、第２回目に流す前記液体が洗浄液である態様とすることができる。

[0019] 前記液体を流す工程において、捕捉対象の細胞の少なくとも一部が前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体に浸漬している態様とすることができる。

[0020] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが捕捉対象の細胞の大きさ以上である態様とすることができる。

[0021] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが５０μｍ以上である態様とすることができる。

[0022] 前記細胞含有溶液の溶媒が、哺乳動物の全血、血清、血漿、又はそれらが由来のたんぱく質を含む水溶液からなる態様とすることができる。

[0023] 前記フィルタが、高分子材料又は金属を用いて加工される態様とすることができる。

[0024] 前記液体を流す工程において、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を導入する速度が、５０～１０００μＬ／ｍｉｎである態様とすることができる。

[0025] また、本発明の一形態に係る特定細胞捕捉済デバイスの製造方法は、所定の容積を有し、２種類以上の細胞を含む細胞含有溶液及び該細胞含有溶液中の細胞を処理するための処理液から選ばれる液体を内部に導入する導入領域と、前記液体を外部に排出するための排出流路とを含む筐体と、前記導入領域と前記排出流路との間の流路上に設けられ、前記液体が通過するための複数の貫通孔が厚み方向に形成されたフィルタと、を有する細胞捕捉デバイスを用いて前記液体をフィルトレーションすることにより、前記フィルタ表面において前記細胞含有溶液に含まれる特定の細胞を選択的に捕捉した特定細胞捕捉済デバイスを製造する特定細胞捕捉済デバイスの製造方法であって、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程をｎ回（ｎは自然数）有し、第１回目の前記液体を流す工程から第ｎ回目の前記液体を流す工程にお

いて、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面が所定の液面高さを維持し、第ｎ回目の前記液体を流す工程の終了時に前記フィルタに所定の高さの液面を有する状態で前記細胞捕捉デバイスからの前記液体の排出を止めることを特徴とする。

[0026] ここで、前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び前記液体の導入流路を含む態様とすることができる。

[0027] 第１回目の前記液体を流す工程の前に、予め前記筐体の前記導入領域内を含む前記フィルタよりも上流側に洗浄液を満たしている態様とすることができる。

[0028] 前記液体を流す工程が、固定液を流す工程と、透過液を流す工程、染色液を流す工程、及び洗浄液を流す工程のうちの１以上の工程と、前記細胞含有溶液を流す工程と、を含む態様とすることができる。

[0029] 前記ｎは１であり、前記液体を流す工程が前記細胞含有溶液を流す工程である態様とすることができる。

[0030] 前記液体を流す工程において、第１回目に流す前記液体が細胞含有溶液であり、第２回目に流す前記液体が洗浄液である態様とすることができる。

[0031] 前記液体を流す工程において、捕捉対象の細胞の少なくとも一部が前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体に浸漬している態様とすることができる。

[0032] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが捕捉対象の細胞の大きさ以上である態様とすることができる。

[0033] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが５０μｍ以上である態様とすることができる。

[0034] 前記細胞含有溶液の溶媒が、哺乳動物の全血、血清、血漿、又はそれらが由来のたんぱく質を含む水溶液からなる態様とすることができる。

[0035] 前記フィルタが、高分子材料又は金属を用いて加工される態様とすることができる。

[0036] 前記液体を流す工程において、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を導入する速度が、５０～１０００μＬ／ｍｉｎである態様とすることができる。

[0037] また、本発明の一形態に係る特定細胞含有溶液の製造方法は、所定の容積を有し、２種類以上の細胞を含む細胞含有溶液及び該細胞含有溶液中の細胞を処理するための処理液から選ばれる液体を内部に導入する導入領域と、前記液体を外部に排出するための排出流路とを含む筐体と、前記導入領域と前記排出流路との間の流路上に設けられ、前記液体が通過するための複数の貫通孔が厚み方向に形成されたフィルタと、を有する細胞捕捉デバイスを用いて前記液体をフィルトレーションすることにより、前記フィルタ表面において前記細胞含有溶液に含まれる特定の細胞を選択的に捕捉することにより得られる特定細胞含有溶液の製造方法であって、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程をｎ回（ｎは自然数）有し、第１回目の前記液体を流す工程から第ｎ回目の前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面が所定の液面高さを維持し、第ｎ回目の前記液体を流す工程の終了時に前記フィルタに所定の高さの液面を有する状態で前記細胞捕捉デバイスからの前記液体の排出を止め、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程の後に、前記筐体内に存在する液体を回収する工程を有することを特徴とする。

[0038] 前記筐体内に存在する液体を回収する工程が、前記導入領域側から前記導入領域内の液体を吸引する工程を含む態様とすることができる。

[0039] 前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び前記液体の導入流路を含み、前記筐体内に存在する液体を回収する工程が、前記排出流路から前記導入流路へ向けて送液を行う工程を含む態様とすることができる。

[0040] 前記排出流路から前記導入流路へ向けた送液の流速が５０～１０００μＬ／ｍｉｎである態様とすることができる。

[0041] 前記排出流路から前記導入流路へ向けた送液の前に、前記筐体に振動を与える態様とすることができる。

[0042] 前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び、２以上の前記液体の導入流路を含み、前記筐体内に存在する液体を回収する工程が、２以上の前記導入流路に含まれる第１の導入流路から２以上の前記導入流路のうち第１の導入流路とは異なる導入流路への送液を行う工程を含む態様とすることができる。

[0043] ２以上の前記導入流路に含まれる第１の導入流路から２以上の前記導入流路のうち第１の導入流路とは異なる導入流路への送液の流速が５０～１００μＬ／ｍｉｎである態様とすることができる。

[0044] ２以上の前記導入流路に含まれる第１の導入流路から２以上の前記導入流路のうち第１の導入流路とは異なる導入流路への送液の前に、前記筐体に振動を与える態様とすることができる。

[0045] 第１回目の前記液体を流す工程の前に、予め前記筐体の前記導入領域内を含む前記フィルタよりも上流側に洗浄液を満たしている態様とすることができる。

[0046] 前記液体を流す工程が、固定液を流す工程と、透過液を流す工程、染色液を流す工程、及び洗浄液を流す工程のうちの１以上の工程と、前記細胞含有溶液を流す工程と、を含む態様とすることができる。

[0047] 前記ｎは１であり、前記液体を流す工程が前記細胞含有溶液を流す工程である態様とすることができる。

[0048] 前記液体を流す工程において、第１回目に流す前記液体が細胞含有溶液であり、第２回目に流す前記液体が洗浄液である態様とすることができる。

[0049] 前記液体を流す工程において、捕捉対象の細胞の少なくとも一部が前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体に浸漬している態様とすることができる。

[0050] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが捕捉対象の細胞の大きさ以上である態様とすることができる。

[0051] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前

記液体の液面の高さが５０μｍ以上である態様とすることができる。

発明の効果

[0052] 本発明によれば、フィルトレーションによって特定の細胞を捕捉した後、捕捉した細胞にダメージを与えることなく取り出す細胞捕捉方法、取り出すための特定細胞捕捉済デバイスを製造する方法、及び、捕捉した細胞を含有する特定細胞含有溶液を製造する方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0053] [図1]細胞捕捉デバイス（開放型筐体）の概略構成を説明する図である。

[図2]細胞捕捉デバイス（密閉型筐体）の概略構成を説明する図である。

[図3]フィルタの製造方法を説明する概略断面図である。

[図4]銅板（銅めっきを行う場合はＮｉ板）を使用してフィルターを製造する方法を示す概略断面図である。

[図5]フィルタにおける長孔径、短孔径、及び開口率の定義を説明する図である。

[図6]実施例１の捕捉後の細胞の写真である。

[図7]実施例４の捕捉後の細胞の写真である。

[図8]比較例１の捕捉後の細胞の写真である。

[図9]比較例４の捕捉後の細胞の写真である。

発明を実施するための形態

[0054] 以下に本発明の一実施形態に係る詳細な説明を行う。本実施形態に係る細胞捕捉方法とは、２種類以上の細胞を含む細胞含有溶液から特定の細胞を選択的に捕捉する方法である。特定の細胞を捕捉する際には、細胞捕捉デバイスを用いる。細胞捕捉デバイスについては後述するが、所定の容積を有する導入領域と、導入領域から内部に導入された液体を外部に排出するための排出流路とを含む筐体と、導入領域と排出流路との間の流路上に設けられた前記液体が通過するための複数の貫通孔が厚み方向に形成されたフィルタと、を備える。この細胞捕捉デバイスを用いて、細胞含有溶液のフィルトレーションを行うことで、特定の細胞をフィルタ上で捕捉する。細胞含有溶液のフ

ィルトレーションの際には、固定液、透過液、染色液又は洗浄液等の処理液を細胞捕捉デバイスに流すことで、捕捉された細胞について観察等を行うための処理を行うことができる。なお、特定の細胞がフィルタ上に捕捉された細胞捕捉デバイスを特定細胞捕捉済デバイスという。

[0055] 本実施形態において、細胞含有溶液とは、２種類以上の細胞が存在する溶液と定義する。細胞含有溶液の例としては、ヒト血液及びヒト血液を含む溶液が挙げられる。

[0056] 本実施形態において、細胞含有溶液がヒト血液である場合、細胞含有溶液中の細胞とは、ヒト血液中に存在する細胞であり２種類以上の細胞が対象である。具体的には、ヒト白血球、血中循環腫瘍細胞（Circulating Tumor Cell：CTC）、循環血管内内皮細胞（Circulating Endothelial Cell：CEC）、癌幹細胞である。

[0057] 細胞含有溶液の溶媒は、哺乳動物の全血、血清或いは血漿、或いはそれらが由来のたんぱく質を含む水溶液からなることが好ましく、ウシ、ウマ、ヒト由来のたんぱく質であることがより好ましく、ヒト由来のたんぱく質であることが更に好ましい。水溶液は、リン酸緩衝液を主成分とすることが好ましい。

[0058] たんぱく質を含む水溶液内に、抗凝固剤を添加する場合もある。抗凝固剤は、ＥＤＴＡ、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、フッ化ナトリウムのいずれかであることが好ましい。

[0059] 細胞捕捉デバイスにより捕捉する対象である特定の細胞とは、ヒト血液中に存在する細胞である。具体的には、ヒト白血球、血中循環腫瘍細胞、循環血管内内皮細胞、癌幹細胞である。

[0060] また、本実施形態において、特定細胞含有溶液とは、細胞捕捉デバイスを用いて２種類以上の細胞が存在する細胞含有溶液から特定の細胞を捕捉した後に作製された溶液と定義する。特定細胞含有溶液中では、特定の細胞以外の細胞に対する捕捉された特定の細胞の存在割合が元の細胞含有溶液のそれに比べ高くなっている。特定細胞含有溶液は、細胞捕捉デバイスにおいて特

定の細胞を捕捉した後の特定細胞捕捉済デバイスに残留する液体を回収することによって得られる。

[0061] 細胞捕捉デバイスについて、図１及び図２を参照しながら説明する。細胞捕捉デバイスは、筐体及びフィルタを有する。まず、筐体の説明を行う。本実施形態の細胞捕捉デバイスにおける筐体とは、内部に液体を導入可能であり、且つフィルタを通過した液体を外部に排出可能である。さらに、筐体内には、フィルタ上で滞留する液体の液面を所定の高さで維持することが可能となるように、所定の容積を有する導入領域を備える。このような、筐体は２種類のタイプが存在する。なお、細胞捕捉デバイスの形状は、図１又は図２に示すものに上記に限定されない。フィルタを用いた細胞含有溶液のフィルトレーションによって、特定の細胞を捕捉することができるのであれば、その装置構成は特に限定されない。

[0062] まず１つめは、フィルタより上部に上蓋を備えないタイプの開放型の筐体である。図１には、開放型の筐体を有する細胞捕捉デバイス１０を示す。細胞捕捉デバイス１０は、厚み方向（上下方向）に延びる貫通孔を有するフィルタ１１と、フィルタ１１の上方に設けられる導入領域１２と、フィルタの下方に設けられる排出流路１３と、を有する。導入領域１２及び排出流路１３は、筐体によって形成されている。開放型の筐体を有する細胞捕捉デバイス１０においては、導入する液体を、フィルタ１１の上部に存在する導入領域１２より導入する。導入領域１２は上方が開口しているので、直接導入することができる。液体を導入するための媒体は、測定者の手技で行う場合と、一定量の液体を自動で導入するための機器を用いることが好ましい。液体を一定量導入するための機器としては、ビュレットのような半自動によるものと、機械的に制御された自動によるものが好ましい。

[0063] ２つめの筐体は、フィルタより上部に液体を導入するための１つ以上の導入流路を備えた上蓋と液体を外部に排出するための排出流路とを備えるタイプの密閉型の筐体である。図２には、密閉型の筐体を有する細胞捕捉デバイス２０を示す。細胞捕捉デバイス２０は、厚み方向（上下方向）に延びる貫

通孔を有するフィルタ２１と、フィルタ２１の上方に設けられる導入領域２２と、フィルタ２１の下方に設けられる排出流路２３と、を有する。さらに導入領域２２の上方には上蓋２４が設置されると共に、上蓋２４によって覆われた導入領域２２に対して液体を導入するための２つの導入流路２５，２６が設けられる。上蓋２４とフィルタ２１との間には、液体及び細胞を保持するための所定の容積を有する空間である導入領域２２が形成される。導入流路２５，２６は、上蓋２４よりも上方もしくは、上蓋２４の横側に取り付けることが好ましい。図２の細胞捕捉デバイス２０では、導入流路２５は、導入領域との接続部分は、上蓋２４の横側に設けられているが、流路が上方に延びている例を示している。導入流路２５，２６を複数備えている場合、細胞捕捉デバイス２０に導入する液体同士（例えば、細胞含有溶液と処理液）のコンタミネーションを防ぐことができる。したがって、導入流路を２つ以上有する構成であることが好ましい。

[0064] 細胞捕捉デバイス１０，２０に用いられるフィルタ１１，２１について、詳細は後述するが、材質は金属又は高分子材料であることが好ましい。金属の主成分としては、ニッケル、銀、パラジウム、銅、イリジウムのいずれか、もしくはこれらの合金が好ましい。高分子材料の主成分としては、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリ乳酸、パリレンを主成分としたものが好ましい。なお「主成分」とは、フィルタを構成する材料における当該成分の割合が５０重量％以上であることをいう。

[0065] また、フィルタ１１，２１には、液体が通過するための複数の貫通孔１１ａ，２１ａが厚み方向に形成されている。これらの貫通孔１１ａ，２１ａの形状及び大きさを調整することで、捕捉対象となる特定の細胞を選択的に捕捉することができる。

[0066] 次に、細胞捕捉デバイスにおいて細胞を捕捉する方法について説明する。まず、細胞捕捉デバイス１０又は細胞捕捉デバイス２０に対して液体を流す工程について説明する。本実施形態でいう液体を流す工程とは、フィルタ１

１，２１より上方もしくは専用の導入流路（例えば、導入流路２５）より目的の液の導入を行う。その後、フィルタ１１，２１を通過させた後に、排出流路１３，２３より液を排出することである。液を流す方法としては、吸引が望ましく、液を吸引するための動力としては、ペリスタポンプを用いることが好ましい。

[0067] 本実施形態に係る細胞捕捉に係る処理では、液体を流す工程がｎ回（ｎは自然数）行われる。液体を流す工程の数は、細胞含有溶液の流す工程の数及び処理液を流す工程（固定液を流す工程と、透過液を流す工程、染色液を流す工程、及び洗浄液を流す工程のうちの１以上の工程）の数に基づいて変動する。すなわち、ｎが１である場合には、細胞含有溶液の流す工程のみが行われる。なお、第１回目に流す液体が細胞含有溶液とし、第２回目に流す前記液体が洗浄液である構成とすることで、細胞含有溶液に含まれる成分のうち、捕捉対象の特定の細胞以外の成分を洗浄液によって洗浄（排出流路側へ移動）した後に、各種の処理液による処理を実施することができるため、洗浄液以外の処理液による処理の効果を向上させることができる。

[0068] 液体を流す工程をｎ回有する際に、第１回目から第ｎ回目の液体を流す工程において、フィルタ１１，２１上の導入領域１２，２２に滞留する液体の液面が所定の高さを維持していることを特徴とする。このような構成とすることで、捕捉対象の細胞の少なくとも一部がフィルタ上の導入領域における液体に浸漬している状態を実現することができる。また、第ｎ回目の最終の液を流す工程の後（終了時）に、フィルタ１１，２１上の導入領域１２，２２に滞留する液体が所定の液面の高さを有した状態で、細胞捕捉デバイス１０，２０からの液体の排出を止めることを特徴とする。所定の高さとは、捕捉を目的としている細胞の平均粒径以上の高さを有することが好ましく、捕捉対象の細胞の大きさ以上であるとより好ましい。具体的には、フィルタ１１，２１上の導入領域１２，２２に滞留する液体の液面高さは、５０μｍ以上であることが好ましく、３０μｍ以上であるとより好ましい。液体の高さを捕捉対象の細胞の平均粒径以上の高さとすることで、フィルタ上に滞留す

る特定の細胞の移動性を十分確保し、フィルタ又は他の細胞との衝突によって細胞がダメージを受けることを防止することができる。

[0069] 第１回目の液を流す工程の前に、予め筐体内の導入領域内及び流路（導入流路、排出流路）内、すなわち、導入領域内を含むフィルタよりも上流側に洗浄液を満たしていることが好ましい。洗浄液とは、ウシ由来の血清を含む燐酸緩衝溶液を用いることが好まく、ウシ胎児血清を含む燐酸緩衝溶液を用いることがより好ましい。ウシ血清の濃度としては、０．１ｗ／ｖ％～２０ｗ／ｖ％が好まく、０．５ｗ／ｖ％～１０ｗ／ｖ％がより好ましい。

[0070] 細胞含有溶液、各種処理液がフィルタの孔を通過する流速としては、１００～８００μＬ／ｍｉｎの範囲であることが好ましく、２００～６００μＬ／ｍｉｎの範囲であることがより好ましい。

[0071] 密閉型の筐体を有する細胞捕捉デバイス２０においては、細胞を捕捉後に筐体内部に液体を充填させた状態で、排出流路２３からの液体の排出を止めた後は、捕捉した細胞の形を保持した状態で保管する容器として用いることが可能となる。

[0072] なお、細胞捕捉デバイスのフィルタ上に細胞を捕捉した後に、筐体内に存在する細胞含有溶液を特定細胞含有溶液として回収する方法は、開放型の筐体と密閉型の筐体によって異なる。

[0073] 例えば、開放型の筐体を有する細胞捕捉デバイス１０から細胞含有溶液を回収するための方法としては、ピペットなどの吸引器を用いることが好ましい。

[0074] 密閉型の筐体を有する細胞捕捉デバイス（例えば細胞捕捉デバイス２０）から細胞含有溶液を回収するための方法として、３つ例示する。まず、１つめの方法としては、導入流路２５，２６のように導入流路を２つ以上保有する場合に用いる方法が挙げられる。一方側の導入流路（第１の導入流路）を液体の導入側とし、液体の導入側として用いる導入流路とは異なる導入流路を液体の排出側とし、液体として、例えば処理液等を送液する。これにより、排出側とした導入流路から、フィルタ２１により捕捉された特定の細胞を

含む細胞含有溶液を回収し、特定細胞含有溶液を得ることができる。この時の送液速度は、５０～１０００μＬ／ｍｉｎの範囲であることが好ましく、２００～８００μＬ／ｍｉｎの範囲であることがより好ましい。送液速度を上記の範囲とすることで、特定の細胞に対してダメージを与えることなく、フィルタ２１上の特定の細胞の回収効率を高めることができる。

[0075] ２つめの方法としては、導入流路が１つのみである場合にも用いることができる方法が挙げられる。排出流路を液体の導入側とし、導入流路を液体の排出側とし、液体を送液することにより、排出側とした導入流路から細胞含有溶液の回収を行う。この時の送液速度は、５０～１０００μＬ／ｍｉｎの範囲であることが好ましく、２００～８００μＬ／ｍｉｎの範囲であることがより好ましい。

[0076] なお、密閉型の筐体から細胞含有溶液を回収する時に、送液の前に筐体に対して一定の振動を与えることが好ましい。振動を与える媒体としては、ＭｉｘｅｒやＳｈａｋｅｒなどを用いることが好ましい。

[0077] ３つめの方法としては、開放型の筐体を有する細胞捕捉デバイス１０と同様に、吸引をする方法が挙げられる。この場合には、ピペットなどの吸引器を導入流路の１つに接続して吸引を行うことが考えられる。

[0078] 以下、図３及び図４を参照しながら、細胞捕捉デバイス１０，２０において好適に用いられるフィルタの一種である金属フィルタの作製方法を例示すると共に、この金属フィルタの説明を行う。

[0079] 図３は、ＭＣＬにピーラブル銅箔（銅めっきを行う場合はＮｉ箔）を貼り合わせた基板を使用し、金属製薄膜フィルタを製造する方法を示す概略断面図である。

[0080] 図３（Ａ）は、ＭＣＬ１上にピーラブル銅箔２（銅めっきを行う場合はＮｉ箔）が積層された基板を示している。まずこの基板を準備する。

[0081] フィルタを作製するための基板として使用する材料は銅（めっきが銅の場合はニッケル）が好ましい。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においても他の材料に比べると優れている

。

[0082] 次に、図３（Ｂ）に示すように、基板のピーラブル銅箔２上にフォトレジスト３を形成する。このフォトレジストの厚みは後の導体の厚みの１．０倍～２．０倍が好ましい。この厚みが薄いと、後にレジスト剥離が困難になり、厚いと回路形成性が困難になる。具体的には、フォトレジスト３は、１５～５０μｍの厚みが好ましい。フォトレジスト３を形成する感光性樹脂組成物としてはネガ型感光性樹脂組成物が好ましい。ネガ型感光性樹脂組成物は少なくともバインダー樹脂、不飽和結合を有する光重合性化合物、光重合開始剤を含むものが好ましい。

[0083] 次に、図３（Ｃ）に示すように、フォトレジスト３上にフォトマスク４を重ねた後にフォトレジスト露光を行う。これにより、フォトマスク４が重ねられていない領域に露光部３ａが形成される。

[0084] 次に、図３（Ｄ）に示すように、アルカリ溶液等で未露光部３ｂのフォトレジスト現像除去を行う。これにより、フィルタの貫通孔に対応する位置に露光部３ａが残る。

[0085] 次に、図３（Ｅ）に示すように、フォトレジストで覆われていない部分への電解めっきを行うことで、めっき層５を形成する。このめっきの部分がフィルタの材質となる。

[0086] 次に、図３（Ｆ）に示すように、ＭＣＬ１から、電解めっきによりめっき層５が形成された施したピーラブル銅箔２を剥離する。

[0087] 次に、図３（Ｇ）に示すように、薬液による化学的溶解により、ピーラブル銅箔２を除去し、露光部３ａ及びめっき層５により形成される自立膜を取り出す。

[0088] 次に、図３（Ｈ）に示すように、自立膜内に残ったフォトレジストによる露光部３ａを除去し、めっき層５に対して貫通孔６を形成する。

[0089] 次に、図３（Ｉ）に示すように、無電解金めっきを行い、フィルタ表面に金めっき層７を形成する。以上により、細胞捕捉デバイス１０，２０に用いられるフィルタ１１，２１を製造することができる。

[0090] 図４は、銅板（銅めっきを行う場合はＮｉ板）を使用して金属製薄膜フィルタを製造する方法を示す概略断面図である。

[0091] 図４に示す方法では、図３に示す方法におけるＭＣＬ１とピーラブル銅箔２に代えて銅板（又はＮｉ板）２’を使用している点以外は、図２に示す製造方法と同じである。

[0092] すなわち、図４（Ａ）は基板として使用する銅板２’を準備する工程を示している。また、図４（Ｂ）は銅板２’へのフォトレジスト３のラミネートする工程を示している。また、図４（Ｃ）はフォトマスク４を重ねてのフォトレジスト露光を示している。また、図４（Ｄ）は未露光部３ｂのフォトレジストの現像除去を示している。また、図４（Ｅ）はフォトレジストの露光部３ａで覆われていない部分への電解めっきによりめっき層を形成する工程を示している。また、図４（Ｆ）は薬液による化学的溶解（ケミカルエッチング）によって銅板２’を除去し、露光部３ａ及びめっき層５により形成される自立膜を取り出す工程を示している。また、図４（Ｇ）は自立膜内に残ったフォトレジストによる露光部３ａを除去し、めっき層５に対して貫通孔６を形成する工程を示している。また、図４（Ｈ）は無電解金めっきを行い、フィルタ表面に金めっき層７を形成する工程を示している。

[0093] このように、図３に示す方法及び図４に示す方法の何れを用いても細胞捕捉デバイス１０，２０に用いられるフィルタ１１，２１を製造することができる。

[0094] フィルタの材質は金属であることが好ましい。金属の主成分としては、ニッケル、銀、パラジウム、銅、イリジウムのいずれか、もしくはこれらの合金が好ましい。以上の金属は電気めっき可能である。なお、「主成分」とは、フィルタ１０５の総重量に対する当該成分の重量割合が５０％以上であることを示す。

[0095] パラジウム及びイリジウムは酸化還元電位が高く、難溶性で特性良好だが、高価である欠点がある。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、イリジウ

ムに比べると比較的安価である。

[0096] フィルタを作製するための基板（銅板２’：図４参照）として使用する材料は銅（フィルタの材質が銅である場合はニッケル）が好ましい。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においても他の材料に比べると優れている。なお、ＭＣＬ１に対して積層する金属箔２（図３参照）についても、銅（フィルタの材質が銅である場合はニッケル）が好ましい。

[0097] また、図３（Ｅ）及び図４（Ｅ）に示すめっき層５の形成は電解めっきにより行われる。例えば、電解ニッケルめっきとしてはワット浴（硫酸ニッケル、塩化ニッケル、ホウ酸が主成分）、スルファミン酸浴（スルファミン酸ニッケル、ホウ酸が主成分）、ストライク浴（塩化ニッケル、塩化水素が主成分）などが挙げられる。

[0098] 電解銀めっきとしては、シアン化銀カリウム又は酒石酸カリウムを主成分とする浴が挙げられる。

[0099] 電解パラジウムめっきとしては、水溶性パラジウム塩とナフタレンスルホン酸化合物よりなる浴が挙げられる。

[0100] 電解イリジウムめっきとしては、ハロゲンを含む可溶性イリジウム塩およびアルコール類を含有する浴が挙げられる。

[0101] 電解銅めっきとしては、硫酸銅と硫酸、塩化物イオンを主成分とする浴が挙げられる。

[0102] これらのめっき浴を用いて、電解めっきを行う。電解めっきの際の電流密度は、０．３～４Ａ／ｄｍ^{2}の範囲がよく、０．５～３Ａ／ｄｍ^{2}の範囲であることがより好ましい。電流密度を４Ａ／ｄｍ^{2}以下とすることで、ざらつきの発生を抑制でき、電流密度を０．３Ａ／ｄｍ^{2}以上とすることで、金属の結晶粒が充分に成長し、バリア層としての効果が高まるため、本実施形態の効果が良好に得られるようになる。

[0103] めっきを行う際のレジストの箇所が貫通孔の箇所となる。貫通孔の開口形状として円、楕円、正方形、長方形、角丸長方形、多角形等が例示できる。効

率良く対象とする成分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。

[0104] 貫通孔６の孔径は捕捉対象とする成分のサイズに応じて孔径を設定される。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。例えば開口形状が長方形の場合、図５に示すように、短辺側の短孔径と、長辺側の長孔径とを定義することができるが、貫通孔６の孔径は短孔径となる。また、貫通孔の孔径は例えば開口形状が長方形の場合、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、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、捕捉対象とする細胞が貫通孔６に捕獲された状態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為、フィルタの目詰まりを防止することができる。金属フィルタの短孔径の長さは５～１５μｍが好ましく、７～９μｍがさらに好ましい。

[0105] フィルタ１１，２１の貫通孔の平均開口率は３～５０％が好ましく、３～２０％がより好ましく、３～１０％が特に好ましい。ここで、開口率とは、フィルターとして機能する領域の面積に対する貫通孔が占める面積の割合をいう（図５参照）。すなわち、フィルタとして機能する領域の面積とは、フィルタに含まれる複数の貫通孔のうち、貫通孔の最外部を結んで得られる領域（図５において破線で囲まれた領域Ａ１）である。開口率が高すぎると白血球にかかる圧力が低下し、白血球残が増加する。開口率が低いと流せる血液量が低下する。

[0106] フィルタ１１，２１の厚さは３μｍ～５０μｍであることが好ましく、５μｍ～３０μｍであることがより好ましく、８μｍ～２０μｍであることが特に好ましい。フィルタ１１，２１の膜厚が３μｍ未満の場合はフィルタの強度が低下し、取り扱い性が困難になる場合がある。逆に、５０μｍを超えると加工時間が長くなることによる生産性低下、必要以上の材料消費による

コスト的な不利や微細加工そのものが困難になることが懸念される上、白血球等の捕捉対象の特定の細胞以外の細胞が通過しにくくなる。

[0107] 以上回路形成後、樹脂層を剥離し、銅箔をエッチング（図３）か、又は銅板を除去する（図４）ことで、図３（Ｈ）又は図４（Ｇ）に示すように、めっき層５によるフィルタが完成する。

[0108] 次に、フィルタに残っているレジスト（露光部３ａ）を強アルカリにより除去する。強アルカリとしては、０．１ｗｔ％～１０ｗｔ％のＮａＯＨ又はＫＯＨ水溶液が好ましい。剥離を促進するためにモノエタノールアミン（１～２０ｖｏｌ％）等を添加しても良い。剥離が困難な場合は過マンガン酸ナトリウム又は過マンガン酸カリウム等にアルカリ（０．１ｗｔ％～１０ｗｔ％のＮａＯＨ又はＫＯＨ）を加えた液でレジストを除去することもできる。

[0109] レジストを除去したフィルタに対しては貴金属めっきを行うと良い。

[0110] 貴金属めっきとしては、金、パラジウム、白金、ルテニウム、インジウムなどが望ましい。

[0111] 貴金属めっきの中でも金は前出の様に全ての金属の中で最も酸化還元電位が高く、細胞毒性がないとされている。長期保存での変色等も殆どない。

[0112] 金めっきは無電解で行うことも出来るし、電解で行うことも出来る。電解で行う場合は厚みばらつきが大きくなり、フィルタの孔径精度に影響出やすい為、無電解で行うことが望ましい。但し、電解金めっきは被覆率を向上できる。

[0113] 金めっきは置換めっきで行うだけでも効果があるが、置換めっきと還元めっきを組み合わせた方が、効果が大きい。

[0114] 金めっき前の金属フィルタは表面が酸化していることがある。そこで、酸化皮膜の除去を行うのであるが、ここでは金属イオンと錯体を形成する化合物の入った水溶液で洗浄すると良い。

[0115] 具体的にはシアン類やＥＤＴＡ類、又はクエン酸類の入った水溶液がよい。

[0116] 中でもクエン酸類は金めっきの前処理として最適である。具体的にはクエ

ン酸の無水物、クエン酸の水和物、クエン酸塩あるいはクエン酸塩の水和物であればよく、具体的には、クエン酸無水物、クエン酸一水和物、クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム等を使用することができる。その濃度は０．０１ｍｏｌ／Ｌ～３ｍｏｌ／Ｌであることが好ましく、０．０３ｍｏｌ／Ｌ～２ｍｏｌ／Ｌであることがより好ましく、０．０５ｍｏｌ／Ｌ～１ｍｏｌ／Ｌの範囲であることが特に好ましい。０．０１ｍｏｌ／Ｌ以上とすることで、無電解金めっき層と金属フィルタの密着性が向上する。

３ｍｏｌ／Ｌを超えた場合、効果が向上しない上、経済的に好ましくない。

[0117] クエン酸を含む溶液への浸漬は、７０℃～９５℃で、１～２０分間行うと良い。

[0118] クエン酸を含む溶液は、発明の効果が得られる範囲でめっき液などに含まれる還元剤、ｐＨ調整剤等の緩衝剤を加えることも可能であるが、還元剤、ｐＨ調整剤などは少量が望ましく、クエン酸のみの水溶液が最も好ましい。クエン酸を含む溶液のｐＨは、好ましくは５～１０であり、より好ましくは６～９である。

[0119] ｐＨ調整剤としては、酸又はアルカリであれば特に限定されず、酸としては、塩酸、硫酸、硝酸などが使用でき、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、等のアルカリ金属又はアルカリ土類金属の水酸化物溶液が挙げられる。前述したように、クエン酸の効果を阻害しない範囲で使用することができる。また、クエン酸を含む溶液に、硝酸を１００ｍｌ／Ｌといった高濃度で含有させると、クエン酸のみを含む溶液で処理した場合と比較して、接着性を改善する効果が低下する。

[0120] 還元剤としては、還元性のあるものであれば特に限定されず、次亜リン酸、ホルムアルデヒド、ジメチルアミンボラン、水素化ホウ素ナトリウムなどが挙げられる。

[0121] 次に、置換金めっきを行う。置換金めっきにはシアン浴と非シアン浴とがあるが、環境負荷又は残存時の細胞毒性を考えると非シアン浴が望ましい。非シアン浴に含まれる金塩としては、塩化金酸塩、亜硫酸金塩、チオ硫酸金

塩、チオリンゴ酸金塩が例示可能である。金塩は一種類のみ用いてもよく、二種以上を組み合わせて用いても良い。

[0122] さらに、シアン系の浴は、金属を溶解する効果が強すぎるため、金属によっては溶解してピンホールが発生しやすい。上記のように前処理を十分に行う場合は非シアン系のめっき浴が好ましい。

[0123] 金の供給源としては亜硫酸金が特に好ましい。亜硫酸金としては、亜硫酸金ナトリウム、亜硫酸金カリウム、亜硫酸金アンモニウム、などがよい。

[0124] 金濃度は０．１ｇ／Ｌ～５ｇ／Ｌの範囲が好ましい。０．１ｇ／Ｌ未満では金が析出しにくく、５ｇ／Ｌを超えると液が分解しやすくなる。

[0125] 置換金めっき浴には金の錯化剤としてアンモニウム塩又はエチレンジアミンテトラ酢酸塩が入っているとよい。アンモニウム塩としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウムが挙げられ、エチレンジアミンテトラ酢酸塩としては、エチレンジアミンテトラ酢酸、エチレンジアミンテトラ酢酸ナトリウム、エチレンジアミンテトラ酢酸カリウム、エチレンジアミンテトラ酢酸アンモニウムを使用する。アンモニウム塩の濃度は、７×１０$^{-3}$ｍｏｌ／Ｌ～０．４ｍｏｌ／Ｌの範囲で使用することが好ましく、アンモニウム塩の濃度がこの範囲外だと液が不安定になる傾向がある。エチレンジアミンテトラ酢酸塩の濃度は、２×１０$^{-3}$ｍｏｌ／Ｌ～０．２ｍｏｌ／Ｌの範囲で使用することが好ましく、アンモニウム塩の濃度がこの範囲外だと液が不安定になる傾向がある。

[0126] 液を安定に保つために０．１ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌの亜硫酸塩が入っているとよい。亜硫酸塩としては亜硫酸ナトリウム、亜硫酸カリウム、又は亜硫酸アンモニウムなどが挙げられる。

[0127] ｐＨ調整剤としてｐＨを下げる場合には、塩酸或いは硫酸を使用するのが好ましい。また、ｐＨを上げる場合には、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニア水を使用することが好ましい。ｐＨは６～７に調整するとよい。この範囲外では液の安定性又はめっきの外観に悪影響を与える。

[0128] 置換めっきは液温３０度～８０度で使用することが好ましく、この範囲外

では液の安定性又はめっきの外観に悪影響を与える。

[0129] 以上のようにして置換めっきを行うわけであるが、置換めっきでは完全に金属を覆うのが難しい。そこで、次に還元剤の入った還元型の金めっきを行う。置換めっきの厚みは０．０２～０．１μｍの範囲が好ましい。

[0130] 還元型の金めっきの金塩としては、亜硫酸金塩及びチオ硫酸塩が好ましく、その含有量は金として１～１０ｇ／Ｌの範囲であることが好ましい。金の含有量が１ｇ／Ｌ未満であると、金の析出反応が低下し、１０ｇ／Ｌを超えると、めっき液の安定性が低下すると共に、めっき液の持ち出しにより金消費量が多くなるため好ましくない。含有量は２～５ｇ／Ｌにすることがより好ましい。

[0131] 還元剤としては次亜リン酸、ホルムアルデヒド、ジメチルアミンボラン、水素化ホウ素ナトリウムなどが挙げられるが、フェニル化合物系還元剤がより好ましい。例えば、フェノール、ｏ－クレゾール、ｐ－クレゾール、ｏ－エチルフェノール、ｐ－エチルフェノール、ｔ－ブチルフェノール、ｏ－アミノフェノール、ｐ－アミノフェノール、ヒドロキノン、カテコール、ピロガロール、メチルヒドロキノン、アニリン、ｏ－フェニレンジアミン、ｐ－フェニレンジアミン、ｏ－トルイジン、ｏ－エチルアニリン、ｐ－エチルアニリン等が挙げられ、これらの１種又は２種以上を用いることが出来る。

[0132] 還元剤の含有量は、０．５ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌであることが好ましい。還元剤の含有量が０．５ｇ／Ｌ未満であると、実用的な析出速度を得ることが困難となる傾向があり、５０ｇ／Ｌを超えると、めっき液の安定性が低下する傾向がある。還元剤の含有量は２ｇ／Ｌ～１０ｇ／Ｌとすることがより好ましく、２ｇ／Ｌ～５ｇ／Ｌであることが特に望ましい。

[0133] 無電解金めっき液は重金属塩を含んでいても良い。析出速度を促進する観点から、重金属塩はタリウム塩、鉛塩、砒素塩、アンチモン塩、テルル塩及びビスマス塩からなる群より選ばれる少なくとも一つであることが好ましい。

[0134] タリウム塩としては、硫酸タリウム塩、塩化タリウム塩、酸化タリウム塩

、硝酸タリウム塩等の無機化合物塩、マロン酸二タリウム塩等の有機錯体塩が挙げられ、鉛塩としては、硫酸鉛塩、硝酸鉛塩等の無機化合物塩、酢酸塩等の有機酢酸塩が挙げられる。

[0135] また、砒素塩としては、亜砒素塩、砒酸塩三酸化砒素等の無機化合物塩又は有機錯体塩が挙げられ、アンチモン塩としては、酒石酸アンチモニル塩等の有機錯体塩、塩化アンチモン塩類、オキシ硫酸アンチモン塩、三酸化アンチモン等の無機化合物塩類が挙げられる。

[0136] テルル塩としては、亜テルル酸塩、テルル酸塩等の無機化合物塩又は有機錯体塩が挙げられ、ビスマス塩としては、硫酸ビスマス（III）、塩化ビスマス（III）、硝酸ビスマス（III）、等の無機化合物塩、シュウ酸ビスマス（III）等の有機錯体塩が挙げられる。

[0137] 上述の重金属塩は、１種類又はそれ以上用いることが出来るが、その添加量の合計はめっき液全容量を基準として１～１００ｐｐｍが好ましく、１～１０ｐｐｍがより好ましい。１ｐｐｍ未満では、析出速度向上効果が十分でない場合があり、１００ｐｐｍを越す場合はめっき液安定性が悪くなる傾向にある。

[0138] 無電解金めっき液は硫黄系化合物を含んでいても良い。フェニル化合物系還元剤及び重金属塩を含む無電解金めっき液中に、硫黄化合物を更に含有させることにより、液温６０～８０℃程度の低温であっても十分な析出速度が得られ、被膜外観も良好である上、めっき液の安定性が特に優れるようになる。

[0139] 硫黄系化合物としては、硫化物塩、チオシアン酸塩、チオ尿素化合物、メルカプタン化合物、スルフィド化合物、ジスルフィド化合物、チオケトン化合物、チアゾール化合物、チオフェン化合物等が挙げられる。

[0140] 硫化物塩としては、例えば、硫化カリウム、硫化ナトリウム、多硫化ナトリウム、多硫化カリウム等が挙げられ、チオシアン酸塩としては、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸カリウム、ジチオシアン酸カリウム等が挙げられ、また、チオ尿素化合物としては、チオ尿素、メチルチオ尿素、ジメチ

ルチオ尿素等が挙げられる。

[0141] メルカプタン化合物としては、１，１－ジメチルエタンチオール、１－メチル－オクタンチオール、ドデカンチオール、１，２－エタンジチオール、チオフェノール、ｏ－チオクレゾール、ｐ－チオクレゾール、ｏ－ジメルカプトベンゼン、ｍ－ジメルカプトベンゼン、ｐ－ジメルカプトベンゼン、チオグリコール、チオジグリコール、チオグリコール酸、ジチオグリコール酸、チオリンゴ酸、メルカプトプロピオン酸、２－メルカプトベンゾオゾイミダゾール、２－メルカプト１－メチルイミダゾール、２－メルカプト－５－メチルベンゾイミダゾール、等が例示できる。

[0142] スルフィド化合物としては、ジエチルスルフィド、ジイソプロピルスルフィド、エチルイソプロピルスルフィド、ジフェニルスルフィド、メチルフェニルスルフィド、ローダニン、チオジグリコール酸、チオジプロピオン酸等が例示でき、ジスルフィド化合物としては、ジメチルジスルフィド、ジエチルジスルフィド、ジプロピルジスルフィド、等が例示できる。

[0143] 更に、チオケトン化合物としては、チオセミカルバジド等が例示でき、チアゾール化合物としてはチアゾール、ベンゾチアゾール、２－メルカプトベンゾチアゾール、６－エトキシ－２－メルカプトベンゾチアゾール、２－アミノチアゾール、２，１，３－ベンゾチアジアゾール、１，２，３－ベンゾチアジアゾール、（２－ベンゾチアゾリルチオ）酢酸、３－（２－ベンゾチアゾリルチオ）プロピオン酸等が例示でき、チオフェン化合物としては、チオフェン、ベンゾチオフェン等が例示できる。

[0144] 硫黄系化合物は、単独で用いてもよく、２種類以上を用いても良い。硫黄系化合物の含有量は１ｐｐｍ～５００ｐｐｍであることが好ましく、１ｐｐｍ～３０ｐｐｍであることがより好ましく、１ｐｐｍ～１０ｐｐｍであることが特に好ましい。硫黄系化合物の含有量が１ｐｐｍ未満では、析出速度が低下し、めっき付きまわり不良が生じ、皮膜外観が悪化する。５００ｐｐｍを超えると、濃度管理に困難を生じ、めっき液が不安定になる。

[0145] 無電解金めっき液には、上述の金塩、還元剤、重金属塩及び硫黄系化合物

に加えて、錯化剤、ｐＨ緩衝剤及び金属イオン隠蔽剤の少なくとも１つを含有することが好ましく、これ等すべてを含有することがより好ましい。

[0146] 本実施形態の無電解金めっき液には、錯化剤を含有させることが好ましい。具体的には亜硫酸塩、チオ硫酸塩、チオリンゴ酸塩等の非シアン系錯化剤が挙げられる。錯化剤の含有量は、めっき液の全容量を基準として１ｇ／Ｌ～２００ｇ／Ｌが好ましい。錯化剤の含有量が１ｇ／Ｌ未満である場合、金錯化力は低下し、安定性が低下する。２００ｇ／Ｌを超えると、めっき安定性は向上するが、液中に再結晶が発生し、経済的に芳しくない。錯化剤の含有量は２０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌとすることがより好ましい。

[0147] 無電解金めっき液には、ｐＨ緩衝剤を含有させることが好ましい。ｐＨ緩衝剤により析出速度を一定値に保ち、めっき液を安定化させる効果がある。緩衝剤は複数のものを混ぜても良い。ｐＨ緩衝剤としては、リン酸塩、酢酸塩、炭酸塩、硼酸塩、クエン酸塩、硫酸塩等が挙げられ、これ等の中では硼酸、硫酸塩が特に好ましい。

[0148] ｐＨ緩衝剤の含有量は、めっき液の全容量を基準として１ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌであることが好ましい。ｐＨ緩衝剤の含有量が１ｇ／Ｌ未満であると、ｐＨの緩衝効果がなく、１００ｇ／Ｌを超えると再結晶化してしまう恐れがある。より好ましい含有量は２０ｇ／Ｌ～５０ｇ／Ｌである。

[0149] 金めっき液には隠蔽剤を含有させることが好ましい。隠蔽剤としては、ベンゾトリアゾール系化合物を用いることができ、ベンゾトリアゾール系化合物としては、例えばベンゾトリアゾールナトリウム、ベンゾトリアゾールカリウム、テトラヒドロベンゾトリアゾール、メチルベンゾトリアゾール、ニトロベンゾトリアゾール等が例示できる。

[0150] 金属イオン隠蔽剤の含有量は、めっき液の全容量を基準として０．５ｇ／Ｌ～１００ｇ／Ｌであることが好ましい。金属イオン隠蔽剤の含有量が０．５ｇ／Ｌ未満であると、不純物の隠蔽効果が少なく、十分な液安定性を確保できない傾向がある。一方、１００ｇ／Ｌを超えると、めっき液中で再結晶化が生じる場合がある。コスト及び効果を鑑みると、２ｇ／Ｌ～１０ｇ／Ｌ

の範囲がもっとも好ましい。

[0151] 金めっき液のｐＨは５～１０の範囲であることが好ましい。めっき液のｐＨが５未満の場合、めっき液の錯化剤である亜硫酸塩又はチオ硫酸塩が分解し、毒性の亜硫酸ガスが発生する恐れがある。ｐＨが１０を超える場合、めっき液の安定性が低下する傾向がある。還元剤の析出効率を向上させ、速い析出速度を得るために、無電解金めっき液のｐＨは８～１０の範囲とすることが好ましい。

[0152] 無電解めっきの方法としては、置換金めっきが終了したフィルタを浸漬して金めっきを行う。

[0153] めっきの液温は５０℃～９５℃がよい。５０℃未満では析出効率が悪く、９５℃以上では液が不安定になりやすい。

[0154] このようにして形成される最外層の金めっき層７は、９９重量％以上の純度の金からなることが好ましい。金めっき層７の金の純度が９９重量％未満であると、接触部の細胞毒性が高くなる。信頼性を高める観点からは、金めっき層７の金の純度は、９９．５重量％以上であることがより好ましい。

[0155] また、金めっき層７の厚さは、０．００５～３μｍとすることが好ましく、０．０５～１μｍとすることがより好ましく、０．１μｍ～０．５μｍとすることが更に好ましい。金めっき層７の厚さを０．００５μｍ以上とすることで、金めっき層７の溶出をある程度抑制できる。一方、３μｍを超えても、それ以上効果が大きく向上しないため、経済的な観点からも３μｍ以下とすることが好ましい。

[0156] なお、金属フィルタに代えて高分子材料から構成されるフィルタを用いることもできる。高分子材料をフィルタの材質として用いる場合、金属と比較して成形加工性に優れるため、例えば貫通孔の形状や孔径をより細かく制御することができる。また、高分子材料から構成されるフィルタの主成分としてポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリテトラフルオロエチレン、ポリウレタン、ポリ乳酸、パリレン等を採用する場合、これらの材料は抗血栓性が強いという特徴を有する。

[0157] 高分子材料から構成されるフィルタの製造方法は特に限定されないが、例えば、トラックエッチング法を用いることができる。具体的には、フィルタの厚さに対応した厚さの高分子フィルムを準備し、当該高分子フィルムに対して、イオンビーム、中粒子線又はレーザ光等を照射することにより、貫通孔を形成する。また、必要に応じて、照射後、ケミカルエッチングにより貫通孔を形成してもよい。貫通孔が形成された高分子フィルムを、フィルタの形状に応じて裁断することで、高分子材料から構成されるフィルタを得ることができる。

[0158] このように、本実施形態に係る細胞捕捉デバイスに用いられるフィルタは、適宜変更することができる。

[0159] 以上、本発明の実施形態について説明したが、本発明に係る細胞捕捉方法、特定細胞捕捉済デバイスの製造方法、及び、特定細胞含有溶液の製造方法は適宜変更することができる。

[0160] 例えば、本発明の一形態に係る細胞捕捉方法において、液を流す工程において、フィルタ上の液面の高さが３０μｍ以上である態様とすることができる。

[0161] また、哺乳動物の全血、血清或いは血漿が、ウシ、ウマ及びヒトの何れかの由来である態様とすることができる。

[0162] 哺乳動物の全血、血清或いは血漿が、ヒト由来である態様とすることができる。

[0163] たんぱく質を含む水溶液がリン酸緩衝液を主成分とする態様とすることができる。

[0164] たんぱく質を含む水溶液が抗凝固剤を含む態様とすることができる。

[0165] 抗凝固剤がＥＤＴＡ、ヘパリン、クエン酸ナトリウム及びフッ化ナトリウムのいずれかである態様とすることができる。

[0166] 細胞含有溶液中の細胞が、ヒト血液中に存在する細胞である態様とすることができる。

[0167] 細胞含有溶液中の細胞が、ヒト白血球、血中循環腫瘍細胞、循環血管内皮

細胞及び癌幹細胞のいずれかを含む態様とすることができる。

[0168] フィルタが、ポリエチレンテレフタラート、ポリカーボネート又はパリレンを用いて成型加工されたものである態様とすることができる。

[0169] フィルタ表面が金、白金、パラジウム又はそれらの合金である態様とすることができる。

フィルタがニッケル、銅又はパラジウムを主成分とし、その表面に金、白金、パラジウム又はそれらの合金がめっきされている態様とすることができる。

[0170] フィルタの最外層が金である態様とすることができる。

[0171] フィルタの最外層は厚さが０．０５μｍ～１μｍの貴金属めっきである態様とすることができる。

[0172] フィルタの貫通孔を形成する形状が円、楕円、角丸長方形、長方形、正方形のいずれかである態様とすることができる。

[0173] フィルタの貫通孔を形成する形状が長方形及び角丸長方形のいずれか一つ以上の形状を含み、その短辺の長さが５μｍ～１５μｍである態様とすることができる。

[0174] フィルタの膜厚が３μｍ～５０μｍである態様とすることができる。

[0175] 前記貫通孔の平均開口率は０．１％～５０％である態様とすることができる。

[0176] また、本発明の一形態に係る特定細胞捕捉済デバイスの製造方法においては、前記液を流す工程において、フィルタ上の液面の高さが３０μｍ以上である態様とすることができる。

[0177] ここで、哺乳動物の全血、血清或いは血漿が、ウシ、ウマ及びヒトの何れかの由来である態様とすることができる。

[0178] 哺乳動物の全血、血清或いは血漿が、ヒト由来である態様とすることができる。

[0179] たんぱく質を含む水溶液がリン酸緩衝液を主成分とする態様とすることができる。

[0180] たんぱく質を含む水溶液が抗凝固剤を含む態様とすることができる。

[0181] 抗凝固剤がＥＤＴＡ、ヘパリン、クエン酸ナトリウム及びフッ化ナトリウムのいずれかである態様とすることができる。

[0182] 細胞含有溶液中の細胞が、ヒト血液中に存在する細胞である態様とすることができる。

[0183] 細胞含有溶液中の細胞が、ヒト白血球、血中循環腫瘍細胞、循環血管内皮細胞及び癌幹細胞のいずれかを含む態様とすることができる。

[0184] フィルタが、ポリエチレンテレフタラート、ポリカーボネート又はパリレンを用いて成型加工されたものである態様とすることができる。

[0185] フィルタ表面が金、白金、パラジウム又はそれらの合金である態様とすることができる。

[0186] フィルタがニッケル、銅又はパラジウムを主成分とし、その表面に金、白金、パラジウム又はそれらの合金がめっきされている態様とすることができる。

[0187] フィルタの最外層が金めっきである態様とすることができる。

[0188] フィルタの最外層は厚さが０．０５μｍ～１μｍの貴金属めっきである態様とすることができる。

[0189] フィルタの貫通孔を形成する形状が円、楕円、角丸長方形、長方形、正方形のいずれかである態様とすることができる。

[0190] フィルタの貫通孔を形成する形状が長方形、又は角丸長方形のいずれか一つ以上の形状を含み、その短辺の長さが５μｍ～１５μｍである態様とすることができる。

[0191] フィルタの膜厚が３μｍ～５０μｍである態様とすることができる。

[0192] 前記貫通孔の平均開口率は０．１％～５０％である態様とすることができる。

[0193] また、本発明の一形態に係る特定細胞含有溶液の製造方法においては、前記液を流す工程において、フィルタ上の液面の高さが３０μｍ以上である態様とすることができる。

[0194] ここで、細胞含有溶液の溶媒が、哺乳動物の全血、血清、血漿、またはそれらが由来のたんぱく質を含む水溶液からなる態様とすることができる。

[0195] 哺乳動物の全血、血清或いは血漿が、ウシ、ウマ、及びヒトの何れかの由来である態様とすることができる。

[0196] 哺乳動物の全血、血清或いは血漿が、ヒト由来である態様とすることができる。

[0197] たんぱく質を含む水溶液がリン酸緩衝液を主成分とする態様とすることができる。

[0198] たんぱく質を含む水溶液が抗凝固剤を含む態様とすることができる。

[0199] 抗凝固剤がＥＤＴＡ、ヘパリン、クエン酸ナトリウム及びフッ化ナトリウムのいずれかである態様とすることができる。

[0200] 細胞含有溶液中の細胞が、ヒト血液中に存在する細胞である態様とすることができる。

[0201] 細胞含有溶液中の細胞が、ヒト白血球、血中循環腫瘍細胞、循環血管内皮細胞、及び癌幹細胞のいずれかである態様とすることができる。

[0202] フィルタが、高分子又は金属を用いて成型加工される態様とすることができる。

[0203] フィルタが、ポリエチレンテレフタラート、ポリカーボネート、パリレンを用いて成型加工される態様とすることができる。

[0204] フィルタ表面が金、白金、パラジウム、又はそれらの合金である態様とすることができる。

[0205] フィルタがニッケル、銅又はパラジウムを主成分とし、その表面に金、白金、パラジウム、又はそれらの合金がめっきされている態様とすることができる。

[0206] フィルタの最外層が金めっきである態様とすることができる。

[0207] フィルタの最外層は厚さが０．０５μｍ～１μｍの貴金属めっきである態様とすることができる。

[0208] フィルタの貫通孔を形成する形状が円、楕円、角丸長方形、長方形、正方

形のいずれかである態様とすることができる。

[0209] フィルタの貫通孔を形成する形状が長方形、又は角丸長方形のいずれか一つ以上の形状を含み、その短辺の長さが５μｍ～１５μｍである態様とすることができる。

[0210] フィルタの膜厚が３μｍ～５０μｍである態様とすることができる。

[0211] 前記貫通孔の平均開口率は０．１％～５０％である態様とすることができる。

[0212] 前記細胞溶液、前記処理液を導入する速度が、５０μＬ／ｍｉｎ～１００μＬ／ｍｉｎである態様とすることができる。

実施例

[0213] （評価例１）

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。ラミネート条件はロール温度９０℃、圧力０．３ＭＰａ、コンベア速度２．０ｍ／分で行った。

[0214] 次に、光の透過部の形状が角丸長方形、サイズが７．８（短孔径）×１００（長孔径）μｍで開口率６．７％となるように設計したガラスマスクを基板のフォトレジストラミネート面に静置した。本実施例においては同一の方向を向いた角丸長方形が長軸及び短軸方向に一定のピッチで整列したガラスマスクを使用した。

[0215] 続いて、６００ｍｍＨｇ以下の真空下において、ガラスマスクを載置した基板上部から紫外線照射装置によって露光量３０ｍＪ／ｃｍ^{2}の紫外線を照射した。

[0216] 次に、１．０％炭酸ナトリウム水溶液で現像を行い、基板上に長方形のフォトレジストが垂直に立ったレジスト層を形成した。このレジスト付き基板の銅露出部分にｐＨが４．５になるように調整したニッケルめっき液中温度５５℃、約２０分間約２０μｍめっきを行った。ニッケルめっき液の組成を

表１に示す。

[0217] [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

[0218] 次に、得られたニッケルめっき層を基板のピーラブル銅箔とともに剥離し、このピーラブル銅箔を温度４０℃で約１２０分間、攪拌処理での薬液による化学的溶解（メックブライトＳＦ－５４２０Ｂ、メック株式会社）によって除去することにより金属フィルタとなる自立膜（２０ｍｍ×２０ｍｍ）を取り出した。

[0219] 最後に、自立膜内に残ったフォトレジストを温度６０℃で約４０分間、超音波処理でのレジスト剥離（Ｐ３　Ｐｏｌｅｖｅ、Ｈｅｎｋｅｌ）によって除去し、微細貫通孔を有する金属フィルタを作製した。

[0220] これによって、シワ・折れ・キズ・カール等のダメージはなく、十分な精度の貫通孔を有する金属フィルタを作製した。

[0221] 次に、酸性脱脂液Ｚ－２００（ワールドメタル製：商品名）に金属フィルタを浸漬し、金属フィルタ上の有機物の除去を行った（４０℃３分）。

[0222] 水洗後、非シアン系の無電解ＡｕめっきであるＨＧＳ－１００（日立化成製：商品名）から金供給源である亜硫酸金を抜いた液により８０℃１０分の条件で置換金めっき前処理を行った。

[0223] 次に非シアン系の置換型無電解ＡｕめっきであるＨＧＳ－１００（日立化成製商品名）に８０℃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。

[0224] 水洗後、非シアン系還元型無電解ＡｕめっきであるＨＧＳ－５４００（日立化成製商品名）に６５℃１０分浸漬し、金めっきを行い、水洗後乾燥を行った。金めっきのトータル厚みは０．２μｍであった。以上により評価例１に係るフィルタを作成した。

[0225] （評価例２）

電気Ｎｉめっきの変わりに電気パラジウムめっきを用いた以外は評価例１と同様に評価例２に係るフィルタを作製した。電気パラジウムめっき液はパラディックスＬＦ－５（日本エレクトロプレイティング・エンジニヤース株式会社：商品名）を用いた。めっき温度は５０℃、電流密度１Ａ／ｄｍ２の条件でめっきを行い、約４．２分／μｍの条件で約２０μｍとなるように電気めっきを行った以外は評価例１と同様の条件でめっきを行った。

[0226] （評価例３）

ＭＣＬのピーラブル銅箔の代わりにピーラブルニッケル箔を用いた（電気めっき後はニッケル箔を除去）。さらに電気Ｎｉめっきの変わりに電気銅めっきを用いた以外は評価例１と同様に表面に評価例３に係るフィルタを作製した。を作製した。電気銅めっき液はミクロファブＣｕ２００（日本エレクトロプレイティング・エンジニヤース株式会社：商品名）を用いた。めっき温度は２５℃、電流密度３Ａ／ｄｍ２の条件でめっきを行い、約１．５分／μｍの条件で約２０μｍとなるように電気めっきを行った以外は評価例１と同様の条件でめっきを行った。

[0227] （評価例４）

金めっきを行わなかったこと以外は評価例１と同様に評価例４に係るフィルタを作製した。

[0228] （評価例５）

２段階の金めっきの代わりに１段階の無電解パラジウムめっきを行った以外は評価例１と同様に評価例５に係るフィルタを作製した。無電解パラジウムめっき液にはパラデックスストライク３（日本エレクトロプレイティング・エンジニヤース株式会社製：商品名）を用いた。パラジウムの厚みは０．１μｍであった。

[0229] （評価例６）

２段階の金めっきの代わりに１段階の無電解白金めっきを行った以外は評価例１と同様に評価例６に係るフィルタを作製した。無電解白金めっき液に

はレクトレスＰｔ１００（日本エレクトロプレイティング・エンジニヤース株式会社製：商品名）を用いた。白金の厚みは０．１μｍであった。

[0230] （実験）

（非小細胞癌細胞株の調製）

非小細胞癌細胞株であるＮＣＩ－Ｈ３５８細胞を１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含むＲＰＭＩ－１６４０培地にて、３７℃、５％CO_2条件下にて静置培養した。トリプシン処理により培養皿から細胞を剥離させて回収し、リン酸緩衝液（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｂｕｆｆｅｒｅｄ ｓａｌｉｎｅ、ＰＢＳ）を用いて洗浄した後に、１０μＭ ＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ ＲｅｄＣＭＴＰＸ（ライフテクノロジーズジャパン株式会社）にて３７℃、３０分間静置させることで、ＮＣＩ－Ｈ３５８細胞を染色した。その後、ＰＢＳにて洗浄し、トリプシン処理にて３７℃にて３分間静置させることで、細胞塊を解離させた。その後、培地にてトリプシン処理を停止させ、ＰＢＳにて洗浄後、２ｍＭＥＤＴＡ及び０．５％ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含むＰＢＳ（以下２ｍＭ ＥＤＴＡ－０．５％ ＢＳＡ－ＰＢＳという。）に懸濁して、調整用の懸濁液を得た。なお、ＰＢＳはリン酸緩衝生理食塩水であり和光純薬工業製製品コード１６６－２３５５５を用いた。ＢＳＡはＳＩＧＭＡ－ＡＬＤＲＩＣＨ社製（Ｐｒｏｄｕｃｔ Ｎａｍｅ ： Ａｌｂｕｍｉｎ ｆｒｏｍ ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ－Ｌｙｏｐｈｉｌｉｚｅｄ ｐｏｗｄｅｒ, Ｂｉｏ Ｒｅａｇｅｎｔ ｆｏｒ ｃｅｌｌ ｃｕｌｔｕｒｅ）のものを用いた。ＥＤＴＡは２Ｎａ（エチレンジアミン－Ｎ，Ｎ，Ｎ’，，Ｎ’－４酢酸二ナトリウム塩二水和物）（和光純薬工業製製品コード３４５－０１８６５）を用いた。

[0231] ＜液体を一度も引き抜かずに連続的に処理を行った場合の細胞形態評価＞

（実施例１）

評価例１のフィルタをカートリッジ（本実施形態に係る細胞捕捉デバイスに相当する）にセットしたＣＴＣ回収装置：ＣＴ６０００（日立化成製商品名）を用いて実験を行った。ＣＴＣ回収装置は血液サンプルや試薬を導入す

るための流路を備えており、流路の入り口は、シリンジを加工して作製したリザーバーに接続した。このリザーバーに、血液サンプルや試薬を順次投入していくことで、ＣＴＣの捕捉、染色、洗浄などの操作を連続的に容易に行えるようにした。

[0232] ＣＴＣ回収装置に血液サンプルを導入して癌細胞を濃縮した。血液サンプルとして、ＥＤＴＡ含有真空採血管に採血した健常者血液に、血液１ｍＬあたり１０００個の癌細胞を含有させたサンプルを用いた。癌細胞としては、上記のヒト非小細胞肺癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８を使用した。なお、血液は採血後６時間のものを用いた。

[0233] まず、リザーバーに、２ｍＭ ＥＤＴＡ－０．５％ ＢＳＡ（牛血清アルブミン）－ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ製ＰＢＳｐＨ７．４） １ｍｌ（以下洗浄液）を導入し、フィルタ上を満たし、１０分放置した。続いて、ペリスタルティックポンプを使用して流速２００μＬ／分で送液を開始した。その後、血液３ｍｌを投入した。約５分後、リザーバーに９ｍＬの洗浄液を導入して細胞の洗浄を行った。

[0234] 次に洗浄液に４％ＰＦＡを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。洗浄後、洗浄液に０．２％ＴｒｉｔｏｎＸを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。

[0235] さらに１０分後、ポンプ流速を２０μＬ／分に変更し、リザーバーに６００μＬの細胞染色液（Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２：３０μＬ、Ｗａｓｈ ｂｕｆｆｅｒ：３００ｍｌ）を導入し、フィルタ上の癌細胞または白血球を蛍光染色した。フィルタ上に捕捉された細胞に対して３０分間染色を行った後、リザーバーに１ｍＬの２ｍＭ ＥＤＴＡ－０．５％ ＢＳＡ－ＰＢＳを導入して細胞の洗浄を行った。

[0236] 続いて、コンピュータ制御式電気ステージ及び冷却デジタルカメラ（ＤＰ７０、オリンパス株式会社）を装備した蛍光顕微鏡（ＢＸ６１、オリンパス株式会社）を使用して、フィルタ上の癌細胞及び白血球の撮像を行った。Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２及びＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ Ｒｅｄ ＣＭＴＰ

Ｘ由来の蛍光を観察するために、それぞれＷＵ及びＷＩＧフィルタ（オリンパス株式会社）を用いて画像を取得した。画像取得及び解析ソフトにはＬｕｍｉｎａ　Ｖｉｓｉｏｎ（三谷商事株式会社）を用いた。撮像した細胞の画像解析を行い、孔内に挟み込まれた四角形の細胞と、フィルタ上で円形を保持している細胞の２つに分類した。

[0237]（実施例２）

血液の導入速度を４００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１と同様の条件で実験を行った。

[0238]（実施例３）

血液の導入速度を６００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１と同様の条件で実験を行った。

[0239]（実施例４）

血液の導入速度を８００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１と同様の条件で実験を行った。

[0240]（比較例１）

まず、リザーバーに、洗浄液１ｍｌ（以下洗浄液）を導入し、フィルタ上を満たし、１０分放置した。続いて、ペリスタポンプを使用して流速２００μＬ／分で送液を開始した。その後、血液３ｍｌを投入した。約５分後、リザーバーに９ｍＬの洗浄液を導入して細胞の洗浄を行った。その後、実施例１と同様の方法で実験を行い、細胞を染色した後、細胞捕捉デバイス（カートリッジ）内の液体を２００μＬ／ｍｉｎの速度で引き抜き、蛍光顕微鏡で撮影を行った。撮像した細胞の画像解析を行い、孔内に挟み込まれている細胞と、円形を保持している細胞の２つに分類を行った。

[0241]（比較例２）

比較例１と同様の方法で実験を行い、細胞捕捉デバイス内の液体を５０μＬ／ｍｉｎの速度で引き抜き、蛍光顕微鏡で撮影を行った。

[0242]（比較例３）

比較例１と同様の方法で実験を行い、細胞捕捉デバイス内の液体を２μＬ／

ｍｉｎの速度で引き抜き、蛍光顕微鏡で撮影を行った。

[0243] ＜１回目～ｎ回目の液体を流す工程の間において、一度液体を完全に引き抜いた後に、再度液体を導入した場合の細胞形態評価＞

（比較例４）

実施例１と同様の方法で実験を行い、染色液導入後の洗浄が終了した後に、５０μＬ／ｍｉｎの速度で細胞捕捉デバイス内の液体を完全に引き抜いた。液体を完全に引き抜いた後、再度リザーバーから洗浄液を２００μ／ｍｉｎの速度で導入した。その後、蛍光顕微鏡で撮影を行い、撮像した細胞の画像解析を行い、孔内に挟み込まれている細胞と、円形を保持している細胞の２つに分類を行った。

[0244] （結果）

まず、実施例１の捕捉後の細胞の写真を図６に示す。実施例１では、細胞が円形であることを確認でき、細胞の粒径も理論平均粒径の１８μｍ前後であった。これより、細胞捕捉後に液を抜ききらずに細胞を保存することで、細胞の形態を維持することが可能となり、孔内に挟まることもなく取り出すことが可能であることが示唆された。

[0245] 実施例４の捕捉後の細胞の写真を図７に示す。実施例１と同様に、細胞が円形であることを確認でき、細胞の粒径も理論粒径の１８　μｍ前後であった。

[0246] 比較例１の捕捉後の細胞の写真を図８に示す。比較例１では、液を引き抜かれた後、フィルタ上に捕捉された細胞は、液の吸引の圧力によって、フィルタの貫通孔に細胞が嵌まってしまい、細胞が四角く変形し、孔径に挟み込まれている様子が確認された。

[0247] 比較例４の捕捉後の細胞の写真を図９に示す。比較例１と同様に、細胞が四角く変形し、孔内に挟み込まれている様子が確認された。

[0248] 次に、各実施例１～６及び比較例１～４について、孔内に挟み込まれている細胞と、円形を保持している細胞の２つに分類を行った結果を表２に示す。

[0249] [表2]

	血液導入速度 [μL/min]	液引き抜き速度[μL/min]	円形の細胞 [%]	四角形の細胞 (挟み込まれ)[%]
実施例1	200	-	97.2	2.8
実施例2	400	-	98.0	2.0
実施例3	600	-	98.5	1.5
実施例4	800	-	96.5	3.5
実施例5	400	-	98.8	1.2
実施例6	600	-	97.6	2.4
比較例1	400	200	2.0	98.0
比較例2	400	50	0	100
比較例3	400	2	1.2	98.8
比較例4	400	50 *その後液再導入	0	100

[0250] 表２に示すように、液体の引き抜きを行わなかった実施例１～６においては、９５％以上の細胞が円形であり、四角形の細胞はわずかに５％以下であった。それに対して、液体の引き抜きを行った比較例１，２においては、９８％以上の細胞が孔内に挟み込まれて四角形であった。また、比較例３において２μＬ／ｍｉｎの低速度で液体を引き抜いた場合においても、８０％の細胞が四角形であった。更に、比較例４において液体を引き抜いた後に、液体を再導入した場合においても、全ての細胞が四角形であった。

[0251] 評価対象の特定の細胞（例えば、ＣＴＣ）が孔内に挟み込まれた場合、特定の細胞を検出する際に形態学的に判断することが困難となり、誤診につながる恐れがある。また、孔内に挟み込まれることにより、フィルタ上から特定の細胞を取り出すことが困難となり、細胞の解析・診断を行うことが難しくなる。このことより、細胞捕捉デバイス内の液体を最終工程まで一度も引き抜くことなく、連続的に行うことで、細胞の形を安定的に保持することが可能であることが示唆された。

[0252] ＜フィルタ上の液体の液面の高さを変えた場合の細胞形態評価＞

（実施例７）

実施例１と同様の方法を用いて、細胞の捕捉、染色、洗浄などの操作を行った。フィルタ表面からの液の高さを５０μｍに設定し液置換の操作を行った。フィルタ表面からの液面の高さは、フィルタ表面積と質量より算出し、液面を５０μｍに設定した。

[0253] 液面の高さは次式を用いて算出した。

液面の高さ（μｍ）＝体積（μｍ^3）÷表面積（μｍ^2）

体積（μｍ^3）＝質量（μｇ）÷比重

[0254] 実施例１と同様の操作で顕微鏡を用いて撮像した細胞の画像解析を行い、孔内に挟み込まれた四角形の細胞と、フィルタ上で円形を保持している細胞の２つに分類した。

[0255] （実施例８）

実施例７と同様の方法を用いて、フィルタ表面からの液の高さを３０μｍに設定し、液置換の操作を行った。フィルタ表面からの液面の高さは、フィルタ表面積と質量より算出し、液面を３０μｍに設定した。

[0256] （実施例９）

実施例７と同様の方法を用いて、フィルタ表面からの液の高さを２０μｍに設定し、液置換の操作を行った。フィルタ表面からの液面の高さは、フィルタ表面積と質量より算出し、液面を２０μｍに設定した。

[0257] （実施例１０）

実施例７と同様の方法を用いて、液置換の操作をフィルタ表面からの液の高さを１０μｍに設定し処理を行った。フィルタ表面からの液面の高さは、フィルタ表面積と質量より算出し、液面を１０μｍに設定した。

[0258] （比較例５）

実施例７と同様の方法を用いて、液置換の操作をフィルタ表面からの液の高さを０μｍに設定し処理を行った。液を交換する時に、液体を全て細胞捕捉デバイス内から抜いてから処理を行うことで液面の高さを０μｍと設定した。

[0259] （結果）

実施例７～実施例１０及び比較例５の結果を表３に示す。

[0260] [表3]

	液面の高さ [μm]	円形の細胞 [%]	四角形の細胞 (挟み込まれ)[%]
実施例7	50	98.2	1.8
実施例8	30	62.5	37.5
実施例9	20	10.3	89.7
実施例10	10	2.6	97.4
比較例5	0	0	100

[0261] 表３に示すように、液面の高さを５０μｍに設定した場合においては、９８％以上の細胞が円形であり、四角形の細胞は２％以下であった。一方で、液面の高さを３０μｍ，２０μｍ，１０μｍに下げていくことにより、円形の細胞の割合が低下し、四角形の細胞の割合が上昇した。比較例４の液面の高さが０μｍの場合においては、全ての細胞が孔内に挟み込まれ変形していた。

[0262] このことより、半分以上の細胞が変形せずに円形を保持することが可能な液面の高さは、３０μｍ以上である必要性が示された。また、液面の高さを５０μｍ以上とした場合には、さらに細胞が変形せずに円形を保持する割合を高めることができることも確認された。

[0263] ＜フィルタ上に捕捉した細胞を取り出す実験１：逆洗浄による取り出し（排出流路→導入流路）＞

（実施例１１）

評価例１のフィルタをカートリッジ（本実施形態に係る細胞捕捉デバイスに相当する）にセットしたＣＴＣ回収装置：ＣＴ６０００（日立化成製商品名）を用いて実験を行った。ＣＴＣ回収装置は血液サンプルや試薬を導入す

るための流路を備えており、流路の入り口は、シリンジを加工して作製したリザーバーに接続した。このリザーバーに、血液サンプルや試薬を順次投入していくことで、ＣＴＣの捕捉、染色、洗浄などの操作を連続的に容易に行えるようにした。

[0264] ＣＴＣ回収装置に血液サンプルを導入して癌細胞を濃縮した。血液サンプルとして、ＥＤＴＡ含有真空採血管に採血した健常者血液に、血液１ｍＬあたり１０００個の癌細胞を含有させたサンプルを用いた。癌細胞としては、上記のヒト非小細胞肺癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８を使用した。尚、血液は採血後６時間のものを用いた。

[0265] まず、リザーバーに、２ｍＭ ＥＤＴＡ－０．５％ ＢＳＡ（牛血清アルブミン）－ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ製ＰＢＳｐＨ７．４） １ｍｌ（以下洗浄液）を導入し、フィルタ上を満たし、１０分放置した。続いて、ペリスタルティックポンプを使用して流速２００μＬ／分で送液を開始した。その後、血液３ｍｌを投入した。約５分後、リザーバーに９ｍＬの洗浄液を導入して細胞の洗浄を行った。

[0266] 次に洗浄液に４％ＰＦＡを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。洗浄後、洗浄液に０．２％ＴｒｉｔｏｎＸを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。

[0267] さらに１０分後、ポンプ流速を２０μＬ／分に変更し、リザーバーに６００μＬの細胞染色液（Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２：３０μＬ、Ｗａｓｈ ｂｕｆｆｅｒ：３００ｍｌ）を導入し、フィルタ上の癌細胞または白血球を蛍光染色した。フィルタ上に捕捉された細胞に対して３０分間染色を行った後、リザーバーに１ｍＬの２ｍＭ ＥＤＴＡ－０．５％ ＢＳＡ－ＰＢＳを導入して細胞の洗浄を行った。

[0268] 続いて、コンピュータ制御式電気ステージ及び冷却デジタルカメラ（ＤＰ７０、オリンパス株式会社）を装備した蛍光顕微鏡（ＢＸ６１、オリンパス株式会社）を使用して、フィルタ上の癌細胞及び白血球の撮像を行った。Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２及びＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ Ｒｅｄ ＣＭＴＰ

Ｘ由来の蛍光を観察するために、それぞれＷＵ及びＷＩＧフィルタ（オリンパス株式会社）を用いて画像を取得した。画像取得及び解析ソフトにはＬｕｍｉｎａ　Ｖｉｓｉｏｎ（三谷商事株式会社）を用いた。撮像した細胞の画像解析を行い、フィルタ上に捕捉されたがん細胞の数を計数した。

[0269] 撮像が終了したカートリッジ（本実施形態に係る特定細胞捕捉済デバイスに相当する）のバルブを全て閉めた後に、排出流路２３（図２参照）から導入流路２５（図２参照）へ液体が流れるように組み換えを行った。排出流路２３側にシリンジポンプＴＥ－３５１（テルモ株式会社）を接続し、２００μＬ／ｍｉｎの速度で６分間送液（逆洗浄）を行った。導入流路から排出された溶液を約１ｍｌを遠心沈殿管内に回収した。

[0270] 新しいカートリッジをセットしたＣＴＣ回収装置：ＣＴ６０００（日立化成製商品名）を用いて、逆洗浄で回収した細胞含有溶液をシリンジに導入することにより、フィルタ上で細胞の再捕捉を行い、回収できた細胞数の計数を行った。ＣＴＣ回収装置は血液サンプルや試薬を導入するための流路を備えており、流路の入り口は、シリンジを加工して作製したリザーバーに接続した。

[0271] 再捕捉した細胞を同様の蛍光顕微鏡を用いて計数を行った。

[0272] 逆洗浄後のがん細胞の捕捉数÷始めに捕捉したがん細胞＝逆洗浄によるがん細胞の回収率を算出した。

[0273]（実施例１２）

逆洗浄時の速度を４００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１１と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0274]（実施例１３）

逆洗浄時の速度を８００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１１と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0275]（実施例１４）

逆洗浄による送液を行う前に、Ｖｏｌｔｅｘ　（Ｆ２０２Ａ０１７５）（ＶＥＬＰ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃａ製）を用いて特定細胞捕捉済デバイスに

対して２００ｒｐｍの振動を５秒間与える以外は、実施例１１と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0276] （実施例１５）

逆洗浄時の速度を４００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１４と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0277] （実施例１６）

逆洗浄時の速度を８００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１４と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0278] （比較例６）

細胞染色が終了した後に、細胞捕捉デバイス内の液体を５０μＬ／ｍｉｎの速度で引き抜き、蛍光顕微鏡で撮影を行った以外は、実施例１１と同様の方法で実験を行った。

[0279] （比較例７）

細胞染色が終了した後に、細胞捕捉デバイス内の液体を５０μＬ／ｍｉｎの速度で引き抜き、蛍光顕微鏡で撮影を行った以外は、実施例１４と同様の方法で実験を行った。

[0280] （結果）

実施例１１～実施例１６及び比較例６，７の結果を表４に示す。

[0281] [表4]

	逆洗浄前液有無	逆洗浄前振動有無	逆洗浄時流速[μl/min]	逆洗浄前捕捉数[cells]	逆洗浄後捕捉数[cells]	回収率[%]
実施例11	有	無	200	1257	718	57.1
実施例12	有	無	400	1113	854	76.7
実施例13	有	無	800	1008	689	68.4
実施例14	有	有	200	1217	863	70.9
実施例15	有	有	400	1194	905	75.8
実施例16	有	有	800	992	758	76.4
比較例6	無	無	400	1098	152	13.8
比較例7	無	有	400	1167	322	27.6

[0282] 表４の結果から、細胞捕捉デバイス内の液体を残した状態で、逆洗浄を行った場合（実施例１１～１６）においては、逆洗浄後の細胞の回収率が５０％以上であった。さらに、逆洗浄前に振動を加えた場合においては（実施例１４～１６）、振動を加えない場合よりも細胞の回収率が向上した。一方で、細胞捕捉デバイス内の液体を全て引き抜いた状態で、逆洗浄を行った場合（比較例６，７）においては、逆洗浄による回収率が１０～３０％と低い結果となった。これより、逆洗浄を行う場合において、細胞捕捉デバイス内の液体を引き抜かない状態で逆洗浄を行うことの重要性が示唆された。

[0283] ＜フィルタ上に捕捉した細胞を取り出す実験２：逆洗浄による取り出し（導入流路１→導入流路２）＞

[0284] （実施例１７）

評価例１のフィルタをカートリッジ（本実施形態に係る細胞捕捉デバイスに相当する）にセットしたＣＴＣ回収装置：ＣＴ６０００（日立化成製商品名）を用いて実験を行った。ＣＴＣ回収装置は血液サンプルや試薬を導入するための流路を備えており、流路の入り口は、シリンジを加工して作製したリザーバーに接続した。このリザーバーに、血液サンプルや試薬を順次投入していくことで、ＣＴＣの捕捉、染色、洗浄などの操作を連続的に容易に行えるようにした。

[0285] ＣＴＣ回収装置に血液サンプルを導入して癌細胞を濃縮した。血液サンプルとして、ＥＤＴＡ含有真空採血管に採血した健常者血液に、血液１ｍＬあたり１０００個の癌細胞を含有させたサンプルを用いた。癌細胞としては、上記のヒト非小細胞肺癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８を使用した。尚、血液は採血後６時間のものを用いた。

[0286] まず、リザーバーに、２ｍＭ ＥＤＴＡ－０．５％ ＢＳＡ（牛血清アルブミン）－ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ製ＰＢＳｐＨ７．４） １ｍｌ（以下洗浄液）を導入し、フィルタ上を満たし、１０分放置した。続いて、ペリスタルティックポンプを使用して流速２００μＬ／分で送液を開始した。その後、血

液３ｍｌを投入した。約５分後、リザーバーに９ｍＬの洗浄液を導入して細胞の洗浄を行った。

[0287] 次に洗浄液に４％ＰＦＡを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。洗浄後、洗浄液に０．２％ＴｒｉｔｏｎＸを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。

[0288] さらに１０分後、ポンプ流速を２０μＬ／分に変更し、リザーバーに６００μＬの細胞染色液（Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２：３０μＬ、Ｗａｓｈ ｂｕｆｆｅｒ：３００ｍｌ）を導入し、フィルタ上の癌細胞または白血球を蛍光染色した。フィルタ上に捕捉された細胞に対して３０分間染色を行った後、リザーバーに１ｍＬの２ｍＭ ＥＤＴＡ－０．５％ ＢＳＡ－ＰＢＳを導入して細胞の洗浄を行った。

[0289] 続いて、コンピュータ制御式電気ステージ及び冷却デジタルカメラ（ＤＰ７０、オリンパス株式会社）を装備した蛍光顕微鏡（ＢＸ６１、オリンパス株式会社）を使用して、フィルタ上の癌細胞及び白血球の撮像を行った。Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２及びＣｅｌｌＴｒａｃｋｅｒ Ｒｅｄ ＣＭＴＰＸ由来の蛍光を観察するために、それぞれＷＵ及びＷＩＧフィルタ（オリンパス株式会社）を用いて画像を取得した。画像取得及び解析ソフトにはＬｕｍｉｎａ Ｖｉｓｉｏｎ（三谷商事株式会社）を用いた。撮像した細胞の画像解析を行い、フィルタ上に捕捉されたがん細胞の数を計数した。

[0290] 撮像が終了したカートリッジ（本実施形態に係る特定細胞捕捉済デバイスに相当する）のバルブを全て閉めた後に、排出流路２３（図２参照）から導入流路２５（図２参照）へ液体が流れるように組み換えを行った。排出流路２３側にシリンジポンプＴＥ－３５１（テルモ株式会社）を接続し、２００μＬ／ｍｉｎの速度で６分間送液（逆洗浄）を行った。導入流路から排出された溶液を約１ｍｌを遠心沈殿管内に回収した。

[0291] 新しいカートリッジをセットしたＣＴＣ回収装置：ＣＴ６０００（日立化成製商品名）を用いて、逆洗浄で回収した細胞含有溶液をシリンジに導入することにより、フィルタ上で細胞を再捕捉を行い、回収できた細胞数の計数

を行った。ＣＴＣ回収装置は血液サンプルや試薬を導入するための流路を備えており、流路の入り口は、シリンジを加工して作製したリザーバーに接続した。

[0292] 再捕捉した細胞を同様の蛍光顕微鏡を用いて計数を行った。

[0293] 逆洗浄後のがん細胞の捕捉数÷始めに捕捉したがん細胞＝逆洗浄によるがん細胞の回収率を算出した。

[0294] （実施例１８）

逆洗浄時の速度を４００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１８と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0295] （実施例１９）

逆洗浄時の速度を８００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例１８と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0296] （実施例２０）

逆洗浄による送液を行う前に、Ｖｏｌｔｅｘ （Ｆ２０２Ａ０１７５）（ＶＥＬＰ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃａ製）を用いて特定細胞捕捉済デバイスに対して２００ｒｐｍの振動を５秒間与える以外は、実施例１８と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0297] （実施例２１）

逆洗浄時の速度を４００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例２１と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0298] （実施例２２）

逆洗浄時の速度を８００μＬ／ｍｉｎで行った以外は、実施例２１と同様の方法を用いて、実験を行った。

[0299] （比較例８）

細胞染色が終了した後に、カートリッジ内の液体を５０μＬ／ｍｉｎの速度で引き抜き、蛍光顕微鏡で撮影を行った以外は、実施例１７と同様の方法で実験を行った。

[0300] （比較例９）

細胞染色が終了した後に、カートリッジ内の液体を５０μＬ／ｍｉｎの速度で引き抜き、蛍光顕微鏡で撮影を行った以外は、実施例２０と同様の方法で実験を行った。

[0301] （結果）

実施例１７～実施例２２及び比較例８，９の結果を表５に示す。

[0302] [表5]

	逆洗浄前液有無	逆洗浄前振動有無	逆洗浄時流速[μl/min]	逆洗浄前捕捉数[cells]	逆洗浄後捕捉数[cells]	回収率[%]
実施例17	有	無	200	1322	881	51.5
実施例18	有	無	400	1081	611	56.5
実施例19	有	無	800	892	665	74.6
実施例20	有	有	200	1033	761	73.7
実施例21	有	有	400	1115	812	72.8
実施例22	有	有	800	908	680	74.9
比較例8	無	無	400	1280	341	26.6
比較例9	無	無	400	887	127	14.3

[0303] 表５の結果から、細胞捕捉デバイス内の液体を残した状態で、逆洗浄を行った場合（実施例１７～２２）においては、逆洗浄後の細胞の回収率が５０％以上であった。さらに、逆洗浄前に振動を加えた場合においては（実施例２０～２２）、振動を加えない場合よりも細胞の回収率が向上した。一方で、細胞捕捉デバイス内の液体を全て引き抜いた状態で、逆洗浄を行った場合（比較例８，９）においては、逆洗浄による回収率が低い結果となった。これより、逆洗浄を行う場合において、細胞捕捉デバイス内の液体を引き抜かない状態で逆洗浄を行うことの重要性が示唆された。

[0304] ＜フィルタ上に捕捉した細胞を取り出す実験３：液採取（吸引）による細胞回収方法（開放型筐体）＞

（実施例２３）

評価例１のフィルタを図１の筐体にセットし、ペリスタポンプ（ＳＪ－１２１５）（アトー株式会社）を用いて液体の吸引を行い、フィルタ上に細胞

の捕捉を行った。血液の導入は、２つのシリンジにシリコンチューブを接続し、三方活栓（ＴＳ－ＴＬ１Ｋ）（テルモ社製）を用いてそれぞれ別のシリンジから血液と洗浄溶液の導入を行った。

[0305] まず、リザーバーに、２ｍＭ　ＥＤＴＡ－０．５％　ＢＳＡ（牛血清アルブミン）－ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ製ＰＢＳｐＨ７．４）　１ｍｌ（以下洗浄液）を導入し、フィルタ上を満たし、１０分放置した。続いて、ペリスタルティックポンプを使用して流速２００μＬ／分で送液を開始した。その後、血液３ｍｌを投入した。約５分後、リザーバーに９ｍＬの洗浄液を導入して細胞の洗浄を行った。

[0306] 第一のシリンジに血液サンプルを導入して癌細胞をフィルタ上に濃縮した。血液サンプルとして、ＥＤＴＡ含有真空採血管に採血した健常者血液に、血液１ｍＬあたり１０００個の癌細胞を含有させたサンプルを用いた。癌細胞としては、上記のヒト非小細胞肺癌細胞株ＮＣＩ－Ｈ３５８を使用した。尚、血液は採血後６時間のものを用いた。

[0307] 次に洗浄液に４％ＰＦＡを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。洗浄後、洗浄液に０．２％ＴｒｉｔｏｎＸを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を１５分浸した。

[0308] さらに１０分後、ポンプ流速を２０μＬ／分に変更し、リザーバーに６００μＬの細胞染色液（Ｈｏｅｃｈｓｔ３３３４２：３０μＬ、Ｗａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒ：３００ｍｌ）を導入し、フィルタ上の癌細胞または白血球を蛍光染色した。フィルタ上に捕捉された細胞に対して３０分間染色を行った後、リザーバーに１ｍＬの２ｍＭ　ＥＤＴＡ－０．５％　ＢＳＡ－ＰＢＳを導入して細胞の洗浄を行った。最後の洗浄液を導入するまでの間、一度も液体を引き抜くことなく、連続的に液体を導入する方法で行った。

[0309] 続いて、液体の導入を止め、液面を筐体の枠組みの高さで保持させた状態で停止した。その状態で、マイクロピペットを用いてフィルタ上の液体を採取（吸引）した。採取した液体を、新しいカートリッジをセットしたＣＴＣ回収装置：ＣＴ６０００（日立化成製商品名）を用いて、逆洗浄で回収した

細胞含有溶液をシリンジに導入することにより、フィルタ上で細胞を再捕捉を行い、回収できた細胞数の計数を行った。ＣＴＣ回収装置は血液サンプルや試薬を導入するための流路を備えており、流路の入り口は、シリンジを加工して作製したリザーバーに接続した。

[0310] 再捕捉した細胞を同様の蛍光顕微鏡を用いて計数を行った。

[0311] 逆洗浄後のがん細胞の捕捉数÷始めに導入したがん細胞（理論値）＝逆洗浄によるがん細胞の回収率を算出した。

[0312]（比較例１０）

実施例２３と同様の方法で実験を行い、染色液導入後の洗浄が終了した後に、５０μＬ／ｍｉｎの速度で筐体内の液体を完全に引き抜いた。液体を完全に引き抜いた後、再度リザーバーから洗浄液を２００μ／ｍｉｎの速度で導入した。

[0313] 続いて、液体の導入を止め、液面を筐体の枠組みの高さで保持させた状態で停止した。その状態で、マイクロピペットを用いてフィルタ上の液体を採取した。採取した液体を、新しいカートリッジをセットしたＣＴＣ回収装置：ＣＴ６０００（日立化成製商品名）を用いて、逆洗浄で回収した細胞含有溶液をシリンジに導入することにより、フィルタ上で細胞を再捕捉を行い、回収できた細胞数の計数を行った。ＣＴＣ回収装置は血液サンプルや試薬を導入するための流路を備えており、流路の入り口は、シリンジを加工して作製したリザーバーに接続した。

[0314] 再捕捉した細胞を同様の蛍光顕微鏡を用いて計数を行った。

[0315] 逆洗浄後のがん細胞の捕捉数÷始めに導入したがん細胞（理論値）＝液採取によるがん細胞の回収率を算出した。

[0316]（結果）

実施例２３及び比較例１０の結果を表６に示す。

[0317]

[表6]

	液抜きの有無	導入した理論細胞数[cells]	液抜き後に再捕捉した細胞数[cells]	回収率[%]
実施例23	無	1000	781	78.1
比較例10	有	1000	182	18.2

[0318] 表６より、液採取（吸引）による細胞回収方法においても、途中の工程で液体を筐体内から引き抜かない場合においては、細胞の回収率が７０％以上と高い値であった。一方で、液体を導入する工程の途中で、液体を一度引き抜いた場合においては、細胞の回収率が１８％と低い値であった。これより、液採取（吸引）による細胞回収方法においても、液体を導入する工程の途中で液体を一度も引きぬかずに連続的に液体を導入することの重要性が示唆された。

符号の説明

[0319] １…ＭＣＬ、２…ピーラブル銅箔、２’…銅板、３…フォトレジスト、３ａ…フォトレジスト露光部分（露光部）、３ｂ…フォトレジスト現像部分、４…フォトマスク、５…めっき層、６…貫通孔、７…金めっき層、１０，２０…細胞捕捉デバイス、１１，１２…フィルタ、１２，２２…導入領域、１３，２３…排出流路、２４…上蓋、２５，２６…導入流路。

請求の範囲

[請求項1] 所定の容積を有し、２種類以上の細胞を含む細胞含有溶液及び該細胞含有溶液中の細胞を処理するための処理液から選ばれる液体を内部に導入する導入領域と、前記液体を外部に排出するための排出流路とを含む筐体と、前記導入領域と前記排出流路との間の流路上に設けられ、前記液体が通過するための複数の貫通孔が厚み方向に形成されたフィルタと、を有する細胞捕捉デバイスを用いて前記液体をフィルトレーションすることにより、前記フィルタ表面において前記細胞含有溶液に含まれる特定の細胞を選択的に捕捉する細胞捕捉方法であって、

前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程をｎ回（ｎは自然数）有し、第１回目の前記液体を流す工程から第ｎ回目の前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面が所定の液面高さを維持し、第ｎ回目の前記液体を流す工程の終了時に前記フィルタに所定の高さの液面を有する状態で前記細胞捕捉デバイスからの前記液体の排出を止める細胞捕捉方法。

[請求項2] 前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び前記液体の導入流路を含む請求項１に記載の細胞捕捉方法。

[請求項3] 第１回目の前記液体を流す工程の前に、予め前記筐体の前記導入領域内を含む前記フィルタよりも上流側に洗浄液を満たしている請求項１又は２に記載の細胞捕捉方法。

[請求項4] 前記液体を流す工程が、固定液を流す工程と、透過液を流す工程、染色液を流す工程、及び洗浄液を流す工程のうちの１以上の工程と、前記細胞含有溶液を流す工程と、を含む請求項１～３のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項5] 前記ｎは１であり、前記液体を流す工程が前記細胞含有溶液を流す工程である請求項１～３のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項6] 前記液体を流す工程において、第１回目に流す前記液体が細胞含有

溶液であり、第２回目に流す前記液体が洗浄液である請求項１～３のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項7] 前記液体を流す工程において、捕捉対象の細胞の少なくとも一部が前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体に浸漬している請求項１～６のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項8] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが捕捉対象の細胞の大きさ以上である請求項１～７のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項9] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが５０μｍ以上である請求項１～８のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項10] 前記細胞含有溶液の溶媒が、哺乳動物の全血、血清、血漿、又はそれらが由来のたんぱく質を含む水溶液からなる請求項１～９のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項11] 前記フィルタが、高分子材料又は金属を用いて加工される請求項１～１０のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項12] 前記液体を流す工程において、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を導入する速度が、５０～１０００μＬ／ｍｉｎである請求項１～１１のいずれか一項に記載の細胞捕捉方法。

[請求項13] 所定の容積を有し、２種類以上の細胞を含む細胞含有溶液及び該細胞含有溶液中の細胞を処理するための処理液から選ばれる液体を内部に導入する導入領域と、前記液体を外部に排出するための排出流路とを含む筐体と、前記導入領域と前記排出流路との間の流路上に設けられ、前記液体が通過するための複数の貫通孔が厚み方向に形成されたフィルタと、を有する細胞捕捉デバイスを用いて前記液体をフィルトレーションすることにより、前記フィルタ表面において前記細胞含有溶液に含まれる特定の細胞を選択的に捕捉した特定細胞捕捉済デバイスを製造する特定細胞捕捉済デバイスの製造方法であって、

前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程をｎ回（ｎは自然数）有し、第１回目の前記液体を流す工程から第ｎ回目の前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面が所定の液面高さを維持し、第ｎ回目の前記液体を流す工程の終了時に前記フィルタに所定の高さの液面を有する状態で前記細胞捕捉デバイスからの前記液体の排出を止める特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項14] 前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び前記液体の導入流路を含む請求項１３に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項15] 第１回目の前記液体を流す工程の前に、予め前記筐体の前記導入領域内を含む前記フィルタよりも上流側に洗浄液を満たしている請求項１３又は１４に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項16] 前記液体を流す工程が、固定液を流す工程と、透過液を流す工程、染色液を流す工程、及び洗浄液を流す工程のうちの１以上の工程と、前記細胞含有溶液を流す工程と、を含む請求項１３～１５のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項17] 前記ｎは１であり、前記液体を流す工程が前記細胞含有溶液を流す工程である請求項１３～１５のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項18] 前記液体を流す工程において、第１回目に流す前記液体が細胞含有溶液であり、第２回目に流す前記液体が洗浄液である請求項１３～１５のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項19] 前記液体を流す工程において、捕捉対象の細胞の少なくとも一部が前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体に浸漬している請求項１３～１８のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項20] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域にお

ける前記液体の液面の高さが捕捉対象の細胞の大きさ以上である請求項１３～１９のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項21] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが５０μｍ以上である請求項１３～２０のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項22] 前記細胞含有溶液の溶媒が、哺乳動物の全血、血清、血漿、又はそれらが由来のたんぱく質を含む水溶液からなる請求項１３～２１のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項23] 前記フィルタが、高分子材料又は金属を用いて加工される請求項１３～２２のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項24] 前記液体を流す工程において、前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を導入する速度が、５０～１０００μＬ／ｍｉｎである請求項１３～２３のいずれか一項に記載の特定細胞捕捉済デバイスの製造方法。

[請求項25] 所定の容積を有し、２種類以上の細胞を含む細胞含有溶液及び該細胞含有溶液中の細胞を処理するための処理液から選ばれる液体を内部に導入する導入領域と、前記液体を外部に排出するための排出流路とを含む筐体と、前記導入領域と前記排出流路との間の流路上に設けられ、前記液体が通過するための複数の貫通孔が厚み方向に形成されたフィルタと、を有する細胞捕捉デバイスを用いて前記液体をフィルトレーションすることにより、前記フィルタ表面において前記細胞含有溶液に含まれる特定の細胞を選択的に捕捉することにより得られる特定細胞含有溶液の製造方法であって、

前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程をｎ回（ｎは自然数）有し、第１回目の前記液体を流す工程から第ｎ回目の前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液

体の液面が所定の液面高さを維持し、第ｎ回目の前記液体を流す工程の終了時に前記フィルタに所定の高さの液面を有する状態で前記細胞捕捉デバイスからの前記液体の排出を止め、

前記細胞捕捉デバイスに対して前記液体を流す工程の後に、前記筐体内に存在する液体を回収する工程を有する特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項26] 前記筐体内に存在する液体を回収する工程が、前記導入領域側から前記導入領域内の液体を吸引する工程を含む請求項２５に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項27] 前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び前記液体の導入流路を含み、前記筐体内に存在する液体を回収する工程が、前記排出流路から前記導入流路へ向けて送液を行う工程を含む請求項２５に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項28] 前記排出流路から前記導入流路へ向けた送液の流速が５０～１０００μＬ／ｍｉｎである請求項２７に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項29] 前記排出流路から前記導入流路へ向けた送液の前に、前記筐体に振動を与える請求項２７又は２８に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項30] 前記筐体は、前記導入領域の上方に設置される上蓋及び、２以上の前記液体の導入流路を含み、前記筐体内に存在する液体を回収する工程が、２以上の前記導入流路に含まれる第１の導入流路から２以上の前記導入流路のうち前記第１の導入流路とは異なる導入流路への送液を行う工程を含む請求項２５に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項31] ２以上の前記導入流路に含まれる前記第１の導入流路から２以上の前記導入流路のうち前記第１の導入流路とは異なる導入流路への送液の流速が５０～１０００μＬ／ｍｉｎである請求項３０に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項32] ２以上の前記導入流路に含まれる前記第１の導入流路から２以上の前記導入流路のうち前記第１の導入流路とは異なる導入流路への送液の前に、前記筐体に振動を与える請求項３０又は３１に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項33] 第１回目の前記液体を流す工程の前に、予め前記筐体の前記導入領域内を含む前記フィルタよりも上流側に洗浄液を満たしている請求項２５～３２のいずれか一項に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項34] 前記液体を流す工程が、固定液を流す工程と、透過液を流す工程、染色液を流す工程、及び洗浄液を流す工程のうちの１以上の工程と、前記細胞含有溶液を流す工程と、を含む請求項２５～３３のいずれか一項に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項35] 前記ｎは１であり、前記液体を流す工程が前記細胞含有溶液を流す工程である請求項２５～３４のいずれか一項に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項36] 前記液体を流す工程において、第１回目に流す前記液体が細胞含有溶液であり、第２回目に流す前記液体が洗浄液である請求項２５～３５のいずれか一項に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項37] 前記液体を流す工程において、捕捉対象の細胞の少なくとも一部が前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体に浸漬している請求項２５～３６のいずれか一項に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項38] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが捕捉対象の細胞の大きさ以上である請求項２５～３７のいずれか一項に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。

[請求項39] 前記液体を流す工程において、前記フィルタ上の前記導入領域における前記液体の液面の高さが５０μｍ以上である請求項２５～３８のいずれか一項に記載の特定細胞含有溶液の製造方法。