

明 細 書

発明の名称：

T i mタンパク質結合担体、当該担体を用いた細胞外膜小胞及びウイルスの取得方法、除去方法、検出方法並びに当該担体を含むキット

技術分野

[0001] 本発明は、T i mタンパク質結合担体、当該担体を用いた細胞外膜小胞及びウイルスの取得方法、除去方法、検出方法並びに当該担体を含むキットに関する。

背景技術

[0002] 細胞外膜小胞は、その粒子内部にタンパク質やm i c r o R N A等の核酸が存在し、細胞間の物質伝達を担っていることが知られている。細胞外膜小胞は、血液等の体液中にも分泌されており、細胞外膜小胞中のタンパク質やm i c r o R N A等が疾患の診断マーカーとして注目されている。また、核酸医薬のデリバリーツールとしての応用も注目されている。

[0003] また、ウィルスには表面に膜状のエンベロープをまとったエンベロープウィルスが数多く存在している。エンベロープウィルスは、インフルエンザウィルスやヒト免疫不全ウィルスなど疾患を引き起こすものが多いため、研究対象として注目されている。また、エンベロープウィルスは無毒化してワクチンやベクターなどに利用され、疾患の予防や治療に応用されている。

[0004] このように細胞外膜小胞の診断や医薬品への利用、エンベロープウィルスのワクチンやベクターとしての利用、細胞外膜小胞やエンベロープウィルスの機能解析等の基礎研究等を行う上で、細胞外膜小胞やエンベロープウィルスを高純度を取得する工程は必要不可欠であり、簡便に高純度な細胞外膜小胞やエンベロープウィルスを取得できる手法が待ち望まれている。また、生物由来細胞外膜小胞やエンベロープウィルスのコンタミネーションを防ぐため、使用する体液由来材料から効率的に細胞外膜小胞やエンベロープウィルスを除去する手法の開発が期待されている。さらに取得した細胞外膜小胞や

エンベロープウィルス、また検体中の細胞外膜小胞やエンベロープウィルスを高感度に検出する手法も待ち望まれている。

[0005] 細胞外膜小胞を取得する方法としては、サンプルを超遠心分離処理し、細胞外膜小胞を沈殿画分として得る方法が最も一般的な方法として知られている（非特許文献1）。しかし、この方法では細胞外膜小胞以外に、サンプル中に含まれるタンパク質複合体や凝集体、HDLなどのリポタンパク質等も共沈し、純度の高い細胞外膜小胞を得るのが困難である。前記超遠心分離処理により得られた沈殿画分をショ糖密度勾配法により密度分画することでタンパク質複合体や凝集体を分離することはできるが、密度が等しいHDLとの分離は困難である。また、この方法は超遠心分離処理が必要なことから多検体を同時に処理することも困難である。加えて、超遠心分離処理には、高価な機械が必要である。

[0006] また、ExoQuick（System Biosciences社製）やTotal Exosome Isolation Reagent（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に代表される市販の試薬を添加して遠心分離処理により沈殿画分として細胞外膜小胞を得る方法もある（非特許文献1）が、前記超遠心分離処理による方法よりも得られる細胞外膜小胞の純度がさらに低いという問題がある。

[0007] これらの従来法の他に、細胞外膜小胞の表面抗原タンパク質に対する抗体を用いて、当該表面抗原タンパク質と抗体のアフィニティーによって細胞外膜小胞を取得する方法（抗CD63抗体固定化法、Exosome-Human CD63 Isolation/Detection（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）等）がある（非特許文献1）。これらの方法では、高純度な細胞外膜小胞が得られるものの、抗体に対する表面抗原タンパク質を有する細胞外膜小胞しか得ることができない、細胞外膜小胞の収量が少ない、抗体から細胞外膜小胞を溶出させるために界面活性剤や酸性バッファー等を用いる必要があり、インタクトな（即ち、細胞外膜小胞の本来の機能を保ったままの状態）細胞外膜小胞を得ることが困難である、等

の問題がある。

[0008] ウィルスを取得する方法としてはサンプルを超遠心分離処理し、ウィルスを沈殿画分として得る方法が最も一般的な方法として知られている（非特許文献1）。しかし、この方法ではウィルス以外に、サンプル中に含まれるタンパク質複合体や凝集体、HDLなどのリポタンパク質等も共沈し、純度の高いウィルスを得るのが困難である。前記超遠心分離処理により得られた沈殿画分をショ糖密度勾配法により密度分画することでタンパク質複合体や凝集体を分離することはできるが、密度が等しい凝集体との分離は困難である。また、超遠心分離処理によりウィルスの活性が落ちてしまうという問題もある（非特許文献2）。また、これらの方法は超遠心分離処理が必要なことから多検体を同時に処理することも困難である。加えて、超遠心分離処理には、高価な機械が必要である。

[0009] これらの方法の他にイオン交換クロマトグラフィーでウィルスを精製する方法が知られている（非特許文献3）。しかし、この方法ではそれぞれのウィルスに対して最適な条件を設定する必要がある。また、条件設定が困難な場合もあり、すべてのウィルスの精製に適用させるのは困難である。

[0010] 細胞外膜小胞を除去する方法としては、サンプルを超遠心分離処理し、細胞外膜小胞を沈殿分画し、その上清画分を除去サンプルとして得る方法が最も一般的な方法として知られている。しかしこの方法では完全に細胞外膜小胞を除去することは困難であり、除去しきれない細胞外膜小胞がサンプルに残存してしまう。

[0011] さらに、ExoQuick（System Biosciences社製）やTotal Exosome Isolation Reagent（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に代表される市販の試薬を添加して遠心分離処理により細胞外膜小胞を沈殿分画し、その上清画分を除去サンプルとして得る方法もある。しかしこの方法においても除去しきれずサンプル中に細胞外膜小胞が残存し、完全に細胞外膜小胞を除去することが困難であった。またサンプル中に添加した試薬が混入するため、その試薬が

細胞外膜小胞の生物活性などに問題を引き起こす場合があった。

ウイルスを除去する方法としても同様の方法が知られており、細胞外膜小胞を除去する方法と同様の問題があった。

[0012] 細胞外膜小胞を検出する方法としては、細胞外膜小胞の表面抗原に対する抗体を用いたサンドイッチELISAが一般的な方法として知られている。しかし通常の発色シグナルを検出する抗体を用いたサンドイッチELISA系の最低検出感度は精製エクソソームで3 μ g程度と報告されており、血清などの体液サンプルを測定する上で十分な感度が得られていなかった（非特許文献4）。ウイルスを検出する方法としても同様の方法が知られており、ウイルスの検出についても十分な感度が得られていなかった。

[0013] またその他の細胞外膜小胞を検出する方法としては、フローサイトメトリー法が知られている。しかし、細胞外膜小胞の表面抗原に対する抗体を固定化した担体を用いて細胞外膜小胞を捕捉する通常の方法では、十分な感度が得られておらず、培養上清又は体液などのサンプルから直接検出するのは困難で、サンプルから細胞外膜小胞を濃縮又は精製してから検出する必要がある。

先行技術文献

非特許文献

[0014] 非特許文献1: Kenneth W. Witwer et al. Journal of Extracellular Vesicles 2013 May 27; 2. doi: 10.3402

非特許文献2: G. Y. Chen et al. Biotechnol. Prog. 25 (2009) 1669

非特許文献3: Petra Gerster et al. Journal of Chromatography A, 1290 (2013) 36-45

非特許文献4: Mariantonia Logozzi et al. PLoS ONE 4 (2009) 5219

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 以上のように、従来の細胞外膜小胞又はウィルスを取得する方法は、純度の高い細胞外膜小胞又はウィルスをインタクトな状態で簡便に且つ効率よく取得することが困難である。また、従来の細胞外膜小胞又はウィルスを除去する方法は、サンプル中の細胞外膜小胞又はウィルスを効率よく除去することが困難である。さらに従来の細胞外膜小胞又はウィルスの検出方法は十分な感度が得られていない。

[0016] 従って、本発明の課題は、試料中に存在する細胞外膜小胞又はウィルスを、純度良く、またインタクトな状態で簡便且つ効率的に取得又は除去し、細胞外膜小胞又はウィルスを高感度に検出することである。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明は、前記課題を解決する目的でなされたものであり、以下の構成よりなる。

1. T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子4 (Tim4) タンパク質、T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子3 (Tim3) タンパク質、及びT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子1 (Tim1) タンパク質から選ばれるタンパク質 (Timタンパク質) が結合した担体 (Tim担体)。

2. 以下の工程を含むことを特徴とする試料中の細胞外膜小胞又はウィルスを取得する方法；

(1) カルシウムイオン存在下、担体に結合したTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウィルスとの複合体を形成させる工程 (複合体形成工程)

(2) 当該複合体と試料とを分離する工程 (複合体分離工程)

(3) 当該複合体から細胞外膜小胞又はウィルスを分離し、細胞外膜小胞又はウィルスを取得する工程 (取得工程)。

3. 以下の工程を含むことを特徴とする試料中の細胞外膜小胞又はウィルス

を除去する方法；

(1) カルシウムイオン存在下、担体に結合したTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（複合体形成工程）

(2) 当該複合体と試料とを分離する工程（複合体分離工程）。

4. 以下の工程を含むことを特徴とする試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを検出する方法；

(1) カルシウムイオン存在下、担体に結合したTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（複合体形成工程）

(2) 当該複合体を検出する工程（検出工程）

5. Tim担体を含んでなる、細胞外膜小胞又はウイルスの捕捉用キット。

6. Timタンパク質を含んでなる試薬と、担体を含んでなる試薬とを含んでなる細胞外膜小胞又はウイルスの捕捉用キット。

[0018] 前記状況に鑑み、本発明者らは、鋭意研究の結果、Tim1タンパク質、Tim3タンパク質及びTim4タンパク質から選ばれる少なくとも1種のタンパク質を用いることにより、ホスファチジルセリンを表面に有する細胞外膜小胞又はウイルスを高純度で得られること、当該細胞外膜小胞又はウイルスをインタクトな状態で得られること、当該細胞外膜小胞又はウイルスを効率よく除去すること、これらを高感度に検出することができることを見出し、本発明を発明するに至った。

[0019] 細胞外膜小胞の表面にはリン脂質のホスファチジルセリンが存在（露出）している。ホスファチジルセリンに対して結合能を有するタンパク質（以下、「ホスファチジルセリン結合タンパク質」「PSタンパク質」と略記する場合がある）としては、例えばAnnexin V、MFG-E8、Tim1（T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子1、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 1）、Tim1（T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子1、T-cell im

munoglobulin-mucin-domain 1) タンパク質、Tim3 (T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子3、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 3) タンパク質、Tim4 (T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子4、T-cell immunoglobulin-mucin-domain 4) タンパク質等が知られている (The Journal of Biochemistry 265, 4923-4928 (25 March 1990)、Nature 417, 182-187 (9 May 2002)、Nature 450, 435-439 (15 November 2007))。

しかしながら、これらのPSタンパク質のうち、Tim1タンパク質、Tim3タンパク質及びTim4タンパク質以外のPSタンパク質を用いた場合には、細胞外膜小胞又はウイルスを取得、除去又は検出することは困難であることが判った。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、試料中に存在する細胞外膜小胞又はウイルスを高純度で、またインタクトな状態で簡便且つ効率的に取得、除去でき、高感度に検出できる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]図1は実施例1-8において、細胞外膜小胞の取得の有無をウェスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図2]図2は実施例9-16において、細胞外膜小胞の取得の有無をウェスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図3]図3は実施例17-18において、細胞外膜小胞の取得の有無をウェスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図4]図4-Aは実施例19-20及び比較例1-3において、細胞外膜小胞の取得の有無をウェスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。図4-Bは実施例19-20及び比較例1-3において、細胞外膜小胞の

取得の有無を銀染色により確認した電気泳動図である。

[図5]図5は実施例21において、本発明の方法により取得した細胞外膜小胞を、電子顕微鏡により観察した図である。

[図6]図6は実施例22-25において、細胞外膜小胞の取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図7]図7は実施例26-27及び比較例4-9において、細胞外膜小胞の取得の有無を銀染色により確認した電気泳動図である。

[図8]図8は実施例28-33において、細胞外膜小胞の取得の有無を、ウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図9]図9は実施例34-35及び比較例10-13において、細胞外膜小胞の取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図10]図10は実施例36-38において、細胞外膜小胞の取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図11]図11は実施例39-40において、細胞外膜小胞の取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図12]図12は実施例41-47において、細胞外膜小胞の取得（除去）の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図13]図13は実施例48-55において、細胞外膜小胞の取得（除去）の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図14]図14は実施例56-67及び比較例14-15において、細胞外膜小胞の取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図15]図15は実施例68-79において、細胞外膜小胞の取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図16]図16は実施例80-83及び比較例16-19において、細胞外膜小胞の取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図17]図17は実施例84－95及び比較例20－21において、ウイルスの取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図18]図18は実施例96－99及び比較例22－25において、ウイルスの取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図19]図19は実施例100－105及び比較例26－33において、細胞外膜小胞をELISA法により検出した結果である。

[図20]図20は実施例106－109において、細胞外膜小胞をELISA法により検出した結果である。

[図21]図21は実施例110－115及び比較例34－39において、ウイルスをELISA法により検出した結果である。

[図22]図22は実施例116－119において、ウイルスの取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図23]図23は実施例120－121及び比較例40－41において、細胞外膜小胞をフローサイトメトリー法により検出した結果である。

[図24]図24は実施例122－123及び比較例42－43において、ウイルスの取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

[図25]図25は実施例124－125及び比較例44－45において、ウイルスの取得の有無をウエスタンブロッティングにより確認した電気泳動図である。

発明を実施するための形態

[0022] ＜1. 本発明に係る細胞外膜小胞＞

本発明に係る細胞外膜小胞としては、生体内の細胞又は培養細胞から分泌される、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。当該小胞の直径は、通常20nmから1000nm、好ましくは50nmから500nm、より好ましくは50nmから200nm

mである。

[0023] 本発明に係る細胞外膜小胞は、Nature Reviews Immunology 9, 581-593 (August 2009)、「肥満研究」Vol. 13 No. 2 2007 トピックス 青木直人等に記載の通り、その発生起源及び小型膜小胞の大きさ等により様々に分類されるものが挙げられる。具体的には、エクソソーム (Exosomes)、微小胞 (microvesicle)、エクトソーム (Ectosomes)、膜粒子 (Membrane particles)、エクソソーム様小胞 (Exosome-like vesicles)、アポトーシス性小胞 (Apoptotic vesicles)、アディボソーム (Adiposome) 等が挙げられる。

[0024] エクソソームは、後期エンドソームに由来する、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。当該小胞の直径は、通常50nmから200nm、好ましくは50nmから150nm、より好ましくは50nmから100nmである。エクソソームは、CD63やCD9等のテトラスパニン (tetraspanins)、Alix、TSG101、Lamp-1、Flotillin等のタンパク質を含むことが知られている。

[0025] 微小胞は、細胞膜 (plasma membrane) に由来する、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。微小胞は、通常100nmから1000nm、好ましくは100nmから800nm、より好ましくは100nmから500nmである。微小胞は、インテグリン、セレクチン、CD40リガンド等のタンパク質を含むことが知られている。

[0026] エクトソームは、細胞膜 (plasma membrane) に由来する、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。エクトソームは、通常50nmから200nm、好ましくは50nmから150nm、より好ましくは50nmから100nmである

。エクソソームは、CR1、タンパク質分解酵素 (proteolytic enzyme) を含むが、CD63は含まないことが知られている。

[0027] 膜粒子は、細胞膜 (plasma membrane) に由来する、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。膜粒子は、通常50nmから80nmである。膜粒子は、CD133を含むが、CD63は含まないことが知られている。

[0028] エクソソーム様小胞は、初期エンドソームに由来する、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。エクソソーム様小胞は、通常20nmから50nmである。エクソソーム様小胞は、TNFRIを含むことが知られている。

[0029] アポトーシス性小胞は、アポトーシス細胞に由来する、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。アポトーシス性小胞は、通常50nmから500nm、好ましくは50nmから300nm、より好ましくは50nmから200nmである。アポトーシス性小胞は、ヒストンを含むことが知られている。

[0030] アディボソームは、脂肪細胞に由来する、脂質二重膜で構成され、その膜表面にホスファチジルセリンを有する小型膜小胞である。アディボソームは、通常100nmから1000nm、好ましくは100nmから800nm、より好ましくは100nmから500nmである。アディボソームは、MFG-E8 (milk fat globule-EGF factor 8) を含むことが知られている。

[0031] <2. 本発明に係るウイルス>

本発明に係るウイルスとしては、宿主細胞の細胞膜、核膜、ゴルジ体、小胞体などに由来する脂質二重膜から構成されるエンベロープをウイルスのカプシド (外殻) に有し、エンベロープ表面にホスファチジルセリンを有するウイルス (以下、「エンベロープウイルス」とよぶ) である。当該本発明に係るウイルスの直径は、通常20nm~320nmである。本発明に係るエンベロープウイルスとしては、生化学辞典 第2版、東京化学同人、199

0、1503p-1505pに記載されている科に属するエンベロープを有するウイルスが挙げられる。具体的には、ポックスウイルス科、バキュロウイルス科、ラブドウイルス科、ブニヤウイルス科、トガウイルス科、ヘルペスウイルス科、パラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、レトロウイルス科、アレナウイルス科、コロナウイルス科などが挙げられる。

[0032] <3. 本発明に係るT i mタンパク質>

本発明に係るT i mタンパク質とは、本発明に係るT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子1 (T i m 1) タンパク質 (以下、「本発明に係るT i m 1タンパク質」と略記する場合がある)、本発明に係るT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子3 (T i m 3) タンパク質 (以下、「本発明に係るT i m 3タンパク質」と略記する場合がある)、及び本発明に係るT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子4 (T i m 4) タンパク質 (以下、「本発明に係るT i m 4タンパク質」と略記する場合がある) から選ばれる少なくとも1種のT i mタンパク質である。

[0033] 本発明に係るT i m 4 (T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子4) タンパク質としては、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスに結合し得るものであればよく、動物に由来するT i m 4タンパク質が好ましい。なかでも、ヒト、又はマウスが有するT i m 4タンパク質が好ましい (以下、ヒトが有するT i m 4タンパク質を「ヒト由来T i m 4タンパク質」、マウスが有するT i m 4タンパク質を「マウス由来T i m 4タンパク質」と略記する場合がある)。

より具体的には、少なくとも、ホスファチジルセリンに対する結合ドメイン (I g Vドメイン) のアミノ酸配列を有しているものであればよく、T i m 4タンパク質の全長のアミノ酸配列を有するものであっても、T i m 4タンパク質の一部でもよい。

前記ホスファチジルセリンに対する結合ドメイン (I g Vドメイン) のアミノ酸配列としては、例えば配列番号1 (マウス由来T i m 4タンパク質のN末端22~135アミノ酸領域 (R e f S e q N P__848874, 3

）、配列番号2（ヒト由来T i m 4タンパク質のN末端25～137アミノ酸領域（R e f S e q N P__612388. 2））等が挙げられる。

前記T i m 4タンパク質の全長のアミノ酸配列としては、配列番号3（マウス由来T i m 4タンパク質の全長配列1～343アミノ酸領域（R e f S e q N P__848874. 3））、配列番号4（ヒト由来T i m 4タンパク質の全長配列1～378アミノ酸領域（R e f S e q N P__612388. 2））等が挙げられる。

当該T i m 4タンパク質の一部としては、配列番号5（マウス由来T i m 4タンパク質のN末端22～273アミノ酸領域（R e f S e q N P__848874. 3））、配列番号6 マウス由来T i m 4タンパク質のN末端22～279アミノ酸領域（R e f S e q N P__848874. 3）、配列番号7 ヒト由来T i m 4タンパク質のN末端25～315アミノ酸領域（R e f S e q N P__612388. 2）等のホスファチジルセリンに対する結合ドメイン（I g Vドメイン）及びムチンドメインのアミノ酸配列を有するもの等が挙げられる。要すれば、これらの配列はシグナル配列を有するものであってもよい。

[0034] 本発明に係るT i m 1（T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子1）タンパク質としては、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスに結合し得るものであればよく、動物に由来するT i m 1タンパク質が好ましい。なかでもヒト又はマウスが有するT i m 1タンパク質が好ましい（以下、ヒトが有するT i m 1タンパク質を「ヒト由来T i m 1タンパク質」、マウスが有するT i m 1タンパク質を「マウス由来T i m 1タンパク質」と略記する場合がある）。

より具体的には、少なくとも、ホスファチジルセリンに対する結合ドメイン（I g Vドメイン）のアミノ酸配列を有しているものであればよく、T i m 1タンパク質の全長のアミノ酸配列を有するものであっても、T i m 1タンパク質の一部でもよい。

前記ホスファチジルセリンに対する結合ドメイン（I g Vドメイン）のA

ミノ酸配列としては、例えば配列番号8（マウス由来Tim1タンパク質のN末端22～131アミノ酸領域（RefSeq NP_001160104.1）、配列番号9（ヒト由来Tim1タンパク質のN末端21～130アミノ酸領域（RefSeq NP_036338.2））等が挙げられる。

前記Tim1タンパク質の全長のアミノ酸配列としては、配列番号10（マウス由来Tim1タンパク質の全長配列1～282アミノ酸領域（RefSeq NP_001160104.1））、配列番号11（ヒト由来Tim1タンパク質の全長配列1～364アミノ酸領域（RefSeq NP_036338.2））等が挙げられる。

当該Tim1タンパク質の一部としては、配列番号12（マウス由来Tim1タンパク質のN末端22～212アミノ酸領域（RefSeq NP_001160104.1））、配列番号13（ヒト由来Tim1タンパク質のN末端21～295アミノ酸領域（RefSeq NP_612388.2））等のホスファチジルセリンに対する結合ドメイン（IgVドメイン）及びムチンドメインのアミノ酸配列を有するもの等が挙げられる。要すれば、これらの配列はシグナル配列を有するものであってもよい。

[0035] 本発明に係るTim3（T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子3）タンパク質としては、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスに結合し得るものであればよく、動物に由来するTim3タンパク質が好ましい。なかでも、ヒト又はマウスが有するTim3タンパク質が好ましい（以下、ヒトが有するTim3タンパク質を「ヒト由来Tim3タンパク質」、マウスが有するTim3タンパク質を「マウス由来Tim3タンパク質」と略記する場合がある）。

より具体的には、少なくとも、ホスファチジルセリンに対する結合ドメイン（IgVドメイン）のアミノ酸配列を有しているものであればよく、Tim3タンパク質の全長のアミノ酸配列を有するものであっても、Tim3タンパク質の一部でもよい。

前記ホスファチジルセリンに対する結合ドメイン（IgVドメイン）のA

ミノ酸配列としては、例えば配列番号14（マウス由来Tim3タンパク質のN末端22～134アミノ酸領域（RefSeq NP_599011.2）、配列番号15（ヒト由来Tim3タンパク質のN末端22～135アミノ酸領域（RefSeq NP_116171.3））等が挙げられる。

前記Tim3タンパク質の全長のアミノ酸配列としては、配列番号16（マウス由来Tim3タンパク質の全長配列1～281アミノ酸領域（RefSeq NP_599011.2））、配列番号17（ヒト由来Tim3タンパク質の全長配列1～301アミノ酸領域（RefSeq NP_116171.3））等が挙げられる。

当該Tim3タンパク質の一部としては、配列番号18（マウス由来Tim3タンパク質のN末端22～189アミノ酸領域（RefSeq NP_599011.2））、配列番号19（ヒト由来Tim3タンパク質のN末端22～200アミノ酸領域（RefSeq NP_116171.3））等のホスファチジルセリンに対する結合ドメイン（IgVドメイン）及びムチンドメインのアミノ酸配列を有するもの等が挙げられる。要すれば、これらの配列はシグナル配列を有するものであってもよい。

[0036] また、本発明に係るTimタンパク質は、本発明に係る細胞外膜小胞又はウィルスに結合し得るものであれば、上記したアミノ酸配列の1又は複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入及び／又は付加した変異体であってもよい。

[0037] 本発明に係るTimタンパク質は、上記した性質を有するものであればよく、マウスやヒト等の動物や植物等のTimタンパク質を有する生物の細胞（例えばマクロファージ等の免疫細胞）や組織等から抽出したもの、これをもとに遺伝子組換え技術により調製したもの等、何れも用いることができる。

[0038] 本発明に係るTimタンパク質として、遺伝子組換え技術により調製したものをを用いる場合、精製の簡便さから、1又は複数のアフィニティータグを有するものが好ましい。

[0039] 当該アフィニティータグとしては、遺伝子組換え技術によりタンパク質を

調製する際に用いられるものであればいずれでもよく、例えば、Fcタグ、FLAGタグ、Hisタグ、GSTタグ、MBPタグ、HAタグ、Mycタグ、Strep(II)タグ、PAタグ等のアフィニティータグが挙げられる。

[0040] 当該アフィニティータグは、本発明に係るTimタンパク質のC末端側に融合される。

[0041] 従って、本発明に係るTimタンパク質には、Timタンパク質のアミノ酸配列（全長又は一部配列）のみからなるタンパク質だけでなく、Timタンパク質のアミノ酸配列（全長又は一部配列）と前記した如きアフィニティータグのアミノ酸配列を有するタンパク質も含まれる。

また、前記したアフィニティータグとTimタンパク質とは、直接結合していても、「「昆虫培養細胞由来無細胞蛋白質合成試薬キットTransdirect insect cellを用いた蛋白質発現」江連徹、鈴木崇、伊東昌章、四方正光（島津製作所・分析計測事業部）公開日 2008/6/9：蛋白質科学会アーカイブ， 1， e005（2008）」等に記載のスペーサーを介して結合していてもよい。従って、本発明に係るTimタンパク質には、Timタンパク質のアミノ酸配列（全長又は一部配列）と前記した如きアフィニティータグのアミノ酸配列とスペーサーのアミノ酸配列とを有するタンパク質も含まれる。

[0042] <4. 本発明に係るTimタンパク質の調製方法>

本発明に係るTimタンパク質は、そのアミノ酸配列に従って、一般的な化学的製法により製造することができる。例えば、フルオレニルメチルオキシカルボニル法（Fmoc法）、tert-ブチルオキシカルボニル法（tBoc法）等の通常の化学的製法（化学合成法）により、本発明に係るTimタンパク質を得ることができる。また、市販のペプチド合成機を用いて化学合成することもできる。

[0043] 更に、本発明に係るTimタンパク質は、本発明に係るTimタンパク質をコードする核酸分子を適当なプラスミドやファージなどの発現用ベクター

に組み込み、宿主細胞を組換え発現ベクターを用いて形質転換（又は形質導入）させ、得られた宿主細胞を増幅させて、細胞内又は細胞外に分泌させる、という遺伝子組み換え技術を用いた周知の方法でも得ることができる。

[0044] 本発明に係るT i mタンパク質の調製方法について、遺伝子組換え技術により調製する場合について、以下に説明する。

[0045] <本発明に係る発現用ベクター>

本発明に係るT i mタンパク質を発現させる為の発現用ベクター（以下、本発明に係る発現用ベクターとする）は、本発明に係るT i mタンパク質をコードする核酸配列（以下、「本発明に係るT i mコード配列」と略記する場合がある）を含むものであれば、いずれでもよい。

[0046] 本発明に係るT i mコード配列のうち、T i m4タンパク質をコードする核酸配列としては、例えば配列番号20（マウス由来T i m4タンパク質の全長配列1～343アミノ酸領域をコードするcDNAの塩基配列（R e f S e q N o. NM__178759. 4）。末端3塩基に終止コドン（t g a）を含む）、配列番号21（ヒト由来T i m4タンパク質の全長配列1～378アミノ酸領域をコードするcDNAの塩基配列（R e f S e q N o. NM__138379. 2）。末端3塩基に終止コドン（t a a）を含む）等が挙げられる。

本発明に係るT i m1タンパク質をコードする核酸配列としては、例えば配列番号22（マウス由来T i m1タンパク質の全長配列1～282アミノ酸領域をコードするcDNAの塩基配列（R e f S e q N o. NM__001166632. 1）。末端3塩基に終止コドン（t g a）を含む）、配列番号23（ヒト由来T i m1タンパク質の全長配列1～364アミノ酸領域をコードするcDNAの塩基配列（R e f S e q N o. NM__012206. 3）。末端3塩基に終止コドン（t a a）を含む）等が挙げられる。

本発明に係るT i m3タンパク質をコードする核酸配列としては例えば配列番号24（マウス由来T i m3タンパク質の全長配列1～281アミノ酸領域をコードするcDNAの塩基配列（R e f S e q N o. NM__134

250. 2)。末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む)、配列番号25 (ヒト由来T i m 3タンパク質の全長配列1～301アミノ酸領域をコードするc D N Aの塩基配列 (R e f S e q N o. NM__032782. 4) 。末端3塩基に終止コドン (t a g) を含む) 等が挙げられる。

[0047] 本発明に係る発現用ベクターとしては、市販されているベクターに、常法のクローニング方法に従い、本発明に係るT i mコード配列を遺伝子導入すればよい。本発明に係る発現用ベクターとしては、例えば、常法のクローニング技術に従い、配列番号26 (マウス由来T i m 4タンパク質のN末端1～273アミノ酸領域をコードするc D N A、末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む)、配列番号27 (マウス由来T i m 4タンパク質のN末端1～279アミノ酸領域をコードするc D N A、末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む)、配列番号28 (ヒト由来T i m 4タンパク質のN末端1～315アミノ酸領域をコードするc D N A、末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む)、配列番号29 (マウス由来T i m 1タンパク質のN末端1～212アミノ酸領域をコードするc D N A、末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む)、配列番号30 (ヒト由来T i m 1タンパク質のN末端1～295アミノ酸領域をコードするc D N A、末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む)、配列番号31 (マウス由来T i m 3タンパク質のN末端1～189アミノ酸領域をコードするc D N A、末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む)、又は配列番号32 (ヒト由来T i m 3タンパク質のN末端1～200アミノ酸領域をコードするc D N A、末端3塩基に終止コドン (t g a) を含む) を例えば市販のp C A G - N e oベクター (和光純薬工業 (株) 製) 等の発現ベクターに組み込んだベクター等が挙げられる。T i mコード配列を遺伝子導入するベクターとしては、宿主細胞中で本発明に係るT i mタンパク質を発現し、生産する機能を有するものであればよく、市販されているベクターを用いれば簡便である。この目的に使用される市販されているベクターとしては、宿主が動物細胞の場合には、p C A G - N e oベクター、p c D N Aベクターなどが挙げられる。

[0048] <宿主>

宿主としては、本発明に係るTimタンパク質を発現可能なものであれば、いずれでもよく、例えば、大腸菌、昆虫細胞、哺乳類細胞、植物細胞、酵母細胞等が挙げられ、哺乳類細胞が好ましい。哺乳類細胞としては、例えば、HEK293T細胞、COS-7細胞、CHO-K1細胞、CHO-S細胞等が挙げられる。

[0049] <宿主への遺伝子導入>

本発明に係る発現用ベクターを、「目的別で選べるタンパク質発現プロトコル、第3章タンパク質発現プロトコル、ISBN978-4-7581-0175-2、羊土社」等に記載のベクターを宿主へ遺伝子導入する手法の常法に従って、宿主へ遺伝子導入する。

[0050] <宿主の培養>

遺伝子導入を行った宿主を、宿主を培養する手法の常法に従って、培養する。培養条件としては、遺伝子導入を行った宿主により異なるが、宿主毎の常法に従えばよく、例えば、動物細胞であれば、通常5～10%、好ましくは5～8%CO₂下、通常36℃～38℃、好ましくは36.5℃～37.5℃で、1日～10日間、好ましくは3日～4日間培養すればよい。尚、本発明に係るTimタンパク質は膜貫通ドメインと細胞内ドメインを含まないため、培養上清中に発現、分泌される。

[0051] <本発明に係るTimタンパク質の精製>

次いで、得られた遺伝子導入した宿主の培養液を、遠心分離処理（通常200～400×gで3分間～10分間、好ましくは300×gで3分間～6分間）して培養上清を回収し、要すれば、（i）通常1000～2000×gで20分間～60分間、好ましくは1200×gで20分間～40分間、回収した培養上清を遠心分離処理し、及び／又は（ii）フィルターろ過処理を行い、不純物を分離して、培養上清濾過液を得てもよい。

さらに、要すれば、得られた培養上清濾過液を、限外濾過等の常法に従って、通常5倍～20倍、好ましくは8倍～12倍に濃縮して培養上清濾過液

の濃縮液を得てもよい。

次いで、本発明に係るT i mタンパク質がアフィニティータグを有する場合は、「目的別で選べるタンパク質発現プロトコル、第3章タンパク質発現プロトコル、第6節タンパク質の精製 タグによる精製、I S B N 9 7 8 - 4 - 7 5 8 1 - 0 1 7 5 - 2、羊土社」等に記載のアフィニティータグ毎のアフィニティータグを利用したタンパク質の精製方法の常法（例えば、アフィニティータグに親和性を有する物質を固定化した担体を用いた方法）に従い、得られた培養上清、得られた培養上清濾過液、又は得られた培養上清濾過液の濃縮液から、本発明に係るT i mタンパク質（T i mタンパク質とアフィニティータグの融合タンパク質）を精製すればよい。

本発明に係るT i mタンパク質がアフィニティータグを有さない場合は、「目的別で選べるタンパク質発現プロトコル、第3章タンパク質発現プロトコル、第6節タンパク質の精製 クロマトグラフィーによる精製、I S B N 9 7 8 - 4 - 7 5 8 1 - 0 1 7 5 - 2、羊土社」等に記載のタンパク質の精製方法の常法に従い、各種クロマトグラフィーにより、得られた培養上清、得られた培養上清濾過液、又は得られた培養上清濾過液の濃縮液から、本発明に係るT i mタンパク質を精製すればよい。

上記精製方法を適宜組み合わせることで精製を行ってもよい。

[0052] <本発明に係るT i mタンパク質の具体的な調製方法>

本発明に係るT i mタンパク質の具体的な調製方法としては、例えばアフィニティータグとしてF cタグを用いた場合、以下の方法が挙げられる。先ず、常法に従い、本発明に係るT i mコード配列をp E F - F cベクター又は市販のベクターに組み込み、本発明に係る発現用ベクターを構築する。次いで、常法に従い、宿主細胞へ本発明に係る発現用ベクターを遺伝子導入し、通常5～10%、好ましくは5～8%CO₂下、36℃～38℃、好ましくは36.5℃～37.5℃で、1日～10日間、好ましくは3日～4日間培養する。次いで、得られた遺伝子導入した宿主の培養液を、遠心分離処理（通常200～400×gで3分間～10分間、好ましくは300×gで3分

間～6分間)して培養上清を回収し、要すれば、(i)通常1000～2000×gで20分間～60分間、好ましくは1200×gで20分間～40分間、回収した培養上清を遠心分離処理し、及び／又は(ii)フィルター過処理を行い、不純物を分離して、培養上清濾過液を得てもよい。さらに、要すれば、得られた培養上清濾過液を、限外濾過等の常法に従って、通常5倍～20倍、好ましくは8倍～12倍に濃縮して培養上清濾過液の濃縮液を得てもよい。その後、本発明に係るTimタンパク質がアフィニータグを有する場合には、アフィニータグ毎の、アフィニータグを利用した精製方法の常法に従い、得られた培養上清、得られた培養上清濾過液、又は得られた培養上清濾過液の濃縮液から本発明に係るTimタンパク質を精製することにより、本発明に係るTimタンパク質が得られる。

[0053] <5. 本発明のTim担体>

本発明のTimタンパク質が結合した担体(以下、「本発明のTim担体」と略記する場合がある)は、前記した如き本発明に係るTimタンパク質を本発明に係る担体に結合させたものである。

具体的には、本発明のTim担体としては、本発明に係るTim1タンパク質が結合した担体(以下、「本発明のTim1担体」と略記する場合がある)、本発明に係るTim3タンパク質が結合した担体(以下、「本発明のTim3担体」と略記する場合がある)、本発明に係るTim4タンパク質が結合した担体(以下、「本発明のTim4担体」と略記する場合がある)等が挙げられる。また、本発明に係るTim1タンパク質、本発明に係るTim3タンパク質、及び本発明に係るTim4タンパク質から選ばれる2種以上のタンパク質を結合させた担体も本発明のTim担体に包含される。

本発明のTim担体としては、本発明のTim4担体が特に好ましい。

[0054] <本発明に係る担体>

本発明に係る担体としては、通常の免疫学的測定法で用いられる不溶性の担体であれば何れも使用可能であるが、例えば、ポリスチレン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメタクリル酸メチル、ポリアクリルアミド、

ポリグリシジルメタクリレート、ポリプロピレン、ポリオレフィン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリエステル、ポリ塩化ビニール、ポリエチレン、ポリクロロカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンラバー、アガロース、デキストラン、エチレンー無水マレイン酸共重合物等の有機物；ガラス、酸化ケイ素、ケイソウ、多孔性ガラス、スリガラス、アルミナ、シリカゲル、金属酸化物等の無機物質；鉄、コバルト、ニッケル、マグネタイト、クロマイト等の磁性体等；及びこれらの磁性体の合金を材料として調製されたものが挙げられる。また、これら担体は、マイクロプレート、チューブ、ディスク状片、粒子（ビーズ）等多種多様の形態で使用し得る。

尚、後述する本発明の取得方法及び本発明の除去方法に用いる場合には、粒子（ビーズ）で用いるのが好ましく、粒子の大きさは特に限定されないが、目的、用途に合わせて、通常 $10\text{ nm} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは 100 nm から $10\text{ }\mu\text{m}$ のものが挙げられる。

また、後述する本発明の検出方法に用いる場合には、粒子（ビーズ）又はマイクロプレートが好ましく、粒子の大きさは特に限定されないが、目的、用途に合わせて、通常 $10\text{ nm} \sim 100\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましくは 100 nm から $10\text{ }\mu\text{m}$ のものが挙げられ、またマイクロプレートのウェルの数、大きさは特に限定されないが、目的、用途に合わせて、通常 12 穴から 1536 穴、好ましくは 96 穴から 384 穴のものが挙げられる。

[0055] <本発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る担体との結合方法>

本発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る担体との結合方法としては、タンパク質を担体に結合させる自体公知の方法に従えばよく、例えば、アフィニティー結合により結合させる方法；化学結合により結合させる方法（例えば、特許 3269554 号公報、WO 2012/039395 公報に記載の方法）；物理的吸着により結合させる方法（例えば、特公平 5-41946 号公報に記載の方法）等が挙げられるが、アフィニティー結合により結合させる方法及び物理的吸着により結合させる方法が好ましい。

尚、後述する本発明の取得方法及び除去方法に用いる場合には、アフィニ

ティー結合により結合させる方法が好ましい。また、後述する本発明の検出方法に用いる場合には、アフィニティー結合により結合させる方法又は物理的吸着が好ましい。

[0056] <発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る担体との結合様式>

本発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る担体との結合様式としては、本発明に係る担体と本発明に係る T i m タンパク質とが結合していれば結合様式は問わないが、本発明に係る担体が本発明に係る T i m タンパク質の S H 基に結合したものが好ましい。また、本発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る担体とを直接結合させても、化学的リンカー、アフィニティー物質〔例えば、アフィニティータグに親和性を有する物質（後述）、本発明の T i m タンパク質に対する抗体、ビオチン類（後述）、アビジン類（後述）、抗体等〕等を介して間接的に結合させてもよい。

[0057] <アフィニティー結合により結合させる方法>

上記したアフィニティー結合により結合させる方法としては、物質間のアフィニティー結合（親和性）を利用して結合させる方法であれば何れでもよく、例えば、以下の（a）～（c）が挙げられる。

（a）ビオチン類とアビジン類とのアフィニティー結合により結合させる方法

例えば、ビオチン類（ビオチン、イミノビオチン、デスチオビオチン、ビオシチン、ビオチンスルホキド等）及びアビジン類（アビジン、タマビジン、タマビジン2、ストレプトアビジン等）の組み合わせ等からなる、互いにアフィニティー（親和性）を有する2種以上の物質（アフィニティー物質）を用いることにより、当該アフィニティー物質を介して本発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る担体とを結合させることができる。

尚、アフィニティー物質は、何れか一方を本発明に係る T i m タンパク質に結合させ、残りの一方を本発明に係る担体に結合させておけばよいが、例えば、ビオチン類とアビジン類を用いる場合には、アビジン類を本発明に係る担体に結合させ、ビオチン類を本発明に係る T i m タンパク質に結合させ

ておくのが一般的である。

(b) アフィニティータグとアフィニティータグに親和性を有する物質とのアフィニティー結合により結合させる方法

例えば、アフィニティータグに親和性を有する物質 (Protein A、Protein G等) 等の本発明に係るTimタンパク質にアフィニティー (親和性) を有する物質 (アフィニティー物質) を用いることにより、当該アフィニティー物質を介して本発明に係るTimタンパク質と本発明に係る担体とを結合させることができる。

尚、アフィニティー物質は、本発明に係る担体に結合させておくのが一般的である。

(c) 本発明のTimタンパク質に対する抗体と本発明のTimタンパク質とのアフィニティー結合により結合させる方法

例えば、本発明に係るTimタンパク質に対する抗体 (抗FLAGタグ抗体、抗Hisタグ抗体、抗HAタグ抗体、抗Mycタグ抗体、抗MBPタグ抗体、抗GSTタグ抗体、抗Strept (II) タグ抗体等のアフィニティータグに対する抗体、及びAnti-TIM4 Antibody (clone RMT4-54) (LifeSpan Biosciences社製) 等) 等の本発明に係るTimタンパク質にアフィニティー (親和性) を有する物質 (アフィニティー物質) を用いることにより、当該アフィニティー物質を介して本発明に係るTimタンパク質と本発明に係る担体とを結合させることができる。

尚、アフィニティー物質は、本発明に係る担体に結合させておくのが一般的である。

[0058] 尚、上記方法において、本発明に係るTimタンパク質又は／及び本発明に係る担体とアフィニティー物質とを結合させる方法も、自体公知の物理的吸着により結合させる方法や化学結合により結合させる方法が使用でき、直接結合させても、リンカー等を介して間接的に結合させてもよい。

[0059] <本発明に係る担体に結合させる本発明に係るTimタンパク質量>

本発明に係る担体に結合させる本発明に係る T i m タンパク質の量は、例えば本発明に係る担体がビーズの場合、担体 1 m g に対して、通常 0. 1 μ g $\sim$ 5 0 μ g、好ましくは 0. 5 μ g $\sim$ 3 0 μ g、より好ましくは 1. 0 μ g $\sim$ 2 0 μ g である。

また、本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1 ウェルに対して、通常 0. 1 μ g $\sim$ 1 0 μ g、好ましくは 0. 2 μ g $\sim$ 5 μ g、より好ましくは 0. 5 μ g $\sim$ 2 μ g である。

[0060] <本発明の T i m 担体の具体的な調製方法>

以下に、本発明の T i m 担体の具体的な調製方法を、前記 (a) - (c) の方法により、本発明の T i m 担体を調製する場合を例にとって説明する。

[0061] <(a) ビオチン類とアビジン類とのアフィニティー結合により結合させる方法>

まず、(a) の方法では、前記の本発明に係る T i m タンパク質の調製方法に従い、本発明に係る T i m タンパク質を調製する。次いで、本発明に係る T i m タンパク質とビオチン類とを結合させ（以下、「ビオチン標識」又は「ビオチン化」と略記する場合がある）、本発明に係る T i m タンパク質-ビオチン類複合体を形成させる。一方、本発明に係る担体にアビジン類を結合させ、本発明に係る担体-アビジン類複合体を形成させる（以下、「アビジン類を結合させた本発明に係る担体」と略記する場合がある）。得られた本発明に係る T i m タンパク質-ビオチン類複合体と本発明に係る担体-アビジン類複合体とを接触させて、本発明に係る T i m タンパク質-ビオチン類複合体中のビオチン類と担体-アビジン類複合体中のアビジン類とを結合させて、本発明の T i m 担体を得る。

[0062] - 本発明に係る T i m タンパク質とビオチン類との結合（ビオチン標識） -

前記 (a) の方法において、本発明に係る T i m タンパク質とビオチン類との結合は、市販のタンパク質のビオチン標識キットを用いても、必要な試薬類を適宜調整してタンパク質のビオチン標識の常法に従って行ってもよい

。市販のタンパク質のビオチン標識キット（ビオチン化キット）を用いる方法としては、Biotin Labeling Kit-SH（（株）同仁科学研究所）又はBiotin Labeling Kit-NH₂（（株）同仁科学研究所）に添付のプロトコールに記載の方法に従えばよい。

[0063] 本発明に係るT i mタンパク質1 μ gと結合させるビオチン類の量は、通常10 ng～1.0 μ g、好ましくは20 ng～200 ng、より好ましくは30 ng～150 ngである。

[0064] 本発明に係るT i mタンパク質にビオチン類を結合させる部位としては、本発明に係るT i mタンパク質のSH基が好ましい。

[0065] ー本発明に係る担体ーアビジン類複合体（アビジン類を結合させた本発明に係る担体）ー

前記（a）の方法において、本発明に係る担体ーアビジン類複合体（アビジン類を結合させた本発明に係る担体）は、市販のものを用いても、必要な試薬類を適宜調整して、常法に従って調製してもよい。本発明に係る担体ーアビジン類複合体としては、例えば、アビジンを結合させたビーズ又はマイクロプレート、タマビジンを結合させたビーズ又はマイクロプレート、タマビジン2を結合させたビーズ又はマイクロプレート、ストレプトアビジンを結合させたビーズ又はマイクロプレート等が挙げられ、市販のものとしては、Dynabeads M-270 Streptavidin C1（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、FGビーズストレプトアビジン（多摩川精機社製）、アビジンプレート（住友ベークライト社製）等が挙げられる。

[0066] 本発明に係る担体とアビジン類との結合において、例えば本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1 mgと接触させるアビジン類の量は、通常5.0～150 μ g、好ましくは10～100 μ g、より好ましくは20～50 μ gである。例えば、本発明に係る担体がマイクロプレートするとき1ウェルに接触させるアビジン類の量は、通常0.1 μ g～10 μ g、好ましくは0.2 μ g～5 μ g、より好ましくは0.5 μ g～2 μ gである。

[0067] ー本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体との結合

前記(a)の方法において、(本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体とを結合させて)本発明のT i m担体を得るには、例えば、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体ーアビジン類複合体を通常0.1mg~10mg、好ましくは0.3mg~5.0mg、より好ましくは0.5~3.0mgと、本発明に係る担体ーアビジン類複合体1mg当たり発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体を通常1.0~50μg、好ましくは1.0~30μg、より好ましくは1.0~20μgとを接触させ、また本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェル当たりの本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体を通常1.0~10μg、好ましくは1.0~5.0μg、より好ましくは1.0~2.0μgとを接触させ、通常4.0℃~37℃、好ましくは11℃~30℃、より好ましくは20℃~25℃で、通常0.5時間~24時間、好ましくは0.5時間~8.0時間、より好ましくは0.5時間~2.0時間反応させ、アビジン類とビオチン類を結合させればよい。これにより、本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体とが結合され、本発明のT i m担体を得られる。

[0068] 尚、一般に、本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体との接触は、本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体を含有する溶液と本発明に係る担体ーアビジン類複合体とを接触させることにより行われる。

[0069] 本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体を含有させる溶液としては、本発明に係るT i mタンパク質ービオチン類複合体を安定な状態で溶解させるものであればよく、例えば精製水、例えばpH 7.0~8.0、好ましくは7.2~7.6に緩衝作用を有する緩衝液(例えばPBS、TBS、HBS等)が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度とし

ては、通常5.0～50mM、好ましくは10～30mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200mM、好ましくは140～160mMの範囲から適宜選択される。また、この溶液中には、本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を含有する溶液とを接触後、本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばTween20等が挙げられ、本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を含有させる溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.0005～0.1%である。尚、これらの溶媒に本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を溶解した溶液を、「本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体含有溶液」と略記する場合がある。

[0070] ー前記(a)の方法による本発明のTim担体の具体的な調製方法ー

前記(a)の方法における、本発明のTim担体の具体的な調製方法は、例えば以下の方法で行えばよい。

まず、前記の本発明に係るTimタンパク質の調整方法に従い、本発明に係るTimタンパク質を調製する。次いで、Biotin Labeling Kit-SH((株)同仁科学研究所)、Biotin Labeling Kit-NH₂((株)同仁科学研究所)に添付のプロトコール、又はタンパク質のビオチン標識における常法に従って、本発明に係るTimタンパク質にビオチン類を結合させて、本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を形成する。

その後、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体ーアビジン類複合体を通常0.1mg～10mg、好ましくは0.3mg～5.0mg、より好ましくは0.5～3.0mgと、本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を本発明に係る担体ーアビジン類複合体1mg当たり本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を通常1.0～50μg、好

ましくは1.0～30 μ g、より好ましくは1.0～20 μ g含有する溶液（例えば精製水、又はpH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液等中に、本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を含有する溶液）通常50 μ L～1500 μ L、好ましくは100 μ L～1000 μ L、より好ましくは200 μ L～500 μ Lとを接触させ、通常4.0℃～37℃、好ましくは11℃～30℃、より好ましくは20℃～25℃で、通常0.5時間～24時間、好ましくは0.5時間～8.0時間、より好ましくは0.5時間～2.0時間反応させ、本発明に係る担体ーアビジン類複合体中のアビジン類と本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体中のビオチン類とを結合させることにより、本発明のTim担体を得る。

本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェル当たりの本発明に係る担体ーアビジン類複合体と本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を通常1.0～10 μ g、好ましくは1.0～5.0 μ g、より好ましくは1.0～2.0 μ g含有する溶液（例えば精製水、又はpH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液等中に、本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体を含有する溶液）通常50 μ L～300 μ L、好ましくは50 μ L～200 μ L、より好ましくは100 μ L～200 μ Lとを接触させ、通常4.0℃～37℃、好ましくは11℃～30℃、より好ましくは20℃～25℃で、通常0.5時間～24時間、好ましくは0.5時間～8.0時間、より好ましくは0.5時間～2.0時間反応させ、本発明に係る担体ーアビジン類複合体中のアビジン類と本発明に係るTimタンパク質ービオチン類複合体中のビオチン類とを結合させることにより、本発明のTim担体を得る。

[0071] < (b) アフィニティータグとアフィニティータグに親和性を有する物質のアフィニティー結合により結合させる方法 >

(b)の方法では、まず、前記の本発明に係るTimタンパク質の調整方法に従い、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を調

製する。一方、アフィニティータグに親和性を有する物質（アフィニティー物質）を本発明に係る担体に結合させ、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体を形成させる（以下、「アフィニティー物質を結合させた本発明に係る担体」と略記する場合がある）。得られた本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質とを接触させ、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体中のアフィニティー物質とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質中のアフィニティータグとを結合させ、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質とを結合させて、本発明のTim担体を得る。

[0072] ー本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体ー

前記（b）の方法における、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体としては、市販のものを用いても、必要な試薬類を適宜調整して常法に従って調製してもよい。本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体としては、例えば、Protein Gを結合させたビーズ又はマイクロプレート、Protein Aを結合させたビーズ又はマイクロプレート等が挙げられ、市販のものとしては、Dynabeads Protein G（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、Dynabeads Protein A（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）、FGビーズ Protein G（多摩川精機製）、FGビーズ Protein A（多摩川精機製）等が挙げられる。

[0073] 本発明に係る担体とアフィニティー物質との結合において、本発明に係る担体1mgと接触させるアフィニティー物質の量としては、本発明に係る担体がビーズの場合、通常5.0～50μg、好ましくは10～50μg、より好ましくは20～50μgである。本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェルに接触させるアフィニティー物質の量は、通常0.1μg～10μg、好ましくは0.2μg～5μg、より好ましくは0.5μg～2μgである。

[0074] ー本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質との結合ー

前記（b）の方法において、（本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質との結合により）本発明のTim担体を得るには、例えば以下の方法で行えばよい。本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体を通常0.1mg～10mg、好ましくは0.3mg～5.0mg、より好ましくは0.5～3.0mgと、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体1mg当たりアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を通常1.0～50μg、好ましくは1.0～30μg、より好ましくは1.0～20μgとを接触させ、本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェル当たりの本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を通常1.0～10μg、好ましくは1.0～5.0μg、より好ましくは1.0～2.0μgとを接触させ、通常4.0℃～37℃、好ましくは11℃～30℃、より好ましくは20℃～25℃で、通常0.5時間～24時間、好ましくは0.5時間～8.0時間、より好ましくは0.5時間～2.0時間反応させ、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質とを結合させ、本発明のTim担体を得る。

[0075] 尚、一般に、前記（b）の方法における、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質との接触は、本発明に係る担体ーアフィニティー物質複合体とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を含有する溶液とを接触させることにより行われる。

[0076] アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を含有させる溶液としては、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を安定な状態で溶解させたものであればよく、例えば精製水、例えばpH7

、0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばPBS、TBS、HBS等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5.0～50mM、好ましくは10～30mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200mM、好ましくは140～160mMの範囲から適宜選択される。

また、この溶液中には、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を含有する溶液と本発明に係る担体－アフィニティー物質複合体とを接触後、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質と本発明に係る担体－アフィニティー物質複合体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばTween20等が挙げられ、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を含有させる溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.0005～0.1%である。尚、これらの溶液にアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を溶解した溶液を、「アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質含有溶液」と略記する場合がある。

[0077] 一前記（b）の方法による本発明のTim担体の具体的な調製方法一

前記（b）の方法における、本発明のTim担体の具体的な調製方法は、例えば以下の方法で行えばよい。

まず、前記の本発明に係るTimタンパク質の調製方法に従い、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を調製する。

次いで、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体－アフィニティー物質複合体を通常0.1mg～10mg、好ましくは0.3mg～5.0mg、より好ましくは0.5～3.0mgと、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を本発明に係る担体－アフィニティー物質複合体1mg当たりアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を通常1.0～50μg、好ましくは1.0～30μg、より好まし

くは1.0～20 μ g含有する溶液（例えば精製水、pH 7.0～8.0の緩衝液等中に、アフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質を含有する溶液）通常50 μ L～1500 μ L、好ましくは100 μ L～1000 μ L、より好ましくは200 μ L～500 μ Lとを接触させ、通常4.0℃～37℃、好ましくは11℃～30℃、より好ましくは20℃～25℃で、通常0.5時間～24時間、好ましくは0.5時間～8.0時間、より好ましくは0.5時間～2.0時間、本発明に係る担体－アフィニティー物質複合体中のアフィニティー物質とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質中のアフィニティータグとを結合させ、本発明のTim担体を得る。

本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェル当たりの本発明に係る担体－アフィニティー物質複合体と本発明に係るアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質1.0～10 μ g、好ましくは1.0～5.0 μ g、より好ましくは1.0～2.0 μ g含有する溶液（例えば精製水、又はpH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液等中に、本発明に係るTimタンパク質－ビオチン類複合体を含有する溶液）通常50 μ L～300 μ L、好ましくは50 μ L～200 μ L、より好ましくは100 μ L～200 μ Lとを接触させ、通常4.0℃～37℃、好ましくは11℃～30℃、より好ましくは20℃～25℃で、通常0.5時間～24時間、好ましくは0.5時間～8.0時間、より好ましくは0.5時間～2.0時間、本発明に係る担体－アフィニティー物質複合体中のアフィニティー物質とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質中のアフィニティータグとを結合させ、本発明のTim担体を得る。

[0078] <（c）本発明のTimタンパク質に対する抗体と本発明のTimタンパク質とのアフィニティー結合により結合させる方法>

[0079] まず、前記の本発明に係るTimタンパク質の調整方法に従い、本発明に係るTimタンパク質を調製する。一方、本発明に係るTimタンパク質に

対する抗体（以下、「抗T i m抗体」と略記する場合がある）を本発明に係る担体に結合させ、本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体を形成させる。得られた本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体と本発明に係るT i mタンパク質とを接触させて、本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体中のT i mタンパク質に対する抗体と本発明に係るT i mタンパク質とを結合させることにより、本発明のT i m担体を得る。

尚、上記において、本発明に係るT i mタンパク質として、アフィニティータグを有するT i mタンパク質（T i mタンパク質のアミノ酸配列とアフィニティータグのアミノ酸配列を有するタンパク質）を用いる場合には、抗T i m抗体としては、T i mタンパク質を認識する抗体（T i mタンパク質のアミノ酸配列に基づくタンパク質部分を認識する抗体）でも、アフィニティータグを認識する抗体（アフィニティータグのアミノ酸配列に基づくタンパク質部分を認識する抗体）でも何れを用いてもよい。また、本発明に係るT i mタンパク質として、アフィニティータグを有さないT i mタンパク質（T i mタンパク質のアミノ酸配列のみからなるタンパク質）を用いる場合には、抗T i m抗体としては、T i mタンパク質を認識する抗体（T i mタンパク質のアミノ酸配列に基づくタンパク質部分を認識する抗体）を使用すればよい。

[0080] 一本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体（抗体を結合させた本発明に係る担体）－

前記（c）の方法において、本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体としては、市販のものを用いても、必要な試薬類を適宜調整して常法に従って調製してもよい。本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体としては、例えば、抗F cタグ抗体を結合させたビーズ又はマイクロプレート、抗F L A Gタグ抗体を結合させたビーズ又はマイクロプレート、抗H i sタグ抗体を結合させたビーズ又はマイクロプレート、抗G S Tタグを結合させたビーズ又はマイクロプレート、抗M B Pタグを結合させたビーズ又はマイクロプレート、抗H Aタグを結合させたビーズ又はマイクロプレート、抗M y cタグを結合

させたビーズ又はマイクロプレート、抗Strept(II)タグを結合させたビーズ又はマイクロプレート、抗Timタンパク質に対する抗体を結合させたビーズ又はマイクロプレート等が挙げられ、市販のものとしては、抗DYKDDDDKタグ抗体磁気ビーズ（和光純薬工業（株）製）等が挙げられる。

[0081] 前記の抗Tim抗体の由来については特に限定されない。また、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも何れでも良いが、モノクローナル抗体の方が好ましい。また、前記の抗Tim抗体は、市販のものを用いても、必要な試薬類を適宜調整して常法に従って調製してもよい。抗Tim抗体の具体例は、前記の通りである。

[0082] 本発明に係る担体と抗Tim抗体との結合において、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1mgと接触させる本発明に係るTimタンパク質に対する抗体の量としては、本発明の取得方法及び本発明の除去方法に用いる場合、通常5.0～50μg、好ましくは10～50μg、より好ましくは20～50μgである。本発明に係る担体がマイクロプレートの場合1ウェルに、通常0.1μg～10μg、好ましくは0.2μg～5μg、より好ましくは0.5μg～2μgである。

[0083] ー本発明に係る担体ー抗Tim抗体複合体と本発明に係るTimタンパク質との結合ー

前記(c)の方法において、本発明に係る担体ー抗Tim抗体複合体と本発明に係るTimタンパク質との結合により本発明のTim担体を得る方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。即ち、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体ー抗Tim抗体複合体を通常0.1mg～10mg、好ましくは0.3mg～5.0mg、より好ましくは0.5～3.0mgと、本発明に係る担体ー抗Tim抗体複合体1mg当たり本発明に係るTimタンパク質を通常1.0～50μg、好ましくは1.0～30μg、より好ましくは1.0～20μgとを接触させ、本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェル当たりの本発明に係る担体ー抗Tim抗体複合

体と本発明に係るT i mタンパク質を通常1. 0～1 0 μ g、好ましくは1. 0～5. 0 μ g、より好ましくは1. 0～2. 0 μ gとを接触させ、通常4. 0℃～3 7℃、好ましくは1 1℃～3 0℃、より好ましくは2 0℃～2 5℃で、通常0. 5時間～2 4時間、好ましくは0. 5時間～8. 0時間、より好ましくは0. 5時間～2. 0時間反応させ、本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体中の抗T i m抗体と本発明に係るT i mタンパク質とを結合させ、本発明のT i m 4担体を得る。

[0084] 尚、一般に、前記(c)の方法における、本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体と本発明に係るT i mタンパク質との接触は、本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体と本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液とを接触させることにより行われる。

[0085] 本発明に係るT i mタンパク質を含有させる溶液としては、本発明に係るT i mタンパク質を安定な状態で溶解させるものであればよく、例えば精製水、例えばp H 7. 0～8. 0、好ましくは7. 2～7. 6に緩衝作用を有する緩衝液(例えばP B S、T B S、H B S等)が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～5 0 m M、好ましくは1 0～3 0 m Mの範囲から適宜選択され、N a C l濃度は通常1 0 0～2 0 0 m M、好ましくは1 4 0～1 6 0 m Mの範囲から適宜選択される。また、この溶液中には、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液と本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体とを接触後、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体－抗T i m抗体複合体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばT w e e n 2 0等が挙げられ、当該本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液における界面活性剤の濃度は、通常0. 0 0 0 0 1～0. 2 %、好ましくは通常0. 0 0 0 5～0. 1 %である。尚、これらの溶液に本発明に係るT i mタンパク質を溶解した溶液を、「本発明に係るT i mタンパク質含有溶液」と略記する場合がある。

[0086] 一前記(c)の方法による本発明のT i m担体の具体的な調製方法一

前記(c)の方法における、本発明のTim担体の具体的な調製方法は、例えば以下の方法で行えばよい。

まず、前記の本発明に係るTimタンパク質の調製方法に従い、本発明に係るTimタンパク質を調製する。次いで、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体-抗Tim抗体複合体を通常0.1mg~10mg、好ましくは0.3mg~5.0mg、より好ましくは0.5~3.0mgと、本発明に係るTimタンパク質を本発明に係る担体-抗Tim抗体複合体1mg当たり通常1.0~50μg、好ましくは1.0~30μg、より好ましくは1.0~20μg含有する溶液(例えば精製水、例えばpH7.0~8.0の緩衝液等中に本発明に係るTimタンパク質を含有する溶液)通常100~1000μL、好ましくは200~500μLを接触させ、通常4℃~37℃、好ましくは11℃~30℃、より好ましくは20℃~25℃で、通常0.5時間~24時間、好ましくは0.5時間~8.0時間、より好ましくは0.5時間~2.0時間反応させ、本発明に係る担体-抗Tim抗体複合体中の本発明に係るTimタンパク質に対する抗体と本発明に係るTimタンパク質とを結合させることにより、本発明のTim担体を得る。

本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェル当たりの本発明に係る担体-抗Tim抗体複合体と本発明に係るTimタンパク質1.0~10μg、好ましくは1.0~5.0μg、より好ましくは1.0~2.0μg含有する溶液(例えば精製水、又はpH7.0~8.0、好ましくは7.2~7.6に緩衝作用を有する緩衝液等中に、本発明に係るTimタンパク質-ビオチン類複合体を含有する溶液)通常50μL~300μL、好ましくは50μL~200μL、より好ましくは100μL~200μLとを接触させ、通常4.0℃~37℃、好ましくは11℃~30℃、より好ましくは20℃~25℃で、通常0.5時間~24時間、好ましくは0.5時間~8.0時間、より好ましくは0.5時間~2.0時間、本発明に係る担体-アフィニティー物質複合体中のアフィニティー物質とアフィニティータグを有する本発明に係るTimタンパク質中のアフィニティータグとを結合

させ、本発明のT i m担体を得る。

[0087] <物理的吸着により結合させる方法>

本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体とを物理的吸着により結合させる方法としては、自体公知の方法に従い、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体とが結合する条件下、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体とを接触させればよい。

[0088] 本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体との反応温度としては、通常2℃～37℃、好ましくは4℃～11℃である。

[0089] 本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体との反応時間としては、通常4時間～48時間、好ましくは12時間～24時間である。

[0090] 本発明に係るT i mタンパク質としては、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1mgと接触させる本発明に係るT i mタンパク質の量は、通常5.0～50μg、好ましくは10～50μg、より好ましくは20～50μgである。本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェルに接触させる本発明に係るT i mタンパク質の量は、通常0.1μg～10μg、好ましくは0.2μg～5μg、より好ましくは0.5μg～2μgである。

[0091] 尚、一般に、前記本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体との物理的吸着は、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液と本発明に係る担体とを接触させることにより行われる。

[0092] 本発明に係るT i mタンパク質を含有させる溶液としては、本発明に係るT i mタンパク質を安定な状態で溶解させるものであればよく、例えば精製水、例えばpH6.0～9.5、好ましくは7.0～8.0に緩衝作用を有する緩衝液（例えばMOPSなどのグッド緩衝液、炭酸緩衝液、PBS、TBS、HBS等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～100mM、好ましくは10～50mMの範囲から適宜選択され、NaClを添加する場合の濃度は通常100～200mM、好ましくは140～160mMの範囲から適宜選択される。また、この溶液中には、

本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液と本発明に係る担体とを接触後、本発明の担体と細胞外膜小胞又はウイルスとのとの結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。尚、これらの溶液に本発明に係るT i mタンパク質を溶解した溶液を、「本発明に係るT i mタンパク質含有溶液」と略記する場合がある。

[0093] 本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体との結合方法における、物理的吸着により結合させる方法の具体例としては、例えば以下の方法が挙げられる。

まず、前記の本発明に係るT i mタンパク質の調製方法に従い、本発明に係るT i mタンパク質を調製する。次いで、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1 m gに、T i mタンパク質を通常5. 0～5 0 μ g、好ましくは1 0～5 0 μ g、より好ましくは2 0～5 0 μ g含有する溶液（例えば精製水、例えばp H 7. 0～8. 0の緩衝液等中に本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液）を通常5 0 μ L～3 0 0 μ L、好ましくは5 0 μ L～2 0 0 μ L、より好ましくは5 0 μ L～1 0 0 μ L接触させ、また本発明に係る担体がマイクロプレートの場合1 ウェルに、T i mタンパク質を通常0. 1 μ g～1 0 μ g、好ましくは0. 2 μ g～5 μ g、より好ましくは0. 5 μ g～2 μ g含有する溶液（例えば精製水、例えばp H 7. 0～8. 0の緩衝液等中に本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液）を通常5 0 μ L～3 0 0 μ L、好ましくは5 0 μ L～2 0 0 μ L、より好ましくは5 0 μ L～1 0 0 μ L接触させ、通常2℃～3 7℃、好ましくは4℃～1 1℃で通常4時間～4 8時間、好ましくは1 2時間～2 4時間反応させ、本発明に係る担体と本発明に係るT i mタンパク質とを結合させることにより、本発明のT i m担体を得る。

[0094] <本発明のT i m担体の処理>

前記のようにして得られた本発明のT i m担体を、通常この分野で行われるブロッキング処理に付してもよい。

[0095] 前記のようにして得られた本発明のT i m担体を、要すれば、通常この分野で行われる精製処理に付してもよい。精製処理としては、担体表面に付着している不純物を除去することが出来ればよく、例えば、本発明のT i m担体を洗浄溶液により洗浄する方法（以下、「洗浄操作」と略記する場合がある）が挙げられる。

[0096] 本発明に係る担体として、磁性粒子を用いる場合を例に取り説明する。

まず、前記のようにして得られた本発明のT i m担体を含有する溶液を含む容器を、マグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明のT i m担体を集合させ、前記容器内の溶液を捨てる。次いで、容器内に洗浄溶液を加え、攪拌する。その後、前記と同様に前記容器を、マグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明のT i m担体を集合させ、前記容器内の溶液を捨てる。これらの洗浄操作は、必要に応じて数回繰り返し行ってもよい。当該洗浄操作において用いられる洗浄溶液としては、本発明のT i m担体における本発明に係るT i mタンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液であればいずれでもよく、例えば精製水、例えばp H 7. 0～8. 0、好ましくは7. 2～7. 6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばP B S、T B S、H B S等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50 m M、好ましくは10～30 m Mの範囲から適宜選択され、N a C l濃度は通常100～200 m M、好ましくは140～160 m Mの範囲から適宜選択される。この溶液中には、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

界面活性剤としては、例えばT w e e n 20等が挙げられ、当該洗浄溶液における界面活性剤の濃度は、通常0. 00001～0. 2%、好ましくは通常0. 0005～0. 1%である。

[0097] 本発明のT i m担体を用いれば、細胞外膜小胞又はウィルスを効率的に取得することができ、試料中の細胞外膜小胞又はウィルスを高純度を取得する

ことができる。また、試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを効率よく除去することもできる。さらに試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを高感度に検出することもできる。

[0098] ＜6．試料中の細胞外膜小胞又はウイルスの取得方法＞

本発明の細胞外膜小胞又はウイルスを取得する方法（以下、「本発明の取得方法」と略記する場合がある）は、以下の工程を含むことを特徴とする。

（１）カルシウムイオン存在下、担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（以下、「複合体形成工程」と略記する場合がある）

（２）当該複合体と試料とを分離する工程（以下、「複合体分離工程」と略記する場合がある）

（３）当該複合体から細胞外膜小胞又はウイルスを分離し、細胞外膜小胞又はウイルスを取得する工程（以下、「取得工程」と略記する場合がある）。

[0099] ＜6－1．複合体形成工程について＞

複合体形成工程は、カルシウムイオン存在下、T i mタンパク質と担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程である。

[0100] ＜本発明に係る試料＞

本発明に係る試料は、液体中に本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有するもの或いは本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有する可能性があるもののいずれであってもよい。本発明に係る試料は、生体に由来するものでも、培地や緩衝液等の溶液に本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを溶解又は懸濁させたもののいずれでもよい。本発明に係る試料として、具体的には、血液、唾液、尿、乳汁、羊水、腹水等の体液、細胞培養上清等が挙げられる。

当該本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有（溶解又は懸濁）させる溶液としては、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを安定な状態で溶解又は懸濁させ、担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体の結合を妨げないものであればよく、例えば水、p

H 7. 0 ~ 8. 0、好ましくは 7. 2 ~ 7. 6 に緩衝作用を有する緩衝液（例えば T B S、H B S 等）等が挙げられる。尚、リン酸バッファはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常 5 ~ 5 0 m M、好ましくは 1 0 ~ 3 0 m M の範囲から適宜選択され、N a C l 濃度は通常 1 0 0 ~ 2 0 0 m M、好ましくは 1 4 0 ~ 1 6 0 m M の範囲から適宜選択される。

この溶液中には、担体に結合した T i m タンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体の結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l 等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えば T w e e n 2 0 等が挙げられ、当該本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有させる溶液における界面活性剤の濃度は、通常 0. 0 0 0 0 1 ~ 0. 2 %、好ましくは通常 0. 0 0 0 5 ~ 0. 1 % である。

[0101] <カルシウムイオン濃度・カルシウムイオンの由来>

本発明において、カルシウムイオンは、本発明に係る T i m タンパク質と担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる際に存在させる。より具体的には、本発明に係る T i m タンパク質と試料中の細胞外膜小胞とを接触させる際に、カルシウムイオンを存在させる。

[0102] 本発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際のカルシウムイオン濃度は、通常 0. 5 ~ 1 0 0 m M、好ましくは 1. 0 ~ 1 0 m M、より好ましくは 2. 0 ~ 5. 0 m M である。尚、本発明に係る T i m タンパク質と本発明に係る試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体が形成され、取得工程を実施するまで、即ち、当該複合体を分離する工程に付すまでの当該複合体を含有する溶液中には、前記した如き濃度のカルシウムイオンが必要であることは言うまでもない。

[0103] また、カルシウムイオンの由来は特に限定されず、例えば塩化カルシウム、水酸化カルシウム、炭酸水素カルシウム、ヨウ化カルシウム、臭化カルシウム、酢酸カルシウム等が挙げられ、好ましくは塩化カルシウム、炭酸水素

カルシウム、ヨウ化カルシウムであり、より好ましくは塩化カルシウム、炭酸水素カルシウムである。

[0104] 尚、本発明に係るT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際に、カルシウムイオンを存在させる方法としては、一般的には、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際のカルシウムイオン濃度が上記した範囲となるように、本発明のT i m担体を含有する溶液、試料、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液又は／及び本発明に係る担体を含有する溶液に、前記した如きカルシウムイオンを含有させればよい。また、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際のカルシウムイオン濃度が上記した範囲となるようにカルシウムイオンを含有させた溶液を用いて、当該溶液と本発明のT i m担体を含有する溶液、試料、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液又は／及び本発明に係る担体を混合させてもよい。

カルシウムイオンを含有させる溶液としては、前記の本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有（溶解又は懸濁）させる溶液と同様であり、具体例等も同様である。

[0105] <試料の量>

複合体形成工程において、本発明のT i mタンパク質1 μ gと接触させる試料の量としては、通常0.1～100ml、好ましくは0.1～10ml、より好ましくは0.1～1.0mlである。

[0106] <温度>

複合体形成工程において、本発明のT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際の温度としては、通常4～37℃、好ましくは4～25℃、より好ましくは4～11℃である。

[0107] <時間>

複合体形成工程において、本発明に係るT i mタンパク質と試料との接触時間としては、通常0.5～24時間、好ましくは0.5～8時間、より好

ましくは0.5～4時間である。

[0108] 複合体形成工程は、(1-A) 予め調製された、本発明のTim担体を用いる場合（即ち、本発明に係るTimタンパク質が結合した担体を用いる場合）と、(1-B) 本発明に係るTimタンパク質と本発明に係る担体とを別々に用いる場合との2つの場合に分けられる。

[0109] <(1-A) について>

(1-A) は、カルシウムイオン存在下、本発明のTim担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させて、本発明に係る担体に結合したTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体（以下、「本発明に係る複合体」と略記する場合がある）を形成させる方法である。（(1-A) において、カルシウムイオンは、本発明のTim担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際に存在させればよい。具体的には、本発明に係るTimタンパク質が結合した担体を含有する溶液又は／及び試料中にカルシウムイオンを含有させたものを用いても、本発明に係るTimタンパク質が結合した担体を含有する溶液と試料とカルシウムイオンを含有する溶液とを用いてもよい。

[0110] ー本発明に係る試料の量ー

(1-A) において、本発明のTim担体1mgと接触させる試料の量としては、通常0.1～100ml、好ましくは0.1～10ml、より好ましくは0.1～1.0mlである。

[0111] ー接触温度ー

(1-A) において、本発明のTim担体と試料を接触させる際の温度としては、通常4.0～37℃、好ましくは4.0～25℃、より好ましくは4.0～11℃である。

[0112] ー接触時間ー

(1-A) において、本発明のTim担体と試料（細胞外膜小胞又はウイルス）との接触時間としては、通常0.5～24時間、好ましくは0.5～8.0時間、より好ましくは0.5～4.0時間である。

[0113] ー本発明のT i m担体の量ー

(1-A)において、本発明のT i m担体の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1 m L当たり通常0. 1～2 0 m g、好ましくは0. 3～1 0 m g、より好ましくは0. 5～6. 0 m gである。

[0114] ー1-Aの具体例ー

(1-A)は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、本発明のT i m担体を、本発明のT i m担体と試料とカルシウムイオンを含有する溶液とを混合後の溶液（本発明に係る複合体を形成させる際の溶液）1 m L当たり通常0. 1～2 0 m g、好ましくは0. 3～1 0 m g、より好ましくは0. 5～6. 0 m gと、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液中のカルシウムイオン濃度が通常0. 5～1 0 0 m M、好ましくは1. 0～1 0 m M、より好ましくは2. 0～5. 0 m Mとなる量のカルシウムイオンを含有する溶液と、本発明のT i m担体1 m g当たり通常0. 1～1 0 0 m l、好ましくは0. 1～1 0 m l、より好ましくは0. 1～1. 0 m lの試料とを、通常4. 0～3 7℃、好ましくは4. 0～2 5℃、より好ましくは4. 0℃～1 1℃、通常0. 5～2 4時間、好ましくは0. 5～8. 0時間、より好ましくは0. 5～4. 0時間接触させて、本発明に係る担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる。

[0115] <(1-B)について>

(1-B)は、本発明のT i mタンパク質と本発明に係る担体とを別々に用いる方法である。例えば、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体とをアフィニティー結合を利用して結合させる場合には、以下の(1-B-i)、(1-B-ii)、又は(1-B-iii)のようにすればよい。

[0116] (1-B-i) 本発明のT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを、カルシウムイオンの存在下で同時に接触させて、本発明に係る複合体を形成させる。

[0117] (1-B-ii) 本発明のT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又は

ウイルスとを、カルシウムイオンの存在下で接触させて、本発明のT i mタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させた後、更に当該複合体と本発明に係る担体とを接触させて、本発明に係る複合体を形成させる。

[0118] (1-B-i i i) 本発明の担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させた後、更に本発明のT i mタンパク質をカルシウムイオンの存在下で接触させて、本発明に係る複合体を形成させる。

[0119] - (1-B-i) について -

(1-B-i) は、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを、カルシウムイオンの存在下で同時に接触させて、[細胞外膜小胞又はウイルス- (本発明に係るT i mタンパク質) -アフィニティー物質- (本発明に係る担体)] からなる本発明に係る複合体を形成させる方法である。

具体的には、例えば、アフィニティー物質として互いに親和性を有する2種以上の物質を用いる場合には、一方のアフィニティー物質が結合した本発明に係るT i mタンパク質 (アフィニティー物質結合T i mタンパク質) と残りのアフィニティー物質が結合した担体 (アフィニティー物質結合担体) と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを、カルシウムイオンの存在下で同時に接触させて、アフィニティー物質結合T i mタンパク質中の本発明に係るT i mタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとを結合させると共に、アフィニティー物質結合T i mタンパク質中のアフィニティー物質とアフィニティー物質結合担体中のアフィニティー物質とを結合させることによって、[試料中の細胞外膜小胞又はウイルス- (本発明に係るT i mタンパク質) -アフィニティー物質- (本発明に係る担体)] からなる本発明に係る複合体を形成させる。

(1-B-i) において、カルシウムイオンは、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを同時に接触させる際に存在させればよい。具体的には、本発明に係るT i mタンパ

ク質を含有する溶液、本発明に係る担体を含有する溶液、及び試料中の少なくとも一種以上にカルシウムイオンを含有させたものを用いても、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液、本発明に係る担体を含有する溶液、及び試料とカルシウムイオンを含有する溶液とを接触させることにより行ってもよい。

[0120] ー本発明に係る試料の量ー

(1-B-i)において、本発明に係るT i mタンパク質1 μ gと接触させる試料の量としては、通常0.1～100ml、好ましくは0.1～10ml、より好ましくは0.1～1.0mlである。

[0121] ー本発明に係るT i mタンパク質の量ー

(1-B-i)において、本発明に係るT i mタンパク質の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1mL当たり通常0.01～200 μ g、好ましくは0.15～50 μ g、より好ましくは0.5～24 μ gである。

[0122] ー本発明に係る担体の量ー

(1-B-i)において、本発明に係る担体の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1mL当たり通常0.1～20mg、好ましくは0.3～10mg、より好ましくは0.5～6.0mgである。

[0123] ー接触温度ー

(1-B-i)において、本発明のT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際の温度としては、通常4～37℃、好ましくは4～25℃、より好ましくは4～11℃である。

[0124] ー接触時間ー

本発明のT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの接触時間としては、通常0.5～24時間、好ましくは0.5～8時間、より好ましくは0.5～4時間である。

[0125] 尚、本発明のT i mタンパク質と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの接触は、通常、本発明のT i mタンパク質を含有する溶

液と本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとカルシウムイオンを含有する溶液とを接触させることにより行われる。

[0126] 本発明に係るT i mタンパク質を含有させる溶液としては、本発明に係るT i mタンパク質を安定な状態で溶解させ、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を妨げないものであればよく、例えば精製水、例えばp H 7. 0～8. 0、好ましくは7. 2～7. 6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばP B S、T B S、H B S等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50 m M、好ましくは10～30 m Mの範囲から適宜選択され、N a C l濃度は通常100～200 m M、好ましくは140～160 m Mの範囲から適宜選択される。この溶液中には、本発明に係るT i mタンパク質を安定な状態で溶解させ、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばT w e e n 20等が挙げられ、当該本発明に係るT i mタンパク質を含有させる溶液における界面活性剤の濃度は、通常0. 00001～0. 2%、好ましくは通常0. 0005～0. 1%である。

[0127] カルシウムイオンを含有させる溶液としては、前記の本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有（溶解又は懸濁）させる溶液と同様であり、具体例等も同様である。

カルシウムイオンを含有する溶液としては、カルシウムイオンを含有させる溶液中、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液中のカルシウムイオンの濃度が通常0. 5～100 m M、好ましくは1～10 m M、より好ましくは2～5 m Mとなる量のカルシウムイオンを含有する溶液である。

[0128] －（1－B－i）の具体例－

（1－B－i）は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1 m L当たり通常0. 01～200 μ g、好ましくは0. 15～50 μ g、より好ましくは0. 5～24 μ gの本発明に係

るTimタンパク質を含有する溶液（例えば精製水、例えばpH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液中に本発明のTimタンパク質を含有させた溶液）を通常0.5μL～1mL、好ましくは0.5μL～100μL、より好ましくは0.5μL～10μLと、試料を本発明に係るTimタンパク質1μg当たり通常0.1～100mL、好ましくは0.1～10mL、より好ましくは0.1～1mLと、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液中のカルシウムイオン濃度が通常0.5～100mM、好ましくは1～10mM、より好ましくは2～5mMとなる量のカルシウムイオンを含有する溶液と、本発明に係るTimタンパク質を含有する溶液と試料とカルシウムイオンを含有する溶液と本発明に係る担体とを混合後の溶液（本発明に係る複合体を形成させる際の溶液）1mL当たり通常0.1～20mg、好ましくは0.3～10mg、より好ましくは0.5～6mgの本発明に係る担体とを、通常0.5～24時間、好ましくは0.5～8時間、より好ましくは0.5～4時間接触させ、本発明に係る複合体を形成させる。

[0129] — (1-B-i i) について —

(1-B-i i) は、本発明のTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを、カルシウムイオンの存在下で接触させて、本発明のTimタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させた後、更に当該複合体と本発明に係る担体とを接触させて、〔細胞外膜小胞又はウイルスー（本発明に係るTimタンパク質）ーアフィニティー物質ー（本発明に係る担体）〕からなる複合体を形成させる方法である。

具体的には、例えばアフィニティー物質として互いに親和性を有する2種以上の物質を用いた場合は、一方のアフィニティー物質が結合したTimタンパク質（アフィニティー物質結合Timタンパク質）と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを、カルシウムイオンの存在下で接触させて、アフィニティー物質結合Timタンパク質中のTimタンパク質と細胞外膜小胞とを結合させて、〔細胞外膜小胞又はウイルスー（本発明に係るTimタンパク

質－アフィニティー物質）］複合体を形成させる。次いで、〔細胞外膜小胞－（本発明に係るT i mタンパク質－アフィニティー物質）］複合体ともう一方のアフィニティー物質が結合した担体（アフィニティー物質結合担体）とを接触させて、〔細胞外膜小胞又はウイルス－（本発明に係るT i mタンパク質－アフィニティー物質）］複合体中のアフィニティー物質とアフィニティー物質結合担体中のアフィニティー物質とを結合させることによって、〔細胞外膜小胞又はウイルス－（本発明に係るT i mタンパク質－アフィニティー物質）－（アフィニティー物質－本発明に係る担体）］複合体を形成させる。

また、例えばアフィニティー物質としてアフィニティータグに親和性を有する物質や抗T i m抗体を用いる場合は、本発明に係るT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを、カルシウムイオン存在下で接触させて、本発明に係るT i mタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとを結合させて、〔細胞外膜小胞又はウイルス－本発明に係るT i mタンパク質］複合体を形成させる。次いで、〔細胞外膜小胞又はウイルス－本発明に係るT i mタンパク質］複合体とアフィニティー物質が結合した担体（アフィニティー物質結合担体）とを接触させて、〔細胞外膜小胞又はウイルス－本発明に係るT i mタンパク質］複合体中の本発明に係るT i mタンパク質とアフィニティー物質結合担体中のアフィニティー物質とを結合させることによって、〔細胞外膜小胞又はウイルス－本発明に係るT i mタンパク質－（アフィニティー物質－本発明に係る担体）］複合体を形成させる。

（1－B－i i）において、カルシウムイオンは、本発明に係るT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際に存在させればよい。具体的には、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液又は／及び試料中にカルシウムイオンを含有させたものを用いても、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液と試料とカルシウムイオンを含有する溶液とを用いてもよい。

[0130] ー本発明に係る試料の量ー

(1-B-i i)において、本発明に係るT i mタンパク質1 μ gと接触させる試料の量としては、通常0.1～100m l、好ましくは0.1～10m l、より好ましくは0.1～1.0m lである。

[0131] ー本発明に係るT i mタンパク質の量ー

(1-B-i i)において、本発明に係るT i mタンパク質の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1m L当たり通常0.01～200 μ g、好ましくは0.15～50 μ g、より好ましくは0.5～24 μ gである。

[0132] ー本発明に係る担体の量ー

(1-B-i i)において、本発明に係る担体の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1m L当たり通常0.1～20m g、好ましくは0.3～10m g、より好ましくは0.5～6m gである。

[0133] ー接触温度ー

(1-B-i i)において、本発明のT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際の温度としては、通常4～37℃、好ましくは4～25℃、より好ましくは4～11℃である。

[0134] (1-B-i i)において、本発明のT i mタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させた後、更に当該複合体と本発明に係る担体とを接触させる際の温度としては、通常4～37℃、好ましくは4～25℃、より好ましくは4～11℃である。

[0135] ー接触時間ー

(1-B-i i)において、本発明のT i mタンパク質と本発明に係る担体と本発明に係る試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの接触時間としては、通常0.5～24時間、好ましくは0.5～8時間、より好ましくは0.5～4時間である。

[0136] (1-B-i i)において、本発明のT i mタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させた後、更に当該複合体と本発明に係る担体とを接触させる際の時間としては、通常0.5～24時間、好ましくは0.

5～8時間、より好ましくは0.5～4時間である。

[0137] 尚、通常、本発明に係るT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの接触は、本発明に係るT i mタンパク質を含有する溶液と試料とカルシウムイオンを含有する溶液を接触させることにより行われる。

[0138] 本発明に係るT i mタンパク質を含有させる溶液としては、本発明に係るT i mタンパク質を安定な状態で溶解させ、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を妨げないものであればよく、例えば精製水、例えばp H 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液（例えば、T B S、H B S等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50 m M、好ましくは10～30 m Mの範囲から適宜選択され、N a C l濃度は通常100～200 m M、好ましくは140～160 m Mの範囲から適宜選択される。この溶液中には、本発明に係るT i mタンパク質を安定な状態で溶解させ、本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体と細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばT w e e n 20等が挙げられ、当該本発明に係るT i mタンパク質を含有させる溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.00005～0.1%である。

[0139] カルシウムイオンを含有させる溶液としては、前記の本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有（溶解又は懸濁）させる溶液と同様であり、具体例等も同様である。

カルシウムイオンを含有する溶液としては、カルシウムイオンを含有させる溶液中、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液中のカルシウムイオンの濃度が通常0.5～100 m M、好ましくは1～10 m M、より好ましくは2～5 m Mとなる量のカルシウムイオンを含有する溶液である。

[0140] – (1 – B – i i) の具体例 –

(1 – B – i i) は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、本発明に係

る複合体を形成させる際の溶液 1 mL 当たり通常 0.01 ~ 200 μ g、好ましくは 0.15 ~ 50 μ g、より好ましくは 0.5 ~ 24 μ g の本発明に係る Tim タンパク質を含有する溶液（例えば精製水、例えば pH 7.0 ~ 8.0、好ましくは 7.2 ~ 7.6 に緩衝作用を有する緩衝液中に本発明に係る Tim タンパク質を含有する溶液）を通常 0.5 μ L ~ 1 mL、好ましくは 0.5 μ L ~ 100 μ L、より好ましくは 0.5 μ L ~ 10 μ L と、試料を本発明に係る Tim タンパク質 1 μ g 当たり通常 0.1 ~ 100 mL、好ましくは 0.1 ~ 10 mL、より好ましくは 0.1 ~ 1 mL と、試料とカルシウムイオンを含有する溶液と本発明に係る Tim タンパク質を含有する溶液とを混合した溶液中及びさらに当該溶液と本発明に係る担体を接触後の溶液中におけるカルシウムイオンの濃度が通常 0.5 ~ 100 mM、好ましくは 1 ~ 10 mM、より好ましくは 2 ~ 5 mM となる量のカルシウムイオンを含有する溶液とを、通常 4 ~ 37℃、好ましくは 4 ~ 25℃、より好ましくは 4 ~ 11℃、通常 0.5 ~ 24 時間、好ましくは 0.5 ~ 8 時間、より好ましくは 0.5 ~ 4 時間接触させ、本発明の Tim タンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させた後、更に本発明に係る複合体を形成させる際の溶液 1 mL 当たり本発明に係る担体を通常 0.1 ~ 20 mg、好ましくは 0.3 ~ 10 mg、より好ましくは 0.5 ~ 6 mg 加えて、通常 4 ~ 37℃、好ましくは 4 ~ 25℃、より好ましくは 4 ~ 11℃、通常 0.5 ~ 24 時間、好ましくは 0.5 ~ 8 時間、より好ましくは 0.5 ~ 4 時間、得られた本発明の Tim タンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体と本発明に係る担体とを接触させて、本発明に係る複合体を形成させる。

[0141] — (1-B-iii) について—

(1-B-iii) は、本発明の担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させた後、更に本発明の Tim タンパク質をカルシウムイオンの存在下で接触させて、〔細胞外膜小胞又はウイルス—（本発明に係る Tim タンパク質）—アフィニティー物質—（本発明に係る担体）〕からなる本発

明に係る複合体を形成させる方法である。

具体的には、例えばアフィニティー物質として互いに親和性を有する2種以上の物質を用いる場合は、一方のアフィニティー物質が結合した担体（アフィニティー物質結合担体）と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させ、次いで、これと、もう一方のアフィニティー物質が結合したTimタンパク質（アフィニティー物質結合Timタンパク質）とを、カルシウムイオンの存在下で同時に接触させて、アフィニティー物質結合Timタンパク質中のTimタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとを結合させると共に、アフィニティー物質結合Timタンパク質中のアフィニティー物質とアフィニティー物質結合担体中のアフィニティー物質とを結合させることによって、〔細胞外膜小胞又はウイルス－（本発明に係るTimタンパク質－アフィニティー物質）－（アフィニティー物質－本発明に係る担体）〕複合体を形成させる。

また、例えばアフィニティー物質としてアフィニティータグに親和性を有する物質や抗Tim抗体を用いる場合は、アフィニティー物質が結合した担体（アフィニティー物質結合担体）と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させ、次いで、これと、本発明に係るTimタンパク質とを、カルシウムイオン存在下で同時に接触させて、本発明に係るTimタンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとを結合させると共に、本発明に係るTimタンパク質とアフィニティー物質結合担体中のアフィニティー物質とを結合させることによって、〔細胞外膜小胞又はウイルス－本発明に係るTimタンパク質－（アフィニティー物質－本発明に係る担体）〕複合体を形成させる。

（1-B-iii）において、カルシウムイオンは、本発明に係るTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際に存在させればよい。具体的には、本発明に係るTimタンパク質を含有する溶液、又は／及び試料中の細胞外膜小胞又はウイルスにカルシウムイオンを含有させたものを用いても、本発明に係るTim4タンパク質を含有する溶液と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとカルシウムイオンを含有する溶液とを用

いてもよい。

[0142] ー本発明に係る試料の量ー

(1-B-iii)において、本発明に係るTimタンパク質1 μ gと接触させる試料の量は、通常0.1~100ml、好ましくは0.1~10ml、より好ましくは0.1~1mlである。

[0143] ー本発明に係るTimタンパク質の量ー

(1-B-iii)において、本発明に係るTimタンパク質の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1mL当たり通常0.01~200 μ g、好ましくは0.15~50 μ g、より好ましくは0.5~24 μ gである。

[0144] ー本発明に係る担体の量ー

(1-B-iii)において、本発明に係る担体の量としては、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液1mL当たり通常0.1~20mg、好ましくは0.3~10mg、より好ましくは0.5~6mgである。

[0145] ー接触温度ー

(1-B-iii)において、本発明に係る担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際の温度としては、通常4~37 $^{\circ}$ C、好ましくは4~25 $^{\circ}$ C、より好ましくは4~11 $^{\circ}$ Cである。

[0146] (1-B-iii)において、本発明の担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させた後、更に本発明のTimタンパク質を接触させる際の温度としては、通常4~37 $^{\circ}$ C、好ましくは4~25 $^{\circ}$ C、より好ましくは4~11 $^{\circ}$ Cである。

[0147] ー接触時間ー

(1-B-iii)において、本発明に係る担体と試料とを接触させる際の接触時間としては、通常0.5~24時間、好ましくは0.5~8時間、より好ましくは0.5~4時間である。

[0148] (1-B-iii)において、本発明の担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させた後、更に本発明に係るTimタンパク質を接触させ

る際の接触時間としては、通常0.5～24時間、好ましくは0.5～8時間、より好ましくは0.5～4時間である。

[0149] 尚、一般には、本発明の担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させた後、更に本発明に係るTimタンパク質との接触は、本発明に係るTimタンパク質を含有する溶液とカルシウムイオンを含有する溶液とを用いて行われる。

[0150] 本発明に係るTimタンパク質を含有させる溶液としては、本発明に係るTimタンパク質を安定な状態で溶解させ、本発明に係るTimタンパク質と本発明に係る担体と細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を妨げないものであればよく、例えば精製水、例えばpH7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばPBS、TBS、HBS等）が挙げられる。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50mM、好ましくは10～30mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200mM、好ましくは140～160mMの範囲から適宜選択される。この溶液中には、本発明に係るTim4タンパク質を安定な状態で溶解させ、本発明に係るTimタンパク質と本発明に係る担体と細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばTween20等が挙げられ、当該本発明に係るTimタンパク質を含有させる溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.0005～0.1%である。

[0151] カルシウムイオンを含有させる溶液としては、前記の本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有（溶解又は懸濁）させる溶液と同様であり、具体例等も同様である。

カルシウムイオンを含有する溶液としては、カルシウムイオンを含有させる溶液中、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液中のカルシウムイオンの濃度が通常0.5～100mM、好ましくは1～10mM、より好ましくは2～5mMとなる量のカルシウムイオンを含有する溶液である。

[0152] — (1-B-iii) の具体例 —

(1-B-iii) は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、本発明に係る試料を本発明に係る Tim タンパク質 1 μ g 当たり通常 0.1 ~ 100 ml、好ましくは 0.1 ~ 10 ml、より好ましくは 0.1 ~ 1 ml と、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液 1 mL 当たり本発明に係る担体を通常 0.1 ~ 20 mg、好ましくは 0.3 ~ 10 mg、より好ましくは 0.5 ~ 6 mg とを、通常 4 ~ 37 $^{\circ}$ C、好ましくは 4 ~ 25 $^{\circ}$ C、より好ましくは 4 ~ 11 $^{\circ}$ C、通常 0.5 ~ 24 時間、好ましくは 0.5 ~ 8 時間、より好ましくは 0.5 ~ 4 時間接触させた後、カルシウムイオンを、本発明に係る試料とカルシウムイオンを含有する溶液と本発明に係る担体とを接触させてさらに本発明に係る Tim タンパク質を含有する溶液を接触させた溶液中におけるカルシウムイオンの濃度が通常 0.5 ~ 100 mM、好ましくは 1.0 ~ 10 mM、より好ましくは 2 ~ 5 mM となる量含有するカルシウムイオン含有溶液と通常 0.01 ~ 200 μ g、好ましくは 0.15 ~ 50 μ g、より好ましくは 0.5 ~ 24 μ g の本発明に係る Tim タンパク質を含有する溶液（例えば精製水、例えば pH 7.0 ~ 8.0、好ましくは 7.2 ~ 7.6 に緩衝作用を有する緩衝液中に本発明に係る Tim タンパク質を含有する溶液）を本発明に係る複合体を形成させる際の溶液 1 mL 当たり通常 0.5 μ L ~ 1 ml、好ましくは 0.5 μ L ~ 100 μ L、より好ましくは 0.5 μ L ~ 10 μ L 加えて、通常 4 ~ 37 $^{\circ}$ C、好ましくは 4 ~ 25 $^{\circ}$ C、より好ましくは 4 ~ 11 $^{\circ}$ C、通常 0.5 ~ 24 時間、好ましくは 0.5 ~ 8 時間、より好ましくは 0.5 ~ 4 時間接触させて、本発明に係る複合体を形成させる。

[0153] <6-2. 複合体分離工程>

本発明の取得方法における複合体分離工程は、複合体形成工程の後、得られた本発明に係る担体に結合した Tim タンパク質（本発明の Tim 担体）と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体（本発明に係る複合体）と試料とを分離し、分離された本発明に係る複合体を取得する工程である。

[0154] 本発明の取得方法における複合体分離工程は、本発明に係る複合体と試料とを分離して本発明に係る複合体を取得することができればどのような方法であってもよいが、例えば以下のような方法が挙げられる。

[0155] (1) 磁気担体を本発明に係る担体として用いる場合、複合体形成工程をおこなった容器を要すればマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明に係る複合体を集合させ、上清の試料を除くことによりこれらを分離する方法。

(2) 本発明の担体がビーズ状である場合、複合体形成工程をおこなった容器を遠心分離処理し、本発明に係る複合体を沈殿として集合させた後、上清の試料を除くことによりこれらを分離する方法。

(3) 本発明の担体がビーズ状でないプレートなどを用いた場合、試料のみを除くことによりこれらを分離する方法。

(4) ろ過により本発明に係る複合体と試料とを分離する方法。

このようにして本発明の複合体と試料とを分離した後、分離された本発明の複合体を自体公知の方法により取得（回収）すればよい。

[0156] ー複合体分離工程の具体例ー

磁気担体を本発明に係る担体として用いる場合、複合体形成工程をおこなった容器を要すればマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明に係る複合体を集合させ、上清の試料を除く。

[0157] <6-3. 洗浄操作>

複合体形成工程、複合体分離工程の後、要すれば得られた本発明に係る複合体をカルシウムイオン含有洗浄溶液を用いて洗浄してもよい（以下、「洗浄操作」と略記する場合がある）。洗浄操作により、本発明に係る担体表面に付着した細胞由来成分等の本発明に係る試料中の夾雑物を除去することができる。洗浄方法としては、上記した如きカルシウムイオン含有洗浄液を使用する以外は、通常この分野で行われている洗浄方法が使用できる。当該洗浄操作において用いられるカルシウムイオン含有洗浄溶液としては、カルシウムイオンを通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より

好ましくは通常2～5 mM含有し、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTim4タンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液であればいずれでもよく、例えば、カルシウムイオンを通常0.5～100 mM、好ましくは通常1～10 mM、より好ましくは通常2～5 mM含有する、pH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有するカルシウムを沈殿させない緩衝液（例えばTBS、HBS）が挙げられる。尚、リン酸バッファーはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50 mM、好ましくは10～30 mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200 mM、好ましくは140～160 mMの範囲から適宜選択される。この溶液中には、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTimタンパク質と本発明の担体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばtween 20（和光純薬工業（株）製）等が挙げられ、当該洗浄溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.0005～0.1%である。

[0158] 例えば、本発明に係る担体として、磁性粒子を用いる場合を例に取り説明する。まず、複合体分離工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器内にカルシウムイオン含有洗浄溶液を加え、攪拌する。その後、前記容器を、マグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に当該複合体を集合させ、前記容器内の溶液を捨てる。これらの洗浄操作は、必要に応じて数回繰り返して行ってもよい。

[0159] ー洗浄操作の具体例ー

まず、複合体分離工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器内にカルシウムイオン含有洗浄溶液（例えば、カルシウムイオンを通常0.5～100 mM、好ましくは通常1～10 mM、より好ましくは通常2～5 mM含有する、pH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有

するカルシウムを沈殿させない緩衝液。但し、リン酸バッファはカルシウムと結合して沈殿することから好ましくない。)を加え、攪拌する。その後、前記容器を、マグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に当該複合体を集合させ、前記容器内の溶液を捨てる。これらの洗浄操作は、必要に応じて数回繰り返して行ってもよい。

[0160] <6-4. 取得工程について>

取得工程は、複合体形成工程、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄工程（洗浄操作）を行った後、得られた本発明に係る担体に結合したTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体から細胞外膜小胞又はウイルスを分離し、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを取得する工程である。

これにより、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを高純度を取得することが出来る。

[0161] 取得工程の具体例としては、例えば以下の(2-A)及び(2-B)が挙げられる。

(2-A) タンパク質変性剤を用いる方法

(2-B) カルシウムイオン濃度を低下させる方法

[0162] <(2-A)：タンパク質変性剤を用いる方法>

(2-A)は、複合体形成工程、複合体分離工程を行った後、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体に、タンパク質変性剤を作用させて、本発明に係る複合体中の本発明に係るTimタンパク質を変性させ、本発明に係る複合体から、細胞外膜小胞又はウイルスを分離する方法である。これにより、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを高純度を取得することができる。

[0163] ータンパク質変性剤ー

(2-A)で用いられるタンパク質変性剤としては、この分野において一般にタンパク質を変性させる化合物として用いられるものであればいずれでもよく、例えば、SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、N-ラウロイルサル

コシン等の陰イオン性界面活性剤；CHAPS（3-（3-コラミドプロピル）シエツルアミノ-1-プロパンスルホン酸塩）、Zwittergent 3-12（N-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホナート）等の両イオン性界面活性剤；Brj 35（タカラバイオ（株）製）、Dodecyl- β -D-maltoside（n-ドデシル- β -D-マルトシド）、ノニデット P-40、Octyl- β -D-glucoside（オクチル- β -D-グルコシド）、Triton X-100（ポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル）、Tween 20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）等の非イオン性界面活性剤；尿素、ホルムアミド、グアニジン等のカオトロピック剤等が挙げられ、陰イオン性界面活性剤が好ましく、SDSが特に好ましい。

[0164] （2-A）において、これらのタンパク質変性剤を本発明に係る複合体に作用させるには、一般的には、タンパク質変性剤を含有させた溶液（以下、「タンパク質変性剤含有溶液」と略記する場合がある）と、本発明に係る担体に結合したTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体とを接触させ、タンパク質変性剤含有溶液を本発明に係る複合体に作用させることにより行われる。

尚、タンパク質変性剤含有溶液と本発明に係る複合体との接触は、例えば、当該溶液に当該複合体を懸濁させる方法（担体がビーズである場合等）、当該溶液に当該複合体を浸漬させる方法（担体がディスク状片、チューブである場合等）、当該溶液を当該複合体（担体）に添加する方法（担体がマイクロプレート、チューブである場合等）等により行うことができる。

[0165] ータンパク質変性剤を含有させる溶液ー

（2-A）において、タンパク質変性剤を含有させる溶液としては、精製水、タンパク質変性剤を溶解させることができる緩衝液等が挙げられる。当該緩衝液としては、通常pHが6～9、好ましくは7～8に緩衝作用を有する緩衝液（例えばTris、HEPES等）が挙げられる。また、これらの

緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～100mM、好ましくは10～50mMの範囲から適宜選択される。

[0166] ータンパク質変性剤含有溶液ー

(2-A)において、タンパク質変性剤含有溶液のpHは通常6.0～9.0、好ましくは7.0～8.0である。タンパク質変性剤含有溶液中のタンパク質変性剤の濃度としては、タンパク質変性剤の種類により異なるが、一般にこの分野において用いられる濃度範囲であればよく、例えばSDSの場合、通常0.1～10%、好ましくは0.3～4%、より好ましくは0.5～2%である。また、タンパク質変性剤含有溶液は、例えば糖類、NaCl等の塩類、防腐剤、蛋白質等を含んでいてもよい。(2-A)において、タンパク質変性剤含有溶液は、本発明のTim担体1mgに対して通常10μL～500μL、好ましくは20μL～200μL、より好ましくは50μL～100μL用いられる。

[0167] ー作用（接触）条件ー

(2-A)において、複合体にタンパク質変性剤を作用（接触）させる温度や時間としては、通常4.0～37℃、好ましくは10～30℃、より好ましくは20～30℃で、通常5.0～60秒間、好ましくは10～30秒間、より好ましくは10～20秒間である。

[0168] ーTimタンパク質ー

タンパク質変性剤を作用（接触）させる（即ち(2-A)の場合、細胞外膜小胞を取得する場合における本発明に係るTimタンパク質としては、前記の本発明に係るTimタンパク質であればいずれでも用いることができるが、本発明に係るTim4タンパク質及び本発明に係るTim1タンパク質が好ましく、本発明に係るTim4タンパク質が特に好ましく、またウイルスを取得する場合には、本発明に係るTim4タンパク質及び本発明に係るTim3タンパク質が特に好ましい。

[0169] ー(2-A)の具体例ー

(2-A)は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、複合体形成工程、

複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体に、タンパク質変性剤を通常0.1～10%、好ましくは0.3～4.0%、より好ましくは0.5～2.0%含有する溶液（精製水、又は通常pHが6～9、好ましくは7～8に緩衝作用を有する緩衝液中にタンパク質変性剤を含有する溶液）を、本発明のTim担体1mgに対して通常10μL～500μL、好ましくは20μL～200μL、より好ましくは50μL～100μL添加し、ボルテックスミキサー等を用いて攪拌しながら通常4～37℃、好ましくは10～30℃、より好ましくは20～30℃で、通常5～60秒間、好ましくは10～30秒間、より好ましくは10～20秒間反応させ、本発明に係る複合体中の本発明に係るTimタンパク質とタンパク質変性剤とを接触させることにより作用させ、本発明に係る複合体から細胞外膜小胞又はウイルスを分離させる。

[0170] <（2-B）：カルシウムイオン濃度を低下させる方法>

（2-B）は、複合体形成工程、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオン及び複合体を含有する溶液中のカルシウムイオンの濃度を低下させることによって、本発明に係る複合体から、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを分離させる方法である。

これにより、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを高純度で、且つインタクトな状態で取得することができる。

[0171] ところで、Timタンパク質とホスファチジルセリンの結合においては、カルシウムイオンが介在していることが知られている（Immunity 2007 December; 27（6）：941－951）。複合体形成工程、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体も、本発明に係る複合体中の本発明に係るTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を保つために、カルシウムイオンを共存させておく必要がある。例えば本発明に係る複合体を溶液中に共存させる場合には、本発明に係る複合体の溶液中に0.5mM以上のカルシ

ウムイオンが必要である。ここで、本発明に係る複合体を溶液中に共存させる場合には、複合体形成工程、複合体分離工程、要すれば洗浄操作を行った後のペレット状態の担体も包含される。

なお、複合体形成工程、複合体分離工程、要すれば洗浄操作を行った後の本発明に係る複合体が乾燥したとしても、取得工程を行わない限り当該複合体からカルシウムイオンが溶出することはなく、本発明の担体と細胞外膜小胞又はウイルスとの結合は保たれる。

[0172] (2-B) は、本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンから持ち込まれたカルシウムイオンの濃度を上記した如き本発明に係る Tim タンパク質と細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を保つために必要な濃度（有効濃度）より低下させることによって、本発明に係る複合体から、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを分離させることが可能となる。

具体的には、本発明に係る複合体を含有される溶液中のカルシウムイオンの濃度を通常 0.5 mM 未満、好ましくは 0.4 mM 未満、より好ましくは 0.2 mM 未満とすればよい。

[0173] カルシウムイオンの（有効）濃度を低下させる方法としては、例えば以下の (2-B-i)、(2-B-ii) 等が挙げられる。

[0174] (2-B-i) カルシウムイオンキレート剤を使用する方法

(2-B-ii) カルシウムイオンを含まない溶液を用いる方法

[0175] — (2-B-i) : カルシウムイオンキレート剤を使用する方法 —

(2-B-i) は、複合体形成工程、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオン及び複合体を含有する溶液から持ち込まれたカルシウムイオンにカルシウムイオンキレート剤を作用させた後、本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオン及び複合体を含有する溶液から持ち込まれたカルシウムイオンの（有効）濃度を低下させる（カルシウムイオンをキレートさせる）ことによって、本発明に係る複合体から細胞外膜小胞又はウイルスを分離させる方法である。

これにより、本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを高純度で、且つインタクトな状態で取得することができる。

[0176] ーカルシウムイオンキレート剤ー

カルシウムイオンキレート剤としては、カルシウムイオンをキレートし得る化合物であればいずれでもよく、例えば、EDTA（エチレンジアミン四酢酸）、NTA（ニトリロ三酢酸）、DTPA（ジエチレントリアミン五酢酸）、GLDA（L-グルタミン酸二酢酸）、HEDTA（ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸）、GEDTA（エチレングリコールビス（ β -アミノエチルエーテル）-N, N, N, N-四酢酸）、TTHA（トリエチレントトラミン-N, N, N', N', N', N'-六酢酸）、HIDA（2-ヒドロキシエチルイミノ二（酢酸））、DHEG（N, N-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン）、CyDTA（trans-1, 2-Diaminocyclohexane-N, N, N', N'-tetraacetic acid, monohydrate）等が挙げられ、EDTA、GEDTA、CyDTAが好ましい。これらのカルシウムイオンキレート剤を本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンに作用させるには、一般には、カルシウムイオンキレート剤を含有させた溶液（以下、「カルシウムイオンキレート剤含有溶液」と略記する場合がある）をペレット状の本発明に係る複合体と接触させ、本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンとカルシウムイオンキレート剤含有溶液中のカルシウムイオンキレート剤とを反応させることにより行われる。

尚、カルシウムイオンキレート剤含有溶液と本発明に係る複合体との接触は、例えば当該溶液に当該複合体を懸濁させる方法（担体がビーズである場合等）、当該溶液に当該複合体を浸漬させる方法（担体がディスク状片、チューブである場合等）、当該溶液を当該複合体（担体）に添加する方法（担体がマイクロプレート、チューブである場合等）等により行うことができる。

[0177] ーカルシウムイオンキレート剤含有溶液ー

(2-B-i)において、カルシウムイオンキレート剤を含有させる溶液としては、カルシウムイオンキレート剤を溶解させるものであればよく、例えば、精製水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液としては、通常pHが7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばPBS、TBS、HBS等）が好ましい。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50mM、好ましくは10～30mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200mM、好ましくは140～160mMの範囲から適宜選択される。カルシウムイオンキレート剤含有溶液は、例えば糖類、NaCl等の塩類、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

[0178] (2-B-i)において、カルシウムイオンキレート剤含有溶液中のカルシウムイオンキレート剤の濃度としては、通常0.5～500mM、好ましくは0.5～100mM、より好ましくは0.5～50mMである。

[0179] (2-B-i)において、カルシウムイオンキレート剤含有溶液のpHは、通常6.0～9.0、好ましくは7.0～8.0、より好ましくは7.2～7.6である。

[0180] (2-B-i)において、反応溶液に混合するカルシウムイオンキレート剤含有溶液の量としては、反応溶液中のカルシウムイオンの濃度を有効濃度未満とし、本発明に係る複合体から細胞外膜小胞又はウイルスが分離される量であればよい。

[0181] ー作用（接触）条件ー

(2-B-i)において、複合体にカルシウムイオンキレート剤を作用（接触）させる温度や時間としては、通常4.0～37℃、好ましくは10～30℃、より好ましくは20～30℃で通常5～60秒間、好ましくは10～30秒間、より好ましくは10～20秒間行う。

[0182] ーTim担体ー

(2-B-i)において、本発明に係るTimタンパク質と本発明に係る担体との結合様式としては、本発明に係る担体と本発明に係るTimタンパ

ク質とが結合していれば結合様式は問わない。カルシウムイオンキレート剤を用いて細胞外膜小胞又はウイルスを溶出させる場合（即ち（2-B-i）の場合）には、多くの細胞外膜小胞又はウイルスを取得可能であることから本発明に係る担体が本発明に係るTimタンパク質のSH基に結合したものが好ましく、本発明に係る担体が本発明に係るTim4タンパク質のSH基に結合したものが特に好ましい。

[0183] -（2-B-i）の具体例-

（2-B-i）は、例えば以下の方法で行えばよい。即ち、複合体形成工程、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体に、通常0.5～500mM、好ましくは0.5～100mM、より好ましくは0.5～50mMカルシウムイオンキレート剤を含有する溶液（精製水、又は通常pHが7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液中にカルシウムイオンキレート剤を含有する溶液）を本発明のTim担体1mg当たり通常10～500μL、好ましくは20～200μL、より好ましくは50～100μL添加し、ボルテックスミキサー等を用いて攪拌しながら通常4.0～37℃、好ましくは10～30℃、より好ましくは20～30℃で通常5～60秒間、好ましくは10～30秒間、より好ましくは10～20秒間反応させ、本発明に係る複合体から、細胞外膜小胞又はウイルスを分離させる。

[0184] -（2-B-ii）：カルシウムイオンを含まない溶液を用いる方法-

（2-B-ii）は、複合体形成工程を行い、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体を、カルシウムイオンを含まない溶液と接触させることにより、本発明に係る複合体と結合しているカルシウムイオンの（有効）濃度を低下させる（希釈する）ことによって、本発明に係る複合体から細胞外膜小胞又はウイルスを分離させる方法である。

[0185] 即ち、本発明に係る複合体に、カルシウムイオンを含まない溶液を接触させることにより、本発明に係る複合体中の本発明に係るTimタンパク質と

試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの結合を保つ為に必要なカルシウムイオンの（有効）濃度を低下させ（希釈し）、本発明に係る複合体から、細胞外膜小胞を分離させることが可能となる。

尚、カルシウムイオンを含まない溶液と本発明に係る複合体との接触は、例えば、当該溶液に当該複合体を懸濁させる方法（担体がビーズである場合等）、当該溶液に当該複合体を浸漬させる方法（担体がディスク状片、チューブである場合等）、当該溶液を当該複合体（担体）に添加する方法（担体がマイクロプレート、チューブである場合等）等により行うことができる。

[0186] ーカルシウムイオンを含まない溶液ー

（2-B-ii）において、得られた本発明に係る複合体に添加するカルシウムイオンを含まない溶液としては、細胞外膜小胞又はウイルスを変性させない溶液であればよく、例えば、精製水、緩衝液等が挙げられる。緩衝液としては、通常pHが7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばPBS、TBS、HBS等）が好ましい。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50mM、好ましくは10～30mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200mM、好ましくは140～160mMの範囲から適宜選択される。カルシウムイオンを含まない溶媒は、例えば糖類、NaCl等の塩類、防腐剤、蛋白質等を含んでいてもよい。

[0187] （2-B-ii）において、得られた本発明に係る複合体に添加するカルシウムイオンを含まない溶液の量としては、カルシウムイオンの濃度を有効濃度未満にできる量であればよい。

[0188] ー（2-B-ii）の具体例ー

複合体形成工程、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体に、カルシウムイオンを含まない溶液を、本発明に係る複合体を含む溶液中のカルシウムイオンの濃度を通常0.5mM未満、好ましくは0.1mM未満、より好ましくは0.01mM未満となるように添加することにより行われる。

[0189] 尚、複合体形成工程、複合体分離工程を行い、要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係る複合体がカルシウムイオンを含有する溶液中（例えば、複合体形成工程を行った後の反応液、カルシウムイオン含有洗浄液）に存在する場合は、最終的なカルシウムイオンの濃度が上記した有効濃度未満となるように、当該カルシウムイオンを含有する溶液を、カルシウムイオンを含まない溶液に置換又は／及びカルシウムイオンを含まない溶液により希釈すればよい。

[0190] 取得工程により得られた細胞外膜小胞を含有する溶液の（体積増加）量が、 $(2 - B - i)$ の方が $(2 - B - i)$ よりも多いことから、 $(2 - B - i)$ の方が好ましい。

[0191] 前記において、複合体と接触・作用させた溶液（タンパク質変性剤含有溶液、カルシウムイオンキレート剤含有溶液、カルシウムイオンを含まない溶液）中には、担体と、担体（複合体）から分離（遊離）した細胞外膜小胞又はウイルスが含有していることとなる。従って、当該溶液から担体を除去し、溶液だけを回収すれば、細胞外膜小胞又はウイルスを含有する溶液を得ることが出来る。

[0192] 本発明のT i m担体を用いれば、試料から細胞外膜小胞又はウイルスを効率よく除去でき、夾雑物の少ない試料を得ることができる。

[0193] 本発明の除去方法は、超遠心分離法やポリマー沈殿処理等の従来法では除去しきれない試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを精度よく効率的に除去することが出来る。

[0194] < 7. 試料中の細胞外膜小胞又はウイルスの除去方法 >

本発明の細胞外膜小胞又はウイルスを取得する方法（以下、「本発明の除去方法」と略記する場合がある）は、以下の工程を含むことを特徴とする。

（１）カルシウムイオン存在下、担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（以下、「複合体形成工程」と略記する場合がある）

（２）当該複合体と試料とを分離する工程（以下、「複合体分離工程」と略

記する場合がある）。

[0195] ＜ 7 - 1 . 複合体形成工程＞

本発明の除去方法における複合体形成工程は、本発明の取得方法における複合体形成工程と同じであり、各種の好ましい条件も同じである。

[0196] ＜ 7 - 2 . 複合体分離工程＞

本発明の除去方法における複合体分離工程は、複合体形成工程を行った後、得られた本発明に係る担体に結合した T i m タンパク質（本発明の T i m 担体）と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体（本発明に係る複合体）と試料とを分離し、分離された試料を取得する工程である。

これにより、細胞外膜小胞又はウイルスが除去された試料を得ることができる。

[0197] 本発明の除去方法における複合体分離工程は、本発明に係る複合体を試料から除去することができればどのような方法であってもよく、前記本発明の取得方法における複合体分離工程と同じ方法が挙げられる。このようにして本発明の複合体と試料とを分離した後、分離された試料を自体公知の方法により取得（回収）すればよい。

[0198] これにより、超遠心分離法やポリマー沈殿処理等の従来法では除去しきれない試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを精度よく効率的に除去することが出来る。

[0199] また、前記の複合体形成工程及び複合体分離工程を複数回繰り返し行うことにより、試料からの細胞外膜小胞又はウイルスの除去をより効率的に行うことができる。前記の複合体形成工程及び複合体分離工程を繰り返し行う際には、新たな担体を用いても使用済みの担体を再利用することもできる。担体の再利用は、本発明の除去方法における複合体分離工程で除去した本発明に係る複合体を、カルシウムイオンキレート剤含有溶液又はカルシウムイオンを含まない溶液を用いて本発明の取得方法の取得工程（（2 - B）カルシウムイオン濃度を低下させる方法）と同様の処理に付せばよい。これにより、本発明に係る複合体から本発明の T i m 担体と細胞外膜小胞又はウイルス

とを分離させることができる。即ち、本発明のTim担体は、再度本発明の除去方法に用いることができるため、当該本発明のTim担体を再利用することで試料中の細胞外膜小胞又はウイルスの除去を精度よく効率的に行うことができる。

[0200] 本発明のTim担体を用いれば、試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを精度よく高感度で検出することができる。

[0201] <8. 試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを検出する方法>

本発明の細胞外膜小胞又はウイルスを検出する方法（以下、「本発明の検出方法」と略記する場合がある）は、以下の工程を含むことを特徴とする。

（１）カルシウムイオン存在下、担体に結合したTimタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（複合体形成工程）

（２）当該複合体を検出する工程（検出工程）

[0202] <8-1. 複合体形成工程>

本発明の検出方法における複合体形成工程は、カルシウムイオン存在下、本発明のTim担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程である。

[0203] ー本発明に係る試料ー

本発明に係る試料は、本発明の取得方法における試料と同様である。

[0204] ーカルシウムイオン濃度・カルシウムイオンの由来ー

本発明の検出方法において、カルシウムイオンは本発明に係るTim担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体（本発明に係る複合体）を形成させる際に存在させる。

[0205] 本発明の検出方法において、本発明に係るTim担体と本発明に係る試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際のカルシウムイオン濃度は、通常0.5～100mM、好ましくは1～10mM、より好ましくは2～5mMである。尚、本発明に係るTim担体と本発明に係る試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体が形成され、検出工程を実施するまで、即ち

当該複合体を検出する工程に付すまでの当該複合体を含有する溶液中には、前記した如き濃度のカルシウムイオンが必要であることは言うまでもない。

[0206] また、カルシウムイオンの由来は特に限定されず、本発明の取得方法におけるカルシウムイオンの由来と同様の具体例が挙げられる。

[0207] 尚、本発明のT i m担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際にカルシウムイオンを存在させる方法としては、一般的には、本発明のT i m担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際のカルシウムイオン濃度が上記した範囲となるように、試料に前記した如きカルシウムイオンを含有させればよい。

カルシウムイオンを含有させる溶液としては、前記の本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有（溶解又は懸濁）させる溶液と同様であり、具体例等も同様である。

[0208] ー試料の量ー

本発明の検出方法の複合体形成工程において試料の量としては、本発明に係る担体としてビーズを用いる場合、本発明のT i m担体1 m g当たり通常0. 1～1 0 0 0 m l、好ましくは0. 1～5 0 0 m l、より好ましくは0. 1～1 0 0 m l、本発明に係る担体としてマイクロプレートを用いる場合、1 ウェルあたり通常5 0 μ L～3 0 0 μ L、好ましくは1 0 0 μ L～2 0 0 μ Lである。

[0209] ー温度ー

本発明の検出方法の複合体形成工程において、本発明のT i m担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させる際の温度としては、通常2～3 7℃、好ましくは2～3 0℃である。

[0210] ー時間ー

本発明の検出方法の複合体形成工程において、本発明に係るT i mタンパク質と試料との接触時間としては、通常0. 5～2 4時間、好ましくは1～2 0時間、より好ましくは1～1 2時間である。

[0211] ーT i mタンパク質ー

本発明の検出方法における本発明に係るT i mタンパク質としては、前記の本発明に係るT i mタンパク質であればいずれでも用いることができるが、本発明に係るT i m 4 タンパク質が特に好ましい。

[0212] – T i m担体 –

本発明に係るT i mタンパク質と本発明に係る担体との結合様式としては、本発明に係る担体と本発明に係るT i mタンパク質とが結合していれば結合様式は問わないが、高感度に細胞外膜小胞又はウイルスを検出可能であることから本発明に係る担体が本発明に係るT i mタンパク質のS H基に結合したものが好ましく、本発明に係る担体が本発明に係るT i m 4 タンパク質のS H基に結合したものが特に好ましい。

[0213] – 本発明の検出方法における複合体形成工程の具体例 –

本発明の検出方法における複合体形成工程は、例えば以下の方法で行えばよい。

即ち、本発明に係る担体としてビーズを用いる場合、本発明のT i m担体を、本発明のT i m担体と試料とカルシウムイオンを含有する溶液とを混合後の溶液（本発明に係る複合体を形成させる際の溶液）1 m L 当たり通常0. 0 0 1 ~ 2 0 m g、好ましくは0. 0 0 5 ~ 1 0 m g、より好ましくは0. 0 1 ~ 6. 0 m g と、本発明に係る複合体を形成させる際の溶液中のカルシウムイオン濃度が通常0. 5 ~ 1 0 0 m M、好ましくは1. 0 ~ 1 0 m M、より好ましくは2. 0 ~ 5. 0 m Mとなる量のカルシウムイオンを含有する溶液と、本発明のT i m担体1 m g 当たり通常0. 1 ~ 1 0 0 0 m l、好ましくは0. 1 ~ 5 0 0 m l、より好ましくは0. 1 ~ 1 0 0 m l の試料とを、通常2 ~ 3 7 °C、好ましくは2 ~ 3 0 °C、通常0. 5 ~ 2 4 時間、好ましくは1 ~ 2 0 時間、より好ましくは1 ~ 1 2 時間接触させて、本発明に係る担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる。

本発明に係る担体としてマイクロプレートを用いる場合、T i mタンパク質を固定化したマイクロプレートの各ウェル（本発明のT i m担体）に、本

発明に係る複合体を形成させる際の溶液中のカルシウムイオン濃度が通常0.5～100mM、好ましくは1.0～10mM、より好ましくは2.0～5.0mMとなる量のカルシウムイオンを含有する溶液と、本発明に係る試料を1ウェルあたり通常50 μ L～300 μ L、好ましくは100 μ L～200 μ L添加し、通常2℃～37℃、好ましくは2℃～30℃で通常0.5時間～24時間、好ましくは1時間～20時間、より好ましくは1～12時間反応させることにより、本発明のTim担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体（本発明に係る複合体）を形成させる。

[0214] ＜8－2. 本発明の検出方法における検出工程＞

本発明の検出方法における検出工程は、複合体形成工程を行った後、要すれば試料の複合体分離工程を行い、要すればさらに洗浄操作を行った後、本発明のTim担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体（本発明に係る複合体）を検出する工程である。

[0215] ー複合体分離工程ー

本発明の検出方法における複合体分離工程は、複合体形成工程の後、要すれば、得られた本発明に係る担体に結合したTimタンパク質（本発明のTim担体）と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体（本発明に係る複合体）から試料を除去する工程である。

[0216] 本発明の検出方法における複合体分離工程は、本発明に係る複合体と試料とを分離する、言い換えればいわゆるB/F分離することができればどのような方法であってもよく、この分野で用いられるB/F分離法が使用できる。このような方法としては、本発明の取得方法における複合体分離工程と同じである。

[0217] ー複合体分離工程の具体例ー

本発明の検出方法における複合体分離工程は、この分野における常法に従えばよいが、本発明に係る担体として磁気ビーズを用いる場合、例えば複合体形成工程をおこなった容器を要すればマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に本発明に係る複合体を集合させ、上清の試料を除く。

本発明に係る担体としてマイクロプレートを用いる場合、例えば複合体形成工程をおこなったマイクロプレートから、要すればマイクロピペット又はプレートウォッシャーを用いて試料を除く。

[0218] < 8 - 3. 洗浄操作 >

複合体形成工程の後、要すれば複合体分離工程を行い、要すれば、さらに得られた本発明に係る複合体を、カルシウムイオン含有洗浄溶液を用いて洗浄してもよい（以下、「洗浄操作」と略記する場合がある）。洗浄操作により、本発明に係る担体表面に付着した細胞由来成分等の本発明に係る試料中の夾雑物を除去することができる。洗浄方法等の各種条件は、本発明の取得方法における洗浄操作と同様である。

[0219] - 洗浄操作の具体例 -

本発明に係る担体として磁気ビーズを用い 1. 5 mL 容チューブで行う場合、まず、複合体分離工程により得られた本発明に係る複合体を含む容器内にカルシウムイオン含有洗浄溶液（例えば、カルシウムイオンを通常 0. 5 ~ 1 0 0 m M、好ましくは通常 1 ~ 1 0 m M、より好ましくは通常 2 ~ 5 m M 含有する、p H 7. 0 ~ 8. 0、好ましくは 7. 2 ~ 7. 6 に緩衝作用を有するカルシウムを沈殿させない緩衝液。但し、リン酸バッファはカルシウムと結合して沈殿することから好ましくない。）を通常 1 0 0 μ L ~ 1 5 0 0 μ L、好ましくは 2 0 0 μ L ~ 1 0 0 0 μ L 添加し、攪拌する。その後、前記容器を、マグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に当該複合体を集合させ、前記容器内の溶液を捨てる。これらの洗浄操作は、必要に応じて数回繰り返し行ってもよい。

本発明に係る担体としてマイクロプレートを用いる場合、まず、複合体分離工程により得られた本発明に係る複合体を含むウェルにカルシウムイオン含有洗浄溶液（例えば、カルシウムイオンを通常 0. 5 ~ 1 0 0 m M、好ましくは通常 1 ~ 1 0 m M、より好ましくは通常 2. 0 ~ 5. 0 m M 含有する、p H 7. 0 ~ 8. 0、好ましくは 7. 2 ~ 7. 6 に緩衝作用を有するカルシウムを沈殿させない緩衝液。但し、リン酸バッファはカルシウムと結合

して沈殿することから好ましくない。)を通常 $100\mu\text{L}\sim 300\mu\text{L}$ 、好ましくは $200\mu\text{L}\sim 300\mu\text{L}$ 添加し加え、次いで加えた洗浄液を除去する。これらの洗浄操作は、必要に応じて複数回繰り返し行ってもよい。

[0220] <8-4. 検出工程>

本発明の検出方法における検出工程は、本発明に係る複合体の有無及び／又は量を検出可能な方法であればいずれでもよく、自体公知の免疫学的測定に用いられる方法はいずれも利用できる。

本発明の検出工程は、上記した如き方法により調製された本発明のT i m担体を用いる以外は特に限定されない。このような免疫学的測定法としては、例えば、逆受身凝集反応法（東京化学同人 続生化学実験講座5 免疫生化学研究法 p. 36-37、金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p. 844-845等）等の凝集反応を利用した測定法、例えば、比ろう法（金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p. 851-853等）、免疫比濁法（金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p. 853-854等）等の凝集反応を応用した光学的測定法、ラジオイムノアッセイ法（RIA）（東京化学同人 続生化学実験講座5 免疫生化学研究法 p. 57-61、金原出版株式会社臨床検査法提要 第30版 p. 856-862等）、イムノラジオメトリックアッセイ法（IRMA）（金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p. 856-862等）、エンザイムイムノアッセイ法（EIA）（東京10化学同人 続生化学実験講座5 免疫生化学研究法 p. 62-65、金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p. 862-865、特開昭56-106154号公報、特開昭58-23796号公報等）、固相酵素免疫測定法（ELISA）（金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p. 1145-1149等）、蛍光・発光免疫測定法（金原出版株式会社 臨床検査法提要 第30版 p. 865-867等）、フローサイトメトリー法等の自体公知の免疫学的測定方法は全て挙げられ、固相酵素免疫測定法（ELISA）又はフローサイトメトリー法が好ましい。

[0221] 本発明の検出工程を固相酵素免疫測定法（E L I S A法）又はフローサイトメトリー法により行う場合、本発明に係る複合体を検出対象とする限りにおいて、自体公知の方法に従って行えばよい。例えば、細胞外膜小胞又はウイルスに対して結合する抗細胞外膜小胞抗体、抗ウイルス抗体等の標識物を用いて1次抗体を標識した標識1次抗体、又は当該1次抗体と当該1次抗体に対して結合する標識2次抗体を用いる方法が挙げられる。当該標識1次抗体及び標識2次抗体としては、E L I S A法又はフローサイトメトリー法の標識抗体に用いられるものであればいずれでもよく、例えばC y 3、C y 5、F I T C、ローダミン、P E等の蛍光物質で標識した蛍光標識抗体、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した酵素標識抗体、磁気ビーズ標識抗体、赤外標識抗体等が挙げられる。これらの標識抗体に係る蛍光等は、当該標識抗体の標識方法（標識物）に対応する自体公知の方法により測定すればよい。

[0222] ー標識抗体の希釈液ー

本発明の検出方法において、本発明に係る複合体と反応させる標識1次抗体、又は1次抗体及び標識2次抗体の希釈液としては、カルシウムイオンを含有する以外は、T i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体と当該抗体との結合を妨げないものであればよく、例えば水、p H 7. 0～8. 0、好ましくは7. 2～7. 6に緩衝作用を有する緩衝液（例えばT B S、H B S等）等が挙げられる。尚、リン酸バッファーはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50 m M、好ましくは10～30 m Mの範囲から適宜選択され、N a C l濃度は通常100～200 m M、好ましくは140～160 m Mの範囲から適宜選択される。この溶液中には、本発明に係るT i m担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体の結合を妨げない量であれば、例えば糖類、N a C l等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばT w e e n 20等が挙げられ、当該本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスを含有させる溶液

における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.0005～0.1%である。また当該希釈液のカルシウムイオン含有濃度は通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mMである。

[0223] 本発明の検出方法において、本発明に係る複合体と反応させる標識1次抗体、又は1次抗体及び標識2次抗体の希釈倍率は、抗体の活性や濃度によって異なるが、通常10倍～1000000倍、好ましくは1000倍～100000倍である。

[0224] 本発明の検出方法において、本発明に係る複合体と反応させる標識1次抗体、又は1次抗体及び標識2次抗体溶液の希釈溶液の量は、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1mgに対し通常0.1mL～1000mL、好ましくは0.1mL～500mL、より好ましくは0.1mL～100mLで、本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェルに、通常50 μ L～300 μ L、好ましくは50 μ L～200 μ L、より好ましくは50 μ L～100 μ Lである。

[0225] ー反応（接触）温度ー

本発明の検出方法において、本発明に係る複合体と標識1次抗体、又は1次抗体及び標識2次抗体の反応温度は、通常2～37℃、好ましくは11～33.7℃、より好ましくは20～30℃である。

[0226] ー反応（接触）時間ー

本発明の検出方法において、本発明に係る複合体と標識1次抗体、又は1次抗体及び標識2次抗体の反応時間は、通常0.5～12時間、好ましくは1～4時間、より好ましくは1～2時間である。

[0227] 本発明の検出方法における検出工程の検出操作において、標識1次抗体を用いる場合、本発明に係る複合体と標識1次抗体を反応させた後、洗浄操作により、未反応の標識1次抗体を除去することができる。また、1次抗体と標識2次抗体を用いる場合、本発明に係る複合体と1次抗体を反応させた後や本発明に係る複合体と1次抗体の複合体と標識2次抗体を反応させた後に

、洗浄操作により、未反応の1次抗体及び標識2次抗体を除去することができる。洗浄方法としては、上記した如きカルシウムイオン含有洗浄液を使用する以外は、通常この分野で行われている洗浄方法が使用できる。当該洗浄操作において用いられるカルシウムイオン含有洗浄溶液としては、カルシウムイオンを通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mM含有し、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTimタンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液であればいずれでもよく、例えば、カルシウムイオンを通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mM含有する、pH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有するカルシウムを沈殿させない緩衝液（例えばTBS、HBS）が挙げられる。尚、リン酸バッファーはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50mM、好ましくは10～30mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200mM、好ましくは140～160mMの範囲から適宜選択される。この溶液中には、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTimタンパク質と本発明の担体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばtween 20（和光純薬工業（株）製）等が挙げられ、当該洗浄溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.0005～0.1%である。本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1mgに対し、通常0.1mL～1000mL、好ましくは0.1mL～500mL、より好ましくは0.1mL～100mLで、本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェルに使用する洗浄液の量は通常100μL～300μL、好ましくは200μL～300μLで、添加した後に洗浄液を除去する。これらの洗浄操作は、必要に応じて複数回繰り返して行ってもよい。

[0228] ー検出ー

本発明の検出方法における検出工程が発色検出の場合、標識1次抗体又は標識2次抗体の標識物としてはペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等が挙げられる。これらの標識物は各標識物に応じた自体公知の方法に従って検出を行えばよい。

[0229] 発色検出における発色用基質液としては、通常この分野において用いられる発色用基質液であればいずれでもよく、例えば標識物としてペルオキシダーゼを用いる場合、TMB（テトラメチルベンジジン）溶液又はOPD（オルトフェニレンジアミン）溶液が挙げられ、好ましくはTMB溶液が挙げられる。

[0230] 発色検出における発色用基質の量としては、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1mgに対し通常0.1mL～1000mL、好ましくは0.1mL～500mL、より好ましくは0.1mL～100mLで、本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェルに、通常50μL～300μL、好ましくは50μL～200μL、より好ましくは50μL～100μLである。

[0231] 本発明の検出方法における検出工程が発色検出の場合、発色用基質液との反応時間は通常5分間～60分間、好ましくは10分間～40分間である。

[0232] 本発明の検出方法における検出工程が発色検出の場合、発色用基質液との反応温度は通常2℃～37℃、好ましくは20℃～30℃である。

[0233] 本発明の検出方法における検出工程が発色検出の場合、発色反応を停止させるため反応停止液として、通常、1mol/L塩酸又は1mol/L硫酸などの強酸を、発色基質液と等量加え、発色反応を停止させる。

[0234] 本発明の検出方法における検出工程が蛍光検出で、標識1次抗体又は標識2次抗体の標識体に蛍光物質を用いた場合、本発明に係る複合体と標識1次抗体との複合体、又は本発明に係る複合体と1次抗体及び標識2次抗体との複合体に蛍光測定液を添加して、蛍光を測定する。蛍光測定液はカルシウムイオン含有蛍光測定液を使用する以外は、通常この分野で用いることができ

る蛍光測定液（以下、「測定液」と略記する場合がある）が使用できる。当該蛍光測定液において用いられるカルシウムイオン含有測定液としては、カルシウムイオンを通常0.5～100 mM、好ましくは通常1～10 mM、より好ましくは通常2～5 mM含有し、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTimタンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液であればいずれでもよく、例えば、カルシウムイオンを通常0.5～100 mM、好ましくは通常1～10 mM、より好ましくは通常2～5 mM含有する、pH 7.0～8.0、好ましくは7.2～7.6に緩衝作用を有するカルシウムを沈殿させない緩衝液（例えばTBS、HBS）が挙げられる。尚、リン酸バッファーはカルシウムと結合して沈殿が生じるので好ましくない。また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常5～50 mM、好ましくは10～30 mMの範囲から適宜選択され、NaCl濃度は通常100～200 mM、好ましくは140～160 mMの範囲から適宜選択される。この溶液中には、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTimタンパク質と本発明の担体との結合を妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、BSA等の蛋白質等が含まれていても良い。界面活性剤としては、例えばtween 20（和光純薬工業（株）製）等が挙げられ、当該洗浄溶液における界面活性剤の濃度は、通常0.00001～0.2%、好ましくは通常0.0005～0.1%である。本発明の検出方法に用いる蛍光測定液の量は、本発明の検出法がELISA法で、本発明に係る担体がマイクロプレートの場合、1ウェルに使用する測定液の量は通常50 μ L～300 μ L、好ましくは50 μ L～200 μ Lである。本発明に係る検出法がフローサイトメトリー法で、本発明に係る担体がビーズの場合、本発明に係る担体1 mgに対し通常0.1 mL～1000 mL、好ましくは0.1 mL～500 mL、より好ましくは0.1 mL～100 mLである。

[0235] ー本発明の検出方法における検出工程の具体例ー

例えば本発明に係る担体としてマイクロプレートを用いてELISA法に

よりおこなう場合、複合体形成工程、要すれば複合体分離工程の後、さらに要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係るT i mタンパク質を固定化したマイクロプレートの各ウェルに対して、ペルオキシダーゼ標識した細胞外膜小胞又はウイルスに対する1次抗体又は未標識の1次抗体を通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mMカルシウムイオンを含有する希釈液で通常10倍～1000000倍、好ましくは1000倍～100000倍希釈した希釈溶液を、1ウェルあたり通常50 μ L～300 μ L、好ましくは50 μ L～200 μ L、より好ましくは50 μ L～100 μ L添加し、通常2～37℃、好ましくは11～37℃で0.5～12時間、好ましくは1～4時間反応させ、次いで、カルシウムイオンを含有する洗浄用バッファー（カルシウムイオンを通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mM含有し、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るT i mタンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液）を用いて各ウェルを洗浄する。未標識の1次抗体を使用する場合は、さらにペルオキシダーゼ標識した2次抗体を1次抗体と同様の方法で反応させた後、カルシウムイオンを含有する洗浄用バッファー（カルシウムイオンを通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mM含有し、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るT i mタンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液）を通常100 μ L～300 μ L、好ましくは200 μ L～300 μ Lで用いて各ウェルを洗浄する。次いで、TMB溶液又はOPD溶液などの発色用基質液を1ウェル当たり通常50 μ L～300 μ L、好ましくは50 μ L～200 μ L、より好ましくは50 μ L～100 μ L各ウェルに添加し、通常2℃～37℃、好ましくは20℃～30℃で5分間～60分間、好ましくは10分間～40分間反応させる。その後、1mol/L塩酸又は1mol/L硫酸などの反応停止液を発色基質液と等量加え、発色反応を停止させ、マイクロプレートリーダーで吸光度を測定する。

例えば本発明に係る担体としてビーズを用いてフローサイトメトリー法によりおこなう場合、複合体形成工程、要すれば複合体分離工程の後、さらに要すれば洗浄操作を行った後、得られた本発明に係るTimタンパク質を固定化したビーズに対して、蛍光標識した1次抗体又は未標識の1次抗体を通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mMカルシウムイオンを含有する希釈液で通常10倍～1000000倍、好ましくは1000倍～100000倍希釈した希釈溶液を、本発明に係る担体1mgに対し通常0.1mL～1000mL、好ましくは0.1mL～500mL、より好ましくは0.1mL～100mL添加し、通常2～37℃、好ましくは11～37℃で0.5～12時間、好ましくは1～4時間反応させ、次いで、カルシウムイオンを含有する洗浄用バッファー（カルシウムイオンを通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mM含有し、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTimタンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液）を用いてビーズを洗浄する。未標識の1次抗体を使用した場合は、さらに蛍光標識した2次抗体を1次抗体と同様の方法で反応させた後、カルシウムイオンを含有する洗浄用バッファー（カルシウムイオンを通常0.5～100mM、好ましくは通常1～10mM、より好ましくは通常2～5mM含有し、当該複合体における本発明に係る細胞外膜小胞又はウイルスと本発明に係るTimタンパク質と本発明の担体との結合に影響を与えない溶液）を用いてビーズを洗浄する。次いで、本発明に係る担体1mgに対し通常0.1mL～1000mL、好ましくは0.1mL～500mL、より好ましくは0.1mL～100mLの蛍光測定液を加えてビーズを懸濁した後、フローサイトメーターで蛍光強度を測定する。

[0236] 抗体の抗原に対する親和性は一般に10nM～100pMレベルのKdといわれている。一方、Tim4タンパク質とホスファチジルセリンとの結合力はKd=約2nM (Nature (Impact Factor: 41.46), 12/2007; 450(7168):435-9, D

O I : 10.1038/nature06307) と報告されている。細胞外膜小胞またはウィルスエンベロープ膜の表面抗原に対する抗体とその表面抗原の親和性は、細胞外膜小胞またはウィルスエンベロープ膜表面のホスファチジルセリンと本発明の T i m タンパク質間の親和性と同程度であるにも関わらず、抗体を用いて細胞外膜小胞またはウィルスの検出等を行う従来法に比べて、本発明に係る T i m タンパク質を用いて細胞外膜小胞またはウィルスの検出等を行う本発明の検出方法が高感度であることは意外なことであった。

[0237] 本発明の方法により得られた細胞外膜小胞又はウィルスは、その粒子表面や内部に有するタンパク質や m i c r o R N A 等の核酸を解析することに用いることや、細胞外膜小胞又はウィルスの機能解析等の基礎研究に用いることができる。また、診断薬や医薬品やワクチンなどに利用することもできる。

[0238] < 9. 本発明の細胞外膜小胞又はウィルスの捕捉用キット >

本発明の細胞外膜小胞又はウィルスの捕捉用キットは、

1. 本発明に係る T i m タンパク質を含んでなる試薬及び本発明に係る担体を含んでなる試薬、又は、 2. 本発明の T i m 担体を含んでなる試薬、を構成要素として含んでなる。

これらのキットは、更に、前記カルシウムイオン含有洗浄溶液、タンパク質変性剤含有溶液、及びカルシウムイオンキレート剤含有溶液から選ばれる少なくとも 1 種を含んでいてもよい。各々の構成要素の具体例、好ましい態様等については、前記した通りである。

[0239] また、これらキットに含まれる試薬中には、通常この分野で用いられる試薬類、例えば緩衝剤、増感剤、界面活性剤、防腐剤（例えばアジ化ナトリウム、サリチル酸、安息香酸等）、安定化剤（例えばアルブミン、グロブリン、水溶性ゼラチン、界面活性剤、糖類等）、賦活剤、共存物質の影響回避剤、その他この分野で用いられているものであって、共存する試薬との安定性を阻害したり、本発明に係る T i m タンパク質と担体、本発明に係る担体に

結合した本発明に係るT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞との反応又は結合を阻害したりしないものを有していてもよい。またこれら試薬類等の濃度範囲等も、各々の試薬類が有する効果を発揮するために通常用いられる濃度範囲等を適宜選択して用いればよい。

[0240] さらにまた、本発明のキットには、本発明の取得方法、本発明の除去方法、本発明の検出方法の説明書等を含ませても良い。当該「説明書」とは、当該方法における特徴・原理・操作手順、判定手順等が文章又は図表等により実質的に記載されている当該キットの取扱説明書、添付文書、あるいはパンフレット（リーフレット）等を意味する。

[0241] 以下に、実験例、実施例及び比較例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。

なお、本発明に係るT i mタンパク質とT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子2（T i m 2）タンパク質（以下、「T i m 2タンパク質」と略記する場合がある）とを併せて、「T i mファミリータンパク質」と略記する場合がある。

実施例

[0242] 実験例1. Fcタグ融合型T i m 4タンパク質の調製

以下の方法により、Fcタグ融合型T i m 4タンパク質を調製した。

[0243] <（1）ベクターの構築・培養>

先ず、M i y a n i s h i e t a l. N a t u r e 2007, V o l. 450:15に記載の方法に従い、マウス由来T i m 4タンパク質のN末端1～273アミノ酸領域をコードするcDNA（配列番号26）が、pEF-FcベクターのS a l I - E c o R Vサイトに組み込まれた、Fcタグ融合型T i m 4タンパク質発現用ベクター（以下、「pEF-T i m 4-Fc」と略記する場合がある）を構築した。

一方、293T細胞（理研BRC）を、150mm細胞培養用ディッシュ25枚で10%FBS（バイオウェスト社製）含有DMEM（ナカライテスク（株）製）20mLを用いてそれぞれ1日間培養した。その後、それぞれ

のディッシュについて、10%FBS含有DMEM25mLを、FBSを含まないDMEM25mLに置換した。

その後、常法に従い、Polyethylenimine “MAX”（ポリサイエンス社製）を用いて、pEF-Tim4-Fc 20 μ gを293T細胞へそれぞれ遺伝子導入した。遺伝子導入後、37℃、5%CO₂条件下で遺伝子導入した293T細胞をそれぞれ4日間培養した。

[0244] <（2）精製>

得られた遺伝子導入した293T細胞の培養液を、それぞれ遠心分離処理し（800×g、5分間）、培養上清をそれぞれ回収し、プールした。得られた培養上清を、Rapid Flow 0.2 μ mフィルターユニット（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いてろ過処理をすることで、不純物を分離し、培養上清濾過液を得た。

次いで、PBS20mLで洗浄したnProtein A Sepharose 4 Fast Flow（GEヘルスケアジャパン社製、Protein AはFcタグに親和性を有する）700 μ Lを充填したポリプレップカラム（バイオラッド社製）に、得られた培養上清濾過液500mLを添加し、培養上清濾過液中のFcタグ融合型Tim4タンパク質をnProtein A Sepharose 4 Fast Flowへ結合させた。そして、当該nProtein A Sepharose 4 Fast Flowを、20mLのPBSで洗浄した。その後、0.1M グリシン塩酸緩衝液（pH3.0）600 μ Lをそれぞれ用いて、中和溶液である1M トリス緩衝液（pH8.0）100 μ L中に5回溶出し、600 μ Lずつの5つの溶出画分を得た。

得られた5つの溶出画分について、それぞれ280nmにおける吸光度を測定し、タンパク質の有無を判断した。タンパク質が含まれる画分を一つに混合後、アミコンウルトラ0.5 mL 10K遠心式フィルターカラム（ミリポア社製）を用いて限外濾過により濃縮後、同カラムを用いて溶媒をPBS40 μ Lに置換した。そして、PBSへ置換した溶出液中のタンパク

量をBCA法により定量後、PBSを用いてタンパク質の濃度を $88\mu\text{g}/\text{mL}$ に調整し、Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（「Fcタグ融合型mTim4タンパク質」と略記する場合がある）を含有するPBS溶液（「Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液」と略記する場合がある）を得た。

[0245] 実験例2. FLAGタグ融合型Tim4タンパク質の調製

以下の方法により、FLAGタグ融合型Tim4タンパク質を調製した。

[0246] <（1）ベクターの構築・培養>

先ず、FLAGタグ融合型マウス由来Tim4 cDNA（マウス由来Tim4タンパク質のN末端1～273アミノ酸領域のC末端に1×FLAGを融合したアミノ酸配列をコードするcDNA、配列番号33（末端に終止コドン（taa）及び1×FLAGをコードする塩基配列を含む、但し制限酵素サイトは含まない）、ファスマック社製）を、常法に従って、pCAG-Neoベクター（和光純薬工業（株）製のXhoI/BamHIサイトに組み込み、FLAGタグ融合型Tim4タンパク質発現用ベクター（以下、「pCAG-Tim4-FLAG」と略記する場合がある）を構築した。

一方、293T細胞（理研BRC）を、 225cm^2 フラスコで10%FBS（Biosera社製）含有DMEM（和光純薬工業（株）製）50mLを用いて、遺伝子導入時に細胞が70～90%コンフルエントになるように播種し、1日間培養した。その後、常法に従い、Lipofectamine 2000（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を用いて、pCAG-Tim4-FLAG $60\mu\text{g}$ を、1日間培養した293T細胞へ遺伝子導入した。遺伝子導入後、 37°C 、5% CO_2 条件下、遺伝子導入した293T細胞を1日間培養した。その後、培養液を全量取り除き、遺伝子導入した293T細胞をPBS 10mLで2回洗浄し、培養液をOpti-MEM（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）50mLに交換し、 37°C 、5% CO_2 条件下で3日間培養した。

[0247] <（2）精製>

3日間培養後の遺伝子導入した293T細胞の培養液を、遠心分離処理し（300×g、5分間）、培養上清を回収した。回収した培養上清を、さらに3回遠心分離処理（1回目：300×g、3分間、2回目：1200×g、20分間、3回目：10000×g、20分間）し、不純物を分離した上清を得た。得られた上清を、Vivaspin（分画分子量30000、GE社製）を用いて限外濾過をして10倍に濃縮し、培養上清濃縮液を得た。PBSで洗浄したANTI-FLAG M2 affinity gel（シグマ社製）500μL（培養上清濃縮液の1/10量）を、得られた培養上清濃縮液5mLに加えて3時間転倒混和し、培養上清濃縮液中のFLAGタグ融合型Tim4タンパク質とANTI-FLAG M2 affinity gelを反応させて、FLAGタグ融合型Tim4タンパク質をANTI-FLAG M2 affinity gelへ結合させた。次いで、当該ANTI-FLAG M2 affinity gelをPBS5μLで3回洗浄した。

その後、200μg/mL FLAGペプチド溶液（DYKDDDDKペプチド（和光純薬工業（株）製）をPBSで希釈した溶液）250μL（使用したANTI-FLAG M2 affinity gelの半分量）を、当該ANTI-FLAG M2 affinity gelに加えて4℃で30分間転倒混和し、遠心分離処理（4℃、8000×g、1分間）の後、上清（溶出液）を回収した。回収した上清（溶出液）中のFLAGペプチドを除去するために、当該上清（溶出液）にPBS20mLを加えて限外濾過し、濃縮液を得た。得られた濃縮液に、PBSを添加して、液量を500μLに合わせ、FLAGタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（「FLAGタグ融合型mTim4タンパク質」と略記する場合がある）を含有するPBS溶液（「FLAGタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液」と略記する場合がある）（実験例2）を得た。

[0248] 実験例3. Hisタグ融合型Tim4タンパク質の調製

以下の方法により、Hisタグ融合型Tim4タンパク質を調製した。

[0249] < (1) ベクターの構築・培養 >

H i s タグ融合型マウス由来 T i m 4 c D N A (マウス由来 T i m 4 タンパク質の N 末端 1 ~ 2 7 3 アミノ酸領域の C 末端に 6 × H i s タグを融合したアミノ酸配列をコードする c D N A、配列番号 3 4 (末端に終止コドン (t g a) 及び 6 × H i s タグをコードする c D N A を含む)) を常法に従って、p C A G - N e o ベクター (和光純薬工業 (株) 製) の X h o I / B a m H I サイトに組み込み、H i s タグ融合型 T i m 4 タンパク質発現用ベクター (以下、「p C A G - T i m 4 - H i s」と略記する場合がある) を構築した。

一方、2 9 3 T 細胞 (理研 B R C) を、2 2 5 c m² フラスコで 1 0 % F B S (B i o s e r a 社製) 含有 D M E M (和光純薬工業 (株) 製) 5 0 m L を用いて 1 日間培養した。その後、常法に従い、L i p o f e c t a m i n e 2 0 0 0 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) を用いて、p C A G - T i m 4 - H i s 6 0 μ g を、2 9 3 T 細胞へ遺伝子導入した。遺伝子導入後、3 7 °C、5 % C O₂ 条件下、遺伝子導入した 2 9 3 T 細胞を 1 日間培養した。その後、培養液を全量取り除き、遺伝子導入した 2 9 3 T 細胞を P B S 1 0 m L で 2 回洗浄し、培養液を O p t i - M E M (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 5 0 m L に交換し、3 7 °C、5 % C O₂ 条件下で 3 日間培養した。

[0250] < (2) 精製 >

3 日間培養後の遺伝子導入した 2 9 3 T 細胞の培養液を、遠心分離処理し (3 0 0 × g、5 分間)、培養上清を回収した。回収した培養上清を、さらに 3 回遠心分離処理 (1 回目: 3 0 0 × g、3 分間、2 回目: 1 2 0 0 × g、2 0 分間、3 回目: 1 0 0 0 0 × g、2 0 分間) し、不純物を分離した上清を得た。得られた上清を、V i v a s p i n (分画分子量 3 0 0 0 0、G E 社製) を用いて限外濾過をして 1 0 倍に濃縮し、培養上清濃縮液を得た。

N i S e p h a r o s e 6 F a s t F l o w (G E 社製) 2. 7 m L を N i S e p h a r o s e 6 F a s t F l o w に添付のプロト

コールに従って調製し、カラムに移した。流速約1 mL/minでOD280 nmを測定しながら、カラムに結合バッファー（50 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、20 mM imidazole）をOD280 nmの吸光度が安定するまで添加した。得られた培養上清濃縮液5 mLをカラムに添加した後、結合バッファーを吸光度が安定するまで十分に添加し洗浄した。次いで、溶出バッファー（50 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、300 mM imidazole）をカラムに添加し、1 mLずつ溶出画分を10画分回収した。

[0251] <（3）電気泳動・銀染色>

各溶出画分を15 µLずつ分取し、4×試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製）5 µLとそれぞれ混合し、98℃で5分間加熱して電気泳動用の試料20 µLをそれぞれ得た。スーパーセップエース 5-20%ゲル（和光純薬工業（株）製）に当該電気泳動用の試料15 µLをそれぞれ乗せて、25 mAで65分間電気泳動した。

銀染色IIキットワコー（和光純薬工業（株）製）でゲルを染色して、目的タンパク質が含まれていた5つの画分を選んでプールした（一つに纏めた）後、溶出液中に含まれるimidazoleを除去する為に、PBSを20 mL加えてVivaspin（分画分子量30000、GE社製）を用いて限外濾過し、濃縮液を得た。得られた濃縮液にPBSを添加して、液量を500 µLに合わせ、Hisタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（「Hisタグ融合型mTim4タンパク質」と略記する場合がある）を含有するPBS溶液（「Hisタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液」と略記する場合がある）を得た。

[0252] 実施例1-8. 本発明のTim4担体を用いた細胞外膜小胞の取得（本発明の取得方法）

以下のように本発明のTim4担体を調製し、これを用いて本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0253] <（1）カルシウムイオン含有培養上清サンプルの調製>

細胞外膜小胞を分泌するヒト慢性骨髄性白血病株 K 5 6 2 細胞 1×10^7 細胞を 80 mL の X-VIVO 15 培地 (Lonza 社製) を用いて 37℃、5% CO₂ 条件下で 3 日間培養した後、遠心分離処理 (300×g、5 分間) して細胞を沈殿させ、上清を除去した。沈殿した細胞を、10 μM モネンシンナトリウム (MP Biomedicals 社製) 含有 X-VIVO 15 培地 60 mL で懸濁後、37℃、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。

その後、培養液を遠心分離処理 (300×g、5 分間) し、培養上清を回収した。回収した培養上清 60 mL をさらに 3 回遠心分離処理 (1 回目: 300×g、3 分間、2 回目: 1200×g、20 分間、3 回目: 10000×g、20 分間) して不純物を分離し、上清を得た。得られた上清に対して、Vivaspin (分画分子量 30000、GE 社製) を用いて 6 mL 以下になるまで限外濾過を行い、濃縮液を得た。得られた濃縮液に 10 μM モネンシンナトリウム (MP Biomedicals 社製) 含有 X-VIVO 15 培地を添加して液量を 6 mL に合わせ、10 倍に濃縮した K 5 6 2 細胞培養濃縮液サンプル (以下、「培養上清サンプル」と略記する場合がある) を得た。

また、得られた培養上清サンプルに終濃度が 2 mM となるように CaCl₂ を添加し、2 mM CaCl₂ 含有 K 5 6 2 細胞培養上清濃縮液サンプル (以下、「カルシウムイオン含有培養上清サンプル」と略記する場合がある) を得た。

[0254] < (2) Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質のビオチン標識 >

実験例 1 と同様の方法により調製した Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質含有 PBS 溶液 114 μL (Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質 10 μg 含有) を、ビオチン標識用キット-NH₂ (同仁化学研究所製) を用いて、当該キットに添付されているプロトコールに従って Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質の NH₂ 基をビオチン標識し、NH₂ 基ビオチン標識 Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質 (「NH₂ 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質」と略記する場合がある) 3.8 μg を含有する PB

S溶液100 μ L（「NH₂基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液」と略記する場合がある）を得た。

また、実験例1と同様の方法により調製したFcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液114 μ L（Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質10 μ g含有）を、ビオチン標識用キットーSH（同仁化学研究所製）を用いて、当該キットに添付されているプロトコールに従ってFcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質のSH基をビオチン標識し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（「SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質」と略記する場合がある）5.9 μ gを含有するPBS溶液100 μ L（「SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液」と略記する場合がある）を得た。

[0255] <（3）Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質含有PBS溶液の希釈>

実験例1と同様の方法により調製したFcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液11.4 μ Lを、PBS188.6 μ Lと混合し、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

前記で調製したNH₂基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液26.3 μ L（NH₂基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有）とPBS173.7 μ Lとを混合し、NH₂基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

また、前記で調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液16.9 μ L（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有）とPBS183.1 μ Lとを混合し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

[0256] < (4) ビーズの洗浄 >

30 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Dynabeads Protein G 含有 PBS-T 溶液 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 20 μL (Dynabeads Protein G 0.6 mg 含有) を、3本の1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) にそれぞれ分注した。次いで、PBS 500 μL を1.5 mL チューブにそれぞれ加え、攪拌した後、1.5 mL チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に Dynabeads Protein G を集合させ、1.5 mL チューブ内の溶液をピペットで捨てた (以下、「洗浄操作」と略記する場合がある)。

また、10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Dynabeads M-270 Streptavidin C1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有 PBS 溶液 60 μL (Dynabeads M-270 Streptavidin C1 0.6 mg 含有) を、1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) に分注し、PBS 500 μL を用いて前記と同様に洗浄操作を行った。

[0257] < (5) Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質のビーズへの固定 >

3本の Dynabeads Protein G (0.6 mg) 含有 1.5 mL チューブのうち、1本については、前記で調製したビオチン非標識 Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質を 1 μg 含有する PBS 溶液 200 μL を全量添加して、8℃で1時間反応させ、ビオチン非標識 Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質が結合した担体 (mTim4 担体) を含有する PBS 溶液 200 μL を得た。

残りの2本の Dynabeads Protein G (0.6 mg) 含有 1.5 mL チューブのうち、1本については、前記で調製した NH_2 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質を 1 μg 含有する PBS 溶液 200 μL を全量添加して、8℃で1時間反応させ、 NH_2 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質が結合した担体 (mTim4 担体) を含有する PBS 溶液 200 μL を得た。

また、1本については、前記で調製した SH 基ビオチン標識 Fc タグ融合

型mTim4タンパク質1 μ gを含有するPBS溶液200 μ Lを全量添加して、8℃で1時間反応させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体（mTim4担体）を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

1本のDynabeads M-270 Streptavidin C1含有1.5mLチューブについては、前記と同様の方法により調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質1 μ gを含有するPBS溶液200 μ Lを添加して、8℃で1時間反応させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体（mTim4担体）を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

以上により、下記表1に示す4種類のmTim4担体をそれぞれ0.6mg含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

[0258] [表1]

		1	2	3	4
マウス由来 Tim4担体	Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	非標識	ビオチン標識 (NH ₂ 基)	ビオチン標識 (SH基)	
	担体	Protein G ビーズ			ストレプトアビジン ビーズ

[0259] <（6）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

前記で得られた表1に記載の4種類のmTim4担体0.6mgをPBS 500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作した後、ペレット状態のそれぞれのmTim4担体に、前記（1）で調製したカルシウムイオン含有培養上清サンプル200 μ Lを加え、8℃で3時間反応させた。

反応後のmTim4担体を、2mM CaCl₂含有TBS-T（Tris buffer, 0.05% tween20, 2mM CaCl₂）500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作した。3回目の洗浄操作の時に、4種類のmTim4担体をそれぞれ250 μ Lずつ1.5mLチューブ2本に分注した。

ペレット状態の4種類のmTim4担体各0.3mgに溶出液として1%

S D S 水溶液又は 1 m M E D T A 水溶液を 2 0 μ L 添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で 1 0 秒間混合し、スピンドウンした。1. 5 m L チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に m T i m 4 担体を集合させ、上清（溶出液）を回収した。

尚、各実施例で用いた m T i m 4 タンパク質及び担体の種類、m T i m 4 担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びに後述するウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表 2 に示す。

[0260] [表2]

		実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6	実施例7	実施例8
マウス由来 Tim4担体	Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	非標識		ビオチン標識 (NH ₂ 基)		ビオチン標識 (SH基)			
	担体	Protein G ビーズ						ストレプトアビジン ビーズ	
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図1におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8

[0261] <（7）ウエスタンブロッティング>

実施例 1－8 で得られた各上清（溶出液） 7. 5 μ L に 4 × 試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製） 2. 5 μ L を加えて 9 8 ° C で 5 分間加熱し、ウエスタンブロッティング用の各試料を得た。スーパーセップエース 5－2 0 % ゲル（和光純薬工業（株）製）に当該ウエスタンブロッティング用の各試料 1 0 μ L を乗せて、2 5 m A で 6 5 分間電気泳動した。得られた泳動ゲルを、セミドライブロッターと不連続バッファー（A n o d e B u f f e r 1 : 0. 3 M T r i s / 2 0 % M e t h a n o l、A n o d e B u f f e r 2 : 0. 0 2 5 M T r i s / 2 0 % M e t h a n o l、C a t h o d e B u f f e r : 0. 0 2 5 M T r i s / 0. 0 4 M アミノカプロン酸 / 2 0 % M e t h a n o l）を用いて、P V D F 膜（M i l l i p o r e 社製）に 1 m A / c m ² で 6 0 分間転写した。

P V D F 膜に P B S - T （P B S b u f f e r, 0. 1 % t w e e n 2 0）で希釈した 3 % スキムミルクを加えて 1 時間室温で反応させてプロ

ッキングし、PBS-Tで250倍希釈した抗ヒトLamp-1マウスモノクローナル抗体（BD Biosciences社製、以下「抗ヒトLamp-1抗体」と略記する場合がある）2mLを8℃で一晩反応させた。

その後、反応後のPVDF膜をPBS-Tで3回洗浄し、PBS-Tで10000倍希釈した2次抗体〔抗マウスIgG（H+L）、ウサギ、IgG分画、ペルオキシダーゼ結合抗体〕（和光純薬工業（株）製）を室温で1時間反応させた。PBS-Tで5回洗浄後、イムノスターゼータ（和光純薬工業（株）製）を添加し、LAS-4000（GE社製）を用いて発光シグナルを検出した。尚、抗ヒトLamp-1抗体は、エクソソームのマーカータンパク質の1つであるLamp-1に対する抗体である。

[0262] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図1に示す。図1において、各レーンは以下の通りである。

レーン1：実施例1の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン2：実施例2の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mM EDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン3：実施例3の結果（NH₂基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン4：実施例4の結果（NH₂基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mM EDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン5：実施例5の結果（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン6：実施例6の結果（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mM EDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン7：実施例7の結果（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン8：実施例8の結果（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mM EDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）。

[0263] 図1より、実施例1－8の何れの場合においても、100kDa付近にエクソソームマーカーであるLamp-1のバンドが得られたことから、本発明の取得方法によれば、エクソソームを含む細胞外膜小胞を取得可能であることが判った（実施例1－8：レーン1－8）。

特に、実施例2、4、6、8の比較から、溶出液としてカルシウムイオンキレート剤を用いた場合には、Tim4タンパク質と担体が、Tim4タンパク質のSH基を介して結合しているものが（実施例8：レーン8）、NH₂基を介して結合しているもの（実施例4：レーン4）やアフィニティータグを介して結合しているもの（実施例2：レーン2、実施例6：レーン6）に比べ、多くの細胞外膜小胞を取得可能なことが判った（実施例2：レーン2、実施例4：レーン4、実施例6：レーン6、実施例8：レーン8）。

[0264] 実施例9－16. 本発明のTim4担体を用いた細胞外膜小胞の取得（本発明の取得方法）

以下のように本発明のTim4担体を調製し、これを用いて本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0265] <（1）培養上清サンプルの調製>

実施例1－8の「（1）培養上清サンプルの調製」と同様の方法により行った。

[0266] <（2）Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質のビオチン標識>

実験例1「(2)Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質のビオチン標識」と同様の方法により調製したFcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液114 μ L(Fcタグ融合型mTim4タンパク質10 μ g含有)について、実施例1と同様の方法により、Fcタグ融合型mTim4タンパク質のSH基をビオチン標識し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質3.9 μ gを含有するPBS溶液100 μ L(以下、「SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液」と略記する場合がある)を得た。

[0267] <(3)FLAGタグ融合マウス由来Tim4タンパク質のビオチン標識>

実験例2と同様の方法により調製したFLAGタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液99 μ L(FLAGタグ融合型mTim4タンパク質10 μ g含有)を、ビオチン標識用キットーSH((株)同仁化学研究所製)を用いて、当該キットに添付されているプロトコールに従ってFLAGタグ融合型mTim4タンパク質のSH基をビオチン標識し、SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質4.6 μ gを含有するPBS溶液(以下、「SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質含有するPBS溶液」と略記する場合がある)100 μ Lを得た。

[0268] <(4)Hisタグ融合マウス由来Tim4タンパク質のビオチン標識>

実験例3と同様の方法により調製したHisタグ融合mTim4タンパク質含有PBS溶液54 μ L(Hisタグ融合型mTim4タンパク質10 μ g含有)を、ビオチン標識用キットーSH((株)同仁化学研究所製)を用いて、当該キットに添付されているプロトコールに従ってHisタグ融合型mTim4タンパク質のSH基をビオチン標識し、SH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質7.2 μ gを含有するPBS溶液(以下、「SH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質含有するPBS溶液」と略記する場合がある)100 μ Lを得た。

[0269] <(5)タグ融合型マウス由来Tim4タンパク質の希釈>

実験例1と同様の方法により調製したFcタグ融合型mTim4タンパク

質含有PBS溶液11.4 μ L (Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質1 μ g含有)を、PBS188.6 μ Lと混合し、ビオチン非標識Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

前記(2)で調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液16.9 μ L (SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質1 μ gを含有する)とPBS183.1 μ Lとを混合し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

また、前記(3)で調製したSH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液21.6 μ L (SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質1 μ g含有)とPBS178.4 μ Lとを混合し、SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

前記(4)で調製したSH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液13.9 μ L (SH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質1 μ g含有)とPBS186.1 μ Lとを混合し、SH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

[0270] <(6) ビーズの洗浄>

30 μ g/ μ L Dynabeads Protein G 含有PBS-T溶液(サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)20 μ L (Dynabeads Protein G 0.6mg含有)を、1.5mLチューブ(ビーエム機器社製)1本に分注し、PBS500 μ Lを用いて、実施例1-8の「(4) ビーズの洗浄」と同様の方法により洗浄操作を行った。

また、10 μ g/ μ L Dynabeads M-270 Streptavidin (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)含有PB

S溶液60 μ L (Dynabeads M-270 Streptavidin 0.6mg含有)を、3本の1.5mLチューブ(ビーエム機器社製)にそれぞれ分注し、PBS500 μ Lを用いて実施例1-8の「(4)ビーズの洗浄」と同様の方法によりそれぞれ洗浄操作を行った。

[0271] <(7) タグ融合マウス由来Tim4タンパク質のビーズへの固定>

次いで、洗浄操作後のペレット状態のDynabeads Protein G 0.6mgを含有する1.5mLチューブに、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを全量添加して、8℃で1時間反応させ、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体(mTim4担体)を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

さらに、洗浄操作後のペレット状態のDynabeads M-270 Streptavidin 0.6mgを含有する1.5mLチューブ3本のうち、1本については、前記で調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを全量添加して、8℃で1時間反応させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体(mTim4担体)を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

残りの2本の洗浄操作後のペレット状態のDynabeads M-270 Streptavidin 0.6mgを含有する1.5mLチューブのうち、1本については、前記で調製したSH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを全量添加して、8℃で1時間反応させ、SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体(mTim4担体)を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

また、1本については、前記で調製したSH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質1 μ gを含有するPBS溶液200 μ Lを全量添加して、8℃で1時間反応させ、SH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体(mTim4担体)を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

i m 4 タンパク質が結合した担体（m T i m 4 担体）を含有する P B S 溶液 2 0 0 μ L を得た。

以上により、下記表 3 に示す 4 種類の m T i m 4 担体をそれぞれ 0. 6 m g 含有する P B S 溶液 2 0 0 μ L を得た。

[0272] [表3]

		1	2	3	4
マウス由来 Tim4担体	タグの種類	Fcタグ		FLAGタグ	Hisタグ
	タグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	非標識	ビオチン標識 (SH基)		
	担体	Protein G ビーズ	ストレプトアビジン ビーズ		

[0273] <（８）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

「表 1 に記載の 4 種類の m T i m 4 担体 0. 6 m g」の代わりに「表 3 に記載の 4 種類の m T i m 4 担体 0. 6 m g」を用いた以外は、実施例 1－8 の「（６）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得」と同様の方法により行い各上清（溶出液）を得た。尚、各実施例で用いた m T i m 4 タンパク質及び担体の種類、m T i m 4 担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びに後述のウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表 4 に示す。

[0274] [表4]

		実施例9	実施例10	実施例11	実施例12	実施例13	実施例14	実施例15	実施例16
マウス由来 Tim4担体	タグの種類	Fcタグ				FLAGタグ		Hisタグ	
	タグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	非標識		ビオチン標識 (SH基)					
	担体	Protein G ビーズ		ストレプトアビジン ビーズ					
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図2におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8

[0275] <（７）ウエスタンブロッティング>

「実施例 1－8 で得られた各上清（溶出液）7. 5 μ L」の代わりに「実施例 9－1 6（前記（８））で得られた各上清（溶出液）7. 5 μ L」を用いた以外は、実施例 1－8 の「（７）ウエスタンブロッティング」と同様の方法により行った。

[0276] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図2に示す。図2において、各レーンは以下の通りである。

レーン1：実施例9の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン2：実施例10の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mMEDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン3：実施例11の結果（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン4：実施例12の結果（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mMEDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン5：実施例13の結果（SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン6：実施例14の結果（SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mMEDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン7：実施例15の結果（SH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン8：実施例16の結果（SH基ビオチン標識Hisタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mMEDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）を、それぞれ示す。

図2より、実施例9-16の何れの場合においても、100kDa付近にエクソソームのマーカータンパク質であるLamp-1のバンドが得られたことから、本発明の取得方法によれば、エクソソームを含む細胞外膜小胞を取得可能であることが判った（実施例9-16：レーン1-8）。

また、本発明のTim4担体を用いれば、タグの種類や長さ、有無に関わらず細胞外膜小胞を取得可能であることが判った（実施例9-16：レーン1-8）。

実施例10、12、14、16の比較から、溶出液としてカルシウムイオンキレート剤であるEDTAを用いる場合には、Tim4タンパク質と担体が、Tim4タンパク質のSH基を介して結合しているものが（実施例12：レーン4、実施例14：レーン6、実施例16：レーン8）、アフィニティータグを介して結合しているもの（実施例10：レーン2）に比べ、多くの細胞外膜小胞を取得可能なことが判った。

[0277] 実施例17-18. 本発明のTim4担体を用いた細胞外膜小胞の取得（本発明の取得方法）

以下のように本発明のTim4担体を調製し、これを用いて本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0278] <（1）培養上清サンプルの調製>

実施例1-8の「（1）培養上清サンプルの調製」と同様の方法により行った。

[0279] <（2）ビオチン非標識FLAGタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質の希釈>

実験例2と同様の方法により調製したビオチン非標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質5 μ gを含有するPBS溶液47 μ L（ビオチン非標識FLAGタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質含有PBS溶液）を、PBS153 μ Lと混合し、ビオチン非標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質を5 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

[0280] <（3）ビーズの洗浄>

10 μg / μL 抗DYKDDDDKタグ抗体磁気ビーズ含有50%グリセロールTBS溶液（和光純薬工業（株）製）50 μL （抗DYKDDDDKタグ抗体磁気ビーズ 0.5 mg 含有）を、1.5 mL チューブ（ビーエム機器社製）に分注し、PBS 500 μL を用いて洗浄操作を行った。

[0281] <（４）FLAGタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質の担体への固定>

次いで、洗浄操作後のペレット状態の抗DYKDDDDKタグ抗体磁気ビーズに、FLAGタグ融合型mTim4タンパク質を5 μg 含有するPBS溶液200 μL の全量を添加して、8℃で1時間反応させ、mTim4担体を含有するPBS溶液200 μL を得た。

以上により、下記表5に示すmTim4担体を0.5 mg 含有するPBS溶液200 μL を得た。

[0282] [表5]

マウス由来 Tim4担体	タグの種類	1 FLAGタグ
	タグ融合型マウス由来 Tim4タンパク質	ビオチン非標識
	担体	抗DYKDDDDKタグ抗体 ビーズ

[0283] <（５）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

「表1に記載の4種類のmTim4担体0.6 mg」の代わりに「表5に記載のmTim4担体0.5 mg」を用いた以外は、実施例1－8の「（６）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得」と同様の方法を行い、各上清（溶出液）を得た。

尚、各実施例で用いたmTim4タンパク質及び担体の種類、mTim4担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びに後述のウェスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表6に示す。

[0284]

[表6]

		実施例17	実施例18
マウス由来 Tim4担体	タグの種類	FLAGタグ	
	タグ融合型マウス由来 Tim4タンパク質	ビオチン非標識	
	担体	抗DYKDDDDKタグ抗体 ビーズ	
溶出液		1% SDS	1mM EDTA
図3におけるレーン番号		1	2

[0285] <（6）ウエスタンブロッティング>

「実施例1－8で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」の代わりに「実施例17－18（前記（5））で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」を用いた以外は、実施例1－8の「（7）ウエスタンブロッティング」と同様の方法で行った。

[0286] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図3に示す。図3において、各レーンは以下の通りである。

レーン1：実施例17の結果（ビオチン非標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質を抗DYKDDDDKタグ抗体ビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン2：実施例18の結果（ビオチン非標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質を抗DYKDDDDKタグ抗体ビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mMEDTA溶液を溶出液として用いた場合の結果）

図3より、実施例17－18の何れの場合においても、100kDa付近にエクソソームマーカであるLamp-1のバンドが認められたことから、本発明の取得方法によれば、抗タグ抗体を介してTim4タンパク質を固定化した担体を用いてもエクソソームを含む細胞外膜小胞を取得可能であることが判った（実施例17－18：レーン1－2）。

[0287] 実施例 19-20・比較例 1-3 本発明の取得方法と従来法により得られる細胞外膜小胞の純度の比較

以下のように、SDS溶出による本発明の取得方法（実施例 19）、EDTA溶出による本発明の取得方法（実施例 20）、超遠心分離法（比較例 1）、Exo Quick（比較例 2）、及びTotal Exosome Isolation（比較例 3）によりそれぞれ得られる細胞外膜小胞の純度の比較を行った。

[0288] <本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得（実施例 19-20）>

「カルシウムイオン含有培養上清サンプル 200 μ L」の代わりに、「カルシウムイオン含有培養上清サンプル 500 μ L」を使用し、また、溶出液として「1% SDS水溶液 20 μ L」の代わりに「1% SDS水溶液 50 μ L」、「1 mM EDTA水溶液 20 μ L」の代わりに「1 mM EDTA水溶液 50 μ L」を使用した以外は、実施例 13-14と同様の方法により、SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質をDynabeads M-270 Streptavidin C1（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）に結合させたmTim4タンパク質とカルシウムイオン含有培養上清サンプル中の細胞外膜小胞とを反応させ、溶出液として1% SDS水溶液及び1 mM EDTA水溶液で細胞外膜小胞をそれぞれ溶出させ、上清（溶出液）をそれぞれ得た。

得られた上清（溶出液）を、それぞれサンプル1（1% SDS水溶液で溶出させた場合）、サンプル2（1 mM EDTA水溶液で溶出させた場合）とした。

尚、実施例 19-20で用いたmTim4タンパク質及び担体の種類、並びにmTim4担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類を下記表 7 に示す。

[0289]

[表7]

		実施例19	実施例20
マウス由来 Tim4担体	タグの種類	FLAGタグ	
	タグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	ビオチン標識 (SH基)	
	担体	ストレプトアビジン ビーズ	
溶出液		1% SDS	1mM EDTA

[0290] <超遠心分離法による細胞外膜小胞の取得（比較例1）>

実施例1と同様の方法により調製した培養上清サンプル1 mLを遠心分離処理（ $20000 \times g$ 、30分間）して不純物を分離し、上清を得た。次いで、得られた上清1 mLを超遠心分離処理（ $110000 \times g$ 、70分間）し、沈殿画分を得た。その後、得られた沈殿画分を1 mL PBSで懸濁した。沈殿画分の懸濁液を、再度超遠心分離処理（ $110000 \times g$ 、70分間）を行った後、得られた沈殿画分をPBS 50 μ Lに懸濁した。得られた懸濁液をサンプル3とした（比較例1）。

[0291] <市販の試薬を用いた遠心分離法による細胞外膜小胞の取得（ExoQuickによる細胞外膜小胞の取得）（比較例2）>

実施例1と同様の方法により調製した培養上清サンプル1 mLを遠心分離処理（ $20000 \times g$ 、30分間）して不純物を分離し、上清を得た。次いで、得られた上清1 mLをExoQuick-TC Reagent（System Biosciences社）0.2 mLと混合し、8℃で当該混合液を終夜静置した。その後、終夜静置した当該混合液を遠心分離処理（ $1500 \times g$ 、30分間）することで得られた沈殿画分をPBS 100 μ Lに懸濁した。得られた懸濁液をサンプル4とした（比較例2）。

[0292] <市販の試薬を用いた遠心分離法による細胞外膜小胞の取得（Total Exosome Isolationによる細胞外膜小胞の取得）（比較例3）>

実施例1と同様の方法により調製したK562細胞培養上清濃縮液サンプ

ル 1 mL を遠心分離処理（ $20000 \times g$ 、30 分間）して不純物を分離し、上清を得た。次いで、得られた上清 1 mL を Total Exosome Isolation Reagent（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製） 0.5 mL と混合し、 8°C で 1 日間静置した。当該混合液を遠心分離処理（ $10000 \times g$ 、1 時間）することで得られた沈殿画分を PBS 100 μL に懸濁した。得られた懸濁液をサンプル 5 とした（比較例 3）。

尚、各実施例及び比較例で用いた方法、得られたサンプル並びに後述のウエスタンブロッティング及び銀染色におけるレーン番号について下記表 8 に示す。

[0293] [表8]

	実施例19	実施例20	比較例1	比較例2	比較例3
方法	本発明の方法 (1% SDSによる 溶出)	本発明の方法 (1mM EDTAによる 溶出)	超遠心分離法	Exo Quick	Total Exosome Isolation
サンプル番号	サンプル1	サンプル2	サンプル3	サンプル4	サンプル5
図4における レーン番号	1	2	3	4	5

[0294] <ウエスタンブロッティング>

各方法により得られたサンプル 1 – 5 中のタンパク質量を BCA 法で測定し、測定結果を基に、タンパク質量をそれぞれ電気泳動の基準量として、ウエスタンブロッティングを行った。即ち、サンプル 1 – 5 中の各タンパク質 0.25 μg を含む PBS 溶液 37.5 μL と 4 $\times$ 試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製）12.5 μL とをそれぞれ混合後、 98°C で 5 分間加熱し、ウエスタンブロッティング用の各試料 50 μL をそれぞれ得た。

次いで、スーパーセップエース 5 – 20% ゲル（和光純薬工業（株）製）に、得られたウエスタンブロッティング用の各試料各 20 μL ずつを 2 枚のゲルに乗せて、25 mA で 60 分間電気泳動した。得られた 2 枚のゲルのうち 1 枚を、セミドライブロッターと不連続バッファー（Anode Buffer 1 : 0.3M Tris / 20% Methanol、Anod

e Buffer 2 : 0.025M Tris / 20% Methanol、Cathode Buffer : 0.025M Tris / 0.04M アミノカプロン酸 / 20% Methanol) を用いて、PVDF膜 (Millipore社製) に1mA / cm²で60分間転写した。PVDF膜にPBS-Tで希釈した3%スキムミルクを加えて1時間室温で反応させてブロッキングし、PBS-Tで250倍希釈した抗ヒトLamp-1マウスモノクローナル抗体 (BD Biosciences社製) 2mLを室温で1時間反応させた。PBS-Tで3回洗浄後、PBS-Tで10000倍希釈した2次抗体 {抗マウスIgG (H+L)、ウサギ、IgG分画、ペルオキシダーゼ結合抗体 (和光純薬工業 (株) 製)} を室温で1時間反応させた。PBS-Tで5回洗浄後、ECL prime (GE社製) を添加し、LAS-4000 (GE社製) を用いて発光シグナルをそれぞれ検出した。

また、もう1枚のゲルを、銀染色IIキットワコー (和光純薬工業 (株) 製) を用いて銀染色した。

[0295] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図4-A、銀染色の結果を図4-Bにそれぞれ示す。図4-A及び図4-Bにおいて、各レーンは以下の通りである。

レーン1 : 実施例19の結果 (SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いて本発明の取得方法を行った場合の結果)

レーン2 : 実施例20の結果 (SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質をストレプトアビジンビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mM EDTA溶液を溶出液として用いて本発明の取得方法を行った場合の結果)

レーン3 : 比較例1の結果 (超遠心分離法により細胞外膜小胞の取得を行った場合の結果)

レーン4：比較例2の結果（Exo Quickにより細胞外膜小胞の取得を行った場合の結果）

レーン5：は比較例3の結果（Total Exosome Isolationにより細胞外膜小胞の取得を行った場合の結果）

図4-Aより、本発明の取得方法である実施例19-20のいずれにおいても、100kDa付近にエクソソームマーカであるLamp-1のバンドが認められており、本発明の取得方法によれば、エクソソームを含む細胞外膜小胞を取得可能であることが判った（実施例19-20：レーン1-2）。

一方、図4-Aより、いずれの従来法（超遠心分離法（比較例1）、Exo Quick（比較例2）、及びTotal Exosome Isolation（比較例3））でも、100kDa付近にエクソソームマーカのLamp-1のバンドは、薄くわずかにしか認められなかった（比較例1-3：レーン3-5）。

また、図4-Bより、本発明の取得方法（実施例19-20）は、いずれの従来法（超遠心分離法（比較例1）、Exo Quick（比較例2）、及びTotal Exosome Isolation（比較例3））よりも、夾雑タンパク質等に由来するバンドが少なかった（実施例19-20：レーン1-2、比較例1-3：レーン3-5）。

[0296] 以上の結果から、本発明の取得方法（実施例19及び20）は、いずれの従来法（超遠心分離法（比較例1）、Exo Quick（比較例2）、及びTotal Exosome Isolation（比較例3））と比較しても、純度よく細胞外膜小胞を取得できることが判った（レーン1-5）。

[0297] 実施例21. 本発明の取得方法により得られた細胞外膜小胞の電子顕微鏡による観察

本発明の取得方法により取得された細胞外膜小胞の状態を調べるために、電子顕微鏡による観察をおこなった。

[0298] < (1) マウスマクロファージ培養上清サンプルの調製 >

腹腔マクロファージを得るため、3%チオグリコレート溶液（フルカ試薬社製）2 mLを8週齢のメスのC57BL/6Jマウス（日本エスエルシー（株）より購入）6匹の腹腔に注射した。3日後、腹腔からマクロファージを回収し、回収したマクロファージを150 mm細胞培養用ディッシュ4枚で10% FBS（バイオウェスト社製）含有DMEM（ナカライテスク（株）製）80 mLを用いて2日間培養し、培養上清を回収し、マウスマクロファージ培養上清サンプルを得た。

[0299] < (2) Tim4担体の調製 >

Dynabeads MyOne Streptavidin C1（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）0.6 mgの代わりに Dynabeads MyOne Streptavidin C1（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を1 mg使用し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合mTim4タンパク質1 μ gを含有するPBS溶液200 μ Lの代わりにSH基ビオチン標識Fcタグ融合mTim4タンパク質100 μ gを含有するPBS溶液100 μ Lを使用し、DynabeadsとSH基ビオチン標識Fcタグ融合mTim4タンパク質を含有するPBS溶液との反応時間を1時間の代わりに2時間とした以外は、実施例11-12と同様の方法により、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をDynabeads MyOne Streptavidin C1に結合させたmTim4担体を調製した。

[0300] < (3) Tim4担体を用いた細胞外膜小胞の取得 >

マウスマクロファージ培養上清サンプル32 mLを遠心分離処理（1回目：800 $\times$ g、10分間、2回目：12000 $\times$ g、30分間）し、上清を得た。得られた上清に、終濃度2 mM となるようにCaCl₂を添加した後、前記で調製したmTim4担体1 mgを加え、室温で1時間攪拌混合した。次いで、室温で1時間攪拌混合したmTim4担体を回収し、終濃度2 mM CaCl₂含有TBS-T 5 mLで3回洗浄操作した後、さらに1 mLで

2回洗浄操作した後、1 mM EDTA含有TBS 100 μ Lで3回溶出し、細胞外膜小胞画分300 μ Lを得た。

次いで、マウスマクロファージ培養上清サンプル中の細胞外膜小胞を確実に回収するため、再度以下の方法により、1 mM EDTA含有TBS 100 μ Lで3回溶出した後のマウスマクロファージ培養上清サンプルから細胞外膜小胞を回収し、細胞外膜小胞画分300 μ Lを得た。即ち、1 mM EDTA含有TBS 100 μ Lで3回溶出した後のマウスマクロファージ培養上清サンプルに、終濃度2 mM となるようにCaCl₂を添加した後、1 mM EDTA含有TBS 100 μ Lで3回溶出した後のmTim4担体1 mgを加え、室温で1時間攪拌混合した。次いで、室温で1時間攪拌混合したmTim4担体を回収し、終濃度2 mM CaCl₂含有TBS-T 5 mLで3回洗浄操作した後、さらに1 mLで2回洗浄操作した後、1 mM EDTA含有TBS 100 μ Lで3回溶出し、細胞外膜小胞画分300 μ Lを得た。

その後、マウスマクロファージ培養上清サンプル中の細胞外膜小胞をより確実に回収するため、以上の操作を再度行い、1 mM EDTA含有TBS 100 μ Lで計6回溶出した後のマウスマクロファージ培養上清サンプルから細胞外膜小胞を回収し、細胞外膜小胞画分300 μ Lを得た。

前記9回の溶出操作により得られた細胞外膜小胞画分計900 μ Lをアミコンウルトラ-0.5 mL 10K遠心式フィルターカラムを用いて60 μ Lに濃縮し、電子顕微鏡による観察用の試料を得た。

[0301] <（４）電子顕微鏡による本発明の取得方法により取得された細胞外膜小胞の観察>

電子顕微鏡による観察用の試料10 μ Lをグリッドに吸着させ、余剰の電子顕微鏡による観察用の試料を濾紙で吸い取った。次いで、グリッドを水洗し、酢酸ウラニウム水溶液による染色を2回行った後、透過型電子顕微鏡を用いてネガティブ染色法による観察を行った。

尚、実施例21で用いたmTim4タンパク質及び担体の種類、並びにm

T i m 4 担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類を下記表 9 に示す。

[0302] [表9]

		実施例21
マウス由来 Tim4担体	タグの種類	Fcタグ
	タグ融合型マウス由来 Tim4タンパク質	ビオチン標識 (SH基)
	担体	streptavidin ビーズ
溶出液		1mM EDTA含有TBS

[0303] <結果>

得られた電気顕微鏡の観察画像を図 5 に示す。図 5 より、本発明の取得方法によれば、球形の形状を保ったまま、直径 5 0 ～ 1 5 0 n m 程度の細胞外膜小胞を取得できた。

[0304] 以上のことから、本発明の取得方法によれば、インタクトな状態で細胞外膜小胞を取得できることが判った。

[0305] 実施例 2 2 - 2 5. 本発明の T i m 4 担体による細胞外膜小胞の取得（本発明の取得方法）

ヒト由来 T i m 4 タンパク質をビーズへ固定化した担体（以下、「h T i m 4 担体」と略記する場合がある）と m T i m 4 担体とを用いて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0306] <（１）培養上清サンプルの調製>

実施例 1 - 8 の「（１）培養上清サンプルの調製」と同様の方法により行った。

[0307] <（２）F c タグ融合型 T i m 4 タンパク質の希釈>

ビオチン非標識 F c タグ融合型ヒト由来 T i m 4 タンパク質（和光純薬工業（株）製、配列番号 7（ヒト由来 T i m 4 タンパク質の N 末端 2 5 ～ 3 1 5 アミノ酸領域（G e n B a n k N P _ 6 1 2 3 8 8. 2）に F c タグが融合されたヒト由来 T i m 4 タンパク質））凍結乾燥品 1 0 0 μ g を P B S 1 m L に溶かし、1 0 0 μ g / m L ビオチン非標識 F c タグ融合型 h T i m

4タンパク質含有PBS溶液を作製した。ビオチン非標識Fcタグ融合型hTim4タンパク質含有PBS溶液10 μ LとPBS190 μ Lと混合し、ビオチン非標識Fcタグ融合型hTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

また、ビオチン非標識Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（和光純薬工業（株）製、配列番号6（マウス由来Tim4タンパク質のN末端22～279アミノ酸領域（GenBank NP_848874.3））にFcタグが融合されたmTim4タンパク質）凍結乾燥品100 μ gをPBS1mLに溶かし、100 μ g/mLビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液を作製した。ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液10 μ LとPBS190 μ Lと混合し、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

<（３）ビーズの洗浄>

30 μ g/ μ L Dynabeads Protein G 含有PBS-T溶液（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）20 μ L（Dynabeads Protein G 0.6mg含有）を、2本の1.5mLチューブ（ビーエム機器社製）にそれぞれ分注し、PBS500 μ Lを用いて洗浄操作を行った。

<（４）ビオチン非標識Fcタグ融合型Tim4タンパク質のビーズへの固定>

2本のDynabeads Protein G（0.6mg）含有1.5mLチューブのうち、1本については、前記で調製したビオチン非標識Fcタグ融合型hTim4タンパク質を1 μ g含有するPBS溶液200 μ Lを全量添加して、8℃で1時間反応させ、ビオチン非標識Fcタグ融合型hTim4タンパク質が結合した担体（hTim4担体）を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

残りの1本のDynabeads Protein G（0.6mg）含

有 1.5 mL チューブについては、前記で調製したビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g 含有するPBS溶液200 μ Lを全量添加して、8℃で1時間反応させ、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体（mTim4担体）を含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

<（５）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

前記で得られたhTim4担体及びmTim4担体 0.6 mgをPBS 500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作した後、ペレット状態のhTim4担体及びmTim4担体に、カルシウムイオン含有培養上清サンプル200 μ Lをそれぞれ加え、8℃で3時間それぞれ反応させた。その後、反応後のhTim4担体及びmTim4担体を、2 mM CaCl_2 含有TBS-T 500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作した。

3回目の洗浄のときにhTim4担体及びmTim4担体をそれぞれ250 μ L（担体0.3 mg）ずつ1.5 mLチューブ2本に分注した。ペレット状態のmTim4担体及びhTim4担体各0.3 mgに溶出液として1% SDS水溶液又は1 mM EDTA水溶液を20 μ L添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。1.5 mLチューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にhTim4担体及びmTim4担体を集合させ、それぞれ上清（溶出液）を回収した。

尚、実施例22－25で用いたTim4タンパク質及び担体の種類、Tim4担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びに後述するウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表10に示す。

[0308]

[表10]

		実施例22	実施例23	実施例24	実施例25
マウス由来Tim4担体 又は ヒト由来Tim4担体	Tim4タンパク質	Fcタグ融合型 ヒト由来 Tim4タンパク質 (ビオチン非標識)		Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質 (ビオチン非標識)	
	担体	Dynabeads Protein Gビーズ			
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図6における レーン番号		1	2	3	4

[0309] < (6) ウェスタンブロッティング >

「実施例1-8で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」の代わりに「実施例22-25（前記（5））で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」を用いた以外は、実施例1-8の「（7）ウェスタンブロッティング」と同様の方法により行った。

[0310] < 結果 >

得られたウェスタンブロッティングの結果を図6に示す。図6において、各レーンは以下の通りである。

レーン1：実施例22の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型hTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたhTim4担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン2：実施例23の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型hTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたhTim4担体を用い、1mM EDTA水溶液を溶出液として用いた場合の結果）、

レーン3：実施例24の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン4：実施例25の結果（ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質をProtein Gビーズに結合させたmTim4担体を用い、1mM EDTA水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

図6より、実施例22-25のいずれの場合においても、100kDa付近にエクソソームマーカであるLamp-1のバンドが認められたことから、本発明の取得方法によれば、エクソソームを含む細胞外膜小胞を取得可能であることが判った（実施例22-25：レーン1-4）。

[0311] また、Tim4タンパク質は由来の生物種によらず本発明のTim4担体及び本発明の取得方法に用いることができることが判った。

[0312] 実施例26-27・比較例4-9. Tim4担体及びPSタンパク質を固定化した担体による細胞外膜小胞の取得量の比較

Tim4担体とPSタンパク質（ヒト由来Annexin V、ヒト由来MFG-E8、及びマウス由来MFG-E8）をそれぞれビーズへ固定化した担体を用いて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0313] <（1）PSタンパク質含有PBS溶液の希釈>

Histaグ融合型ヒト由来Annexin V（Creative BioMart社製、「Histaグ融合型hAnnexin V」と略記する場合がある）20μgを200μg/mLとなるようにPBS100μLに溶かし、Histaグ融合型hAnnexin V含有PBS溶液を作製した。Histaグ融合型hAnnexin Vタンパク質1μg含有PBS溶液5μLとPBS195μLを混合して希釈した。

Histaグ融合型ヒト由来MFG-E8（R&D Systems社製、「Histaグ融合型hMFG-E8」と略記する場合がある）50μgを100μg/mLとなるようにPBS500μLに溶かし、Histaグ融合型hMFG-E8含有PBS溶液を作製した。Histaグ融合型hMFG-E8タンパク質1μg含有PBS溶液10μLとPBS190μLを混合して希釈した。Histaグ融合型マウス由来MFG-E8（R&D Systems社製、「Histaグ融合型mMFG-E8」と略記する場合がある）50μgを100μg/mLとなるようにPBS500μLに溶かし、Histaグ融合型mMFG-E8含有PBS溶液を作製した。Histaグ融合型マウス由来MFG-E8タンパク質1μg含有PBS溶液10μLとPBS

190 μ Lを混合して希釈した。

[0314] < (2) 抗Hisタグ抗体固定化ビーズの調製 >

30 μ g/ μ L Dynabeads M-270 Carboxylic Acid (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有溶液 100 μ L (Dynabeads M-270 Carboxylic Acid 3 mg 含有) を 1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) に分注し、反応バッファー (0.1 M MES、pH 5.0) を用いて洗浄操作を行った。

次いで、反応バッファー 490 μ L で希釈した 6xHis 抗体 (和光純薬工業 (株) 製) 溶液 60 μ L (6xHis 抗体 60 μ g 含有) を加えて室温で 30 分間転倒混和し、その後 6 mg/mL WSC (同仁化学研究所製) を 50 μ L 加えて室温で 4 時間転倒混和した。転倒混和後の Dynabeads M-270 Carboxylic Acid を TBS-T で洗浄操作した後、100 μ L PBS で希釈して抗Hisタグ抗体固定化ビーズ 3 mg を得た。

[0315] < (3) Tim4 担体及び各種 PS タンパク質を固定化した担体の調製 >

次いで、得られた抗Hisタグ抗体固定化ビーズを含有する PBS 溶液 100 μ L (抗Hisタグ抗体固定化ビーズ 3 mg 含有) を、4 本の 1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) にそれぞれ 20 μ L (抗Hisタグ抗体固定化ビーズ 0.6 mg 含有) ずつ分注し、500 μ L PBS で洗浄操作をそれぞれ行った。

次いで、4 本の洗浄操作後のペレット状態の抗Hisタグ抗体固定化ビーズ 0.6 mg を含有する 1.5 mL チューブのうち、1 本については、前記で調製した His タグ融合型 mTim4 タンパク質含有 PBS 溶液 200 μ L (His タグ融合型 mTim4 タンパク質 1 μ g 含有) を添加して、8 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。

さらに、1 本については、前記で調製した His タグ融合型 hAnnexin V 質含有 PBS 溶液 200 μ L (His タグ融合型 hAnnexin

V 1 μ g 含有) を添加して、8℃で1時間反応させた。

1本については、前記で調製したHisタグ融合型hMFG-E8含有PBS溶液200 μ L (Hisタグ融合型hMFG-E8 1 μ g 含有) を添加して、8℃で1時間反応させた。

1本については、前記で調製したHisタグ融合型mMFG-E8含有PBS溶液200 μ L (Hisタグ融合型mMFG-E8 1 μ g 含有) を添加して、8℃で1時間反応させた。

以上により、下記表11に示す4種類の担体をそれぞれ0.6mg含有するPBS溶液200 μ Lを得た。

[0316] [表11]

		1	2	3	4
マウス由来Tim4担体 又は ホスファチジルセリン結合 タンパク質固定化担体	ホスファチジルセリン 結合タンパク質	Hisタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	Hisタグ融合型 ヒト由来 Annexin V	Hisタグ融合型 ヒト由来 MFG-E8	Hisタグ融合型 マウス由来 MFG-E8
	担体	抗Hisタグ抗体固定化ビーズ			

[0317] <(4) 細胞外膜小胞の取得>

前記で得られた4種類の担体 0.6mgを含有するPBS溶液200 μ LをPBS 500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作した後、ペレット状態の5種類の担体に、実施例1-8と同様の方法により調製したカルシウムイオン含有培養上清サンプル200 μ Lをそれぞれ加え、8℃で3時間それぞれ反応させた。

その後、カルシウムイオン含有培養上清サンプルを反応させた4種類の担体を、2mM CaCl_2 含有TBS-T 500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作した。

3回目の洗浄の時に、4種類の担体をそれぞれ250 μ Lずつ1.5mLチューブ2本に分注した。ペレット状態の4種類の担体各0.3mgに溶出液として1% SDS水溶液又は1mM EDTA水溶液を20 μ L添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間スピンドウンした。1.5mLチューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁

に得られた4種類の担体を集合させ、それぞれ上清（溶出液）を回収した。

尚、各実施例で用いたPSタンパク質及び担体の種類、担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びに後述するウェスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表12に示す。

[0318] [表12]

		実施例26	実施例27	比較例4	比較例5	比較例6	比較例7	比較例8	比較例9
マウス由来Tim4担体 又はPSタンパク質 固定化担体	PSタンパク質	Hisタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質		Hisタグ融合型 ヒト由来 Annexin V		Hisタグ融合型 ヒト由来 MFG-E8		Hisタグ融合型 マウス由来 MFG-E8	
	担体	抗Hisタグ抗体固定化ビーズ							
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図7におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8

[0319] <（5）ウェスタンブロッティング>

「実施例1－8で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」の代わりに「実施例26－27、比較例4－9（前記（4））で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」を用いた以外は、実施例1－8の「（7）ウェスタンブロッティング」と同様の方法により行った。

[0320] <結果>

得られたウェスタンブロッティングの結果を図7に示す。図7において、各レーンは以下の通りである。

レーン1：実施例26の結果（Hisタグ融合型mTim4タンパク質を抗Hisタグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン2：実施例27の結果（Hisタグ融合型mTim4タンパク質を抗Hisタグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1mMEDTA水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン3：比較例4の結果（Hisタグ融合型hAnnexin Vを抗Hisタグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1%SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン4：比較例5の結果（H i s タグ融合型 h A n n e x i n V を抗 H i s タグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1 m M E D T A 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン5：比較例6の結果（H i s タグ融合型 h M F G - E 8 を抗 H i s タグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン6：比較例7の結果（H i s タグ融合型 h M F G - E 8 を抗 H i s タグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1 m M E D T A 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン7：比較例8の結果（H i s タグ融合型 m M F G - E 8 を抗 H i s タグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン8：比較例9の結果（H i s タグ融合型 m M F G - E 8 を抗 H i s タグ抗体固定化ビーズに結合させた担体を用い、1 m M E D T A 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

図7より、実施例26-27の何れの場合においても、100 k D a 付近にエクソソームマーカーである L a m p - 1 のバンドが得られたことから、本発明の取得方法によれば、エクソソームを含む細胞外膜小胞を取得可能であることが判った（実施例26-27：レーン1-2）。

一方、図7より、比較例4-9の何れの場合においても、100 k D a 付近に L a m p - 1 のバンドが認められなかったことから、T i m 4 タンパク質以外の P S タンパク質（A n n e x i n V、M F G - E 8）を固定化した担体では、エクソソームを含む細胞外膜小胞を取得不可能であることが判った（比較例4-9：レーン3-8）。

[0321] 実施例28-33. 本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得（複合体形成工程の検討）

下記のようにそれぞれ本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得を行った。

実施例 28-29 は、実施例 13-14 と同様の方法により調製した S H 基ビオチン標識 F L A G タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質と本発明に係る担体とを反応後、さらに試料を加えて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

実施例 30-31 は、実施例 13-14 と同様の方法により調製した S H 基ビオチン標識 F L A G タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質と試料とを反応後、さらに本発明に係る担体を加えて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

実施例 32-33 は、実施例 13-14 と同様の方法により調製した S H 基ビオチン標識 F L A G タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質と、試料と、本発明に係る担体とを同時に加えて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0322] <ビーズの洗浄>

10 μ g / μ L Dynabeads M-270 Streptavidin C1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有 PBS 溶液 60 μ L (Dynabeads M-270 Streptavidin C1 0.6 mg 含有) を、3つの 1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) にそれぞれ分注し、PBS 500 μ L を用いてそれぞれ洗浄操作を行った。

[0323] 実施例 13-14 と同様の方法により、H i s タグ融合 m T i m 4 タンパク質含有 PBS 溶液 270 μ L (H i s タグ融合型 m T i m 4 タンパク質 50 μ g 含有) をビオチン標識し、S H 基ビオチン標識 F L A G タグ融合型 m T i m 4 タンパク質 39.2 μ g を含有する PBS 溶液 200 μ L を得た。得られた S H 基ビオチン標識 F L A G タグ融合型 m T i m 4 タンパク質 1 μ g を含有する PBS 溶液 5.1 μ L に PBS 溶液 194.9 μ L を加え、S H 基ビオチン標識 F L A G タグ融合型 m T i m 4 タンパク質 1 μ g を含有する PBS 溶液 200 μ L を得た。

[0324] <S H 基ビオチン標識 F L A G タグ融合型 m T i m 4 タンパク質と本発明に

係る担体とを反応後、さらに本発明に係る試料中の細胞外膜小胞を反応させる場合（実施例28-29）＞

洗浄操作を行ったペレット状のDyna beads M-270 Streptavidin C1 0.6mgを含有する1.5mLチューブに、SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質1μgを含有するPBS溶液200μLを加えて、Dyna beads M-270 Streptavidin C1とSH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質とを接触させて、8℃で1時間反応させ、mTim4担体を得た。次いで、得られたmTim4担体をPBS500μLで3回洗浄操作し、当該洗浄後のmTim4担体0.6mgを含有する1.5mLチューブに、実施例1と同様の方法により調製したカルシウムイオン含有培養上清サンプル200μLを加えて8℃で3時間反応させた。その後、カルシウムイオン含有培養上清サンプルを反応させたmTim4担体を、終濃度2mM CaCl₂添加TBS-T500μLで3回洗浄操作した。3回目の洗浄の時に、mTim4担体をそれぞれ250μLずつ1.5mLチューブ2本に分注した。ペレット状態のmTim4担体各0.3mgに溶出液として1% SDS水溶液又は1mM EDTA水溶液を20μL添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。1.5mLチューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にmTim4担体を集合させ、上清（溶出液）をそれぞれ回収した。

[0325] ＜SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質と本発明に係る試料とを反応後、さらに本発明に係る担体を反応させる場合（実施例30-31）＞

1.5mLチューブに、実施例1と同様の方法により調製したカルシウムイオン含有培養上清サンプル200μLを分注し、SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質1μgを含有するPBS溶液5.1μLを加えて、カルシウムイオン含有培養上清サンプル中の細胞外膜小胞とSH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質とを接触させ、

8℃で3時間反応させた。

洗浄操作を行ったペレット状のDyna beads M-270 Streptavidin C1 0.6mgを含有する1.5mLチューブに、カルシウムイオン含有培養上清サンプル中の細胞外膜小胞とSH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質とを8℃で3時間反応させた溶液を添加し、8℃で1時間反応させ、細胞外膜小胞とmTim4担体との複合体を得た。その後、得られた細胞外膜小胞とmTim4担体との複合体を、終濃度2mM CaCl₂添加TBS-T 500μLで3回洗浄操作した。3回目の洗浄の時に、mTim4担体との複合体をそれぞれ250μLずつ1.5mLチューブ2本に分注した。ペレット状態のmTim4担体との複合体各0.3mgに溶出液として1% SDS水溶液又は1mM EDTA水溶液を20μL添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。1.5mLチューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にmTim4担体を集合させ、上清（溶出液）をそれぞれ回収した。

[0326] <SH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質と、本発明に係る試料と、本発明に係る担体とを同時に反応させる場合（実施例32-33）>

洗浄操作を行ったペレット状のDyna beads M-270 Streptavidin C1 0.6mgを含有する1.5mLチューブに、実施例1と同様の方法により調製したカルシウムイオン含有培養上清サンプル200μLとSH基ビオチン標識FLAGタグ融合型mTim4タンパク質1μgを含有するPBS溶液5.1μLとを加えて、8℃で4時間反応させた。反応後のペレット状のDyna beads M-270 Streptavidin C1を、終濃度2mM CaCl₂添加TBS-T 500μLで3回洗浄操作した。3回目の洗浄の時に、mTim4担体をそれぞれ250μLずつ1.5mLチューブ2本に分注し、mTim4担体各0.3mgに溶出液として1% SDS水溶液又は1mM EDTA水溶液を20

μ L 添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で 10 秒間混合し、スピンドウンした。1. 5 mL チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に Dynabeads M-270 Streptavidin C1 を集合させ、上清（溶出液）をそれぞれ回収した。

尚、各実施例における担体、mTim4 タンパク質、カルシウムイオン含有培養上清サンプルを接触させる順番、及び担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類を下記表 13 に示す。

[0327] [表13]

	接触の順番	溶出液
実施例28	(1) 担体とマウス由来Tim4タンパク質を接触 (2) さらにカルシウムイオン細胞培養上清サンプルと接触	1% SDS
実施例29		1% EDTA
実施例30	(1) マウス由来Tim4タンパク質と カルシウムイオン細胞培養上清サンプルと接触 (2) さらに、担体と接触	1% SDS
実施例31		1% EDTA
実施例32	(1) 担体とカルシウムイオン細胞培養上清サンプルとマウス由来 Tim4タンパク質とを同時に接触させる	1% SDS
実施例33		1% EDTA

[0328] <ウエスタンブロッティング>

「実施例 1－8 で得られた各上清（溶出液）7. 5 μ L」の代わりに「実施例 28－33 で得られた各上清（溶出液）7. 5 μ L」を用いた以外は、実施例 1－8 の「（7）ウエスタンブロッティング」と同様の方法により行った。

[0329] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図 8 にそれぞれ示す。図 8 において、各レーンは以下の通りである。

レーン 1：実施例 28 の結果（担体と mTim4 タンパク質を接触後、さらにカルシウムイオン細胞培養上清サンプルと接触させる方法により細胞外膜小胞を取得し、1% SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン 2：実施例 29 の結果（担体と mTim4 タンパク質を接触後、さらにカルシウムイオン細胞培養上清サンプルと接触させる方法により細胞外膜小胞を取得し、1 mM EDTA 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン 3 : 実施例 30 の結果 (mT i m 4 タンパク質とカルシウムイオン細胞培養上清サンプルを接触後、さらに担体と接触させる方法により細胞外膜小胞を取得し、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合の結果) を、

レーン 4 : 実施例 31 の結果 (mT i m 4 タンパク質とカルシウムイオン細胞培養上清サンプルを接触後、さらに担体と接触させる方法により細胞外膜小胞を取得し、1 m M E D T A 水溶液を溶出液として用いた場合の結果) を、

レーン 5 : 実施例 32 の結果 (担体とカルシウムイオン細胞培養上清サンプルと mT i m 4 タンパク質とを同時に接触させる方法により細胞外膜小胞を取得し、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合の結果) を、

レーン 6 : 実施例 33 の結果 (担体とカルシウムイオン細胞培養上清サンプルと mT i m 4 タンパク質とを同時に接触させる方法により細胞外膜小胞を取得し、1 m M E D T A 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

図 8 より、実施例 28 - 33 の何れにおいても、100 k D a 付近にエクソソームマーカーである L a m p - 1 のバンドが得られた (実施例 28 - 33 : レーン 1 - 6)。

また、実施例 28 - 33 の結果より、担体に結合した T i m 4 タンパク質と試料中の細胞外膜小胞の複合体を形成させる工程 (複合体形成工程) は、本発明に係る T i m 4 タンパク質と、本発明に係る担体と、試料中の細胞外膜小胞との接触する順序によらず、結果として、担体に結合した mT i m 4 タンパク質と試料中の細胞外膜小胞の複合体が形成されればよいことが判った。

[0330] 実施例 34 - 35 ・ 比較例 10 - 13 本発明の取得方法と従来法の比較

以下のように、S D S 溶出による本発明の取得方法 (実施例 34)、E D T A 溶出による本発明の取得方法 (実施例 35)、抗 C D 63 抗体固定化法 (比較例 10 - 11)、E x o s o m e - H u m a n C D 63 I s o l a t i o n / D e t e c t i o n (比較例 12 - 13) により得られる細胞外膜小胞の取得を行った。

[0331] <Tim4タンパク質の担体への固定>

10 μ g/ μ L Dynabeads M-270 Streptavidin (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有溶液 15 μ L (Dynabeads M-270 Streptavidin 1×10^7 個含有する) を 1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) に分注し、PBS を用いて洗浄操作を行った。

次いで、洗浄操作後の Dynabeads M-270 Streptavidin を含有する 1.5 mL チューブに、実施例 11-12 と同様の方法により調製した SH 基ビオチン標識 FLAG タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質を 0.25 μ g 含有する PBS 溶液 200 μ L の全量を加えて、冷蔵で 1 時間反応させて、mTim4 担体含有 PBS 溶液を得た。

[0332] <抗CD63抗体 (H5C6) 固定化担体の調製>

30 μ g/ μ L Dynabeads M-270 Carboxylic Acid (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有溶液 50 μ L (Dynabeads M-270 Carboxylic Acid 1×10^8 個含有する) を 1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) に分注し、反応バッファー (0.1 M MES、pH 5.0) を用いて洗浄操作を行った。

一方、抗CD63抗体 (H5C6) (BD Pharmingen 社製) 30 g (60 μ L) を、反応バッファー (0.1 M MES、pH 5.0) 490 μ L で希釈し、反応バッファー希釈抗CD63抗体溶液を得た。

次いで、洗浄操作後の Dynabeads M-270 Carboxylic Acid を含有する 1.5 mL チューブに、前記反応バッファー希釈抗CD63抗体溶液を 550 μ L 加えて室温で 30 分間転倒混和した。その後、さらに 3 mg/mL WSC (同仁化学研究所社製) を 50 μ L 加えて室温で 4 時間転倒混和し、TBS-T で洗浄操作後、50 μ L PBS で希釈し、抗CD63抗体 (H5C6) 担体含有 PBS 溶液を得た。

以上により、下記表 14 に示す 2 種類の担体を得た。

[0333] [表14]

	1	2
担体へ固定化する タンパク質又は抗体	ビオチン標識(SH基)FLAGタグ融 合型マウス由来Tim4タンパク質	抗CD63抗体(H5C6)
担体	Dynabeads M-270 Streptavidin	Dynabeads M-270 Carboxylic Acid

＜本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得＞

前記で得られたmTim4担体含有PBS溶液200 μ L (mTim4担体 1×10^7 個含有)をPBS500 μ Lで3回洗浄操作した後、ペレット状態のmTim4担体に、実施例1－8と同様の方法により調製したカルシウムイオン含有培養上清サンプル50 μ Lを加え、8℃で3時間反応させた。

その後、反応後のmTim4担体を、2mM CaCl_2 含有TBS-T500 μ Lで3回洗浄操作した。3回目の洗浄の時に、mTim4担体をそれぞれ250 μ Lずつ1.5mLチューブ2本に分注した。ペレット状態のmTim4担体0.3mgずつに、溶出液として1% SDS水溶液及び1mM EDTA水溶液をそれぞれ20 μ L添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間それぞれ混合し、スピンドウンした。1.5mLチューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にmTim4担体を集合させ、上清(溶出液)を回収した。

[0334] ＜抗CD63抗体固定化法による細胞外膜小胞の取得＞

「mTim4担体含有PBS溶液200 μ L」の代わりに、「抗CD63抗体(H5C6)担体含有PBS溶液5 μ L (担体 1×10^7 個含有)」を用いた以外は、前記＜本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得＞と同様の方法により、カルシウムイオン含有培養上清サンプル中の細胞外膜小胞を取得し、1% SDS水溶液又は1mM EDTA水溶液により細胞外膜小胞を溶出させ、上清(溶出液)を回収した。

[0335] ＜Exosome-Human CD63 Isolation/Detectionによる細胞外膜小胞の取得＞

「mTim4担体含有PBS溶液200 μ L」の代わりに、「Exoso

me-Human CD63 Isolation/Detection (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 1 mL (担体 1×10^7 個含有)」を用いた以外は、前記＜本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得＞と同様の方法により、カルシウムイオン含有培養上清サンプル中の細胞外膜小胞を取得し、1% SDS水溶液又は1 mM EDTA水溶液により細胞外膜小胞を溶出させ、上清（溶出液）を回収した。

尚、各実施例、比較例で用いた担体の種類、担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びに後述するウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表15に示す。

[0336] [表15]

	実施例34	実施例35	比較例10	比較例11	比較例12	比較例13
方法	本発明の取得方法		抗CD63抗体法		Exosome-Human CD63 Isolation/Detection	
担体へ固定化するタンパク質又は抗体	FLAGタグ融合型マウス由来 Tim4タンパク質 (SH基をビオチン標識)		抗CD63抗体(H5C6)		抗CD63抗体	
担体	Dynabeads M-270 Streptavidin		Dynabeads M-270 Carboxylic Acid		—	
溶出液	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図9におけるレーン番号	1	2	3	4	5	6

[0337] ＜ウエスタンブロッティング＞

「実施例1－8で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」の代わりに「実施例34－35、比較例10－13で得られた各上清（溶出液）7.5 μ L」を用いた以外は、実施例1－8の「(7) ウエスタンブロッティング」と同様の方法により行った。

[0338] ＜結果＞

得られたウエスタンブロッティングの結果を図9に示す。図9において、各レーンは以下の通りである。

レーン1：実施例34の結果（本発明の取得方法により細胞外膜小胞を取得し、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン 2 : 実施例 3 5 の結果 (本発明の取得方法により細胞外膜小胞を取得し、1 mM EDTA 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 3 : 比較例 1 0 の結果 (抗 CD 6 3 抗体法により細胞外膜小胞を取得し、1 % SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 4 : 比較例 1 1 の結果 (抗 CD 6 3 抗体法により細胞外膜小胞を取得し、1 mM EDTA 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 5 : 比較例 1 2 の結果 (Exosome-Human CD63 Isolation/Detection により細胞外膜小胞を取得し、1 % SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 6 : 比較例 1 3 の結果 (Exosome-Human CD63 Isolation/Detection により細胞外膜小胞を取得し、1 mM EDTA 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

図 9 より、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得を行った実施例 3 4 - 3 5 では、25 - 60 kDa 付近にエクソソームマーカーの一つである CD 6 3 のバンドが得られた (実施例 3 4 - 3 5 : レーン 1 - 2)。

一方、図 9 より、抗 CD 6 3 抗体法により細胞外膜小胞の取得を行った比較例 1 0 - 1 1 及び Exosome-Human CD63 Isolation/Detection により細胞外膜小胞の取得を行った比較例 1 2 - 1 3 では、25 - 60 kDa 付近に CD 6 3 のバンドは薄くしか得られなかった (比較例 1 0 - 1 3 : レーン 3 - 6)。

以上から、本発明の取得方法によれば、抗 CD 6 3 抗体法や Exosome-Human CD63 Isolation/Detection 等の細胞外膜小胞の表面抗原タンパク質に対する抗体を用いて当該表面抗原タンパク質と抗体のアフィニティーによって細胞外膜小胞を取得する方法よりも多くの細胞外膜小胞を回収可能であることが判った。

[0339] 実施例 3 6 - 3 8. 超遠心分離処理済試料からの本発明の取得方法による残存細胞外膜小胞の取得

以下のように、従来法である超遠心分離法 (以下、超遠心分離処理と略記

する場合がある)により細胞外膜小胞を除去・取得した試料に対して、本発明の取得方法を実施した。

[0340] <(1) 超遠心分離法による細胞外膜小胞の除去>

FBS (CORNING社製) 15 mLを遠心分離処理(10000×g、20分間)して不純物を分離し、上清を新しいチューブに移して遠心分離処理済みFBSを得た。次いで、得られた遠心分離処理済みFBSを5 mLずつ超遠心分離処理(110000×g、一晚)又は超遠心分離処理(450000×g、一晚)し、上清を新しいチューブに移して超遠心分離処理(110000×g)済みFBS及び超遠心分離処理(450000×g)済みFBSを各5 mL得た。

[0341] <(2) ビーズの洗浄>

10 µg/µL Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有PBS溶液180 µL (Dynabeads MyOne Streptavidin C1 1.8 mg含有)を、3つのチューブにそれぞれ分注した。次いで、PBS1500 µLをチューブにそれぞれ加え、攪拌した後、チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にDynabeads MyOne Streptavidin C1を集合させ、チューブ内の溶液をピペットで捨てた(以下、洗浄操作と略記する場合がある)。

[0342] <(3) Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質のビーズへの固定>

洗浄操作後のペレット状態のDynabeads MyOne Streptavidin C1 1.8 mgに、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質3 µgを含有するPBS溶液1500 µLをそれぞれ添加して、8℃で10分間反応させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体(mTim4担体)を含有するPBS溶液1500 µLをそれぞれ得た。

[0343] <(4) 本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

得られたmTim4担体1.8mgをPBS1500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作し、ペレット状態のmTim4担体を得た。その後、3本の15mL遠沈管（CORNING社製）に遠心分離処理済みFBS、超遠心分離処理（110000 $\times$ g）済みFBS、及び超遠心分離処理（450000 $\times$ g）済みFBS各5mLをそれぞれ分注し、ペレット状態のmTim4担体を1.8mg添加し、8 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。反応後、15mL遠沈管をそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にmTim4担体を集合させ、各上清（各FBS）を新しい15mL遠沈管にそれぞれ回収した。遠沈管に残ったペレット状態のmTim4担体を、2mM CaCl₂含有TBS-T（Tris buffer, 0.0005% tween 20, 2mM CaCl₂）3mLでそれぞれ洗浄操作後、ペレット状態のmTim4担体に2mM CaCl₂含有TBS-Tをそれぞれ1mL添加して懸濁し、1.5mLチューブに懸濁液を全量移した後、それぞれ2回洗浄操作した。

ペレット状態のmTim4担体1.8mgに溶出液として1mM EDTA含有TBS溶液を50 μ Lそれぞれ添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。1.5mLチューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にmTim4担体を集合させ、溶出液を回収した。再度1mM EDTA含有TBS溶液を50 μ L添加し、前記で使用したmTim4担体を用いて同様の方法で溶出液を回収した。

その後、溶出液を2度回収した際に使用したビーズを、15mL遠沈管に回収した各上清（各FBS）に再度添加し、前記したのと同様の方法により、各上清（各FBS）中の細胞外膜小胞を回収する操作をさらに2回繰り返し各溶出液をそれぞれ得た。

[0344] <（5）ウエスタンブロッティング>

得られた各溶出液100 μ Lを30 μ Lになるように、VIVASPIN 500（MVCO10, 000）（ザルトリウス社製）を用いて限外ろ過し

た。限外ろ過した各溶出液 $15 \mu\text{L}$ に $4 \times$ 試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製） $5 \mu\text{L}$ を加えて 98°C で5分間加熱し、ウエスタンブロッティング用の各試料を得た。スーパーセップエース 5-20%ゲル（和光純薬工業（株）製）に当該ウエスタンブロッティング用の各試料 $20 \mu\text{L}$ を乗せて、 25 mA で65分間電気泳動した。得られた泳動ゲルを、セミドライブロッターと不連続バッファー（Anode Buffer 1: $0.3 \text{ M Tris} / 20\% \text{ Methanol}$ 、Anode Buffer 2: $0.025 \text{ M Tris} / 20\% \text{ Methanol}$ 、Cathode Buffer: $0.025 \text{ M Tris} / 0.04 \text{ M アミノカプロン酸} / 20\% \text{ Methanol}$ ）を用いて、PVDF膜（Millipore社製）に $1 \text{ mA} / \text{cm}^2$ で60分間転写した。転写後のPVDF膜にPBS-T（PBS buffer, $0.1\% \text{ tween } 20$ ）で希釈した3%スキムミルクを加えて1時間室温で反応させてブロッキングし、PBS-Tで1000倍希釈した抗ウシCD9抗体（Novus Biologicals社製、以下「抗ウシCD9抗体」と略記する場合がある） 2 mL を室温で1時間反応させた。反応後のPVDF膜をPBS-Tで3回洗浄し、PBS-Tで10000倍希釈した2次抗体〔抗マウスIgG（H+L）、ウサギ、IgG分画、ペルオキシダーゼ結合抗体〕（和光純薬工業（株）製）を室温で1時間反応させた。PBS-Tで5回洗浄後、抗ウシCD9抗体を反応させたメンブレンにイムノスターベーシック（和光純薬工業（株）製）を、抗Flotillin-2抗体を反応させたメンブレンにイムノスターゼータ（和光純薬工業（株）製）をそれぞれ添加し、LAS-4000（GE社製）を用いて発光シグナルを検出した。尚、抗ウシCD9抗体と抗Flotillin-2抗体は、エクソソームのマーカータンパク質であるCD9とFlotillin-2をそれぞれ認識する抗体である。

[0345] <（6）平均粒子数及び平均粒子サイズの測定>

得られた各溶出液 $100 \mu\text{L}$ を遠心式フィルター（ $0.45 \mu\text{m}$ 、PVDF）（Millipore社製）で処理後、水で5倍希釈し、ナノサイトL

M10（NanoSight社製）を用いて希釈液中に含まれる粒子についてNanoSight社のマニュアルに従い各3回測定し、平均粒子数（Particles）と平均粒子サイズ（Mean Size）を調べた。

尚、各実施例で用いた試料の処理方法、試料中に残存する細胞外膜小胞の取得方法等について下記表16に示す。

[0346] [表16]

		実施例36	実施例37	実施例38
試料の処理方法	超遠心分離法 (括弧内は超遠心分離法における重力)	—	○ (110000×g)	○ (450000×g)
+				
本発明の方法による 試料中の残存 細胞外膜小胞の取得	本発明の 取得方法	○	○	○
図10におけるレーン番号		1	2	3

[0347] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図10、ナノサイトによる平均粒子数及び平均粒子サイズの測定結果を表17にそれぞれ示す。図10において、各レーンは以下の結果である。

レーン1：実施例36の結果（試料を遠心分離処理し、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン2：実施例37の結果（試料を遠心分離処理し、110000×gで超遠心処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン3：実施例38の結果（試料を遠心分離処理し、450000×gで超遠心処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

[0348] 図10より、試料を遠心分離処理し、110000×g又は450000×gで超遠心処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合（実施例37－38）にもエクソソームマーカーのCD9とF

lotillin-2のバンドが確認され、超遠心分離処理では試料中に含まれる細胞外膜小胞を除去（取得）しきれず、試料中には多量の細胞外膜小胞が残存することが判った（実施例37-38：レーン2-3）。さらに、これらの超遠心分離法では除去（取得）しきれず試料中に残存する細胞外膜小胞を、本発明の取得方法によって取得（除去）可能であることが判った（実施例37-38：レーン2-3）。

[0349] 表17より、試料を遠心分離処理し、 $110000 \times g$ 又は $450000 \times g$ で超遠心処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合（実施例37-38）と試料を遠心分離処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合（実施例36）とで、取得した細胞外膜小胞の大きさ（粒子径）はほぼ同じであった。よって、超遠心分離法では除去しきれない試料中に残存する細胞外膜小胞は断片化されておらず、粒子として存在していることが判った。

[0350] [表17]

		Particles	Mean Size(nm)
実施例36	①未処理	2.04×10^9	155
実施例37	② $110,000 \times g$	1.36×10^9	162
実施例38	③ $450,000 \times g$	1.20×10^9	159

[0351] 実施例39-40. Total Exosome Isolation (ポリマー沈殿) 処理済試料からの本発明の取得方法による残存細胞外膜小胞の取得

以下のように、試料に含まれる細胞外膜小胞を従来法であるTotal Exosome Isolation (ポリマー沈殿) で除去（以下、「ポリマー沈殿処理」と略記する場合がある）により細胞外膜小胞を除去（取得）した試料に対して、本発明の取得方法を実施した。

[0352] < (1) Total Exosome Isolation (ポリマー沈殿) 法による細胞外膜小胞の除去 >

FBS (CORNING社製) 10mLを遠心分離処理 ($10000 \times g$ 、20分間) して不純物を分離し、遠心分離処理済みFBSを得た。次いで

、得られた遠心分離処理済みFBS 5 mLにTotal Exosome Isolation (from serum) (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)を1 mL添加し、冷蔵で30分間静置し、遠心分離処理(10000×g、20分間)して上清を回収し、Total Exosome Isolation処理済みFBS 6 mLを得た。

[0353] <(2) ビーズの洗浄>

10 μg/μL Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)含有PBS溶液180 μL (Dynabeads MyOne Streptavidin C1 1.8 mg含有)を、2つのチューブにそれぞれ分注した。次いで、PBS 1500 μLをチューブにそれぞれ加え、攪拌した後、チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にDynabeads MyOne Streptavidin C1を集合させ、チューブ内の溶液をピペットで捨てた(以下、洗浄操作と略記する場合がある)。

[0354] <(3) Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質のビーズへの固定>

洗浄操作後のペレット状態のDynabeads MyOne Streptavidin C1 1.8 mgに、実施例5-8と同様の方法により調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質3 μgを含有するPBS溶液1500 μLを添加して、8℃で10分間反応させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質が結合した担体(mTim4担体)を含有するPBS溶液1500 μLをそれぞれ得た。

[0355] <(4) 本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

得られたmTim4担体1.8 mgをPBS 1500 μLでそれぞれ3回洗浄操作し、ペレット状態のmTim4担体を得た。その後、ペレット状態のmTim4担体を1.8 mgずつ、15 mL遠沈管(CORNING社製)に分注した遠心分離処理済みFBS 5 mL又はTotal Exosome

e i s o l a t i o n 処理済み F B S 6 m L にそれぞれ添加し、8℃で2時間反応させた。

反応後、15 mL 遠沈管をそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にマウス由来 T i m 4 担体を集合させ、各上清（各 F B S）を新しい15 mL 遠沈管にそれぞれ回収した。遠沈管に残ったペレット状態の m T i m 4 担体を、2 mM C a C l ₂ 含有 T B S - T (T r i s b u f f e r , 0.0005% t w e e n 2 0 , 2 mM C a C l ₂) 3 mL でそれぞれ洗浄操作後、ペレット状態の m T i m 4 担体に 2 mM C a C l ₂ 含有 T B S - T をそれぞれ 1 mL 添加して懸濁し、1.5 mL チューブに懸濁液を全量移した後、それぞれ2回洗浄操作した。

ペレット状態の各 m T i m 4 担体 1.8 mg に溶出液として 1 mM E D T A 含有 T B S 溶液を 50 μ L それぞれ添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で 10 秒間混合し、スピンドウンした。1.5 mL チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に m T i m 4 担体を集合させ、溶出液を回収した。再度 1 mM E D T A 含有 T B S 溶液を 50 μ L 添加し、前記で使用した m T i m 4 担体を用いて同様の方法で溶出液を回収した。

その後、溶出液を2度回収した際に使用した m T i m 4 担体（ビーズ）を、15 mL 遠沈管に回収した
各上清（各 F B S）に再度添加し、前記したのと同様の方法により、各上清（各 F B S）中の細胞外膜小胞を回収する操作をさらに2回繰り返し各溶出液をそれぞれ得た。

[0356] < (5) ウェスタンブロッティング >

得られた各溶出液 300 μ L を 30 μ L になるように、V I V A S P I N 500 (M V C O 1 0 , 000) (ザルトリウス社製) を用いて限外ろ過した。限外ろ過した各溶出液 30 μ L に 4 × 試料用緩衝液 (和光純薬工業 (株) 製) 10 μ L を加えて 98℃ で 5 分間加熱し、ウェスタンブロッティング用の各試料を得た。スーパーセップエース 5 - 20% ゲル (和光純薬工業

(株) 製) に当該ウエスタンブロッティング用の各試料 $20\mu\text{L}$ を2ヶ所ずつ乗せて、 25mA で65分間電気泳動した。得られた泳動ゲルを、セミドライブロッターと不連続バッファー (Anode Buffer 1:0.3M Tris/20% Methanol、Anode Buffer 2:0.025M Tris/20% Methanol、Cathode Buffer:0.025M Tris/0.04M アミノカプロン酸/20% Methanol) を用いて、PVDF膜 (Millipore社製) に $1\text{mA}/\text{cm}^2$ で60分間転写した。転写後のPVDF膜にPBST (PBS buffer, 0.1% tween 20) で希釈した3% スキムミルクを加えて1時間室温で反応させてブロッキングし、PBSTで1000倍希釈した抗ウシCD9抗体 (Novus Biologicals社製、以下「抗ウシCD9抗体」と略記する場合がある) 2mL又はPBSTで250倍希釈した抗ヒトFlotillin-2抗体 (BD Biosciences社製、以下「抗ヒトFlotillin-2抗体」と略記する場合がある) を室温で1時間反応させた。反応後のPVDF膜をPBSTで3回洗浄し、PBSTで10000倍希釈した2次抗体 {抗マウスIgG (H+L)、ウサギ、IgG分画、ペルオキシダーゼ結合抗体} (和光純薬工業(株) 製) を室温で1時間反応させた。PBSTで5回洗浄後、抗ウシCD9抗体を反応させたメンブレンにイムノスターベーシク (和光純薬工業(株) 製) を、抗Flotillin-2抗体を反応させたメンブレンにイムノスターゼータ (和光純薬工業(株) 製) をそれぞれ添加し、LAS-4000 (GE社製) を用いて発光シグナルを検出した。尚、抗ウシCD9抗体は、エクソソームのマーカータンパク質の1つであるCD9に対する抗体であり、抗ヒトFlotillin-2抗体は、エクソソームのマーカータンパク質の1つであるFlotillin-2に対する抗体である。

[0357] 尚、各実施例で用いた試料の処理方法、試料中に残存する細胞外膜小胞の取得方法並びにウエスタンブロッティングにおけるレーン番号について下記

表 1 8 に示す。

[0358] [表18]

		実施例39	実施例40
試料の処理方法	Total Exosome Isolation (PEG沈殿) 法	—	○
+			
本発明の方法による 試料中の残存 細胞外膜小胞の取得	本発明の 取得方法	○	○
図11におけるレーン番号		1	2

[0359] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図 1 1 に示す。図 1 1 において、各レーンは以下の結果を表す。

レーン 1 : 実施例 3 9 の結果（試料を遠心分離処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン 2 : 実施例 4 0 の結果（試料を遠心分離処理し、ポリマー沈殿処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

[0360] 図 1 1 より、試料を遠心分離処理し、ポリマー沈殿した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合（実施例 4 0）にもエクソソームマーカーの CD 9 と Flotillin-2 のバンドが確認されたことから、Total Exosome Isolation（ポリマー沈殿）法では試料中に含まれる細胞外膜小胞を除去（取得）しきれず、試料中には多量の細胞外膜小胞が残存することが判った（実施例 4 0 : レーン 2）。

さらに、Total Exosome Isolation（ポリマー沈殿）法では除去（取得）しきれず試料中に残存する細胞外膜小胞を、本発明の取得方法によっては取得可能であることが判った（実施例 4 0 : レーン 2）。

[0361] 実施例 4 1 - 4 7. 本発明の除去方法及び／又は従来法（超遠心法、Total Exosome Isolation（ポリマー沈殿）法）による試料

からの細胞外膜小胞の取得（除去）

以下のように、本発明の除去方法及び／又は従来法（超遠心法、Total Exosome Isolation（ポリマー沈殿）法）により試料から細胞外膜小胞を取得（除去）した。

[0362] <（１）超遠心分離法による細胞外膜小胞の除去>

FBS（CORNING社製）28mLを遠心分離処理（10000×g、20分間）して不純物を分離し、遠心分離処理済みFBS（以下、「除去試料１」と略記する場合がある）を得た。次いで、得られた遠心分離処理済みFBS（「除去試料１」）12mLを超遠心分離処理（110000×g、一晚）し、超遠心分離処理（110000×g）済みFBS（以下、「除去試料２」と略記する場合がある）を得た。

[0363] <（２）Total Exosome Isolation（ポリマー沈殿）法による細胞外膜小胞の除去>

次に、遠心分離処理済みFBS（「除去試料１」）8mLにTotal Exosome Isolation（from serum）（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）を1.6mL添加し、冷蔵で30分間それぞれ静置し、遠心分離処理（10000×g、20分間）してそれぞれ上清を回収し、Total Exosome Isolation処理済みFBS（以下、「除去試料３」と略記する場合がある）9.6mLを得た。

また、超遠心分離処理（110000×g）済みFBS（「除去試料２」）4mLにTotal Exosome Isolationを0.8mL添加し、冷蔵で30分間それぞれ静置し、遠心分離処理（10000×g、20分間）してそれぞれ上清を回収し、超遠心分離処理（110000×g）／Total Exosome Isolation処理済みFBS（以下、「除去試料４」と略記する場合がある）4.8mLを得た。

[0364] <（３）ビーズの洗浄>

10μg／μL Dynabeads MyOne Streptavi

d i n C 1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有 P B S 溶液 $240\mu\text{L}$ (D y n a b e a d s M y O n e S t r e p t a v i d i n C 1 2.4mg 含有) を、3本のチューブにそれぞれ分注した。次いで、P B S $2000\mu\text{L}$ をチューブにそれぞれ加え、攪拌した後、チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に D y n a b e a d s M y O n e S t r e p t a v i d i n C 1 を集合させ、チューブ内の溶液をピペットで捨てた(以下、「洗浄操作」と略記する場合がある)。

[0365] <(4) F c タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質のビーズへの固定>

洗浄操作後のペレット状態の D y n a b e a d s M y O n e S t r e p t a v i d i n C 1 2.4mg に、S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質 $4\mu\text{g}$ を含有する P B S 溶液 $2000\mu\text{L}$ をそれぞれ添加して、 8°C で10分間反応させ、S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質が結合した担体 (m T i m 4 担体) を含有する P B S 溶液 $2000\mu\text{L}$ をそれぞれ得た。

[0366] <(5) 細胞外膜小胞の除去>

得られた m T i m 4 担体 2.4mg を P B S $2000\mu\text{L}$ でそれぞれ3回洗浄操作し、ペレット状の m T i m 4 担体をそれぞれ得た。

その後、遠心分離処理済み F B S (「除去試料1」) 又は超遠心分離処理 ($110000\times g$) 済み F B S (「除去試料2」) 4mL 、T o t a l E x o s o m e I s o l a t i o n 処理済み F B S (「除去試料3」) 4.8mL をチューブにそれぞれ分注し、 8°C で1時間それぞれ反応させた。反応後、チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に m T i m 4 担体を集合させ、各上清 (各 F B S) を新しいチューブにそれぞれ回収した。

チューブに残ったペレット状態の m T i m 4 担体を、T B S - T (T r i s b u f f e r, 0.0005% t w e e n 20) 4mL でそれぞれ3回洗浄操作後、各上清 (各 F B S) をそれぞれ再度添加し、反応から洗浄

までの操作をそれぞれ合計5回繰り返した。5回目の反応後、各上清（各FBS）を新しいチューブに移して遠心分離処理（ $10000 \times g$ 、20分間）し、上清を回収し、超遠心分離処理（ $110000 \times g$ ）／Tim4処理済みFBS（以下、「除去試料5」と略記する場合がある）4 mL、Total Exosome Isolation処理／Tim4処理済みFBS（以下、「除去試料6」と略記する場合がある）4.8 mL、Tim4処理済みFBS（以下、「除去試料7」と略記する場合がある）4 mLを得た。

[0367] <（6）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

前記方法と同様の方法により、新たにmTim4担体0.6 mgを7本分準備し、それぞれ洗浄操作を行った。下記表19に記載の所定の除去試料を除去試料のマウス由来Tim4担体への添加量ずつそれぞれペレット状態のmTim4担体0.6 mgに添加し、8℃で3時間それぞれ反応させた。

[0368] [表19]

		実施例41	実施例42	実施例43	実施例44	実施例45	実施例46	実施例47
各実施例において得られたサンプルの名称		除去試料5	除去試料6	除去試料4	除去試料2	除去試料3	除去試料7	除去試料1
遠心分離処理		○	○	○	○	○	○	○
試料の処理方法	超遠心分離法（括弧内は超遠心分離法における重力）	○ ($110000 \times g$)	—	○ ($110000 \times g$)	○ ($110000 \times g$)	—	—	—
	Total Exosome Isolation (PEG沈殿)法	—	○	○	—	○	—	—
	本発明の除去方法	○	○	—	—	—	○	—
除去試料のマウス由来Tim4担体への添加量		1mL	1.2mL	1.2mL	1mL	1.2mL	1mL	1ml

反応後、1.5 mLチューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にmTim4担体を集合させ、各上清（各FBS）を回収し、ペレット状態のmTim4担体を得た。

得られたペレット状態のmTim4担体を2 mM CaCl_2 含有TBSー

T (Tris buffer, 0.0005% tween 20, 2 mM CaCl_2) 1 mL でそれぞれ3回洗浄操作後、ペレット状態の各 mTim4 担体 0.6 mg に溶出液として 1 mM EDTA 含有 TBS 溶液を 50 μL それぞれ添加し、ボルテックスミキサーにより室温で 10 秒間混合し、スピンドウンした。1.5 mL チューブをそれぞれマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に mTim4 担体を集合させ、溶出液をそれぞれ回収した。再度 1 mM EDTA 含有 TBS 溶液を 50 μL 添加し、同様の方法で溶出液をそれぞれ回収した。

[0369] <(7) ウエスタンブロッティング>

得られた各溶出液のうち 100 μL を 30 μL になるように、VIVASPIN 500 (MVCO10, 000) (ザルトリウス社製) を用いて限外ろ過した。限外ろ過した各溶出液 30 μL に 4 × 試料用緩衝液 (和光純薬工業 (株) 製) 10 μL を加えて 98°C で 5 分間加熱し、ウエスタンブロッティング用の各試料を得た。スーパーセップエース 5-20% ゲル (和光純薬工業 (株) 製) に当該ウエスタンブロッティング用の各試料 20 μL を 2 ヶ所ずつ乗せて、25 mA で 65 分間電気泳動した。得られた泳動ゲルを、セミドライブロッターと不連続バッファー (Anode Buffer 1 : 0.3 M Tris / 20% Methanol、Anode Buffer 2 : 0.025 M Tris / 20% Methanol、Cathode Buffer : 0.025 M Tris / 0.04 M アミノカプロン酸 / 20% Methanol) を用いて、PVDF 膜 (Millipore 社製) に 1 mA / cm^2 で 60 分間転写した。転写後の PVDF 膜に PBS-T (PBS buffer, 0.1% tween 20) で希釈した 3% スキムミルクを加えて 1 時間室温で反応させてブロッキングし、PBS-T で 1000 倍希釈した抗ウシ CD9 抗体 (Novus Biologicals 社製、以下「抗ウシ CD9 抗体」と略記する場合がある) 2 mL 又は PBS-T で 250 倍希釈した抗ヒト Flotillin-2 抗体 (BD Biosciences 社製、以下「抗ヒト Flotillin-2 抗

体」と略記する場合がある)を室温で1時間反応させた。反応後のP V D F膜をP B S - Tで3回洗浄し、P B S - Tで1 0 0 0 0倍希釈した2次抗体{抗マウスI g G (H + L)、ウサギ、I g G分画、ペルオキシダーゼ結合抗体}(和光純薬工業(株)製)を室温で1時間反応させた。P B S - Tで5回洗浄後、抗ウシC D 9抗体を反応させたメンブレンにイムノスターベーシック(和光純薬工業(株)製)を、抗F l o t i l l i n - 2抗体を反応させたメンブレンにイムノスターゼータ(和光純薬工業(株)製)をそれぞれ添加し、L A S - 4 0 0 0 (G E社製)を用いて発光シグナルを検出した。尚、抗ウシC D 9抗体は、エクソソームのマーカータンパク質の1つであるC D 9に対する抗体であり、抗ヒトF l o t i l l i n - 2抗体は、エクソソームのマーカータンパク質の1つであるF l o t i l l i n - 2に対する抗体である。

[0370] 尚、各実施例で用いた試料の処理方法、試料中に残存する細胞外膜小胞の取得(除去)方法、及び後述するウエスタンブロッティングにおけるレーン番号等について下記表20に示す。

[0371]

[表20]

		実施例41	実施例42	実施例43	実施例44	実施例45	実施例46	実施例47
各実施例において得られたサンプルの名称		除去試料5	除去試料6	除去試料4	除去試料2	除去試料3	除去試料7	除去試料1
遠心分離処理		○	○	○	○	○	○	○
試料の処理方法	超遠心分離法 (括弧内は超遠心分離法における重力)	○ (110000 × g)	—	○ (110000 × g)	○ (110000 × g)	—	—	—
	Total Exosome Isolation (PEG沈殿)法	—	○	○	—	○	—	—
	本発明の除去方法	○	○	—	—	—	○	—
除去試料のマウス由来Tim4担体への添加量		1mL	1. 2mL	1. 2mL	1mL	1. 2mL	1mL	1ml
+								
本発明の取得方法による試料中の残存細胞外膜小胞の取得		○	○	○	○	○	○	○
図12におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7

[0372] <結果>

得られたウエスタンブロットティングの結果を図12に示す。図12において、各レーンは以下の結果を表す。

レーン1：実施例41の結果（試料を遠心分離処理し、超遠心分離処理し、さらに本発明の除去方法で処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン2：実施例42の結果（試料を遠心分離処理し、ポリマー沈殿処理し、さらに本発明の除去方法で処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン3：実施例43の結果（試料を遠心分離処理し、超遠心分離処理し、さらにポリマー沈殿処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン4：実施例44の結果（試料を遠心分離処理し、超遠心分離処理し、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン 5 : 実施例 4 5 の結果（試料を遠心分離処理し、ポリマー沈殿処理し、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン 6 実施例 4 6 の結果（試料を遠心分離処理し、本発明の除去方法で処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

レーン 7 実施例 4 7 の結果（試料を遠心分離処理した後、本発明の取得方法により細胞外膜小胞の取得をおこなった場合の結果）

[0373] 図 1 2 より、従来法である超遠心法、Total Exosome Isolation（ポリマー沈殿）法ではエクソソームマーカである CD 9 と Flotillin-2 のバンドが確認され、試料中に含まれる細胞外膜小胞を除去しきれず、試料中には多量の細胞外膜小胞が残存することが判った（実施例 4 4 - 4 5 : レーン 4 - 5）。また、例えこれらの従来法を組み合わせたとしても、CD 9 と Flotillin-2 のバンドが確認され、細胞外膜小胞を十分に除去することができずに残存してしまうことが判る（実施例 4 3 : レーン 3）。これに対して、従来法である超遠心法又は Total Exosome Isolation（ポリマー沈殿）法と本発明の除去方法を組み合わせることにより、CD 9 と Flotillin-2 のバンドは確認されず、従来法のみでは除去しきれない試料中の細胞外膜小胞を、除去（取得）可能であることが判った（実施例 4 1 - 4 2 : レーン 1 - 2）。さらには、本発明の方法のみでも、CD 9 と Flotillin-2 のバンドは確認されず、十分に細胞外膜小胞を除去（取得）可能であることが判った（実施例 4 6 : レーン 6）。また、本発明の除去（取得）方法によれば、ウイルスについても細胞外膜小胞と同様に除去可能であることが示唆された。

[0374] 実施例 4 8 - 5 5. 本発明の除去方法における本発明の Tim 担体の再利用
— 以下のように、本発明の Tim 担体を用いて本発明の除去方法を繰り返した。

[0375] <（1）試料の準備>

FBS (CORNING社製) 1 mLを遠心分離処理 (10000×g、20分間) して不純物を分離し、遠心分離処理済みFBS 1 mLを得た。

[0376] < (2) ビーズの洗浄 >

10 μg / μL Dynabeads MyOne Streptavidin C1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有PBS溶液 60 μL (Dynabeads MyOne Streptavidin C1 0.6 mg 含有) を、1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) に分注した。次いで、PBS 500 μL を1.5 mL チューブにそれぞれ加え、攪拌した後、1.5 mL チューブをマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁にDynabeads MyOne Streptavidin C1 を集合させ、1.5 mL チューブ内の溶液をピペットで捨てた (以下、洗浄操作と略記する場合がある)。

[0377] < (3) Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質のビーズへの固定 >

洗浄操作後のペレット状態のDynabeads MyOne Streptavidin C1 0.6 mg に、SH基ビオチン標識Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質 1 μg を含有するPBS溶液 500 μL を添加して、8℃で10分間反応させ、SH基ビオチン標識Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質が結合した担体 (mTim4 担体) を含有するPBS溶液 500 μL を得た。

[0378] < (4) 本発明の除去方法による細胞外膜小胞の除去 >

1.5 mL チューブをマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に mTim4 担体を集合させ、1.5 mL チューブ内の溶液をピペットで捨てた後、mTim4 担体をPBS 500 μL でそれぞれ3回洗浄操作しペレット状態の mTim4 担体を得た。その後、ペレット状態の mTim4 担体に、遠心分離処理済みFBSを1 mL 加え、8℃で1時間反応させた。

反応後、1.5 mL チューブをマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に mTim4 担体を集合させ、上清 (FBS) を新しい1.5 mL チューブに回収した (上清1とする)。ペレット状態の mTim4 担体を、2

mM CaCl_2 含有 TBS-T (Tris buffer, 0.0005% tween 20, 2mM CaCl_2) 500 μL で 3 回洗浄操作した。

ペレット状態の各 mTim4 担体 0.6 mg に溶出液として 1 mM EDTA 含有 TBS 溶液を 50 μL 添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で 10 秒間混合し、スピンドウンした。1.5 mL チューブをマグネットスタンドに設置し、磁力を用いて管壁に mTim4 担体を集合させ、溶出液を回収した（溶出液 1 とする）。当該 mTim4 担体に再度 1 mM EDTA 含有 TBS 溶液を 50 μL 添加し、同様の方法で溶出液を回収した（溶出液 2 とする）。得られた溶出液 1 と溶出液 2 を混合し、除去試料 8 を得た。

前記上清 1 を溶出操作後（溶出液 2 を得る溶出操作後）の mTim4 担体に再度添加し、上清 1 中の細胞外膜小胞を回収する操作を合計で 8 回繰り返し各溶出液をそれぞれ得た。

得られた除去試料及び後述するウエスタンブロッティングにおけるレーン番号は下記表 21 に記載の通り。

[0379] [表21]

	実施例48	実施例49	実施例50	実施例51	実施例52	実施例53	実施例54	実施例55
試料の名称	除去試料8	除去試料9	除去試料10	除去試料11	除去試料12	除去試料13	除去試料14	除去試料15
マウス由来Tim4担体及び試料の再利用回数	0 (新品)	1	2	3	4	5	6	7
図13におけるレーン番号	1	2	3	4	5	6	7	8

[0380] < (5) ウエスタンブロッティング >

得られた各溶出液 100 μL を 30 μL になるように、VIVASPIN 500 (MVCO10, 000) (ザルトリウス社製) を用いて限外ろ過した。限外ろ過した各溶出液 15 μL に 4 × 試料用緩衝液 (和光純薬工業 (株) 製) 5 μL を加えて 98 °C で 5 分間加熱し、ウエスタンブロッティング用の各試料を得た。スーパーセップエース 5-20% ゲル (和光純薬工業 (株) 製) に当該ウエスタンブロッティング用の各試料 20 μL を乗せて、25 mA で 65 分間電気泳動した。得られた泳動ゲルを、セミドライブロッタ

ーと不連続バッファー (Anode Buffer 1:0.3M Tris/20% Methanol、Anode Buffer 2:0.025M Tris/20% Methanol、Cathode Buffer:0.025M Tris/0.04M アミノカプロン酸/20% Methanol) を用いて、PVDF膜 (Millipore社製) に1mA/cm²で60分間転写した。転写後のPVDF膜にPBS-T (PBS buffer, 0.1% tween 20) で希釈した3%スキムミルクを加えて1時間室温で反応させてブロッキングし、PBS-Tで1000倍希釈した抗ウシCD9抗体 (Novus Biologicals社製、以下「抗ウシCD9抗体」と略記する場合がある) 2mLを室温で1時間反応させた。反応後のPVDF膜をPBS-Tで3回洗浄し、PBS-Tで10000倍希釈した2次抗体 {抗マウスIgG (H+L)、ウサギ、IgG分画、ペルオキシダーゼ結合抗体} (和光純薬工業 (株) 製) を室温で1時間反応させた。PBS-Tで5回洗浄後、イムノスターゼータ (和光純薬工業 (株) 製) を添加し、LAS-4000 (GE社製) を用いて発光シグナルを検出した。尚、抗ウシCD9抗体は、エクソソームのマーカータンパク質の1つであるCD9に対する抗体である。

[0381] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図13に示す。図13において、各レーンは以下の結果を表す。

レーン1: 実施例48の結果 (試料中の細胞外膜小胞を未使用の本発明のTim4担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

レーン2: 実施例49の結果 (1度使用した試料中の細胞外膜小胞を1度使用した本発明のTim4担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

レーン3: 実施例50の結果 (2度使用した試料中の細胞外膜小胞を2度使用した本発明のTim4担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

レーン 4 : 実施例 5 1 の結果 (3 度使用した試料中の細胞外膜小胞を 3 度使用した本発明の T i m 4 担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

レーン 5 : 実施例 5 2 の結果 (4 度使用した試料中の細胞外膜小胞を 4 度使用した本発明の T i m 4 担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

レーン 6 : 実施例 5 3 の結果 (5 度使用した試料中の細胞外膜小胞を 5 度使用した本発明の T i m 4 担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

レーン 7 : 実施例 5 4 の結果 (6 度使用した試料中の細胞外膜小胞を 6 度使用した本発明の T i m 4 担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

レーン 8 : 実施例 5 5 の結果 (7 度使用した試料中の細胞外膜小胞を 7 度使用した本発明の T i m 4 担体を用いて本発明の取得除去により除去した場合の結果)

[0382] 図 1 3 より、本発明の T i m 4 担体を繰り返し使用して除去操作を行った場合、試料から回収されるエクソソームの量が少なくなることが確認され、本発明の T i m 4 担体を繰り返し利用することで、細胞外膜小胞の除去をより確実に行うことができることが判った。また、カルシウムイオンキレート剤である E D T A を用いて担体に結合した T i m 4 タンパク質と試料中の細胞外膜小胞との複合体から細胞外膜小胞を分離することにより、本発明の T i m 4 担体は再利用可能であることが判った。

[0383] 実施例 5 6 - 6 7 . 比較例 1 4 - 1 5 . T i m ファミリータンパク質を固定化した担体による細胞外膜小胞の取得

以下のように、T i m ファミリーである T i m 1 タンパク質、T i m 3 タンパク質、又は T i m 4 タンパク質をそれぞれビーズへ固定化した担体を用いて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0384] < (1) カルシウムイオン含有培養上清 (原液) の調製 >

細胞外膜小胞を分泌するヒト慢性骨髄性白血病株 K 5 6 2 細胞 1×10^7 細胞を 80 mL の X-VIVO 15 培地 (Lonza 社製) を用いて 37℃、5% CO₂ 条件下で 3 日間培養した後、遠心分離処理 (300×g、5 分間) して細胞を沈殿させ、上清を除去した。沈殿した細胞を、10 μM モネンシンナトリウム (MP Biomedicals 社製) 含有 X-VIVO 15 培地 60 mL で懸濁後、37℃、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。

その後、培養液を遠心分離処理 (300×g、5 分間) し、培養上清を回収した。回収した培養上清 60 mL をさらに 3 回遠心分離処理 (1 回目: 300×g、3 分間、2 回目: 1200×g、20 分間、3 回目: 10000×g、20 分間) して不純物を分離し、上清を得た (以下、「培養上清 (原液)」と略記する場合がある) を得た。

また、得られた培養上清原液に終濃度が 2 mM となるように CaCl₂ を添加し、2 mM CaCl₂ 含有 K 5 6 2 細胞培養上清濃縮液サンプル (以下、「カルシウムイオン含有培養上清 (原液)」と略記する場合がある) を得た。

[0385] < (2) ビーズの洗浄 >

30 μg / μL Dynabeads Protein G (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有 PBS-T 溶液 20 μL (Dynabeads Protein G 0.6 mg 含有) を、1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) 7 本にそれぞれ移し、それぞれ洗浄操作をした。

[0386] < (3) Fc タグ融合型 Tim タンパク質のビーズへの固定 >

洗浄操作後のペレット状態の Dynabeads Protein G 0.6 mg を含有する 1.5 mL チューブに、Fc タグ融合型マウス由来 Tim 1 タンパク質、Fc タグ融合型マウス由来 Tim 3 タンパク質、Fc タグ融合型マウス由来 Tim 4 タンパク質、Fc タグ融合型ヒト由来 Tim 1 タンパク質、Fc タグ融合型ヒト由来 Tim 3 タンパク質、又は Fc タグ融合型ヒト由来 Tim 4 タンパク質 (すべて和光純薬工業 (株) 製) を 1 μg 含有する TBS 溶液 200 μL をそれぞれ添加して、8℃ で 1 時間反応させ、Fc タグ融合型 mTim 1 タンパク質結合担体、Fc タグ融合型 mTim 3 タ

ンパク質結合担体、Fcタグ融合型mTim4タンパク質結合担体、Fcタグ融合型hTim1タンパク質結合担体、Fcタグ融合型hTim3タンパク質結合担体、及びFcタグ融合型hTim4タンパク質結合担体をそれぞれ得た。尚、これらの得られた6種類の担体を下記表22に示す。これらをまとめて「Timタンパク質結合担体」と略記する場合がある。

[0387] [表22]

		1	2	3	4	5	6
Tim タンパク質 結合担体	担体	Dynabeads ProteinG ビーズ					
	Fcタグ融合型 Tim タンパク質	ヒト由来 Tim1	マウス由来 Tim1	ヒト由来 Tim3	マウス由来 Tim3	ヒト由来 Tim4	マウス由来 Tim4

[0388] < (4) 本発明の方法による細胞外膜小胞の取得 >

前記で得られた6種類のTimタンパク質結合担体をそれぞれTBS-T (Tris buffer, 0.1% Tween20) 500 μ Lで3回、TBS 500 μ Lで2回洗浄操作し、ペレット状態のTimタンパク質結合担体を得た。次いで、ペレット状態のTimタンパク質結合担体及び洗浄操作のみを行ったDynabeads ProteinG (以下、「Timタンパク質非結合担体」と略記する場合がある)に、前記(1)で調製したカルシウムイオン含有培養上清(原液) 1 mLをそれぞれ加え、8℃で3時間それぞれ反応させた。

その後、反応後のTimタンパク質結合担体又はTimタンパク質非結合担体を、カルシウムイオン含有TBS-T (Tris buffer, 0.0005% Tween20, 2 mM CaCl_2) 500 μ Lでそれぞれ3回洗浄操作した。3回目の洗浄操作の時に、Timタンパク質結合担体又はTimタンパク質非結合担体を含む CaCl_2 含有TBS-T溶液500 μ Lを、250 μ Lずつ1.5 mLチューブ2本にそれぞれ分注し、チューブを磁気スタンドにセットした後、洗浄液を除いた。。

ペレット状態のTimタンパク質結合担体又はTimタンパク質非結合担体0.3 mgにそれぞれ溶出液として1% SDS水溶液を50 μ L、又は1 mM EDTA含有TBS溶液を25 μ L添加した後、ボルテックスミキサ

ーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。EDTAを添加したチューブには再度1mM EDTA含有TBS溶液を25 μ L添加し、同様の操作を行い、各上清（溶出液）を得た。

[0389] <（5）ウエスタンブロッティング>

前記（4）で得られた各上清（各溶出液）11.25 μ Lに4 $\times$ 試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製）3.75 μ Lを加えて95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱し、ウエスタンブロッティング用の各試料を得た。スーパーセップエース 5ー20%ゲル（和光純薬工業（株）製）に当該ウエスタンブロッティング用の各試料15 μ Lを載せて、30mAで60分間電気泳動した。得られた泳動ゲルを、セミドライブロッターと不連続バッファー（Anode Buffer 1:0.3M Tris/20% Methanol、Anode Buffer 2:0.025M Tris/20% Methanol、Cathode Buffer:0.025M Tris/0.04M アミノカプロン酸/20% Methanol）を用いて、PVDF膜（Millipore社製）に1mA/cm²で60分間転写した。転写後のPVDF膜にTBS-T（TBS buffer, 0.1% tween20）で希釈した5%スキムミルクを加えて1時間室温で反応させてブロッキングし、TBS-Tで250倍希釈した抗ヒトLamp-1抗体（BD biosciences社製）、250倍希釈した抗ヒトFlotillin-2抗体（BD biosciences社製）2mLを室温で1時間反応させた。反応後のPVDF膜をTBS-Tで3回洗浄し、TBS-Tで5000倍希釈した2次抗体〔抗マウスIgG（H+L）, ウサギ, IgG画分、ペルオキシダーゼ結合抗体〕（和光純薬工業（株）製）を室温で1時間反応させた。TBS-Tで5回洗浄後、各抗体を反応させたPVDF膜にイムノスターゼータ（和光純薬工業（株）製）を添加し、LAS-4000（GE社製）を用いて発光シグナルを検出した。

尚、各実施例、比較例で用いたTimタンパク質及び担体の種類、並びにTimタンパク質（非）結合担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた

溶出液の種類を下記表 2 3 に示す。

[0390] [表23]

		比較例		実施例											
		14	15	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67
Tim タンパク質 (非) 結合担体	担体	Dynabeads ProteinG ビーズ													
	Fcタグ融合型 Tim タンパク質	—		ヒト由来 Tim1		マウス由来 Tim1		ヒト由来 Tim3		マウス由来 Tim3		ヒト由来 Tim4		マウス由来 Tim4	
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図14におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

[0391] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図 1 4 に示す。図 1 4 において、各レーンは以下の通りである。

レーン 1 : 比較例 1 4 の結果 (Dynabeads protein G の磁性ビーズのみの担体を用い、1 % SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 2 : 比較例 1 5 の結果 (Dynabeads protein G の磁性ビーズのみの担体を用い、1 mM EDTA 含有 TBS 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 3 : 実施例 5 6 の結果 (Dynabeads protein G にヒト由来 Tim 1 タンパク質を結合させた担体を用い、1 % SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 4 : 実施例 5 7 の結果 (Dynabeads protein G にヒト由来 Tim 1 タンパク質を結合させた担体を用い、1 mM EDTA 含有 TBS 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 5 : 実施例 5 8 の結果 (Dynabeads protein G にマウス由来 Tim 1 タンパク質を結合させた担体を用い、1 % SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 6 : 実施例 5 9 の結果 (Dynabeads protein G に

マウス由来Tim1タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン7：実施例60の結果 (Dynabeads protein Gにヒト由来Tim3タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン8：実施例61の結果 (Dynabeads protein Gにヒト由来Tim3タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン9：実施例62の結果 (Dynabeads protein Gにマウス由来Tim3タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン10：実施例63の結果 (Dynabeads protein Gにマウス由来Tim3タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン11：実施例64の結果 (Dynabeads protein Gにヒト由来Tim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン12：実施例65の結果 (Dynabeads protein Gにヒト由来Tim4タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン13：実施例66の結果 (Dynabeads protein Gにマウス由来Tim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン14：実施例67の結果 (Dynabeads protein Gにマウス由来Tim4タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

図14より、レーン3-14において、エクソソームのマーカータンパク質であるLamp-1又はFlotillin-2のバンドが認められている

ことから、T i m 1 タンパク質、T i m 3 タンパク質又はT i m 4 タンパク質を結合させた担体（本発明のT i m タンパク質結合担体）を用いることで、タンパク質の由来や溶出方法に関わらず、細胞外膜小胞を取得可能であることが判った。

また、S D S により溶出させる場合、T i m 4 タンパク質を結合させた担体>T i m 1 タンパク質を結合させた担体>T i m 3 タンパク質を結合させた担体の順でより多くの細胞外膜小胞を取得できることが判った。

[0392] 実施例 6 8 - 7 9. T i m タンパク質を固定化した担体による細胞外膜小胞の取得

ビオチン標識したT i m 1 タンパク質、ビオチン標識したT i m 3 タンパク質又はビオチン標識したT i m 4 タンパク質をそれぞれ固定化した担体を用いて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0393] <（１）培養上清サンプルの調製>

実施例 5 0 - 6 7、比較例 1 4 - 1 5 の「（１）カルシウムイオン含有培養上清（原液）の調製」と同様の方法により行い、カルシウムイオン含有培養上清（原液）を得た。

[0394] <（２）F c タグ融合型T i m 1 タンパク質のS H 基ビオチン標識>

F c タグ融合型マウス由来T i m 1 タンパク質（和光純薬工業（株）製）含有P B S 溶液2 0 0 μ L（F c タグ融合型マウス由来T i m 1 タンパク質2 0 μ g 含有）を、ビオチン化標識用キットーS H（同仁化学研究所製）を用いて、当該キットに添付されているプロトコールにしたがってF c タグ融合型マウス由来T i m 1 タンパク質のS H 基をビオチン標識し、S H 基ビオチン標識F c タグ融合型m T i m 1 タンパク質含有P B S 溶液2 0 0 μ Lを得た。

[0395] <（３）F c タグ融合型T i m 3 タンパク質のS H 基ビオチン標識>

F c タグ融合型マウス由来T i m 3 タンパク質（和光純薬工業（株）製）含有P B S 溶液2 0 0 μ L（F c タグ融合型マウス由来T i m 3 タンパク質2 0 μ g 含有）を、ビオチン化標識用キットーS H（同仁化学研究所製）を

用いて、当該キットに添付されているプロトコールにしたがってFcタグ融合型マウス由来Tim3タンパク質のSH基をビオチン標識し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質含有PBS溶液200 μ Lを得た。

[0396] < (4) Fcタグ融合型Tim4タンパク質のSH基ビオチン標識 >

Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（和光純薬工業（株）製）含有PBS溶液100 μ L（Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質10 μ g含有）を、ビオチン化標識用キットーSH（同仁化学研究所製）を用いて、当該キットに添付されているプロトコールにしたがってFcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質のSH基をビオチン標識し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液100 μ Lを得た。

[0397] < (5) タグ融合Timタンパク質の希釈 >

Fcタグ融合型mTim1タンパク質（和光純薬工業（株）製）含有PBS溶液10 μ L（Fcタグ融合型mTim1タンパク質1 μ g含有）を、TBS190 μ Lと混合し、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lを得た。

前記（2）で調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質含有TBS溶液11.5 μ L（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質1 μ g含有）をTBS188.5 μ Lと混合し、ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lを得た。

Fcタグ融合型mTim3タンパク質（和光純薬工業（株）製）含有PBS溶液10 μ L（Fcタグ融合型mTim3タンパク質1 μ g含有）を、TBS190 μ Lと混合し、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lを得た。

前記（3）で調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質含有TBS溶液9.0 μ L（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質1 μ g含有）をTBS190 μ Lと混合し、ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lを得た。

i m 3 タンパク質 1 μ g 含有) を TBS 191.0 μ L と混合し、ビオチン標識 Fc タグ融合型 mT i m 3 タンパク質を 1 μ g 含有する溶液 200 μ L を得た。

Fc タグ融合型 mT i m 4 タンパク質 (和光純薬工業 (株) 製) 含有 PBS 溶液 10 μ L (Fc タグ融合型 mT i m 4 タンパク質 1 μ g 含有) を、TBS 190 μ L と混合し、ビオチン非標識 Fc タグ融合型 mT i m 4 タンパク質を 1 μ g 含有する溶液 200 μ L を得た。

前記 (4) で調製した SH 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mT i m 4 タンパク質含有 TBS 溶液 10 μ L (SH 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mT i m 4 タンパク質 1 μ g 含有) を TBS 190 μ L と混合し、ビオチン標識 Fc タグ融合型 mT i m 4 タンパク質を 1 μ g 含有する溶液 200 μ L を得た。

[0398] < (6) ビーズの洗浄 >

30 μ g / μ L Dynabeads ProteinG (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有 PBS-T 溶液 20 μ L (Dynabeads ProteinG 0.6 mg 含有) を、1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) 6 本にそれぞれ移し、それぞれ洗浄操作をした。

また、10 μ g / μ L Dynabeads M270 Streptavidin C1 (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有 PBS 溶液 60 μ L (Dynabeads M270 Streptavidin C1 0.6 mg 含有) を、1.5 mL チューブ (ビーエム機器社製) にそれぞれ分注し、TBS 500 μ L を用いて前記と同様に洗浄操作を行った。

[0399] < (7) Fc タグ融合型 T i m タンパク質のビーズへの固定 >

洗浄操作後のペレット状態の Dynabeads ProteinG 0.6 mg を含有する 1.5 mL チューブ 6 本に、SH 基ビオチン非標識 Fc タグ融合型 mT i m 1 タンパク質を 1 μ g 含有する溶液 200 μ L、SH 基ビオチン非標識 Fc タグ融合型 mT i m 3 タンパク質を 1 μ g 含有する溶液 2

00 μ L、又はSH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lをそれぞれ添加して、8℃で1時間反応させ、SH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim1が結合した担体（「ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim1担体」と略記する場合がある）、SH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim3が結合した担体（「ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim3担体」と略記する場合がある）、SH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4が結合した担体（「ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4担体」と略記する場合がある）をそれぞれ得た。

また、洗浄操作後のDynabeads M270 Streptavidin C1 0.6mgを含有する1.5mLチューブに、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ L、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ L、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lを加え、前記と同様にビーズに結合させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1が結合した担体（「ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1担体」と略記する場合がある）、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3が結合した担体（「ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3担体」と略記する場合がある）、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4が結合した担体（「ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4担体」と略記する場合がある）をそれぞれ得た。

尚、これらの得られた6種類の担体をまとめて「Timタンパク質結合担体」と略記する場合がある。

[0400] <（8）本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得>

前記で得られたこれらのTimタンパク質結合担体をTBS-T（Tris buffer、0.1% Tween20）500 μ Lで3回、TBS 500 μ Lで2回それぞれ洗浄操作し、ペレット状態のTimタンパク質結合担体を得た。次いで、得られた6種類のペレット状態のTimタンパク質結合担体に、カルシウムイオン含有培養上清（原液）1mLをそれぞれ加え

、8℃で3時間それぞれ反応させた。その後、反応後のTimタンパク質結合担体を、カルシウムイオン含有TBS-T (Tris buffer、0.0005% Tween 20、2mM CaCl₂) 500μLでそれぞれ3回洗浄操作した。3回目の洗浄操作の時に、Timタンパク質結合担体を含むCaCl₂含有TBS-T溶液500μLを250μLずつ1.5mLチューブ2本にそれぞれ分注し、チューブを磁気スタンドにセットした後、洗浄液を除いた。

ペレット状態の6種類のTimタンパク質結合担体0.3mgにそれぞれ溶出液として1%SDS水溶液を50μL、又は1mM EDTA含有TBS溶液を25μL添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。EDTAを添加したチューブには再度1mM EDTA含有TBS溶液を25μL添加し、同様の操作を行い、溶出液を得た。

尚、各実施例で用いたTimタンパク質及び担体の種類、並びにTimタンパク質（非）結合担体の種類を下記表24に示す。

[0401] [表24]

		実施例											
		68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
Tim タンパク質 結合担体	担体	Dynabeads ProteinG ビーズ	ストレプトアビジン ビーズ	Dynabeads ProteinG ビーズ	ストレプトアビジン ビーズ	Dynabeads ProteinG ビーズ	ストレプトアビジン ビーズ	Dynabeads ProteinG ビーズ	ストレプトアビジン ビーズ	Dynabeads ProteinG ビーズ	ストレプトアビジン ビーズ	Dynabeads ProteinG ビーズ	ストレプトアビジン ビーズ
	Fcタグ融合型 Tim タンパク質	ビオチン非標識 マウス由来 Tim1	SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim1	ビオチン非標識 マウス由来 Tim3	SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim3	ビオチン非標識 マウス由来 Tim3	SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim3	ビオチン非標識 マウス由来 Tim4	SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim4	ビオチン非標識 マウス由来 Tim4	SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim4	ビオチン非標識 マウス由来 Tim4	SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim4

[0402] < (9) ウェスタンブロッティング >

実施例56-67の< (5) ウェスタンブロッティング >において「前記 (4) で得られた各溶出液11.25μL」の代わりに前記 (6) で得られた各溶出液11.25μLを使用し、2次抗体として「2次抗体 {抗マウスIgG (H+L), ウサギ, IgG画分、ペルオキシダーゼ結合抗体} (和光純薬工業 (株) 製)」の代わりにTBS-Tで30000倍希釈した「2次抗体 {抗マウスIgG (H+L), ロバ, IgG画分、ペルオキシダーゼ結合抗体} (Jackson ImmunoResearch社製)」

を用いた以外は、実施例 56－67 の「(5) ウエスタンブロッティング」と同様の方法により行った。

尚、各実施例で用いた T i m タンパク質及び担体の種類、T i m タンパク質（非）結合担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びにウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表 25 に示す。

[0403] [表25]

		実施例											
		68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79
Tim タンパク質 結合担体	担体	Dynabeads ProteinG ビーズ		ストレプトアビジン ビーズ		Dynabeads ProteinG ビーズ		ストレプトアビジン ビーズ		Dynabeads ProteinG ビーズ		ストレプトアビジン ビーズ	
	Fcタグ融合型 Tim タンパク質	ビオチン非標識 マウス由来 Tim1		SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim1		ビオチン非標識 マウス由来 Tim3		SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim3		ビオチン非標識 マウス由来 Tim4		SH基ビオチン標識 マウス由来 Tim4	
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図15におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

[0404] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図 15 に示す。図 15 において、各レーンは以下の結果である。

レーン 1：実施例 68 の結果（Dynabeads protein G に SH 基ビオチン非標識 Fc タグ融合型 mTim1 タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン 2：実施例 69 の結果（Dynabeads protein G に SH 基ビオチン非標識 Fc タグ融合型 mTim1 タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA 含有 TBS 溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン 3：実施例 70 の結果（Dynabeads M270 Streptavidin に SH 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mTim1 タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS 水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン 4：実施例 71 の結果（Dynabeads M270 Streptavidin に SH 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mTim1 タンパク質

を結合させた担体を用い、1 mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン5：実施例72の結果 (Dynabeads protein GにSH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン6：実施例73の結果 (Dynabeads protein GにSH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1 mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン7：実施例74の結果 (Dynabeads M270 StreptavidinにSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン8：実施例75の結果 (Dynabeads M270 StreptavidinにSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1 mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン9：実施例76の結果 (Dynabeads protein GにSH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン10：実施例77の結果 (Dynabeads protein GにSH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% 1 mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン11：実施例78の結果 (Dynabeads M270 StreptavidinにSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン12：実施例79の結果（Dynabeads M270 StreptavidinにSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

図15より、レーン1-12において、いずれの場合でもエクソソームのマーカータンパク質であるLamp-1のバンドが認められたことから、Tim1、Tim3、又はTim4を結合させた担体（Timタンパク質結合担体）を用いることで、細胞外膜小胞を取得可能であることが判った。

また、Tim4タンパク質が結合した担体>Tim1タンパク質が結合した担体>Tim3タンパク質が結合した担体の順でより多くの細胞外膜小胞を取得できることが判った。カルシウムキレート剤により溶出させる場合には、Tim4タンパク質のSH基を介してビーズ（担体）に固定化させることで、タグを介して固定化させるよりも多くの細胞外膜小胞を取得できることが判った（レーン9-12）。

[0405] 実施例80-83. 比較例16-19. Timファミリータンパク質を固定化した担体による細胞外膜小胞の取得

Timファミリータンパク質としてTim1タンパク質、Tim2タンパク質、又はTim4タンパク質をそれぞれビーズへ固定化した担体を用いて、本発明に係る細胞外膜小胞の取得を行った。

[0406] <（1）カルシウムイオン含有培養上清サンプルの調製>

実施例1-8の「（1）培養上清サンプルの調製」と同様の方法でカルシウムイオン含有培養上清サンプルを得た。

[0407] <（2）ビーズの洗浄>

30 μ g/ μ L Dynabeads ProteinG（サーモフィッシュアサイエンティフィック社製）含有PBS-T溶液20 μ L（Dynabeads ProteinG 4.8mg含有）を、1.5mLチューブ（ビーエム機器社製）4本にそれぞれ分注し、それぞれ洗浄操作をした。

[0408] <（3）6×Hisタグ融合型Timファミリータンパク質のビーズへの固

定>

洗浄操作後のペレット状態の Dynabeads Protein G 0.6 mg を含有する 1.5 mL チューブ 4 本に、抗 6×His 抗体（クローン No. 28-75、和光純薬工業社製）を 4 μg 含有する TBS 溶液 100 μL をそれぞれ添加して、8℃で30分間それぞれ反応させ、抗 6×His 抗体が結合した担体を含有する TBS 溶液 100 μL を得た。これらの抗 6×His 抗体が結合した担体を TBS-T (Tris buffer、0.1% Tween 20) 250 μL でそれぞれ3回洗浄操作し、その後 TBS 250 μL でそれぞれ2回洗浄操作した。

次いで、洗浄操作後の抗 6×His 抗体結合 Dynabeads Protein G 担体に、6×His タグ融合型マウス由来 Tim1 タンパク質（R&D システムズ社製）を 1 μg 含有する TBS 溶液 100 μL、6×His タグ融合型マウス由来 Tim2 タンパク質（R&D システムズ社製）を 1 μg 含有する TBS 溶液 100 μL、又は 6×His タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質（R&D システムズ社製）を 1 μg 含有する TBS 溶液 100 μL をそれぞれ添加して、8℃で1時間それぞれ反応させ、抗 6×His 抗体を介して Tim1 タンパク質が結合した担体（「6×His タグ融合型 mTim1 タンパク質結合担体」と略記する場合がある）、Tim2 タンパク質が結合した担体（「6×His タグ融合型 mTim2 タンパク質結合担体」と略記する場合がある）、Tim4 タンパク質が結合した担体（「6×His タグ融合型 mTim4 タンパク質結合担体」と略記する場合がある）をそれぞれ得た。

尚、得られた 6×His 融合型 mTim1 タンパク質結合担体及び 6×His 融合型 mTim4 タンパク質結合担体を纏めて「Tim タンパク質結合担体」と略記する場合がある。

各実施例で用いた Tim タンパク質及び担体の種類、並びに Tim ファミリータンパク質（非）結合担体の種類を下記表 26 に示す。

[0409]

[表26]

		比較例16	比較例17	実施例80	実施例81	比較例18	比較例19	実施例82	実施例83
Timファミリー タンパク質 (非)結合担体	担体	抗6×Hisタグ抗体結合Dynabeads ProteinG担体							
	Tim ファミリー タンパク質	—	—	6×Hisタグ融合型 マウス由来 Tim1タンパク質	6×Hisタグ融合型 マウス由来 Tim2タンパク質			6×Hisタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	

[0410] < (4) 本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得 >

前記(3)で得られた抗6×His抗体結合Dynabeads ProteinG担体、6×Hisタグ融合型mTim1タンパク質結合担体、6×Hisタグ融合型mTim2タンパク質結合担体、6×Hisタグ融合型mTim2タンパク質結合担体をTBS-T (Tris buffer、0.1% Tween 20) 250 μLで3回、TBS 250 μLで2回それぞれ洗浄操作し、ペレット状態の各担体を得た。その後、ペレット状態の各担体に、カルシウムイオン含有培養上清サンプル200 μLをそれぞれ加え、8℃で3時間それぞれ反応させた。反応後の各担体を、カルシウムイオン含有TBS-T (Tris buffer、0.0005% Tween 20、2 mM CaCl₂) 500 μLで3回洗浄操作した。3回目の洗浄操作の時に、各担体を含むCaCl₂含有TBS-T溶液500 μLを、250 μLずつ1.5 mLチューブ2本にそれぞれ分注し、チューブを磁気スタンドにセットした後、洗浄液を除いた。

ペレット状態の各担体0.3 mgずつにそれぞれ溶出液として1% SDS水溶液を50 μL、又は1 mM EDTA含有TBS溶液を25 μL添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。EDTAを添加したチューブには再度1 mM EDTA含有TBS溶液を25 μL添加し、同様の操作を行い、溶出液を得た。

[0411] < (5) ウェスタンブロッティング >

前記(4)で得られた各溶出液11.25 μLを用いた以外は、実施例68-79の「(7) ウェスタンブロッティング」と同様の方法により行った。

尚、各実施例で用いたTimファミリータンパク質及び担体の種類、Timタンパク質（非）結合担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びにウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表27に示す。

[0412] [表27]

		比較例16	比較例17	実施例80	実施例81	比較例18	比較例19	実施例82	実施例83
Timファミリータンパク質（非）結合担体	担体	抗6×Hisタグ抗体結合Dynabeads ProteinG担体							
	Timファミリータンパク質	—	—	6×Hisタグ融合型マウス由来Tim1タンパク質		6×Hisタグ融合型マウス由来Tim2タンパク質		6×Hisタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質	
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図16におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8

[0413] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図16に示す。図16において、各レーンは以下の結果を表す。

レーン1：比較例16の結果（Dynabeads protein Gに抗6×His抗体を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）
 レーン2：比較例17の結果（Dynabeads protein Gに抗6×His抗体を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン3：実施例80の結果（Dynabeads protein Gに抗6×His抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim1タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン4：実施例81の結果（Dynabeads protein Gに抗6×His抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim1タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン5：比較例18の結果（Dynabeads protein G

に抗6×His抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim2タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン6：比較例19の結果 (Dynabeads protein Gに抗6×His抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim2タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン7：実施例82の結果 (Dynabeads protein Gに抗6×His抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン8：実施例83の結果 (Dynabeads protein Gに抗6×His抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

図16より、6×Hisタグ融合型Tim2タンパク質を結合させた場合は、いずれの溶出法でもエクソソームマーカートンパク質のLamp-1のバンドが認められなかった(レーン5-6)。一方、6×Hisタグ融合型mTim1タンパク質、又は6×Hisタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体は、いずれの溶出法でもエクソソームのマーカートンパク質である抗Lamp-1のバンドが認められた(レーン3-4、レーン7-8)。この結果から、Tim2タンパク質を固定化した担体では、細胞外膜小胞を取得不可能であることが判った。

また、SDSにより溶出させる場合には、Tim4タンパク質を結合させた担体>Tim1タンパク質を結合させた担体の順でより多くの細胞外膜小胞を取得できることが判った。

[0414] 実施例84-95、比較例20-21、Timタンパク質を固定化した担体によるウイルスの取得

以下のように、Timタンパク質としてTim1タンパク質、Tim3タンパク質又はTim4タンパク質をそれぞれビーズへ固定化した担体を用いて、本発明に係るウイルスの取得を行った。

[0415] < (1) コトランスフェクション細胞培養上清の調製 >

25 cm² フラスコに播いた 1.0×10^6 cells の Sf9 細胞に、マウス IL23 発現ベクター DNA 約 2 μ g、Linear AcNPV DNA 90 ng、及び TransIT-Insect (Mirus 社) 3 μ L を含む PSFM-J1 培地 (和光純薬工業社製) 100 μ L を加えた。28℃ で 7 日間培養後、培養上清 (コトランスフェクション溶液) を回収した。

[0416] < (2) バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプルの調製 >

1.5×10^6 cells / mL になるように PSFM-J1 培地で希釈した Sf9 細胞を 50 mL 用意した。これに前記コトランスフェクション溶液を培養液の 1 / 200 量加え、130 rpm、27℃ で振盪培養した。72 時間後に細胞培養液を回収し、3,000 $\times$ g、4℃ で 30 分間遠心分離後、沈殿と上清に分画した。得られた上清を mouse IL23 を発現する組換えバキュロウイルス溶液 (以下、「バキュロウイルス溶液」と略記する場合がある) とした。

また、得られたバキュロウイルス溶液に終濃度が 2 mM となるように CaCl₂ を添加し、2 mM CaCl₂ 含有バキュロウイルス溶液 (以下、「カルシウムイオン含有バキュロウイルス溶液」と略記する場合がある) を得た。

[0417] < (3) ビーズの洗浄 >

実施例 56-67 及び比較例 14-15 の「(2) ビーズの洗浄」と同様の方法で行った。

[0418] < (4) Fc タグ融合型 Tim タンパク質のビーズへの固定 >

実施例 56-67 及び比較例 14-15 の「(3) Fc タグ融合型 Tim タンパク質のビーズへの固定」と同様の方法で行い、下記表 28 に示す通り 6 種の Tim タンパク質結合担体を得た。

[0419] [表28]

		1	2	3	4	5	6
Tim タンパク質 結合担体	担体	Dynabeads ProteinG ビーズ					
	Fcタグ融合型 Tim タンパク質	ヒト由来 Tim1	マウス由来 Tim1	ヒト由来 Tim3	マウス由来 Tim3	ヒト由来 Tim4	マウス由来 Tim4

[0420] < (5) 本発明の方法によるバキュロウイルスの取得 >

「カルシウムイオン含有の培養上清サンプル 1 mL」の代わりに「前記 (2) で調製したカルシウムイオン含有バキュロウイルス溶液 1 mL」を用いた以外は、実施例 56-67 及び比較例 14-15 の「(4) 本発明の方法による細胞外膜小胞の取得」と同様に行い、各溶出液を得た。

[0421] < (6) ウェスタンブロッティング >

「TBS-T で 250 倍希釈した抗ヒト Lamp-1 抗体 (BD biosciences 社製)、250 倍希釈した抗ヒト Flotillin-2 抗体 (BD biosciences 社製) 2 mL」の代わりに「TBS-T で 500 倍希釈した抗バキュロウイルス gp64 抗体 (Novus Biologicals 社製)」を用いた以外は、実施例 56-67 及び比較例 14-15 の「(5) ウェスタンブロッティング」と同様の方法で行った。

尚、各実施例、比較例で用いた Tim タンパク質及び担体の種類、Tim タンパク質 (非) 結合担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びにウェスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表 29 に示す。

[0422]

[表29]

		比較例		実施例											
		20	21	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95
Tim タンパク 質 (非) 結合担体	担体	Dynabeads ProteinG ビーズ													
	Fcタグ融合 型 Tim タンパク質	—		ヒト由来 Tim1 (hTim1)		マウス由来 Tim1 (mTim1)		ヒト由来 Tim3 (hTim3)		マウス由来 Tim3 (mTim3)		ヒト由来 Tim4 (hTim4)		マウス由来 Tim4 (mTim4)	
	溶出液	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図17におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14

[0423] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図17に示す。図17において、各レーンは以下の結果を表す。

レーン1：比較例20の結果（Dynabeads protein Gの磁性ビーズのみの担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン2：比較例21の結果（Dynabeads protein Gの磁性ビーズのみの担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン3：実施例84の結果（Dynabeads protein GにhTim1タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン4：実施例85の結果（Dynabeads protein GにhTim1タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン5：実施例86の結果（Dynabeads protein GにmTim1タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶

出液として用いた場合の結果)

レーン6：実施例87の結果 (Dynabeads protein G にmTim1タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン7：実施例88の結果 (Dynabeads protein G にhTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン8：実施例89の結果 (Dynabeads protein G にhTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン9：実施例90の結果 (Dynabeads protein G にmTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン10：実施例91の結果 (Dynabeads protein G にmTim3タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン11：実施例92の結果 (Dynabeads protein G にhTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン12：実施例93の結果 (Dynabeads protein G にhTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン13：実施例94の結果 (Dynabeads protein G にmTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン14：実施例95の結果 (Dynabeads protein G にmTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

図17より、レーン3-14において、バキュロウイルスのマーカートンパク質gp64のバンドが認められていることから、Tim1タンパク質、Tim3タンパク質、又はTim4タンパク質を結合させた担体（Timタンパク質結合担体）を用いることで、Timタンパク質の由来や溶出方法にかかわらずバキュロウイルスを取得可能であることが判った。

また、SDSにより溶出させる場合には、Tim3タンパク質を結合させた担体とTim4タンパク質を結合させた担体が同程度であり、次いでTim1タンパク質を結合させた担体の順でより多くのウイルスを取得できることが判った。

カルシウムイオンキレート剤を用いて溶出させる場合には、Tim3タンパク質を結合させた担体が最も多く、次いでTim1タンパク質を結合させた担体とTim4タンパク質を結合させた担体の順でより多くのウイルスを取得できることが判った。

[0424] 実施例96-99、比較例22-25、Timファミリータンパク質を固定化した担体によるウイルスの取得

以下のように、Timファミリータンパク質として、Tim1タンパク質、Tim2タンパク質、又はTim4タンパク質をそれぞれビーズへ固定化した担体を用いて、本発明に係るウイルスの取得を行った。

[0425] <（1）コトランスフェクション細胞培養上清の調製>

実施例84-95、比較例20-21の「（1）コトランスフェクション細胞培養上清の調製」と同様に行った。

[0426] <（2）カルシウムイオン含有バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプルの調製>

実施例84-95、比較例20-21の「（2）バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプルの調製」と同様の方法でカルシウムイオン含有バキュロウイルス溶液得た。

[0427] <（3）ビーズの洗浄>

30 μ g/ μ L Dynabeads ProteinG（サーモフィッ

シャーサイエンティフィック社製) 含有PBS-T溶液20 μ L (Dynabeads ProteinG 4.8mg含有) を、1.5mLチューブ (ビーエム機器社製) 4本にそれぞれ分注し、それぞれ洗浄操作をした。

[0428] <(4) 6 $\times$ Hisタグ融合型Timファミリータンパク質のビーズへの固定>

実施例80-83及び比較例16-19の「(3) 6 $\times$ Hisタグ融合型Timファミリータンパク質のビーズへの固定」と同様に行い、6 $\times$ Hisタグ融合型mTim1タンパク質結合担体、6 $\times$ Hisタグ融合型mTim2タンパク質結合担体、6 $\times$ Hisタグ融合型mTim4タンパク質結合担体をそれぞれ得た。

各実施例で用いたTimファミリータンパク質及び担体の種類、並びにTimファミリータンパク質 (非) 結合担体の種類を下記表30に示す。

[0429] [表30]

		比較例22	比較例23	実施例96	実施例97	比較例24	比較例25	実施例98	実施例99
Timファミリー タンパク質 結合担体	担体	抗6 $\times$ Hisタグ抗体結合Dynabeads ProteinG担体							
	Tim タンパク質	—	—	6 $\times$ Hisタグ融合型 マウス由来 Tim1タンパク質	6 $\times$ Hisタグ融合型 マウス由来 Tim2タンパク質	6 $\times$ Hisタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質			

[0430] <(5) 本発明の取得方法によるバキュロウイルスの取得>

「カルシウムイオン含有培養上清サンプル200 μ L」の代わりに前記(2)で調製した

「カルシウムイオン含有バキュロウイルス溶液200 μ L」を用いた以外は、実施例80-83及び比較例16-19の「(4) 本発明の取得方法による細胞外膜小胞の取得」と同様の方法で行い、溶出液を得た。

[0431] <(6) ウェスタンブロッティング>

「得られた各溶出液11.25 μ Lに4 $\times$ 試料用緩衝液 (和光純薬工業 (株) 製) 3.75 μ Lを加え」た代わりに「前記(5) 本発明の取得方法によるバキュロウイルスの取得で得られた各溶出液3 μ Lに4 $\times$ 試料用緩衝液

(和光純薬工業(株)製) 1 μ Lを加え」、「ウエスタンブロッティング用の各試料 15 μ L」の代わりに「ウエスタンブロッティング用の各試料 4 μ L」を使用し、「抗L a m p - 1 抗体」の代わりに「抗バキュロウイルス g p 6 4 抗体」を用いた以外は、実施例 8 0 - 8 3 及び比較例 1 6 - 1 9 の「(5) ウエスタンブロッティング」と同様の方法で行った。

尚、各実施例で用いた T i m ファミリータンパク質及び担体の種類、T i m ファミリータンパク質(非)結合担体から細胞外膜小胞を取得するために用いた溶出液の種類、並びにウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表 3 1 に示す。

[0432] [表31]

		比較例22	比較例23	実施例96	実施例97	比較例24	比較例25	実施例98	実施例99
Timファミリー タンパク質 結合担体	担体	抗6×Hisタグ抗体結合Dynabeads ProteinG担体							
	Tim タンパク質	—	—	6×Hisタグ融合型 マウス由来 Tim1タンパク質		6×Hisタグ融合型 マウス由来 Tim2タンパク質		6×Hisタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図18におけるレーン番号		1	2	3	4	5	6	7	8

[0433] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図 1 8 に示す。図 1 8 において、各レーンは以下の結果を示す。

レーン 1 : 比較例 2 2 の結果 (D y n a b e a d s p r o t e i n G に抗 6 × H i s タグ抗体を結合させた担体を用い、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 2 : 比較例 2 3 の結果 (D y n a b e a d s p r o t e i n G に抗 6 × H i s タグ抗体を結合させた担体を用い、1 m M E D T A 含有 T B S 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 3 : 実施例 9 6 の結果 (D y n a b e a d s p r o t e i n G に抗 6 × H i s タグ抗体を介して 6 × H i s タグ融合型 m T i m 1 タンパク質を結合させた担体を用い、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合

の結果)

レーン4：実施例97の結果 (Dynabeads protein G に抗6×Hisタグ抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim1タンパク質を結合させた担体を用い、1 mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン5：比較例24の結果 (Dynabeads protein G に抗6×Hisタグ抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim2タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン6：比較例25の結果 (Dynabeads protein G に抗6×Hisタグ抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim2タンパク質を結合させた担体を用い、1 mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン7：実施例98の結果 (Dynabeads protein G に抗6×Hisタグ抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1% SDS水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン8 実施例99の結果 (Dynabeads protein G に抗6×Hisタグ抗体を介して6×Hisタグ融合型mTim4タンパク質を結合させた担体を用い、1 mM EDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果)

図18より、Tim2タンパク質を結合させた場合は、いずれの溶出法でもバキュロウイルスのマーカータンパク質gp64のバンドは認められなかった(レーン5-6)。一方、Tim1タンパク質、又はTim4タンパク質を結合させた担体は、いずれの溶出法でもgp64のバンドが認められた(レーン3-4、レーン7-8)。

この結果から、Tim2タンパク質を固定化した担体では、バキュロウイルスを取得不可能であることが判った。

[0434] 実施例 100-105, 比較例 26-33, PSタンパク質を用いた ELISA による細胞外膜小胞の検出における感度比較

以下のように、PSタンパク質又はエクソソームの表面マーカータンパク質（以下、「マーカータンパク質」と略記する場合がある）に対する抗体を固定化したプレート（ウェル）及びHRP標識抗CD63抗体を検出抗体に用いたサンドイッチELISAを行い、K562細胞培養上清由来の細胞外膜小胞を検出した。

[0435] <（１）培養上清（原液）の調製>

細胞外膜小胞を分泌するヒト慢性骨髄性白血病株K562細胞 1×10^7 細胞を80mLのX-VIVO15培地（Lonza社製）を用いて37℃、5%CO₂条件下で3日間培養した後、遠心分離処理（300×g、5分間）して細胞を沈殿させ、上清を除去した。沈殿した細胞を、10μMモネンシンナトリウム（MP Biomedicals社製）含有X-VIVO15培地60mLで懸濁後、37℃、5%CO₂条件下で24時間培養した。

その後、培養液を遠心分離処理（300×g、5分間）し、培養上清を回収した。回収した培養上清60mLをさらに3回遠心分離処理（1回目：300×g、3分間、2回目：1200×g、20分間、3回目：10000×g、20分間）して不純物を分離し、上清を得た（以下、「培養上清（原液）」と略記する場合がある）を得た。

[0436] <（２）カルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分希釈系列の調製>

前記（１）で得られた培養上清原液10mLを遠心分離処理（10000×g、20分間）して不純物を分離し、上清を新しいチューブに移して遠心分離処理済みK562細胞培養上清10mLを得た。次いで、得られた遠心分離処理済みK562細胞培養上清10mLを超遠心分離処理（110000×g、70分間）し、上清を除いた後、沈殿にTBSを10mL加え懸濁した。懸濁液を超遠心分離処理（110000×g、70分間）し、上清を除いた後、沈殿にTBSを200μL加え懸濁し、K562細胞培養上清超

遠心沈殿画分を得た。K 5 6 2細胞培養上清超遠心沈殿画分のタンパク質濃度を、プロテインアッセイBCAキット（和光純薬工業（株）製）を用いて当該キットに添付されているプロトコールに従って測定した。タンパク質濃度が125、250、500、1000、2000 ng/mLとなるようにそれぞれ2 mM CaCl₂含有TBSで希釈し、カルシウムイオン含有K 5 6 2細胞培養上清超遠心沈殿画分希釈系列を調製した。

[0437] <（３）HRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体の調製>

抗CD63マウスモノクローナル抗体H5C6（BDバイオサイエンス社製）100 μL（50 μg）を、Peroxidase Labeling Kit-NH₂（（株）同仁化学研究所製）を用いて、当該キットに添付されているプロトコールに従ってHRP標識し、HRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体200 μLを得た。得られた標識体にグリセロール200 μLを添加混合し、HRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体保存液とし-20℃で保存した。HRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体保存液を2 mM CaCl₂含有TBSで2000倍希釈し、HRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体希釈液を調製した。

[0438] <（４）PSタンパク質及び抗マーカートンパク質抗体の固定化溶液の調製>

以下の通りに、各種PSタンパク質及び抗マーカートンパク質抗体の固定化溶液を調製した。抗CD9マウスモノクローナル抗体M-L13（BDバイオサイエンス社製）16 μL（8 μg）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液784 μLを混合し、抗CD9抗体固定化溶液800 μLを調製した。抗CD63マウスモノクローナル抗体H5C6（BDバイオサイエンス社製）16 μL（8 μg）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液784 μLを混合し、抗CD63抗体固定化溶液800 μLを調製した。抗CD81マウスモノクローナル抗体JS-81（BDバイオサイエンス社製）16 μL（8 μg）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液784 μLを混合し、抗CD81抗体固定化溶液800 μLを調製した。Hisタグ融合型マ

ウスMFG-E8タンパク質（R&Dシステムズ社製）80 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液720 μ Lを混合し、mMFG-E8固定化溶液800 μ Lを調製した。Hisタグ融合型ヒトMFG-E8タンパク質（R&Dシステムズ社製）80 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液720 μ Lを混合し、hMFG-E8固定化溶液800 μ Lを調製した。Hisタグ融合型ヒトAnnexin Vタンパク質（Creative BioMart社製）40 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液760 μ Lを混合し、hAnnexin V固定化溶液800 μ Lを調製した。Fcタグ融合型マウスTim1タンパク質（和光純薬工業（株）製）32 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液768 μ Lを混合し、mTim1固定化溶液800 μ Lを調製した。Hisタグ融合型マウスTim2タンパク質（R&Dシステムズ社製）80 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液720 μ Lを混合し、mTim2固定化溶液800 μ Lを調製した。Fcタグ融合型マウスTim3タンパク質（和光純薬工業（株）製）32 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液768 μ Lを混合し、mTim3固定化溶液800 μ Lを調製した。Fcタグ融合型mTim4タンパク質（和光純薬工業（株）製）32 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液768 μ Lを混合し、mTim4固定化溶液800 μ Lを調製した。Fcタグ融合型ヒトTim1タンパク質（和光純薬工業（株）製）32 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液768 μ Lを混合し、hTim1固定化溶液800 μ Lを調製した。Fcタグ融合型ヒトTim3タンパク質（和光純薬工業（株）製）32 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液768 μ Lを混合し、hTim3固定化溶液800 μ Lを調製した。Fcタグ融合型ヒトTim4タンパク質（和光純薬工業（株）製）32 μ L（8 μ g）と50 mM MOPS（pH 7.5）溶液768 μ Lを混合し、hTim4固定化溶液800 μ Lを調製した。

[0439] <（5）ELISA測定>

Immuno-plate Maxisorp C96 (Nunc社製) にPSタンパク質の固定化溶液又は抗マーカータンパク質抗体の固定化溶液を1ウェルあたり100 μ Lずつタンパク質1種について6ウェルに分注し、8 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。分注液を除去した後、ブロッキング溶液(25%ブロッケーヌ含有TBS)を各ウェルに300 μ Lずつ添加し、プレートミキサーを用いて500rpmで混合しながら室温で1時間反応した。ブロッキング溶液を除去した後、得られた各PSタンパク質又は抗マーカータンパク質抗体を固定化したウェルに対してタンパク質濃度がそれぞれ125、250、500、1000、2000ng/mLであるカルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分希釈系列各100 μ Lをそれぞれ1ウェルずつ5ウェルに、ブランクとして2mMCaCl₂含有TBS 100 μ Lを1ウェルにそれぞれ添加し、プレートミキサーを用いて500rpmで混合しながら室温で1時間反応した。2mMCaCl₂含有TBS-T 300 μ Lで3回洗浄した後、HRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体希釈液100 μ Lを各ウェルに添加し、プレートミキサーを用いて500rpmで混合しながら室温で1時間反応した。2mMCaCl₂含有TBS-T 300 μ Lで5回洗浄した後、TMB溶液(和光純薬工業(株)製)100 μ Lを各ウェルに添加し、室温で30分間静置反応した。1M HCl 100 μ Lを添加して反応を停止させた後、マイクロプレートリーダーTecan Ultra (Tecan社製)で450nmの吸光度を測定した。

尚、各実施例、比較例でプレートに固定化したタンパク質及び検出の可否(結果)を下記表32に示す。

[0440]

[表32]

	比較例26	比較例27	比較例28	比較例29	比較例30	比較例31	比較例32
プレートに固定化したタンパク質	—	Anti-CD9	Anti-CD63	Anti-CD81	Hisタグ融合型マウス由来MFG-E8	Hisタグ融合型ヒト由来MFG-E8	Hisタグ融合型ヒト由来Annexin V
検出の可否	×	△	△	△	△	△	△
図19におけるレーンの名称	Blank	Anti-CD9	Anti-CD63	Anti-CD81	mMFG-E8	hMFG-E8	hAnnexin V

	実施例100	比較例33	実施例101	実施例102	実施例103	実施例104	実施例105
プレートに固定化したタンパク質	Fcタグ融合型マウス由来Tim1タンパク質	Hisタグ融合型マウス由来Tim2タンパク質	Fcタグ融合型マウス由来Tim3タンパク質	Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質	Fcタグ融合型ヒト由来Tim1タンパク質	Fcタグ融合型ヒト由来Tim3タンパク質	Fcタグ融合型ヒト由来Tim4タンパク質
検出の可否	○	△	○	◎	○	○	◎
図19におけるレーンの名称	mTim1	mTim2	mTim3	mTim4	hTim1	hTim3	hTim4

[0441] <結果>

得られたELISA測定の結果を図19に示す。図19はPSタンパク質又は抗マーカータンパク質抗体を固定化したウェルにおける、カルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分の各タンパク質濃度希釈系列に含まれるエクソソームに対し結合したHRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体由来の検出シグナル（450nmの吸光度）をそれぞれあらわす。横軸はウェルに固定化したPSタンパク質又は抗マーカータンパク質抗体の種類を表し、同じPSタンパク質等を固定化したウェルについての検出結果においては用いたカルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分中のタンパク質濃度が左から順に0、125、250、500、1000、2000ng/mLである。また、縦軸はK562細胞培養上清超遠心沈殿画分の各タンパク質濃度希釈系列に含まれるエクソソームに対し結合したHRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体由来の検出シグナルを表す。

Tim1タンパク質、Tim3タンパク質、又はTim4タンパク質をそれぞれ固定化したウェルでは、抗マーカータンパク質抗体である抗CD9抗体、抗CD63抗体又は抗CD81抗体をそれぞれ固定化したウェル、PSタンパク質であるMFG-E8、Annexin Vを固定化したウェル、Timファミリータンパク質であるTim2タンパク質を固定化したウェル

に比べ（比較例 27-33）高感度に細胞外膜小胞を検出できた（実施例 100-105）。即ち、従来法に比べ本発明に係る Tim タンパク質を用いる本発明の検出方法は高感度に細胞外膜小胞を検出できることが判った。とりわけ、Tim タンパク質のうち、Tim4 タンパク質を用いると特に高感度に細胞外膜小胞を検出できることが判った。

[0442] 実施例 106-109. Tim タンパク質の固定化方法の違いによる ELISA による細胞外膜小胞の検出における感度比較

以下のように、Tim1 タンパク質又は Tim4 タンパク質をそれぞれ直接プレートに固定化した場合と、SH 基をビオチン標識した Tim1 タンパク質又は SH 基をビオチン標識した Tim4 タンパク質を、ストレプトアビジンを介してプレートにそれぞれ固定化した場合との細胞外膜小胞の検出感度を比較した。

[0443] <（1）K562 細胞培養上清超遠心沈殿画分の調製>

「タンパク質濃度が 125、250、500、1000、2000 ng/mL となるようにそれぞれ 2 mM CaCl₂ 含有 TBS で希釈した」代わりに「タンパク質濃度が 500、1000 ng/mL となるように 2 mM CaCl₂ 含有 TBS でそれぞれ希釈」した以外は、実施例 100-105 及び比較例 26-33 の「（2）カルシウムイオン含有 K562 細胞培養上清超遠心沈殿画分の調製」と同様の方法により、カルシウムイオン含有 K562 細胞培養上清超遠心沈殿画分希釈系列を調製した。

[0444] <（2）HRP 標識抗 CD63 マウスモノクローナル抗体の調製>

実施例 100-105 及び比較例 26-33 の「（3）HRP 標識抗 CD63 マウスモノクローナル抗体の調製」と同様の方法により、HRP 標識抗 CD63 マウスモノクローナル抗体希釈液を調製した。

[0445] <（3）Tim1 タンパク質及び Tim4 タンパク質のビオチン標識・固定化溶液の調製>

Fc タグ融合型マウス由来 Tim1 タンパク質（和光純薬工業（株）製）40 μL（10 μg）及び Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質（

和光純薬工業（株）製） $40\mu\text{L}$ （ $10\mu\text{g}$ ）を、Biotin Labeling Kit-SH（（株）同仁化学研究所製）を用いて、当該キットに添付されているプロトコールに従ってそれぞれビオチン標識し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質及びSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を得た。SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質及びSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質のタンパク質濃度を、プロテインアッセイBCAキット（和光純薬工業（株）製）を用いて当該キットに添付されているプロトコールに従ってそれぞれ測定した。タンパク質濃度が $5\mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにTBSで希釈し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質及びSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質溶液をそれぞれ調製した。

Fcタグ融合型マウス由来Tim1タンパク質（和光純薬工業（株）製）又はFcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（和光純薬工業（株）製） $8\mu\text{L}$ （ $2\mu\text{g}$ ）と 50mM MOPS（ $\text{pH}7.5$ ）溶液 $392\mu\text{L}$ を混合し、mTim1タンパク質固定化溶液又はmTim4タンパク質固定化溶液 $400\mu\text{L}$ をそれぞれ調製した。

また、ストレプトアビジン（和光純薬工業（株）製） $2\mu\text{L}$ （ $10\mu\text{g}$ ）と 50mM MOPS（ $\text{pH}7.5$ ）溶液 $998\mu\text{L}$ を混合し、ストレプトアビジン固定化溶液 $1000\mu\text{L}$ を調製した。

[0446] <（４）固定化>

Immuno-plate Maxisorp C96（Nunc社製）に各タンパク質固定化溶液を1ウェルあたり $100\mu\text{L}$ （ $0.5\mu\text{g}$ ）ずつ3ウェルに添加し、 8°C で一晩静置した。添加液を除去した後、ブロッキング溶液（ 25% ブロックエース含有TBS）を各ウェルに $300\mu\text{L}$ ずつ添加し、プレートミキサーを用いて 500rpm で混合しながら室温で1時間反応させた。

また、Immuno-plate Maxisorp C96（Nunc

社製) にストレプトアビジン固定化溶液を1ウェルあたり100 μ Lずつ6ウェルに添加し、8℃で一晩静置した。添加液を除去した後、ブロッキング溶液(25%ブロッカー含有TBS)を各ウェルに300 μ Lずつ添加し、プレートミキサーを用いて500 rpmで混合しながら室温で1時間反応した。ブロッキング溶液を除去した後、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim1タンパク質及びSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質溶液を1ウェルあたり100 μ L(0.5 μ g)ずつ3ウェルに添加し、プレートミキサーを用いて500 rpmで混合しながら室温で1時間反応させた。

[0447] <(5) ELISA測定>

「各PSタンパク質又はマーカータンパク質を固定化したウェルに対してタンパク質濃度がそれぞれ125、250、500、1000、2000 ng/mLであるカルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分希釈系列各100 μ Lをそれぞれ1ウェルずつ5ウェルに」それぞれ添加した代わりに「各タンパク質固定化ウェルに対してタンパク質濃度が500又は1000 ng/mLであるカルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分希釈系列各100 μ Lをそれぞれ1ウェルずつ2ウェルに」それぞれ添加した以外は、実施例100-105及び比較例26-33と同様の方法により、ELISA測定を行った。

尚、各実施例、比較例でプレートに固定化したタンパク質、プレートへのタンパク質の固定化方法、及び検出の可否(結果)を下記表33に示す。表33中の検出の可否は、それぞれ実施例106と107、実施例108と109との比較である。

[0448]

[表33]

	実施例106	実施例107	実施例108	実施例109
固定化 タンパク質	Fcタグ融合型 マウス由来 Tim1 タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim1 タンパク質	Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4 タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4 タンパク質
固定化方法	直接固定化	ビオチン-ストレプトア ビジン結合	直接固定化	ビオチン-ストレプトア ビジン結合
検出の可否	○	◎	○	◎
図20における 列の名称	mTim1	bmTim1/SA	mTim4	bmTim4/SA

得られたELISA測定の結果を図20に示す。図20はmTim1タンパク質を直接プレートに固定化したウェル、mTim4タンパク質を直接プレートに固定化したウェル、mTim1タンパク質をビオチン-ストレプトアビジン結合により固定化したウェル、及びmTim4タンパク質をビオチン-ストレプトアビジン結合により固定化したウェルにおける、カルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分の各タンパク質濃度希釈系列に含まれるエクソソームに結合するHRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体由来の検出シグナル（450nmの吸光度）をあらわす。

横軸はウェルに固定化したTimタンパク質の種類を表す。また、縦軸はカルシウムイオン含有K562細胞培養上清超遠心沈殿画分の各タンパク質濃度希釈系列に含まれるエクソソームに対し結合したHRP標識抗CD63マウスモノクローナル抗体由来の検出シグナルを表す。

図20より、Tim1タンパク質又はTim4タンパク質を用いたELISAによれば、プレートに対するTimタンパク質の固定化方法にかかわらず、試料中の細胞外膜小胞を検出できることが判った（実施例106-109）。とりわけ、Timタンパク質を直接固定化したウェル（mTim1をプレートに直接固定化した実施例106）及びmTim4をプレートに直接固定化した固定化した実施例108）に比べ、Timタンパク質を、ストレプトアビジンを介して固定化したウェル（mTim1のSH基のビオチンと

ストレプトアビジンとの結合によってプレートとT i mタンパク質とを結合させた実施例107及びmT i m4のSH基のビオチンとストレプトアビジンとの結合によってプレートとT i mタンパク質とを結合させた実施例109)では高感度に細胞外膜小胞を検出できた。

よって、T i mタンパク質と固相との結合様式としては、T i mタンパク質のSH基のビオチンとストレプトアビジンとの結合によってプレートとT i mタンパク質とを結合させる場合がより好ましいことが判った。

[0449] 実施例110-115. 比較例34-39. PSタンパク質を用いたELISAによるウィルスの検出における感度比較

以下のように、各種PSタンパク質又はバキュロウィルスの表面マーカータンパク質gp64に対する抗体を固定化したプレート及びHRP標識抗gp64抗体を検出抗体に用いたサンドイッチELISAを行い、バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清サンプル中のバキュロウィルスを検出した。

[0450] <(1) コトランスフェクション細胞培養上清の調製>

実施例84-95、比較例20-21の「(1) コトランスフェクション細胞培養上清の調製」と同様に行った。

[0451] <(2) カルシウムイオン含有バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清サンプルの調製>

実施例84-95、比較例20-21の「(2) バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清サンプルの調製」と同様に行いカルシウムイオン含有バキュロウィルス溶液を得た。

[0452] <(3) バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清サンプル希釈系列の調製>

バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清サンプル50 μ LとPSFM-J1培地4950 μ Lを混合し100倍希釈液を調製し、100倍希釈液2.0mLとPSFM-J1培地2.0mLを混合し200倍希釈液4.0mLを調製し、200倍希釈液2.0mLとPSFM-J1培地2.0mLを混合し400倍希釈液を4.0mL調製し、400倍希釈液2.0mLとPSFM-J1培地2.0mLを混合し800倍希釈液4.0mLを調製した。

[0453] < (4) HRP標識抗gp64マウスモノクローナル抗体の調製 >

抗gp64マウスモノクローナル抗体AcV1 (Novus Biologicals社製) 200 μ L (100 μ g) を、Peroxidase Labeling Kit-NH₂ ((株) 同仁化学研究所製) を用いて、当該キットに添付されているプロトコールに従ってHRP標識し、HRP標識抗gp64マウスモノクローナル抗体溶液200 μ Lを得た。HRP標識抗gp64マウスモノクローナル抗体溶液を2 mM CaCl₂ 含有TBSで1000倍希釈し、HRP標識抗gp64マウスモノクローナル抗体希釈液を調製した。

[0454] < (5) PSタンパク質及び抗gp64抗体の固定化溶液の調製 >

以下の通りに、各種PSタンパク質及びマーカータンパク質の固定化溶液をそれぞれ調製した。抗gp64マウスモノクローナル抗体AcV1 (Novus Biologicals社製) 12 μ L (6 μ g) と50 mM MOPS (pH 7.5) 溶液588 μ Lを混合し、抗gp64抗体固定化溶液600 μ Lを調製した。Hisタグ融合型マウス由来MFG-E8タンパク質 (R&Dシステムズ社製) 60 μ L (6 μ g) と50 mM MOPS (pH 7.5) 溶液540 μ Lを混合し、mMFG-E8固定化溶液600 μ Lを調製した。Hisタグ融合型ヒト由来MFG-E8タンパク質 (R&Dシステムズ社製) 60 μ L (6 μ g) と50 mM MOPS (pH 7.5) 溶液540 μ Lを混合し、hMFG-E8固定化溶液600 μ Lを調製した。Hisタグ融合型ヒト由来Annexin Vタンパク質 (Creative BioMart社製) 30 μ L (6 μ g) と50 mM MOPS (pH 7.5) 溶液570 μ Lを混合し、hAnnexin V固定化溶液600 μ Lを調製した。Fcタグ融合型マウス由来Tim1タンパク質 (和光純薬工業(株) 製) 24 μ L (6 μ g) と50 mM MOPS (pH 7.5) 溶液576 μ Lを混合し、mTim1固定化溶液600 μ Lを調製した。Hisタグ融合型マウス由来Tim2タンパク質 (R&Dシステムズ社製) 60 μ L (6 μ g) と50 mM MOPS (pH 7.5) 溶液540 μ Lを混合し、

mTim2固定化溶液600 μ Lを調製した。Fcタグ融合型マウス由来Tim3タンパク質（和光純薬工業（株）製）24 μ L（6 μ g）と50mM MOPS（pH7.5）溶液576 μ Lを混合し、mTim3固定化溶液600 μ Lを調製した。Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（和光純薬工業（株）製）24 μ L（6 μ g）と50mM MOPS（pH7.5）溶液576 μ Lを混合し、mTim4固定化溶液600 μ Lを調製した。Fcタグ融合型ヒト由来Tim1タンパク質（和光純薬工業（株）製）24 μ L（6 μ g）と50mM MOPS（pH7.5）溶液576 μ Lを混合し、hTim1固定化溶液600 μ Lを調製した。Fcタグ融合型ヒト由来Tim3タンパク質（和光純薬工業（株）製）24 μ L（6 μ g）と50mM MOPS（pH7.5）溶液576 μ Lを混合し、hTim3固定化溶液600 μ Lを調製した。Fcタグ融合型ヒト由来Tim4タンパク質（和光純薬工業（株）製）24 μ L（6 μ g）と50mM MOPS（pH7.5）溶液576 μ Lを混合し、hTim4固定化溶液600 μ Lを調製した。

[0455] <（6）ELISA測定>

Immuno-plate Maxisorp C96（Nunc社製）にPSタンパク質又は抗gp64抗体の固定化溶液を1ウェルあたり100 μ Lずつタンパク質1種について5ウェルに分注し、8℃で一晩静置した。分注液を除去した後、ブロッキング溶液（25%ブロックエース含有TBS）を各ウェルに300 μ Lずつ添加し、プレートミキサーを用いて500rpmで混合しながら室温で1時間反応した。ブロッキング溶液を除去した後、得られた各PSタンパク質又は抗gp64抗体を固定化したウェルに対して、前記（3）で調製したカルシウムイオン含有バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清サンプル希釈系列（100倍希釈、200倍希釈、400倍希釈、800倍希釈）各100 μ Lをそれぞれ1ウェルずつ4ウェルに、blankとしてPMSF-J1培地100 μ Lを1ウェルにそれぞれ添加し、プレートミキサーを用いて500rpmで混合しながら室温で1時間反応し

た。2 mM CaCl₂ 含有 TBS-T 300 μL で3回洗浄した後、HRP 標識抗 gp64 マウスモノクローナル抗体希釈液 100 μL を各ウェルに添加し、プレートミキサーを用いて 500 rpm で混合しながら室温で1時間反応した。2 mM CaCl₂ 含有 TBS-T 300 μL で5回洗浄した後、TMB 溶液（和光純薬工業（株）製）100 μL を各ウェルに添加し、室温で30分間静置反応した。1 M HCl 100 μL を添加して反応を停止させた後、マイクロプレートリーダー Tecan Ultra（Tecan 社製）で 450 nm の吸光度を測定した。

尚、各実施例、比較例でプレートに固定化したタンパク質及び検出の可否（結果）を下記表 34 に示す。

[0456] [表34]

	比較例34	比較例35	比較例36	比較例37	比較例38	実施例110
プレートに固定化したタンパク質	-	抗gp64抗体	Hisタグ融合型マウス由来 MFG-E8	Hisタグ融合型ヒト由来 MFG-E8	Hisタグ融合型ヒト由来 AnnexinV	Fcタグ融合型マウス由来 Tim1 タンパク質
検出の可否	×	△	△	△	△	○
図21におけるレーンの名称	Blank	Anti-gp64	mMFG-E8	hMFG-E8	hAnnexinV	mTim1

	比較例39	実施例111	実施例112	実施例113	実施例114	実施例115
プレートに固定化したタンパク質	Hisタグ融合型マウス由来 Tim2 タンパク質	Fcタグ融合型マウス由来 Tim3 タンパク質	Fcタグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質	Fcタグ融合型ヒト由来 Tim1 タンパク質	Fcタグ融合型ヒト由来 Tim3 タンパク質	Fcタグ融合型ヒト由来 Tim4 タンパク質
検出の可否	△	○	◎	○	○	◎
図21におけるレーンの名称	mTim2	mTim3	mTim4	hTim1	hTim3	hTim4

[0457] <結果>

得られた ELISA 測定の結果を図 21 に示す。図 21 は各種 PS タンパク質及び抗 gp64 抗体を固定化したウェルにおける、カルシウムイオン含有バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清の各希釈系列に含まれるエクソソームに対し結合した HRP 標識抗 gp64 マウスモノクローナル抗体由来の検出シグナル（450 nm の吸光度）をそれぞれあらわす。横軸はウェルに固定化した PS タンパク質又は抗マーカータンパク質抗体の種類を表し、同じ PS タンパク質等を固定化したウェルについての検出結果においては左か

ら順にブランク、用いたカルシウムイオン含有バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプル希釈系列がそれぞれ800倍希釈、400倍希釈、200倍希釈、100倍希釈を表す。また、縦軸はHRP標識抗gp64マウスモノクローナル抗体由来の検出シグナル（450nmの吸光度）を表す。

Tim1タンパク質、Tim3タンパク質、又はTim4タンパク質をそれぞれ固定化したウェルでは、バキュロウイルスの表面マーカータンパク質である抗gp64抗体を固定化したウェル、PSタンパク質であるMFG-E8、Annexin Vを固定化したウェル、Timファミリータンパク質であるTim2タンパク質を固定化したウェルに比べ（比較例34-39）高感度にウイルスを検出できた（実施例110-115）。即ち、従来法に比べ本発明に係るTimタンパク質を用いる本発明の検出方法は高感度にウイルスを検出できることが判った。とりわけ、Timタンパク質のうち、Tim4タンパク質を用いると特に高感度にウイルスを検出できることが判った。

[0458] 実施例116-119. Timタンパク質を固定化した担体によるウイルスの取得

ビオチン標識したTim4タンパク質を固定化した担体を用いて、本発明に係るウイルスの取得を行った。

[0459] <（1）コトランスフェクション細胞培養上清の調製>

実施例84-95、比較例20-21の「（1）コトランスフェクション細胞培養上清の調製」と同様に行った。

[0460] <（2）カルシウムイオン含有バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプルの調製>

実施例84-95、比較例20-21の「（2）バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプルの調製」と同様に行い、カルシウムイオン含有バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプルを得た。

[0461] <（3）バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプル希釈液の調製>

カルシウムイオン含有バキュロウイルス含有昆虫細胞培養上清サンプル1

00 μ L と P S F M-J 1 培地 800 μ L を混合し 9 倍希釈液 900 μ L を調製した。

[0462] < (4) T i m 4 タンパク質の S H 基ビオチン標識 >

F c タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質 (和光純薬工業 (株) 製) 含有 P B S 溶液 100 μ L (F c タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質 10 μ g 含有) を、ビオチン化標識用キット-S H (同仁化学研究所製) を用いて、当該キットに添付されているプロトコールにしたがって F c タグ融合型マウス由来 T i m 4 タンパク質の S H 基をビオチン標識し、S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質含有 P B S 溶液 100 μ L を得た。

[0463] < (5) タグ融合 T i m タンパク質の希釈 >

F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質 (和光純薬工業 (株) 製) 含有 P B S 溶液 5 μ L (F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質 0.5 μ g 含有) を、T B S 95 μ L と混合し、ビオチン非標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質を 0.5 μ g 含有する溶液 100 μ L を得た。

前記 (4) で調製した S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質含有 T B S 溶液 5 μ L (S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質 0.5 μ g 含有) を T B S 95 μ L と混合し、ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質を 1 μ g 含有する溶液 100 μ L を得た。

[0464] < (6) ビーズの洗浄 >

30 μ g / μ L D y n a b e a d s P r o t e i n G (サーモフィッシャーサイエンティフィック社製) 含有 P B S-T 溶液 5 μ L (D y n a b e a d s P r o t e i n G 0.3mg 含有) を、1.5mL チューブ (ビーエム機器社製) に移し、T B S-T (T B S、0.0005% T w e e n 20) 500 μ L を用いて 2 回洗浄した後、チューブを磁気スタンドにセットし、洗浄液を除いた。

また、M a g C a p t u r e T a m a v i d i n 2-RE V (和光純薬

工業（株）製）含有PBS溶液30 μ L（ビーズ 0.3mg含有）を、1.5mLチューブ（ビーエム機器社製）に移し、TBS-T（TBS、0.0005% Tween 20）500 μ Lを用いて2回洗浄した後、チューブを磁気スタンドにセットし、洗浄液を除いた。

[0465] <（7）Timタンパク質のビーズへの固定>

洗浄操作後のペレット状態のDynabeads Protein G 0.3mgを含有する1.5mLチューブに、SH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を0.5 μ g含有する溶液100 μ Lを添加して、サーモミキサーを用いて8℃で1200rpm 1時間反応させ、SH基ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4が結合した担体（「ビオチン非標識Fcタグ融合型mTim4担体」と略記する場合がある）を得た。

また、洗浄操作後のMagCapture Tamavidin 2-REV 0.3mgを含有する1.5mLチューブに、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を0.5 μ g含有する溶液100 μ Lを加え、前記と同様にビーズに結合させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4が結合した担体（「ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4担体」と略記する場合がある）を得た。

尚、これらの得られた2種類の担体をまとめて「Timタンパク質結合担体」と略記する場合がある。

[0466] <（8）本発明の取得方法によるバキュロウィルスの取得>

前記で得られたこれらのTimタンパク質結合担体をTBS-T（TBS、0.0005% Tween 20）250 μ Lで3回洗浄操作し、ペレット状態のTimタンパク質結合担体を得た。次いで、得られた2種類のペレット状態のTimタンパク質結合担体に、前記（3）で調製したカルシウムイオン含有バキュロウィルス含有昆虫細胞培養上清サンプル希釈液100 μ Lをそれぞれ加え、サーモミキサーを用いて8℃で1200rpm 12時間反応させた。その後、反応後のTimタンパク質結合担体を、カルシウムイオン含有TBS-T（Tris buffer、0.0005% Twe

e n 2 0、2 m M C a C l₂) 2 5 0 μ L でそれぞれ3回洗浄操作した。3回目の洗浄操作の時に、T i mタンパク質結合担体を含むC a C l₂含有T B S-T溶液2 5 0 μ Lを1 2 5 μ Lずつ1. 5 m Lチューブ2本にそれぞれ分注し、チューブを磁気スタンドにセットした後、洗浄液を除いた。

ペレット状態の2種類のT i mタンパク質結合担体0. 1 5 m gにそれぞれ溶出液として1 % S D S水溶液を5 0 μ L、又は1 m M E D T A含有T B S溶液を2 5 μ L添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で1 0秒間混合し、スピンドウンした。E D T Aを添加したチューブには再度1 m M

E D T A含有T B S溶液を2 5 μ L添加し、同様の操作を行い、溶出液を得た。

尚、各実施例で用いたT i mタンパク質及び担体の種類、並びにT i mタンパク質（非）結合担体の種類を下記表3 5に示す。

[0467] [表35]

		実施例			
		116	117	118	119
Tim タンパク質 結合担体	担体	Dynabeads protein G	Dynabeads protein G	MagCapture Tamavidin REV-2	MagCapture Tamavidin REV-2
	Tim タンパク質	ビオチン非標識 マウス由来 Tim4 タンパク質	ビオチン非標識 マウス由来 Tim4 タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質

[0468] <（9）ウエスタンブロッティング>

「得られた各溶出液1 1. 2 5 μ Lに4 ×試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製）3. 7 5 μ Lを加え」た代わりに「前記（8）本発明の取得方法によるバキュロウイルスの取得で得られた各溶出液1 5 μ Lに4 ×試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製）1 5 μ Lを加え」、「抗L a m p-1抗体」の代わりに「抗バキュロウイルスg p 6 4抗体」を用いた以外は、実施例8 0-8 3及び比較例1 6-1 9の「（5）ウエスタンブロッティング」と同様の方法で行った。

尚、各実施例で用いたT i mタンパク質及び担体の種類、T i mタンパク

質結合担体からウイルスを取得するために用いた溶出液の種類、並びにウエスタンブロッティングにおけるレーン番号を下記表 3 6 に示す。

[0469] [表36]

		実施例			
		116	117	118	119
Tim タンパク質 結合担体	担体	Dynabeads protein G	Dynabeads protein G	MagCapture Tamavidin REV-2	MagCapture Tamavidin REV-2
	Tim タンパク質	ビオチン非標識 マウス由来 Tim4 タンパク質	ビオチン非標識 マウス由来 Tim4 タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質
溶出液		1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図22におけるレーン番号		1	2	3	4

[0470] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図 2 2 に示す。図 2 2 において、各レーンは以下の結果である。

レーン 1 : 実施例 1 1 6 の結果 (D y n a b e a d s p r o t e i n G に S H 基ビオチン非標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質を結合させた担体を用い、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 2 : 実施例 1 1 7 の結果 (D y n a b e a d s p r o t e i n G に S H 基ビオチン非標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質を結合させた担体を用い、1 m M E D T A 含有 T B S 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 3 : 実施例 1 1 8 の結果 (M a g C a p t u r e T a m a v i d i n R E V - 2 に S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質を結合させた担体を用い、1 % S D S 水溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 4 : 実施例 1 1 9 の結果 (M a g C a p t u r e T a m a v i d i n R E V - 2 に S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質を結合させた担体を用い、1 m M E D T A 含有 T B S 溶液を溶出液として

用いた場合の結果)

図22より、レーン1-4において、いずれの場合でもバキュロウィルスのマーカートンパク質であるgp64のバンドが認められたことから、SH基ビオチン非標識又は標識Tim4を結合させた担体を用いることで、ウィルスを取得可能であることが判った。

また、レーン2とレーン4の比較から、カルシウムキレート剤により溶出させる場合には、Timタンパク質のSH基を介してビーズ(担体)に固定化させることで、タグを介して固定化させるよりも多くのウィルスを取得できることが判った。

[0471] 実施例120-121. 比較例40-41. フローサイトメーターによる細胞外膜小胞の検出感度比較

以下のように、Tim4タンパク質又はエクソソームの表面マーカートンパク質のCD63に対する抗体を固定化した担体及び検出抗体としてPE標識抗CD63抗体を用いて、K562細胞培養上清由来の細胞外膜小胞をフローサイトメーターにより検出した。

[0472] <(1) カルシウムイオン含有培養上清(原液)の調製>

細胞外膜小胞を分泌するヒト慢性骨髓性白血病株K562細胞 1×10^7 細胞を80mLのX-VIVO15培地(Lonza社製)を用いて37℃、5%CO₂条件下で3日間培養した後、遠心分離処理(300×g、5分間)して細胞を沈殿させ、上清を除去した。沈殿した細胞を、10μMモネンシンナトリウム(MP Biomedicals社製)含有X-VIVO15培地60mLで懸濁後、37℃、5%CO₂条件下で24時間培養した。

その後、培養液を遠心分離処理(300×g、5分間)し、培養上清を回収した。回収した培養上清60mLをさらに3回遠心分離処理(1回目: 300×g、3分間、2回目: 1200×g、20分間、3回目: 10000×g、20分間)して不純物を分離し、上清を得た(以下、「培養上清(原液)」と略記する場合がある)を得た。

また、得られた培養上清原液に終濃度が2mMとなるようにCaCl₂を添

加し、 2 mM CaCl_2 含有 K562 細胞培養上清濃縮液サンプル（以下、「カルシウムイオン含有培養上清（原液）」と略記する場合がある）を得た。

[0473] <（２）培養上清サンプル希釈液の調製>

前記で得られたカルシウムイオン含有培養上清（原液） $500\text{ }\mu\text{L}$ と X-VIVO15 培地 $500\text{ }\mu\text{L}$ を混合し 2 倍希釈液を 1.0 mL 調製し、2 倍希釈液 $200\text{ }\mu\text{L}$ と X-VIVO15 培地 $800\text{ }\mu\text{L}$ を混合し 10 倍希釈液 1.0 mL を調製し、カルシウムイオン含有培養上清 2 倍希釈液（原液）とカルシウムイオン含有培養上清 10 倍希釈液（原液）をそれぞれ得た。

[0474] <（３）Tim4 タンパク質の SH 基ビオチン標識>

Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質（和光純薬工業（株）製）含有 PBS 溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$ （Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質 $10\text{ }\mu\text{g}$ 含有）を、ビオチン化標識用キット-SH（同仁化学研究所製）を用いて、当該キットに添付されているプロトコールにしたがって Fc タグ融合型マウス由来 Tim4 タンパク質の SH 基をビオチン標識し、SH 基ビオチン標識 Fc タグ融合型 mTim4 タンパク質含有 PBS 溶液 $100\text{ }\mu\text{L}$ を得た。

[0475] <（５）ビーズの洗浄>

Exosome-Streptavidin Isolation/Detection Reagent（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）（Dynabeads Streptavidin $4.5\text{ }\mu\text{m}$ $1\times 10^7/\text{mL}$ 含有） $20\text{ }\mu\text{L}$ を、 1.5 mL チューブ（ビーエム機器社製）2 本にそれぞれ分注し、TBS $200\text{ }\mu\text{L}$ を用いて洗浄操作を行った。

Exosome-Human CD63 Isolation/Detection Reagent（サーモフィッシャーサイエンティフィック社製）（Dynabeads Anti-CD63 抗体固定化済み $4.5\text{ }\mu\text{m}$ $1\times 10^7/\text{mL}$ 含有） $20\text{ }\mu\text{L}$ を、 1.5 mL チューブ（ビーエム機器社製）2 本にそれぞれ分注し、TBS $200\text{ }\mu\text{L}$ を用いて洗浄操作を行った。

[0476] < (6) T i m 4 タンパク質のビーズへの固定 >

洗浄操作後のペレット状態の D y n a b e a d s S t r e p t a v i d i n を含有する 1. 5 m L チューブ 2 本に、S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 タンパク質を 0. 1 μ g 含有する溶液 1 0 0 μ L を添加して、サーモミキサーを用いて 8℃ で 1 2 0 0 r p m 3 0 分間反応させ、S H 基ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 が結合した担体（「ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 担体」と略記する場合がある）を含有する溶液（「ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 担体含有溶液」と略記する場合がある）を得た。

[0477] < (7) 細胞外膜小胞との反応 >

前記で得られたビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 担体含有溶液 1 0 0 μ L を磁気スタンドにセットした後、ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 担体含有溶液中の溶液を除いた。ペレット状態のビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 担体及び洗浄操作後のペレット状態の E x o s o m e - H u m a n C D 6 3 I s o l a t i o n / D e t e c t i o n R e a g e n t を 0. 1 % B S A 含有 T B S 2 0 0 μ L で 2 回洗浄し、ペレット状態の担体を得た。次いで、得られたペレット状態の各担体に、前記 (2) で調製したカルシウムイオン含有培養上清 2 倍希釈液（原液）と培養上清 1 0 倍希釈液（原液） 1 0 0 μ L をそれぞれ加え、サーモミキサーを用いて 8℃ で 1 2 0 0 r p m 1 2 時間それぞれ反応させた。その後、反応後の担体を、カルシウムイオン - 0. 1 % B S A 含有 T B S (T B S 、 0. 1 % B S A 、 2 m M C a C l ₂) 3 0 0 μ L で 1 回、カルシウムイオン - 0. 1 % B S A 含有 T B S 4 0 0 μ L でそれぞれ 1 回洗浄操作し、洗浄操作後のペレット状態の各担体をカルシウムイオン - 0. 1 % B S A 含有 T B S (T B S 、 0. 1 % B S A 、 2 m M C a C l ₂) 3 0 0 μ L でそれぞれ懸濁し、下記表 3 7 に記載の 2 種類の担体の懸濁液をそれぞれ得た。

[0478]

[表37]

	1	2
担体	Dynabeads Streptavidin	Exosome-Human CD63 Isolation/Detection Reagent
Tim タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	-

[0479] < (8) PE 標識抗CD63 抗体による検出 >

前記(7)で得られた2種類の担体の懸濁液を100 μ Lずつそれぞれ2本の1.5mLチューブに分注し、磁気分離により担体をペレット状態にした後、PE 標識抗CD63 マウスモノクローナル抗体H5C6 (BDバイオサイエンス社製)又はPE 標識コントロールマウスIgG (BDバイオサイエンス社製)を20 μ Lそれぞれ添加し、サーモミキサーを用いて25℃で1000rpm 1時間それぞれ反応させた。その後、カルシウムイオンと0.1%BSA含有TBS (TBS、0.1% BSA、2mM CaCl₂) 300 μ Lでそれぞれ2回洗浄操作した後、カルシウムイオンと0.1%BSA含有TBS (TBS、0.1% BSA、2mM CaCl₂) 500 μ Lで担体を懸濁した。その後ファルコンセルストレーナー (コーニング社製)で濾過した濾液を回収し、フローサイトメーターGalios (ベックマンコールター社製)で測定及び解析を行った。なお、測定時のレーザー波長は488nmであり、検出波長は575nmである。

尚、各実施例で用いたTimタンパク質、担体の種類、及び試料を下記表38に示す。

[0480]

[表38]

	実施例120	実施例121	比較例40	比較例41
担体	Dynabeads Streptavidin	Dynabeads Streptavidin	Exosome—Human CD63 Isolation/Detection Reagent	Exosome—Human CD63 Isolation/Detection Reagent
Tim タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	SH基ビオチン標識 Fcタグ融合型 マウス由来 Tim4タンパク質	-	-
試料	カルシウムイオン 含有培養上清 2倍希釈液(原液)	カルシウムイオン 含有培養上清 10倍希釈液(原液)	カルシウムイオン 含有培養上清 2倍希釈液(原液)	カルシウムイオン 含有培養上清 10倍希釈液(原液)

[0481] <結果>

得られたフローサイトメーター測定の結果を図23に示す。図23は各倍率で希釈したカルシウムイオン含有培養上清（原液）からビオチン標識Fcタグ融合型mTim4担体と抗CD63抗体担体を用いて捕捉したエクソソームを、PE標識抗CD63マウスモノクローナル抗体で検出したシグナルとPE標識コントロールマウスIgGで検出したノイズの比（Signal/Noise比）をそれぞれあらわす。横軸は使用したカルシウムイオン含有培養上清（原液）の希釈倍率、縦軸はPE標識抗CD63マウスモノクローナル抗体で検出したシグナルとPE標識コントロールマウスIgGで検出したノイズの比をそれぞれ表す。

図23より、本発明に係るTimタンパク質を結合させた担体を用いることで、細胞外膜小胞を検出可能であることが判った。また、抗CD63抗体を固定化した担体を用いるよりもTim4を固定化した担体を用いる方が高いSignal/Noise比（検出感度）でフローサイトメーター測定ができることが示された。即ち、本発明に係るTim担体を用いたフローサイトメーター解析によれば従来法に比べ高感度に細胞外膜小胞を検出できることが判った。

[0482] 実施例122—123、比較例42—43、Timタンパク質を固定化した担体によるウィルスの取得

Timタンパク質を固定化した担体を用いて、本発明に係るウィルスの取

得を行った。

[0483] < (1) Fcタグ融合型mTim4タンパク質のSH基ビオチン標識>

Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質（和光純薬工業（株）製）含有PBS溶液100 μ L（Fcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質10 μ g含有）中のFcタグ融合型マウス由来Tim4タンパク質のSH基を、ビオチン化標識用キットーSH（同仁化学研究所製）を用いて、当該キットに添付されているプロトコールにしたがってビオチン標識し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有PBS溶液100 μ Lを得た。

[0484] < (2) SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質の希釈>

前記（1）で調製したSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質含有TBS溶液10 μ L（SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質1 μ g含有）をTBS190 μ Lと混合し、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lを得た。

[0485] < (3) ビーズの洗浄>

MagCapture Tamavidin2-REV（和光純薬工業（株）製）含有PBS溶液60 μ L（MagCapture Tamavidin2-REV 0.6mg含有）を、2本の1.5mLチューブ（ビーエム機器社製）にそれぞれ移し、TBS-T（TrisBuffer、0.005% Tween20）500 μ Lを用いてそれぞれ2回洗浄した後、チューブを磁気スタンドにセットし、洗浄液を除いた。

[0486] < (4) SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質のビーズへの固定>

洗浄操作後のMagCapture Tamavidin2-REV 0.6mgを含有する2本の1.5mLチューブに、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ L又はTBS200 μ Lを加え、サーモミキサーを用いて8℃で1200rpm 1時

間それぞれ反応させ、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4が結合した担体（「ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4結合担体」と略記する場合がある）とSH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4が結合していない担体（「ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4非結合担体」と略記する場合がある）を得た。尚、ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4結合担体とビオチン標識Fcタグ融合型mTim4非結合担体を合わせて「Timタンパク質（非）結合担体」と略記する場合がある。

[0487] <（５）本発明の取得方法によるインフルエンザウィルスの取得>

前記で得られた２種類のTimタンパク質（非）結合担体をTBS-T（Tris Buffer、0.0005% Tween 20）500 μ Lでそれぞれ３回洗浄操作した。洗浄操作後の２種類のTimタンパク質（非）結合担体に、終濃度2 mMの塩化カルシウムを添加したカルシウムイオン含有のインフルエンザAウィルス溶液（H1N1 A/WS/33 strain）（ATCC Code: VR-825）60 μ Lをそれぞれ加え、サーモミキサーを用いて8℃で1200 rpm 2時間それぞれ反応させた。反応後の２種類のTimタンパク質（非）結合担体を、カルシウムイオン含有TBS-T（Tris buffer、0.0005% Tween 20、2 mM CaCl₂）500 μ Lでそれぞれ３回洗浄操作した。３回目の洗浄操作の後、２種類のTimタンパク質（非）結合担体にカルシウムイオン含有TBS-T（Tris buffer、0.0005% Tween 20、2 mM CaCl₂）500 μ Lをそれぞれ加えて懸濁し、懸濁液500 μ Lをそれぞれ得た。当該懸濁液を250 μ Lずつ1.5 mLチューブ２本にそれぞれ分注し、チューブを磁気スタンドにセットした後、それぞれ洗浄液を除き、ペレット状態のTimタンパク質（非）結合担体をそれぞれ得た。

尚、各実施例及び比較例で用いた担体の種類、及びTimタンパク質の種類を下記表39に示す。

[0488]

[表39]

	比較例42	比較例43	実施例122	実施例123
担体	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV
Tim タンパク質	-	-	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質

[0489] 得られたペレット状態のTimタンパク質（非）結合担体0.3mgを含有する4本の1.5mLチューブのうち、Timタンパク質結合担体を含有する1.5mLチューブ1本及びTimタンパク質非結合担体を含有する1.5mLチューブ1本については、溶出液として1%SDS水溶液をそれぞれ20 μ L添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンし溶出液をそれぞれ得た。

また、当該ペレット状態のTimタンパク質（非）結合担体0.3mgを含有する4本の1.5mLチューブのうち、Timタンパク質結合担体を含有する1.5mLチューブ1本及びTimタンパク質非結合担体を含有する1.5mLチューブ1本については、溶出液として50mM EDTA含有TBS溶液をそれぞれ10 μ L添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンした。スピンドウン後のチューブにそれぞれ再度50mM EDTA含有TBS溶液を10 μ L添加した後、ボルテックスミキサーにより室温で10秒間混合し、スピンドウンし溶出液をそれぞれ得た。

得られた4種類の溶出液20 μ Lにそれぞれ10% β -プロピオラクトン含有TBS溶液 2.2 μ Lを添加して、ボルテックスミキサーで混合後、氷上で3時間静置し、4種類の β -プロピオラクトン処理済溶出液22.2 μ Lをそれぞれ得た。

[0490] <（6）ウエスタンブロッティング>

前記カルシウムイオン含有のインフルエンザAウィルス溶液（H1N1 A/WS/33 strain）（ATCC Code: VR-825）30 μ Lに10% β -プロピオラクトン含有TBS溶液 3.3 μ Lを添加

して、ボルテックスミキサーで混合後、氷上で3時間静置した溶液に4×試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製）11.1 μ Lを加え、95℃で3分間加熱し、ウエスタンブロットティング用のインプット試料（計44.4 μ L）を得た。また、前記4種類の β -プロピオラクトン処理済溶出液22.2 μ Lに4×試料用緩衝液（和光純薬工業（株）製）7.4 μ Lをそれぞれ加え、95℃で3分間加熱し、ウエスタンブロットティング用の各溶出液試料（（計29.6 μ L）をそれぞれ得た。スーパーセップエース 5-20%ゲル（和光純薬工業（株）製）に当該ウエスタンブロットティング用のインプット試料20 μ L及びウエスタンブロットティング用の各溶出液試料20 μ Lをそれぞれ載せて、30mAで60分間電気泳動した。得られた泳動ゲルを、セミドライブロッターと不連続バッファー（Anode Buffer 1:0.3M Tris/20% Methanol、Anode Buffer 2:0.025M Tris/20% Methanol、Cathode Buffer:0.025M Tris/0.04M アミノカプロン酸/20% Methanol）を用いて、PVDF膜（Millipore社製）に1.2mA/cm²で60分間転写した。転写後のPVDF膜にTBS-T（TBS buffer, 0.1% tween20）で希釈した5%スキムミルクを加えて1時間室温で反応させてブロッキングし、TBS-Tで300倍希釈した抗インフルエンザAウィルスNucleoprotein抗体C43（Abcam社製）2mLを室温で1時間反応させた。反応後のPVDF膜をTBS-Tで3回洗浄し、TBS-Tで30000倍希釈した2次抗体抗{マウスIgG（H+L）, ロバ, IgG画分、ペルオキシダーゼ結合抗体}（Jackson ImmunoResearch社製）を室温で1時間反応させた。TBS-Tで5回洗浄後、各抗体を反応させたPVDF膜にイムノスターゼータ（和光純薬工業（株）製）を添加し、LAS-4000（GE社製）を用いて発光シグナルを検出した。

尚、各実施例で用いた担体の種類、Timタンパク質の種類及び担体からの溶出液の種類を下記表40に示す。

[0491] [表40]

	比較例42	比較例43	実施例122	実施例123
担体	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV
Tim タンパク質	-	-	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質
溶出液	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図24における レーン番号	2	3	4	5

[0492] <結果>

得られたウエスタンブロッティングの結果を図24に示す。図24において、各レーンは以下の結果である。

レーン1：インフルエンザAウィルスを電気泳動した結果

レーン2：比較例42の結果（ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4非結合担体を用い、1%SDS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン3：比較例43の結果（ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4非結合担体を用い、50mMEDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン4：実施例122の結果（ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4結合担体を用い、1%SDS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

レーン5：実施例123の結果（ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4結合担体を用い、50mMEDTA含有TBS溶液を溶出液として用いた場合の結果）

図24より、レーン2-3（ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4非結合担体を用いた場合）において、いずれの場合でもインフルエンザAウィルスのマーカートンパク質であるNucleoproteinのバンドは認められなかったのに対し、レーン4-5（ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4結合担体を用いた場合）において、いずれの場合でもインフルエンザAウィルスのマーカートンパク質であるNucleoproteinのバンド

が認められたことから、T i mタンパク質を結合させた担体は、インフルエンザウィルスを取得可能であることが判った。

また、レーン1（インフルエンザAウィルスを電気泳動した結果）とレーン4-5（ビオチン標識F cタグ融合型mT i m4結合担体を用いた場合の結果）との比較から、T i mタンパク質を結合させた担体を用いることにより効率よくインフルエンザウィルスを取得できることが判った。

[0493] 実施例124-125、比較例44-45、T i mタンパク質を固定化した担体によるウィルスの取得

T i mタンパク質を固定化した担体を用いて、本発明に係るウィルスの取得を行った。

[0494] <（1）RSウィルス含有HEp-2細胞培養上清サンプルの調製>

1. 5×10^6 細胞のHEp-2細胞を含む10%FBS含有DMEM高グルコース培地（和光純薬工業（株）製）20mLを75cm²フラスコに加え、37℃、5%CO₂で4日間培養した。培養後の培養液から上清を除去し、 5.3×10^5 TCID₅₀/mLのRSウィルス液（ATCC、Code:VR-26）を含む2%FBS含有EMEM培地5mLを添加して、36℃、5%CO₂で1時間静置した。2%FBS含有EMEM培地をさらに20mL添加して、36℃、5%CO₂で3日間培養した。当該培養後の培養液から上清を除去し、2%FBS含有EMEM培地を20mL添加して、36℃、5%CO₂で2日間培養した。その後、細胞をピペティングによりフラスコから剥がし、培養上清と共に50mL遠沈管に回収し、1500rpmで10分間遠心して培養上清のみを回収した。得られた培養上清に終濃度2mMとなるように塩化カルシウムを添加し、「カルシウム含有RSウィルス溶液」とした。

[0495] <（2）F cタグ融合型mT i m4タンパク質のSH基ビオチン標識>

実施例122-123及び比較例42-43の<（1）F cタグ融合型mT i m4タンパク質のSH基ビオチン標識>と同様の方法を行い、SH基ビオチン標識F cタグ融合型mT i m4タンパク質含有PBS溶液100μL

を得た。

[0496] < (3) SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質の希釈>
実施例122-123及び比較例42-43の<(2) SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質の希釈>と同様の方法を行い、SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質を1 μ g含有する溶液200 μ Lを得た。

[0497] < (4) ビーズの洗浄>
実施例122-123及び比較例42-43の<(3) ビーズの洗浄>と同様の方法を行い、洗浄操作を行ったMag Capture Tamavidin2-REVを得た。

[0498] < (5) SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質のビーズへの固定>

実施例122-123及び比較例42-43の<(4) SH基ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4タンパク質のビーズへの固定>と同様の方法を行い、ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4結合担体及びビオチン標識Fcタグ融合型mTim4（非）結合担体をそれぞれ得た。

尚、ビオチン標識Fcタグ融合型mTim4結合担体とビオチン標識Fcタグ融合型mTim4非結合担体を合わせて「Timタンパク質（非）結合担体」と略記する場合がある。

[0499] < (6) 本発明の取得方法によるRSウィルスの取得>

「終濃度2 mMの塩化カルシウムを添加したカルシウムイオン含有のインフルエンザAウィルス溶液（（H1N1 A/WS/33 strain）（ATCC Code: VR-825）60 μ L）」の代わりに「前記（1）で調製したカルシウムイオン含有RSウィルス溶液120 μ L」を用いた以外は、実施例122-123及び比較例42-43の<(5) 本発明の取得方法によるインフルエンザウィルスの取得>と同様の方法を行い、 β -プロピオラクトン処理済溶出液22.2 μ Lをそれぞれ得た。

尚、各実施例で用いた担体の種類、及びTimタンパク質の種類を下記表

4 1 に示す。

[0500] [表41]

	比較例44	比較例45	実施例124	実施例125
担体	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV
Tim タンパク質	-	-	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質

[0501] < (7) ウェスタンブロッティング >

「カルシウムイオン含有のインフルエンザAウィルス溶液 (H1N1 A /WS/33 strain) (ATCC Code: VR-825) 30 μ L」の代わりに「前記カルシウムイオン含有RSウィルス溶液30 μ L」を使用し、「TBS-Tで300倍希釈した抗インフルエンザAウィルスNucleoprotein抗体C43 (Abcam社製) 2mL」の代わりに「TBS-Tで500倍希釈した抗RSウィルスFタンパク質抗体2F7 (Abcam社製) 2mL」を用いた以外は、実施例122-123及び比較例42-43の< (6) ウェスタンブロッティング >と同様の方法により行い、発光シグナルを検出した。

尚、各実施例で用いた担体の種類、Timタンパク質の種類、及び担体からの溶出液の種類を下記表42に示す

[0502] [表42]

	比較例44	比較例45	実施例124	実施例125
担体	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV	MagCapture Tamavidin2-REV
Tim タンパク質	-	-	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質	ビオチン標識 Fcタグ融合型 Tim4タンパク質
溶出液	1% SDS	1mM EDTA	1% SDS	1mM EDTA
図25における レーン番号	2	3	4	5

[0503] < 結果 >

得られたウェスタンブロッティングの結果を図25に示す。図25において、各レーンは以下の結果である。

レーン 1 : R S ウィルスを電気泳動した結果

レーン 2 : 比較例 4 4 の結果 (ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 非結合担体を用い、 1 % S D S 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 3 : 比較例 4 5 の結果 (ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 非結合担体を用い、 5 0 m M E D T A 含有 T B S 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 4 : 実施例 1 2 4 の結果 (ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 結合担体を用い、 1 % S D S 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

レーン 5 : 実施例 1 2 5 の結果 (ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 結合担体を用い、 5 0 m M E D T A 含有 T B S 溶液を溶出液として用いた場合の結果)

図 2 5 より、レーン 2 - 3 (ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 非結合担体を用いた場合) において、いずれの場合でも R S ウィルスのマーカートンパク質である F タンパク質のバンドは認められなかったのに対し、レーン 4 - 5 (ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 結合担体を用いた場合) において、いずれの場合でも R S ウィルスのマーカートンパク質である F タンパク質のバンドが認められたことから、 T i m タンパク質を結合させた担体は、 R S ウィルスを取得可能であることが判った。

また、レーン 1 (R S ウィルスを電気泳動した結果) とレーン 4 - 5 (ビオチン標識 F c タグ融合型 m T i m 4 結合担体を用いた場合の結果) との比較から、 T i m タンパク質を結合させた担体を用いることにより効率よく R S ウィルスを取得できることが判った。

産業上の利用可能性

[0504] 本発明の T i m タンパク質結合担体、当該担体を用いた細胞外膜小胞及びウイルスの取得方法、除去方法並びに当該担体を含むキットは、従来の細胞外膜小胞及びウイルスの取得方法並びに当該取得方法に用いられる抗体等を含むキットに比べて、試料中に存在する細胞外膜小胞又はウイルスを高純度で、またインタクトな状態で簡便且つ効率的に取得又は除去することができ

る。

本発明の取得方法により取得した細胞外膜小胞は医薬品等として利用され、また取得したウィルスはワクチンやベクター等として利用されることから、本発明のT i mタンパク質結合担体及び本発明の取得方法は有用なものである。

本発明の除去方法により細胞外膜小胞又はウィルスを除去した試料は生物由来細胞外膜小胞やエンベロープウィルスのコンタミネーションを防いだものとなり、当該試料を用いた研究等に利用されることから、本発明のT i mタンパク質結合担体及び本発明の除去方法は有用なものである。

本発明のT i mタンパク質結合担体、当該担体を用いた細胞外膜小胞及びウィルスの検出方法は、従来の細胞外膜小胞及びウィルスの検出方法に比べて試料中の細胞外膜小胞及びウィルスを高感度に検出することができる。

本発明の検出方法によれば検体中の微量な細胞外膜小胞及びウィルスを検出する場合であっても、検体を濃縮や精製等せずにそのまま測定をすることが可能となるため、本発明のT i mタンパク質結合担体及び本発明の検出方法は有用なものである。

請求の範囲

- [請求項1] T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子4 (T i m 4) タンパク質、T細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子3 (T i m 3) タンパク質、及びT細胞免疫グロブリン・ムチンドメイン含有分子1 (T i m 1) タンパク質から選ばれるタンパク質 (T i m タンパク質) が結合した担体 (T i m 担体)。
- [請求項2] 細胞外膜小胞又はウイルスの捕捉用である、請求項1に記載のT i m 担体。
- [請求項3] T i m タンパク質がI g V ドメインを含むものである、請求項1に記載のT i m 担体。
- [請求項4] 以下の工程を含むことを特徴とする試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを取得する方法；
(1) カルシウムイオン存在下、担体に結合したT i m タンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（複合体形成工程）
(2) 当該複合体と試料とを分離する工程（複合体分離工程）
(3) 当該複合体から細胞外膜小胞又はウイルスを分離し、細胞外膜小胞又はウイルスを取得する工程（取得工程）。
- [請求項5] 複合体形成工程がカルシウムイオン存在下、T i m 担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させて、担体に結合したT i m タンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程である、請求項4に記載の方法。
- [請求項6] 複合体形成工程がカルシウムイオン存在下、T i m タンパク質と、担体と、試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させて、担体に結合したT i m タンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程である、請求項4に記載の方法。
- [請求項7] 取得工程がタンパク質変性剤を用いて行われる、請求項4に記載の方法。

- [請求項8] 取得工程がカルシウムイオンキレート剤を用いて行われる、請求項4に記載の方法。
- [請求項9] T i mタンパク質がI g Vドメインを含むものである、請求項4に記載の方法。
- [請求項10] 以下の工程を含むことを特徴とする試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを除去する方法；
（1）カルシウムイオン存在下、担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（複合体形成工程）
（2）当該複合体と試料とを分離する工程（複合体分離工程）。
- [請求項11] 複合体形成工程がカルシウムイオン存在下、T i m担体と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとを接触させて、担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程である、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] T i mタンパク質がI g Vドメインを含むものである、請求項10に記載の方法。
- [請求項13] 以下の工程を含むことを特徴とする試料中の細胞外膜小胞又はウイルスを検出する方法；
（1）カルシウムイオン存在下、担体に結合したT i mタンパク質と試料中の細胞外膜小胞又はウイルスとの複合体を形成させる工程（複合体形成工程）
（2）当該複合体を検出する工程（検出工程）
- [請求項14] 細胞外膜小胞又はウイルスを検出する方法がE L I S A法又はフローサイトメトリー法である請求項13に記載の方法。
- [請求項15] T i mタンパク質がI g Vドメインを含むものである、請求項13に記載の方法。
- [請求項16] 担体とT i mタンパク質とが、T i mタンパク質のS H基を介して結合したものである、請求項13に記載の方法。

- [請求項17] T i m担体を含んでなる、細胞外膜小胞又はウイルスの捕捉用キット
。
- [請求項18] T i mタンパク質を含んでなる試薬と、担体を含んでなる試薬とを含
んでなる細胞外膜小胞又はウイルスの捕捉用キット。