(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105393120 B
(45)授权公告日 2017.07.28

(21)申请号 201480029913.4

(22)申请日 2014.03.27

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105393120 A

(43)申请公布日 2016.03.09

(30)优先权数据
2013-081122 2013.04.09 JP
2014-059623 2014.03.24 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/058960 2014.03.27

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/168020 JA 2014.10.16

(73)专利权人 JVC建伍株式会社
地址 日本神奈川县

(72)发明人 丝长诚 柳生慎悟 长谷川佑一 辻田公二 小野雅之

(74)专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
代理人 丁文蕴 宋春华

(51)Int.Cl.
G01N 33/543(2006.01)
G01N 33/536(2006.01)
G01N 37/00(2006.01)

(56)对比文件
US 2012288408 A1,2012.11.15,
WO 2010065765 A2,2010.06.10,
CN 1989412 A,2007.06.27,
JP 特开平9159673 A,1997.06.20,
EP 1566635 A1,2005.08.24,
CN 102317778 A,2012.01.11,
Thery C et al.Exosomes: composition, biogenesis and funciton.《Nature Reviews Immunology》.2002,569-579.
Gahee Kim et al.Noble Polymeric Surface Conjugated with Zwitterionic Moieties and Antibodies for the Isolation of Exosomes from Human Serum.《Bioconjugate Chemistry》.2012,第23卷(第10期),2114-2120.

审查员 李进进

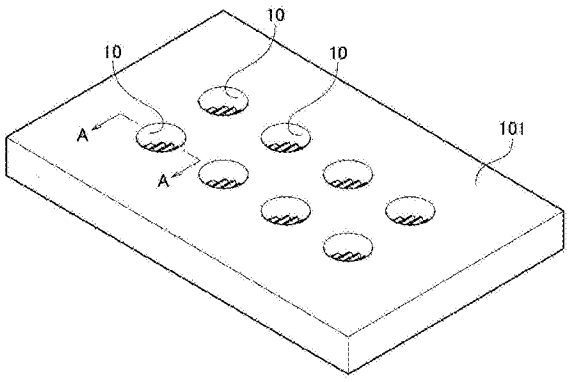
权利要求书1页 说明书9页 附图11页

(54)发明名称

试样分析用设备

(57)摘要

在基部上,凹部和凸部呈周期性排列。所述凹部通过使与检测对象的外泌体中存在的抗原结合的抗体固定,使所述外泌体与所述抗体结合,从而使所述外泌体固定。所述凸部的宽度小于所述外泌体的平均粒径。



CN 105393120 B

1.一种试样分析用设备，其特征在于，具备：

基部；

凹部，所述凹部形成于所述基部上，并通过使与检测对象的外泌体中存在的抗原结合的抗体固定在表面上，使所述外泌体与所述抗体结合，从而使所述外泌体固定；以及，

与所述凹部邻接的凸部，

所述凹部和所述凸部在所述基部上周期性排列，

所述凹部的宽度小于所述外泌体的平均粒径的4倍，

所述凸部的宽度小于所述外泌体的平均粒径。

2.根据权利要求1所述的试样分析用设备，其特征在于，

所述凸部的宽度小于修饰所述外泌体的纳米粒子的直径。

3.根据权利要求1或2所述的试样分析用设备，其特征在于，

所述凹部的宽度大于所述外泌体的平均粒径，小于修饰所述外泌体的纳米粒子的直径的2倍。

试样分析用设备

技术领域

[0001] 本发明涉及用于分析各种细胞所分泌的外泌体的试样分析用设备及外泌体的捕捉方法。

背景技术

[0002] 通过将与疾病相关联的特定的抗原(或抗体)作为生物标记进行检测分析，从而对疾病的发现、治疗的效果等进行定量分析的方法已被广泛应用。近年来，被称为外泌体(exosome)的微小膜囊泡作为新的生物标记而受到期待。

[0003] 外泌体在血液、淋巴液、唾液、尿液、母乳、精液等中含有。外泌体在液体中呈大致球形，以直径100nm左右为中心分布。外泌体被脂双层膜覆盖，脂双层膜上有各种物质例如膜蛋白质。此外，外泌体有时也被称为微泡、细胞外小泡，有多种称呼。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献1国际公开第2009/092386号

[0006] 专利文献2国际公开第2006/016617号

[0007] 专利文献1中记载了使用免疫学测定法(免疫测定法)来检测分析外泌体。使用专利文献1记载的免疫学测定法时，通过识别以外泌体的脂双层膜上存在的膜蛋白质作为抗原的抗体，从而能够检测外泌体。但是，由于膜蛋白质的数量在外泌体的个体上并不固定，所以不能够精度良好地检测外泌体的数量。

[0008] 因此，需要能够高精度地检测外泌体的试样分析用设备及外泌体的捕捉方法。如果能够高精度地检测出外泌体，就可能高精度地定量测定外泌体。

发明内容

[0009] 本发明为了应对这种需求，以提供能够高精度地检测外泌体的试样分析用设备为目的。

[0010] 根据本发明的一个方式，为了解决上述以往的技术问题，提供试样分析用设备，其特征在于，具备：基部；凹部，所述凹部形成于所述基部上，并通过使与检测对象的外泌体中存在的抗原结合的抗体固定，使所述外泌体与所述抗体结合，从而使所述外泌体固定；以及，与所述凹部邻接的凸部，所述凹部和所述凸部在所述基部上周期性排列，所述凸部的宽度小于所述外泌体的平均粒径。

[0011] 根据本发明的试样分析用设备，能够高精度地检测外泌体。

附图说明

[0012] 图1是表示试样分析用设备的第1实施方式的立体图。

[0013] 图2是表示图1中沿A－A线剖切的局部放大立体图。

[0014] 图3是表示试样分析用设备的第1～第3实施方式中凹凸结构的尺寸形状的放大剖面图。

[0015] 图4是表示试样分析用设备的第2实施方式的立体图。

[0016] 图5是表示沿图4中A－A线剖切的局部放大立体图。

[0017] 图6是外泌体的模式化剖面图。

[0018] 图7是表示用于修饰外泌体的纳米粒子的剖面图。

[0019] 图8是表示外泌体的捕捉方法的一个实施方式的流程图。

[0020] 图9是表示用于说明在外泌体的捕捉方法的一个实施方式中执行的工序的局部放大剖面图。

[0021] 图10是模式化表示通过在外泌体的捕捉方法的一个实施方式中执行的工序而在凹凸结构上产生的状态的局部放大剖面图。

[0022] 图11是表示试样分析用设备的第3实施方式的俯视图。

[0023] 图12是表示试样分析用设备的第3实施方式中凹凸结构的局部放大剖面图。

[0024] 图13是表示试样分析用设备的第3实施方式的局部剖面图。

具体实施方式

[0025] 以下，对于各实施方式的试样分析用设备以及外泌体的捕捉方法，参照附图进行说明。

[0026] 第1实施方式的试样分析用设备

[0027] 使用图1～图3，对第1实施方式的试样分析用设备的结构进行说明。在图1中，第1实施方式的试样分析用设备101例如由合成树脂形成矩形。试样分析用设备101的外形形状并不限于矩形，可以为任意形状。

[0028] 也可以使用玻璃、金属、半导体基板等形成试样分析用设备101。

[0029] 在试样分析用设备101中形成有多个为圆筒状凹部的孔10。在图1中，形成有8个孔10，但也可以形成更多的孔10，孔10的个数是任意的。孔10为下述注入各种液体的注入部。

[0030] 在与试样分析用设备101的厚度方向垂直的方向切割孔10时的剖面形状为正圆形。也可以使孔10的剖面形状为椭圆形或矩形。但优选孔10的剖面形状为正圆形。

[0031] 图2为放大表示图1的A－A剖面的图。如图2所示，在孔10的底面上形成有使凹部20a和与凹部20a邻接的凸部20b周期性地多个排列的凹凸结构20。在试样分析用设备101中，由合成树脂等形成的试样分析用设备101自身成为形成凹凸结构20的基部。

[0032] 凹部20a及凸部20b大致呈直线状。凹部20a及凸部20b的各自的侧面倾斜。也可以形成使凹部20a及凸部20b各自的侧面与试样分析用设备101的面大致垂直的凹凸结构20。

[0033] 如图3的放大剖面图所示，将凹部20a的深度(凸部20b的高度)设为H，将凹部20a及凸部20b各自的宽度设为用单点划线表示的从底面开始在H/2位置处的Wa、Wb。凹部20a的宽度Wa和凸部20b的宽度Wb优选满足Wa＞Wb的关系。

[0034] 如上述构成的试样分析用设备101，使用合成树脂形成的情况下，通过整体成形而能够容易地制作。

[0035] 第2实施方式的试样分析用设备

[0036] 使用图4、图5，对第2实施方式的试样分析用设备的结构进行说明。在图4、图5中，在与图1～图3实质上相同的部分标注同一符号，适当省略其说明。

[0037] 在图4中，第2实施方式的试样分析用设备102，具有例如由合成树脂形成的基板

112和由合成树脂形成并重叠在基板112上的薄片122。薄片例如为硅聚合物薄片。以下，称为硅聚合物薄片122。试样分析用设备102也可以形成矩形形状，外形形状为任意形状。

[0038] 在基板112上重叠的薄片的材料并不限定于硅聚合物。薄片的材料也可以为比硅聚合物廉价的材料，例如聚苯乙烯、ABS、聚碳酸酯等树脂。

[0039] 与试样分析用设备101相同，在试样分析用设备102中形成有多个圆筒状凹部即孔10。

[0040] 图5是放大表示图4的A－A剖面的图。如图5所示，在基板112的整个表面上形成有使凹部20a和凸部20b多个排列的凹凸结构20。在试样分析用设备102中，由合成树脂等形成的基板112成为形成凹凸结构20的基部。

[0041] 在第1实施方式的试样分析用设备101中，仅在孔10的底面形成有凹凸结构20，而与此相对，在第2实施方式的试样分析用设备102中，在基板112的整个表面上形成有凹凸结构20。

[0042] 在试样分析用设备102中，在硅聚合物薄片122上形成有圆筒状的贯通孔11。通过将基板112和具有贯通孔11的硅聚合物薄片122相重叠，形成孔10。在使基板112和硅聚合物薄片122相重叠的状态下，试样分析用设备102实质上与在孔10的底面形成凹凸结构20的试样分析用设备101为相同的结构。

[0043] 由于硅聚合物薄片122紧贴在基板112上，所以不需要将基板112和硅聚合物薄片122粘接。如果不使基板112和硅聚合物薄片122粘接，则在下述的外泌体的检测工序中，能够根据需要将硅聚合物薄片122剥离。当然，也可以将基板112和硅聚合物薄片122粘接。

[0044] 也可以通过由硅橡胶等形成的密封件使基板112和硅聚合物薄片122粘合。例如密封件可以为配置于与贯通孔11相同的位置的形成有与贯通孔11大致相同直径的贯通孔的由硅橡胶形成的平板。

[0045] 密封件也可以为在每个贯通孔11上设置的截面为大致四边形或大致圆形的环状的部件。

[0046] 可以在硅聚合物薄片122上设置环状的突起，在密封件上设置环状槽，突起嵌入槽内即可。也可以在硅聚合物薄片122上设置环状的槽，在密封件上设置环状的突起，突起嵌入槽内。

[0047] 也可以在硅聚合物薄片122的与基板112的连接面上设置多个密封件。多个密封件的直径与贯通孔11的直径大致相同。多个密封件对应各个贯通孔11而设置。

[0048] 一个实施方式的外泌体的捕捉方法

[0049] 对于使用了第1实施方式的试样分析用设备101或第2实施方式的试样分析用设备102的一个实施方式的外泌体的捕捉方法进行说明。在此，对于使用试样分析用设备101的情况进行说明。

[0050] 图6为外泌体的模式化剖面图。将图6表示的外泌体作为检测对象的外泌体50。如图6所示，外泌体50被脂双层膜51覆盖。在脂双层膜51上存在有多个膜贯通型的膜蛋白质52。膜蛋白质52的个数、在脂双层膜51上的位置根据外泌体的种类而不同。

[0051] 在实施例1中外泌体50的平均粒径E为100nm。在实施例1中，试样分析用设备101的凹部20a的宽度Wa为240nm，凸部20b的宽度Wb为80nm，凹部20a的深度H为50nm。

[0052] 在实施例2中，外泌体50的平均粒径E为70nm。在实施例2中，凹部20a的宽度Wa为

260nm，凸部20b的宽度Wb为60nm，凹部20a的深度H为60nm。

[0053] 但是，外泌体50的平均粒径E，是指用任意测定方法测定的外泌体50的粒径值的平均值。作为测定方法，例如有使用纳米粒子跟踪法的在外泌体50处于溶液中的状态下进行观测的湿式测定方法、利用透射型电子显微镜在保持外泌体50的形态不变的情况下观测的干式测定方法。

[0054] 在后者的测定方法中，由于能够在保持外泌体50的形态不变的情况下采用干式进行观测，所以实施符合对于含有外泌体50的试样观测细胞的方法的处理。

[0055] 具体而言，将试样固定在基体上，从低浓度乙醇到纯度为100％的乙醇按步提高乙醇的浓度，经过几步反复在乙醇中含浸。通过这样，试样中的水分被乙醇置换从而进行脱水。

[0056] 接着，通过将试样在含有可溶于乙醇的合成树脂的溶液中含浸，从而将乙醇置换到合成树脂中。然后，将置换到合成树脂中的试样制成薄片进行观测。

[0057] 此外，也可以通过将含有外泌体50的试样快速冷冻，从而在保持外泌体50的形态不变的情况下进行脱水观测。

[0058] 在本实施方式的外泌体的捕捉方法、以及检测捕捉到的外泌体50的试样分析方法中，如下所述，为了检测外泌体50而使用图7中(a)所示的纳米粒子70。在实施例1及实施例2中，纳米粒子70的直径D为200nm。纳米粒子70例如由合成树脂形成大致球形。

[0059] 图8表示用于利用试样分析用设备101捕捉外泌体50的顺序的各工序。在图8中，进行试样分析的操作者，在步骤S1中，如图9的(a)所示，将含有适量抗体60的缓冲溶液F60分注于孔10。作为膜贯通型的膜蛋白质的CD63、CD9等作为用于识别外泌体的抗原而公知。

[0060] 作为在步骤S1中使用的抗体60，使用与作为抗原的膜蛋白质52反应的抗体。此外，抗原并不限于膜蛋白质52，也可以为在脂双层膜51的表面存在的其他物质。

[0061] 操作者在步骤S1中，通过振荡机使图9中(a)所示状态的试样分析用设备101振荡适当时间。通过步骤S1的处理，在凹凸结构20的表面固定抗体60。步骤S1为抗体固定工序。

[0062] 操作者在步骤S2中，将含有抗体的缓冲溶液F60排出，用缓冲溶液将孔10洗净。

[0063] 图10中(a)模式化表示出步骤S2后的凹凸结构20的表面状态。抗体60通过疏水键附着在凹凸结构20的表面。将抗体60固定在凹凸结构20的表面的方法，不限定于疏水键。也可以对凹凸结构20的表面进行适当化学修饰，使用共价键使抗体60固定在凹凸结构20的表面。使抗体60固定在凹凸结构20的表面的方法，使用免疫学测定法中通常使用的方法即可。

[0064] 为了防止在抗体60的抗原识别部以外抗原发生非特异性吸附，操作者在步骤S3中，对凹凸结构20的表面进行封闭处理。具体而言，操作者将用缓冲溶液稀释的脱脂乳分注于孔10，与步骤S1相同，使试样分析用设备101振荡规定的时间。

[0065] 由于脱脂乳含有不附着于外泌体50的蛋白质，所以适合封闭处理。只要产生同样的效果，则封闭处理中使用的物质不限定于脱脂乳。

[0066] 操作者在步骤S4中，将含有脱脂乳的缓冲溶液排出，用缓冲溶液将孔10洗净。作为洗净时使用的缓冲溶液，可以含有脱脂乳，也可以不含有。此外，也可以省略洗净。如图10中(b)模式化所示，在凹凸结构20的表面，通过步骤S3、S4形成有封闭层65。

[0067] 接着，操作者在步骤S5中，如图9中(b)所示，将含有检测对象的外泌体50的试样液F50分注于孔10，与步骤S1相同，使试样分析用设备101振荡适当时间。在步骤S5中，例如使

试样分析用设备101振荡2小时左右。

[0068] 通过步骤S5，在试样液F50中含有的外泌体50的大部分，通过抗体60和膜蛋白质52的抗原抗体反应被固定于凹凸结构20的凹部20a。步骤S5是外泌体固定工序。

[0069] 在步骤S5之后，操作者在步骤S6中将试样液F50排出，用缓冲溶液清洗孔10。通过用缓冲溶液清洗孔10，能够将并非通过抗原抗体反应，而是通过非特异性吸附附着在凹凸结构20的表面上的外泌体50排除。

[0070] 图10中(C)表示在凹部20a固定有1个外泌体50的状态。图10中(C)表示的外泌体50是将图6所示的外泌体50简化后模式化表示。在图10中(C)所示的例子中，外泌体50具有以白色的椭圆和带有阴影的椭圆模式化表示的2种膜蛋白质52。

[0071] 如图10中(C)所示，抗体60和以带有阴影的椭圆表示的膜蛋白质52通过抗原抗体反应结合，外泌体50被固定在凹部20a。此外，膜蛋白质52的种类不限于2种。如上所述，也可以将膜蛋白质以外的物质作为抗原。在使用2种单克隆抗体识别并捕捉外泌体50的情况下，只要识别1种或2种膜蛋白质52即可。

[0072] 如图7中(b)所示，纳米粒子70上预先在表面固定有抗体80。相对于未固定抗体80的图7中(a)所示的纳米粒子70，如图7中(b)所示使抗体80固定的工序，只要采用与图8的一系列工序不同的工序进行即可。

[0073] 操作者在步骤S7中，如图9中(C)所示，将含有表面固定有抗体80的纳米粒子70的缓冲溶液F70分注于孔10，与步骤S1相同，使试样分析用设备101振荡适当时间。

[0074] 通过步骤S7，如图10中(D)所示，外泌体50被纳米粒子70修饰。通过用纳米粒子70修饰外泌体50，能够将纳米粒子70作为外泌体50的标记。步骤S7是用纳米粒子70修饰外泌体50的修饰工序。

[0075] 操作者在步骤S8中，将缓冲溶液F70排出，用缓冲溶液清洗孔10。通过以上操作，能够通过试样分析用设备101捕捉外泌体50，用纳米粒子70修饰外泌体50。

[0076] 在本实施方式中，纳米粒子70上固定有与凹凸结构20的表面上固定的抗体60不同的抗体80。抗体80和以白色椭圆表示的膜蛋白质52通过抗原抗体反应结合，纳米粒子70被固定在外泌体50上。

[0077] 使在凹凸结构20的表面固定的抗体和在纳米粒子70的表面固定的抗体不同时，能够检测具有2种不同抗原的外泌体。当然，也可以在纳米粒子70上固定与在凹凸结构20的表面固定的抗体相同的抗体60。使用相同的抗体还是使用不同的抗体，只要根据分析试样的情况进行适当选择即可。

[0078] 在上述说明中，首先通过凹凸结构20的凹部20a捕捉外泌体50，然后投入纳米粒子70，使纳米粒子70固定在外泌体50上，但是也可以为将外泌体50和纳米粒子70同时投入缓冲溶液中进行反应的顺序。这种情况下，由于在液体中产生外泌体50和纳米粒子70的固定反应，所以产生促进反应速度的优点。

[0079] 也可以在纳米粒子70的内部包含铁素体等磁性物质。若形成包含磁性物质的纳米粒子70，则在步骤S7中，通过在试样分析用设备101的下面配置磁铁，能够快速聚集纳米粒子70。此外，通过磁力能够使纳米粒子70有效地朝向凹部20a。因此，能够缩短步骤S7所需要的时间。

[0080] 进而在这种情况下，如上所述通过将外泌体50和纳米粒子70同时投入，有可能实

现更加促进反应的目的。这种情况下，也可能使用于在凹凸结构20上固定外泌体50的振荡时间缩短至几分钟左右。

[0081] 通过磁力将纳米粒子70拉近后，如果在试样分析用设备101的下面配置的磁铁是电磁铁，就切断电源，如果是永久性磁铁，就使其远离试样分析用设备101，然后再次搅拌缓冲溶液F70。通过这样，将不是通过抗原抗体反应固定的纳米粒子70暂时从凹凸结构20剥离，然后再次通过磁力将纳米粒子70拉近，也可以提高反应的收率。

[0082] 在使用包含磁性物质的纳米粒子70的情况下，除了通过振荡进行搅拌之外，也可以通过使磁力作用的方向和强度发生改变进行搅拌。

[0083] 此外，在磁力作用下纳米粒子70产生的力有可能使外泌体50变成扁平，但是，一旦外泌体50被凹部20a捕捉，则不会向凸部20b移动，对外泌体50的检测不产生影响。

[0084] 在图8中，将含有外泌体50的试样液F50和含有纳米粒子70的缓冲溶液F70分别分注于孔10，但是也可以将含有外泌体50的试样和纳米粒子70同时加入缓冲溶液中再分注于孔10，同时进行步骤S5、S7。在这种情况下，能够使用包含磁性物质的纳米粒子70。

[0085] 但是，在第1实施方式的试样分析用设备101及第2实施方式的试样分析用设备102中，优选外泌体50的平均粒径E、纳米粒子70的直径D、凹凸结构20的凹部20a的宽度Wa及凸部20bの宽度Wb、凹部20a的深度H为以下所示的关系。

[0086] 通过使试样分析用设备101、102的尺寸形状和检测对象的外泌体50、作为标记使用的纳米粒子70为以下所示的关系，如图10中(d)所示，1个外泌体50上结合1个纳米粒子70，能够使外泌体50和纳米粒子70的数量关系尽量接近1比1。

[0087] 凹部20a的宽度Wa，优选大于外泌体50的平均粒径E，小于纳米粒子70的直径D的2倍。即优选试样分析用设备101、102具有式(1)的关系。

[0088] $E<Wa<2D$ …(1)

[0089] 如果满足式(1)的$E<Wa$，则能够使外泌体50固定于凹部20a。如果满足式(1)的$Wa<2D$，则纳米粒子70难于在凹部20a的宽度方向同时进入2个，使得外泌体50和纳米粒子70的数量关系接近1比1。

[0090] 优选满足式(2)。

[0091] $Wb<D<Wa<2D$ …(2)

[0092] 如果满足式(2)的$Wb<D$，则纳米粒子70难于位于凸部20b上。如果满足式(2)的$D<Wa$，则纳米粒子70能够进入凹部20a。

[0093] 优选满足式(3)。

[0094] $Wb<E$ …(3)

[0095] 如果满足式(3)，则外泌体50难于位于凸部20b上。

[0096] 优选满足式(4)。

[0097] $E<Wa<4E$ …(4)

[0098] 被凹部20a捕捉的外泌体50，在大多数情况下，如图10中(c)所示，由球形向接触面积扩大的方向发生变形。如上所述，若使用包含磁性物质的纳米粒子70时，则在磁力作用下促进外泌体50变形。

[0099] 假设球形的外泌体50在保持体积不变的情况下变形为椭圆体，则在球的直径变化50％的情况下，与作为旋转椭圆体的长轴的凹部20a的接触部位的直径约增大40％。进而实

际上，相对于旋转椭圆体形状，由于在接触部位的面积变大的方向发生变形，所以接触部位的直径有可能会增大原来球形时的直径的50％以上，有时会增大100％以上。

[0100] 由上述可知，优选满足式(4)的Wa＜4E。

[0101] 外泌体50的平均粒径E和纳米粒子70的直径D，优选满足式(5)。

[0102] E＜D …(5)

[0103] 如果满足式(5)，则难于用多个纳米粒子70修饰被凹部20a固定的外泌体50，能够使外泌体50和纳米粒子70的数量关系接近1比1。如果满足式(5)，则外泌体50和纳米粒子70的反应相遇的概率提高，结果能够提高反应收率。

[0104] 凹部20a的深度H优选满足式(6)。

[0105] (D+E)/8＜H …(6)

[0106] 如果满足式(6)，则外泌体50几乎确切地被固定于凹部20a，防止纳米粒子70向凸部20b上的非特异性吸附，纳米粒子70几乎确切地被固定在凹部20a存在的外泌体50上。

[0107] 还优选凹部20a的深度H满足式(7)。

[0108] (D+E)/6＜H …(7)

[0109] 实施例1满足式(1)～式(6)，实施例2满足式(1)～式(7)。根据实施例1、2，能够使被凹部20a固定的外泌体50和纳米粒子70的数量关系接近1比1。1个外泌体50上结合2个或3个纳米粒子70的情况极少，但对于定量检测外泌体50几乎不产生影响。

[0110] 最优选全部满足式(1)～式(7)，但也可以仅部分满足式(1)～式(7)。仅满足式(1)就有效果。优选在式(1)的基础上满足式(4)。还优选在式(1)的基础上满足式(3)。更优选在式(1)的基础上满足式(3)及式(4)。

[0111] 优选在式(1)的基础上满足式(2)的Wb＜D。更优选在式(1)的基础上满足式(4)及式(2)的Wb＜D。更优选在式(1)的基础上满足式(3)及式(2)的Wb＜D。还优选全部满足式(1)、式(2)的Wb＜D、式(3)及式(4)。

[0112] 但是试样分析用设备，作为试样分析用设备101、102，除了图1、图4所示的矩形外，还可以为圆形盘状。在这种情况下，能够同样进行以上说明的使用免疫学测定法的反应。使试样分析用设备形成圆形盘状的情况下，可以使凹凸结构20的凹部20a及凸部20b形成螺旋状或同心圆状。在下述的检测外泌体50时，能够使盘状的形状发挥作用。

[0113] 进而，在盘状的情况下，也可以设置与盘状的形状对应的送液路线的结构。使用图11～图13，将设置了送液路线结构的盘状的试样分析用设备作为第3实施方式的试样分析用设备进行说明。在第3实施方式中，与第1、第2实施方式实质上相同的物质、相同的部分标注相同的符号进行说明。

[0114] 第3实施方式的试样分析用设备

[0115] 在图11中，第3实施方式的试样分析用设备103形成与蓝光光盘、DVD、CD等光盘相同直径的圆盘状。试样分析用设备103是试样分析用盘。图11是从透明保护层36一侧观察试样分析用设备103的俯视图。

[0116] 试样分析用设备103与光盘相同，能够由聚碳酸酯等合成树脂形成。

[0117] 在试样分析用设备103的中心部形成有圆形的开口103a。在开口103a的周围，以围绕开口103a的方式形成有用于滴下含有检测对象的外泌体50的试样的注入孔31。

[0118] 各个注入孔31连接有用于使试样流动的流路32。多个流路32从注入孔31向试样分

析用设备103的外周端部方向呈放射状延伸。在流路32的中间部，设置有用于填充纳米粒子70的纳米粒子填充部33。

[0119] 在试样分析用设备103的外周端部设置有呈扇形扩展的检测区域34。流路32与检测区域34连接。从注入孔31注入试样，若使试样分析用设备103旋转，则试样通过流路32到达检测区域34。因此，检测区域34是各种液体经过注入孔31及流路32注入的注入部。

[0120] 在试样分析用设备103的外周端部，如图12中(a)所示，形成有包括螺旋状或同心圆状的凹部20a和凸部20b的凹凸结构20。检测区域34设置在凹凸结构20内。

[0121] 代替图12中(a)表示的凹凸结构20，如图12中(b)所示，也可以形成多个凹状的凹痕20c以螺旋状或同心圆状排列的凹痕结构20P。没有设置凹痕20c的部分，相对于凹痕20c是凸部，所以凹痕结构20P也是凹凸结构。

[0122] 在试样分析用设备103中，透明保护层36的相反一侧的用合成树脂等形成的圆盘部分成为形成凹凸结构20(包括凹痕结构20P)的基部。

[0123] 如图11所示，在凹凸结构20的检测区域34以外的部分成为轨道域35。通过在轨道域35设置地址信息，能够特定试样分析用设备103的半径方向及圆周方向的位置。可以在凹痕、凸起设置地址信息，也可以通过凹部20a或凸部20b的侧面的移动来表示地址信息。

[0124] 图13为试样分析用设备103的局部剖面图。填充在纳米粒子填充部33的纳米粒子70上，与图7中(b)相同，预先固定有抗体80。实际上，与凹凸结构20邻接设置有反射激光的反射层，在图12及图13中省略了图示。

[0125] 首先，若从注入孔31注入含有抗体60的缓冲溶液F60而使试样分析用设备103旋转，则与图10中(a)相同，在凹凸结构20的表面固定抗体60。根据需要，对凹凸结构20的表面进行封闭处理即可。

[0126] 若从注入孔31注入含有检测对象的外泌体50的试样液F50而使试样分析用设备103旋转，则外泌体50通过纳米粒子填充部33时被纳米粒子70修饰。被纳米粒子70修饰的外泌体50，与图10中(d)相同，被凹部20a固定。在图13中，为了方便图示，省略外泌体50的图示，仅图示了纳米粒子70。

[0127] 在检测区域34，从没有图示的光拾波器的激光光源发出并通过物镜40收集的激光通过透明保护层36照射进来。在凹部20a固定的纳米粒子70，通过分析照射的激光的反射光而能够检测出来。

[0128] 第3实施方式的试样分析用设备103的凹凸结构20的尺寸形状和检测对象的外泌体50、作为标记使用的纳米粒子70的大小关系，与第1、第2实施方式相同。

[0129] 外泌体的检测及试样分析方法

[0130] 接着，对于检测通过第1～第3实施方式的试样分析用设备101～103如图10中(d)所示的捕捉的外泌体50的检测方法进行说明。

[0131] 作为第1检测方法，使用光学显微镜检测纳米粒子70，通过图像处理能够对纳米粒子70进行计数。其结果，可定量检测外泌体50。第1检测方法适合检测通过第1、第2实施方式的试样分析用设备101、102捕捉到的外泌体50。

[0132] 使搭载试样分析用设备101、102的平台移动，在大面积对纳米粒子70进行计数，能够提高计测的精度。使用激光显微镜代替光学显微镜，可以提高检测的分辨率，也可以提高S/N。

[0133] 作为第2检测方法，在纳米粒子70内包含照射特定波长的光时产生荧光的荧光物质，通过检测荧光能够对纳米粒子70进行计数。可以使用光学显微镜计测产生荧光的纳米粒子70，也可以用光传感器检测荧光总量。第2检测方法适合检测通过第1、第2实施方式的试样分析用设备101、102捕捉到的外泌体50。

[0134] 使用第1及第2检测方法的情况下，如果从没有设置孔10的试样分析用设备101、102的背面一侧检测纳米粒子70，能够防止检测装置和试样分析用设备101、102之间的机械性干涉。此外，也可以将孔10的形状形成避开显微镜物镜等的干涉的形状。

[0135] 在第2实施方式的试样分析用设备102的情况下，能够剥离硅聚合物薄片122。如果将硅聚合物薄片122剥离仅在基板112上检测纳米粒子70，则能够回避与检测装置之间的机械性干涉。

[0136] 作为第3方法，能够使用将与固定在纳米粒子70上的抗体80特异性结合的酶作为标记的二级抗体，对纳米粒子70进行检测、计数。代表性二级抗体为辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体、碱性磷酸酶(AP)标记抗体。

[0137] 这些二级抗体，通过加入与酶对应的发光底物而产生化学发光。因此，用二级抗体修饰在外泌体50上固定的纳米粒子70，通过检测加入发光底物产生的化学发光的光强度能够对纳米粒子70进行计数。

[0138] 作为第4方法，在第3实施方式的试样分析用设备103的情况下，如上所述，通过用从光学拾波器的激光光源发出的激光扫描试样分析用设备103，能够对纳米粒子70进行计数。将凹凸结构20的凹部20a作为轨道，通过使用伺服机构使激光的光斑沿着轨道扫描，能够快速且高精度地对纳米粒子70进行计数。

[0139] 如上所述，通过对在外泌体50上作为标记固定的纳米粒子70进行计数，能够高精度地定量测量外泌体50，从而对试样进行分析。

[0140] 本发明并不限于以上说明的各实施方式，在不脱离本发明的主旨范围内可以进行各种变更。

[0141] 产业上的可利用性

[0142] 本发明能够应用于血液、淋巴液、唾液、尿液、母乳、精液等中含有的外泌体的检测。

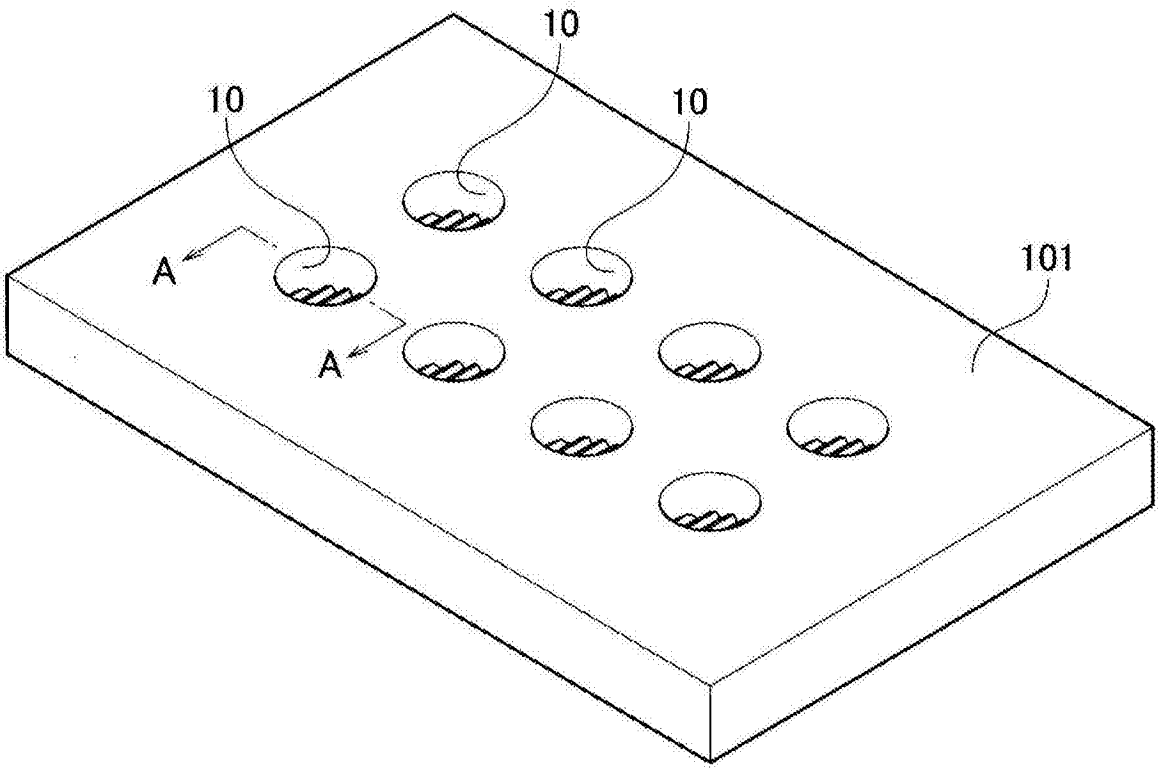


图1

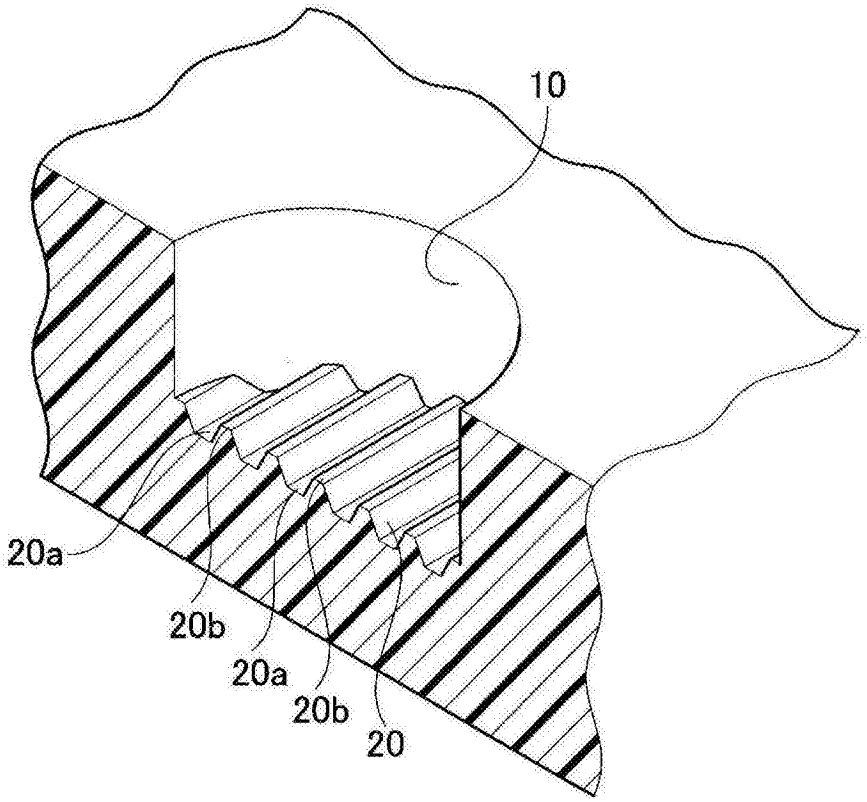


图2

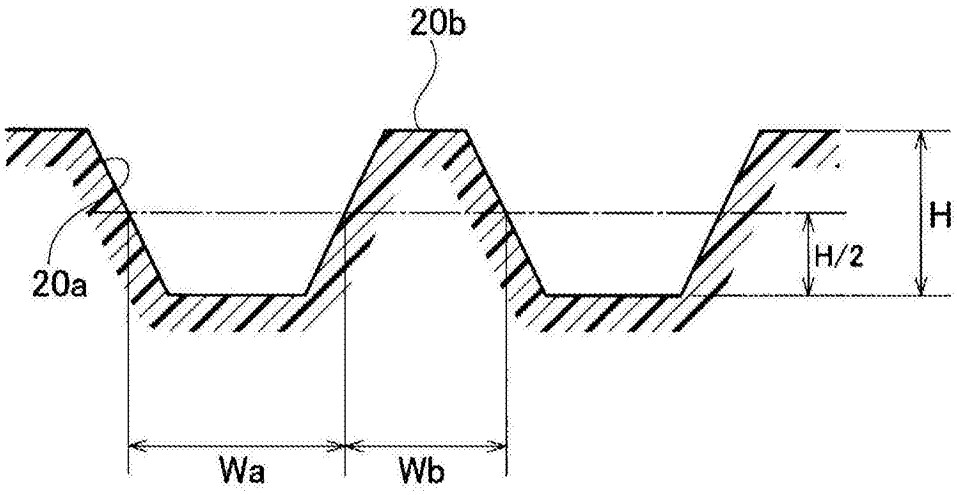


图3

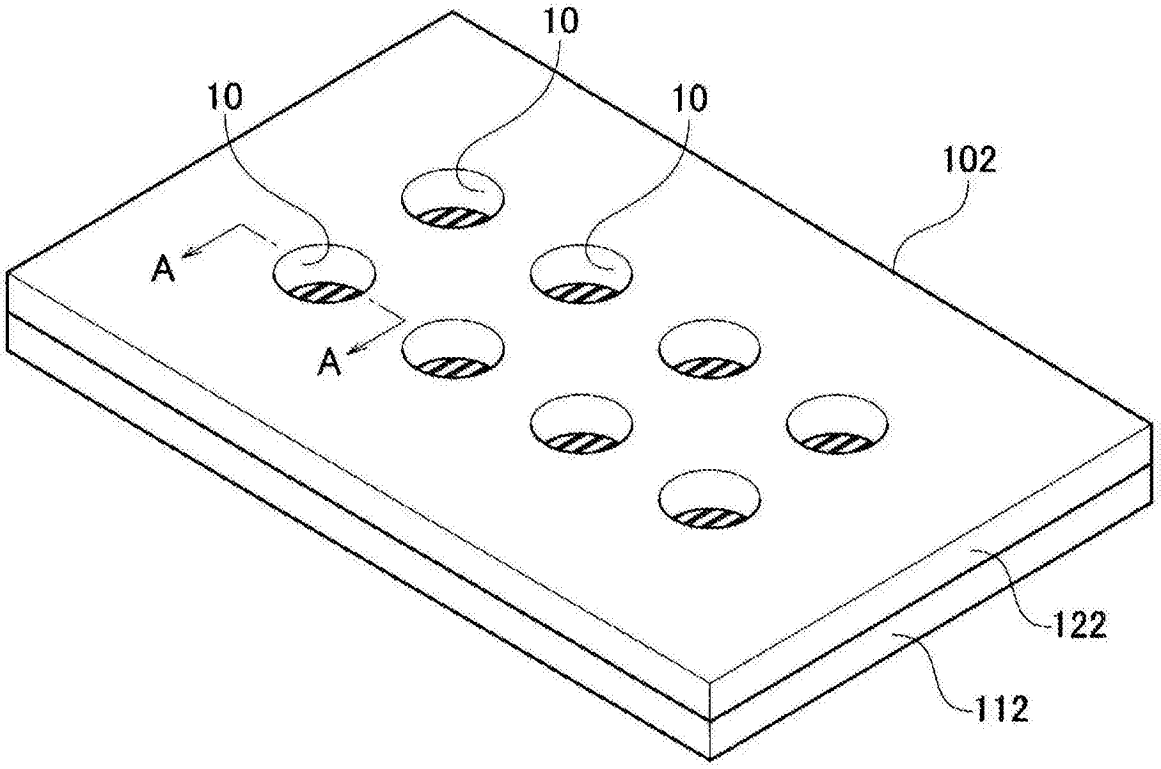


图4

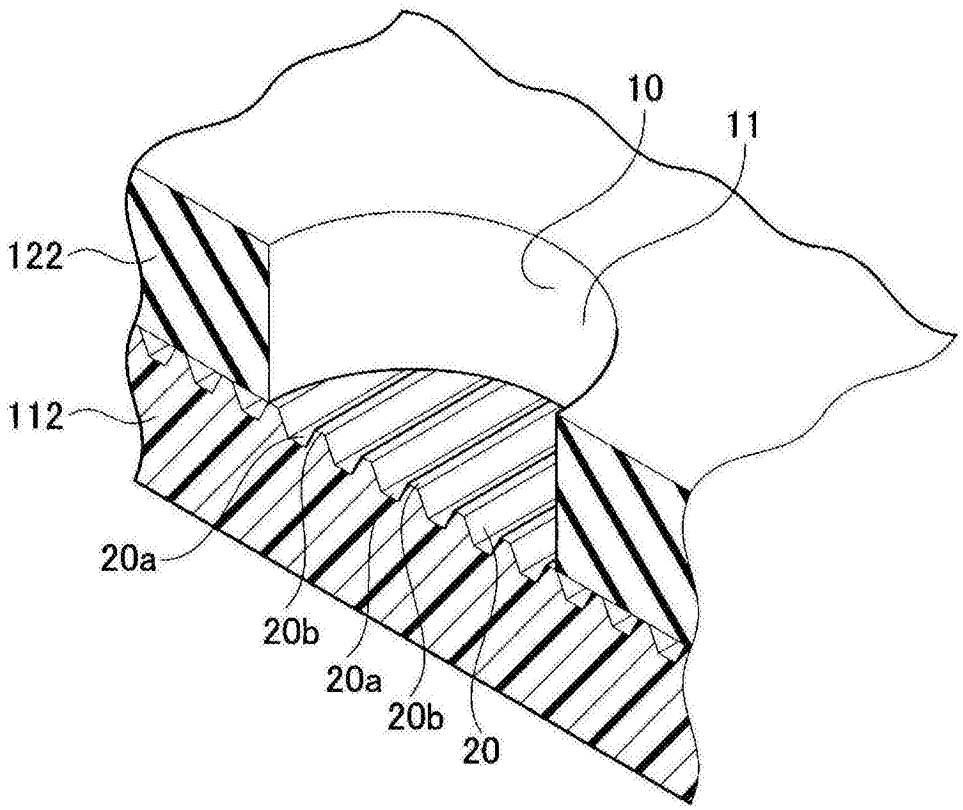


图5

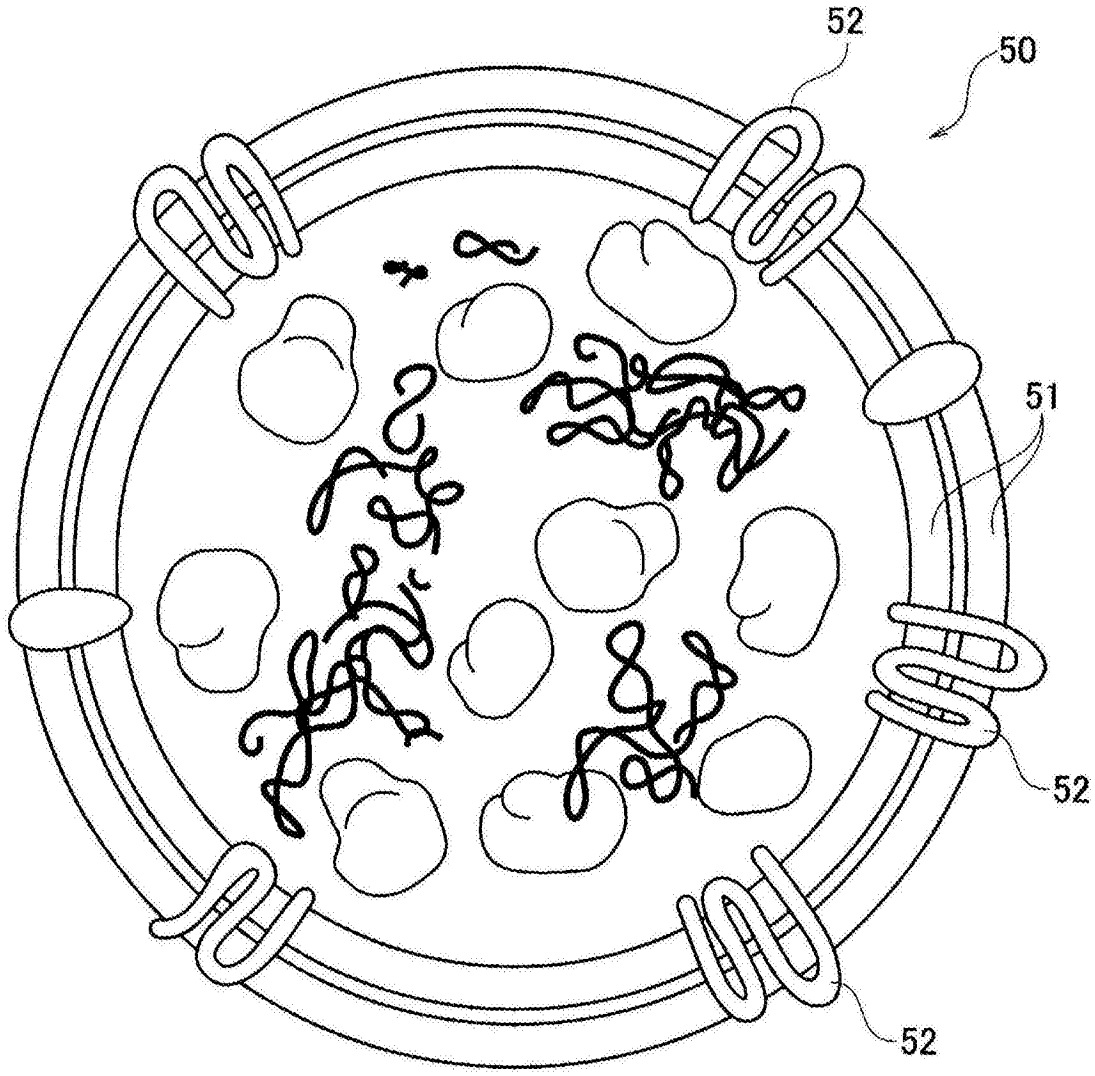


图6

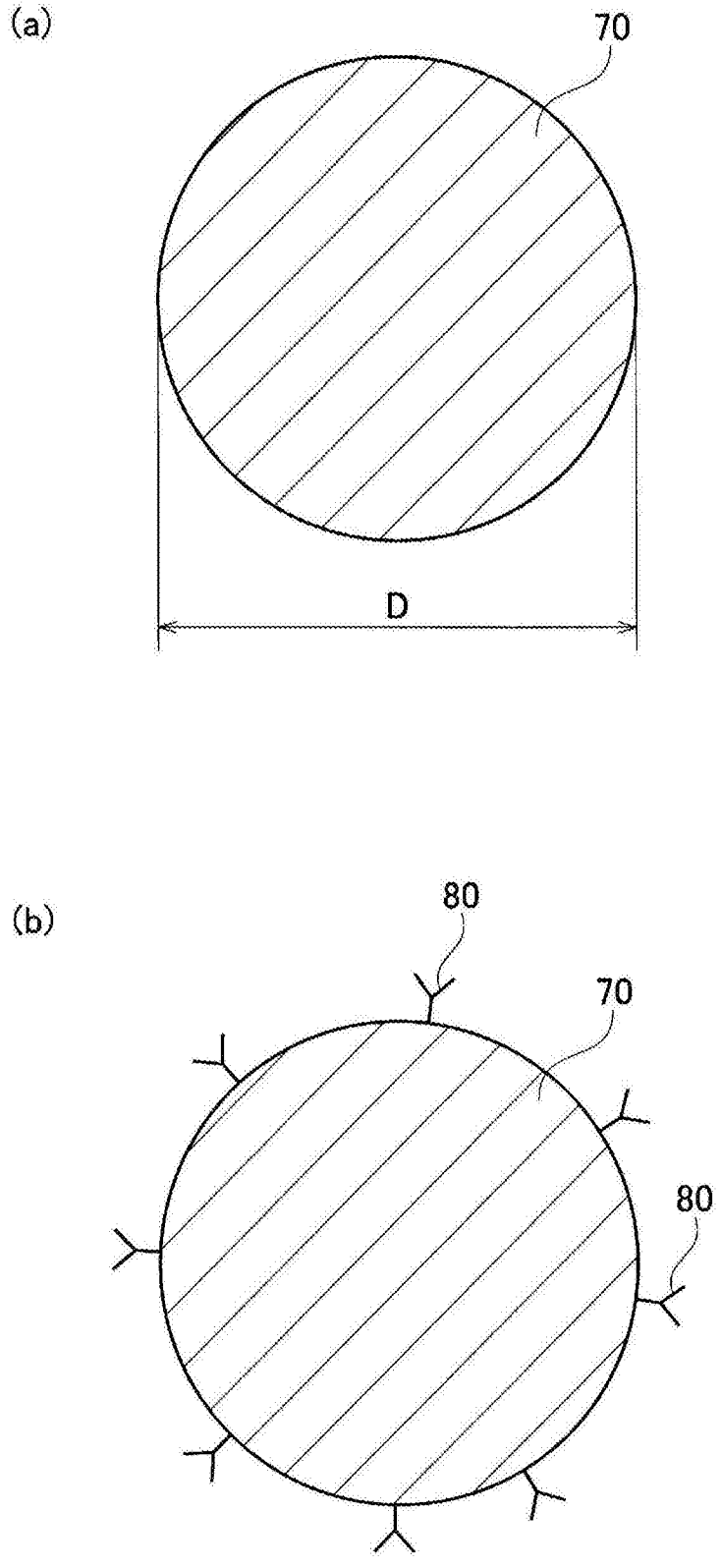


图7

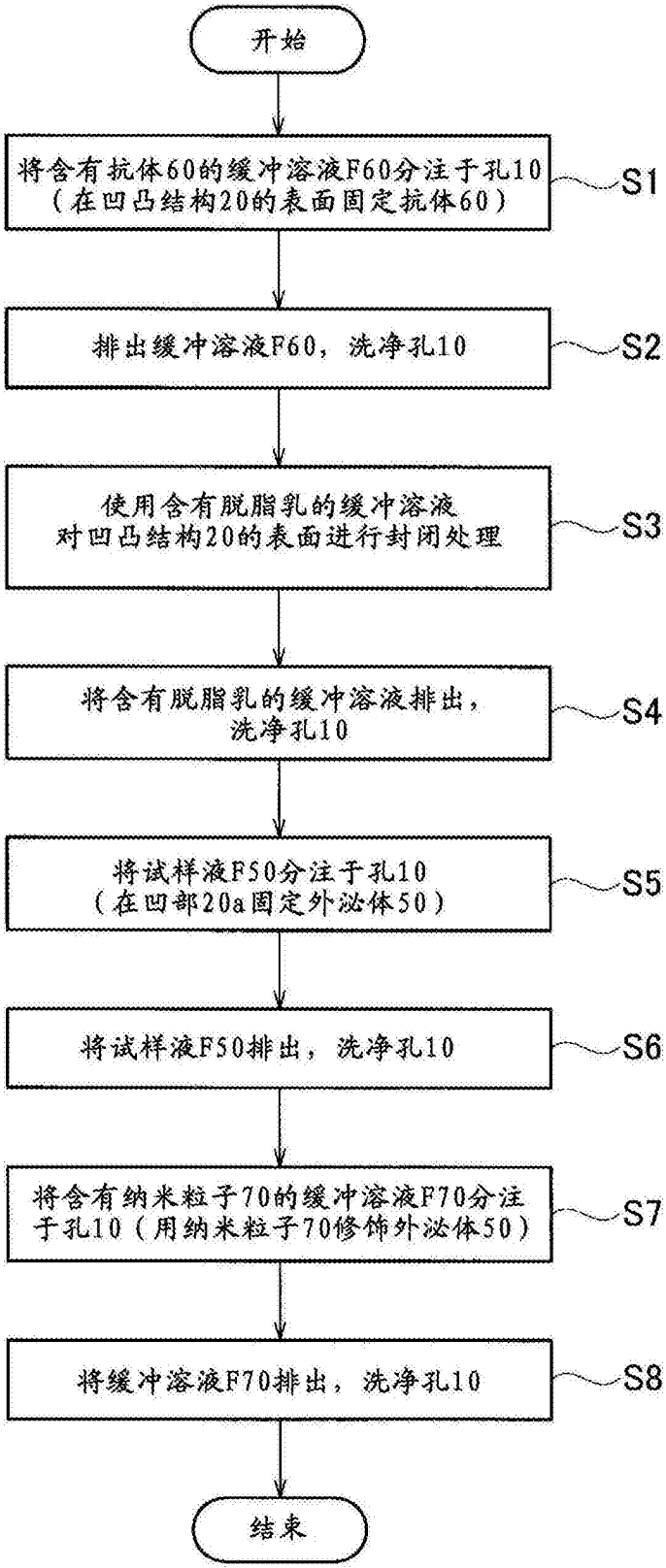

开始
将含有抗体60的缓冲溶液F60分注于孔10（在凹凸结构20的表面固定抗体60）
S1
排出缓冲溶液F60，洗净孔10
S2
使用含有脱脂乳的缓冲溶液对凹凸结构20的表面进行封闭处理
S3
将含有脱脂乳的缓冲溶液排出，洗净孔10
S4
将试样液F50分注于孔10（在凹部20a固定外泌体50）
S5
将试样液F50排出，洗净孔10
S6
将含有纳米粒子70的缓冲溶液F70分注于孔10（用纳米粒子70修饰外泌体50）
S7
将缓冲溶液F70排出，洗净孔10
S8
结束

图8

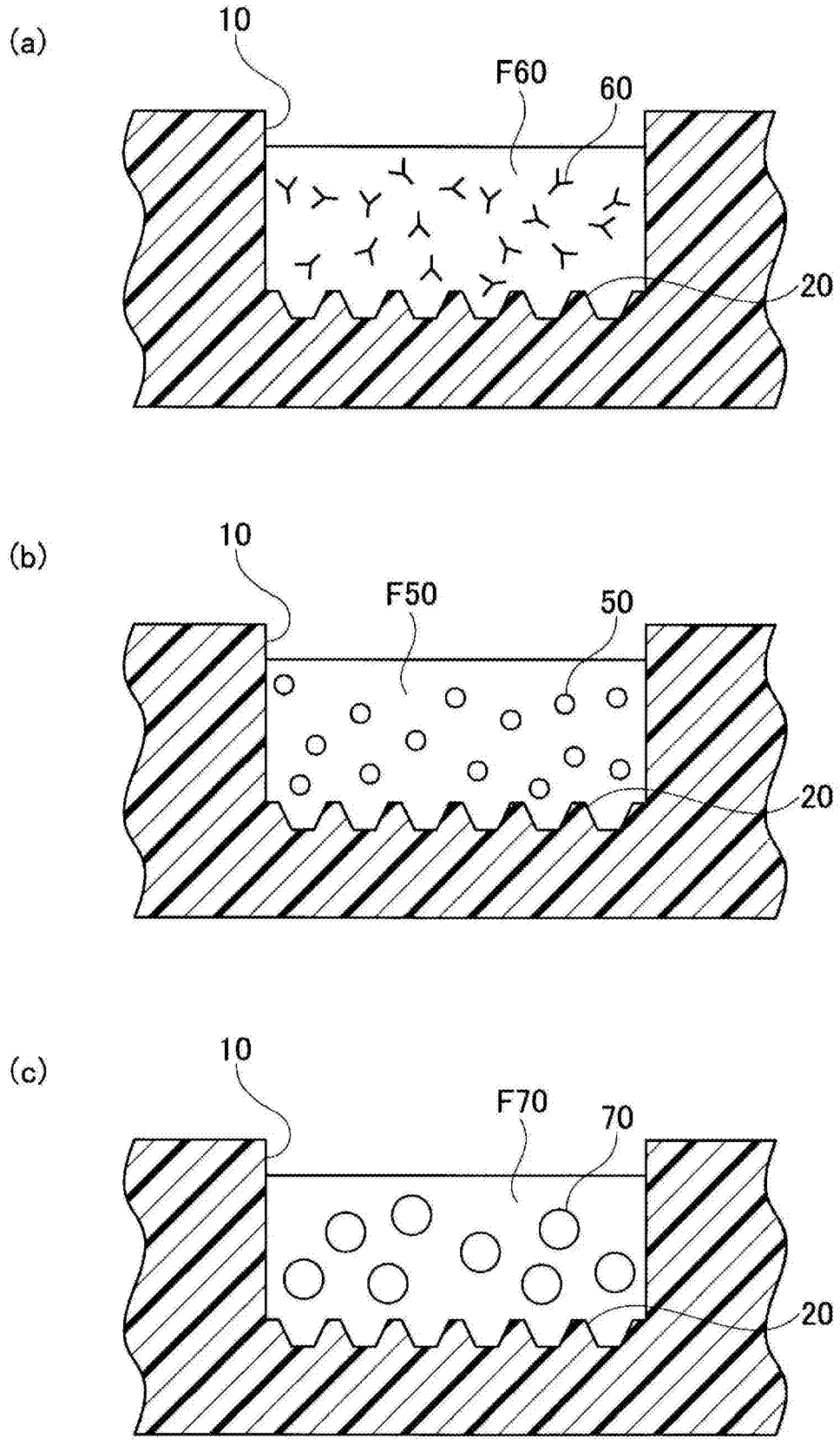


图9

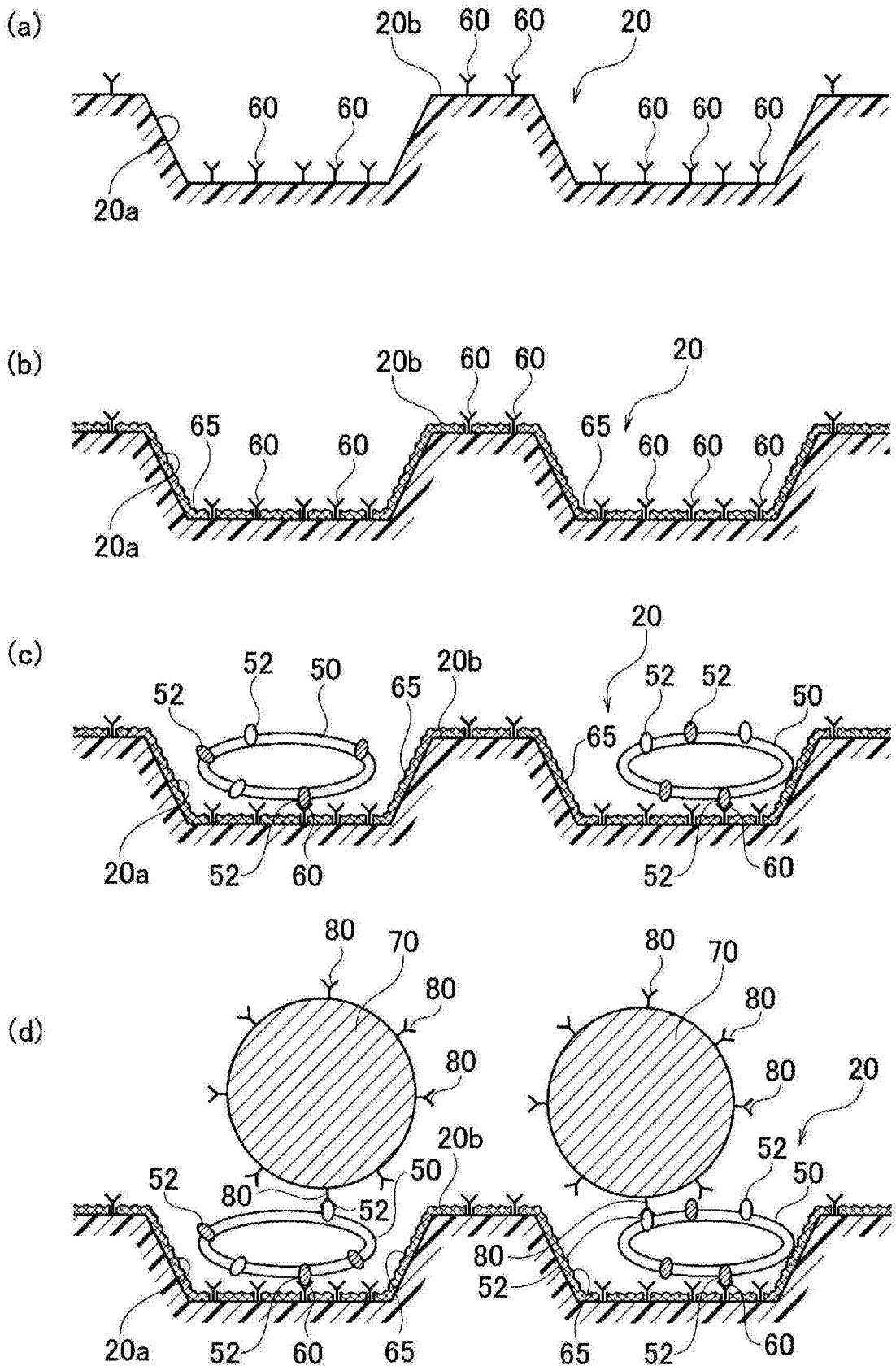

(a)
20b
60
60
20
60
60
60
60
60
20a
(b)
20b
60
60
20
65
65
60
60
60
60
60
20a
(c)
20
52
50
52
65
20b
52
52
50
65
20a
52
60
52
60
(d)
80
70
80
80
80
70
80
80
20
20b
52
50
52
50
80
52
80
52
20a
52
60
65
65
52
60

图10

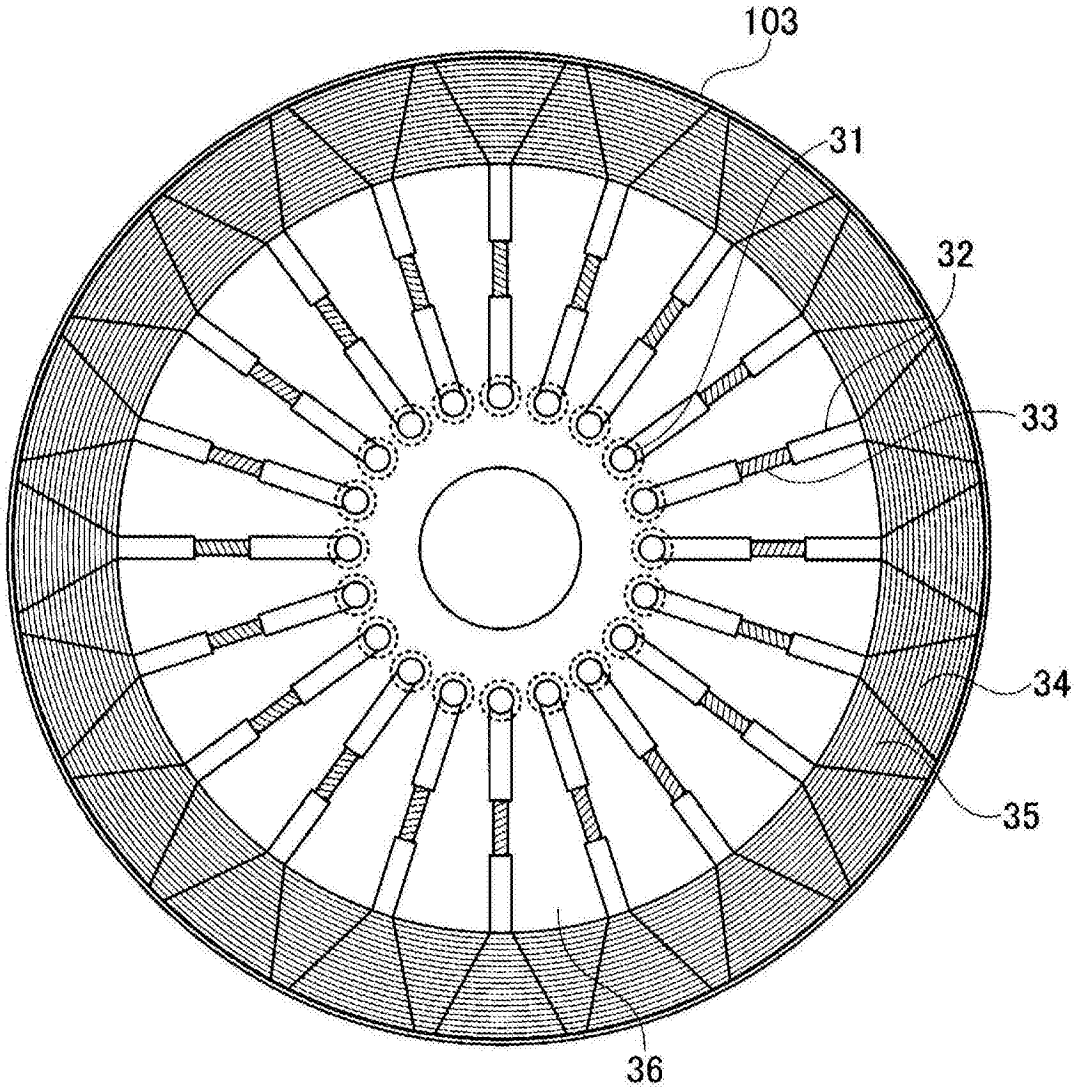
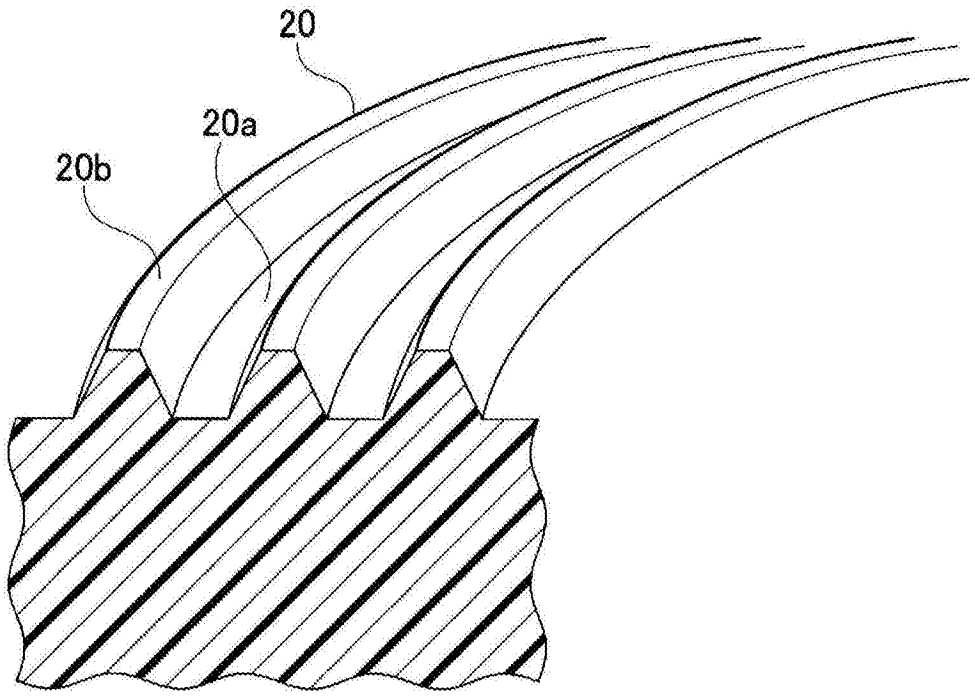
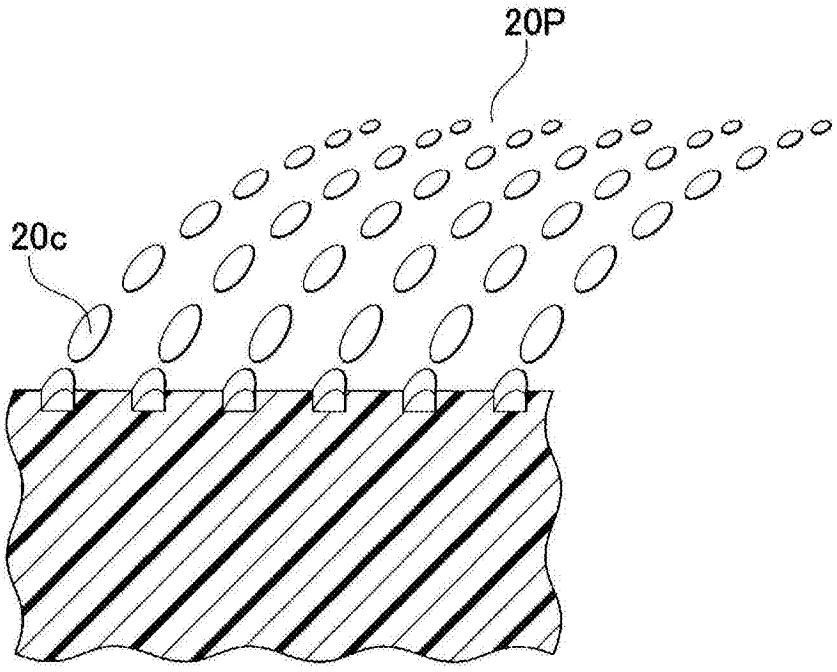


图11



(a)



(b)

图12

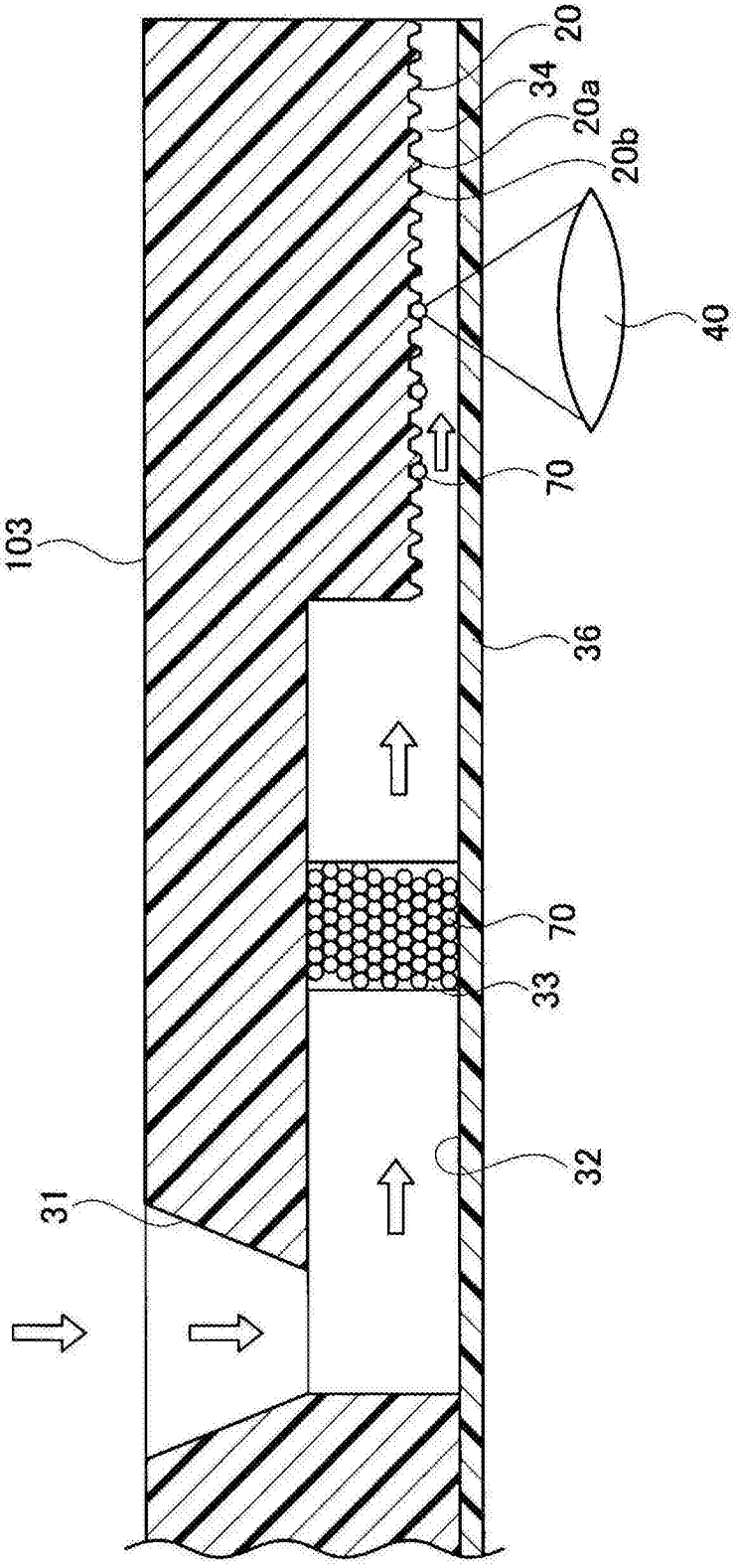


图13