

(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
2017年11月30日(30.11.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/204187 A1

(51) 国際特許分類:

C09D 185/02 (2006.01) C09D 133/14 (2006.01)
C08F 230/02 (2006.01) C09D 139/06 (2006.01)
C09D 129/04 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/019121

(22) 国際出願日: 2017年5月23日(23.05.2017)

(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 2016-103091 2016年5月24日(24.05.2016) JP

(71) 出願人: 公益財団法人がん研究会 (JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH) [JP/JP]; 〒1358550 東京都江東区有明三丁目8番31号 Tokyo (JP). 日油株式会社 (NOF CORPORATION) [JP/JP]; 〒1506019 東京都渋谷区恵比寿四丁目20番3号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 芝 清隆 (SHIBA Kiyotaka); 〒1358550 東京都江東区有明三丁目8番31号 公益財団法人がん研究会内 Tokyo (JP). 坂元伸行 (SAKAMOTO Nobuyuki); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町3-3 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 野田 朋澄 (NODA

Tomozumi); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町3-3 日油株式会社内 Kanagawa (JP). 山田 智 (YAMADA Satoshi); 〒2100865 神奈川県川崎市川崎区千鳥町3-3 日油株式会社内 Kanagawa (JP).

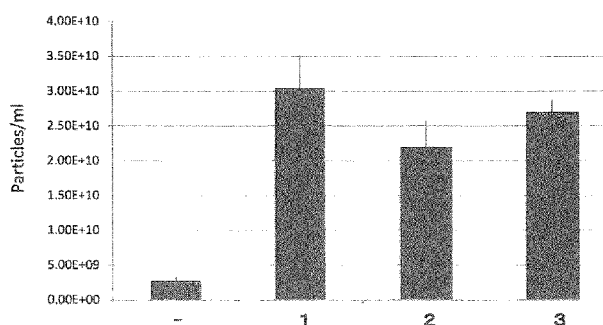
(74) 代理人: 白形 由美子 (SHIRAKATA Yumiko); 〒1410031 東京都品川区西五反田1丁目11番1号 アイオス五反田駅前ビル1001号 Tokyo (JP).

(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, DJ, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,

(54) Title: METHOD OF RECOVERING EXTRACELLULAR VESICLES AND CONTAINER FOR EXTRACELLULAR VESICLES

(54) 発明の名称: 細胞外小胞回収方法及び細胞外小胞用容器



(57) Abstract: A coating agent, for preventing extracellular vesicles represented by exosomes from being adsorbed to a tool, has been developed. Extracellular vesicles can be prevented from being adsorbed to a tool by using a coating agent which contains a hydrophilic polymer having a weight average molecular weight of 10,000-1,000,000 and which forms a coating film having a contact angle of 0-30 degrees.

(57) 要約: エクソソームに代表される細胞外小胞の器具への吸着を防止するためのコーティング剤を開発した。重量平均分子量が1万以上100万以下である親水性ポリマーを含有し、得られるコーティング被膜の接触角が0度以上30度以下であるコーティング剤を使用することによって、細胞外小胞の器具への吸着を防止することができる。

[続葉有]



WO 2017/204187 A1

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)）

明 細 書

発明の名称：細胞外小胞回収方法及び細胞外小胞用容器

技術分野

[0001] 本発明は、エクソソーム（*exosome*）に代表される細胞由来の小胞を効率的に回収するための方法及びその回収に用いる容器、器具に関する。また、エクソソームによって検査する方法に用いるための基板、流路等に関する。

背景技術

[0002] 細胞外小胞とは、細胞に由来する細胞外に存在する小胞で、その大きさからエクソソーム、微小小胞体（*Microvesicle*）、アポトーシス小体（*apoptotic body*）に分類される。エクソソームや微小小胞体には、タンパク質や*mRNA*、*miRNA*などの核酸が含まれ、アポトーシス小体には断片化された核や細胞小器官が含まれている。細胞外小胞の中でも、エクソソームや微小小胞体にはタンパク質や核酸が含まれていることから、放出した細胞由来の情報が含まれており、バイオマーカーとして利用できる可能性を有している。特にエクソソームは診断マーカーや治療に利用できる可能性を含んでおり近年注目されている。

[0003] エクソソームは、細胞から分泌される脂質二重膜で形成された直径30～100nmの小胞体である。エクソソームはほとんどの細胞から分泌されることが知られており、血液、唾液、尿、母乳などの体液中で存在が確認されている。エクソソームには分泌された細胞由来の*RNA*やタンパク質が内包されており、体液中を循環することで離れた細胞まで情報を伝達する可能性が示唆されている（非特許文献1）。癌細胞由来のエクソソームに含まれている核酸やタンパク質によって、癌の進展が促進される可能性が示され、さらにこのことからエクソソームを用いた癌診断システムの可能性が示唆された（非特許文献2）。

[0004] 上述のように、エクソソームに内包されているタンパク質や核酸は、分泌

された細胞種によって異なることが明らかになっている。そのため、エクソソーム由来の核酸やタンパク質は診断マーカーとして有用である。また、エクソソームは唾液や尿中にも含まれることから、エクソソームを用いた精度の高い検査方法を確立することができれば、非侵襲的な診断方法とすることができる。さらに、エクソソームの情報伝達機能を用いることによって、健康な細胞から採取し回収したエクソソームを、傷害を受けた細胞や罹患細胞の回復に用いる試みも行われている（特許文献1）。

[0005] 唾液など少量の試料からエクソソームを精製したり、治療目的で多量のエクソソームを精製するためには、回収率良く精製する方法が必要となる。従来からエクソソームを精製する方法として、遠心分離やカラムにより単離する方法が開示されている（特許文献2、3）。中でも超遠心を用いた遠心分離法は確立された回収技術であり、エクソソームの形状維持性の点で優れた技術である。

[0006] 例えば、細胞の培養上清からエクソソームを回収する場合であれば、エクソソームを含む培地を低速遠心で細胞の破片等を除去した後に、2時間程度超遠心によりエクソソームをペレットとして回収することができる。こうして得たエクソソームはPBSなどの緩衝液に再分散させ、さらに精製を行ったり、そのまま検査や研究などの解析に用いることができる。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特表2014-507140号公報

特許文献2：特表2003-531864号公報

特許文献3：特表2002-535665号公報

特許文献4：特開平7-83923号公報

特許文献5：国際公開第2005/001019号

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Valadi, H. et al., 2007, Nat. Cell Biol., Vol.9, p.654-659.

非特許文献2 : Skog, J. et al., 2008, Nat. Cell Biol., Vol.10, pp.1470-1476.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] しかしながら、上述の超遠心による回収方法では、使用する回収容器のプラスチック表面にエクソソームが非特異的に吸着し、安定した回収率が得られず、操作のたびに回収率が低下することが問題となっていた。特に、定量的な解析を行うにあたって、精製に用いる容器や、解析器具の表面への吸着は、解析の効率だけではなく解析結果にも影響を与える。しかしながら、今までエクソソームなどの細胞外小胞の吸着を防止する有効な方法は開発されていない。

[0010] 従来、生体由来物質であるタンパク質や細胞を親水性ポリマーによって、容器へ非特異的に吸着するのを防止する方法は開示されている（特許文献4、5）。特許文献4には2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン重合体や、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン含有成分の共重合体を含むPBS溶液でポリスチレン製の容器をコートすることにより、タンパク質の吸着を防止できることが開示されている。特許文献5には、ホスホリルコリン類似基を含有する化合物を用いて培養容器を被覆することによって、ES細胞の培養容器への接着を防止し、効率良く胚様体を形成できることが開示されている。

[0011] しかしながら、特許文献4はタンパク質に特化した方法であり、エクソソーム等の表面にはタンパク質が表出しているとはいえ、脂質二重膜で形成されている細胞外小胞の吸着を完全に防止することが困難であった。また、特許文献5の方法は、脂質二重膜で形成されている細胞の吸着を防止するものであるが、細胞と細胞外小胞、特にエクソソームとではその大きさが全く異なることから容器への吸着の程度が大きく異なり、エクソソームの容器への吸着を完全に防止することはできなかった。

[0012] 本発明は、エクソソームに代表される細胞由来の小胞を精製する際に、遠

心管など精製に使用する容器やピペットチップなどの器具への細胞由来の小胞の吸着を防止し、回収率の向上を図るためのコーティング剤を提供することを課題とする。また、精製の過程に使用できるだけではなく、エクソソーム解析に用いる基板、流路などにコートすることによって、エクソソーム解析の精度を向上させることができるコーティング剤を提供することを課題とする。さらに、これらコーティング剤によってコートされた容器やチップ、基板などの分析器具を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明は以下のコーティング剤、器具、精製方法、解析方法に関する。

(1) 重量平均分子量が1万以上100万以下である親水性ポリマーを含有し、得られるコーティング被膜の接触角が0度以上30度以下である細胞外小胞吸着防止用コーティング剤。

(2) 前記親水性ポリマーが2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ビニルアルコール、ビニルピロリドン、メトキシアルキレングリコールモノメタクリレート又はメタクリル酸2-ヒドロキシエチルからなる1種以上の親水性単量体を含む(1)記載のコーティング剤。

(3) 前記親水性ポリマーを構成する前記親水性単量体が、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンであって、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに基づく構成単位を30モル%以上50モル%以下含有し、残余が疎水性基含有単量体からなる共重合体である(2)記載のコーティング剤。

(4) (1)～(3)いずれか1つ記載のコーティング剤でコートされている器具。

(5) (4)記載の器具を用いることを特徴とする細胞外小胞の精製及び／又は解析方法。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]コーティング剤の有無によるエクソソーム回収量を示す図。

[図2]コーティング剤の種類によるエクソソーム回収量を示す図。

[図3]コーティング剤によるエクソソーム回収量を粒子数によって検討した結果を示す図。

[図4]図4 Aは、コーティング剤によるエクソソーム回収量を粒子数によって、図4 Bはウェスタンブロッティングによって検討した結果を示す図。

[図5]図5 Aは、コーティング剤の膜厚によるエクソソーム回収量を粒子数によって、図5 Bはウェスタンブロッティングによって検討した結果を示す図。図5 Cは回収サンプル、吸着サンプルを電気泳動し、銀染色により解析した図。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明で細胞外小胞とは、細胞に由来する小胞をいい、具体的には、エクソソーム、微小小胞体、アポトーシス小体を指す。以下の実施例ではエクソソームを中心に記載するが、エクソソーム以外の細胞外小胞にも応用できることは言うまでもない。

[0016] また、本発明のコーティング剤は、遠心管、チューブ、ピペットチップなど、エクソソーム等の細胞外小胞を精製する際に使用する器具にコートすることによって、その吸着を防止し、回収率を向上することができる。また、ビーズ、マイクロタイタープレート、スライドグラス、マイクロタス、ラボ・オン・チップ等、当該分野で用いられている分析器具、分析機器にコートすることにより非特異吸着を防止し、分析精度を向上させることができる。

[0017] 本発明のコーティング剤は、どのような材質の器具であってもコートすることができる。例えば、遠心管として多用されているポリカーボネート、ポリプロピレン、ポリアロマーや、分析器具の基材として使用される塩化ビニル、ポリスチレン、ポリエチレンテレフタレート、シリコン、親水性ポリジメチルシロキサン、疎水性ポリジメチルシロキサン、ガラス、ステンレスやアルミなどの金属も本発明のコーティング剤によってコートすることにより、エクソソーム等の細胞外小胞の吸着を防止することができる。

[0018] 本発明のコーティング剤によって得られるコーティング被膜の接触角は0度以上30度以下であるが、0度以上25度以下であることが好ましい。また

、本発明の親水性ポリマーの分子量は重量平均分子量が10,000以上1,000,000以下であるが、コーティング膜の耐久性の点から100,000以上が好ましく、またコーティング時の高粘度による塗り斑を抑制するために700,000以下であることがより好ましい。

[0019] また、親水性ポリマーの親水性単量体としては、親水性の重合体、あるいは共重合体を合成できるものであれば構わないが、中でも2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ビニルアルコール、ビニルピロリドン、メトキシアルキレングリコールモノメタクリレート又はメタクリル酸2-ヒドロキシエチルであることが好ましい。これら親水性単量体は、重合体として使用しても、他の単量体とともに共重合体として使用してもよい。

[0020] なかでも、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン（MPC）と疎水性単量体との共重合体は好ましく用いることができる。疎水性単量体としては、メタクリル酸メチル（MMA）、*n*-ブチルメタクリレート（BMA）、メタクリル酸2-エチルヘキシル（EHMA）、メタクリル酸ドデシル（DMA）、メタクリル酸ステアリル（SMA）などを用いることができるが、特にメタクリル酸-*n*-ブチルとの共重合体が入手しやすさと製膜性の点から好ましい。また、MPCと疎水性単量体との共重合体を作製する場合には、MPCと疎水性単量体の組成比は20/80～50/50が良い。

[0021] 本発明のコーティング剤は上述の重合体、あるいは共重合体を0.05%以上5.0%以下の濃度で含有した溶液として用いることができる。0.05重量%未満であると所望の効果を発揮できず、また5重量%より高いとコーティング剤の塗り斑による効果の低下やコーティング剤の物理的な剥離を生ずる恐れがある。溶媒としては、エタノール、メタノールなどのアルコール類、あるいはリン酸緩衝液、トリス緩衝液、PBS、TBSなど当該分野で通常用いられている緩衝液を用いることができる。

[0022] また、コーティング剤を器具に製膜する場合の膜厚は50nm以上2000nm以下であることが好ましく、より好ましくは、90nm以上900nm

m以下であることが好ましい。

[0023] 器具に製膜する場合、完全に均一に製膜することはできない。薄い膜厚で製膜することは非常に困難であることから、平均膜厚が50nm未満の場合には、膜厚のばらつきが大きく、エクソソームの吸着防止効果が弱い箇所が生じる。また、膜厚が2000nmより大きい場合には、製膜に用いるコーティング液（ポリマー溶液）の粘度が高く、使用するポリマー量も多くなるため、製膜時の作業性（乾燥や操作性の点）と経済性の点から難しい。50nm以上2000nm以下の膜厚であれば、エクソソームの吸着を防止する効果がある。さらに、90nm以上900nm以下の膜厚の場合には、安定した膜厚で製膜を行うことができるため、エクソソームの吸着を防止し、安定した測定結果を得ることができる。

以下、実施例を示しながら、本発明を詳細に説明する。

[0024] 1. 重合体

以下の実施例では、下記表1に示す重合体を用いた。

[重合体1]

MPC 23.5g及びBMA 26.5gをエタノール50gに溶解して4つ口フラスコに入れ、30分間窒素を吹き込んだ後、45℃でt-ブチルペルオキシネオデカノエート0.1gを加えて24時間重合反応させた。重合液を3Lのジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿をろ過し、48時間45℃で真空乾燥して粉末36.8gを得た。分子量は標準をポリエチレングリコールに用いたゲルパーミエーションクロマトグラフィー（東ソー社製）により測定した。重量平均分子量は、580,000であった。¹H-NMRにて組成分析した結果、MPC/BMA=30/70（モル比）であった。

[0025] 上記のポリマー0.5gをエタノール100gに溶解して0.5重量%の溶液を調製した。これをPETフィルム上に塗布した後風乾したものを水洗した。これを接触角測定用サンプルとした。接触角測定はドロップマスター（協和界面科学社製）を用いた気泡法により行い、接触角値を水の接触角と

して求めた。具体的には、「 180° - 気泡角」として算出した。得られたコーティング被膜の接触角値は25度であった。

[0026] [重合体2]

MPC 4.7 g 及びBMA 5.3 g をエタノール90 g に溶解して4つ口フラスコに入れ、30分間窒素を吹き込んだ後、60℃でt-ブチルペルオキシネオデカノエート0.25 g を加えて24時間重合反応させた。重合液を3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿をろ過し、48時間45℃で真空乾燥して粉末36.8 g を得た。重量平均分子量は、120,000であった。 $^1\text{H-NMR}$ にて組成分析では、MPC/BMA = 30/70 (モル比) であった。得られたコーティング被膜の接触角値は20度であった。

[0027] [重合体3]

重合体3は、分子量300,000のポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート) (Sigma-Aldrich社製) を使用した。得られたコーティング被膜の接触角値は30度であった。

[0028] [重合体4] (比較例)

重合体4は、MPC 8.4 g およびBMA 36.6 g をエタノール54.6 g に溶解して4つ口フラスコに入れ、30分間窒素を吹き込んだ後、60℃でt-ブチルペルオキシネオデカノエート0.37 g を加え24時間重合反応させた。重合液を3 L のジエチルエーテル中に攪拌しながら滴下し、析出した沈殿をろ過し、48時間45℃で真空乾燥して粉末26.3 g を得た。重量平均分子量は340,000であった。 $^1\text{H-NMR}$ にて組成分析した結果、MPC/BMA = 10/90 (モル比) であった。得られたコーティング被膜の接触角値は42度であった。

[表1]

	組成	組成比 (モル%)	重量平均分子量	接触角
重合体1	MPC/BMA	30/70	580,000	25
重合体2	MPC/BMA	30/70	120,000	20
重合体3	HEMA	100	300,000	30
重合体4	MPC/BMA	10/90	340,000	42

[0029] 上記の親水性ポリマーを含有したコーティング剤を用いて、精製に用いる容器のコーティングを行い、エクソソームの吸着量の解析を行った。なお、コーティングは、表1に示す重合体1～3、比較例である重合体4の親水性ポリマーを夫々0.5wt%含むエタノール溶液で容器表面を濡らし、余剰液を排出した後乾燥させて用いた。

[0030] 2. 親水性ポリマーの有無によるエクソソームの吸着比較

[エクソソームを含む培養上清の調製]

エクソソームはヒト肝がん由来の細胞株HuH-7細胞、又は大腸がん由来の細胞株HT-29細胞の培養上清から得た。HuH-7細胞からエクソソームを得る場合は以下のようにして行った。1×10⁶個のHuH-7細胞は、10%ウシ胎仔血清（サーモフィッシューサイエンティフィック社製）、1/100量のペニシリンストレプトマイシン（ペニシリンストレプトマイシン溶液×100、和光純薬工業製）を添加したRPMI 1640培地、25mlに懸濁して、150mmシャーレ（cell culture dishes 150mm、イワキ株式会社製）に播種し、5%CO₂、37℃、72時間培養した。その後培地を吸引除去し、ウシ胎仔血清を含まないRPMI 1640培地を25ml加え、5%CO₂、37℃、66時間培養した。66時間後に、培養上清を回収し、8,900×g 10分で低速遠心を行い、上清を0.22μmフィルター（milliex-GS-SLGV033RS、メルク社製）に通した。

[0031] HT-29細胞からエクソソームを得る場合には、以下のようにして行った。2×10⁸個のHT-29細胞を、10%ウシ胎仔血清、ペニシリンスト

レプトマイシンを添加したMcCoy's 5A培地、500mlに播種し、Bellocell (CESCO社製) 培養器を用い、5%CO₂、37℃、96時間培養した。次に、培地をデカントで除去し、ウシ胎仔血清を含まないMcCoy's 5A培地を500ml加え、5%CO₂、37℃、72時間さらに培養した。72時間後に、培養上清を回収し、上記と同様にして低速遠心し、上清をフィルターに通しエクソソームの含まれた培養上清を得た。

[0032] [実施例1] エクソソーム吸着実験1

上記で調製したHuH-7細胞の培養上清480mlを30,700rpmで70分遠心し、エクソソームの濃縮を行った。沈殿は12mlの培養上清に再懸濁し、さらに培養上清60mlを加え、エクソソームが濃縮された試料を得た。

[0033] 以下の超遠心工程は、すべて重合体1の親水性ポリマーを含有するコーティング剤をコートした超遠心用チューブ (UCチューブ、Ultra-Clear Tubes、ベックマン・コールター社製)、あるいはコートしていない遠心管にエクソソームが含まれる試料を等量分注し精製を行い、コーティング剤の有無によるエクソソーム回収率を比較した。なお、以下の実験で用いたコーティング剤の膜厚は特に断らない限りおよそ90nmのものを用いた。

[0034] 濃縮されたエクソソームを含む試料は、30,700rpmで120分遠心を行った。得られた沈殿は、3mlの45% OptiPrep (コスモ・バイオ株式会社製) にピペティングで懸濁し、8-40%のグラジエントを用いて24,200rpmで20分遠心した後10分画に分けて採取した。採取した各分画は30,700rpm120分遠心し、沈殿を250μl PBSに懸濁して回収した。

[0035] 各分画で回収されたエクソソーム、及び遠心管に吸着したエクソソーム量をウェスタンブロッティングにより解析した。定法にしたがって、ウェスタンブロッティングを行い、エクソソームのマーカーとして知られているCD

9及びCD63を検出した。抗CD9抗体、抗CD63抗体（両者ともコスモ・バイオ株式会社製）を夫々一次抗体として、二次抗体としてHRP標識抗マウスIgG抗体（バイオ・ラッド ラボラトリーズ社製）を反応させ、化学発光検出を行った。

[0036] 図1は10分画に分画した各分画で回収されたエクソソーム量（回収量）、遠心管に吸着して回収できなかったエクソソーム量（吸着量）を重合体1の親水性ポリマーを含有したコーティング剤、あるいは未処理の遠心管を用いた場合で比較したものである。図1に示すように、コーティング剤を用いずにエクソソームの精製を行った場合には、回収されたエクソソームはごくわずかであり、多くのエクソソームが遠心管に吸着していた。これに対し、重合体1の親水性ポリマーをコートした遠心管を用いて精製を行った場合には、遠心管に吸着したエクソソームはごくわずかであり、ほとんどのエクソソームは再懸濁させて回収することができた。

[0037] [実施例2] エクソソーム吸着実験2

重合体1～3の親水性ポリマーをコートした遠心管、あるいは未処理の遠心管に、上記と同様に低速遠心後、0.22 μ mのフィルター濾過を行ったHuH-7細胞の培養上清12mlにPBS23mlを加えた試料を入れ、37,000rpm70分超遠心を行った。沈殿を250 μ lのPBSに懸濁して回収した。沈殿回収後の遠心管は150 μ l、1×SDS sample bufferを加えて溶出した（1回目遠心管吸着試料）。回収したエクソソームは30mlのPBSを加え、夫々重合体1～3の親水性ポリマーをコートした新しい遠心管、あるいは新しい未処理の遠心管を用い、再度37,000rpm120分遠心を行った。エクソソームは150 μ lになるようにPBSで懸濁して回収した。また、エクソソーム回収後の遠心管は150 μ lの1×SDS sample bufferを加えて溶出した（2回目遠心管吸着試料）。

[0038] 回収したエクソソーム、1回目、2回目の超遠心で遠心管に吸着したエクソソームは実施例1と同様にしてウェスタンブロッティングにより解析を行

った。結果を図2に示す。

[0039] 図2は同じ実験を3回行い、各実験のウェスタンブロッティングの結果を示している。図中、上清は培養上清を、－は未処理の遠心管を、1～3は重合体1～3の親水性ポリマーを含有するコーティング剤によってコートした遠心管を用いていることを示す。

[0040] CD63、CD9どちらのマーカーによって検出した場合も、コーティング剤を使用した場合にはエクソソームが効率よく回収されている。一方、未処理(－)の遠心管を用いた場合には、遠心管に非特異的に吸着したエクソソーム量が多く、回収率が非常に悪くなっている。

[0041] [実施例3] エクソソーム吸着実験3

実施例2において回収されたエクソソームの粒子数をナノサイトLM10(マルバーン社製)によって測定した。キャリブレーションは、Silica Microspheres: 100nm (Polysciences, Inc. #24041)をGEプラディスク13(NYL 0.1 μ m)を通したミリQ水で希釈したもので行った。次に、エクソソームをGEプラディスク13を通したPBSでおよそ10⁸程度に希釈し、シリンジでサンプル溶液を測定セルに注入し10秒待ち、次に30秒のデータ測定を行った。シリンジを押して、チャンバー内のサンプル溶液を移動させることにより、新しいサンプルでセル内を入れ換えながら5回測定を行った。図3は平均値、及び標準偏差を示している。Detection thresholdは4、Camera levelは14を用いた。

[0042] 重合体1～3、いずれの親水性ポリマーを含有したコーティング剤を用いた場合も、未処理の遠心管を用いて精製を行った場合に比べてエクソソームの回収率が非常に向上していることは明らかである。

[0043] [実施例4]

遠心を下記の要領で1回、又は2回行い、エクソソームの回収量、チューブに吸着する量を検討した。エクソソームはHT-29細胞の培養上清から以下のようにして精製した。上記のようにして調製したHT-29細胞の培

養上清500mlを160,000×gで70分遠心し、エクソソームを沈殿させ、続いて沈殿を180mlのPBSで再懸濁し、さらに160,000×gで70分遠心して洗浄した。得られた沈殿を1.3mlのPBSに再懸濁して、エクソソーム粗分画とする。

[0044] エクソソーム粗分画1.3mlを1.7mlの46% Iodixanol (OptiPrep、コスモバイオ社製)と混合し、遠心チューブの底に入れ、その上に8%から40%のIodixanol連続密度勾配を重ねる。遠心チューブをベックマンL-90K遠心機とSW32Tiローターで、100,000×g、17時間、平衡密度勾配遠心を行った。遠心後、試料の上液面から4.26mlずつ3分画を回収し、その後3.26mlずつ6分画を回収し、合計9分画に分けた。それぞれの分画を27mlのPBSに懸濁し、160,000×g、120分の遠心を行った後、沈殿を500μlのPBSに懸濁して精製エクソソームとした。この9分画のうち、この実験では、分画2（密度1.36g/cm³）を精製エクソソーム試料として用いた。

[0045] HT-29細胞の培養上清より得た密度1.36g/cm³エクソソーム溶液をマイクロチューブ（エッペンドルフ社製）に各30μlずつ入れた。チューブは、予め重合体1、又は重合体4の親水性ポリマーをコートしたものを用意した。吸着実験は室温で10分静置し、13,200rpm、4℃、30分間遠心した後、ボルテックスミキサーで10秒攪拌し、エクソソームを回収した。遠心を2回行う場合は、同じ工程を2回行い、エクソソームを回収した。回収したエクソソームは、ナノサイトLM10を用いて粒子数を、ウェスタンブロットティングによって解析を行った。実験は3回行い、粒子数は平均を、ウェスタンブロットティングによる結果は3回の各実験結果を示す（図4）。

[0046] 図4Aは、回収したエクソソームの粒子数の解析結果を示す。実験は3回の平均値をインプットに対する割合で示し、カッコ内の数字は遠心した回数を示す。重合体1を用いた場合には、遠心を1回行った場合にはインプット

の50%以上、2回遠心を行った場合であっても30%以上の粒子を回収することができる。これに対し、重合体4の比較例を用いた場合には、遠心を1回行った場合には30%、2回行った場合には15%程度の回収率しかなかった。

[0047] 図4Bに、ウェスタンブロッティングによる解析結果を示す。各パネルは、1回目、2回目、3回目の各実験において、回収したサンプル、チューブに吸着したサンプルを解析し、上から順に1回目から3回目までの解析結果を示したものである。抗EpCAM抗体（R&D Systems社製）、抗CD9抗体を用いて検出を行った。重合体4を用いた場合には、遠心を2回行って回収したサンプルでは、抗EpCAM抗体、抗CD9抗体いずれの抗体を用いた場合であってもほとんど検出されなかったのに対し、重合体1を用いた場合には、いずれの場合も検出可能であった。

[0048] [実施例5]

コーティング剤の膜厚による吸着量の比較を行った。重合体1を0.5、1.0、2.0、4.0wt%となるようにエタノールに溶解し、マイクロチューブ（トレフ社製）に、90nm～1400nmまで膜厚を変えてコートし解析に用いた。なお、膜厚の測定は、反射分光膜厚計（FE-3000、大塚電子株式会社製）を用いて測定した。実施例4と同様に、HT-29細胞の培養上清から得られたエクソソームを用い、遠心を1回、あるいは2回行い、エクソソームの回収量を比較した。

[0049] 図5Aは、回収したエクソソームの粒子数の解析結果を示す。左側に示す90、140、370、1400は、マイクロチューブをコートした膜厚（nm）を示す。実験は3回の平均値をインプットに対する割合で示し、かつこ内の数字は遠心した回数を示す。－は未処理のチューブを用いた結果を示す。いずれの膜厚であっても、コーティングを行ったチューブを使用した場合には、インプットの50%以上の粒子を回収可能であった。これに対し、未処理のチューブの場合には、遠心を1回行った場合でも平均約45%、2回遠心を行った場合では平均20%以下の粒子しか回収することができな

った。

[0050] 粒子数の解析によって、コート剤の厚さによる回収量の違いは見られなかったが、製膜時のばらつき、作業性を考慮すると50nm以上2000nm以下の膜厚であることが好ましい。この範囲の膜厚であれば、エクソソームの吸着を防止し、かつ安定した測定結果が得られると考えられる。

[0051] 図5Bに、ウェスタンブロッティングによる解析結果を示す。実施例4と同様に、抗EpCAM抗体、及び抗CD9抗体により検出を行った結果を示している。いずれの膜厚でも、コートしていないチューブと比較して、明らかにエクソソームの吸着が抑えられるという結果が得られた。

[0052] 図5Cに、回収サンプル、チューブに吸着したサンプルをSDS電気泳動し、銀染色により解析した結果を示す。未処理のチューブを用いた場合には、明らかに回収量が低下している。これに対し、いずれの膜厚であってもコーティングを行った場合には、吸着サンプルが減少し、回収サンプルが増加していることは明らかである。

[0053] 上記実施例に示すように、重合体1～3を含有するコーティング剤を用いることによりエクソソームの容器への吸着が減少し、著しく回収率が向上している。これらコーティング剤により、エクソソーム回収率を向上させることができるだけでなく、定量的な解析を精度良く行うことができる。

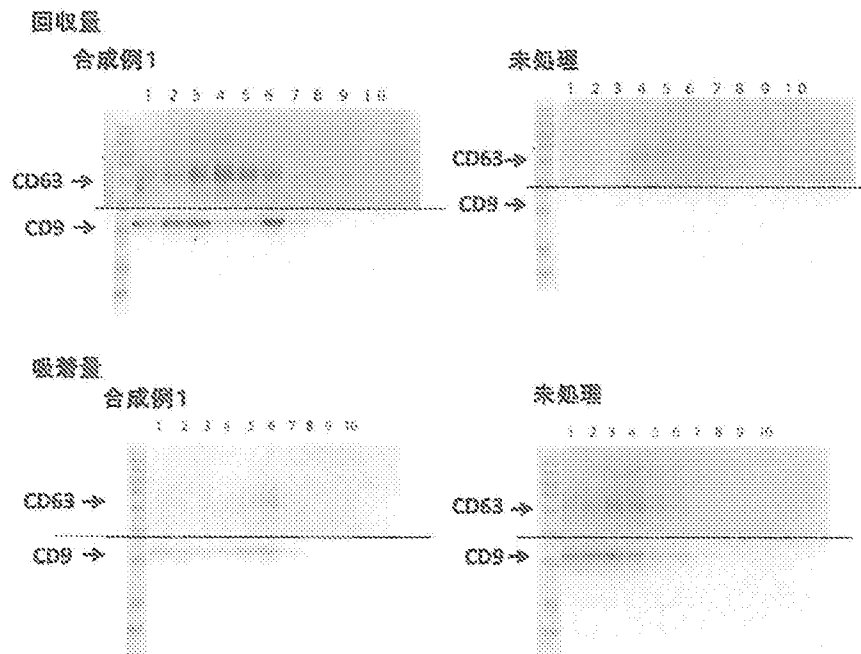
産業上の利用可能性

[0054] 本発明のコーティング剤を使用することによって、エクソソームをはじめとする細胞外小胞が容器や解析に用いる基板などへ吸着することを防止できる。その結果、細胞外小胞の回収率を著しく改善し、さらに解析の精度を向上させることができる。

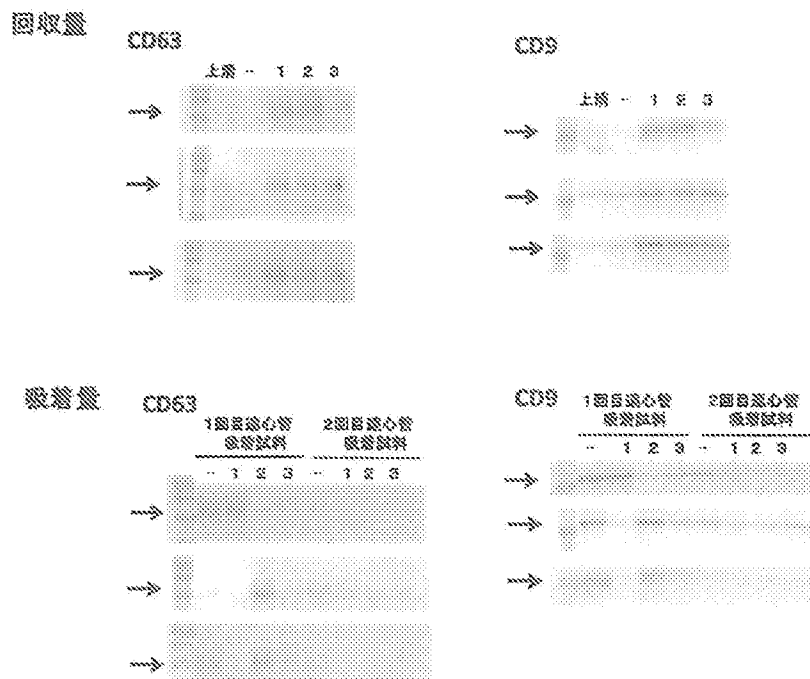
請求の範囲

- [請求項1] 重量平均分子量が1万以上100万以下である親水性ポリマーを含有し、
得られるコーティング被膜の接触角が0度以上30度以下である細胞外小胞吸着防止用コーティング剤。
- [請求項2] 前記親水性ポリマーが
2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン、ビニルアルコール、ビニルピロリドン、メトキシアルキレングリコールモノメタクリレート又はメタクリル酸2-ヒドロキシエチルからなる1種以上の親水性単量体を含む請求項1記載のコーティング剤。
- [請求項3] 前記親水性ポリマーを構成する前記親水性単量体が、
2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンであって、
2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンに基づく構成単位を30モル%以上50モル%以下含有し、
残余が疎水性基含有単量体からなる共重合体である請求項2記載のコーティング剤。
- [請求項4] 請求項1～3いずれか1項記載のコーティング剤でコートされている器具。
- [請求項5] 請求項4記載の器具を用いることを特徴とする細胞外小胞の精製及び／又は解析方法。

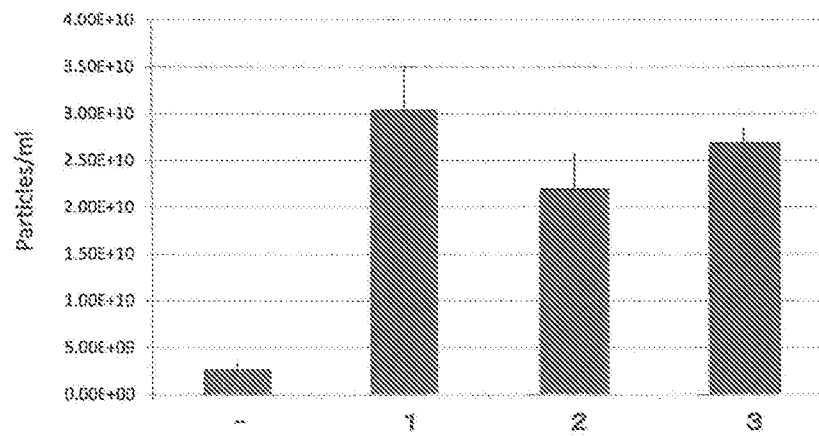
[図1]



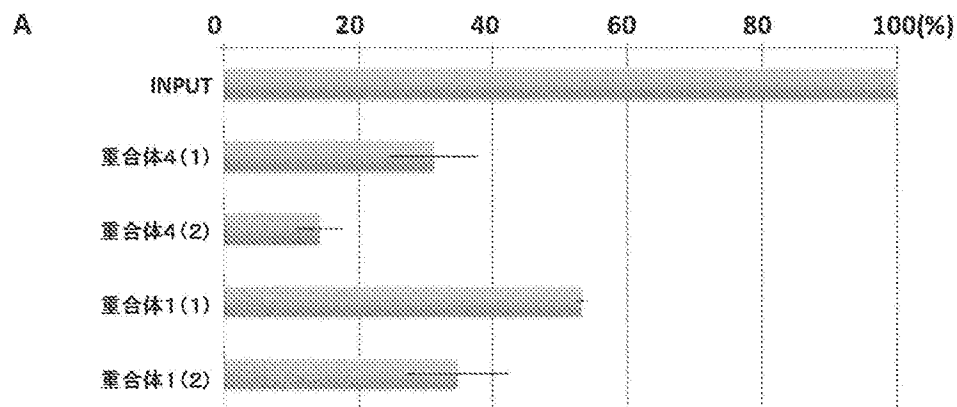
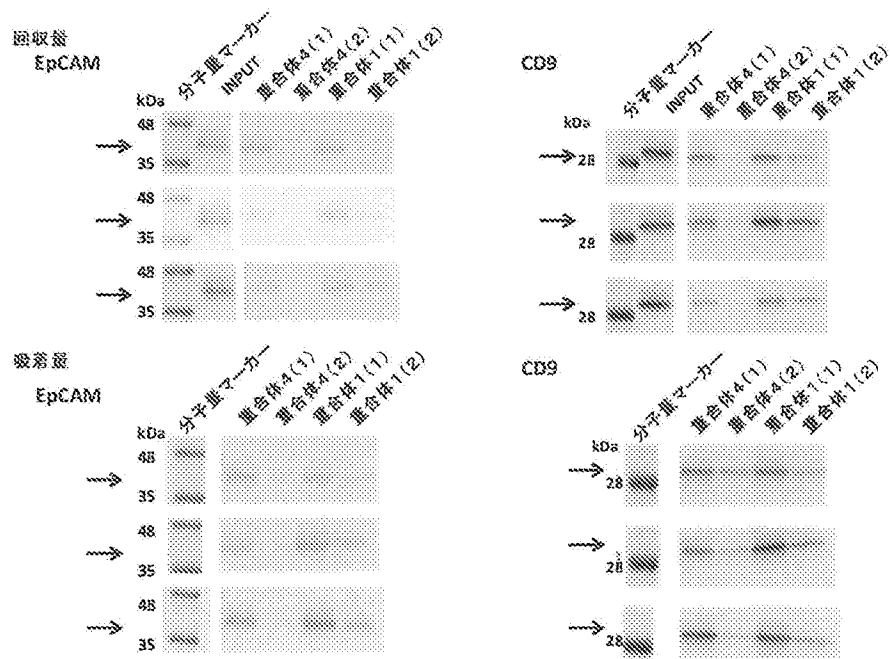
[図2]



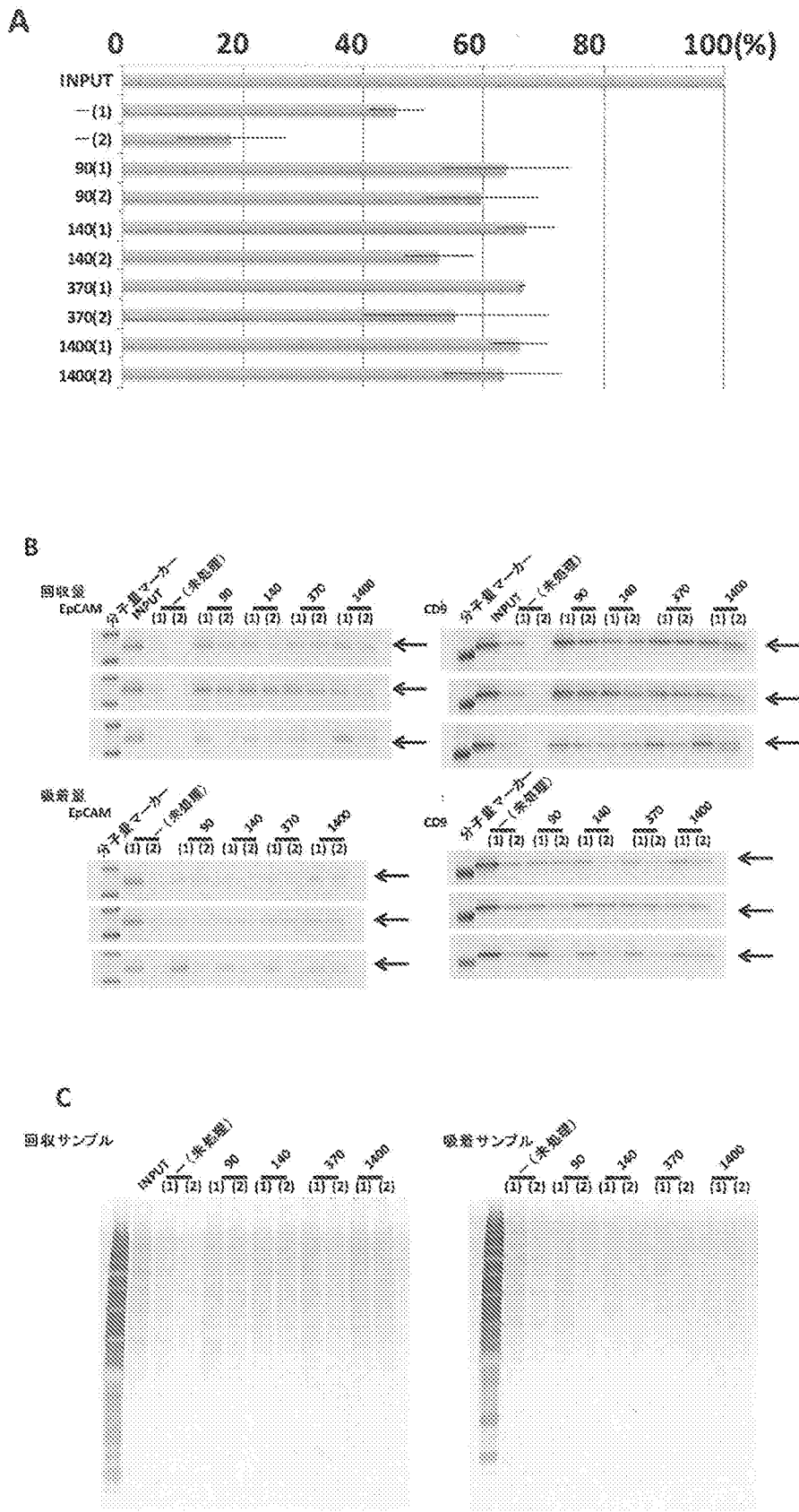
[図3]



[図4]

**B**

[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/019121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C09D185/02(2006.01)i, C08F230/02(2006.01)i, C09D129/04(2006.01)i,
C09D133/14(2006.01)i, C09D139/06(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C09D185/02, C08F230/02, C09D129/04, C09D133/14, C09D139/06, G01N33/543

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2005-99040 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 14 April 2005 (14.04.2005), claims; paragraphs [0012], [0016], [0020] to [0023]; examples 3, 5, 6 & EP 1152242 A1 claims; paragraphs [0016] to [0017], [0023] to [0024], [0029] to [0032]; examples 3, 5, 6 & DE 69929248 T2 & AU 6366799 A & CA 2356857 A & WO 2000/039582 A1	4 1-3, 5
X Y	JP 2004-275862 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 07 October 2004 (07.10.2004), claims; paragraphs [0006] to [0009]; examples; paragraph [0015] (Family: none)	4 1-3, 5

☒ 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
13 July 2017 (13.07.17)

Date of mailing of the international search report
01 August 2017 (01.08.17)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/019121

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-5177 A (NOF Corp.),	4
Y	10 January 1995 (10.01.1995), claims; paragraphs [0010], [0020]; examples (Family: none)	1-3, 5
Y	WO 2015/029979 A1 (The University of Tokyo), 05 March 2015 (05.03.2015), claims; paragraphs [0002] to [0003], [0014] & US 2016/0169876 A1 claims; paragraphs [0003] to [0004], [0042]	1-3, 5
Y	WO 2015/068772 A1 (JSR Corp.), 14 May 2015 (14.05.2015), claims; paragraphs [0001] to [0005] & US 2016/0349246 A1 claims; paragraphs [0001] to [0004] & CN 105723221 A	1-3, 5
Y	Kyoko FUKAZAWA, Kazuhiko ISHIHARA, "Surface Modification of Various Materials Using Photoreactive MPC Polymer", Function & materials, 2013, vol.33, no.9, pages 26 to 32 (1., 6.)	1-3, 5
Y	Madoka TAKAI, "Evaluation of Biocompatible Polymer for Medical Devices", Materials Science and Technology, 2015, vol.52, no.1, pages 14 to 17 (3.)	1-3, 5
A	JP 2008-58334 A (Tauns Co., Ltd.), 13 March 2008 (13.03.2008), claims; paragraphs [0006], [0029] (Family: none)	1-5
A	JP 2003-14767 A (NOF Corp.), 15 January 2003 (15.01.2003), claims; paragraph [0007]; examples & US 2004/0219546 A1 claims; paragraph [0011]; examples & WO 2002/088389 A1 & EP 1391519 A1 & DE 60215635 T2 & CN 1547615 A	1-5
A	JP 3-39309 A (Research Development Corp. of Japan), 20 February 1991 (20.02.1991), claims; page 3, upper right column, line 13 to lower left column, line 18; examples (Family: none)	1-5

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C09D185/02(2006.01)i, C08F230/02(2006.01)i, C09D129/04(2006.01)i, C09D133/14(2006.01)i, C09D139/06(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C09D185/02, C08F230/02, C09D129/04, C09D133/14, C09D139/06, G01N33/543

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 2005-99040 A (住友ベークライト株式会社) 2005.04.14, 特許請求の範囲、【0012】、【0016】、【0020】～【0023】、実施例3, 5, 6 & EP 1152242 A1 (CLAIMS, [0016]-[0017], [0023]-[0024], [0029]-[0032], EXAMPLE 3, 5, 6) & DE 69929248 T2 & AU 6366799 A & CA 2356857 A & WO 2000/039582 A1	4 1-3, 5
X Y	JP 2004-275862 A (住友ベークライト株式会社) 2004.10.07, 特許請求の範囲、【0006】～【0009】、実施例、【0015】 (ファミリーなし)	4 1-3, 5

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

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

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

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

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

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

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13.07.2017

国際調査報告の発送日

01.08.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 のぶよ

4Z

9454

電話番号 03-3581-1101 内線 3480

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	JP 7-5177 A (日本油脂株式会社) 1995. 01. 10, 特許請求の範囲、【0010】、【0020】、実施例 (ファミリーなし)	4 1-3, 5
Y	WO 2015/029979 A1 (国立大学法人東京大学) 2015. 03. 05, 特許請求の範囲、【0002】～【0003】、【0014】 & US 2016/0169876 A1 (CLAIMS, [0003]-[0004], [0042])	1-3, 5
Y	WO 2015/068772 A1 (J S R株式会社) 2015. 05. 14, 特許請求の範囲、【0001】～【0005】 & US 2016/0349246 A1 (CLAIMS, [0001]-[0004]) & CN 105723221 A	1-3, 5
Y	深澤今日子、石原一彦, 光反応性MPCポリマーによるマテリアル表面機能化, 機能材料, 2013, Vol. 33, No. 9, p. 26-32 (1., 6.)	1-3, 5
Y	高井まどか, 医用デバイスに用いる生体親和性材料の創製と評価, 材料の科学と工学, 2015, Vol. 52, No. 1, p. 14-17 (3.)	1-3, 5
A	JP 2008-58334 A (株式会社タウンズ) 2008. 03. 13, 特許請求の範囲、【0006】、【0029】 (ファミリーなし)	1-5
A	JP 2003-14767 A (日本油脂株式会社) 2003. 01. 15, 特許請求の範囲、【0007】、実施例 & US 2004/0219546 A1 (CLAIMS, [0011], EXAMPLES) & WO 2002/088389 A1 & EP 1391519 A1 & DE 60215635 T2 & CN 1547615 A	1-5
A	JP 3-39309 A (新技術開発事業団) 1991. 02. 20, 特許請求の範囲、3頁右上欄13行～左下欄18行、実施例 (ファミリーなし)	1-5