

(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  
2021年8月26日(26.08.2021)



(10) 国際公開番号  
**WO 2021/166713 A1**

(51) 国際特許分類:  
G01N 33/53 (2006.01) C12Q 1/6806 (2018.01)  
C12Q 1/06 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/004553

(22) 国際出願日: 2021年2月8日(08.02.2021)

(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 2020-024511 2020年2月17日(17.02.2020) JP

(71) 出願人: 株式会社 J V C ケンウッド (JVCKENWOOD CORPORATION) [JP/JP];  
〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町  
3丁目12番地 Kanagawa (JP).

(72) 発明者: 辻田 公二 (TSUJITA Koji); 〒2210022  
神奈川県横浜市神奈川区守屋町3丁目12  
番地 株式会社 J V C ケンウッド 知的財産部  
内 Kanagawa (JP). 糸長 誠 (ITONAGA Makoto);  
〒2210022 神奈川県横浜市神奈川区守屋町

3丁目12番地 株式会社 J V C ケンウ  
ド 知的財産部内 Kanagawa (JP).

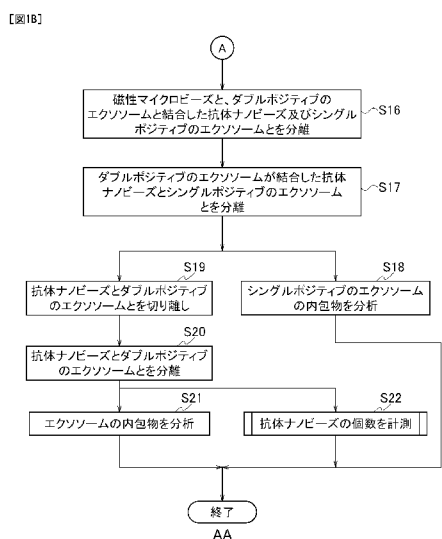
(74) 代理人: 三好 秀和, 外 (MIYOSHI Hidekazu et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門1丁目2番  
8号 虎ノ門琴平タワー Tokyo (JP).

(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, DJ, DK, DM, DO,  
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,  
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, KE, KG, KH,  
KN, KP, KR, KW, 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,  
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, GH, GM, KE, LR, LS,

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING BIOLOGICAL SAMPLE

(54) 発明の名称: 生体試料分析方法



S16 Separate magnetic microbeads from antibody nanobeads bound to double-positive exosomes and single-positive exosomes  
S17 Separate antibody nanobeads bound to double-positive exosomes from single-positive exosomes  
S18 Analyze contents of single-positive exosomes  
S19 Unbind antibody nanobeads from double-positive exosomes  
S20 Separate antibody nanobeads from double-positive exosomes  
S21 Analyze contents of exosomes  
S22 Count antibody nanobeads  
AA End

(57) Abstract: In this method for analyzing a biological sample, exosomes to which first and second beads are bound are collected from a buffer solution containing the exosomes to which the first and second beads are bound. To the surface of the first beads, a first antibody specifically binding to a first antigen associated with a first disease is fixed. To the surface of the second beads, a second antibody specifically binding to a second antigen associated with a second disease is fixed. The first beads are unbound from the exosomes and then the exosomes to which the second beads are bound are collected. The exosomes to which the second beads are bound are lysed and the second beads and the contents of the exosomes are collected (S19 and S20). The contents of the exosomes are analyzed (S21) and the second beads are counted (S22).



WO 2021/166713 A1

MW, MZ, NA, RW, 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, 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)）

---

(57) 要約：第1のビーズと第2のビーズとが結合したエクソソームを含む緩衝液から、第1のビーズと第2のビーズとが結合したエクソソームが回収される。第1のビーズの表面には、第1の疾患に関連した第1の抗原と特異的に結合する第1の抗体が固定されている。第2のビーズの表面には、第2の疾患に関連した第2の抗原と特異的に結合する第2の抗体が固定されている。エクソソームから第1のビーズが切り離され、第2のビーズが結合したエクソソームが回収される。第2のビーズが結合したエクソソームが溶解処理されて、第2のビーズとエクソソームの内包物とが回収される（S 19及びS 20）。エクソソームの内包物が分析され（S 21）、第2のビーズの個数が計測される（S 22）。

## 明 細 書

**発明の名称**：生体試料分析方法

### 技術分野

[0001] 本開示は、生体試料に含まれているエクソソームの内包物を分析し、エクソソームの個数を計測する生体試料分析方法に関する。

### 背景技術

[0002] 特定の疾患と関連付けられている抗原をバイオマーカとして検出して分析することで、特定の疾患を発見したり、特定の疾患の治療の効果を検証したりすることが行われている。細胞から分泌され、血液等の各種の体液に含まれているエクソソームは、特定の疾患を発見するためのバイオマーカとして期待されている。

[0003] エクソソームは脂質二重膜で覆われた微小な膜小胞であり、脂質二重膜には、CD9、CD63等の各種の膜たんぱく質が存在する。人が特定の疾患に罹患すると、疾患に関連した膜たんぱく質が脂質二重膜の表面に発現しているエクソソームの量が増加することが知られている。エクソソームの表面に発現している疾患に関連した膜たんぱく質を抗原とし、疾患に関連した抗原を有するエクソソームの個数を計測することによって、人が特定の疾患に罹患しているか否かを発見できる可能性がある。

[0004] エクソソームの内部には、miRNA（マイクロRNA）及びDNA等の核酸、たんぱく質等の内包物が存在する。エクソソームの内包物も特定の疾患を発見するためのバイオマーカとして期待されている（特許文献1参照）。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0005] 特許文献1：特開2018-163043号公報

特許文献2：特開2017-40595号公報

特許文献3：特開2019-211366号公報

## 発明の概要

- [0006] 従来においては、エクソソームを含む生体試料の検体を2つ用意し、一方の検体でエクソソームの内包物を分析し、他方の検体でエクソソームの個数を計測する。即ち、内包物を分析したエクソソームと、個数を計測したエクソソームとは同一のものではない。1つの検体で、エクソソームの内包物を分析し、エクソソームの個数を計測することが望まれる。
- [0007] 1またはそれ以上の実施形態は、1つの生体試料で、エクソソームの内包物を分析し、かつ、エクソソームの個数を計測することができる生体試料分析方法を提供することを目的とする。
- [0008] 1またはそれ以上の実施形態の一態様によれば、第1の疾患に関連した第1の抗原と特異的に結合する第1の抗体を表面に固定した複数の第1のビーズを含む第1の緩衝液が注入された反応容器に、第2の疾患に関連した第2の抗原と特異的に結合する第2の抗体を表面に固定した複数の第2のビーズと、前記第1の抗原及び前記第2の抗原を表面に有する分析対象のエクソソームを含む生体試料とを注入して、前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象のエクソソームを含む第2の緩衝液を生成し、前記第2の緩衝液から、前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象のエクソソームを回収し、回収した前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象のエクソソームから前記第1のビーズを切り離し、前記第2のビーズが結合した前記分析対象のエクソソームを回収し、回収した前記第2のビーズが結合した前記分析対象のエクソソームを溶解処理して、前記第2のビーズと前記分析対象のエクソソームの内包物とに分離してそれぞれを回収し、回収した前記分析対象のエクソソームの内包物を分析し、回収した前記第2のビーズの個数を計測する生体試料分析方法が提供される。
- [0009] 1またはそれ以上の実施形態の生体試料分析方法によれば、1つの生体試料で、エクソソームの内包物を分析し、かつ、エクソソームの個数を計測することができる。

## 図面の簡単な説明

- [0010] [図1A]図 1 Aは、1 またはそれ以上の実施形態の生体試料分析方法を部分的に示すフローチャートである。
- [図1B]図 1 Bは、図 1 Aに続く、1 またはそれ以上の実施形態の生体試料分析方法を部分的に示すフローチャートである。
- [図2]図 2は、1 またはそれ以上の実施形態の生体試料分析方法で用いる磁性マイクロビーズを示す概念図である。
- [図3]図 3は、磁性マイクロビーズを含む緩衝液を注入した反応容器を示す概念図である。
- [図4]図 4は、シングルポジティブのエクソソーム及びダブルポジティブのエクソソームを含む生体試料の検体を示す概念図である。
- [図5A]図 5 Aは、シングルポジティブのエクソソームの構造を示す概念図である。
- [図5B]図 5 Bは、ダブルポジティブのエクソソームの構造を示す概念図である。
- [図6]図 6は、1 またはそれ以上の実施形態の生体試料分析方法で用いる抗体ナノビーズを示す概念図である。
- [図7]図 7は、磁性マイクロビーズを含む緩衝液を注入した反応容器にダブルポジティブのエクソソームを含む検体及び抗体ナノビーズを注入して、ダブルポジティブのエクソソームを磁性マイクロビーズと抗体ナノビーズとでサンドイッチ捕捉した状態を示す概念図である。
- [図8]図 8は、図 7に示す反応容器からダブルポジティブのエクソソームをサンドイッチ捕捉した磁性マイクロビーズ及び抗体ナノビーズ以外の不要物を除去した状態を示す概念図である。
- [図9]図 9は、図 7に示す反応容器から不要物を分離する方法を示す図である。
- [図10]図 1 0は、ダブルポジティブのエクソソームをサンドイッチ捕捉した磁性マイクロビーズ及び抗体ナノビーズにおけるエクソソームを磁性マイク

ロビーズから切り離した状態を示す概念図である。

[図11]図11は、ハプテンを用いてエクソソームを磁性マイクロビーズから切り離す方法を示す図である。

[図12]図12は、リンカーを用いてエクソソームを磁性マイクロビーズから切り離す方法を示す図である。

[図13]図13は、磁性マイクロビーズと、ダブルポジティブのエクソソームを捕捉した抗体ナノビーズと、シングルポジティブのエクソソームとを分離して得られた磁性マイクロビーズを示す概念図である。

[図14]図14は、磁性マイクロビーズと、ダブルポジティブのエクソソームを捕捉した抗体ナノビーズと、シングルポジティブのエクソソームとを分離して得られた、ダブルポジティブのエクソソームを捕捉した抗体ナノビーズ及びシングルポジティブのエクソソームを示す概念図である。

[図15A]図15Aは、磁性マイクロビーズと抗体ナノビーズとを分離する方法の途中までの工程を示す図である。

[図15B]図15Bは、磁性マイクロビーズと抗体ナノビーズとを分離する方法の図15Aに続く工程を示す図である。

[図16]図16は、ダブルポジティブのエクソソームを捕捉した抗体ナノビーズと、シングルポジティブのエクソソームとを分離して得られた、ダブルポジティブのエクソソームを捕捉した抗体ナノビーズを示す概念図である。

[図17]図17は、ダブルポジティブのエクソソームを捕捉した抗体ナノビーズと、シングルポジティブのエクソソームとを分離して得られた、シングルポジティブのエクソソームを示す概念図である。

[図18]図18は、ダブルポジティブのエクソソームから抗体ナノビーズを切り離した状態を示す概念図である。

[図19]図19は、互いに切り離された、抗体ナノビーズとダブルポジティブのエクソソームとを分離して得られた抗体ナノビーズを示す概念図である。

[図20]図20は、互いに切り離された、抗体ナノビーズとダブルポジティブのエクソソームとを分離して得られたダブルポジティブのエクソソームを示

す概念図である。

[図21]図21は、図1BのステップS22の具体的な抗体ナノビーズの個数の計測方法を示すフローチャートである。

[図22]図22は、抗体ナノビーズの個数の計測方法を示す図である。

[図23]図23は、ディスク基板に抗体ナノビーズを付着させるための極性官能基を形成した状態を示す概念図である。

### 発明を実施するための形態

[0011] 以下、1またはそれ以上の実施形態の生体試料分析方法について、添付図面を参照して説明する。1またはそれ以上の実施形態においては、1つのエクソソームの表面に2種類の特定の膜たんぱく質が発現しているダブルポジティブのエクソソームを捕捉して内包物を分析し、かつ、そのエクソソームの個数を計測することができる生体試料分析方法を例とする。

[0012] 図1Aにおいて、オペレータは、ステップS11にて、図2に示すように、磁性マイクロビーズ10の表面に第1の疾患に関連した抗原と特異的に結合する複数の抗体11を固定させる。図3に示すように、オペレータは、ステップS12にて、反応容器20に抗体11が固定された多数の磁性マイクロビーズ10を含む緩衝液21（第1の緩衝液）を注入する。磁性マイクロビーズ10の直径は3 $\mu$ m程度であり、直径はマイクロメートルオーダーであればよい。

[0013] 図4に示すように、オペレータは、容器30に生体試料の検体31を準備する。検体31は、後述するシングルポジティブのエクソソーム32s及びダブルポジティブのエクソソーム32wを含む。検体31は血液等の任意の体液であって、エクソソーム32s及び32wの他に、不要物である夾雑物33及び34を含む。シングルポジティブのエクソソーム32s及びダブルポジティブのエクソソーム32wをエクソソーム32と総称する。

[0014] 図5Aに概念的に示すように、シングルポジティブのエクソソーム32sは脂質二重膜320で覆われており、脂質二重膜320には、膜たんぱく質321～323が存在している。膜たんぱく質321はCD9、膜たんぱく

質322はCD63、膜たんぱく質323はCD147である。CD9及びCD63は通常存在する膜たんぱく質であり、CD147は第1の疾患に関連した膜たんぱく質の一例である。このようにシングルポジティブのエクソソーム32sは、1つのエクソソーム32の表面に1種類の疾患に関連した膜たんぱく質（1またはそれ以上の実施形態においてはCD147）が存在しているエクソソーム32を指す。

[0015] 図5Bに概念的に示すように、ダブルポジティブのエクソソーム32wは脂質二重膜320で覆われており、脂質二重膜320には、膜たんぱく質321～324が存在している。膜たんぱく質324はHER2（CD340）である。HER2（CD340）は第2の疾患に関連した膜たんぱく質の一例である。このようにダブルポジティブのエクソソーム32wは、1つのエクソソーム32の表面に2種類の疾患に関連した膜たんぱく質（1またはそれ以上の実施形態においてはCD147及びHER2（CD340）の2つ）が存在しているエクソソーム32を指す。以下、HER2（CD340）を通称名であるHER2と称する。

[0016] 1またはそれ以上の実施形態においては、一例として、CD147及びHER2の双方が表面に存在するダブルポジティブのエクソソーム32wを分析対象のエクソソームとする。1またはそれ以上の実施形態においては、CD147を第1の疾患に関連した第1の抗原とし、HER2を第2の疾患に関連した第2の抗原としているが、これに限定されない。磁性マイクロビーズ10の表面に固定されている抗体11は、CD147と特異的に結合する第1の抗体である。

[0017] エクソソーム32の内部には、miRNA325及びDNA326等の核酸、及び図示していないたんぱく質等の内包物が存在する。

[0018] 図6に示すように、オペレータは、容器40に、表面に複数の抗体51が固定された抗体ナノビーズ50を含む緩衝液41を準備する。抗体ナノビーズ50は磁性マイクロビーズ10よりも格段に小径であって、直径は200nm程度である。抗体ナノビーズ50の直径は1μm未満であればよく、好

ましくは100nm～500nmである。抗体ナノビーズ50の表面に固定されている抗体51は、第2の疾患に関連した第2の抗原であるHER2と特異的に結合する抗体（第2の抗体）である。

[0019] 図7に示すように、オペレータは、ステップS13にて、エクソソーム32を含む検体31と、抗体ナノビーズ50を含む緩衝液41を順に（または同時に）反応容器20に注入する。緩衝液21と緩衝液41とを混合した緩衝液を緩衝液21とすると、反応容器20内には、磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50とでサンドイッチ捕捉されたダブルポジティブのエクソソーム32wを含む緩衝液21（第2の緩衝液）が生成される。この場合、サンドイッチ捕捉とは2つのビーズが1つのエクソソームに結合することを意味していることから、磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50とが結合したエクソソーム32wを含む第2の緩衝液が生成される、ということが出来る。このとき、オペレータは、反応容器20を必要に応じて振盪し、所定時間待機する。

[0020] 図7において、CD147及びHER2の双方が表面に存在しているダブルポジティブのエクソソーム32wが磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50とでサンドイッチ捕捉されている。HER2が存在していないシングルポジティブのエクソソーム32sは磁性マイクロビーズ10の抗体11と結合する。しかしながら、シングルポジティブのエクソソーム32sには抗体ナノビーズ50は結合しないため、シングルポジティブのエクソソーム32sは磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50とでサンドイッチ捕捉されない。

[0021] 図7において、反応容器20内には多数の磁性マイクロビーズ10が存在しているが、理解を容易にするため、拡大した1つの磁性マイクロビーズ10のみを示している。

[0022] オペレータは、ステップS14にて、エクソソーム32を介して抗体ナノビーズ50が連結された磁性マイクロビーズ10と不要物とを磁気捕集または弱遠心分離等によって分離する。オペレータは、分離された磁性マイクロ

ビーズ10を洗浄する。磁性マイクロビーズ10と連結していない抗体ナノビーズ50、夾雑物33及び34は不要物である。なお、ステップS13にて抗体ナノビーズ50は過剰に注入されるから、不要物は主として磁性マイクロビーズ10と連結していない抗体ナノビーズ50である。ステップS14の結果、図8に示す、エクソソーム32を介して抗体ナノビーズ50が連結された磁性マイクロビーズ10を回収することができる。

[0023] 回収された磁性マイクロビーズ10には抗体ナノビーズ50が結合していないエクソソーム32sも結合している。勿論、複数ある磁性マイクロビーズ10の中には、抗体ナノビーズ50が結合したエクソソーム32wのみが結合している磁性マイクロビーズ10もあれば、抗体ナノビーズ50が結合していないエクソソーム32sのみが結合している磁性マイクロビーズ10もある。

[0024] ところで、抗体ナノビーズ50が磁性ナノビーズでなければ、磁性マイクロビーズ10を磁気捕集することによって、磁性マイクロビーズ10と、磁性マイクロビーズ10と連結していない抗体ナノビーズ50とを容易に分離することができる。後述するステップS22にて磁性マイクロビーズ10と連結している抗体ナノビーズ50の個数を計測する際に、抗体ナノビーズ50は磁性ナノビーズであることが好ましい。抗体ナノビーズ50が磁性ナノビーズであったとしても、磁性マイクロビーズ10と、非連結の抗体ナノビーズ50とを分離することが可能である。

[0025] 具体的には、図9に示すようにして、磁性マイクロビーズ10と非連結の抗体ナノビーズ50とを分離することができる。図9において、(a)は、容器60内に抗体ナノビーズ50が連結された磁性マイクロビーズ10と非連結の抗体ナノビーズ50とを含む緩衝液21を注入した状態である。図9の(a)は図7の状態に相当する。容器60の底部に磁石を配置する磁気捕集または弱遠心分離によって、図9の(b)に示すように、磁性マイクロビーズ10と非連結の抗体ナノビーズ50とを大方分離することができる。

[0026] これは、磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50との体積が約10

00倍異なるため、磁性マイクロビーズ10は短時間で磁気捕集されるのに対し、抗体ナノビーズ50は長時間かけないと磁気捕集されないからである。この磁気捕集の時間差を利用することによって、磁性マイクロビーズ10と非連結の抗体ナノビーズ50とを大方分離することができる。

[0027] 磁性マイクロビーズ10を洗浄する工程において、図9の(b)の主として磁性マイクロビーズ10である沈殿物を回収して上清を除去して緩衝液21を加えれば、図9の(c)に示すように非連結の抗体ナノビーズ50を大幅に減らすことができる。図9の(c)に示す状態で磁気捕集すれば図9の(d)となり、沈殿物を回収して上清を除去して緩衝液21を加えれば、図9の(e)に示すように非連結の抗体ナノビーズ50をさらに大幅に減らすことができる。

[0028] 図9の(e)に示す状態で磁気捕集すれば図9の(f)となり、沈殿物を回収して上清を除去して緩衝液21を加えれば、図9の(g)に示すように抗体ナノビーズ50が連結された磁性マイクロビーズ10のみを分離することができる。図9の(g)は図8の状態に相当する。沈殿物回収及び上清除去の回数は図9に示す回数に限定されない。

[0029] 図10に示すように、オペレータは、ステップS15にて、エクソソーム32を磁性マイクロビーズ10から切り離す処理を実行する。すると、抗体ナノビーズ50が結合したダブルポジティブのエクソソーム32wと、抗体ナノビーズ50が結合していないシングルポジティブのエクソソーム32sとが、磁性マイクロビーズ10から切り離される。

[0030] ステップS15のエクソソーム32を磁性マイクロビーズ10から切り離す処理としては、以下のいずれかの方法を採用することができる。第1の方法として、図11に示すハプテンを用いる方法がある。ハプテンとは、抗体と結合するが、分子量が小さいため単独で抗体産生を誘起する活性(免疫原性)を示さない物質である。ハプテンは、適当なたんぱく質と結合すると、免疫原性を有する完全抗原となる。

[0031] 図11に示すように、磁性マイクロビーズ10には抗体51の代わりに抗

DNP抗体52が固定されている。DNPとは、4-ジニトロフェノールであって、ハプテンの一例である。抗DNP抗体52には、DNP53が結合した抗体54（以下、DNP抗体54）を介して、ダブルポジティブのエクソソーム32wまたはシングルポジティブのエクソソーム32sが結合されている。DNP抗体54はCD147と特異的に結合する抗体である。

[0032] この状態で抗DNP抗体52とDNP抗体54との結合は平衡反応である。磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50とでサンドイッチ捕捉されたエクソソーム32wを含む緩衝液21（第3の緩衝液）にDNP53（ハプテン）を大過剰に添加すると、抗DNP抗体52と結合していたDNP抗体54がDNP53に入れ替わって、磁性マイクロビーズ10と、抗体ナノビーズ50と結合しているダブルポジティブのエクソソーム32w及びシングルポジティブのエクソソーム32sとが切り離される。

[0033] エクソソーム32を磁性マイクロビーズ10から切り離す第2の方法として、図12に示す開裂可能なリンカー55を用いる方法がある。磁性マイクロビーズ10には、リンカー55を介して抗体11が固定されている。第2の方法を用いる場合、図8に示す磁性マイクロビーズ10にはリンカー55を介して抗体11が固定され、抗体11がエクソソーム32と結合している。

[0034] 反応容器20内の緩衝液21（第3の緩衝液）にリンカー開裂試薬を添加すると、図12に示すように、リンカー55が開裂して、磁性マイクロビーズ10と抗体11とが切り離される。

[0035] エクソソーム32を磁性マイクロビーズ10から切り離す第3の方法として、磁性マイクロビーズ10にWhole抗体を用い、抗体ナノビーズ50にFab抗体を用いてもよい。Whole抗体を酵素で分解及び消化すれば、エクソソーム32を磁性マイクロビーズ10から切り離すことができる。

[0036] 図1Bにおいて、オペレータは、ステップS16にて、磁性マイクロビーズ10と、ダブルポジティブのエクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50及びシングルポジティブのエクソソーム32sとを分離する。分離さ

れた磁性マイクロビーズ10を洗浄すれば、図13に示す磁性マイクロビーズ10を回収することができる。図13において、磁性マイクロビーズ10のみを含む緩衝液21は反応容器20に注入されている。

[0037] 分離されたエクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50及びエクソソーム32sを洗浄すれば、図14に示すエクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50及びエクソソーム32sを回収することができる。図14において、エクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50及びエクソソーム32sを含む緩衝液21は容器22に注入されている。

[0038] ステップS16における磁性マイクロビーズ10と、エクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50及びエクソソーム32sとの分離は、図9と同様に実行することができる。但し、ステップS16の分離においては、上清を廃棄せず、上清に含まれるエクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50及びエクソソーム32sを回収する必要がある。

[0039] 具体的には、図15A及び図15Bに示すようにして、磁性マイクロビーズ10とエクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50とを分離することができる。図15A及び図15Bにおいてはエクソソーム32sの図示を省略している。

[0040] 図15Aにおいて、(a)は、容器61内に互いに分離した磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50とを含む緩衝液21を注入した状態である。図16Aの(a)は図10の状態に相当する。容器61の底部に磁石を配置する磁気捕集または弱遠心分離によって、図15Aの(b)に示すように、磁性マイクロビーズ10と抗体ナノビーズ50とを大方分離することができる。

[0041] 図15Aの(b)の主として磁性マイクロビーズ10である沈殿物を回収して緩衝液21を加えれば、図15Aの(c)に示すように抗体ナノビーズ50を大幅に減らすことができる。図15Aの(d)に示すように、上清を容器62に回収すれば、抗体ナノビーズ50を多く含む緩衝液21を得ることができる。図15Aの(c)に示す状態で磁気捕集すれば図15Aの(e

)となる。

[0042] 図15Aの(e)の主として磁性マイクロビーズ10である沈殿物を回収して緩衝液21を加えれば、図15Bの(f)に示すように抗体ナノビーズ50をさらに減らすことができる。図15Bの(g)に示すように、上清を容器63に回収すれば、抗体ナノビーズ50を含む緩衝液21を得ることができる。図15Bの(f)に示す状態で磁気捕集すれば図15Bの(h)となる。

[0043] 図15Bの(h)の磁性マイクロビーズ10のみとなった沈殿物を回収して緩衝液21を加えれば、図15Bの(i)に示すように抗体ナノビーズ50を含まない磁性マイクロビーズ10のみを含む緩衝液21を得ることができる。図15Bの(i)は図13の状態に相当する。図15Bの(j)に示すように、上清を容器64に回収すれば、抗体ナノビーズ50をわずかに含む緩衝液21を得ることができる。

[0044] 図15Bの(k)に示すように、容器62~64全ての抗体ナノビーズ50を合わせれば、磁性マイクロビーズ10に結合していた、エクソソーム32wと結合した全ての抗体ナノビーズ50を回収することができる。このとき、エクソソーム32sも回収することができる。図15Bの(k)は図14の状態に相当する。沈殿物回収及び上清回収の回数は図15A及び図15Bに示す回数に限定されない。

[0045] 図1Bにおいて、オペレータは、ステップS17にて、エクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50とエクソソーム32sとを分離する。エクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50とエクソソーム32sとは、図15A及び図15Bと同様の方法によって分離して個別に回収することができる。

[0046] 分離されたエクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50を洗浄すれば、図16に示すエクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50を回収することができる。図16において、エクソソーム32wと結合した抗体ナノビーズ50のみを含む緩衝液21は容器23に注入されている。分離され

たエクソソーム32sを洗浄すれば、図17に示すエクソソーム32sを回収することができる。図17において、エクソソーム32sのみを含む緩衝液21は容器24に注入されている。

[0047] オペレータは、ステップS18にて、エクソソーム32sを溶解処理してエクソソーム32sの内包物を分析する。エクソソーム32sを含む緩衝液21に界面活性剤を添加すると、エクソソーム32sの脂質二重膜320が溶解処理されて破壊される。1またはそれ以上の実施形態においては、ダブルポジティブのエクソソーム32wを分析することを主目的としているので、ステップS18は省略されてもよい。

[0048] オペレータは、ステップS19にて、抗体ナノビーズ50とエクソソーム32wとを切り離す処理を実行する。一例として、図16に示す緩衝液21に界面活性剤を添加することによって、図18に示すように、抗体ナノビーズ50とエクソソーム32wとを切り離すことができる。例えば、界面活性剤は2%の非イオン性界面活性剤であるTritonX-100溶液である。界面活性剤によってエクソソーム32wの脂質二重膜320が溶解処理されるので、エクソソーム32wが破壊されることによって抗体ナノビーズ50とエクソソーム32wとが切り離され、かつ、エクソソーム32wの内包物が緩衝液21中に放出される。図18において、実際には各エクソソーム32wは脂質二重膜320が破壊されて複数の内包物に分断される。

[0049] オペレータは、ステップS20にて、抗体ナノビーズ50とエクソソーム32wの内包物とを分離して個別に回収する。抗体ナノビーズ50とエクソソーム32wの内包物とは、図15A及び図15Bと同様の方法によって分離することができる。

[0050] 分離された抗体ナノビーズ50を洗浄すれば、図19に示す抗体ナノビーズ50を回収することができる。図19において、抗体ナノビーズ50のみを含む緩衝液21は容器24に注入されている。分離されたエクソソーム32wの内包物を洗浄すれば、図20に示すエクソソーム32wの内包物を回収することができる。図20においても、実際には各エクソソーム32wは

複数の内包物に分断されている。図20において、エクソソーム32wの内包物のみを含む緩衝液21は容器25に注入されている。

[0051] オペレータは、ステップS21にて、容器25内のエクソソーム32wの内包物を取り出して内包物を分析する。このとき、RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction) 分析、LC-MS (Liquid Chromatography - Mass Spectrometry) 分析等の分析方法によって、内包物中のDNAまたはタンパク質を解析することができる。また、オペレータは、ステップS22にて、抗体ナノビーズ50の個数を計測する。オペレータは、ステップS21とステップS22とを任意の順番で行えばよく、複数のオペレータによって同時に行ってもよい。ステップS18とステップS21とステップS22との順番も任意である。オペレータがステップS21及びS22（または、ステップS18、S21及びS22）を実行すれば、生体試料分析の処理が終了する。

[0052] ステップS22で個数が計測される抗体ナノビーズ50はダブルポジティブのエクソソーム32wと結合していたものであるから、ステップS22では、CD147及びHER2の双方が存在するエクソソーム32wの個数が計測されることになる。ステップS21で内包物が分析されるエクソソーム32は、シングルポジティブのエクソソーム32sを取り除いたダブルポジティブのエクソソーム32wのみであり、ステップS22で個数が計測されるエクソソーム32wである。

[0053] よって、内包物を分析したダブルポジティブのエクソソーム32wと、個数を計測したダブルポジティブのエクソソーム32wとは同一のものである。図4に示す1つの検体31で、疾患に関連した膜たんぱく質であるCD147及びHER2の双方が存在するダブルポジティブのエクソソーム32wの内包物を分析し、かつ、そのエクソソーム32wの個数を計測することができる。

[0054] 図21～図23を用いて、図1BのステップS22の具体的な抗体ナノビーズ50の個数の計測方法を説明する。図21において、オペレータは、ス

ステップS 2 2 1にて、図2 2の(a)に示すように、抗体ナノビーズ5 0に固定されている抗体5 1と結合する抗体8 2(第3の抗体)を固定させたディスク基板8 1を準備する。抗体8 2は一例としてGoat anti Mouse IgG抗体である。

[0055] ディスク基板8 1は円盤状であるのがよく、径方向に凹部8 1 Gと凸部8 1 Lとが交互に配置されているのがよい。凹部8 1 G及び凸部8 1 Lはスパイラル状または同心円状に形成されている。

[0056] 図2 2の(b)に示すように、オペレータは、複数の例えば円筒状の貫通穴が形成されたカートリッジ8 3をディスク基板8 1に装着する。すると、ディスク基板8 1とカートリッジ8 3とでウェル8 3 Wが形成される。図2 2の(c)に示すように、オペレータは、ステップS 2 2 2にて、回収した抗体ナノビーズ5 0を含む緩衝液2 1を各ウェル8 3 Wに分注する。なお、カートリッジ8 3は特許文献2に記載の構成を採用することができる。

[0057] 図2 2の(d)に示すように、オペレータは、ステップS 2 2 3にて、振盪または磁気吸着によって、抗体ナノビーズ5 0の抗体5 1とディスク基板8 1に固定された抗体8 2とを結合させる。抗体ナノビーズ5 0を磁性ナノビーズとして、ディスク基板8 1の裏面側に磁石を配置すれば、抗体ナノビーズ5 0がディスク基板8 1の表面に引き寄せられる。これにより、ディスク基板8 1に固定された抗体8 2に抗体ナノビーズ5 0の抗体5 1が結合しやすくなる。

[0058] オペレータは、ステップS 2 2 4にて、ウェル8 3 W中の上清を排出し、ステップS 2 2 5にて、ディスク基板8 1を乾燥させる。図2 2の(e)に示すように、オペレータは、ステップS 2 2 6にて、乾燥させたディスク基板8 1を分析装置に装着して、分析装置でディスク基板8 1に固定された抗体ナノビーズ5 0の個数を計測する。分析装置は、ディスク基板8 1に集光レンズ1 0 1によって集光したレーザビームを照射して抗体ナノビーズ5 0の個数を計測する。なお、分析装置は特許文献3に記載の構成を採用することができる。

- [0059] 図23に示すように、ディスク基板81に抗体82を固定する代わりに、ディスク基板81の表面を酸素プラズマ処理してカルボキシル基(COOH)等の極性官能基を形成してもよい。抗体ナノビーズ50の抗体51は極性官能基に吸着する。
- [0060] 以上のように、1またはそれ以上の実施形態の生体試料分析方法によれば、1つの生体試料(検体31)で、疾患に関連した2種類の抗原(膜たんぱく質)を含むダブルポジティブのエクソソーム32wの内包物を分析し、かつ、そのエクソソーム32wの個数を計測することができる。
- [0061] 本発明は以上説明した1またはそれ以上の実施形態に限定されるものではなく、本発明の要旨を逸脱しない範囲において種々変更可能である。1またはそれ以上の実施形態においては、第1のビーズを磁性マイクロビーズ10、第2のビーズを抗体ナノビーズ50としているが、第1のビーズと第2のビーズとは互いに分離可能な程度に大きさが異なればよい。第1のビーズをマイクロビーズ、第2のビーズをナノビーズとすると互いに容易に分離可能となるので、第1のビーズをマイクロビーズ、第2のビーズをナノビーズとすることが好ましい。
- [0062] 第1のビーズは磁性ビーズであることが好ましいが、非磁性ビーズとすることも可能である。第1のビーズを磁性ビーズ、第2のビーズが非磁性ビーズとすれば、互いの分離が極めて容易となる。第2のビーズを磁性ビーズとすれば、第2のビーズをディスク基板81に固定させやすくなる。第1のビーズを非磁性ビーズ、第2のビーズを磁性ビーズとしてもよい。第1のビーズ及び第2のビーズを磁性ビーズとしてもよい。
- [0063] 本願は、2020年2月17日に日本国特許庁に出願された特願2020-024511号に基づく優先権を主張するものであり、その全ての開示内容は引用によりここに援用される。

## 請求の範囲

- [請求項1] 第1の疾患に関連した第1の抗原と特異的に結合する第1の抗体を表面に固定した複数の第1のビーズを含む第1の緩衝液が注入された反応容器に、第2の疾患に関連した第2の抗原と特異的に結合する第2の抗体を表面に固定した複数の第2のビーズと、前記第1の抗原及び前記第2の抗原を表面に有する分析対象のエクソソームを含む生体試料とを注入して、前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象のエクソソームを含む第2の緩衝液を生成し、
- 前記第2の緩衝液から、前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象のエクソソームを回収し、
- 回収した前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象のエクソソームから前記第1のビーズを切り離し、前記第2のビーズが結合した前記分析対象のエクソソームを回収し、
- 回収した前記第2のビーズが結合した前記分析対象のエクソソームを溶解処理して、前記第2のビーズと前記分析対象のエクソソームの内包物とに分離してそれぞれを回収し、
- 回収した前記分析対象のエクソソームの内包物を分析し、回収した前記第2のビーズの個数を計測する
- 生体試料分析方法。
- [請求項2] 前記第1の抗体は、ハプテンを用いて前記第1のビーズに固定されており、
- 前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象のエクソソームを含む第3の緩衝液にハプテンを添加することによって、前記第1のビーズを切り離す
- 請求項1に記載の生体試料分析方法。
- [請求項3] 前記第1の抗体は、開裂可能なリンカーを用いて前記第1のビーズに固定されており、
- 前記第1のビーズと前記第2のビーズとが結合した前記分析対象の

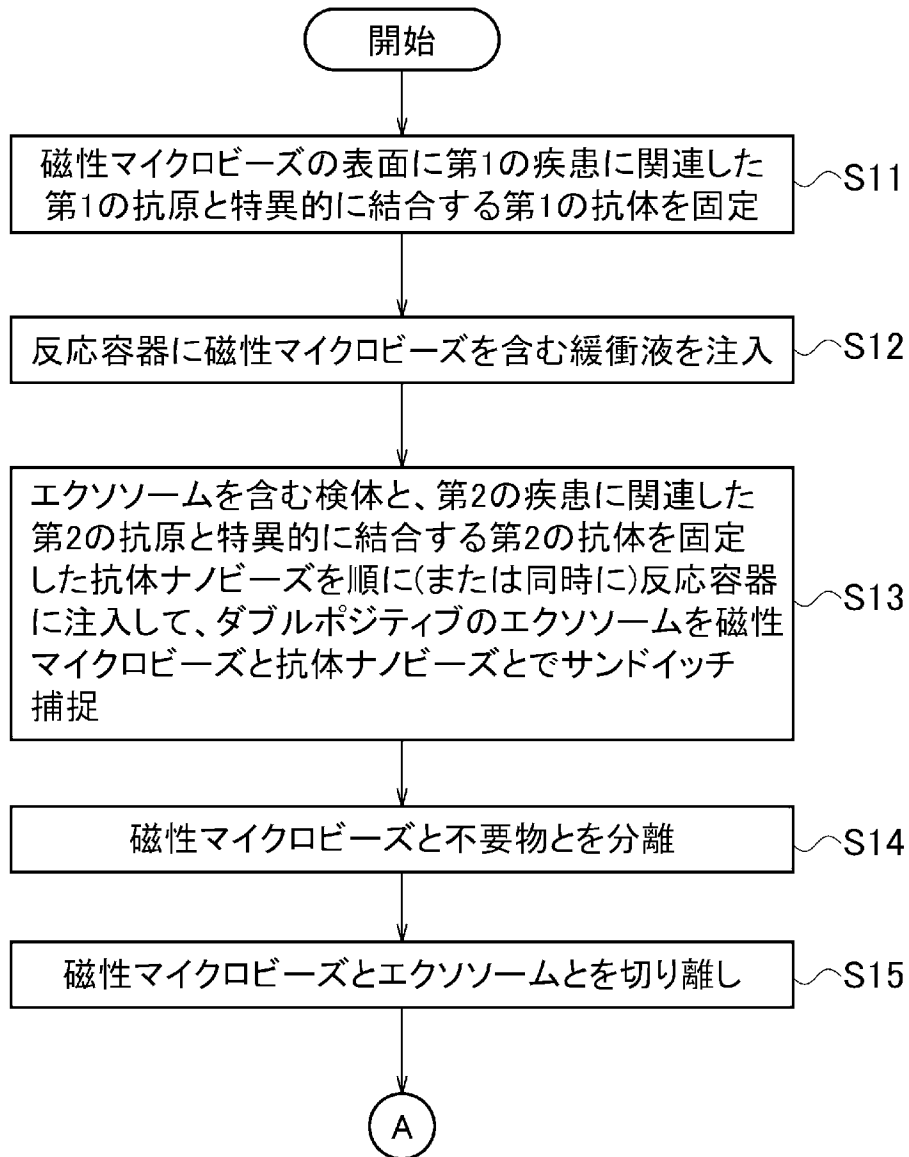
エクソソームを含む第3の緩衝液に前記リンカーの開裂試薬を添加することによって、前記第1のビーズを切り離す

請求項1に記載の生体試料分析方法。

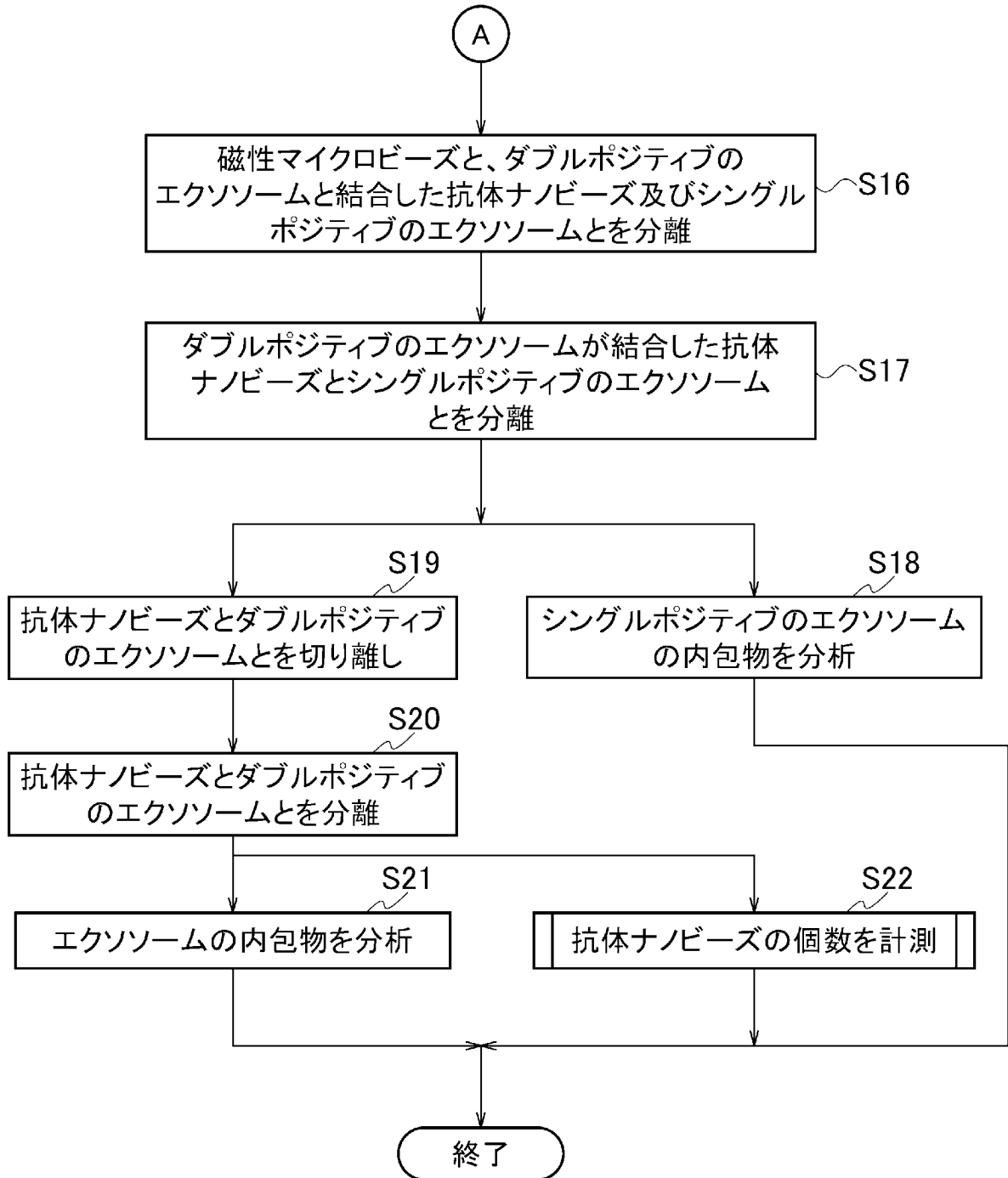
[請求項4] 前記溶解処理に界面活性剤を用いる請求項1～3のいずれか1項に記載の生体試料分析方法。

[請求項5] 前記第1のビーズが磁性ビーズである請求項1～4のいずれか1項に記載の生体試料分析方法。

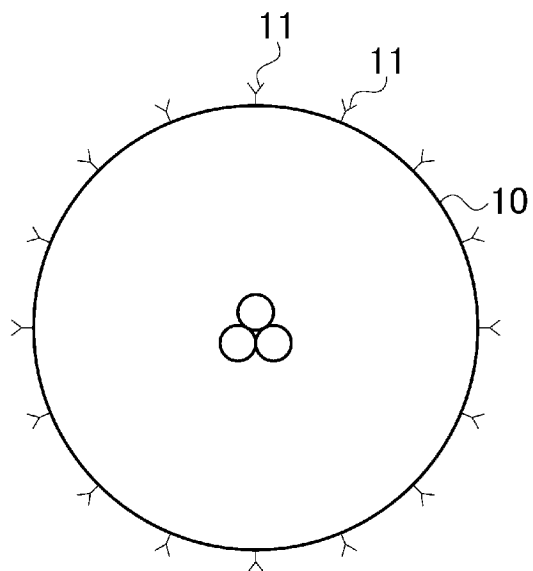
[図1A]



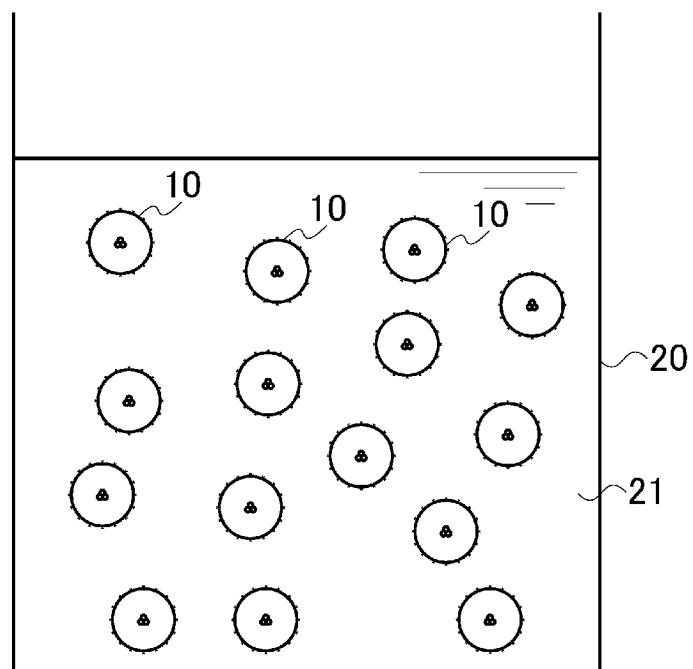
[図1B]



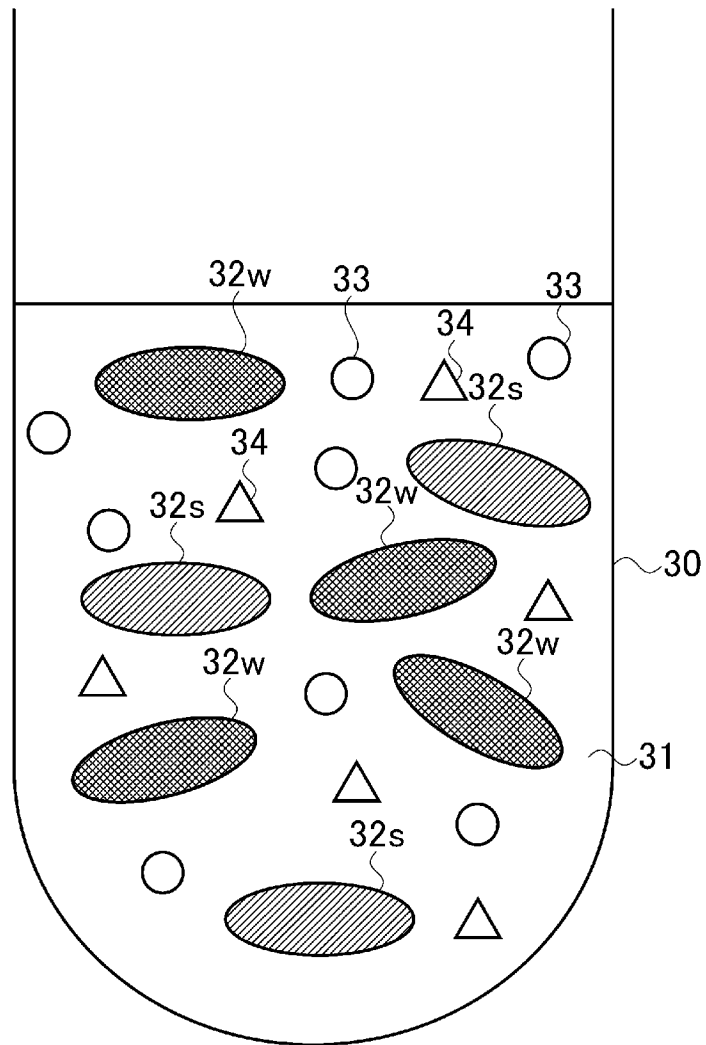
[図2]



[図3]

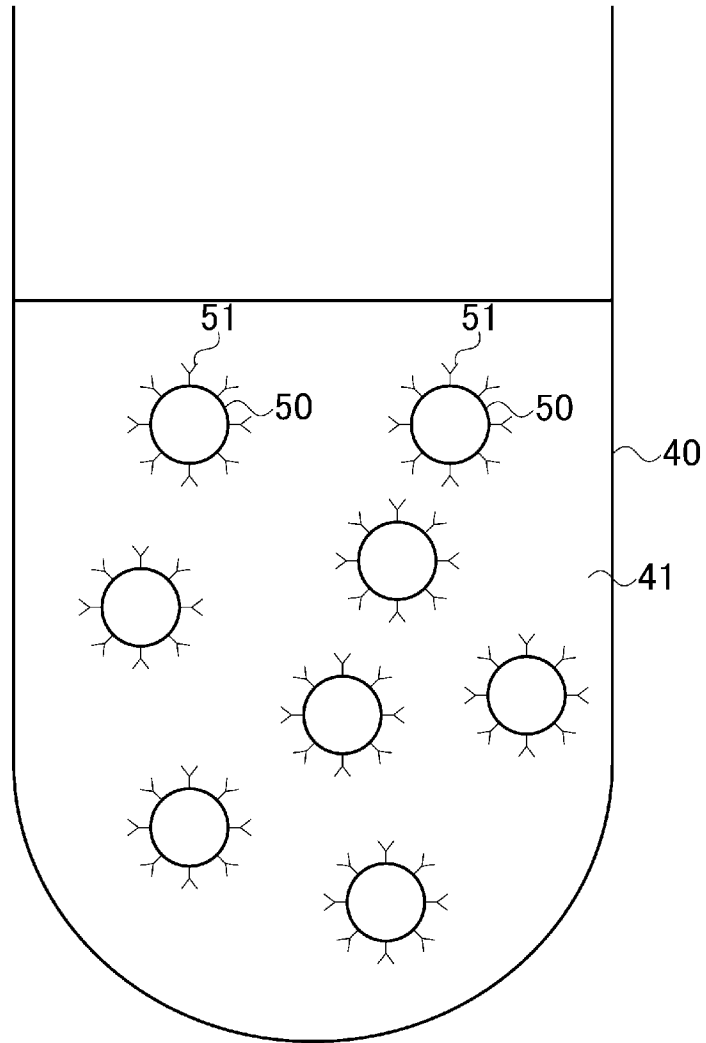


[図4]

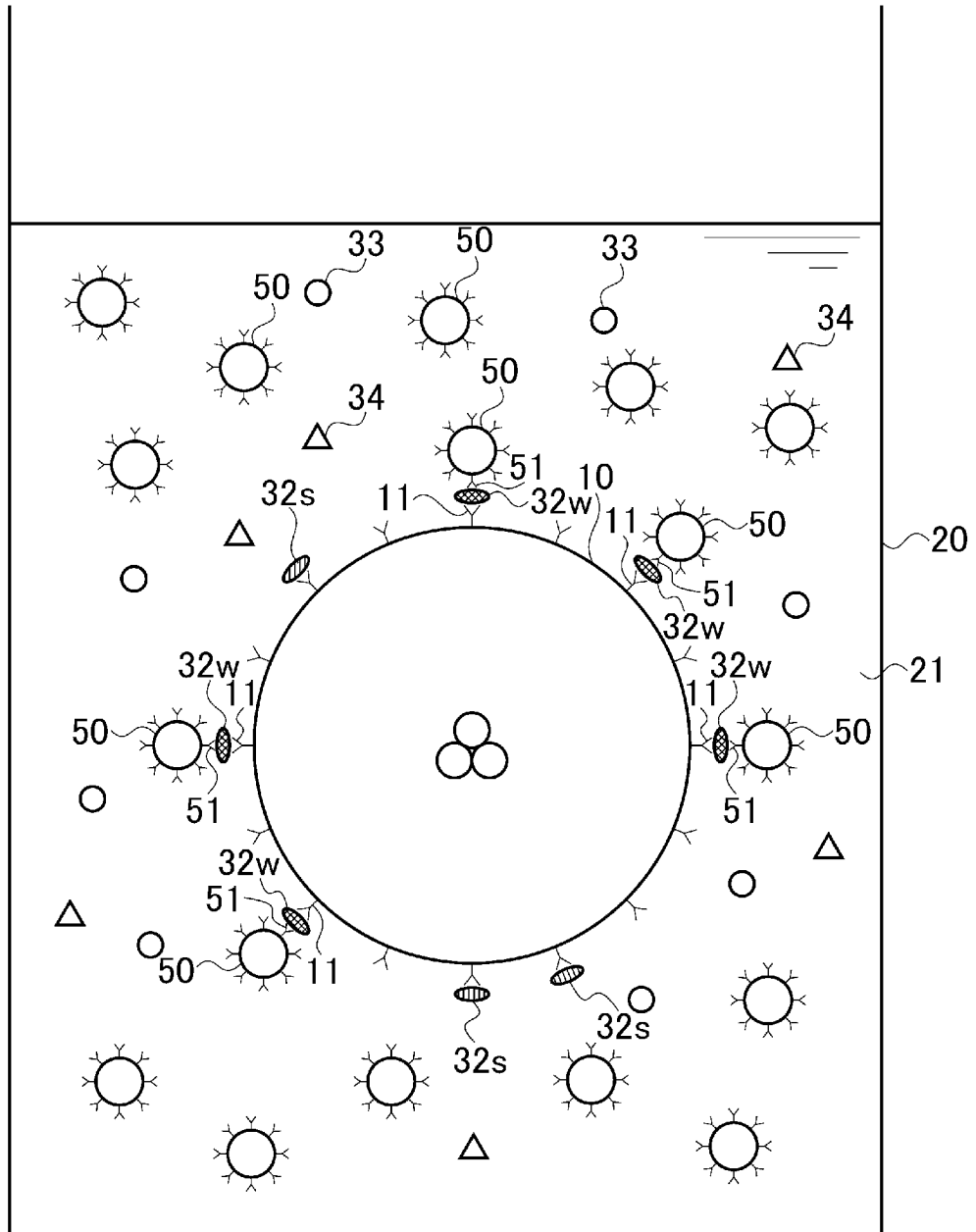




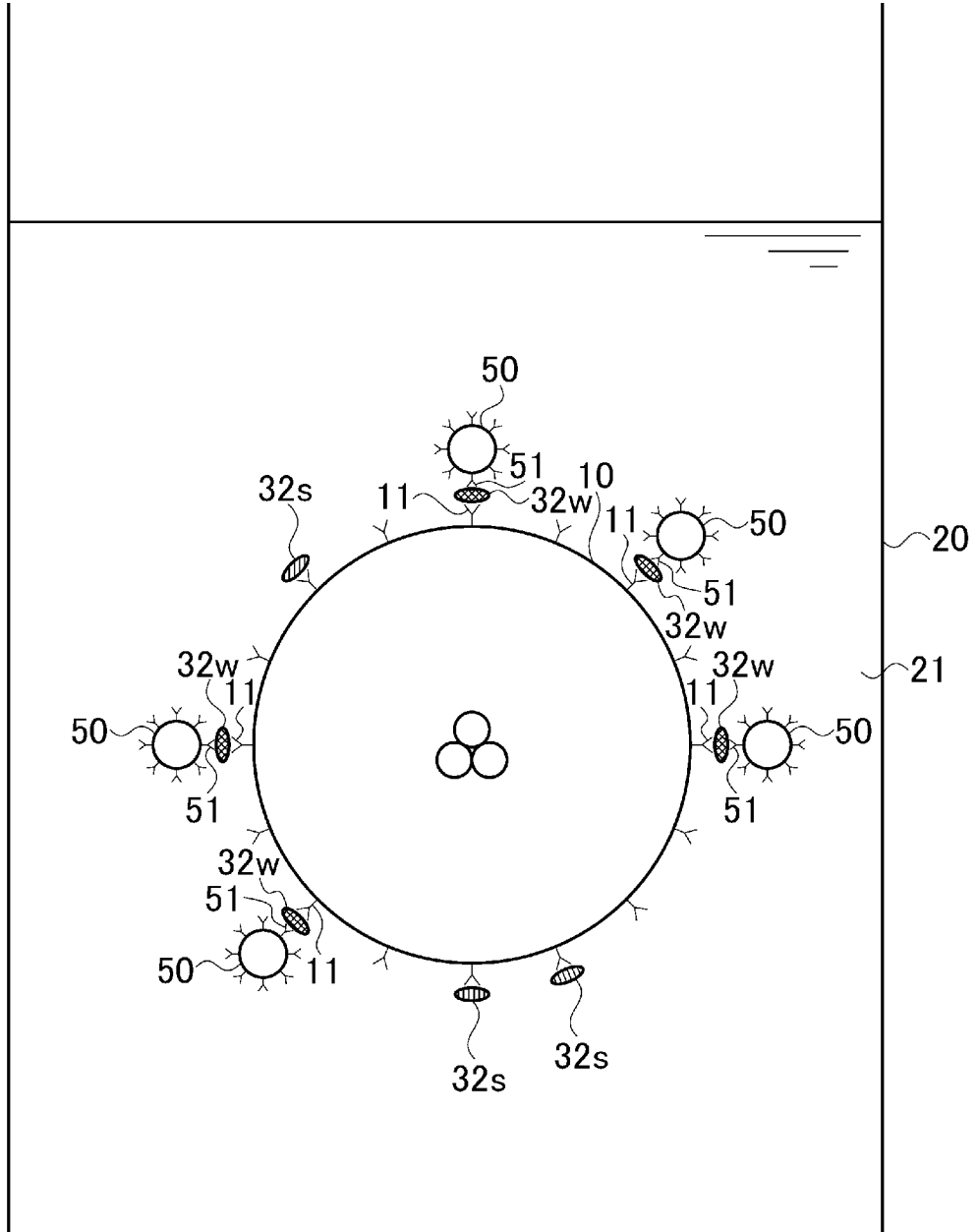
[図6]



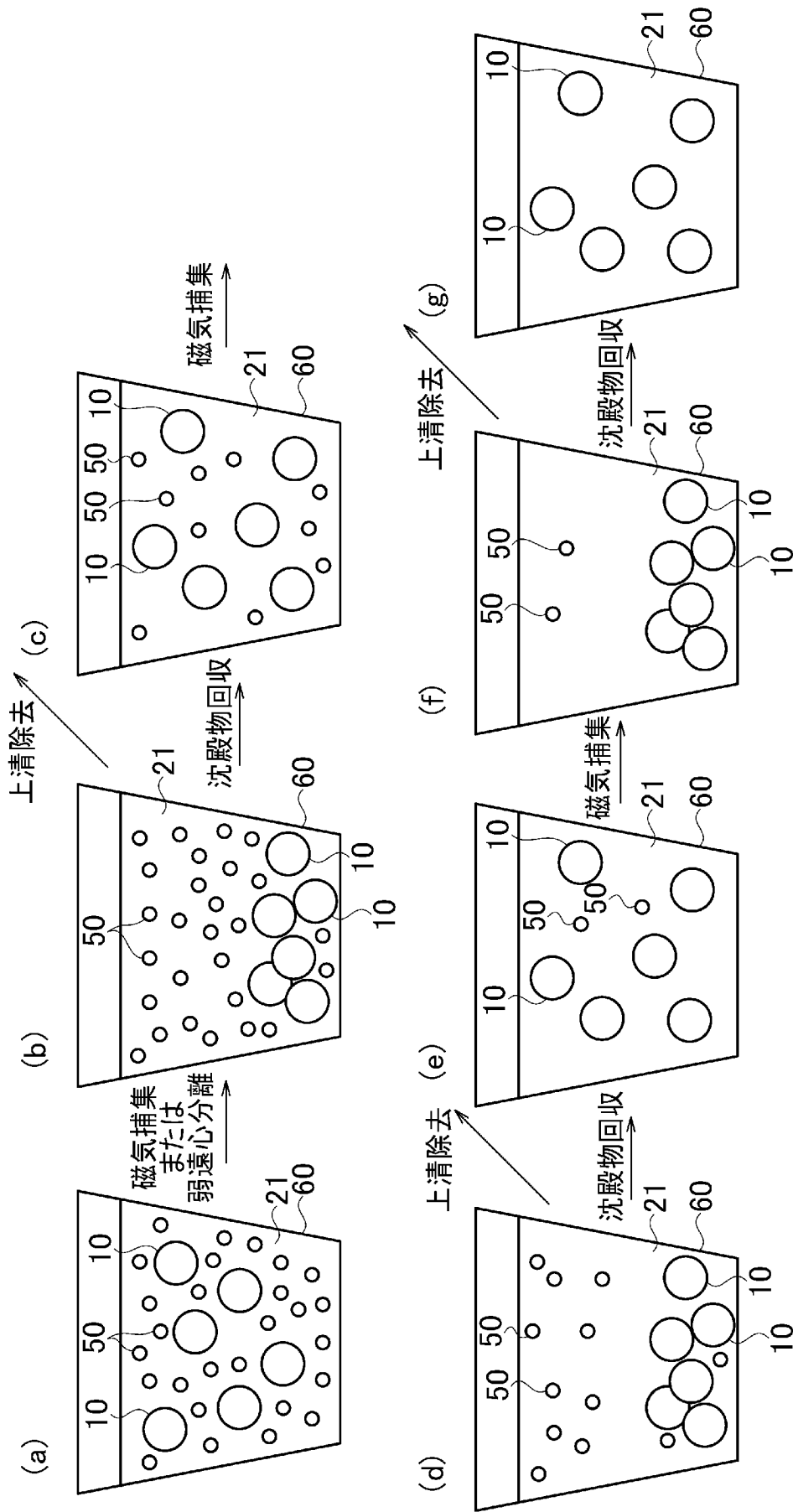
[図7]



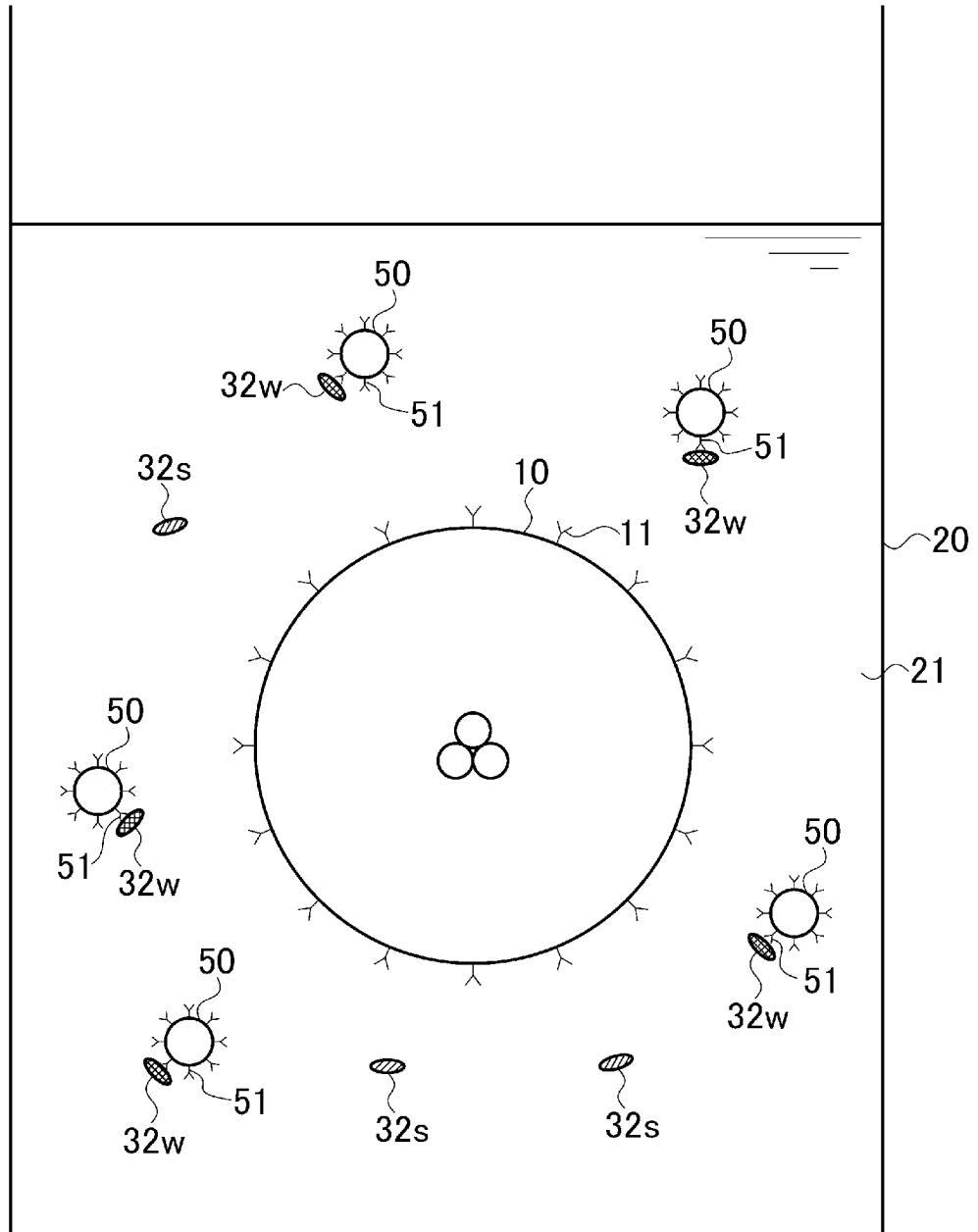
[図8]



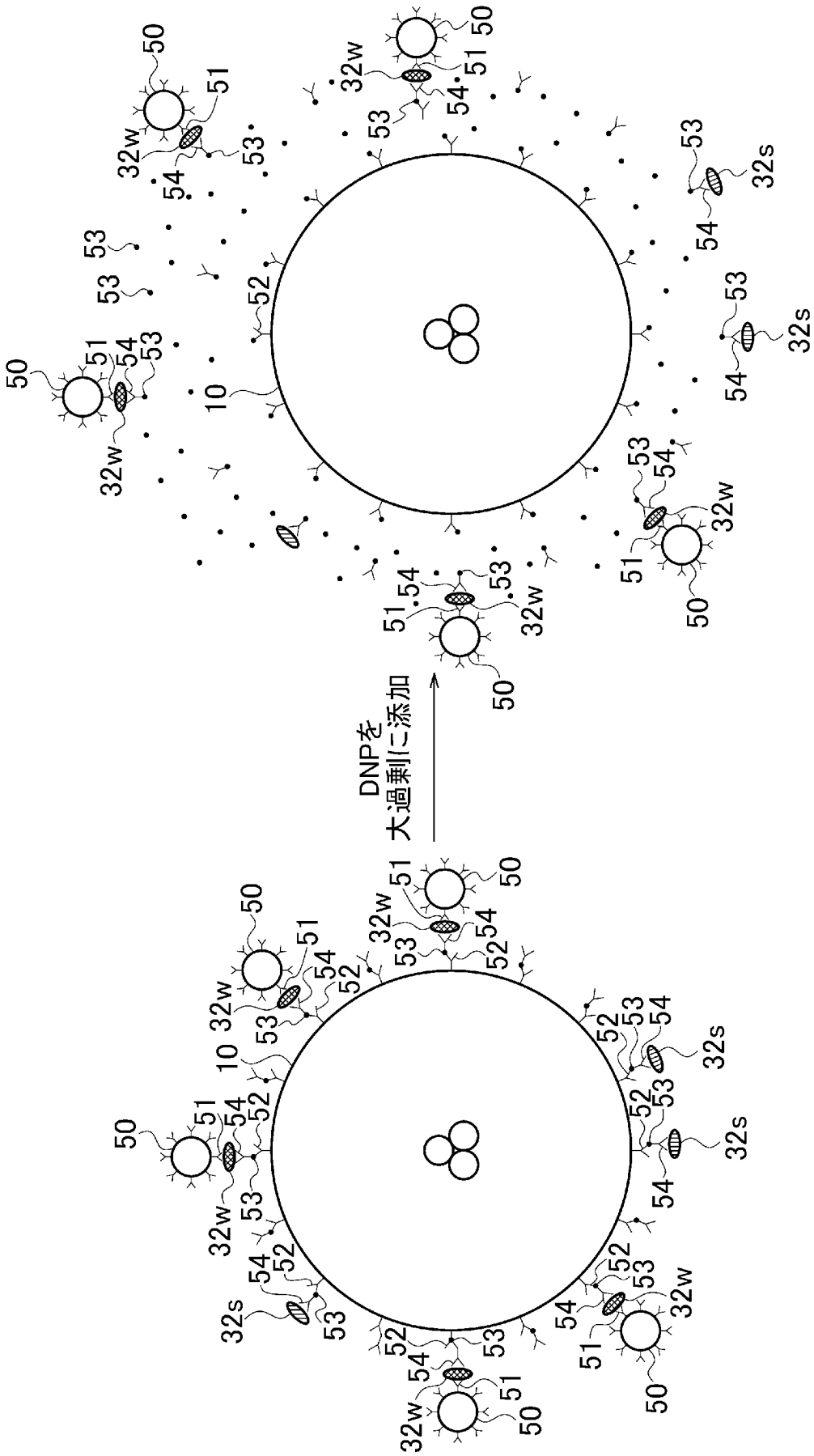
[図9]



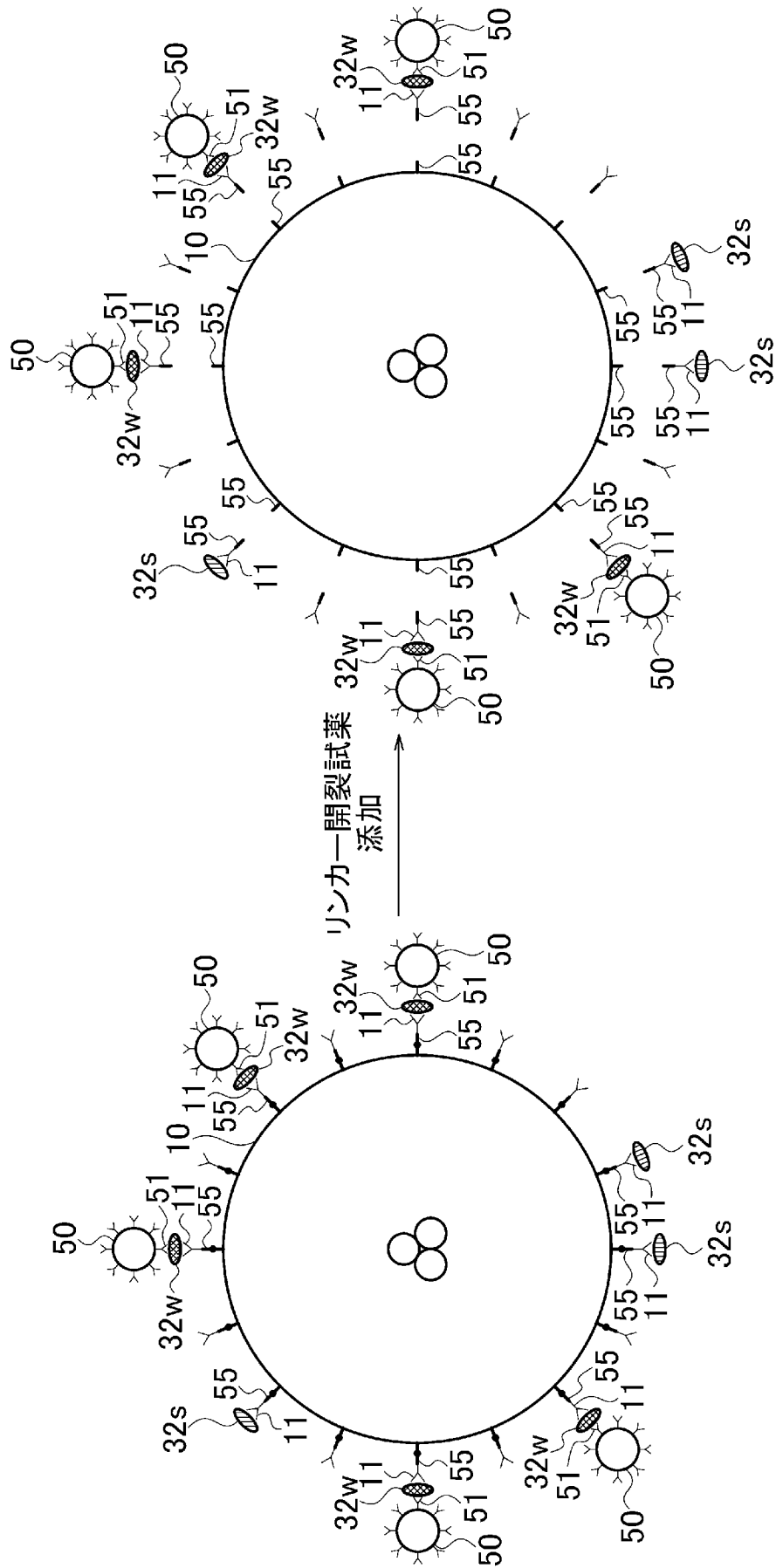
[図10]



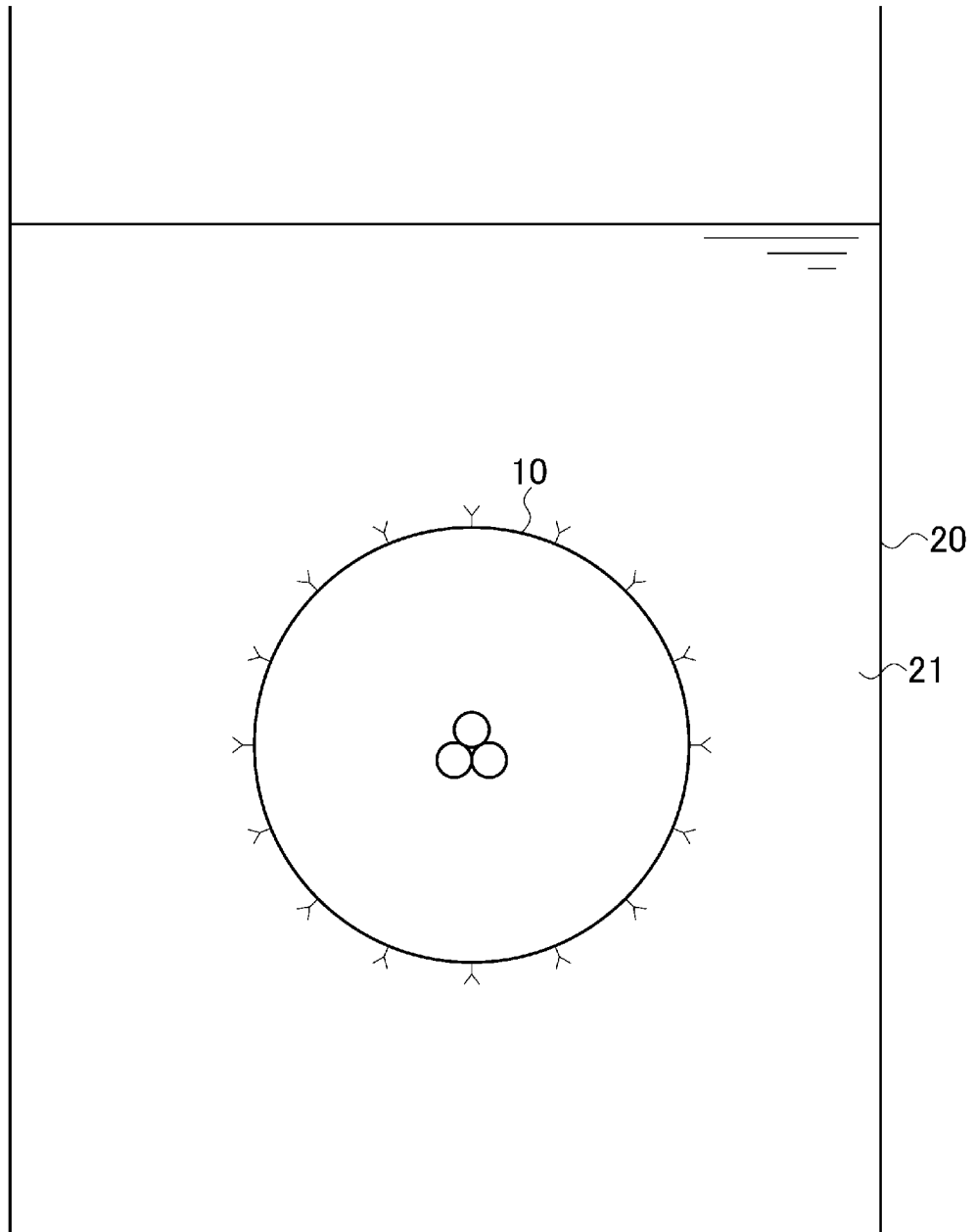
[図11]



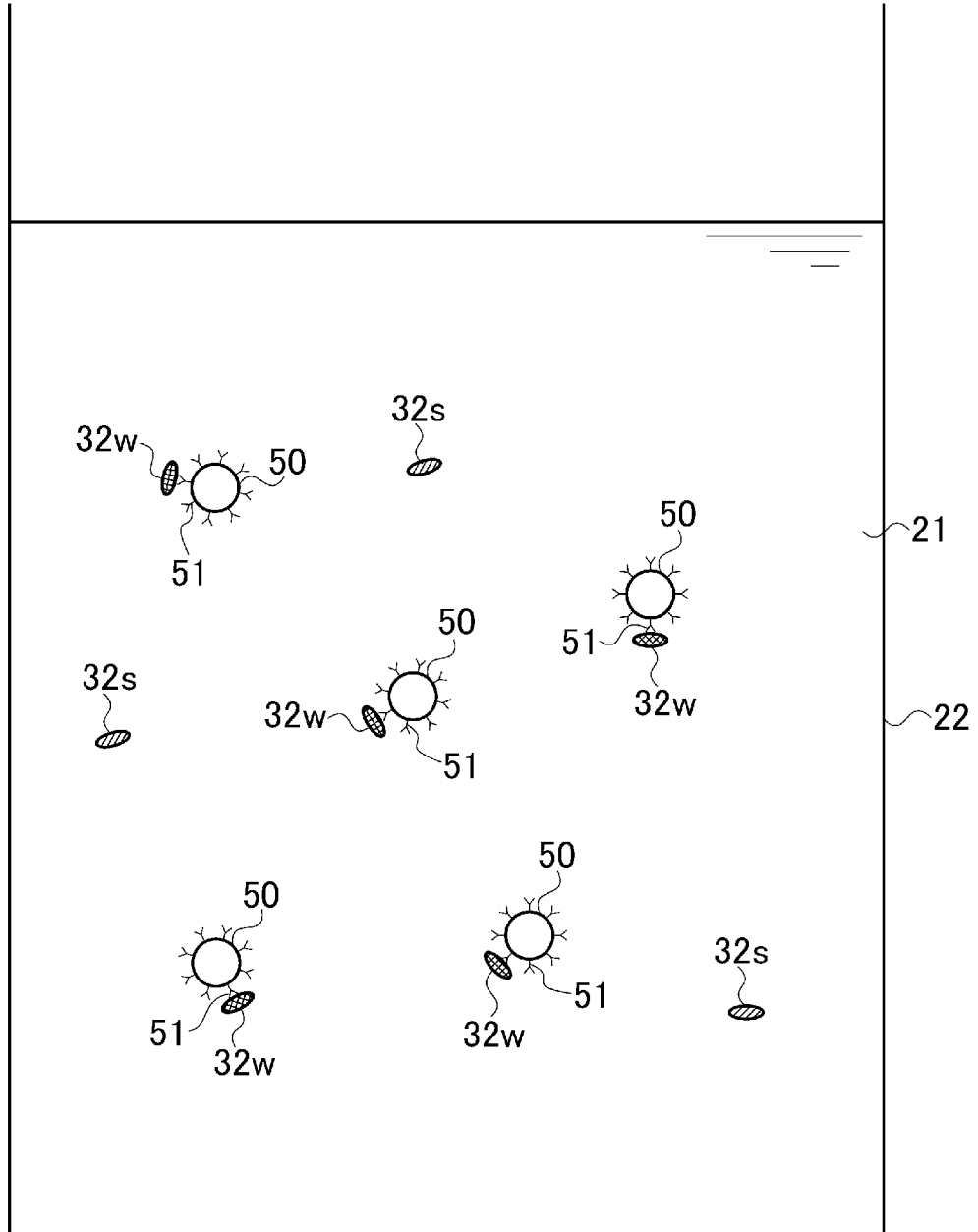
[図12]



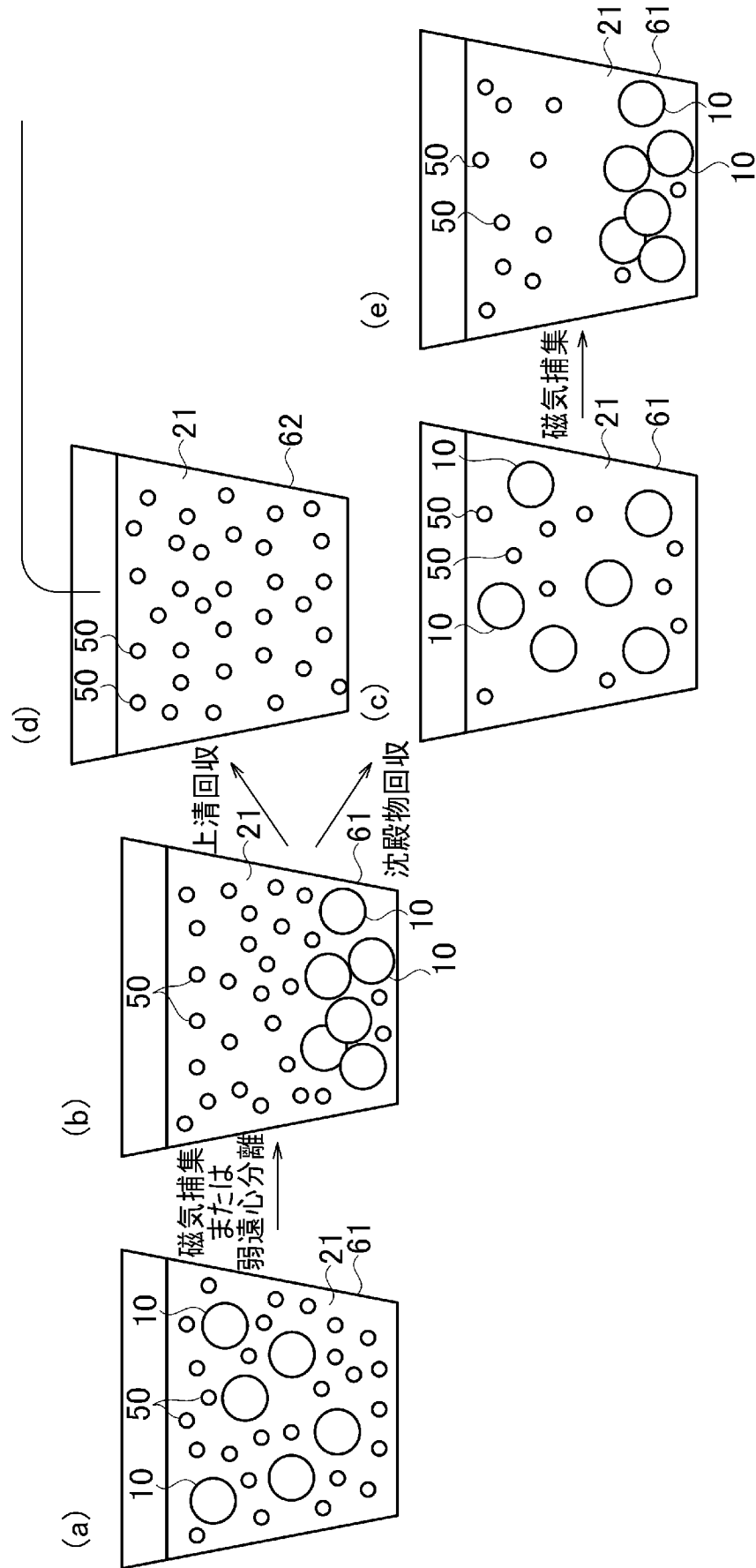
[図13]



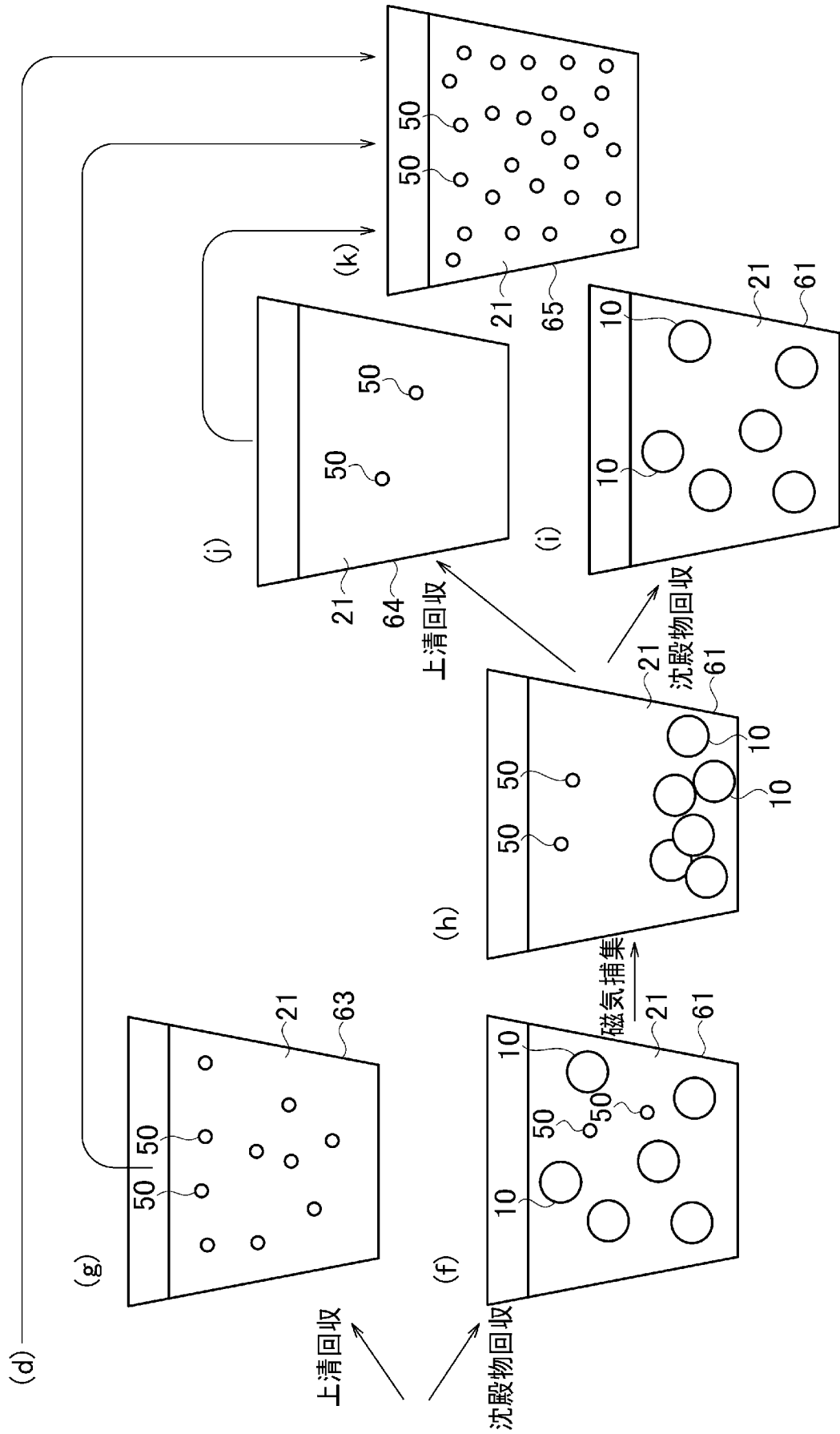
[図14]



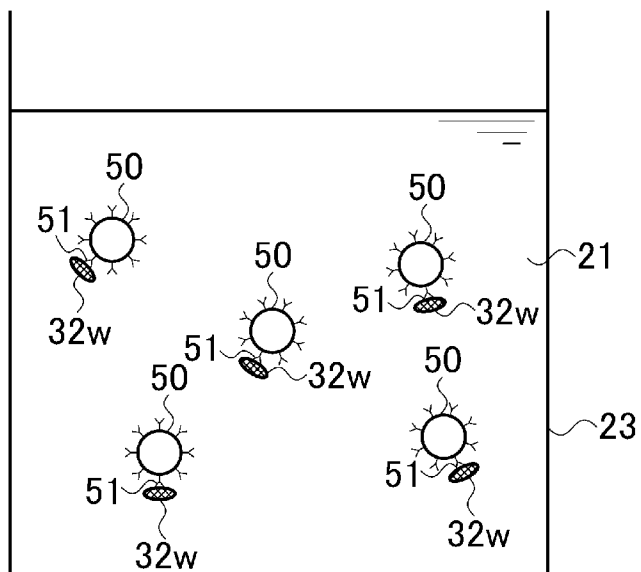
[図15A]



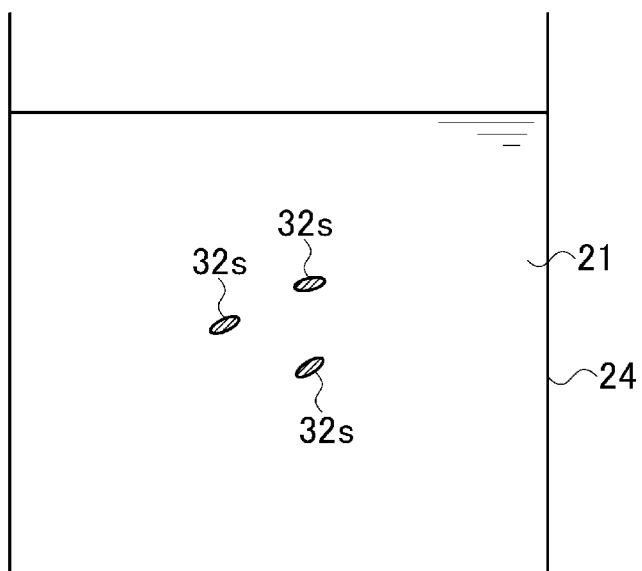
[図15B]



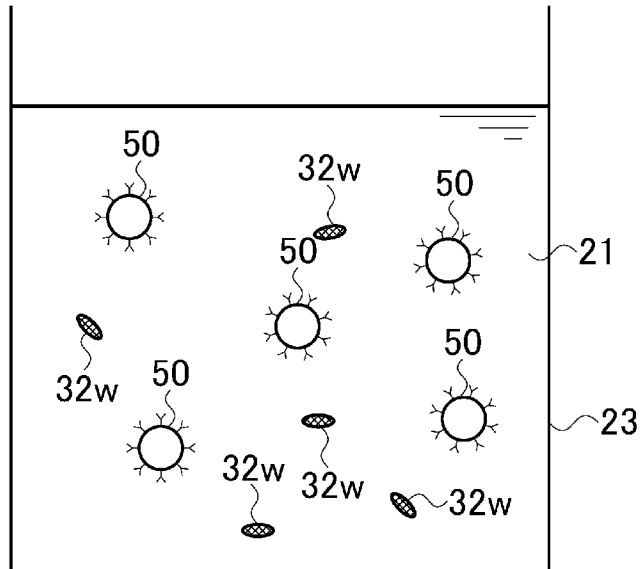
[図16]



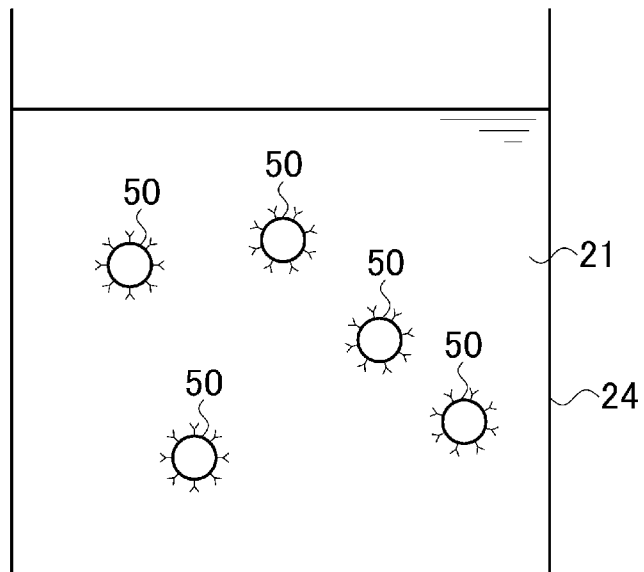
[図17]



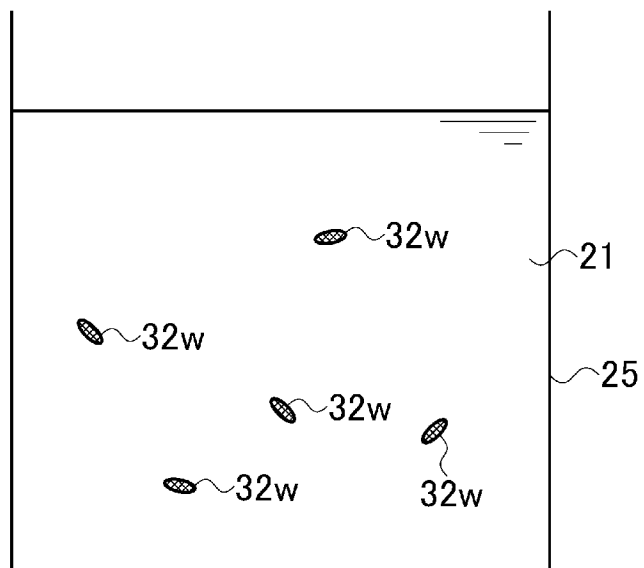
[図18]



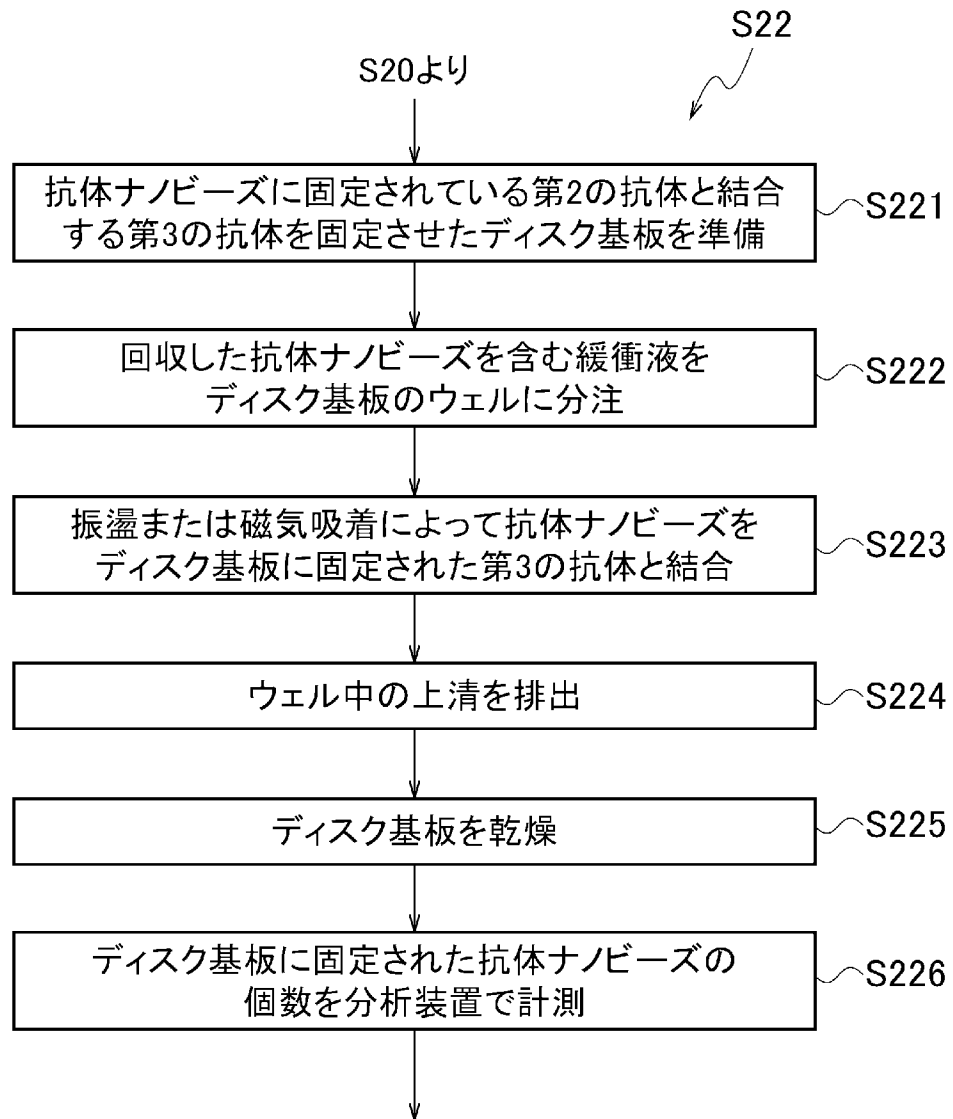
[図19]



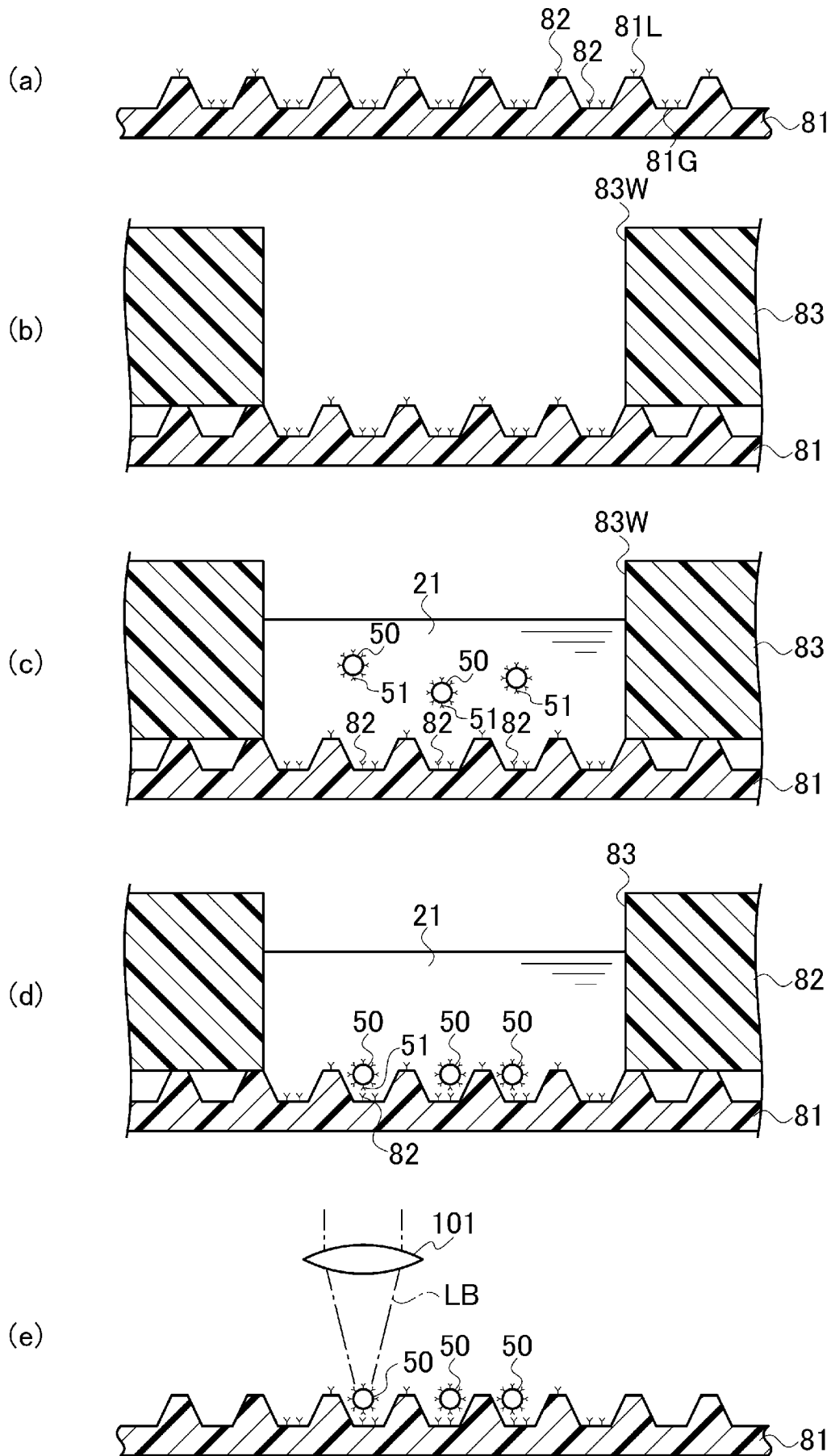
[図20]



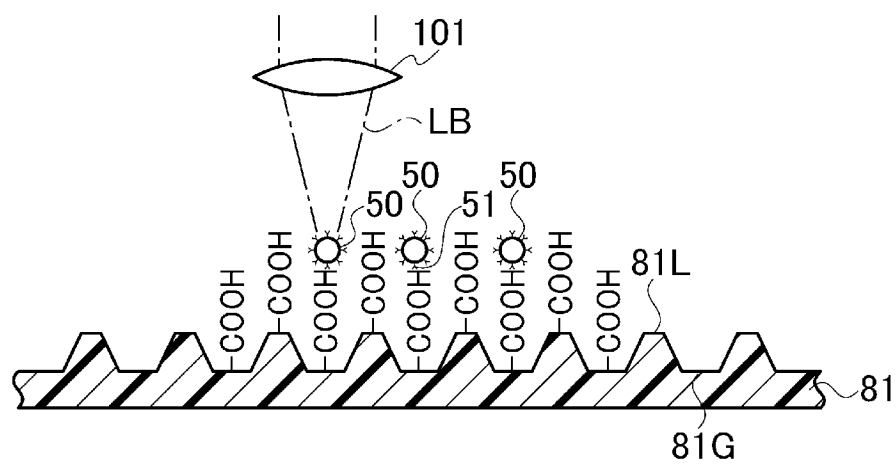
[図21]



[図22]



[図23]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2021/004553

<p><b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>                  Int.Cl. G01N33/53 (2006.01) i, C12Q1/06 (2006.01) i, C12Q1/6806 (2018.01) i,                  G01N33/543 (2006.01) i                  FI: G01N33/53S, G01N33/543541A, C12Q1/06, C12Q1/6806Z, G01N33/543515F                  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																	
<p><b>B. FIELDS SEARCHED</b></p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)                  Int.Cl. G01N33/53, C12Q1/06, C12Q1/6806, G01N33/543</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published examined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1922-1996</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published unexamined utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1971-2021</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Registered utility model specifications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1996-2021</td> </tr> <tr> <td style="padding-left: 20px;">Published registered utility model applications of Japan</td> <td style="text-align: right;">1994-2021</td> </tr> </table> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)</p>			Published examined utility model applications of Japan	1922-1996	Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021	Registered utility model specifications of Japan	1996-2021	Published registered utility model applications of Japan	1994-2021							
Published examined utility model applications of Japan	1922-1996																
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021																
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021																
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021																
<p><b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b></p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width:10%;">Category*</th> <th style="width:70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width:20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td align="center">A</td> <td>JP 2017-138112 A (JVC KENWOOD CORPORATION) 10 August 2017 (2017-08-10), entire text, all drawings</td> <td align="center">1-5</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>WO 2019/039179 A1 (HIROSHIMA UNIVERSITY) 28 February 2019 (2019-02-28), entire text, all drawings</td> <td align="center">1-5</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>WO 2013/094307 A1 (OCHIYA, Takahiro) 27 June 2013 (2013-06-27), entire text, all drawings</td> <td align="center">1-5</td> </tr> <tr> <td align="center">A</td> <td>JP 2017-40595 A (JVC KENWOOD CORPORATION) 23 February 2017 (2017-02-23), entire text, all drawings</td> <td align="center">1-5</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	JP 2017-138112 A (JVC KENWOOD CORPORATION) 10 August 2017 (2017-08-10), entire text, all drawings	1-5	A	WO 2019/039179 A1 (HIROSHIMA UNIVERSITY) 28 February 2019 (2019-02-28), entire text, all drawings	1-5	A	WO 2013/094307 A1 (OCHIYA, Takahiro) 27 June 2013 (2013-06-27), entire text, all drawings	1-5	A	JP 2017-40595 A (JVC KENWOOD CORPORATION) 23 February 2017 (2017-02-23), entire text, all drawings	1-5
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A	JP 2017-138112 A (JVC KENWOOD CORPORATION) 10 August 2017 (2017-08-10), entire text, all drawings	1-5															
A	WO 2019/039179 A1 (HIROSHIMA UNIVERSITY) 28 February 2019 (2019-02-28), entire text, all drawings	1-5															
A	WO 2013/094307 A1 (OCHIYA, Takahiro) 27 June 2013 (2013-06-27), entire text, all drawings	1-5															
A	JP 2017-40595 A (JVC KENWOOD CORPORATION) 23 February 2017 (2017-02-23), entire text, all drawings	1-5															
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.      <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																	
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table style="width:100%; border:none;"> <tr> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </td> <td style="width:50%; vertical-align: top;"> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p> </td> </tr> </table>			<p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>													
<p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&amp;” document member of the same patent family</p>																
<p>Date of the actual completion of the international search 29 March 2021</p>		<p>Date of mailing of the international search report 06 April 2021</p>															
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan</p>		<p>Authorized officer</p> <p>Telephone No.</p>															

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/004553

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2019/068269 A1 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 11 April 2019 (2019-04-11), entire text, all drawings	1-5
A	HE, F. et al., Quantification of exosome based on a copper-mediated signal amplification strategy, Analytical Chemistry, 12 June 2018, vol. 90, pp. 8072-8079, whole document	1-5
A	ZONG, S. et al., Facile detection of tumor-derived exosomes using magnetic nanobeads and SERS nanoprobe, Analytical Methods, 2016, vol. 8, pp. 5001-5008, entire text, all drawings	1-5
A	JP 2016-502862 A (EXOSOME DIAGNOSTICS, INC.) 01 February 2016 (2016-02-01), entire text, all drawings	1-5
A	WO 2015/068772 A1 (JSR CORPORATION) 14 May 2015 (2015-05-14), entire text, all drawings	1-5
A	US 2017/0001197 A1 (HE, M.) 05 January 2017 (2017-01-05), entire text, all drawings	1-5
A	CN 110540961 A (ZHENGZHOU UNIVERSITY) 06 December 2019 (2019-12-06), entire text, all drawings	1-5

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/004553

JP 2017-138112 A	10 August 2017	WO 2017/134906 A1 entire text, all drawings
WO 2019/039179 A1	28 February 2019	EP 3674704 A1 whole document
WO 2013/094307 A1	27 June 2013	US 2015/0017660 A1 whole document EP 2801822 A1 CA 2860144 A1
JP 2017-40595 A	23 February 2017	US 2018/0180604 A1 whole document WO 2017/033547 A1 EP 3339863 A1
WO 2019/068269 A1	11 April 2019	CN 109490528 A whole document
JP 2016-502862 A	01 February 2016	US 2015/0353920 A1 whole document WO 2014/107571 A1 EP 2941629 A1 CA 2897207 A1 AU 2014203987 A1 IL 239786 A CN 105026911 A MX 2015008727 A HK 1217365 A BR 112015016136 A2
WO 2015/068772 A1	14 May 2015	US 2016/0349246 A1 whole document CN 105723221 A
US 2017/0001197 A1	05 January 2017	WO 2015/139019 A1 whole document
CN 110540961 A	06 December 2019	(Family: none)

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  G01N 33/53(2006.01)i; C12Q 1/06(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; G01N 33/543(2006.01)i                  FI: G01N33/53 S; G01N33/543 541A; C12Q1/06; C12Q1/6806 Z; G01N33/543 515F</p>										
<p>B. 調査を行った分野</p>										
<p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  G01N33/53; C12Q1/06; C12Q1/6806; G01N33/543</p>										
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年
日本国実用新案公報	1922 - 1996年									
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年									
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年									
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年									
<p>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）</p>										
<p>C. 関連すると認められる文献</p>										
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	JP 2017-138112 A (株式会社JVCケンウッド) 10.08.2017 (2017-08-10) 全文, 全図	1-5								
A	WO 2019/039179 A1 (国立大学法人広島大学) 28.02.2019 (2019-02-28) 全文, 全図	1-5								
A	WO 2013/094307 A1 (落谷 孝広) 27.06.2013 (2013-06-27) 全文, 全図	1-5								
A	JP 2017-40595 A (株式会社JVCケンウッド) 23.02.2017 (2017-02-23) 全文, 全図	1-5								
A	WO 2019/068269 A1 (THE HONG KONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 11.04.2019 (2019-04-11) 全文, 全図	1-5								
A	HE, F. et al., Quantification of Exosome Based on a Copper-Mediated Signal Amplification Strategy, Analytical Chemistry, 2018.06.12, Vol.90, pp.8072-8079 Whole Document	1-5								
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>										
* 引用文献のカテゴリー	<p>“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</p>									
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	<p>“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</p>									
“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	<p>“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</p>									
“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）	<p>“&amp;” 同一パテントファミリー文献</p>									
“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										
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日									
29.03.2021	06.04.2021									
名称及びあて先	権限のある職員（特許庁審査官）									
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	倉持 俊輔 2J 3209									
	電話番号 03-3581-1101 内線 3250									

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	ZONG, S. et al., Facile detection of tumor-derived exosomes using magnetic nanobeads and SERS nanoprobe, Analytical Methods, 2016, Vol.8, pp.5001-5008 全文, 全図	1-5
A	JP 2016-502862 A (エクソサム ダイアグノスティクス, インコーポレイティド) 01.02.2016 (2016 - 02 - 01) 全文, 全図	1-5
A	WO 2015/068772 A1 (J S R株式会社) 14.05.2015 (2015 - 05 - 14) 全文, 全図	1-5
A	US 2017/0001197 A1 (HE Mei) 05.01.2017 (2017 - 01 - 05) 全文, 全図	1-5
A	CN 110540961 A (ZHENGZHOU UNIVERSITY) 06.12.2019 (2019 - 12 - 06) 全文, 全図	1-5

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/JP2021/004553

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2017-138112 A	10.08.2017	WO 2017/134906 A1 全文, 全図	
WO 2019/039179 A1	28.02.2019	EP 3674704 A1 Whole Document	
WO 2013/094307 A1	27.06.2013	US 2015/0017660 A1 Whole Document EP 2801822 A1 CA 2860144 A1	
JP 2017-40595 A	23.02.2017	US 2018/0180604 A1 Whole Document WO 2017/033547 A1 EP 3339863 A1	
WO 2019/068269 A1	11.04.2019	CN 109490528 A Whole Document	
JP 2016-502862 A	01.02.2016	US 2015/0353920 A1 Whole Document WO 2014/107571 A1 EP 2941629 A1 CA 2897207 A1 AU 2014203987 A1 IL 239786 A CN 105026911 A MX 2015008727 A HK 1217365 A BR 112015016136 A2	
WO 2015/068772 A1	14.05.2015	US 2016/0349246 A1 Whole Document CN 105723221 A	
US 2017/0001197 A1	05.01.2017	WO 2015/139019 A1 Whole Document	
CN 110540961 A	06.12.2019	(ファミリーなし)	