

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02018/070479

発行日 令和1年8月8日 (2019. 8. 8)

(43) 国際公開日 平成30年4月19日 (2018. 4. 19)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 S	2 G O 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	4 B O 6 3
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
C 1 2 Q 1/00 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z	
	C 1 2 Q 1/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)		

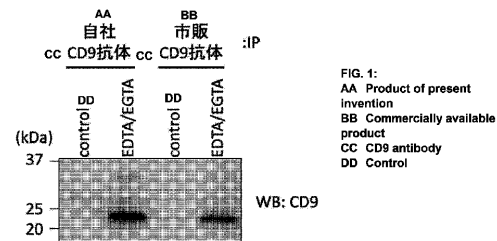
出願番号 特願2018-545052 (P2018-545052)	(71) 出願人 517448489
(21) 国際出願番号 PCT/JP2017/037021	合同会社みらか中央研究所
(22) 国際出願日 平成29年10月12日 (2017. 10. 12)	東京都八王子市小宮町 5 1 番地
(31) 優先権主張番号 特願2016-202043 (P2016-202043)	(74) 代理人 110002147
(32) 優先日 平成28年10月13日 (2016. 10. 13)	特許業務法人酒井国際特許事務所
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	(72) 発明者 犬塚 達俊
	東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 富士
	レビオ株式会社内
	(72) 発明者 栗本 綾子
	東京都新宿区西新宿二丁目 1 番 1 号 富士
	レビオ株式会社内
最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 細胞外小胞の回収方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞外小胞含有試料から高純度の細胞外小胞を回収することを提供する。具体的には、本発明は、以下を含む、細胞外小胞の回収方法を提供する：

- (1) 細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；および
- (2) キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下を含む、細胞外小胞の回収方法：

- (1) 細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；および
- (2) キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること。

【請求項 2】

キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、グリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸（HEDTA）、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸（HIDA）、ニトリロ三酢酸（NTA）、シュウ酸、エチレンジアミンテトラ（メチレンホスホン酸）（EDTMP）、およびそれらの塩、並びにそれらの混合物からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

細胞外小胞含有試料が、1～200 mM のキレート剤で処理される、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

細胞外小胞含有試料が、20～200 mM のキレート剤で処理される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

細胞外小胞がエクソソームである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

分離が、細胞外小胞膜結合物質を用いた沈降法、又は細胞外小胞含有試料の超遠心法により行われる、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7】

細胞外小胞膜結合物質が CD9 に対する抗体である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

細胞外小胞含有試料が体液または培養上清である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

細胞外小胞含有試料が血液試料、尿、または乳汁である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 10】

以下を含む、細胞外小胞の分析方法：

- (1) 細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；
- (2) キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること；および
- (3) 分離された細胞外小胞を分析すること。

【請求項 11】

分離された細胞外小胞中のタンパク質が分析される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

キレート剤および細胞外小胞膜結合物質を含む、キット。

40

【請求項 13】

細胞外小胞と細胞外小胞吸着タンパク質との結合の抑制方法であって、

細胞外小胞吸着タンパク質が結合した細胞外小胞をキレート剤で処理して、細胞外小胞から細胞外小胞吸着タンパク質を解離させることを含み、

細胞外小胞吸着タンパク質が、アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質 4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質 2 ホモログ、トリプシン 2、免疫グロブリン μ 重鎖疾患タンパク質、 α -1 B-糖タンパク質、免疫グロブリン κ 鎖 V-I I I 領域 W O L、ヘモペキシン、アンチトロニン 1 I I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体 C 1 サブ成分、補体因子 B、補体成分 C 9、フィコリン 2、血清パラオキシナーゼ/アリステラーゼ 1、免疫グロブリン κ 鎖 V-I 領域 D a u d i、および免疫グロブリン重鎖 V-I

50

I I 領域 T U R からなる群より選ばれる 1 以上のタンパク質である、方法。

【請求項 14】

アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質 4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質 2 ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリン μ 重鎖疾患タンパク質、 α -1 B-糖タンパク質、免疫グロブリン κ 鎖 V-I I I 領域 W O L、ヘモペキシン、アンチトロンビン-I I I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体 C 1 サブ成分、補体因子 B、補体成分 C 9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ/アリステラーゼ 1、免疫グロブリン κ 鎖 V-I 領域 D a u d i、および免疫グロブリン重鎖 V-I I I 領域 T U R からなる群より選ばれる 1 以上の細胞外小胞吸着タンパク質が解離している、遊離した天然の細胞外小胞。

10

【請求項 15】

前記群より選ばれる全ての細胞外小胞吸着タンパク質が解離している、請求項 14 に記載の細胞外小胞。

【請求項 16】

前記細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の解離度が 50 % 以上である、請求項 14 または 15 に記載の細胞外小胞。

【請求項 17】

前記細胞外小胞が単離または精製されている、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 18】

前記細胞外小胞がエクソソームである、請求項 14 ~ 17 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

20

【請求項 19】

前記細胞外小胞が、以下：

(1) 細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；および

(2) キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること；

を含む方法により得られるものである、請求項 14 ~ 16 のいずれか一項に記載の細胞外小胞。

【請求項 20】

(A) アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質 4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質 2 ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリン μ 重鎖疾患タンパク質、 α -1 B-糖タンパク質、免疫グロブリン κ 鎖 V-I I I 領域 W O L、ヘモペキシン、アンチトロンビン-I I I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体 C 1 サブ成分、補体因子 B、補体成分 C 9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ/アリステラーゼ 1、免疫グロブリン κ 鎖 V-I 領域 D a u d i、および免疫グロブリン重鎖 V-I I I 領域 T U R からなる群より選ばれる 1 以上の細胞外小胞吸着タンパク質が解離している、遊離した天然の細胞外小胞を含み、

30

(B) 前記 1 以上の細胞外小胞吸着タンパク質を含まない、溶液。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、細胞外小胞の回収方法などに関する。

【背景技術】

【0002】

細胞外小胞 (e x t r a c e l l u l a r v e s i c l e) は、さまざまな種類の細胞から分泌される、膜構造を有する微小な小胞であり、血液などの体液中に存在する。細胞外に分泌される細胞外小胞には、エクソソーム (e x o s o m e)、エクトソーム (e c t o s o m e)、アポトーシス胞 (a p o p t o t i c b l e b) が含まれる。細胞外小胞は、細胞間の情報伝達等の機能を担う種々の物質を含むことから、診断、創薬等の目的のために解析されている。よって、このような解析に有用な細胞外小胞の処理方法の

50

開発が求められている。例えば、特許文献1には、細胞外小胞の安定化のためにキレート剤（例、EDTA）を使用することが記載されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】米国特許出願公開第2015/0125864号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

細胞外小胞含有試料から高純度の細胞外小胞を回収することができれば、診断、創薬等の応用に有望である。細胞外小胞は主に、細胞外小胞マーカーに対する抗体を用いる免疫沈降法、または超遠心法により回収されている。しかし、このような方法により回収される細胞外小胞は必ずしも高純度ではなく、また、品質にばらつきがある。

【0005】

したがって、本発明の目的は、細胞外小胞を高純度で回収できる方法を開発することである。

【0006】

また、本発明の別の目的は、より均一な品質の細胞外小胞を回収できる方法を開発することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、鋭意検討した結果、細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理した後に回収することにより、細胞外小胞を高純度で回収できること等を見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は以下のとおりである。

〔1〕以下を含む、細胞外小胞の回収方法：

（1）細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；および

（2）キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること。

〔2〕キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、グリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸（HEDTA）、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸（HIDA）、ニトリロ三酢酸（NTA）、シュウ酸、エチレンジアミンテトラ（メチレンホスホン酸）（EDTMP）、およびそれらの塩、並びにそれらの混合物からなる群から選択される、〔1〕に記載の方法。

〔3〕細胞外小胞含有試料が、1～200mMのキレート剤で処理される、〔1〕または〔2〕に記載の方法。

〔4〕細胞外小胞含有試料が、20～200mMのキレート剤で処理される、〔3〕に記載の方法。

〔5〕細胞外小胞がエクソソームである、〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

〔6〕分離が、細胞外小胞膜結合物質を用いた沈降法、又は細胞外小胞含有試料の超遠心法により行われる、〔1〕～〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕細胞外小胞膜結合物質がCD9に対する抗体である、〔6〕に記載の方法。

〔8〕細胞外小胞含有試料が体液または培養上清である、〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔9〕細胞外小胞含有試料が血液試料、尿、または乳汁である、〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔10〕以下を含む、細胞外小胞の分析方法：

（1）細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；

（2）キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること；および

10

20

30

40

50

(3) 分離された細胞外小胞を分析すること。

[11] 分離された細胞外小胞中のタンパク質が分析される、[10]に記載の方法。

[12] キレート剤および細胞外小胞膜結合物質を含む、キット。

[13] 細胞外小胞と細胞外小胞吸着タンパク質との結合の抑制方法であって、

細胞外小胞吸着タンパク質が結合した細胞外小胞をキレート剤で処理して、細胞外小胞から細胞外小胞吸着タンパク質を解離させることを含み、

細胞外小胞吸着タンパク質が、アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質2ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリン μ 重鎖疾患タンパク質、 α -1B-糖タンパク質、免疫グロブリン κ 鎖V-I I I領域WOL、ヘモペキシン、アンチトロンビン-I I I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体C1サブ成分、補体因子B、補体成分C9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ/アリステラーゼ1、免疫グロブリン κ 鎖V-I領域Daudi、および免疫グロブリン重鎖V-I I I領域TURからなる群より選ばれる1以上のタンパク質である、方法。

[14] アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質2ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリン μ 重鎖疾患タンパク質、 α -1B-糖タンパク質、免疫グロブリン κ 鎖V-I I I領域WOL、ヘモペキシン、アンチトロンビン-I I I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体C1サブ成分、補体因子B、補体成分C9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ/アリステラーゼ1、免疫グロブリン κ 鎖V-I領域Daudi、および免疫グロブリン重鎖V-I I I領域TURからなる群より選ばれる1以上の細胞外小胞吸着タンパク質が解離している、遊離した天然の細胞外小胞。

[15] 前記群より選ばれる全ての細胞外小胞吸着タンパク質が解離している、[14]に記載の細胞外小胞。

[16] 前記細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の解離度が50%以上である、

[14]または[15]に記載の細胞外小胞。

[17] 前記細胞外小胞が単離または精製されている、[14]～[16]のいずれかに記載の細胞外小胞。

[18] 前記細胞外小胞がエクソソームである、[14]～[17]のいずれかに記載の細胞外小胞。

[19] 前記細胞外小胞が、以下：

(1) 細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；および

(2) キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること；を含む方法により得られるものである、[14]～[16]のいずれかに記載の細胞外小胞。

[20] (A) アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質2ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリン μ 重鎖疾患タンパク質、 α -1B-糖タンパク質、免疫グロブリン κ 鎖V-I I I領域WOL、ヘモペキシン、アンチトロンビン-I I I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体C1サブ成分、補体因子B、補体成分C9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ/アリステラーゼ1、免疫グロブリン κ 鎖V-I領域Daudi、および免疫グロブリン重鎖V-I I I領域TURからなる群より選ばれる1以上の細胞外小胞吸着タンパク質が解離している、遊離した天然の細胞外小胞を含み、

(B) 前記1以上の細胞外小胞吸着タンパク質を含まない、溶液。

【発明の効果】

【0009】

細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理することにより、回収される細胞外小胞への夾雑物の吸着を低減することができる。したがって、本発明によれば、細胞外小胞を高純度で回収することができる。また、細胞外小胞含有試料に含まれる細胞外小胞吸着タンパク質の種類および量は、細胞外小胞含有試料の種類、細胞外小胞含有試料が由来する生物の種類、並びに細胞外小胞含有試料が由来する生物の状態によって異なると考えられるが、

本発明によれば、細胞外小胞への種々の吸着タンパク質の結合を抑制することができる。したがって、本発明によれば、より均一な品質の細胞外小胞の回収が可能になると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、実施例1におけるPBS（「control」）またはEDTA/EGTA/PBS（「EDTA/EGTA」）で希釈した血清検体の免疫沈降法（IP）で得られたサンプルのビオチン化抗CD9抗体によるウェスタンブロッティング（WB）を示す図である。

【図2A】図2Aは、実施例2における各濃度の各キレート剤で希釈した血清検体の免疫沈降法で得られたサンプルのビオチン化抗CD9抗体によるウェスタンブロッティングを示す図である。

【図2B】図2Bは、実施例2における各濃度の各キレート剤で希釈した血漿検体の免疫沈降法で得られたサンプルのビオチン化抗CD9抗体によるウェスタンブロッティングを示す図である。

【図3】図3は、実施例3におけるPBS（「control」）またはEDTA/EGTA/PBS（「EDTA/EGTA」）で希釈した血清検体の超遠心法で得られたサンプルのビオチン化抗CD9抗体によるウェスタンブロッティングを示す図である。

【図4A】図4Aは、実施例4においてヒト結腸腺癌細胞LoVoの培養上清を超遠心し、得られた沈殿物を再懸濁させ、再度超遠心し、得られた沈殿物を再懸濁することにより得られたサンプルの抗CD9抗体および抗CEA抗体によるウェスタンブロッティングを示す図である。再懸濁は、PBS（「control」）またはEDTA/EGTA/PBS（「EDTA/EGTA」）で行った。

【図4B】図4Bは、実施例4においてヒト結腸腺癌細胞LoVoの培養上清を超遠心し、得られた沈殿物を再懸濁させ、再度超遠心し、得られた沈殿物を再懸濁することにより得られたサンプルの粒子数および粒子径分布の測定を示す図である。再懸濁は、PBS（「control」）またはEDTA/EGTA/PBS（「EDTA/EGTA」）で行った。

【図5】図5は、実施例5における、ヒト膵臓腺癌細胞BxPC-3の培養上清からの免疫沈降法によるエクソソーム回収サンプルにおける粒子数および粒子径分布を示す図である。夾雑物（アルブミン）を添加しない培養上清（aおよびb）および夾雑物（アルブミン）を添加した培養上清（cおよびd）、EDTA/EGTAを添加した培養上清（bおよびd）およびEDTA/EGTAを添加しない培養上清（aおよびc）を示す図である。

【図6】図6は、実施例7におけるPBS（「control」）またはEDTA/EGTA/PBS（「EDTA/EGTA」）で希釈した血清検体の免疫沈降法で得られたサンプルのビオチン化抗CD9抗体によるウェスタンブロッティング（WB）を示す図である。

【図7】図7は、実施例8において酢酸処理した牛乳の上清を超遠心し、得られた沈殿物を再懸濁させ、再度超遠心し、得られた沈殿物を再懸濁することにより得られたサンプルの粒子数および粒子径分布の測定を示す図である。再懸濁は、PBS（「control」）またはEDTA/EGTA/PBS（「EDTA/EGTA」）で行った。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本発明は、細胞外小胞の回収方法を提供する。

【0012】

細胞外小胞は、さまざまな種類の細胞から分泌される、膜構造を有する微小な小胞である。細胞外小胞としては、例えば、エクソソーム、エクトソーム、およびアポトーシス胞が挙げられる。好ましくは、細胞外小胞は、エクソソームである。細胞外小胞はまた、そのサイズにより規定することができる。細胞外小胞のサイズは、例えば、30～1000

10

20

30

40

50

nmであり、好ましくは50～300nm、より好ましくは80～200nmである。細胞外小胞のサイズの測定は、例えば、細胞外小胞のブラウン運動に基づく方法、光散乱法、および電気抵抗法などにより行うことができる。好ましくは、細胞外小胞のサイズの測定は、NanoSight (Malvern Instruments社製)により行われる。

【0013】

本発明の回収方法は、以下の工程を含む：

- (1) 細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；および
- (2) キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること。

【0014】

細胞外小胞含有試料は、細胞外小胞を含有する任意の試料である。好ましくは、細胞外小胞含有試料は、生物学的な液体試料である。細胞外小胞含有試料は、本発明の方法に用いられる前に、他の処理に付されてもよい。このような処理としては、例えば、遠心分離、抽出、ろ過、沈殿、加熱、凍結、冷蔵、および攪拌が挙げられる。

【0015】

一実施形態では、細胞外小胞含有試料は、培養上清である。培養上清は、細胞培養上清であっても組織培養上清であってもよい。培養される細胞または組織が由来する生物としては、例えば、哺乳動物（例、ヒト、サル等の霊長類；マウス、ラット、ウサギ等の齧歯類；ウシ、ブタ、ヤギ等の家畜；およびウマ、ヒツジ等の使役動物）、鳥類（例、ニワトリ）等の動物、昆虫、微生物（例、細菌類）、植物、および魚類が挙げられる。好ましくは、生物は、ヒト等の哺乳動物である。

【0016】

別の実施形態では、細胞外小胞含有試料は、体液である。体液は、上述したような生物に由来する体液である。体液としては、例えば、血液試料（例、全血、血清および血漿）、リンパ液、組織液、脳脊髄液、腹水、唾液、汗、精液、尿、涙液、粘液、乳汁、胸腔液、気管支肺胞洗浄液および羊水が挙げられる。好ましくは、体液は、血液である。一般に、細胞外小胞の回収は、培養上清に比し、培養上清よりも多量のタンパク質（例、アルブミン、カゼイン、ラクトアルブミン、ラクトフェリン）が混在している体液（例、血液、尿、乳汁）において困難であるが、本発明の方法によれば、このような体液からであっても細胞外小胞を高純度で回収することができる。

【0017】

さらに別の実施形態では、細胞外小胞含有試料は、細胞外小胞に加えて、夾雑物として1以上の細胞外小胞吸着タンパク質をさらに含む試料である。細胞外小胞吸着タンパク質とは、細胞外小胞に直接的に吸着する能力を有するタンパク質、または他の因子（例、タンパク質）を介して細胞外小胞に間接的に吸着する能力を有するタンパク質を意味する。細胞外小胞吸着タンパク質としては、例えば、アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質4、ピトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質2ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリンμ重鎖疾患タンパク質、α-1B-糖タンパク質、免疫グロブリンκ鎖V-I-I-I領域WOL、ヘモペキシン、アンチトロンビン-I-I-I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体C1サブ成分、補体因子B、補体成分C9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ/アリステラーゼ1、免疫グロブリンκ鎖V-I領域Daudi、および免疫グロブリン重鎖V-I-I-I領域TURが挙げられる。細胞外小胞含有試料に含まれる細胞外小胞吸着タンパク質の種類および量は、細胞外小胞含有試料の種類（例、血液等の体液、および培養上清）、細胞外小胞含有試料が由来する生物の種類、並びに細胞外小胞含有試料が由来する生物の状態（例、健常状態、特定疾患等の異常状態）によって異なると考えられるが、本発明によれば、細胞外小胞への種々の吸着タンパク質の結合を抑制することができる。よって、本発明によれば、より均一な品質の細胞外小胞の回収が可能になると考えられる。

【0018】

キレート剤は、金属イオンとの配位結合が可能である配位部分を有する化合物またはそ

10

20

30

40

50

の塩である。配位部分の数は、好ましくは2個以上、より好ましくは3個以上（例、3個または6個）である。配位部分としての配位原子としては、例えば、酸素原子、リン原子、窒素原子、硫黄原子、および塩素原子が挙げられる。配位原子は、好ましくは酸素原子又はリン原子であり、より好ましくは酸素原子である。配位部分としての配位基としては、例えば、上記配位原子を有する基が挙げられる。配位基は、好ましくはカルボン酸基またはリン酸基であり、より好ましくはカルボン酸基である。

【0019】

キレート剤としては、例えば、シュウ酸、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸（HIDA）、ニトリロ三酢酸（NTA）、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸（HEDTA）、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）、エチレンジアミンテトラ（メチレンホスホン酸）（EDTMP）、グリコールエーテルジアミン四酢酸（EGTA）、並びにそれらの塩が挙げられる。塩としては、例えば、金属塩（例、ナトリウム塩、カリウム塩等の一価の金属塩、およびカルシウム塩、マグネシウム塩等の二価の金属塩）、無機塩（例、フッ化物、塩化物、臭化物、ヨウ化物等のハロゲン化物塩、およびアンモニウム塩）、有機塩（例、アルキル基で置換されたアンモニウム塩）、および酸付加塩（例、硫酸、塩酸、臭化水素酸、硝酸、リン酸等の無機酸との塩、および酢酸、シュウ酸、乳酸、クエン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸等の塩）が挙げられる。本発明では、2種以上（例、2種、3種、4種、5種）のキレート剤の混合物を細胞外小胞含有試料の処理に用いてもよい。本発明では、細胞外小胞含有試料の処理前に、細胞外小胞含有試料にキレート剤を添加することを含んでいてもよい。

【0020】

細胞外小胞含有試料の処理におけるキレート剤の濃度は、細胞外小胞への夾雑物の吸着を抑制でき、かつ処理で用いられる溶液中にキレート剤が溶解できる濃度である限り特に限定されない。このような濃度は、キレート剤の種類によっても異なるが、例えば、1 mM～200 mMである。好ましくは、キレート剤の濃度は、10 mM以上、15 mM以上、20 mM以上、30 mM以上、40 mM以上、または50 mM以上であってもよい。このような濃度はまた、キレート剤の種類によっても異なるが、200 mM以下、180 mM以下、160 mM以下、140 mM以下、120 mM以下、または100 mM以下であってもよい。

【0021】

細胞外小胞含有試料の処理における温度は、例えば、4～37℃であり、好ましくは、15～30℃であってもよい。処理における時間は、細胞外小胞への夾雑物の吸着を抑制するために十分な時間である限り特に限定されず、例えば、1分以上、5分以上、10分以上、または20分以上であってもよい。このような時間はまた、4時間以下、2時間以下、または1時間以下であってもよい。細胞外小胞含有試料の処理では、細胞外小胞含有試料およびキレート剤の混合後に、混合液が放置されてもよい。

【0022】

キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料からの細胞外小胞の分離は、例えば、細胞外小胞膜結合物質を用いた沈降法、または超遠心法により行うことができる。沈降法または超遠心法により細胞外小胞を沈殿させ、次いで、沈殿物を回収することにより、または上清を廃棄することにより、細胞外小胞を回収することができる。分離は、好ましくは、単離または精製である。したがって、本発明の回収方法は、単離または精製方法として利用することができる。

【0023】

沈降法において用いられる細胞外小胞膜結合物質は、細胞外小胞マーカーに親和性を有する物質である。細胞外小胞マーカーとしては、例えば、CD9、癌胎児性抗原（Carcinoembryonic antigen、CEA）、CD81、CD63、熱ショックタンパク質（HSP）70、HSP90、主要組織適合性複合体（MHC）I、腫瘍感受性遺伝子（TSG）101、リソソーム関連膜タンパク質（LAMP）1、細胞間接着分子（ICAM）-1、インテグリン、セラミド、コレステロール、ホスファチジルセ

リン、A L I X、A n n e x i n s、C a v e o l i n - I、F l o t i l l i n - I、R a b タンパク、E p C A Mなどが挙げられる。細胞外小胞膜結合物質としては、例えば、抗体（例、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体）、アプタマー、ホスファチジルセリン結合タンパク質、セラミド結合タンパク質が挙げられる。細胞外小胞膜結合物質は、好ましくは抗体であり、より好ましくはモノクローナル抗体である。細胞外小胞膜結合物質として抗体が用いられる場合、沈降法は免疫沈降法である。細胞外小胞膜結合物質は、凝集を容易にするための固相（例、磁性ビーズ）と結合していてもよい。

【0024】

超遠心は、超遠心機を使用して行うことができる。超遠心で印加される重力は、例えば、 $10,000 \times g \sim 200,000 \times g$ であり、好ましくは、 $70,000 \times g \sim 150,000 \times g$ であってもよい。超遠心の時間は、例えば、0.5～24時間であり、好ましくは1～5時間である。超遠心での温度は、例えば、4～30℃である。超遠心は、1回または複数回（例、2回、3回）行ってもよい。

【0025】

本発明はまた、細胞外小胞の分析方法を提供する。

【0026】

本発明の分析方法は、以下を含む：

- (1) 細胞外小胞含有試料をキレート剤で処理すること；
- (2) キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を分離すること；および
- (3) 分離された細胞外小胞を分析すること。

【0027】

本発明の分析方法における(1)および(2)は、本発明の回収方法における(1)および(2)と同様にして行うことができる。

【0028】

(3)では、分離された細胞外小胞が分析される。分析される対象としては、例えば、細胞外小胞中に含まれる成分（例、細胞外小胞の内部に含まれる成分、細胞外小胞の膜成分、細胞外小胞の膜表面に存在している成分）、および細胞外小胞自体（粒子）が挙げられる。

【0029】

細胞外小胞中に含まれる成分が分析される場合、分析は、成分の検出または定量である。このような分析はまた、一成分または複数成分の分析である。分析される成分としては、例えば、タンパク質、核酸（例、RNA、DNA）、糖、脂質、アミノ酸、ビタミン類、ポリアミン、およびペプチドが挙げられる。キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から分離された細胞外小胞は、特にタンパク質夾雑物が除去されている。したがって、本発明の分析方法によれば、タンパク質夾雑物の影響を排除することにより、細胞外小胞中のタンパク質を高精度で分析することができる。

【0030】

成分の分析は、当該分野において公知である任意の方法により行うことができる。

分析される成分がタンパク質である場合、分析方法としては、例えば、イムノアッセイ、質量分析法が挙げられる。イムノアッセイとしては、例えば、直接競合法、間接競合法、およびサンドイッチ法が挙げられる。また、このようなイムノアッセイとしては、化学発光イムノアッセイ（CLIA）〔例、化学発光酵素免疫測定法（CLEIA）〕、免疫比濁法（TIA）、酵素免疫測定法（EIA）（例、直接競合ELISA、間接競合ELISA、およびサンドイッチELISA）、放射イムノアッセイ（RIA）、ラテックス凝集反応法、蛍光イムノアッセイ（FIA）、およびイムノクロマトグラフィー法、ウェスタンブロッティング、免疫染色、蛍光活性化細胞選別（fluorescence activated cell sorting、FACS）が挙げられる。複数成分が分析される場合、プロテオーム分析が行われてもよい。

分析される成分が核酸である場合、分析方法としては、例えば、プローブを用いるハイ

ブリダイゼーション法、プライマー（例、2、3、または4個のプライマー）を用いる遺伝子増幅法、質量分析法が挙げられる。

分析される成分がタンパク質および核酸以外の成分である場合、分析方法としては、例えば、イムノアッセイ、質量分析法が挙げられる。複数成分が分析される場合、メタボローム分析が行われてもよい。

【0031】

細胞外小胞自体（粒子）の分析は、例えば、粒子分析機器、電子顕微鏡、フローサイトメーター等の機器により行うことができる。この場合、細胞外小胞の粒子数、粒子の大きさおよび形状、並びにそれらの分布を分析することができる。

【0032】

細胞外小胞は、癌等の種々の疾患に関与し得ることが報告されている（国際公開第2014/003053号；国際公開第2014/152622号；Taylor et al., Gynecologic Oncol, 100 (2008) pp13-21）。したがって、本発明の回収方法および分析方法は、例えば、細胞外小胞に基づく診断および創薬に有用である。

【0033】

本発明はまた、細胞外小胞と細胞外小胞吸着タンパク質との結合の抑制方法を提供する。

【0034】

本発明の抑制方法は、細胞外小胞吸着タンパク質が結合した細胞外小胞をキレート剤で処理して、細胞外小胞から細胞外小胞吸着タンパク質を解離させることを含む。細胞外小胞吸着タンパク質としては、例えば、アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質2ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリンμ重鎖疾患タンパク質、α-1B-糖タンパク質、免疫グロブリンκ鎖V-I-I-I領域WOL、ヘモペキシン、アンチトロニン-1-I-I-I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体C1サブ成分、補体因子B、補体成分C9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ/アリレステラーゼ1、免疫グロブリンκ鎖V-I領域Daudi、および免疫グロブリン重鎖V-I-I-I領域TURが挙げられる。上述したように、より均一な品質の細胞外小胞の回収が可能になると考えられることから、本発明の抑制方法は、例えば、本発明の回収方法および分析方法の実施、並びに細胞外小胞を用いた医薬のスクリーニングに有用である。

【0035】

本発明はまた、上述したようなキレート剤および細胞外小胞膜結合物質を含むキットを提供する。本発明のキットは、例えば、本発明の回収方法、分析方法および抑制方法の簡便な実施、ならびに後述する本発明の細胞外小胞および溶液の簡便な調製に有用である。

【0036】

本発明はまた、遊離した天然の細胞外小胞を提供する。本発明の細胞外小胞には、上記1以上の細胞外小胞吸着タンパク質が吸着しているが、本発明の細胞外小胞は、これらの細胞外小胞吸着タンパク質のうち、1以上、好ましくは、2以上、3以上、4以上、5以上、6以上、7以上、8以上、9以上、10以上、11以上、12以上、13以上、14以上、15以上、16以上、17以上、18以上、または全ての細胞外小胞吸着タンパク質が解離したものであってもよい。

【0037】

本発明の細胞外小胞はまた、細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の解離度（％）で規定することができる。前記細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の解離度（％）は、 $\left[\left(\text{細胞外小胞含有試料中の細胞外小胞をキレート剤で処理することにより、当該細胞外小胞から解離した細胞外小胞吸着タンパク質の総量} \right) / \left(\text{細胞外小胞含有試料中の細胞外小胞に天然に吸着している細胞外小胞吸着タンパク質の総量} \right) \right] \times 100\%$ で算出することができる。ここで、「（細胞外小胞含有試料中の細胞外小胞をキレート剤で処理することにより、当該細胞外小胞から解離した細胞外小胞吸着タンパク質の総量）／（細胞外小胞含有試料中の細胞外小胞に天然に吸着している細胞外小胞吸着タンパク質の総

10

20

30

40

50

量)」の比率値は、例えば、免疫学的方法（例、ウェスタンブロッティング）により間接的に評価することができる。これは、細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の解離量に比例して、細胞外小胞吸着タンパク質による細胞外小胞のマスキングが解除され、細胞外小胞マーカーに対する抗体が細胞外小胞に結合する量、ひいては、細胞外小胞マーカーに対する抗体による細胞外小胞マーカーの免疫染色強度が増加すると考えられるためである。

具体的には、以下のとおりである。まず、細胞外小胞のキレート剤処理後の細胞外小胞マーカー免疫染色強度がプラトーに到達するまでキレート剤濃度を増加させていき、プラトーに到達した免疫染色強度（a）を測定する。したがって、（a）は解離度100%のときの値となる。つぎに、対象となる濃度のキレート剤処理後の細胞外小胞マーカー免疫染色強度（b）を測定する。そして、（b）／（a）を算出することにより、上記比率値を間接的に算定することができる。

上記解離度について、図2AにおけるEDTA処理の免疫染色の結果を参照して、より具体的に説明する。10mM EDTA処理と50mM EDTA処理後の免疫染色強度はほぼ一致することから、細胞外小胞マーカー（CD9）に基づく免疫染色強度はプラトーに到達していることが理解できる。よって、10mM EDTA処理により、ほぼ全ての細胞外小胞中着タンパク質（細胞外小胞含有試料中の細胞外小胞に天然に吸着している細胞外小胞吸着タンパク質の総量）が細胞外小胞から解離していると見積もることができる。そして、1mM EDTA処理後の免疫染色強度は10mMまたは50mM EDTA処理後の免疫染色強度の約30%であるから、1mM EDTA処理後では、細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の解離度は、約30%であると評価することができる。

【0038】

本発明の細胞外小胞について、細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の解離度（%）は、解離のために用いられるキレート剤の種類および濃度等の条件によっても異なるが、例えば、30%以上、好ましくは50%以上、より好ましくは80%以上、さらにより好ましくは90%以上、最も好ましくは91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上である。

【0039】

用語「遊離」とは、細胞外小胞が固相（例、支持体、容器、粒子）に固定されていないことを意味する。したがって、直接的または間接的（例、抗体等の親和性物質を介する場合）に固相に固定されている細胞外小胞は、遊離した細胞外小胞ではない。

【0040】

用語「天然」とは、細胞外小胞が人工物質または外来物質（例、細胞外小胞が由来する培養上清、体液または生物に対してそれぞれ異種の培養上清、体液または生物由来の抗体、および抗体断片；ならびに色素、蛍光物質等の標識物質）で改変されていないことを意味する。したがって、人工物質で標識されている細胞外小胞（例、人工物質を取り込んでいる細胞外小胞、人工物質で膜表面が修飾されている細胞外小胞）は、天然の細胞外小胞ではない。一方、細胞外小胞から細胞外小胞吸着タンパク質が解離した細胞外小胞は、人工物質または外来物質で標識されていないことから、天然の細胞外小胞と解するものとする。

【0041】

一実施形態では、本発明の細胞外小胞は、培養上清に由来する。培養上清は、細胞培養上清であっても組織培養上清であってもよい。培養される細胞または組織が由来する生物の例および好ましい例は、上述したとおりである。

【0042】

別の実施形態では、本発明の細胞外小胞は、体液に由来する。体液は、上述したような生物に由来する体液である。体液の例および好ましい例は、上述したとおりである。

【0043】

本発明の細胞外小胞の例および好ましい例は、上述したとおりである。本発明の細胞外

10

20

30

40

50

小胞は、上述したようなサイズを有していてもよい。本発明の細胞外小胞はまた、上述したような細胞外小胞マーカーを有していてもよい。

【0044】

本発明の細胞外小胞は、単離または精製されたものであってもよい。細胞外小胞の単離または精製は、例えば、キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を超遠心により分離することにより行うことができる。また、細胞外小胞の単離または精製は、細胞外小胞膜結合物質を用いた沈降法により、キレート剤で処理された細胞外小胞含有試料から細胞外小胞を超遠心により分離し、次いで、細胞外小胞（当該沈降法において細胞外小胞膜結合物質に結合している）を細胞外小胞膜結合物質から解離させることにより行うことができる。

10

【0045】

本発明の細胞外小胞は、例えば、上述した本発明の回収方法により調製することができる。本発明の細胞外小胞は、高純度かつ均一な品質であることから、例えば、細胞外小胞を用いた医薬のスクリーニングに有用である。

【0046】

本発明はまた、（A）アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質4、ビトロネクチン、細胞分裂制御タンパク質2ホモログ、トリプシン-2、免疫グロブリン μ 重鎖疾患タンパク質、 α -1B-糖タンパク質、免疫グロブリン κ 鎖V-I-I-I領域WOL、ヘモペキシン、アンチトロンビン-I-I-I、プロトロンビン、ゲルソリン、補体C1サブ成分、補体因子B、補体成分C9、フィコリン-2、血清パラオキシナーゼ／アリステラーゼ1、免疫グロブリン κ 鎖V-I領域Dauidi、および免疫グロブリン重鎖V-I-I-I領域TURからなる群より選ばれる1以上の細胞外小胞吸着タンパク質が解離している、遊離した天然の細胞外小胞を含み、（B）上記1以上の細胞外小胞吸着タンパク質を含まない溶液を提供する。

20

【0047】

溶液は、好ましくは水溶液である。水溶液としては、例えば、例えば、水（例、蒸留水、滅菌水、滅菌蒸留水、純水）、および緩衝液が挙げられる。緩衝液としては、例えば、リン酸緩衝液（例、PBS）、Tris-HCl、TE（Tris-EDTA）緩衝液等のTrisベースの緩衝液、炭酸緩衝液が挙げられる。緩衝液のpHは、中性付近のpHが適切である。このようなpHは、例えばpH5.0～9.0、好ましくは5.5～8.5、より好ましくは6.0～8.0、さらにより好ましくは6.5～7.5である。水溶液は、少量の有機溶媒（例、アルコール）、他の成分を含んでもよい。特定の実施形態では、水溶液は、好ましくは、リン酸緩衝液以外の水溶液であり、より好ましくは、リン酸緩衝液以外の緩衝液である。溶液は、液体または凍結のいずれの状態で提供されてもよいが、好ましくは液体の状態で提供される。

30

【0048】

溶液の容量は、例えば、10 μ L～10mLであってもよい。好ましくは、容量は、20 μ L以上、40 μ L以上、50 μ L以上、または100 μ L以上であってもよい。容量はまた、5mL以下、1mL以下、または200 μ L以下であってもよい。

【0049】

（A）において、遊離した天然の細胞外小胞、および細胞外小胞からの細胞外小胞吸着タンパク質の種類の解離数の詳細（定義、例、および好ましい例など）は、上述したとおりである。

40

【0050】

本発明の溶液は、遊離した天然の細胞外小胞を所定の濃度で含んでもよい。このような所定の濃度は、例えば、 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^{10}$ 粒子/mLであってもよい。好ましくは、濃度は、 1.0×10^2 以上、 1.0×10^3 以上、 1.0×10^4 以上、 1.0×10^5 以上、または 1.0×10^6 以上であってもよい。濃度はまた、 1.0×10^9 粒子/mL以下、 1.0×10^8 粒子/mL以下、または 1.0×10^7 粒子/mL以下であってもよい。細胞外小胞の濃度の測定は、例えば、細胞外小胞のブラウン

50

運動の速度に基づく方法、光散乱法、および電気抵抗法などにより行うことができる。好ましくは、細胞外小胞のサイズの測定は、NanoSight (Malvern Instruments 社製) により行われる。

【0051】

(B) において、溶液に含まれない細胞外小胞吸着タンパク質の数および種類は、(A) において細胞外小胞から解離している細胞外小胞吸着タンパク質の数および種類と同じである。例えば、(A) において細胞外小胞から解離している 1 以上の細胞外小胞吸着タンパク質がアルブミン、シナプトタグミン様タンパク質 4、ビトロネクチンである場合、(B) において、溶液に含まれない 1 以上の細胞外小胞吸着タンパク質は、アルブミン、シナプトタグミン様タンパク質 4、ビトロネクチンである。(B) において、溶液に含まれない細胞外小胞吸着タンパク質は、好ましくは、2 以上、3 以上、4 以上、5 以上、6 以上、7 以上、8 以上、9 以上、10 以上、11 以上、12 以上、13 以上、14 以上、15 以上、16 以上、17 以上、18 以上、または全てであってもよい。

10

【0052】

本発明の溶液はまた、上述した細胞外小胞吸着タンパク質に加えて、キレート剤、標識物質 (例、色素、蛍光物質)、抗体等の物質を含まないものであってもよい。

【0053】

本発明の溶液は、適宜調製することができる。例えば、本発明の溶液の調製は、本発明の細胞外小胞の単離または精製後、本発明の細胞外小胞を所望の溶液中に添加することにより行うことができる。本発明の溶液は、高純度かつ均一な品質の細胞外小胞を含むことから、例えば、細胞外小胞を用いた医薬のスクリーニングに有用である。

20

【実施例】

【0054】

以下、実施例を参照して本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0055】

(実施例 1)

キレート剤の効果を確認するために免疫沈降法による細胞外小胞の一種であるエクソソームの沈降量への影響を検討した。

300 μ L の血清検体を、600 μ L の PBS または EDTA および EGTA 含有 PBS (EDTA および EGTA の終濃度はそれぞれ 50 mM) で希釈し、室温で 30 分放置した後、20,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。その上清を新しいチューブに移し、そこにエクソソームの表面マーカーである CD9 を認識するモノクローナル抗体 (自社モノクローナル抗体および市販モノクローナル抗体 (コスモバイオ社製)) をそれぞれ 2 μ g 固定した磁性ビーズ (Protein G Dynabeads (ライフテクノロジーズ社製)) を添加した。4 $^{\circ}$ C で一晩、回転反応させた後に、磁性ビーズを PBS で 3 回洗浄し、サンプルを磁性ビーズから溶出させ、SDS を含有するサンプルバッファー (Bio-Rad 社製) で希釈してウェスタンブロッティング用サンプルとした。ウェスタンブロッティング用サンプルでは、エクソソームを含むサンプルが SDS で処理されることにより、エクソソームが破壊され、エクソソームのマーカータンパク質 (例、CD9) がサンプル溶液中に放出されている。PBS で希釈した血清検体に由来するサンプルを control、EDTA/EGTA/PBS で希釈した血清検体に由来するサンプルを EDTA/EGTA とし、両サンプルを自社製ビオチン化抗 CD9 抗体によるウェスタンブロッティングで分析した。

30

40

その結果、自社抗体および市販抗体において、キレート剤 (EDTA および EGTA) 添加条件でエクソソーム (CD9) の免疫沈降量が大幅に増加した (図 1)。

この結果から、キレート剤が免疫沈降法によるエクソソーム回収の効率を向上させる効果を有することが示された。

【0056】

(実施例 2)

50

キレート剤の種類および濃度とエクソソームの免疫沈降量との関係を検討した。

キレート剤として、エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム (EDTA・2Na)、グリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸 (HEDTA)、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸 (HIDA)、ニトリロ三酢酸 (NTA)、シュウ酸二水和物、エチレンジアミンテトラ (メチレンホスホン酸) (EDTMP) (EDTA・2Na、EGTAは同仁化学研究所社製、HEDTA、HIDA、NTA、EDTMPは東京化成工業社製、シュウ酸二水和物は和光純薬工業社製) を使用した。各キレート剤のエクソソームの沈降量への影響を検討した。

300 μ L の血清検体または血漿検体を、600 μ L の PBS または各キレート剤添加 PBS で希釈した。各キレート剤の濃度はそれぞれ終濃度で 1、10 および 50 mM となるように使用した (ただし、EDTMP のみは 1、10 および 30 mM)。次いで、溶液を室温で 30 分放置した後、20,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。その上清を新しいチューブに移し、そこに、CD9 を認識する自社モノクローナル抗体を 2 μ g 固定した磁性ビーズ (Protein G Dynabeads) を添加した。4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた後に、磁性ビーズを PBS で 3 回洗浄し、サンプルをサンプルバッファー (SDS 含有) で磁性ビーズから溶出し、ウェスタンブロッティング用サンプルとした。これらのサンプルをビオチン化抗 CD9 抗体によるウェスタンブロッティングで分析した。

その結果、血清 (図 2A) および血漿 (図 2B) の両方において、使用したキレート剤はいずれも、免疫沈降法によるエクソソームの回収を示し、また、濃度が高くなるにつれてエクソソームの免疫沈降量が増加した。特に、30 mM の EDTMP、50 mM の EDTA、EGTA、HEDTA、NTA、シュウ酸で、エクソソームの免疫沈降量が大幅に増加した (図 2A、2B)。

これらの結果から、使用したキレート剤はいずれも、免疫沈降法によるエクソソームの回収を示し、また、キレート剤の濃度が高くなるにつれて免疫沈降法によるエクソソーム回収の効率を向上させる効果を有することが示された。

【0057】

(実施例 3)

超遠心法によるエクソソーム調製におけるキレート剤のエクソソーム回収効率に対する効果を検討した。

300 μ L の血漿検体 (#1 および #2 の 2 種類) を、600 μ L の PBS または EDTA および EGTA 含有 PBS (EDTA および EGTA の終濃度はそれぞれ 50 mM) で希釈し、室温で 30 分放置した後、20,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心した。次に、その上清を、100,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 3 時間遠心した。上清を捨て、新たに PBS を加えて、沈殿物を再懸濁した後、150,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C で 1 時間遠心した。上清を捨て、新たに PBS を加えて、沈殿物を再懸濁してサンプルを得た。サンプルのタンパク質定量を BCA assay kit (サーモサイエンティフィック社製) により行った。サンプルをサンプルバッファー (SDS 含有) で希釈してウェスタンブロッティング用サンプルとした、ウェスタンブロッティングには各サンプルをタンパク質の量として 1.5 μ g 使用した。サンプル中の CD9 をビオチン化抗 CD9 抗体により、検出した。

その結果、キレート剤を用いた回収条件で、等量タンパク質中における CD9 の量が増加した (表 1 および 図 3)。

この結果から、超遠心法においても、キレート剤での処理によって回収産物中のエクソソームの純度が増し、エクソソーム回収効率が向上したことが示された。このことは、キレート剤での処理によって、エクソソーム表面の夾雑物が減少したことによると考えられる。

【0058】

10

20

30

40

【表 1】

表1

		濃度
血漿 #1	Control	453 ug/mL
	EDTA/EGTA	195 ug/mL
血漿 #2	Control	2347 ug/mL
	EDTA/EGTA	827 ug/mL

10

【0059】

(実施例 4)

超遠心法による培養細胞由来のエクソソームの回収において、キレート剤での処理によるエクソソーム回収効率に対する効果を検討した。

3日間無血清培地で培養したヒト結腸腺癌細胞LoVoの培養上清を、 $2,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で5分間遠心し、 $0.22 \mu m$ フィルター（ミリポア社製）で濾過した後、Amicon Ultra-15（ミリポア社製）を用いて濃縮した。濃縮したサンプルを $20,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で15分間遠心した。次に、その上清を、 $100,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で1時間遠心した。上清を捨て、PBSまたは50mM EDTA/50mM EGTA/PBSを加えて、沈殿物を再懸濁させた。再懸濁させた後、 $150,000 \times g$ 、 $4^\circ C$ で1時間遠心した。上清を捨て、新たにPBSまたは50mM EDTA/50mM EGTA/PBSを加えて、沈殿物を再懸濁させてサンプルを得た。サンプルの粒子数および分布の測定をNanoSight（Malvern Instruments社製）により行った。サンプル中のCD9およびエクソソームに存在すると報告されているCEA（Dai et al., Clin Cancer Res. 2005 Oct 15; 11(20): 7554-63）の検出を、ビオチン化抗CD9抗体および抗CEA抗体（アブカム社製）でのウェスタンブロッティングにて行った。

20

その結果、ウェスタンブロッティングの結果から、エクソソームマーカー（CD9およびCEA）のタンパク質の量が、キレート剤を用いた回収条件で増加した（図4A）。NanoSightの結果から、 $100 \sim 200 nm$ の粒子（エクソソームを示すと考えられる）が、キレート剤を用いた回収条件で顕著に増加した（表2、図4B）。

30

これらの結果から、超遠心法によるエクソソームの回収において、再懸濁時におけるキレート剤での処理がエクソソームの回収量を飛躍的に改善させたことが示された。これは、キレート剤での処理によって、夾雑物が減少し、エクソソームの再懸濁を促進したため、エクソソーム回収効率が増加したと考えられる。

【0060】

【表 2】

表 2

粒子/mL	control	EDTA/EGTA	対control
LoVo	5.04×10^7	7.40×10^8	1468%

40

【0061】

(実施例 5)

免疫沈降法によるエクソソームの回収における、キレート剤による処理の効果および夾雑物混入の影響を検討した。

3日間無血清培地で培養したヒト膵臓腺癌細胞BxPC-3の培養上清と、その培養上清に20mg/mLアルブミン（ミリポア社製）を添加したサンプルを調製した。 $500 \mu L$ のこれらのサンプルを、等量のPBSまたはEDTAおよびEGTA含有PBS（EDTAおよびEGTAの終濃度はそれぞれ50mM）で希釈し、室温で30分放置した後

50

、20,000×g、4℃で15分間遠心した。その上清を新しいチューブに移し、そこにCD9を認識する自社モノクローナル抗体を2μg固定した磁性ビーズ（Protein G Dynabeads）を添加した。

4℃で一晩、回転反応させた後に、磁性ビーズをPBSで3回洗浄し、BRUB（Britton & Robinson Universal Buffer）を40μL添加して粒子を磁性ビーズから溶出させた。室温で10分放置した後、磁性ビーズを集磁し、回収した上清をPBSで希釈し、NanoSight（Malvern Instruments社製）にて粒子数および分布の測定を行った。

その結果、アルブミン非存在下では、キレート剤非添加条件と比較してキレート剤添加条件で回収された粒子数が増加した（表3、図5aおよびb）。アルブミン存在下でも、キレート剤非添加条件と比較してキレート剤添加条件で回収された粒子数が増加した（表3、図5cおよびd）。キレート剤非添加条件では、アルブミン非存在下と比較してアルブミン存在下で回収された粒子数が約10%程度にまで減少した（表3、図5aおよびc）。しかし、キレート剤添加条件では、アルブミン非存在下と比較してのアルブミン存在下で回収された粒子数の減少が約40%程度であった（表3、図5bおよびd）。

これらの結果から、夾雑物としてのアルブミンの存在下または非存在下のいずれにおいても、キレート剤がエクソソーム回収効率を上昇させる効果を有することが示された。このことは、エクソソームの周囲のアルブミンはエクソソーム回収の妨げとなるが、キレート剤にはその妨げを抑制する効果があり、その結果エクソソームの回収効率が上昇したと考えられる。

【0062】

【表3】

表3

粒子/mL	control	EDTA/EGTA	対control
アルブミン添加無し	1.61×10^8	4.32×10^8	268%
アルブミン添加有り	1.56×10^7	1.69×10^8	1083%

【0063】

（実施例6）

キレート剤によるエクソソーム含有試料の処理によるエクソソームへの夾雑物の吸着の抑制を、プロテオミクス分析により確認した。

300μLの血清検体を600μLのPBSまたはEDTAおよびEGTA含有PBS（EDTAおよびEGTAの終濃度はそれぞれ50mM）で希釈し、室温で30分放置した後、20,000×g、4℃で15分間遠心した。その上清を新しいチューブに移し、そこにCD9を認識する自社抗体を2μg固定した磁性ビーズ（Protein G Dynabeads）または、抗体を固定化していない磁性ビーズ（Protein G Dynabeads）を添加した。4℃で一晩、回転反応させた後に、磁性ビーズをPBSで3回洗浄し、溶出液を磁性ビーズから溶出させ、サンプルバッファー（SDS含有）を添加後SDS-PAGEを行った。

泳動後のゲルから11バンド／レーンを切り出した後、水で洗浄し、アセトニトリル（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）で脱水した。ゲルを遠心エバポレーター（東京理化学株式会社製）で完全に乾燥させた後、50μLの0.01M DTT／100mM重炭酸アンモニウム（シグマアルドリッチ社製）で56℃、45分還元した。ゲルを室温に戻し、2μLの0.25Mヨードアセトアミド（和光純薬社製）／100mM重炭酸アンモニウムを添加し、暗所で15分室温で反応させた。上清を除去後、ゲルを50μLの100mM重炭酸アンモニウムで洗浄した。さらに50μLの50mM重炭酸アンモニウム／50%アセトニトリルで洗浄後、30μLの100%アセトニトリルで洗浄し、遠心エバポレーターで乾燥させた。

得られたゲルに20μLの0.1%RapiGest SF試薬（Waters社製）

／50 mM重炭酸アンモニウムを添加し、37℃、10分反応させた後、上清を除去し、遠心エバポレーターで乾燥させた。乾燥させたゲルに50 mM重炭酸アンモニウムで希釈した20 ng/μLのTrypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade（プロメガ社製）を20 μL加え、氷上で15分ゲルに浸透させた。ゲルが乾燥しないように50 mM重炭酸アンモニウムを20 μL加えた後、ゲルを37℃で18時間インキュベートした。反応後のゲルに50 μLの50%アセトニトリル/1% TFA（サーモサイエンティフィック社製）を添加し、37℃10分間インキュベート後、抽出液を回収した。これを二度繰り返した。最後に80%アセトニトリル50 μLを加え、ゲルを37℃2分インキュベートした後、抽出液を回収した。すべての抽出液を一つにまとめた後、遠心エバポレーターで濃縮乾固し、ペプチドを含むサンプルを得た。

10

得られたペプチドを含むサンプルに10 μLの0.1%ギ酸水（サーモサイエンティフィック社製）を加えて溶解したのち、LC-MS（LC: Eksigent社製、質量分析装置: Triple TOF 5600+, エービーサイエックス社製）で質量分析測定を行った。タンパク質の同定はProtein Pilot Ver 4.5 beta（エービーサイエックス社製）で行った。

質量分析測定の結果、PBS希釈かつCD9抗体結合ビーズ条件で同定されたタンパク質から、EDTA/EGTA希釈かつCD9抗体結合ビーズ条件で同定されたタンパク質およびPBS希釈かつ抗体非結合ビーズ条件で同定されたタンパク質を除いたタンパク質を表4に示す。表4に示される種々のタンパク質がキレート材処理によりエクソソームへの吸着が抑制されたことが示された。

20

この結果から、キレート剤での処理により種々のタンパク質のエクソソームへの吸着を抑制できることから、エクソソームのより高精度のプロテオミクスが可能になることが示された。また、かかる吸着の抑制により、より均一な品質のエクソソームの提供が可能になると期待される。

【0064】

【表4】

表4

キレート剤処理によりエクソソームへの吸着が抑制されたタンパク質

	Accession	Name
1	Q96C24	Synaptotagmin-like protein 4 OS=Homo sapiens GN=SYTL4 PE=1 SV=1
2	P04004	Vitronectin OS=Homo sapiens GN=VTN PE=1 SV=1
3	P06493	Cell division control protein 2 homolog OS=Homo sapiens GN=CDC2 PE=1 SV=2
4	P07478	Trypsin-2 OS=Homo sapiens GN=PRSS2 PE=1 SV=1
5	P04220	Ig mu heavy chain disease protein OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
6	P04217	Alpha-1B-glycoprotein OS=Homo sapiens GN=A1BG PE=1 SV=3
7	P01623	Ig kappa chain V-III region WOL OS=Homo sapiens PE=1 SV=1
8	P02790	Hemopexin OS=Homo sapiens GN=HPX PE=1 SV=2
9	P01008	Antithrombin-III OS=Homo sapiens GN=SERPINC1 PE=1 SV=1
10	P00734	Prothrombin OS=Homo sapiens GN=F2 PE=1 SV=2
11	P06396	Gelsolin OS=Homo sapiens GN=GSN PE=1 SV=1
12	P09871	Complement C1s subcomponent OS=Homo sapiens GN=C1S PE=1 SV=1
13	P00751	Complement factor B OS=Homo sapiens GN=CFB PE=1 SV=2
14	P02748	Complement component C9 OS=Homo sapiens GN=C9 PE=1 SV=2
15	Q15485	Ficolin-2 OS=Homo sapiens GN=FCN2 PE=1 SV=2
16	P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1 OS=Homo sapiens GN=PON1 PE=1 SV=2
17	P04432	Ig kappa chain V-I region Daudi OS=Homo sapiens PE=4 SV=1
18	P01779	Ig heavy chain V-III region TUR OS=Homo sapiens PE=1 SV=1

30

40

【0065】

(実施例7)

免疫沈降法による尿中エクソソームの回収における、キレート剤による処理の効果を検討した。

300 μLの尿検体を、600 μLのPBSまたはEDTAおよびEGTA含有PBS（EDTAおよびEGTAの終濃度はそれぞれ50 mM）で希釈し、室温で30分放置した後、20,000×g、4℃で15分間遠心した。その上清を新しいチューブに移し、

50

そこにエクソソームの表面マーカーであるCD9を認識する自社モノクローナル抗体を2 μ g固定した磁性ビーズ(Protein G Dynabeads(ライフテクノロジーズ社製))を添加した。4℃で一晩、回転反応させた後に、磁性ビーズをPBSTで3回洗浄し、サンプルを磁性ビーズから溶出させ、SDSを含有するサンプルバッファー(BIO-RAD社製)で希釈してウエスタンブロッティングのサンプルとした。

PBSにて希釈したサンプルをcontrol、EDTA/EGTA/PBSで希釈したサンプルをEDTA/EGTAとし、ビオチン化した抗CD9抗体によるウエスタンブロッティングで分析した。

その結果、キレート剤(EDTAおよびEGTA)添加条件でエクソソーム(CD9)の免疫沈降量が増加した(図6)。

この結果から、尿検体においても、キレート剤が免疫沈降法によるエクソソーム回収の効率を向上させる効果を有し、本発明が尿検体にも利用可能であることが示された。

【0066】

(実施例8)

超遠心法による牛乳由来のエクソソームの回収において、キレート剤での処理によるエクソソーム回収効率に対する効果を検討した。

市販牛乳20mLに酢酸を1/10vol加え、転倒混和したのち、2,000×g、4℃で5分間遠心した。上清を0.45 μ mフィルター(ミリポア社製)、0.22 μ mフィルター(ミリポア社製)で順に濾過した後、Amicon Ultra-15(ミリポア社製)を用いて濃縮した。濃縮したサンプルを20,000×g、4℃で15分間遠心した。次に、その上清を、100,000×g、4℃で1時間遠心した。上清を捨て、PBSまたは50mM EDTA/50mM EGTA/PBSを加えて、沈殿物を再懸濁させた。再懸濁させた後、150,000×g、4℃で1時間遠心した。上清を捨て、新たにPBSまたは50mM EDTA/50mM EGTA/PBSを加えて、沈殿物を再懸濁させてサンプルを得た。2.0M、1.5M、1.0M、0Mの各濃度のsucrose/PBSを調製し、2.0M、1.5M、1.0M、0Mの順に、1.4mL、1.0mL、1.4mL、0.8mLずつ超遠心用チューブに充填した。その上層に再懸濁したサンプルを200 μ Lアプライし、150,000×g、4℃で16時間超遠心した。遠心後、回収したサンプルの粒子数および分布の測定をNanoSight(Malvern Instruments社製)により行った。NanoSightの結果から、100~200nmの粒子(エクソソームを示すと考えられる)が、キレート剤を用いた回収条件で顕著に増加した(表5、図7)。

この結果から、超遠心法による牛乳中エクソソームの回収において、再懸濁時におけるキレート剤での処理がエクソソームの回収量を飛躍的に改善させたことが示された。これは、キレート剤での処理によって、夾雑物が減少し、エクソソームの再懸濁を促進したため、エクソソーム回収効率が増加したと考えられる。

【0067】

【表5】

表5

粒子/mL	control	EDTA/EGTA	対control
牛乳	3.94×10^8	9.98×10^8	253%

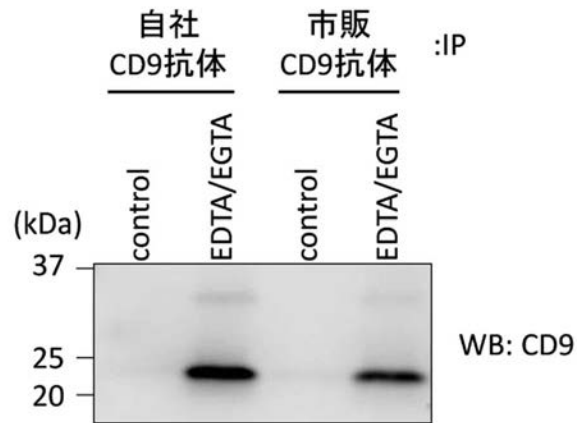
10

20

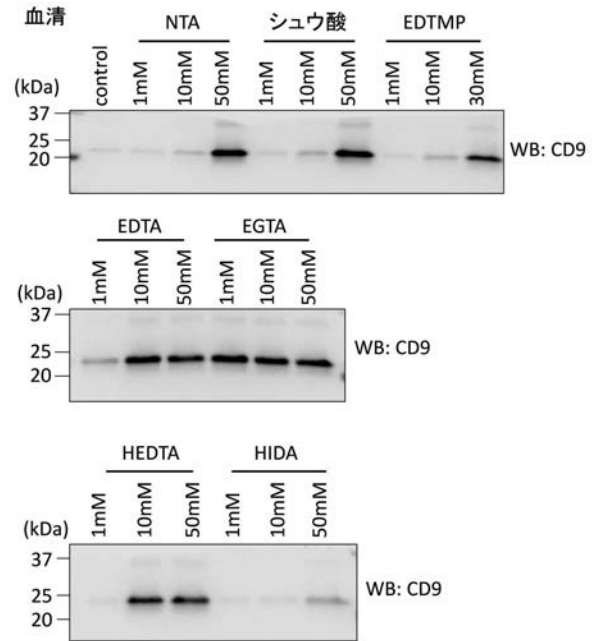
30

40

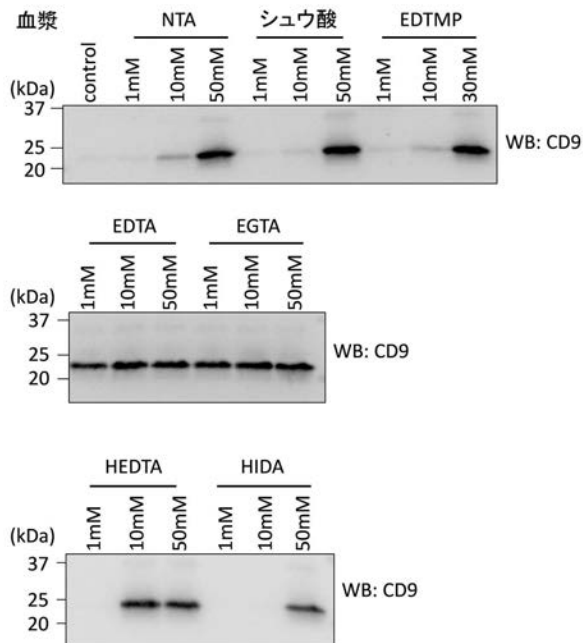
【図 1】



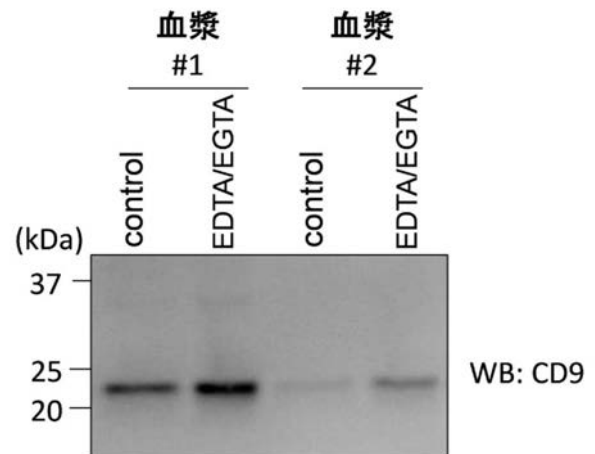
【図 2 A】



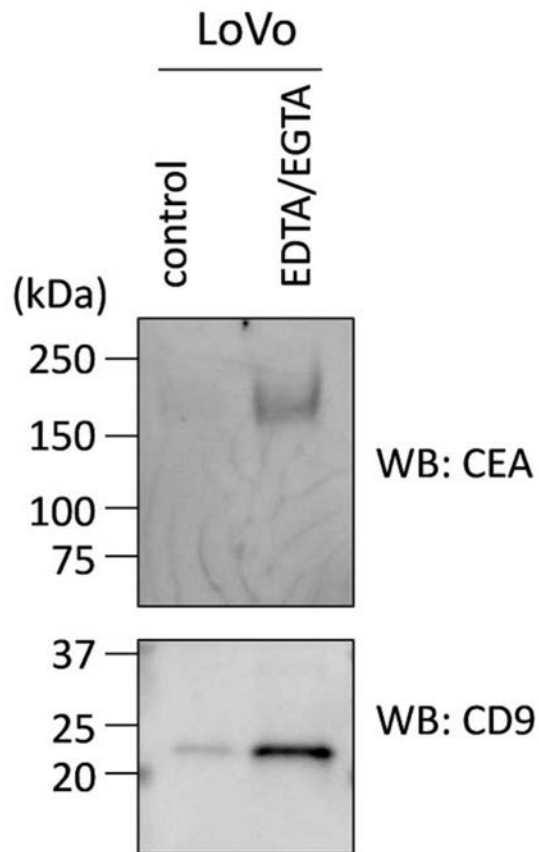
【図 2 B】



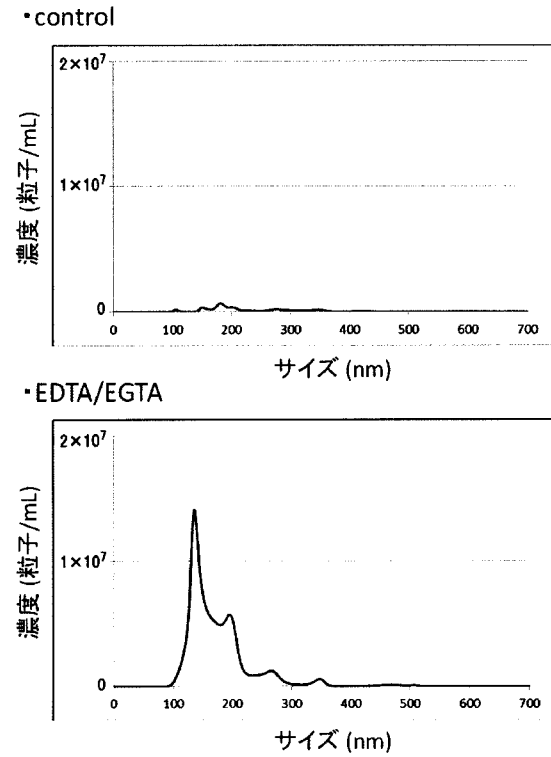
【図 3】



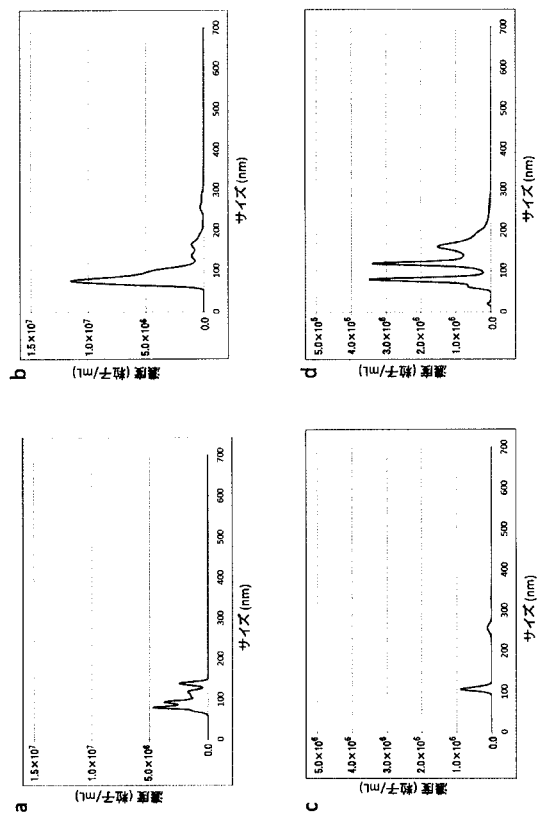
【図 4 A】



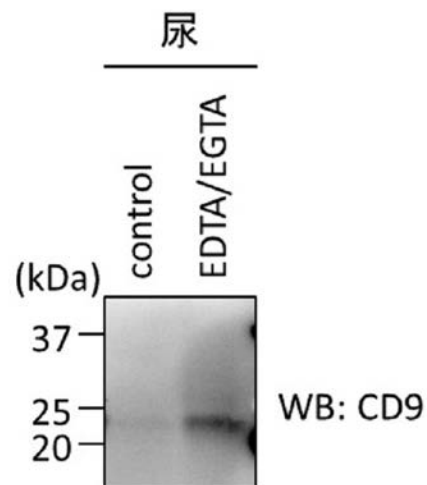
【図 4 B】



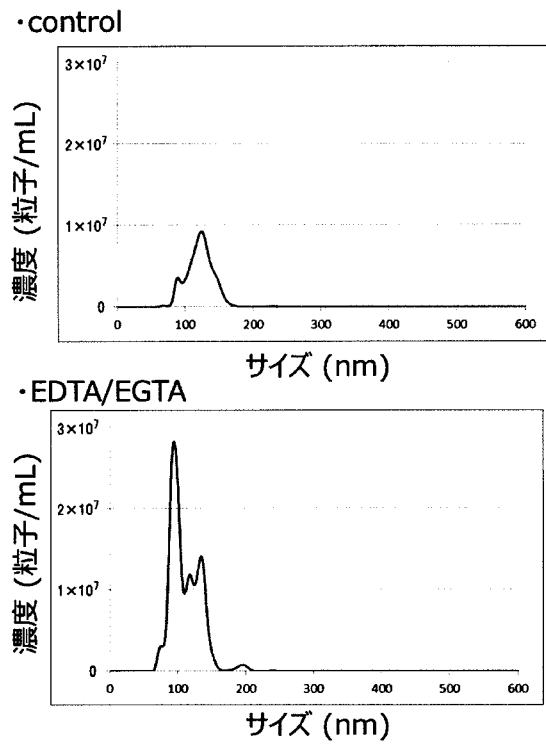
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/037021

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, G01N33/68(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) Int.Cl. G01N33/48, G01N33/68		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2017 Registered utility model specifications of Japan 1996-2017 Published registered utility model specifications of Japan 1994-2017		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPl us/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0125864 A1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 07 May 2015, claims 1, 3, 6, 7, 16, paragraphs [0025], [0032], [0038] & KR 10-2015-0052667 A	1-20
X/A	JP 2011-510309 A (HANSABIOMED OÜ) 31 March 2011, paragraphs [0021], [0023]-[0024] & WO 2009/092386 A2 & US 2009/0220944 A1, paragraphs [0045], [0047]-[0048] & EP 2245458 A2 & CN 102317778 A & CA 2713196 A1 & AU2009207927 A1	12/1-11, 13-20
A	WO 2015/185730 A2 (HANSABIOMED OÜ) 10 December 2015, entire text, all drawings JP 2017-518517 A & US 2017/0146543 A1 & EP 3152576 A2 & AU2015270450 A1 & CA 2950977 A1 & CN 106574928 A	1-20
☒ 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 05 January 2018 (05.01.2018)		Date of mailing of the international search report 16 January 2018 (16.01.2018)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 7 0 2 1	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/48(2006.01)i, G01N33/68(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. G01N33/48, G01N33/68			
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 1971-2018年 日本国実用新案登録公報 1996-2018年 日本国登録実用新案公報 1994-2018年			
国際調査で利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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
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	US 2015/0125864 A1 (SAMSUNG ELECTRONICS CO., LTD.) 2015.05.07, 請求項1、3、6、7、16、段落[0025]、[0032]、[0038] & KR 10-2015-0052667 A	1-20	
X/A	JP 2011-510309 A (ハンサビオメド・オサウヒング) 2011.03.31, 段落[0021]、[0023]-[0024] & WO 2009/092386 A2 & US 2009/0220944 A1, 段落[0045]、[0047]-[0048] & EP 2245458 A2 & CN 102317778 A & CA 2713196 A1 & AU 2009207927 A1	12/1-11, 13-20	
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 05.01.2018		国際調査報告の発送日 16.01.2018	
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) 海野 佳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 3 7 0 2 1
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
A	WO 2015/185730 A2 (HANSABIOMED OU) 2015.12.10, 全文全図 & JP 2017-518517 A & US 2017/0146543 A1 & EP 3152576 A2 & AU 2015270450 A1 & CA 2950977 A1 & CN 106574928 A	1-20

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, JO, 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

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA25 AA26 AA28 AA40 BA13 BA14 BB05
BB07 BB10 BB12 BB20 BB29 BB46 BB51 CA25 CA26 CB01
CB02 CB03 CB07 CB11 CB12 CB14 CB17 CB19 CB20 CB21
DA13 DA14 DA17 DA20 DA30 DA35 DA36 DA37 DA38 DA57
DA60 FA11 FA16 FA34 FA37 FB01 FB02 FB03 FB06 FB08
FB12 FB13 FB15 GC11 GC15 GC30
4B063 QA01 QA19 QQ01 QR16 QR54 QS13 QS33 QX02

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	收集细胞外囊泡的方法		
公开(公告)号	JPWO2018070479A1	公开(公告)日	2019-08-08
申请号	JP2018545052	申请日	2017-10-12
[标]发明人	栗本綾子		
发明人	犬塚 達俊 栗本 綾子		
IPC分类号	G01N33/48 G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/00		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/5076 G01N33/92 G01N1/34 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/48.S G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/68 C12Q1/00.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/AA28 2G045/AA40 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB05 2G045/BB07 2G045/BB10 2G045/BB12 2G045/BB20 2G045/BB29 2G045/BB46 2G045/BB51 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/CB12 2G045/CB14 2G045/CB17 2G045/CB19 2G045/CB20 2G045/CB21 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA17 2G045/DA20 2G045/DA30 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA38 2G045/DA57 2G045/DA60 2G045/FA11 2G045/FA16 2G045/FA34 2G045/FA37 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB13 2G045/FB15 2G045/GC11 2G045/GC15 2G045/GC30 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ01 4B063/QR16 4B063/QR54 4B063/QS13 4B063/QS33 4B063/QX02		
优先权	2016202043 2016-10-13 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了从含有细胞外囊泡的样品中回收高纯度的细胞外囊泡的方法。具体地，本发明提供了一种收集细胞外囊泡的方法，包括：（1）用螯合剂处理含细胞外囊泡的样品；和（2）从含有用螯合剂处理过的细胞外囊泡的样品中分离细胞外囊泡。

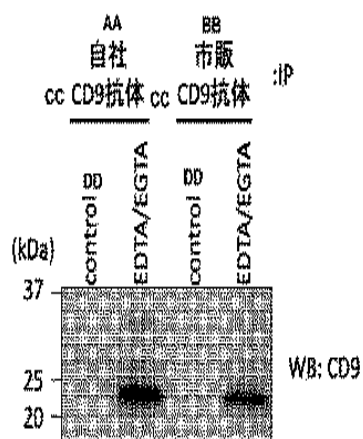


FIG. 1:
AA Product of present invention
BB Commercially available product
CC CD9 antibody
DD Control