

(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
2015 年 4 月 2 日(02.04.2015)



(10) 国際公開番号

WO 2015/045666 A1

- (51) 国際特許分類:
C12M 1/00 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/071422
- (22) 国際出願日: 2014 年 8 月 14 日(14.08.2014)
- (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 2013-199070 2013 年 9 月 25 日(25.09.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 Tokyo (JP). 株式会社ニコン(NIKON CORPORATION) [JP/JP]; 〒1008331 東京都千代田区有楽町一丁目 1 2 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 一木 隆範(ICHIKI Takanori); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 小林 雅(KOBAYASHI Masashi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 林綾子(HAYASHI Ayako); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 土屋 章一(TSUCHIYA Shoichi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 赤木 貴則(AKAGI Takanori); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 上野 太郎(UENO Taro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 船津 高志(FUNATSU Takashi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目 3 番 1 号

国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 宮本 健司(MIYAMOTO Kenji); 〒1008331 東京都千代田区有楽町一丁目 1 2 番 1 号 株式会社ニコン内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 志賀 正武, 外(SHIGA Masatake et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目 9 番 2 号 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, LT, 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, 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:
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
 - 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: FLUID DEVICE, EXOSOME ANALYSIS METHOD, BIOMOLECULE ANALYSIS METHOD, AND BIOMOLECULE DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: 流体デバイス、エキソソームの分析方法、生体分子分析方法及び生体分子検出方法

(57) Abstract: The present invention provides a fluid device, an exosome analysis method, a biomolecule analysis method, and a biomolecule detection method, with which a series of flows can be used to even analyse exosome content by introducing a sample into the device. This fluid device (1) detects biomolecules included in exosomes in a sample, and is characterized by being provided with: an exosome purification unit (2) provided with a layer modified with a compound having hydrophobic chains and hydrophilic chains; a biomolecule purification unit (3); a biomolecule detection unit (4); a first passage (5) connecting the exosome purification unit (2) and the biomolecule purification unit (3); and a second passage (6) connecting the biomolecule purification unit (3) and the biomolecule detection unit (4).

(57) 要約: 本発明は、サンプルをデバイスに導入することで一連の流れでエキソソーム内容物まで分析できる、流体デバイス、エキソソームの分析方法、生体分子分析方法及び生体分子検出方法を提供する。本発明の流体デバイス(1)は、サンプル中のエキソソームが内包する生体分子を検出する流体デバイスであって、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム精製部(2)と、生体分子精製部(3)と、生体分子検出部(4)と、前記エキソソーム精製部(2)と前記生体分子精製部(3)とを繋ぐ第一の流路(5)と、前記生体分子精製部(3)と前記生体分子検出部(4)とを繋ぐ第二の流路(6)と、を備えたことを特徴とする。

WO 2015/045666 A1

明 細 書

発明の名称：

流体デバイス、エキソソームの分析方法、生体分子分析方法及び生体分子
検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、流体デバイス、エキソソームの分析方法、生体分子分析方法及び生体分子検出方法に関する。

背景技術

[0002] エキソソームは、直径30～100nmの小型脂質小胞であり、エンドソームと細胞膜との融合体として、腫瘍細胞、樹状細胞、T細胞、B細胞等、種々の細胞から、血液、尿、唾液等の体液中に分泌される。

[0003] がん細胞等の異常細胞は、細胞膜の内部に特有のタンパク質や核酸、マイクロRNAなどを発現している。そして、体液中に分泌されるエキソソームも、分泌元の細胞由来のマイクロRNAなどを発現している。

そのため、体液中のエキソソームの膜内部に存在する生体分子を分析することで、バイオプシー検査をしなくとも、生体内の異常を調べることができる技術の確立が期待されている。

なお、バイオプシー検査とは、病変部位の組織を採取し顕微鏡で病変部位を観察することによって、病気の診断等を調べる臨床検査をいう。

[0004] このような期待に対して、生物学的サンプルからマイクロRNA（以下、miRNAともいう。）を含んでなるがん細胞由来エキソソームを単離し、がん細胞由来エキソソーム中の所定のmiRNAの発現量と、被検体由来のエキソソーム中のmiRNAの発現量と、を比較して、被検体のがん細胞を有するかを評価するエキソソームの分析方法が提案されている（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2013-102768号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] しかしながら、特許文献1には、研究者がエキソソームを単離して、該エキソソームからmiRNAを精製し、該miRNAを分析に供する各工程について記載されているが、サンプルをデバイスに導入することで一連の流れでエキソソーム内容物まで分析できる技術については何ら開示されておらず、改良の余地がある。

[0007] 本発明は、上記事情に鑑みてなされたものであって、サンプルをデバイスに導入することで一連の流れでエキソソーム内容物まで分析できる、流体デバイス、エキソソームの分析方法、生体分子分析方法及び生体分子検出方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記の課題を解決するため、鋭意研究を行った結果、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム精製部を用いることにより課題を解決できることを見出した。本発明の一実施態様は、下記(1)～(5)を提供するものである。

(1) 本発明の一実施態様における流体デバイスは、

サンプル中のエキソソームが内包する生体分子を検出する流体デバイスであって、

疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム精製部と、

生体分子精製部と、

生体分子検出部と、

前記エキソソーム精製部と前記生体分子精製部を繋ぐ第一の流路と、

前記生体分子精製部と前記生体分子検出部を繋ぐ第二の流路と、

を備えたことを特徴とする。

(2) 本発明の一実施態様における流体デバイスは、

サンプル中のエキソソームが内包する生体分子を精製する流体デバイスであって、

サンプル導入用インレット及びエキソソーム破碎液導入用インレットと、
前記疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム固定部と、
を備えたことを特徴とする。

(3) 本発明の一実施態様におけるエキソソームの分析方法は、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム精製部上でエキソソームを精製し、破碎する工程を有することを特徴とする。

(4) 本発明の一実施態様における生体分子分析方法は、

(a) 流体デバイス中の疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された基板に、エキソソーム含有試料を接触させて、前記基板上的疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物にエキソソームを結合させる工程と、

(b) 前記エキソソームが結合した基板に破碎液を流入して前記エキソソームを破碎し、内包される生体分子を放出させる工程と、

(c) 前記生体分子を精製する工程と、

(d) 前記生体分子を検出する工程と、

を有することを特徴とする。

(5) 本発明の一実施態様における生体分子検出方法は、

(a) 疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された基板に脂質二重層で囲まれた構造体を含有する試料を接触させて、前記基板上的疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物に前記脂質二重層で囲まれた構造体を結合させる工程と、

(b) 前記膜小胞体を破碎し、内包される生体分子を放出させる工程と、

(d) 前記生体分子を検出する工程と、

を有することを特徴とする。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、サンプルをデバイスに導入することで一連の流れでエキ

ソソーム内容物まで分析できる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本実施形態における流体デバイスの一態様の模式図である。

[図2]本実施形態における流体デバイスの一態様の模式図である。

[図3]本実施形態における流体デバイスの一態様の模式図である。

[図4]本実施形態における流体デバイスの一態様の模式図である。

[図5]実施例におけるBAM基板に固定したエキソソームの定量結果である。

[図6]実施例における精製したmiRNAの定量結果である。

[図7A]実施例におけるmiRNAに相補的なプローブが固定されてなる基板を備えた検出部、を有する流体デバイスを用いたmiRNA検出結果である。

[図7B]図7(A)の画像のスポットに対応した、蛍光が観察されるべきスポットを示す図である。図中、網掛けで示したスポットが、標的miRNAに対応するスポットで、各アルファベットは下記のmiRNAに対応している
: A: 141、B: 143、C: 1275、D: 107、E: 181a-2*、F: 484、S: let-7a、T: let-7b、U: let-7d。

[図8]本実施形態における流体デバイスの基板の一態様の模式図である。

[図9A]本実施形態における流体デバイスの一態様の模式図である。

[図9B]実施例における流体デバイス中のバルブの制御の詳細を示した結果である。

発明を実施するための形態

[0011] 《流体デバイス》

[第一実施形態]

図1に示すように、本実施形態の流体デバイス（たとえばマイクロ流体デバイス（マイクロTAS）、ミリ流体デバイス（ミリTAS）など）1は、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム精製部2と、生体分子精製部3と、生体分子検出部4と、エキソソーム精製部2と生体分子精製部3を繋ぐ第一の流路5と、生体分子精製部3と生体分子

検出部 4 を繋ぐ第二の流路 6 と、を備えている。

本実施形態の流体デバイス 1 は、サンプル中のエキソソームが内包する生体分子を検出するデバイスである。

本実施形態において、第一の流路 5 は、生体分子を含むエキソソームの破砕液をエキソソーム精製部 2 から生体分子精製部 3 に送液する流路であり、第二の流路 6 は、精製された生体分子を含む溶液を生体分子検出部 4 に送液する流路である。

また、たとえば、本実施形態の流体デバイス 1 は後述する図 9 (A) に示すような構成によって、サンプルを導入し、エキソソームを破砕し、生体分子を精製し、生体分子を検出するデバイスである。

[0012] エキソソームは、脂質二重膜で囲まれた直径 30～100 nm の小型脂質小胞であり、エンドソームと細胞膜との融合体として、腫瘍細胞、樹状細胞、T 細胞、B 細胞等、種々の細胞から、血液、尿、唾液等の体液中に分泌される。

エキソソームは、細胞の分泌物であり、分泌元の細胞由来の生体分子、例えばタンパク質、核酸、miRNA などを内包している。生体内に存在するがん細胞等の異常細胞は、その細胞膜の内部に特有のタンパク質や核酸、miRNA などを発現している。

そのため、エキソソームに内包される生体分子を分析することで分泌元の細胞の異常を検出することができる。エキソソームに内包される生体分子を取り出す（抽出する）手段として、一例にはエキソソームの脂質二重膜の破砕などが挙げられる。

更に、エキソソームは、生体内で循環している血液、尿、唾液などの体液中で検出されるため、エキソソームを分析することで、バイオプシー検査をしなくとも、生体内の異常を検出することができる。

[0013] 分析に用いるサンプルによる二次感染を防止する観点から、本実施形態の流体デバイス 1 は、更に廃液槽を備えていることが好ましい。一例として、図 2 に示すように、本実施形態の流体デバイスは、第一の廃液槽 7、第二の

廃液槽 8、第三の廃液槽 9 を備え、第一の廃液槽 7 とエキソソーム精製部 2 を繋ぐ第三の流路 10、第二の廃液槽 8 と生体分子精製部 3 を繋ぐ第四の流路 11、第三の廃液槽 9 と生体分子検出部 4 を繋ぐ第五の流路 12 を備えたものであることが好ましい。

尚、図 2 においては三つの廃液槽を示しているが一つ又は二つの廃液槽にまとめたものであってもよい。

後述するように、エキソソーム精製部 2 からの廃液が第三の流路 10 を通って第一の廃液槽 7 に送られる。生体分子精製部 3 からの廃液が第四の流路 11 を通って第二の廃液槽 8 に送られる。生体分子検出部 4 からの廃液が第五の流路 12 を通って第三の廃液槽 9 に送られる。

[0014] 本実施形態の流体デバイス 1 における各構成の一例について、図 3 を用いて説明する。

エキソソーム精製部 2 は、エキソソームの固定と、エキソソームの破碎を行うものであり、インレットと、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム固定部 2d を備える。図 3 に示すように、エキソソーム精製部 2 は、導入する試薬別にインレットを備えることが好ましい。即ち、エキソソーム精製部 2 は、サンプル導入用インレット 2b と破碎液導入用インレット 2c を備えることが好ましく、更に洗浄液導入用インレット 2a を備えることがより好ましい。

[0015] エキソソーム固定部 2d における疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物とは、脂質二重膜に結合するための疎水性鎖と、この脂質鎖を溶解するための親水性鎖を有する化合物である。係る化合物を用いることにより、エキソソーム固定部 2d 上に脂質二重膜を有するエキソソームを固定することができる。

尚、本明細書において、「エキソソーム固定部 2d 上にエキソソームを固定する」とは、エキソソーム固定部にエキソソームを吸着させることも意味する。サンプル中からのエキソソームの単離が可能である。

[0016] 疎水性鎖としては、単鎖であっても複鎖であってもよく、例えば、置換基

を有していてもよい飽和又は不飽和の炭化水素基が挙げられる。

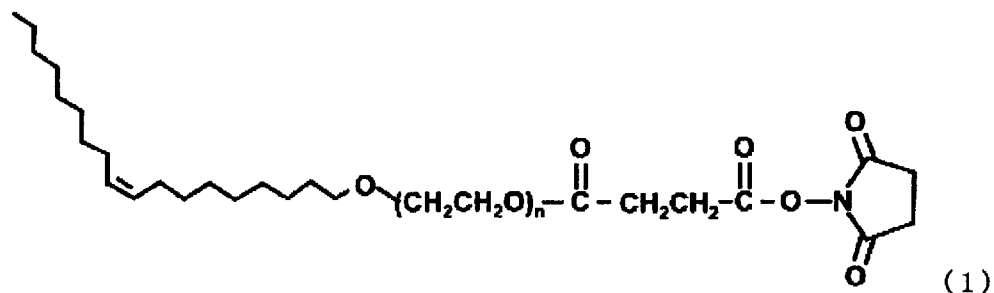
飽和又は不飽和の炭化水素基としては、炭素原子数6～24の直鎖若しくは分岐鎖のアルキル基又はアルケニル基が好ましく、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、ステアリル基（オクタデシル基）、ノナデシル基、イコシル基、ヘンイコシル基、ドコシル基、トリコシル基、テトラコシル基、ミリストレイル基、パルミトレイル基、オレイル基、リノイル基、リノレイル基、リシノレイル基、イソステアリル基等が挙げられる。

中でも、ミリストレイル基、パルミトレイル基、オレイル基、リノイル基、リノレイル基が好ましく、オレイル基がより好ましい。

[0017] 親水性鎖としては、タンパク質、オリゴペプチド、ポリペプチド、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール（PEG）、デキストラン等が挙げられ、PEGが好ましい。係る親水性鎖は、基板との結合のために化学修飾されていることが好ましく、活性エステル基を有することがより好ましく、N-ヒドロキシスクシンイミド基を有することが特に好ましい。

[0018] 即ち、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物としては、脂質-PEG誘導体が好ましい。脂質-PEG誘導体は、BAM（Biocompatible anchor for membrane）と呼ばれる。BAMとしては、例えば下記式（1）で表される化合物が挙げられる。

[0019] [化1]



[0020] [式中、nは1以上の整数である。]

エキソソーム固定部 2 d の層として用いられる基板としては、ガラス基板、シリコン基板、ポリマー基板、金属基板等が挙げられる。基板は、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物の親水性鎖と結合する物質を介して結合していてもよく、係る物質としては、アミノ基、カルボキシル基、チオール基、水酸基、アルデヒド基を有する物質が挙げられ、3-アミノプロピルトリエトキシシランが好ましい。

[0021] 本実施形態の流体デバイス 1 における液体の駆動は、外部吸引ポンプによってなされ、液体の流れはバルブの開閉によって制御される。バルブは一例として空圧式バルブであり、バルブの開閉は、流体デバイス 1 に連結した外部空圧装置によって駆動・制御される。

[0022] 図 3 に示すように、エキソソームの分析において、まず上述したエキソソーム精製部において、サンプル導入用インレット 2 b にサンプルを注入し、流路 2 i のバルブ 2 f を開き、吸引によりサンプルをエキソソーム固定部 2 d に導入する。

分析に用いられるサンプル量としては、一例として数 μL から数 mL であり、例えば 1 mL 程度である。

[0023] サンプルとしては、検出対象の細胞をとりまく環境から得られるものであって、該細胞が分泌したエキソソームを含有するものであれば特に限定されず、血液、尿、母乳、気管支肺胞洗浄液、羊水、悪性滲出液、唾液等が挙げられる。中でも、エキソソームを検出しやすい血液又は尿が好ましい。更に、血液においては、エキソソームの検出のしやすさから、血漿が好ましい。

また、係るサンプルには、培養細胞が分泌したエキソソームを含有する細胞培養液も含まれる。

[0024] 検出対象の細胞としては、エキソソームを産生することが知られているがん細胞、肥満細胞、樹状細胞、網赤血球、上皮細胞、B 細胞、神経細胞等が挙げられる。

サンプルは、超遠心分離、限外ろ過、連続フロー電気泳動、サイズフィルターを用いたろ過、ゲルろ過クロマトグラフィー等により調製されたもので

あってもよいが、本実施形態においては、エキソソーム固定部 2 d における疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物とエキソソームとの親和性が非常に高いため、調製を加えていないサンプルそのものであってもよい。

[0025] エキソソーム固定部 2 d にエキソソームを特異的に結合させる観点から、エキソソーム固定部 2 d に非特異的吸着抑制部を設けることが好ましい。一例として基板を、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾した後、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物が修飾されていない箇所を、PEG等の親水性基を有する化合物で処理することが挙げられる。

[0026] エキソソーム固定部 2 d に導入されたサンプル中のエキソソームは、上述した疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物によって捕捉される。疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物とエキソソームとの親和性が非常に高いため、サンプルをエキソソーム固定部 2 d に静置する必要はなく、連続的にエキソソーム固定部 2 d 上をサンプルが通過すると同時にサンプル中のエキソソームがエキソソーム固定部 2 d 上に捕捉される。

一例として、エキソソーム捕捉時の吸引圧力は、1～30 kPaであり、捕捉に要する時間は15秒程度である。エキソソーム固定部 2 d を通過した溶液は、バルブ 10 a を介して第三の流路 10 を通り第一の廃液槽 7 へ送られる。

[0027] 本実施形態の流体デバイス 1 において、エキソソーム固定部 2 d の天井高を低く設計しておくことが好ましい。これにより、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物と、エキソソームとの接触の機会を増し、エキソソームの捕捉効率を高めることができる。

[0028] 血液中には、エキソソーム以外にもマイクロベシクルやアポトーシス小体等の細胞外小胞が含まれており、これら細胞外小胞もエキソソーム固定部 2 d に固定される可能性がある。エキソソーム固定部 2 d からこれらの細胞外小胞を除去する観点から、エキソソーム固定部 2 d 上のエキソソームを洗浄することが好ましい。

一例として、図 3 に示すように、流路 2 h 上のバルブ 2 e を開き、洗浄液

導入用インレット 2 a に洗浄液を注入し、エキソソーム固定部 2 d に導入する。

本実施形態においては疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層とエキソソームとの結合が強力であるため、流速を速く調整でき、短時間での洗浄が可能である。一例として、PBS 洗浄液 500 μ L を吸引圧力 1 ~ 30 kPa で 15 秒程度送液することにより洗浄される。エキソソーム固定部 2 d を通過した廃液は、バルブ 10 a を介して第三の流路 10 を通り第一の廃液槽 7 へ送られる。

[0029] 次いで、エキソソーム固定部 2 d に固定されたエキソソームを破碎する。図 3 に示すように、流路 2 j 上のバルブ 2 g を開き、破碎液導入用インレット 2 c に破碎液を注入し、吸引により破碎液をエキソソーム固定部 2 d へ導入する。破碎液としては、例えば細胞溶解に用いられる従来公知のものが挙げられる。

破碎液がエキソソーム固定部 2 d を通ることにより、エキソソーム固定部 2 d 上に捕捉されたエキソソームが破碎され、エキソソームに内包される生体分子が放出される。

一例として、エキソソーム破碎時の吸引圧力は、1 ~ 30 kPa であり、破碎に要する時間は 30 秒程度である。エキソソーム固定部 2 d を通過した廃液は、バルブ 10 a を介して第三の流路 10 を通り第一の廃液槽 7 へ送られる。エキソソームから放出された生体分子は、バルブ 5 a を介して第一の流路 5 を通り生体分子精製部 3 へ送られる。

[0030] 図 3 に示すように、生体分子精製部 3 は、生体分子回収液導入用インレット 3 b と、生体分子固定部 3 c とを備えることが好ましく、更に生体分子洗浄液導入用インレット 3 a を備えることがより好ましい。

生体分子固定部 3 c は、生体分子を固定可能なものであれば特に限定されないが、一例として生体分子が核酸である場合には核酸を固定するシリカメンブレンが挙げられる。

エキソソームは、分泌元の細胞に由来するタンパク質や核酸を保持してい

る。核酸としては、m i R N Aが挙げられる。近年、短鎖の非コードRNAであるm i R N Aが、生体内の遺伝子発現の制御をしていることが報告され、m i R N Aの異常発現とがんを初めとした様々な疾患との関係が明らかになりつつある。

本実施形態において、生体分子固定部3 cが固定する生体分子はm i R N Aであることが好ましい。生体分子固定部3 cとしては、上述したように、流路上に埋め込まれたシリカメンブレンが挙げられる。

生体分子固定部3 cをエキソソーム破砕液が通過することにより、生体分子固定部3 c上に生体分子が捕捉される。

一例として、エキソソーム破砕液送液時の吸引圧力は、50～70 k P aであり、送液に要する時間は1分程度である。生体分子固定部3 cを通過した廃液は、バルブ1 1 aを介して第四の流路1 1を通り第二の廃液槽8へ送られる。

[0031] 生体分子固定部3 cに生体分子を固定した後、生体分子固定部3 cを洗浄し、目的とする生体分子以外の夾雑物を取り除くことが好ましい。

図3に示すように、流路3 e上のバルブ3 dを開き、生体分子洗浄液導入用インレット3 aに洗浄液を注入し、吸引により洗浄液を生体分子固定部3 cへ導入する。洗浄液としては、例えば70%～80%程度のエタノールが挙げられる。

一例として、洗浄時の洗浄液使用量は1 m L程度であり、吸引圧力は、50～70 k P aであり、洗浄液の送液に要する時間は1分程度である。生体分子固定部3 cを通過した廃液は、バルブ1 1 aを介して第四の流路1 1を通り第二の廃液槽8へ送られる。エキソソームから放出された生体分子は、バルブ5 aを介して第一の流路5を通り生体分子精製部3へ送られる。

[0032] 生体分子検出部への生体分子洗浄液の持ち込みを防止するために、生体分子固定部3 cを洗浄した後、生体分子固定部3 cを乾燥させることが好ましい。

図3に示すように、生体分子洗浄液導入用インレット3 aから空気を吸引

し、生体分子固定部 3 c を通過させることにより乾燥させる。

一例として、生体分子固定部 3 c 乾燥時の吸引圧力は、50～70 kPa であり、乾燥に要する時間は 2 分程度である。

[0033] 次いで、生体分子固定部 3 c に固定された生体分子を溶出させる。生体分子の回収率を向上させるために、生体分子回収液を生体分子固定部 3 c に導入した後、一定時間保持させることが好ましい。

図 3 に示すように、流路 3 g のバルブ 3 f を開け、生体分子回収液導入用インレット 3 b に生体分子回収液を注入し、生体分子回収液を生体分子固定部 3 c に導入する。

一例として、生体分子回収液は、RNase-free water であり、該回収液の使用量は 30 μ L であり、吸引圧力 50～70 kPa で回収液を吸引し、回収液が生体分子固定部 3 c に到達した時点で吸引を停止させ、3 分程度保持する。

[0034] 次いで、生体分子固定部 3 c から生体分子を回収する。一例として、吸引圧力 50～70 kPa で回収液を 30 秒かけて回収する。

生体分子は第二の流路 6 を通り、生体分子検出部 4 へ送られる。一例として、生体分子検出部 4 への生体分子の吸引圧力は、6 kPa 以下であり、30 秒程度かけて送液する。

[0035] 生体分子検出部 4 は、一例として、生体分子に親和性を有する物質が固定されてなる基板を備えている。一例として、生体分子を核酸とする場合には核酸アレイを備えていることが好ましく、生体分子をタンパク質とする場合にはプロテインアレイを備えていることが好ましい。生体分子を miRNA とする場合には、標的 miRNA に相補的なプローブが固定されてなる基板 4 c を備えていることが好ましい（図 3 参照。）。標的 miRNA に相補的なプローブが固定されてなる基板としては、例えば従来公知の DNA チップが挙げられる。

[0036] 更に、特異的にかつ高感度に標的 miRNA を検出するという観点から、生体分子検出部 4 は、以下の構成を備えていることが好ましい。

図9 (A) 及び図9 (B) に示すように、生体分子検出部4は、標的miRNA33を第一の部分31と第二の部分32に分割した場合に、第一の部分31とハイブリダイズし得る配列を含む捕捉プローブ34が固定されてなる基板と、検出プローブ導入用インレット4a (図3参照。) と、を備えていることが好ましい。

検出プローブ35は、二本鎖を形成する二つのステム部35c, 35dと、該二つのステム部35c, 35d間の領域であり、標識物質35aにより標識されているループ部35eと、標的miRNA33を第一の部分31と第二の部分32に分割した場合に、第二の部分32とハイブリダイズし得る配列35bを有し、5' 突出末端又は3' 突出末端を有する。

[0037] 捕捉プローブ34及び検出プローブ35は、それぞれ、miRNA33の第1の部分31及び第2の部分32にハイブリダイズし得るものである。そのため、第1の部分31及び第2の部分32の長さは、5～17塩基が好ましく、約22塩基からなるmiRNAを2分割した塩基数という観点から、7～15塩基がより好ましい。

本実施形態においては、miRNA33の5' 側の部分を第1の部分31とし、miRNA33の3' 側の部分を第2の部分32とする。

[0038] 尚、本発明及び本願明細書において「ハイブリダイズし得る」とは、本発明に用いられる捕捉プローブ及び検出プローブの一部がストリンジェントな条件下で標的核酸 (標的miRNA) にハイブリダイズし、標的核酸 (標的miRNA) 以外の核酸分子にはハイブリダイズしないことを意味する。「ストリンジェントな条件」とは、例えば、Molecular Cloning - A LABORATORY MANUAL THIRD EDITION (Sambrookら、Cold Spring Harbor Laboratory Press) に記載の条件が挙げられる。

[0039] 捕捉プローブ34は、5' 末端領域に、miRNA33の第1の部分31とハイブリダイズし得る配列を含む。

miRNA33を高精度に定量する観点から、捕捉プローブ34は、mi

RNA 33の第2の部分32とハイブリダイズしないように、miRNA 33の第2の部分32に相補的な配列を含まないことが好ましい。

基板36に固定された捕捉プローブ34が、miRNA 33とハイブリダイゼーションするためには、分子的な自由度が必要であることから、捕捉プローブ34は、基板36と結合する3'末端にスペーサー34aを有していることが好ましい。スペーサー34aの長さとしては、特に限定されないが、3～50塩基が好ましく、5～25塩基がより好ましい。ただし、スペーサーに用いられる塩基は、同程度の長さで柔軟性を持ったPEG等のリンカーで代替可能である。係る場合には、スペーサー34aに用いられる塩基数は0塩基でもよい。

捕捉プローブ34の長さは、プローブとして機能するために必要な長さであれば特に限定されないが、第1の部分31及びスペーサー34aの塩基数を勘案し、3～50塩基が好ましく、5～40塩基がより好ましい。

[0040] 捕捉プローブ34は、DNAでもRNAでもよく、DNAやRNAと同様の機能を有するものであれば、天然、非天然に限られず、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、BNA（Bridged Nucleic Acid）等の人工核酸を含むものであってもよい。DNAやRNAと比較して、標的miRNA 33との親和性が高く、DNA分解酵素やRNA分解酵素に認識されにくく、T4DNAリガーゼ等のDNAリガーゼの基質になり得る観点から、捕捉プローブ34は、LNA又はBNAを含むことが好ましい。

[0041] 捕捉プローブ34を固定するために用いられる基板36としては、ガラス基板、シリコン基板、プラスチック基板、金属基板等が挙げられる。捕捉プローブ34を基板36上に固定する方法としては、光リソグラフ技術を利用して、基板上に高密度でプローブを固定する方法やガラス基板等にスポットティングによりプローブを固定する方法が挙げられる。

[0042] 本実施形態において、検出プローブ35は、3'末端領域に、miRNA 33の第2の部分32とハイブリダイズし得る配列35bを含む。

miRNA 33を高精度に定量する観点から、検出プローブ 35は、miRNA 33の第1の部分 31とハイブリダイズしないように、miRNA 33の第1の部分 31に相補的な配列を含まないことが好ましい。

[0043] 検出プローブ 35は、ステムループ構造を形成する。ステムループ構造とは、一本鎖核酸において、分子内で離れた二箇所の領域に相補的な配列がある場合、核酸の塩基対間の相互作用によって二本鎖（ステム構造）を形成するとともに、その二箇所の領域に挟まれた配列がループ構造を形成するものをいい、ヘアピンループとも称される。

本実施形態において、検出プローブ 35は、5'末端側から、二本鎖を形成する二つのステム部 35c, 35dと、該2つのステム部 35c, 35d間の領域であるループ部 35eと、第2の部分 32とハイブリダイズし得る配列 35bとからなる。即ち、検出プローブ 35は、3'突出末端を有している。検出プローブは、突出末端を有しており、検出プローブが有する突出末端が、5'突出末端であるか3'突出末端であるかは、捕捉プローブと基板とが捕捉プローブの5'末端を介して結合しているか3'末端を介して結合しているかによる。

[0044] 検出プローブ 35におけるステム部の長さは、ループ部の長さとの兼ね合いによって決まり、検出プローブ 35が安定してステムループ構造を形成できる長さであれば特に限定されないが、3～50塩基が好ましく、5～20塩基がより好ましい。

検出プローブ 35におけるループ部の長さは、ステム部の長さとの兼ね合いによって決まり、検出プローブ 35が安定してステムループ構造を形成できる長さであれば特に限定されないが、3～200塩基が好ましく、5～100塩基がより好ましい。

検出プローブ 35の長さは、ステムループ構造を形成でき、プローブとして機能するために必要な長さであれば特に限定されないが、第2の部分 32の塩基数及びステムループ構造形成に必要な塩基数を勘案し、14～200塩基が好ましく、24～150塩基がより好ましい。

[0045] 検出プローブ35は、DNAでもRNAでもよく、DNAやRNAと同様の機能を有するものであれば、天然、非天然に限られず、PNA（ペプチド核酸）、LNA（Locked Nucleic Acid）、BNA（Bridged Nucleic Acid）等の人工核酸を含むものであってもよい。DNAやRNAと比較して、標的miRNAとの親和性が高く、DNA分解酵素やRNA分解酵素に認識されにくく、T4DNAリガーゼ等のDNAリガーゼの基質になり得る観点から、検出プローブ35は、LNA又はBNAを含むことが好ましい。

捕捉プローブ34及び検出プローブ35の少なくともいずれか一方が、LNA又はBNAを含むことが好ましく、捕捉プローブ34及び検出プローブ35の両方が、LNA又はBNAを含むことがより好ましい。

[0046] 検出プローブ35は、標識物質35aにより標識されている。標識物質としては、例えば、蛍光色素、蛍光ビーズ、量子ドット、ビオチン、抗体、抗原、エネルギー吸収性物質、ラジオアイソトープ、化学発光体、酵素等が挙げられる。

蛍光色素としては、FAM（カルボキシフルオレセイン）、JOE（6-カルボキシ-4',5'-ジクロロ-2',7'-ジメチルフルオレセイン）、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、TET（テトラクロロフルオレセイン）、HEX（5'-ヘキサクロロフルオレセイン-Cエホスホロアミダイト）、Cy3、Cy5、Alexa568、Alexa647等が挙げられる。

全RNA中、miRNAはごく微量しか存在しないため、分画せずにmiRNAを高効率に標識することは困難である。一方、本実施形態においては、予め標識した検出プローブを用いるため、高感度に、miRNAを検出することができる。

[0047] また、図3に示すように、生体分子検出部4は、更に洗浄液導入用インレット4bを備えていることが好ましい。また、生体分子検出部4は、図3のように液が循環する流路と、図示略のポンプバルブとで構成される回転式混

合器を含む。

[0048] 生体分子が生体分子検出部4へ送られた後、バルブ4dを開け、検出プローブ導入用インレット4aに検出プローブ溶解液を注入する。

一例として、検出プローブ溶解液の組成は、100～200nM検出プローブ、100～200mM Tris-HCl (pH7.5)、200～400mM NaCl、10～30mM MgCl₂、0.5～2mg/mL BSA、10～30mM DTT、5～20units/μL T4DNA Ligaseであり、係る検出プローブ溶解液を吸引圧力6kPa以下、30秒程度かけて送液する。

[0049] 次いで、生体分子と検出プローブ溶解液を生体分子検出部内で循環させ、混合する。一例として図示略のポンプバルブの開閉を10分間程度継続させる。液を循環させることにより短時間で効率よく複合体 (miRNA33-検出プローブ35-捕捉プローブ34複合体) が基板上に形成される (図9 (A) 及び図9 (B) 参照。) 。

[0050] 次いで、捕捉プローブが固定されてなる基板 (図3における基板4c) を洗浄し、該基板上の非特異的吸着物を取り除くことが好ましい。バルブ4eを開け、洗浄液導入用インレット4bに洗浄液を注入し、基板4cに導入する。

一例として、洗浄液は0.2×SSCバッファーであり、使用量は500μLであり、該洗浄液を吸引圧力6kPa以下、1分かけて送液して洗浄を行う。

基板4cを通過した廃液は、バルブ12aを介して第五の流路12を通り、第三の廃液槽9へ送られる。

[0051] 次いで、基板4c上に形成された複合体の標識物質の強度を測定する。標識物質の強度は、生体分子の存在量を反映するため、本実施形態によれば、サンプル中に含まれる生体分子の量を定量することができる。

標識物質の強度の測定は、一例として、図示略の顕微鏡、光源、パソコンなどの制御部により行われる。

[0052] 本実施形態によれば、従来は1日以上要したエキソソームの分析をわずが一時間程度で迅速に行うことができる。

[0053] また、本デバイスのエキソソーム精製部で上述のようにエキソソームを固定した後、エキソソーム精製部においてエキソソームの表面に存在する生体分子を検出してもよい。

基板に固定されたエキソソームの表面に存在する生体分子の検出方法は、エキソソームの表面に存在する生体分子と該生体分子と特異的に結合する第1の分子とを相互作用させて複合体を形成し、基板上の複合体（第1の分子－エキソソーム複合体）を検出することを含む。

第1の分子－エキソソーム複合体を検出する方法は、例えば蛍光標識した第1の分子－エキソソーム複合体の蛍光を検出する工程である。一例として、第1の分子として抗体を用いる場合、第1の分子である抗体に対する二次抗体を、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等の酵素で標識したもの、金コロイド、量子ドットなどのナノ粒子で標識したものをを用いることが好ましい。

量子ドットとしては、CdSeやCdTeが挙げられる。これらの量子ドットは、従来の有機系色素や蛍光タンパク質と比べて明るく光退色しにくい点で優れている。

また、ELISAによる検出方法を利用してもよい。一例としては、酵素標識された二次抗体を一次抗体に作用させ、発色性の基質を加え、酵素反応生成物の発色を検出する方法が挙げられる。この場合においても、上記蛍光標識の場合と同様に、エキソソームの検出が可能である。

[0054] 本デバイスのエキソソーム精製部は、一例としてエキソソーム表面の生体分子を検出する検出溶液の導入用インレットを含む。その検出溶液は第1の分子および二次抗体を含む溶液である。

[0055] エキソソームは、細胞の分泌物であり、その表面に分泌源の細胞由来の生体分子、例えば、タンパク質、核酸、糖鎖、糖脂質などを発現している。生体内に存在するがん細胞等の異常細胞は、その細胞膜に特有のタンパク質な

どを発現している。

そのため、エキソソームの表面に発現しているタンパク質を分析することで、分泌源の細胞の異常を検出することができる。ここで、エキソソームの表面とは、細胞から分泌される膜小胞の膜表面であって、分泌されたエキソソームが生体内の環境と接する部分をいう。

[0056] 第1の分子とエキソソームの相互作用の一例として、例えば抗原-抗体反応といった結合反応が挙げられる。

エキソソームを分泌する異常細胞は、その細胞表面に、生体分子として特有のタンパク質を発現しているか、又は、該異常細胞において、特有のタンパク質の発現が欠損している。従って、正常細胞と比較して、発現パターンの異なるタンパク質を抗原とする抗体を第1の分子として用いることで、細胞の異常を検出できる。

係る観点から、用いられる抗体は、異常細胞又は正常細胞に高発現が認められるタンパク質を抗原とするものであることが好ましく、異常細胞特異的又は正常細胞特異的に発現が認められるタンパク質を抗原とするものであることがより好ましい。

また、第1の分子としては、抗体に限られず、アプタマーも好適に用いられる。アプタマーの一例として、核酸アプタマーやペプチドアプタマーが挙げられる。

[0057] 上記のようなエキソソームの表面に存在する生体分子の検出と、そのエキソソームに内包されるmiRNAの検出とを本デバイス上で行うことによって、エキソソームを二段階で分析することができる。一例として、乳がんの場合、乳がん細胞由来のエキソソームは表面に膜タンパクとしてMUC1、CD24、ADAM10を発現している。これらの膜タンパクにはそれぞれ、抗MUC1抗体、抗CD24抗体、抗ADAM10抗体が結合する。また、乳がん細胞由来のエキソソームには、miR-1275、miR21が内包される。したがって、乳がんの検査の場合、本デバイスを用いて、膜タンパクとmiRNAとを分析することで、より精度や信頼性の高い検査が実現

できる。本デバイスは、乳がん以外においても同様に、疾患に対応するエキソソーム表面の膜タンパクとエキソソームに内包される *miRNA* とを検出することでエキソソームを二段階に分析することができる。

[0058] [第二実施形態]

図4に示されるように、本実施形態の流体デバイス20は、サンプル中のエキソソームが内包する生体分子を精製する流体デバイスであって、サンプル導入用インレット2b及びエキソソーム破砕液導入用インレット2cと、前記疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム固定部2dと、を備える。

また、図4に示されるように、本実施形態の流体デバイス20は、更に洗浄液導入用インレット2aを備えることがより好ましい。

本実施形態の流体デバイス20における各構成については、第一実施形態における各構成と重複するため説明を省略する。

本実施形態によれば、簡便に効率よくエキソソーム中の生体分子を精製することができる。

[0059] 《エキソソームの分析方法》

本実施形態のエキソソームの分析方法は、疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム精製部上でエキソソームを精製し、破砕する工程を有する。

更に、本実施形態のエキソソームの分析方法は、前記破砕されたエキソソームから流出する生体分子を精製し、検出する工程を有することが好ましい。検出する工程は、流体デバイス内で行われなくともよい。一例として、DNAシーケンサーを用いてエキソソーム中の核酸を分析する工程が挙げられる。

その他の詳細については、《流体デバイス》の第一実施形態で述べたため省略する。

[0060] 《生体分子分析方法》

本実施形態の生体分子分析方法は、

(a) 流体デバイス中の疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された基板に、エキソソーム含有試料を接触させて、前記基板上の疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物にエキソソームを結合させる工程と、

(b) 前記エキソソームが結合した基板に破砕液を流入して前記エキソソームを破砕し、内包される生体分子を放出させる工程と、

(c) 前記生体分子を精製する工程と、

(d) 前記生体分子を検出する工程と、

を有する。

[0061] 本実施形態の生体分子分析方法は、分析対象をエキソソーム中の生体分子としたものである。工程 (d) は、流体デバイス内で行われなくともよい。一例として、DNAシーケンサーを用いてエキソソーム中の核酸を分析する工程が挙げられる。

[0062] また、前記工程前記精製工程 (c) は、

(c 1) 前記生体分子を捕捉部に捕捉する工程と、

(c 2) 前記生体分子を捕捉部から溶出させる工程と、

を有することが好ましい。

[0063] 本実施形態において、工程 (c 1) は、前記工程 (b) において得られる生体分子を含む破砕液を捕捉部に送液し、破砕液に含まれる生体分子を捕捉する工程であることが好ましい。

捕捉部としては、生体分子を捕捉できるものであれば特に限定されず、一例として上述した生体分子固定部 3c が挙げられる。

細胞中の生体分子の分析の場合には、通常、破砕液と、シリカメンブレン等の捕捉部への捕捉液は同一組成ではない。破砕にはフェノールや界面活性剤を用いることが多いが、その場合捕捉部への捕捉に必要なエタノールを追加混合する必要がある。本発明者は、エキソソームは細胞に比べ破砕が容易であることを確認したため、本実施形態においては、破砕と捕捉を同一の組成で行うことが可能となった。本実施形態によれば、デバイスの構成の簡略化が可能である。

また、本実施形態において、一例には、前記エキソソームが結合した基板上で、前記エキソソームの表面に存在する生体分子の検出を行う。

その他の詳細については、《流体デバイス》の第一実施形態で述べたため省略する。

[0064] 《生体分子検出方法》

本実施形態の生体分子検出方法は、

(a) 疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された基板に脂質二重層で囲まれた構造体を含有する試料を接触させて、前記基板上の疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物に前記脂質二重層で囲まれた構造体を結合させる工程と、

(b) 前記膜小胞体を破碎し、内包される生体分子を放出させる工程と、

(d) 前記生体分子を検出する工程と、

を有する。

本実施形態に係る工程 (a) において、対象はエキソソームに限られない。疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された基板は、脂質二重層を捕捉する性質があるため、白血球等の脂質二重層で囲まれた構造体も捕捉することができる。

また、対象がエキソソームではなく細胞や白血球などの脂質二重層で囲まれた構造体を破碎する破碎液は、一例にはフェノールや界面活性剤である。その場合には、脂質二重層で囲まれた構造体に内包される核酸をシリカメンブレン等に捕捉するにあたって、一例にはエタノールを追加混合する。

[0065] 以下、実施例により本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例

[0066] [エキソソームの精製]

ガラス表面に 3-アミノプロピルトリエトキシシラン（以下、APTES ともいう。）を修飾し、APTES 末端にエキソソームを固定化する前記式 (1) で表される PEG 脂質誘導体、非特異吸着を抑制するメトキシ PEG

を修飾した。乳がん細胞株MCF-7の培養上清を超遠心し回収したエキソソーム懸濁液およびヒト血清中のエキソソームをデバイス内で固定した。

エキソソームの固定の評価は、AFMで固定粒子密度を計測して行った。

デバイス内で固定化されたエキソソームのAFM像と固定密度を図5に示す。まず、AFM像より30-200nmの直径を持つ粒子が固定化されていることを確認した。

次に、固定層からの距離に対し、固定密度が指数関数的に減少することを確認した。また、ヒト血清から直接固定化した場合の固定量が、精製済みエキソソームを固定した場合の74%であることから、メトキシPEGが非特異吸着の抑制に寄与していると考えられる。

[エキソソームの破碎]

エキソソームの破碎効率は、エキソソームから放出されたmiRNA量を定量することにより評価した。

精製されたエキソソームを破碎液と接触させて、エキソソームから放出されたmiRNA量を定量リアルタイムPCRにより求めた。また、破碎効率の比較として、細胞からmiRNAを抽出する製品であるQIAGEN社miRNeasy Mini Kitを用いた。破碎効率の比較結果を図6に示す。

[0067] [miRNA精製]

流路内に小型化したシリカメンブレンを固定し、miRNAの精製を行った。miRNAを含むエキソソーム破碎液を吸引操作し、シリカメンブレンを通過させた。続いてシリカメンブレンの洗浄、乾燥を行った後、miRNA溶出液を導入しmiRNAを回収した。miRNA回収量は定量リアルタイムPCRにより求めた。また、一般的なスピンカラム法との比較として、QIAGEN社miRNeasy Mini Kitを用いた。

miRNAの回収結果を図6に示す。本ユニットではシリカメンブレンのサイズを小型化することによって、所要時間の短縮と使用試薬の低減が達成された。また、サイズの小型化に伴い、少量の溶出液でmiRNAを回収す

ることできるようになり、miRNA溶液の濃縮が可能となった。

[0068] [miRNA検出]

本デバイスは、標的miRNAとして、miR-141、miR-143、miR-1275、miR-107、miR-181a-2*、miR-484、miR-21、let-7a、let-7b、let-7d、let-7fを検出する。それぞれの標的miRNAに相補的な配列を有する検出プローブ合計12種の核酸プローブを設計・合成した。一方、それぞれの標的miRNAに相補的な配列を有する捕捉プローブをガラス基板上で合成し、スポット状に配置した。

なお、miR-141は前立腺がんまたは卵巣がん由来のエキソソームに内包される。miR-143は慢性心疾患由来のエキソソームに内包される。miR-1275は乳がん由来のエキソソームに内包される。miR-107は前立腺がんまたは卵巣がん由来のエキソソームに内包される。miR-181a-2*は前立腺がん由来のエキソソームに内包される。miR-484は前立腺がんまたは卵巣がん由来のエキソソームに内包される。miR-21は前立腺がん、肝臓がん、卵巣がん、乳がん、膵臓がん、または肺がん由来のエキソソームに内包される。let-7a、let-7bは大腸がん、肺がん、胃がん、卵巣がん由来のエキソソームに内包される。let-7d、let-7fは胃がん、卵巣がん由来のエキソソームに内包される。miR-39は線虫由来のコントロールスポットである。

標的miRNA、捕捉プローブ、及び検出プローブの配列を以下に示す。

(1) 標的miRNA: miR-141

[配列: 5' -UACACUGUCUGGUAAAGAUGG-3'] (配列番号1: 22mer)

標的miRNA 2: miR-143

[配列: 5' -UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC-3'] (配列番号2: 21mer)

標的miRNA 3: miR-1275

[配列：5' - GUGGGGGAGAGGCUGUC-3'] (配列番号
3 : 17mer)

標のmiRNA4 : miR-107

[配列：5' - AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUC-3']
(配列番号4 : 23mer)

標のmiRNA5 : miR-181a-2*

[配列：5' - ACCACUGACCGUUGACUGUACC-3']
(配列番号5 : 22mer)

標のmiRNA6 : miR-484

[配列：5' - UCAGGCUCAGUCCCCUCCCGAU-3']
(配列番号6 : 22mer)

標のmiRNA7 : miR-21

[配列：5' - UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA-3']
(配列番号7 : 22mer)

標のmiRNA8 : let-7a

[配列：5' - UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU-3']
(配列番号8 : 22mer)

標のmiRNA9 : let-7b

[配列：5' - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU-3']
(配列番号9 : 22mer)

標のmiRNA10 : let-7d

[配列：5' - AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU-3']
(配列番号10 : 22mer)

標のmiRNA11 : let-7f

[配列：5' - UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU-3']
(配列番号11 : 22mer)

標のmiRNA12 : miR-39

[配列：5' - UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG-3']

捕捉プローブ7 (Capture probe 7)

X1 : AGTCTGATAAGCTAACAAACAACAACAACAAC
AACAAACAACAACAACAACAACAACAACAACA (配列番号
19 : 60mer)

捕捉プローブ8 (Capture probe 8)

X1 : AACCTACTACCTCAACAACAACAACAACAAC
AACAAACAACAACAACAACAACAACAACAACA (配列番号
20 : 60mer)

捕捉プローブ9 (Capture probe 9)

X1 : ACCTACTACCTCAACAACAACAACAACAACA
ACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC (配列番号
21 : 60mer)

捕捉プローブ10 (Capture probe 10)

X1 : AACCTACTACCTCTACAACAACAACAACAAC
AACAAACAACAACAACAACAACAACAACAACA (配列番号
22 : 60mer)

捕捉プローブ11 (Capture probe 11)

X1 : ATCTACTACCTCAACAACAACAACAACAACA
ACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAC (配列番号
23 : 60mer)

捕捉プローブ12 (Capture probe 12)

X1 : TTTACACCCGGTGAACAACAACAACAACAAC
AACAAACAACAACAACAACAACAACAACAACA (配列番号
24 : 60mer)

[0070] (3) 検出プローブ1 (Detect probe 1)

[配列 : 5' - p - X2 - A1 - X3 - 3']

X2、X3は以下の配列を表し、pはリン酸を表し、A1はAlexa647-AminoC6-dAを表す。

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGCCATCTTT (配列番号
26 : 26mer)

検出プローブ2 (Detect probe 2)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGGAGCTACA (配列番号
27 : 26mer)

検出プローブ3 (Detect probe 3)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGGACAGCCT (配列番号
28 : 26mer)

検出プローブ4 (Detect probe 4)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGTGATAGCC (配列番号
29 : 26mer)

検出プローブ5 (Detect probe 5)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGGGTACAGT (配列番号
30 : 26mer)

検出プローブ6 (Detect probe 6)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGATCGGGAG (配列番号
31 : 26mer)

検出プローブ7 (Detect probe 7)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGTCAACATC (配列番号
32 : 26mer)

検出プローブ8 (Detect probe 8)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGAACTATAC (配列番号
33 : 26mer)

検出プローブ9 (Detect probe 9)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGAACACACA (配列番
号34 : 27mer)

検出プローブ10 (Detect probe 10)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : GTCGGCAATTCAGTTGAGAACTATGC (配列番号
35 : 26mer)

検出プローブ11 (Detect probe 11)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 :)GTCGGCAATTCAGTTGAGAACTATACA (配列番
号36 : 27mer)

検出プローブ12 (Detect probe 12)

X2 : CTCAACTGGTGTCGTGG (配列番号25 : 17mer)

X3 : (配列番号37 : 26mer)

[0071] 上述した捕捉プローブを固定したDNAマイクロアレイ基板を、表1の溶液に接触させながら室温で90分放置した。DNAマイクロアレイ基板を超純水で洗浄・乾燥後、回転式混合器（生体分子検出部）に設置した。

表1中、Takara 10×bufferの組成は、500mM Tris-HCl (pH7.5)、100mM MgCl₂、50mM DTTである。

[0072]

[表1]

10 unit/ μ l T4 Polynucleotide Kinase	25 μ l
5M betaine 100mM ATP	10 μ l
Takara 10 $\times$ buffer	100 μ l
Milli-Q Water	865 μ l
Total	1000 μ l

[0073] さらに、任意の濃度のmiRNA溶液を表2のように調製し、検出プローブ1を含有するハイブリダイゼーション反応溶液を表3のように調製した。

[0074] [表2]

1 μ M miR-141	1 μ l
1 μ M miR-143	1 μ l
1 nM miR-1275	1 μ l
1 μ M miR-107	1 μ l
1 μ M miR-181a-2*	1 μ l
1 μ M miR-484	1 μ l
1 μ M miR-21	1 μ l
1 μ M let-7a	1 μ l
1 μ M let-7b	1 μ l
1 μ M let-7d	1 μ l
1 μ M let-7f	1 μ l
10 μ M miR-39	1 μ l
RNase-free water	88 μ l
Total	100 μ l

[0075]

[表3]

20 μ M Detect probe 1	1 μ l
20 μ M Detect probe 2	1 μ l
20 μ M Detect probe 3	1 μ l
20 μ M Detect probe 4	1 μ l
20 μ M Detect probe 5	1 μ l
20 μ M Detect probe 6	1 μ l
20 μ M Detect probe 7	1 μ l
20 μ M Detect probe 8	1 μ l
20 μ M Detect probe 9	1 μ l
20 μ M Detect probe 10	1 μ l
20 μ M Detect probe 11	1 μ l
20 μ M Detect probe 12	1 μ l
1M Tris-HCl (pH7.5)	13.3 μ l
1M MgCl ₂	2 μ l
100mM ATP	2 μ l
10mg/ml BSA	2 μ l
1M DTT	2 μ l
2.5M NaCl	12 μ l
350units/ μ l T4 DNA ligase	2.9 μ l
RNase-free water	51.8 μ l
Total	100 μ l

[0076] 調製したmiRNA溶液とハイブリダイゼーション反応溶液とをそれぞれ別のインレットから導入し、回転式混合器で10分間循環させてハイブリダイゼーションさせた。

[0077] ハイブリダイゼーション反応終了後、上記のインレットから0.3M NaClと30mM クエン酸ナトリウムを含む洗浄液を500 μ l流してDNAマイクロアレイ基板を洗浄し、蛍光顕微鏡で観察し、蛍光強度を測定した。

結果を図7(A)及び図7(B)に示す。図7(A)は、miRNA検出結果を示す基板の画像である。図7(B)は、左の画像のスポットに対応しており、網掛けで示したスポットが、標的miRNAに対応するスポットで、蛍光が観察されるべきスポットである。各アルファベットは下記のmiR

NAに対応している。

A : 141、B : 143、C : 1275、D : 107、E : 181a-2*、F : 484、S : let-7a、T : let-7b、U : let-7d。

導入したmiRNAに対応するプローブを固定した各スポットにおいて、Alexa647標識された検出プローブの蛍光像が観察された。なお、「C」のmiR-1275は、検出限界濃度を確認するため他のmiRNAの1000分の1の濃度で入れたため、蛍光が暗くなっている。また、プローブの配列ごとに明るさが異なるのは、プローブの親和性が異なるためである。

このことから、miRNAを配列依存的に検出できることが確認された。

[0078] [流体デバイスにおけるバルブの開閉]

本実施例におけるバルブの開閉動作を説明するための流体デバイスの模式図を図9(A)に示す。本デバイスは、エクソソーム精製ユニット（エクソソーム精製部2）、miRNA精製ユニット（生体分子精製部3）、DNAチップ（生体分子検出部4）、廃液槽7、廃液槽8、廃液槽9を備える。廃液槽は吸引口を備える。

図9(B)に示すような、各工程におけるバルブの開閉制御により、流体の流れを制御できることが確認された。たとえば、上清導入の際には、図9(A)のバルブ1番(1)、バルブ3番(3)、バルブ5番(5)、バルブ7番(7)、バルブ8番(8)、バルブ10番(10)、バルブ13番(13)を開き、上清廃液槽の吸引口Aから溶液を吸引する。

[0079] 以上の結果から、本実施形態によれば、サンプルをデバイスに導入することで一連の流れでエクソソーム内容物まで分析できる。

符号の説明

[0080] 1, 20…流体デバイス、2…エクソソーム精製部、2a…洗浄液導入用インレット、2b…サンプル導入用インレット、2c…破碎液導入用インレット、2d…エクソソーム固定部、2e, 2f, 2g, 3d, 3f, 5a, 10a, 11a, …バルブ、2h, 2i, 2j, 3e, 3g…流路、3…生体分子精製部、3b…生体分子回収液導入用インレット、3c…生体分子固

定部、４…生体分子検出部、４ a…検出プローブ導入用インレット、４ b…洗浄液導入用インレット、４ c…基板、５…第一の流路、６…第二の流路、７…第一の廃液槽、８…第二の廃液槽、９…第三の廃液槽、１０…第三の流路、１１…第四の流路、１２…第五の流路、３３…miRNA、３１…第一の部分、３２…第二の部分、３４…捕捉プローブ、３４ a…スペーサー、３５…検出プローブ、３５ a…標識物質、３５ b…配列、３５ c, ３５ d…ステム部、３６…基板。

請求の範囲

- [請求項1] サンプル中のエクソソームが内包する生体分子を検出する流体デバイスであって、
- 疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエクソソーム精製部と、
- 生体分子精製部と、
- 生体分子検出部と、
- 前記エクソソーム精製部と前記生体分子精製部を繋ぐ第一の流路と、
- 前記生体分子精製部と前記生体分子検出部を繋ぐ第二の流路と、
- を備えたことを特徴とする流体デバイス。
- [請求項2] 前記エクソソーム精製部は、前記エクソソームの固定と、前記エクソソームの破碎とを行う請求項1に記載の流体デバイス。
- [請求項3] 前記エクソソーム精製部は、
- インレットと、
- 前記疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエクソソーム固定部と、
- を備えた請求項1又は2に記載の流体デバイス。
- [請求項4] 前記インレットは、
- サンプル導入用インレット及びエクソソーム破碎液導入用インレット
- を備えた請求項1～3のいずれか一項に記載の流体デバイス。
- [請求項5] 前記第一の流路は、前記生体分子を含む前記エクソソームの破碎液を前記エクソソーム精製部から前記生体分子精製部に送液する流路であり、
- 前記第二の流路は、精製された前記生体分子を含む溶液を前記生体分子検出部に送液する流路である請求項1～4のいずれか一項に記載の流体デバイス。

- [請求項6] 更に廃液槽と、
前記廃液槽と前記エキソソーム精製部を繋ぐ第三の流路と、
前記廃液槽と前記生体分子精製部を繋ぐ第四の流路と、
前記廃液槽と前記生体分子検出部を繋ぐ第五の流路と、
を備えた請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の流体デバイス。
- [請求項7] 前記生体分子精製部は、
生体分子回収液導入用インレットと、
生体分子固定部と、
を備えた請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の流体デバイス。
- [請求項8] 前記生体分子検出部は、前記生体分子に親和性を有する物質が固定されてなる基板を備えた請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の流体デバイス。
- [請求項9] 前記生体分子は m i R N A であり、前記生体分子検出部は、標的 m i R N A に相補的なプローブが固定されてなる基板を備えた請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の流体デバイス。
- [請求項10] 前記生体分子検出部は、
標的 m i R N A を第一の部分と第二の部分に分割した場合に、前記第一の部分とハイブリダイズし得る配列を含む捕捉プローブが固定されてなる基板と、
検出プローブ導入用インレットと、を備え、
前記検出プローブは、二本鎖を形成する二つのステム部と、該二つのステム部間の領域であり、標識物質により標識されているループ部と、
標的 m i R N A を第一の部分と第二の部分に分割した場合に、前記第二の部分とハイブリダイズし得る配列を有し、5' 突出末端又は 3' 突出末端を有する請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の流体デバイス。
- [請求項11] 前記エキソソーム精製部は、前記エキソソームを固定後、前記エキ

ソソームの表面に存在する生体分子の検出を行う、請求項2～10のいずれか一項に記載の流体デバイス。

[請求項12] 前記インレットは、エキソソーム表面の生体分子を検出する検出溶液の導入用インレットを含む、請求項3～11のいずれか一項に記載の流体デバイス。

[請求項13] サンプル中のエキソソームが内包する生体分子を精製する流体デバイスであって、

サンプル導入用インレット及びエキソソーム破碎液導入用インレットと、

前記疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム固定部と、

を備えたことを特徴とする流体デバイス。

[請求項14] 疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された層を有するエキソソーム精製部上でエキソソームを精製し、破碎する工程を有することを特徴とするエキソソームの分析方法。

[請求項15] 更に、前記破碎されたエキソソームから流出する生体分子を精製し、検出する工程を有する請求項14に記載のエキソソームの分析方法。

[請求項16] (a) 流体デバイス中の疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された基板に、エキソソーム含有試料を接触させて、前記基板上の疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物にエキソソームを結合させる工程と、

(b) 前記エキソソームが結合した基板に破碎液を流入して前記エキソソームを破碎し、内包される生体分子を放出させる工程と、

(c) 前記生体分子を精製する工程と、

(d) 前記生体分子を検出する工程と、

を有することを特徴とする生体分子分析方法。

[請求項17] 前記精製工程(c)は、

(c 1) 前記生体分子を捕捉部に捕捉する工程と、

(c 2) 前記生体分子を捕捉部から溶出させる工程と、

を有する請求項 16 に記載の生体分子分析方法。

[請求項18] 工程 c 1 において、前記生体分子を含む前記破砕液を前記捕捉部に送液し、前記破砕液に含まれる前記生体分子を捕捉する請求項 17 に記載の生体分子分析方法。

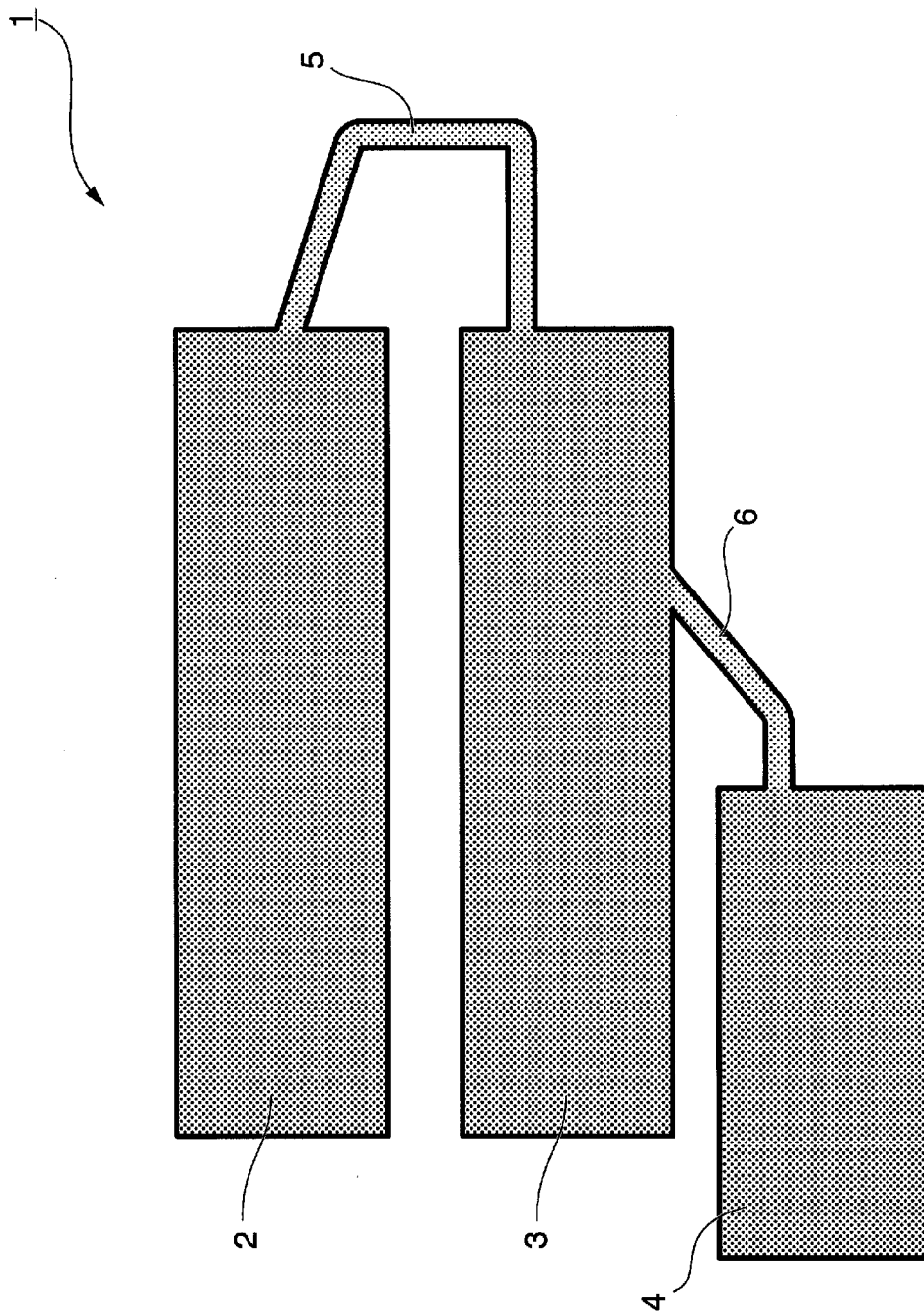
[請求項19] 前記工程 (a) の後、前記エキソソームが結合した基板上で、前記エキソソームの表面に存在する生体分子の検出を行う工程を有する、請求項 16 ～ 18 のいずれか一項に記載の生体分子分析方法。

[請求項20] (a) 疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物で修飾された基板に脂質二重層で囲まれた構造体を含有する試料を接触させて、前記基板上の疎水性鎖と親水性鎖を有する化合物に前記脂質二重層で囲まれた構造体を結合させる工程と、

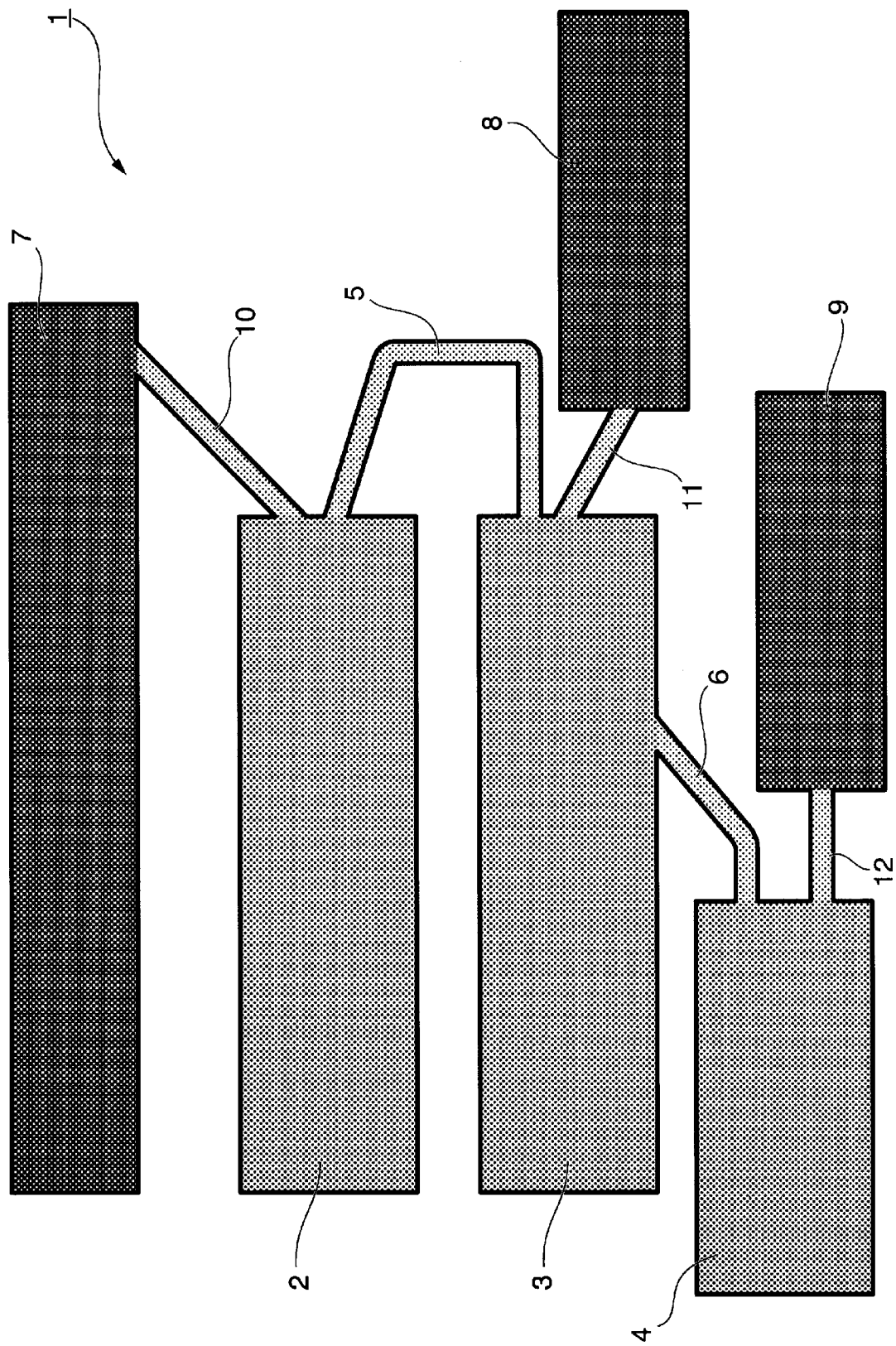
(b) 前記膜小胞体を破砕し、内包される生体分子を放出させる工程と、

(d) 前記生体分子を検出する工程と、
を有することを特徴とする生体分子検出方法。

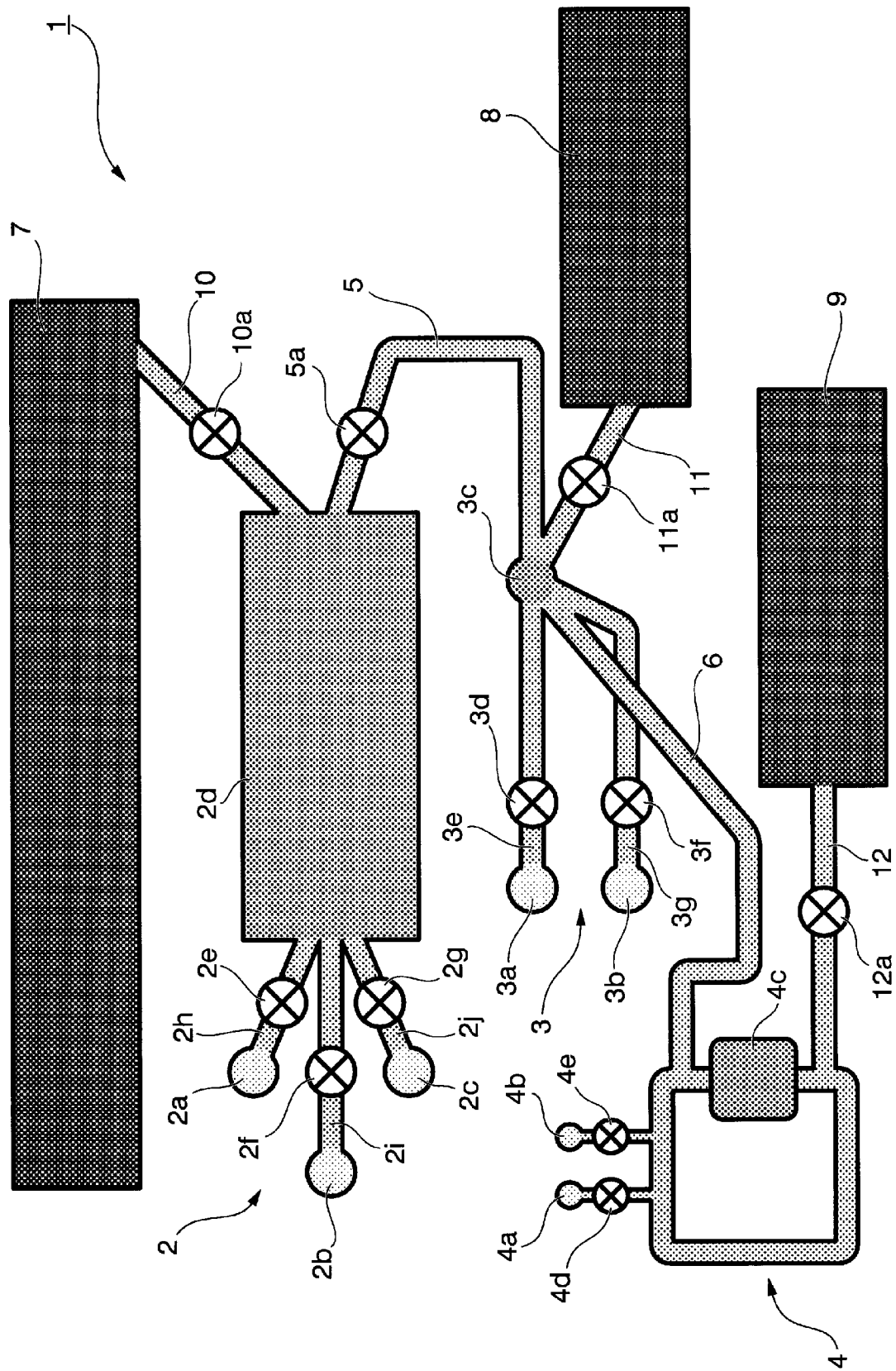
[図1]



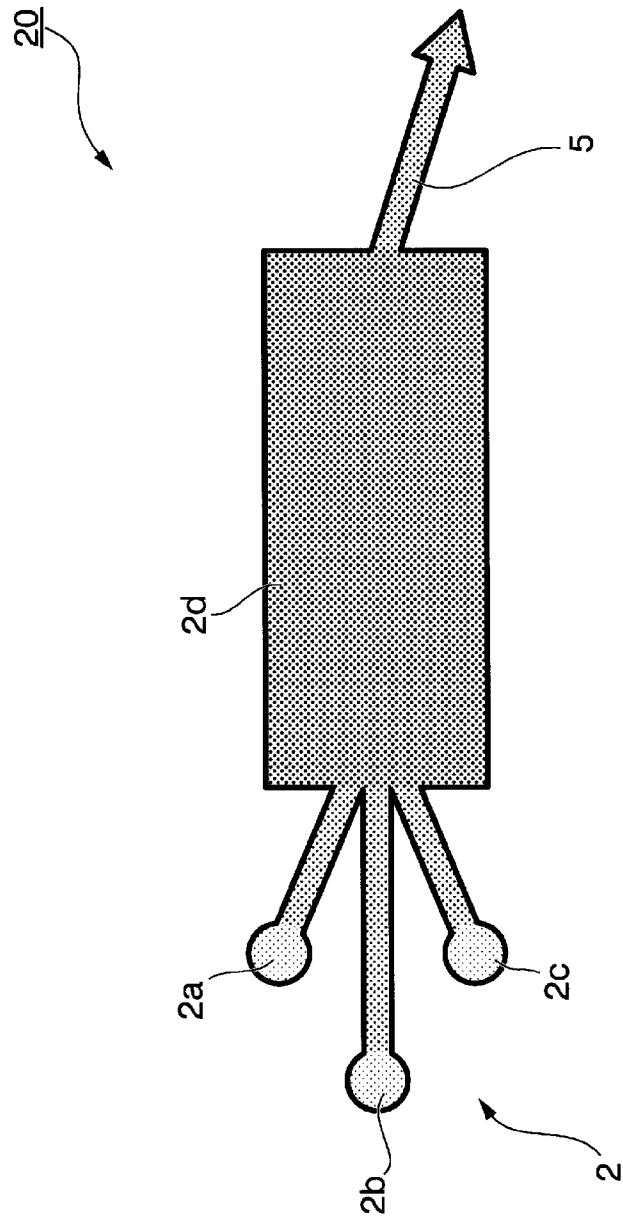
[図2]



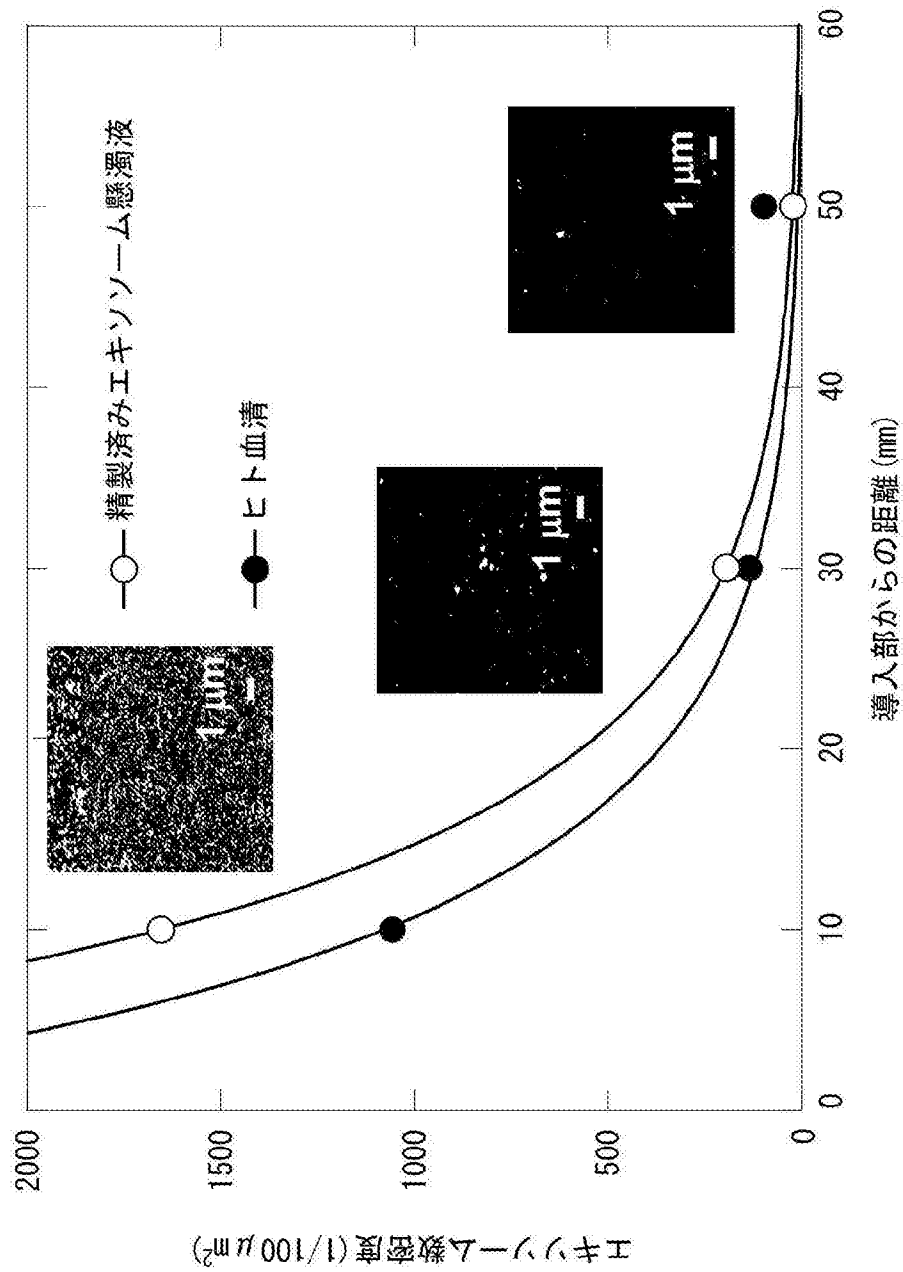
[図3]



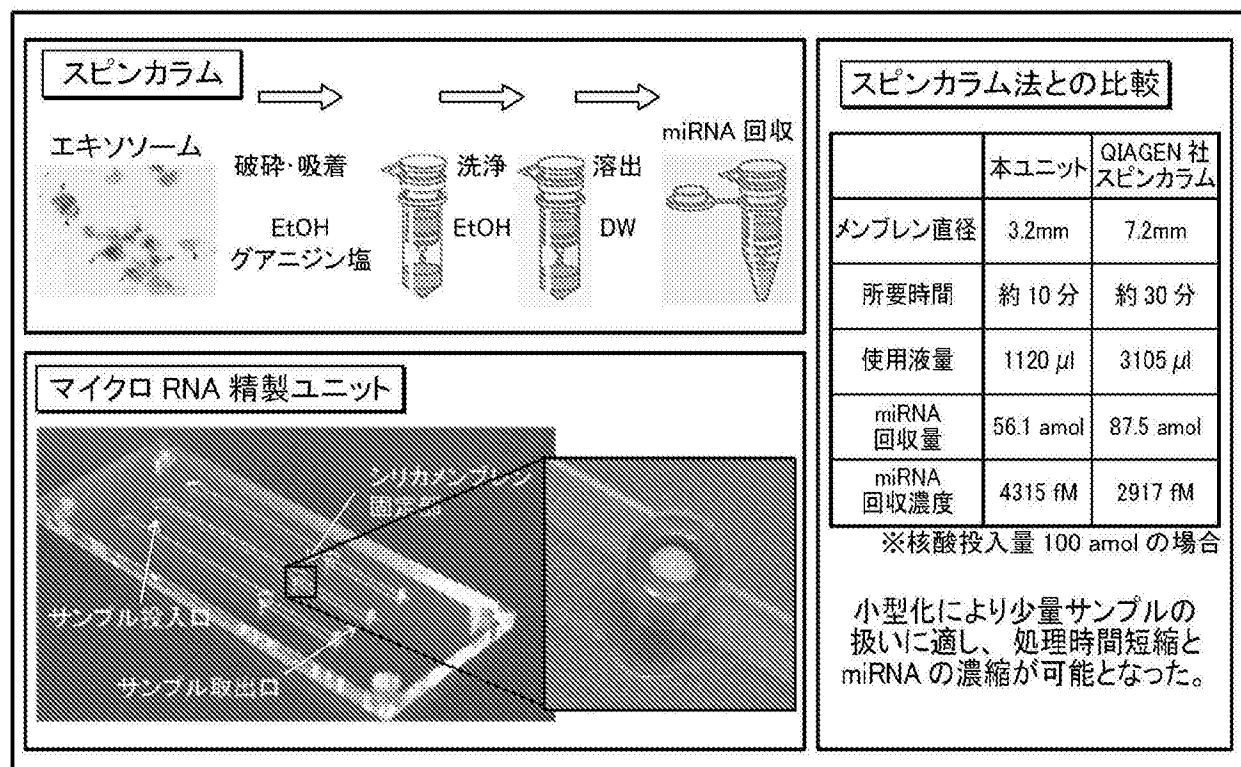
[図4]



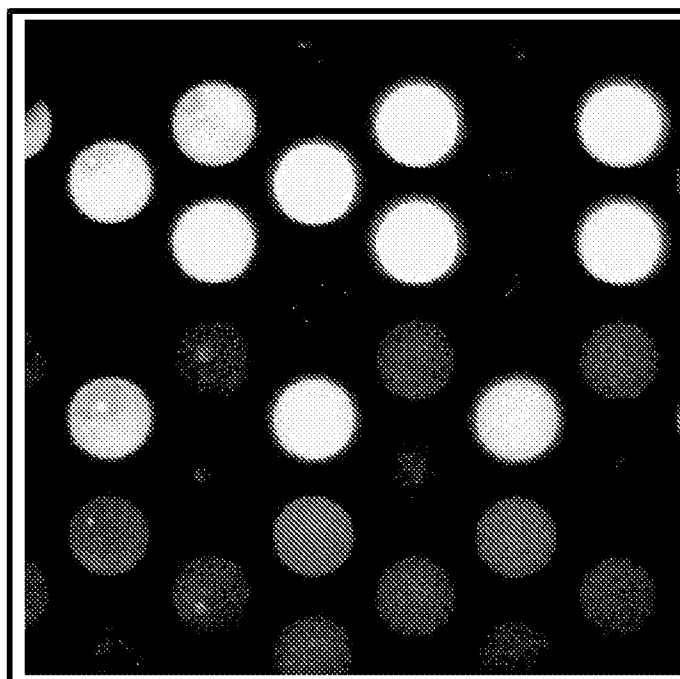
[図5]



[図6]



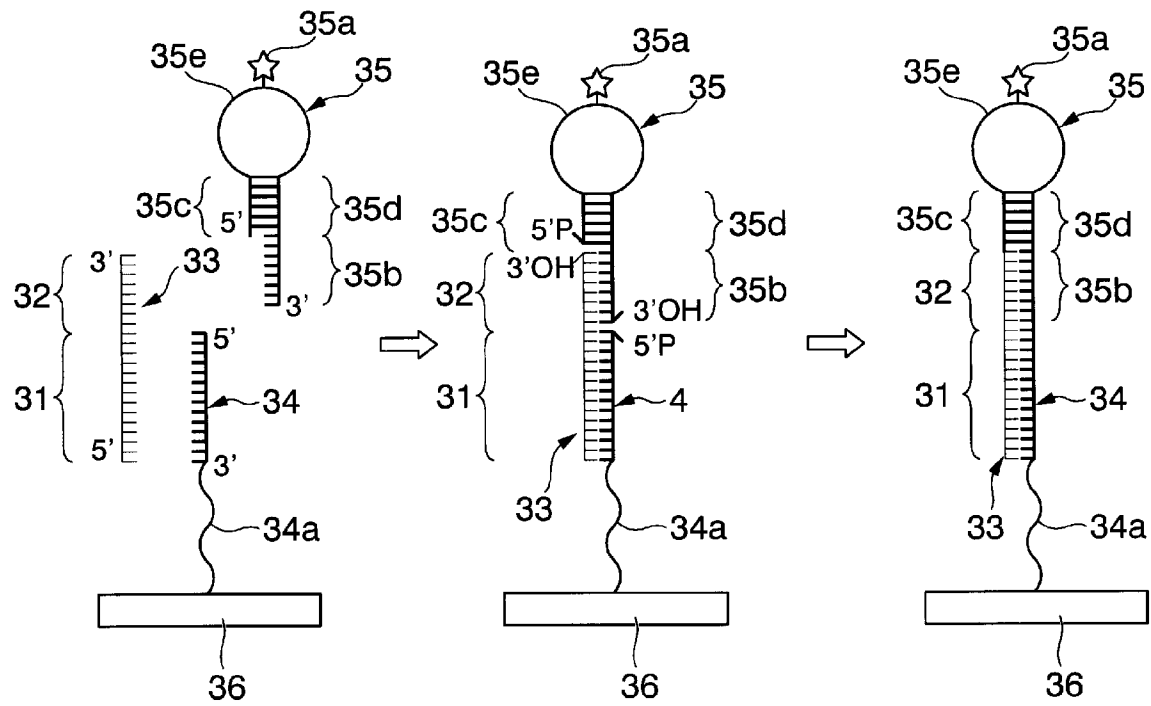
[図7A]



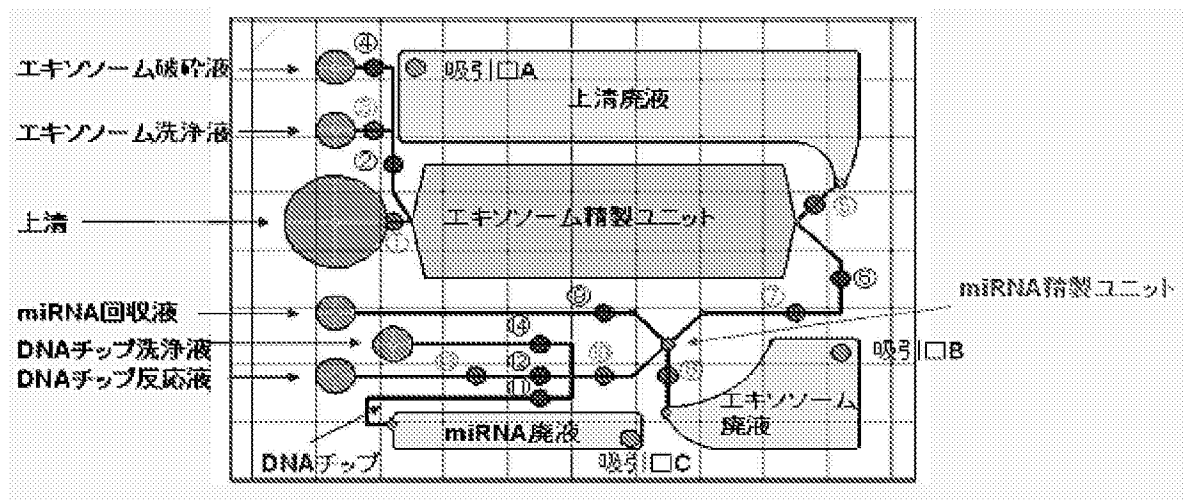
[図7B]

R	5951	R	5952	R	5953
6032	S	6033	S	6034	S
T	6110	T	6111	T	6112
6191	U	6192	U	6193	U
Q-prob	6270	Q-prob	6271	Q-prob	6272
6351	A	6352	A	6353	A
B	6431	B	6432	B	6433
6511	G	6512	G	6513	G
D	6591	D	6592	D	6593
6672	E	6673	E	6674	E
F	6752	F	6753	F	6754

[図8]



[図9A]



[図9B]

O : Open
X : Close

バルブ番号・接続口	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	A	B	C
上清投入	O	X	O	X	O	X	O	O	X	O	X	X	O	X	O	X	X
エキソソーム洗浄	X	O	O	X	O	X	O	O	X	O	X	X	O	X	O	X	X
エキソソーム破砕	X	O	X	O	X	O	O	O	X	O	X	X	O	X	X	O	X
シリカビーズ反応	X	O	X	O	X	O	O	O	X	O	X	X	O	X	X	O	X
miRNA回収	X	O	X	O	X	O	X	X	O	O	O	X	O	X	X	X	O
DNAチップ反応	X	O	X	O	X	O	X	X	O	X	O	O	O	X	X	X	O
DNAチップ洗浄	X	O	X	O	X	O	X	X	O	X	O	O	X	O	X	X	O

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/071422

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12N15/113(2010.01)n 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) C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09, C12N15/113 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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	Takanori ICHIKI, "Micro RNA ni yoru Gan Shindan Platform", Gendai Kagaku, The March issue, 2013.03, pages 42 to 45	1-18, 20/19
Y	Masashi KOBAYASHI et al., "Development of the isolation method for exosome in human serum immobilized by biocompatible anchor for membrane", JSAP Spring Meeting Koen Yokoshu, 2013.03, vol.60th, page 12-194, #29a-G17-10	19
Y	Masashi KOBAYASHI et al., "Development of evaluation method for immobilized exosomes in human serum on the glass substrate modified with biocompatible anchor for membrane", JSAP Autumn Meeting Koen Yokoshu, 17 September 2013 (17.09.2013), vol.74th, page 12-155, #17a-C4-10	19
☒ 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 29 October, 2014 (29.10.14)		Date of mailing of the international search report 11 November, 2014 (11.11.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/071422

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Takanori ICHIKI, "Diagnostic Platform of Exosomes in Body Flood", Cell technology, 2012, vol.32, no.1, pages 91 to 95	1-20
A	AKAGI, T. et al., Immobilization and Isolation of Exosomes Using Polyethylene Glycol-Lipid-Modified Surface in a Microchannel and Evaluation by Atomic Force Microscopy, International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2012, Vol.16th, pp.1291-1293	1-20
A	JP 2008-513022 A (Microchip Biotechnologies, Inc.), 01 May 2008 (01.05.2008), claims & US 2007/0248958 A1 & EP 1794581 A2 & WO 2006/032044 A2	1-20
A	WO 2012/170037 A1 (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.), 13 December 2012 (13.12.2012), claims & US 2014/0099649 A1 & EP 2717989 A1 & JP 2014-519331 A	1-20

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C）） Int.Cl. C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n, C12N15/113(2010.01)n			
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（I P C）） Int.Cl. C12M1/00, C12M1/34, C12Q1/68, G01N33/53, G01N37/00, C12N15/09, C12N15/113			
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 1 9 2 2 - 1 9 9 6 年 日本国公開実用新案公報 1 9 7 1 - 2 0 1 4 年 日本国実用新案登録公報 1 9 9 6 - 2 0 1 4 年 日本国登録実用新案公報 1 9 9 4 - 2 0 1 4 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） CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamIII), PubMed			
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/Y	一木隆範, マイクロRNAによるがん診断プラットフォーム, 現代化学3月号, 2013.03, pp.42-45	1-18, 20/19	
Y	小林雅 他, 脂質膜固定分子を用いたヒト血清中エキソソーム回収 法の開発, 応用物理学会春季学術講演会講演予稿集, 2013.03, Vol.60th, p.12-194, #29a-G17-10	19	
☒ 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 2 9 . 1 0 . 2 0 1 4		国際調査報告の発送日 1 1 . 1 1 . 2 0 1 4	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（I S A / 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） 藤井 美穂 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	4 N 4 4 3 4

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
Y	小林雅 他, 脂質膜固定分子上に固定化されたエキソソーム評価法の開発, 応用物理学会秋季学術講演会講演予稿集, 2013.09.17, Vol.74th, p.12-155, #17a-C4-10	19
A	一木隆範, 体液エクソソームの診断プラットフォーム, 細胞工学, 2012, Vol.32, No.1, pp.91-95	1-20
A	AKAGI, T. et al., Immobilization and Isolation of Exosomes Using Polyethylene Glycol-Lipid-Modified Surface in a Microchannel and Evaluation by Atomic Force Microscopy, International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, 2012, Vol.16th, pp.1291-1293	1-20
A	JP 2008-513022 A (マイクロチップ バイオテクノロジーズ, インコーポレイテッド) 2008.05.01, 特許請求の範囲 & US 2007/0248958 A1 & EP 1794581 A2 & WO 2006/032044 A2	1-20
A	WO 2012/170037 A1 (HITACHI CHEMICAL CO., LTD.) 2012.12.13, Claims & US 2014/0099649 A1 & EP 2717989 A1 & JP 2014-519331 A	1-20