

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-526688
(P2016-526688A)

(43) 公表日 平成28年9月5日(2016.9.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48	M 2GO45
GO 1 N 15/00 (2006.01)	GO 1 N 33/48	H
	GO 1 N 33/48	P
	GO 1 N 15/00	B

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 37 頁)

(21) 出願番号 特願2016-525261 (P2016-525261)
 (86) (22) 出願日 平成26年1月14日 (2014.1.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成28年3月11日 (2016.3.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2014/000393
 (87) 国際公開番号 WO2015/005553
 (87) 国際公開日 平成27年1月15日 (2015.1.15)
 (31) 優先権主張番号 10-2013-0082060
 (32) 優先日 平成25年7月12日 (2013.7.12)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

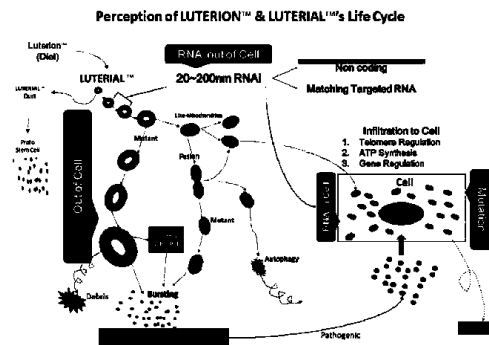
(71) 出願人 516012221
 クォン ヨンア
 KWON, Young Ah
 大韓民国, 135-787, ソウル, カン
 ナム-グ, アプクジョン-ロ 29-ギル
 , 71, ヒョンデ アパートメント, 12
 -1403
 (71) 出願人 516012232
 チョイ ウォンチョル
 CHOI, Won Cheol
 大韓民国, 464-842, キョンギ-ド
 , クワンジュ-シ, トエチョン-ミョン,
 チョンジナム-ロ, 1050-52

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ルテリアルの形態学的特性を用いた疾病の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、血液中に存在するルテリアルの形態学的特性を用いた疾病の診断方法に関する。本発明によれば、疾病の種類および進行程度によって、ルテリアルの数、サイズや形状などの形態学的特性および動き（ナノトラッキング速度）が変わるため、このような血液中のルテリアルの特性を観察および測定することで、疾病（特に、癌）の診断および予後を効果的に判断することができる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの数、サイズ（直径または面積）、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中 1 つ以上を顕微鏡を用いて測定するステップと、(b) 前記測定されたルテリアルの数、サイズ（直径または面積）、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中 1 つ以上を健常人のルテリアル、正常なルテリアル、または赤血球と比較するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 2】

前記体液は血液であることを特徴とする請求項 1 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。 10

【請求項 3】

前記 (a) ステップはルテリアルをローダミン 1 2 3、ミトトラッカー、アクリジンオレンジ、D A P I 及びヤーンスグリーン B からなる群より選択される一つ以上の染料で染色し発色させて、測定することを特徴とする請求項 1 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 4】

前記ルテリアルは血液から血清を分離するステップと、前記分離した血清から、100 nm ~ 2 mm の直径の空隙を備えたフィルターを通過していない沈殿物を分離するステップと、前記分離した沈殿物を洗浄するステップと、を含む方法により分離されることを特徴とする請求項 1 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。 20

【請求項 5】

前記 (b) ステップで測定されたルテリアルの直径が赤血球の直径の 8 ~ 30 倍、または測定されたルテリアルの面積が赤血球の面積の 8 ~ 30 倍である場合、疾病を癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 6】

前記 (b) ステップで測定されたルテリアルの数が健常人の 20 % 以下であり、長径が 20 μ m 以上である場合に、癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。 30

【請求項 7】

前記 (b) ステップはルテリアルの外部に被膜が形成されている場合、癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 8】

前記 (b) ステップにおいて、ルテリアルの形態は、正常形、外部に鞭毛が備えられた鞭毛形、マス (M) 形、ロッド (L) 形、および複合形を含む群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 9】

前記正常形は、ルテリアルの長径と短径との比が 1 : 1 ~ 3 : 1 であり、前記マス形は、長径と短径との比が 3 : 1 ~ 5 : 1 であり、前記ロッド形は、長径と短径との比が 5 : 1 ~ 12 : 1 であり、前記複合形は、ロッド形とマス形の融合形態、またはロッド形とロッド形の融合形態であることを特徴とする請求項 8 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。 40

【請求項 10】

前記 (b) ステップでは、測定されたルテリアルの形態が (i) ロッド形である場合、肺癌、乳癌、膵臓癌、胆管癌、胸膜中皮腫、甲状腺癌、卵巣癌、胆道癌、前立腺癌、またはリンパ性血液癌の発生状態に決定し、(i i) マス形である場合、肝癌、肝血管肉腫、大腸癌、子宮癌、消化器癌 (胃癌)、腎臓癌、直腸癌、または骨髄性血液癌の発生状態に 50

決定し、(i i i) 複合形である場合、重度の血液癌または転移癌が疑われる状態に決定し、(i v) 鞭毛形が表れる場合、末期腫瘍が疑われる状態に決定することを特徴とする請求項 8 または請求項 9 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 1 1】

前記 (b) ステップで、観察または撮影により測定されたルテリアルナノトラッキング速度が $8.0 \sim 11 \text{ nm/sec}$ である場合には 1 期癌が疑われる状態、 $2.5 \sim 8.0 \text{ nm/sec}$ である場合には 2 期癌が疑われる状態、 $0.5 \sim 2.5 \text{ nm/sec}$ である場合には 3 期癌が疑われる状態、 0.5 nm/sec 未満の場合には 4 期癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

10

【請求項 1 2】

(a) 患者から既に排出された体液中に存在するルテリアル形態を電子顕微鏡で測定するステップと、(b) 前記測定されたルテリアル形態を、単一形、融合形、多重融合形、および膜が裂けた融合形からなる群より選択される形態に決定するステップと、(c) 前記決定された形態を基準に疾病の状態を決定するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 1 3】

前記体液は血液であることを特徴とする請求項 1 2 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

20

【請求項 1 4】

前記ルテリアルをローダミン 1 2 3、ミトトラッカー、アクリジンオレンジ、D A P I 及びヤヌスグリーン B からなる群より選択される一つ以上の染料で染色し発色が確認され、電子顕微鏡上で二重膜およびクリステ構造が確認されることを特徴とする請求項 1 2 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 1 5】

前記 (c) ステップは、前記測定されたルテリアル形態が単一形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合、正常であると決定し、融合形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合には、疾病が疑われる状態であると決定し、多重融合形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合には、腫瘍が疑われる状態であると決定し、膜が裂けた融合形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合には、重度の腫瘍が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項 1 2 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者から既に排出された体液中に存在するルテリアル形態学的特性を用いた疾病の診断方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液中における微小胞などの微細物質は、かつては、特別な機能を持っていない物質として認識されてきた。しかし、微小胞 (*microvesicle*) も様々な生物活性を有するということが、種々の実験データにより明らかになっている。例えば、血小板由来の微小胞は、小胞状の表面タンパク質を介して特定細胞を刺激する機能をするということが明らかになっており (*CD154* , *RANTES* および / または *PF-4* ; *Thromb. Haemost.* (1999) 82 : 794 , または *J. Biol. Chem.* (1999) 274 : 7545)、血小板の微小胞における生理活性脂質 (例えば、*HETE* またはアラキドン酸) が特定の標的細胞に対して特定効果を示すことが報告されている (*J. Biol. Chem.* (2001) 276 ; 19672 ; または *Cardiovasc. Res.* (2001) 49 (5) : 88 を参照)。このように、生物学的試料

40

50

中に存在する小囊などの物質の特徴（例えば、サイズ、表面抗原、起源細胞の決定、ペイロッド）は、疾病の診断、予後または治療診断に関する情報を提供することができるため、疾患を探索して治療するのに用いられることができる生物学的指標を確認することに対する必要性が求められている。

【0003】

一方、産業化された大部分の国で、癌（cancer）は、今でも死亡率第1位の難治性疾患である。癌の治癒率は依然として低く、癌による死亡者が増加しつつあるため、家計負担および国の医療費負担も多く増加している。癌は、細胞が無限に増殖して正常な細胞の機能を妨害する疾病であり、肺癌、胃癌（gastric cancer、GC）、乳癌（breast cancer、BRC）、大腸癌（colorectal cancer、CRC）などが代表的であるが、実質的には何れの組織でも発生し得る。

10

【0004】

初期の癌の診断は、癌細胞の成長による生体組織の外的変化に基づいて行われたが、近年、血液、糖鎖（glyco chain）、DNAなどの生物の組織または細胞に存在する微量の生体分子を用いた診断および検出が試されている。しかし、最も一般的に用いられる癌の診断方法は、生体組織検査により得られた組織サンプルを用いるか、映像を用いた診断である。このうち生体組織検査は、患者に大きい苦痛を与え、費用が高だけでなく、診断まで長時間がかかるという欠点がある。また、患者が実際に癌にかかった場合、生体組織検査の過程に癌の転移が誘発される恐れがあり、生体組織検査により組織サンプルが得られない部位の場合、疑われる組織を外科的な手術で摘出しないと、疾病の診断が不可能であるという欠点がある。また、映像を用いた診断では、エックス線（X-ray）映像、疾病標的物質が付着された造影剤を用いて得た核磁気共鳴（nuclear magnetic resonance、NMR）映像などに基づいて癌を判定していた。しかし、かかる映像による診断は、臨床医または読影医の熟練度によって誤診の可能性があり、映像を得る機器の精度に大きく依存するという欠点がある。さらに、最も高精度の機器であるとしても、数mm以下の腫瘍は検出が不可能であり、初期段階では癌の検出が難しいという欠点がある。また、映像を得るためには、患者または疾病保有可能者が、遺伝子の変異が誘発し得る高エネルギーの電磁気波に露出されるため、さらに他の疾病を引き起こす恐れがあるだけでなく、映像を用いた診断の回数が制限されるという欠点がある。

20

30

【0005】

すなわち、癌の診断のための生体組織検査は、多くの時間、費用、不便さ、苦痛などが伴われるため、不要な生体組織検査の対象者数を著しく減少させることができる方法、癌を早期に診断できる方法が求められている。

【0006】

このような背景下で、本発明者らは、患者から既に排出された体液中に存在する微細物質であるルテリアル（Luterial）の形態学的特性を観察することで、疾病を診断および予測することができることを見出し、本発明を成すに至った。

【発明の概要】

【0007】

本発明の目的は、患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの形態学的特性を用いた疾病の診断方法を提供することにある。

40

【0008】

上記の目的を達成するために、本発明は、（a）患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの数、サイズ（直径または面積）、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中1つ以上を顕微鏡を用いて測定するステップと、（b）前記測定されたルテリアルの数、サイズ（直径または面積）、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中1つ以上を健常人のルテリアル、正常なルテリアル、または赤血球と比較するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法を提供する。

50

【0009】

また、本発明は、(a)患者から既に排出された体液中に存在するルテリアル形態を電子顕微鏡で測定するステップと、(b)前記測定されたルテリアル形態を、単一形、融合形、多重融合形、および膜が裂けた融合形からなる群から選択される形態に決定するステップと、(c)前記決定された形態を基準に疾病の状態を決定するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法を提供する。

【0010】

また、本発明は、(a)患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の1つ以上を顕微鏡を用いて測定するステップと、(b)前記測定されたルテリアルの数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の1つ以上を健常人のルテリアル、正常なルテリアル、または赤血球と比較するステップと、を含む、疾病の診断または予後の予測方法を提供する。

10

【0011】

また、本発明は、(a)患者から既に排出された体液中に存在するルテリアル形態を電子顕微鏡で測定するステップと、(b)前記測定されたルテリアル形態を単一形、融合形、多重融合形、および膜が裂けた融合形からなる群から選択される形態に決定するステップと、(c)前記決定された形態を基準に疾病の状態を決定するステップと、を含む、疾病の診断または予後の予測方法を提供する。

20

【0012】

本発明の他の特徴および具現例は、次の詳細な説明および添付の特許請求の範囲によりさらに明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】ルテリアルのライフサイクルを概略的に示したものである。

【図2a】非小細胞性肺癌末期患者の血液由来のルテリアルを走査型共焦点レーザー顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図2b】非小細胞性肺癌末期患者の血液由来のルテリオンをローダミン123で蛍光染色した後に撮影した走査型共焦点レーザー顕微鏡写真を示したものである。

【図2c】非小細胞性肺癌末期患者の血液由来のルテリオンを電子顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

30

【図3】血液由来のルテリアルを電子顕微鏡で撮影し、100~1000nm以上まで、直径の順に配列した写真を示したものである。

【図4a】健常人の血液のルテリアル(1ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図4b】健常人の血液のルテリアル(2ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図4c】健常人の血液のルテリアル(3ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図4d】メチル化(methylation)異常を有する患者の血液のルテリアル(4ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

40

【図4e】遺伝子変異を有する患者の血液のルテリアル(5ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図4f】遺伝子変異を有する患者の血液のルテリアル(6ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図4g】腫瘍関連遺伝子変異を有する患者の血液のルテリアル(7ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図4h】腫瘍関連遺伝子複合変異を有する患者の血液のルテリアル(8ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図4i】末期癌患者由来の血液のルテリアル(9ステップ)を暗視野顕微鏡で撮影した

50

写真を示したものである。

【図 5】マス形のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図 6】ロッド形のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図 7 a】肺癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（初期）。

【図 7 b】肺癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（2～3期）。

【図 7 c】肺癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（2～3期）。

【図 7 d】肺癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（2～3期）。

【図 7 e】肺癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（2～3期）。

【図 8 a】乳癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（初期）。

【図 8 b】乳癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（初期）。

【図 8 c】乳癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 8 d】乳癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 8 e】乳癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（リンパ、腹膜、および心膜へ転移）。

【図 9 a】膵臓癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（初期）。

【図 9 b】膵臓癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 9 c】膵臓癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 9 d】膵臓癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 10】胆管癌（Common Bile Duct Cancer）の骨/肺への転移患者由来のルテリアルを走査型共焦点レーザー顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図 11】胸膜中皮腫（Pleural Mesothelioma）患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図 12】甲状腺癌（中期）患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図 13 a】卵巣癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 13 b】卵巣癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 14】胆道癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図 15】前立腺癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図 16 a】急性リンパ性白血病患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図 16 b】急性リンパ性白血病患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（ロッド - マス複合進行形）。

10

20

30

40

50

【図17a】肝癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（初期）。

【図17b】肝癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図17c】肝癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図17d】肺へ転移された肝癌患者由来のルテリアルを走査型共焦点レーザー顕微鏡撮影した写真を示したものである。

【図18】肝血管肉腫（angiosarcoma of liver）患者由来のルテリアルを走査型共焦点レーザー顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

10

【図19a】大腸癌および胃癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図19b】大腸癌および胃癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図19c】大腸癌および胃癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図20】子宮癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図21】胃癌初期患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

20

【図22a】直腸癌初期患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（マス・ロッド進行形）。

【図22b】直腸癌初期患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（マス形）。

【図23a】急性骨髄性白血病患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（マス・ロッド進行形）。

【図23b】急性骨髄性白血病患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

【図23c】急性骨髄性白血病患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（中期）。

30

【図24】急性骨髄性白血病患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである（マス・ロッド進行形）。

【図25a】肝へ転移された胃癌患者由来のルテリアルを示したものである。

【図25b】腹膜へ転移された胃癌患者由来のルテリアルを示したものである。

【図25c】腹膜および肝へ転移された胃癌患者由来のルテリアルを示したものである。

【図26】骨および肺へ転移された直腸癌患者由来のルテリアルを示したものである。

【図27】骨へ転移された前立腺癌患者由来のルテリアルを示したものである。

【図28】リンパへ転移された非小細胞性肺癌（NSCLC）患者由来のルテリアルを示したものである。

【図29】骨へ転移された腎臓癌患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

40

【図30】急性リンパ性白血病患者由来のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図31】ナノトラッカーを用いてルテリアルの移動速度（ナノトラッキング速度）を測定した写真を示したものである。

【図32a】膜が裂けた融合形の形態を順に電子顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図32b】膜が裂けた融合形の形態を順に電子顕微鏡で撮影した写真を示したものである。

【図32c】膜が裂けた融合形の形態を順に電子顕微鏡で撮影した写真を示したものであ

50

る。

【発明を実施するための形態】

【0014】

他に定義されない限り、この明細書において用いられた全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野において熟練した当業者により通常的に理解されるものと同一の意味を有する。通常、この明細書において用いられた命名法は、本技術分野において公知の、通常的に用いられるものである。

【0015】

本発明で用いる用語「ルテリアル(luterial)」は、全ての動物に存在する生命因子(living organism)であって、ウイルスに近似な程度から約500nmまで(正常フィッシュンステップ50~500nm/非正常フュージョンステップ800nm以上)のサイズを有する微細物質を本発明者が命名したものである。前記ルテリアルは、DNAおよびRNAの両方を含み、付着性と運動性を有する点でエキソソーム(exosome)や微小胞(microvessicle)と区別される。

10

【0016】

ヒトを含む動物の場合、血液、唾液、リンパ管、精液、膣液、母乳(特に、初乳)、臍帯血、脳細胞、脊髄、骨髄に存在し、「ルテリアル」と称される。尚、植物に存在する物質は「ルテリオン(Luterion)」と称され、血液などで発見されるルテリアルの起源は、植物由来のルテリオンであると推定される(図1)。

【0017】

ミトコンドリアは、ヤーンスグリーンB(Janus green B)および蛍光染色のローダミン123(Rhodamine 123)、ミトトラック(Mitotracker)、アクリジンオレンジ(Acridine Orange)、およびDAPIにより発色が確認されるが、前記ルテリアルもミトコンドリアと同一の染料により発色が確認され、ミトコンドリアと類似の二重膜の膜構造であって、内部クリステ(cristae)構造が完成されていない状態の構造を有し、ミトコンドリアと同一のレーザー波長範囲で観察されるという点で、「類似ミトコンドリア」、「ミトコンドリア類似体」、または「ミトコンドリア前駆体(proto-mitochondria)」と称することもできる。

20

【0018】

ルテリアルは、ヒトを含む動物の場合、血液、唾液、リンパ管、精液・膣液、母乳(特に、初乳)、臍帯血、脳細胞、脊髄、骨髄に存在する。その他に、角を有する動物の場合、角中にもルテリアルが存在する。

30

【0019】

前記ルテリアルは、また、シグナリング、細胞分化、アポトーシスだけでなく、細胞サイクルおよび細胞成長の調節にも関連すると予想されるが、本発明者は、中でもルテリアルが癌の診断に密接な関連を有することを見出した。

【0020】

正常なルテリアル(normal luterial)は、癌細胞の成長を抑え、細胞を健康な免疫体系に戻す役割をすると予想されるが、その役割は、遺伝子を正常化させる可能性を有するRNAi(RNA interference; RNA干渉)により行われる。このように、健康な人や動物由来のルテリアルの場合、RNA中における情報体系が正常軌道を外れて、異常疾患を誘発するタンパク質を生産するように指示する場合、これを人為的に干渉することで癌などの疾病の発生を抑えるように作用し、サイズが200~500nm以上に成熟した時にはエネルギー代謝にも関与する。そのため、かかるルテリアルが正常な役割を行うことができない場合、恒常性およびATP生産において決定的障害を誘発し、呼吸およびエネルギー代謝の両方において疾病を招く恐れがある。

40

【0021】

このように、役割を正常に果たすことができない変異ルテリアルは、正常なルテリアルとは生態および特性が異なって、そのサイズや形態が多様である。具体的に、正常なルテ

50

リアルは、二重胞子 (double-spore) を形成した後にはそれ以上増殖しないが、癌患者や晩成疾病を有する患者の血液で発見される変異ルテリアルは、幹細胞と類似に無限に増殖する特性を有するため、600~800nm以上のサイズを有し、200 μ m (200,000nm)以上のサイズを有するものもある。また、ウイルスと類似に、赤血球、白血球、血小板などに侵入して生長したり、他のルテリアルと凝集したりする特性を示す。

【0022】

一方、ルテリアルは、個体の疾病有無に応じて、その数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度が異なり、前記特性の1つまたは2つ以上を組み合わせることで、疾病の診断や予後の予測が可能である。これは、疾病のない健康人由来のルテリアルと、疾病のあるヒト由来のルテリアルの数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、ナノトラッキング速度などが異なることから分かる。かかる差は、ルテリアルの変異有無に起因したものであって、疾病のあるヒト由来のルテリアルを、健康人由来の正常なルテリアルから区分するために「変異ルテリアル(mutant luteria l)」と命名した。

10

【0023】

結局、患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの数と形態学的特性または生化学的特性を観察することで、疾病の診断および予後の予測が可能である。

【0024】

より具体的に、患者の場合、ルテリアルの数、特に4,000nm以下のサイズのルテリアル数が健康人に比べ少なくなる特性があり、重度患者の場合は20~80%に少なくなる。したがって、ルテリアルの数が健康人の20%以下である場合には、腫瘍が疑われる状態であると決定することができる。

20

【0025】

尚、ルテリアルのサイズ(長径)が20 μ mである変異ルテリアルが発見される場合、腫瘍が疑われる状態であると決定することができる。特に、ルテリアルの長径が20 μ m以下であるとしても、変異ルテリアルの外部に被膜が形成されている場合には、悪性腫瘍が疑われる状態であると決定することができる。但し、変異ルテリアルの長径が20 μ m以上であるとしても、被膜が完成されていない場合には、良性腫瘍が疑われる状態であると決定することができる。

30

【0026】

また、患者由来のルテリアルは、その動きが健康人由来のルテリアルに比べ著しく減少する。このようなルテリアルの動きは、ナノトラッキング速度により定量することができる。

【0027】

したがって、一観点による本発明は、(a)患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの数、サイズ、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の1つ以上を顕微鏡を用いて測定するステップと、(b)前記測定されたルテリアルの数、サイズ、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の1つ以上を健康人のルテリアル、正常なルテリアル、または赤血球と比較するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法に関する。

40

【0028】

他の観点による本発明は、(a)患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの数、サイズ、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の1つ以上を顕微鏡を用いて測定するステップと、(b)前記測定されたルテリアルの数、サイズ、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の1つ以上を健康人のルテリアル、正常なルテリアル、または赤血球と比較するステップと、を含む、疾病の診断または予後の予測方法に関する。

【0029】

本発明で観察されるルテリアルは、患者から既に排出された体液から分離されることが

50

できる。本発明における「患者から既に排出された体液」は、血液、唾液、リンパ管、精液、膣液、母乳（特に、初乳）、臍帯血、脳細胞、脊髄、または骨髄であることができるが、これに制限されるものではない。最も好ましくは、血液由来のルテリアルを用いることができる。具体的に、採取された血液サンプル中に存在するルテリアルまたは血液から分離されたルテリアルを顕微鏡で観察することで、疾病を診断し、予後を予測することができる。

【0030】

本発明の一実施例では、血液から血清を分離する第1の分離ステップと、前記分離した血清から、100nm～2mmの直径の空隙を備えたフィルターを通過していない沈殿物を分離する第2の分離ステップと、前記分離した沈殿物を洗浄するステップと、を含む工程によりルテリアルを得た。

10

【0031】

より詳細には、前記第1の分離ステップは、患者から血液を採取し、1200～5000rpmで5～15分間遠心分離するステップを含むことができる。前記第2の分離ステップは、血清から、遠心分離などによりエキソソーム(exosome)などの一般微小胞を除去して上清を得るステップと、前記得られた上清を、100nm～2mmの直径の空隙を備えたフィルターに通過させ、これを通過していない沈殿物を分離するステップと、を含むことができる。エキソソームを除去するためにExoQuick)が使用できるが、これに制限されるものではない。前記洗浄するステップは、前記沈殿物が分離された血清（これはエキソソームであることができる）を生理食塩水(Normal Saline)で洗浄するステップを含むことができる。前記洗浄するステップの後に、アイシング(4以下)を維持するステップをさらに含むことができる。

20

【0032】

前記(b)ステップで観察または撮影されたルテリアルの長径が赤血球の直径の8～30倍、または観察または撮影されたルテリアルの面積が赤血球の面積の8～30倍である場合、疾病が癌が疑われる状態であると決定することができる。

【0033】

ルテリアルのサイズを観察または撮影して測定する場合、健常人のルテリアルは100～250nmであるが、疲労症候群のある場合には250～800nm、疾病のある場合には800nm以上、最大数百μm(約200μm)のサイズを有する。

30

【0034】

前記(b)ステップで観察または撮影されたルテリアルの数が健常人の20%以下であり、サイズ(直径)が0.8～1μmである場合には、疾病発生が疑われる状態であると決定し、20μmである場合には、癌が疑われる状態であると決定することができる。変異ルテリアルの外部に被膜が形成されている場合には、そのサイズを問わずに癌の標識因子に決定することができる。特に、被膜が形成されており、鞭毛(触手)が観察されると、悪性腫瘍の重度因子に決定することができる。被膜形成有無は、暗視野顕微鏡や電子顕微鏡で観察可能である。

【0035】

前記(a)ステップでは、ルテリアルの形態を観察または撮影し、前記(b)ステップでは、観察または撮影されたルテリアルの形態に応じて疾病を決定することができる。

40

【0036】

前記(b)ステップにおいて、ルテリアルの形態は、正常形、外部に鞭毛が備えられた鞭毛形、マス(Mass:M)形、ロッド(Rod:L)形、および複合形を含む群から選択されることができる。

【0037】

前記正常形は、ルテリアルの長径と短径との比が1:1～3:1であることができる。

【0038】

前記マス(Mass)形は、丸やかな形状に密集されており、大多数の膜が開口された構造であって、長径と短径との比が3:1～5:1であることができる。

50

【0039】

前記ロッド (Rod) 形は、尖って且つ角状の形状を有しており、大多数の膜が閉塞された構造であって、長径と短径との比が 5 : 1 ~ 12 : 1 であることができる。

【0040】

前記ロッド (Rod) 形は、円形または楕円形の単一鎖からなるロッド 1 形、または 2 つ以上の単一鎖が結合してなるロッド 2 形であることができる。

【0041】

前記複合形は、ロッド形とマス形の融合形態、ロッド形とロッド形の融合形態、またはマス形とマス形の融合形態であることができる。

【0042】

前記 (b) ステップでは、観察または撮影により測定されたルテリアル形態がロッド形である場合、肺癌、乳癌、膵臓癌、胆管癌、胸膜中皮腫、甲状腺癌、卵巣癌、胆道癌、前立腺癌、またはリンパ性血液癌の発生標識因子に決定し、マス形である場合、肝癌、肝血管肉腫、大腸癌、子宮癌、消化器癌 (胃癌)、腎臓癌、直腸癌、または骨髄性血液癌の発生標識因子に決定し、複合形である場合、重度の血液癌または転移癌が疑われる状態の標識因子に決定し、鞭毛形が表れる場合、末期腫瘍が疑われる標識因子に決定することを特徴とする。

【0043】

このような変異ルテリアル形態により、発生部位を追跡することもできる。ロッド形の場合、癌の発生部位を肺、乳、膵臓、胆管、甲状腺、卵巣、胆道、前立腺、またはリンパ性血液に決定することができ、マス形の場合、癌の発生部位を肝、大腸、子宮、消化器 (胃)、腎臓、直腸、または骨髄性血液に決定することができる。尚、ロッド形からマス形へ複合形に進行中である場合、癌の元発生部位はロッド形と同一であり、マス形からロッド形へ複合形に進行中である場合には、癌の元発生部位はマス形と同一である。

【0044】

また、本発明は、ルテリアルの運動性を意味するナノトラッキング速度を測定し、その速度に応じて、1 期癌 ~ 4 期癌が疑われる状態であると決定することができる。前記 (b) ステップで、観察または撮影により測定されたルテリアルのナノトラッキング速度が 8 . 0 ~ 11 nm / sec である場合には 1 期癌が疑われる状態、2 . 5 ~ 8 . 0 nm / sec である場合には 2 期癌が疑われる状態、0 . 5 ~ 2 . 5 nm / sec である場合には 3 期癌が疑われる状態、0 . 5 nm / sec 未満の場合には 4 期癌が疑われる状態であると決定することができる。

【0045】

さらに他の観点による本発明は、(a) 患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの形態を電子顕微鏡で測定するステップと、(b) 前記測定されたルテリアルの形態を、単一形、融合形、多重融合形、および膜が裂けた融合形からなる群から選択される形態に決定するステップと、(c) 前記決定された形態を基準に疾病の状態を決定するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法に関する。

【0046】

さらに他の観点による本発明は、(a) 患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの形態を電子顕微鏡で測定するステップと、(b) 前記測定されたルテリアルの形態を、単一形、融合形、多重融合形、および膜が裂けた融合形からなる群から選択される形態に決定するステップと、(c) 前記決定された形態を基準に疾病の状態を決定するステップと、を含む、疾病の診断または予後の予測方法に関する。

【0047】

前記血液由来のルテリアルは、ローダミン 123 (Rhodamine 123)、ミトトラッカー (Mitotracker)、アクリジンオレンジ (Acridine Orange)、DAPI、およびヤヌスグリーン B (Janus green B) からなる群から選択される 1 つ以上の染料で染色することで発色が確認され、電子顕微鏡上で二重膜およびクリステ構造が確認されることを特徴とする。

10

20

30

40

50

【0048】

前記(c)ステップは、前記観察または撮影により測定されたルテリアル形態が単一形態の形態と80~100%一致する場合、正常であると決定し、融合形態の形態と80~100%一致する場合には、疾病が疑われる状態であると決定し、多重融合形態の形態と80~100%一致する場合には、腫瘍が疑われる状態であると決定し、膜が裂けた融合形態の形態と80~100%一致する場合には、重度の腫瘍が疑われる状態であると決定することができる。

【0049】

以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明する。これら実施例は、本発明を例示するためのものにすぎず、本発明の範囲がこれら実施例によって制限されると解釈されないことは、当業界において通常の知識を有する者にとって自明である。

10

【0050】

実施例1：血液由来のルテリアルの分離

非小細胞性肺癌末期患者から採取された血液250 μ Lを1600rpmで10分間遠心分離することで、血清を分離した。この血清にSBI社製のExoQuickを63 μ L添加し、3000rpmで15分間遠心分離した後、さらに15分間維持させてから、ExoQuickと反応していない上層部を分離した。分離された上層部(上清)を100nmのマイクロフィルターでフィルタリングし、通過していない沈殿物を分離した。これを生理食塩水で複数回洗浄した後、アイシング(4以下)を維持して、微細物質であるルテリアルを分離した。

20

【0051】

実施例2：顕微鏡観察およびルテリアルの確認

実施例1で分離されたルテリアルは、走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察することができた(図2a)。これをローダミン123で染色した後、走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いて確認し(図2b)、ヤーンスグリーンBで染色されたルテリアルの陽性反応を光学顕微鏡で確認した。

【0052】

尚、前記分離されたルテリアルを電子顕微鏡サンプルにして観察した(図2c)。血球をMICAで固定させた後、膜をプローブ(Probe)で剥がしてDNAとRNAを確認した(原子間力顕微鏡を利用)。MICAに代えて、固定液のCell-Tack B (Bioscience社製)、またはGlutaraldehyde/poly-L-lysineを使用してもよい。暗視野顕微鏡で、ローダミン123蛍光染色試薬を塗布して5分後に洗浄した後、オレンジフィルター(506nm~520nm帯波長フィルター)で観察したところ、緑色が観察されることを確認した。

30

【0053】

図2aから図2cは、実施例1で分離されたルテリアルを撮影した写真であり、図2bに示すように、前記ルテリアルをローダミン123で蛍光染色すると特異的に染色され、これは走査型共焦点レーザー顕微鏡で観察される。前記ルテリアルは、ヤーンスグリーンB (Janus green B)で特異的に染色され、光学顕微鏡で観察可能である。蛍光染色試薬であるミトトラッカー(Mitotracker)、アクリジンオレンジ(Acridine Orange)、およびDAPIによっても発色を確認することができる。

40

【0054】

図2aに示したルテリアルは、最大718nm、すなわち0.718 μ mの直径を有し、図2cに示すように、外部に被膜が形成されていることが確認された。実際に、実験群の患者は非小細胞性肺癌末期であると診断された。したがって、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、観察または撮影されたルテリアルの直径が0.5 μ m以上であり、外部に被膜が形成されている場合、癌が疑われる状態であると決定することができる。

【0055】

50

図2cは、前記ルテリアル電子顕微鏡写真であり、本発明による疾病の診断および予後の予測方法に用いられるルテリアルは、外部に被膜が形成されている二重膜の膜構造であって、完成されていない内部クリステ構造を有することを確認することができる。

【0056】

実施例3：多様な被験者由来のルテリアルの直径測定（電子顕微鏡）

健常人を始め、末期癌患者を含む多様な被験者30人の血液から実施例1と同様の方法でルテリアルを分離した後、電子顕微鏡を用いてルテリアルの直径を測定した。

【0057】

図3は、観察されたルテリアルを100nmから1 μ mまで直径の順に配列したものである。融合または変異されたルテリアルは、直径450nm以上で発見され（大体800nm以上で発見）、このうち大多数は、疾病が診断された。したがって、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、ルテリアルの直径を顕微鏡で観察または撮影し、観察または撮影されたルテリアルの直径が800nm、すなわち0.8 μ m以上である場合、疾病の発生が疑われる状態であると決定することができる（電子顕微鏡または原子間力顕微鏡では0.45 μ mでも観察可能である）。顕微鏡で観察された最大サイズは200 μ mであったが、最大値は患者によって増加し得る。

10

【0058】

図3の800nm（0.8 μ m）の被膜が形成されたルテリアルは、癌患者由来の血液で多数発見された。したがって、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、ルテリアルの直径を顕微鏡で観察または撮影し、観察または撮影されたルテリアルの直径が0.8 μ m以上であり、被膜が形成されている場合、疾病が癌が疑われる状態であると決定することができる。

20

【0059】

実施例4：健常人の血液由来のルテリアルの顕微鏡観察

疾病の兆候が全くない健常人から採取した血液をスライドガラスに付け、カバーガラスで覆った後、暗視野用オイルを一滴加え、暗視野顕微鏡（Nikon Eclipse Ni（1000倍））を用いて1000倍率で観察した。

【0060】

その結果、図4aに示したように、瞬く点としてみえるルテリアルが観察された。円形の物質は赤血球であり、健常人由来のルテリアルは赤血球より非常に小さく観察される。

30

【0061】

実施例5：ルテリアルの直径に応じた疾病の診断および予後の予測

1期癌、2期癌、3期癌、および4期癌の患者（それぞれ15人）から採取した血液から、実施例1と同様の方法でルテリアルを分離した。

【0062】

分離されたルテリアルをバッファ溶液に入れ、ローダミン123で染色した後、走査型共焦点レーザー顕微鏡を用いてその直径を測定した。2 μ m以上のルテリアル変異体、すなわち変異ルテリアルの観測割合は次のとおりである。

【0063】

【表1】

40

	直径2 μ m以上の変異ルテリアルの観測割合
1期癌	72.2%
2期癌	83.5%
3期癌	91.3%
4期癌	93.6%

【0064】

早期癌から末期癌に進むに従って、直径2 μ m以上の変異ルテリアルが増加した。4期癌では、約94%の患者で直径2 μ m以上の変異ルテリアルが発見され、観測された最大サイズは200 μ m以上であった。また、1期～3期癌患者で、直径0.5～5 μ mの変

50

異ルテリアルを観測割合が高かった。また、末期癌である4期癌患者の場合、5 μm 以上の変異ルテリアルを観測割合が高かった。

【0065】

したがって、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、ルテリアルの直径を顕微鏡で観察または撮影し、観察または撮影されたルテリアルの直径が1.0 ~ 200 μm である場合、癌が疑われる状態であると決定し、20 μm 以上で、且つ被膜が形成されている時に、癌が疑われる状態であると決定することができる。

【0066】

実施例6：ルテリアルの形態に応じた疾病の診断および予後の予測

健常人、染色体メチル化異常を有する患者、遺伝子変異を有する患者、腫瘍関連遺伝子変異を有する患者、腫瘍関連遺伝子複合変異を有する患者（前立腺癌末期患者）の血液をスライドガラスに付け、カバーガラスで覆った後、暗視野用オイルを一滴加え、暗視野顕微鏡（Nikon Eclipse Ni（1000倍））を用いて1000倍率で観察した。

10

【0067】

また、前記実験群の患者のうち、1期癌、2期癌、3期癌、および4期癌患者を対象として、ルテリアルの形態が鞭毛形に観察される割合を計算した。

【0068】

【表2】

	鞭毛形観察割合
1期癌	2.3%
2期癌	7.2%
3期癌	13.6%
4期癌	99.1%

20

【0069】

図4bから図4iは、実施例6により撮影されたルテリアルの形態を、疾病の軽重順に2ステップから9ステップに分類して示したものであり、1ステップは図4aに示した。

【0070】

図4bおよび図4cは健常人の血液由来のルテリアル（2ステップおよび3ステップ）、図4dはメチル化（methylation）異常を有する患者の血液由来のルテリアル（4ステップ）、図4eおよび図4fは遺伝子変異を有する患者由来のルテリアル（5ステップおよび6ステップ）、図4gは腫瘍関連遺伝子変異を有する患者由来のルテリアル（7ステップ）、図4hは腫瘍関連遺伝子複合変異を有する患者由来のルテリアル（8ステップ）、図4iは腫瘍関連遺伝子複合変異を有する患者（末期前立腺癌）由来のルテリアル（9ステップ）を撮影したものである。図4bから図4iにおいて、円形の物質は赤血球または白血球である。

30

【0071】

まず、図4bおよび図4cにおいて、円形の物質の他に、瞬く銀色の微細物質がルテリアルである。健常人由来のルテリアルでは、赤血球よりサイズが小さく、融合または変形された群集形態が発見されなかった。

40

【0072】

図4dは、染色体メチル化（methylation）異常を有する患者の血液由来のルテリアルを撮影したものであって、図4cの分類3ステップと比較するとそのサイズが大きくなったが、まだ変形された群集形態が発見されなかった。

【0073】

図4eおよび図4fは、遺伝子変異を有する患者の血液由来のルテリアルを撮影したものであって、特に図4fの分類6ステップの場合、図4dの分類4ステップと比較すると、ルテリアル同士の融合が進行されたことが分かる。図4eおよび図4fの遺伝子変異を

50

有する患者は、まだ腫瘍関連遺伝子の変異が起こっていない。

【0074】

図4gは、腫瘍関連遺伝子の一部に変異が発生した患者の血液由来のルテリアルを撮影したものであって(分類7ステップ)、図4eおよび図4fに比べ、赤血球のサイズの20倍以上の、極めて大きい変異ルテリアル(マス形)群集が観察された(中央の銀色物質)。

【0075】

図4hは、腫瘍関連遺伝子に複合変異が発生した患者の血液由来のルテリアルを撮影したものであって(分類8ステップ)、分類7ステップに比べてサイズが著しく大きくなっており、ロッド形に観察された。

10

【0076】

図4iは、末期癌患者の血液由来のルテリアル(9ステップ)を撮影したものであって、8ステップと異なって鞭毛形に観察された。鞭毛が形成された変異ルテリアルが観察された患者は末期癌患者に区分され、鞭毛形ルテリアルを有する癌患者の生存期間は1~4ヶ月であった。また、図4iに示すように、300nm以上の鞭毛が放出される場合、生存期間が2ヶ月以内であった。

【0077】

実施例6による顕微鏡観察結果、血液由来のルテリアルの形態は、正常形、鞭毛形、マス(Mass)形、ロッド(Rod)形、および複合形に示されることを確認することができた。

20

【0078】

正常形とは、観察または撮影されたルテリアルが、別の融合やバースティング(Bursting)などの変形を起こすことなく、長径と短径との比が1:1~3:1の形態であって、顕微鏡観察時に小さい点として示される。図4aから図4cに示された形態が正常形のルテリアルである。本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、観察または撮影されたルテリアルの形態が正常形の形態と80~100%一致する場合、正常であると決定することができる。

【0079】

鞭毛形とは、観察または撮影されたルテリアルが、変形または融合を起こして外部に鞭毛が備えられた形態であって、図4iで、鞭毛形のルテリアルが観察された。末期癌に進むに従って、鞭毛形が観察される割合が急激に増加し、4期癌では99.1%と、略大部分の4期癌患者で鞭毛形のルテリアルが観察された。本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、観察または撮影されたルテリアルの形態が鞭毛形の形態と80~100%一致する場合、末期腫瘍が疑われる状態であると決定することができる。前記末期腫瘍であると診断された患者の生存期間は1~4ヶ月であり得る。特に、鞭毛形の場合、長期生存が不可能である。

30

【0080】

マス形(M)とは、観察または撮影されたルテリアルが、バースティング(Bursting)または融合を起こしてサイズおよび形態が正常形から変形されたものであって、長径と短径の差が大きい不規則的な体積形態であって、好ましくは、長径と短径との比が3:1~5:1であることができる。図4gおよび図5は、実施例6によってマス形のルテリアルを暗視野顕微鏡で撮影した写真を示したものであって、多様な形態のマス形が観察される。これを対照群として、観察または撮影されたルテリアルの形態を比較することで疾病を決定することができる。

40

【0081】

ロッド形(L)は、観察または撮影されたルテリアルが、バースティング(Bursting)、変形、または融合を起こして棒(Rod)の形態を呈するものであって、短径と長径との長さ差がマス形より大きい。好ましくは、長径と短径との比が5:1~12:1であることができる。ロッド形は、図6に示すように多様な形態に観察される。ロッド形は、円形または楕円形の単一鎖からなるロッド1形、および2つ以上の単一鎖が結合し

50

てなるロッド 2 形を含むことができる。前記ロッド 1 形は、単一のルテリアルが棒の形態となったものであって、これはパースティング (B u r s t i n g) および / または変形によるものであることができる。前記ロッド 2 形は、2 つ以上のルテリアルが結合して棒の形態となったものであって、これはパースティング (B u r s t i n g) 、変形、および融合の 1 つ以上によるものであることができる。

【 0 0 8 2 】

鞭毛形は、その形状から、大きい範疇でロッド形に含まれることができるが、鞭毛が突出している点で異なる。したがって、ロッド形であるかを先に判断してから、鞭毛形であるかを判断することができる。

【 0 0 8 3 】

複合形は、ロッド形とマス形の融合形態であることができる。一体に形成されたルテリアルの一部がロッド形であり、一部がマス形である形態を複合形と称することができる。

【 0 0 8 4 】

実施例 7 : 種々の種類の癌患者由来のルテリアルの形態に応じた疾病の診断および予後の予測

種々の癌が診断された患者 (表 3) から採取された血液または実施例 1 と同様の方法で前記血液からルテリアルを得て観察した。

【 0 0 8 5 】

前記血液サンプルまたはルテリアルをバッファ溶液に入れ、スライドガラスに付けてカバーガラスで覆った後、暗視野用オイルを一滴加え、暗視野顕微鏡 (N i k o n E c l i p s e N i (1 0 0 0 倍)) および共焦点走査型顕微鏡を用いて観察した。

【 0 0 8 6 】

その結果、表 4 に示したように、肺癌、乳癌、膵臓癌、胆管癌、胸膜中皮腫、甲状腺癌、卵巣癌、胆道癌、前立腺癌、および急性リンパ性白血病の場合、ロッド形 (L) のルテリアルが観察された。

【 0 0 8 7 】

また、肝癌、肝血管肉腫、大腸癌、子宮癌、消化器癌 (胃癌) 、直腸癌、および急性骨髄性白血病の場合、マス形 (M) のルテリアルが観察された。

【 0 0 8 8 】

転移癌患者の場合、マス形とロッド形が複合された複合形のルテリアルが発見され、末期癌患者の場合、図 4 i に示したように、鞭毛形のルテリアルが観察された。

【 0 0 8 9 】

ロッド形からロッド - マス形に進む場合 (L - M) 、癌の発生部位は L 形と同一であるが、転移が進んでいると判断することができる。尚、マス形からマス - ロッド形に進む場合 (M - L) 、癌の発生部位は M 形と同一であるが、転移が進んでいると判断することができる。

【 0 0 9 0 】

10

20

30

【表 3】

癌の種類	進行状態	ルテリアル 形態	図面
肺癌	初期	L	図 7 a
	中期	L	図 7 b ~ e
乳癌	初期	L	図 8 a ~ b
	中期	L	図 8 c
	中期	L-M	図 8 d
	リンパ、腹膜(Peritoneal)及び 心膜(Pericardial)転移	L	図 8 e
膵臓癌	初期	L	図 9 a
	中期	L-M	図 9 b
	中期	L	図 9 c ~ d
胆管癌 (Common Bile Duct Cancer)	骨/肺転移	L	図 10
胸膜中皮腫 (Pleural Mesothelioma)		L	図 11
甲状腺癌	初期	L	図 6
	中期	L	図 12
卵巣癌		L-M	図 13 a ~ b
胆道癌		L	図 14
前立腺癌		L	図 15
急性リンパ性白血病		L	図 16 a
		L-M	図 16 b
肝癌	初期	M	図 17 a
	中期	M	図 17 b ~ c
	肺転移	M	図 17 d
肝血管肉腫 (angiosarcoma of liver)		M	図 18
大腸癌		M	図 19 a ~ c
子宮癌		M	図 20
胃癌		M-L	図 21
直腸癌	中期	M-L	図 22 a
	中期	M	図 22 b
急性骨髄性白血病	中期	M-L	図 23 a
		M	図 23 b ~ c
腎臓癌	中期	M-L	図 24
胃癌	肝臓転移	複合形	図 25 a
胃癌	腹膜転移	複合形	図 25 b
胃癌	腹膜及び肝臓転移	複合形	図 25 c
直腸癌	骨/肺転移	複合形	図 26
前立腺癌	骨転移	複合形	図 27
非塑性肺癌 (NSCLC)	リンパ転移	複合形	図 28
腎臓癌	骨転移	複合形	図 29
急性リンパ性白血病		複合形	図 30

この結果から明らかなように、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、観察または撮影されたルテリアル¹の形態がロッド形である場合、肺癌、乳癌、膵臓癌、胆管癌、胸膜中皮腫、甲状腺癌、卵巣癌、胆道癌、前立腺癌、またはリンパ性血液癌の発生状態であると決定することができる。

【0092】

また、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、観察または撮影されたルテリアル¹の形態がマス形である場合、肝癌、肝血管肉腫、大腸癌、子宮癌、消化器癌（胃癌）、直腸癌、腎臓癌、または骨髄性血液癌の発生状態であると決定することができる。

【0093】

尚、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、ルテリアル¹の形態が複合形である場合、重度の血液癌または転移癌が疑われる状態であると決定することができ、鞭毛形が検出される場合、末期癌が疑われる状態であると決定することができる。

10

【0094】

実施例8：ルテリアル¹のナノトラッキング速度に応じた疾病の診断および予後の予測

1期癌、2期癌、3期癌、および4期癌の患者（それぞれ15人）の血液から、実施例1と同様の方法でルテリアル¹を得た。前記ルテリアル¹をパフファ溶液に入れ、ヤーヌスグリーンB（Janus Green B）で染色した後、光学顕微鏡で観察した。

【0095】

運動性の基準として、200nmのルテリアル¹およびナノトラッキング（3i社製、米国）を用いてルテリアル¹のナノトラッキング速度を測定した。具体的に、ルテリアル¹を明視野顕微鏡で観察した後、ルテリアル¹の中心にトラッキングを設定し、ナノトラッキングを作動すると、ルテリアル¹の移動とともにリアルタイムで移動軌跡を表記し、毎秒当りの速度を計算した（図31）。

20

【0096】

【表4】

	ナノトラッキング速度
健常人	12 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上
1期癌	8.0~11 $\mu\text{m}/\text{sec}$
2期癌	5.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 内外 (2.5~8.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$)
3期癌	0.5~2.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$
4期癌	運動性なし (0~0.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$)

30

【0097】

本実施例による癌患者由来のルテリアル¹のナノトラッキング速度は、ルテリアル¹の運動性を示す。健常人の場合12 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上であるが、早期癌である1期癌から末期癌である4期癌に進むに従って運動性が減少し、4期癌では運動性が殆どないと観察された。したがって、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、観察または撮影されたルテリアル¹のナノトラッキング速度が8.0~11 $\mu\text{m}/\text{sec}$ である場合には1期癌、2.5~8.0 $\mu\text{m}/\text{sec}$ である場合には2期癌、0.5~2.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ である場合には3期癌、0~0.5 $\mu\text{m}/\text{sec}$ である場合には4期癌であると決定することができる。

40

【0098】

実施例9：電子顕微鏡を用いたルテリアル¹の形態に応じた疾病の診断および予後の予測

ルテリアル¹は、電子顕微鏡で観察したときに、単一形、融合形、多重融合形、または膜が裂けた融合形の形態を示し、これを基準に疾病の診断および予後の予測が可能である。

【0099】

単一形は、単一のルテリアル¹が観察される形態であり、融合形は、2~4つのルテリアル¹群集が融合されて観察される形態であり、多重融合形は、前記融合形のルテリアル¹群集

50

が幾重に重なって融合されて観察される形態であり、膜が裂けた融合形は、前記融合形のルテリアル膜が裂けて内部物質が放出された形態である。

【0100】

健常人を始め、末期癌患者を含む多様な被験者(30人)の血液から、実施例1と同様の方法でルテリアルを得た。得られたルテリアルをスライドガラスに固定させ、電子顕微鏡を用いてその形態を観察または撮影した。

【0101】

その結果、健常人の場合、単一形のルテリアルが観察された。また、癌以外の疾病を有する患者の場合、融合形のルテリアルが観察された。したがって、融合形のルテリアルは、疾病が疑われる状態の標識因子であると判断することができる。

10

【0102】

多重融合形のルテリアルが発見された多数の患者で腫瘍が発見された。したがって、多重融合形のルテリアルは、腫瘍が疑われる状態の標識因子であると判断することができる。

【0103】

図32a~図32cは、膜が裂けた融合形の形態を順に電子顕微鏡で撮影した写真を示したものである。膜を形成したルテリアル群集(図32a)が益々増殖し(図32b)、最後には膜が裂けて内部の変形された粒子が放出された(図32c)。このように膜が裂けた融合形のルテリアルが発見された多数の患者で、重度癌が発見された。したがって、膜が裂けた融合形のルテリアルは、重度癌が疑われる状態の標識因子であると判断することができる。

20

【0104】

したがって、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、血液中に存在し、電子顕微鏡上で二重膜およびクリステ構造が確認されるルテリアルの形態と比較して、単一形の形態と80~100%一致する場合には正常であると決定し、融合形の形態と80~100%一致する場合には、疾病が疑われる状態であると決定し、多重融合形の形態と80~100%一致する場合には、腫瘍が疑われる状態であると決定し、膜が裂けた融合形の形態と80~100%一致する場合には、重度の腫瘍が疑われる状態であると決定することができる。

【0105】

したがって、本発明による疾病の診断および予後の予測方法は、ルテリアルを疾病の診断および予後の予測のマーカーとして活用することで、特に、癌患者の診断、治療法の効果有無、治療前後の比較、および治療を受けた患者の長期生存有無を判断するにあたり効果的に用いることができる。

30

【0106】

以上、本発明の内容を詳細に記述したが、当業界において通常の知識を有する者において、このような具体的技術は好ましい実施形態にすぎず、これにより本発明の範囲が制限されるものではないことは明らかである。したがって、本発明の実質的な範囲は、添付の特許請求の範囲とそれらの等価物により定義されるといえる。

【産業上の利用可能性】

40

【0107】

本発明によれば、患者から既に排出された体液中に存在する微細物質であるルテリアルを疾病の診断および予後の予測のマーカーとして活用することで、特に、癌患者の診断、手術法および治療法の効果有無、治療前後の比較、および治療を受けた患者の長期生存有無を判断するにあたり効果的に用いることができる。特に、癌の種類をとわず、癌細胞組織のサイズが5mm以下であるとしても、癌疾患の現在の状態、再発可能性、長期生存可能性に対する判断が可能であるという利点がある。

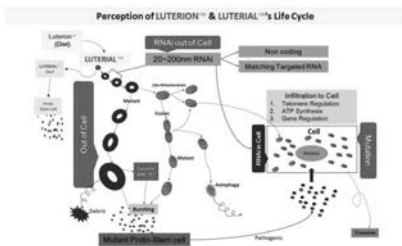
【0108】

また、別の遺伝子分析、高価の装置を用いることなく、顕微鏡で観察するだけで自動で疾病の診断および予後の予測が可能であるため、生体組織検査または高価の映像診断が不

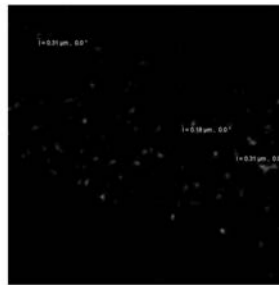
50

要であって、経済的であるという利点がある。

【 図 1 】



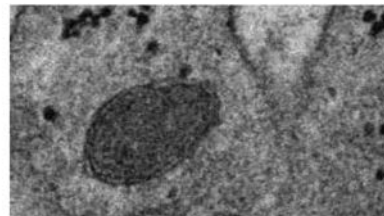
【 図 2 b 】



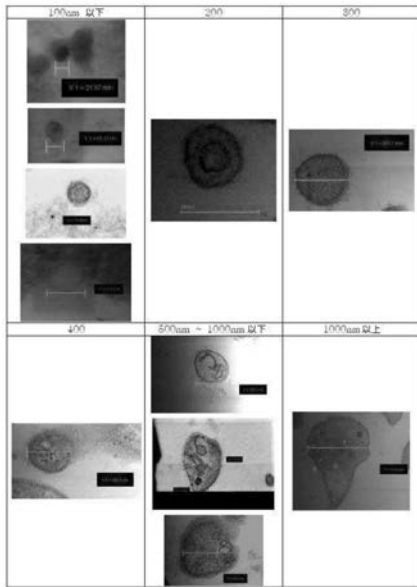
【 図 2 a 】



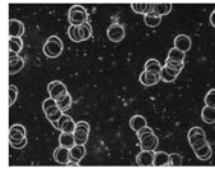
【 図 2 c 】



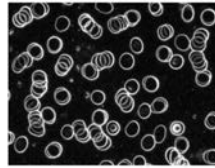
【 図 3 】



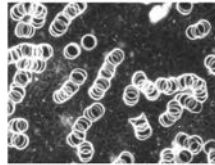
【 図 4 b 】



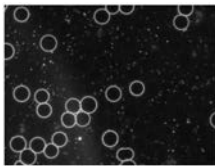
【 図 4 c 】



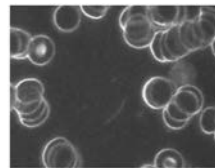
【 図 4 d 】



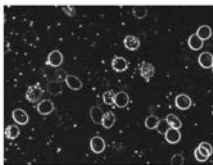
【 図 4 a 】



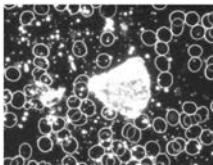
【 図 4 e 】



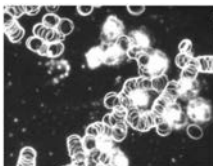
【 図 4 f 】



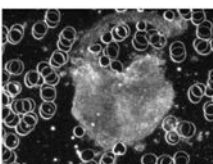
【 図 4 g 】



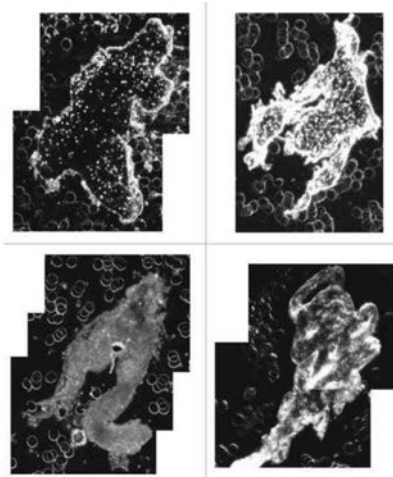
【 図 4 h 】



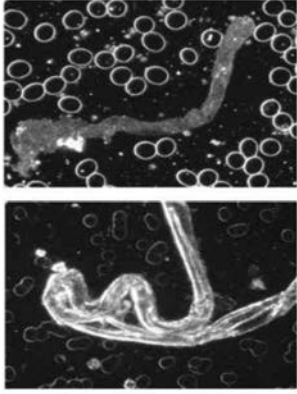
【 図 4 i 】



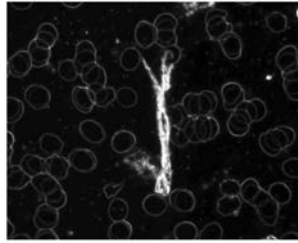
【 図 5 】



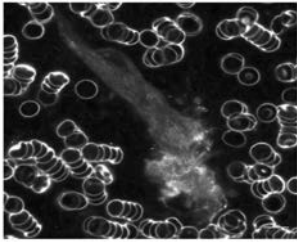
【 図 6 】



【 図 7 b 】



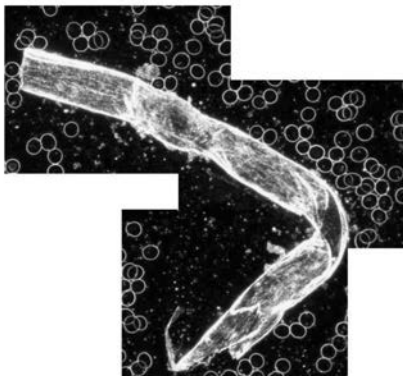
【 図 7 a 】



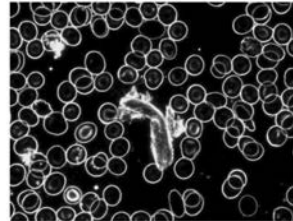
【 図 7 c 】



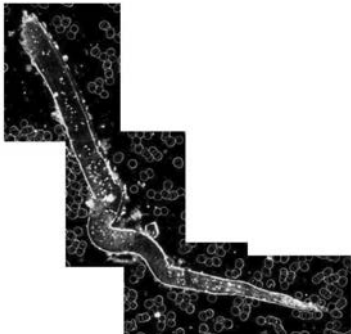
【 図 7 d 】



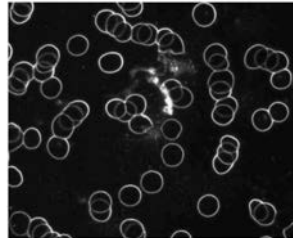
【 図 8 a 】



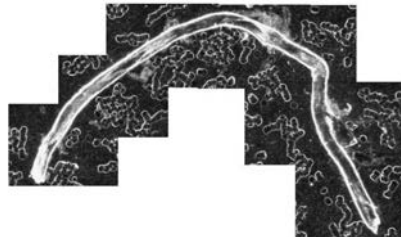
【 図 7 e 】



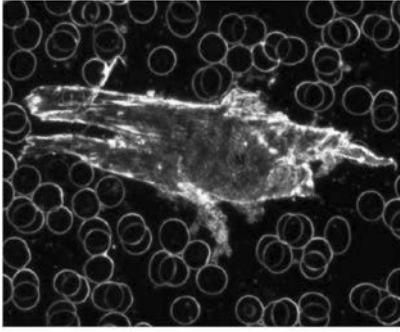
【 図 8 b 】



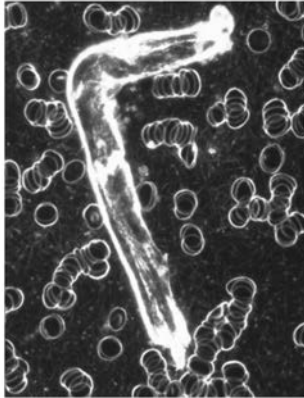
【 図 8 c 】



【 図 8 d 】



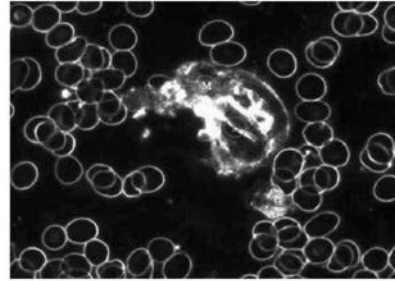
【 図 8 e 】



【 図 9 a 】



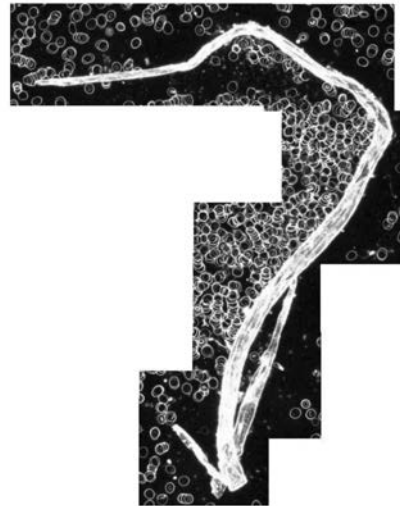
【 図 9 b 】



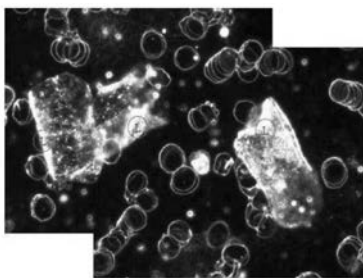
【 図 9 c 】



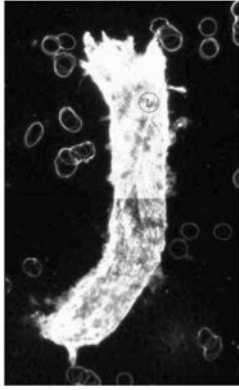
【 図 1 0 】



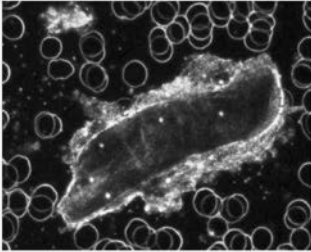
【 図 9 d 】



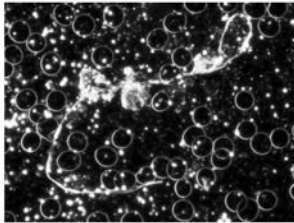
【 図 1 1 】



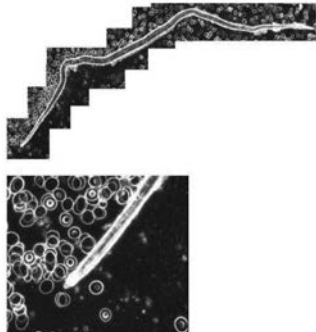
【 図 1 2 】



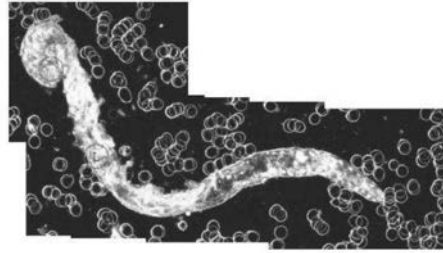
【 図 1 5 】



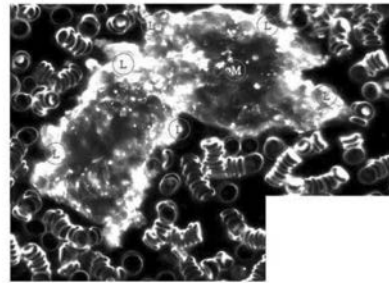
【 図 1 6 a 】



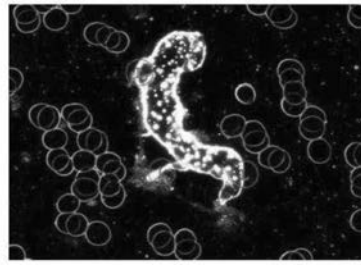
【 図 1 3 a 】



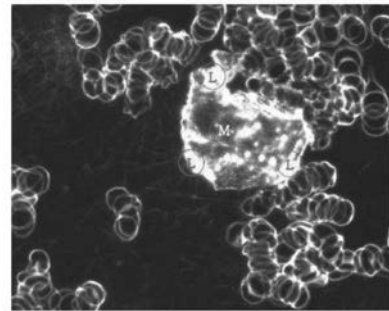
【 図 1 3 b 】



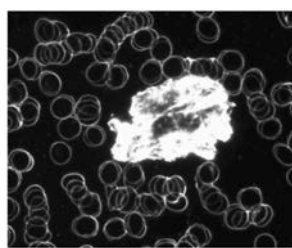
【 図 1 4 】



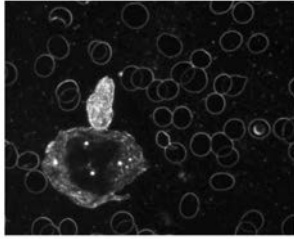
【 図 1 6 b 】



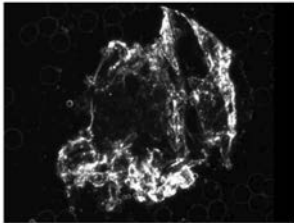
【 図 1 7 a 】



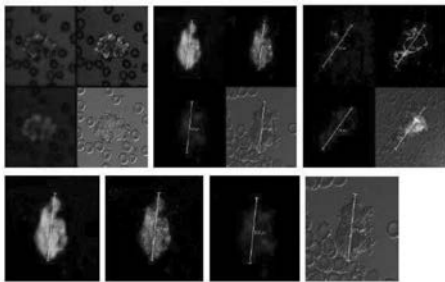
【 図 1 7 b 】



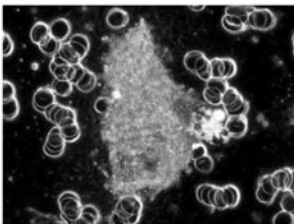
【 図 1 7 c 】



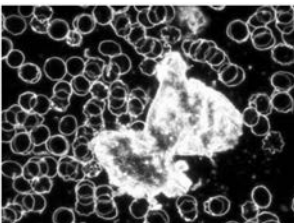
【 図 1 7 d 】



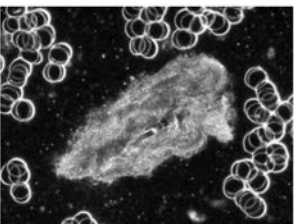
【 図 1 9 b 】



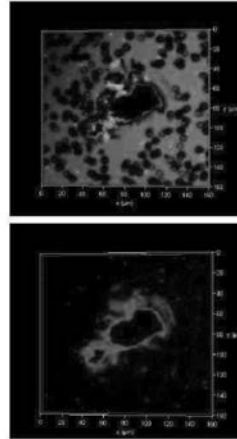
【 図 1 9 c 】



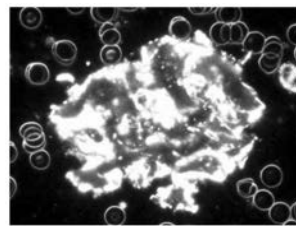
【 図 2 0 】



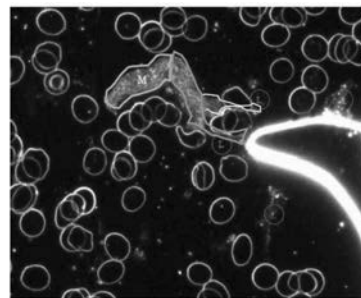
【 図 1 8 】



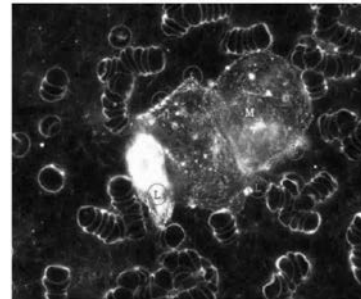
【 図 1 9 a 】



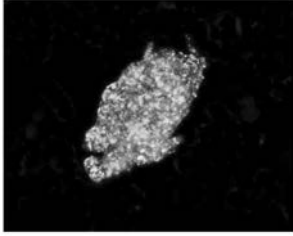
【 図 2 1 】



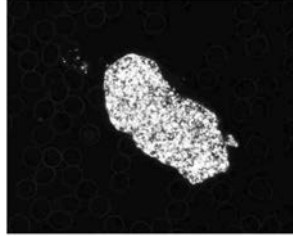
【 図 2 2 a 】



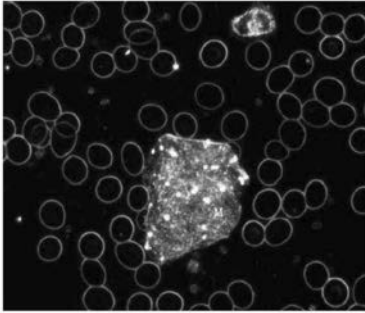
【 図 2 2 b 】



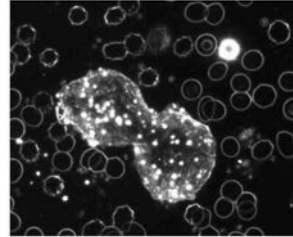
【 図 2 3 b 】



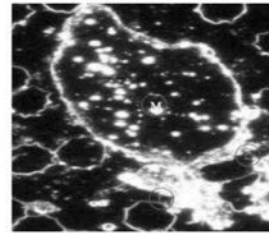
【 図 2 3 a 】



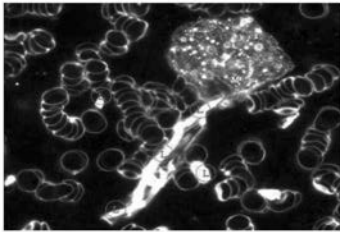
【 図 2 3 c 】



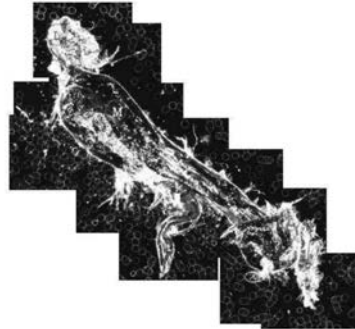
【 図 2 4 】



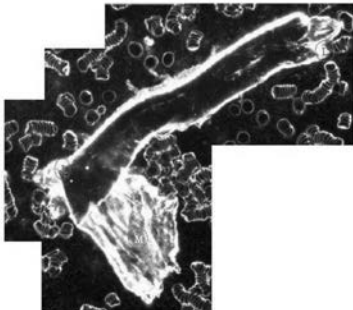
【 図 2 5 a 】



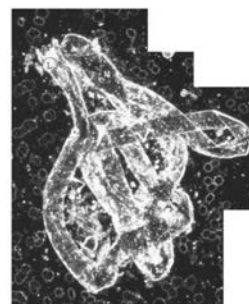
【 図 2 5 c 】



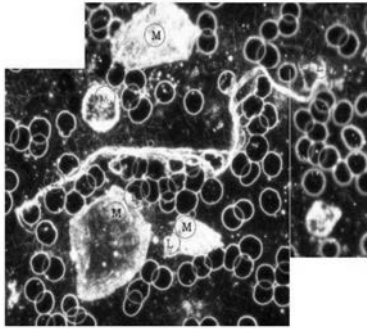
【 図 2 5 b 】



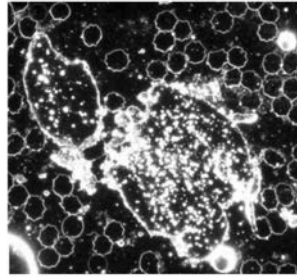
【 図 2 6 】



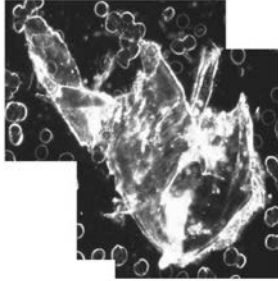
【 図 2 7 】



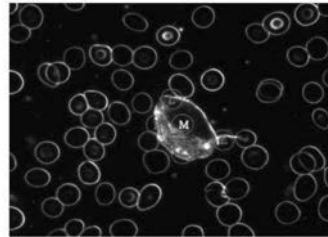
【 図 2 9 】



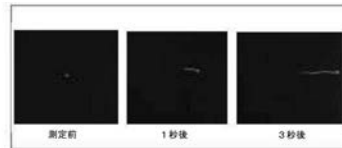
【 図 2 8 】



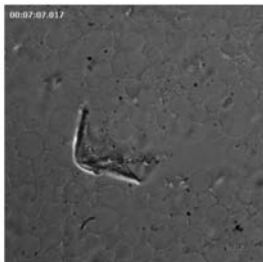
【 図 3 0 】



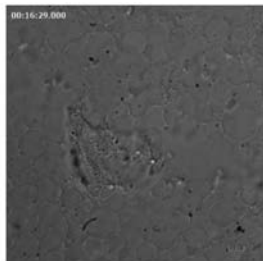
【 図 3 1 】



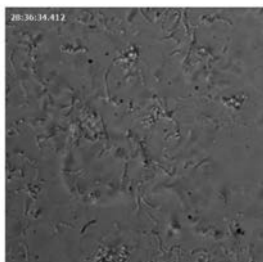
【 図 3 2 a 】



【 図 3 2 b 】



【 図 3 2 c 】



【手続補正書】

【提出日】平成28年3月11日(2016.3.11)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a)患者から既に排出された体液中に存在するルテリアルの数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中1つ以上を顕微鏡を用いて測定するステップと、(b)前記測定されたルテリアルの数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中1つ以上を健常人のルテリアル、正常なルテリアル、または赤血球と比較するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項2】

前記体液は血液であることを特徴とする請求項1に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項3】

前記(a)ステップはルテリアルをローダミン123、ミトトラッカー、アクリジンオレンジ、DAPI及びヤヌスグリーンBからなる群より選択される一つ以上の染料で染色し発色させて、測定することを特徴とする請求項1に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項4】

前記ルテリアルは血液から血清を分離するステップと、前記分離した血清から、100nm~2mmの直径の空隙を備えたフィルターを通過していない沈殿物を分離するステップと、前記分離した沈殿物を洗浄するステップと、を含む方法により分離されることを特徴とする請求項1に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項5】

前記(b)ステップで測定されたルテリアルの直径が赤血球の直径の8~30倍、または測定されたルテリアルの面積が赤血球の面積の8~30倍である場合、疾病を癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項1~4のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項6】

前記(b)ステップで測定されたルテリアルの数が健常人の20%以下であり、長径が20μm以上である場合に、癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項1~4のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項7】

前記(b)ステップはルテリアルの外部に被膜が形成されている場合、癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項1~4のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項8】

前記(b)ステップにおいて、ルテリアルの形態は、正常形、外部に鞭毛が備えられた鞭毛形、マス(M)形、ロッド(L)形、および複合形を含む群から選択されることを特徴とする請求項1に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項9】

前記正常形は、ルテリアルの長径と短径との比が1:1~3:1であり、前記マス形は、長径と短径との比が3:1~5:1であり、前記ロッド形は、長径と短径との比が5:1~12:1であり、前記複合形は、ロッド形とマス形の融合形態、またはロッド形とロ

ッド形の融合形態であることを特徴とする請求項 8 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 10】

前記 (b) ステップでは、測定されたルテリアル形態が (i) ロッド形である場合、肺癌、乳癌、膵臓癌、胆管癌、胸膜中皮腫、甲状腺癌、卵巣癌、胆道癌、前立腺癌、またはリンパ性血液癌の発生状態に決定し、(ii) マス形である場合、肝癌、肝血管肉腫、大腸癌、子宮癌、消化器癌(胃癌)、腎臓癌、直腸癌、または骨髄性血液癌の発生状態に決定し、(iii) 複合形である場合、重度の血液癌または転移癌が疑われる状態に決定し、(iv) 鞭毛形が表れる場合、末期腫瘍が疑われる状態に決定することを特徴とする請求項 8 または請求項 9 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 11】

前記 (b) ステップで、観察または撮影により測定されたルテリアルナノトラッキング速度が $8.0 \sim 11 \text{ nm/sec}$ である場合には 1 期癌が疑われる状態、 $2.5 \sim 8.0 \text{ nm/sec}$ である場合には 2 期癌が疑われる状態、 $0.5 \sim 2.5 \text{ nm/sec}$ である場合には 3 期癌が疑われる状態、 0.5 nm/sec 未満の場合には 4 期癌が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 12】

(a) 患者から既に排出された体液中に存在するルテリアル形態を電子顕微鏡で測定するステップと、(b) 前記測定されたルテリアル形態を、単一形、融合形、多重融合形、および膜が裂けた融合形からなる群より選択される形態に決定するステップと、(c) 前記決定された形態を基準に疾病の状態を決定するステップと、を含む、疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 13】

前記体液は血液であることを特徴とする請求項 12 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 14】

前記ルテリアルをローダミン 123、ミトトラッカー、アクリジンオレンジ、DAPI 及びヤヌスグリーン B からなる群より選択される一つ以上の染料で染色し発色が確認され、電子顕微鏡上で二重膜およびクリステ構造が確認されることを特徴とする請求項 12 に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 15】

前記 (c) ステップは、前記測定されたルテリアル形態が単一形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合、正常であると決定し、融合形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合には、疾病が疑われる状態であると決定し、多重融合形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合には、腫瘍が疑われる状態であると決定し、膜が裂けた融合形の形態と $80 \sim 100\%$ 一致する場合には、重度の腫瘍が疑われる状態であると決定することを特徴とする請求項 12 ~ 14 のいずれか一項に記載の疾病の診断および予後の予測のための情報を提供する方法。

【請求項 16】

(a) 患者から既に排出された体液中に存在するルテリアル数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中 1 つ以上を顕微鏡を用いて測定するステップと、(b) 前記測定されたルテリアル数、サイズ(直径または面積)、形態、被膜形成有無、およびナノトラッキング速度の中 1 つ以上を健常人のルテリアル、正常なルテリアル、または赤血球と比較するステップと、を含む、疾病の診断および予後予測の補助のための方法。

【請求項 17】

(a) 患者から既に排出された体液中に存在するルテリアル形態を電子顕微鏡で測定するステップと、(b) 前記測定されたルテリアル形態を、単一形、融合形、多重融合


形、および膜が裂けた融合形からなる群より選択される形態に決定するステップと、(c)前記決定された形態を基準に疾病の状態を決定するステップと、を含む、疾病の診断および予後予測の補助のための方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/000393

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/48(2006.01)i</i> According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/53; G01N 21/64; A61K 51/00; A61B 5/02; C12Q 1/70; C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/58; G01N 33/48 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Luterial, disease, diagnosis, micro materials in blood		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012-135844 A2 (CORNELL UNIVERSITY) 04 October 2012 See claims 1-77.	1-15
A	WO 2006-054296 A2 (SPECTRUM DYNAMICS (ISRAEL) LTD.) 26 May 2006 See the entire document.	1-15
A	WO 2009-100029 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 13 August 2009 See the entire document.	1-15
A	KR 10-2003-0033134 A (CHANG, Jun Keun et al.) 01 May 2003 See the entire document.	1-15
A	WO 00-22432 A1 (DOGLIA et al.) 20 April 2000 See the entire document.	1-15
A	US 2009-0311664 A1 (FONG et al.) 17 December 2009 See the entire document.	1-15
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 APRIL 2014 (02.04.2014)		Date of mailing of the international search report 03 APRIL 2014 (03.04.2014)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korea Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seomsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/000393

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2012-135844 A2	04/10/2012	WO 2012-135844 A3	22/11/2012
WO 2006-054296 A2	26/05/2006	AU 2002-226655 B2	07/09/2006
		AU 2003-276658 A1	07/06/2004
		AU 2004-203126 A1	27/01/2005
		AU 2008-202189 A1	04/12/2008
		CA 2435205 A1	01/08/2002
		CA 2610256 A1	07/12/2006
		CN 1469720 A	21/01/2004
		CN 1545395 A	10/11/2004
		CN 1981210 A	13/06/2007
		EP 1573495 A1	14/09/2005
		JP 2004-512502 A	22/04/2004
		JP 2004-521680 A	22/07/2004
		US 2002-0099310 A1	25/07/2002
		US 2002-0194096 A1	19/12/2002
		US 2003-0086546 A1	08/05/2003
		US 6836540 B2	28/12/2004
		US 7176466 B2	13/02/2007
		US 7601966 B2	13/10/2009
		WO 2004-042546 A1	21/05/2004
		WO 2005-067383 A2	28/07/2005
		WO 2005-067383 A3	01/08/2006
		WO 2005-104939 A2	10/11/2005
		WO 2005-104939 A3	18/05/2007
		WO 2005-118659 A2	15/12/2005
		WO 2005-118659 A3	18/05/2006
		WO 2005-119025 A2	15/12/2005
		WO 2005-119025 A3	05/07/2007
		WO 2006-051531 A2	18/05/2006
		WO 2006-051531 A3	28/09/2006
		WO 2008-144531 A1	27/11/2008
WO 2009-100029 A1	13/08/2009	AU 2009-212543 A1	13/08/2009
		CA 2713909 A1	13/08/2009
		EP 2245199 A1	03/11/2010
		EP 2604704 A1	19/06/2013
		JP 2011-510663 A	07/04/2011
		KR 10-2010-0127768 A	06/12/2010
		US 2010-0196426 A1	05/08/2010
		US 2011-0003704 A1	06/01/2011
		US 2011-0053157 A1	03/03/2011
KR 10-2003-0033134 A	01/05/2003	NONE	
WO 00-22432 A1	20/04/2000	AU 1999-63357 A1	01/05/2000
		CA 2346386 A1	20/04/2000
		EP 1119768 A1	01/08/2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/000393

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2009-0311664 A1	17/12/2009	CA 2634591 A1	05/07/2007
		EP 1979000 A2	15/10/2008
		WO 2007-075879 A2	05/07/2007
		WO 2007-075879 A3	23/08/2007

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2014/000393

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))
G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/48(2006.01)i

B. 조사된 분야
조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
G01N 33/53; G01N 21/64; A61K 51/00; A61B 5/02; C12Q 1/70; C12Q 1/68; G01N 33/50; G01N 33/58; G01N 33/48

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드:루테리알, 질병, 진단, 혈액 내 미세물질

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2012-135844 A2 (CORNELL UNIVERSITY) 2012.10.04. 청구항 1-77 참조.	1-15
A	WO 2006-054296 A2 (SPECTRUM DYNAMICS (ISRAEL) LTD.) 2006.05.26. 전체 문헌 참조.	1-15
A	WO 2009-100029 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2009.08.13. 전체 문헌 참조.	1-15
A	KR 10-2003-0033134 A (장준근 외) 2003.05.01. 전체 문헌 참조.	1-15
A	WO 00-22432 A1 (DOGLIA 외) 2000.04.20. 전체 문헌 참조.	1-15
A	US 2009-0311664 A1 (FONG 외) 2009.12.17. 전체 문헌 참조.	1-15

추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:
 "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌
 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌
 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌
 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌
 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌
 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌
 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.
 "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.
 "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일 2014년 04월 02일 (02.04.2014)	국제조사보고서 발송일 2014년 04월 03일 (03.04.2014)
--	---

ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140	심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371
---	------------------------------------

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2014/000393

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2012-135844 A2	2012/10/04	WO 2012-135844 A3	2012/11/22
WO 2006-054296 A2	2006/05/26	AU 2002-226655 B2	2006/09/07
		AU 2003-276658 A1	2004/06/07
		AU 2004-203126 A1	2005/01/27
		AU 2008-202189 A1	2008/12/04
		CA 2435205 A1	2002/08/01
		CA 2610256 A1	2006/12/07
		CN 1469720 A	2004/01/21
		CN 1545395 A	2004/11/10
		CN 1981210 A	2007/06/13
		EP 1573495 A1	2005/09/14
		JP 2004-512502 A	2004/04/22
		JP 2004-521680 A	2004/07/22
		US 2002-0099310 A1	2002/07/25
		US 2002-0194096 A1	2002/12/19
		US 2003-0086546 A1	2003/05/08
		US 6836540 B2	2004/12/28
		US 7176466 B2	2007/02/13
		US 7601966 B2	2009/10/13
		WO 2004-042546 A1	2004/05/21
		WO 2005-067383 A2	2005/07/28
		WO 2005-067383 A3	2006/06/01
		WO 2005-104939 A2	2005/11/10
		WO 2005-104939 A3	2007/05/18
		WO 2005-118659 A2	2005/12/15
		WO 2005-118659 A3	2006/05/18
		WO 2005-119025 A2	2005/12/15
		WO 2005-119025 A3	2007/07/05
		WO 2006-051531 A2	2006/05/18
		WO 2006-051531 A3	2006/09/28
		WO 2008-144531 A1	2008/11/27
WO 2009-100029 A1	2009/08/13	AU 2009-212543 A1	2009/08/13
		CA 2713909 A1	2009/08/13
		EP 2245199 A1	2010/11/03
		EP 2604704 A1	2013/06/19
		JP 2011-510663 A	2011/04/07
		KR 10-2010-0127768 A	2010/12/06
		US 2010-0196426 A1	2010/08/05
		US 2011-0003704 A1	2011/01/06
		US 2011-0053157 A1	2011/03/03
KR 10-2003-0033134 A	2003/05/01	없음	
WO 00-22432 A1	2000/04/20	AU 1999-63357 A1	2000/05/01
		CA 2346386 A1	2000/04/20
		EP 1119768 A1	2001/08/01

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2014/000393

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2009-0311664 A1	2009/12/17	CA 2634591 A1	2007/07/05
		EP 1979000 A2	2008/10/15
		WO 2007-075879 A2	2007/07/05
		WO 2007-075879 A3	2007/08/23

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ

(71) 出願人 516012243

チョイ ソクフン

CHOI, Suk Hoon

大韓民国, 135-787, ソウル, カンナム - グ, アプクジョン - 口 29 - ギル, 71, 12 - 1403

(71) 出願人 516012254

チョイ チャンフン

CHOI, Chang Hoon

大韓民国, 135-787, ソウル, カンナム - グ, アプクジョン - 口 29 - ギル, 71, 12 - 1403

(74) 代理人 100090251

弁理士 森田 憲一

(74) 代理人 100139594

弁理士 山口 健次郎

(74) 代理人 100185915

弁理士 長山 弘典

(74) 代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72) 発明者 クォン ヨンア

大韓民国, 135-787, ソウル, カンナム - グ, アプクジョン - 口 29 - ギル, 71, ヒョンデ アパートメント, 12 - 1403

(72) 発明者 チョイ ウォンチョル

大韓民国, 464-842, キョンギ - ド, クワンジュ - シ, トエチョン - ミョン, チョンジナム - 口, 1050-52

(72) 発明者 チョイ ソクフン

大韓民国, 135-787, ソウル, カンナム - グ, アプクジョン - 口 29 - ギル, 71, 12 - 1403

(72) 発明者 チョイ チャンフン

大韓民国, 135-787, ソウル, カンナム - グ, アプクジョン - 口 29 - ギル, 71, 12 - 1403

(72) 発明者 クォン ソンピル

大韓民国, 138-747, ソウル, ソンパ - グ, トンナム - 口, 193, サンヨン アパートメント, 103-103

(72) 発明者 チョン ヒョンジョン

アメリカ合衆国, 02143, マサチューセッツ州, サマービル, セントラル ストリート 19, アパートメント 28

Fターム(参考) 2G045 AA25 BA14 BB04 CA25 FA16