(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
2025年1月9日(09.01.2025)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2025/009486 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/48 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/023680

(22) 国際出願日： 2024年6月28日(28.06.2024)

(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 2023-110882 2023年7月5日(05.07.2023) JP

(71) 出願人: 東ソー株式会社 (**TOSOH CORPORATION**) [JP/JP]; 〒7468501 山口県周南市開成町４５６０番地 Yamaguchi (JP).

(72) 発明者: 廣野 琳子(**HIRONO, Linko**); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 長坂 畑下 瑠依(**NAGASAKA HATASHITA, Rui**); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP). 松永 太一(**MATSUNAGA, Taichi**); 〒2521123 神奈川県綾瀬市早川２７４３番地１ 東ソー株式会社 東京研究センター内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人秀和特許事務所 (**IP FIRM SHUWA**); 〒1050001 東京都港区虎ノ門五丁目１１番２号 オランダヒルズ森タワー１４階 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (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, ME, 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：
一 国際調査報告（条約第21条(3)）

WO 2025/009486 A1

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING EXTRACELLULAR VESICLE

(54) 発明の名称： 細胞外小胞の検出方法

(57) **Abstract:** The present invention addresses the problem of providing a method for detecting, with high sensitivity, a target extracellular vesicle in a blood-derived sample. The problem is solved by removing a platelet-derived extracellular vesicle in a blood-derived sample or suppressing the generation of the platelet-derived extracellular vesicle in the blood-derived sample, before detecting a target extracellular vesicle in the blood-derived sample.

(57) 要約：血液由来試料中の標的細胞外小胞を高感度に検出する方法を提供することを課題とする。血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出前に、血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去すること、または血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制することにより、前記課題を解決する。

明　細　書

発明の名称 ： 細胞外小胞の検出方法

技術分野

[0001]　本発明は、血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出方法に関する。

背景技術

[0002]　がん患者の血液等の体液や培養腫瘍細胞の培養液には、腫瘍細胞由来のタンパク質が含まれている。腫瘍細胞由来のタンパク質は、例えば、血中循環腫瘍細胞（もしくは死細胞デブリス）の細胞内に局在する場合や、腫瘍細胞から細胞外に分泌された結果、血中に遊離タンパクとして存在する場合、および細胞外小胞内のタンパク質として存在する場合がある。これらのタンパク質を検出することによって、腫瘍の早期発見や治療後の患者の状態の予測などの情報を得ることができる。特に、細胞外小胞は、脂質二重膜で覆われたコロイド状の粒子であり、生体内の細胞間コミュニケーションの媒介役としての機能や、がん等の疾患や生理現象との関連性が近年報告されており、生理学的な機能の解明や疾患検査への応用に向けた研究が進められている。

[0003]　細胞外小胞を利用した疾患検査として、特許文献１には、血漿中に存在する、腫瘍細胞から放出された細胞外小胞表面に局在するタンパク質を、ＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ　Ｉｍｍｕｎｏ　Ｓｏｒｂｅｎｔ　Ａｓｓａｙ）法を用いて検出する方法を開示している。当該方法によれば、がん患者と健常ドナーとを判別できる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特表２０１１－５１０３０９号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　本発明の課題は、血液由来試料中の標的細胞外小胞を高感度に検出す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

[0006] 本発明者らは、血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出の際に、血小板由来細胞外小胞が測定値のバラつきの増大や非特異シグナル（バックグラウンド）の増大等の問題を引き起こすことを見出した。

[0007] 上記課題を解決するために、本発明者らは鋭意検討を重ねた結果、血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去すること、または血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制することにより、血液由来試料中の標的細胞外小胞を高感度に検出できることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] すなわち本発明は以下の通り例示できる。

［１］

血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出する方法であって、

前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程Ａ１または前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程Ａ２、および

前記血液由来試料中の前記標的細胞外小胞を検出する工程Ｂ

を含む、方法。

［２］

血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出感度を向上させる方法であって、

前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程Ａ１または前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程Ａ２

を含む、方法。

［３］

血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出するために血液由来試料を前処理する方法であって、

前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程Ａ１または前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程Ａ２

を含む、方法。

［４］

前記標的細胞外小胞が、血小板由来細胞外小胞以外の細胞外小胞である、前記（具体的には、［１］～［３］のいずれかに記載の）方法。

［５］

前記血小板由来細胞外小胞以外の細胞外小胞が、腫瘍細胞由来の細胞外小胞である、前記（具体的には、［４］に記載の）方法。

［６］

前記腫瘍細胞由来の細胞外小胞が、前立腺癌由来の細胞外小胞である、前記（具体的には、［５］に記載の）方法。

［７］

前記血液由来試料が、血漿または血清である、前記（具体的には、［１］～［３］のいずれかに記載の）方法。

［８］

前記工程Ａ１が、前記血小板由来細胞外小胞に特異的に結合する物質を用いて実施される、前記（具体的には、［１］～［７］のいずれかに記載の）方法。

［９］

前記物質が、前記血小板由来細胞外小胞に特異的に存在するマーカーに対する抗体である、前記（具体的には、［８］に記載の）方法。

［１０］

前記マーカーが、ＣＤ４１である、前記（具体的には、［９］に記載の）方法。

［１１］

前記工程Ａ２が、前記血液由来試料中の血小板を除去することにより実施される、前記（具体的には、［１］～［１０］のいずれかに記載の）方法。

［１２］

前記血小板の除去が、前記血液由来試料の調製時に遠心分離を２回以上実施することにより実施される、前記（具体的には、［１１］に記載の）方法。

［１３］

前記工程Ａ２が、前記血液由来試料を凍結しないことにより実施される、前記（具体的には、［１］～［１０］のいずれかに記載の）方法。

［１４］

前記工程Ｂが、免疫学的測定法により実施される、前記（具体的には、［１］および［４］～［１３］のいずれかに記載の）方法。

［１５］

前記工程Ｂが、前記標的細胞外小胞を担体に捕捉する工程Ｂ１と、捕捉された前記標的細胞外小胞を検出する工程Ｂ２を含む、前記（具体的には、［１］および［４］～［１４］のいずれかに記載の）方法。

［１６］

前記工程Ｂ１が、前記標的細胞外小胞に結合する第１の物質を用いて実施され、且つ

前記工程Ｂ２が、前記標的細胞外小胞に結合する第２の物質を用いて実施される、前記（具体的には、［１５］に記載の）方法。

［１７］

前記第１の物質が、前記標的細胞外小胞に存在する第１のマーカーに対する抗体であり、且つ

前記第２の物質が、前記標的細胞外小胞に存在する第２のマーカーに対する抗体である、前記（具体的には、［１６］に記載の）方法。

［１８］

前記第１のマーカーが、前記標的細胞外小胞に特異的に存在するマーカーである、前記（具体的には、［１７］に記載の）方法。

［１９］

前記第１のマーカーが、ＴＭ４ＳＦ１またはＣＤ８１である、前記（具体的には、［１７］または［１８］に記載の）方法。

［２０］

前記第２のマーカーが、ＣＤ９またはＣＤ８１である、前記（具体的には

、［１７］～［１９］のいずれかに記載の）方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、血液由来試料中の標的細胞外小胞を高感度に検出できる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ＰＣ－３由来細胞外小胞の検出結果を示す図（比較例３）。

[図2]ＰＣ－３由来細胞外小胞の検出結果を示す図（実施例６）。

[図3]ＰＣ－３由来細胞外小胞の検出結果を示す図（参考例１）。

[図4]ＰＣ－３由来細胞外小胞の検出結果を示す図（比較例４）。

[図5]ＰＣ－３由来細胞外小胞の検出結果を示す図（実施例７）。

[図6]ＰＣ－３由来細胞外小胞の検出結果を示す図（参考例２）。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。本明細書において、「癌」と「がん」は、代替可能に用いられてよい。

[0012] ＜１＞本発明の方法

本発明の方法は、血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程または血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程を含む方法である。本発明の方法は、さらに、血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出する工程を含んでいてよい。

[0013] 血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程を「除去工程」ともいう。血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程を「抑制工程」ともいう。本発明の方法においては、除去工程および抑制工程の一方または両方が実施されてよい。血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出する工程を「検出工程」ともいう。検出工程は、除去工程または抑制工程の後に実施される。「標的細胞外小胞」とは、検出対象である細胞外小胞を意味し、血小板由来細胞外小胞とは区別されるものとする。言い換えると、「標的細胞外小胞」とは、血液由来試料中に含有され得る、血小板由来細胞外小胞以外の細胞外小胞を意味する。標的細胞外小胞は、血小板由来細胞外小

胞以外の細胞外小胞から選択される特定の1種またはそれ以上の細胞外小胞であってもよいし、血小板由来細胞外小胞以外の全ての細胞外小胞であってもよい。特定の細胞外小胞としては、腫瘍細胞に由来する細胞外小胞が挙げられる。

[0014] 標的細胞外小胞の由来となり得る腫瘍細胞にかかる腫瘍の種類は、特に制限されず、悪性腫瘍と良性腫瘍を含んでよい。悪性腫瘍は、原発癌でもよく、転移癌であってもよい。腫瘍としては、造血細胞悪性腫瘍、頭頚部癌、脳腫瘍、乳癌、子宮体癌、子宮頚癌、卵巣癌、食道癌、胃癌、虫垂癌、大腸癌、肝癌、胆嚢癌、胆管癌、膵癌、腎癌、副腎癌、消化管間質腫瘍、中皮腫、甲状腺癌、肺癌、骨肉腫、骨癌、前立腺癌、精巣腫瘍、膀胱癌、皮膚癌、肛門癌が挙げられる。造血細胞悪性腫瘍としては、白血病、リンパ腫、多発性骨髄腫が挙げられる。リンパ腫としては、ホジキンリンパ腫や非ホジキンリンパ腫が挙げられる。頭頚部癌としては、口腔底癌、歯肉癌、舌癌、頬粘膜癌、唾液腺癌、副鼻腔癌が挙げられる。

[0015] 「細胞外小胞」とは、能動的または受動的であるかに関わらず細胞が放出した直径１ｎｍから１μｍの脂質で覆われた小胞を意味する。細胞外小胞としては、エクソソーム（ｅｘｏｓｏｍｅｓ）、マイクロベシクル（ｍｉｃｒｏｖｅｓｉｃｌｅｓ）、エクトソーム（ｅｃｔｏｓｏｍｅｓ）、メンブレンパーティクル（ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｐａｒｔｉｃｌｅｓ）、エクソソーム様小胞（ｅｘｏｓｏｍｅ　ｌｉｋｅ　ｖｅｓｉｃｌｅｓ）、アポトーシス小胞（ａｐｏｐｔｏｔｉｃ　ｖｅｓｉｃｌｅｓ）が挙げられる（Ｎａｔｕｒｅ　Ｒｅｖｉｅｗｓ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，９，５８１－５９３（２００９））。一般的に、細胞外小胞は、細胞膜とは異なる組成の脂質やタンパク質で構成されているが（Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，６５，７８３－７９７（２０１５））、放出元の細胞の特徴を反映したタンパク質等が細胞外小胞に局在する。例えば、放出元が腫瘍細胞である場合、当該細胞から放出される細胞外小胞の有無によって、がん患者と健常ドナーとを判別できる（特表２０１１－５１０３０９号公報）。

[0016] 除去工程または抑制工程の実施により、血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出感度を向上させることができる。すなわち、本発明の方法の一態様は、除去工程または抑制工程を含む、血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出感度を向上させる方法である。同方法を「本発明の検出感度向上方法」ともいう。除去工程または抑制工程の実施により、具体的には、検出工程を実施する際の血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出感度を向上させることができる。本発明の検出感度向上方法は、さらに、検出工程を含んでいてもよい。検出感度の向上としては、測定値のバラつきの低減や非特異シグナル（バックグラウンド）の低減が挙げられる。

[0017] 除去工程または抑制工程は、血液由来試料の前処理として実施できる。すなわち、本発明の方法の一態様は、除去工程または抑制工程を含む、血液由来試料を前処理する方法である。同方法を「本発明の前処理方法」ともいう。除去工程および抑制工程を総称して「前処理工程」ともいう。除去工程または抑制工程は、具体的には、検出工程を実施する際の血液由来試料の前処理として実施できる。すなわち、本発明の前処理方法は、具体的には、血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出するために血液由来試料を前処理する方法であってよい。除去工程または抑制工程は、具体的には、血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出感度を向上させるための前処理として実施できる。すなわち、本発明の前処理方法は、具体的には、血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出感度を向上させるために血液由来試料を前処理する方法であってよい。

[0018] 除去工程または抑制工程、および検出工程の実施により、血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出することができる。すなわち、本発明の方法の一態様は、除去工程または抑制工程、および検出工程を含む、血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出する方法である。同方法を「本発明の検出方法」ともいう。本発明の検出方法は、言い換えると、本発明の前処理方法により血液由来試料を前処理する工程、および検出工程を含む、血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出する方法でもある。除去工程または抑制工程、および検出

工程の実施により、具体的には、向上した検出感度で血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出することができる。

[0019] なお、「本発明の検出方法」、「本発明の検出感度向上方法」、「本発明の前処理方法」の方法はいずれも、通常はｉｎ ｖｉｔｒｏで実施される。

[0020] 血液由来試料は、標的細胞外小胞を含有し得るものであれば、特に制限されない。血液由来試料としては、全血、血清、血漿、それらの分画物が挙げられる。血液由来試料としては、特に、血清や血漿が挙げられる。血清や血漿等の血液由来試料は、例えば、除去工程または抑制工程の実施前に、クエン酸、ヘパリン、ＥＤＴＡ等の抗凝固剤で処理されていてもよい。

[0021] 血液由来試料は、被験体から取得されたものであってよい。被験体は、特に制限されない。被験体は、ヒトであってもよく、ヒト以外の動物であってもよい。ヒト以外の動物としては、マウス、ラット、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル、チンパンジー、鳥が挙げられる。被験体は、特に、ヒトであってよい。被験体は、例えば、癌への罹患が疑われる被験体であってよい。被験体は、例えば、癌の検査の対象となる被験体であってよい。

[0022] 除去工程の実施態様は、所望の程度に血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞が除去される限り、特に制限されない。除去工程は、例えば、血小板由来細胞外小胞に特異的に結合する物質を用いて実施されてよい。血小板由来細胞外小胞に特異的に結合する物質を「血小板由来細胞外小胞特異的結合物質」ともいう。「血小板由来細胞外小胞に特異的に結合する」とは、血小板由来細胞外小胞には結合するが、標的細胞外小胞には実質的に結合しないことを意味してよい。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質としては、血小板由来細胞外小胞の表面に特異的に存在するマーカーに結合する物質が挙げられる。血小板由来細胞外小胞の表面に特異的に存在するマーカーを「血小板由来細胞外小胞特異的マーカー」ともいう。「血小板由来細胞外小胞の表面に特異的に存在する」とは、血小板由来細胞外小胞の表面には存在するが、標的細胞外小胞の表面には実質的に存在しないことを意味してよい。血小板

由来細胞外小胞特異的マーカーとしては、血小板由来細胞外小胞の表面に特異的に存在するタンパク質が挙げられる。血小板由来細胞外小胞の表面に特異的に存在するタンパク質としては、ＣＤ４１、ＣＤ４２ａ、ＣＤ４２ｂ、ＣＤ６１、ＣＤ６２Ｐなどが挙げられる。血小板由来細胞外小胞の表面に特異的に存在するタンパク質としては、特に、ＣＤ４１が挙げられる。血小板由来細胞外小胞特異的マーカーに結合する物質としては、血小板由来細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体やアプタマーが挙げられる。血小板由来細胞外小胞特異的マーカーに結合する物質としては、特に、血小板由来細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体が挙げられる。血小板由来細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体としては、抗ＣＤ４１抗体、抗ＣＤ４２ａ抗体、抗ＣＤ４２ｂ抗体、抗ＣＤ６１抗体、抗ＣＤ６２Ｐ抗体などが挙げられる。血小板由来細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体としては、特に、抗ＣＤ４１抗体が挙げられる。抗体は、例えば、免疫グロブリンの全体であってもよく、免疫グロブリンの一部であってもよい。抗体としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｄＡｂ、相補性決定領域（ＣＤＲ）フラグメント、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）、単一ドメイン抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ダイアボディも挙げられる。抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、特に、モノクローナル抗体であってよい。

[0023] 除去工程は、具体的には、例えば、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞を結合させることにより実施されてよい。すなわち、除去工程は、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞を結合させる工程を含んでいてよい。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞の結合は、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞を接触させることにより実施できる。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞の結合は、具体的には、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血液由来試料（これは血小板由来細胞外小胞を含有し得る）を接触させることにより実施できる。血小板由来細胞

外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞の接触は、液体媒体中で実施することができる。液体媒体としては、水や水性緩衝液等の水性媒体や、ジメチルスルホキシド等の有機溶媒が挙げられる。例えば、液体媒体中で血液由来試料と血小板由来細胞外小胞特異的結合物質を混合することにより、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞を接触させることができる。また、例えば、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質が固相に結合しており、固相がカラムに充填されている場合、液体の形態で準備された血液由来試料をカラムに通液することにより、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞を接触させることができる。

[0024] 血小板由来細胞外小胞特異的結合物質は、担体に結合させて除去工程に利用されてよい。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質を担体に結合させることにより、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質を介して血小板由来細胞外小胞を担体に捕捉することができる。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と担体の結合は、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞の結合の実施順は、特に制限されない。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と担体の結合は、典型的には、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と血小板由来細胞外小胞の結合の前に実施されてよい。すなわち、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質は、典型的には、予め担体に結合した状態で血小板由来細胞外小胞との結合に用いられてよい。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と担体の結合様式は、特に制限されない。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と担体の結合は、共有結合であってもよく、非共有結合であってもよい。非共有結合としては、水素結合や疎水結合が挙げられる。血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と担体の結合は、特に、共有結合であってよい。担体としては、水に不溶性の担体が挙げられる。担体は、親水性であってもよく、疎水性であってもよい。担体として、具体的には、例えば、アガロース、デキストラン、キトサン、セルロース等の多糖類；ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリアクリロニトリル、スチレン－ジビニルベンゼン共重合体、ポリスチレン、アクリル酸エ

ステル、メタクリル酸エステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ４－フッ化エチレン、エチレン－酢酸ビニル共重合体、ポリアミド、ポリカーボネート、ポリフッ化ビニリデン、ポリビニルホルマール、ポリアリレート、ポリエーテルスルホン等の有機合成高分子；ガラス、活性炭、アルミナ、シリカ、ヒドロキシアパタイト等のセラミックス；酸化鉄、チタン、金等の金属が挙げられる。担体は、例えば、粒子、繊維、中空糸、膜、平板等のいずれの形状であってもよい。担体は、特に、粒子であってよい。粒子としては、磁性粒子が挙げられる。磁性粒子としては、磁性体を含有させて製造した粒子が挙げられる。

[0025] 血小板由来細胞外小胞を捕捉した担体を血液由来試料から分離することにより、血小板由来細胞外小胞を血液由来試料から除去することができる。すなわち、除去工程は、血小板由来細胞外小胞を捕捉した担体を血液由来試料から分離する工程を含んでいてよい。担体と血液由来試料の分離は、例えば、通常の固液分離手段により実施できる。固液分離手段は、例えば、担体の形状等の諸条件に応じて適宜選択できる。例えば、血液由来試料を含有する液体中に血小板由来細胞外小胞を捕捉した担体が分散している場合、同液体を遠心分離、磁気分離、または濾過に供することにより、担体を血液由来試料と分離することができる。具体的には、例えば、担体が抗体固定化磁性粒子の場合、血液由来試料と抗体固定化磁性粒子を混合して血小板由来細胞外小胞を担体に捕捉させた後に、磁石を用いて血小板由来細胞外小胞を捕捉した抗体固定化磁性粒子を除去することにより、担体（すなわち血小板由来細胞外小胞を捕捉した抗体固定化磁性粒子）を血液由来試料と分離することができる。すなわち、血液由来試料は、非吸着画分（すなわち上清）として回収できる。また、例えば、担体がカラムに充填されている場合、血液由来試料をカラムに通液して血小板由来細胞外小胞を担体に捕捉させた後に血液由来試料をカラムから排出することにより、担体を血液由来試料と分離することができる。すなわち、血液由来試料は、非吸着画分としてカラムから回収できる。

[0026] 抑制工程の実施態様は、所望の程度に血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生が抑制される限り、特に制限されない。血小板由来細胞外小胞は、血液由来試料中に含有される血小板から発生し得る。よって、抑制工程は、血液由来試料から血小板を除去することにより達成できる。血液由来試料からの血小板の除去は、例えば、血液由来試料（特に、血漿）の調製の際に遠心分離を２回以上実施することにより実施されてよい。遠心分離の条件は、血小板と標的細胞外小胞とを分離できる条件であれば、特に制限されない。遠心分離の条件は、例えば、血漿の調製に利用される通常の遠心分離の条件であってよい。血小板由来細胞外小胞は、血小板を含有する血液由来試料を凍結した際に発生し得る。よって、抑制工程は、例えば、血液由来試料を凍結しないことにより実施されてよい。言い換えると、「本発明の方法が抑制工程を含み、抑制工程が血液由来試料を凍結しないことにより実施される」とは、本発明の方法が血液由来試料を凍結する工程を含まないことを意味してよい。

[0027] 検出工程の実施態様は、所望の程度に標的細胞外小胞を検出できる限り、特に制限されない。標的細胞外小胞の検出は、定性的な検出（例えば、標的細胞外小胞の有無の検出）であってもよく、定量的な検出（例えば、標的細胞外小胞の存在量の検出）であってもよい。標的細胞外小胞の検出は、特に、定量的な検出であってよい。標的細胞外小胞の検出方法は、所望の検出感度等の諸条件に応じて、適宜選択できる。「標的細胞外小胞の測定」と「標的細胞外小胞の検出」は、代替可能に用いられてよい。検出工程は、除去工程または抑制工程の後に実施される。

[0028] 検出工程は、例えば、標的細胞外小胞に結合する物質を用いて実施されてよい。標的細胞外小胞に結合する物質を「標的細胞外小胞結合物質」ともいう。標的細胞外小胞特異的結合物質としては、標的細胞外小胞の表面に存在するマーカーに結合する物質が挙げられる。標的細胞外小胞の表面に存在するマーカーを「標的細胞外小胞マーカー」ともいう。標的細胞外小胞結合物質は、好ましくは、標的細胞外小胞に特異的に結合する物質であってよい。

標的細胞外小胞に特異的に結合する物質を「標的細胞外小胞特異的結合物質」ともいう。「標的細胞外小胞に特異的に結合する」とは、標的細胞外小胞には結合するが、血小板由来細胞外小胞には実質的に結合しないことを意味してよい。標的細胞外小胞特異的結合物質としては、標的細胞外小胞の表面に特異的に存在するマーカーに結合する物質が挙げられる。標的細胞外小胞の表面に特異的に存在するマーカーを「標的細胞外小胞特異的マーカー」ともいう。「標的細胞外小胞の表面に特異的に存在する」とは、標的細胞外小胞の表面には存在するが、血小板由来細胞外小胞の表面には実質的に存在しないことを意味してよい。

[0029] 標的細胞外小胞マーカーとしては、標的細胞外小胞の表面に存在するタンパク質や脂質が挙げられる。標的細胞外小胞の表面に存在するタンパク質としては、ＴＭ４ＳＦ１、ＣＤ９、ＣＤ６３、ＣＤ８１等のテトラスパニン；ＭＨＣ（Ｍａｊｏｒ Ｈｉｓｔｏｃｏｍｐａｔｉｂｉｌｉｔｙ Ｃｏｍｐｌｅｘ）Ｉ、ＭＨＣＩＩ等の抗原提示関連タンパク質；インテグリン、カドヘリン、ＩＣＡＭ－１（ＩｎｔｅｒＣｅｌｌｕｌａｒ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ １）、ＥｐＣＡＭ（Ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ Ｃｅｌｌ Ａｄｈｅｓｉｏｎ Ｍｏｌｅｃｕｌｅ）等の接着分子；ＥＧＦＲ（Ｅｐｉｄｅｒｍａｌ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒ）ｖＩＩＩ、ＴＧＦ（Ｔｒａｎｓｆｏｒｍｉｎｇ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒ）－β等のサイトカインまたは増殖因子；サイトカインまたは増殖因子の受容体；酵素が挙げられる。標的細胞外小胞の表面に存在する脂質としては、ホスファチジルセリン（ＰＳ）やスフィンゴミエリンが挙げられる。標的細胞外小胞特異的マーカーとしては、ＴＭ４ＳＦ１やＣＤ８１が挙げられる。

[0030] 標的細胞外小胞マーカーに結合する物質としては、標的細胞外小胞マーカーに対する抗体やアプタマー（ペプチドアプタマーや核酸アプタマー）が挙げられる。抗体は、例えば、免疫グロブリンの全体であってもよく、免疫グロブリンの一部であってもよい。抗体としては、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆｖ、ｄＡｂ、相補性決定領域（ＣＤＲ）フラグメント、一本鎖

抗体（ｓｃＦｖ）、単一ドメイン抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ダイアボディも挙げられる。標的細胞外小胞マーカーに結合する物質としては、特に、標的細胞外小胞マーカーに対する抗体が挙げられる。すなわち、検出工程は、特に、免疫学的測定法（Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ；すなわち、抗体を利用した測定法）により実施されてよい。標的細胞外小胞マーカーに結合する物質としては、さらに特には、標的細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体が挙げられる。標的細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体としては、抗ＴＭ４ＳＦ１抗体や抗ＣＤ８１抗体が挙げられる。抗体は、モノクローナル抗体であってもよく、ポリクローナル抗体であってもよい。抗体は、特に、モノクローナル抗体であってよい。抗体やアプタマーは、いずれも、適宜、標識物質で修飾されていてよい。標識物質としては、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フィコエリスリン（ＰＥ）、Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ（商品名）等の蛍光物質；ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等の酵素；放射性物質が挙げられる。抗体またはアプタマーと標識物質との結合態様は、特に制限されない。抗体またはアプタマーは標識物質と直接結合していてもよく、そうでなくてもよい。例えば、抗体は、標識物質と化学結合等により直接結合していてもよく、標識物質と結合した二次抗体（標識二次抗体）と結合することによって間接的に標識物質と結合していてもよい。免疫学的測定法としては、ＥＩＡ（Ｅｎｚｙｍｅ　Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）法やウェスタンブロット法が挙げられる。ＥＩＡ法としては、ＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ　ＩｍｍｕｎｏＳｏｒｂｅｎｔ　Ａｓｓａｙ）法、ＣＬＥＩＡ（Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ　Ｅｎｚｙｍｅ　Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）法、ＦＥＩＡ（Ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　Ｅｎｚｙｍｅ　Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙ）法が挙げられる。検出工程においては、適宜、検出基質を利用してよい。検出基質としては、比色基質、蛍光基質、発光基質が挙げられる。検出基質としては、特に、発光基質が挙げられる。発光基質としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ等の酵素反応により発光を生じる基

質が挙げられる。すなわち、例えば、発光基質に対応した酵素を標識物質として用い、発光基質と反応させることにより発光が生じ得る。標的細胞外小胞は、手動で検出してもよく、測定装置を用いて自動的に検出してもよい。測定装置としては、ＡＩＡ－９００（東ソー）等のエンザイムイムノアッセイ装置やＡＩＡ－ＣＬ２４００（東ソー）等の化学発光酵素免疫測定装置が挙げられる。

[0031] 検出工程においては、例えば、標的細胞外小胞を回収し、回収した標的細胞外小胞を検出してもよい。すなわち、検出工程は、例えば、標的細胞外小胞を担体に回収する工程と、回収した標的細胞外小胞を検出する工程を含んでいてもよい。標的細胞外小胞の回収方法としては、超遠心法、沈降法、サイズ排除クロマトグラフィー法、アフィニティー法、ポリマー沈殿法が挙げられる。標的細胞外小胞の回収方法としては、特に、アフィニティー法が挙げられる。標的細胞外小胞の回収は、具体的には、標的細胞外小胞を担体に捕捉させることにより実施してよい。すなわち、検出工程は、具体的には、例えば、標的細胞外小胞を担体に捕捉する工程と、捕捉された標的細胞外小胞を検出する工程を含んでいてよい。例えば、アフィニティー法により標的細胞外小胞を担体に捕捉させることができる。具体的には、例えば、アフィニティー法により標的細胞外小胞結合物質を介して標的細胞外小胞を担体に捕捉させることができる。担体への標的細胞外小胞の捕捉については、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質に代えて標的細胞外小胞結合物質を用いること以外は、上述した、担体への血小板由来細胞外小胞の捕捉と同様に実施することができる。すなわち、例えば、担体については、担体への血小板由来細胞外小胞の捕捉の説明で上述した通りである。また、担体として、具体的には、磁性粒子やマイクロプレートが挙げられる。担体は、例えば、磁性粒子であってよい。標的細胞外小胞を担体に捕捉する工程は、例えば、標的細胞外小胞に結合する第１の物質を用いて実施されてよい。捕捉された標的細胞外小胞を検出する工程は、例えば、標的細胞外小胞に結合する第２の物質を用いて実施されてよい。第１の物質および第２の物質は、いずれも、標

的細胞外小胞結合物質である。第１の物質および第２の物質は、いずれも、例えば、標的細胞外小胞マーカーに対する抗体であってよい。すなわち、第１の物質は、標的細胞外小胞に存在する第１のマーカーに対する抗体（第１の抗体ともいう）であってよい。第２の物質は、標的細胞外小胞に存在する第２のマーカーに対する抗体（第２の抗体ともいう）であってよい。第１の抗体および第２の抗体は、例えば、それぞれ異なる標的細胞外小胞マーカーに対する抗体であってよい。例えば、第１の抗体および第２の抗体を用いて、サンドイッチＣＬＥＩＡ法等のサンドイッチＥＩＡ法を実施することができる。第１の物質および第２の物質の一方または両方は、標的細胞外小胞特異的結合物質（例えば、標的細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体）であってよい。言い換えると、第１のマーカーおよび第２のマーカーの一方または両方は、標的細胞外小胞特異的マーカーであってよい。例えば、少なくとも、第１の物質が標的細胞外小胞特異的結合物質（例えば、標的細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体）であってよく、さらに、第２の物質が標的細胞外小胞特異的結合物質（例えば、標的細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体）であってもよい。言い換えると、少なくとも、第１のマーカーが標的細胞外小胞特異的マーカーであってよく、さらに、第２のマーカーが標的細胞外小胞特異的マーカーであってもよい。また、例えば、少なくとも、第２の物質が標的細胞外小胞特異的結合物質（例えば、標的細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体）であってよく、さらに、第１の物質が標的細胞外小胞特異的結合物質（例えば、標的細胞外小胞特異的マーカーに対する抗体）であってもよい。言い換えると、少なくとも、第２のマーカーが標的細胞外小胞特異的マーカーであってよく、さらに、第１のマーカーが標的細胞外小胞特異的マーカーであってもよい。第１のマーカーは、例えば、特に、ＴＭ４ＳＦ１やＣＤ８１等の標的細胞外小胞特異的マーカーであってよい。第２のマーカーは、例えば、特に、ＣＤ９またはＣＤ８１であってよい。

[0032] 標的細胞外小胞の検出結果の用途は、特に制限されない。

[0033] 例えば、標的細胞外小胞が癌細胞に由来する細胞外小胞である場合、標的

細胞外小胞の検出結果を利用して癌を検査することができる。具体的には、血液由来試料が被験体から得られたものであり、且つ標的細胞外小胞が癌細胞に由来する細胞外小胞である場合、標的細胞外小胞の検出結果を利用して被験体における癌を検査することができる。被験体における癌の検査としては、被験体が癌に罹患しているかの検査、被験体が癌に罹患している可能性の有無または程度の検査、被験体が癌に罹患している場合の癌の進行度（例えばステージ）の検査が挙げられる。「癌の検査」は、「癌の診断」と読み替えてもよい。

[0034] ＜２＞本発明のキット

本発明のキットの一態様は、血液由来試料の前処理用のキットである。同キットを「本発明の前処理キット」ともいう。血液由来試料の前処理については、本発明の方法で上述した通りである。

[0035] 本発明のキットの一態様は、血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出用のキットである。同キットを「本発明の検出キット」ともいう。血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出については、本発明の方法で上述した通りである。

[0036] 本発明のキットは、例えば、本発明の方法で用いられる試薬を含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、本発明の方法で用いられる実験器具を含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、本発明のキットについての説明書を含んでいてよい。

[0037] 本発明のキットは、例えば、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質を含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と結合するための担体を含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、予め結合した血小板由来細胞外小胞特異的結合物質と担体を含んでいてもよい。

[0038] 本発明のキットは、例えば、標的細胞外小胞結合物質を含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、第１の物質および／または第２の物質を含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、第１の物質と結合するための担体を

含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、予め結合した第１の物質と担体を含んでいてもよい。本発明のキットは、例えば、標的細胞外小胞結合物質（例えば第２の物質）を標識するための標識物質を含んでいてよい。本発明のキットは、例えば、予め結合した標的細胞外小胞結合物質（例えば第２の物質）と標識物質を含んでいてもよい。本発明のキットは、例えば、検出基質を含んでいてよい。

[0039] 本発明のキットは、例えば、本発明の方法を実施するために利用することができる。

実施例

[0040] 以下、実施例を用いて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。なお、「実施例」、「比較例」、および「参考例」の用語は相対的なものであり、必ずしも本発明に該当するか否かを示すものではない。

[0041] 実施例１　抗体固定化磁性粒子の作製

（１）表面にカルボキシ基を有した磁性粒子溶液（Ｍａｇｎｏｓｐｈｅｒｅ　ＭＳ３００／Ｃａｒｂｏｘｙｌ、１．０％（ｗ／ｖ）スラリー、ＪＳＲライフサイエンス社製）４００μＬに０．０１Ｍ　ＭＥＳ（２－Ｍｏｒｐｈｏｌｉｎｏｅｔｈａｎｅｓｕｌｆｏｎｉｃ　ａｃｉｄ）緩衝液（ｐＨ６．０）（以下、「緩衝液Ａ」と表記する）６００μＬを添加した。

[0042] （２）（１）で得られた磁性粒子懸濁液を磁石に近接後１分放置し、上清を除去後、緩衝液Ａを１ｍＬ添加して磁性粒子を再懸濁する洗浄操作を２回行なった。洗浄後の磁性粒子は４５０μＬの緩衝液Ａに再懸濁した。

[0043] （３）（２）で得られた磁性粒子懸濁液に、１０ｍｇ／ｍＬ　ＥＤＣ（１－（３－ジメチルアミノプロピル）－３－エチルカルボジイミド塩酸塩）を含む緩衝液Ａを５０μＬ添加し、３７℃で１時間振とうすることで磁性粒子表面のカルボキシ基にＥＤＣを結合させた。当該操作により、磁性粒子表面のカルボン酸とタンパク質などが有するアミノ基とがＥＤＣを介して共有結合できる。

[0044] （４）（３）で得られたＥＤＣ結合磁性粒子を緩衝液Ａ１ｍＬで１回洗浄し、緩衝液Ａ１８０μＬに再懸濁後、以下［ａ］～［ｃ］に示すいずれかのタンパク質を含む溶液２０μＬを添加し、３７℃で３時間振とうすることでＥＤＣを介してタンパク質と磁性粒子とを共有結合させた（すなわち磁性粒子にタンパク質を固定化させた）。固定化後は、０．４Ｍ塩化ナトリウムを含む緩衝液Ａ１ｍＬで１回洗浄した。

［ａ］１ｍｇ／ｍＬ抗ヒトＴＭ４ＳＦ１抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ社製）を含む緩衝液Ａ

［ｂ］０．５ｍｇ／ｍＬ抗ヒトＣＤ４１抗体（ＢｉｏＬｅｇｅｎｄ社製）を含む緩衝液Ａ

［ｃ］１ｍｇ／ｍＬマウスＩｇＧ（富士フイルム和光純薬社製）を含む緩衝液Ａ

[0045] （５）（４）で得られたタンパク質固定化磁性粒子を、０．９％（ｗ／ｖ）Ｂｌｏｃｋｍａｓｔｅｒ　ＣＥ２１０（タンパク質低吸着ポリマー、ＪＳＲライフサイエンス社製）を含む緩衝液Ａ１ｍＬで２回洗浄し、緩衝液Ａ５００μＬで再懸濁後、３７℃で一晩（１７時間から２４時間）振とうすることでブロッキングを行なった。

[0046] （６）ブロッキング終了後、０．２％（ｗ／ｖ）Ｂｌｏｃｋｍａｓｔｅｒ　ＣＥ２１０を含む０．１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ緩衝液（ｐＨ８．０）１ｍＬで１回洗浄後、緩衝液Ａ２００μＬで再懸濁することにより、抗ＴＭ４ＳＦ１抗体固定化磁性粒子、抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子およびコントロールとしてマウスＩｇＧ固定化磁性粒子を得た。

[0047] 実施例２　ビオチン化修飾抗体の作製

（１）以下［ｄ］および［ｅ］に示すいずれかの抗体を含む溶液２００μＬをフィルトレーションチューブ（同人化学研究所社製）に添加し、８，０００×ｇで１０分間、室温で遠心分離し、フィルター上に抗体を固定化した。

［ｄ］１ｍｇ／ｍＬ抗ヒトＣＤ９抗体（フロンティア研究所社製）

［ｅ］１ｍｇ／ｍＬ抗ヒトＣＤ８１抗体（フロンティア研究所社製）

[0048] （２）Ｒｅａｃｔｉｏｎ　Ｂｕｆｆｅｒ（同人化学研究所社製）１００μＬをフィルターチューブに添加した。さらにジメチルスルホキシド１０μＬに懸濁したＮＨ２－Ｒｅａｃｔｉｖｅ　Ｂｉｏｔｉｎ（同人化学研究所社製）をフィルターチューブに添加し、懸濁後、３７℃で１０分間インキュベーションすることにより抗体のビオチン修飾を行った。

[0049] （３）ＷＳ　Ｂｕｆｆｅｒ（同人化学研究所社製）１００μＬをフィルターチューブに添加し、８，０００×ｇで１０分間、室温で遠心分離した後、フロースルーを除去した。

[0050] （４）ＷＳ　Ｂｕｆｆｅｒ（同人化学研究所社製）２００μＬをフィルターチューブに添加し、８，０００×ｇで１０分間、室温で遠心分離した後、フロースルーを除去した。

[0051] （５）（４）を繰り返し行った。

[0052] （６）ＷＳ　Ｂｕｆｆｅｒ（同人化学研究所社製）２００μＬをフィルターチューブに添加し、懸濁することによりビオチン修飾抗ＣＤ９抗体溶液およびビオチン修飾抗ＣＤ８１抗体溶液を得た。

[0053] 実施例３　血漿測定におけるバックグラウンドの検出

以降の比較例、実施例および参考例では、標的細胞外小胞としてＰＣ－３由来細胞外小胞を使用する。ＰＣ－３由来細胞外小胞を検出するためのマーカータンパク質として、ＴＭ４ＳＦ１（４回膜貫通タンパク質（Ｔｒａｎｓｍｅｍｂｒａｎｅ　４　ｓｕｐｅｒｆａｍｉｌｙ、ｔｅｔｒａｓｐａｎｉｎ）の一つであり、ＰＣ－３を含む多くの腫瘍細胞および腫瘍細胞由来細胞外小胞で高発現しているタンパク質）を選択した。なおＴＭ４ＳＦ１は血漿中に含まれる血球由来の細胞外小胞には発現していない。また、サンプルに使用する検体として血漿を使用する。本実施例では、血漿測定におけるバックグラウンドの検出を実施した。ここで、「バックグラウンド」とは標的細胞外小胞を含まない検体の測定値（シグナル）のことであり、夾雑物等が多く含まれるとノイズシグナルが増加することでバックグラウンドが高くなり、

正確な測定ができない。

[0054] （１）血漿サンプルの作製

（１－１）インフォームドコンセントを取得した健常者１名から、ＥＤＴＡ－２Ｋ採血管（テルモ社製ＶＰ－ＤＫ０５０Ｋ）にそれぞれ５ｍＬ採血した。採血管を１，５００×ｇで２０分間、４℃で遠心分離して血球を分離後、上清を回収した。当該上清を１，５００×ｇで２０分間、４℃で遠心分離して残存する血球を分離後、上清を回収することで健常者血漿を得た。

[0055] （１－２）得られた健常者血漿２５０μＬを－８０℃にて凍結保存した。

[0056] （１－３）凍結保存した健常者血漿を４℃で１時間程度融解し、ＰＢＳ（Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ Ｂｕｆｆｅｒｅｄ Ｓａｌｉｎｅ）１ｍＬを添加し希釈した後、１０，０００×ｇで２０分間、４℃で遠心分離して血漿試料中に残存していた血球を分離後、上清を回収することで血漿サンプルを得た。

[0057] （２）バックグラウンドの測定

（２－１）３％（ｗ／ｖ）ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を含むＰＢＳ（以下、「ＢＳＡバッファー」と表記する）１ｍＬと実施例１で作製した抗ＴＭ４ＳＦ１抗体固定化磁性粒子１０μＬとを２ｍＬチューブにて混合し、３分間転倒撹拌した。２ｍＬチューブを磁石に近接後１分放置し、溶液を除去した後、ＢＳＡバッファー１ｍＬを添加して１０分以上転倒撹拌した。２ｍＬチューブを磁石に近接後１分放置し、溶液を除去した後、ＢＳＡバッファー５０μＬを添加して抗ＴＭ４ＳＦ１抗体固定化磁性粒子懸濁液を調製した。

[0058] （２－２）（２－１）で得た抗ＴＭ４ＳＦ１抗体固定化磁性粒子懸濁液５０μＬと（２－１）で得た血漿サンプル１００μＬとを９６ウェルプレートのウェル内で混合し、９０分間撹拌した。血漿中に目的の細胞外小胞（がん細胞由来細胞外小胞など）が含まれる場合、当該操作により目的の細胞外小胞を抗ＴＭ４ＳＦ１抗体を介して磁性粒子上に結合できる。

[0059] （２－３）撹拌後、９６ウェルプレート下部に磁石を近接後１分放置し、溶液を除去後、０．０５％（ｖ／ｖ）Ｔｗｅｅｎ ２０（商品名）を含むＰ

ＢＳ（以下、「洗浄バッファー」と表記する）を１５０μＬ添加して混合した。再度９６ウェルプレート下部に磁石を近接後１分放置し、溶液を除去することにより磁性粒子を洗浄した。当該洗浄操作を合計３回実施した。

[0060] （２－４）洗浄液を除去後、ＢＳＡバッファー９０μＬとＦｃＲ Ｂｌｏｃｋｉｎｇ Ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ社製）１０μＬとの混合液をブロッキング試薬として加え、１０分間撹拌した。

[0061] （２－５）ブロッキング試薬を除去後、０．５μｇ／ｍＬビオチン修飾抗ＣＤ９抗体を含むＢＳＡバッファー１００μＬを加え、３０分間撹拌した。（２－３）と同様に磁石を用いて上清を除去し、洗浄バッファーで３回洗浄した。

[0062] （２－６）洗浄液を除去後、ＨＲＰ（Ｈｏｒｓｅｒａｄｉｓｈ Ｐｅｒｏｘｉｄａｓｅ）を多価に結合させたストレプトアビジンを含むＢＳＡバッファー１００μＬを加え、２０分間撹拌した。（２－３）と同様に磁石を用いて上清を除去し、洗浄バッファーで３回洗浄した。

[0063] （２－７）洗浄液を除去後、発光基質であるＳｕｐｅｒＳｉｇｎａｌ ＥＬＩＳＡ Ｐｉｃｏ Ｃｈｅｍｉｌｕｍｉｎｅｓｃｅｎｔ Ｓｕｂｓｔｒａｔｅ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ社製）の基質反応液１５０μＬを加え、５分間撹拌した。磁石を含む基質反応液１００μＬを回収し、新たな９６ウェルプレートに移した後、プレートリーダー（Ｔｅｃａｎ社製）で発光量を測定することで、血漿測定におけるバックグラウンドを検出した。

[0064] 比較例１　血漿測定におけるバックグラウンドの検出

（１）血漿サンプルの作製

実施例３（１－１）において、採血管をそれぞれ１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離して血球を分離後、上清を回収することで健常者血漿を得た以外は、実施例３（１）と同様の方法で血漿サンプルを得た。

[0065] （２）バックグラウンドの測定

実施例３（２）において、血漿サンプルを（１）で得た血漿サンプルとした以外は、実施例３（２）と同様の方法で血漿測定におけるバックグラウン

ドを検出した。

[0066] 比較例２　マウスＩｇＧ固定化磁性粒子を用いて前処理を行った際の血漿測定におけるバックグラウンドの検出

（１）血漿サンプルの作製

比較例１（１）と同様に、血漿サンプルを作製した。

[0067] （２）マウスＩｇＧ固定化磁性粒子を用いた前処理

（２－１）ＢＳＡバッファー１ｍＬと実施例１で作製したマウスＩｇＧ固定化磁性粒子１０μＬとを２ｍＬチューブにて混合し、３分間転倒撹拌した。２ｍＬチューブを磁石に近接後１分放置し、溶液を除去した後、ＢＳＡバッファー１ｍＬを添加して１０分以上転倒撹拌した。２ｍＬチューブを磁石に近接後１分放置し、溶液を除去した。

[0068] （２－２）（２－１）で調製したマウスＩｇＧ固定化磁性粒子を（１）で作製した血漿サンプル１００μＬに懸濁し、９０分間転倒撹拌した。

[0069] （２－３）撹拌後、マウスＩｇＧ固定化磁性粒子を含む血漿サンプルを磁石に近接後１分放置し、上清を回収することにより、前処理後の血漿サンプルを得た。

[0070] （３）バックグラウンドの測定

実施例３（２）において、血漿サンプルを（２－３）で得た前処理後の血漿サンプルとした以外は、実施例３（２）と同様の方法で血漿測定におけるバックグラウンドを検出した。

[0071] 実施例４　抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子を用いて前処理を行った際の血漿測定におけるバックグラウンドの検出

比較例２（２）において、抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子を使用した以外は、比較例２と同様の方法で血漿測定におけるバックグラウンドを検出した。

[0072] 実施例３および４ならびに比較例１および２の結果を表１に示す。実施例３において１６万であったバックグラウンドの発光量は、比較例１で１００万まで増加した。実施例３は遠心分離２回により血漿中からほとんどすべて

の血球細胞が除去された一方、比較例１はより緩い条件かつ１回の遠心分離であったため、血漿中に多数の血球細胞が残存した状態であった。残存した血球細胞は、凍結融解を経ることで細胞外小胞を放出すると考えられる。特に血小板は凍結融解等の物理的刺激により活性化し、活性化に伴い細胞外小胞を放出することが知られている。比較例１では融解後の遠心分離（１０，０００×ｇ）により残存した血球細胞自体は除去されたものの、血球細胞由来の細胞外小胞は沈降せず上清中に残存したと推測される。今回、検出マーカーとして使用したＴＭ４ＳＦ１は血球細胞上で発現していないため、血球由来細胞外小胞をＴＭ４ＳＦ１特異的に検出したことは考えにくいが、何らかの形で血球由来細胞外小胞がバックグラウンドの発光量増加に関与した可能性を検証することとした。

[0073] そこで、血球細胞由来細胞外小胞の中でも特に存在量が多い血小板由来細胞外小胞を、血小板上で発現しているＣＤ４１に対する抗体を固定化した磁性粒子を用いた前処理により除去し、バックグラウンドが低下するか確認した。まず、血小板由来細胞外小胞が抗体固定化磁性粒子に非特異吸着しないことを確認するため、抗体の対照コントロールとしてマウスＩｇＧタンパク質を固定化した磁性粒子と血漿サンプルとを反応させる前処理を行った後、バックグラウンド測定を行った（比較例２）。その結果、前処理を行わなかった比較例１と同等の発光量（１００万）となったため、抗体固定化磁性粒子対する非特異吸着によるバックグラウンドの低下は認められなかった。続いて、抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子と血漿サンプルとを反応させる前処理を行った後、バックグラウンド測定を行った結果（実施例４）、比較例１および比較例２と比較して発光量が３８万に減少した。したがって、血漿中に含まれる血小板由来細胞外小胞が抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子に特異的に結合し、除去されたことによりバックグラウンドが低下したことが分かった。

[0074] 以上の結果から、今回、血小板由来細胞外小胞が血漿測定におけるバックグラウンドの発光量増加の主要因であることを初めて明らかにした。さらに

、抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子を用いた前処理により、血漿中から血小板由来細胞外小胞が除去され、バックグラウンドを低減可能であることを確認した。

[0075] ［表１］

表１

実施例	血漿回収時の遠心回数	血漿の凍結融解	前処理	発光量[×10^4]
実施例３	２回	あり	なし	16
比較例１	１回	あり	なし	100
比較例２	１回	あり	マウスＩｇＧ固定化磁性粒子との反応	100
実施例４	１回	あり	抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子との反応	38

[0076] 実施例５　疾患細胞由来細胞外小胞の回収

以降の実施例で使用する疾患細胞として、ヒト前立腺癌細胞であるＰＣ－３細胞を選択した。

[0077] （１）ＰＣ－３細胞を１×１０^{5}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるように１５％（ｖ／ｖ）ＦＢＳ（ウシ胎児血清）を含むＨａｍ’ｓ　Ｆ－１２Ｋ（富士フイルム和光純薬社製）培地に懸濁後、１５ｃｍディッシュ５枚に３０ｍＬずつ播種し、５％CO_2環境下、３７℃で培養した。

[0078] （２）ＦＢＳからウシ由来細胞外小胞を除去するため、遠心式限外ろ過フィルターであるアミコンウルトラ－１５（１００Ｋ）（メルク社製）にＦＢＳ１５ｍＬを添加し、３，５００×ｇで１０分間、室温で遠心分離した。限外ろ過フィルターを通過した溶液を回収後、シリンジフィルター（ポアサイズ０．２２μｍ）に通液し、ウシ由来細胞外小胞除去ＦＢＳを得た。

[0079] （３）（１）で得られたＰＣ－３細胞を２日間培養後、培養上清を１５％（ｖ／ｖ）ウシ由来細胞外小胞除去ＦＢＳを含むＨａｍ’ｓ　Ｆ－１２Ｋ培地に交換し、培養した。

[0080] （４）（３）で得られたＰＣ－３細胞をさらに３日間培養した後、培養上清を全量（約１２５ｍＬ）回収した。３００×ｇで１０分間、室温で遠心分離して浮遊細胞を除去後、上清１２０ｍＬを回収した。

[0081] （５）（４）で得られた上清を、希釈により液量を揃えた上で超遠心用のチューブに分注し、３００，０００×ｇで７０分間、４℃で遠心分離し、上清１２０ｍＬを除去した。残った沈殿物をＰＢＳ４ｍＬで懸濁し、得られた懸濁液を２５９，０００×ｇで７０分間、４℃で遠心分離後、上清４ｍＬを除去した。残った沈殿物を含む１ｍＬをＰＣ－３由来細胞外小胞溶液とした。

[0082] 比較例３　血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞の検出

（１）血漿サンプルの作製

（１－１）実施例３（１－１）において、健常者３名から採血し、採血管をそれぞれ１，５００×ｇで１０分間、４℃で遠心分離して血球を分離後、上清を回収した以外は実施例３（１－１）と同様の方法で健常者血漿を得た。

[0083] （１－２）実施例５で得たＰＣ－３由来細胞外小胞をＰＢＳで希釈した溶液１００μＬを健常者血漿２５０μＬにそれぞれ添加することで、ＰＣ－３由来細胞外小胞を以下［ｆ］～［ｋ］に示す６種類の濃度で含む血漿試料を調製し、－８０℃にて凍結保存した。

［ｆ］２．５×10^{7}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ

［ｇ］５．０×10^{7}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ

［ｈ］１．０×10^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ

［ｉ］２．５×10^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ

［ｊ］５．０×10^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ

［ｋ］１．０×10^{9}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ

[0084] （１－３）ＰＣ－３由来細胞外小胞を含まない血漿試料を調製するため、ＰＢＳ１００μＬを健常者血漿２５０μＬに添加し、－８０℃にて凍結保存した。

[0085] （１－４）（１－２）および（１－３）で凍結保存した血漿試料をそれぞれ４℃で１時間程度融解後、ＰＢＳ９００μＬを添加し希釈した。希釈した血漿試料を１０，０００×ｇで２０分間、４℃で遠心分離して血漿試料中に

残存していた血球を分離後、上清を回収することで血漿サンプルを得た。

[0086] （２）ＰＣ－３由来細胞外小胞の測定

実施例３（２）において、血漿サンプルを（１）で得た血漿サンプルとした以外は、実施例３（２）と同様の方法でＰＣ－３由来細胞外小胞を検出した。

[0087] 実施例６　血小板由来細胞外小胞を除去した健常者血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞の検出

（１）血漿サンプルの作製

比較例３（１）と同様に、血漿サンプルを作製した。

[0088] （２）血小板由来細胞外小胞の除去

実施例４において、血漿サンプルを（１）で得た血漿サンプルとした以外は、実施例４と記載の方法で前処理後の血漿サンプルを得た。

[0089] （３）ＰＣ－３由来細胞外小胞の測定

実施例３（２）において、血漿サンプルを（２）で得た前処理後の血漿サンプルとした以外は、実施例３（２）と同様の方法で血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞を検出した。

[0090] 参考例１　血小板を除去した健常者血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞の検出

（１）血漿サンプルの作製

（１－１）実施例３（１－１）と同様の方法で健常者血漿を得た。

[0091] （１－２）比較例３（１－２）において、健常者血漿を（１－１）で得た健常者血漿とし、－８０℃にて凍結保存せず調製後速やかに（２）の工程に進んだ以外は比較例３（１－２）と同様に血漿試料を調製した。

[0092] （１－３）実施例３（１－３）において、健常者血漿を（１－１）で得た健常者血漿とし、－８０℃にて凍結保存せず調製後速やかに（２）の工程に進んだ以外は比較例３（１－３）と同様にＰＣ－３由来細胞外小胞を含まない血漿試料を調製した。

[0093] （１－４）比較例３（１－４）において、融解操作を行わなかった以外は

比較例３（１－４）と同様に血漿サンプルを得た。

[0094] （２）ＰＣ－３由来細胞外小胞の測定

実施例３（２）において、血漿サンプルを（１）で得た血漿サンプルとした以外は、実施例３（２）と同様の方法でＰＣ－３由来細胞外小胞を検出した。

[0095] 比較例３、実施例６および参考例１の結果を表２および図１～３に示す。なお、表２における「変動計数」とは、発光量の標準偏差を発光量の平均値で除した値であり、当該値が低値であるほど検体間の測定値のバラつきが小さく測定精度が高いといえる。また、表２における「閾値」とは、細胞由来細胞外小胞を含まない血漿サンプルにおける発光量の標準偏差を２倍した値を発光量の平均値に加えた値である。表２における「検出下限濃度」とは、発光量が閾値より高値となるＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度のうち最も低い濃度のことをいい、ＰＣ－３細胞由来細胞外小胞を含まない血漿サンプルにおける発光量および標準偏差が低値であるほど検出下限濃度が低下し検出感度が高いといえる。

[0096] 比較例３、実施例６および参考例１はいずれもＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度に応じて発光量が増加したことから、血漿中からＰＣ－３由来細胞外小胞を検出可能であることを確認した。

[0097] しかし、ＰＣ－３細胞由来細胞外小胞を含まない血漿サンプルの発光量の平均値に注目すると、比較例３は実施例６および参考例１と比較して大幅に高値となった。当該結果は比較例１の結果と同様に、血漿中に残存した血小板から凍結融解により放出された血小板由来細胞外小胞によるバックグラウンドの発光量増加が要因であると考えられる。さらに、比較例３では検体間でノイズシグナル量が異なったため変動計数が高値となり（０．５０）、それに伴い検出下限濃度が高値（１．０×10^9ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ）となった。

[0098] そこで、凍結融解後の血漿に対して抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子を用いた前処理を行ったところ（実施例６）、バックグラウンドの発光量を低減し

、変動計数（０．２３）および検出下限濃度（２．５×１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ）を低減させることができた。したがって、抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子を用いた前処理により血漿中から血小板由来細胞外小胞を除去することにより、目的のＰＣ－３由来細胞外小胞をより高精度かつ高感度に検出することが可能となった。

[0099] また、血漿中からあらかじめほとんどすべての血小板を除去した血漿を凍結融解せずに測定に供することにより（参考例１）、実施例６と同様にバックグラウンドの発光量を低減し、変動計数（０．３６）および検出下限濃度（１．０×１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ）を低下させることができた。したがって、血小板由来細胞外小胞の発生を抑制することによっても、目的の細胞外小胞の検出感度および測定精度を向上可能であることを明らかにした。

[0100] ここで、一般的に癌を含む疾患患者血漿中に含まれる疾患細胞由来細胞外小胞濃度は１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ以下と推測されるため、当該疾患細胞由来細胞外小胞を血漿中から検出するための測定方法は検出下限濃度が１０^{8}ｐａｒｔｉｃｌｅｓ／ｍＬ以上である必要がある。したがって、比較例３に示すような血小板由来細胞外小胞を含む状態での血漿測定方法は、検出下限濃度が当該疾患細胞由来細胞外小胞濃度を大きく上回るため、疾患患者血漿検体中からの疾患細胞由来細胞外小胞検出への適用が困難である。一方、実施例６および参考例１に示すように、血小板由来細胞外小胞を除去する工程を含むあるいは血小板由来細胞外小胞の発生を抑制した血漿測定方法は疾患患者血漿検体への適用が可能であると示唆される。

[0101] ［表２］

表２

実施例	血漿回収時の遠心回数	血漿の凍結融解	前処理	ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]	発光量 [×10^4]					変動計数	変動計数平均値	閾値	検出下限濃度 [particles/mL]
					健常者１	健常者２	健常者３	平均値	標準偏差 (SD)				
比較例３	１回	あり	抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子との反応	0	151	46	95	97	52	0.54	0.50	202	1.0.E+09
				2.5.E+07	117	51	87	85	33	0.39			
				5.0.E+07	167	57	85	103	57	0.56			
				1.0.E+08	166	70	81	106	53	0.50			
				2.5.E+08	228	79	94	133	82	0.61			
				5.0.E+08	223	103	122	149	65	0.43			
				1.0.E+09	317	167	135	206	97	0.47			
実施例６	１回	あり	抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子との反応	0	11	13	24	16	7	0.43	0.23	30	2.5.E+08
				2.5.E+07	17	23	22	21	3	0.14			
				5.0.E+07	20	21	24	22	2	0.09			
				1.0.E+08	24	28	25	26	2	0.08			
				2.5.E+08	47	48	34	43	8	0.19			
				5.0.E+08	98	81	54	78	22	0.29			
				1.0.E+09	152	167	73	131	50	0.38			
参考例１	２回	なし	なし	0	13	20	16	16	3	0.21	0.36	23	1.0.E+08
				2.5.E+07	8	20	21	17	7	0.42			
				5.0.E+07	16	27	21	21	5	0.25			
				1.0.E+08	20	37	24	27	9	0.34			
				2.5.E+08	44	69	32	48	19	0.39			
				5.0.E+08	85	119	49	84	35	0.41			
				1.0.E+09	180	222	75	159	75	0.47			

[0102] 比較例４　血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞の検出

比較例３（２）において、０．５μｇ／ｍＬビオチン修飾抗ＣＤ９抗体の代わりに０．５μｇ／ｍＬビオチン修飾抗ＣＤ８１抗体を使用した以外は、比較例３と同様の方法で血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞を検出した。

[0103] 実施例７　血小板由来細胞外小胞を除去した健常者血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞の検出

実施例６（３）において、０．５μｇ／ｍＬビオチン修飾抗ＣＤ９抗体の代わりに０．５μｇ／ｍＬビオチン修飾抗ＣＤ８１抗体を使用した以外は、実施例６と同様の方法で血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞を検出した。

[0104] 参考例２　血小板を除去した健常者血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞の検出

参考例１（２）において、０．５μｇ／ｍＬビオチン修飾抗ＣＤ９抗体の代わりに０．５μｇ／ｍＬビオチン修飾抗ＣＤ８１抗体を使用した以外は、参考例１と同様の方法で血漿中のＰＣ－３由来細胞外小胞を検出した。

[0105] 比較例４、実施例７および参考例２の結果を表３および図４～６に示す。なお、表３における「変動計数」とは発光量の標準偏差を発光量の平均値で除した値であり、当該値が低値であるほど検体間における測定値のバラつきが小さく測定精度が高いといえる。また、表３における「閾値」とは細胞由来細胞外小胞を含まない血漿サンプルにおける発光量の標準偏差を２倍した値を発光量の平均値に加えた値である。また、表３における「検出下限濃度」とは発光量が閾値より高値となるＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度のうち最も低い濃度のことをいい、検出下限濃度が低いほど検出感度が高いといえる。したがって、ＰＣ－３細胞由来細胞外小胞を含まない血漿サンプルにおける発光量および標準偏差の増加に応じて検出感度が低下する。

[0106] 比較例４、実施例７および参考例２はいずれもＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度依存的に発光量が増加したことから、血漿中からＰＣ－３由来細胞外小胞を検出可能であることを確認した。また、いずれの結果もＰＣ－３細胞由来細胞外小胞を含まない血漿サンプルの発光量の平均値が同等に低値とな

った。これは、比較例３、実施例６、参考例１においては検出マーカーとして血小板においても発現するＣＤ９を使用した一方、比較例４、実施例７および参考例２では検出マーカーとして血小板において発現が認められないＣＤ８１を使用したため、ノイズシグナル発生が抑制されたことが要因と推測される。

[0107] 検出下限濃度に注目すると、実施例７において比較例４および参考例２と比較してより低値となった。これは比較例４および参考例２と比較して、実施例７において血小板由来細胞外小胞を除去する工程により血漿中に含まれる細胞外小胞の総量が減少し、目的の細胞外小胞（ＰＣ－３由来細胞外小胞）と抗ＴＭ４ＳＦ１抗体固定化磁性粒子との反応性が向上したことにより測定安定性が増し、検体間の測定値のバラつきが小さくなったためと推測される。

[0108] 以上の結果より、ＣＤ８１を検出マーカーとして使用した場合においても、血小板由来細胞外小胞を除去する工程により、目的の細胞外小胞の検出感度および測定精度を向上可能であり、疾患患者血漿検体中からの疾患細胞由来細胞外小胞検出に適用可能な測定方法であることが示唆される。

[0109] ［表３］

表３

実施例	血漿回収時の遠心回数	血漿の凍結融解	前処理	ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]	発光量 [×10^4]					変動計数	変動計数平均値	閾値	検出下限濃度 [particles/mL]
					健常者１	健常者２	健常者３	平均値	標準偏差 (SD)				
比較例４	１回	あり	抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子との反応	0	7	14	24	15	8	0.56	0.30	32	2.5.E+08
				2.5.E+07	11	19	25	18	7	0.40			
				5.0.E+07	15	20	24	19	5	0.24			
				1.0.E+08	19	25	26	23	4	0.15			
				2.5.E+08	40	43	32	38	6	0.15			
				5.0.E+08	74	67	46	62	15	0.24			
				1.0.E+09	141	136	64	114	43	0.38			
実施例７	１回	あり	抗ＣＤ４１抗体固定化磁性粒子との反応	0	11	13	16	13	3	0.21	0.23	19	1.0.E+08
				2.5.E+07	13	16	18	15	3	0.18			
				5.0.E+07	14	19	20	17	3	0.20			
				1.0.E+08	18	22	21	20	2	0.10			
				2.5.E+08	39	45	29	37	8	0.22			
				5.0.E+08	54	73	37	55	18	0.33			
				1.0.E+09	131	137	59	109	44	0.40			
参考例２	２回	なし	なし	0	6	19	17	14	7	0.49	0.41	28	2.5.E+08
				2.5.E+07	9	23	20	18	7	0.41			
				5.0.E+07	12	27	24	21	8	0.37			
				1.0.E+08	18	34	24	25	8	0.31			
				2.5.E+08	31	58	30	40	16	0.40			
				5.0.E+08	60	98	40	66	30	0.45			
				1.0.E+09	139	176	62	125	58	0.46			

[0110] 実施例６および実施例７において示されたように、本発明の検出方法は血漿中から目的の細胞外小胞を高感度かつ高精度に検出できることから、疾患患者血漿検体中においても疾患細胞由来細胞外小胞検出に適用可能な測定方法であることが示唆される。

請求の範囲

[請求項1] 血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出する方法であって、

前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程Ａ１または前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程Ａ２、および

前記血液由来試料中の前記標的細胞外小胞を検出する工程Ｂ

を含む、方法。

[請求項2] 血液由来試料中の標的細胞外小胞の検出感度を向上させる方法であって、

前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程Ａ１または前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程Ａ２

を含む、方法。

[請求項3] 血液由来試料中の標的細胞外小胞を検出するために血液由来試料を前処理する方法であって、

前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞を除去する工程Ａ１または前記血液由来試料中の血小板由来細胞外小胞の発生を抑制する工程Ａ２

を含む、方法。

[請求項4] 前記標的細胞外小胞が、血小板由来細胞外小胞以外の細胞外小胞である、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項5] 前記血小板由来細胞外小胞以外の細胞外小胞が、腫瘍細胞由来の細胞外小胞である、請求項４に記載の方法。

[請求項6] 前記腫瘍細胞由来の細胞外小胞が、前立腺癌由来の細胞外小胞である、請求項５に記載の方法。

[請求項7] 前記血液由来試料が、血漿または血清である、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項8] 前記工程Ａ１が、前記血小板由来細胞外小胞に特異的に結合する物

質を用いて実施される、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項9] 前記物質が、前記血小板由来細胞外小胞に特異的に存在するマーカーに対する抗体である、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 前記マーカーが、ＣＤ４１である、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 前記工程Ａ２が、前記血液由来試料中の血小板を除去することにより実施される、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項12] 前記血小板の除去が、前記血液由来試料の調製時に遠心分離を２回以上実施することにより実施される、請求項１１に記載の方法。

[請求項13] 前記工程Ａ２が、前記血液由来試料を凍結しないことにより実施される、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

[請求項14] 前記工程Ｂが、免疫学的測定法により実施される、請求項１に記載の方法。

[請求項15] 前記工程Ｂが、前記標的細胞外小胞を担体に捕捉する工程Ｂ１と、捕捉された前記標的細胞外小胞を検出する工程Ｂ２を含む、請求項１に記載の方法。

[請求項16] 前記工程Ｂ１が、前記標的細胞外小胞に結合する第１の物質を用いて実施され、且つ

前記工程Ｂ２が、前記標的細胞外小胞に結合する第２の物質を用いて実施される、請求項１５に記載の方法。

[請求項17] 前記第１の物質が、前記標的細胞外小胞に存在する第１のマーカーに対する抗体であり、且つ

前記第２の物質が、前記標的細胞外小胞に存在する第２のマーカーに対する抗体である、請求項１６に記載の方法。

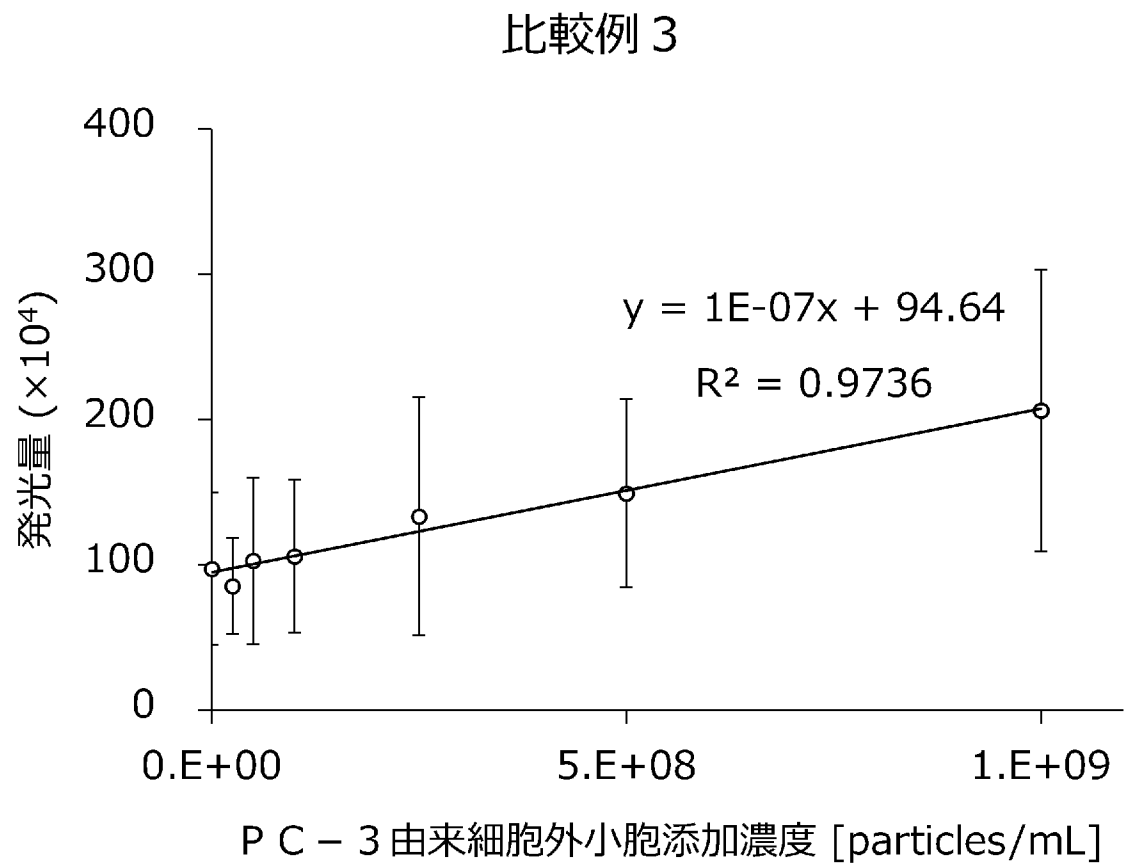
[請求項18] 前記第１のマーカーが、前記標的細胞外小胞に特異的に存在するマーカーである、請求項１７に記載の方法。

[請求項19] 前記第１のマーカーが、ＴＭ４ＳＦ１またはＣＤ８１である、請求項１７に記載の方法。

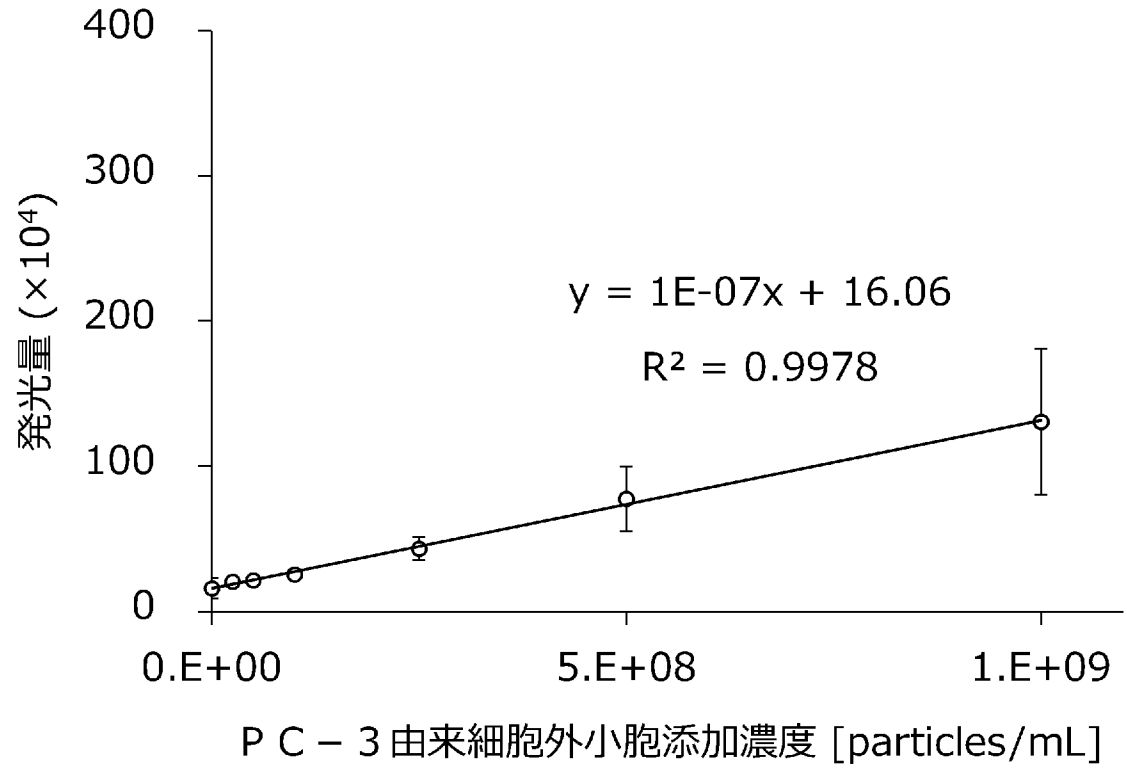
[請求項20] 前記第２のマーカーが、ＣＤ９またはＣＤ８１である、請求項１７

～１９のいずれか１項に記載の方法。

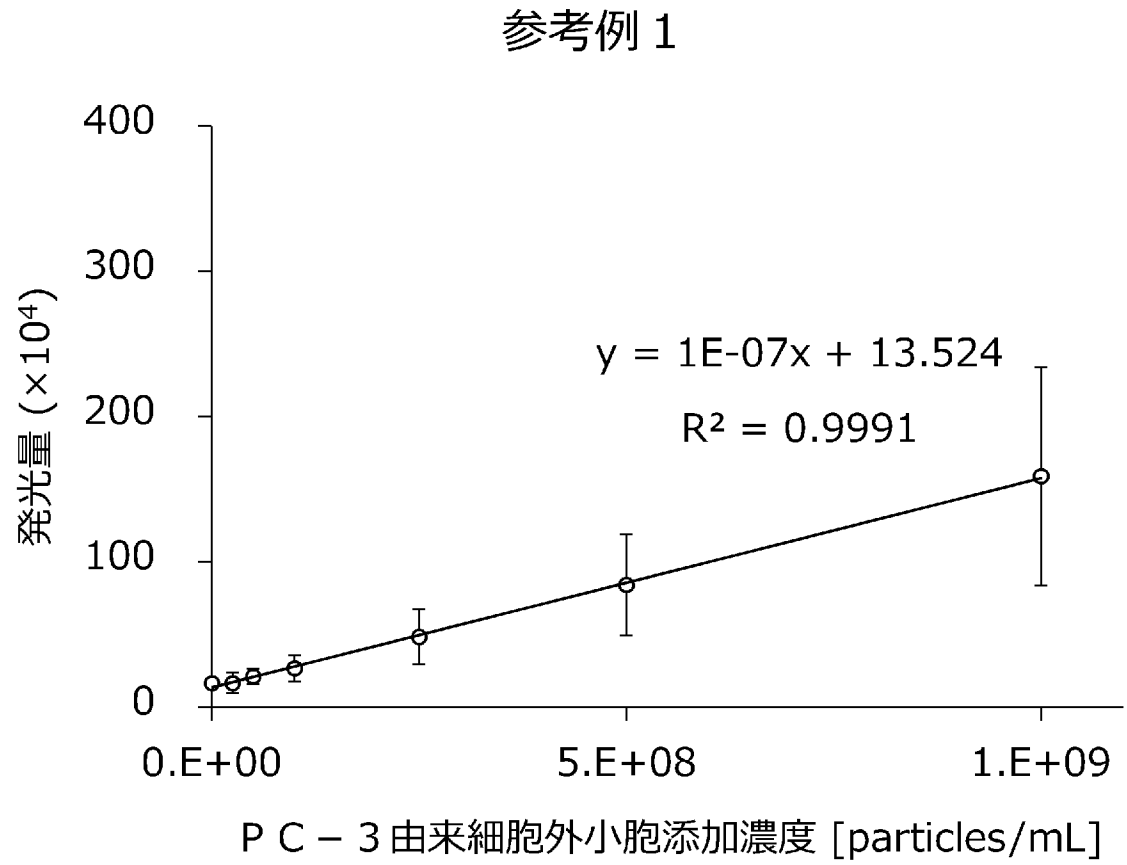
[図1]


比較例３
400
300
200
100
0
発光量（×10⁴）
y = 1E-07x + 94.64
R² = 0.9736
0.E+00
5.E+08
1.E+09
ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]

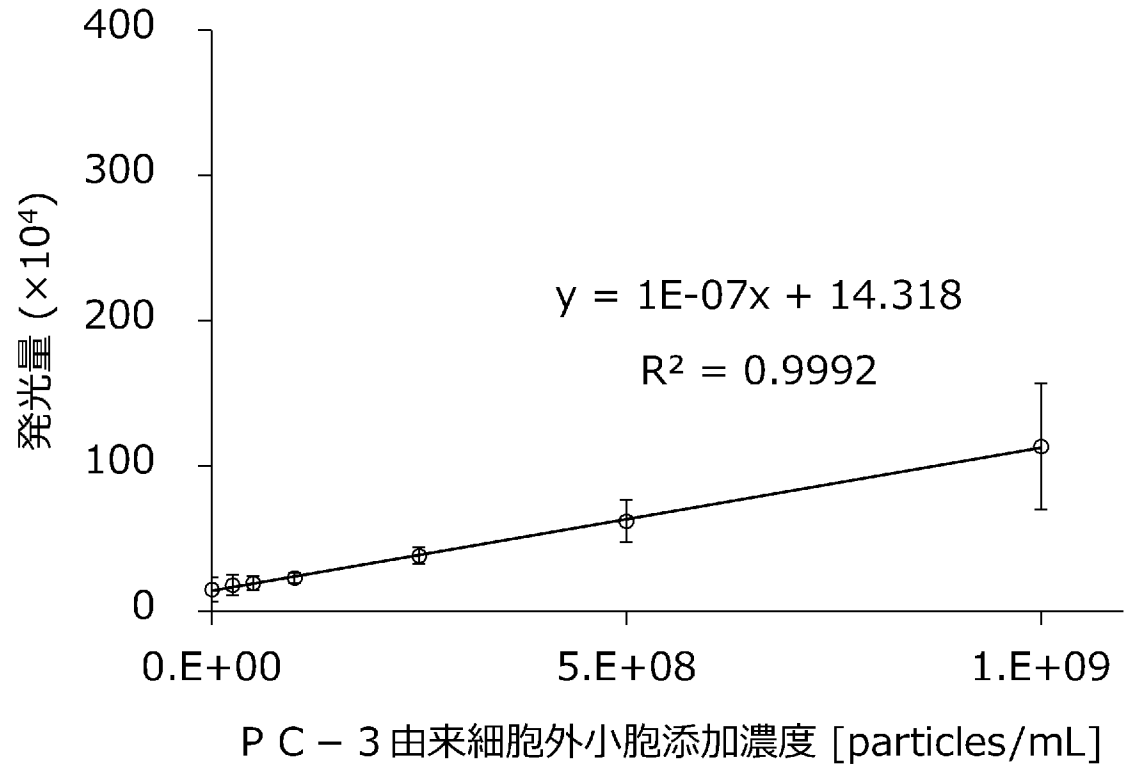
[図2]


実施例６
400
300
200
100
0
発光量（×10⁴）
y = 1E-07x + 16.06
R² = 0.9978
0.E+00
5.E+08
1.E+09
ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]

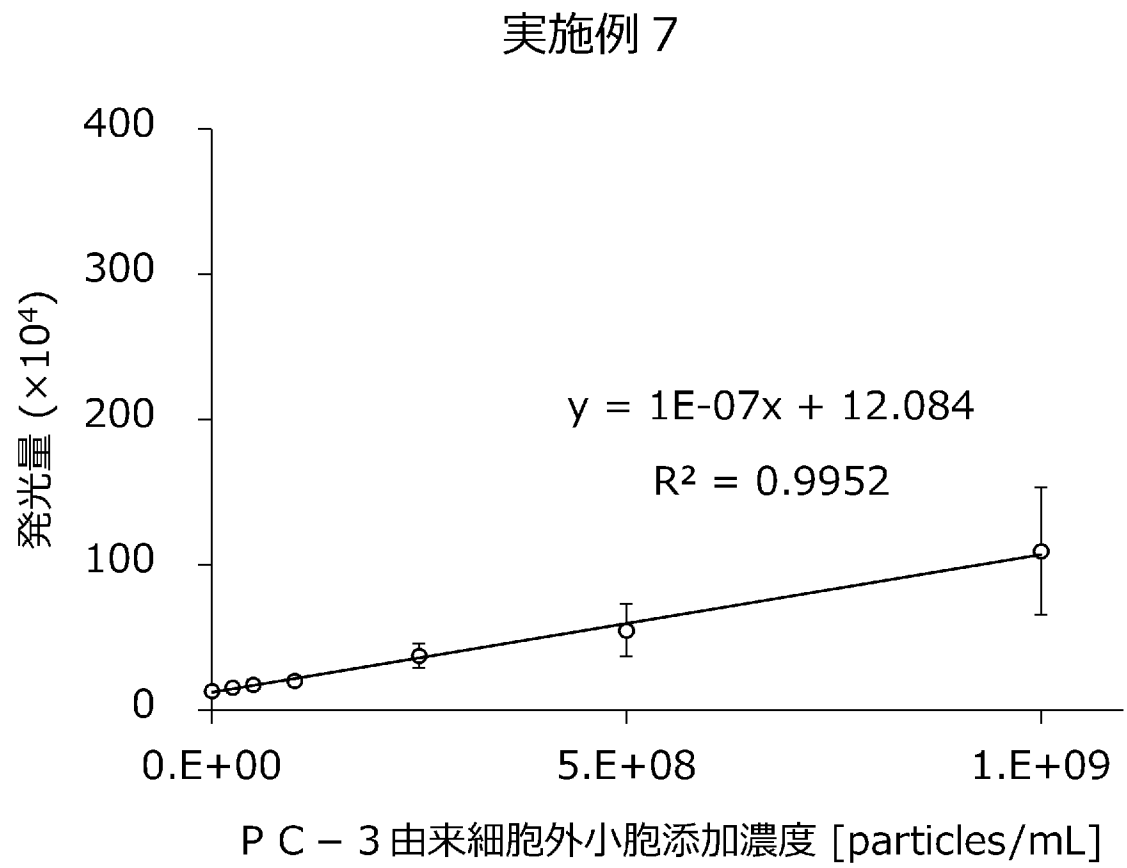
[図3]


参考例１
400
300
200
100
0
発光量（×10⁴）
y = 1E-07x + 13.524
R² = 0.9991
0.E+00
5.E+08
1.E+09
ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]

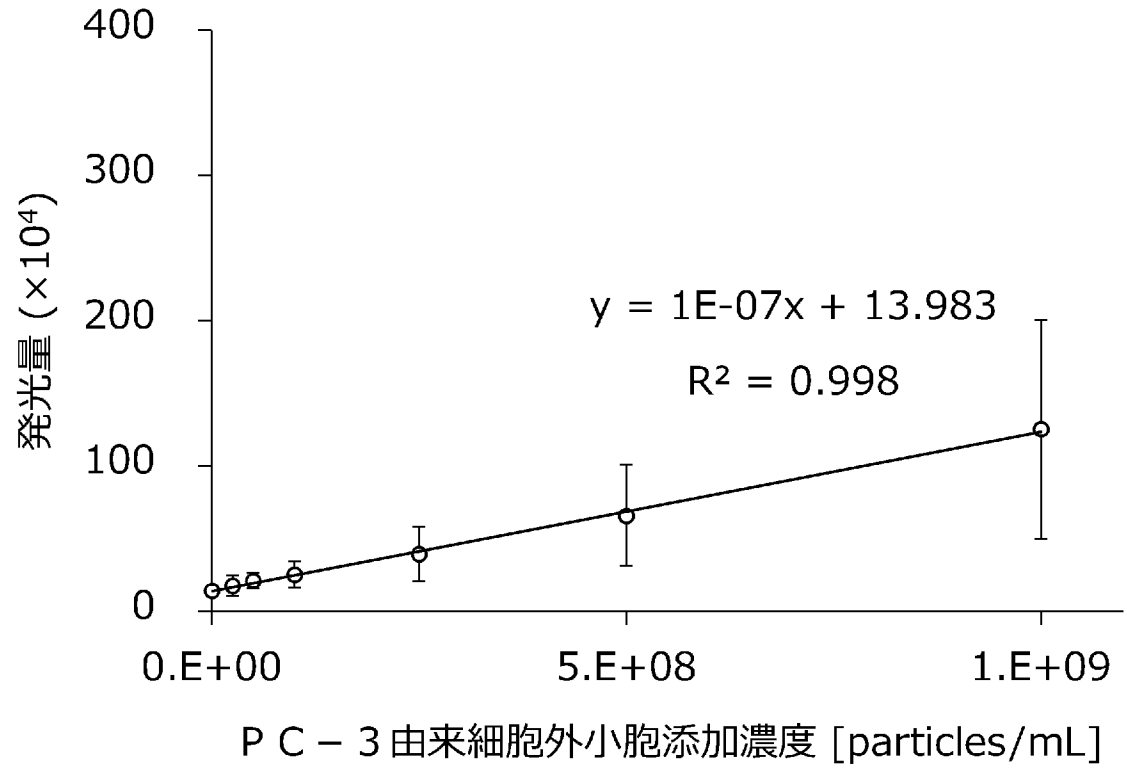
[図4]


比較例４
400
300
200
100
0
発光量（×10⁴）
y = 1E-07x + 14.318
R² = 0.9992
0.E+00
5.E+08
1.E+09
ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]

[図5]


実施例７
400
300
200
100
0
発光量（×10⁴）
y = 1E-07x + 12.084
R² = 0.9952
0.E+00
5.E+08
1.E+09
ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]

[図6]


参考例２
400
300
200
100
0
発光量（×10⁴）
y = 1E-07x + 13.983
R² = 0.998
0.E+00
5.E+08
1.E+09
ＰＣ－３由来細胞外小胞添加濃度 [particles/mL]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/023680

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/48(2006.01)i; ***G01N 33/53***(2006.01)i
FI: G01N33/48 B; G01N33/53 S

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)

G01N33/48; G01N33/53

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-179957 A (NIHON KOHDEN CORPORATION) 15 November 2018 (2018-11-15) paragraphs [0018]-[0021], [0026], [0029], [0031]-[0036], [0040], [0042]-[0046], [0050]-[0051], [0056]-[0057]	1-4, 7-9, 11-13
Y		1-20
Y	WO 2023/112980 A1 (TOSOH CORP.) 22 June 2023 (2023-06-22) paragraphs [0003], [0006]-[0007], [0014], [0017], [0020]-[0023], [0030], [0040], [0063], [0066]-[0077], [0083]-[0087], [0122]-[0123], [0126]	1-20
Y	WO 2010/072410 A2 (UNIVERSITEIT LEIDEN) 01 July 2010 (2010-07-01) p. 11, line 35 to p. 12, line 1	10
A	US 2019/0049438 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 14 February 2019 (2019-02-14) paragraph [0081]	1-20

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
30 August 2024	**10 September 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/023680

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017/0146542 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 25 May 2017 (2017-05-25) paragraphs [0011], [0014], [0028], [0040], [0044]	1-20
A	WO 2023/004082 A1 (MERCY BIOANALYTICS, INC.) 26 January 2023 (2023-01-26) paragraphs [0004]-[0005], [0407]-[0408]	1-20
A	MOITA, Brenda. Applications of Prostate Cancer Proteomics: A Review. JYI. April 2021, 39(4), pp.45-53, doi:10.22186/jyi.39.4.45-53, in particular, table 1 table 1	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023680

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-179957 A	15 November 2018	US 2018/0299452 A1 paragraphs [0015]-[0024], [0040]-[0045], [0049], [0051]-[0056], [0060], [0062]-[0068], [0072]-[0074], [0079]-[0080] EP 3392658 A1	
WO 2023/112980 A1	22 June 2023	(Family: none)	
WO 2010/072410 A2	01 July 2010	EP 2202522 A1	
US 2019/0049438 A1	14 February 2019	WO 2017/136430 A1	
US 2017/0146542 A1	25 May 2017	WO 2016/201064 A1 CA 2988771 A	
WO 2023/004082 A1	26 January 2023	CA 3227131 A CA 3227133 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/023680

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/48(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i
FI: G01N33/48 B; G01N33/53 S

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））

G01N33/48; G01N33/53

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	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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 2018-179957 A (日本光電工業株式会社) 15.11.2018 (2018-11-15) [0018]-[0021][0026][0029][0031]-[0036][0040][0042]-[0046][0050]-[0051][0056]-[0057]	1-4,7-9,11-13
Y		1-20
Y	WO 2023/112980 A1 (東ソー株式会社) 22.06.2023 (2023-06-22) [0003][0006]-[0007][0014][0017][0020]-[0023][0030][0040][0063][0066]-[0077][0083]-[0087][0122]-[0123][0126]	1-20
Y	WO 2010/072410 A2 (UNIVERSITEIT LEIDEN) 01.07.2010 (2010-07-01) 第11頁第35行～第12頁第1行	10
A	US 2019/0049438 A1 (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 14.02.2019 (2019-02-14) [0081]	1-20
A	US 2017/0146542 A1 (THE BOARD OF REGENTS OF THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 25.05.2017 (2017-05-25) [0011][0014][0028][0040][0044]	1-20

☑ 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
"D" 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
"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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
30.08.2024	10.09.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
北条　弥作子 2J 1168
電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
A	WO 2023/004082 A1 (MERCY BIOANALYTICS, INC.) 26.01.2023 (2023-01-26) [4]-[5][407]-[408]	1-20
A	MOITA, Brenda, Applications of Prostate Cancer Proteomics: A Review, JYI, 2021.04, 39(4), pp.45-53, doi:10.22186/jyi.39.4.45-53, 特に、Table 1 Table 1	1-20

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/023680

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-179957 A	15.11.2018	US 2018/0299452 A1 [0015]-[0024][0040]-[0045][0049][0051]-[0056][0060][0062]-[0068][0072]-[0074][0079]-[0080] EP 3392658 A1	
WO 2023/112980 A1	22.06.2023	（ファミリーなし）	
WO 2010/072410 A2	01.07.2010	EP 2202522 A1	
US 2019/0049438 A1	14.02.2019	WO 2017/136430 A1	
US 2017/0146542 A1	25.05.2017	WO 2016/201064 A1 CA 2988771 A	
WO 2023/004082 A1	26.01.2023	CA 3227131 A CA 3227133 A	