

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/060446

発行日 平成29年3月9日 (2017.3.9)

(43) 国際公開日 平成27年4月30日 (2015.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C12M 1/26 (2006.01)</b>	C12M 1/26	2G045
<b>C12M 1/14 (2006.01)</b>	C12M 1/14	4B029
<b>C12Q 1/02 (2006.01)</b>	C12Q 1/02	4B063
<b>GO1N 33/53 (2006.01)</b>	GO1N 33/53	Y
<b>GO1N 33/48 (2006.01)</b>	GO1N 33/48	P

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

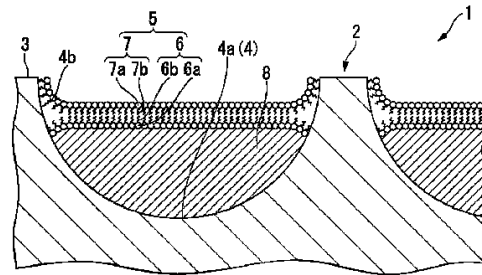
出願番号 特願2015-543937 (P2015-543937)	(71) 出願人 000003193 凸版印刷株式会社 東京都台東区台東1丁目5番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/078405	
(22) 国際出願日 平成26年10月24日 (2014.10.24)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-222751 (P2013-222751)	(74) 代理人 100139686 弁理士 鈴木 史朗
(32) 優先日 平成25年10月25日 (2013.10.25)	(74) 代理人 100064908 弁理士 志賀 正武
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100108578 弁理士 高橋 詔男
	(74) 代理人 100152146 弁理士 伏見 俊介
	(72) 発明者 牧野 洋一 東京都台東区台東1丁目5番1号 凸版印刷株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜小胞回収デバイス、膜小胞回収方法、及び膜小胞分析方法

(57) 【要約】

本発明の膜小胞回収デバイスは、液性の充填物と、前記充填物の外周の少なくとも一部を覆う脂質二重膜を有する融合膜と、を備え、膜小胞と前記融合膜とが融合することにより前記膜小胞の内容物が前記充填物に混合される。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

液性の充填物と、  
前記充填物の外周の少なくとも一部を覆う脂質二重膜を有する融合膜と、  
を備え、  
膜小胞と前記融合膜とが融合することにより前記膜小胞の内容物が前記充填物に混合される膜小胞回収デバイス。

**【請求項 2】**

請求項 1 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記充填物を保持可能な複数の保持部が形成された表面を有する反応基体をさらに備え、  
前記充填物は、複数の前記保持部の各々において前記融合膜に覆われている膜小胞回収デバイス。

10

**【請求項 3】**

請求項 2 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記保持部は前記反応基体に形成された凹部であり、  
前記融合膜は、前記凹部において前記表面と前記凹部との境界を形成する開口端に接し、  
前記凹部を塞ぐように前記反応基体に設けられ、  
前記充填物は前記凹部に充填されている膜小胞回収デバイス。

20

**【請求項 4】**

請求項 3 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記融合膜は、前記凹部の内壁面のうち前記開口端に沿う部分に結合され前記複数の凹部の各々を個別に塞ぐように前記反応基体に複数設けられている膜小胞回収デバイス。

**【請求項 5】**

請求項 4 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記反応基体は少なくとも前記内壁面が疎水性であり、前記融合膜の疎水部と前記内壁面とが結合している膜小胞回収デバイス。

**【請求項 6】**

請求項 3 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記融合膜は、前記表面に沿う面状に形成され、前記複数の凹部を塞ぐ一続きの膜状に形成される膜小胞回収デバイス。

30

**【請求項 7】**

請求項 3 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記融合膜は、生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞と前記融合膜との膜融合を促進する膜電荷調整物質を含む膜小胞回収デバイス。

**【請求項 8】**

請求項 7 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記膜電荷調整物質は、膜破壊性ペプチド、膜融合性ポリマー、pH感受性ポリマー、及びウイルス由来膜融合蛋白質のうち少なくとも1つを含む膜小胞回収デバイス。

**【請求項 9】**

請求項 1 から請求項 8 のいずれか一項に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記充填物は、溶媒と、前記溶媒に含まれる生化学分析用反応試薬と、を含む膜小胞回収デバイス。

40

**【請求項 10】**

請求項 9 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記生化学分析用反応試薬は pH 指示薬を含む膜小胞回収デバイス。

**【請求項 11】**

請求項 1 から請求項 10 のいずれか一項に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
前記充填物はゲルあるいはゾルである膜小胞回収デバイス。

**【請求項 12】**

50

請求項 1 に記載の膜小胞回収デバイスであって、  
複数の親水部および前記親水部を囲む疎水部が形成された表面を有する反応基体をさらに備え、

前記充填物は前記親水部に設けられ、前記融合膜は、前記親水部と前記疎水部との境界において前記疎水部に結合して前記充填物を包んでいる膜小胞回収デバイス。

【請求項 1 3】

生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞を請求項 1 から請求項 1 2 のいずれか一項に記載の膜小胞回収デバイスに回収する膜小胞回収方法であって、  
前記膜小胞を含む試料を前記融合膜に接触させて前記融合膜と前記膜小胞とを膜融合させる膜小胞回収方法。

10

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の膜小胞回収方法であって、  
前記試料を酸性にする pH 調整剤を前記試料に添加した後に酸性の前記試料を前記融合膜に接触させる膜小胞回収方法。

【請求項 1 5】

生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞の内容物、膜蛋白質、若しくは膜脂質を分析する膜小胞分析方法であって、

請求項 1 から請求項 1 2 のいずれか一項に記載の膜小胞回収デバイスの前記融合膜に前記膜小胞を融合させ、

前記膜小胞上の前記膜蛋白質若しくは前記膜脂質を前記融合膜において保持する膜小胞分析方法。

20

【請求項 1 6】

生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞の内容物、膜蛋白質、若しくは膜脂質を分析する膜小胞分析方法であって、

請求項 9 または請求項 1 0 に記載の膜小胞回収デバイスの前記融合膜に前記膜小胞を融合させ、

前記充填物内で前記膜小胞の内容物、膜蛋白質、若しくは膜脂質と前記生化学分析用反応試薬と反応させる膜小胞分析方法。

【請求項 1 7】

請求項 9 または請求項 1 0 に記載の膜小胞回収デバイスを用いた膜小胞分析方法若しくは請求項 1 6 に記載の膜小胞分析方法であって、

前記生化学分析用反応試薬は、核酸分析試薬、インベーター反応試薬、蛋白質分析試薬、脂質分析試薬、イムノアッセイ試薬、及びホモジニアス抗原抗体反応用試薬のうちの少なくとも 1 つを含む膜小胞分析方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学、生化学、生物工学、医学、及び医療分野における膜小胞体の分離及びその分析に係る器具及び方法に関する。

本願は、2013年10月25日に日本に出願された特願2013-222751号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

40

【背景技術】

【0002】

従来、細胞、細胞小器官等の生体由来の膜小胞、人工の膜小胞など、脂質二重膜により覆われた構造体において、この構造体の内容物や、脂質二重膜上に保持された物質等に対する分析が行われている。

【0003】

近年、細胞間情報伝達の方法として、脂質二重膜を有する小胞であるエキソソームによる方法が注目されている。

エキソソームは、蛋白質、mRNA、マイクロRNA (miRNA)、DNAなどを内

50

部に包含し、細胞間を移動することにより移動先の細胞に情報を伝達できることが知られた膜小胞である。例えば、がん細胞由来のマイクロRNAを含むエクソソームを受容した細胞において、免疫機能が活性化したり、転移能を獲得したりすることが知られている。

#### 【0004】

エクソソームには、エクソソームを放出した細胞が保持する遺伝情報その他のシグナル因子に加え、このエクソソームを受容した他の細胞の機能を制御し得る因子が含まれている。そのため、エクソソームは、疾患を診断するための新たなバイオマーカーソースとして活用できると考えられている。

たとえば、特許文献1、3には、エクソソーム内のmiRNAを分析し、がん又は有害な妊娠転帰を診断することが開示されている。

特許文献2には、siRNA (small interfering RNA) またはmiRNA治療薬による治療の効率を決定するために各RNAを測定することが開示されている。

特許文献4には、心血管系イベントを発症するリスクの指標となる蛋白質マーカーを検出することが開示されている。

特許文献5には、免疫反応性の自己抗体のレベルを測定し、がんや不妊症など自己抗体産生に関連する疾患を診断することが開示されている。

特許文献6には、尿中エクソソームのアクアポリン1を測定することにより小胞体ストレス応答および該応答に関連する腎疾患を検出することが開示されている。

#### 【0005】

エクソソームは、エクソソームを含み得る試料から、超遠心分離や密度勾配超遠心分離など、密度差による分離によって分離し、調製することができる。また、特許文献7や特許文献8に記載された方法によってもエクソソームの分離ができる。また、エクソソームを分離精製するキットが市販されている(たとえば、System Biosciences社のExoQuick、Life、あるいは、Technologies社のTotal Exosome Isolationなど)。

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0006】

【特許文献1】日本国特開2013-102768号公報

【特許文献2】日本国特表2011-524164号公報

【特許文献3】日本国特表2010-534480号公報

【特許文献4】日本国特表2013-516619号公報

【特許文献5】日本国特表2010-517048号公報

【特許文献6】日本国特開2013-7698号公報

【特許文献7】日本国特表2003-531864号公報

【特許文献8】日本国特表2002-535665号公報

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

たとえばエクソソームを遠心分離により分離する場合、分離されたエクソソームへのエクソソーム以外の夾雑物の混入が避けられず、分析精度及び再現性の向上には限界がある。

また、超遠心分離や密度勾配超遠心分離などは、エクソソームを分離するための作業手順が煩雑であり且つ分離精製に長時間を要する。

また、エクソソームを簡便に分離する従来の分離キットは、エクソソームの精製が不十分で分析の信頼性に劣る。

#### 【0008】

ところで、エクソソームの脂質二重膜に存在するテトラスパニンを利用してエクソソームを選択的に分離精製することも知られている。テトラスパニンは、たとえばヒトにおい

10

20

30

40

50

ては3種類の種類が知られている膜4回貫通型膜タンパクファミリーである。特に、CD9, CD63, CD81は、エキソソームマーカーとして知られている。しかしながら、抗テトラスパニンモノクローナル抗体を用いてエキソソームを分離精製する場合、分離対象とする抗原の種類によって、最終的に分離精製されるエキソソームに偏りが生じることがある。

また、エキソソームを分析するためにエキソソームの膜構造を破壊することがあるが、この場合、エキソソームの内容物はエキソソームの破壊過程で希釈されてしまう。希釈された状態のエキソソームを破壊することによって得られる産物を濃縮しようとする、濃縮過程で変性したり失われたりする成分があり得るので、濃縮は困難である。また、エキソソームの蛋白質を解析対象とする場合、核酸と異なり解析対象の蛋白質をin vitroで増幅することができないので、できるだけ希釈せずにエキソソームの分析をすることが求められている。

#### 【0009】

本発明は、上述した事情に鑑みてなされたものであって、その目的は、膜小胞が破壊されず膜小胞の構成要素が希釈されにくく膜小胞を選択的に回収可能な膜小胞回収デバイス及び膜小胞回収方法、並びに簡便で精度及び再現性に優れた膜小胞分析方法の提供である。

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0010】

本発明の第一態様に係る膜小胞回収デバイスは、液性の充填物と、前記充填物の外周の少なくとも一部を覆う脂質二重膜を有する融合膜と、を備え、膜小胞と前記融合膜とが融合することにより前記膜小胞の内容物が前記充填物に混合される。

#### 【0011】

上記第一態様に係る膜小胞回収デバイスは、前記充填物を保持可能な複数の保持部が形成された表面を有する反応基体をさらに備え、前記充填物は、複数の前記保持部の各々において前記融合膜に覆われていてもよい。

#### 【0012】

上記第一態様において、前記保持部は前記反応基体に形成された凹部であり、前記融合膜は、前記凹部において前記表面と前記凹部との境界を形成する開口端に接し、前記凹部を塞ぐように前記反応基体に設けられ、前記充填物は前記凹部に充填されていてもよい。

#### 【0013】

上記第一態様において、前記融合膜は、前記凹部の内壁面のうち前記開口端に沿う部分に結合され前記複数の凹部の各々を個別に塞ぐように前記反応基体に複数設けられていてもよい。

#### 【0014】

上記第一態様において、前記反応基体は少なくとも前記内壁面が疎水性であり、前記融合膜の疎水部と前記内壁面とが結合していてもよい。

#### 【0015】

上記第一態様において、前記融合膜は、前記表面に沿う面状に形成され、前記複数の凹部を塞ぐ一続きの膜状に形成されていてもよい。

#### 【0016】

上記第一態様において、前記融合膜は、生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞と前記融合膜との膜融合を促進する膜電荷調整物質を含んでもよい。

#### 【0017】

上記第一態様において、前記膜電荷調整物質は、膜破壊性ペプチド、膜融合性ポリマー、pH感受性ポリマー、及びウイルス由来膜融合蛋白質のうち少なくとも1つを含んでもよい。

#### 【0018】

上記第一態様において、前記充填物は、溶媒と、前記溶媒に含まれる生化学分析用反応

10

20

30

40

50

試薬と、を含んでもよい。

【0019】

上記第一態様において、前記生化学分析用反応試薬はpH指示薬を含んでもよい。

【0020】

上記第一態様において、前記充填物はゲルあるいはゾルであってもよい。

【0021】

上記第一態様に係る膜小胞回収デバイスは、複数の親水部および前記親水部を囲む疎水部が形成された表面を有する反応基体をさらに備え、前記充填物は前記親水部に設けられ、前記融合膜は、前記親水部と前記疎水部との境界において前記疎水部に結合して前記充填物を包んでいてもよい。

10

【0022】

本発明の第二態様に係る膜小胞回収方法は、生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞を上記第一態様に係る膜小胞回収デバイスに回収する膜小胞回収方法であって、前記膜小胞を含む試料を前記融合膜に接触させて前記融合膜と前記膜小胞とを膜融合させる。

【0023】

上記第二態様において、前記試料を酸性にするpH調整剤を前記試料に添加した後に酸性の前記試料を前記融合膜に接触させてもよい。

【0024】

本発明の第三態様に係る膜小胞分析方法は、生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞の内容物、膜蛋白質、若しくは膜脂質を分析する膜小胞分析方法であって、上記第一態様に係る膜小胞回収デバイスの前記融合膜に前記膜小胞を融合させ、前記膜小胞上の前記膜蛋白質若しくは前記膜脂質を前記融合膜において保持する。

20

【0025】

本発明の第四態様に係る膜小胞分析方法は、生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞の内容物、膜蛋白質、若しくは膜脂質を分析する膜小胞分析方法であって、上記第一態様に係る膜小胞回収デバイスの前記融合膜に前記膜小胞を融合させ、前記充填物内で前記膜小胞の内容物、膜蛋白質、若しくは膜脂質と前記生化学分析用反応試薬と反応させる。

【0026】

上記第一態様に係る膜小胞回収デバイスを用いた膜小胞分析方法、若しくは上記第四態様に係る膜小胞分析方法において、前記生化学分析用反応試薬は、核酸分析試薬、インペーダー反応試薬、蛋白質分析試薬、脂質分析試薬、イムノアッセイ試薬、及びホモジニアス抗原抗体反应用試薬のうち少なくとも1つを含んでもよい。

30

【発明の効果】

【0027】

本発明の上記各態様によれば、膜小胞の構成要素が希釈されにくく膜小胞を選択的に回収可能な膜小胞回収デバイス及び膜小胞回収方法、並びに簡便で精度及び再現性に優れる膜小胞分析方法を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

40

【0028】

【図1】本発明の第1実施形態に係る膜小胞回収デバイスを示す斜視図である。

【図2】図1に符号Xで示す部分の拡大図である。

【図3A】図2のA-A線における模式的な断面図である。

【図3B】本発明の第1実施形態に係る膜小胞回収デバイスの他の構成例を示す断面図である。

【図4】本発明の第1実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

【図5】本発明の第1実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

50

【図 6】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

【図 7】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

【図 8】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

【図 9】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

【図 10】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

10

【図 11】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

【図 12】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの製造工程を説明するための図である。

【図 13】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスの他の構成例を示す模式図である。

【図 14 A】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスのさらに他の構成例を示す模式図である。

【図 14 B】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスのさらに他の構成例を示す模式図である。

20

【図 15】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを使用した膜小胞回収方法を説明するための図である。

【図 16】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを使用した膜小胞回収方法を説明するための図である。

【図 17】本発明の第 1 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを使用した膜小胞回収方法を説明するための図である。

【図 18】本発明の第 2 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを示す模式的な断面図で、図 2 の B - B 線と同様の線における断面図である。

【図 19】図 18 の模式的な拡大図である。

【図 20】本発明の第 3 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを示す模式的な拡大断面図である。

30

【図 21】本発明の第 4 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを示す模式的な拡大断面図である。

【図 22】本発明の第 5 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを示す模式的な拡大断面図である。

【図 23】本発明の第 5 実施形態に係る膜小胞回収デバイスを示す模式的な拡大断面図である。

【図 24】本発明に係る膜小胞回収デバイスの反応後のウェルの蛍光量を測定した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

40

【0029】

(第 1 実施形態)

本発明の第 1 実施形態について説明する。図 1 は、本実施形態の膜小胞回収デバイスを示す斜視図である。図 2 は、図 1 に符号 X で示す部分の拡大図である。図 3 は、図 2 の A - A 線における模式的な断面図である。

【0030】

図 1 から図 3 B に示すように、本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 は、反応基体 2 と、融合膜 5 と、充填物 8 とを備える。

反応基体 2 は、表面 3 に複数の凹部 4 が形成された板状部材である。反応基体 2 において、凹部 4 の開口端 4 b と表面 3 とは疎水性である。本実施形態では、反応基体 2 はガラ

50

すまたはシリコン製である。凹部 4 となる微細ウェルは、反応基体 2 の表面がジシラザン処理により疎水性処理された後に、反応基体 2 の表面に作製されている。本実施形態では、凹部 4 の内壁面 4 a は親水性である。

#### 【0031】

融合膜 5 は、凹部 4 を塞ぐ脂質二重膜である。すなわち、融合膜 5 は、反応基体 2 に近い位置に位置する第一層 6 と、第一層 6 上に積層された第二層 7 とを有する。第一層 6 と第二層 7 とは、それぞれ、親水部 6 a , 7 a と疎水部 6 b , 7 b とを有している。融合膜 5 は、凹部 4 において反応基体 2 の表面 3 と凹部 4 との境界を形成する開口端 4 b に接している。本実施形態の融合膜 5 は、凹部 4 の内壁面 4 a のうち凹部 4 の開口端 4 b に沿う部分に結合されている。また、本実施形態では、複数の凹部 4 の各々を個別に塞ぐように、複数の融合膜 5 が反応基体 2 の凹部 4 の各々に対して設けられている。

10

凹部 4 において、融合膜 5 の疎水部、凹部 4 の開口端 4 b、及び疎水性の表面 3 が結合している。

#### 【0032】

充填物 8 は、凹部 4 に充填された液体である。また、充填物 8 はゲルあるいはゾルであってもよい。充填物 8 は、回収対象の膜小胞に対して、変性や分解が起こらない組成を有していることが好ましい。また、充填物 8 は、回収対象の膜小胞において分析の妨げとなる物質を分解又は不活化するための物質を含んでいてもよい。また、本実施形態では、融合膜 5 の充填物 8 と対向する面とは反対の面に水系の溶媒（不図示）が存在する。

20

#### 【0033】

次に、本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 の製造方法について説明する。図 4 から図 12 は、膜小胞回収デバイス 1 の製造工程を説明するための図である。

まず、反応基体 2 を成形する。反応基体 2 は、図 4 に示すように、板状のガラス若しくは板状の樹脂部材からなる母材 9 に対して、エキソソーム 11 等の膜小胞が収納可能な大きさを有する凹部 4 をアレイ状に配置することにより成形される。凹部 4 のアレイは、成形型を用いた母材 9 への転写や、母材 9 の切削等によって母材 9 に形成される。

凹部 4 は、例えば 1  $\mu$ m の直径、1  $\mu$ m の深さを有する形状であってもよい。

また、母材 9 が親水性の材料から形成される場合には、凹部 4 が成形された後に母材 9 の外面に対して疎水化処理を行う。疎水化処理は、たとえば、母材 9 の外面に対するジシラザン処理などの表面改質である。

30

#### 【0034】

次に、図 4 及び図 5 に示すように、反応基体 2 に形成された凹部 4 内に充填物 8 を充填する。充填物 8 は、融合膜 5 を凹部 4 に結合させる後述の工程における水槽 100 内の液体でもよい。

#### 【0035】

次に、凹部 4 を塞ぐ融合膜 5 を各凹部 4 に結合させる。融合膜 5 は、アラキドン酸やステアリン酸などの両親媒性分子を有機溶媒に溶かして図 6 に示す水槽 100 の水面上に展開し、パリアにより分子を圧縮することによって得られる 2 次元固体膜 10（図 7 参照）から形成される。この 2 次元固体膜 10 は、脂質二重膜における第一層 6 及び第二層 7 を構成する単分子膜である。水面上に 2 次元固体膜 10 が形成された状態では、水面上に親水部 10 a が接し、疎水部 10 b は外気に露出される。

40

融合膜 5 を反応基体 2 に結合させるためには、まず、図 7 に示すように、反応基体 2 を水槽 100 内に保持し、上記の 2 次元固体膜 10 を水面上に形成する。続いて、図 8 に示すように、水面上の 2 次元固体膜 10 を固体状態に保ったまま、水槽 100 中の反応基体 2 を水槽 100 から引き上げる。このとき、反応基体 2 において凹部 4 が形成された表面 3 が鉛直となるように反応基体 2 を引き上げることで、2 次元固体膜 10 が、反応基体 2 の表面 3 の凹部 4 を覆うように、反応基体 2 の表面 3 に付着する。このとき、図 9 に示すように、反応基体 2 に付着した 2 次元固体膜 10 は、融合膜 5 の第一層 6 となる。

2 次元固体膜 10 が凹部 4 を覆って反応基体 2 の表面 3 に付着したあと、再び、図 10 に示すように、反応基体 2 が水槽 100 中に挿入される。このとき、水面上には、上記の 2

50

次元固体膜 10 が存在する。

図 1 1 に示すように、反応基体 2 が水槽 100 中に挿入されることにより、水面に形成された 2 次元固体膜 10 の疎水部 10 b と第一層 6 の疎水部 6 b とが接し、融合膜 5 の第二層 7 が反応基体 2 の表面 3 で凹部 4 を覆うように形成される。

融合膜 5 の第一層 6 及び第二層 7 が反応基体 2 の表面 3 に形成された後、図 1 2 に示すように、2 次元固体膜 10 を水面から除去し、その後膜小胞回収デバイス 1 を水槽 100 から引き上げる。このとき、反応基体 2 の表面 3 のうち凹部 4 でない部分では、融合膜 5 の第一層 6 における親水部 6 a が疎水性処理をした表面 3 に対して結合力が弱いことにより、融合膜 5 の第一層 6 が表面 3 から外れる。すると、凹部 4 の開口端 4 b 近傍の部分と、融合膜 5 の疎水部 6 b とが結合 (図 3 A 参照) する。このため、複数の凹部 4 は融合膜 5 によってそれぞれ個別に塞がれる。また、融合膜 5 の疎水部 7 b は表面 3 に結合 (図 3 B 参照) した状態となる場合もある。この場合でも、複数の凹部 4 は塞がれる。

10

#### 【0036】

本実施形態における反応基体 2 が持つ凹部 4 は垂直方向でなくてもよい。たとえば図 1 3 に示すように反応基体 2 の面方向に対して凹部 4 が水平方向に形成されていてもよい。

すなわち、反応基体 2 は、凹部 4 が形成された中間層 2 A と、中間層 2 A を間に挟む一対の外層 2 B とを有し、中間層 2 A に形成された凹部 4 に融合膜 5 が形成されていてもよい。このとき、反応基体 2 に設ける脂質二重膜の形成方法としては、上記の方法によるほか、日本国特開 2009 - 128206 号公報に記載される方法などが利用できる。

20

#### 【0037】

また、本実施形態における反応基体 2 は凹部 4 を持たなくてもよい。例えば、凹部 4 に代えて、たとえば図 1 4 A あるいは図 1 4 B に示すように平面上に親水部 4 A と疎水部 4 B とを持っていてもよい。この場合、親水部 4 A が上記の凹部 4 として機能する。すなわち、親水性の親水部 4 A には充填物 8 が留まり、充填物 8 を包むように融合膜 5 が設けられ、融合膜 5 は親水部 4 A と疎水部 4 B との境界近傍において疎水部 4 B に結合している。

このような構成の器具は、たとえば、日本国特開 2009 - 128206 号公報に記載の方法により平面上に設けられた液滴表面に脂質二重膜を形成することで製造し得る。具体的には、図 1 4 A 及び図 1 4 B に示す外層 2 B の間に充填物 8 を流し込んだあと、脂質溶液入りの有機溶媒を流し込み、最後に溶解物を含まない緩衝液を流し込む。これによって、充填物 8 の外面を覆う脂質二重膜から形成される融合膜 5 を形成できる。この際、融合膜 5 は、反応基体 2 の疎水部 4 B の疎水度、溶質の種類により図 1 4 A 若しくは図 1 4 B に示すいずれかの形状をとる。

30

#### 【0038】

次に、本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 を用いた膜小胞回収方法について説明する。

図 1 5 から図 1 7 は、膜小胞回収デバイス 1 を使用した膜小胞回収方法を説明するための図である。

本実施形態の膜小胞回収方法は、生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞を本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 に回収する膜小胞回収方法である。

本実施形態においては、膜小胞の回収の例として、エキソソーム 11 を回収する例を示す。

40

#### 【0039】

まず、エキソソーム 11 を含み得る試料を調製する。エキソソーム 11 を含み得る試料は、たとえば、体液や、培養細胞の培養上清であってよい。また、人工的に調製したりボソームを含む溶液を試料であってよい。

#### 【0040】

続いて、図 1 5 及び図 1 6 に示すように、試料を融合膜 5 に接触させて融合膜 5 とエキソソーム 11 とを膜融合させる。

凹部 4 がアレイ状に配置された反応基体 2 においては、各凹部 4 を塞ぐ脂質二重膜から形成される融合膜 5 が各凹部 4 の内壁面 4 a (図 3 A 及び図 3 B 参照) に結合している。

50

このため、エキソソーム 11 などの膜小胞が融合膜 5 に近接すると、膜融合を経て、エキソソーム 11 などの膜小胞の内容物が凹部 4 の内部へ移動する（図 17 参照）。膜小胞の内容物が凹部 4 の内部へ移動する過程において、エキソソーム 11 の内部と凹部 4 の内部が連通した状態で、エキソソーム 11 の内部と外界とは脂質二重膜により仕切られている。このため、エキソソーム 11 の内容物は外界へは拡散せず、エキソソーム 11 の融合後、凹部 4 は、エキソソーム 11 の内容物が収容されて脂質二重膜で塞がれ閉ざされた容器となる。

#### 【0041】

脂質二重膜による膜融合は脂質二重膜の自発的な性質であるが、それをブロックするのは膜を構成するリン脂質のリン酸基の負電荷による斥力（反発力）である。エキソソーム 11 等の膜小胞が融合膜 5 に頻度良く融合するためには、エキソソーム 11 膜上の負電荷と融合膜 5 の負電荷とを合わせれば良い。しかしながら、エキソソーム 11 上の負電荷はエキソソーム 11 の膜蛋白質に依存するので、エキソソーム 11 に合わせて融合膜 5 の負電荷を調整するのは煩雑となり得る。

10

#### 【0042】

膜小胞を融合膜 5 に対して高頻度に融合させるためには、膜小胞と融合膜 5 との間の物理的な距離を縮めることが重要である。エキソソーム 11 を含む溶液の体積が少ない場合、エキソソーム 11 と融合膜 5 との物理的距離が縮まり、エキソソーム 11 が融合膜 5 に接触する頻度が高い。また、エキソソーム 11 を含む溶液におけるエキソソーム 11 の濃度が高い場合も、エキソソーム 11 が融合膜 5 に接触する頻度が高い。また、単にエキソソーム 11 の濃度を高めるだけであると、1 つの凹部 4 に複数のエキソソーム 11 が回収される可能性も上がってしまう。

20

#### 【0043】

試料を酸性にする pH 調整剤を試料に添加してから酸性となった試料を融合膜 5 に接触させることによっても、膜融合効率を上げることができる。

#### 【0044】

次に、本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 を用いた膜小胞分析方法について説明する。

本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 は、エキソソーム 11 などの膜小胞を凹部 4 内にトラップし、エキソソーム 11 の構成要素である分子を分析可能である。

本実施形態では、膜小胞回収デバイス 1 の融合膜 5 にエキソソーム 11 などの膜小胞を融合させることで、エキソソーム 11 の内容物は充填物 8 内に保持され、エキソソーム 11 の膜蛋白質や膜脂質は融合膜 5 上に保持される。

30

このため、各凹部 4 においてエキソソーム 11 の構成要素に対する分析ができる。たとえば、融合膜 5 上に保持された膜貫通蛋白質等に対する分析としては、イムノアッセイが挙げられる。具体的な分析方法の例としては、エキソソーム 11 に多く発現していることが知られている CD9, CD63, 及び CD81 の定量が挙げられる。CD9, CD63, 及び CD81 は、エキソソーム 11 が融合膜 5 と融合することで融合膜 5 上に保持され、抗 CD9 抗体, 抗 CD63 抗体, 及び抗 CD81 抗体を用いてそれぞれ定量可能である。

#### 【0045】

このように、本実施形態の膜小胞分析方法によれば、膜小胞由来の生体分子を凹部 4 において検出、定量可能である。これにより、膜小胞に含まれる構成要素に対して簡便且つ精度及び再現性が高い分析をすることができる。

40

#### 【0046】

（第 2 実施形態）

本発明の第 2 実施形態について説明する。図 18 は、本実施形態の膜小胞回収デバイスを示す模式的な断面図で、図 2 の B - B 線と同様の線における断面図である。図 19 は、図 18 の模式的な拡大図である。

図 18 及び図 19 に示すように、本実施形態の膜小胞回収デバイス 1A は、第 1 実施形態で説明した反応基体 2 に代えて、反応基体 2 とは材質が異なる反応基体 2A を備える。

50

本実施形態では、反応基体 2 A の表面 3 A は親水性である。たとえば、本実施形態の反応基体 2 A は親水性の材料により形成される。なお、反応基体 2 A の母材が疎水性の材料から形成される場合には、凹部 4 が成形された後に母材の外面对して親水化処理を行う。親水化処理は、たとえば、母材の外面对するプラズマ処理などの表面改質である。

本実施形態では、融合膜 5 の親水部が反応基体 2 A の表面 3 A に好適に結合する。このため、融合膜 5 は、反応基体 2 A の表面 3 A に沿う面状に形成され、複数の凹部 4 を塞ぐ一続きの膜状に形成される。

このような構成であっても上記第 1 実施形態と同様の効果を奏する。

#### 【0047】

(第 3 実施形態)

本発明の第 3 実施形態について説明する。図 20 は、本実施形態の膜小胞回収デバイスを示す模式的な拡大断面図である。

図 20 に示す本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 B は、融合膜 5 が、膜小胞と融合膜 5 との融合を促進する膜電荷調整物質 1 2 を含む。

膜電荷調整物質 1 2 は、膜破壊性ペプチド、膜融合性ポリマー、pH 感受性ポリマー、及びウイルス由来膜融合蛋白質のうち少なくとも 1 つを含む。

本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 B においては、エキソソームを含んだ溶液を融合膜 5 に接触するように添加したときに、融合膜 5 に組み込まれた膜電荷調整物質 1 2 が融合膜 5 の膜電荷を調整し膜小胞に対する膜融合を促進する。

本実施形態では、上記第 1, 2 実施形態と比較して、エキソソームなどの膜小胞の回収効率がさらに高い。

#### 【0048】

(第 4 実施形態)

本発明の第 4 実施形態について説明する。図 21 は、本実施形態の膜小胞回収デバイスを示す模式的な拡大断面図である。

図 21 に示す本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 C は、充填物 8 が、溶媒 1 3 と、溶媒 1 3 に含まれた生化学分析用反応試薬 1 4 とを含む。生化学分析用反応試薬 1 4 は、核酸分析試薬、インベダー反応試薬、蛋白質分析試薬、脂質分析試薬、イムノアッセイ試薬、及びホモジニアス抗原抗体反応用試薬のうち少なくとも 1 つを含む。

また、本実施形態では、生化学分析用反応試薬 1 4 が、溶媒 1 3 としての水系バッファーに溶解された状態で充填物 8 が形成されてもよいし、ゲルあるいはゾルに加工されて充填物 8 が形成されてもよい。充填物 8 がゲルあるいはゾルであると、膜小胞回収デバイス 1 C の製造時に水槽 100 (図 7 参照) 内に反応基体 2 を入れたときに生化学分析用反応試薬 1 4 が水槽 100 内に拡散しにくい。

#### 【0049】

次に、本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 C を用いた膜小胞分析方法について説明する。

本実施形態の膜小胞分析方法は、生体由来又は人工の小胞であって脂質二重膜に覆われた膜小胞の内容物若しくは膜蛋白質若しくは膜脂質を凹部 4 内で分析する方法である。

本実施形態では、上記第 1 実施形態で説明したのと同様に、エキソソーム等の膜小胞を融合膜 5 に融合させる。

#### 【0050】

本実施形態では、凹部 4 内に予め満たしておく充填物 8 に、分析対象物と反応する酵素、基質などの生化学分析用反応試薬 1 4 が存在するので、生化学分析用反応試薬 1 4 の種類に対応した反応を凹部 4 内で起こさせることができる。

#### 【0051】

例えばマイクロ RNA その他の核酸検出であれば、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ、及び検出用蛍光試薬を凹部 4 内に入れておけば良い。或いは蛋白質の検出であれば、蛍光標識した抗体のサンドイッチ反応で FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) が起こるようなホモジニアス系のイムノアッセイ試薬を凹部 4 内に入れておけばよい。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 5 2 】

本実施形態では、凹部 4 内に外界の夾雑物が入り込まない状態で凹部 4 内の物質に対して分析をすることができるので、夾雑物を取り除くための洗浄が不要である。そのため、洗浄によって分析対象物に変性したり失われたりする可能性を排除できるので、エキソソーム 1 1 の分離精製及び分析の過程において洗浄を要する方法と比較して、分析の精度及び再現性に優れる。

さらに、分析に必要な試薬を予め凹部 4 内に含ませておくことにより、凹部 4 内に取り込まれた分析対象物に対する生化学的反応を速やかに実施することが可能である。このため、実験系において活性が失われるのが早い物質などに対する分析を簡便に行うことができる。

10

## 【 0 0 5 3 】

さらに、本実施形態の膜小胞回収デバイス 1 C、膜小胞回収方法、及び膜小胞分析方法によれば、凹部 4 内に生化学分析用反応試薬 1 4 を含んでいるので、エキソソーム等の膜小胞の構成要素に対する分析を、膜小胞の分離に引き続いて簡便且つ迅速に行うことができる。

また、融合膜 5 上のテトラスパニンの検出と凹部 4 内での生化学分析とをあわせて行うことにより、反応基体 2 上の複数の凹部 4 のうち、エキソソームが入っている凹部 4 とエキソソームが入らなかった凹部 4 とを区別し、エキソソームが入っている凹部 4 のみを対象とした生化学分析結果を得ることができる。

なお、各凹部 4 におけるテトラスパニンを定量することによって、一つの凹部 4 に対して何個のエキソソームが入っているかを推定することもできる。

20

## 【 0 0 5 4 】

(変形例)

次に、上記実施形態の変形例について図 2 1 を参照して説明する。

本変形例では、図 2 1 に示す生化学分析用反応試薬 1 4 は、上記の試薬に加えて、pH 指示薬をさらに含む。本変形例では、反応基体 2 上の複数の凹部 4 のうち、エキソソーム 1 1 が入っている凹部 4 とエキソソーム 1 1 が入らなかった凹部 4 とを pH 指示薬を用いて区別することができる。

また、凹部 4 の容積及び pH 指示薬の量が各凹部 4 において一定になるように構成された膜小胞回収デバイス 1 を用いれば、一つの凹部 4 に対して何個のエキソソーム 1 1 が入っているかを pH 指示薬を用いて推定することもできる。

30

## 【 0 0 5 5 】

(第 5 実施形態)

本発明の第 5 実施形態について説明する。図 2 2 は、本発明の第 5 実施形態に係る膜小胞体回収デバイス 1 D の断面図である。本実施形態に係る膜小胞体回収デバイスは、凹部 4 を有する基材 (反応基体) 2 C と、平滑な基材 (反応基体) 2 D とで構成されている。また、本実施形態に係る膜小胞体回収デバイスは、2 つの基材の間に設けられた流路 1 5 を備えている。流路 1 5 は液体を凹部 4 に送液可能である。流路 1 5 を通じて充填物 8 が凹部 4 に充填され、脂質溶液を含む有機溶媒が凹部 4 に送液される。この後にさらに、水系の溶媒 1 7 が凹部 4 に送液される。これによって、図 2 3 に示すように、充填物 8 を覆い、凹部 4 を塞ぐ融合膜 5 を各凹部 4 に結合させることができる。この水系の溶媒 1 7 は、図 1 4 A、1 4 B に記載された緩衝液 1 6 のように、融合膜 5 の親水部が水系の溶媒に向く構成を有すれば、特に溶媒の種類は問わない。例えば、血清、血液等のサンプル、試薬、バッファなどの水溶液が挙げられる。また、水系の溶媒は、膜小胞体を含んでも良い。

40

## 【 0 0 5 6 】

本実施形態に係る膜小胞体回収デバイスにおいて、凹部は樹脂やガラス等で形成されていてもよく、基材と同じ材料で形成されていてもよい。また、凹部は樹脂成型加工などによって基材と一体化していてもよい。樹脂としては、シクロオレフィンポリマー、シリコン、ポリプロピレン、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリ酢酸ビニル

50

などから選ぶことができるが、これらに限られない。基材は剛性を持つ材料から形成されていればよく、樹脂やガラス等で形成されていれば良い。透過によって微小孔を観察する場合には、基材は透明であるほうが良い。また、フォトリソグラフィーで疎水部を形成してもよく、樹脂としてはCYTOP（旭硝子社製）などの疎水性の高い材料が選ばれる。

【0057】

次に、以下に示す実施例に基づいて、本実施形態の膜小胞回収デバイス、膜小胞回収方法、及び膜小胞分析方法についてより詳細に説明する。

【実施例1】

【0058】

(1) 脂質二重膜でコートしたインベーター反応試薬充填ウェル平板の作製

インプリントにより直径1 $\mu$ m、深さ1 $\mu$ mの微細孔（ウェル，凹部）をアレイ状に配置したPDMS製の平板を作製し、プラズマ発生装置でプラズマ処理を行いウェル部だけを親水化処理した。平板は1辺1cm、厚さ5mmとし、9 $\times$ 10<sup>6</sup>ウェルを中央に配置した。ウェルへインベーター反応試薬（1 $\mu$ M アレルプローブ、0.4 $\mu$ M インベーターオリゴ、1 $\mu$ M FAM標識アーム、20 $\mu$ M MOPS pH7.5、15mM NaCl、6.25mM MgCl<sub>2</sub>、50U/ $\mu$ L クリベース）を充填するために、平板上に試薬溶液5 $\mu$ Lを滴下しカバーガラスで覆い、減圧下でウェル内部に試薬溶液を注入後、カバーガラスを剥がして風乾した。

【0059】

0.0013gのオキソチタニウムフタロシアニンを、0.1mol/Lのトリクロロ酢酸を含むジクロロメタン10mLに溶かして、LB膜用試料溶液を調製した。この試料溶液を水面上に滴下して単分子膜を形成し、市販のLB膜作製装置を用いLB膜を作製した。インベーター反応試薬をウェルに充填した平板を予め水槽に沈めておき、引き上げるにより平板表面上に単分子膜を移し取り、再度水槽に沈めて二重膜を作製した。

【0060】

(2) リポソームで封入したオリゴヌクレオチドの反応

エキソソームのモデルとして、基質となるオリゴヌクレオチドをリポソーム試薬（ライフテクノロジー社、リポフェクタミン）で封入後段階希釈し、試料溶液を得た。その後、上記(1)のインベーター反応試薬充填ウェル平板上に試料溶液を滴下し、カバーガラスを載せ軽く押し付け、62のオープンにて15分間インキュベートした。反応後のウェルを蛍光顕微鏡（ツァイス社、AX10）、対物レンズ（ECP lan-Neofluar 40 $\times$  oil NA1.3）、光源（LEJ社、FluoArc001.26A Usable with HBO 10）、センサー（浜松ホトニクス社、EM-CCD C9100）、フィルター（オリンパス社、U-MNIBA2）、解析ソフト（浜松ホトニクス社、AQUACOSMOS 2.6：露光時間 64.3ms、EMゲイン 180、オフセット 0、ピンング  $\times$ 1）にて蛍光量を測定（5ウェルを選び、21ピクセルの蛍光量の平均値を求めた）すると共に、蛍光を発するウェル数を計測した。その結果、リポソーム量に応じて一定量の蛍光を発するウェル数が増加することが確認された。

【実施例2】

【0061】

(1) 脂質二重膜を持つ膜小胞体回収デバイスの作製

0.5mm厚のガラス基材にCYTOP（旭硝子社製）をスピンコートし、180で3時間熱硬化させ、フォトリソグラフィー技術を使って直径5 $\mu$ mの微小孔（ウェル，凹部）を100万個持つ微小孔チップを作製した。微小孔チップとの隙間が100 $\mu$ mとなるように、微小孔チップの上部に送液ポート付きのガラス基材を設置した。これにより、2つの基材の間に設けられた流路を作製した。流路は微小孔に液体を送液可能である。インベーター反応試薬（1 $\mu$ M アレルプローブ、0.4 $\mu$ M インベーターオリゴ、1 $\mu$ M FAM標識アーム、20 $\mu$ M MOPS pH7.5、15mM NaCl、6.25mM MgCl<sub>2</sub>、50U/ $\mu$ L クリベース）をサンプルポートより凹部に送液し、

10

20

30

40

50

脱気することで微細な凹部に反応試薬を充填した。凹部に、D O P E と D O P G との混合脂質を 4 m g / m l になるように溶解したヘキサデカン を 4 0 μ L 送液した。凹部にバッファー ( 2 0 μ M M O P S p H 7 . 5 、 1 5 m M N a C l 、 6 . 2 5 m M M g C l 2 ) を 4 0 μ L 送液した。

【 0 0 6 2 】

( 2 ) リポソームで封入したオリゴヌクレオチドの反応

エキソソームのモデルとして、基質となるオリゴヌクレオチドをリポソーム試薬 ( ライフテクノロジー社、リポフェクタミン ) で封入し、試料溶液を得た。その後、上記のインベーター反応試薬が充填されたウェル上に試料溶液を送液し、さらにオイルを送液することで試料溶液を液滴化した。その後、62 のオープンにて15分間インキュベートした。反応後のウェルを蛍光顕微鏡にて蛍光量を測定した。測定結果を図23に示す。

10

【 0 0 6 3 】

以上、本発明の実施形態及び実施例について図面を参照して詳述したが、具体的な構成はこの実施形態に限られず、本発明の要旨を逸脱しない範囲の設計変更等も含まれる。

たとえば、上記実施形態3, 4, 及び5において、上記第1実施形態で説明したように融合膜5の疎水部7bが反応基体2の表面3に結合していてもよい。

また、上述の各実施形態において示した事項は適宜に組み合わせて構成することが可能である。

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 6 4 】

20

本発明は、エキソソームの分離、細胞小器官の分離その他膜小胞の分離に利用できる。

また、本発明は、膜小胞の構成要素の分析に利用できる。

【 符号の説明 】

【 0 0 6 5 】

1, 1 A, 1 B, 1 C, 1 D 膜小胞回収デバイス

2 反応基体

3 表面

4 凹部

5 融合膜

6 第一層

30

6 a 親水部

6 b 疎水部

7 第二層

7 a 親水部

7 b 疎水部

8 充填物

9 母材

1 0 2次元固体膜

1 0 a 親水部

1 0 b 疎水部

40

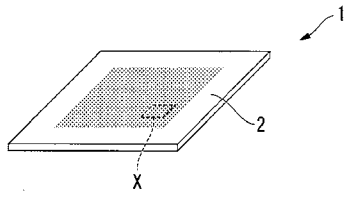
1 1 エキソソーム

1 2 膜電荷調整物質

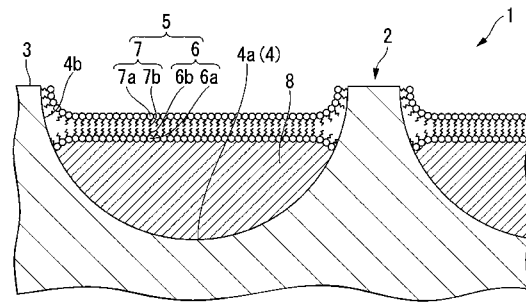
1 3 溶媒

1 4 生化学分析用反応試薬

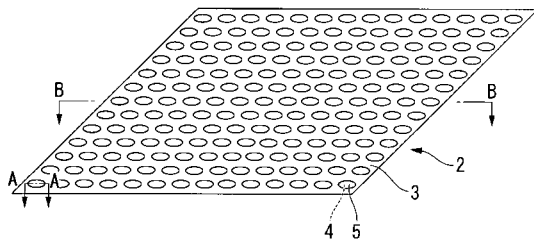
【 図 1 】



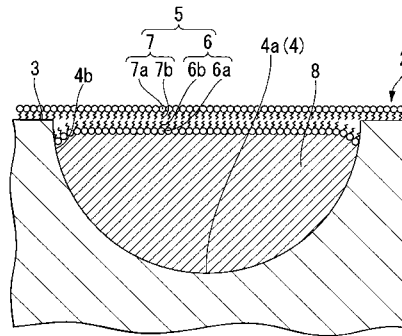
【 図 3 A 】



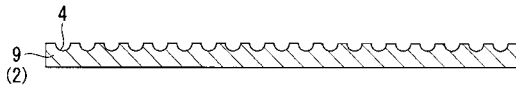
【 図 2 】



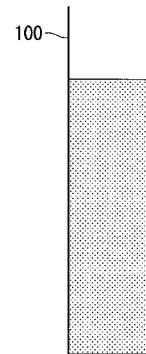
【 図 3 B 】



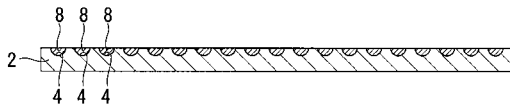
【 図 4 】



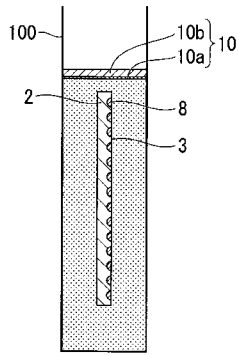
【 図 6 】



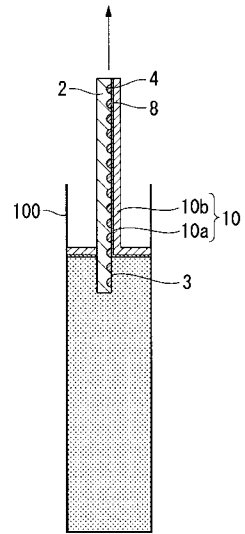
【 図 5 】



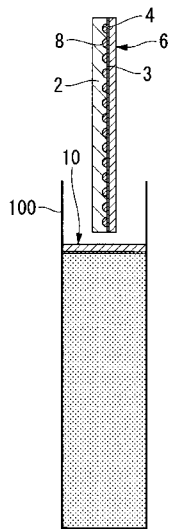
【 図 7 】



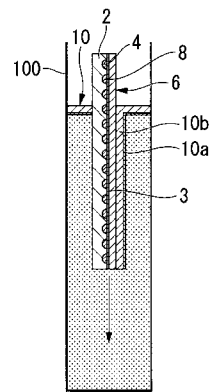
【 図 8 】



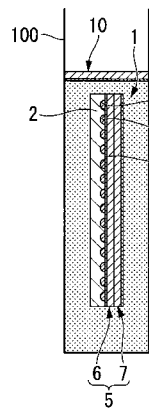
【 図 9 】



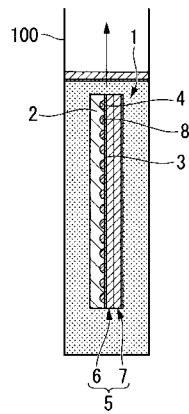
【 図 1 0 】



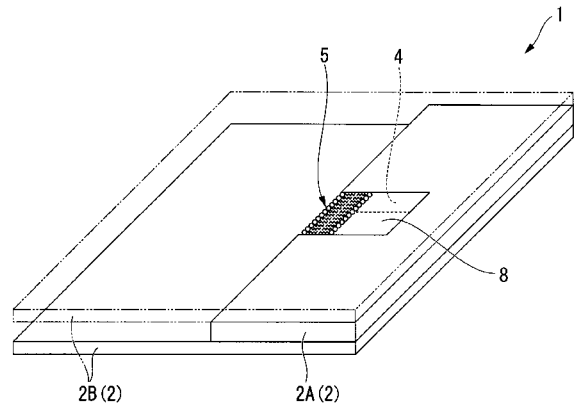
【 図 1 1 】



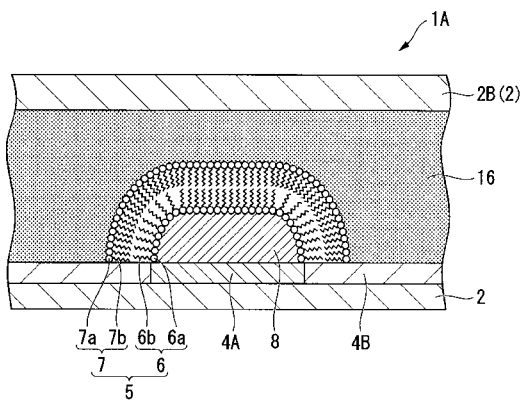
【 図 1 2 】



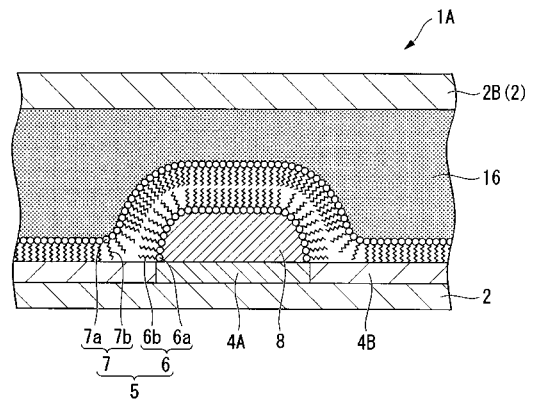
【 図 1 3 】



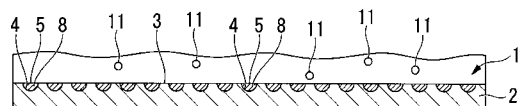
【 図 1 4 A 】



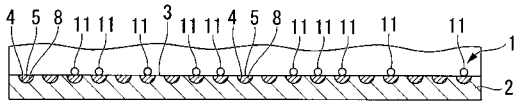
【 図 1 4 B 】



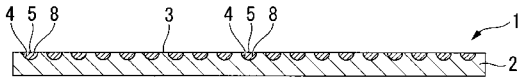
【 図 1 5 】



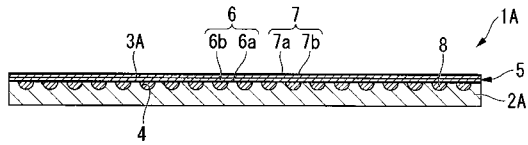
【 図 1 6 】



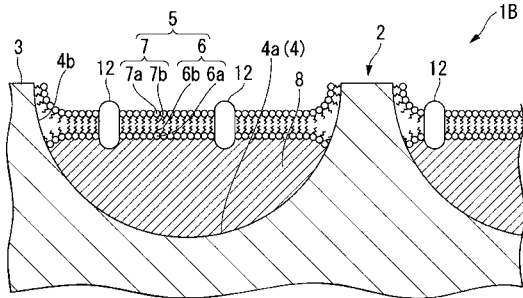
【 図 1 7 】



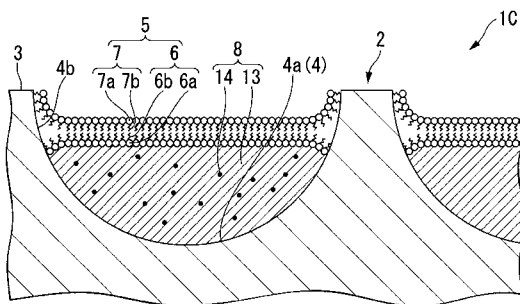
【 図 1 8 】



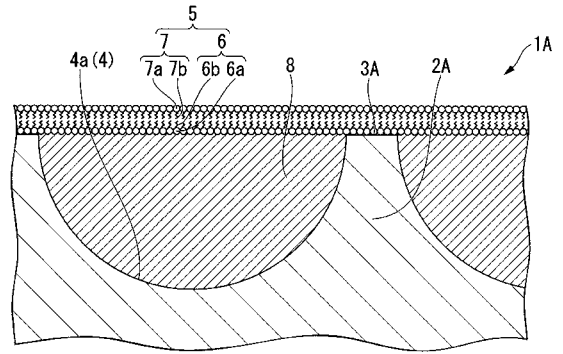
【 図 2 0 】



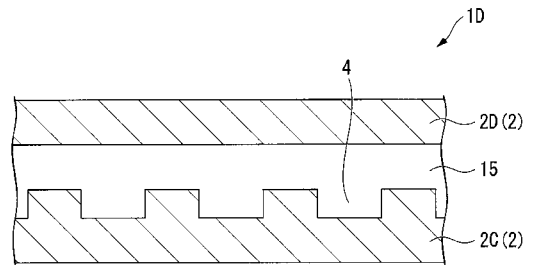
【 図 2 1 】



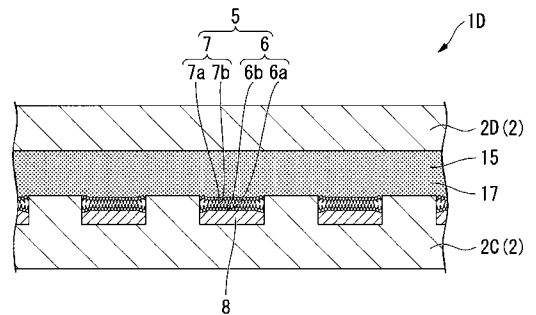
【 図 1 9 】



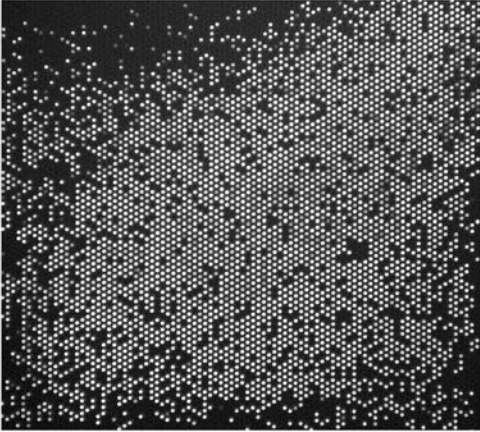
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2014/078405
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12M1/26(2006.01)i, C12M1/14(2006.01)i, C12Q1/00(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12M1/26, C12M1/14, C12Q1/00  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAlplus/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), Thomson Innovation		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2005-185972 A (Toshiba Corp.), 14 July 2005 (14.07.2005), paragraphs [0284] to [0285], [0426] to [0430], [0502]; fig. 20, 39, 50 (Family: none)	1, 9-11, 13-17/2-8, 12
Y/A	JP 2011-516867 A (The Regents of the University of California), 26 May 2011 (26.05.2011), paragraph [0003] & US 2011/0108422 A1 & EP 2260297 A2 & WO 2009/146143 A2	1, 9-11, 13-17/2-8, 12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 20 January 2015 (20.01.15)		Date of mailing of the international search report 27 January 2015 (27.01.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/078405

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-128206 A (The University of Tokyo), 11 June 2009 (11.06.2009), fig. 1 to 3, 8 & US 2010/0304980 A1 & EP 2219032 A1 & WO 2009/069608 A1	1-17
A	JP 2013-500858 A (ISIS Innovation Ltd.), 10 January 2013 (10.01.2013), fig. 1, 13 & US 2012/0220481 A1 & EP 2462453 A1 & WO 2011/015870 A1	1-17
A	HARDY, G. J. et al., Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion, Curr Opin Colloid Interface Sci., 2013.10.01, Vol. 18, No. 5, pp.448-458	1-17

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 8 4 0 5	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12M1/26(2006.01)i, C12M1/14(2006.01)i, C12Q1/00(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. C12M1/26, C12M1/14, C12Q1/00			
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/WPIDS/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), Thomson Innovation			
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	
Y/A	JP 2005-185972 A (株式会社東芝) 2005.07.14, 段落【0284】 - 【0285】、【0426】 - 【0430】、【0502】、 図20、39、50 (ファミリーなし)	1,9-11,13-17 /2-8,12	
Y/A	JP 2011-516867 A (ザ レジエンツ オブ ザ ユニヴァースティ オブ カリフォルニア) 2011.05.26, 段落【0003】 & US 2011/0108422 A1 & EP 2260297 A2 & WO 2009/146143 A2	1,9-11,13-17 /2-8,12	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。		<input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。	
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 20.01.2015		国際調査報告の発送日 27.01.2015	
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) 高山 敏充	4B 4153
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 8 4 0 5
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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	JP 2009-128206 A (国立大学法人 東京大学) 2009.06.11, 図 1 - 3、8 & US 2010/0304980 A1 & EP 2219032 A1 & WO 2009/069608 A1	1-17
A	JP 2013-500858 A (アイシス・イノベーション・リミテッド) 2013.01.10, 図 1、13 & US 2012/0220481 A1 & EP 2462453 A1 & WO 2011/015870 A1	1-17
A	HARDY, G. J. et al., Model cell membranes: Techniques to form complex biomimetic supported lipid bilayers via vesicle fusion, Curr Opin Colloid Interface Sci., 2013.10.01, Vol. 18, No. 5, pp. 448-458	1-17

## フロントページの続き

(81)指定国 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 入江 新司

千葉県市原市泉台2丁目17番2

Fターム(参考) 2G045 AA01 AA15 AA24 AA25 BA13 BB03 CB01 DA13 DA14 DA36  
 DA60 FA16 FA19 FB03 FB12 FB15 GC15 HA14 HA16 JA07  
 4B029 AA07 AA27 BB20 CC01 FA12 FA15 GA03 GB04 GB10  
 4B063 QQ62 QQ70 QQ79 QR48 QS33 QS39 QX01 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)	膜囊泡收集装置，膜囊泡回收方法和膜囊泡分析方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2015060446A1</a>	公开(公告)日	2017-03-09
申请号	JP2015543937	申请日	2014-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	凸版印刷株式会社		
申请(专利权)人(译)	凸版印刷株式会社		
[标]发明人	牧野洋一 入江新司		
发明人	牧野 洋一 入江 新司		
IPC分类号	C12M1/26 C12M1/14 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/48		
CPC分类号	C12M47/06 B01L3/5085 B01L2300/069 B01L2300/0829 B01L2300/0848 B01L2300/12 B01L2300/161 B01L2300/165 C12Q1/68 G01N1/4005 G01N1/4055 G01N33/6842		
FI分类号	C12M1/26 C12M1/14 C12Q1/02 G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/AA15 2G045/AA24 2G045/AA25 2G045/BA13 2G045/BB03 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA60 2G045/FA16 2G045/FA19 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC15 2G045/HA14 2G045/HA16 2G045/JA07 4B029/AA07 4B029/AA27 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/FA12 4B029/FA15 4B029/GA03 4B029/GB04 4B029/GB10 4B063/QQ62 4B063/QQ70 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	铃木史朗		
优先权	2013222751 2013-10-25 JP		
其他公开文献	JP6547625B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的膜囊泡回收装置包括液体填充材料和融合膜，所述融合膜具有覆盖所述填充材料的外周的至少一部分的脂质双层膜。膜囊泡的内容物通过融合与填料混合。

