

明 細 書

発明の名称：血中希少細胞捕獲方法

技術分野

[0001] 本発明は、血中希少細胞、特に血中循環癌細胞（Circulating Tumor Cell、以下、CTCという）を効率良く捕獲できるフィルターを用いた血中希少細胞捕獲方法に関する。

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もできれば、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抹消血中に及んだ場合、CTCを検出することは、癌の病状進行を判断する有用な手段である。しかしながら、血液中には、赤血球又は白血球などの血液成分が圧倒的に多く存在するため、極めて少量のCTCの検出は困難である。

[0003] 近年、パリレンを用いた樹脂フィルターを使用することで、少量のCTCを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ーを使用することで、フィルターの強度を向上させ、白血球と癌細胞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）。

[0005] 或いは、近年白血球を選択的に除去することで、残った細胞を血中希少細胞として抽出する方法が提案されている（非特許文献1～6）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2010／135603号

特許文献2：特開2013－42689号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Fehm T, Solomayer EF, Meng S, Tucker T, Lane N, Wang J,

et al. 「Methods for isolating circulating epithelial cells and criteria for their classification as carcinoma cells」 *Cytotherapy* 2005;7:171–85.

非特許文献2: Königsberg R, Obermayr E, Bises G, Pfeiler G, Gneist M, Wrba F, et al. 「Detection of EpCAM positive and negative circulating tumor cells in metastatic breast cancer patients」 *Acta Oncol* 2011;50:700–10.

非特許文献3: Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt J, van der Spoel P, Elstrodt F, Schutte M, et al. 「Anti-epithelial cell adhesion molecule antibodies and the detection of circulating normal-like breast tumor cells」 *J Natl Cancer Inst* 2009;101:61–6.

非特許文献4: Mostert B, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Sieuwerts AM, Schutte M, et al 「Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146」 *Breast Cancer Res Treat* 2011;127:33–41.

非特許文献5: Schindlbeck C, Stellwagen J, Jeschke U, Karsten U, Rack B, Janni W, et al 「Immunomagnetic enrichment of disseminated tumor cells in bone marrow and blood of breast cancer patients by the Thomsen-Friedenreich-Antigen」 *Clin Exp Metastasis* 2008;25:233–40.

非特許文献6: Deng G, Herrler M, Burgess D, Manna E, Krag D, Burke JF 「Enrichment with anti-cytokeratin alone or combined with anti-EpCAM antibodies significantly increases the sensitivity for circulating tumor cell detection in metastatic breast cancer patients」 *Breast Cancer Res* 2008;10:R69.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] フィルター法は血液中の白血球、赤血球及び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。

[0009] フィルター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、フィルターの材質、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。

[0010] しかしながら、血液量を増やすと、白血球残渣は多くなる傾向がある。通常、3500～9500個/ μ Lの白血球を健常人は保有している。

[0011] アメリカ食品医薬品局（FDA）で承認されている唯一の血中がん細胞検査システムはCellsearchであり、EpCAMを持つがん細胞だけを選択的に捕獲できる。但し、この方法はEpCAMを持つがん細胞だけしか捕獲できないということで、臨床意義が問われている。このとき使用される血液量は7.5mLである。

[0012] 発明者らが鋭意努力した結果、7.5mLの血液を流した場合、白血球は2,000個程度残留する。

[0013] 現時点では濃縮率は1:25000程度が限界と考えている。

[0014] 近年、Cellsearchは臨床意義が問われている。すなわち、がん細胞の数を数えるだけでは、がん患者の予後予測しかできないといわれている。

[0015] 近年要求されているのは採取した細胞を遺伝子解析する等のダウンストリームである。その場合、がん細胞1個に対して許される白血球の数は10個～100個であり、望小特性である。

[0016] 7.5mLの血液を流した場合に許される白血球は500個未満が望ましく、100個未満が更に望ましく、50個未満が更に望ましく、10個未満が更に望ましい。

[0017] つまり、即ち2,000個ではダウンストリームを考えた場合、不十分である。

[0018] 一方、白血球を選択的に除去することで、残った細胞を血中希少細胞として抽出する方法も提案されているが、この方法でも限界が存在する。

[0019] この方法でも発明者らが鋭意努力した結果、7.5 mlの血液を流した場合、白血球は2,000個程度残留する。また、白血球の除去率を上げようとすると、磁気ビーズの大量投入が必要となり、コストがかかる。

[0020] CTCの除去方法は上記の方法以外にも多数提案されているが、単独の方法では限界がある。

[0021] 本発明は上記を考え見てなされたものであり、磁気ビーズにより白血球を減らした後、フィルターにより更に白血球を減らすことで、ダウンストリームに適した血中希少細胞捕獲を含むサンプルを準備することが可能な血中希少細胞捕獲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

[0022] 本発明の一形態に係る血中希少細胞捕獲方法は、血中希少細胞を血液中から取り出す血中希少細胞捕獲方法であって、フィルターによる血液フィルトレーションの前に前記血液から白血球を取り除く工程を有することを特徴とする。

[0023] ここで、前記白血球を取り除く工程が白血球を磁性ビーズにより取り除く工程である態様とすることができる。

[0024] また、前記血液フィルトレーションの前の前記血液の白血球数が50個以下である態様とすることができる。

[0025] 前記白血球を取り除く工程において、又はその後に、細胞懸濁液を哺乳動物の血清、血漿、又はこれら由来のたんぱく質を含む水溶液で希釈する工程を有する態様とすることができる。

[0026] 前記哺乳動物の血清或いは血漿が、ウシ、ウマ、ヒト由来である態様とすることができる。

[0027] 前記哺乳動物の血清或いは血漿が、ウシ胎児由来である態様とすることができる。

[0028] 前記哺乳動物の血清或いは血漿の水溶液濃度が1%～50%の範囲である態様とすることができる。

[0029] 前記血清或いは血漿の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。

[0030] 前記血清或いは血漿の水溶液が抗凝固剤を含む態様とすることができる。

[0031] 前記抗凝固剤が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態様とすることができる。

[0032] 前記血液フィルトレーションの前に哺乳動物の血清或いは血漿を含む水溶液にフィルターを浸漬する工程を含む態様とすることができる。

[0033] 前記血液フィルトレーションの後に哺乳動物の血清或いは血漿を含む水溶液で血球細胞を洗浄する工程を含む態様とすることができる。

[0034] 前記哺乳動物の血清或いは血漿が、ウシ、ウマ、ヒト由来である態様とすることができる。

[0035] 前記哺乳動物の血清がウシ胎児血清或いは血漿である態様とすることができる。

[0036] 前記フィルター表面が金又は白金又はパラジウム、或いはそれらの合金である態様とすることができる。

[0037] 前記フィルターがニッケルを主成分とし、その表面に金又は白金又はパラジウム、或い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。

[0038] 前記フィルターが銅を主成分とし、その表面に金又は白金又はパラジウム、或い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。

[0039] 前記フィルターがパラジウムを主成分とし、その表面に金又は白金、或い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。

[0040] 前記フィルターの最外層が金めっきである態様とすることができる。

[0041] 前記フィルターの最外層が0.05 μm ~ 1 μm の貴金属めっきある態様とすることができる。

[0042] 前記血中希少細胞ががん細胞である態様とすることができる。

[0043] 前記フィルターの貫通孔の開口形状が円、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。なお、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。開口形状を長方形又は角丸長方形とした場合、貫通孔に目詰まりしにくく、捕獲対象とする成

分の濃縮率を更に向上させることができる。

[0044] 前記フィルター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 $5\ \mu\text{m}$ ～ $15\ \mu\text{m}$ である態様とすることができる。

[0045] 前記フィルターの膜厚が $3\ \mu\text{m}$ ～ $50\ \mu\text{m}$ である態様とすることができる。

発明の効果

[0046] 本発明によれば、ダウンストリームに適した血中希少細胞捕獲を含むサンプルを準備することが可能な血中希少細胞捕獲方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0047] [図1]細胞捕捉カートリッジの概略構成を説明する図である。

[図2]フィルターの製造方法を説明する図である。

[図3]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4]フィルターにおける長孔径、短孔径、及び開口率の定義を説明する図である。

発明を実施するための形態

[0048] 以下、添付図面を参照して、本発明を実施するための形態を詳細に説明する。なお、図面の説明においては同一要素には同一符号を付し、重複する説明を省略する。

[0049] 本実施形態に係る血中希少細胞捕獲方法では血中希少細胞を血液中からフィルターによるフィルトレーションを行う。血液フィルトレーションを行うための装置構成は特に限定されないが、一例として細胞捕捉カートリッジを用いる場合について説明する。細胞捕捉カートリッジ100は、図1に示すように、細胞分散液が流入する流入管125が接続された流入口130と、細胞分散液が流出する流出管135が接続された流出口140とを有する筐体120と、筐体120内に配置され、細胞分散液に含まれる血中希少細胞を捕捉する捕捉領域を有するフィルター105とを備える。

- [0050] 筐体 120 は、フィルター 105 を保持するための部材であり、上部部材 110 及び下部部材 115 から構成される。筐体 120 の形状は直方体又は円筒等であってよく、特に制約はない。
- [0051] 流入管 125 の上流には、例えば、血液又は洗浄液等の処理液等が接続される。また、流出管 135 の下流に、ポンプ P が接続することで、ポンプ P の駆動により、流入管 125 から筐体 120 の内部に血液等が供給され。その後、流出管 135 から外部に排出される。
- [0052] フィルター 105 には貫通孔 106 が形成されている。血液を細胞捕捉カートリッジ 100 内に導入すると、血液の赤血球等は貫通孔 106 を通過するが、血中希少細胞は貫通孔 106 を通過できず、フィルター 105 表面に滞留する。これにより、血中希少細胞を回収することができる。
- [0053] なお、細胞捕捉カートリッジ 100 の形状は上記に限定されない。フィルターによる血液フィルトレーションによって、血中希少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。
- [0054] 次に、図 2 及び図 3 を参照しながら、フィルター作製方法を例示すると共に、フィルターの説明を行う。
- [0055] 図 2 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ーを製造する方法を示す概略断面図である。
- [0056] 図 2（A）は、MCL 1 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。
- [0057] フィルター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。
- [0058] 次に、図 2（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 ~ 50 μm 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。

[0059] 次に、図 2 (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 3 a が形成される。

[0060] 次に、図 2 (D) に示すように、アルカリ溶液等で未露光部 3 b のフォトレジスト現像除去を行う。これにより、フィルターの貫通孔に対応する位置に露光部 3 a が残る。

[0061] 次に、図 2 (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ーの材質となる。

[0062] 次に、図 2 (F) に示すように、MCL 1 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。

[0063] 次に、図 2 (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 3 a 及びめっき層 5 により形成される自立膜を取り出す。

[0064] 次に、図 2 (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 3 a を除去し、めっき層 5 に対して貫通孔 6 を形成する。

[0065] 次に、図 2 (I) に示すように、無電解金めっきを行い、フィルター表面に金めっき層 7 を形成する。以上により、細胞捕捉カートリッジ 100 に用いられるフィルター 105 を製造することができる。

[0066] 図 3 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ーを製造する方法を示す概略断面図である。

[0067] 図 3 に示す方法では、図 2 に示す方法における MCL 1 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。

[0068] すなわち、図3（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3（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3（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3（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3（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3（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3（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3（H）は無電解金めっきを行い、フィルター表面に金めっき層7を形成する工程を示している。

[0069] このように、図2に示す方法及び図3に示す方法の何れを用いても細胞捕捉カートリッジ100に用いられるフィルター105を製造することができる。

[0070] フィルター105の材質は金属であることが好ましい。金属は加工性に優れている為、フィルターの加工精度を高めることができる。これにより、捕獲対象とする成分の捕獲率を更に向上させることができる。また、金属はプラスチックなどの他の材料と比べて剛直である為、外部から力が加わってもそのサイズ及び形状が維持される。この為、貫通孔よりも若干大きな成分を変形させて通過させる場合、より高精度の分離・濃縮が可能となる。

[0071] また、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、フィルター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。

[0072] 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。

[0073] フィルターを作製するための基板（銅板 2' : 図 3 参照）として使用する材料は銅（フィルター 105 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、MCL 1 に対して積層する金属箔 2（図 2 参照）についても、銅（フィルター 105 の材質が銅である場合はニッケル）が好ましい。

[0074] また、図 2（E）及び図 3（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。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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、 $0.3 \sim 4 \text{ A/dm}^2$ の範囲がよく、 $0.5 \sim 3 \text{ A/dm}^2$ の範囲であることがより好ましい。電流密度を 4 A/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 0.3 A/dm^2 以上とすることで、金属の結晶粒が十分に成長し、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。

[0080] めっきを行う際のレジスト、すなわち、露光部 3 a 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。

[0081] 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 4 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、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、捕捉対象とする成分が貫通孔 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ため、フィルターの目詰まりを防止することができる。フィルターの短孔径の長さは $5\ \mu\text{m}$ ~ $15\ \mu\text{m}$ が好ましく、 $7\ \mu\text{m}$ ~ $9\ \mu\text{m}$ がさらに好ましい。

[0082] フィルター 105 の貫通孔の平均開口率は $3\sim 50\%$ が好ましく、 $3\sim 20\%$ がより好ましく、 $3\sim 10\%$ 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 4 参照）。即ち、フィルターとして機能する領域の面積とは、フィルター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 4 において破線で囲まれた領域 A 1）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。

[0083] フィルター 105 の厚さは $3\ \mu\text{m}$ ~ $50\ \mu\text{m}$ であることが好ましく、 $5\ \mu\text{m}$ ~ $30\ \mu\text{m}$ であることがより好ましく、 $8\ \mu\text{m}$ ~ $20\ \mu\text{m}$ であることが特に好ましい。フィルター 105 の膜厚が $3\ \mu\text{m}$ 未満の場合はフィルターの強度が低下し、取り扱い性が困難になる場合がある。逆に、 $50\ \mu\text{m}$ 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又は微細加工そのものが困難になることが懸念される上、白血球が抜けにくくなる。

[0084] 以上回路形成後、樹脂層を剥離し銅箔をエッチングする（図2）か、又は銅板を除去する（図3）ことで、図2（H）又は図3（G）に示すように、めっき層5によるフィルターが完成する。

[0085] 次に、フィルター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、0.1～10wt%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（0.1～10wt%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。

[0086] レジストを除去したフィルターに対しては貴金属めっきを行うと良い。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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、フィルターの孔径精度に影響出やすいため、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。

[0090] 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。

[0091] 金めっき前の金属フィルター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。

[0092] 具体的にはシアン類、EDTA類、又はクエン酸類の入った水溶液がよい。

- [0093] 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 $0.01\text{ mol/L} \sim 3\text{ mol/L}$ であることが好ましく、 $0.03\text{ mol/L} \sim 2\text{ mol/L}$ であることがより好ましく、 $0.05\text{ mol/L} \sim 1\text{ mol/L}$ の範囲であることが特に好ましい。 0.01 mol/L 以上とすることで、無電解金めっき層と金属フィルターの密着性が向上する。また、 3 mol/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。
- [0094] クエン酸を含む溶液への浸漬は、 $70^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$ で、 $1 \sim 20$ 分間行うと良い。
- [0095] 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 $5 \sim 10$ であり、より好ましくは $6 \sim 9$ である。
- [0096] 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 100 mL/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。
- [0097] 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。
- [0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 金濃度は0.1 g/L～5 g/Lの範囲が好ましい。0.1 g/L未満では金が析出しにくく、5 g/Lを超えると液が分解しやすくなる。

[0102] 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、 $7 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \sim 0.4 \text{ mol/L}$ 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、 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L} \sim 0.2 \text{ mol/L}$ 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。

[0103] 液を安定に保つために0.1 g/L～50 g/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又は亜硫酸カリウム、亜硫酸アンモニウムなどが挙げられる。

[0104] 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。

- [0105] 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。
- [0106] 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 μm ～0.1 μm の範囲が好ましい。
- [0107] 還元型の金めっきの金塩としては、亜硫酸金塩および及びチオ硫酸塩が好ましく、その含有量は金として1 g/L～10 g/Lの範囲であることが好ましい。金の含有量が1 g/L未満であると、金の析出反応が低下し、10 g/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為好ましくない。含有量は2 g/L～5 g/Lにすることがより好ましい。
- [0108] 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。
- [0109] 還元剤の含有量は、0.5 g/L～50 g/Lであることが好ましい。還元剤の含有量が0.5 g/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、50 g/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2 g/L～10 g/Lとすることがより好ましく、2 g/L～5 g/Lであることが特に望ましい。
- [0110] 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。

- [0111] 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。
- [0112] 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。
- [0113] 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。
- [0114] 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１ppm～１００ppmが好ましく、１ppm～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。
- [0115] 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。
- [0116] 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、チオフエン化合物等が挙げられる。
- [0117] 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。

[0118] 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。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] 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1 ppm~500 ppmであることが好ましく、1 ppm~30 ppmであることがより好ましく、1 ppm~10 ppmであることが特に好ましい。硫黄系化合物の含有量が1 ppm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。500 ppm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。

- [0122] 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。
- [0123] 本発明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1 g/L～200 g/Lが好ましい。錯化剤の含有量が1 g/L未満である場合、金錯化力は低下し、安定性が低下する。200 g/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20 g/L～50 g/Lとすることがより好ましい。
- [0124] 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。
- [0125] pH緩衝剤の含有量は、めっき液の全容量を基準として1 g/L～100 g/Lであることが好ましい。pH緩衝剤の含有量が1 g/L未満であると、pHの緩衝効果がなく、100 g/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20 g/L～50 g/Lである。
- [0126] 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。
- [0127] 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0.5 g/L～100 g/Lであることが好ましい。金属イオン隠蔽剤の含有量が0.5 g/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、100 g/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、 $2\text{ g/L} \sim 10\text{ g/L}$ の範囲がもっとも好ましい。

[0128] 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。

[0129] 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ーを浸漬して金めっきを行う。

[0130] めっきの液温は $50^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$ がよい。 50°C 未満では析出効率が悪く、 95°C 以上では液が不安定になりやすい。

[0131] 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、金層の純度は、99.5重量%以上であることがより好ましい。

[0132] また、金めっき層7の厚さは、 $0.005\text{ }\mu\text{m} \sim 3\text{ }\mu\text{m}$ とすることが好ましく、 $0.05\text{ }\mu\text{m} \sim 1\text{ }\mu\text{m}$ とすることがより好ましく、 $0.1\text{ }\mu\text{m} \sim 0.5\text{ }\mu\text{m}$ とすることが更に好ましい。金めっき層7の厚さを $0.005\text{ }\mu\text{m}$ 以上とすることで、金属の溶出をある程度抑制できる。一方、 $3\text{ }\mu\text{m}$ 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 $3\text{ }\mu\text{m}$ 以下とすることが好ましい。貴金属めっきの場合、厚さ $0.05\text{ }\mu\text{m} \sim 1\text{ }\mu\text{m}$ とすることが好ましい。

[0133] 以上のように形成した金表面は細胞毒性がなく、大気中又は血液を含む殆どの水溶液中で安定である。しかしながら、金表面は比較的疎水性であり、生体適合性が低いので、生体適合性を向上させる処理を施すと良い。以下表面処理の一例を示す。

[0134] 血液中の成分である白血球、赤血球、血小板は異物に対して拒絶反応を示

す。したがって、金属表面に前処理を施すのがよい。この場合、血液ろ過の直前に金属表面を、生体適合性ポリマーを含む溶媒に浸漬するのが好ましい。

[0135] 生体適合性ポリマーを含む溶媒としては、哺乳動物の血清或いは血漿が挙げられる。血漿は、抗凝固剤入り採血管で採血して放置または遠心分離した場合に、血球成分の沈殿によりできる上澄みである。この血漿は凝固因子を含む。一方で、抗凝固剤の入らない採血管で採血して放置した場合、抗凝固剤が入らないため、血球成分が凝固因子により凝血する。その場合の上澄みが血清であり、血清は凝固因子を欠く。

[0136] 哺乳動物の中でも特性又は価格を考慮すると、ウシ、ウマ、ヒトの中から選択するのが好ましく、特にウシ胎児血清が好ましい。

[0137] 血清の中にはたんぱく質を含む。タンパク質中に含むアルブミン又はグロブリンがフィルター表面に吸着することで、血球成分がフィルター表面に吸着するのを防ぐ。血清中には多くのタンパク質が存在するが、血清アルブミンは約50%～65%を占める。

[0138] アルブミンはアミノ酸が多数連結しているのでアミノ基を多数有している。アミノ基は貴金属（金、白金、パラジウム）に対して強固な配位結合をする。

[0139] 特に金は酸化皮膜が殆ど存在しないので、特別な前処理をしなくてもアルブミンと強固な結合を形成する。

[0140] こうした血清或いは血漿を希釈した水溶液でフィルター105の前処理を行う。血清或いは血漿の濃度は1%～50%の範囲が好ましく、5%～30%の範囲が更に好ましく、10%～20%の範囲が更に好ましい。

[0141] 血清或いは血漿は水系の溶媒で希釈するのが良く、リン酸等の緩衝液が入っているのが望ましい。血清或いは血漿の水溶液は、リン酸緩衝液を主成分とすることが好ましい。

[0142] 更に血清或いは血漿溶液には血液の抗凝固剤が入っているのが望ましい。こうした抗凝固剤にはEDTA、ヘパリン、クエン酸ナトリウム、及びフッ

化ナトリウム等が挙げられるが、中でもEDTA又はヘパリンが望ましい。

[0143] 処理時間は1分以上60分以下が好ましく、1分以上10分以下が更に好ましい。1分より短い場合は生体適合高分子が強固に貴金属表面と配位結合しにくい。他方60分より長い場合は作業時間の観点から好ましくない。

[0144] こうして生体適合性ポリマーを処理したフィルターに血液を流す（血液フィルトレーション）。フィルター105を細胞捕捉カートリッジ100のような装置に対して取り付けて血液を通過させる。血液はフィルターの下方から陰圧で処理しても、フィルターの上方から加圧で処理しても、遠心分離のように遠心力で処理しても構わない。いずれの方法においても血液がフィルターの孔を通過する線速度をコントロールすることが重要になる。

[0145] なお、サンプルとして必要な血液の量は1～10mlである。

[0146] 血液を採取する際の採血管は、抗凝固剤が入ったものが好ましい。こうしたものの中にはEDTA-2K、EDTA-2Na、クエン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、又はヘパリン等が挙げられる。

[0147] また、採血管で採取した血液をサンプルとしてすべて用いる方法と、遠心分離によりバッフィーコートのみを取り出す方法がある。採血管で採取した血液をすべて用いる方法が簡便ではあるが、赤血球等の成分を取り除いておいた方が、後の工程が容易になるというメリットがある。

[0148] バッフィーコートのみを取り出す方法を用いる場合、生体適合性ポリマーを含む溶媒で希釈するとよい。これにより、血液中のがん細胞などが余計な箇所吸着するのを妨げることができる。

[0149] 生体適合性ポリマーを含む溶媒としては、哺乳動物の血清或いは血漿が挙げられる。血漿は、抗凝固剤入り採血管で採血して放置または遠心分離した場合に、血球成分の沈殿によりできる上澄みである。この血漿は凝固因子を含む。一方で、抗凝固剤の入らない採血管で採血して放置した場合、抗凝固剤が入らないため、血球成分が凝固因子により凝血する。その場合の上澄みが血清であり、血清は凝固因子を欠く。

[0150] 哺乳動物の中でも特性又は価格を考慮すると、ウシ、ウマ及びヒトの中か

ら選択するのが望ましく。特にウシ胎児血清は良好な特性が得られやすい。

[0151] 血清の中にはたんぱく質を含む。タンパク質中に含むアルブミン又はグロブリンがフィルター表面に吸着することで、血球成分がフィルター表面に吸着するのを防ぐ。血清中には多くのタンパク質が存在するが、血清アルブミンは約50%～65%を占める。

[0152] こうした血清或いは血漿を希釈した溶液でフィルターの前処理を行う。血清或いは血漿の濃度は1%～50%の範囲が好ましく、5%～30%の範囲が更に好ましく、10%～20%の範囲が更に好ましい。

[0153] 血清或いは血漿は水系の溶媒で希釈するのが良く、リン酸等の緩衝液が入っているのが望ましい。

[0154] 更に血清或いは血漿溶液には血液の抗凝固剤が入っているのが望ましい。こうした抗凝固剤にはEDTA、ヘパリン、クエン酸ナトリウム及びフッ化ナトリウム等が挙げられるが、中でもEDTA又はヘパリンが望ましい。

[0155] こうして白血球とCTCが生体適合性ポリマーを含む溶媒に希釈された細胞懸濁液ができたなら、白血球を取り除く。

[0156] 白血球の除去には従来公知の方法である白血球の磁気ビーズ（磁性ビーズ）による除去法を用いることができる。このようなビーズとしてDynabeads M-450-CD45（pan-leucocyte）が挙げられる。

[0157] CD45抗体を上記の磁気ビーズに反応させたビーズを上記細胞懸濁液に浸漬させる。この際、磁気ビーズを白血球の4倍～10倍程度入れるとよい。磁気ビーズの量が少ないと白血球の除去効率が低下し、磁気ビーズの量が多いとコスト高につながる。

[0158] 磁気ビーズと白血球を所定の時間反応させた後、磁気ビーズを除去する。

[0159] 上記工程によって、白血球数を当初の5000万個（5mLの場合）レベルから最低でも50万個レベルに低減することが可能になる。

[0160] 以上の工程によって得られた細胞の懸濁液を血液フィルトレーションすることによってダウンストリームが可能なレベルまで低減させる。

- [0161] 血液がフィルター１０５の孔を通過する線速度（血液の体積／孔の総面積）は、 $0.5 \sim 100 \text{ cm/min}$ の範囲であることが望ましく、 $5 \sim 20 \text{ cm/min}$ の範囲であることが更に望ましい。
- [0162] 血液ろ過後のフィルター１０５を、再び血清或いは血漿溶媒で洗浄すると良い。血清或いは血漿溶媒は、前期浸漬用とまったく同じものを用いることができる。洗浄液の線速度は、やはり $0.5 \sim 100 \text{ cm/min}$ の範囲であることが望ましく、 $5 \sim 20 \text{ cm/min}$ の範囲であることが更に望ましい。
- [0163] 当初の浸漬により、生体適合高分子がフィルター１０５の表面に吸着しているのでもろ過の際の血球成分の吸着を抑えることができるが、血液処理により血球が吸着しやすい表面になる。
- [0164] また、洗浄時に再度生体適合性高分子を流すことで、洗浄効果が上がる。
- [0165] 洗浄液の量は適宜調整してよいが、前記線速度で１～２０分の洗浄が望ましく、５～１５分の洗浄が更に望ましい。
- [0166] 以上のようにして濃縮したＣＴＣ等の希少細胞を捕捉することができる。生体適合性ポリマーを化学的に強固にフィルターに被覆することで、赤血球、白血球、血しょう板といった成分を除外することが可能になる。なお、血液フィルトレーションの前に哺乳動物の血清或いは血漿を含む水溶液にフィルターを浸漬するか、又は、フィルターによる血液フィルトレーションの後に哺乳動物の血清或いは血漿を含む水溶液で血液の血球細胞を洗浄する工程の少なくとも一方を含んでいればよいが、特に血液フィルトレーションの前に処理を行うことにより、効率的に血液中の希少細胞を捕獲することが可能となる。
- [0167] フィルター法では白血球の初期投入量によって最終的に残る白血球の残存量が異なる傾向がある。発明者らの検討では白血球の量はフィルターろ過により $1/10000$ に低減できる。
- [0168] すなわち、初期投入量が５０万個であれば、５０個に低減できる。
- [0169] したがって、フィルターへの白血球投入量は５０万個以下が望ましく、５

万個以下が更に望ましく、5000個以下が最も望ましい。なるべく白血球を磁気ビーズにより低減させた後にフィルトレーションを行うと良い。

実施例

[0170] (フィルター1)

感光性樹脂組成物 (PHOTEC RD-1225: 厚さ $25\ \mu\text{m}$ 、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°C 、圧力 0.3MPa 、コンベア速度 $2.0\text{m}/\text{分}$ で行った。

[0171] 次に、光の透過部の形状が角丸長方形、サイズが $7.8\ \mu\text{m}$ (短孔径) $\times$ $100\ \mu\text{m}$ (長孔径) であって、開口率が 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。

[0172] 続いて、 600mmHg 以下の真空中において、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 $30\text{mJ}/\text{cm}^2$ の紫外線を照射した。

[0173] 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°C 、約 20 分間約 $20\ \mu\text{m}$ めっきを行った。ニッケルめっき液の組成を表1に示す。

[0174] [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

[0175] 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°C 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ーとなる自立膜（20mm×20mm）を取り出した。

[0176] 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 Pol-eve、Henkel）によって除去し、微細貫通孔を有する金属フィルターを作製した。

[0177] 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ーを作製した。

[0178] 次に、酸性脱脂液Z-200（ワールドメタル製：商品名）に金属フィルターを浸漬し、金属フィルター上の有機物の除去を行った（40℃3分）。

[0179] 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。

[0180] 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。

[0181] 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。

[0182] （非小細胞癌細胞株の調整）

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%CO₂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 Cell Tracker Red CMTPX（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、2 mM EDTA及び0.5%ウシ血清アルブミン(BSA)を含むPBS(以下2 mM EDTA-0.5% BSA-PBSという。)中に懸濁して、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)のものをを用いた。また、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。

[0183] (磁気ビーズによる血液サンプル中のCTCの濃縮)

(実施例1)

7.5 mlの血液サンプルとして、EDTA-2Na含有真空採血管に採血した健常者血液に、血液7.5 mLあたり1000個の前出癌細胞を含有させたサンプルを用いた。サンプル中の白血球の数は470万個/ml即ち、3525万個/7.5 mlであった。

[0184] 遠心分離によりバッフィーコートのみを取り出した。その際の白血球回収率は97%であった。

[0185] 2 mM EDTA-20.0% FBS(牛胎児血清)-PBS(Gibco製PBS pH 7.4)の溶液7.5 mlにバッフィーコートを分散させた。

[0186] 磁気ビーズにCD45抗体をつけたDynabeads CD45を4.0×10⁸個分散液1 ml(0.1%BSA、0.02% Sodium azide, PBS pH 7.4)を投入し、所定時間反応後、磁気ビーズを磁石により用いて取り出した。その際の白血球数は5.2万個/7.5 mlであった(サンプル1)。

[0187] 上記で作製したフィルターをカートリッジにセットした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又は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、血液サンプル又は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。

[0188] まず、リザーバーに、2 mM EDTA-10.0% FBS（牛胎児血清）-PBS（Gibco製PBS、pH7.4）1 mL（以下洗浄液）を導入し、フィルター上を満たし、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200 μ L/分で送液を開始した。その後、サンプル1を投入した。約5分後、リザーバーに9 mLの洗浄液を導入して細胞の洗浄を行った。

[0189] 次にPBS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% Triton Xを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を15分浸した。

[0190] さらに10分後、ポンプ流速を20 μ L/分に変更し、リザーバーに600 μ Lの細胞染色液（Hoechst 33342：30 μ L、Wash buffer：300 mL）を導入し、フィルター上の癌細胞または白血球を蛍光染色した。フィルター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1 mLの2 mM EDTA-0.5% BSA-PBSを導入して細胞の洗浄を行った。

[0191] 続いて、コンピューター制御式電気ステージ及び冷却デジタルカメラ（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製）を使用してフィルターを観察し、フィルター上の癌細胞及び白血球の数をカウントした。

[0192] Hoechst 33342及びCell Tracker Red CMTPX由来の蛍光を観察するために、それぞれWU及びWIGフィルター（オリンパス株式会社製）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（三谷商事株式会社製）を用いた。結果を

表2に示す。細胞回収率(%) = フィルターに回収された癌細胞数 / 血液サンプルに混合した癌細胞数 × 100%である。また、白血球の数はHoechst 33342で染色された細胞数からがん細胞数を引くことで算出した。

[0193] (実施例2)

100mlの血液サンプルとして、EDTA-2Na含有真空採血管に採血した健常者血液を用い、がん細胞をスパイクしなかった。サンプル中の白血球の数は530万個/ml即ち、5億3千万個/100mlであった。

[0194] 遠心分離によりbuffy coatのみを取り出した。その際の白血球回収率は97%であった。

[0195] 2mM EDTA-20.0% FBS (牛胎児血清) - PBS (Gibco製PBS、pH7.4)の溶液100mlにbuffy coatを分散させた。

[0196] 磁気ビーズにCD45抗体をつけたDynabeads CD45を 4.0×10^8 個分散液10ml (0.1%BSA、0.02% Sodium azide, PBS pH7.4)を投入し、所定時間反応後、磁気ビーズを磁石により用いて取り出した。その際の白血球数は550万個(全部)であった。

[0197] 前述の懸濁液を用い、白血球数が50万個となるように調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル2を用いた。

[0198] 上記で作製したフィルターをカートリッジにセットした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又は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、血液サンプル又は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。

[0199] まず、リザーバーに、2mM EDTA-10.0% FBS (牛胎児血清) - PBS (Gibco製PBS、pH7.4) 1ml (以下洗浄液)

を導入し、フィルター上を満たし、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200 μ L/分で送液を開始した。その後、上記サンプル2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。

[0200] 次にPBS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%Triton Xを溶かした液をカートリッジに入れ、細胞を15分浸した。

[0201] さらに10分後、ポンプ流速を20 μ L/分に変更し、リザーバーに600 μ Lの細胞染色液(Hoechst 33342:30 μ L、Wash buffer:300mL)を導入し、フィルター上の癌細胞または白血球を蛍光染色した。フィルター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。

[0202] 続いて、コンピューター制御式電気ステージ及び冷却デジタルカメラ(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製)を使用してフィルターを観察し、フィルター上の癌細胞及び白血球の数をカウントした。

[0203] Hoechst 33342及びCell Tracker Red CMTPX由来の蛍光を観察するために、それぞれWU及びWIGフィルター(オリンパス株式会社製)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(三谷商事株式会社製)を用いた。結果を表2に示す。細胞回収率(%)=フィルターに回収された癌細胞数/血液サンプルに混合した癌細胞数 $\times$ 100%である。白血球の数はHoechst 33342で染色された細胞数からがん細胞数を引くことで算出した。

[0204] (実施例3)

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるように2mM EDTA-20.0% FBS(牛胎児血清)-PBS(Gibco製PBS、pH7.4)で10mLに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプ

ル3を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例3に係る測定を行った。

[0205] (実施例4)

前述の懸濁液を用い、白血球数が1万個となるように2 mM EDTA-20.0% FBS (牛胎児血清)-PBS (Gibco製PBS、pH 7.4) で10 mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル4を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例4に係る測定を行った。

[0206] (実施例5)

前述の懸濁液を用い、白血球数が5千個となるように2 mM EDTA-20.0% FBS (牛胎児血清)-PBS (Gibco製PBS pH 7.4) で10 mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル5を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例5に係る測定を行った。

[0207] (実施例6)

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう2 mM EDTA-20.0% 人血清-PBS (Gibco製PBS、pH 7.4) で10 mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル6を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例6に係る測定を行った。

[0208] (実施例7)

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう2 mM EDTA-20.0% ウマ血清-PBS (Gibco製PBS、pH 7.4) で10 mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル7を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例7に係る測定を行った。

[0209] (実施例8)

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう2 mM EDTA-20.0% ウシ血清-PBS (Gibco製PBS、pH 7.4) で10 mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル8を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例8に係る測定を行った。

[0210] (実施例9)

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう2 mM EDTA-0

． 5 % ウシ血清アルブミン－PBS（Gibco製PBS、pH7.4）で10mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル9を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例9に係る測定を行った。

[0211]（実施例10）

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう2mM EDTA－PBS（Gibco製PBS、pH7.4）で10mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル10を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例10に係る測定を行った。

[0212]（実施例11）

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう2mM EDTA－5.0% FBS（牛胎児血清）－PBS（Gibco製PBS、pH7.4）で10mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル11を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例11に係る測定を行った。

[0213]（実施例12）

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう100% FBS（牛胎児血清）で10mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル12を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例12に係る測定を行った。

[0214]（実施例13）

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう2mM EDTA－1.0% FBS（牛胎児血清）－PBS（Gibco製PBS、pH7.4）で10mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル13を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例13に係る測定を行った。

[0215]（実施例14）

前述の懸濁液を用い、白血球数が5万個となるよう20.0% FBS（牛胎児血清）－PBS（Gibco製PBS pH7.4）で10mlに調整した後、がん細胞を1000個スパイクしたサンプル14を用いた以外は実施例2と同様の方法で実施例14に係る測定を行った。

[0216] (比較例)

7. 5 m l の血液サンプルとして、E D T A - 2 N a 含有真空採血管に採血した健常者血液に、血液 7. 5 m L あたり 1 0 0 0 個の前出癌細胞を含有させたサンプル 1 5 をそのまま用いた。サンプル中の白血球の数は 4 7 0 万個 / m l 、すなわち、3 5 2 5 万個 / 7. 5 m l であった。

[0217] (結果)

測定の結果を表 2 に示す。実施例 1 により 3 5 2 5 万個の白血球を磁気ビーズで減らした後にフィルターを行うことで、白血球の残渣をかなり減らすことができることがわかった。抗原抗体反応とフィルター法の組み合わせにより、従来に無い白血球除去率を実現している。実施例 2 ~ 5 は抗原抗体反応で残った白血球にがん細胞をスパイクしたモデル実験である。5 0 万個 → 4 5 個、5 万個 → 1 1 個、1 万個 → 6 個、5 千個 → 1 個の結果が示すように、フィルトレーションを行う際の白血球を減らすことで、最終的に残るフィルター上の白血球の量を減らすことができる。

[0218] また、実施例 6 ~ 8 はそれぞれヒト、ウマ、ウシ血清を希釈溶媒に用いた場合である。牛胎児血清と比べると、若干効果は変わるが、実用上問題ないレベルである。実施例 9 は牛胎児血清の代わりに安価な B S A (ウシ血清アルブミン) を用いた場合である。牛胎児血清と比べると効果は落ちるが、使用可能なレベルである。実施例 1 1 ~ 1 3 は牛胎児血清の濃度を変更した場合の結果である。1 ~ 5 0 % の範囲が良好であることがわかる。実施例 1 4 は E D T A を用いなかった場合であるが、用いた場合に比べると、若干結果が悪くなる。

[0219] 比較例は磁気ビーズを用いず、白血球 3 2 5 0 万個をそのまま用いた場合である。フィルター上に残る白血球は 1 0 0 0 を超えているので、遺伝子解析には不向きである。

[0220]

[表2]

実施例	サンプル	初期白血球数	残存白血球数	がん細胞(NCI-H358)回収率
実施例 1	サンプル 1	3525 万個	13 個	95.3%
実施例 2	サンプル 2	50 万個	45 個	97.8%
実施例 3	サンプル 3	5 万個	11 個	98.3%
実施例 4	サンプル 4	1 万個	6 個	98.4%
実施例 5	サンプル 5	5 千個	1 個	99.1%
実施例 6	サンプル 6	5 万個	22 個	98.7%
実施例 7	サンプル 7	5 万個	25 個	97.8%
実施例 8	サンプル 8	5 万個	28 個	98.5%
実施例 9	サンプル 9	5 万個	264 個	98.2%
実施例 10	サンプル 10	5 万個	548 個	97.6%
実施例 11	サンプル 11	5 万個	18 個	97.6%
実施例 12	サンプル 12	5 万個	72 個	96.5%
実施例 13	サンプル 13	5 万個	23 個	97.4%
実施例 14	サンプル 14	5 万個	58 個	97.3%
比較例	サンプル 15	3525 万個	1862 個	94.9%

[0221] 以上示したように、本発明で示したフィルターと抗原抗体反応による白血球除去を組み合わせることで、従来のフィルターよりも特性が向上し、ダウンストリームが可能になる。

符号の説明

[0222] 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。

請求の範囲

- [請求項1] 血中希少細胞を血液中から取り出す血中希少細胞捕獲方法であって、フィルターによる血液フィルトレーションの前に前記血液から白血球を取り除く工程を有することを特徴とする血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項2] 前記白血球を取り除く工程が白血球を磁性ビーズにより取り除く工程であることを特徴とする請求項1に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項3] 前記血液フィルトレーションの前の前記血液の白血球数が50個以下であることを特徴とする請求項1又は2に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項4] 前記白血球を取り除く工程において、又はその後に、細胞懸濁液を哺乳動物の血清、血漿、又はこれら由来のたんぱく質を含む水溶液で希釈する工程を有することを特徴とする請求項1～3のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項5] 前記哺乳動物の血清或いは血漿が、ウシ、ウマ、ヒト由来であることを特徴とする請求項4に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項6] 前記哺乳動物の血清或いは血漿が、ウシ胎児由来であることを特徴とする請求項4に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項7] 前記哺乳動物の血清或いは血漿の水溶液濃度が1%～50%の範囲であることを特徴とする請求項4～6のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項8] 前記血清或いは血漿の水溶液がリン酸緩衝液を主成分とすることを特徴とする請求項4～7のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項9] 前記血清或いは血漿の水溶液が抗凝固剤を含むことを特徴とする請求項4～8のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項10] 前記抗凝固剤が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を特徴とする請求項9に記載の血中希少細胞捕獲方法。

- [請求項11] 前記血液フィルトレーションの前に哺乳動物の血清或いは血漿を含む水溶液にフィルターを浸漬する工程を含むことを特徴とする請求項1～10のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項12] 前記血液フィルトレーションの後に哺乳動物の血清或いは血漿を含む水溶液で血球細胞を洗浄する工程を含むことを特徴とする請求項1～11のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項13] 前記哺乳動物の血清或いは血漿が、ウシ、ウマ、ヒト由来であることを特徴とする請求項11又は12に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項14] 前記哺乳動物の血清がウシ胎児血清或いは血漿であることを特徴とする請求項11又は12に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項15] 前記フィルター表面が金又は白金又はパラジウム、或いはそれらの合金であることを特徴とする請求項1～14のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項16] 前記フィルターがニッケルを主成分とし、その表面に金又は白金又はパラジウム、或いはそれらの合金がめっきされていることを特徴とする請求項15に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項17] 前記フィルターが銅を主成分とし、その表面に金又は白金又はパラジウム、或いはそれらの合金がめっきされていることを特徴とする請求項15に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項18] 前記フィルターがパラジウムを主成分とし、その表面に金又は白金、或いはそれらの合金がめっきされていることを特徴とする請求項15に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項19] 前記フィルターの最外層が金めっきであることを特徴とする請求項15～18のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項20] 前記フィルターの最外層が0.05 μm ～1 μm の貴金属めっきであることを特徴とする請求項15～18のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。
- [請求項21] 前記血中希少細胞ががん細胞であることを特徴とする請求項1～2

0のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。

[請求項22] 前記フィルターの貫通孔の開口形状が円、楕円、角丸長方形、長方形、正方形のいずれかである請求項1～21のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。

[請求項23] 前記フィルターの貫通孔の開口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 $5\mu\text{m}$ ～ $15\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項1～22のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。

[請求項24] 前記フィルターの膜厚が $3\mu\text{m}$ ～ $50\mu\text{m}$ であることを特徴とする請求項1～23のいずれか一項に記載の血中希少細胞捕獲方法。