

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-215341

(P2019-215341A)

(43) 公開日 令和1年12月19日(2019.12.19)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/53 (2006.01)
C 1 2 N 5/078 (2010.01)

F 1

G O 1 N 33/53
C 1 2 N 5/078

S

テーマコード(参考)

4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2019-107270 (P2019-107270)
 (22) 出願日 令和1年6月7日 (2019.6.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2018-109402 (P2018-109402)
 (32) 優先日 平成30年6月7日 (2018.6.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
日本国 (JP)

特許法第30条第2項適用申請有り 2019年4月30日、<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/623553v1>

(71) 出願人 591122956
株式会社 L S I メディエンス
東京都千代田区内神田一丁目13番4号
 (71) 出願人 504145342
国立大学法人九州大学
福岡県福岡市西区元岡744
 (74) 代理人 100139594
弁理士 山口 健次郎
 (74) 代理人 100090251
弁理士 森田 憲一
 (72) 発明者 康 東天
福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法人九州大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヒト血液からのマイクロベシクルの分離方法及び分析方法

(57) 【要約】

【課題】ヒト血液中に存在するマイクロベシクルを、効率的に分離及び分析する方法を提供する。

【解決手段】前記方法は、以下の工程を含む；(工程A)血液検体又はその処理物に(1)染色試薬と(2)標識したIgGとを、この順に、若しくは逆の順に、又は同時に添加する工程、(工程B)前記工程Aで得られた反応物をフローサイトメーターの測定に供する工程、(工程C)前記工程Bで取得したデータを解析し、(1)凝集したマイクロベシクルと、(2)標識したIgGに反応する粒子群とを、この順に、若しくは逆の順に、又は同時に観測像から除外する工程、(工程D)由来する細胞のマイクロベシクル集団への分別、キャラクタライズを行う工程。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液検体中のマイクロベシクルを分離する方法であつて、以下の工程を含む方法；

(工程 A) 血液検体又はその処理物に(1)染色試薬と(2)標識した IgGとを、この順に、若しくは逆の順に、又は同時に添加する工程、

(工程 B) 前記工程 Aで得られた反応物をフローサイトメーターの測定に供する工程、

(工程 C) 前記工程 Bで取得したデータを解析し、(1)凝集したマイクロベシクルと、(2)標識した IgG に反応する粒子群とを、この順に、若しくは逆の順に、又は同時に観測像から除外する工程、

(工程 D) 由来する細胞のマイクロベシクル集団への分別、キャラクタライズを行う工程。 10

【請求項 2】

前記工程 Bにおける観測域が $1 \mu m$ 以下、又は $200 nm$ 以上 $1 \mu m$ 以下のいずれかである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

フローサイトメーターの観測域に所望の直径の粒子群を収束させるためにフローサイトメーターのパラメータを設定する工程を実施する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

粒径が $0.22 \sim 1.35 \mu m$ である、ポリスチレンビーズを使用して観測域における粒子径を推定する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 5】

血液検体の処理物が、遠心分離によって分離された試料である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

分離されるマイクロベシクルの直径が $1 \mu m$ 以下である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

分離されたマイクロベシクルが、表 4 に記載の蛋白質を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法によって得られた画分を使用して、血液に由来するマイクロベシクルに特異的に含まれる物質を探索する方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法によって得られた画分を使用して、対象における疾患、薬剤投与効果または他の医学的状態の検出を助ける方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、ヒト血液中に存在するマイクロベシクルを効率的に分離及び分析する方法に関する。 40

【背景技術】**【0002】**

細胞から離出分離する微小膜画分として、エクソソーム(直径 $0.03 \sim 0.1 \mu m$)、マイクロベシクル(直径 $0.1 \sim 1 \mu m$)等が知られており、これらはそれぞれ異なるメカニズムで分泌され、正常条件下および病的条件下のいずれにおいても数多くの異なる細胞タイプから分泌されることが報告されている(非特許文献 1)。

【0003】

これらの微小膜画分はヒト体液中(血液、尿、髄液、他)に含まれるが、これらの微小膜画分が含有する内容物は、細胞や組織間相互作用におけるシグナル伝達機能において重要な役割を担うと考えられている。そして一方で、これらの微小膜画分は、非侵襲的な診

断材料であるリキッドバイオプシとして罹患状態や疾病の有無を判別に用いられ得ることが期待されている（特許文献1、特許文献2、非特許文献2、非特許文献3）。

【0004】

リキッドバイオプシとして使用される生体材料には、遊離核酸、微小膜画分、血中循環腫瘍細胞（circulating tumor cells : CTC）等が挙げられる。微小膜画分は、（I）エクソソーム（exosome）：直径30～100nmの膜性小胞、（II）エクトソーム（ectosome）（マイクロベシクル（microvesicles）、シェディング・マイクロベシクル（SMVs：shedding microvesicles）ともいう）：原形質膜（plasma membrane）から直接放出される、直径100～1,000nmの大きい膜性小胞、（III）アポトーシス性水疱（apoptotic blebs）：死んで行く細胞から放出される直径50～5,000nmの小胞、を含む。

10

【0005】

近年、これら微小膜画分の臨床的価値が注目されている。エクソソームにおいては臨床応用が進められており、小胞内のポリヌクレオチドを利用した乳がん診断方法が開発されている（特許文献3）。しかしながら、従来のエクソソームを使用した診断方法は、1個1個のキャラクタライズが困難でどういった組織や細胞に由来しているのかが簡便には判別しづらいという問題点がある。マイクロベシクルは、CTCなどと比べてヒト体液中に多量に含まれること、腫瘍の浸潤に極めて重要な役割を担っていること（非特許文献4）や、血液中に存在するマイクロベシクルは生理的な血液凝固の因子であると同時に敗血症などへの疾患への関与が報告されている（非特許文献1）ことから、臨床検査材料としての有効利用が期待されているものの、未だ実現には至っていない。

20

【0006】

エクソソームとマイクロベシクルはその生成プロセスが異なり、別々の微小膜画分として定義されているものの、これまでの観測法では大きさやそれらを特徴づける膜に存在する表面抗原が非常に近接、類似しており、これらを厳密に区別して分離し観測することができなかった。例えば、特許文献1や特許文献2ではエクソソーム及びマイクロベシクルを両方含む形での分離方法及び分析方法について記述されており、両者の区別は不明瞭である。

30

【0007】

また、一般的に、体液中に存在する微小膜画分は、全身の臓器、組織、またはそれらを構成する各細胞に由来するため、診断や検査応用に価値を見出すには、特定の疾患にマッチングした特定の臓器、組織や細胞にフォーカスした微小膜画分の観測が必要とされている。従って、観測する微小膜画分がどういった臓器、組織や細胞に由来するかを簡便にカテゴライズする分析法が確立できれば、微小膜画分の臨床的有用性は更に高まると考えられる。

40

【0008】

このように、マイクロベシクルを臨床検査材料等として有効利用するためには、エクソソームと区別して分離することに加えて、由来する臓器、組織や細胞を区別できる分離法及び分析法が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特許第5838963号公報

【特許文献2】特開2015-91251号公報

【特許文献3】特開2014-117282号公報

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Andrea Piccin , William G, Owen P (2007) Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. Blood Reviews 21, 157-171

50

【非特許文献 2】Boukouris S, Mathivanan S (2015) Exosomes in bodily fluids are a highly stable resource of disease biomarkers. *Proteomics Clin Appl* 9(3-4): 358-367

【非特許文献 3】IH Chen, L Xue, CC Hsu, (2017) Phosphoproteins in extracellular vesicles as candidate markers for breast cancer. *PNAS* vol. 114, no. 12, 3175-3180

【非特許文献 4】James W. Clancy, Alanna Sedgwick, Carine Rosse, (2015) Regulated delivery of molecular cargo to invasive tumour-derived microvesicles. *Nature Communications* 6, Article number: 6919

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

上述したように、マイクロベシクルはリキッドバイオプシとして有効な臨床検査材料になりえると考えられるが、エクソソームとマイクロベシクルを明確に区別して分離することは非常に困難である上に、様々な細胞や組織に由来するマイクロベシクルが混在している限り、血液中マイクロベシクル全体をリキッドバイオプシとして使用（例えば核酸などを抽出）しても、疾患部位の特定や診断目的にマッチした結果は獲得しがたいと考えられる。

【0012】

そこで、特に血液中のマイクロベシクル（直径0.1～1μm）に注目し、これらを簡便にキャラクタライズし1個1個のマイクロベシクルがどういった細胞に由来するかを観測でき、また、これまで不明瞭であったエクソソームとマイクロベシクルとを区別して分離し、また観測するマイクロベシクルが由来する細胞や組織、臓器を明確にする方法を構築することを、本発明の課題とする。

20

【0013】

更に、本発明者らは、上記課題に加えて、マイクロベシクルを臨床検査材料として使用するにあたって、特に血液中には補体などイムノグロブリンを補足するタンパク質が存在しており、これらはイムノコンプレックスを形成し分子サイズとしてマイクロベシクルと近接する可能性があり、これらはIgGとも相互作用するので血液由来のマイクロベシクルに免疫化学的なキャラクタライズ方法を実施する際には問題となりうることを見出した。

30

なお、本明細書において、分離とは、分画、検出などと同義で用いるものとする。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、前記の問題点を解決すべく鋭意検討した結果、血液検体（全血、血漿または血清）からマイクロベシクルを遠心操作により濃縮する前処理工程、前記血液検体または前記前処理工程で得られた濃縮マイクロベシクル画分に、標識したIgGを添加する工程、フローサイトメーターを使用し、直径約0.1～1μmの画分に集約させて観測する工程、前記観測データから標識IgGに反応する粒子集団を除去する工程、そしてマイクロベシクルが由来する細胞に特異的な表面抗原にてマイクロベシクルをキャラクタライズする工程を適宜組み合わせて選択して実施することにより、1個1個のマイクロベシクルがどういった臓器、組織やそれを構成する細胞から放出されて血液中に存在していたのかを精度よく観測できることを見出した。本発明はこの知見に基づいて、血液中のマイクロベシクルを個々にキャラクタライズしうる測定法を完成させたものである。

40

【0015】

すなわち、本発明は、以下を提供する：

[1] 血液検体中のマイクロベシクルを分離する方法であって、以下の工程を含む方法；

（工程A）血液検体又はその処理物に（1）染色試薬と（2）標識したIgGとを、この順に、若しくは逆の順に、又は同時に添加する工程、

（工程B）前記工程Aで得られた反応物をフローサイトメーターの測定に供する工程、

50

(工程C) 前記工程Bで取得したデータを解析し、(1)凝集したマイクロベシクルと、(2)標識したIgGに反応する粒子群とを、この順に、若しくは逆の順に、又は同時に観測像から除外する工程、

(工程D) 由来する細胞のマイクロベシクル集団への分別、キャラクタライズを行う工程、

[2] 前記工程Bにおける観測域が1μm以下、又は200nm以上1μm以下のいずれかである、[1]の方法、

[3] フローサイトメーターの観測域に所望の直径の粒子群を収束させるためにフローサイトメーターのパラメータを設定する工程を実施する、[1]又は[2]の方法、

[4] 粒径が0.22~1.35μmである、ポリスチレンビーズを使用して観測域における粒子径を推定する、[1]~[3]のいずれかの方法、

[5] 血液検体の処理物が、遠心分離によって分離された試料である、[1]~[4]のいずれかの方法、

[6] 分離されるマイクロベシクルの直径が1μm以下である、[1]~[5]のいずれかの方法、

[7] 分離されたマイクロベシクルが、表4に記載の蛋白質を含む、[1]~[6]のいずれかの方法、

[8] [1]~[7]のいずれかの方法によって得られた画分を使用して、血液に由来するマイクロベシクルに特異的に含まれる物質を探査する方法、

[9] [1]~[7]のいずれかの方法によって得られた画分を使用して、対象における疾患、薬剤投与効果または他の医学的状態の検出を助ける方法。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、血液中に存在するマイクロベシクルを簡便に且つ特異的に分離、観測することができ、さらに膜に存在する表面抗原を用いて個々のマイクロベシクルをキャラクタライズ（どういった細胞や組織、臓器に由来するのか）することができる。その結果、特定の疾患にマッチングした特定の臓器、組織や細胞にフォーカスした診断や検査応用が可能な検査としての価値の向上が期待される。また、本発明により得られた画分を使用して分析することで、対象における疾患、薬剤投与効果または他の医学的状態を推定することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】血漿を直接染色したサンプル（上側）と、前処理により濃縮したマイクロベシクル画分を染色したサンプル（下側）のフローサイトメーターでの観測像である。

【図2】前処理により濃縮したマイクロベシクル画分のフローサイトメーターでの観測像である。

【図3】前処理により濃縮したマイクロベシクル画分の透過型電子顕微鏡によるネガティブ染色像である。

【図4】前処理により濃縮したマイクロベシクル画分のナノ粒子解析システムによる粒度分布ヒストグラムである。

【図5】ショットガンプロテオミクス解析により検出した蛋白質からmetascapeを使用した蛋白質のエンリッチメント解析結果である。

【図6】ショットガンプロテオミクス解析により検出した蛋白質からmetascapeを使用した蛋白質のエンリッチメント解析結果をクラスター毎にネットワーク解析した結果である。

【図7】前処理により濃縮したマイクロベシクル画分のフローサイトメーターによる測定データを側方散乱光におけるパルス幅とパルスエリアで展開した観測像である。

【図8】図7と同じ測定データを前方散乱光と側方散乱光の面積で展開した観察像である。

【図9】図7及び図8に示す観測像から大きく外れた集団を除外（ゲートアウト）した測

10

20

30

40

50

定データを側方散乱光と A P C マウス I g G で展開した観測像である。

【図 1 0】図 9 に示す観察像から A P C マウス I g G 陽性集団を除外（ゲートアウト）した測定データから赤血球由来マイクロベシクルを選別する過程を示す説明図と、キャラクタライゼーションに使用した表面抗原との反応性を示す表である。

【図 1 1】図 9 に示す観察像から A P C マウス I g G 陽性集団を除外（ゲートアウト）した測定データからマクロファージ / 単球 / 顆粒球由来マイクロベシクルを選別する過程を示す説明図と、キャラクタライゼーションに使用した表面抗原との反応性を示す表である。
10

【図 1 2】図 9 に示す観察像から A P C マウス I g G 陽性集団を除外（ゲートアウト）した測定データから T 細胞 / B 細胞由来マイクロベシクルを選別する過程を示す説明図と、キャラクタライゼーションに使用した表面抗原との反応性を示す表である。

【図 1 3】図 9 に示す観察像から A P C マウス I g G 陽性集団を除外（ゲートアウト）した測定データから血小板由来マイクロベシクルを選別する過程を示す説明図と、キャラクタライゼーションに使用した表面抗原との反応性を示す表である。

【図 1 4】図 9 に示す観察像から A P C マウス I g G 陽性集団を除外（ゲートアウト）した測定データから血管内皮細胞由来マイクロベシクルを選別する過程を示す説明図と、キャラクタライゼーションに使用した表面抗原との反応性を示す表である。

【図 1 5】由来する細胞集団へのマイクロベシクルのキャラクタライゼーション後に側方散乱光と A n n e x i n 5 の展開図へ重ね合わせた図である。

【図 1 6】由来する細胞集団へのマイクロベシクルのキャラクタライゼーション後に側方散乱光と A n n e x i n 5 の展開図へ重ね合わせた図（上側）と、由来する各細胞集団における、 A n n e x i n 5 陽性集団と A n n e x i n 5 陰性集団のフローサイトメーターでの観察像（下側）である。
20

【図 1 7】フローサイトメーターによる健常人 10 名からの各細胞由来マイクロベシクルの A n n e x i n 5 陽性集団と A n n e x i n 5 陰性集団との割合を比較した結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 8】

以下において、本発明の実施形態について詳細に説明するが、利用方法の態様についてはこれに限定されるものではない。
30

【0 0 1 9】

本発明は、血液中のマイクロベシクルに特化した観測条件を設定したフローサイトメーターによる分離方法及び分析方法である。夾雑物を除去しマイクロベシクルを濃縮する前処理工程を組み合わせてもよいが、前処理条件を省いて、直接フローサイトメーターにより分離、測定することもできる。直接フローサイトメーターにより分離、測定する方法は、検査応用や実用的に汎用性のある観測系として好ましい。本明細書において、前処理は濃縮や回収の意味を含むものとし、濃縮と回収はほぼ同義の語として用いられることがある。

【0 0 2 0】

本明細書において血液とは、例えば、全血、血漿、血清などが挙げられる。生体試料はそのまま本発明の方法に適用してもよいし、水、酸性溶液、アルカリ性溶液、緩衝液、またはこれらの混合液に溶解または懸濁し、必要に応じてさらに処理を加えたものを本発明の方法に適用してもよい。本発明で利用可能な酸性溶液、アルカリ性溶液、緩衝液は、当業者であれば適宜選択して使用することが可能である。
40

【0 0 2 1】

以下、血液中のマイクロベシクルを、フローサイトメーターを用いて分離、分析する条件の一例について説明をするが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0 0 2 2】

また、本発明において使用できるフローサイトメーターは、特定の機器に限定されるものではなく、クオーツキュベット方式、ジェットインエアー方式などいずれのフローセル
50

を採用したフローサイトメーターであっても使用することができる。

【0023】

本発明で利用可能なフローサイトメーターを用いた観測法は、例えば、以下の工程に従って実施することができる。

【0024】

(1) マイクロベシクルの染色

本工程では、血液検体又はその処理物と染色試薬とを混和させて、マイクロベシクルを染色する。より具体的には、全血、血漿、血清そのもの、あるいは前処理法により濃縮した画分に、染色試薬、例えば、蛍光標識した、表面抗原に特異的な抗体を混和させて、マイクロベシクルを染色する。染色方法は、当業者であれば定法を採用し、場合によっては条件を適宜検討して実施することができる。マイクロベシクル中の複数の抗原ターゲッティングを行うために、マルチカラー分別として、多種類の標識抗体で染色して検出してもよい。例えば、マイクロベシクルの膜構成成分であるホスファチジルセリン (Phosphatidylserine : PS) に対して、金属イオン存在下で結合するタンパク質である Annexin 5などを使用することができる。

10

【0025】

その他、マイクロベシクルに特異的に結合することができる物質としては、例えば、小胞マイクロベシクル表面に存在するタンパク質、脂質または糖に結合することができる物質であればよい。表面に存在する物質としては、例えばタンパク質の場合、CD235a、CD59、CD44、CD33、CD45、CD144、CD66a、CD66b、CD66c、CD66e、CD41、CD61、EP-CAM、CD324、CD14、CD81、CD31、CD274、CD63、Alix、CD105、CD133、CD279、CD15、TSG101、CD20、CD249、CD5、CD10、CD26、CD273、CD9、MUC-1、CD13、CD146、CD62Eまたはこれらの組み合わせを使用することができる。例えば、赤血球に由来するマイクロベシクルとして Annexin 5、CD235a、CD59を、血小板に由来するマイクロベシクルとして Annexin 5、CD41、CD61を、マクロファージ・単球・顆粒球に由来するマイクロベシクルとして Annexin 5、CD45、CD15を、T細胞 / B細胞に由来するマイクロベシクルとして Annexin 5、CD45、CD5、血管内皮細胞に由来するマイクロベシクルとして Annexin 5、CD146、CD105のように組み合わせて使用することで、より高精度な分離ができるため、好ましい。

20

【0026】

上記以外のマイクロベシクルに特異的に結合することができる物質は、例えば、タンパク質に対して結合親和性を有する物質、酵素の基質、補酵素、調節因子、受容体と特異的に結合する物質、レクチン、糖、糖蛋白質、抗原、抗体若しくはその抗原結合断片、ホルモン、神経伝達物質、リン脂質結合タンパク質、プレクストリニン相同 (PH : pleckstrin homology, PH) ドメインを含むタンパク質、コレステロール結合タンパク質、またはこれらの組み合わせであってもよい。抗原結合断片は、抗原結合部位を含むものであり、例えば、單一ドメイン抗体 (single-domain antibody)、Fab、Fab'またはscFvを使用してもよい。

30

【0027】

(2) IgG の添加

先の工程で血液検体又はその処理物と染色試薬とを混和させて得られた混和物に、あるいは、染色試薬と混和させる前の血液検体又はその処理物に、IgGを蛍光標識したものを混和させて反応させる。前記 IgG の由来は特に限定されるものではなく、例えば、マウス IgG、ヒト IgG、ラット IgG、ウサギ IgG、ヤギ IgG、ウシ IgGなどを用いることができる。マイクロベシクルの染色工程同様、当業者であれば定法に従って実施することができる。例えば、アロフィコシアニン (APC) 標識マウス IgG、Mix-n-Stain APC Antibody Labeling kit (Biotium社) を使用して、定常プロトコールにて、室温で30分静置することで実施すること

40

50

ができる。

【0028】

血液中には補体などイムノグロブリンを補足するタンパク質が存在し、イムノコンプレックスを形成することがある。このイムノコンプレックスは、マイクロベシクルと分子サイズが近接する場合がある。そのため、イムノコンプレックスは IgGとも相互作用するので血液由来のマイクロベシクルに免疫化学的なキャラクタライズ方法を実施する際には問題となりうる。従って、観測像において IgGを捕捉する画分を検出し、それらを観測像から除去するために IgGを蛍光標識したものを混和させて IgG捕捉画分と反応させる工程を実施することで、目的とするマイクロベシクル以外を除去することができ、夾雑物を含まないより正確な測定を行うことができるため、好ましい。

なお、上記の、表面抗原特異的な抗体によってマイクロベシクルを染色する工程と IgGを添加する工程とは、いずれを先に実施してもよく、両工程を同時に実施してもよく、当業者が実施する環境に合わせて、適宜選択することが可能である。

【0029】

(3) フローサイトメーターの設定

前方散乱光と側方散乱光の光電子増倍管の電圧 (Voltage) と閾値 (Threshold) を調節して観測域に特定の直径を持つ粒子群を収束させる。これらのパラメータ等条件設定に際しては、未染色サンプルおよび染色サンプルの測定を実施し、各標的を検出するまでのその検出感度を満たす電圧設定や及びシース流速度を決定することができる。

【0030】

フローサイトメーターのパラメータ設定としては、当業者であれば、最適な条件を探索して適宜設定することが可能であるが、例えば、流量 (Flow rate) は 12 μL/min、前方散乱光の電圧は 381、側方散乱光の電圧は 340 に設定し、それぞれの検出感度として、蛍光強度閾値を 200 に設定して実施することができる。各蛍光物質に対する励起光 (Ex.) 及び蛍光検出フィルター (Em.) の波長及び電圧は、使用する各々の蛍光物質に応じて適宜選択して設定することができる。

【0031】

上記で設定したフローサイトメーターのパラメータを使用して、観測域における粒子径の推定を行う。サイズが均一なポリスチレンビーズ (例えば、SPHEROTM Nano Polystyrene Size Standard Kit, Spherotech)などを使用して定法に従って測定を実施することができる。観測域の粒子径を推定するためには、例えば、ポリスチレンビーズのサイズの粒径が 0.22 μm、0.45 μm、0.88 μm、1.35 μm であることが好ましい。

【0032】

観測域として設定する直径としては、マイクロベシクルを含む大きさであれば特に限定されるものではないが、例えば、約 1 μm 以下が好ましく、100 nm ~ 1 μm がより好ましく、200 nm ~ 1 μm が更に好ましい。特にこれら微小粒子を観測する際に、側方散乱光が前方散乱光より分解能が高く粒子のサイズ検証などにも使用することができるため、好ましい。

【0033】

なお、本工程は、前記染色工程及び IgG 添加工程と、下記測定・分離工程との間に実施する態様に限定されず、例えば、パラメータを設定した後、染色工程、IgG 添加工程、測定・分離工程を実施することもできるし、あるいは、一度設定できれば、測定毎にパラメータを設定することなく、一連の工程を繰り返し実施することができる。

【0034】

(4) フローサイトメトリーによる測定・分離

フローサイトメーターでデータを取得する。マルチカラー測定を実施した場合は各蛍光から割り当てた検出器以外の検出器へ漏れこんだ蛍光の漏れこみ補正を実施し、その条件下にて測定結果を得る。

【 0 0 3 5 】

マイクロベシクルが凝集する場合があるが、凝集したマイクロベシクルを観測像から除外するために、1) 側方散乱光のパルス幅 (Width) の値が集団から外れて非常に高いもの、2) 前方散乱光と側方散乱光のプロットから両者が集団から外れて高い値となっているものをマーキングしてゲートアウトすることができる。特に、前処理法を加えてマイクロベシクルが凝集した場合などに有効である。また、IgG 捕捉画分との免疫複合体を除去するために、IgG を蛍光標識したものに反応する陽性集団をマーキングしてゲートアウトすることができる。

なお、上記の、凝集したマイクロベシクルを除外する工程と IgG により捕捉された免疫複合体を除去する工程とは、いずれを先に実施してもよく、両工程を同時に実施してもよく、当業者が実施する環境に合わせて、適宜選択することが可能である。10

【 0 0 3 6 】

マルチカラーで検出したマイクロベシクルをゲーティング操作により、それぞれが由来する細胞のマイクロベシクル集団への分別、キャラクタライズを行うことができる。この工程により、分離された血液中のマイクロベシクルであることを確認することができる。

【 0 0 3 7 】

本発明により血液中マイクロベシクルの分別、キャラクタライズを行うことができるが、これらのキャラクタライズした画分を、セルソーターを使用して更に分離することもできる。これらの分離した画分からその特異的なコンテンツ（核酸、代謝物、蛋白質、脂質）を分析し臨床応用することも可能である。分離された画分について、更に、各マイクロベシクル集団の頻度解析や標的分子の発現量解析に使用してもよい。20

【 0 0 3 8 】

マイクロベシクルを分離し観測しうる測定技術としては上記工程に加えて、例えば、ナノトラッキング粒子径測定装置 NanoSight (ナノサイト、 Malvern Panalytical 社) は、NTA (Nano Tracking Analysis) 技術とFFF (Field Flow Fractionation) 技術を組み合わせて使用することもできる。NTA 技術は、液中のナノ粒子のブラウン運動の様子を PC 画面上で、リアルタイムに観察することができ、また、FFF 技術は、薄いフロー・チャンネルの中で分離が行われるが、このチャンネルの特殊な幾何学的形状によって、このフローは放射状の断面をもつ層流をなしえ、この層流と直交することで、分離力が生じさせることにより、マイクロベシクルのような微小粒子をサイズで分離することができるため、より高精度な分離や分析が期待される。このような分離 / 観測法と個々のマイクロベシクルを特徴付ける表面抗原を組み合わせることでマイクロベシクルをキャラクタライズし、臓器特異性や疾患特異性を高め、臨床応用に利用できる。30

【 0 0 3 9 】

本発明で利用可能なマイクロベシクルの分離方法において、夾雑物を除去し、マイクロベシクルを濃縮することが可能な前処理工程を組み合わせた方法を使用することができる。このような前処理工程を組み合わせることで、フローサイトメーターによる分離工程において、条件設定が容易になるだけでなく、分離の速度や感度が向上させることができるので、好ましい。遠心分離法を特徴とする前処理工程は、例えば、以下の工程に従って実施することができる。40

【 0 0 4 0 】

採血管に採取された血液検体を、低速遠心分離にて血漿あるいは血清成分に分離する（前処理工程 1）。このとき、低速遠心分離条件などは、公知の方法に従って実施することができ、室温で $2,000 \times g$ で 20 分間遠心分離して得られた上清を使用することができる。

【 0 0 4 1 】

次に、上記前処理工程 1 において得られた血漿や血清をさらに低速遠心する（前処理工程 2）。この遠心工程により、血小板やアポトーシス性水疱などを沈殿させることができるので、好ましい。前処理工程 1 同様に、室温で $2,000 \times g$ で 20 分間遠心分離して50

得られた上清を回収して使用することができる。

【0042】

前処理工程2によって得られた上清を、高速遠心してマイクロベシクル画分を沈殿させる（前処理工程3）。当該工程の条件としては、例えば、室温で $20,000 \times g$ で30分遠心分離して得られた沈殿を使用することができる。

【0043】

前処理工程3によって得られた沈殿画分に例えばPBS等の緩衝液を加えて懸濁し、更に高速遠心を行う（前処理工程4）。この高速遠心により、マイクロベシクル画分を濃縮することができ、夾雑物を除去することができるため、好ましい。当該工程の条件としては、室温で $20,000 \times g$ で30分遠心分離して得られた沈殿を使用することができる。必要に応じて、前処理工程4を繰り返してもよい。複数回高速で遠心分離をおこなうことにより、夾雑物を取り除いてマイクロベシクル画分の純度を高めることができ、好ましい。

10

【0044】

本発明の一態様として利用可能な前処理方法は上記の前処理工程に加えて、他の方法を使用してもよい。例えば、水溶液およびタンパク質を含む溶液のろ過滅菌等に使用する各種孔径を有するメンブレンフィルターを組み合わせて、目的とするマイクロベシクル画分を抽出することができる。この場合孔径は、直径 $0.1 \sim 10 \mu m$ のものを使用した精密ろ過(Micro-Filtration)法に相当する方法が好適である。

20

【0045】

また、その他の前処理法として、密度勾配溶質とともに試料を遠心分画する平衡密度勾配遠心法、微小膜画分の表面抗原に特異的な抗体を利用し、微小膜画分を様々な担体に結合させて回収する免疫学的捕捉法、サイズ排除クロマトグラフィー(ゲルろ過法)により可溶性蛋白質よりも早く溶出してくる画分を回収する方法、微小膜画分の膜構成成分に対して金属イオン存在下で結合する担体を使用したリン脂質アフィニティー法、また高分子ポリマーと微小膜画分を混合し、目的の微小膜画分を沈殿させるポリマー沈殿法を組み合わせて実施してもよく、当業者であれば、これらの方法を、必要とされる組織や細胞、用途に応じて適宜選択して組み合わせて使用することができる。複数の前処理工程を組み合わせることで、フローサイトメーターによる分離が高感度、高精度に行える可能性がある。

30

【0046】

異なる本発明実施の一態様として、対象における疾患進行のモニタリングのための方法、個体における疾患再発のモニタリングのための方法として使用することもできる。これらの方は、血液検体中からマイクロベシクルを分離する工程に加えて、マイクロベシクル中に含まれる物質を分析するプロファイル工程を含む。ある特定の医学的状態の対象個体において、プロファイルを分析することによって、例えば特定の疾患の存在を推定することに用いることができる。例えば、マイクロベシクルを分離するための試料採取の期間を、目的とする対象疾患の検出などに応じて適宜設定することで、より詳細なプロファイルを得て状態を観察し、診断を補助することが可能となる。また、これは、薬剤投与後の疾患状態をモニタリングする方法としても使用することができる。

40

【0047】

本発明により、マイクロベシクルを臨床検査材料としての有効利用できるようになるため、血液中に存在するマイクロベシクルを簡便に且つ特異的に抽出、観測することができ、さらに膜に存在する表面抗原を用いて個々のマイクロベシクルのキャラクタライズ（どういった細胞や組織、臓器に由来するのか）することができる。その結果、特定の疾患にマッチングした特定の臓器、組織や細胞にフォーカスした診断や検査応用が可能な検査としての価値の向上が期待される。また、本発明により得られた画分を使用して分析することで、対象における疾患、薬剤投与効果または他の医学的状態を推定することが可能となる。

【実施例】

50

【0048】

以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0049】**《実施例1：ヒト血液中からのマイクロベシクルの濃縮》**

健常人から、5mL～7mLの血液をTERUMOベノジェクトII真空採血管EDTA-Na(VENOject II(登録商標)、テルモ)へ採取した。血液試料を、20で2,330×gで10分間遠心分離して血漿を得て、その後に約20で約2,000×gで10分間遠心分離し、血漿内脂質及び細胞残余物、血小板を除去し、上澄み液を下記実験に使用した。なお、本採血からの実験は、九州大学医系地区部局臨床研究倫理審査委員会の承認(許可番号29-340)の下、実施された。10

【0050】

得られた血漿600μLを20で18,900×gで30分間遠心分離した。遠心分離された結果物から上澄み液を除去し、ペレットにおいてマイクロベシクル画分を濃縮した。このペレットに対してリン酸緩衝生理食塩水(PBS)600μLを使用して希釈した。希釈されたペレットは、20で18,900×gで30分遠心分離した。遠心分離された結果物からペレットにおいてマイクロベシクル画分を濃縮した。

【0051】**《実施例2：フローサイトメーターを用いた血漿マイクロベシクルの観測》**

A. 血漿を直接染色した場合におけるフローサイトメーターでのマイクロベシクル観測(前処理濃縮画分との比較データ)20

遠心操作(2,000×g)によって得られた血漿60μLに対して、FITC-Annexin5(Becton Dickinson Biosciences)、PE anti-human CD235a(Biolegend)、PerCP anti-human CD61(Biolegend)を各々1μL添加し、室温で30分静置した。この染色溶液に750μLの10mmol/L Hepes(pH7.4)、0.14mol/L NaCl、2.5mmol/L CaCl₂に懸濁したものをサンプルとして使用した。フローサイトメーターでの測定パラメータは以下Cの項に記載する。測定データを横軸：側方散乱光(SSC)の強度、縦軸：FITC(Annexin5)強度にて展開した観測像を図1に示す。この図において下部のノイズ由来の集団と分離して得られる蛍光強度の大きい領域を抽出し、この領域をAnnexin5陽性集団として解析対象とした。Annexin5陽性画分においては血漿を直接染色して観測されるものと、前記実施例1で得られた前処理濃縮画分を染色して観測されるものは同様の結果を示した。30

【0052】**B. 血漿から濃縮したマイクロベシクルの免疫蛍光染色**

前記実施例1にてマイクロベシクル画分を濃縮したペレットに対してPBS60μLを添加し、ボルテックスにてマイクロベシクル画分を溶液中に分散させた。この溶液に対し、FITC-Annexin5(Becton Dickinson Biosciences)、Brilliant Violet 510 anti-human CD5(Biolegend)、PerCP anti-human CD15(Biolegend)、APC/Cy7 anti-human CD41(Biolegend)、PE/Cy7 anti-human CD45(Biolegend)、PE anti-human CD59(Biolegend)、Brilliant Violet 421 anti-human CD105(Biolegend)、PE anti-human CD146(Biolegend)、PE/Cy7 anti-human CD235a(Biolegend)、PerCP anti-human CD61(Biolegend)、APC標識mouse IgG(購入したNormal Mouse IgG(Wako社)を、Mix-n-Stain APC Antibody Labeling kit(Biotium社)に添付の定常プロトコールにて標識したもの)を、各々1μL添40

10

20

30

40

50

加し、室温で30分静置した。

【0053】

C. フローサイトメーターでの血漿中マイクロベシクルの観測

測定は、フローサイトメーターとしてBD FACSVersetM (Becton Dickinson and Company)を用いて行った。測定手順とパラメータ設定は次のとおりである。サンプルは前記実施例2Bで各種蛍光染色した画分を750μLの10mmol/L Hepes (pH 7.4)、0.14mol/L NaCl、2.5mmol/L CaCl₂に懸濁したものを使用した。流量 (Flow rate) は12μL/min、前方散乱光の電圧 (Voltage) は381、側方散乱光の電圧は340に設定し、それぞれの閾値 (Threshold) として200に設定した。各蛍光物質に対する励起光 (Ex.) 及び蛍光検出フィルター (Em.) の波長及び電圧は、FITC : Ex. 488nm、Em. 527 / 520nm、電圧442、PE : Ex. 488nm、Em. 586 / 580nm、電圧411、PerCP : Ex. 488nm、Em. 700 / 704nm、電圧556、PE/Cy7 : Ex. 488nm、Em. 783 / 785nm、電圧564.3、APC : Ex. 640nm、Em. 660 / 665nm、電圧538.2、APC/Cy7 : Ex. 640nm、Em. 783 / 785nm、電圧584.8、Brilliant Violet 421 : Ex. 405nm、Em. 448 / 450nm、電圧538.2、Brilliant Violet 510 : Ex. 405nm、Em. 528 / 530nm、電圧540とした。

10

20

20

【0054】

D. 設定した観測域におけるポリスチレンビーズによるサイズ検証測定

前記にて設定したフローサイトメーターのパラメータにおいて、観測域における粒子径を推定するためにサイズが均一なポリスチレンビーズ (SPHEROTM Nano Polystyrene Size Standard Kit, Spherotech) の測定を行った。ポリスチレンビーズのサイズはその粒子径が0.22μm、0.45μm、0.88μm、1.35μmのものを使用した。

30

【0055】

E. フローサイトメーターでのマイクロベシクル測定結果の解釈

測定データを横軸：側方散乱光 (SSC) の強度、縦軸：FITC (Annexin V) 強度にて展開した観測像を図2に示す。この図において下部のノイズ由来の集団と分離して得られる蛍光強度の大きい領域を抽出し、この領域をAnnexin V陽性集団として解析対象とした。また側方散乱光の強度と0.22~1.35μmのポリスチレンビーズのサイズが観測域にて比例関係にあり、特に0.22μmと0.45μmの直径を有するポリスチレンビーズ間にマイクロベシクル画分の中央値が集積するように観測された。

30

【0056】

《実施例3：血液から濃縮したマイクロベシクル画分の電子顕微鏡観測》

A. 血漿中マイクロベシクルの固定化

実施例1においてマイクロベシクル画分を濃縮したペレットに対してPBS100μLを添加し、これに対し固定液 (4%パラフォルムアルデヒド、4%グルタルアルデヒド含有の0.1mol/Lリン酸緩衝液 (pH 7.4)) 100μLを添加し、攪拌後、40にて1時間静置した。

40

【0057】

B. ネガティブ染色法

上記固定化したサンプルをグリッドがコートされたフォルムバールフィルム (formvar film) に吸着させて、2%のリン・タンゲステン酸 (pH 7.0) で30秒間染色した。

【0058】

C. 透過型電子顕微鏡での観測

上記のグリッドを透過型電子顕微鏡 (JEM-1400; JEOL Ltd.) にて観測した。加速電圧 (acceleration voltage) は100kVに設定し

50

た。デジタルイメージ (3296×2472 pixels) は CCD カメラ (EM-14830 RUBY2; JEOL Ltd.) にて取得した。観察画像を図 3 に示す。マイクロベシクルの大きさを有し、膜構造及びその内側に内部構造として含有されるもの（オルガネラ他）を含む微小膜画分が検出された。

【0059】

《実施例 4：ナノ粒子解析システムによる抽出画分の粒子計測》

実施例 1においてマイクロベシクル画分を濃縮したペレットに対して PBS $100\text{ }\mu\text{L}$ を添加し、さらに PBS にて 3 倍希釈したものを Nanosight (Malvern Panalytical 社) にて測定した。装置の観測条件を表 1 に示す。ナノ粒子解析システムによる粒度分布ヒストグラムを図 4 に示す。本濃縮操作にて直径が $1\text{ }\mu\text{m}$ 以上の画分は殆ど含まれず、直径が $600\text{ }\mu\text{m}$ 以下の画分に濃縮され、その粒子径として $200\text{ }\sim 300\text{ nm}$ 程度に均一な集団をメインに含有し、それ以下の粒子径 ($\sim 100\text{ nm}$) を含む画分であることが確認された。

【0060】

【表 1】

Frames Processed	1500 of 1500
Frames per Second	25.00
Calibration	220 nm/pixel
Blur	Auto
Detection Threshold	7 Multi
Min Track Length	Auto
Min Expected Size	Auto
Temperature	22.50°C
Viscosity	0.94 cP

【0061】

《実施例 5：ショットガンプロテオミクス解析による濃縮マイクロベシクル画分において検出された蛋白質》

A. 血液の前処理により得られた濃縮マイクロベシクル画分から蛋白質画分の抽出

実施例 1においてマイクロベシクル画分を濃縮した画分から、特に膜蛋白質を効率よく抽出するために PTS (Phase Transfer Surfactant (相間移動可溶化剤)) を用いた蛋白質可溶化法を実施した。この原理を用いた試薬キットとして MPEX PTS Reagents for MS (GL Science Inc.) を使用した。実施例 1においてマイクロベシクル画分を濃縮したペレットに対して $250\text{ }\mu\text{L}$ の当該キット試薬 B を添加し、超音波ホモジナイザー (Bioruptor: ソニック・バイオ社) にて稼働 1 分 30 秒、インターバル 30 秒からなるサイクルを 10 回、10 の条件でソニケーション (パワー : MAX) した。破碎後、遠心式フィルター (Amicon ultra 3K、メルク) にて $14,000\text{ g} \times 15\text{ min}$ を 2 回繰り返し、濃縮した。この画分を BCA アッセイ (PierceTM BCA Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)) を使用して蛋白質定量した。

【0062】

B. 蛋白質画分の酵素消化

BCA アッセイにて定量し、 $30\text{ }\mu\text{g} / 20\text{ }\mu\text{L}$ の濃度になるように前記試薬 B に溶解したものを膜蛋白質消化のための試料とした。 $1\text{ }\mu\text{L}$ の 100 mmol/L デチオトレイトル (DTT) を加え (ジスルフィド結合の還元開裂のため)、室温で 30 分間インキュベートした。これに $1\text{ }\mu\text{L}$ の 550 mmol/L ヨードアセトアミドを加え (Cys のカルバミドメチル化のため)、遮光して室温で 30 分間インキュベートした。当該キットの試薬 A を $77\text{ }\mu\text{L}$ 加え、 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ のトリプシン (TPCK-Trypsin (The

10

20

30

40

50

rmo Fisher Scientific Inc. : Prod # 20233)) を加えた。室温で一晩インキュベートして蛋白消化を実施した。150 μL の試薬 C と 1.5 μL の試薬 D を加えた。添加後 1 分間ボルテックスをして、25°、15°, 600 × g で 2 分間遠心し二相分離した。不要な可溶化剤は上相にくるので、これをピペットで吸引し除去した。残った試薬 C を除去するために、遠心濃縮を行った後に、50 μL の 5% アセトニトリル、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を加えてボルテックスした。

【0063】

C. ベプチドの脱塩・濃縮

前記にて酵素消化したものを脱塩・濃縮するために GL-Tip SDB (GL Science Inc.) を使用した。当該チップをまず、80% アセトニトリル、0.1% TFA 水溶液を 20 μL 添加し、室温、3,000 × g で 2 分間遠心することでコンディショニングした。これに 5% アセトニトリル、0.1% TFA 水溶液を 20 μL 添加し、室温、3,000 × g で 2 分間遠心することでカラムを平衡化した。これに対して、前記実施例 5B の操作で得られた試料を全量添加し、室温、3,000 × g で 5 分間遠心することでペプチドをカラムに吸着させた。さらに 5% アセトニトリル、0.1% TFA 水溶液を 20 μL 添加し、室温、3,000 × g で 2 分間遠心することでカラムを洗浄後、80% アセトニトリル、0.1% TFA 水溶液を 50 μL 添加し、室温、3,000 × g で 2 分間遠心することで、ペプチドを溶出させた。

【0064】

D. 質量分析測定

上記サンプルを、nano-LC システム (EASY-nLC 1000 : Thermo Fisher Scientific Inc.) を連結したフーリエ変換型 Orbitrap 質量分析計 (Q-Exactive : Thermo Fisher Scientific Inc.) で、LC-MS/MS 解析を行った。上記にて調製した質量分析測定用サンプルから 2 μL を測定に供した。なお、トラップカラムとして Acclaim[®] PepMap 100 (Thermo Fisher Scientific Inc. : C18、充填剤径 3 μm、内径 75 μm、カラム長 2 cm)、分析カラムとして、Acclaim[®] PepMap RSLC (Thermo Fisher Scientific Inc. : C18、充填剤径 2 μm、内径 50 μm、カラム長 15 cm) を用いた。移動相 A は 0.1% 蟻酸水溶液、移動相 B は 0.1% 蟻酸 / アセトニトリル、流量は 200 nL / 分、グラジエントは、0 - 40% 移動相 B / 200 分間、40 - 100% 移動相 B / 10 分間、100% 移動相 B / 10 分間で測定した。

【0065】

MS 測定のスキャン条件は Full MS / dd - MS2 モードを使用し Full MS をスキャンした後に、強度が高いシグナルの MS / MS スペクトルを取得した。設定条件を表 2 に示す。

【0066】

【表2】

General

Polarity	positive
Default charge state	2

Full MS

scan range	350 to 1400m/z
Resolution	70000
AGC target	3E+06
Maximum IT	50ms

10

dd-MS2

Resolution	35000
AGC target	1E+05
Maximum IT	100ms
Loop count	20
TopN	20
Isolation window	4.0m/z
Fixed first mass	100.0m/z
NCE/stepped NCE	32

【0067】

20

E. データ解析

得られたデータは Proteome Discoverer 1.4 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific Inc.) にて、ヒトタンパク質データベース Homo_sapiens_Uniprot_201210.fasta に対して Sequest HT アルゴリズムにより検索を行った。Sequest HT での検索条件を表3に示す。

【0068】

【表3】

Input Data

Protein Database	Homo_sapiens_Uniprot_201210.fasta
Enzyme Name	Trypsin(Full)

30

Tolerances

Precursor Mass Tolerance	10ppm
Fragment Mass Tolerance	0.6Da

Dynamic Modification

N-Terminal Modofication	Carbamidomethyl/+57.021Da
1.Dynamic Modification	Oxidation/+15.995Da(M)
2.Dynamic Modification	Carbamyl/+43.006Da(K,R)

40

Static Modification

1.Static Modification	Carbamidomethyl/+57.021Da (C)
-----------------------	-------------------------------

【0069】

検索結果から Score 1.0 以上のものをピックアップした。抽出したマイクロペシクル画分のショットガンプロテオミクス解析により検出できた蛋白質の一覧を表4に示す。また、ショットガンプロテオミクス解析により検出した蛋白質から metascape (Tripathi et al., Cell Host & Microbe (2015), 18: 723-735) を使用した蛋白質のエンリッチメント解析結果を図5に、そのエンリッチメント解析結果をクラスター毎にネットワーク解析した結果を図6に、それぞれ、示す。表4に示す蛋白質は細胞膜や細胞内にカテゴライズされるものが多く、血液凝固や免疫応答、各種シグナル伝達としての機能を

50

有すものが含まれ(図5、図6)、これら検出された蛋白質はマイクロベシクルをキャラクタライズする表面マーカーとして、またその内容物をバイオマーカー利用として、臨床検査や診断に使用できる可能性がある。

【0070】

【表4-1】

アクセシション	蛋白質の名称
075636	Ficolin-3
AOA087X2C0	Ig mu chain C region
Q86TT1	Full-length cDNA clone CS0DD006YL02 of Neuroblastoma
Q6PIL8	IGK protein
AOA087X130	Ig kappa chain C region
AOA075B6H6	Ig kappa chain C region (Fragment)
S6BGE9	IgG L chain
U6A216	Mutant hemoglobin alpha 1 globin chain (Fragment)
AOA087WV47	Ig gamma-1 chain C region OS=Homo sapiens GN=IGHG1 PE=1 SV=1 - [AOA087WV47_HUMAN]
Q6GMX6	IGH protein
Q6MZQ6	Putative uncharacterized protein DKFZp686G11190
Q8WVW5	Putative uncharacterized protein (Fragment)
S6BGE0	IgG H chain
Q96K68	cDNA FLJ14473 fis, clone MAMMA1001080
S6B2A6	IgG H chain
Q8NCL6	cDNA FLJ90170 fis, clone MAMMA1000370, highly similar to Ig alpha-1 chain C region
Q6ZW64	cDNA FLJ41552 fis, clone COLON2004478, highly similar to Protein Troy alpha1 H, myeloma
P02768	Serum albumin
P68871	Hemoglobin subunit beta
AOA087WXL8	Ig gamma-3 chain C region
A2NUT2	Lambda-chain (AA -20 to 215)
Q9NPP6	Immunoglobulin heavy chain variant (Fragment)
Q8NEJ1	Uncharacterized protein
S6BGD6	IgG L chain
Q7Z2U7	Uncharacterized protein
AOA075B6N7	Ig alpha-2 chain C region (Fragment)
Q9Y490	Talin-1
Q9UK54	Hemoglobin beta subunit variant (Fragment)
S6BAR0	IgG L chain
P21333	Filamin-A
AOA087WYR4	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5
P02549	Spectrin alpha chain, erythrocytic 1
P35579	Myosin-9
P48740	Mannan-binding lectin serine protease 1
G4V2I8	Anion exchange protein
Q6J1Z7	Hemoglobin beta (Fragment)
Q5FWF9	IGL protein
Q562R1	Beta-actin-like protein 2
Q6N093	Putative uncharacterized protein DKFZp686I04196 (Fragment)
P02042	Hemoglobin subunit delta
B4DUI8	cDNA FLJ52761, highly similar to Actin, aortic smooth muscle
P01591	Immunoglobulin J chain
P11277	Spectrin beta chain, erythrocytic

10

20

30

40

【表4-2】

S6C4R7	IgG L chain
P02747	Complement C1q subcomponent subunit C
P16157	Ankyrin-1
043866	CD5 antigen-like
P01861	Ig gamma-4 chain C region
Q9HCC1	Single chain Fv (Fragment)
P08514	Integrin alpha-IIb
A2KBC6	Anti-FactorVIII scFv (Fragment)
D6R934	Complement C1q subcomponent subunit B
000187	Mannan-binding lectin serine protease 2
B7Z410	cDNA FLJ50791, highly similar to Nitrilase homolog 1 (EC 3.5.-.-)
A0A024R2I4	Chromosome 3 open reading frame 20, isoform CRA_a
P01779	Ig heavy chain V-III region TUR
P26038	Moesin
P02671	Fibrinogen alpha chain
Q5T123	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein 3
A0A024QZN4	Vinculin, isoform CRA_c
Q52LR7	Enhancer of polycomb homolog 2
A7E2D6	NAV2 protein
Q9C0G6	Dynein heavy chain 6, axonemal
D6RGG3	Collagen alpha-1(XII) chain
A0A087WWU8	Tropomyosin alpha-3 chain
B2RDE1	cDNA, FLJ96568, highly similar to Homo sapiens tropomyosin 3 (TPM3), mRNA
P02787	Serotransferrin
P02675	Fibrinogen beta chain
A2MYE1	A30 (Fragment)
P67936	Tropomyosin alpha-4 chain
P00739	Haptoglobin-related protein
P01625	Ig kappa chain V-IV region Len
A0A087WW89	Protein IGHV3-72
B4DIU7	cDNA FLJ60574, highly similar to Dyslexia susceptibility 1 candidate gene 1protein
B2RCL8	cDNA, FLJ96151, highly similar to Homo sapiens aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like(ARNTL), mRNA
P02745	Complement C1q subcomponent subunit A
Q4VB86	EPB41 protein
P08519	Apolipoprotein(a)
A0A087WTM7	Apolipoprotein B-100
Q15485	Ficolin-2
Q96JD0	Amyloid lambda 6 light chain variable region SAR (Fragment)
E7ER44	Lactotransferrin
Q5JW98	Protein FAM26D
P01024	Complement C3
Q6MZL2	Putative uncharacterized protein DKFZp686M0562 (Fragment)
B4DLZ1	cDNA FLJ56574, highly similar to GEM-interacting protein
P10909	Clusterin
B1AJS0	Protein-tyrosine-phosphatase

10

20

30

40

【表4-3】

P01623	Ig kappa chain V-III region WOL
P14618	Pyruvate kinase PKM
P27105	Erythrocyte band 7 integral membrane protein
H7C1Q1	Uncharacterized protein (Fragment)
P32119	Peroxiredoxin-2
L7UUZ7	Integrin beta
B7Z6Z4	Myosin light polypeptide 6
B4E1B2	cDNA FLJ53691, highly similar to Serotransferrin
P35527	Keratin, type I cytoskeletal 9
P00915	Carbonic anhydrase 1
P07437	Tubulin beta chain
L8E853	von Willebrand factor
H6VRF8	Keratin 1
014514	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1
P01023	Alpha-2-macroglobulin
D3DU05	Tousled-like kinase 2, isoform CRA_a
P63104	14-3-3 protein zeta/delta
Q92574	Hamartin
Q5NV90	V2-17 protein (Fragment)
B3KVN0	cDNA FLJ16785 fis, clone NT2RI2015342, highly similar to Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1
P00738	Haptoglobin
P12814	Alpha-actinin-1
AOA0AOMT01	Gelsolin
F5H7S3	Tropomyosin alpha-1 chain
B4DTE1	cDNA FLJ54879, highly similar to Homo sapiens AT rich interactive domain 5A (MRF1-like) (ARID5A), transcript variant 1, mRNA
P68371	Tubulin beta-4B chain
000510	Putative uncharacterized protein
B3KPS3	cDNA FLJ32131 fis, clone PEBLM2000267, highly similar to Tubulin alpha-ubiquitous chain
Q9BQV1	Putative uncharacterized protein
E9PK25	Cofilin-1
D3DPU2	Adenylyl cyclase-associated protein
P59665	Neutrophil defensin 1
P07737	Profilin-1
Q86UX7	Fermitin family homolog 3
Q9H4B7	Tubulin beta-1 chain
060890	Oligophrenin-1
A0N5G5	Rheumatoid factor D5 light chain (Fragment)
P01622	Ig kappa chain V-III region Ti
B0I1T2	Unconventional myosin-Ig
P02647	Apolipoprotein A-I
AOA0AOMTQ6	Protein IGKV2D-28
P16452	Erythrocyte membrane protein band 4.2
P68366	Tubulin alpha-4A chain
P31146	Coronin-1A
P04206	Ig kappa chain V-III region GOL

10

20

30

40

【表4-4】

P13645	Keratin, type I cytoskeletal 10
Q53EL3	Non-specific protein-tyrosine kinase (Fragment)
E5RH38	Meckelin
Q9UL85	Myosin-reactive immunoglobulin kappa chain variable region (Fragment)
Q9UL90	Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment)
B4DNT5	cDNA FLJ60316, highly similar to Apolipoprotein-L1
C9JEU5	Fibrinogen gamma chain
Q13201	Multimerin-1
AOA024R9Q1	Thrombospondin 1, isoform CRA_a
P04004	Vitronectin
P01593	Ig kappa chain V-I region AG
P02452	Collagen alpha-1(I) chain
P61224	Ras-related protein Rap-1b
Q15942	Zyxin
P01606	Ig kappa chain V-I region OU
Q04826	HLA class I histocompatibility antigen, B-40 alpha chain
C5IYE8	MHC class I antigen
F8W6G5	Aprataxin (Fragment)
G3V5X4	Nesprin-2
B2R6J2	cDNA, FLJ92973, highly similar to Homo sapiens villin 2 (ezrin) (VI L2), mRNA
P29322	Ephrin type-A receptor 8
P35241	Radixin
POCOL4	Complement C4-A
X6R433	Protein-tyrosine-phosphatase
B4DIB7	cDNA FLJ50965, highly similar to Beta-neoendorphin-dynorphin
Q14724	Beta-spectrin (Fragment)
B7ZLE5	FN1 protein
B3KP68	cDNA FLJ31264 fis, clone KIDNE2006014, highly similar to Homo sapiens selective LIM binding factor, rat homolog (SLB), mRNA
J9ZVQ3	Apolipoprotein E (Fragment)
Q86SR2	AZU1 protein (Fragment)
P04075	Fructose-bisphosphate aldolase A
P01763	Ig heavy chain V-III region WEA
AOA0C4DH31	Protein IGHV1-18 (Fragment)
Q6PIF6	Unconventional myosin-VIIb
A4VCI9	PML protein (Fragment)
Q00151	PDZ and LIM domain protein 1
Q9UQ53	Alpha-1, 3-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-acetylglucosaminyltransferase B
Q29644	HLA-B protein
Q7Z3Y5	Rearranged VKA17 V gene segment (Fragment)
A4FU77	SNRNP200 protein (Fragment)
Q14315	Filamin-C
P02656	Apolipoprotein C-III
Q9HC10	Otoferlin

10

20

30

40

【表4-5】

A2MYC8	V5-2 protein (Fragment)
P00488	Coagulation factor XIII A chain
Q9UL88	Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment)
P60953	Cell division control protein 42 homolog
K7EJA5	Cysteine protease ATG4D (Fragment)
Q0QEN7	ATP synthase subunit beta (Fragment)
B7Z8Y6	cDNA FLJ58394, highly similar to Platelet endothelial cell adhesion molecule
B4DM82	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
P35908	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal
P37802	Transgelin-2
A0A0B4J1X5	Protein IGHV3-74 (Fragment)
A0A087WV90	Dystrophin
Q8WWZ8	Oncoprotein-induced transcript 3 protein
A0AOA0MRF6	A-kinase anchor protein 9
P01714	Ig lambda chain V-III region SH
A0A087WTU9	Alstrom syndrome protein 1
P06727	Apolipoprotein A-IV
Q6ZVA0	cDNA FLJ42842 fis, clone BRCOC2007034
P05164	Myeloperoxidase
Q14993	Collagen alpha-1(XIX) chain
P04899	Guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2
I6L894	Ankyrin-2
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein
F5H3P3	Rho GDP-dissociation inhibitor 2 (Fragment)
P00918	Carbonic anhydrase 2
D3JV43	C-X-C motif chemokine (Fragment)
P04040	Catalase
Q53HF2	Heat shock 70kDa protein 8 isoform 2 variant (Fragment)
B2R6K4	cDNA, FLJ92996, highly similar to Homo sapiens guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1 (GNB1), mRNA
Q8TCF0	LBP protein
Q9Y509	VH3 protein (Fragment)
D9IWP9	Beta-2-glycoprotein I (Fragment)
095810	Serum deprivation-response protein
B1N7B6	Cryocrystalglobulin CC1 heavy chain variable region (Fragment)
Q96SZ4	Zinc finger and SCAN domain-containing protein 10
075083	WD repeat-containing protein 1
095470	Sphingosine-1-phosphate lyase 1
Q53HQ0	Flotillin 1 variant (Fragment)
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial
043707	Alpha-actinin-4
E9PI60	Bromodomain and PHD finger-containing protein 3
B4DPP8	cDNA FLJ53075, highly similar to Kininogen-1
H0Y360	AMP deaminase 2 (Fragment)
P48059	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1
I3L100	Neuralized-like protein 4 (Fragment)

10

20

30

40

【表4-6】

I3L1T8	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (Fragment)
P01767	Ig heavy chain V-III region BUT
A0A024R8V1	SEC14-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>), isoform CRA_a
U5U7S7	Dyskeratosis congenita 1 isoform 5
Q0VDD8	Dynein heavy chain 14, axonemal
HOY4R5	Transmembrane protein 201 (Fragment)
Q7Z5J4	Retinoic acid-induced protein 1
Q6ZMI3	Gliomedin
P61160	Actin-related protein 2
Q9Y4D8	Probable E3 ubiquitin-protein ligase HECTD4
Q5NV89	V1-7 protein (Fragment)
B4DL87	cDNA FLJ52243, highly similar to Heat-shock protein beta-1
B4E396	cDNA FLJ59612, highly similar to Lactadherin
075445	Usherin
B4E3S0	Coronin
P01833	Polymeric immunoglobulin receptor
P50552	Vasodilator-stimulated phosphoprotein
A8K4G3	Non-specific protein-tyrosine kinase
Q9Y2H5	Pleckstrin homology domain-containing family A member 6
Q8TDW7	Protocadherin Fat 3
D1MER8	Truncated glycoprotein IX (Platelet)
Q08AE9	ACAD11 protein
B7ZM17	PRAMEF1 protein
B5BU24	14-3-3 protein beta/alpha
A8K3Q7	Annixin
D3DRP5	Chromosome 9 open reading frame 19, isoform CRA_a (Fragment)
A2J1N5	Rheumatoid factor RF-ET6 (Fragment)
A0A068LKQ0	Ig heavy chain variable region (Fragment)
Q04917	14-3-3 protein eta
E7EUT5	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
P02766	Transthyretin
Q5NV81	V1-16 protein (Fragment)
A0AOAOOMSI0	Peroxiredoxin-1 (Fragment)
Q5NV91	V2-19 protein (Fragment)
B2DFH5	MHC class I antigen (Fragment)
P20702	Integrin alpha-X
P08567	Pleckstrin
P07195	L-lactate dehydrogenase B chain
D9IX65	Platelet glycoprotein IV variant
A2IPI5	HRV Fab 026-VL (Fragment)
A2J422	Anti-HER3 scFv (Fragment)
P19105	Myosin regulatory light chain 12A
Q5NV64	V2-11 protein (Fragment)
B1AH77	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
B4E3I0	cDNA FLJ55017, highly similar to Caldesmon
Q5T985	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2
P30101	Protein disulfide-isomerase A3

10

20

30

40

【表4-7】

P80419	Ig heavy chain V-III region GAR
Q9UJU6	Drebrin-like protein
Q9BWP8	Collectin-11
F6S2S5	LIM and SH3 domain protein 1
C9JIS1	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-2 (Fragment)
B2R6A3	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF
Q08495	Dematin
Q00610	Clathrin heavy chain 1
A2NXP9	K light chain variable region (Fragment)
P08779	Keratin, type I cytoskeletal 16
A8K9K1	Calcium-transporting ATPase
P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1
Q96SB0	Anti-streptococcal/anti-myosin immunoglobulin lambda light chain variable region (Fragment)
AOAOC4DH32	Protein IGHV3-20 (Fragment)
AOAA0AOMS11	Protein IGHV3-13 (Fragment)
Q04756	Hepatocyte growth factor activator
A2J1M2	Rheumatoid factor RF-IP9 (Fragment)
P13639	Elongation factor 2
Q68D26	Putative uncharacterized protein DKFZp686P06199
B2MUD5	Neutrophil elastase (Fragment)
Q9NR12	PDZ and LIM domain protein 7
AOAOC4DH36	Protein IGHV3-38 (Fragment)
F5GZS6	4F2 cell-surface antigen heavy chain
Q5NV92	V5-6 protein (Fragment)
AOA0B4J1V4	Protein IGHV1-46 (Fragment)
Q9UDR5	Alpha-amino adipic semialdehyde synthase, mitochondrial
B2R5J8	C-C motif chemokine
AOA0B4J1X8	Protein IGHV3-43 (Fragment)
AOA024R3H2	Sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats-containing, isoform CRA_b
P13224	Platelet glycoprotein Ib beta chain
AOA087X188	Bridging integrator 2
Q9BVT0	ARHA protein (Fragment)
Q15599	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF2
P02774	Vitamin D-binding protein
Q8WW3D	HCG1980063 (Fragment)
A8KOT9	cDNA FLJ75422, highly similar to Homo sapiens capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 1, mRNA
Q53G71	Calreticulin variant (Fragment)
Q68DX3	FERM and PDZ domain-containing protein 2
Q96JV1	cDNA FLJ14959 fis, clone PLACE4000156, moderately similar to ZINC FINGER PROTEIN 91
D6RAM3	Docking protein 3
B3KSQ7	Drebrin 1, isoform CRA_d
AOA087WTW5	CASP8-associated protein 2
AOA024R9T5	HCG20693, isoform CRA_a

10

20

30

40

【表4-8】

P16070	CD44 antigen
A2N2X1	VL1 protein (Fragment)
A1L441	G protein-coupled receptor 128
Q9H9B1	Histone-lysine N-methyltransferase EHMT1
Q59GH7	Structure specific recognition protein 1 variant (Fragment)
Q8WXX0	Dynein heavy chain 7, axonemal
Q0II16	Transglutaminase 5
AOA087WWS7	Syntaxin-binding protein 2
J3QKY4	Proline-rich protein 11 (Fragment)
P62258	14-3-3 protein epsilon
F6S8N6	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase
AOA087X1I7	PRAME family member 7
Q5THJ4	Vacuolar protein sorting-associated protein 13D
P33261	Cytochrome P450 2C19
095714	E3 ubiquitin-protein ligase HERC2
AOA087WX18	HLA class II histocompatibility antigen, DRB1-16 beta chain
P05556	Integrin beta-1
Q8IZX4	Transcription initiation factor TFIID subunit 1-like
P61626	Lysozyme C
P00338	L-lactate dehydrogenase A chain
A2NB44	Cold agglutinin FS-2 H-chain (Fragment)
AOA087X0P6	Protein IGKV2D-29
B7Z4R3	cDNA FLJ50585, highly similar to T-complex protein 1 subunit beta
E9PNW4	CD59 glycoprotein
Q99650	Oncostatin-M-specific receptor subunit beta
A2A312	Forkhead box protein P4 (Fragment)
Q12756	Kinesin-like protein KIF1A
Q8N343	Putative uncharacterized protein (Fragment)
B4E1B0	cDNA FLJ54318, highly similar to Complement C1r subcomponent (EC 3.4.21.41)
D6W5K2	Thymosin, beta 10, isoform CRA_a (Fragment)
P05090	Apolipoprotein D
B3KUX5	cDNA FLJ40857 fis, clone TRACH2016722, weakly similar to Homo sapiens lipoxygenase homology domains 1 (LOXHD1), mRNA
Q9NTC4	Putative uncharacterized protein DKFZp434K0126 (Fragment)
J3QQX2	Rho GDP-dissociation inhibitor 1
HOYD14	Myoferlin (Fragment)
AOA0C4DH25	Protein IGKV3D-20 (Fragment)
B2RU35	Tensin 1
E9PG32	Dynein heavy chain 12, axonemal
094915	Protein furry homolog-like
P06733	Alpha-enolase
AOA087X1X7	Elongation factor 1-delta
HOYKS4	Annexin (Fragment)
B4DUI5	Triosephosphate isomerase
AOA024R872	Chromosome 9 open reading frame 88, isoform CRA_a
Q0P5N8	TMSB4X protein (Fragment)

10

20

30

40

【表4-9】

P13796	Plastin-2
Q8WW51	ZNF605 protein (Fragment)
Q96G01	Protein bicaudal D homolog 1
Q14644	Ras GTPase-activating protein 3
Q8TC12	Retinol dehydrogenase 11
P08311	Cathepsin G
P61158	Actin-related protein 3
B7Z1C9	Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (Eta), isoform CRA_a
P11021	78 kDa glucose-regulated protein
E9PKF5	Nucleolar protein 14
Q6ZSJ9	Protein shisa-6 homolog
H7BYH4	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
I6NLS4	Phosphodiesterase 5A
P10606	Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial
Q17RW2	Collagen alpha-1(XXIV) chain
B2R7F8	cDNA FLJ93426, highly similar to Homo sapiens plasminogen (PLG), mRNA
P08758	Annexin A5
A0A024R968	Calcium-transporting ATPase
P12931	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
B4DL07	cDNA FLJ53353, highly similar to ATP-binding cassette sub-family D member 3
P62987	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40
Q96RS2	40S ribosomal protein SA
H7BXY5	Nexilin (Fragment)
Q53RR5	Putative uncharacterized protein YWHAQ (Fragment)
P51572	B-cell receptor-associated protein 31
095478	Ribosome biogenesis protein NSA2 homolog
E9PK21	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E
P30273	High affinity immunoglobulin epsilon receptor subunit gamma
P23229	Integrin alpha-6
P22105	Tenascin-X
A0A087X1X5	Calponin (Fragment)
K7ELW0	Protein deglycase DJ-1
Q16666	Gamma-interferon-inducible protein 16
A2J1N8	Rheumatoid factor RF-ET11 (Fragment)
B4DEA6	cDNA FLJ56566, highly similar to Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein A
B3GQS7	Mitochondrial heat shock 60kD protein 1 variant 1
015397	Importin-8
A0A0A0MQZ2	Ras/Rap GTPase-activating protein SynGAP (Fragment)
P22692	Insulin-like growth factor-binding protein 4
A0A024R984	HCG40889, isoform CRA_a
D3DQQ7	Low density lipoprotein receptor-related protein 4, isoform CRA_a
H3BMH2	Ras-related protein Rab-11A (Fragment)
H7BZJ3	Protein disulfide-isomerase A3 (Fragment)
Q15555	Microtubule-associated protein RP/EB family member 2
B7Z2R7	Acyl-CoA-binding domain-containing protein 5

10

20

30

40

【表4-10】

AOA024QZV0	HCG1811539, isoform CRA_b
Q5TEZ5	Uncharacterized protein C6orf163
Q13418	Integrin-linked protein kinase
Q13120	Cytochrome P450
AOA0C4DH38	Protein IGHV5-51 (Fragment)
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2
D6REX5	Selenoprotein P (Fragment)
B2RCG5	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming]
Q15084	Protein disulfide-isomerase A6
P06311	Ig kappa chain V-III region IARC/BL41
Q9UEY4	Anion exchange protein
P10645	Chromogranin-A
AOA087WVU3	Homeobox protein Nkx-2.3
Q9P1Y5	Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3
Q8TDB8	Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 14
B2R876	P2X purinoceptor
Q9NRC6	Spectrin beta chain, non-erythrocytic 5
Q15365	Poly(rC)-binding protein 1
C7DJS1	Glutathione S-transferase pi (Fragment)
B7Z4B2	cDNA FLJ56108, highly similar to Puromycin-sensitive aminopeptidase (EC 3.4.11.-)
Q59F73	Beta adrenergic receptor kinase 1 variant (Fragment)
P80723	Brain acid soluble protein 1
Q9Y2A7	Nck-associated protein 1
A6ND36	Protein FAM83G
Q15286	Ras-related protein Rab-35
AOA024R7H7	B-cell novel protein 1, isoform CRA_b
B2R983	cDNA, FLJ94267, highly similar to Homo sapiens glutathione S-transferase omega 1 (GSTO1), mRNA
075558	Syntaxin-11
Q92738	USP6 N-terminal-like protein
A8K806	cDNA FLJ77705
L8E7T7	Alternative protein SUPT5H
P02790	Hemopexin
B4E0R1	Integrin beta
D6RFL4	Monocyte differentiation antigen CD14 (Fragment)
B4DLV7	cDNA FLJ60299, highly similar to Rab GDP dissociation inhibitor beta a
Q53GF9	Full-length cDNA 5-PRIME end of clone CS0DF013YM24 of Fetal brain of Homo sapiens (Human) variant (Fragment)
P04921	Glycophorin-C
P62993	Growth factor receptor-bound protein 2
B4DHP5	cDNA FLJ51847, highly similar to Heat shock 70 kDa protein 6
M0R2W8	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (Fragment)
B1AKG0	Complement factor H-related protein 1
B1ARL5	Uncharacterized protein CXorf22
B4DE80	cDNA FLJ52255, highly similar to Angiotensinogen
B4DZZ0	cDNA FLJ52128, highly similar to PRA1 family protein 3

10

20

30

40

【表4-11】

H3BT58	Coactosin-like protein
K9JIK7	Glycophorin A
060361	Putative nucleoside diphosphate kinase
B7Z7K8	cDNA FLJ51143, highly similar to Melanoma antigen preferentially expressed in tumors
A8MUD9	60S ribosomal protein L7
Q9P1G4	PRO1837
P81605	Dermcidin
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin
P24844	Myosin regulatory light polypeptide 9
K7EQ00	Katanin p60 ATPase-containing subunit A-like 2
B3KWNO	cDNA FLJ43389 fis, clone OCBBF2007068, highly similar to Ankyrin repeat domain-containing protein 52
P24387	Corticotropin-releasing factor-binding protein
D6RA82	Annexin
P05109	Protein S100-A8
B4DWD1	cDNA FLJ60919, highly similar to Cytochrome b-245 heavy chain
Q5T9A4	ATPase family AAA domain-containing protein 3B
P08637	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A
A2J1M8	Rheumatoid factor RF-IP12 (Fragment)
HOY7H8	AT-rich interactive domain-containing protein 1B (Fragment)
B4DKQ6	cDNA FLJ54269, highly similar to Docking protein 2 (Downstream of tyrosine kinase 2)
Q9UL89	Myosin-reactive immunoglobulin heavy chain variable region (Fragment)
B4DH37	cDNA FLJ53760, highly similar to Syntaxin-7
P05198	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1
Q6FG43	FLOT2 protein
HOYL11	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial
A0A024R035	Complement component 9, isoform CRA_a
B4DI05	Zinc finger protein 263
B4DE30	cDNA FLJ51711, highly similar to T-complex protein 1 subunit epsilon
HOYKU1	Tropomodulin-3 (Fragment)
P60983	Glia maturation factor beta
A0A024R9R8	Synaptosomal-associated protein, 23kDa, isoform CRA_b
Q9HBD1	Roquin-2
P84095	Rho-related GTP-binding protein RhoG
B7Z7V0	cDNA FLJ52524, moderately similar to Matrix metalloproteinase-9 (EC 3.4.24.35)
H3BS34	72 kDa type IV collagenase (Fragment)
E9PNR6	Rho GTPase-activating protein 1 (Fragment)
A0A0A0MT36	Protein IGKV6D-21 (Fragment)
B4DI70	cDNA FLJ53509, highly similar to Galectin-3-binding protein
B3KMB8	cDNA FLJ10654 fis, clone NT2RP2005901, highly similar to FAST kinase domains-containing protein 2
B3KP79	cDNA FLJ31323 fis, clone LIVER2000037, highly similar to Alpha-1B-glycoprotein

10

20

30

40

【表4-12】

P40925	Malate dehydrogenase, cytoplasmic
C9JL85	Myotrophin
Q09472	Histone acetyltransferase p300
A0N7G9	Vcon-JH5b protein (Fragment)
Q6ZUX3	Protein FAM179A
A0A0A0MSR2	Alpha-adducin
H7C5R1	Ceruloplasmin (Fragment)
P19827	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1
P08842	Steryl-sulfatase
Q68DR3	Putative uncharacterized protein DKFZp779H1622 (Fragment)
B1AM21	Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha (Fragment)
B1AHF3	NADH-cytochrome b5 reductase 3 (Fragment)
B4DPS6	cDNA FLJ59371, highly similar to Exportin-2
P52655	Transcription initiation factor IIA subunit 1
P82650	28S ribosomal protein S22, mitochondrial
Q96M91	Cilia- and flagella-associated protein 53
B4DFR8	cDNA FLJ57967, highly similar to ATP-binding cassette sub-family B member 9
Q8ND04	Protein SMG8
Q5CAQ5	Tumor rejection antigen (Gp96) 1
B4DZ97	cDNA FLJ60985
P04209	Ig lambda chain V-II region NIG-84
P59091	Putative uncharacterized protein encoded by LINC00315
J3KR73	Ras-related protein Rab-6B (Fragment)
Q6FIG4	RAB1B protein
A8K2L4	cDNA FLJ76079, highly similar to Homo sapiens lymphocyte-specific protein 1 (LSP1), mRNA
P61956	Small ubiquitin-related modifier 2
Q5SQ64	Lymphocyte antigen 6 complex locus protein G6f
Q6NXR0	Interferon-inducible GTPase 5
H3BR35	Eukaryotic peptide chain release factor GTP-binding subunit ERF3A (Fragment)
Q6RJW0	Alpha-1,4-galactosyltransferase
B0AZS5	Kinesin-like protein
P49913	Cathelicidin antimicrobial peptide
P46020	Phosphorylase b kinase regulatory subunit alpha, skeletal muscle isoform
B4DPP0	cDNA FLJ51032, highly similar to CD9 antigen
P30043	Flavin reductase (NADPH)
H0UI27	HCG33447, isoform CRA_a
K7EMN2	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating (Fragment)
P12724	Eosinophil cationic protein
P16150	Leukosialin
Q5T011	Protein SZT2
B4E3A8	cDNA FLJ53963, highly similar to Leukocyte elastase inhibitor
B4E022	cDNA FLJ56274, highly similar to Transketolase (EC 2.2.1.1)
Q8IZZ8	Antithrombin (Fragment)

10

20

30

40

【表4-13】

AOA0D9SF00	MADS box transcription enhancer factor 2, polypeptide C (Myocyte enhancer factor 2C), isoform CRA_e
B4DTD7	Protein-tyrosine-phosphatase
Q71SA9	GCDRP
C9JQB3	Ras-related protein Ral-B (Fragment)
AOA087WSV0	Bcl-2-like protein 12
095396	Adenylyltransferase and sulfurtransferase MOCS3
AOA0D9SFZ9	Four and a half LIM domains protein 1 (Fragment)
Q16181	Septin-7
D6RIU4	Vesicular integral-membrane protein VIP36 (Fragment)
B3KUR3	cDNA FLJ40459 fis, clone TESTI2041800, highly similar to BISPHOSPHO GLYCERATE MUTASE (EC 5.4.2.4)
B4DT46	cDNA FLJ57889, highly similar to Cytochrome b-245 light chain
Q9C0I3	Serine-rich coiled-coil domain-containing protein 1
J3KQC6	Transmembrane protease serine 13
B7ZBK6	Delta-aminolevulinic acid dehydratase (Fragment)
H7BXT0	Vitamin K-dependent protein S (Fragment)
Q5NV79	V5-4 protein (Fragment)
HOY4U4	Glycodeulin (Fragment)
E0D851	Platelet glycoprotein Ib alpha
AOA068LKQ8	Ig heavy chain variable region (Fragment)
AOA096LPE2	Protein SAA2-SAA4
Q5VYK3	Proteasome-associated protein ECM29 homolog
075368	SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein
C9JDQ8	EH domain-containing protein 1 (Fragment)
C9J9W2	LIM and SH3 domain protein 1 (Fragment)
A2J1N6	Rheumatoid factor RF-ET9 (Fragment)
B4DM22	cDNA FLJ53357, highly similar to 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 2
G1EP27	MHC class I antigen (Fragment)
AOA075DL39	Major duffy antigen receptor for chemokine glycoprotein beta isoform
094919	Endonuclease domain-containing 1 protein
D6RCK3	MOB kinase activator 1B (Fragment)
B4DLN6	cDNA FLJ59033, highly similar to Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)
A8K6P8	Cell cycle related kinase, isoform CRA_e
B3KRY1	Zinc finger, DHHC-type containing 14, isoform CRA_f
B3KRY3	cDNA FLJ35079 fis, clone PLACE6005283, highly similar to Lysosome-associated membrane glycoprotein 1
Q99592	Zinc finger and BTB domain-containing protein 18
Q5JSD2	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (Fragment)
B5MD45	Vitrin
AOA087X0S5	Collagen alpha-1(VI) chain
Q5SZL2	Centrosomal protein of 85 kDa-like
G9I2K8	MHC Class I antigen (Fragment)
G3V3F7	X-linked retinitis pigmentosa GTPase regulator-interacting protein 1

10

20

30

40

【表4-14】

V9GYJ8	Apolipoprotein C-II
B4DMJ7	HCG2015269, isoform CRA_c
Q05CV3	C8B protein (Fragment)
Q9UL86	Myosin-reactive immunoglobulin kappa chain variable region (Fragment)
H0YAJ1	Solute carrier family 23 member 1 (Fragment)
H6V744	Glucocorticoid receptor
P01603	Ig kappa chain V-I region Ka
Q59H55	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 13 isoform 2 variant (Fragment)
M0QZL6	Cytokine receptor-like factor 1 (Fragment)
P01612	Ig kappa chain V-I region Mev
B7ZKQ2	CLEC4G protein
H7C1V0	Cathepsin D (Fragment)
Q8WWF3	Serine-rich single-pass membrane protein 1
A0A087X0P0	Kinesin-like protein
094804	Serine/threonine-protein kinase 10
Q5QJV5	DNA polymerase lamda2
094806	Serine/threonine-protein kinase D3
P09382	Galectin-1
E9PJN1	Ribosomal protein S6 kinase
E7EQT3	Anion exchange protein (Fragment)
Q14028	Cyclic nucleotide-gated cation channel beta-1
B4DVP1	cDNA FLJ59444, highly similar to Thromboxane-A synthase (EC 5.3.99.5)
A9UJP8	Tetratricopeptide repeat protein 38 (Fragment)
P22792	Carboxypeptidase N subunit 2
J3KP75	Phosphatase and actin regulator
P28066	Proteasome subunit alpha type-5
Q9BXCO	Hydroxycarboxylic acid receptor 1
P46937	Transcriptional coactivator YAP1
Q14674	Separin
B4E1D8	cDNA FLJ51597, highly similar to C4b-binding protein alpha chain
B2RAQ8	cDNA, FLJ95058, highly similar to Homo sapiens carnitine palmitoyltransferase 1A (liver) (CPT1A), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA
H0YFC6	GTP-binding nuclear protein Ran (Fragment)
A6NES4	Maestro heat-like repeat-containing protein family member 2A
Q8N5G2	Macoilin
A0A087WUV8	Basigin
Q6ZML5	FLJ00268 protein (Fragment)
K7ERI9	Apolipoprotein C-I (Fragment)
A8KOT6	cDNA FLJ76736, highly similar to Homo sapiens sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II) (SMPD3), mRNA
Q2Q9B7	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (Fragment)
Q8N4H5	Mitochondrial import receptor subunit TOM5 homolog

10

20

30

40

【表4-15】

AOA024R6I7	Serpin peptidase inhibitor, clade A (Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1, isoform CRA_a
B3KXX5	Structural maintenance of chromosomes protein
Q15405	TOX high mobility group box family member 3
Q2TBE0	CWF19-like protein 2
E9PLZ6	Tetraspanin (Fragment)
F8WCZ6	Complement C1s subcomponent
Q86WU2	Probable D-lactate dehydrogenase, mitochondrial
AOA024R752	Forkhead box P2, isoform CRA_f
Q8NEW0	Zinc transporter 7
Q96A08	Histone H2B type 1-A
B2R6F5	Protein XRP2
B3KX11	T-complex protein 1 subunit gamma

10

【0071】

《実施例6：フローサイトメーターを用いた血漿マイクロベシクルのキャラクタライゼーション》

A. パルス処理による凝集マイクロベシクルのゲートアウト（観測像からの除外）

実施例1においてマイクロベシクル画分を濃縮した画分を各表面抗原で染色し、実施例2のフローサイトメーターの観測条件にて測定した。このとき、観測像の中にはマイクロベシクルが凝集して複数個合体したような像が観測された（各種染色した表面抗原が全て陽性集団となるような集団）。これを観測像から除去するために、側方散乱光におけるパルス幅（縦軸）とパルスエリア（横軸）で展開した観察像（図7）と前方散乱光（横軸）と側方散乱光（縦軸）の面積で展開した観察像（図8）を用意して、それぞれから大きく外れた集団を観測像から除外した。

20

【0072】

B. IgG捕捉画分のゲートアウト（観測像からの除外）

前記実施例6Aの操作後に、側方散乱光（横軸）とAPC標識マウスIgG（縦軸）の展開図（図9）からAPC陽性集団すなわちIgGを捕捉する集団を抽出し、観測像から除外すると共に、APC陰性となる集団を以下のキャラクタライゼーションの対象とした。マイクロベシクルキャラクタライゼーションに使用した（または使用可能な）表面抗原の各種細胞での発現パターンを表5に示す。

30

【0073】

【表5】

CD	T Cell	B Cell	Dendritic Cell	NK Cell	Stem Cell/Pre cursor	Macrophage/Monocyte	Granulocyte	Platelet	Erythrocyte	Endothelial Cell	Epithelial Cell
CD5	○	○		X		X	X	X	X		
CD15	X	X		X	○	○	○	X	X	X	
CD41	X	X	X	X	○	X	X	○	X	X	X
CD45	○	○	○	○	○	○	○	X	X	X	X
CD59	○			○		○	○		○		
CD61						○		○		○	
CD105	X	X		X	○	○	X	X	X	○	
CD146	○	X		X		X	X	X	X	○	
CD235a	X	X	X	X	○	X	X		○		

【0074】

C. 赤血球由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション

前記実施例6Bの操作後に、側方散乱光とAnnexin5の展開図からAnnexin5陽性集団を抽出し、この集団からCD45陰性となる集団を抽出し、更にこの集団からCD235a陽性且つCD59陽性集団を選別した(図10)。キャラクタライゼーションに使用した表面抗原とそれが各種細胞に存在する()、しない(×)ことを提示させた表も同時に記載している。この集団(図10の表における「Erythrocyte」の欄)を赤血球由来マイクロベシクルとし、Annexin5陽性集団中の本集団の割合は32%であった。

【0075】

D. マクロファージ/単球/顆粒球由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション

前記実施例6Bの操作後に、側方散乱光とAnnexin5の展開図からAnnexin5陽性集団を抽出し、この集団からCD235a陰性となる集団を抽出し、更にこの集団からCD45陽性且つCD15陽性集団を選別した(図11)。キャラクタライゼーションに使用した表面抗原とそれが各種細胞に存在する()、しない(×)ことを提示させた表も同時に記載している。この集団(図11の表における「Macrophage/Monocyte」と及び「Granulocyte」の各欄)をマクロファージ/単球/顆粒球由来マイクロベシクルとし、Annexin5陽性集団中の本集団の割合は2.6%であった。

【0076】

E. T細胞/B細胞由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション

前記実施例6Bの操作後に、側方散乱光とAnnexin5の展開図からAnnexin5陽性集団を抽出し、この集団からCD235a陰性となる集団を抽出し、更にこの集団からCD45陽性且つCD5陽性集団を選別した(図12)。キャラクタライゼーションに使用した表面抗原とそれが各種細胞に存在する()、しない(×)ことを提示させた表も同時に記載している。この集団(図12の表における「T Cell」と及び「B Cell」の各欄)をT細胞/B細胞由来マイクロベシクルとし、Annexin5陽性集団中の本集団の割合は0.4%であった。

【0077】

F. 血小板由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション

10

20

30

40

50

前記実施例 6 B の操作後に、側方散乱光と Annexin 5 の展開図から Annexin 5 陽性集団を抽出し、この集団から CD 45 陰性且つ CD 5 陰性となる集団を抽出し、更にこの集団から CD 41 陽性且つ CD 61 陽性集団を選別した(図 13)。キャラクタライゼーションに使用した表面抗原とそれが各種細胞に存在する()、しない(×)ことを提示させた表も同時に記載している。この集団(図 13 の表における「Platelet」の欄)を血小板由来マイクロベシクルとし、Annexin 5 陽性集団中の本集団の割合は 6.2 % であった。

【0078】

G. 血管内皮細胞由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション

前記実施例 6 B の操作後に、側方散乱光と Annexin 5 の展開図から Annexin 5 陽性集団を抽出し、この集団から CD 105 陽性且つ CD 146 陽性集団を選別した(図 14)。キャラクタライゼーションに使用した表面抗原とそれが各種細胞に存在する()、しない(×)ことを提示させた表も同時に記載している。この集団(図 14 の表における「Endothelial Cell」の欄)を血管内皮細胞由来マイクロベシクルとし、Annexin 5 陽性集団中の本集団の割合は 0.3 % であった。

10

【0079】

H. 血漿マイクロベシクルの 5 分類

上記において、それぞれが由来する細胞集団へのマイクロベシクルのキャラクタライゼーション後に側方散乱光と Annexin 5 の展開図へ重ね合わせた図の一例を図 15 に示す。

20

【0080】

I. 各細胞由来マイクロベシクルの Annexin 5 陽性と陰性によるキャラクタライゼーション

前記実施例 6 B の操作後に、側方散乱光と Annexin 5 の展開図から Annexin 5 陽性と陰性集団を抽出し、この集団から前記 C、D、E、F、G で示した CD 抗原を用いた由来細胞からのマイクロベシクルキャラクタライゼーションも行った(図 16)。由来するベシクルごとに Annexin 5 陽性と陰性の割合を比較したところ赤血球由来及びマクロファージ / 単球 / 顆粒球由来及び血管内皮細胞由来マイクロベシクルは Annexin 5 陽性集団が多く、T 細胞 / B 細胞由来マイクロベシクルは Annexin 5 陰性集団が多かった(図 17)。なお、比較検定はウィルコクソンの符号順位検定を用いた(* p < 0.05, ** p < 0.01)。

30

従来より利用されているマイクロベシクルのマーカー(例えば Annexin 5)について、上記結果より、Annexin 5 陰性のマイクロベシクルが多数存在し、その割合も由来する細胞ごとに大きな違いがあることが明らかとなった。すなわち、各細胞に由来するマイクロベシクル中の物質の挙動が従来とは異なる可能性が見いだされた。このことは、従来より利用されている方法を利用したキャラクタライゼーションのみではマイクロベシクルの正確な性質を見落とす可能性がある。本発明を利用してすることで、疾患部位の特定や診断目的にマッチした結果を得るための臨床検査材料入手することができる可能性があることが示唆された。

40

【0081】

以上の結果より、血液中のマイクロベシクルを血漿から直接的に観測する方法または血漿からマイクロベシクル画分を濃縮したものを観測する方法により、個々のマイクロベシクルが表面に有している蛋白質によりキャラクタライゼーションできることが示された。本発明を用いることで、血液中に存在する個々のマイクロベシクルの由来する細胞や臓器を判別し、その増減や含有率などを測定することができるようになった。

【産業上の利用可能性】

【0082】

本発明におけるマイクロベシクルを濃縮する前処理法は特に複雑な操作を伴うことなく、効率よくマイクロベシクル抽出することが可能である。当該、前処理法を実施することで、マイクロベシクルに含有されるバイオマーカーとなるべく候補物質(実施例では蛋白

50

質の一覧を例示)を濃縮することができ、血漿や血清を直接測定するよりも高感度な測定を実施できる可能性がある。

【0083】

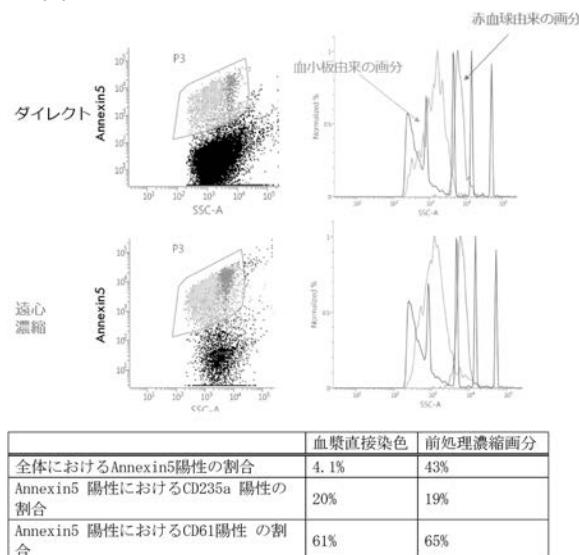
また、本発明によれば、簡便にマイクロベシクルの表面抗原によって個々の血液中マイクロベシクルのキャラクタライゼーションを行うことができ、どういった細胞や臓器に由来したマイクロベシクルが存在するのかを測定/定量/解析することができる。マイクロベシクルなどの微小膜画分には細胞や臓器間コミュニケーションに必要な伝達物質が含まれリキッドバイオプシとしての臨床応用が期待されているが、表面抗原そのものにも標的臓器や細胞との接着や相互作用としての臨床的、生理的な意味合いが含有されると思われる。

10

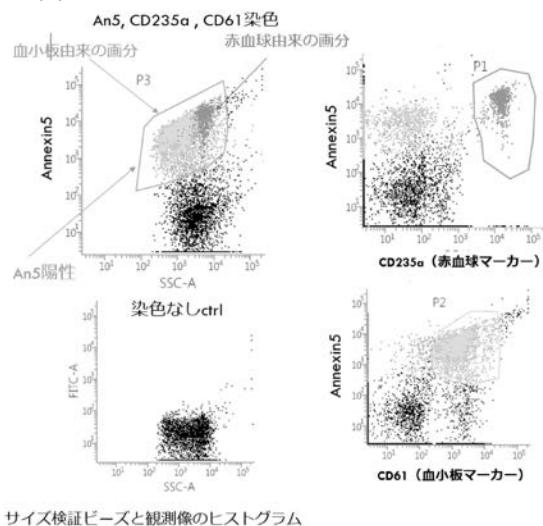
【0084】

これらのこととは本発明によるマイクロベシクルの観測が特定の疾患や患者の状態を判定する検査法への応用や健康状態(未病(疾病予備軍))状態への個人の遷移などを日々管理しうる予防、予知マーカーとしての臨床応用なども考えられる。より微小な粒子をダイナミックレンジの広い性能にて、表面抗原と合わせて測定できる系があればエクソソーム、マイクロベシクルなどを含めて微小膜画分としての臨床応用価値を高めることができる。

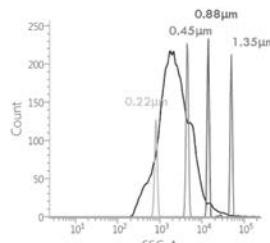
【図1】



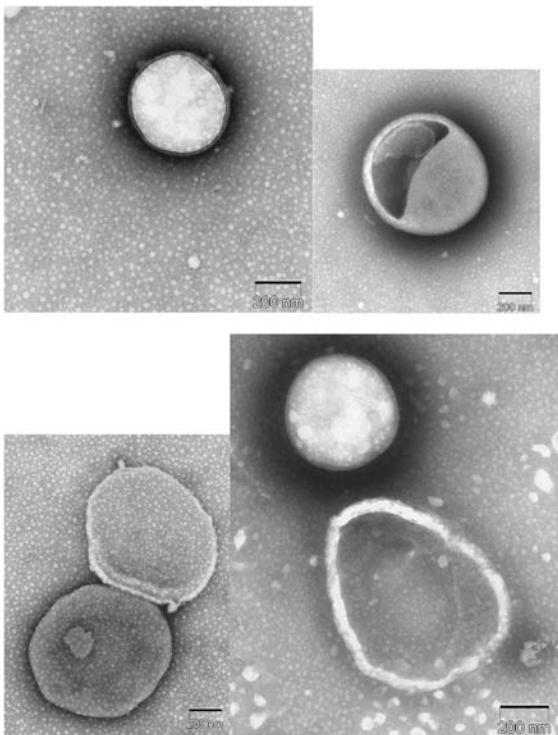
【図2】



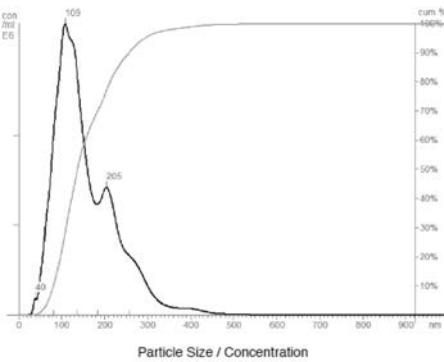
サイズ検証ビーズと観測像のヒストグラム



【図3】

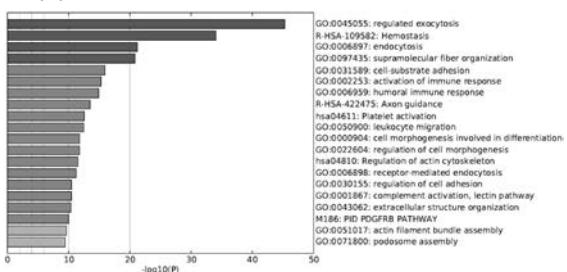


【図4】

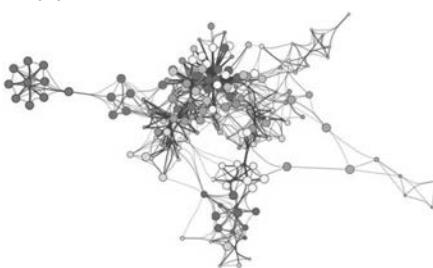


Particle Size / Relative Intensity 3D plot

【図5】



【図6】

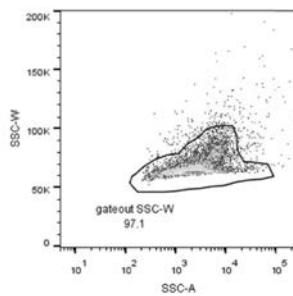


■regulated exocytosis
■Hemostasis
■endocytosis
■supramolecular fiber organization
■cell-substrate adhesion
■activation of immune response
■humoral immune response
■Axon guidance
■Platelet activation
■leukocyte migration
■cell morphogenesis involved in differentiation
■regulation of cell morphogenesis
■Regulation of actin cytoskeleton
■receptor-mediated endocytosis
■regulation of cell adhesion
■complement activation, lectin pathway
■extracellular structure organization
PID PDGFRB PATHWAY
■actin filament bundle assembly
■podosome assembly

created by
 http://metascape.org

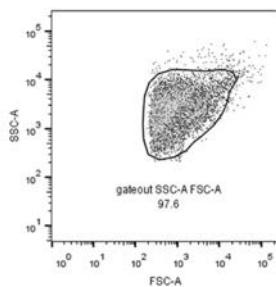
【図7】

図において、黒のラインで囲んだ集団を单一マイクロペシクル：観測像とした（ゲートイン）。それ以外をゲートアウト（観測像から除外）した。



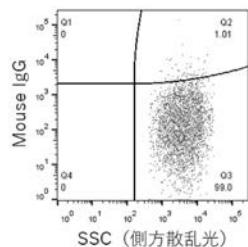
【図8】

図において、黒のラインで囲んだ集団を单一マイクロペシクル：観測像とした（ゲートイン）。それ以外をゲートアウト（観測像から除外）した。



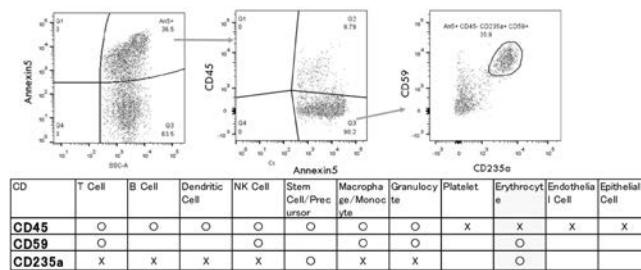
【図9】

図において、Q2画分はAPC-mouse IgG陽性集団と判定し除外した(ゲートアウト)。それが陰性となるものから、マイクロベシクル画分を選別していく(ゲートイン)。



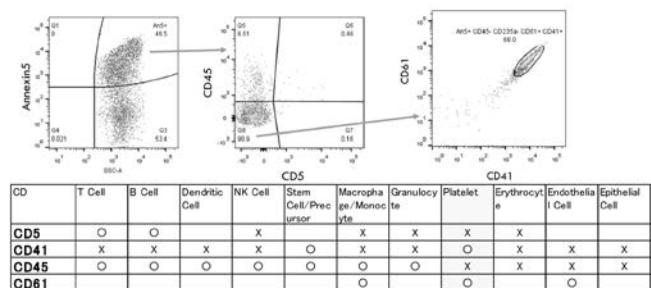
【図10】

赤血球由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション



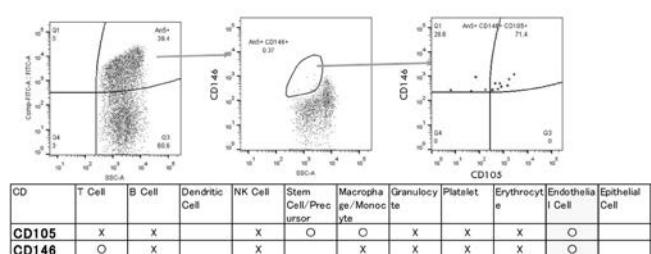
【図13】

血小板由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション



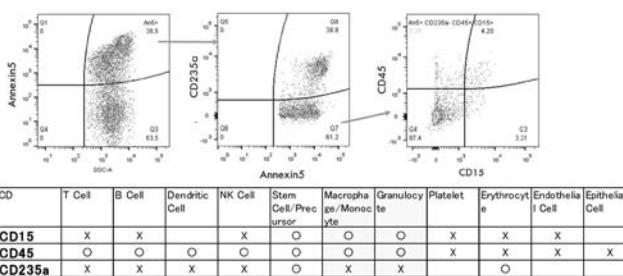
【図14】

血管内皮細胞由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション



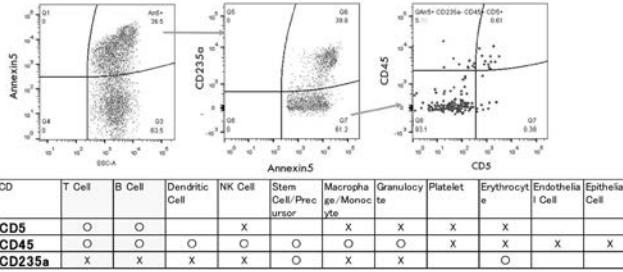
【図11】

マクロファージ/単球/顆粒球由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション



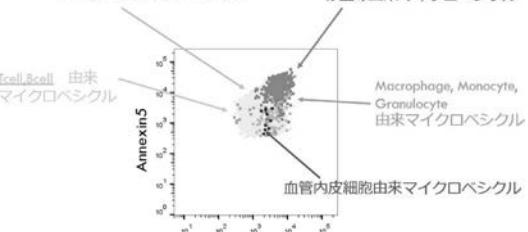
【図12】

T細胞/B細胞由来マイクロベシクルのキャラクタライゼーション

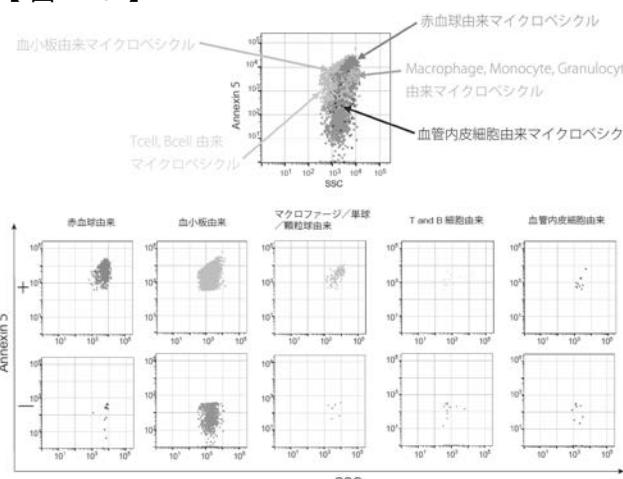


【図15】

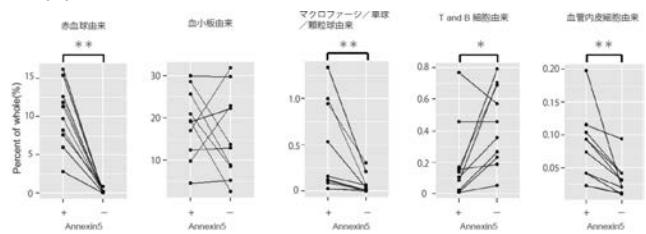
血小板由来マイクロベシクル 赤血球由来マイクロベシクル



【図16】



【図17】



フロントページの続き

(72)発明者 内海 健

福岡県福岡市西区元岡 744 国立大学法人九州大学内

(72)発明者 伊神 恒

福岡県福岡市西区九大新町 4-1 福岡市産学連携交流センター 226号 九州プロサーチ有限責任
任事業組合内

F ターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BA30 BD14 BD39 BD50 CA46

专利名称(译)	人血中微囊的分离方法及分析方法		
公开(公告)号	JP2019215341A	公开(公告)日	2019-12-19
申请号	JP2019107270	申请日	2019-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	三菱化学美迪恩斯株式会社 国立大学法人九州大学		
申请(专利权)人(译)	有限公司的LSI Medience 国立大学法人九州大学		
[标]发明人	康東天 内海健 伊神恒		
发明人	康 東天 内海 健 伊神 恒		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/078		
FI分类号	G01N33/53.S C12N5/078		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AC20 4B065/BA30 4B065/BD14 4B065/BD39 4B065/BD50 4B065/CA46		
代理人(译)	山口健次郎 森田健一		
优先权	2018109402 2018-06-07 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种有效分离和分析人血中存在的微囊泡的方法。解决方案：该方法包括：(步骤A)将(1)染色剂和(2)同时添加到血液样品或其处理对象中的步骤。)按照此顺序或相反的顺序标记的IgG；(步骤B)有助于利用步骤A中得到的反应物进行流式细胞仪的测定的步骤。(步骤C)分析在步骤B中获得的数据的步骤，以从观察图像中以该顺序，或者相反的顺序或同时地排除(1)聚集的微泡和(2)与标记的IgG反应的颗粒群。；(步骤D)将衍生细胞分类并鉴定为微泡群体的步骤。

(19)日本国特許庁(JP)	(12)公開特許公報(A)	(11)特許出願公開番号 特開2019-215341 (P2019-215341A)
		(43)公開日 令和1年12月19日(2019.12.19)
(51)Int.Cl. G 0 1 N 3 3 / 5 3 C 1 2 N 5 / 0 7 8	F I G 0 1 N 3 3 / 5 3 C 1 2 N 5 / 0 7 8	テマコード (参考) 4 B 0 6 5
(21)出願番号 特願2019-107270 (P2019-107270)	(71)出願人 581122956 株式会社 L S I メディエンス 東京都千代田区内神田一丁目13番4号	
(22)出願日 令和1年6月7日 (2019.6.7)	(72)発明者 504145342 国立大学法人九州大学 福岡県福岡市西区元岡744	
(31)優先権主張番号 特願2018-109402 (P2018-109402)	(73)代理人 10013954 弁理士 山口 健次郎	
(32)優先日 平成30年6月7日 (2018.6.7)	(74)代理人 100090251 弁理士 森田 健一	
(33)優先権主張国・地域又は機関 日本国(JP)	(75)発明者 康 東天 福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法 人九州大学内	
特許法第30条第2項適用申請有り 2019年4月3 0日、 https://www.biorxiv.org/content/10.1101/623553v1		
		最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト血液からのマイクロベシクルの分離方法及び分析方法