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 ＲｅｓＴｒｅａｔ；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

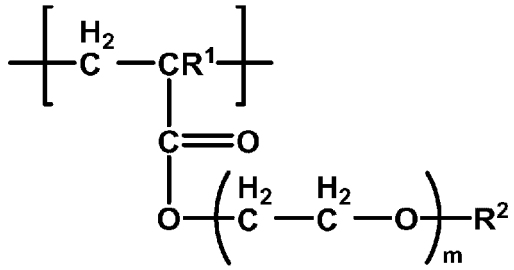
[0011]　従来、人工心肺等の医療用材料表面に血液が接触すると、補体系の活性化や血小板の活性化による血栓形成の誘発や溶血等の副作用が生じることが問題となっていた。そして、下記一般式（１）で表される構造単位を含むポリマーで医療用材料表面を被覆すると、血液が接触した場合であっても、医療

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]



(1)

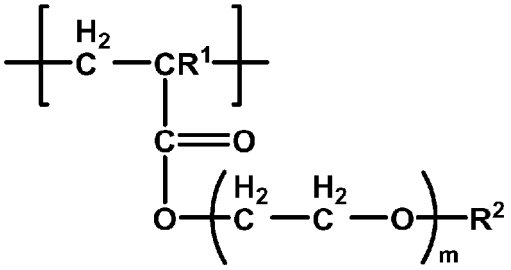
[0015] 一般式（１）中、Ｒ[1]は水素原子又はメチル基であり、Ｒ[2]はメチル基又はエチル基であり、ｍは１～３である。

[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]

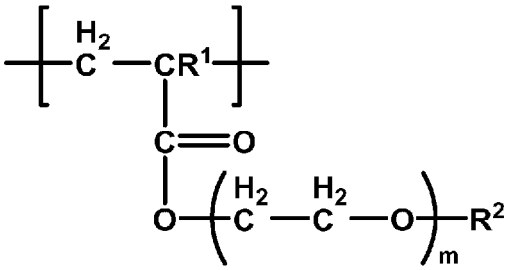


(1)

[0020] 一般式（１）中、Ｒ[1]は水素原子又はメチル基であり、Ｒ[2]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]

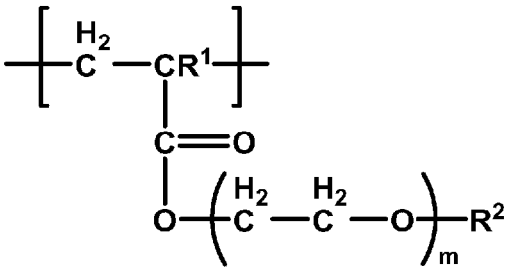


(1)

[0023] 一般式（１）中、Ｒ[1]は水素原子又はメチル基であり、Ｒ[2]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]

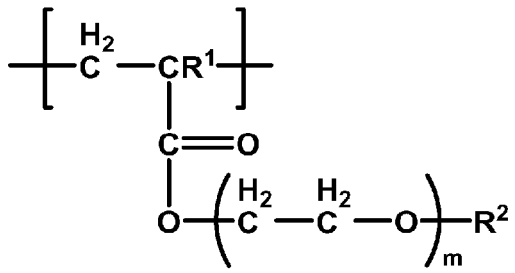


(1)

[0026] 一般式（１）中、Ｒ[1]は水素原子又はメチル基であり、Ｒ[2]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]

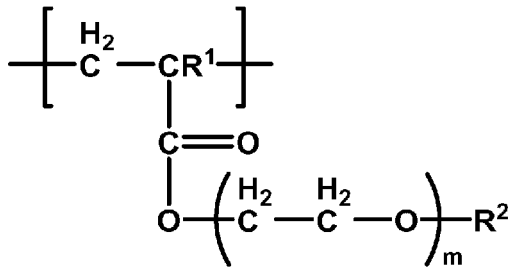


(1)

[0029] 一般式（１）中、Ｒ[1]は水素原子又はメチル基であり、Ｒ[2]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]



(1)

[0032] 一般式（１）中、Ｒ[1]は水素原子又はメチル基であり、Ｒ[2]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、Ｒ[1]が水素原子であり、Ｒ[2]がメチル基であり、ｍが１であることが好ましい。また、Ｒ[1]が水素原子であり、Ｒ[2]がエチル基であり、ｍが２であってもよく、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５μｍ以上３０μｍ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Ｉ－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Ｉ－４の結果を示すグラフである。

[図4]図４は、実験例Ｉ－５の結果を示すグラフである。

[図5]図５は、実験例ＩＩ－４の結果を示すグラフである。

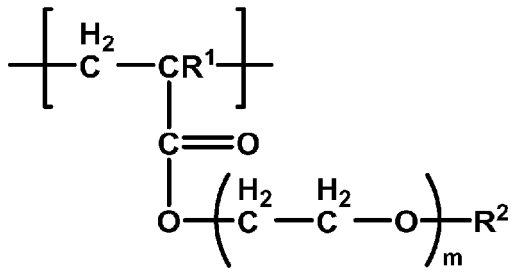
[図6]図６は、実験例ＩＩＩ－４の結果を示すグラフである。

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]



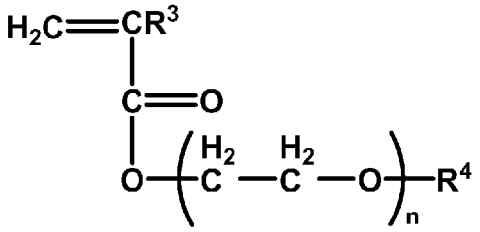
(1)

[0048] 上記一般式（１）中、R^1は水素原子又はメチル基であり、R^2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]



(2)

[0051] 上記一般式（２）中、R^3は水素原子又はメチル基であり、R^4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R^1、R^2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）R^1が水素原子であり、R^2がメチル基であり、ｍが１～２である。

（ｂ）R^1が水素原子であり、R^2がメチル基であり、ｍが３である。

（ｃ）R^1が水素原子であり、R^2がエチル基であり、ｍが１～２である。

（ｄ）R^1が水素原子であり、R^2がエチル基であり、ｍが３である。

（ｅ）Ｒ[1]がメチル基であり、Ｒ[2]がメチル基であり、ｍが１～２である。

（ｆ）Ｒ[1]がメチル基であり、Ｒ[2]がメチル基であり、ｍが３である。

（ｇ）Ｒ[1]がメチル基であり、Ｒ[2]がエチル基であり、ｍが１～２である。

（ｈ）Ｒ[1]がメチル基であり、Ｒ[2]がエチル基であり、ｍが３である。

[0055] Ｒ[1]、Ｒ[2]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キシアルキル（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、アルコキシ（メタ）アクリレート、アルコキシアルキル（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、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。

[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、中間水の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ー１００℃でも凍結しない不凍水、（３）自由水と不凍水の中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、スピン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、０．０１μｍ～１．０ｍｍが好ましく、０．１～１００μｍがより好ましく、０．５～５０μｍが更に好ましい。膜厚が０．０１μｍ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１．３×１０$^{-1}$Ｐａ、好ましくは１．３～１３３．３Ｐａ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１～３００秒間、好ましくは２～３０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ーポリビニルアル

コール共重合体、ブタジエンー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１０μｍ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５μｍ以上３０μｍ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５μｍ以上１５μｍ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５μｍ以上１０μｍ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３～１００μｍであることが好ましく、５～５０μｍであることがより好ましく、１０～３０μｍであることが特に好ましい。基板の厚さが３μｍ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１００μｍ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１ｍＬの血液からＣＴＣを濃縮する場合、１～１０ｃｍ^{2}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℃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（Ｍｗ／Ｍｎ）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：１．０ｍＬ／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℃）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１０μｍ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Ｉ－３）

（ニッケル基板の被覆及び確認）

実験例Ｉ－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Ｉ－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上に、４０μＬ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２μｌ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Ｉ－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Ｉ－４）

（基板の準備）

実験例Ｉ－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Ｉ－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Ｉ－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Ｉ－２で作製したニッケル基板を比較例Ｉ－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Ｉ－１及び比較例Ｉ－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１．０ｍＬをピペットで滴下し、３７℃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Ｉ－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Ｉ－１のニッケル基板は、比較例Ｉ－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Ｉ－５）

（基板の準備）

実験例Ｉ－４と同様に、実施例Ｉ－１及び比較例Ｉ－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Ｉ－１及び比較例Ｉ－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０．２ｍＬをピペットで滴下し、３７℃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、$１\times１０^{4}\mu m^{2}$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Ｉ－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Ｉ－１のニッケル基板は、比較例Ｉ－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Ｉ－４及びＩ－５の結果から、実施例Ｉ－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ＩＩ－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℃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１１．４ｇ（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（Ｍｎ）が１２，０００であり分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）が３．９であった。ポリマーの分子量は、実験例Ｉ－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）

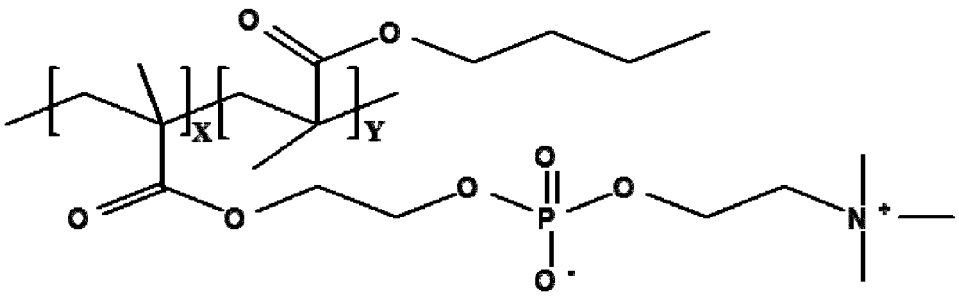
上記一般式（１）において、R^1がメチル基であり、R^2がメチル基であり、ｍが２である、ポリ［２－（２－メトキシエトキシ）エチルメタクリレート］を合成した。具体的には、２－（２－メトキシエトキシ）エチルメタクリレート１０ｇを１，４－ジオキサン５０ｇ中でアゾビスイソブチロニトリル（０．１質量％）を開始剤として、窒素バブリングしながら８０℃で８時間重合した。重合反応終了後、ｎ－ヘキサンに滴下し沈殿させ、生成物を単離した。生成物をテトラヒドロフランに溶解し、さらに２回ｎ－ヘキサンを

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８．２ｇ（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（Ｍｎ）が１０４，０００であり分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）が４．６であった。ポリマーの分子量は、実験例Ｉ－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－コー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－コー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－コー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]



(3)

[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（Ｍｗ／Ｍｎ）が２．９であった。ポリマーの分子量は、溶離液をエタノール／クロロホルム（２／８）にした点以外は、実験例Ｉ－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ＩＩ－２）

（ニッケル基板の作製）

実験例Ｉ－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ＩＩ－３）

（実験例Ｉ－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－コー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ＩＩ－４）

（基板の準備）

実験例Ｉ－１及び実験例ＩＩ－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ＩＩ－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ＩＩ－１（ポリメトキシエチルアクリレート）、実施例ＩＩ－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ＩＩ－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ＩＩ－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－コー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、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。

[0107] （癌細胞の接着性試験）

実施例ＩＩ－１～３及び比較例ＩＩ－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１．０ｍＬをピペットで滴下し、３７℃で６０分間静置した。癌細胞として、ヒト乳腺癌細胞株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ＩＩ－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ＩＩ－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ＩＩ－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ＩＩ－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ＩＩ－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ＩＩＩ－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、R^1がメチル基であり、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１５．０ｇ（７．４×10^{-2}ｍｏｌ）を１，４－ジオキサン５８．２ｍＬに溶解し、２時間N_2パージを行った。開始剤アゾビスイソブチロニトリル１５．１ｍｇ（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℃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１５００ｍＬ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５０ｍＬを加えて溶解し、再びヘキサン１０００ｍＬ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５．３６ｇ、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（Ｍｎ）が１４２，０００であり分子量分布（Ｍｗ／Ｍｎ）が６．０６であった。ポリマーの分子量は、実験例Ｉ－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ＩＩＩ－２）

（ニッケル基板の作製）

実験例Ｉ－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ＩＩＩ－３）

（実験例Ｉ－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、０．５ｗｔ／ｖｏｌ％以上で接触角が７８°でほぼ安定した。

[0112] （実験例ＩＩＩ－４）

（基板の準備）

実験例Ｉ－１、実験例ＩＩ－１及び実験例ＩＩＩ－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ＩＩＩ－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ＩＩＩ－１（ポリメトキシエチルアクリレート）、実施例ＩＩＩ－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ＩＩＩ－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ＩＩＩ－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ーコーブチルメタクリレート））及び実施例ＩＩＩ－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ＩＩＩ－１～４及び比較例ＩＩＩ－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１．０ｍＬをピペットで滴下し、３７℃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ＩＩＩ－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ＩＩＩ－１及び実施例ＩＩＩ－４のニッケル基板は、６０００個／ｃｍ^{2}以上の癌細胞を捕捉した。実施例ＩＩＩ－２のニッケル基板は、５０００個／ｃｍ^{2}以上の癌細胞を捕捉した。また、実施例ＩＩＩ－３のニッケル基板は、２０００個／ｃｍ^{2}以上の癌細胞を捕捉した。一方、比較例ＩＩＩ－１のニッケル基板は、１３０個／ｃｍ^{2}程度しか癌細胞を捕捉できなかった。

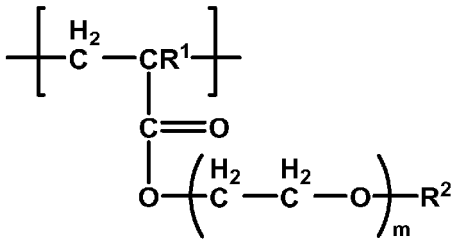
符号の説明

[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］



(1)

［式中、Ｒ[1]は水素原子又はメチル基であり、Ｒ[2]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］ Ｒ[1]が水素原子であり、Ｒ[2]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］ Ｒ[1]が水素原子であり、Ｒ[2]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］ 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、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５μｍ以上３０μｍ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。