

明 細 書

発明の名称：細胞単離方法及び細胞捕捉フィルタ

技術分野

[0001] 本発明は、細胞単離方法及びこの細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタに関する。

背景技術

[0002] がんは世界各国で死因の上位を占めるため、その早期発見および治療が望まれている。がんによる人の死亡は、がんの転移再発によるものがほとんどである。がんの転移再発は、癌細胞が原発巣から血管またはリンパ管を經由して、別臓器組織の血管壁に定着、浸潤して微小転移巣を形成することで起こる。このような血管又はリンパ管を通じての人の体内を循環するがん細胞は、血中循環癌細胞（C i r c u l a t i n g T u m o r C e l l、以下、場合により「C T C」という。）と呼ばれている。

[0003] がんの転移再発を引き起こす可能性のある血管中のがん細胞（C T C）の有無およびその量を測定できれば、がん治療に大きな貢献が可能となる。血液中のがん細胞を捕らえる従来技術としては、例えば、特許文献1に記載の構成が知られている。特許文献1記載の技術は、血液中のがん細胞をフィルタで捕獲しようとするもので、ここではフィルタの半導体技術を用いた製造方法、フィルタを収納したセルユニットの形状、および血液および処理液を流す流路の構造が示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許出願公開第2011／0053152号明細書

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、近年、血管中のがん細胞の状況についてより正確に把握をする目的から、がん細胞の個体についてそれぞれ観察したいという要求があ

る。しかしながら、例えば特許文献 1 記載の技術を用いてフィルタ上にがん細胞を捕捉したとしても、がん細胞個体を観察するのは困難である。また、フィルタ上のがん細胞は弾性変形しやすいため取り扱いが困難である一方で損傷させてしまうとがん細胞の観察を好適に行うことができない。

[0006] 本発明は上記を鑑みてなされたものであり、細胞捕捉フィルタ上に捕捉されたがん細胞を損傷させることなく単離することが可能な細胞単離方法及びこの細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタ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

[0007] 上記目的を達成するため、本発明の一形態に係る細胞単離方法は、厚さ方向に複数の貫通孔を有する細胞捕捉フィルタに対して被検液を通過させることにより、細胞捕捉フィルタの一方の面上に前記被検液に含まれる単離対象の細胞を捕捉する細胞捕捉ステップと、前記細胞捕捉ステップにおいて前記細胞が捕捉された前記細胞捕捉フィルタの一方の面上に刺激応答性ハイドロゲルを導入し、当該刺激応答性ハイドロゲルにより前記細胞を包埋するゲル包埋ステップと、前記細胞を包埋した前記刺激応答性ハイドロゲルに対して刺激を与えることで、当該刺激応答性ハイドロゲルを硬化させるゲル硬化ステップと、前記ゲル硬化ステップにおいて硬化した前記刺激応答性ハイドロゲルを前記細胞捕捉フィルタから剥離する剥離ステップと、を含むことを特徴とする。

[0008] 上記の細胞単離方法では、細胞捕捉ステップにおいて細胞が捕捉された細胞捕捉フィルタ 2 の一方の面上に刺激応答性ハイドロゲルを導入し、当該刺激応答性ハイドロゲルにより細胞を包埋した後、刺激応答性ハイドロゲルに対して刺激を与えることで、当該刺激応答性ハイドロゲルを硬化させ、硬化した刺激応答性ハイドロゲルを細胞捕捉フィルタから剥離する。このように、刺激応答性ハイドロゲルを用いて細胞を単離することにより、細胞が刺激応答性ハイドロゲルに包埋された状態で細胞を操作するため、単離対象の細胞を直接操作する場合と比較して取り扱い性が向上し、細胞を損傷させるこ

となく単離することが可能となる。

[0009] ここで、前記ゲル硬化ステップにおいて、前記細胞を包埋した前記刺激応答性ハイドロゲルのうち単離対象の前記細胞の周囲のみを局所的に硬化させる態様とすることができる。

[0010] このように、ゲル硬化ステップにおいて、単離対象の前記細胞の周囲のみを局所的に硬化させる構成とした場合には、細胞毎に個別に硬化されたハイドロゲルを操作することができるため、取り扱い性がさらに向上する。

[0011] また、本発明の一形態に係る細胞捕捉フィルタは、上記の細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタであって、前記一方の面側において隣接する前記貫通孔間の距離が $80\mu\text{m}$ 以上であることを特徴とする。

[0012] 上記の細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタ2は、一方の面側において隣接する貫通孔間の距離が $80\mu\text{m}$ 以上である構成とすることで、隣接する貫通孔に捕捉された細胞がハイドロゲルによって一度に硬化されることを防ぐことができるため、細胞の単離を好適に行うことができる。

発明の効果

[0013] 本発明によれば、細胞捕捉フィルタ上に捕捉された細胞を損傷させることなく単離することが可能な細胞単離方法及びこの細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタが提供される。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]細胞捕捉デバイスの概略構成図である。

[図2]細胞捕捉デバイスの分解斜視図である。

[図3]細胞捕捉フィルタについて説明する図である。

[図4]細胞捕捉フィルタについて説明する図である。

[図5]細胞単離方法について説明する図である。

[図6]PEGDAについて説明する図である。

[図7]硬化後のPEGDAの構造について説明する図である。

[図8]単離後のPEGDAのSEM画像である。

発明を実施するための形態

[0015] 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。

[0016] 図1は、本発明の一形態に係る細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタを含む細胞捕捉デバイスの構成を説明する図である、図2は、細胞捕捉デバイスの分解斜視図である。また、図3及び図4は、細胞捕捉フィルタについて説明する図である。

[0017] 細胞捕捉デバイスは、被検液となる細胞分散液を細胞捕捉フィルタによってろ過することで、被検液中に含まれる細胞を捕捉する装置である。また、細胞捕捉フィルタにより捕捉された細胞を以下の実施形態で説明する単離方法により単離することで、細胞の特定及び細胞の個体数のカウント等が行われる。被検液となる細胞分散液としては、例えば血液及び血液を希釈した液体が挙げられる。細胞捕捉デバイスは、例えば、CTCと呼ばれる循環癌細胞等の希少細胞が含まれる血液中から、血液中に含まれる赤血球、血小板及び白血球（以下、これらを総称して「血球成分」とする）を通過させる一方で、希少細胞を捕捉する目的に好適に用いられる。希少細胞の種類はCTCに限定されるものではない。例えば、循環内皮細胞（Circulating endothelial cells: CEC）、及び、血管循環内皮前駆細胞（Circulating endothelial progenitor cells: CEP）等も捕捉対象の希少細胞として取り扱うことができる。

[0018] 図1及び図2に示すように、細胞捕捉デバイス1は、厚さ方向に貫通孔が複数形成された細胞捕捉フィルタ2の上方に枠材3が設けられていると共に下方に排出流路が形成されたものである。

[0019] 細胞捕捉フィルタ2の材質としてはなるべく硬質なものがよく、特に金属が望ましい。金属は加工性に優れているため、フィルタ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

るため、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。このため、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。

[0020] 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、ルテニウム、クロムのいずれか、もしくはこれらの合金が好ましい。このうち、特に金属の主成分として銅又はニッケルが用いられることが好ましい。

[0021] 細胞捕捉フィルタ2として、本実施形態では、厚さ $25\mu\text{m}$ のニッケル基板を用いた場合について説明するが、厚さは適宜変更することができ、例えば $10\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ とすることができる。細胞捕捉フィルタ2は、図3に示すように、中央に複数の貫通孔21が形成されたフィルタ領域22が形成される。

[0022] 細胞捕捉フィルタ2のフィルタ領域22は、図4(A)に示すように、上方から見たときに直径 $8\mu\text{m}$ の円形の貫通孔21が複数設けられている。貫通孔21は、隣接する貫通孔21との間隔が $125\mu\text{m}$ となるように格子状に配置されていて、フィルタ領域22内に貫通孔21が $63\times 63=3969$ 個配置されている。また、断面から見た場合、図4(B)で示すように、上面側（被検液が導入される側）では貫通孔21の周囲に深さ $2\mu\text{m}$ の凹部23が形成されている。また、上面側から下面側（被検液が排出される側）へ向けて、貫通孔21の孔径が徐々に大きくなるように傾斜している。

[0023] 貫通孔21の形状及び配置は適宜変更することができるが、本実施形態に係る細胞捕捉フィルタ2では、隣接する貫通孔21との距離が $80\mu\text{m}$ 以上であることが好ましい。貫通孔21間の距離を上記の範囲とすることにより、捕捉した細胞の単離が容易となる。

[0024] 図1及び図2に戻り、細胞捕捉フィルタ2の上方の枠材3は、細胞捕捉フィルタ2のフィルタ領域22よりも外側において、細胞捕捉フィルタ2を囲むように設けられる。枠材3は、例えば、樹脂等のように細胞捕捉フィルタ2に対して密着性を有する材料により構成されることが好ましい。また、枠材3よりも上方において、細胞捕捉デバイス1に対して被検液又は処理液を

導入するために導入流路を有する導入部材等を設ける構成としてもよい。

[0025] 細胞捕捉フィルタ 2 の下方には、枠材 5 及び流路部材 6 によって、細胞捕捉フィルタ 2 の貫通孔 2 1 を上方から下方へ通過した被検液を外部に排出するための排出流路 6 1 と、排出流路 6 1 に対し被検液を移動させる排出領域 6 2 とが設けられている。

[0026] 具体的には、流路部材 6 には排出流路 6 1 が形成されている。流路部材 6 の上部には、シール部材 7 を介して枠材 5 が設けられている。枠材 5 は、内側にフィルタ領域 2 2 に対応した開口が形成された環状の部材である。この枠材 5 により囲まれた領域が排出領域 6 2 とされる。細胞捕捉フィルタ 2 と枠材 5 との間にはシール部材 8 が設けられる。

[0027] 枠材 5 及び流路部材 6 は、樹脂等によって構成することができる。枠材 5 は、例えば PMMA (Poly(methyl methacrylate)) によって構成することができる。また、流路部材 6 は、例えば、排出流路 6 1 をシリコンチューブにより形成して、その周囲を PDMS (poly(dimethylsiloxane)) により覆うことで成形する構成とすることができる。シール部材 7, 8 はそれぞれ細胞捕捉フィルタ 2、枠材 5 及び流路部材 6 に対して密着性を有する材料により構成されることが好ましい。また、枠材 3、シール部材 7, 8 としては、例えば、in situ PCR seal (Bio-Rad Laboratories 社製) を用いることができる。

[0028] このように形成した細胞捕捉デバイス 1 は、排出流路 6 1 をポンプ等に接続し、ポンプによる吸引によって被検液等を吸引することで、被検液が細胞捕捉フィルタ 2 の貫通孔 2 1 を通過すると共に通過できない細胞が細胞捕捉フィルタ 2 の上面側に捕捉される。

[0029] なお、被検液を導入する前には、例えば PBS (0.5% BSA (N,0-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド)、2 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸)) 等によって細胞捕捉デバイス 1 内を満たしておくことにより、被検液を好適に導入することができる。また、細胞を捕捉した後も、PBS 等によって捕捉された細胞の洗浄処理を行うことが好ましい。なお、捕捉

した後の細胞については、固定液、染色液等を用いて所望の処理を行ってもよい。この場合、細胞捕捉デバイス 1 内に固定液、染色液等を導入して所定の時間静置した後に、PBSにより洗浄する方法を用いることができる。

[0030] 次に、細胞捕捉デバイス 1 からの細胞の単離方法について、図 5 を参照しながら説明する。図 5 は、細胞捕捉デバイス 1 を用いた細胞の単離方法を説明する図である。まず、図 5 (A) に示すように、被検液を細胞捕捉フィルタ 2 の貫通孔 2 1 を通過することで、例えば CTC 等の捕捉対象の細胞が貫通孔 2 1 上に捕捉される（細胞捕捉ステップ）。この際、捕捉対象である CTC 9 1 の他に、血中成分である赤血球 9 2 及び白血球 9 3 等の他の細胞も細胞捕捉フィルタ 2 上に捕捉されることがある。

[0031] 次に、刺激応答性ハイドロゲルを細胞捕捉フィルタ 2 の細胞が捕捉されている上面側に導入して刺激応答性ハイドロゲル 3 1 により捕捉された細胞を包埋する（ゲル包埋ステップ）。刺激応答性ハイドロゲル 3 1 は、温度、電場、光等の外部環境のわずかな変化に応答して、親・疎水性などの物理化学的特性が劇的に変化するハイドロゲルのことをいう。本実施形態に係る細胞単離方法では、刺激に応答して、硬化するゲルが好適に用いられる。

[0032] このような刺激応答性ハイドロゲルとしては、例えば、Polyethyleneglycol diacrylate (PEGDA) を用いることができる。PEGDA は、図 6 に示すように、紫外線照射により架橋構造を得ることができる。また、他の刺激応答性ハイドロゲルとしては、Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)、キトサンゲル等が挙げられる。

[0033] PEGDA を用いる場合、例えば、2-hydroxy-2-methylpropiophenone を添加した溶液を細胞捕捉フィルタ 2 上に導入して枠材 3 上からカバーガラスを積層する方法を用いることができる。

[0034] PEGDA を用いる場合、刺激応答性ハイドロゲルの導入量は、単離対象の細胞を包埋することができる量であれば特に制限されないが、例えば、細胞捕捉フィルタ 2 上に導入された刺激応答性ハイドロゲルの高さが $100\mu\text{m}$ ~ $600\mu\text{m}$ 程度となるように、導入することが好ましい。このような範

囲とすることにより、 $10\mu\text{m}$ ～数 $10\mu\text{m}$ 程度の大きさの単離対象の細胞を好適に包埋することができる。また、硬化後のハイドロゲルの取り扱い性が向上する。高さが $100\mu\text{m}$ 以下である場合には硬化後のハイドロゲルの取り扱いが難しくなる。また、高さが $600\mu\text{m}$ よりも高くなると、硬化する領域の大きさを好適に制御することが難しくなる可能性がある。刺激応答性ハイドロゲルの導入量について、より好ましくは、高さが $200\mu\text{m}$ ～ $300\mu\text{m}$ 程度とされる。

[0035] 次に、図5（C）及び図5（D）に示すように、刺激応答性ハイドロゲル31を硬化させる（ゲル硬化ステップ）。刺激応答性ハイドロゲル31が光硬化性の場合には、光源からの光を捕捉対象の細胞の周囲に対してのみ光を照射することにより、細胞の周囲のみを硬化させることができる。なお、刺激応答性ハイドロゲル31としてPEGDAを用いる場合、紫外線レーザ光を照射することで、細胞の周囲のPEGDAを硬化させることができる。細胞の周囲の刺激応答性ハイドロゲルを選択的に硬化させることにより、他の細胞とは別に当該細胞を硬化させることができる。

[0036] その後、図5（E）に示すように、硬化後の刺激応答性ハイドロゲル32を細胞捕捉フィルタ2上から剥離する（剥離ステップ）。これにより、単離対象の細胞（CTC91）を個別に取り出すことができる。剥離した後は、ハイドロゲル中から細胞を個別に取出してもよいし、そのまま分析に使用してもよい。

[0037] ここで、刺激応答性ハイドロゲルとしてPEGDAを用いる場合について詳細を検討した結果を示す。

[0038] 細胞捕捉フィルタ2として、直径 $8\mu\text{m}$ の貫通孔21が間隔 $125\mu\text{m}$ で格子状に配置されたNi基板を準備した。また、捕捉対象の細胞として、NCI-H1975細胞またはHCC827細胞100又は1000cellsを健常者血液およびPBS（0.5% BSA、2mM EDTA）1mL中に添加したものを被検液とした。

[0039] まず、細胞捕捉デバイス1に対してPBS1mLを導入し、細胞捕捉デバ

イス 1 内の P B S で満たした。次に、細胞捕捉デバイス 1 内に被検液を導入し、ペリスタルティックポンプを用いて流量 $150-1750\ \mu\text{l}/\text{min}$ で送液した。その後、被検液中の血球成分を流きのために P B S $1\ \text{ml}$ を導入して洗浄を行い、ペリスタルティックポンプにより溶液を吸引操作することによって、細胞捕捉デバイス 1 内の P B S を除去すると共に、細胞捕捉フィルタ 2 の貫通孔 2 1 上に細胞を捕捉した。その後流量を $200\ \mu\text{m}/\text{min}$ に変更し、細胞固定処理として 4 % paraformaldehyde (P F A) in PBS を導入し、15 分間静置した。細胞捕捉デバイス 1 内を、P B S により PFA in PBS を洗浄し、0.2% TritonX-100 in PBS に置換して 15 分間静置することで透過処理を行った。次に、P B S にて洗浄した後、染色液 (FITC 標識抗cytok eratin 抗体、PE 標識抗 CD45 抗体、Hoechst33342) に置換して 30 分間静置することで染色を行った。その後、P B S にて洗浄した。

[0040] その後、Mn 250、575、700 の P E G D A に対して、2-hydroxy-2-methylpropiophenone を 1.0 % の割合で添加した溶液を作成して、細胞捕捉デバイス 1 の細胞捕捉フィルタ 2 上に導入し、その上面にカバーガラスを積層した。その後、細胞捕捉デバイス 1 を共焦点レーザ走査型顕微鏡 (FV1000-D IX81; Olympus 社製) に設置し、10 倍対物レンズを用いて基板上の単離対象細胞を選択した。対物レンズ 100 倍油浸レンズに切り替えた後に、レンズをカバーガラスに接触させ、レーザ強度 1.4mW、波長 405nm の励起光を 180 秒間照射し、局所的に P E G D A を硬化させた。その後、カバーガラスを剥離し硬化したハイドロゲルを細胞捕捉フィルタ 2 上から剥離することで、ハイドロゲル中に包埋された細胞を単離することができた。

[0041] 細胞捕捉フィルタ 2 上でカバーガラス 5 1 に覆われた後に光により硬化するハイドロゲル 3 2 の形状を模式的に示したものが図 7 である。ハイドロゲル 3 1 のうち、破線で示す光線 L に囲われた領域が硬化する。また、剥離したハイドロゲル (P E G D A) の走査型電子顕微鏡 (S E M) で撮影した結果を示したものが図 8 である。図 8 (A) は、剥離したハイドロゲルの全体像である。また、図 8 (B) は、剥離したハイドロゲルが存在した領域を破

線で示した像である。また、図8（C）は、細胞捕捉フィルタ2の貫通孔21周辺に対応するハイドロゲルの拡大像であり、細胞を捕捉していることを示したものである。

[0042] 硬化後のハイドロゲル32は、幅（細胞捕捉フィルタ2と対向する面での大きさ）が $100\mu\text{m}\sim 400\mu\text{m}$ 程度となり、高さが $100\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ 程度となる。また、レーザ光をPEGDAに対して照射した場合、硬化後のハイドロゲルは、図7に示すように中央部分が線対称のくびれを有する形状となる。このときのくびれS（図7参照）は、対物レンズの焦点面であると考えられる。なお、くびれSの有無等のハイドロゲルの形状は、レーザ光照射条件又はハイドロゲルの高さ等によって変更される。硬化後のハイドロゲルがくびれSを有する場合、ピンセット等でハイドロゲルを保持することが容易になるため、取り扱い性が向上する。また、細胞が包埋されたハイドロゲルは、細胞単体と比較して十分大きくなるため、肉眼でも視認が可能となる。したがって、細胞単体を取り扱う場合と比較して、取り扱い性がさらに向上する。

[0043] 硬化後のハイドロゲル（PEDGA）の高さを $200\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ とした場合、レーザ光による硬化領域について、細胞捕捉フィルタ2に対向する側の面（単離対象の細胞が存在する側の面）において半径 $250\mu\text{m}$ 以下とすることができた。硬化領域の面積を小さくすることができれば、細胞の単離精度が向上することができるため、PEDGAの高さは $200\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ とすることが好ましい。一方、複数の細胞をその位置関係を維持したまま細胞捕捉フィルタ2から剥離することを目的とした場合には、PEDGAの高さ等の条件は適宜変更することができる。

[0044] なお、上記のようにPEDGAを用いて単離した細胞について、全ゲノム増幅反応を行ったところ、PEDGAを用いずに細胞を単離した場合と同様に、遺伝子量が45－53万倍程度に増幅されることが確認された。すなわち、PEDGAのハイドロゲルによるゲノム増幅阻害は確認されなかった。なお、細胞がPEDGAのハイドロゲルに全て包埋されている場合には、全

ゲノム増幅に関与する酵素等が細胞に接近できなかったため、遺伝子量の増幅が生じないことも確認されたため、細胞の一部が外部に露出した状態であれば、全ゲノム増幅が可能であることから、単離された細胞に係る解析（遺伝子変異解析等）等を実施することが可能である。

[0045] 以上のように、本実施形態に係る細胞単離方法では、細胞捕捉ステップにおいて細胞が捕捉された細胞捕捉フィルタ 2 の一方の面上に刺激応答性ハイドロゲルを導入し、当該刺激応答性ハイドロゲルにより細胞を包埋した後、刺激応答性ハイドロゲルに対して刺激を与えることで、当該刺激応答性ハイドロゲルを硬化させ、硬化した刺激応答性ハイドロゲルを細胞捕捉フィルタから剥離する。このように、刺激応答性ハイドロゲルを用いて細胞を単離することにより、細胞が刺激応答性ハイドロゲルに包埋された状態で細胞を操作するため、単離対象の細胞を直接操作する場合と比較して取り扱い性が向上し、細胞を損傷させることなく単離することが可能となる。

[0046] 特に、ゲル硬化ステップにおいて、前記細胞を包埋した前記刺激応答性ハイドロゲルのうち単離対象の前記細胞の周囲のみを局所的に硬化させる構成とした場合には、細胞毎に個別に硬化されたハイドロゲルを操作することができるため、取り扱い性がさらに向上する。

[0047] また、上記の細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタ 2 は、一方の面側において隣接する貫通孔 21 間の距離が $80\ \mu\text{m}$ 以上である構成とすることで、隣接する貫通孔に捕捉された細胞がハイドロゲルによって一度に硬化されることを防ぐことができるため、細胞の単離を好適に行うことができる。従来は、細胞捕捉の速度を向上させるため、例えば、貫通孔間の距離を $60\ \mu\text{m}$ 程度としていた。この場合には、細胞の捕捉自体は好適に行われるものの、貫通孔毎に個別にハイドロゲルを硬化させることが困難であるため、ハイドロゲルを用いて細胞を 1 つずつ単離することが難しかった。これに対して、細胞捕捉フィルタ 2 における貫通孔 21 間の距離を大きくすることで、ハイドロゲルを用いた細胞毎の単離を好適に行うことができる。なお、複数の細胞が 1 つのハイドロゲル中に含まれた状態でハイドロゲルを硬化させ

て取り出してもよい場合には、貫通孔 21 間の距離は $80\mu\text{m}$ よりも小さくてもよい。この場合であっても、ハイドロゲルを用いることで、捕捉後の細胞の単離を好適に行うことができる。

[0048] 以上、本実施形態に係る細胞単離方法及び細胞捕捉フィルタについて説明したが、本発明に係る細胞単離方法及び細胞捕捉フィルタは、上記実施形態に限定されず、種々の変更を行うことができる。

[0049] 例えば、細胞捕捉フィルタが用いられる細胞捕捉デバイスは上記実施形態の構造に限定されず適宜変更される。細胞捕捉フィルタ 2 の貫通孔 21 に単離対象の細胞が捕捉できればよく、その形状等は限定されない。また、細胞捕捉フィルタ 2 の貫通孔 21 の形状等についても特に限定されず、開口形状としては、楕円、正方形、長方形、角丸長方形、多角形等が例示できる。なお、細胞の捕捉効率の観点からは、円、長方形又は角丸長方形が好ましい。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。

符号の説明

[0050] 1…細胞捕捉デバイス、2…細胞捕捉フィルタ、3, 5…枠材、6…流路部材、7, 8…シール部材、61…排出流路、62…排出領域。

請求の範囲

- [請求項1] 厚さ方向に複数の貫通孔を有する細胞捕捉フィルタに対して被検液を通過させることにより、細胞捕捉フィルタの一方の面上に前記被検液に含まれる単離対象の細胞を捕捉する細胞捕捉ステップと、
- 前記細胞捕捉ステップにおいて前記細胞が捕捉された前記細胞捕捉フィルタの一方の面上に刺激応答性ハイドロゲルを導入し、当該刺激応答性ハイドロゲルにより前記細胞を包埋するゲル包埋ステップと、
- 前記細胞を包埋した前記刺激応答性ハイドロゲルに対して刺激を与えることで、当該刺激応答性ハイドロゲルを硬化させるゲル硬化ステップと、
- 前記ゲル硬化ステップにおいて硬化した前記刺激応答性ハイドロゲルを前記細胞捕捉フィルタから剥離する剥離ステップと、
- を含む細胞単離方法。
- [請求項2] 前記ゲル硬化ステップにおいて、前記細胞を包埋した前記刺激応答性ハイドロゲルのうち単離対象の前記細胞の周囲のみを局所的に硬化させる請求項1に記載の細胞単離方法。
- [請求項3] 請求項1又は2に記載の細胞単離方法に用いられる細胞捕捉フィルタであって、
- 前記一方の面側において隣接する前記貫通孔間の距離が80 μm 以上である細胞捕捉フィルタ。