

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 11 月 24 日(24.11.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/186215 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/065104
- (22) 国際出願日: 2016 年 5 月 20 日(20.05.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-102515 2015 年 5 月 20 日(20.05.2015) JP
特願 2015-133031 2015 年 7 月 1 日(01.07.2015) JP
PCT/JP2016/052353 2016 年 1 月 27 日(27.01.2016) JP
- (71) 出願人: J S R 株式会社 (JSR CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目 9 番 2 号 Tokyo (JP). JSR ライフサイエンス株式会社 (JSR LIFE SCIENCES CORPORATION) [JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目 9 番 2 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 安倍 弘喜 (ABE, Hiroki); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目 9 番 2 号 JSR ライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP). 藤井 寛也 (FUJII, Hiroya); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目 9 番 2 号 JSR ライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP). 内田 公子 (UCHIDA, Kimiko); 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目 9 番 2 号 JSR ライフサイエンス株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 8 号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロピア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: SEPARATION METHOD, DETECTION METHOD, SIGNAL MEASUREMENT METHOD, DISEASE DETERMINATION METHOD, DRUG EFFICACY ASSESSMENT METHOD, KIT, LIQUID COMPOSITION, AND SPECIMEN DILUENT

(54) 発明の名称: 分離方法、検出方法、シグナル測定方法、疾患の判定方法、薬効評価方法、キット、液状組成物及び検体希釈液

(57) Abstract: Provided is a method which makes it possible to reduce nonspecific adsorption to a solid-phase carrier, and to selectively and efficiently separate vesicles having a lipid bilayer. This method for separating vesicles having a lipid bilayer includes: a composite formation step for forming a composite comprising a vesicle and a solid-phase carrier, by contacting a biological specimen that contains a vesicle having a lipid bilayer with a solid-phase carrier to which a ligand is bonded that recognizes a surface antigen present on the vesicle surface; and a cleaning step for cleaning the composite. The method is characterized by performing the composite formation step and/or the cleaning step in an environment having a salt concentration of 0.15-2M.

(57) 要約: 固相担体への非特異吸着を低減でき、脂質二重膜を有する小胞を選択的かつ効率よく分離できる方法を提供すること。脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、前記複合体を洗浄する洗浄工程を含み、前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかを、塩濃度 0.15 ~ 2 M の環境下で行うことを特徴とする、脂質二重膜を有する小胞の分離方法。

WO 2016/186215 A1

明 細 書

発明の名称：

分離方法、検出方法、シグナル測定方法、疾患の判定方法、薬効評価方法、キット、液状組成物及び検体希釈液

技術分野

[0001] 本発明は、分離方法、検出方法、シグナル測定方法、疾患の判定方法、薬効評価方法、キット、液状組成物及び検体希釈液に関する。より詳細には、エクソソームなどの脂質二重膜を有する小胞の分離方法、該方法を利用した核酸又はタンパク質の検出方法、シグナル測定方法、疾患の判定方法、疾患治療薬の薬効評価方法、疾患判定又は薬効評価用キット、上記分離方法に用いる液状組成物、及び検体希釈液に関する。

背景技術

[0002] 小胞は脂質二重膜に包まれた構造を有するものであり、斯様な小胞のうち、生体内の体液中に存在する小胞顆粒としてエクソソームが知られている。エクソソームの表面には、一般的な細胞表面と同様に、種々の膜タンパク質が存在することが知られており、その一方で、エクソソームの内部には、サイトカイン等各種タンパク質以外にも *microRNA* (*miRNA*) が含まれることも分かってきた。

[0003] また、免疫系の細胞や各種癌細胞等の種々の細胞からエクソソームが分泌されることが知られており、生体内の細胞間コミュニケーションの媒介役としてのエクソソームの機能、エクソソームと生理現象や癌等の疾患との関連性が注目され、これについて検討が進められている。例えば、腫瘍マーカーである *EpCAM* の抗体を用いた場合に、卵巢癌患者の循環血中からエクソソームが分離され、エクソソーム由来の *miRNA* 発現量と卵巢癌の進行との間に関連性があることが既に報告されている（非特許文献1）。

[0004] また、エクソソーム上に発現する4回膜貫通型の膜タンパク質として、テトラスパニンファミリーに属する *CD9*、*CD63* 及び *CD81* があり、非

特許文献2には、メラノーマ患者の血漿中のエクソソーム量が健常者のものと比べて高く、これがCD63に対する抗体や腫瘍関連マーカーのCaveolin-1に対する抗体で検出・定量化できることが報告されている。また、遠心分離後の血漿サンプルに、抗CD63抗体や種々の膜タンパク質に対する抗体等を組み合わせて反応させることで、癌患者におけるエクソソームに由来するシグナルを定量して解析することが行われている（特許文献1）。

[0005] 上記のように、血清、血漿、血液などの臨床検体からエクソソームを特異的に捕捉し、エクソソームに含まれるタンパク質やmiRNAを新たなバイオマーカーとして疾患の早期診断や再発の発見に利用する試みがされている。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2010/065968号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：D. D. Taylor, et al., Gynecol. Oncol., 110, 13-21 (2008)

非特許文献2：M. Logozzi, et al., PLoS ONE, 4, 1-10 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、上記臨床検体は、アルブミンおよびグロブリン等の高濃度のタンパク質を含んでいるため、臨床検体から分離したエクソソームを疾患の判定に用いる際に、固相担体や反応容器内壁に対する非特異吸着に起因して、抗原抗体反応などの特異反応が検体成分により阻害をうけることや陰性と判定されるべき検体が誤って陽性と判定される（以下、偽陽性）ことが大きな問題となる。この問題は臨床検体が血清や血漿の場合に特に顕著となる

。

この偽陽性を減少させるために、反応中に界面活性剤を添加する、或いは固相担体にタンパク質やポリマーをオーバーコートするなどの手法が用いられてきたが、これまでの手法だけでは非特異吸着に起因する偽陽性を減少させるには限界があった。偽陽性を減少させることは、エクソソームをはじめとする小胞を利用した疾患の判定や疾患治療薬の薬効評価において、ますます重要な課題となってくる。

また、エクソソームの分離に先立ち、抗原抗体反応を阻害しうる検体成分を取り除き、エクソソームを濃縮するなどの前処理をすることが提案されており、斯様な前処理法として、ポリエチレングリコール（PEG）沈殿法による単離法、超遠心機を用いた単離法等が一般的に行われているが、このような前処理を行っても非特異吸着を十分に低減することは困難であり、また手間がかかるという問題があった。

本発明が解決しようとする課題は、固相担体への非特異吸着を低減でき、脂質二重膜を有する小胞を選択的かつ効率よく分離できる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] そこで、本発明者らは鋭意検討した結果、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを混合して複合体形成反応液を形成して、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、上記複合体形成工程で形成された小胞と固相担体との複合体に洗浄液を加えて洗浄工程液を形成し、前記複合体を洗浄する洗浄工程を含む、脂質二重膜を有する小胞の分離方法において、（以下、複合体形成反応液および洗浄工程液を総称して、「反応液」と言う。）前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかを、反応液中の塩濃度0.15～2M的环境下で行うことにより、固相担体への非特異吸着を低減でき、脂質二重膜を有する小胞を選択的かつ効率よく分離できることを見出し、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は、以下の＜1＞～＜23＞を提供するものである。

[0011] ＜1＞ 脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、前記複合体を洗浄する洗浄工程を含み、前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかを、塩濃度0.15～2Mの環境下で行うことを特徴とする、脂質二重膜を有する小胞の分離方法。

＜2＞ 前記複合体形成工程を、塩濃度0.15～2Mの環境下で行う、＜1＞に記載の分離方法。

＜3＞ 前記生体試料が、体液又は細胞培養上清である、＜1＞又は＜2＞に記載の分離方法。

＜4＞ 前記生体試料が、体液である、＜1＞～＜3＞のいずれかに記載の分離方法。

＜5＞ 前記複合体形成工程に用いられる複合体形成反応液が、無機塩を含有する、＜1＞～＜4＞のいずれかに記載の分離方法。

＜6＞ 前記無機塩が、アルカリ金属ハロゲン化物である、＜5＞に記載の分離方法。

＜7＞ 前記複合体形成工程における複合体形成反応の反応温度が、2～42℃の範囲内である、＜1＞～＜6＞のいずれかに記載の分離方法。

＜8＞ 前記リガンドが、小胞の表面に存在する表面抗原を認識する抗体である、＜1＞～＜7＞のいずれかに記載の分離方法。

＜9＞ 前記小胞が、エクソソームである、＜1＞～＜8＞のいずれかに記載の分離方法。

＜10＞ 前記固相担体が、磁性粒子である、＜1＞～＜9＞のいずれかに記載の分離方法。

＜11＞ 前記洗浄工程が、前記磁性粒子を磁力により集めて磁性粒子と液相とを分離する集磁工程、及び該集磁工程で分離された磁性粒子を洗浄液中に分散させる分散工程を含む、＜10＞に記載の分離方法。

[0012] <12> <1>~<11>のいずれかに記載の分離方法の後に、さらに小胞中の核酸を検出する核酸検出工程を含むことを特徴とする、小胞中の核酸の検出方法。

<13> <1>~<11>のいずれかに記載の分離方法の後に、さらに小胞の内側及び表面の少なくとも一方に存在するタンパク質を検出するタンパク質検出工程を含むことを特徴とする、小胞由来のタンパク質の検出方法。

<14> <1>~<11>のいずれかに記載の分離方法の後に、さらに前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定するシグナル測定工程を含むことを特徴とする、小胞由来のシグナル測定方法。

<15> 被検者が疾患を発症しているか否かを判定するための方法であって、被検者由来の生体試料を用いて、<14>に記載のシグナル測定方法により前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程を含むことを特徴とする、疾患の判定方法。

<16> 疾患治療薬の薬効評価方法であって、疾患治療薬の投与前及び投与後の被検者由来の生体試料を用いて、<14>に記載のシグナル測定方法により、前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程を含むことを特徴とする、疾患治療薬の薬効評価方法。

[0013] <17> 脂質二重膜を有する小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体と、無機塩又は有機塩を含み該無機塩又は有機塩の含有量が、0.15M以上の塩濃度を有する液状組成物を備えることを特徴とする、キット。

<18> 疾患の判定用又は疾患治療薬の薬効評価用である、<17>に記載のキット。

[0014] <19> 脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、前記複合体を洗浄する洗浄工程とを含む、脂質二重膜を有する小胞の分離方法に使用

される、前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかに添加するための液状組成物であって、0.15 M以上の塩濃度を有することを特徴とする、液状組成物。

[0015] <20> 不溶性担体を用いて脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料から脂質二重膜を有する小胞を分離する方法に使用される、前記小胞と前記不溶性担体との複合体を形成させるための検体希釈液であって、0.15 M以上の塩濃度を有することを特徴とする、検体希釈液。

<21> 無機塩を含有する、<20>に記載の検体希釈液。

<22> 前記無機塩が、アルカリ金属ハロゲン化物である、<21>に記載の検体希釈液。

[0016] <23> 不溶性担体を用いて脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料から脂質二重膜を有する小胞を分離する方法であって、0.15 M以上の塩濃度を有する検体希釈液を用いることを特徴とする、脂質二重膜を有する小胞の分離方法。

発明の効果

[0017] 本発明の脂質二重膜を有する小胞の分離方法によれば、固相担体への非特異吸着を低減でき、脂質二重膜を有する小胞を選択的かつ効率よく分離できる。

したがって、本発明によれば小胞中の核酸、小胞由来のタンパク質、小胞由来のシグナルを、簡便且つ正確に検出・測定できる。また、本発明の疾患の判定方法、薬効評価方法は、偽陽性になりにくい。また、本発明のキット、液状組成物、検体希釈液を用いることにより、固相担体への非特異吸着を低減でき、脂質二重膜を有する小胞を選択的かつ効率よく分離できる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1-1]塩濃度を0.15～0.35 Mとすることによる非特異吸着低減作用を示す図である（臨床検体：血清）。

[図1-2]塩濃度を0.15～0.35 Mとすることによる非特異吸着低減作用を示す図である（臨床検体：クエン酸血漿）。

[図2-1]反応温度25℃における塩濃度を0.15～0.35Mとすることによる反応性向上作用を示す図である（臨床検体：血清）。

[図2-2]反応温度4℃における塩濃度を0.25Mとすることによる反応性向上作用を示す図である（臨床検体：血清）。

[図3]種々の臨床検体を用いた場合の非特異吸着低減作用を確認した図である。

[図4]種々の臨床検体を用いた場合の反応性向上作用を確認した図である。

[図5-1]固相担体として抗CD63抗体結合磁性粒子を用いた場合の反応性向上作用を確認した図である。

[図5-2]固相担体として抗CD81抗体結合磁性粒子を用いた場合の反応性向上作用を確認した図である。

[図5-3]固相担体として抗EpCAM抗体結合磁性粒子を用いた場合の反応性向上作用を確認した図である。

[図6]固相担体として抗CD9抗体結合磁性粒子を用いてヒト健常者血清と反応させた場合の小胞中の核酸の検出結果を示す図である。

[図7-1]ヒト健常者血清に由来する小胞中の核酸の検出結果を示す図である。

[図7-2]ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞中の核酸の検出結果を示す図である。

[図8-1]ヒト健常者血清に由来する小胞表面のタンパクの検出結果を示す図である。

[図8-2]ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞表面のタンパクの検出結果を示す図である。

[図9-1]ヒト健常者血清に由来する小胞表面のネイティブフォームの立体構造を維持したタンパクの検出結果を示す図である。

[図9-2]ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞表面のネイティブフォームの立体構造を維持したタンパクの検出結果を示す図である。

[図9-3]ヒト結腸がんHT29細胞より調製したエクソソーム含有培養上清をヒト健常者血清に添加した、擬似的な疾患由来生体試料から、小胞表面のタ

ンパクをネイティブフォームの立体構造を維持したまま検出した結果を示す図である。

[図9-4]ヒト結腸がんH T 2 9細胞より調製したエクソソーム含有培養上清をヒト健常者ヘパリン血漿に添加した、擬似的な疾患由来生体試料から、小胞表面のタンパクをネイティブフォームの立体構造を維持したまま検出した結果を示す図である。

[図10-1]ヒト結腸がんH T 2 9細胞より調製したエクソソーム含有培養上清をヒト健常者血清に添加した、擬似的な疾患由来生体試料から、小胞表面のタンパクを検出した結果を示す図である。

[図10-2]ヒト結腸がんH T 2 9細胞より調製したエクソソーム含有培養上清をヒト健常者ヘパリン血漿に添加した、擬似的な疾患由来生体試料から、小胞表面のタンパクを検出した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0019] 〔脂質二重膜を有する小胞の分離方法〕

本発明の脂質二重膜を有する小胞の分離方法は、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、小胞と固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、複合体を洗浄する洗浄工程を含み、複合体形成工程及び洗浄工程の少なくともいずれかを、塩濃度0.15～2Mの環境下で行うことを特徴とするものである。ここで、本明細書において塩濃度とは、無機塩および有機塩の合計である塩濃度であり、好ましくは無機塩の塩濃度であり、さらに好ましくは1価の無機塩の塩濃度であり、特に好ましくはアルカリ金属ハロゲン化物の濃度であり、最も好ましくは塩化ナトリウムの濃度である。反応液の塩濃度は、反応液中の塩の終濃度ともいう。

[0020] 〔複合体形成工程〕

複合体形成工程は、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを混合して複合体形成反応液を形成して、小胞と固相担体との複合体を形成させる工程

である。複合体形成反応液を形成することにより、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とが接触する。上記接触により、リガンドに小胞が捕捉され、小胞と固相担体との複合体が形成される。なお、複合体形成工程の反応系には、上記固相担体に結合したリガンド以外に、脂質二重膜を有する小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドも共存していてもよい。

[0021] 上記生体試料は脂質二重膜を有する小胞を含むものであれば特に限定されるものではなく、例えば、体液、菌体液、細胞培養の培地、細胞培養上清、組織細胞の破碎液等の各種液体が挙げられる。この中でも、体液、細胞培養上清が好ましく、体液がより好ましい。体液としては、全血、血清、血漿、血液成分、各種血球、血餅、血小板等の血液組成成分の他、尿、精液、母乳、汗、間質液、間質性リンパ液、骨髓液、組織液、唾液、胃液、関節液、胸水、胆汁、腹水、羊水等が挙げられ、好ましくは血液組成成分である。本発明の分離方法は、斯様な臨床検体を生体試料として用いた場合であっても、固相担体への非特異吸着が低く、捕捉反応の反応性が高いため、本発明の分離方法によれば、広範な種類の生体試料から選択的かつ効率よく小胞を分離できる。例えば、生体試料として血漿を用いた場合でも非特異吸着が起こりにくく、血清を用いた場合でも捕捉反応の反応性が高い。

なお、血液組成成分は、クエン酸、ヘパリン、EDTA等の抗凝固剤で処理されたものでもよい。

[0022] 上記生体試料は、バッファー組成物で希釈するなどして予め前処理したものを用いてもよいが、生体から摂取したものをそのまま用いることもできる。すなわち、本発明の分離方法によれば、PEG沈殿法、超遠心機等を用いた単離法等による前処理を行わず簡便に選択的な分離をすることも可能である。

[0023] また、上記脂質二重膜を有する小胞としては、細胞、細胞から細胞外に放出されるエクソソームのような小胞、エンベロープを有するウイルス等が挙げられるが、本発明の分離方法は、小胞がエクソソームである場合に特に好

ましく用いられる。

また、小胞の表面に存在する表面抗原は、小胞の表面に存在する物質で抗原性のあるものであれば特に限定されない。エクソソームの表面抗原を例に挙げると、CD9、CD63、CD81等のテトラスパニン類；MHCⅠ、MHCⅡ等の抗原提示関連タンパク質；インテグリン、ICAM-1、EpcAMなどの接着分子；EGFRvIII、TGF- β などのサイトカイン／サイトカイン受容体、酵素類等が挙げられる。これらの中でも、エクソソーム表面に存在する抗原タンパク質が好ましい。

[0024] 生体試料の使用量（濃度）は、好ましくは0.001～100%（w/v）、より好ましくは0.1～50%（w/v）である。

[0025] また、本発明の分離方法に用いる固相担体は、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合したものであれば特に限定されない。

リガンドとしては、小胞の表面に存在する表面抗原を認識する抗体が好ましく、エクソソームの表面に存在する表面抗原を認識する抗体がより好ましい。また、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。

上記モノクローナル抗体は、特に限定されるものではなく、公知の方法、例えば、K. Watanabe et al., Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis, J. Clin. Invest. 114 (2004), 898-907に記載された方法に従って調製したものでよい。また、エクソソームの表面抗原CD9、CD63、CD81等のテトラスパニン類を認識するモノクローナル抗体は、国際公開第2013/099925号等を参照して作製できる。

なお、上記抗体のクラスとしては、IgG、IgMが挙げられるが、IgGが好ましい。また、これらを低分子化したフラグメントを用いてもよい。例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab等が挙げられる。

[0026] 上記リガンドを結合させる固相担体の材質としては、例えば、ポリスチレ

ン類、ポリエチレン類、ポリプロピレン類、ポリエステル類、ポリ（メタ）アクリロニトリル類、スチレンーブタジエン共重合体、ポリ（メタ）アクリル酸エステル類、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物；ガラス；金属；磁性体；磁性体を含む樹脂組成物；これらの組み合わせ等が挙げられる。

また、固相担体の形状は特に限定されるものではなく、例えば、トレイ状、球状、粒子状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管等が挙げられる。

本発明においては、固液分離や洗浄の容易性の観点から、磁性粒子が好ましい。

[0027] 上記磁性粒子としては、例えば、四三酸化鉄（ Fe_3O_4 ）、三二酸化鉄（ $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ）、各種フェライト、鉄、マンガン、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属；コバルト、ニッケル、マンガンなどの合金からなる磁性体からなる微粒子；これら磁性体を樹脂中に含む磁性粒子が挙げられる。樹脂としては、疎水性重合体、親水性重合体などが挙げられる。

中でも、磁性体を樹脂中に含む磁性粒子が好ましく、超常磁性微粒子を含む母粒子の表面にポリマー層が形成されたものがより好ましい。例えば、特開2008-32411号公報に記載の、超常磁性微粒子を含む母粒子の表面に、疎水性の第1ポリマー層が形成され、当該第1ポリマー層上に、少なくとも表面にグリシジル基を有する第2ポリマー層が形成され、当該グリシジル基を化学修飾することにより極性基が導入された磁性粒子が挙げられる。

[0028] ここで、超常磁性微粒子としては、粒子径20nm以下（好ましくは粒子径5～20nm）の酸化鉄系の微粒子が代表的であり、 XFe_2O_4 （Xは、Mn、Co、Ni、Mg、Cu、 $\text{Li}_{0.5}\text{Fe}_{0.5}$ 等である。）で表現されるフェライト、 Fe_3O_4 で表現されるマグネタイト、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ が挙げられ、飽和磁化が強く、かつ残留磁化が少ない点で、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 及び Fe_3O_4 のいずれか一方を含むことが好ましい。

[0029] また、上記疎水性の第1ポリマー層を形成するためのモノマーは、単官能モノマー、多官能モノマーに大別される。ここで、単官能モノマーとは反応性基を1個有するモノマーであり、多官能モノマーとは反応性基を2個以上有するモノマーである。

単官能モノマーとしては、例えば、スチレン、 α -メチルスチレン、ハロゲン化スチレンなどの芳香族ビニル系モノマー；メチルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルアクリレート、エチルメタクリレート、ステアリルアクリレート、ステアリルメタクリレート、シクロヘキシルアクリレート、シクロヘキシルメタクリレート、イソボニルアクリレート、イソボニルメタクリレート等のエチレン性不飽和カルボン酸アルキルエステル系モノマーを例示することができる。

多官能モノマーとしては、例えば、エチレングリコールジアクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、トリメチロールプロパントリメタクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ペンタエリスリトールトリメタクリレート、ジペンタエリスリトールヘキサアクリレート、ジペンタエリスリトールヘキサメタクリレート等の多官能（メタ）アクリレート；ブタジエン、イソプレン等の共役ジオレフィンの他、ジビニルベンゼン、ジアリルフタレート、アリルアクリレート、アリルメタクリレートなどを例示することができる。

[0030] また、上記第2ポリマー層を形成するためのモノマーは、粒子表面への官能基導入を主目的とするものであり、グリシジル基含有モノマーを含むものが好ましい。グリシジル基含有モノマーの含有量としては、第2ポリマー層を形成するための全モノマー中、20質量%以上が好ましい。ここで、グリシジル基含有モノマーとしては、グリシジルアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル等が挙げられる。

[0031] 第2ポリマー層のグリシジル基を化学修飾することにより導入される極性基としては、リガンドと反応可能な官能基であることが好ましく、酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群より選ばれた少なくとも1種の原子を1

個以上含むものがより好ましい。中でも、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシ基、活性エステル基がより好ましい。特に、磁性粒子の第2ポリマー層が前記極性基及び2, 3-ジヒドロキシプロピル基を有する場合、リガンドとの結合性が良好となる。

また、磁性粒子等の固相担体は、その表面にビオチン類結合部位を有する物質が固定されていてもよい。ビオチン類結合部位を有する物質としては、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、タマビジン、及びそれらの誘導体から選ばれる1種又は2種以上の化合物等が挙げられる。さらに、この場合、固相担体は、ビオチン類結合部位を有する物質を介してビオチン類を結合した抗体等が結合されていてもよい。固相担体の表面へのビオチン類結合部位を有する物質の固定は、日本国特許第4716034号公報に記載された方法等の公知の方法により行えばよい。

[0032] リガンドを固相担体に結合する方法としては、物理的吸着法や、共有結合法、イオン結合法といった化学的に結合する方法などが用いられる。物理的吸着法としては、固相担体にリガンドを直接固定する方法、アルブミンなどの他のタンパク質に化学的に結合させてから吸着させて固定する方法などが挙げられる。化学的に結合させる方法としては、固相担体表面に導入した、リガンドと反応可能な官能基を利用して、固相担体上に直接結合する方法、固相担体とリガンドとの間にスペーサー分子（カルボジイミド化合物など）を化学結合で導入してから結合する方法、アルブミンなどの他のタンパク質にリガンドを結合させた後、そのタンパク質を固相担体に化学結合する方法などが挙げられる。

[0033] また、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体は、市販品を用いてもよい。例えば、Exosome-Human CD9 Isolation Reagent (from cell culture)、Exosome-Human CD63 Isolation / Detection Reagent (from cell culture media)（いずれもLife technologies社製）

、CD9 Exo-Flow Capture kit、CD63 Exo-Flow Capture kit、CD81 Exo-Flow Capture kit（いずれもSBI社製）等が挙げられる。

[0034] また、上記リガンドが結合した固相担体の使用量は、生体試料に対し、好ましくは0.00001～0.1質量倍、より好ましくは0.0001～0.01質量倍である。

[0035] 複合体形成工程における複合体形成反応液には、上記各成分の他に、必要に応じて、界面活性剤；アルブミン等のタンパク質；核酸；ショ糖等の糖類等を添加することもできる。

界面活性剤は、非特異吸着の低減の観点、小胞へのダメージを抑える上で効果的であり、非イオン性界面活性剤が好ましく、ポリエチレングリコール型非イオン性界面活性剤がさらに好ましい。また、界面活性剤は、芳香族基を分子中に含まない界面活性剤が好ましい。

芳香族基を分子中に含まない界面活性剤としては、例えば、高級アルコールエチレンオキサイド付加物、脂肪酸エチレンオキサイド付加物、多価アルコール脂肪酸エステルエチレンオキサイド付加物、高級アルキルアミンエチレンオキサイド付加物、脂肪酸アミドエチレンオキサイド付加物、油脂のエチレンオキサイド付加物、ポリアルキレングリコールエチレンオキサイド付加物等が挙げられる。これらの中でも、ポリアルキレングリコールエチレンオキサイド付加物が好ましい。具体的には、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール、ポリオキシエチレン（196）ポリオキシプロピレン（67）グリコール等が挙げられる。

界面活性剤の使用量は、複合体形成反応液の全量に対して、好ましくは0.005～10%（w/v）、より好ましくは0.015～3.5%（w/v）である。

[0036] また、複合体形成工程における反応温度は、好ましくは2～42℃の範囲内であり、より好ましくは3～40℃の範囲内、特に好ましくは4～37℃の範囲内である。本発明の分離方法における複合体形成工程は常温又は常温

付近でも反応が選択的かつ効率よく進行するため、非常に簡便である。また、反応時間は、通常、1分間～48時間であるが、好ましくは5分間～24時間、より好ましくは10分間～10時間、特に好ましくは10分間～5時間である。

[0037] 複合体形成工程において、系中のpHは特に限定されないが、好ましくはpH5～10の範囲、より好ましくはpH6～8の範囲である。目的のpHを維持するために、通常、緩衝液が用いられる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液等が挙げられる。

[0038] （洗浄工程）

洗浄工程は、上記複合体形成工程で形成された小胞と固相担体との複合体に洗浄液を加えて洗浄工程液を形成し、上記複合体を洗浄する工程である。これによって、未反応の成分や未反応の標識物質等が除去される。複合体形成工程における複合体を含む系をそのまま洗浄してもよい。

[0039] 上記洗浄工程は、通常、固相担体の形状により2種類に分けられる。磁性粒子のように固相担体が粒子状である場合には、例えば洗浄液中に磁性粒子を分散させて洗浄する方法が挙げられ、一方、固相担体がマイクロプレートのような形態である場合には、その表面に洗浄液を接触させて洗浄する方法が挙げられる。いずれの態様であっても、本発明においては、洗浄液として、界面活性剤を含む洗浄液を使用することが好ましい。界面活性剤としては、上記複合体形成工程で使用してもよいものと同様のものが好ましい。

[0040] また、固相担体が磁性粒子の場合、洗浄工程としては、磁性粒子を磁力により集めて磁性粒子と液相とを分離する集磁工程、及び該集磁工程で分離された磁性粒子を洗浄液中に分散させる分散工程とを含むことが好ましい。これによって、未反応の物質や生体試料中の夾雑物を磁性粒子表面からさらに効率よく洗浄・分離除去できる。

具体的には、反応容器に磁場を作用させ、磁性粒子を反応容器壁に付着させて集めた後、反応上清を除去し、さらに必要に応じて洗浄液を加え、同様

に磁場を作用させた後上清を除去する操作を繰り返すことにより行えばよい。洗浄液としては、上記複合体形成工程で挙げた界面活性剤と緩衝液を含む洗浄液が好ましい。

[0041] (反応液の塩濃度)

本発明の分離方法では、複合体形成工程及び洗浄工程の少なくともいずれかを、塩濃度 0.15 ~ 2 M の環境下で行うことが好ましい。すなわち、複合体形成反応液の塩濃度および洗浄工程液の塩濃度の少なくともいずれかを、0.15 ~ 2 M の環境下で行うことが好ましい。さらに、捕捉反応の反応性の観点から、複合体形成工程を、塩濃度 0.15 ~ 2 M の環境下で行うのが好ましい。反応液の塩濃度は、複合体形成工程の全体もしくは一部、または洗浄工程の全体もしくは一部において 0.15 ~ 2 M の範囲であればよい。

反応液の塩濃度は、より好ましくは 0.2 M 以上、さらに好ましくは 0.25 M 以上であり、また、より好ましくは 1 M 以下、さらに好ましくは 0.5 M 以下、特に好ましくは 0.45 M 以下、最も好ましくは 0.35 M 以下である。

[0042] 反応液に含まれる無機塩としては、アルカリ金属ハロゲン化物；炭酸塩、重炭酸塩等の無機酸の塩が挙げられ、アルカリ金属ハロゲン化物が好ましく、アルカリ金属塩化物がより好ましい。無機塩としては、具体的には、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム等が挙げられ、これらのうち 1 種を単独で用いても 2 種以上を組み合わせ用いてもよい。これらの中でも、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムが好ましく、塩化ナトリウム、塩化カリウムがより好ましく、塩化ナトリウムが特に好ましい。

[0043] 反応液に含まれる有機塩としては、有機酸の塩が好ましく、有機酸のアルカリ金属塩がより好ましく、カルボン酸のアルカリ金属塩が更に好ましく、カルボン酸のナトリウム塩が特に好ましい。有機塩としては、具体的には、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリ

ウム、コハク酸ナトリウム、乳酸ナトリウム等が挙げられ、これらのうち1種を単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0044] 反応液の塩濃度が0.15M未満の場合及び2Mよりも高い場合には、非特異吸着の増大や捕捉反応の反応性の低下が生じる場合があり、また、小胞内外の浸透圧差によって、小胞が破壊される場合もある。

[0045] (解離工程)

本発明の分離方法は、洗浄工程後、捕捉された小胞をリガンドから解離する解離工程を有していてもよい。

リガンドが特定の抗体である場合に抗原・抗体反応による特異的な結合を解離される条件としては、アフィニティークロマトグラフィー等で種々のものが知られている（例えば、“A f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y p r i n c i p l e s & m e t h o d s” P h a r m a c i a L K B B i o t e c h n o l o g y 参照）。上記解離工程はこれに準じて行えばよい。即ち、本発明で使用される解離液としては、塩酸、硫酸、プロピオン酸、酢酸、グリシン／塩酸バッファー等の酸性溶液；水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、アンモニア水溶液、ジエチルアミン等のアルカリ性溶液；3M塩化ナトリウム水溶液、4.5M塩化マグネシウム水溶液等の高イオン強度溶液；SDS、T r i t o n X-100、T w e e n 20等の界面活性剤含有溶液；ジオキサン、エチレングリコール等の極性を下げる物質を含有する緩衝液；トリクロロ酢酸、チオシアン酸などのカオトロピックイオンの他、尿素、塩酸グアニジン等を含有する緩衝液が挙げられる。

[0046] [核酸の検出方法及びタンパク質の検出方法]

本発明の小胞中の核酸の検出方法は、上記分離方法の後に、さらに小胞中の核酸を検出する核酸検出工程を含むものである。

また、本発明の小胞由来のタンパク質の検出方法は、上記分離方法の後に、さらに小胞の内側及び表面の少なくとも一方に存在するタンパク質を検出するタンパク質検出工程を含むものである。

これら検出方法は、上記分離方法を行う以外は常法にしたがっておこなえばよい。上記脂質二重膜を有する小胞がエクソソームである場合、回収されたエクソソームから核酸やタンパク質を、PCR法、電気泳動法、ウェスタンブロッティング法、免疫化学的方法、フローサイトメトリー等の公知の方法に従って検出すればよい。これらの中でも、簡便に感度よく検出でき、且つネイティブフォームの立体構造を維持できる点からは、フローサイトメトリーが好ましい。また、核酸としては、miRNAやmRNA等が挙げられる。

特に、エクソソームは、種々の細胞、例えば免疫系の細胞や各種癌細胞から分泌されることから、本発明の核酸の検出方法によれば、エクソソーム由来の核酸（miRNA等）を検出し、それを解析することによって、生理現象や各種疾患の判定が可能になる。

[0047] [シグナル測定方法]

本発明の小胞由来のシグナル測定方法は、上記分離方法の後に、さらに前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定するシグナル測定工程を含むものである。

上記シグナル強度の測定は免疫測定法により行えばよく、例えば、酵素免疫測定法（EIA）、酵素イムノメトリックアッセイ法（ELISA）、蛍光免疫測定法（FIA）、放射線免疫測定法（RIA）、発光免疫測定法、イムノブロット法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー等が挙げられる。これらの中でも、簡便に感度よく検出でき、且つネイティブフォームの立体構造を維持できる点からは、フローサイトメトリーが好ましい。また、簡便に感度よく抗体を検出できる点からは、ELISA法が好ましい。ELISA法としては、競合法、サンドイッチ法などが挙げられる。また、検出感度の面から発光免疫測定法も好ましい。発光免疫測定法は、例えば、富士レビオ社製クラスIIIシリーズ等の市販の発光基質を反応させて、Promega社製 GloMax等の発光測定機を用いて、発光免疫測定法におけるシグナル強度である発光強度を測定することにより行うことができる。

ここで、サンドイッチELISA法を使用する場合の分離方法の一例を示す。まず、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドを固相担体に結合した後、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料を接触させて複合体を形成させ、その後洗浄する。そこに、モノクローナル抗体又はその抗体断片や疾患特異的膜タンパク質抗体又はその抗体断片を修飾した標識抗体を添加して、さらなる複合体を形成させる。そして、形成された複合体中の標識量を検出することにより、生体試料に含まれる小胞に由来するシグナル量や、生体試料に含まれる疾患特異的小胞量を測定することができる。

[0048] 〔疾患の判定方法〕

本発明の被検者が疾患を発症しているか否かを判定するための方法は、被検者由来の生体試料を用いて、上記シグナル測定方法により前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程（以下、工程（I）ともいう）を含むことを特徴とするものである。

そして、工程（I）で測定されたシグナル強度と、対照者由来の生体試料のシグナル強度とを対比して、被検者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合に、被検者が疾患を発症していると判定すればよい（以下、工程（II）ともいう）。

本発明の疾患の判定方法で判定可能な疾患としては、癌疾患（大腸癌、乳癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、膵癌、胃癌、食道癌、肝癌、肺癌、腎癌、皮膚癌など）、炎症系疾患（リウマチ、変形性関節症、腎症、膵炎、肝炎、アレルギーなど）、アルツハイマー等の神経変性疾患、脳疾患、免疫不全に関連する疾患、不妊、うつ病、自閉症等の精神疾患、パーキンソン病等の難治療性疾患、自己免疫性疾患、循環器疾患、血液疾患、消化器疾患、老化に伴う疾患、感染症等が例示される。これらの中でも、癌疾患、免疫系疾患の判定に有用であり、特に癌疾患の判定に特に有用である。

また、細胞障害性T細胞（CTL）の免疫活性の指標に応用すれば、癌ワクチンの癌疾患に対する効果判定にも応用できる。

[0049] 工程（I）は、上記シグナル測定方法で測定を行うこと以外は常法にした

がって行えばよい。

また、工程（１１）は、工程（１）で測定されたシグナル強度について、対照者由来の生体試料のシグナルに基づいて統計学的な解析を行って比較を行う。解析方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を用いることができる。また、その後の判定は、例えば、被検者由来の生体試料のシグナルが対照者におけるシグナルと比べて強い場合に、疾患を発症している可能性が高いと判断される。なお、本発明において、対照者とは、疾患を発症していない被検者と同年代・同性の者の平均をいい、対照者におけるシグナル強度は被検者におけるシグナル強度と共に測定してもよく、別途予め測定した値から得られた統計値を用いてもよい。

[0050] 〔疾患治療薬の薬効評価方法〕

本発明の疾患治療薬の薬効評価方法は、疾患治療薬の投与前及び投与後の被検者由来の生体試料を用いて、上記シグナル測定方法により、複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程（以下、工程（Ａ）ともいう）を含むことを特徴とするものである。

そして、疾患治療薬の投与後の被検者由来の生体試料における複合体由来のシグナル強度が、疾患治療薬の投与前の被検者由来の生体試料における複合体由来のシグナル強度より弱いと認められる場合に、疾患治療薬が薬効を示している可能性が高いと判定すればよい（以下、工程（Ｂ）ともいう）。

上記疾患治療薬としては、上記判定方法で判定可能な疾患を治療する薬物が挙げられる。好適な具体例は、抗癌剤、抗免疫系疾患薬である。

[0051] 工程（Ａ）は、上記シグナル測定方法で測定を行うこと以外は常法にしたがって行えばよい。

また、工程（Ｂ）は、工程（Ａ）で測定されたシグナル強度について、疾患治療薬の投与前の生体試料におけるシグナルに基づいて統計学的な解析を行って比較を行う。解析方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を用いることができる。また、その後の判定は、例えば、疾患治療薬の投与後の生体試料におけるシグナル量が投与前の生体試料におけるシグナル量と比

べて少ない場合に、該薬が疾患を抑える効果を有している可能性が高いと判断される。

特に、エクソソームは、種々の細胞、例えば免疫系の細胞や各種癌細胞から分泌されることから、疾患治療薬の投与の前後での血中エクソソームの変化（存在量の増減に加え、膜タンパク質の量の変動を含む）を測定することにより、患者における薬効を評価することが可能になると考えられる。また、例えば、癌細胞に特異的な膜タンパク質に対するリガンドとエクソソームの表面抗原に対するリガンドとを組み合わせれば、癌診断の特異性の向上や癌種の特特定などが期待でき、より癌疾患に特異的な診断薬の開発が可能となると考えられる。

[0052] [キット]

本発明のキットは、脂質二重膜を有する小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体と、0.15 M以上の塩濃度を有する液状組成物とを備えることを特徴とするものである。斯かるキットは、上記分離方法、上記疾患の判定、上記疾患治療薬の薬効評価に有用である。

固相担体、液状組成物に含まれる無機塩又は有機塩としては、上記分離方法で用いるものと同様のものが挙げられる。

上記液状組成物中の塩濃度は、好ましくは0.3 M以上、より好ましくは0.4 M以上、更に好ましくは0.5 M以上であり、また、好ましくは4 M以下、より好ましくは2 M以下、更に好ましくは1 M以下、更に好ましくは0.9 M以下、特に好ましくは0.7 M以下である。

また、液状組成物は、上記分離方法と同様の界面活性剤を含んでいてもよい。また、液状組成物のpHは特に限定されないが、好ましくはpH 5～10の範囲、より好ましくはpH 6～8の範囲である。目的のpHを維持するために、通常、緩衝液が用いられ、例えば、リン酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、H E P E S緩衝液、M E S緩衝液等が挙げられる。

[0053] [液状組成物、検体希釈液]

本発明の液状組成物は、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、前記複合体を洗浄する洗浄工程とを含む、脂質二重膜を有する小胞の分離方法に使用される、前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかに添加するための液状組成物であって、 0.15 M 以上の塩濃度を有する。また、本発明の検体希釈液は、不溶性担体を用いて脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料から脂質二重膜を有する小胞を分離する方法に使用される、前記小胞と前記不溶性担体との複合体を形成させるための検体希釈液であって、 0.15 M 以上の塩濃度を有することを特徴とするものである。

[実施例]

[0054] 以下、具体例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら具体例に限定されるものではない。

[0055] (バッファー類の調製)

表1に示す比較反応バッファー1および反応バッファー1～5を準備した。

反応バッファー：トリス緩衝生理食塩水（TBS（組成は、 $1,370\text{ mmol/L NaCl}$ 、 26.8 mmol/L KCl 、 250 mmol/L Tris ；Sigma社製 $10\times\text{TBS}$ を水で10倍希釈したもの。pH7.4。以下同じ。））に、非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール（gibco社製 Pluronic F-68、以下同じ）を 0.03% （w/v）になるように添加し、更に、必要に応じて塩化ナトリウム（Wako社製、試薬特級）を表1に示す濃度になるように添加したもの。

[0056]

[表1]

	無機塩
比較反応バッファー1	NaCl 0. 14M
反応バッファー1	NaCl 0. 3M
反応バッファー2	NaCl 0. 4M
反応バッファー3	NaCl 0. 5M
反応バッファー4	NaCl 0. 6M
反応バッファー5	NaCl 0. 7M

[0057] コントロールバッファーとして、以下のバッファーを準備した。

コントロールバッファー：TBSに、非イオン性界面活性剤であるポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコールを濃度が0. 03%（w/v）になるように添加したもの。pH7.4。

[0058] （検体の調製）

検体1（HT29 sup. in Control Buffer）：コントロールバッファーに、HT29細胞培養上清100倍濃縮液（低分子の塩は濃縮されていない。以下同じ。）を20倍希釈となるように添加したもの。

検体2（Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）。

検体3（HT29 sup. in Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を20倍希釈となるように添加したもの。

検体4（Plasma）：プールクエン酸血漿（コージンバイオ社製）。

検体5（HT29 sup. in Plasma）：プールクエン酸血

漿（コージンバイオ社製）に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を20倍希釈となるように添加したもの。

検体6（HT29 sup. in Control Buffer）：試験例1で作製したコントロールバッファーに、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの。

検体7（Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）。

検体8（HT29 sup. in Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの。

検体9（HT29 sup. spike Control Buffer）：試験例1で作製したコントロールバッファーに、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの。

検体10（Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）。

検体11（HT29 sup. spike Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの。

検体12（Plasma（Heparin））：プールヘパリン血漿（コージンバイオ社製）。

検体13（HT29 sup. spike Plasma（Heparin））：プールヘパリン血漿（コージンバイオ社製）に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの。

検体14（Plasma（EDTA））：プールEDTA血漿（コージンバイオ社製）。

検体15（HT29 sup. spike Plasma（EDTA））：プールEDTA血漿（コージンバイオ社製）に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの。

検体16（Plasma（Citrate））：プールクエン酸血漿（コージンバイオ社製）。

検体17 (HT29 sup. spike Plasma (Citra te)) : プールクエン酸血漿 (コージンバイオ社製) に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの。

検体18 (HT29 sup. spike Serum) : プール血清 (コージンバイオ社製) に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を10倍希釈となるように添加したもの。

検体19 (HT29 sup. spike Plasma (Hepar in)) : プールヘパリン血漿 (コージンバイオ社製) に、HT29細胞培養上清100倍濃縮液を10倍希釈となるように添加したもの。

[0059] (抗体結合粒子の調製)

陰性対照粒子 : 抗マウスIgG抗体 (JSRライフサイエンス社製、以下同じ) を磁性粒子 (JSRライフサイエンス社製MS300/Carboxyl、以下同じ。) に結合させたもの。陰性対象粒子は、エクソソームと反応しない。

抗CD9抗体結合磁性粒子 : CD9抗体 (アブカム社製 ab2215、以下同じ) を磁性粒子に結合させたもの。

抗CD63抗体結合磁性粒子 : CD63抗体 (JSRライフサイエンス社製) を磁性粒子に結合させたもの。

抗CD81抗体結合磁性粒子 : 抗CD81抗体 (Clone M38、Abnova MAB6435) を磁性粒子に結合させたもの。

抗EpCAM抗体結合磁性粒子 : 抗EpCAM抗体 (JSRライフサイエンス社製) を磁性粒子に結合させたもの。

Composite抗体結合磁性粒子 : 抗CD9抗体結合磁性粒子と抗CD63抗体結合磁性粒子と抗CD81抗体結合磁性粒子と抗EpCAM抗体結合磁性粒子を1:1:1:1で混合したもの。

[0060] (試験例1)

96ウェル白色プレート (コーニング社製 #23711007) に、陰性対照粒子0.0125mgを加え、各ウェルに、コントロールバッファー

、検体 1 ～ 5 を 25 μ L、1 ウェルあたりに 1 種ずつ添加した。比較反応バッファ 1 を、反応液の塩濃度が 0.07 M になるように加え、25℃で 20 分反応させた (pH : 7.4)。また、比較反応バッファ 1 に代えて反応バッファ 1 ～ 5 をそれぞれ使用し、同様の反応を行った。

[0061] 本明細書におけるすべての試験例において、各反応バッファを用いたときの、反応液の塩濃度は以下の通りである。

[0062] 反応バッファ 反応液の塩濃度

比較反応バッファ 1	0.07 M
反応バッファ 1	0.15 M
反応バッファ 2	0.2 M
反応バッファ 3	0.25 M
反応バッファ 4	0.3 M
反応バッファ 5	0.35 M

[0063] 次に、洗浄バッファ (Tween 20 を 0.1 質量%含む TBS。以下同じ。) を用いて反応後の陰性対照粒子を洗浄し、BSA を 1 質量%含む TBS で希釈したアルカリホスファターゼ (以下、ALP) 標識抗 CD81 抗体 (0.1 μ g/mL) を 50 μ L 添加し、25℃で 20 分反応させた。上記と同様の洗浄バッファで洗浄した後、発光基質 (富士レビオ社製クラス II シリーズ ルミパルス基質液) を 50 μ L 添加し、5 分後に発光測定機 (Promega 社製 GloMax) を用いて発光強度を測定した。結果を図 1-1、図 1-2 に示す。

図 1-1、図 1-2 に示すとおり、反応液の塩濃度が 0.07 M の場合は、検体成分の非特異吸着に起因すると考えられるバックグラウンドシグナルが検出されたが、反応液の塩濃度が 0.15 ～ 0.35 M の場合には非特異吸着が低減され、バックグラウンドシグナルが減少していた。

[0064] (試験例 2-1)

この抗CD9抗体結合磁性粒子と、エクソソームを含む臨床検体と、比較反応バッファー1または反応バッファー1～5のいずれかを混合し、洗浄後、試験例1と同様にELISAにより捕捉されたエクソソームを検出することで、比較反応バッファー1または反応バッファー1～5を用いた場合の反応性を評価した。

[0065] Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1mg加え、各チューブに、検体6～8を1チューブあたりに1種ずつ添加した(検体6:0.1mL、検体7:0.1mL、検体8:0.1mL)。比較反応バッファー1を、反応液の塩濃度が0.07Mになるように加え、25℃で5時間反応させた(pH:7.4)。また、比較反応バッファー1に代えて反応バッファー1～5をそれぞれ使用し、同様の反応を行った。

次に、Washing/Dilution Buffer (JSRライフサイエンス社製) 0.5mLで洗浄した後、96ウェル白色プレート(コニング社製 #23711007) に、0.0125mg/wellとなるように分注した。試験例1と同様に、洗浄バッファーによる洗浄、ALP標識抗CD81抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を行った後、発光強度を測定した。結果を図2-1に示す。

図2-1に示すとおり、反応液の塩濃度が0.15～0.35Mの場合は、血清中での捕捉反応の反応性が向上することがわかった。

[0066] (試験例2-2)

捕捉反応の反応条件を25℃20分から4℃5時間に変更して、試験例2-1と同様の試験を行った。

Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1mg加え、各チューブに、検体6～8を各0.1mL、1チューブあたりに1種ずつ添加した。比較反応バッファー1を、反応液の塩濃度が0.07Mになるように加え、4℃で5時間反応させた(pH:7.4)。また、比較反応バッ

ファー 1 に代えて反応バッファー 3 を使用し、同様の反応を行った。

次に、洗浄バッファー 0.5 mL で洗浄した後、96 ウェル白色プレート（コーニング社製 #23711007）に、0.0125 mg/well となるように分注した。試験例 1 と同様にして、洗浄バッファーによる洗浄、ALP 標識抗 CD81 抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を行った後、発光強度を測定した。結果を図 2-2 に示す。なお、図 2-2 には反応温度 25℃で行った試験結果もあわせて示す。

試験例 2-2 の結果（図 2-2）から、反応液の塩濃度が 0.25 M の場合は、反応温度が 4℃、25℃のいずれであっても、血清中での捕捉反応の反応性が良好となることがわかった。

[0067] （試験例 3）

反応バッファー 3 の非特異吸着低減作用を、検体を変更して確認した。

[0068] Protein LoBind チューブ 2 mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）に、陰性対照粒子 0.1 mg を加え、各チューブに検体 9~17 を 0.1 mL、1 チューブあたりに 1 種ずつ添加した。比較反応バッファー 1 を、反応液の塩濃度が 0.07 M になるように加え、25℃で 5 時間反応させた（pH：7.4）。また、比較反応バッファー 1 に代えて反応バッファー 3 を等量使用し、同様の反応を行った。

次に、洗浄バッファー 0.5 mL で洗浄した後、96 ウェル白色プレート（コーニング社製 #23711007）に、0.0125 mg/well となるように分注した。試験例 1 と同様にして、洗浄バッファーによる洗浄、ALP 標識抗 CD81 抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を行った後、発光強度を測定した。

図 3 に示すとおり、反応液の塩濃度が 0.25 M の場合は、検体の種類によらずバックグラウンドシグナルが少なかった。

[0069] （試験例 4）

反応バッファー 3 の反応性向上作用を、検体を変更して確認した。具体的手順を以下に示す。

Protein LoBindチューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1 mg 加え、各チューブに、検体9～13を0.1 mL、1チューブあたりに1種ずつ添加した。比較反応バッファー1を、塩濃度が0.07 Mになるように加え、25℃で5時間反応させた(pH: 7.4)。また、比較反応バッファー1に代えて反応バッファー3を使用し、同様の反応を行った。

次に、洗浄バッファー0.5 mLで洗浄した後、96ウェル白色プレート(コーニング社製 #23711007) に、0.0125 mg/well となるように分注した。試験例1と同様にして、洗浄バッファーによる洗浄、ALP標識抗CD81抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を行った後、発光強度を測定した。結果を図4に示す。

図4に示すとおり、塩濃度が0.25 Mの場合は、検体の種類によらず捕捉反応の反応性が高かった。

[0070] (試験例5)

抗CD9抗体結合磁性粒子を、抗CD63抗体結合磁性粒子、抗CD81抗体結合磁性粒子、抗EpCAM抗体結合磁性粒子に変更し、検体として検体10～13を用いた以外は試験例4と同様にして、反応バッファー3の反応性向上作用の検討を行った。結果を図5-1(抗CD63抗体結合磁性粒子)、図5-2(抗CD81抗体結合磁性粒子)、図5-3(抗EpCAM抗体結合磁性粒子)に示す。

[0071] (試験例6 小胞中の核酸の検出)

Protein LoBindチューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を12本用意し、チューブ1～12とナンバリングした。チューブ1～4に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1 mg ずつ、チューブ5～8に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.5 mg ずつ、チューブ9～12に、抗CD9抗体結合磁性粒子を1 mg ずつ、それぞれ加えた。

次いで、チューブ1～12に、反応バッファー3を、反応液の塩濃度が0.25 Mになるように加え、更に検体10を1 mL ずつ加えた。チューブ1

、5、9については25℃で1時間、チューブ2、6、10については25℃で5時間、チューブ3、7、11については25℃で24時間、チューブ4、8、12については4℃で24時間反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー0.5mLで3回洗浄し、この懸濁液を、上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ2mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）に0.5mL分注した。集磁ラックを用いて、抗体結合磁性粒子を集磁後、上清を0.4mL抜き取り、残った抗体結合粒子液0.1mLからmicroRNAを回収し定量した。結果を図6に示す。

なお、microRNAの回収にはExoCap™ Nucleic Acid Elution Buffer（MBL社製、#MEX-E）を用いた。また、microRNA（miR-21）の定量には、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit（ライフテクノロジーズ社製、#4366597）、TaqMan MicroRNA Assays（ライフテクノロジーズ社製、#186948384）、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG（ライフテクノロジーズ社製、#4440040）を用い、操作については推奨プロトコールに従った。

[0072] 図6に示すとおり、反応液の塩濃度0.25M環境下で反応させることによって、ヒト健常者血清に由来する小胞中の核酸を検出できた。さらに検出された核酸量は、抗体結合粒子量、温度、時間に依存して上昇した。

[0073] （試験例7 小胞中の核酸の検出）

Protein LoBindチューブ2mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）を8本用意し、チューブ13～20とナンバリングした。チューブ13～14に、抗CD9抗体結合磁性粒子を1mgずつ、チューブ15～16に、抗CD63抗体結合磁性粒子を1mgずつ、チューブ17～18に、抗CD81抗体結合磁性粒子を1mgずつ、チューブ19～20に、Composite抗体結合磁性粒子（抗CD9抗体結合磁性粒

子と抗CD63抗体結合磁性粒子と抗CD81抗体結合磁性粒子と抗EpCAM抗体結合磁性粒子を1:1:1:1で混合したもの)を1mgずつ、それぞれ加えた。

次いで、チューブ13~20に、反応バッファー3を、反応液の塩濃度が0.25Mになるように添加した。奇数番号のチューブに試験例3で示した検体10を、偶数番号のチューブに試験例3で示した検体12を、それぞれ0.3mLずつ加え、25℃で24時間反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー0.5mLで3回洗浄し、この懸濁液を、上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ2mL(エッペンドルフ社製、#0030108132)に0.5mL分注した。集磁ラックを用いて、抗体結合磁性粒子を集磁後、上清を0.4mL抜き取り、残った抗体結合粒子液0.1mLからmicroRNAを回収し定量した。結果を図7-1、図7-2に示す。

なお、microRNAの回収にはmiRNeasy Serum/Plasma Kit(50)(QIAGEN社製、#217184)を用いた。また、microRNA(miR-21)の定量は、試験例6の場合と同様に行った。

[0074] また、比較対象として、エクソソームを回収する標準的な方法である超遠心分離法を利用して小胞中の核酸の検出を行った。すなわち、検体10、12それぞれ11mLずつについて、超遠心分離機(ベックマン社製 Optima XE-90)を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にリン酸緩衝生理食塩水(以下、「PBS」とも言う。)を11mL加え、懸濁した。再度、超遠心分離機(ベックマン社製 Optima XE-90)を用い、100,000rpm、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを0.11mL加え、懸濁した。懸濁液のうち3μLをmicroRNAの回収、定量に用いた。結果を図7-1、図7-2に示す。

なお、microRNAの回収、microRNA(miR-21)の定

量は、上記と同様にして行った。

[0075] 図 7-1 に示すとおり、反応液の塩濃度 0.25 M 環境下で反応させることによって、ヒト健常者血清に由来する小胞中の核酸を、超遠心分離法と同等レベルで検出できることが確認された。

図 7-2 に示すとおり、ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞中の核酸は、超遠心分離法を利用した場合では検出できなかった。ヒト健常者ヘパリン血漿は一般的に PCR 阻害を起こす物質を含むと考えられており、超遠心分離法により回収したサンプルでは PCR を阻害する物質が残存するためと考えられる。これに対し、反応液の塩濃度 0.25 M の環境下で反応させた場合にはヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞中の核酸を検出できた。

これらの結果から、反応液の塩濃度 0.25 M の環境下で小胞と粒子を反応させることによって、血清、血漿といった検体の種類を問わず小胞中の核酸を検出できた。

[0076] (試験例 8 小胞表面のタンパクの検出)

Protein LoBind チューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を 10 本用意し、チューブ 21~30 とナンバリングした。各チューブに、以下のように磁性粒子 0.2 mg ずつを加えた。

[0077] チューブ番号 磁性粒子

21~22	抗 CD9 抗体結合磁性粒子
23~24	抗 CD63 抗体結合磁性粒子
25~26	抗 CD81 抗体結合磁性粒子
27~28	抗 EpCAM 抗体結合磁性粒子
29~30	Composite 抗体結合磁性粒子

[0078] 次いで、チューブ 21~30 に、反応バッファー 3 を、反応液の塩濃度が 0.25 M になるように添加した。奇数番号のチューブに試験例 3 で示した検体 10 を、偶数番号のチューブに試験例 3 で示した検体 12 を、それぞれ

1. 0 mL ずつ加え、25℃で3時間反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー0.5 mLで3回洗浄し、この懸濁液を、上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ 2 mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）に0.5 mL分注した。

次いで集磁して洗浄液を廃棄後、抗体結合磁性粒子を1×サンプルバッファー20 µLで懸濁し、95℃で5分間静置処理した。各サンプルを全量（20 µL）アプライし、SDS-PAGEを行った。ゲルをPVDF膜に転写後、ブロッキングバッファー（1%（w/v）BSA及び0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて37℃で2時間振とうした。これを洗浄バッファーにて洗浄した。

試験例8と同様にして、一次抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を行い、発光基質を反応させ、発光測定器にてウェスタンブロット像を確認した。結果を図8-1、図8-2に示す。

[0079] また、比較対象として、エクソソームを回収する標準的な方法である超遠心分離法を利用して小胞表面のタンパクの検出を行った。すなわち、検体10、12それぞれ11 mL ずつについて、超遠心分離機（ベックマン社製 Optima XE-90）を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを11 mL 加え、懸濁した。再度、超遠心分離機（ベックマン社製 Optima XE-90）を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを0.11 mL 加え、懸濁した。懸濁液のうち10 µL に4×サンプルバッファー5 µL、PBS 5 µL を添加し、95℃で5分間静置処理した。各サンプルを全量（20 µL）アプライし、SDS-PAGEを行った。ゲルをPVDF膜に転写後、ブロッキングバッファー（1%（w/v）BSA及び0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて37℃で2時間振とうした。これを洗浄バッファーにて洗浄した。

試験例8と同様にして、一次抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を

行い、発光基質を反応させ、発光測定器にてウェスタンブロット像を確認した。結果を図 8-1、図 8-2 に示す。

[0080] 図 8-1、図 8-2 に示すとおり、反応液の塩濃度 0.25 M の環境下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞表面のタンパクを、超遠心分離法と同等レベルで検出できることが確認された。また、抗 E p C A M 抗体結合磁性粒子を用いた場合には、小胞表面タンパクは検出されなかった。E p C A M タンパク質は健常者の血液中にはほとんど存在せず、癌などの疾患によりその血中濃度が上昇すると考えられている。反応液の塩濃度 0.25 M の環境下で小胞と粒子を反応させることによって、非特異反応を抑制することができた。

[0081] (試験例 9-1 小胞表面のネイティブフォームの立体構造を維持したタンパクの検出 (1))

Protein LoBind チューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を 8 本用意し、チューブ 31~38 とナンバリングした。各チューブに、以下のように磁性粒子 0.1 mg ずつを加えた。

[0082] チューブ番号 磁性粒子

31, 32	抗 CD9 抗体結合磁性粒子
33, 34	抗 CD63 抗体結合磁性粒子
35, 36	抗 CD81 抗体結合磁性粒子
37, 38	抗 E p C A M 抗体結合磁性粒子

[0083] 反応バッファー 3 を、反応液の塩濃度が 0.25 M になるようにチューブ 31~38 に添加した。

次いで、チューブ 31, 33, 35, 37 には試験例 3 で示した検体 10 を 0.3 mL 添加し、25℃で一晩反応させた。また、チューブ 32, 34, 36, 38 には試験例 3 で示した検体 12 を 0.3 mL 添加し、25℃で一晩反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー0.25 mLで2回洗浄し、集磁後、上清を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水1 mLに懸濁した。

上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132)を40本用意し、チューブ39～78とナンバリングした。チューブ31～38の懸濁液を、次のようにして0.1 mLずつ分注した。

チューブ31の懸濁液を、チューブ39～43へ。

チューブ32の懸濁液を、チューブ44～48へ。

チューブ33の懸濁液を、チューブ49～53へ。

チューブ34の懸濁液を、チューブ54～58へ。

チューブ35の懸濁液を、チューブ59～63へ。

チューブ36の懸濁液を、チューブ64～68へ。

チューブ37の懸濁液を、チューブ69～73へ。

チューブ38の懸濁液を、チューブ74～78へ。

[0084] 次に、各チューブに、以下のように抗体をそれぞれ5 μ Lずつ添加した。

[0085]	チューブ番号	抗体
	39, 44, 49, 54, 59, 64, 69, 74	PE抗マウスIgG
	40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75	PE抗CD9
	41, 46, 51, 56, 61, 66, 71, 76	PE抗CD63
	42, 47, 52, 57, 62, 67, 72, 77	PE抗CD81
	43, 48, 53, 58, 63, 68, 73, 78	PE抗EpcAM

[0086] ここで、

PE抗マウスIgG：フィコエリスリン（以下、PE）標識抗マウスIgG抗体（SONY社製）

PE抗CD9：PE標識抗CD9抗体（SONY社製）

PE抗CD63：PE標識抗CD63抗体（SONY社製）

PE抗CD81：PE標識抗CD81抗体（SONY社製）

PE抗EpcAM：PE標識抗EpcAM抗体（SONY社製）

[0087] その後、チューブ39～78を、25℃、1000rpmの条件で、1時間懸濁した。

次に、反応後の各粒子をリン酸緩衝生理食塩水0.5mLで2回洗浄した後、フローサイトメーター（BD社製、BD Accuri C6）を用いて、各サンプルの蛍光シグナルを確認した。結果を図9-1、図9-2に示す。

[0088] 図9-1、図9-2に示すとおり、反応液の塩濃度0.25Mの環境下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞表面のCD9、CD63、CD81が検出できた。

また、抗CD9抗体結合磁性粒子、抗CD63抗体結合磁性粒子、抗CD81抗体結合磁性粒子を用いた場合において、発癌により発現すると考えられているEpcAMを抗EpcAM抗体で検出したピークが、コントロールとした抗マウスIgG抗体と比較してピークシフトしていなかった。健常者の検体からは検出されないものと考えられる。

さらに、固相担体として抗EpcAM抗体結合磁性粒子を用いた場合には、抗マウスIgG抗体で検出されたピークと抗CD9抗体、抗CD63抗体、抗CD81抗体、抗EpcAM抗体で検出されたピークはさほど変わらなかった。すなわち、固相担体として抗EpcAM抗体結合磁性粒子を用いた場合に、健常者の検体よりエクソソームは得られなかった。非特異吸着が低いものと考えられる。

また、解析に用いたサンプルにはタンパク質の立体構造を変化させる熱、薬剤等の処理をしておらず、小胞表面に存在するネイティブフォームのCD9、CD63、CD81が検出できたものと考えられる。

[0089] （試験例9-2 小胞表面のネイティブフォームの立体構造を維持したタンパクの検出（2））

試験に先立ち、以下に示す検体 18、19 を用意した。

[0090] Protein LoBind チューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を 8 本用意し、チューブ 79～86 とナンバリングした。チューブ 79、80 に抗 CD9 抗体結合磁性粒子を 0.1 mg、チューブ 81、82 に抗 CD63 抗体結合磁性粒子を 0.1 mg、チューブ 83、84 に抗 CD81 抗体結合磁性粒子を 0.1 mg、チューブ 85、86 に抗 EpCAM 抗体結合磁性粒子を 0.1 mg 加えた。反応バッファー 3 を、反応液の塩濃度が 0.25 M になるようにチューブ 79～86 に添加した。

次いで、チューブ 79、81、83、85 には検体 18 を 0.3 mL 添加し、25℃で一晩反応させた。また、チューブ 80、82、84、86 には検体 19 を 0.3 mL 添加し、25℃で一晩反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー 0.25 mL で 2 回洗浄し、集磁後、上清を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水 1 mL に懸濁した。

上記とは別の新しい Protein LoBind チューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を 40 本用意し、チューブ 87～126 とナンバリングした。チューブ 79～86 の懸濁液を、次のようにして 0.1 mL ずつ分注した。

チューブ 79 の懸濁液を、チューブ 87～91 へ。

チューブ 80 の懸濁液を、チューブ 92～96 へ。

チューブ 81 の懸濁液を、チューブ 97～101 へ。

チューブ 82 の懸濁液を、チューブ 102～106 へ。

チューブ 83 の懸濁液を、チューブ 107～111 へ。

チューブ 84 の懸濁液を、チューブ 112～116 へ。

チューブ 85 の懸濁液を、チューブ 117～121 へ。

チューブ 86 の懸濁液を、チューブ 122～126 へ。

[0091] 次いで、各チューブに、以下のように抗体をそれぞれ 5 μ L ずつ添加した。

[0092]	チューブ番号	抗体
	87, 92, 97, 102, 107, 112, 117, 122	P E 抗マウス I g G
	88, 93, 98, 103, 108, 113, 118, 123	P E 抗 C D 9
	89, 94, 99, 104, 109, 114, 119, 124	P E 抗 C D 6 3
	90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125	P E 抗 C D 8 1
	91, 96, 101, 106, 111, 116, 121, 126	P E 抗 E p C A M

[0093] その後、チューブ 87～126 を、25℃、1000 rpm の条件で、1 時間懸濁した。

次に、反応後の各粒子をリン酸緩衝生理食塩水 0.5 mL で 2 回洗浄した後、フローサイトメーター（BD 社製、BD Accuri C6）を用いて、各サンプルの蛍光シグナルを確認した。結果を図 9-3、図 9-4 に示す。

[0094] 図 9-3、図 9-4 に示すとおり、反応液の塩濃度 0.25 M の環境下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿、ヒト結腸がん HT29 細胞に由来する小胞表面に存在する CD9、CD63、CD81 が検出できた。

また発癌により発現すると考えられている E p C A M を抗 E p C A M 抗体で検出したピークについて、コントロールとした抗マウス I g G 抗体と比較してピークシフトが観察された。サンプルに健常者検体のみを用いている図 9-1、図 9-2 ではこのピークシフトは確認されなかったことから、本発明を利用して疾患を判定できると考えられる。

さらに、固相担体として抗 E p C A M 抗体結合磁性粒子を用いた場合には、抗マウス I g G 抗体で検出されたピークと抗 CD9 抗体、抗 CD63 抗体、抗 CD81 抗体、抗 E p C A M 抗体で検出されたピークはさほど変わらなかった。すなわち、固相担体として抗 E p C A M 抗体結合磁性粒子を用いた場合に、健常者の検体よりエクソソームは得られなかった。非特異吸着が低

いものと考えられる。

また、解析に用いたサンプルにはタンパク質の立体構造を変化させる熱、薬剤等の処理をしておらず、小胞表面に存在するネイティブフォームのCD 9、CD 63、CD 81が検出できたものと考えられる。

[0095] (試験例10)

Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132)を20本用意し、チューブ127~146とナンバリングした。各チューブに、以下のように磁性粒子0.2mgずつを加えた。

[0096] チューブ番号	磁性粒子

127~130	抗CD9抗体結合磁性粒子
131~134	抗CD63抗体結合磁性粒子
135~138	抗CD81抗体結合磁性粒子
139~142	抗EpCAM抗体結合磁性粒子
143~146	Composite抗体結合磁性粒子

[0097] 次いで、チューブ127~146に、反応バッファー3を、反応液の塩濃度が0.25Mになるように添加した。各チューブに、以下のように検体をそれぞれ0.1mLずつ加え、25℃で24時間反応させた。

[0098]	チューブ番号	検体

	127, 131, 135, 139, 143	検体10
	128, 132, 136, 140, 144	検体18
	129, 133, 137, 141, 145	検体12
	130, 134, 138, 142, 146	検体19

[0099] 次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー0.5mLで3回洗浄し、この懸

濁液を、上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) に0.5 mL分注した。

次いで集磁して洗浄液を廃棄後、抗体結合磁性粒子を1×サンプルバッファー20 μ Lで懸濁し、95℃で5分間静置処理した。各サンプルを全量(20 μ L) アプライし、SDS-PAGEを行った。ゲルをPVDF膜に転写後、ブロッキングバッファー(1% (w/v) BSA及び0.1% (w/v) Tween 20含有TBS) にて37℃で2時間振とうした。これを洗浄バッファーにて洗浄した。

試験例8と同様にして、一次抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を行い、発光基質を反応させ、発光測定器にてウェスタンブロット像を確認した。結果を図10-1、図10-2に示す。

[0100] また、比較対象として、エクソソームを回収する標準的な方法である超遠心分離法を利用して小胞表面のタンパクの検出を行った。すなわち、検体10、12、18、19それぞれ11 mLずつについて、超遠心分離機(ベックマン社製 Optima XE-90)を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを11 mL加え、懸濁した。再度、超遠心分離機(ベックマン社製 Optima XE-90)を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを0.11 mL加え、懸濁した。懸濁液のうち1 μ Lに4×サンプルバッファー5 μ L、PBS 14 μ Lを添加し、95℃で5分間静置処理した。各サンプルを全量(20 μ L) アプライし、SDS-PAGEを行った。ゲルをPVDF膜に転写後、ブロッキングバッファー(1% (w/v) BSA及び0.1% (w/v) Tween 20含有TBS) にて37℃で2時間振とうした。これを洗浄バッファーにて洗浄した。

試験例8と同様にして、一次抗体との反応、洗浄バッファーによる洗浄を行い、発光基質を反応させ、発光測定器にてウェスタンブロット像を確認した。結果を図10-1、図10-2に示す。

[0101] 図10-1、図10-2に示すとおり、反応液の塩濃度0.25Mの環境下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿、ヒト結腸がんHT29細胞に由来する小胞表面のタンパクを、超遠心分離法と同等レベルもしくはそれ以上で検出できた。また、抗EpCAM抗体を用いて検出した場合に、ヒト健常者血清、ヘパリン血漿ではバンドが検出されず、これらにヒト結腸がんHT29細胞の培養上清を添加した場合にはバンドが検出された。本発明を利用して疾患を判定できると考えられる。

[0102] [脂質二重膜を有する小胞の分離方法（第1の分離方法）]

本発明の第1の分離方法は、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、小胞と固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、複合体を洗浄する洗浄工程を含み、複合体形成工程及び洗浄工程の少なくともいずれかを、終濃度0.15～2Mの無機塩又は有機塩の存在下で行うことを特徴とするものである。ここで、本明細書において終濃度（最終濃度）とは、生体試料由来の無機塩（通常0.14M程度）や有機塩を含まない無機塩、有機塩の濃度であり、複合体形成工程、洗浄工程の際における人為的に存在させた系内の無機塩又は有機塩の最終濃度をいう。無機塩又は有機塩の終濃度は、粉状、粒状等の固形物や検体希釈液等の液状組成物によるいずれの方法においても調整することが可能である。また、終濃度の測定は、公知の各種の測定方法や測定機器等を用いて行えばよい。

[0103] （複合体形成工程）

複合体形成工程は、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、小胞と固相担体との複合体を形成させる工程である。上記接触により、リガンドに小胞が捕捉され、小胞と固相担体との複合体が形成される。なお、複合体形成工程の反応系には、上記固相担体に結合したリガンド以外に、脂質二重膜を有する小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドも共存

していてもよい。

[0104] 上記生体試料は脂質二重膜を有する小胞を含むものであれば特に限定されるものではなく、例えば、体液、菌体液、細胞培養の培地、細胞培養上清、組織細胞の破碎液等の各種液体が挙げられる。この中でも、体液、細胞培養上清が好ましく、体液がより好ましい。体液としては、全血、血清、血漿、血液成分、各種血球、血餅、血小板等の血液組成成分の他、尿、精液、母乳、汗、間質液、間質性リンパ液、骨髓液、組織液、唾液、胃液、関節液、胸水、胆汁、腹水、羊水等が挙げられ、好ましくは血液組成成分である。本発明の第1の分離方法は、斯様な臨床検体を生体試料として用いた場合であっても、固相担体への非特異吸着が低く、捕捉反応の反応性が高いため、本発明の第1の分離方法によれば、広範な種類の生体試料から選択的かつ効率よく小胞を分離できる。例えば、生体試料として血漿を用いた場合でも非特異吸着が起こりにくく、血清を用いた場合でも捕捉反応の反応性が高い。

なお、血液組成成分は、クエン酸、ヘパリン、EDTA等の抗凝固剤で処理されたものでもよい。

[0105] 上記生体試料は、終濃度が0.15～2Mとなる量の無機塩又は有機塩を含むバッファー組成物に添加しておくなどして予め前処理したものを用いてもよいが、生体から摂取したものをそのまま用いることもできる。すなわち、本発明の第1の分離方法によれば、PEG沈殿法、超遠心機等を用いた単離法等による前処理を行わず簡便に選択的な分離をすることも可能である。

[0106] また、上記脂質二重膜を有する小胞としては、細胞、細胞から細胞外に放出されるエクソソームのような小胞が挙げられるが、本発明の第1の分離方法は、小胞がエクソソームである場合に特に好ましく用いられる。

また、小胞の表面に存在する表面抗原は、小胞の表面に存在する物質で抗原性のあるものであれば特に限定されない。エクソソームの表面抗原を例に挙げると、CD9、CD63、CD81等のテトラスパニン類；MHCⅠ、MHCⅡ等の抗原提示関連タンパク質；インテグリン、ICAM-1、EPCAMなどの接着分子；EGFRvIII、TGF- β などのサイトカイ

ン／サイトカイン受容体、酵素類等が挙げられる。これらの中でも、エクソソーム表面に存在する抗原タンパク質が好ましい。

[0107] また、本発明の第1の分離方法に用いる固相担体は、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合したものであれば特に限定されない。

リガンドとしては、小胞の表面に存在する表面抗原を認識する抗体が好ましく、エクソソームの表面に存在する表面抗原を認識する抗体がより好ましい。また、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。

上記モノクローナル抗体は、特に限定されるものではなく、公知の方法、例えば、K. Watanabe et al., Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis, J. Clin. Invest. 114 (2004), 898-907に記載された方法に従って調製したものでよい。また、エクソソームの表面抗原CD9、CD63、CD81等のテトラスパニン類を認識するモノクローナル抗体は、国際公開第2013/099925号等を参照して作製できる。

なお、上記抗体のクラスとしては、IgG、IgMが挙げられるが、IgGが好ましい。また、これらを低分子化したフラグメントを用いてもよい。例えば、F(ab')₂、Fab'、Fab等が挙げられる。

[0108] 上記リガンドを結合させる固相担体の材質としては、例えば、ポリスチレン類、ポリエチレン類、ポリプロピレン類、ポリエステル類、ポリ(メタ)アクリロニトリル類、スチレンーブタジエン共重合体、ポリ(メタ)アクリル酸エステル類、フッ素樹脂、架橋デキストラン、ポリサッカライド等の高分子化合物；ガラス；金属；磁性体；磁性体を含む樹脂組成物；これらの組み合わせ等が挙げられる。

また、固相担体の形状は特に限定されるものではなく、例えば、トレイ状、球状、粒子状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、マイクロプレート、試験管等が挙げられる。

本発明においては、固液分離や洗浄の容易性の観点から、磁性粒子が好ましい。

[0109] 上記磁性粒子としては、例えば、四三酸化鉄 (Fe_3O_4)、三二酸化鉄 ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)、各種フェライト、鉄、マンガン、ニッケル、コバルト、クロムなどの金属；コバルト、ニッケル、マンガンなどの合金からなる磁性体微粒子；これら磁性体を樹脂中に含む磁性粒子が挙げられる。樹脂としては、疎水性重合体、親水性重合体などが挙げられる。

中でも、磁性体を樹脂中に含む磁性粒子が好ましく、超常磁性微粒子を含む母粒子の表面にポリマー層が形成されたものがより好ましい。例えば、特開2008-32411号公報に記載の、超常磁性微粒子を含む母粒子の表面に、疎水性の第1ポリマー層が形成され、当該第1ポリマー層上に、少なくとも表面にグリシジル基を有する第2ポリマー層が形成され、当該グリシジル基を化学修飾することにより極性基が導入された磁性粒子が挙げられる。

[0110] ここで、超常磁性微粒子としては、粒子径20nm以下（好ましくは粒子径5～20nm）の酸化鉄系の微粒子が代表的であり、 XFe_2O_4 ($\text{X}=\text{Mn}$ 、 Co 、 Ni 、 Mg 、 Cu 、 $\text{Li}_{0.5}\text{Fe}_{0.5}$ 等)で表現されるフェライト、 Fe_3O_4 で表現されるマグネタイト、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ が挙げられ、飽和磁化が強く、かつ残留磁化が少ない点で、 $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ 及び Fe_3O_4 のいずれか一方を含むことが好ましい。

[0111] また、上記疎水性の第1ポリマー層を形成するためのモノマーは、単官能性モノマー、架橋性モノマーに大別される。

上記単官能性モノマーとして、例えば、スチレン、 α -メチルスチレン、ハロゲン化スチレンなどの芳香族ビニル系モノマー；メチルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルアクリレート、エチルメタクリレート、ステアリルアクリレート、ステアリルメタクリレート、シクロヘキシルアクリレート、シクロヘキシルメタクリレート、イソボニルアクリレート、イソボニルメタクリレート等のエチレン性不飽和カルボン酸アルキルエステル系モノ

マーを例示することができる。また、上記架橋性モノマーとして、エチレングリコールジアクリレート、エチレングリコールジメタクリレート、トリメチロールプロパントリアクリレート、トリメチロールプロパントリメタクリレート、ペンタエリスリトールトリアクリレート、ペンタエリスリトールトリメタクリレート、ジペンタエリスリトールヘキサアクリレート、ジペンタエリスリトールヘキサメタクリレート等の多官能性（メタ）アクリレート；ブタジエン、イソプレン等の共役ジオレフィンの他、ジビニルベンゼン、ジアリルフタレート、アリルアクリレート、アリルメタクリレートなどを例示することができる。

[0112] また、上記第2ポリマー層を形成するためのモノマーは、粒子表面への官能基導入を主目的とするものであり、グリシジル基含有モノマーを含むものである。グリシジル基含有モノマーの含有量としては、第2ポリマー層を形成するためのモノマー中、20質量%以上が好ましい。ここで、グリシジル基を含む共重合性モノマーとしては、グリシジリアクリレート、グリシジルメタクリレート、アリルグリシジルエーテル等が挙げられる。

[0113] 第2ポリマー層のグリシジル基を化学修飾することにより導入される極性基としては、リガンドと反応可能な官能基であることが好ましく、酸素原子、窒素原子及び硫黄原子からなる群より選ばれた少なくとも1種の原子を1個以上含むものがより好ましい。中でも、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシ基、活性エステル基がより好ましい。特に、磁性粒子の第2ポリマー層が前記極性基及び2，3-ジヒドロキシプロピル基を有する場合、リガンドとの結合性が良好となる。

また、磁性粒子等の固相担体は、その表面にビオチン類結合部位を有する物質が固定されていてもよい。ビオチン類結合部位を有する物質としては、例えば、アビジン、ストレプトアビジン、タマビジン、及びそれらの誘導体から選ばれる1種又は2種以上の化合物等が挙げられる。さらに、この場合、固相担体は、ビオチン類結合部位を有する物質を介してビオチン類を結合した抗体等が結合されていてもよい。固相担体の表面へのビオチン類結合部

位を有する物質の固定は、日本国特許第4716034号公報に記載された方法等の公知の方法により行えばよい。

[0114] リガンドを固相担体に結合する方法としては、物理的吸着法や、共有結合法、イオン結合法といった化学的に結合する方法などが用いられる。物理的吸着法としては、固相担体にリガンドを直接固定する方法、アルブミンなどの他のタンパク質に化学的に結合させてから吸着させて固定する方法などが挙げられる。化学的に結合させる方法としては、固相担体表面に導入した、リガンドと反応可能な官能基を利用して、固相担体上に直接結合する方法、固相担体とリガンドとの間にスペーサー分子（カルボジイミド化合物など）を化学結合で導入してから結合する方法、アルブミンなどの他のタンパク質にリガンドを結合させた後、そのタンパク質を固相担体に化学結合する方法などが挙げられる。

[0115] また、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体は、市販品を用いてもよい。例えば、Exosome-Human CD9 Isolation Reagent (from cell culture)、Exosome-Human CD63 Isolation / Detection Reagent (from cell culture media)（いずれもLife technologies社製）、CD9 Exo-Flow Capture kit、CD63 Exo-Flow Capture kit、CD81 Exo-Flow Capture kit（いずれもSBI社製）等が挙げられる。

[0116] また、上記リガンドが結合した固相担体の使用量は、生体試料に対し、好ましくは0.00001～0.1質量倍、より好ましくは0.0001～0.01質量倍である。

[0117] 複合体形成工程は、上記各成分の他に、必要に応じて、界面活性剤；アルブミン等のタンパク質；核酸；ショ糖等の糖類等を用いてもよい。

これらの中では、非特異吸着の低減の観点、小胞へのダメージを抑える観点から、界面活性剤が好ましく、非イオン性界面活性剤がより好ましく、ポ

リエチレングリコール型非イオン性界面活性剤が特に好ましい。また、界面活性剤は、芳香族基を分子中に含まないものが好ましい。

例えば、高級アルコールエチレンオキサイド付加物、脂肪酸エチレンオキサイド付加物、多価アルコール脂肪酸エステルエチレンオキサイド付加物、高級アルキルアミンエチレンオキサイド付加物、脂肪酸アミドエチレンオキサイド付加物、油脂のエチレンオキサイド付加物、ポリアルキレングリコールエチレンオキサイド付加物等が挙げられる。これらの中でも、ポリアルキレングリコールエチレンオキサイド付加物が好ましい。具体的には、ポリオキシエチレン（１６０）ポリオキシプロピレン（３０）グリコール、ポリオキシエチレン（１９６）ポリオキシプロピレン（６７）グリコール等が挙げられる。

界面活性剤の使用量は、終濃度で、好ましくは０．００５～１０％（ｗ／ｖ）、より好ましくは０．０１５～３．５％（ｗ／ｖ）である。

[0118] また、複合体形成工程における反応温度は、好ましくは２～４２℃の範囲内であり、より好ましくは１５～４０℃の範囲内、特に好ましくは２０～３７℃の範囲内である。本発明の第１の分離方法における複合体形成工程は常温又は常温付近でも反応が選択的かつ効率よく進行するため、非常に簡便である。また、反応時間は、通常、１分間～４８時間であるが、好ましくは５分間～２４時間、より好ましくは１０分間～１０時間、特に好ましくは１０分間～５時間である。

[0119] 複合体形成工程において、系中のｐＨは特に限定されないが、好ましくはｐＨ５～１０の範囲、より好ましくはｐＨ６～８の範囲である。目的のｐＨを維持するために、通常、緩衝液が用いられ、例えば、リン酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、ＨＥＰＥＳ緩衝液、ＭＥＳ緩衝液等が挙げられる。

[0120] （洗浄工程）

洗浄工程は、上記複合体形成工程で形成された小胞と固相担体との複合体を洗浄する工程である。これによって、未反応の成分や未反応の標識物質等

が除去される。複合体形成工程における複合体を含む系をそのまま洗浄してもよい。

[0121] 上記洗浄工程は、通常、固相担体の形状により2種類に分けられる。磁性粒子のように固相担体が粒子状である場合には、例えば洗浄液中に磁性粒子を分散させて洗浄する方法が挙げられ、一方、固相担体がマイクロプレートのような形態である場合には、その表面に洗浄液を接触させて洗浄する方法が挙げられる。いずれの態様であっても、本発明においては、洗浄液として、界面活性剤を含む洗浄液を使用することが好ましい。界面活性剤としては、上記複合体形成工程で使用してもよいものと同様のものが好ましい。

[0122] また、固相担体が磁性粒子の場合、洗浄工程としては、磁性粒子を磁力により集めて磁性粒子と液相とを分離する集磁工程、及び該集磁工程で分離された磁性粒子を洗浄液中に分散させる分散工程とを含むことが好ましい。これによって、未反応の物質や生体試料中の夾雑物を磁性粒子表面からさらに効率よく洗浄・分離除去できる。

具体的には、反応容器に磁場を作用させ、磁性粒子を反応容器壁に付着させて集めた後、反応上清を除去し、さらに必要に応じて洗浄液を加え、同様に磁場を作用させた後上清を除去する操作を繰り返すことにより行えばよい。洗浄液としては、上記複合体形成工程で挙げた界面活性剤と緩衝液を含む洗浄液が好ましい。

[0123] (無機塩又は有機塩)

本発明の第1の分離方法は、複合体形成工程及び洗浄工程の少なくともいずれかを、終濃度0.15～2Mの無機塩又は有機塩の存在下で行うものであるが、捕捉反応の反応性の観点から、複合体形成工程を、終濃度0.15～2Mの無機塩又は有機塩の存在下で行うのが好ましい。また、無機塩、有機塩の中では、本発明の所望の効果を高める観点から、無機塩が好ましい。

[0124] 上記無機塩としては、アルカリ金属ハロゲン化物；炭酸塩、重炭酸塩等の無機酸の塩が挙げられ、アルカリ金属ハロゲン化物が好ましく、アルカリ金属塩化物がより好ましい。無機塩としては、具体的には、塩化ナトリウム、

塩化カリウム、塩化カルシウム、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム等が挙げられ、これらのうち1種を単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。これらの中でも、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウムが好ましく、塩化ナトリウム、塩化カリウムがより好ましく、塩化ナトリウムが特に好ましい。

[0125] 上記有機塩としては、有機酸の塩が好ましく、有機酸のアルカリ金属塩がより好ましく、カルボン酸のアルカリ金属塩が更に好ましく、カルボン酸のナトリウム塩が特に好ましい。有機塩としては、具体的には、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、酒石酸ナトリウム、リンゴ酸ナトリウム、コハク酸ナトリウム、乳酸ナトリウム等が挙げられ、これらのうち1種を単独で用いても2種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0126] また、系内の無機塩又は有機塩の終濃度は、0.15～2Mである。本明細書で規定する終濃度が0.15M未満の場合及び2Mよりも高い場合は、非特異吸着の増大や捕捉反応の反応性の低下が生じることがあり、また、小胞内外の浸透圧差によって、小胞が破壊されることも懸念される。終濃度は、好ましくは0.175M以上、より好ましくは0.2M以上、特に好ましくは0.25M以上であり、また、好ましくは1M以下、より好ましくは0.5M以下、更に好ましくは0.45M以下、特に好ましくは0.35M以下である。

[0127] (解離工程)

本発明の分離方法は、洗浄工程後、捕捉された小胞をリガンドから解離する解離工程を有していてもよい。

リガンドが特定の抗体である場合に抗原・抗体反応による特異的な結合を解離される条件としては、アフィニティークロマトグラフィー等で種々のものが知られている（例えば、“*A f i n i t y C h r o m a t o g r a p h y p r i n c i p l e s & m e t h o d s*” *P h a r m a c i a L K B B i o t e c h n o l o g y* 参照）。上記解離工程はこれに準じて行えばよい。即ち、本発明で使用される解離液としては、塩酸、硫酸、プロピ

オン酸、酢酸、グリシン／塩酸バッファー等の酸性溶液；水酸化ナトリウム水溶液、水酸化カリウム水溶液、アンモニア水溶液、ジエチルアミン等のアルカリ性溶液；3 M塩化ナトリウム水溶液、4．5 M塩化マグネシウム水溶液等の高イオン強度溶液；SDS、T r i t o n X-100、T w e e n 20等の界面活性剤含有溶液；ジオキサン、エチレングリコール等の極性を下げる物質を含有する緩衝液；トリクロロ酢酸、チオシアン酸などのカオトロピックイオンの他、尿素、塩酸グアニジン等を含有する緩衝液が挙げられる。

[0128] 〔核酸の検出方法及びタンパク質の検出方法〕

本発明の小胞中の核酸の検出方法は、上記第1の分離方法の後に、さらに小胞中の核酸を検出する核酸検出工程を含むものである。

また、本発明の小胞由来のタンパク質の検出方法は、上記第1の分離方法の後に、さらに小胞の内側及び表面の少なくとも一方に存在するタンパク質を検出するタンパク質検出工程を含むものである。

これら検出方法は、上記第1の分離方法を行う以外は常法にしたがっておこなえばよい。上記脂質二重膜を有する小胞がエクソソームである場合、回収されたエクソソームから核酸やタンパク質を、PCR法、電気泳動法、ウェスタンブロッティング法、免疫化学的方法、フローサイトメトリー等の公知の方法に従って検出すればよい。これらの中でも、簡便に感度よく検出でき、且つネイティブフォームの立体構造を維持できる点からは、フローサイトメトリーが好ましい。また、核酸としては、m i R N Aやm R N A等が挙げられる。

特に、エクソソームは、種々の細胞、例えば免疫系の細胞や各種癌細胞から分泌されることから、本発明の核酸の検出方法によれば、エクソソーム由来の核酸（m i R N A等）を検出し、それを解析することによって、生理現象や各種疾患の判定が可能になる。

[0129] 〔シグナル測定方法〕

本発明の小胞由来のシグナル測定方法は、上記第1の分離方法の後に、さ

らに前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定するシグナル測定工程を含むものである。

上記シグナル強度の測定は免疫測定法により行えばよく、例えば、酵素免疫測定法（E I A）、酵素イムノメトリックアッセイ法（E L I S A）、蛍光免疫測定法（F I A）、放射線免疫測定法（R I A）、発光免疫測定法、イムノブロット法、ウェスタンブロット法、フローサイトメトリー等が挙げられる。これらの中でも、簡便に感度よく検出でき、且つネイティブフォームの立体構造を維持できる点からは、フローサイトメトリーが好ましい。また、簡便に感度よく抗体を検出できる点からは、E L I S A法が好ましい。E L I S A法としては、競合法、サンドイッチ法などが挙げられる。

ここで、サンドイッチE L I S A法を使用する場合の分離方法の一例を示す。まず、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドを固相担体に結合した後、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料を接触させて複合体を形成させ、その後洗浄する。そこに、モノクローナル抗体又はその抗体断片や疾患特異的膜タンパク質抗体又はその抗体断片を修飾した標識抗体を添加して、さらなる複合体を形成させる。そして、形成された複合体中の標識量を検出することにより、生体試料に含まれる小胞に由来するシグナル量や、生体試料に含まれる疾患特異的小胞量を測定することができる。

[0130] 〔疾患の判定方法〕

本発明の被検者が疾患を発症しているか否かを判定するための方法は、被検者由来の生体試料を用いて、上記シグナル測定方法により前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程（以下、工程（I）ともいう）を含むことを特徴とするものである。

そして、工程（I）で測定されたシグナル強度と、対照者由来の生体試料のシグナル強度とを対比して、被検者におけるシグナル強度が対照者におけるシグナル強度より強いと認められる場合に、被検者が疾患を発症していると判定すればよい（以下、工程（I I）ともいう）。

本発明の疾患の判定方法で判定可能な疾患としては、癌疾患（大腸癌、乳

癌、子宮体癌、子宮頸癌、卵巣癌、膵癌、胃癌、食道癌、肝癌、肺癌、腎癌、皮膚癌など）、炎症系疾患（リウマチ、変形性関節症、腎症、膵炎、肝炎、アレルギーなど）、アルツハイマー等の神経変性疾患、脳疾患、免疫不全に関連する疾患、不妊、うつ病、自閉症等の精神疾患、パーキンソン病等の難治療性疾患、自己免疫性疾患、循環器疾患、血液疾患、消化器疾患、老化に伴う疾患、感染症等が例示される。これらの中でも、癌疾患、免疫系疾患の判定に有用であり、特に癌疾患の判定に特に有用である。

また、細胞障害性T細胞（CTL）の免疫活性の指標に応用すれば、癌ワクチンの癌疾患に対する効果判定にも応用できる。

[0131] 工程（I）は、上記シグナル測定方法で測定を行うこと以外は常法にしたがって行えばよい。

また、工程（II）は、工程（I）で測定されたシグナル強度について、対照者由来の生体試料のシグナルに基づいて統計学的な解析を行って比較を行う。解析方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を用いることができる。また、その後の判定は、例えば、被検者由来の生体試料のシグナルが対照者におけるシグナルと比べて強い場合に、疾患を発症している可能性が高いと判断される。なお、本発明において、対照者とは、疾患を発症していない被検者と同年代・同性の者の平均をいい、対照者におけるシグナル強度は被検者におけるシグナル強度と共に測定してもよく、別途予め測定した値から得られた統計値を用いてもよい。

[0132] 〔疾患治療薬の薬効評価方法〕

本発明の疾患治療薬の薬効評価方法は、疾患治療薬の投与前及び投与後の被検者由来の生体試料を用いて、上記シグナル測定方法により、複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程（以下、工程（A）ともいう）を含むことを特徴とするものである。

そして、疾患治療薬の投与後の被検者由来の生体試料における複合体由来のシグナル強度が、疾患治療薬の投与前の被検者由来の生体試料における複合体由来のシグナル強度より弱いと認められる場合に、疾患治療薬が薬効を

示している可能性が高いと判定すればよい（以下、工程（B）ともいう）。

上記疾患治療薬としては、上記判定方法で判定可能な疾患を治療する薬物が挙げられる。好適な具体例は、抗癌剤、抗免疫系疾患薬である。

[0133] 工程（A）は、上記シグナル測定方法で測定を行うこと以外は常法にしたがって行えばよい。

また、工程（B）は、工程（A）で測定されたシグナル強度について、疾患治療薬の投与前の生体試料におけるシグナルに基づいて統計学的な解析を行って比較を行う。解析方法は特に限定されるものではなく、公知の方法を用いることができる。また、その後の判定は、例えば、疾患治療薬の投与後の生体試料におけるシグナル量が投与前の生体試料におけるシグナル量と比べて少ない場合に、該薬が疾患を抑える効果を有している可能性が高いと判断される。

特に、エクソソームは、種々の細胞、例えば免疫系の細胞や各種癌細胞から分泌されることから、疾患治療薬の投与の前後での血中エクソソームの変化（存在量の増減に加え、膜タンパク質の量の変動を含む）を測定することにより、患者における薬効を評価することが可能になると考えられる。また、例えば、癌細胞に特異的な膜タンパク質に対するリガンドとエクソソームの表面抗原に対するリガンドとを組み合わせれば、癌診断の特異性の向上や癌種の特定などが期待でき、より癌疾患に特異的な診断薬の開発が可能となると考えられる。

[0134] [キット]

本発明のキットは、脂質二重膜を有する小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体と、無機塩又は有機塩を含み該無機塩又は有機塩の含有量が系内の終濃度を0.15～2Mに調整できる量である液状組成物とを備えることを特徴とするものである。斯かるキットは、上記第1の分離方法、上記疾患の判定、上記疾患治療薬の薬効評価に有用である。

固相担体、液状組成物に含まれる無機塩又は有機塩としては、上記第1の

分離方法で用いるものと同様のものが挙げられる。

上記終濃度は、好ましくは0.175 M以上、より好ましくは0.2 M以上、特に好ましくは0.25 M以上であり、また、好ましくは1 M以下、より好ましくは0.5 M以下、更に好ましくは0.45 M以下、特に好ましくは0.35 M以下である。

具体的には、液状組成物中における無機塩又は有機塩の含有量は、好ましくは0.3 M以上、より好ましくは0.4 M以上、更に好ましくは0.5 M以上であり、また、好ましくは4 M以下、より好ましくは2 M以下、更に好ましくは1 M以下、更に好ましくは0.9 M以下、特に好ましくは0.7 M以下である。

また、液状組成物は、上記第1の分離方法と同様の界面活性剤を含んでもよい。また、液状組成物のpHは特に限定されないが、好ましくはpH 5～10の範囲、より好ましくはpH 6～8の範囲である。目的のpHを維持するために、通常、緩衝液が用いられ、例えば、リン酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝液、HEPES緩衝液、MES緩衝液等が挙げられる。

[0135] [液状組成物、検体希釈液及び第2の分離方法]

本発明の液状組成物は、脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、前記複合体を洗浄する洗浄工程とを含む、脂質二重膜を有する小胞の分離方法に使用される、前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかに添加するための液状組成物であって、無機塩又は有機塩を含み、該無機塩又は有機塩の含有量が、系内の終濃度を0.15～2 Mに調整できる量であることを特徴とするものである。

また、本発明の検体希釈液は、不溶性担体を用いて脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料から脂質二重膜を有する小胞を分離する方法に使用される、前記小胞と前記不溶性担体との複合体を形成させるための検体希釈液であ

って、無機塩又は有機塩を含み、該無機塩又は有機塩の含有量が、系内の終濃度を0.15～2 Mに調整できる量であることを特徴とするものである。

また、本発明の第2の分離方法は、不溶性担体を用いて脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料から脂質二重膜を有する小胞を分離する方法であって、無機塩又は有機塩を含み、該無機塩又は有機塩の含有量が、系内の終濃度を0.15～2 Mに調整できる量である検体希釈液を系内に添加することを特徴とするものである。

本発明の液状組成物及び検体希釈液の組成、pHは、上記本発明のキットが備える液状組成物と同様である。また、本発明の検体希釈液は、小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体以外の不溶性担体（例えば、ゲル濾過担体やフィルター等）を用いた小胞分離に用いてもよい。したがって、本発明の検体希釈液は、種々の担体を用いた小胞分離に利用することができる。

[実施例]

[0136] 以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0137] (試験例1)

エクソソームとは反応しない抗マウスIgG抗体を磁性粒子に結合させた陰性対照粒子と、エクソソームを含む臨床検体と、反応バッファーとを混合し、洗浄後、エクソソームの膜上に発現しているCD81を認識する抗体を用いたELISAにより陰性対照粒子に非特異吸着したエクソソームを検出することで、反応バッファーの非特異吸着低減作用を確認した。具体的手順を以下に示す。

[0138] まず、参考例1及び実施例1～5の反応バッファーとして、以下の反応バッファーを準備した。

参考例1及び実施例1～5の反応バッファー：トリス緩衝生理食塩水（TBS（Sigma社製10×TBSを10倍希釈、以下同じ））に、非イオン性界面活性剤としてポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン

(30) グリコール (gibco社製 Pluronic F-68、以下同じ) を濃度が0.03% (w/v) になるように添加し、更に、無機塩として塩化ナトリウム (Wako社製、試薬特級) を表2に示す濃度になるように添加したもの

[0139] [表2]

	無機塩
参考例1	NaCl 0.14M
実施例1	NaCl 0.3M
実施例2	NaCl 0.4M
実施例3	NaCl 0.5M
実施例4	NaCl 0.6M
実施例5	NaCl 0.7M

[0140] 次に、コントロールバッファーとして、以下のバッファーを準備した。

コントロールバッファー：TBSに、非イオン性界面活性剤としてポリオキシエチレン (160) ポリオキシプロピレン (30) グリコールを濃度が0.03% (w/v) になるように添加したもの

また、検体1～5として、以下の検体を準備した。

検体1 (HT29 sup. in Control Buffer) : コントロールバッファーに、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を20倍希釈となるように添加したもの

検体2 (Serum) : プール血清 (コージンバイオ社製)

検体3 (HT29 sup. in Serum) : プール血清 (コージ

ンバイオ社製)に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を20倍希釈となるように添加したもの

検体4 (Plasma) : プールクエン酸血漿 (コージンバイオ社製)

検体5 (HT29 sup. in Plasma) : プールクエン酸血漿 (コージンバイオ社製)に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を20倍希釈となるように添加したもの

次に、陰性対照粒子として、抗マウスIgG抗体 (JSRライフサイエンス社製、以下同じ) を磁性粒子 (JSRライフサイエンス社製MS300/Carboxyl、以下同じ) に結合させたものを準備した。

[0141] 次に、96ウェル白色プレート (コーニング社製 #23711007) に、陰性対照粒子0.0125mgを加え、各ウェルに、コントロールバッファー、検体1~5を25 μ L、1ウェルあたりに1種ずつ添加した。参考例1の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.07Mになるように加え、25 $^{\circ}$ Cで20分反応させた (pH: 7.4)。また、参考例1の反応バッファーに代えて実施例1~5の反応バッファーをそれぞれ等量使用し、同様の反応を行った (実施例1: 終濃度0.15M、実施例2: 終濃度0.2M、実施例3: 終濃度0.25M、実施例4: 終濃度0.3M、実施例5: 終濃度0.35M (実施例1~5: pH7.4))。

次に、洗浄バッファー (Tween20を0.1質量%含むTBS) を用いて反応後の陰性対照粒子を洗浄し、BSAを1質量%含むTBSで希釈したアルカリホスファターゼ (以下、ALP) 標識抗CD81抗体 (0.1 μ g/mL) を50 μ L添加し、25 $^{\circ}$ Cで20分反応させた。上記と同様の洗浄バッファーで洗浄した後、発光基質 (富士レビオ社製クラスIIIシリーズルミパルス基質液) を50 μ L添加し、5分後に発光測定機 (Promega社製 GloMax) を用いて発光強度を測定した。結果を図1-1、図1-2に示す。

図1-1、図1-2に示すとおり、塩化ナトリウムの終濃度が0.07Mの場合 (参考例1) は、検体成分の非特異吸着に起因すると考えられるバツ

クグラウンドシグナルが検出されたが、塩化ナトリウムの終濃度が0.15～0.35 Mの場合（実施例1～5）には非特異吸着が低減され、バックグラウンドシグナルが減少していた。

[0142] （試験例2－1）

抗CD9抗体（アブカム社製 ab2215、以下同じ）を磁性粒子に結合させたもの（以下、抗CD9抗体結合磁性粒子ともいう）を準備し、この抗CD9抗体結合磁性粒子と、エクソソームを含む臨床検体と、参考例1及び実施例1～5の各反応バッファーとを混合し、洗浄後、試験例1と同様にELISAにより捕捉されたエクソソームを検出することで、参考例1及び実施例1～5の各反応バッファーを用いた場合の反応性を評価した。具体的手順を以下に示す。

まず、検体6～8として、以下の検体を準備した。

検体6（HT29 sup. in Control Buffer）：試験例1で作製したコントロールバッファーに、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの

検体7（Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）

検体8（HT29 sup. in Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの

[0143] 次いで、Protein LoBindチューブ 2mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1 mg加え、各チューブに、検体6～8を1チューブあたりに1種ずつ添加した（検体6：0.1 mL、検体7：0.1 mL、検体8：0.1 mL）。参考例1の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.07 Mになるように加え、25℃で5時間反応させた（pH：7.4）。また、参考例1の反応バッファーに代えて実施例1～5の反応バッファーをそれぞれ等量使用し、同様の反応を行った（実施例1：終濃度0.15 M、実施例2：終濃度0.2 M、実施例3：終濃度0.25 M、実施例4：終濃度0.3 M、実施

例5：終濃度0.35M（実施例1～5：pH7.4））。

次に、Washing/Dilution Buffer（JSRライフサイエンス社製）0.5mLで洗浄した後、96ウェル白色プレート（コーニング社製 #23711007）に、0.0125mg/wellとなるように分注した。これに、BSAを1質量%含むTBSで希釈したALP標識抗CD81抗体（0.1μg/mL）を50μL添加し、25℃で20分反応させた。洗浄バッファー（Tween20を0.1質量%含むTBS）を用いて反応後の粒子を洗浄し、発光基質（富士レビオ社製クラスIIIシリーズ ルミパルス基質液）を50μL添加し、5分後に発光測定機（Promega社製 GloMax）を用いて発光強度を測定した。結果を図2-1に示す。

図2-1に示すとおり、塩化ナトリウムの終濃度が0.15～0.35Mの場合（実施例1～5）は、血清中での捕捉反応の反応性が向上することがわかった。

[0144]（試験例2-2）

捕捉反応の反応温度を25℃から4℃に変更して、試験例2-1と同様の試験を行った。具体的手順を以下に示す。

Protein LoBindチューブ 2mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1mg加え、各チューブに、検体6～8を1チューブあたりに1種ずつ添加した（検体6：0.1mL、検体7：0.1mL、検体8：0.1mL）。参考例1の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.07Mになるように加え、4℃で5時間反応させた（pH：7.4）。また、参考例1の反応バッファーに代えて実施例3の反応バッファーを等量使用し、同様の反応を行った（実施例3：終濃度0.25M（pH：7.4））。

次に、洗浄バッファー（Tween20を0.1質量%含むTBS）0.5mLで洗浄した後、96ウェル白色プレート（コーニング社製 #23711007）に、0.0125mg/wellとなるように分注した。これ

に、BSAを1質量%含むTBSで希釈したALP標識抗CD81抗体（ $0.1 \mu\text{g/mL}$ ）を $50 \mu\text{L}$ 添加し、 25°C で20分反応させた。洗浄バッファー（Tween 20を0.1質量%含むTBS）を用いて反応後の粒子を洗浄し、発光基質（富士レビオ社製クラスIIIシリーズ ルミパルス基質液）を $50 \mu\text{L}$ 添加し、5分後に発光測定機（Promega社製 GloMax）を用いて発光強度を測定した。結果を図2-2に示す。なお、図2-2には反応温度 25°C で行った試験結果もあわせて示す。

試験例2-2の結果（図2-2）から、塩化ナトリウムの終濃度が0.25 Mの場合（実施例3）は、反応温度が 4°C 、 25°C のいずれであっても、血清中での捕捉反応の反応性が良好となることがわかった。

[0145] （試験例3）

実施例3の反応バッファーの非特異吸着低減作用を、検体を変更して確認した。具体的手順を以下に示す。

まず、検体9～17として、以下の検体を準備した。

検体9（HT29 sup. spike Control Buffer）：試験例1で作製したコントロールバッファーに、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの

検体10（Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）

検体11（HT29 sup. spike Serum）：プール血清（コージンバイオ社製）に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの

検体12（Plasma（Heparin））：プールヘパリン血漿（コージンバイオ社製）

検体13（HT29 sup. spike Plasma（Heparin））：プールヘパリン血漿（コージンバイオ社製）に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの

検体14（Plasma（EDTA））：プールEDTA血漿（コージン

バイオ社製)

検体15 (HT29 sup. spike Plasma (EDTA)) : プールEDTA血漿 (コージンバイオ社製) に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの

検体16 (Plasma (Citrate)) : プールクエン酸血漿 (コージンバイオ社製)

検体17 (HT29 sup. spike Plasma (Citrate)) : プールクエン酸血漿 (コージンバイオ社製) に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を100倍希釈となるように添加したもの

[0146] 次いで、Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) に、試験例1で作製した陰性対照粒子0.1mgを加え、各チューブに検体9~17を0.1mL、1チューブあたりに1種ずつ添加した。参考例1の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.07Mになるように加え、25℃で5時間反応させた (pH: 7.4)。また、参考例1の反応バッファーに代えて実施例3の反応バッファーを等量使用し、同様の反応を行った (実施例3: 終濃度0.25M (pH: 7.4))。

次に、洗浄バッファー (Tween 20を0.1質量%含むTBS) 0.5mLで洗浄した後、96ウェル白色プレート (コーニング社製 #23711007) に、0.0125mg/wellとなるように分注した。これに、BSAを1質量%含むTBSで希釈したALP標識抗CD81抗体 (0.1μg/mL) を50μL添加し、25℃で20分反応させた。洗浄バッファー (Tween 20を0.1質量%含むTBS) を用いて反応後の粒子を洗浄し、発光基質 (富士レピオ社製クラスIIIシリーズ ルミパルス基質液) を50μL添加し、5分後に発光測定機 (Promega社製 GloMax) を用いて発光強度を測定した。

図3に示すとおり、塩化ナトリウムの終濃度が0.25Mの場合 (実施例

3) は、検体の種類によらずバックグラウンドシグナルが少なかった。

[0147] (試験例4)

実施例3の反応バッファの反応性向上作用を、検体を変更して確認した。具体的手順を以下に示す。

Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1mg加え、各チューブに、試験例3で示した検体9~13を0.1mL、1チューブあたりに1種ずつ添加した。参考例1の反応バッファを、塩化ナトリウムの終濃度が0.07Mになるように加え、25℃で5時間反応させた(pH: 7.4)。また、参考例1の反応バッファに代えて実施例3の反応バッファを等量使用し、同様の反応を行った(実施例3: 終濃度0.25M (pH: 7.4))。

次に、洗浄バッファ(Tween 20を0.1質量%含むTBS) 0.5mLで洗浄した後、96ウェル白色プレート(コーニング社製 #23711007) に、0.0125mg/wellとなるように分注した。これに、BSAを1質量%含むTBSで希釈したALP標識抗CD81抗体(0.1μg/mL)を50μL添加し、25℃で20分反応させた。洗浄バッファ(Tween 20を0.1質量%含むTBS)を用いて反応後の粒子を洗浄し、発光基質(富士レビオ社製クラスIIIシリーズ ルミパルス基質液)を50μL添加し、5分後に発光測定機(Promega社製 GloMax)を用いて発光強度を測定した。結果を図4に示す。

図4に示すとおり、塩化ナトリウムの終濃度が0.25Mの場合(実施例3)は、検体の種類によらず捕捉反応の反応性が高かった。

[0148] (試験例5)

抗CD63抗体(JSRライフサイエンス社製)を磁性粒子に結合させたもの(以下、抗CD63抗体結合磁性粒子という)、抗CD81抗体(Clonal M38、Abnova MAB6435)を磁性粒子に結合させたもの(以下、抗CD81抗体結合磁性粒子という)、抗EpCAM抗体(J

S R ライフサイエンス社製) を磁性粒子に結合させたもの (以下、抗 E p C A M 抗体結合磁性粒子という) を、それぞれ準備した。

抗 C D 9 抗体結合磁性粒子を、抗 C D 6 3 抗体結合磁性粒子、抗 C D 8 1 抗体結合磁性粒子、抗 E p C A M 抗体結合磁性粒子に変更し、検体として試験例 3 で示した検体 1 0 ~ 1 3 を用いた以外は試験例 4 と同様にして、実施例 3 の反応バッファの反応性向上作用の検討を行った。結果を図 5 - 1 (抗 C D 6 3 抗体結合磁性粒子)、図 5 - 2 (抗 C D 8 1 抗体結合磁性粒子)、図 5 - 3 (抗 E p C A M 抗体結合磁性粒子) に示す。

[0149] (試験例 6 小胞中の核酸の検出)

P r o t e i n L o B i n d チューブ 2 m L (エッペンドルフ社製、# 0 0 3 0 1 0 8 1 3 2) を 1 2 本用意し、チューブ 1 ~ 1 2 とナンバリングした。チューブ 1 ~ 4 に、抗 C D 9 抗体結合磁性粒子を 0. 1 m g ずつ、チューブ 5 ~ 8 に、抗 C D 9 抗体結合磁性粒子を 0. 5 m g ずつ、チューブ 9 ~ 1 2 に、抗 C D 9 抗体結合磁性粒子を 1 m g ずつ、それぞれ加えた。

次いで、チューブ 1 ~ 1 2 に、実施例 3 の反応バッファを、塩化ナトリウムの終濃度が 0. 2 5 M になるように 1 m L ずつ加え、更に試験例 3 で示した検体 1 0 を 1 m L ずつ加えた。チューブ 1, 5, 9 については 2 5 ° C で 1 時間、チューブ 2, 6, 1 0 については 2 5 ° C で 5 時間、チューブ 3, 7, 1 1 については 2 5 ° C で 2 4 時間、チューブ 4, 8, 1 2 については 4 ° C で 2 4 時間反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファ (T w e e n 2 0 を 0. 1 質量% 含む T B S) 0. 5 m L で 3 回洗浄し、この懸濁液を、上記とは別の新しい P r o t e i n L o B i n d チューブ 2 m L (エッペンドルフ社製、# 0 0 3 0 1 0 8 1 3 2) に 0. 5 m L 分注した。集磁ラックを用いて、抗体結合磁性粒子を集磁後、上清を 0. 4 m L 抜き取り、残った抗体結合粒子液 0. 1 m L から m i c r o R N A を回収し定量した。結果を図 6 に示す。

なお、m i c r o R N A の回収には E x o C a p TM N u c l e i c A c i d E l u t i o n B u f f e r (M B L 社製、# M E X - E) を用いた

。また、microRNA (miR-21) の定量には、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ライフテクノロジーズ社製、#4366597)、TaqMan MicroRNA Assays (ライフテクノロジーズ社製、#186948384)、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (ライフテクノロジーズ社製、#4440040) を用い、操作については推奨プロトコールに従った。

[0150] 図6に示すとおり、終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で反応させることによって、ヒト健常者血清に由来する小胞中の核酸を検出できた。さらに検出された核酸量は、抗体結合粒子量、温度、時間に依存して上昇することが確認された。

[0151] (試験例7 小胞中の核酸の検出)

Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を8本用意し、チューブ13~20とナンバリングした。チューブ13~14に、抗CD9抗体結合磁性粒子を1mgずつ、チューブ15~16に、抗CD63抗体結合磁性粒子を1mgずつ、チューブ17~18に、抗CD81抗体結合磁性粒子を1mgずつ、チューブ19~20に、Composite抗体結合磁性粒子(抗CD9抗体結合磁性粒子と抗CD63抗体結合磁性粒子と抗CD81抗体結合磁性粒子と抗EpCAM抗体結合磁性粒子を1:1:1:1で混合したもの)を1mgずつ、それぞれ加えた。

次いで、チューブ13~20に、実施例3の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.25Mになるように0.3mLずつ添加した。奇数番号のチューブに試験例3で示した検体10を、偶数番号のチューブに試験例3で示した検体12を、それぞれ0.3mLずつ加え、25℃で24時間反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー(Tween20を0.1質量%含むTBS)0.5mLで3回洗浄し、この懸濁液を、上記とは別の新しい

Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) に0.5mL分注した。集磁ラックを用いて、抗体結合磁性粒子を集磁後、上清を0.4mL抜き取り、残った抗体結合粒子液0.1mLからmicroRNAを回収し定量した。結果を図7-1、図7-2に示す。

なお、microRNAの回収にはmiRNeasy Serum/Plasma Kit (50) (QIAGEN社製、#217184) を用いた。また、microRNA (miR-21) の定量には、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ライフテクノロジーズ社製、#4366597)、TaqMan MicroRNA Assays (ライフテクノロジーズ社製、#186948384)、TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (ライフテクノロジーズ社製、#4440040) を用い、操作については推奨プロトコールに従った。

[0152] また、比較対象として、エクソソームを回収する標準的な方法である超遠心分離法を利用して小胞中の核酸の検出を行った。すなわち、試験例3で示した検体10、12それぞれ11mLずつについて、超遠心分離機(ベックマン社製 Optima XE-90)を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを11mL加え、懸濁した。再度、超遠心分離機(ベックマン社製 Optima XE-90)を用い、100,000rpm、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを0.11mL加え、懸濁した。懸濁液のうち3μLをmicroRNAの回収、定量に用いた。結果を図7-1、図7-2に示す。

なお、microRNAの回収、microRNA (miR-21) の定量は、上記と同様にして行った。

[0153] 図7-1に示すとおり、終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で反応させることによって、ヒト健常者血清に由来する小胞中の核酸を、超遠心分離法と同等レベルで検出できることが確認された。

図7-2に示すとおり、ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞中の核酸は、超遠心分離法を利用した場合では検出できなかった。ヒト健常者ヘパリン血漿は一般的にPCR阻害を起こす物質を含むと考えられており、超遠心分離法により回収したサンプルではPCRを阻害する物質が残存するためと考えられる。これに対し、終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で反応させた場合にはヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞中の核酸を検出できた。

これらの結果から、終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で小胞と粒子を反応させることによって、血清、血漿といった検体の種類を問わず小胞中の核酸を検出できることがわかった。

[0154] (試験例8 小胞表面のタンパクの検出)

Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132)を10本用意し、チューブ21~30とナンバリングした。チューブ21~22に、抗CD9抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ23~24に、抗CD63抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ25~26に、抗CD81抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ27~28に、抗EpCAM抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ29~30に、Composite抗体結合磁性粒子(抗CD9抗体結合磁性粒子と抗CD63抗体結合磁性粒子と抗CD81抗体結合磁性粒子と抗EpCAM抗体結合磁性粒子を1:1:1:1で混合したもの)を0.2mgずつ、それぞれ加えた。

次いで、チューブ21~30に、実施例3の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.25Mになるように1.0mLずつ添加した。奇数番号のチューブに試験例3で示した検体10を、偶数番号のチューブに試験例3で示した検体12を、それぞれ1.0mLずつ加え、25℃で3時間反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー(Tween20を0.1質量%含むTBS)0.5mLで3回洗浄し、この懸濁液を、上記とは別の新しい

Protein LoBindチューブ 2 mL (エッペンドルフ社製、# 0030108132) に 0.5 mL 分注した。

次いで集磁して洗浄液を廃棄後、抗体結合磁性粒子を 1×サンプルバッファ 20 μ L で懸濁し、95℃で 5 分間静置処理した。各サンプルを全量 (20 μ L) アプライし、SDS-PAGE を行った。ゲルを PVDF 膜に転写後、ブロッキングバッファ (1% (w/v) BSA 及び 0.1% (w/v) Tween 20 含有 TBS) にて 37℃で 2 時間振とうした。これを洗浄バッファ (0.1% (w/v) Tween 20 含有 TBS) にて洗浄した。

一次抗体として抗 CD9 抗体、抗 CD63 抗体、抗 CD81 抗体を、標識抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (Mouse TrueBlot ULTRA: Anti-Mouse IgG HRP, Rockland 18-8817-33) を、それぞれ 25℃で 1 時間反応させ、これを洗浄バッファ (0.1% (w/v) Tween 20 含有 TBS) にて洗浄した後、発光基質を反応させ、発光測定器 (LAS-3000, FUJIFILM) にてウェスタンプロット像を確認した。結果を図 8-1、図 8-2 に示す。

[0155] また、比較対象として、エクソソームを回収する標準的な方法である超遠心分離法を利用して小胞表面のタンパクの検出を行った。すなわち、試験例 3 で示した検体 10、12 それぞれ 11 mL ずつについて、超遠心分離機 (ベックマン社製 Optima XE-90) を用い、100,000×g、4℃で 70 分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿に PBS を 11 mL 加え、懸濁した。再度、超遠心分離機 (ベックマン社製 Optima XE-90) を用い、100,000×g、4℃で 70 分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿に PBS を 0.11 mL 加え、懸濁した。懸濁液のうち 10 μ L に 4×サンプルバッファ 5 μ L、PBS 5 μ L を添加し、95℃で 5 分間静置処理した。各サンプルを全量 (20 μ L) アプライし、SDS-PAGE を行った。ゲルを PVDF 膜に転写後、ブロッキングバッファ (1% (

w/v) BSA及び0.1% (w/v) Tween 20含有TBS) にて37℃で2時間振とうした。これを洗浄バッファー (0.1% (w/v) Tween 20含有TBS) にて洗浄した。

一次抗体として抗CD9抗体、抗CD63抗体、抗CD81抗体を、標識抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体 (Mouse TrueBlot ULTRA: Anti-Mouse IgG HRP, Rockland 18-8817-33) を、それぞれ25℃で1時間反応させ、これを洗浄バッファー (0.1% (w/v) Tween 20含有TBS) にて洗浄した後、発光基質を反応させ、発光測定器 (LAS-3000, FUJIFILM) にてウェスタンプロット像を確認した。結果を図8-1、図8-2に示す。

[0156] 図8-1、図8-2に示すとおり、終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞表面のタンパクを、超遠心分離法と同等レベルで検出できることが確認された。また、抗EpCAM抗体結合磁性粒子を用いた場合には、小胞表面タンパクは検出されなかった。EpCAMタンパク質は健常者の血液中にはほとんど存在せず、癌などの疾患によりその血中濃度が上昇すると考えられている。終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で小胞と粒子を反応させることによって、非特異反応を抑制できていることが確認された。

[0157] (試験例9-1 小胞表面のネイティブフォームの立体構造を維持したタンパクの検出(1))

Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を8本用意し、チューブ31~38とナンバリングした。チューブ31, 32に抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1mg、チューブ33, 34に抗CD63抗体結合磁性粒子を0.1mg、チューブ35, 36に抗CD81抗体結合磁性粒子を0.1mg、チューブ37, 38に抗EpCAM抗体結合磁性粒子を0.1mg加えた。実施例3の反応バッ

ファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.25 Mになるようにチューブ31～38に0.3 mLずつ添加した。

次いで、チューブ31, 33, 35, 37には試験例3で示した検体10を0.3 mL添加し、25℃で一晩反応させた。また、チューブ32, 34, 36, 38には試験例3で示した検体12を0.3 mL添加し、25℃で一晩反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー（Tween 20を0.1質量%含むTBS）0.25 mLで2回洗浄し、集磁後、上清を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水1 mLに懸濁した。

上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ 2 mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）を40本用意し、チューブ39～78とナンバリングした。チューブ31より、チューブ39～43へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。チューブ32より、チューブ44～48へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。チューブ33より、チューブ49～53へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。チューブ34より、チューブ54～58へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。チューブ35より、チューブ59～63へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。チューブ36より、チューブ64～68へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。チューブ37より、チューブ69～73へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。チューブ38より、チューブ74～78へ、懸濁液を0.1 mLずつ分注した。

次いで、チューブ39, 44, 49, 54, 59, 64, 69, 74には、コントロールとして、フィコエリスリン（以下、PE）標識抗マウスIgG抗体（SONY社製）を、チューブ40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75には、PE標識抗CD9抗体（SONY社製）を、チューブ41, 46, 51, 56, 61, 66, 71, 76には、PE標識抗CD63抗体（SONY社製）を、チューブ42, 47, 52, 57, 62, 67, 72, 77には、PE標識抗CD81抗体（SONY社製）を、チューブ43, 48, 53, 58, 63, 68, 73, 78には、PE標識抗EpCA

M抗体（SONY社製）を、それぞれ5 μ Lずつ添加した。その後、チューブ39～78を、25℃、1000 rpmの条件で、1時間懸濁した。

次に、反応後の各粒子をリン酸緩衝生理食塩水0.5 mLで2回洗浄した後、フローサイトメーター（BD社製、BD Accuri C6）を用いて、各サンプルの蛍光シグナルを確認した。結果を図9-1、図9-2に示す。

[0158] 図9-1、図9-2に示すとおり、終濃度0.25 Mの塩化ナトリウム存在下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿に由来する小胞表面のCD9、CD63、CD81が検出できることが確認された。

また、抗CD9抗体結合磁性粒子、抗CD63抗体結合磁性粒子、抗CD81抗体結合磁性粒子を用いた場合において、発癌により発現すると考えられているEpCAMを抗EpCAM抗体で検出したピークが、コントロールとした抗マウスIgG抗体と比較してピークシフトしておらず、健常者の検体からは検出されないものと考えられる。

さらに、固相担体として抗EpCAM抗体結合磁性粒子を用いた場合には、抗マウスIgG抗体で検出されたピークと抗CD9抗体、抗CD63抗体、抗CD81抗体、抗EpCAM抗体で検出されたピークはさほど変わらなかった。すなわち、固相担体として抗EpCAM抗体結合磁性粒子を用いた場合に、健常者の検体よりエクソソームは得られておらず、非特異吸着が低いものと考えられる。

また、解析に用いたサンプルにはタンパク質の立体構造を変化させる熱、薬剤等の処理をしておらず、小胞表面に存在するネイティブフォームのCD9、CD63、CD81が検出できたものと考えられる。

[0159] （試験例9-2 小胞表面のネイティブフォームの立体構造を維持したタンパクの検出（2））

試験に先立ち、以下に示す検体18、19を用意した。

検体18（HT29 sup. spike Serum）：プール血清

(コージンバイオ社製)に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を10倍希釈となるように添加したもの

検体19 (HT29 sup. spike Plasma (Heparin)) : プールヘパリン血漿 (コージンバイオ社製) に、スパイクとしてHT29細胞培養上清100倍濃縮液を10倍希釈となるように添加したもの

[0160] Protein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を8本用意し、チューブ79~86とナンバリングした。チューブ79, 80に抗CD9抗体結合磁性粒子を0.1mg、チューブ81, 82に抗CD63抗体結合磁性粒子を0.1mg、チューブ83, 84に抗CD81抗体結合磁性粒子を0.1mg、チューブ85, 86に抗EpCAM抗体結合磁性粒子を0.1mg加えた。実施例3の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.25Mになるようにチューブ79~86に0.3mLずつ添加した。

次いで、チューブ79, 81, 83, 85には検体18を0.3mL添加し、25℃で一晩反応させた。また、チューブ80, 82, 84, 86には検体19を0.3mL添加し、25℃で一晩反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー (Tween 20を0.1質量%含むTBS) 0.25mLで2回洗浄し、集磁後、上清を取り除き、リン酸緩衝生理食塩水1mLに懸濁した。

上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132) を40本用意し、チューブ87~126とナンバリングした。チューブ79より、チューブ87~91へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。チューブ80より、チューブ92~96へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。チューブ81より、チューブ97~101へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。チューブ82より、チューブ102~106へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。チューブ83より、チューブ107~111へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。チューブ

84より、チューブ112～116へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。チューブ85より、チューブ117～121へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。チューブ86より、チューブ122～126へ、懸濁液を0.1mLずつ分注した。

次いで、チューブ87, 92, 97, 102, 107, 112, 117, 122には、コントロールとしてPE標識抗マウスIgG抗体（SONY社製）を、チューブ88, 93, 98, 103, 108, 113, 118, 123には、PE標識抗CD9抗体（SONY社製）を、チューブ89, 94, 99, 104, 109, 114, 119, 124には、PE標識抗CD63抗体（SONY社製）を、チューブ90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125には、PE標識抗CD81抗体（SONY社製）を、チューブ91, 96, 101, 106, 111, 116, 121, 126には、PE標識抗EpCAM抗体（SONY社製）を、それぞれ5μLずつ添加した。その後、チューブ87～126を、25℃、1000rpmの条件で、1時間懸濁した。

次に、反応後の各粒子をリン酸緩衝生理食塩水0.5mLで2回洗浄した後、フローサイトメーター（BD社製、BD Accuri C6）を用いて、各サンプルの蛍光シグナルを確認した。結果を図9-3、図9-4に示す。

[0161] 図9-3、図9-4に示すとおり、終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿、ヒト結腸がんHT29細胞に由来する小胞表面に存在するCD9、CD63、CD81が検出できることが確認された。

また発癌により発現すると考えられているEpCAMを抗EpCAM抗体で検出したピークについて、コントロールとした抗マウスIgG抗体と比較してピークシフトが確認できた。サンプルに健常者検体のみを用いている図9-1、図9-2ではこのピークシフトは確認されなかったことから、本発明を利用して疾患を判定できることがわかった。

さらに、固相担体として抗E p C A M抗体結合磁性粒子を用いた場合には、抗マウス I g G抗体で検出されたピークと抗C D 9抗体、抗C D 6 3抗体、抗C D 8 1抗体、抗E p C A M抗体で検出されたピークはさほど変わらなかった。すなわち、固相担体として抗E p C A M抗体結合磁性粒子を用いた場合に、健常者の検体よりエクソソームは得られておらず、非特異吸着が低いものと考えられる。

また、解析に用いたサンプルにはタンパク質の立体構造を変化させる熱、薬剤等の処理をしておらず、小胞表面に存在するネイティブフォームのC D 9、C D 6 3、C D 8 1が検出できたものと考えられる。

[0162] (試験例10)

P r o t e i n L o B i n dチューブ 2mL (エッペンドルフ社製、#0030108132)を20本用意し、チューブ127~146とナンバリングした。チューブ127~130に、抗C D 9抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ131~134に、抗C D 6 3抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ135~138に、抗C D 8 1抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ139~142に、抗E p C A M抗体結合磁性粒子を0.2mgずつ、チューブ143~146に、C o m p o s i t e抗体結合磁性粒子(抗C D 9抗体結合磁性粒子と抗C D 6 3抗体結合磁性粒子と抗C D 8 1抗体結合磁性粒子と抗E p C A M抗体結合磁性粒子を1:1:1で混合したもの)を0.2mgずつ、それぞれ加えた。

次いで、チューブ127~146に、実施例3の反応バッファーを、塩化ナトリウムの終濃度が0.25Mになるように0.1mLずつ添加した。チューブ127, 131, 135, 139, 143に試験例3で示した検体10を、チューブ128, 132, 136, 140, 144に試験例9-2で示した検体18を、チューブ129, 133, 137, 141, 145に試験例3で示した検体12を、チューブ130, 134, 138, 142, 146に試験例9-2で示した検体19を、それぞれ0.1mLずつ加え、25℃で24時間反応させた。

次に、反応後の各粒子を洗浄バッファー（Tween 20を0.1質量%含むTBS）0.5 mLで3回洗浄し、この懸濁液を、上記とは別の新しいProtein LoBindチューブ 2 mL（エッペンドルフ社製、#0030108132）に0.5 mL分注した。

次いで集磁して洗浄液を廃棄後、抗体結合磁性粒子を1×サンプルバッファー20 μ Lで懸濁し、95℃で5分間静置処理した。各サンプルを全量（20 μ L）アプライし、SDS-PAGEを行った。ゲルをPVDF膜に転写後、ブロッキングバッファー（1%（w/v）BSA及び0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて37℃で2時間振とうした。これを洗浄バッファー（0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて洗浄した。

一次抗体として抗CD9抗体、抗EpCAM抗体、抗Alix抗体を、標識抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体（Mouse TrueBlot ULTRA: Anti-Mouse IgG HRP, Rockland 18-8817-33）を、それぞれ25℃で1時間反応させ、これを洗浄バッファー（0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて洗浄した後、発光基質を反応させ、発光測定器（LAS-3000, FUJIFILM）にてウェスタンブロット像を確認した。結果を図10-1、図10-2に示す。

[0163] また、比較対象として、エクソソームを回収する標準的な方法である超遠心分離法を利用して小胞表面のタンパクの検出を行った。すなわち、検体10、12、18、19それぞれ11 mLずつについて、超遠心分離機（ベックマン社製 Optima XE-90）を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを11 mL加え、懸濁した。再度、超遠心分離機（ベックマン社製 Optima XE-90）を用い、100,000×g、4℃で70分間遠心した。上清を抜き取り、沈殿にPBSを0.11 mL加え、懸濁した。懸濁液のうち1 μ Lに4×サンプルバッファー5 μ L、PBS 14 μ Lを添加し、95℃で5分間静置

処理した。各サンプルを全量（20 μ L）アプライし、SDS-PAGEを行った。ゲルをPVD F膜に転写後、ブロッキングバッファー（1%（w/v）BSA及び0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて37℃で2時間振とうした。これを洗浄バッファー（0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて洗浄した。

一次抗体として抗CD9抗体、抗EpCAM抗体、抗Alix抗体を、標識抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体（Mouse TrueBlot ULTRA: Anti-Mouse IgG HRP、Rockland 18-8817-33）を、それぞれ25℃で1時間反応させ、これを洗浄バッファー（0.1%（w/v）Tween 20含有TBS）にて洗浄した後、発光基質を反応させ、発光測定器（LAS-3000, FUJIFILM）にてウェスタンブロット像を確認した。結果を図10-1、図10-2に示す。

[0164] 図10-1、図10-2に示すとおり、終濃度0.25Mの塩化ナトリウム存在下で小胞と粒子を反応させることによって、ヒト健常者血清、ヒト健常者ヘパリン血漿、ヒト結腸がんHT29細胞に由来する小胞表面のタンパクを、超遠心分離法と同等レベルもしくはそれ以上で検出できることが確認された。また、抗EpCAM抗体を用いて検出した場合に、ヒト健常者血清、ヘパリン血漿ではバンドが検出されず、これらにヒト結腸がんHT29細胞の培養上清を添加した場合にはバンドが検出されることから、本発明を利用して疾患を判定できることがわかった。

請求の範囲

- [請求項1] 脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、前記複合体を洗浄する洗浄工程を含み、
前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかを、塩濃度0.15～2Mの環境下で行うことを特徴とする、
脂質二重膜を有する小胞の分離方法。
- [請求項2] 前記複合体形成工程を、塩濃度0.15～2Mの環境下で行う、請求項1に記載の分離方法。
- [請求項3] 前記生体試料が、体液又は細胞培養上清である、請求項1又は2に記載の分離方法。
- [請求項4] 前記生体試料が、体液である、請求項1～3のいずれか1項に記載の分離方法。
- [請求項5] 前記複合体形成工程に用いられる複合体形成反応液が、無機塩を含有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の分離方法。
- [請求項6] 前記無機塩が、アルカリ金属ハロゲン化物である、請求項5に記載の分離方法。
- [請求項7] 前記複合体形成工程における複合体形成反応の反応温度が、2～42℃の範囲内である、請求項1～6のいずれか1項に記載の分離方法。
- [請求項8] 前記リガンドが、小胞の表面に存在する表面抗原を認識する抗体である、請求項1～7のいずれか1項に記載の分離方法。
- [請求項9] 前記小胞が、エクソソームである、請求項1～8のいずれか1項に記載の分離方法。
- [請求項10] 前記固相担体が、磁性粒子である、請求項1～9のいずれか1項に記載の分離方法。
- [請求項11] 前記洗浄工程が、前記磁性粒子を磁力により集めて磁性粒子と液相

とを分離する集磁工程、及び該集磁工程で分離された磁性粒子を洗浄液中に分散させる分散工程を含む、請求項 10 に記載の分離方法。

[請求項12] 請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の分離方法の後に、
さらに小胞中の核酸を検出する核酸検出工程を含むことを特徴とする、
小胞中の核酸の検出方法。

[請求項13] 請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の分離方法の後に、
さらに小胞の内側及び表面の少なくとも一方に存在するタンパク質を検出するタンパク質検出工程を含むことを特徴とする、
小胞由来のタンパク質の検出方法。

[請求項14] 請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の分離方法の後に、
さらに前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定するシグナル測定工程を含むことを特徴とする、
小胞由来のシグナル測定方法。

[請求項15] 被検者が疾患を発症しているか否かを判定するための方法であって、
被検者由来の生体試料を用いて、請求項 14 に記載のシグナル測定方法により前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程を含むことを特徴とする、
疾患の判定方法。

[請求項16] 疾患治療薬の薬効評価方法であって、
疾患治療薬の投与前及び投与後の被検者由来の生体試料を用いて、請求項 14 に記載のシグナル測定方法により、前記複合体を形成した小胞由来のシグナル強度を測定する工程を含むことを特徴とする、
疾患治療薬の薬効評価方法。

[請求項17] 脂質二重膜を有する小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体と、
無機塩又は有機塩を含み該無機塩又は有機塩の含有量が、 0.15

M以上の塩濃度を有する液状組成物を備えることを特徴とする、
キット。

[請求項18] 疾患の判定用又は疾患治療薬の薬効評価用である、請求項17に記載のキット。

[請求項19] 脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料と、前記小胞の表面に存在する表面抗原を認識するリガンドが結合した固相担体とを接触させ、前記小胞と前記固相担体との複合体を形成させる複合体形成工程と、前記複合体を洗浄する洗浄工程とを含む、脂質二重膜を有する小胞の分離方法に使用される、前記複合体形成工程及び前記洗浄工程の少なくともいずれかに添加するための液状組成物であって、
0.15 M以上の塩濃度を有することを特徴とする、
液状組成物。

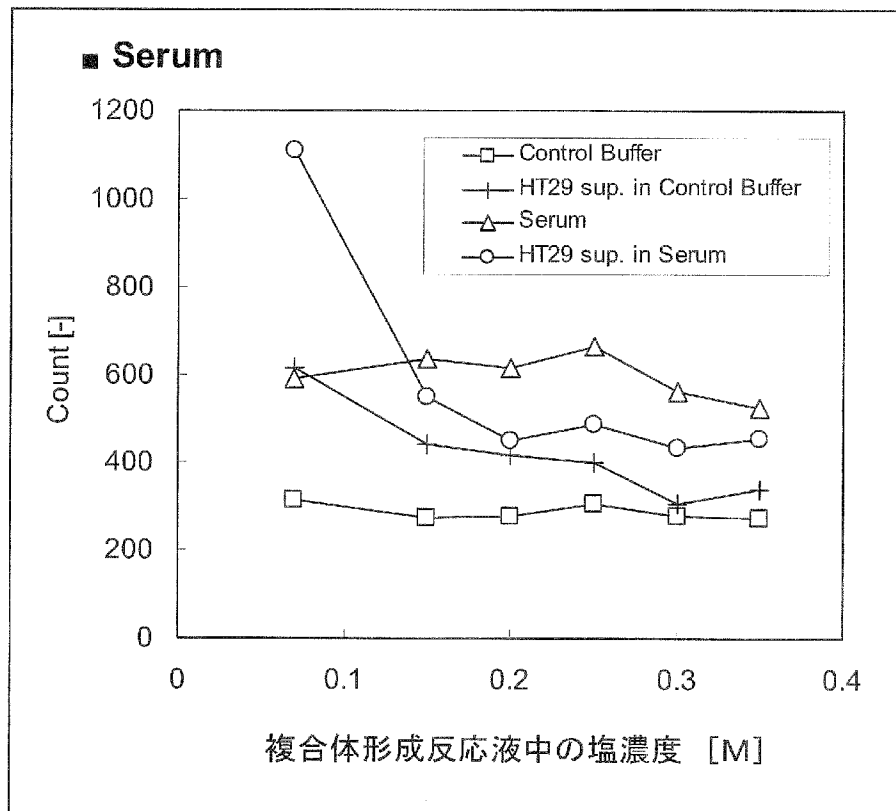
[請求項20] 不溶性担体を用いて脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料から脂質二重膜を有する小胞を分離する方法に使用される、前記小胞と前記不溶性担体との複合体を形成させるための検体希釈液であって、
0.15 M以上の塩濃度を有することを特徴とする、
検体希釈液。

[請求項21] 無機塩を含有する、請求項20に記載の検体希釈液。

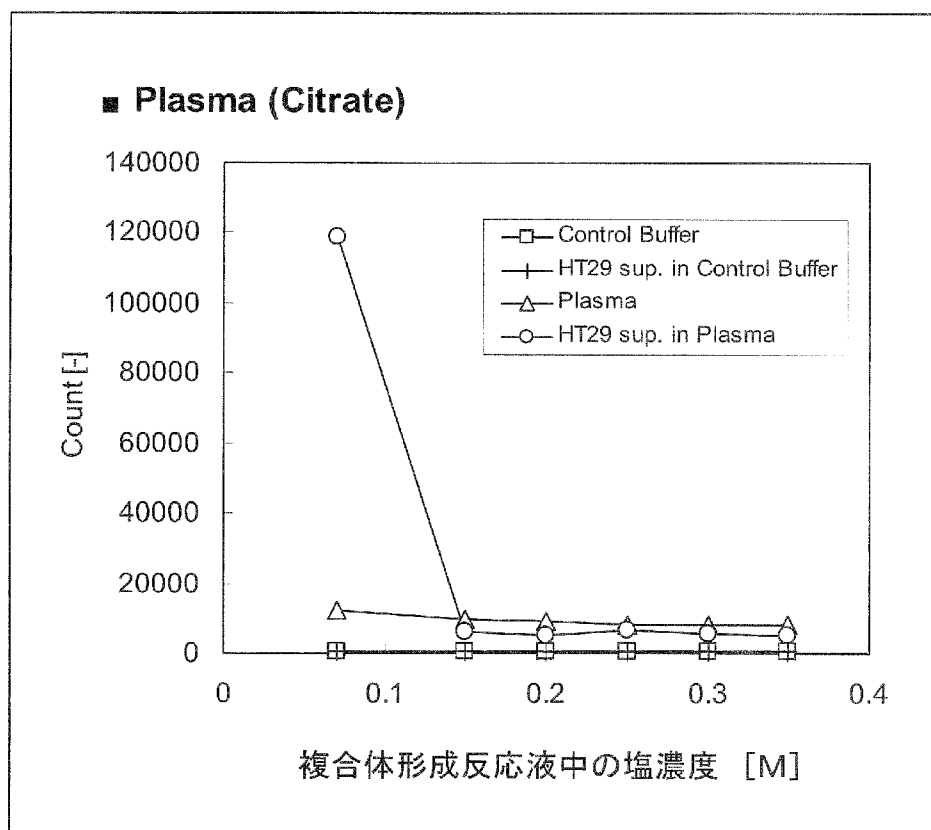
[請求項22] 前記無機塩が、アルカリ金属ハロゲン化物である、請求項21に記載の検体希釈液。

[請求項23] 不溶性担体を用いて脂質二重膜を有する小胞を含む生体試料から脂質二重膜を有する小胞を分離する方法であって、
0.15 M以上の塩濃度を有する検体希釈液を用いることを特徴とする、
脂質二重膜を有する小胞の分離方法。

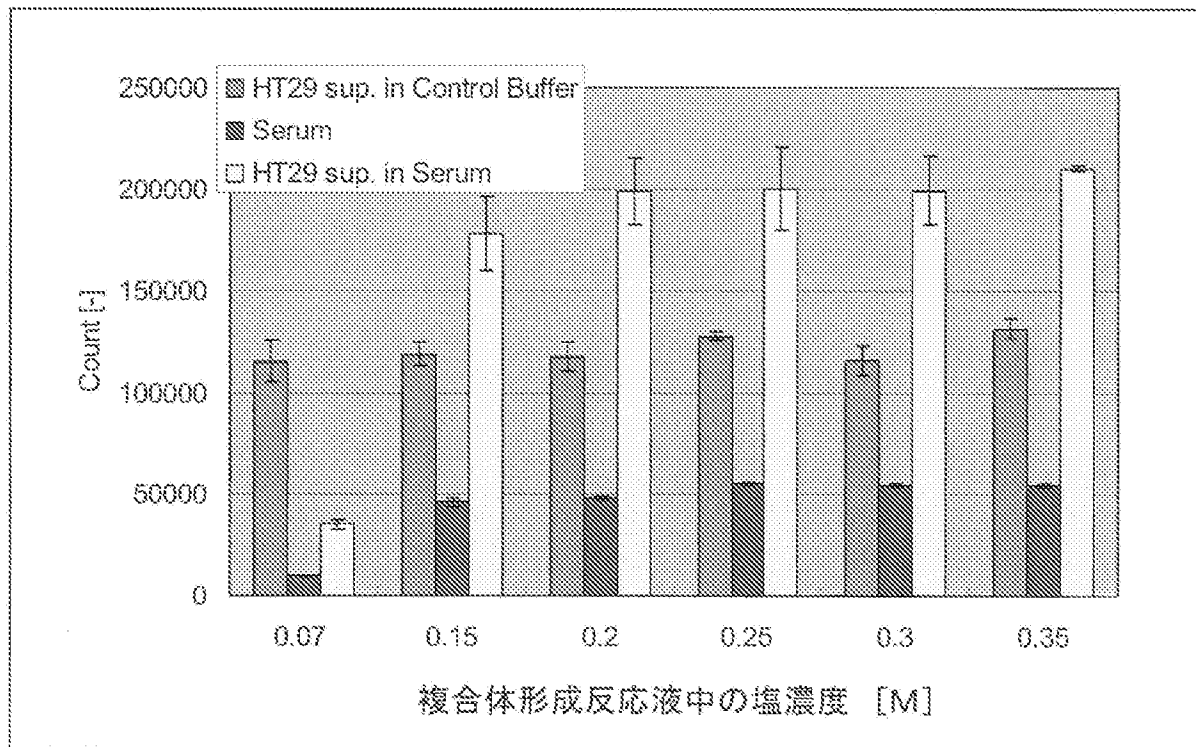
[図1-1]



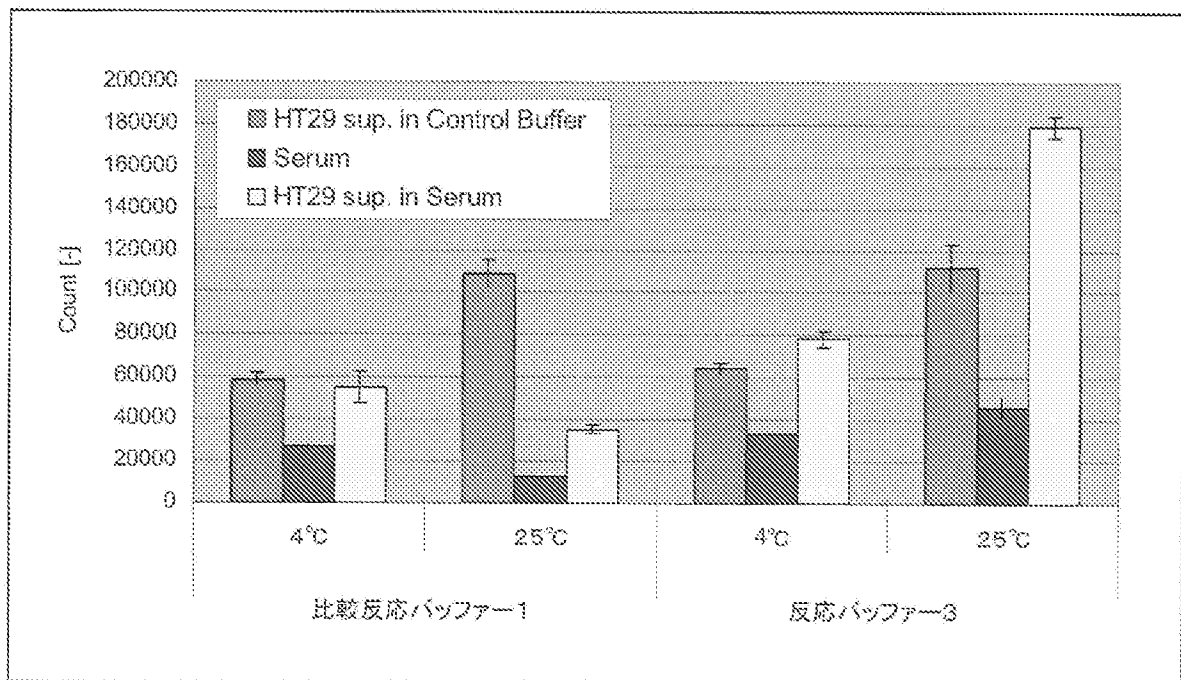
[図1-2]



[図2-1]



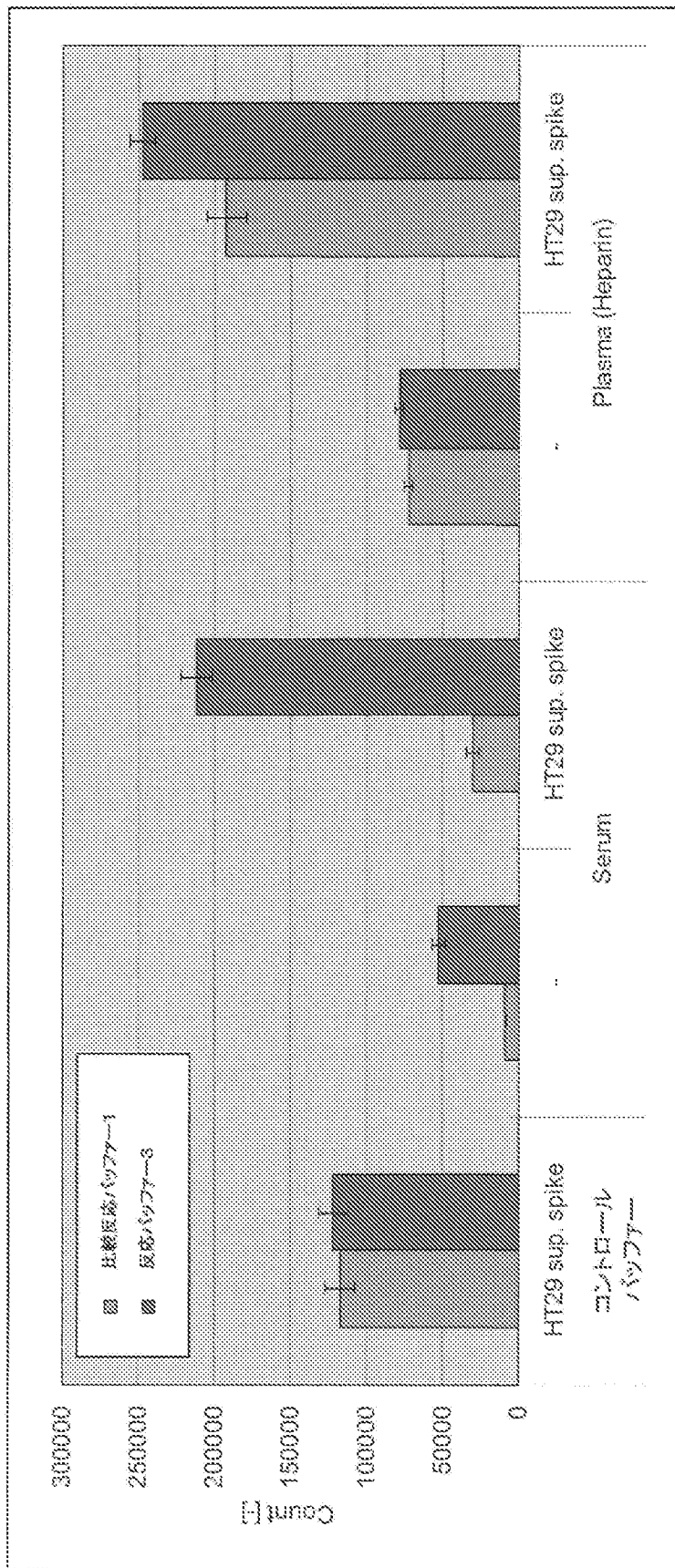
[図2-2]



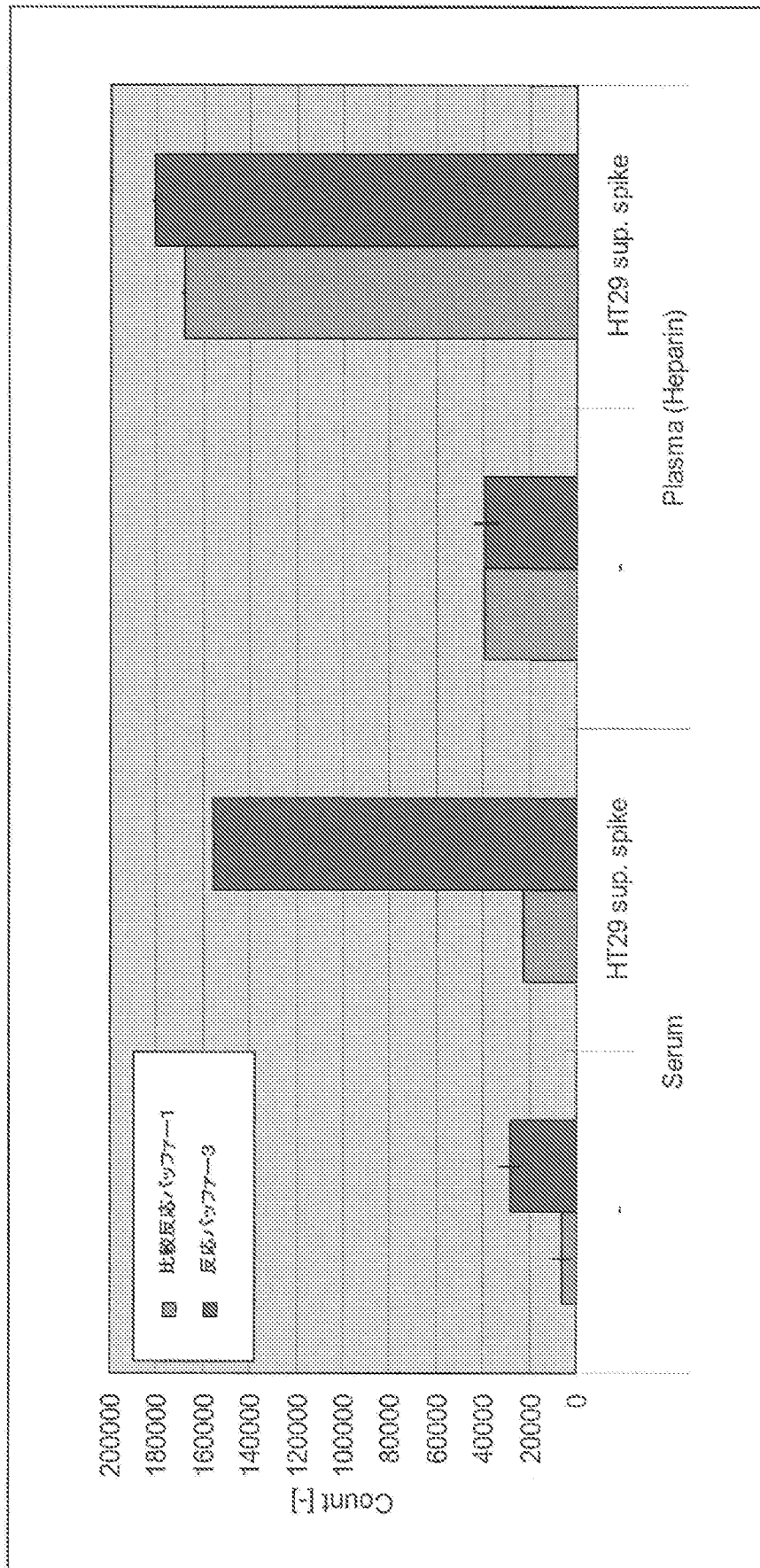
[図3]



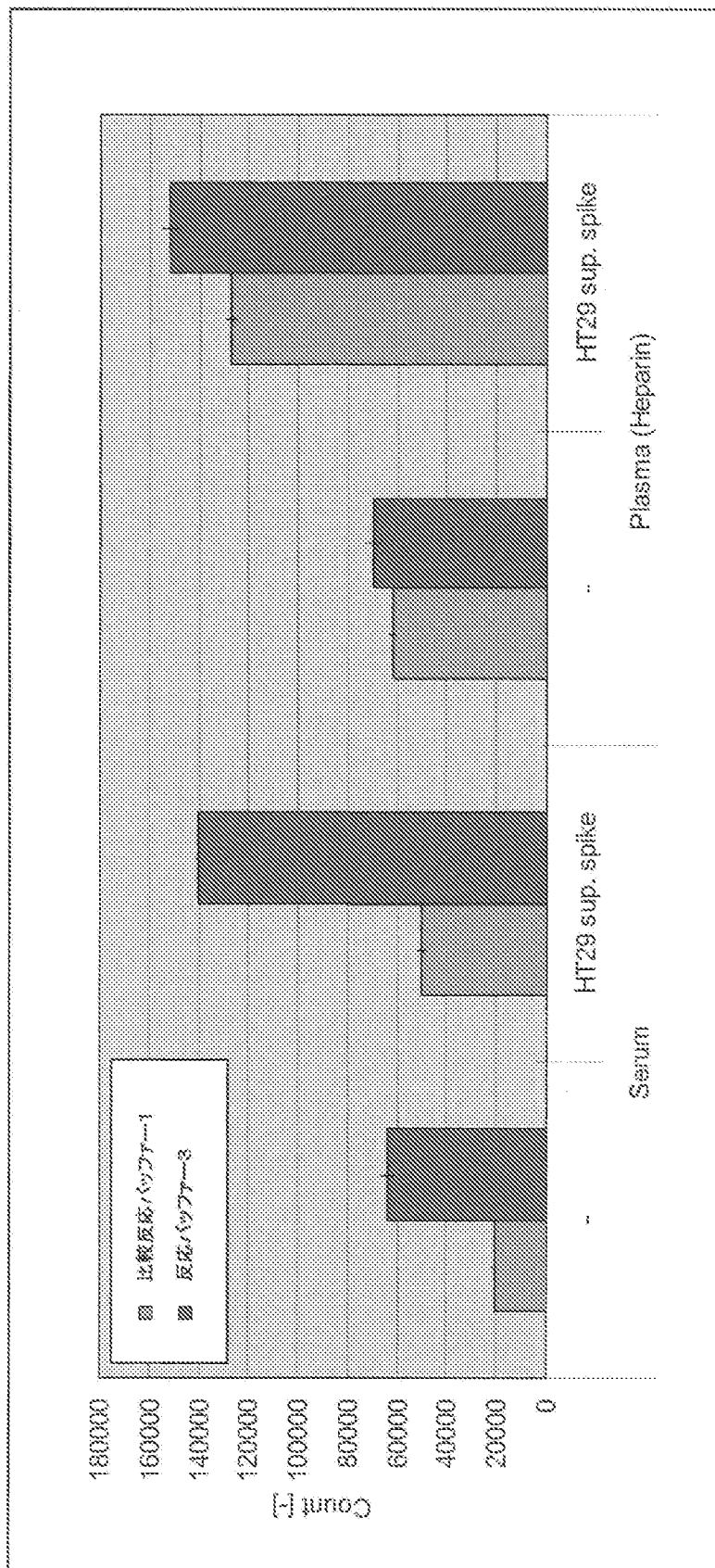
[図4]



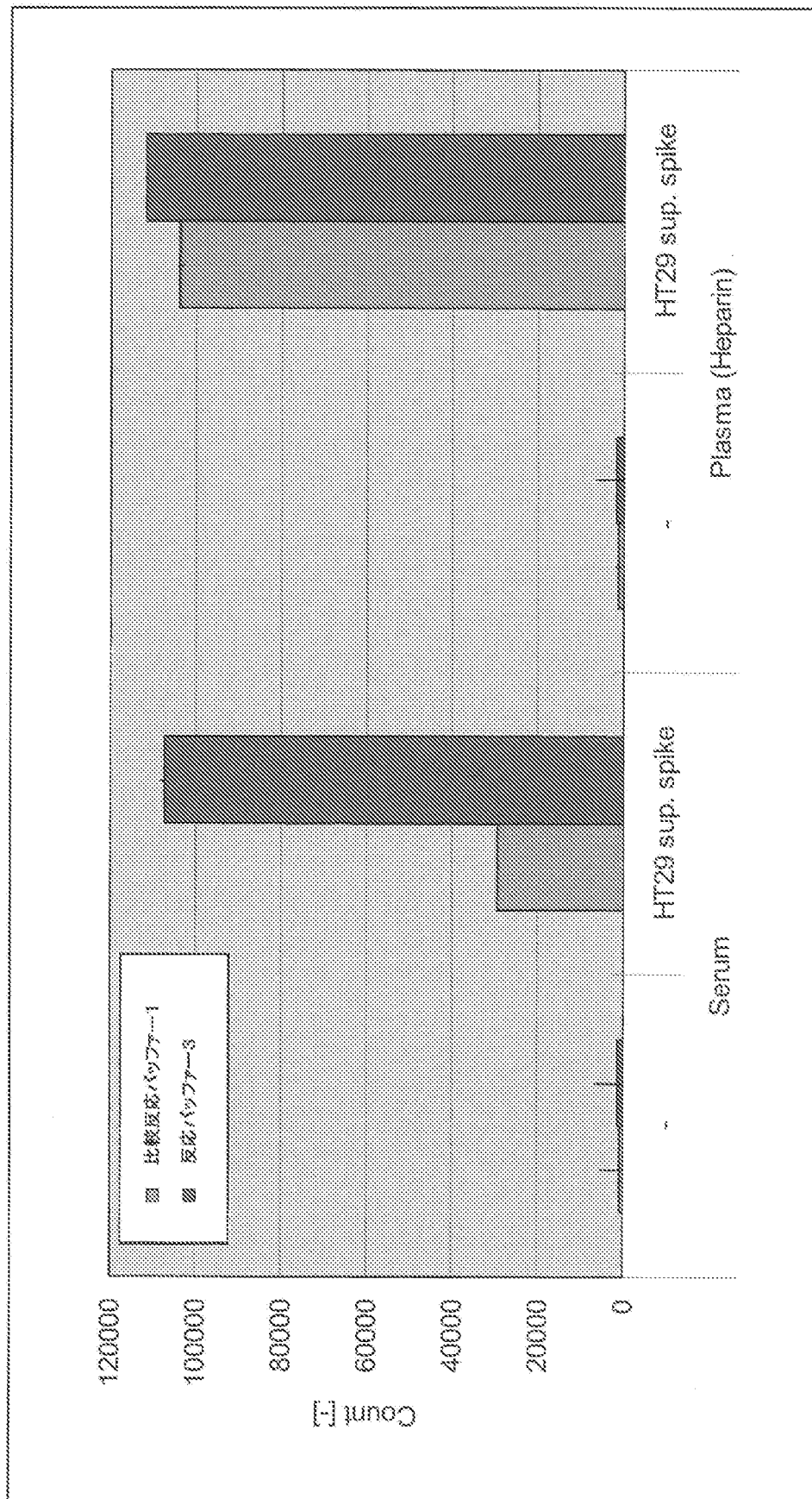
[図5-1]



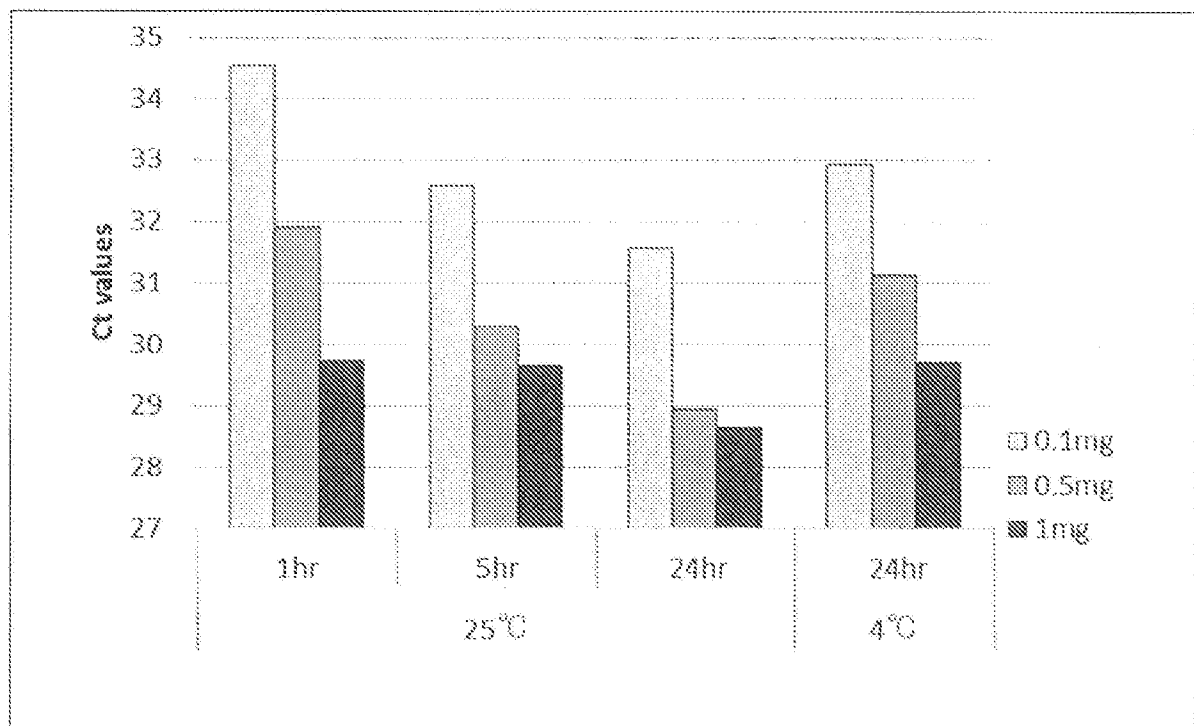
[図5-2]



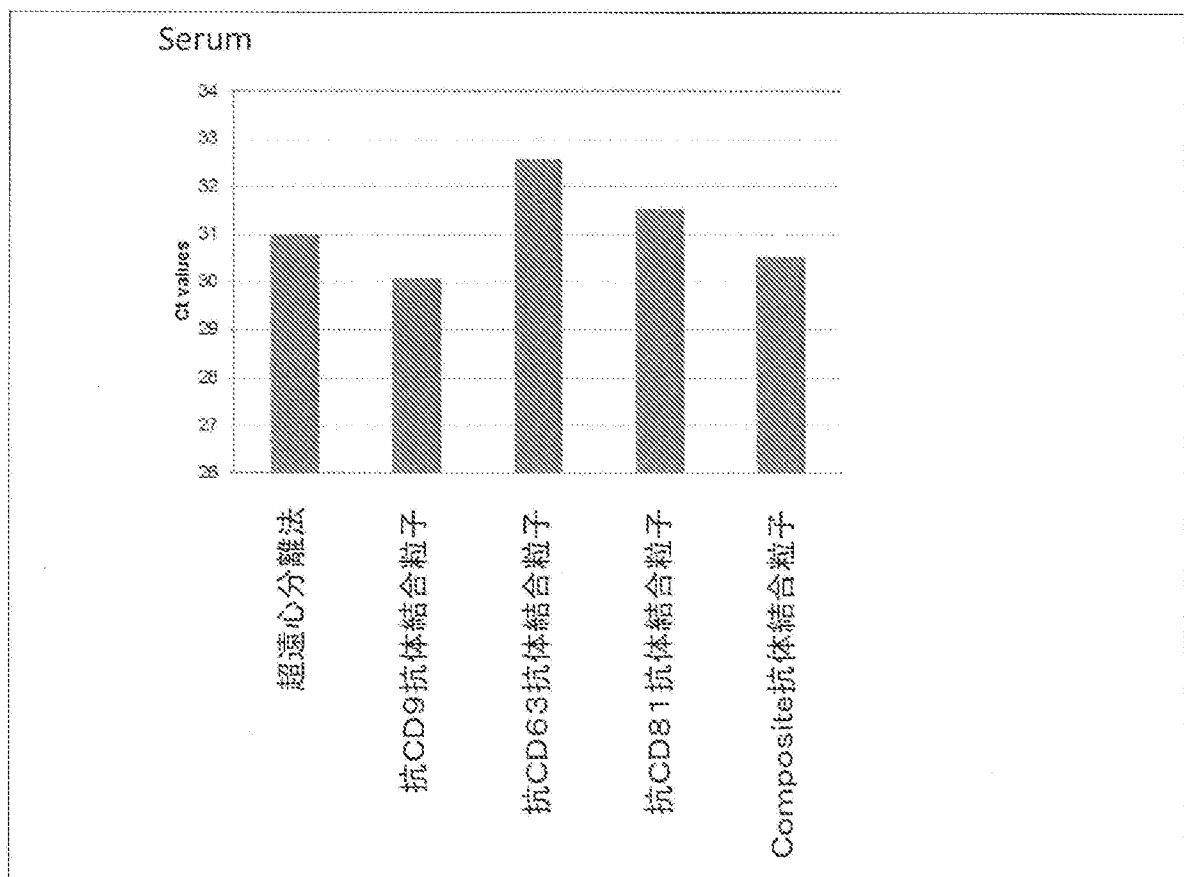
[図5-3]



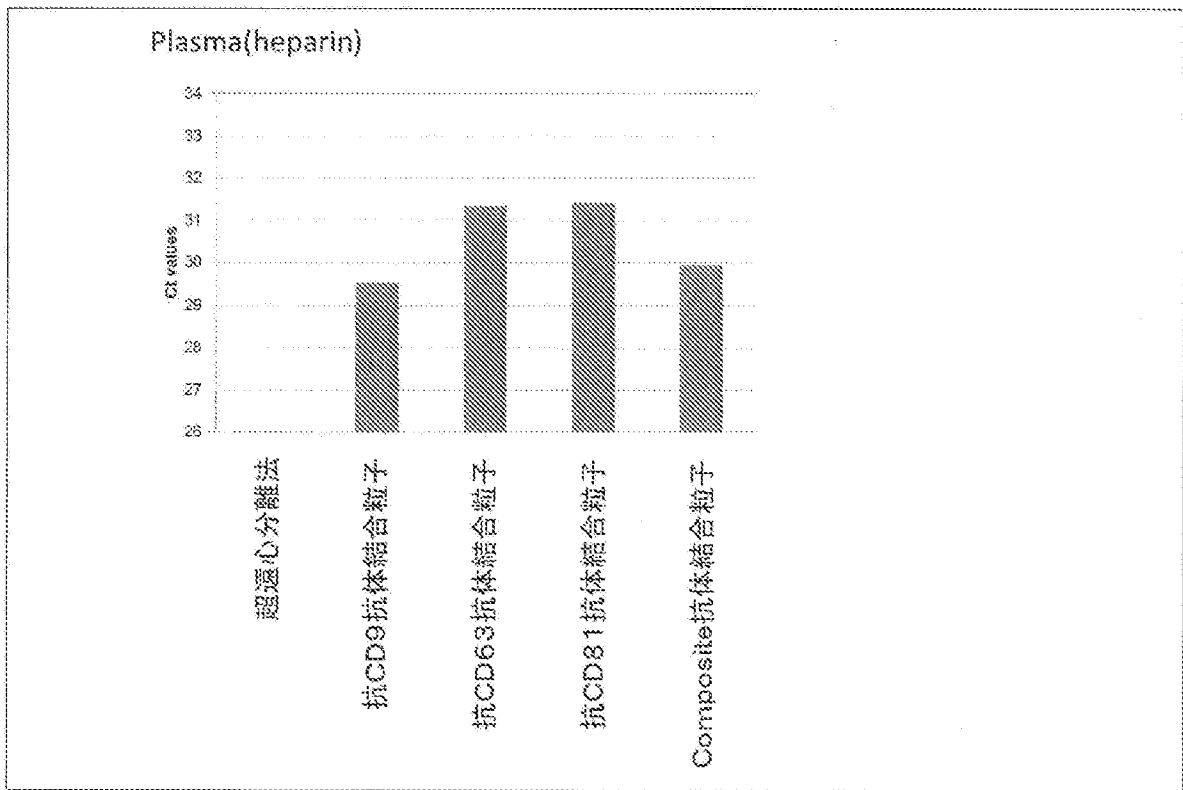
[図6]



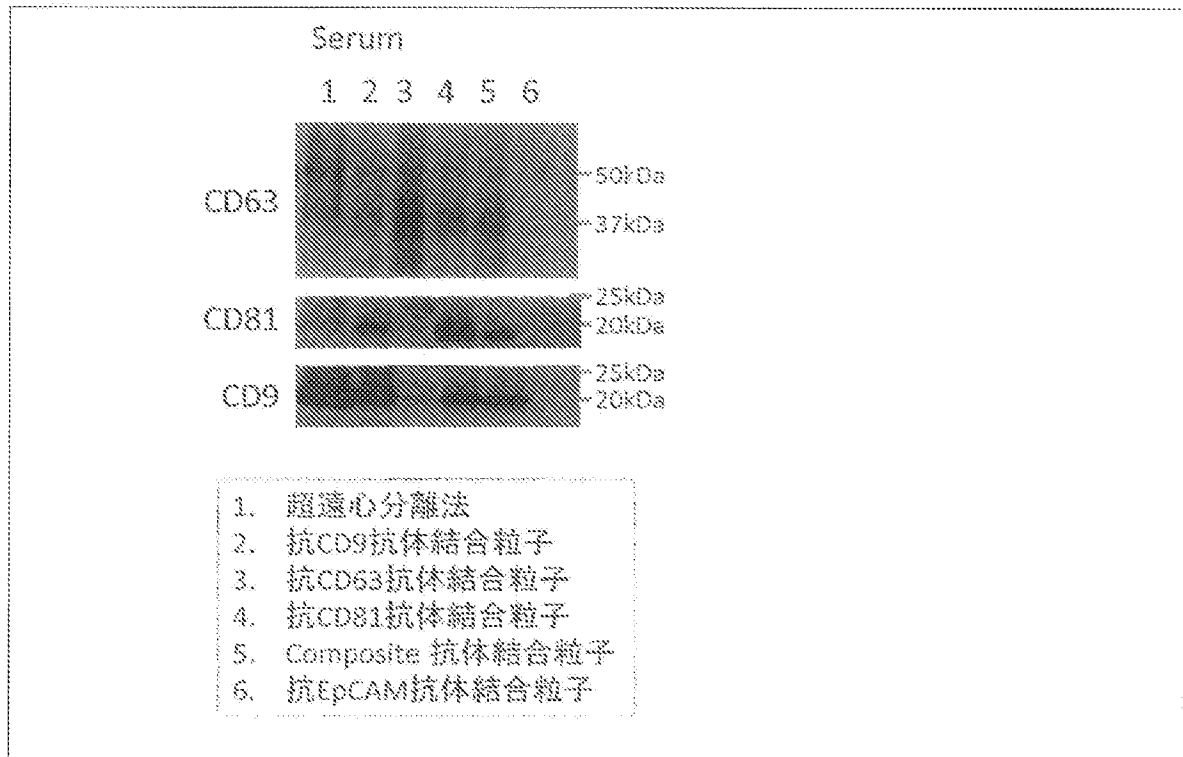
[図7-1]



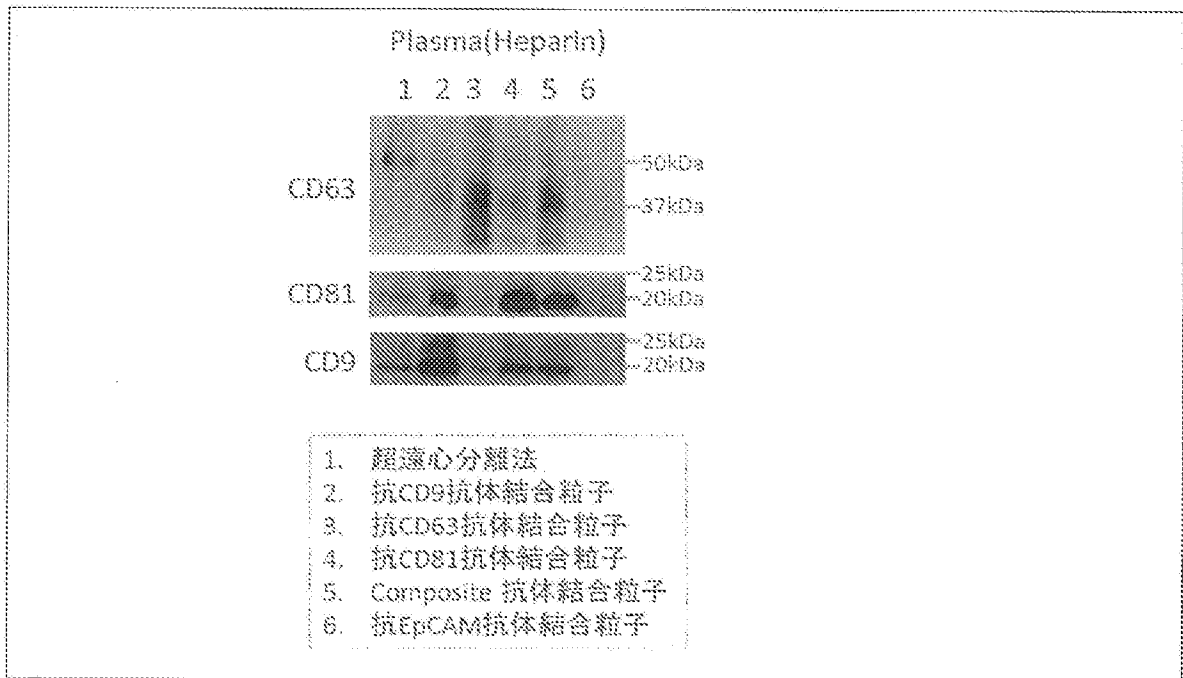
[図7-2]



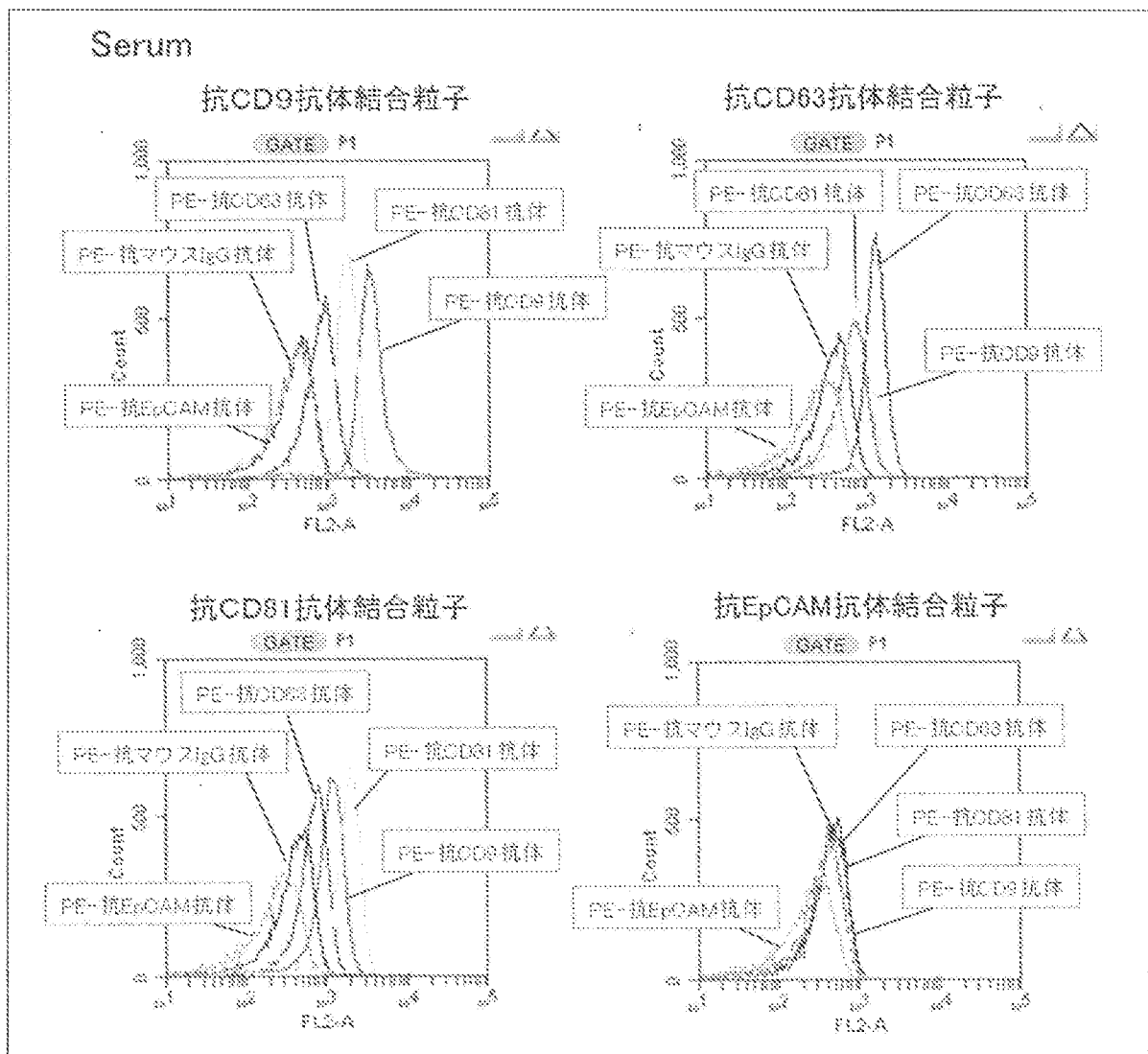
[図8-1]



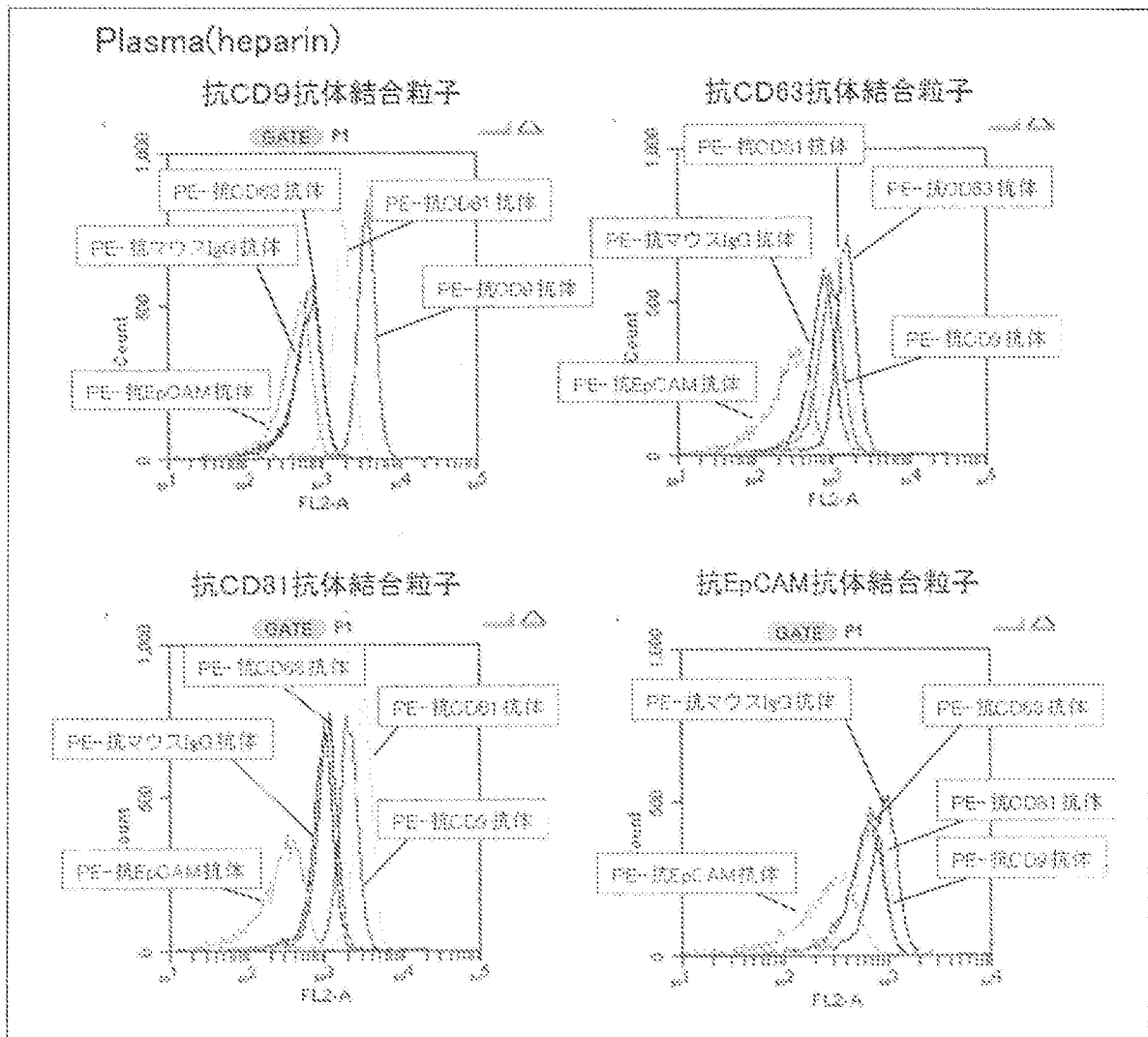
[図8-2]



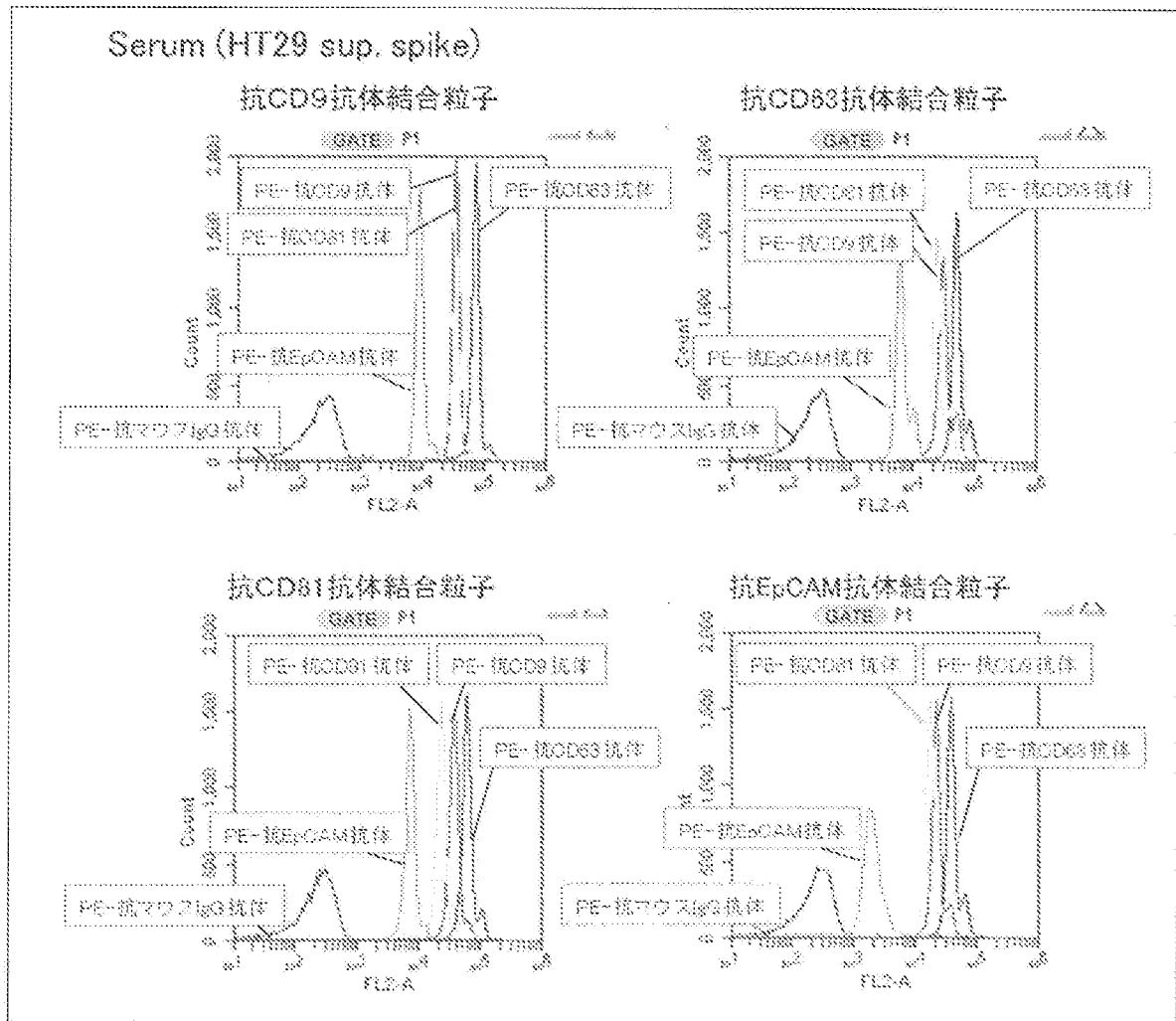
[図9-1]



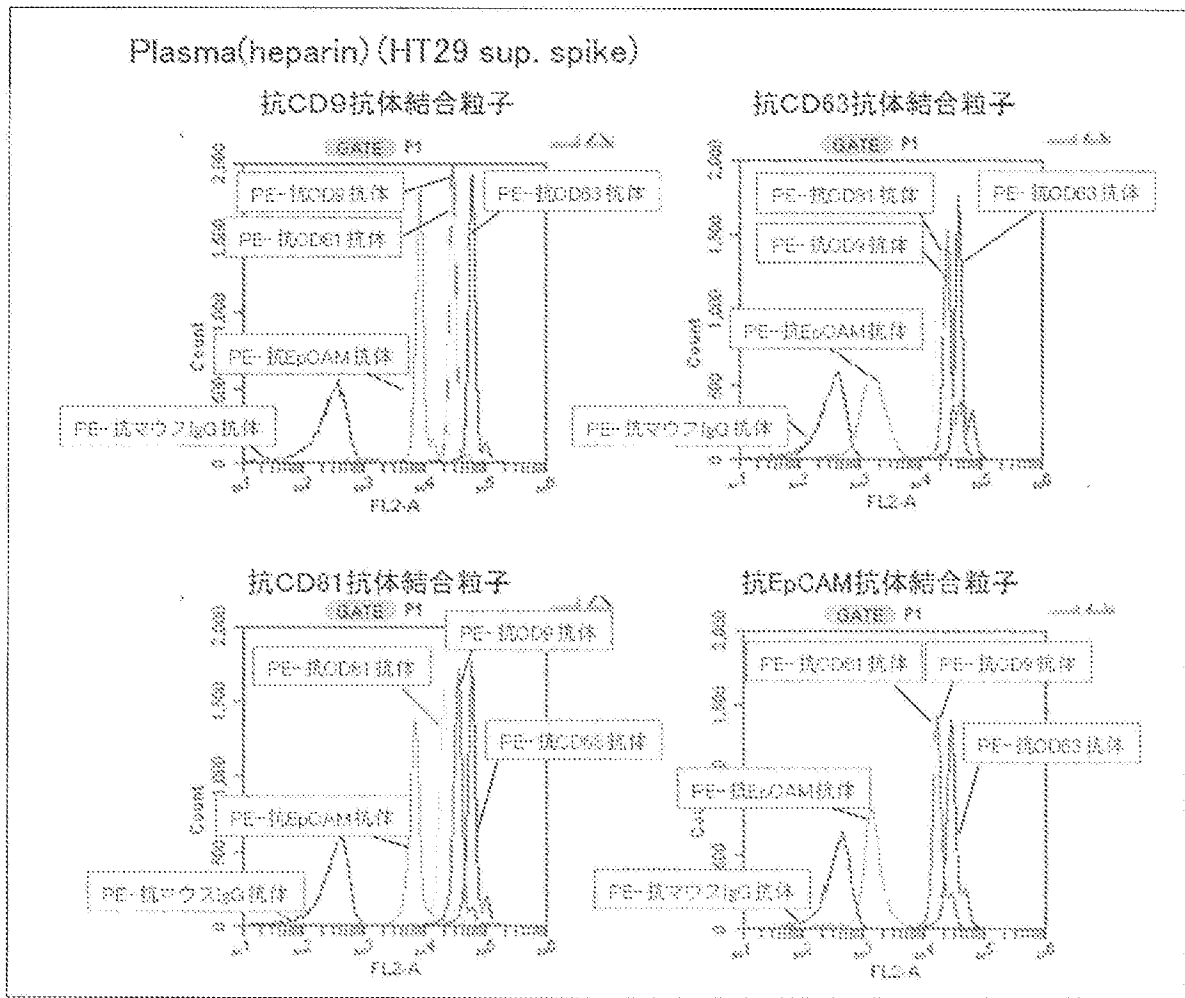
[図9-2]



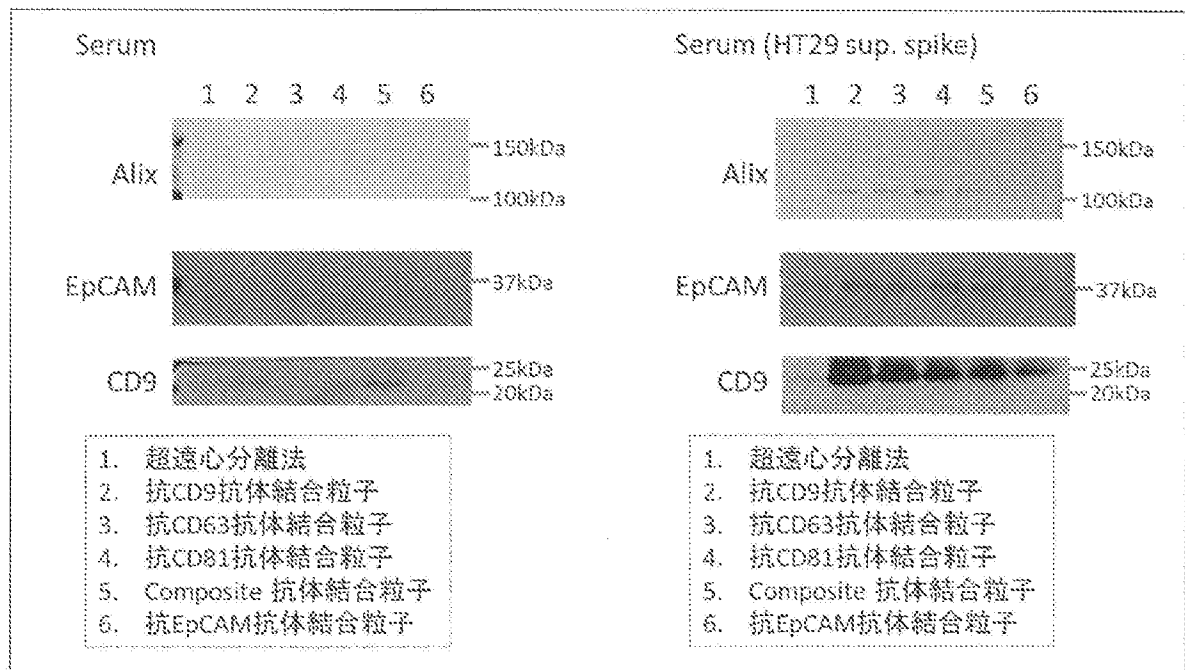
[図9-3]



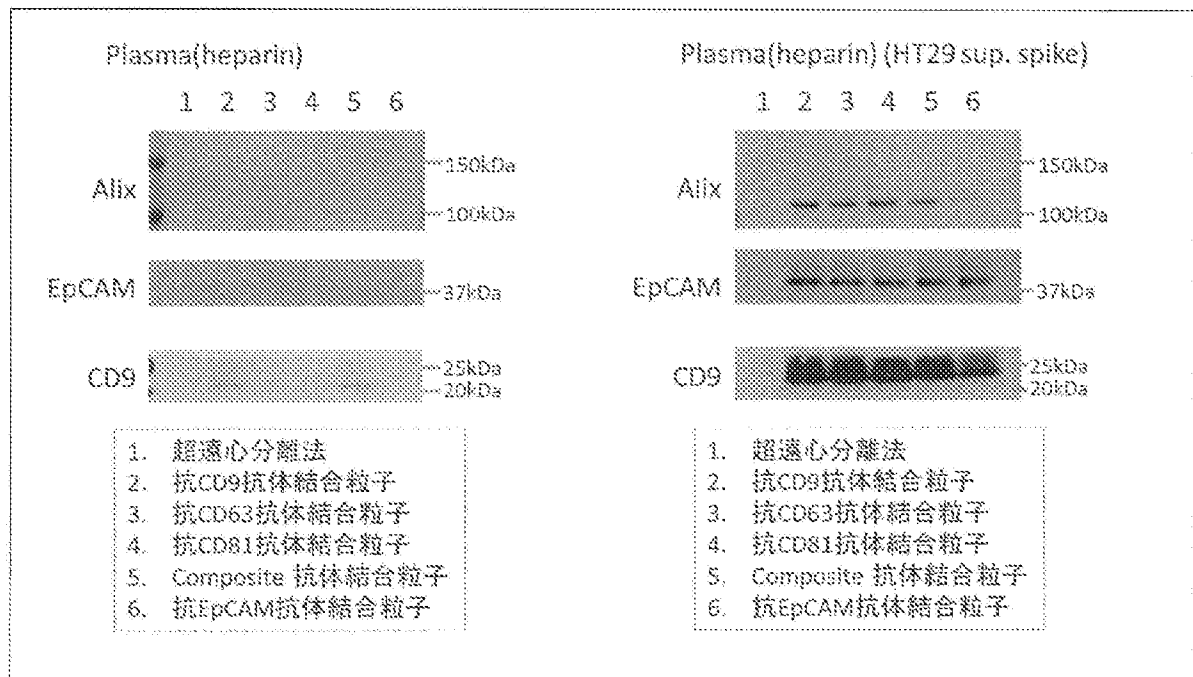
[図9-4]



[図10-1]



[図10-2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065104

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2014-522993 A (Caris Life Sciences Luxembourg Holdings S.a.r.l.), 08 September 2014 (08.09.2014), claims; paragraphs [0760] to [0764], [0960] to [0963] & WO 2013/022995 A2 claims; examples 30, 55 & US 2016/0041153 A1 & CN 103874770 A	1-23
A	WO 2011/052620 A1 (Kyowa Medex Co., Ltd.), 05 May 2011 (05.05.2011), paragraph [0043] & US 2012/0219966 A1 paragraph [0046] & EP 2495565 A1 & CN 102687015 A	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
04 August 2016 (04.08.16)

Date of mailing of the international search report
16 August 2016 (16.08.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/065104

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2014/068408 A2 (CARIS LIFE SCIENCES SWITZERLAND HOLDINGS, S.A.R.L.), 08 May 2014 (08.05.2014), claims; examples 8, 11 & JP 2016-506716 A & US 2015/0301058 A1	1-23
X	JP 2011-510309 A (Hansabiomed OU), 31 March 2011 (31.03.2011), claims; paragraphs [0019] to [0038] & WO 2009/092386 A2 claims; examples & US 2009/0220944 A1 & CN 102317778 A	1-9, 13-23
P, X	WO 2015/182580 A1 (National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition), 03 December 2015 (03.12.2015), example 4 (Family: none)	1-23

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, G01N33/68(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/543, C12Q1/68, G01N33/50, G01N33/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	JP 2014-522993 A (カリス ライフ サイエンシズ ルクセンブルク ホールディングス エス.アー. エール.エル.) 2014.09.08, 特許請求の範囲, [0760]-[0764], [0960]-[0963] & WO 2013/022995 A2, Claims, Example 30, Example 55 & US 2016/0041153 A1 & CN 103874770 A	1-23
A	WO 2011/052620 A1 (協和メデックス株式会社) 2011.05.05, [0043] & US 2012/0219966 A1, [0046] & EP 2495565 A1 & CN 102687015 A	1-23

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

04.08.2016

国際調査報告の発送日

16.08.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大瀧 真理

2 J

9812

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2014/068408 A2 (CARIS LIFE SCIENCES SWITZERLAND HOLDINGS, S. A. R. L.) 2014. 05. 08, Claims, Example 8, Example 11 & JP 2016-506716 A & US 2015/0301058 A1	1-23
X	JP 2011-510309 A (ハンサビオメド・オサウヒング) 2011. 03. 31, 特許請求の範囲, [0019]-[0038] & WO 2009/092386 A2, Claims, Examples & US 2009/0220944 A1 & CN 102317778 A	1-9, 13-23
P, X	WO 2015/182580 A1 (国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所) 2015. 12. 03, 実施例 4 (ファミリーなし)	1-23