

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号

特開2023-55865
(P2023-55865A)

(43)公開日 令和5年4月18日(2023.4.18)

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

F I

C 1 2 N 5/07

Z N A

審査請求 有 請求項の数 4 O L 外国語出願 (全49頁)

(21)出願番号	特願2023-14621(P2023-14621)	(71)出願人	516012232
(22)出願日	令和5年2月2日(2023.2.2)		チョイ ウォンチョル
(62)分割の表示	特願2020-179573(P2020-179573)		CHOI, Won Cheol
)の分割		大韓民国, 2 2 1 4 3, インチョン, ナム - グ, キョンウォン - デロ, 8 8 4, ザ ワールド ステイト アパートメント, 1 0 3 - 4 0 1
原出願日	平成26年5月9日(2014.5.9)	(71)出願人	516012221
(31)優先権主張番号	10-2014-0004525		クォン ヨンア
(32)優先日	平成26年1月14日(2014.1.14)		KWON, Young Ah
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)		大韓民国, 1 3 5 - 7 8 7, ソウル, カンナム - グ, アブクジョン - ロ 2 9 - ギル, 7 1, ヒョンデ アパートメント, 1 2 - 1 4 0 3
		(71)出願人	516012243

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ルテリアル、並びにその分離および培養方法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】患者または健常人から既に排出された体液中に存在するミトコンドリア類似ナノサイズ粒子の濃縮方法を提供する。

【解決手段】血小板および血液由来物質を分離させた血液をフィルタに通過させたのち遠心分離して、ミトコンドリア類似ナノサイズ粒子を含む上清を得る。得られた液体から、粒子が、例えば下記に示す性質の一つ以上を有するか否かを評価することで、ミトコンドリア類似ナノサイズ粒子を同定する。(1)免疫蛍光試験で、ヤーンスグリーンB、アクリジンオレンジ、およびローダミン123に陽性の発色反応を示す(2)健康な状態では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子の発現特性を示し800nm未満のサイズを有する(3)疾病状態では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子だけでなく、真核細胞であるストレプトファイト遺伝子を発現し、800nmを超えるサイズを有する

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次のステップを含むルテリアル分離方法：

- (a) 血液から血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離する第 1 の分離ステップと、
- (b) 前記血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離させた血液を遠心分離する第 2 の分離ステップと、
- (c) 前記遠心分離により得られた上清からルテリアルを分離する第 3 の分離ステップと、
- (d) 前記分離されたルテリアルを洗浄するステップ。

10

【請求項 2】

前記血液は哺乳動物由来であることを特徴とする、請求項 1 に記載のルテリアル分離方法。

【請求項 3】

前記血液はヒト由来であることを特徴とする、請求項 2 に記載のルテリアル分離方法。

【請求項 4】

前記第 1 の分離ステップは $0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$ の空隙を有するフィルタに通過させ、濾過されていない物質は分離するステップをさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のルテリアル分離方法。

20

【請求項 5】

200 nm 、 400 nm 、 600 nm 、 800 nm 、および 1000 nm のフィルタを順に用いて、各々 $50 \sim 200 \text{ nm}$ 、 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 、 $400 \sim 600 \text{ nm}$ 、 $600 \sim 800 \text{ nm}$ 及び $800 \sim 1000 \text{ nm}$ のサイズのルテリアルに分類することをさらに含むことを特徴とする、請求項 4 に記載のルテリアル分離方法。

【請求項 6】

前記第 2 の分離ステップは $1200 \sim 5000 \text{ rpm}$ で $5 \sim 10$ 分間遠心分離を繰り返すことにより行うことを特徴とする、請求項 1 に記載のルテリアル分離方法。

【請求項 7】

前記第 2 の分離ステップにおいてエキソソーム (exosome) が除去されることを特徴とする請求項 1 に記載のルテリアル分離方法。

30

【請求項 8】

前記第 3 の分離ステップは遠心分離により得られた上清に可視光線を照射すること、及び可視光線が照射された位置に集まる運動性を有するルテリアル粒子をピペットを用いて分離して行うことを特徴とする請求項 1 に記載のルテリアル分離方法。

【請求項 9】

前記洗浄するステップは前記第 3 の分離ステップから得られたルテリアルを直径 50 nm の空隙を有するフィルタに通過させること、濾過されていない部分のみを洗浄すること、それによってルテリアルを得ることにより行われることを特徴とする請求項 1 に記載のルテリアル分離方法。

40

【請求項 10】

次の特性の一つ以上を有する体液由来ルテリアル：

- (a) 免疫蛍光試験で、ヤヌスグリーン B (Janus green B)、アクリジンオレンジ (Acridine Orange)、およびローダミン 123 (Rhodamine 123) に陽性の発色反応を示す；
- (b) 最適状態 ($\text{pH } 7.2 \sim 7.4$) において、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子の発現特性を示し、 $30 \sim 800 \text{ nm}$ のサイズを有する；
- (c) 酸性化状態では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子だけでなく、真核細胞であるストレプトファイト (Streptophyta) 遺伝子を発現し、 $400 \text{ nm} \sim 2000 \text{ nm}$ またはそれ以上までサイズが大きくなる；

50

- (d) 正常条件でATP生成に関与する；
- (e) ミトコンドリアおよびエキソソームとは全く異なる細胞または細胞類似構造体である；
- (f) 定常状態では円形または楕円形であり、患者由来の場合は、定常状態に比べてサイズ（長径800nm以上）が大きく、形態が均一ではない変異ルテリアルが発生する；
- (g) 二重膜構造を有しており、付着性がある；
- (h) 細胞内または外の両方に存在可能である；
- (i) 運動性を有し、融合（fusion）および/または分裂（fission）の生態様式を示す；
- (j) 特定条件で変異ルテリアルはバースティング（Bursting）し、バースティング（Bursting）後には幹細胞性（stemness）を有する； 10
- (k) p53遺伝子およびテロメアの調節機能を有する。

【請求項11】

前記体液は哺乳動物由来の血液、精液、腸液、唾液、または細胞液であることを特徴とする請求項10に記載のルテリアル。

【請求項12】

請求項10に記載のルテリアルに水分を添加し、IR光線照射下、18～30℃で培養することを含むルテリアルの培養方法。

【請求項13】

前記培養前及び後において、ルテリアルのサイズは、各々50～200nm及び300～800nmであることを特徴とする請求項12に記載のルテリアルの培養方法。 20

【請求項14】

前記水分は、食塩水またはPBS溶液であることを特徴とする請求項13に記載のルテリアルの培養方法。

【請求項15】

次のステップを含むルテリアルの分離方法：

- (a) 体液を遠心分離して上清を得て、この上清を2～5μmの孔のサイズのフィルタで濾過するステップ；と、
- (b) 前記濾過された溶液を2次遠心分離して上清を得て、この上清を0.5～2μmの孔のサイズのフィルタで濾過するステップ。 30

【請求項16】

(c) 前記(b)ステップにおいて濾過された溶液に可視光線を照射して、そして可視光線が照射された位置に集まる運動性を有するルテリアル粒子をピペットを用いて分離するステップをさらに含むことを特徴とする請求項15に記載のルテリアルの分離方法。

【請求項17】

前記体液は哺乳動物由来の血液、精液、腸液、唾液、または細胞液であることを特徴とする請求項15に記載のルテリアルの分離方法。

【請求項18】

前記1次遠心分離は2000～4000rpmで5～30分行うことを特徴とする請求項15に記載のルテリアルの分離方法。 40

【請求項19】

前記2次遠心分離は3000～7000rpmで5～20分行うことを特徴とする請求項15に記載のルテリアルの分離方法。

【請求項20】

請求項10に記載のルテリアルを有効成分として含有する抗癌組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、体液由来のミトコンドリア類似微細物質であるルテリアル、並びにその分離および培養方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液中の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 and/or PF4; Thromb. Haemost. (1999) 82:794; J. Boil. 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; Cardiovasc. Res. (2001) 49(5):88)。このように、生物学的試料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。そこで、小囊に関わるRNA および他の生物学的指標と小囊の特徴を、診断、予後、または治療診断に提供しようとする試みもあった (WO2011/127219 参照)。

10

【0003】

一方、癌 (cancer) は、細胞が無限に増殖して正常の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、実質には何れの組織でも発生し得る。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で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により摘出しないと、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、発病初期段階では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、遺伝子の突然変異が誘発され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

【0004】

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。

40

【0005】

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の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、その内容を2013年7月12日付けで特許出願している (韓国特許出願第10-2013-0082060号)。本発明者らは、上記の微細物質を「ルテリアル (luterial)」と命名した。

【0006】

50

しかし、上記の微細物質を臨床に適用することができるように、ルテリアルを効率的に分離および培養する技術は未だに知られていない。

【0007】

そこで、本発明者らは、患者または健常人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効果的に分離することができる方法を開発し、その方法により分離されたルテリアルの特性を調べることにより本発明を成すに至った。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、患者または健常人から既に排出された体液中に存在するルテリアルの分離および培養方法を提供することにある。 10

【0009】

本発明の他の目的は、原核細胞 (prokaryote) と真核細胞 (Eukaryote) の中間段階の融合特性を有し、免疫蛍光 (Immunofluorescence) 試験でヤーンスグリーン B (Janus Green B)、ミトトラッカーレッド (Mito Tracker Red)、ローダミン 123 (Rhodamine 123) に陽性の免疫化学蛍光染色反応を示し、運動性を有するとともに、ATP 生産などの特徴を有するルテリアルを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0010】

上記の目的を達成するために、本発明は、血液から血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離する第 1 の分離ステップと、前記血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離させた血液を遠心分離する第 2 の分離ステップと、前記遠心分離により得られた上清からルテリアルを分離する第 3 の分離ステップと、前記分離されたルテリアルを洗浄するステップと、を含む、ルテリアルの分離方法を提供する。 20

【0011】

本発明は、また、体液を 1 次遠心分離した後、上清を 2 ~ 5 μm のフィルタで濾過するステップと、前記濾過された溶液を 2 次遠心分離した後、上清を 0.5 ~ 2 μm のフィルタで濾過するステップと、を含む、ルテリアルの分離方法を提供する。

【0012】

本発明は、また、次の特性の一つ以上を有する体液由来ルテリアルを提供する：

- (a) 免疫蛍光試験で、ヤーンスグリーン B (Janus green B)、アクリジンオレンジ (Acridine Orange)、およびローダミン 123 (Rhodamine 123) に陽性の発色反応を示す；
- (b) 最適状態 (pH 7.2 ~ 7.4) では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子の発現特性を示し、30 ~ 800 nm のサイズを有する；
- (c) 酸性化状態では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子だけでなく、真核細胞であるストレプトファイト (Streptophyta) 遺伝子を発現し、400 nm 以上から 2000 nm 以上までサイズが大きくなる；
- (d) 正常条件で ATP 生成に関与する； 40
- (e) ミトコンドリアおよびエキソソームとは全く異なる細胞または細胞類似体である；
- (f) 定常状態では円形乃至楕円形であり、患者由来の場合は、定常状態に比べてサイズ (長径 800 nm 以上) が大きく、形態が均一ではない変異ルテリアルが発生する；
- (g) 二重膜構造を有しており、付着性がある；
- (h) 細胞内または外の両方に存在可能である；
- (i) 運動性を有し、フュージョン (fusion) および / またはフィッション (fission) の生態様式を示す；
- (j) 特定条件で変異ルテリアルはバースティング (Bursting) し、バースティング (Bursting) 後には幹細胞性 (stemness) を有する；
- (k) p53 遺伝子およびテロメア (telomere) の調節機能を有する。 50

【0013】

本発明は、また、前記分離された体液由来ルテリアルに水分を添加し、IR光線照射下、18~30 で培養することを特徴とするルテリアルの培養方法を提供する。

【0014】

本発明は、また、ルテリアルを有効成分として含有する抗癌組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】血液由来微細物質であるルテリアルを共焦点レーザー走査顕微鏡 (Confocal Laser Scanning Microscope、Zeiss)、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope)、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope)、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope)、および共焦点スキャナ (Leica TCS SP8) で撮影した写真である。

10

【図2】ルテリアルのサイズ毎の形状や形態を示した写真である ((a): 39.6~49.0 nm、ミトトラッカーレッド (Mito tracker Red) で染色した後の超高解像度顕微鏡 (SR GSD) 写真; (b): 50.1~85.1 nm、ミトトラッカーレッド (Mito tracker Red) で染色した後の超高解像度顕微鏡 (SR GSD) 写真; (c): 76.5 nm、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope) 写真; (d): 160 nm、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope) 写真; (e): 170~230 nm、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope) 写真、二重膜構造; (f): 234 nm、ヤーヌスグリーンB (Janus green B) で染色した後の写真; (g): 250 nm、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope) 写真; (h): 361 nm、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope) 写真; (i): 650.1 nm、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope) 写真; (j): 5 μm以上のサイズのルテリアルをDAPI (4',6 diamidino 2 phenylindole) で染色した後のレーザー走査顕微鏡 (Laser Scanning Microscope) 写真)。

20

30

【図3】ルテリアルをローダミン123 (Rhodamine 123) で染色した後、その発色有無を観察した写真である。

【図4】ルテリアルをミトトラッカー (Mito tracker) で染色した後、その発色有無を観察した写真である。

【図5】ルテリアルをアクリジンオレンジ (Acridine Orange) で染色した後、その発色有無を観察した写真である。

【図6】ルテリアルをDAPI (4',6 diamidino 2 phenylindole) で染色した後、その発色有無を観察した写真である。

【図7】ナノトラッカーを用いてルテリアルの運動性を測定した写真である ((a) 測定前; (b) 1秒後; (c) 3秒後)。

40

【図8】正常のルテリアルのライフサイクルAと突然変異されたルテリアルのライフサイクルBを示したものである。

【図9】突然変異ルテリアルのライフサイクルおよび特性を示したものである。

【図10】癌患者の体液から分離したルテリアルを示したものであって、(a) は長い枝が伸びて形態が変わった癌患者由来ルテリアルを示し、(b) はDAPI (4',6 diamidino 2 phenylindole)、ミトトラッカー (Mito tracker)、およびローダミン123 (Rhodamine 123) で染色した癌患者由来ルテリアルを示す。

【図11】ルテリアルのライフサイクルを示したものである。

【図12】ルテリアル、変異ルテリアルのサイズを確認した写真である。

50

【図13】ルテリアル原子顕微鏡プローブを用いてスクラッチングし、膜を除去した写真である。

【図14】(a)、(b)は、変異されてフュージョン状態のルテリアルを原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope) で撮影したものであり、(c)、(d)は、変異されたルテリアルの膜をカンチレバーで剥離させた後、原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope) で撮影したものである。

【図15】ルテリアル原子顕微鏡プローブを用いてスクラッチングした後、DAPI染色写真によりDNAを確認した写真である。

【図16】(a)は、ルテリアル中にDNAが含有されているか否かを分析した、バイオアナライザの結果であり、(b)は、ルテリアルのサイズによって、DNAのGAPDH遺伝子発現において差が生じることをqRT-PCRで示したものである。 10

【図17】ルテリアル中にRNAが含有されているか否かを分析した、バイオアナライザの結果である。

【図18】ルテリアル添加を異ならせた培養液において、ルシフェリンルシフェラーゼ (luciferin luciferase) 反応とルミノメータ (luminometer) を用いてATP含量を測定したものである (SSH:三聖丸、SSF:フィセチン、12h:実験前に予め37℃で12時間活性化)。

【図19】ルテリアルとエキソソームの違いを観察できる写真であって、20~120nmのサイズのうち、膜の区分が明確でなく、内部色が比較的薄いものがエキソソームであり、50~800nmのサイズのうち、膜の区分が明確であるか、内部が満たされているものがルテリアルである。 20

【図20】ルテリアル (luteria l)、エキソソーム (exosome)、および微小胞 (microvesicle) の形態を比較できるように示した写真である。

【図21】本発明の一実施例で構築されたルテリアルライブラリの電子顕微鏡 (TEM) 写真である。

【図22】ルテリアルの培養によるサイズの変化を示した共焦点レーザー走査顕微鏡写真である。

【図23】ルテリアルの培養による形態およびサイズの変化を示した写真である。

【図24】健康人 (基準: pH 7.2~7.4) の血液由来ルテリアルのサイズ毎の16S rRNA塩基配列を分析して、相同性を示す類似バクテリア構成を示したものである (a): 100nm以下; (b): 100~200nm; (c): 200~400nm; (d): 400~800nm)。 30

【図25】疲労・疾病状態 (pH 7.0以下) の血液および精液由来ルテリアルのサイズ毎の16S rRNA塩基配列を分析して、相同性を示す類似バクテリア構成を示したものである (a): 100nm以下; (b): 100~200nm; (c): 200~400nm; (d): 400~800nm)。

【図26】(a)、(b)および(c)は、血液由来ルテリアルの16S rRNA塩基配列に基づいた系統発生図を示したものである。

【図27】卵巣癌細胞株であるSKOV3およびA2780細胞株に対して、100~800nmのサイズのルテリアルと市販中の抗癌剤cisplatinを濃度毎に処理した後、MTT分析法による細胞生存率を示したものである。 40

【発明を実施するための形態】

【0016】

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じの意味を有する。通常、この明細書において用いられた命名法及び以下に記載の実験方法は、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。

【0017】

本発明で用いる用語「ルテリアル (luteria l)」は、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800nm 50

まで（正常フィッシュンステップ50～800nm/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。ルテリアルは、（1）原核細胞と真核細胞の中間段階の融合特性を有する細胞または細胞類似体であり；（2）血液、精液、腸液、唾液、細胞液などの体液に存在し；（3）免疫蛍光試験で、ヤーンスグリーンB（Janus green B）、アクリジンオレンジ（Acridine Orange）、およびローダミン123（Rhodamine 123）に陽性の発色反応を示し；（4）最適状態（pH7.2～7.4）では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子の発現特性を示し、30～800nmのサイズを有しており；（5）酸性化状態では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子だけでなく、真核細胞由来遺伝子の発現特性を示すが、主にストレプトファイト（Streptophyta）遺伝子を発現し、400nm以上から2000nm以上までサイズが大きくなり；（6）正常条件でATP生成に関与し；および（7）ミトコンドリアとは異なって、エキソソームとは全く異なる細胞または細胞類似体である。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、腸液、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。

10

20

30

40

50

【0018】

正常のルテリアルのサイズは50～800nmであり、変異ルテリアルは融合して変異体を形成し、数十マイクロメートルのサイズを有する。ルテリアルは、mRNAとmiRNAだけでなく、DNAも含む未成熟ミトコンドリア段階のものを指すことができる。ルテリアルは、消化液に溶解せず、血液に流入される特徴を有する。

【0019】

ルテリアルは、シグナリング、細胞分化、細胞死滅だけでなく、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に関連することを見出した。

【0020】

正常のルテリアル（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、健康な人や動物の血液中において、ルテリアルは、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し、特定波長を照射すると、反応発現として光エネルギー増幅機能をし、葉緑体のように反応することが確認される。そのため、かかるルテリアルが正常の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。

【0021】

このように、役割を正常に果たすことができない突然変異ルテリアルは、正常の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、正常のルテリアルは、二重胞子（double spore）を形成した後にはそれ以上増殖しないが、癌患者や晩成疾患を有する患者の血液中で発見される突然変異ルテリアルは、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、200μm（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】

したがって、ルテリアルの形態学的特性または生化学的特性を観察することで、疾病の診断や治療が可能であり、その用途が無限にあると予想される。しかし、ヒトを含む動物から既に排出された体液から分離されたルテリアルは、生体外では短い時間内に溶解され

て消滅されたり、形態が変わったりする特性があるため観察自体が難しく、異常な環境下で放置する場合には、24時間以内に正常のルテリアルも突然変異ルテリアルに変異され、疾病の正確な診断や治療が困難であるという問題点がある。

【0023】

本発明では、患者または健常人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2つの方法により分離した。

【0024】

したがって、一観点による本発明は、体液からルテリアルを分離する方法に関する。

【0025】

第1の方法は、血液からルテリアルを分離する方法であって、血液から血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離する第1の分離ステップと、前記血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離させた血液を遠心分離する第2の分離ステップと、前記遠心分離により得られた上清からルテリアルを分離する第3の分離ステップと、前記分離されたルテリアルを洗浄するステップと、を含む。

10

【0026】

前記第1の分離ステップは、血液を0.8~1.2 μ mの空隙を有するフィルタに通過させ、濾過されていない物質は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、1200~5000rpmで5~10分間遠心分離を繰り返すことで、エキソソーム(exosome)のような一般微小胞を除去して上清を得るステップを含むことができる。前記第3の分離ステップは、遠心分離により得られた上清に可視光線を照射して、運動性を有して集まるルテリアル粒子をピペットを用いて分離するステップを含むことができる。前記第1のステップで用いられた血液は、哺乳動物のうちヒト由来のものであることを特徴とする。ルテリアルは、自家蛍光および運動性の特性を有するため、上記のように可視光線を照射すると、上清からルテリアル粒子を確認することができる。この際、動くルテリアル粒子を暗視野顕微鏡または共焦点顕微鏡で確認しながら、ピペットを用いて分離することができる。前記第3のステップで分離されたルテリアルを直径50nmの空隙を有するフィルタに通過させ、濾過されていない部分のみをPBSで洗浄することでルテリアルを得ることができる。ルテリアルは、長径50nm以上のサイズを有するため、前記過程により、ルテリアル以外の血液由来微細物質は除去することができる。

20

【0027】

第2の方法は、血液や精液などの体液からルテリアルを分離する方法であって、体液を1次遠心分離した後、上清を2~5 μ mのフィルタで濾過するステップと、前記濾過された溶液を2次遠心分離した後、上清を0.5~2 μ mのフィルタで濾過するステップと、を含む。

30

【0028】

すなわち、体液を2000~4000rpmで5~30分間1次遠心分離した後、上清を2~5 μ mのフィルタで濾過し、濾過された溶液を3000~7000rpmで5~20分間2次遠心分離した後、0.5~2 μ mのフィルタで濾過するステップを含むことができる。

【0029】

濾過により得られた溶液に可視光線を照射して、運動性を有して集まるルテリアル粒子をピペットを用いて分離するステップをさらに含むことができる。ルテリアルは、自家蛍光および運動性の特性を有するため、上記のように可視光線を照射すると、上清からルテリアル粒子を確認することができる。この際、動くルテリアル粒子を暗視野顕微鏡または共焦点顕微鏡で確認しながらピペットを用いて分離することができる。分離されたルテリアルを直径50nmの空隙を有するフィルタに通過させ、濾過されていない部分のみをPBSで洗浄することでルテリアルを得ることができる。ルテリアルは、長径50nm以上のサイズを有するため、前記過程によりルテリアル以外の血液由来微細物質を除去することができる。

40

【0030】

50

上記のような2つの方法により分離されたルテリアルは暗視野顕微鏡または共焦点顕微鏡により観察可能であり、それぞれ200nm、400nm、600nm、800nm、および1000nmのフィルタを順に用いて、サイズに応じて50~200nm(発生期)/200~400nm(成熟期)/400~600nm(分裂期)/600~800nm(過分裂期)に区別することができる。

【0031】

本発明では、前記分離されたルテリアルの特性を調べた。

【0032】

(1) Morphology

正常のルテリアルのサイズは50~800nmであって(図2および図12)、フュージョンがない場合には800nmまで成熟する。患者由来ルテリアルの場合、正常由来のものに比べてサイズ(長径800nm以上)が大きく、形態が均一ではない変異ルテリアルが発生して、フュージョンが発生する場合にはルテリアルのサイズが数千nmまで大きくなることを確認した。

【0033】

尚、ルテリアルは円形乃至楕円形であって、SEMまたはTEM電子顕微鏡写真でミトコンドリアと類似した二重膜構造を示すが、内部クリステ(cristae)構造を有していなかった(図1)。

【0034】

(2) 免疫化学蛍光染色

ミトコンドリアは、ヤーンスグリーンB(Janus green B)、および蛍光染色薬であるローダミン123(Rhodamine 123)、ミトトラッカー(Mito tracker)、アクリジンオレンジ(Acridine Orange)およびDAPIにより発色されると知られているが、ルテリアルも、ミトコンドリアと同一の染色薬による発色が確認された。前記ルテリアルがミトコンドリアと類似の免疫化学蛍光染色反応を示したのに対し、エキソソーム(exosome)とは相反する反応を示し、自家蛍光(autofluorescence)を示す特徴を蛍光写真から確認した(図2(a)、図2(b)、図2(f)、図2(j)、図3~図6)。

【0035】

(3) 生態様式

ルテリアルは、エキソソーム(exosome)および微小胞(microvessicle)とは異なって、付着性および運動性を有し、フュージョン(fusion)またはフィッション(fission)の生態様式を示した。特定条件で変異ルテリアルはバースティング(Bursting)し、バースティング(Bursting)後には幹細胞性(stemness)を有することを確認し、細胞内または細胞外に存在可能であることを確認した(図8、図9、図11)。

【0036】

(4) ATP生産

200~400nmのサイズのルテリアルからATPが生産されることを、ルシフェリン(luciferin) ルシフェラーゼ(luciferase)反応とルミノメータ(luminometer)を用いて立証した。ルテリアルが添加された群は、ルテリアルが添加されていない群に比べてATP濃度が増加した。このことから、ルテリアルがATP生産能力を有するという結論を導出することができる。SSHおよびSSFの添加による差については、SSF添加群がSSH添加群に比べてATP濃度が高かった。このことから、ATP含量を効率的に増加させることができる培養液を確認した(図18)。

【0037】

(5) 核酸含有

DAPIおよびアクリジンオレンジ(AO)染色法により、ルテリアル中にRNAだけでなくDNAも含有されていることを確認した。具体的に、RNAは、アクリジンオレンジ染色薬により、励起460nm、放出650nmのレベル(level)でオレンジで

10

20

30

40

50

染色され、DNAは、励起502nm、放出525nmのレベルで緑色で染色されて、DAPI染色法により、DNAが含有されていることを確認することができる。前記染色法を用いて、本発明のルテリアル中にRNAとDNAが含有されていることを確認した(図5および図6)。また、ルテリアルのRNAおよびDNAをキット(kit)で分離および精製した後、アガロース(agarose)ゲル電気泳動によりバンドを確認し、qRT-PCR技法によりGAPDH発現程度を確認することで、ルテリアルのサイズによって遺伝子発現において差があることを確認した(図2(h)、図16および図17)。

【0038】

(6) 16S rRNA配列分析

FastDNA SPIN Kit(MP Biomedicals、Cat 6560200)を用いてルテリアルのgDNAを抽出した後、表1および表2の特定プライマー(primer)を用いて16S rRNA遺伝子を増幅させた。

【0039】

尚、前記増幅された1461個の断片遺伝子を対象に、GeneBank database(NCBI database)を用いて相同性を分析した結果、血液および精液由来ルテリアルの16S rRNA塩基配列は、
 - プロテオバクテリア(Proteobacteria)、
 - プロテオバクテリア(Proteobacteria)、
 アシドバクテリア(Acidobacteria)、シアノバクテリア(Cyanobacteria)、アクチノバクテリア(Actinobacteria)、ファームキューテス(Firmicutes)、および真核細胞(Eukaryote)由来遺伝子と相同性を示し、原核細胞と真核細胞の中間段階の融合特性を有していた(図24~図25)。

【0040】

最適状態(血液のpH:7.2~7.4)で、血液由来ルテリアルは、
 - プロテオバクテリア(Proteobacteria)、
 - プロテオバクテリア(Proteobacteria)、
 およびバクテロイデス(Bacteroidetes)由来遺伝子と相同性を示し(図24)、50~800nmのサイズで観察される。

【0041】

定常状態で、精液由来ルテリアルは、
 プロテオバクテリア、
 プロテオバクテリア、
 バクテロイデス、
 および脊索動物(Chordata)由来遺伝子と相同性を示す。

【0042】

これに対し、酸性化状態では、定常状態と同様に
 プロテオバクテリア(proteobacteria)および
 プロテオバクテリア(Proteobacteria)由来遺伝子だけでなく、バクテリア由来遺伝子がさらに多様に発現され、真核細胞(Eukaryote)由来遺伝子も発現される。主にストレプトファイト(Streptophyta)とプランクトミ(planktomy)の16S rRNA特性を発現し(図25)、サイズは400~2000nmまで成長する。

【0043】

【表1】

フォワードプライマー

Taxon	名称	配列 (Adaptor-key-linker-target 配列)	配列番号
細菌	B16S-F	5' -CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GAGTTTGATCMTG GCTCAG-3'	1
Bifidobacterium	Bif16S-F	5' -CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC-TCAG-AC-GGGTTCGATTCTG GCTCAG-3'	2

【0044】

10

20

30

40

50

【表 2】

リバースプライマー

Taxon	名称	配列 (Adaptor-key-linker-target 配列)	配列番号
細菌	B16-7-4	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGAGCTG-AC-WTTACCGC GGCTGCTGG-3'	3
細菌	B16-7-7	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TCAGATG-AC-WTTACCGC GGCTGCTGG-3'	4
細菌	B16-7-8	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CGATGAG-AC-WTTACCGC GGCTGCTGG-3'	5
細菌	B16-7-12	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TCTGCAG-AC-WTTACCGC GGCTGCTGG-3'	6
細菌	B16-7-13	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGCGATG-AC-WTTACCGC GGCTGCTGG-3'	7
細菌	B16-8-3	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATGCTGAG-AC-WTTACCG CGGCTGCTGG-3'	8
細菌	B16-8-4	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TACAGCAG-AC-WTTACCG CGGCTGCTGG-3'	9
細菌	B16-8-18	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATCGTGTG-AC-WTTACCG CGGCTGCTGG-3'	10
細菌	B16-8-21	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CTACACAG-AC-WTTACCG CGGCTGCTGG-3'	11
細菌	B16-9-4	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CGTGTACTG-AC-WTTACC GCGGCTGCTGG-3'	12
細菌	B16-9-5	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CTGTCTACG-AC-WTTACC GCGGCTGCTGG-3'	13
細菌	B16-9-8	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGTCACTAG-AC-WTTACC GCGGCTGCTGG-3'	14
細菌	B16-9-12	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGTCACTG-AC-WTTACC GCGGCTGCTGG-3'	15
細菌	B16-10-6	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATCACGTGCG-AC-WTTAC CGCGGCTGCTGG-3'	16
細菌	B16-10-7	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ATAGCTCTCG-AC-WTTAC CGCGGCTGCTGG-3'	17
細菌	B16-10-8	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGTGAGCTCG-AC-WTTAC CGCGGCTGCTGG-3'	18
細菌	B16-10-9	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-AGTCTGACTG-AC-WTTAC CGCGGCTGCTGG-3'	19
細菌	B16-11-1	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TCATATACGCG-AC-WTTA CCGCGGCTGCTGG-3'	20
細菌	B16-11-2	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-TAGATAGTGG-AC-WTTA CCGCGGCTGCTGG-3'	21
細菌	B16-11-3	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-ACGTCTCTACG-AC-WTTA CCGCGGCTGCTGG-3'	22
細菌	B16-11-4	5' -CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC-TCAG-CTAGAGACACT-AC-WTTA CCGCGGCTGCTGG-3'	23

10

20

30

40

【0045】

(7) エキソソームおよびミトコンドリアとの違い

表3は、エキソソームおよびミトコンドリアとルテリアルとの違いを整理したものである。

【0046】

50

【表 3】

No.	カテゴリ	エキソソーム	ルテリアル	ミトコンドリア
1	サイズ	20~120nm	50~800nm	400~1,000nm
2	蛍光	(CD63antibody)GFP+	(CD63antibody)GFP-	(CD63antibody)GFP-
3	Fluorescence	Mitotracker Red -	Mitotracker Red+	Mitotracker Red+
4	Fluorescence	Janus Green B -	Janus Green B+	Janus Green B+
5	Fluorescence	Rhodamine 123 -	Rhodamine 123+	Rhodamine 123+
6	移動度	-	13~25 μ m/秒	-
7	培養の時の成長	-	+	-
8	自然成長	-	+	-
9	ATP合成	-	+	+
10	自家-蛍光	-	+	N/A
11	フュージョン	+	+	+
12	キス-アンド-ラン (Fission and Fusion)	-	+	+
13	配列決定	18SrRNA 28S rRNA	16SrRNA (GammaProteobacteria Beta Proteobacteria Bacteroidetes)	16srRNA Alpha Proteobacteria
14	生息地	細胞外	細胞内外	細胞内

10

20

【0047】

ルテリアルの平均サイズは200~800nmであって、ミトコンドリア(400~1,000nm)よりは小さく、エキソソーム(20~120nm)よりは大きい。また、エキソソームは膜の区分が明確でなく、内部色が比較的薄いのに対し、ルテリアルは、膜の区分が明確であるか、内部が満たされている形態である(図19)。尚、ルテリアルは、エキソソームおよび微小胞(microvessicles)とはその形態が全く異なる(図20)。

30

【0048】

免疫化学蛍光染色時に、ルテリアルはミトコンドリアと類似の反応を示すのに対し、エキソソームとは相反する反応を示す。細胞内外に存在するルテリアルと細胞外に存在するエキソソームは、食品を摂取することで得られる物質でもあるのに対し、ミトコンドリアは食品摂取によっては得られない細胞内にのみ存在するという違いがある。

【0049】

そして、エキソソームおよびミトコンドリアと異なって、ルテリアルは運動性を有し、自然成長が可能であって培養により成長を維持することができ、自家蛍光の特徴を示す。また、ルテリアル、エキソソーム、およびミトコンドリアは何れもフュージョンの生態様式を有するが、エキソソームではkiss and runフュージョンが起らず、ATP生産も起らない。また、エキソソームは細胞外に存在し、ミトコンドリアは細胞内に存在するのに対し、ルテリアルは細胞外または内の両方に存在可能である(図11)。

40

【0050】

また、16SrRNA塩基配列分析結果、ミトコンドリアは、プロテオバクテリアと相同性を示すのに対し、ルテリアルは、プロテオバクテリア(Proteobacteria)、プロテオバクテリア(Proteobacteria)、バクテロイデス(Bacteroidetes)、ファーミキューテス(Firmicutes)、および真核細胞(Eukaryote)と相同性を示す。

【0051】

50

他の観点による本発明は、次の特性の一つ以上を有する体液由来ルテリアルに関する：

- (a) 免疫蛍光試験で、ヤーンスグリーンB (Janus green B)、アクリジンオレンジ (Acridine Orange)、およびローダミン123 (Rhodamine 123) に陽性の発色反応を示す；
- (b) 最適状態 (pH 7.2 ~ 7.4) では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子の発現特性を示し、30 ~ 800 nmのサイズを有する；
- (c) 酸性化状態では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子だけでなく、真核細胞であるストレプトファイタ (Streptophyta) 遺伝子を発現し、400 nm以上から2000 nm以上までサイズが大きくなる；
- (d) 正常条件でATP生成に参与する；
- (e) ミトコンドリアおよびエキソソームとは全く異なる細胞または細胞類似体である；
- (f) 定常状態では円形乃至楕円形であり、患者由来の場合、定常状態に比べてサイズ (長径800 nm以上) が大きく、形態が均一ではない変異ルテリアルが発生する；
- (g) 二重膜構造を有し、付着性がある；
- (h) 細胞内または外の両方に存在可能である；
- (i) 運動性を有し、フュージョン (fusion) および/またはフィッション (fission) の生態様式を示す；
- (j) 特定条件で変異ルテリアルがバースティング (Bursting) し、バースティング (Bursting) 後には幹細胞性 (stemness) を有する；および
- (k) p53 遺伝子およびテロメアの調節機能を有する。

10

20

【0052】

一方、ルテリアルは、個体の疾病有無に応じて、サイズ (直径)、面積、形態、およびナノトラッキング速度が異なるため、前記特性の1つ以上を用いて、疾病の診断や予後を予測することができる。これは、疾病のない健常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サイズ、形態、ナノトラッキング速度などが異なることから分かる。

【0053】

健常人由来の正常のルテリアルは、単に二重胞子 (double spore) を形成 (fission) するだけであるが、晩成疾病患者や癌患者由来のルテリアル (突然変異ルテリアル) は、ルテリアル同士が融合 (fusion) または凝集 (coagulation) したり爆発 (Bursting) して、赤血球や癌細胞などの細胞にも付着し、その形態およびサイズが正常のルテリアルとは異なって異常に大きくなる特徴がある (図8 ~ 図10)。突然変異ルテリアルは付着性が高いため、上記のようなサイクル (cycle) によって融合 (fusion) がさらに加速化してそのサイズが約600 ~ 800 nm以上に大きくなり、200 μm (200,000 nm) 以上のサイズを有するものもある。本発明者は、癌の種類や進行程度によって、突然変異されたルテリアルの形態に一貫性があることを確認し、これについての内容を特許出願している (韓国特許出願第10 2013 0082060号)。

30

【0054】

したがって、ルテリアルの形態学的特性または生化学的特性を観察することで、疾病の診断や予後を予測ことができ、その用途が無限にある。

40

【0055】

ルテリアルの形態は、正常形、鞭毛形、マス (Mass) 形、ロッド (Rod) 形、または複合形を示す。正常形とは、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の形態であり、円形に近い形状を示すことができる。顕微鏡で観察時には小さい点として示される。

【0056】

鞭毛形とは、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ることができる。本発明者らは、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期癌が診断された患者で鞭毛形のルテリアルが観察されることを確認した (韓国特許出願第2013 0082060号)。ルテ

50

リアルな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腫瘍マーカー (Tumor Marker) で表示することができる。前記末期腫瘍が診断された患者の生存期間は略1～4ヶ月であり、特に、鞭毛形の場合、長期生存が不可能である。

【0057】

マス形 (M形) とは、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る。好ましくは、長径と短径との比が3：1～5：1であり、多様な形態のマス形が観察される。

【0058】

ロッド形 (R形) は、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る。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、円形または楕円形の単一鎖からなるロッド1形、および単一鎖が2個以上結合してなるロッド2形を含む。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、バースティング (Bursting) 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個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、バースティング (Bursting)、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。一方、鞭毛形は、その形状から、大きい範囲でロッド形に含まれることができるが、鞭毛が伸びているという点で異なる点がある。したがって、ロッド形であるかを先に判断した後、鞭毛形であるかを判断することができる。

【0059】

前記複合形は、ロッド形とマス形の融合形態であることができる。一体に形成された微細物質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えることができる。

【0060】

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、および単一鎖が2個以上結合してなるロッド2形を含む群の一つであることができる。前記複合形は、ロッド形とマス形の融合形態であることができる。

【0061】

上記のように、疾病の発病と進行によって、生体内のルテリアルの形態が変わるため、ルテリアルの形態学的特性を観察することで疾病の診断や予後を予測することができる。また、前記ルテリアルの形態変化は、ルテリアルが含有している核酸の量と配列変化にも関連するため、ルテリアルの核酸発現パターン (16S rRNA) 配列を分析することで疾病を診断することができる。

【0062】

例えば、正常のルテリアルの16S rRNA配列と患者のルテリアルの16S rRNA配列を比較することで、疾病 (特に、癌) を診断することができる。特に、ストレプトファイト (Streptophyta) 遺伝子発現と真核細胞 (Eukaryote) 遺伝子同時発現は、癌の診断予測マーカーとして活用可能である。

【0063】

但し、患者または健常人から既に排出された体液から分離されたルテリアルは、生体外では短い時間内に溶解されて消滅されたり、形態が変わったりする特性があるため観察自体が難しく、異常な環境下で放置する場合には、24時間以内に正常のルテリアルも突然変異ルテリアルに変異されて、疾病の正確な診断や治療が困難である。しかし、本発明の培養方法によると、特定のサイズ (500nm) 以上にならないようにルテリアルを培養することができる。

【0064】

したがって、他の観点による本発明は、ルテリアルに水分を添加し、IR光線照射下、18～30 (好ましくは20～25) で培養することを特徴とするルテリアルの培養

10

20

30

40

50

方法に関する。

【0065】

前記培養時に添加される水分は、食塩水またはPBS溶液であることができるが、これに制限されない。培養前の体液由来ルテリアルは本発明の分離方法により得ることができるが、そのサイズが50～200nmのものを用いることができる。本発明の培養方法により培養された血液由来ルテリアルの培養後のサイズは300～800nmであることができる。この際、顕微鏡で観察しながら、ルテリアルのサイズが500nmを超えないようにすることができ、培養が終了すると、サイズ毎に分類して零下80℃に冷却して保存したり、窒素を充填して保存または零度以上で保存することができ、保存時には保存剤を添加することができる。

10

【0066】

上記のように培養されたルテリアルは、その特性が変化することなく所定期間保存が可能であり、ルテリアルを用いた疾病の診断および予後の予測に効果的に活用されることができる。本発明において「ルテリアルの特性が変化することなく」とは、ルテリアルの形態(morphology)やサイズが培地で培養する前の状態と略類似に維持されることを意味する。また、ナノトラッキング速度のようなルテリアルの運動性などの活性が、培養する前の状態と類似の値を維持することを意味する。

【0067】

具体的に、本発明の培養方法により培養されたルテリアルは、次の目的のために用いることができる。変異された突然変異ルテリアルは、融合(fusion)または凝集して、その形態およびサイズが正常のルテリアルとは異なって異常に大きくなったものであり(図8～図10)、分離された突然変異ルテリアルの培養時に、ルテリアルの融合または凝集を抑えることができる候補物質や手段を処理して、ルテリアルの融合または凝集の抑制有無を観察することで、ルテリアルの変異を抑制または予防することができる物質をスクリーニングすることができる。

20

【0068】

また、分離されたルテリアルの培養時、フィッション(fission)を促進する候補物質や手段を処理することで、突然変異ルテリアルのフィッション(fission)を促進する物質をスクリーニングすることができる。突然変異ルテリアルは融合または凝集する生態様式を有するが(図8、図9および図11)、フィッション(fission)の生態様式に転換されたり、突然変異されたルテリアルがフィッション(fission)されたりして正常のルテリアルのサイズを有するように、フィッション(fission)を促進する候補物質を処理することで、ルテリアルが変異されることを抑制するか、変異されたルテリアルが正常のルテリアルの生態様式を有するように転換する物質、窮極的には、変異されたルテリアルにより誘発され得る疾病の予防物質をスクリーニングすることができる。

30

【0069】

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。

40

【0070】

実施例

実施例1：血液由来ルテリアルの分離

非小細胞性肺癌末期患者から血液を50cc採取して直径0.8μm以上の空隙を有するフィルタに通過させ、濾過されていない物質は分離した。濾過された血液を1200～5000rpmで5～10分間繰り返し遠心分離することで、エキソソーム(exosome)のような一般微小胞を除去して上清を得た。前記上清に可視光線を照射して、運動性を有して集まるルテリアル粒子をピペットを用いて分離した。ルテリアルは自家蛍光および運動性の特性を有するため、上記のように可視光線を照射するとルテリアル粒子を確認することができる。この際、動くルテリアル粒子を暗視野顕微鏡または共焦点顕微鏡

50

で確認しながらピペットを用いて分離した。分離されたルテリアルを直径50 nmの空隙を有するフィルタに通過させて、濾過されていない部分のみをPBSで洗浄することでルテリアルを得た。前記過程により長径50～800 nmのルテリアルが得られ、これは暗視野顕微鏡または共焦点顕微鏡により観察確認が可能であった。前記得られたルテリアルは、サイズに応じて、50～200 nm（発生期）/200～400 nm（成熟期）/400～600 nm（分裂期）/600～800 nm（過分裂期）に区分した。類似の方法により、図21のようなルテリアルのサイズ毎のライブラリを構築し、ルテリアルのサイズ毎のmorphologyを図2に示した。

【0071】

実施例2：精液由来ルテリアルの分離

精液を2000～4000 rpmで5～30分間1次遠心分離した後、上清を2～5 μmのフィルタで濾過し、濾過された溶液を3000～7000 rpmで5～20分間2次遠心分離した後、0.5～2 μmのフィルタで濾過した。ルテリアルは自家蛍光および運動性の特性を有するため、濾過した溶液に可視光線を照射するとルテリアル粒子を確認することができる。この際、動くルテリアル粒子を暗視野顕微鏡または共焦点顕微鏡で確認しながらピペットを用いて分離した。分離されたルテリアルを直径50 nmの空隙を有するフィルタに通過させ、濾過されていない部分のみをPBSで洗浄することでルテリアルを得た。これは暗視野顕微鏡または共焦点顕微鏡により観察確認が可能であった。

【0072】

実施例3：ルテリアルの特性

(1) 構造

実施例1で得られたルテリアルのうち約50～400 nmのサイズを有するルテリアルを、共焦点レーザー走査顕微鏡(Confocal Laser Scanning Microscope、Zeiss)、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope)、走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope)、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope)、および共焦点スキャナ(Leica TCS SP8)で撮影した結果、ルテリアルもミトコンドリアと類似に二重膜を有する膜構造であって、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ており、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ことを確認した。また、その形態は円形乃至楕円形であることを観察することができた(図1、図(e)、図2(h)、図13および図14)。

【0073】

(2) 染色特性

実施例1で得られたルテリアルのうち約50～800 nmのサイズを有するルテリアルを、ミトトラッカー(Mito tracker)、ローダミン123(Rhodamine 123)、アクリジンオレンジ(Acridine Orange)、およびヤヌスグリーンB(Janus green B)で染色した後、その発色有無を観察した。その結果、植物由来ルテリアルも、ミトトラッカー、ローダミン123、アクリジンオレンジ、およびヤヌスグリーンBにより発色されることを確認した(図2(a)、図2(b)、図2(f)、図2(j)、図3～図6)。

【0074】

(3) 自家蛍光

実施例1で得られたルテリアルのうち約50～800 nmのサイズを有するルテリアルが光反応を示すことを蛍光写真から確認した(図5)。

【0075】

(4) 運動性

実施例1で得られたルテリアルの運動性を、米国3i社のナノトラッキングにより測定した。具体的に、ルテリアルを明視野顕微鏡で観察した後、ルテリアルの中心にトラッキングを設定してナノトラッキングを作動すると、ルテリアルの移動にしたがってリアルタ

10

20

30

40

50

イム移動軌跡が表示され、その秒当りの速度を計算した(図7)。

【0076】

その結果、本実施例によるルテリアルのナノトラッキング速度は、約13~25 $\mu\text{m}/\text{sec}$ と測定された。

【0077】

(5) ルテリアルにおけるRNAおよびDNAの含有有無の分析

実施例1で分離された200~400nmのルテリアルを原子顕微鏡で撮影した結果、図2(h)、図15、図16および図17に示されたように、ルテリアルにRNAやDNAのような核酸が含有されていると推定することができる。

【0078】

実施例1で分離された200~400nmのルテリアルから全RNAとDNAを分離するために、QIAGENキット(RNeasy Micro Kit: Cat 74004)を用いて分離した後、Experion RNA(DNA) StdSens (Bio Rad社)チップを用いて定量した。

【0079】

ルテリアルを遠心分離(8000g、1時間30分)して回収した後、キット内の分解緩衝液RLT plus (Guanidine isothiocyanate, detergents) 50 μl にメルカプトエタノール3.5 μl を添加し、20ゲージの針付きの注射器を用いて5~10回通過させてルテリアルを溶解させた。サンプル分解緩衝液をAllPrep DNA spinカラムに移した後、遠心分離(8000g、15秒)して、カラムに詰っているDNAとカラムを通過したRNAが含まれたバッファからそれぞれ分離した。

【0080】

まず、カラムを通過したバッファに同一体積の350 μl の70%エタノールを入れて均一に混合した後、700 μl の混合液をRNease MinElute spinカラムに移して遠心分離(8000g、15秒)し、カラムを通過したバッファは除去した。それぞれの350 μl のRW1, 500 μl のRPEバッファと500 μl の80%エタノールを用いて、カラム洗浄を段階的に行った。上記で用いられた全ての遠心分離(8000g、15秒)は同一条件で行った。RNAを得るために、14 μl のRNeasy free溶液をカラムに入れた後、遠心分離(8000g、60秒)してルテリアルRNAを分離した。

【0081】

ゲノムDNAの分離のために、FastDNA SPIN Kit (MP Biomedica)を用いた。チューブに分離されたルテリアルを入れた後、978 μl のリン酸ナトリウム(sodium phosphate)バッファ、122 μl のMTバッファを添加した。40秒間均質化させてから、遠心分離(14,000g、10分)して上清を得た後、250 μl のPPS (Protein Precipitation Solution)を入れて10分間混合した。遠心分離(14000g、5分)した後、15mlのチューブに上清を移す過程を2回繰り返し、DNA結合(DNA binding)のためにロータ(rotor)に2分間載せた後、シリカマトリックス台に3分間入れて置いた。上清を略600 μl 程度注意して回収してSPIN Filterに入れ、遠心分離(14000g、1分)した後、上清を捨て、ペレット(pellet)にSEWS Mを500 μl 入れて懸濁させた(suspending)。1分間遠心分離した後、上清を捨て、如何なるバッファも残らないように遠心分離を繰り返した。50 μl のDES (DNase/Pyrogen Free Water)を入れて遠心分離(14000g、1分)した後、ゲノムDNAを得た。

【0082】

Experion RNA(DNA) StdSens (Bio Rad社)チップを用いて定量した結果、図16および図17に示されたように、ルテリアルにそれぞれRNAおよびDNAが含有されていることを確認することができた。

10

20

30

40

50

【0083】

(6) 16S rRNA 配列分析

16S rRNA (ribosomal Ribonucleic acid) は、様々なタンパク質と相互作用してリボソーム (Ribosome) を構成する RNA である。塩基配列変化率が殆どのゲノムにおける他の遺伝子の塩基配列より著しく小さいため、16S rRNA 塩基配列類似度の程度が生物間の系統学的距離を反映すると認識されている。

【0084】

[1] 血液由来ルテリアル

実施例1で得られた血液由来ルテリアルから FastDNA SPIN Kit (MP Biomedicals, Cat 6560 200) を用いて gDNA を抽出した後、PCR premix (iNtRON Biotechnology, Korea) 配列番号 1~23 のプライマー (primer) を用いてルテリアルの 16S rRNA を増幅させた。 10

【0085】

増幅された PCR 産物は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems, USA) と automated DNA analyzer system (PRISM 3730XL DNA analyzer, Applied Biosystems) を用いて塩基配列を分析した。増幅された PCR 産物は総 1461 個の断片 20 であって、このうち 1407 個の断片はプロテオバクテリア (proteobacteria) 由来遺伝子と相同性を示し、20 個の断片はアシドバクテリア (Acidobacteria) 由来遺伝子と相同性を示し、11 個の断片はアクチノバクテリア (Actinobacteria) 由来遺伝子と相同性を示した (表4)。

【0086】

分析した塩基配列の断片を SeqMan software (DNASTAR) で組み合わせて 16S rRNA の塩基配列を得た。

【0087】

図24は、健常人 (血液の pH: 7.2~7.4) の血液由来ルテリアルの 16S rRNA を塩基配列分析して、相同性を示す類似バクテリアの構成を示したものであって、ルテリアルのサイズ毎に分析した ((a): 100nm 以下、(b): 100~200nm、(c) 200~400nm、(d) 400~800nm)。サイズ毎に大きい差はなく、何れもプロテオバクテリア (Proteobacteria)、ファーミキューテス (Firmicutes)、およびバクテロイデス (Bacteroidetes) 由来遺伝子と相同性を示した。 30

【0088】

図25(c)は、疲労・疾病状態 (血液の pH: 7.0 以下) の血液由来のルテリアル (サイズ: 200~400nm) の 16S rRNA を塩基配列分析して、相同性を示す類似バクテリアの構成を示したものである。定常状態とは異なって、ストレプトファイト (Streptophyta) 由来遺伝子と相同性を示す遺伝子がさらに発現された。 40

【0089】

図26(a)、(b) および (c) は、血液由来ルテリアルの 16S rRNA 塩基配列に基づいた系統発生図を示したものである。

【0090】

【表 4】

ランク	分類	名称	LKL-B	SUM (Ratio)	LKL-B	Sum (Number)
Phylum	Bacteria;;;Proteobacteria	Proteobacteria	96.3039	96.3039	1407	1407
Phylum	Bacteria;;;Acidobacteria	Acidobacteria	1.36893	1.36893	20	20
Phylum	Bacteria;;;Actinobacteria	Actinobacteria	0.75291	0.75291	11	11
Phylum	Bacteria;;;Bacteroidetes	Bacteroidetes	0.54757	0.54757	8	8
Phylum	Bacteria;;;Cyanobacteria	Cyanobacteria	0.41068	0.41068	6	6
Phylum	Eukarya;Viridiplantae;;;Streptophyta	Streptophyta	0.27379	0.27379	4	4
Phylum	Bacteria;;;Firmicutes	Firmicutes	0.20534	0.20534	3	3
Phylum	Bacteria;;;TM6	TM6	0.06845	0.06845	1	1
Phylum	Bacteria;;;Planctomycetes	Planctomycetes	0.06845	0.06845	1	1

10

【0091】

血液由来ルテリアル^{16S rRNA}断片は、プロテオバクテリア、プロテオバクテリア、バクテロイデス、ファーミキューテス、およびストレプトファイトなどの様々なバクテリアと相同性を示すことが確認された。

20

【0092】

一般に、微生物分類体系上、gDNA関連性(relatedness)が70%未満であると、互いに独立した菌株として認められる。また、16S rRNA塩基配列の相同性が97%未満であると、gDNA関連性が70%未満であるということが、統計学的な分析により証明された。したがって、ルテリアル^{16S rRNA}断片と97.0%以上の相同性を示す配列を有する細胞を分析した結果、表5~表7に示したように、血液由来ルテリアルはプロテオバクテリアと100%の相同性を示し、ファーミキューテスとは97.53%、バクテロイデスとは97%以上の相同性を示した。

【0093】

一方、異常状態である酸性条件のルテリアルは、表8に示したように、ストレプトファイト(Streptophyta)と99%以上の相同性を示した。

30

【0094】

40

50

【表 5】

16S rRNA 配列によるルテリアル分析

生データ 配列名称	配列	登録番号	相同性	分類学的割振
IOFBYR001 DTJ3I	ATTGAACGCTGGCGGAGGCTTAACACA TGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTG CACCTTATCTTAGCGGGGACGGTGAGT AATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGG GGGACAACATTCGAAAGGGATGCTAAT ACCGCATACTCCTACGGGAGAAAGCAG GGGATCTCCGGACCTTGCCTAATAGAT GAGCCTAAGTCGATTAGCTAGTTGGTG GGGTAAGGCCTACCAAGGCGACGATCT GTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC CTACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTG GACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCA TGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGG TTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGG CTACTGAGACTAATACTCTGGATAGTGG ACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTA ACTCTGTG	AM410704	100	Bacteria;;;Proteobacteria;; Gammaproteobacteria ;; Pseudomonadales;; Moraxellaceae;; Acinetobacter; Acinetobacter junii;; LMG 998-AM410704(T)
IOFBYR001 DU0G5	ATTGAACGCTGGCGGAGGCTTAACACA TGCAAGTCGAGCGGAGATGAGGTGCTTG CACCTTATCTTAGCGGGGACGGTGAG TAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGG GGACAACATTCGAAAGGAATGCTAATA CCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGG GGATCTTCGGACCTTGCCTAATAGATG AGCCTAAGTCGATTAGCTAGTTGGTGG GGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTG TAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCAC ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCC TACGGGAGGAGCAGTGGGGAATATTG GACAATGGGGGAACCCTGATCCAGCCA TGCCCGTGTGTGAAGAAGGCCTTATGG TTGTAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGG CTACTGAGACTAATACTCTGGATAGTGG ACGTTACTCGCAGAATAAGCACCGGCTA ACTCTGTG	AM410704	100	Bacteria;;;Proteobacteria;; Gammaproteobacteria ;; Pseudomonadales;; Moraxellaceae;; Acinetobacter; Acinetobacter junii;; LMG 998-AM410704(T)

10

20

30

40

50

【表 6】

Firmicutes

生データ 配列名称	配列	登録番号	相同性	分類学的割振
IOFBYR001 ANZSO	GGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTAGA ACGCTGAAGCTTGGTGCTGCACCGAGC GGATGAGTTGCGAACGGGTGAGTAACGC GTAGGTAACCTGCCTCTTAGCGGGGAT AACTATTGGAAACGATAGCTAATACAGCA TAAAAGTCGATATCGCATGATATTGATTT GAAAGGTGCAATTGCATCACTAAGAGAT GGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTG AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATAC ATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA CACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC GGCAATGGGGCAACCCTGACCGAGCA ACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTTCG GATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAA CGAGTGTGAGAGTGAAAGTTCACACTG TGACGGTAACTACCAGAAAGGACGGC TAACTACGTG	ADVN0100 0004	97.53	Bacteria;;;Firmicutes;; Bacilli;;Lactobacillales;; Streptococcaceae;; Streptococcus;Streptococcus parasanguinis;;ATCC 15912-ADVN01000004(T)

10

20

【 0 0 9 6 】

30

40

50

【表 7】

Bacteroidetes

生データ 配列名称	配列	登録番号	相同性	分類学的割振
IOFBYR001 BUV34	TGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACATG CAAGTCGTGGGGCAGCACAGAATAGCAA TATTTGGGTGGGACCGGCAAACGGGTG CGGAACACGTACACAACCTTCCGATAAG TGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATT AATACCCGTAACATATAGAGATGGCATC GTCTTTATATTATAGCTTCGGTGCTTATT GATGGGTGTGCGTCTGATTAGGTAGTTG GCGGGGTAACGGCCACCAAGCCTACG ATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATGATCA GCCACACGGGCACTGAGACACGGGCC GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAA TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC AGCCATGCCGCGTGAAGGATGAATGTCC TCTGGATTGTAACTTCTTTTATTTGGGA CGAAAAAGAGCATTCTTGCTCACTTGACG GTACCAAGTGAATAAGCACCGGCTAACT CCGTG	4P004046	99.79	Bacteria;;;Bacteroidetes;; Sphingobacteria;; Sphingobacteriales;; Chitinophagaceae;; 4P004046_g;4P004046_s;;4P004 046
IOFBYR001 AEZDS	GATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACA TGCAAGTCGAGGGCAGCACATGAAGTA GCAATACTGATGGTGGCAGCGCGCA CGGGTGAGTAACACGTATGCAACCTACC TTCAACAGGAGAATAACCCGTCGAAAGA CGGACTAATACTCCATAACACAGGGATC CCACATGGGAATATTTGTAAAGATTTAT CGGTTGAAGATGGGCATGCGCTCCATTA GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAA GGCAACGATGGATAGGGAACTGAGAG GTTTATCCCCCACTGGTACTGAGACA CGGACCAGACTCTACGGGAGGCAGCA GTGAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAAC TCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGAT GACGGCCCTACGGGTTGTAACCTTCTTTT GTAAGGGAATAAAGTTAGTTACGTGTAAC TATTTGCATGTACCTTACGAATAAGGATC GGCTAACTCCGTG	FJ672469	97.34	Bacteria;;;Bacteroidetes;; Bacteroidia;;Bacteroidales;; Porphyromonadaceae;; AB243818_g;FJ672469_s;;FJ672 469

10

20

30

40

50

<p>IOFBYR001 BBHTW</p>	<p>ATGGACGCTAGCGGCAGGCTTAATACAT GCAAGTCGTGGGGCAGCACAGAATAGCA ATATTGGGTGGCGACCGGCAAACGGGT GCGGAACACGTACACAACCTTCCGATAA GTGGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGAT TAATACCCCGTAACATATAGAGATGGCAT CGTCTTTATATTATAGCTTCGGCGCTTAT TGATGGGTGTGCGTCTAATTAGGTAGTT GGCGGGGTAACGGCCCAAGCCTAC GATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATGATC AGCCACACGGGCACTGAGACACGGGCC CGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGG AATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGAT CCAGCCATGCCCGTGAAGGATGAATGT CCTCTGGATTGTAACTTCTTTATTGG GACGAAAAAGAGCATTCTTGCTCACTTG ACGGTACCAAGTGAATAAGCACCGGCTA ACTCCGTG</p>	<p>4P004046</p>	<p>99.58</p>	<p>Bacteria;;;Bacteroidetes;; Sphingobacteria;; Sphingobacteriales;; Chitinophagaceae;; 4P004046_g;4P004046_s;;4P004 046</p>	10
<p>IOFBYR001 BQCEI</p>	<p>GATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACA TGCAAGTCGAAGGGGCAGCACATGAAGT AGCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCA CGGGTGAGTAACACGTATGCAACCTACC TTCAACAGGAGAATAACCCGTCGAAAGA CGGACTAATACTCCATAACACAGGGATC CCACATGGGAATATTTGTTAAAGAGTTTA TCGGTTGAAGATGGGCATGCGCTCCATT AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCA AGGCAACGATGGATAGGGGAACTGAGA GGTTTATCCCCCACTGGTACTGAGAC ACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGC AGTGAGGAATATTGGTCAATGGAGGCAA CTCTGAACCAGCCACGTCGCGTGAAGGA TGACGGCCCTACGGGTTGTAACCTCTTT TGTAAGGGAATAAAGTTAGTTACGTGTAA CTATTTGCATGTACCTTACGAATAAGGAT CGGCTAACTCCGTG</p>	<p>FJ672469</p>	<p>97.34</p>	<p>Bacteria;;;Bacteroidetes;; Bacteroidia;;Bacteroidales;; Porphyromonadaceae;; AB243818_g;FJ672469_s;;FJ672 469</p>	30
					40

IOFBYR001 CGIIX	ATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACAT GCAAGTCGAGGGGACGACGGTATAGC AATATATGGGTGGCGACCGGCAAACGGG TGCGGAACACGTACACAACCTTCCGGTG AGCGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGA TTAATACCCATACTATAATGATCAGGCA TCTGGTTATTATCAAAGGCTTCGGCCGCT TATTGATGGGTGTGCGTCTGATTAGGTA GTTGGCGGGTAGAGGCCACCAAGCC TACGATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATG ATCAGCCACACGGGCACTGAGACACGGG CCCRACTCTACGGGAGGCAGCAGTAA GGAATATTGGACAATGGACGCAAGTCTG ATCCAGCCATGCTGCGTGAAGGATGAAT GCCCTCTGGGTGTAAACTTCTTTTACAG GGGAAGAAAGTTATCTTTTTTAGGATATT TGACGGTACCCTATGAATAAGCACCGGC TAACTCCGTG	FN665659	97.8	Bacteria;;;Bacteroidetes;; Sphingobacteria;; Sphingobacteriales;; Chitinophagaceae;; Hydrotalea;Hydrotalea flava;; CCUG 51397-FN665659(T)	10
IOFBYR001 BUV35	TGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACATG CAAGTCGTGGGACGACAGAAATAGCAA TATTTGGGTGGCGACCGGCAAACGGGTG CGGAACACGTACACAACCTTCCGATAAG TGGGGATAGCCCAGAGAAATTTGGATT AATACCCCGTAACATATAGAGATGGCATC GTCTTTATATTATAGCTTCGGTGCTTATT GATGGGTGTGCGTCTGATTAGGTAGTTG GCGGGGTAACGGCCACCAAGCCTACG ATCAGTAGCTGATGTGAGAGCATGATCA GCCACACGGGCACTGAGACACGGGCC GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAA TATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC AGCCATGCCCGTGAAGGATGAATGTCC TCTGGATTGTAAACTTCTTTTATTTGGGA CGAAAAAGAGCATTCTTGCTCACTTGACG GTACCAAGTGAATAAGCACCGGCTAACT CCGTG	4P004047	99.249 06689	Bacteria;;;Bacteroidetes;; Sphingobacteria;; Sphingobacteriales;; Chitinophagaceae;; 4P004046_g;4P004046_s;;4P004 047	30

20

40

40

【 0 0 9 7 】

【表 8】

Streptophyta

生データ 配列名称	配列	登録番号	相同性	分類学的割振
IOFBYR001 BVMU5	GATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTC AGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTAA GAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGAGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCCGTGGAGGTAGAAG GCCACGGGTCGTGAACCTTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAAGCATCGGCTAACTCTGTG	CAAP0201 6081	100	Eukarya;Viridiplantae;; Streptophyta ;;eudicotyledons ;;core eudicotyledons;;Vitaceae;;Vi tis;Vitis vinifera;;CAAP02016081
IOFBYR001 DG9Y3	GATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTC AGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTAA GAACCTGCCCTTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGAGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCCGTGGAGGTAGAAG GCCACGGGTCGTGAACCTTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAAGCATCGGCTAACTCTGTG	CAAP0201 6081	100	Eukarya;Viridiplantae;; Streptophyta ;;eudicotyledons ;;core eudicotyledons;;Vitaceae;;Vi tis;Vitis vinifera;;CAAP02016081

10

20

30

40

50

IOFBYR001 BVXH2	GATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTC AGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTAA GAACCTGCCCTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGAGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCGCTGGAGGTAGAAG GCCCACGGGTCGTGAACCTCTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAAGCATCGGCTAACTCTGTG	CAAP0201 6081	100	Eukarya;Viridiplantae;; Streptophyta ;;eudicotyledons ;;core eudicotyledons;;Vitaceae;;Vi tis;Vitis vinifera;;CAAP02016081	10
IOFBYR001 CVD3E	GATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACACA TGCAAGTCGGACGGGAAGTGGTGTTC AGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTAA GAACCTGCCCTGGGAGGGGAACAACA GCTGGAACGGCTGCTAATACCCCGTAG GCTGAGGAGCAAAGGAGGAATCCGCC CGAGGAGGGGCTCGCGTCTGATTAGCTA GTTGGTGGGGCAATAGCTTACCAAGGCG ATGATCAGTAGCTGGTCCGAGAGGATGA TCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGG GAATTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGA CGGAGCAATGCCGCTGGAGGTAGAAG GCCCACGGGTCGTGAACCTCTTTCCCG GAGAAGAAGCAATGACGGTATCTGGGGA ATAAGCATCGGCTAACTCTGTG	CAAP0201 6081	99.77	Eukarya;Viridiplantae;; Streptophyta ;;eudicotyledons ;;core eudicotyledons;;Vitaceae;;Vi tis;Vitis vinifera;;CAAP02016081	20

【 0 0 9 8 】

[2] 精液由来ルテリアル

実施例 2 で得られた精液由来ルテリアルに対して、上記のような方法により g D N A 抽出、P C R 増幅、および塩基配列分析を行った。図 2 5 は、疲労・疾病状態（精液の p H : 7 . 0 以下）の精液由来ルテリアルの 1 6 S r R N A を塩基配列分析して、相同性を示す類似バクテリアの構成を示したものであって、ルテリアルのサイズ毎に分析した（（ a ） : 1 0 0 n m 以下、（ b ） : 1 0 0 ~ 2 0 0 n m 、（ d ） 4 0 0 ~ 8 0 0 n m ）。

【 0 0 9 9 】

定常状態の精液由来ルテリアルは、血液由来ルテリアルと同様に、プロテオバクテリア（ P r o t e o b a c t e r i a ）、ファームキユース（ F i r m i c u t e s ）、およびバクテロイデス（ B a c t e r o i d e t e s ）由来遺伝子と相同性を示し、特異なことに、脊索動物（ C h o r d a t a ）由来遺伝子と相同性を示した。

【 0 1 0 0 】

40

30

50

尚、異常状態である酸性条件では、ストレプトファイト (Streptophyta) 由来遺伝子と相同性を有する遺伝子が発現された。

【0101】

(7) ATP 含量測定

対照群、ルテリアル、ルテリアル (SSH 12 h)、およびルテリアル (SSF 12 h) で構成された4種の培養液 10 mL をそれぞれチューブに入れ、グルコース (Glucose) (100 mg/mL) および ADP (1 mM) 基質を入れて 37 °C の水浴で培養した。培養開始後、30 分間隔で試料 100 μL を採取してチューブに入れ、900 μL の蒸留水を入れて 10 倍希釈した後、10 μL の試料を新しいチューブに移して、ATP kit に含まれているルシフェラーゼ試薬を 100 μL 添加し、直ちにルミノメータで 5 回繰り返して測定した。 10

【0102】

その結果、図 18 に示されたように、ルテリアルが添加された群では、ルテリアルが添加されていない群に比べて ATP 濃度が増加していた。この結果から、ルテリアルが ATP 生産能力を有するということを確認することができた。SSH および SSF 添加による差については、SSF 添加群が SSH 添加群に比べて ATP 濃度が高かった (図 18)。

【0103】

実施例 4 : ルテリアルの培養

(1) 実施例 1 で得られたルテリアルのうちサイズが約 50 ~ 200 nm であるルテリアルに PBS を添加し、IR 光線を照射した後、18 ~ 30 °C で約 3 時間培養した。IR 光線を照射した直後から約 1 時間間隔でルテリアルのサイズを顕微鏡で確認した。約 1 ~ 6 時間後、培養前のサイズが約 200 nm であったルテリアルが、約 500 nm に成長したことを確認することができた。これにより、血液由来ルテリアルに水分を添加し、IR 光線照射下で 18 ~ 30 °C で培養する場合、そのサイズを 500 nm 程度まで成長させることができた。勿論、追加培養すると数百 μm まで培養されることが確認され、この状態で追加培養するとバースティング (Bursting) されることも確認された (図 22)。 20

【0104】

(2) 実施例 1 で得られたルテリアルのうちサイズが約 400 ~ 800 nm であるルテリアルに PBS を添加し、IR 光線を照射した後、18 ~ 30 °C で約 3 時間培養した。IR 光線を照射した直後から約 1 時間間隔でルテリアルのサイズと状態を顕微鏡で確認した。約 1 ~ 6 時間後、培養前のサイズが約 400 ~ 800 nm であったルテリアルが成長せず、フィッション (fission) されることを確認した。 30

【0105】

尚、800 nm 以上の変異ルテリアルを追加培養する場合、癌患者の血液で示された変異ルテリアルの形態に変わることが観察された (図 23)。

【0106】

実施例 5 : ルテリアルの抗癌効果

卵巣癌細胞株 SKOV3 および A2780 の2種の増殖抑制効果を測定するために、黄色テトラゾリウム MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾリル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロミド) 分析法を実施した。MTT 分析法は、生きている細胞の生育を測定する方法であって、生きている細胞のミトコンドリア中の脱水素酵素が黄色水溶性物質である MTT により紫色ホルマザン (formazan) を生成する原理を利用する。紫色ホルマザン (formazan) の生産量は、代謝的活性を有する生きている細胞数と略比例すると知られており、細胞の生育と分化を測定するにおいて非常に効果的に用いられることができる。 40

【0107】

培養されたそれぞれの癌細胞を 96 ウェルプレートに 5×10^4 個/mL になるようにウェル当たり 100 μL ずつ添加し、37 °C、炭素 5% および酸素 9.5% が供給される湿潤インキュベータで 24 時間培養した後、サイズ 100 ~ 800 nm のルテリアルを濃 50

度毎に処理した。48時間培養した後、それぞれのウェルにリン酸塩緩衝溶液 (phosphate buffered saline、PBS) に溶解したMTT (5 mg / ml) 溶液を15 μlずつ添加して、さらに4時間培養した。ホルマザン (formazan) の形成を確認した後、培地を完全に除去し、ウェルの底に形成されたホルマザンを溶解するために100 μlのジメチルスルホキシド (DMSO) を添加した。その後、マイクロプレートリーダー (GEMINI、Strattec biomedical) を用いて560 nmで吸光度を測定し、対照群細胞を100%としたときの相対的な細胞増殖抑制率を算出した。

【0108】

その結果、SKOV3およびA2780細胞株のルテリアル(IC50はそれぞれ30 μg / mlおよび60 μg / mlであり、市販中の抗癌剤cisplatinのIC50は100 μMであった(図27)。ルテリアルは、卵巣癌細胞株2種に対して陽性対照薬物群よりも強い細胞毒性を示し、卵巣正常細胞に対しては陽性対照薬物群と類似の細胞毒性を示した。

10

【0109】

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。

20

【産業上の利用可能性】

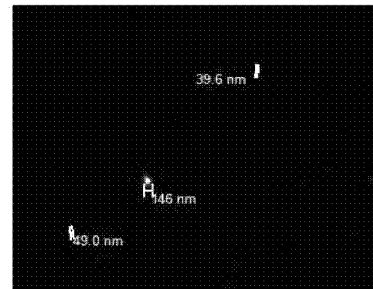
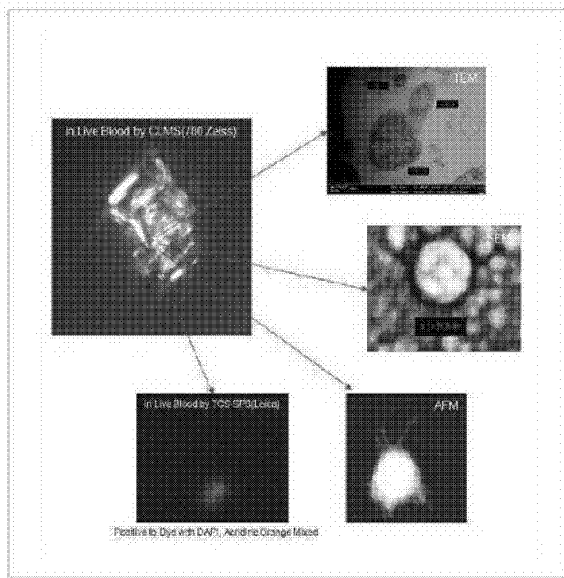
【0110】

本発明によると、患者または健常人の体液中に存在する微細物質であるルテリアルを効果的に分離することができ、前記分離されたルテリアルを所定のサイズに成長するように培養することができるため、疾病の診断および治療に有用である。特に、ルテリアルは癌細胞株に対して強い抗癌効果を示すため抗癌剤として有用である。

【図面】

【図1】

【図2a】

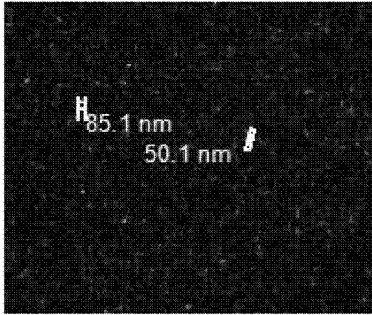


30

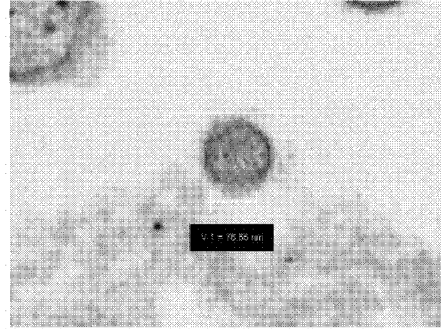
40

50

【 図 2 b 】

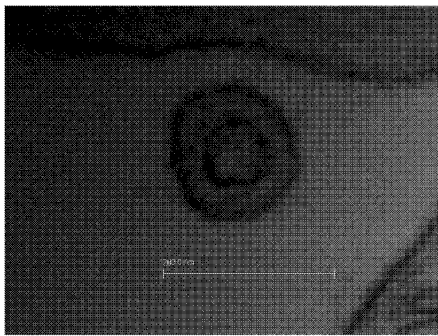


【 図 2 c 】

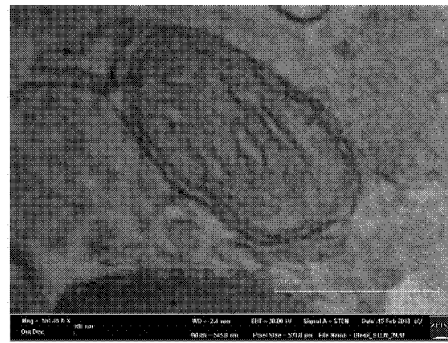


10

【 図 2 d 】

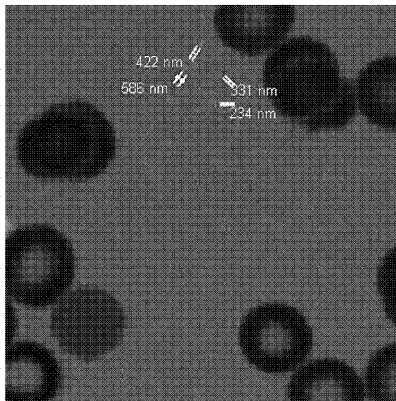


【 図 2 e 】

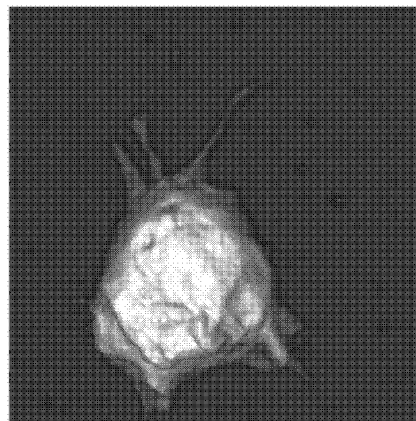


20

【 図 2 f 】



【 図 2 g 】

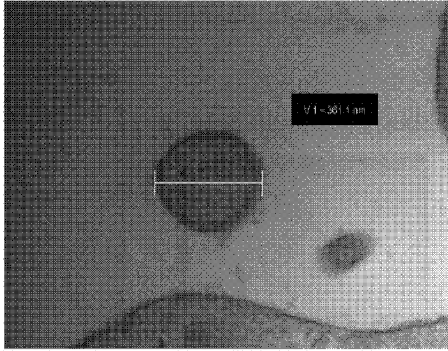


30

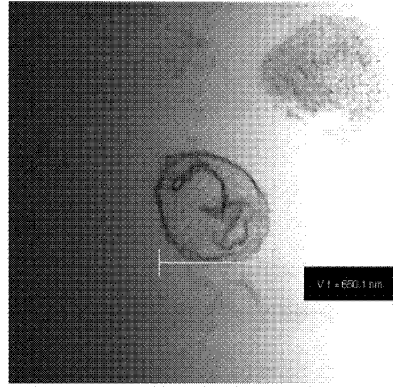
40

50

【 図 2 h 】

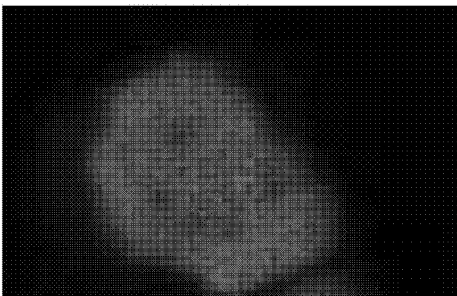


【 図 2 i 】



10

【 図 2 j 】



【 図 3 】



20

30

Rhodamine 123 Positive by Zeiss LSM-780

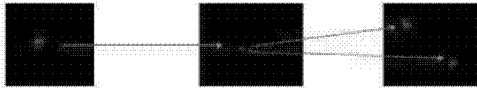
40

50

【 8 】

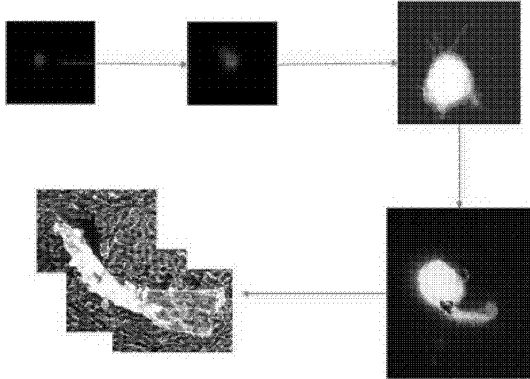
Life Cycling A

Normal (Fission)

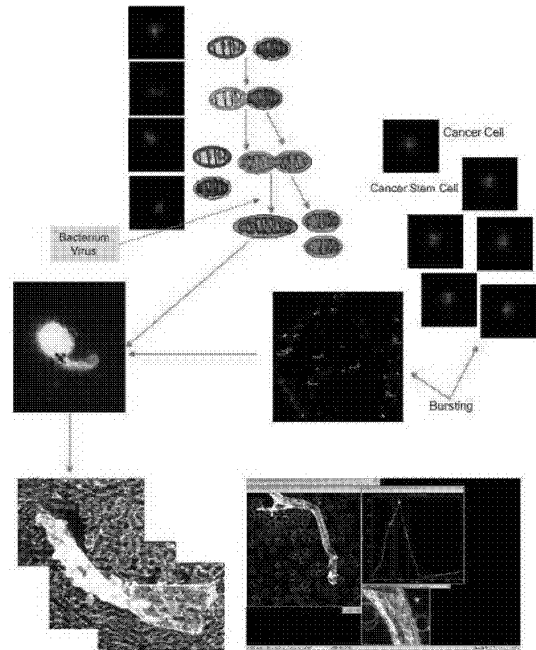


Life Cycling B

Abnormal (Fusion or Coagulation)



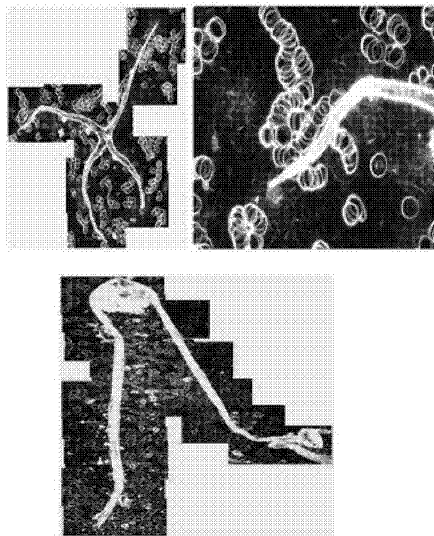
【 9 】



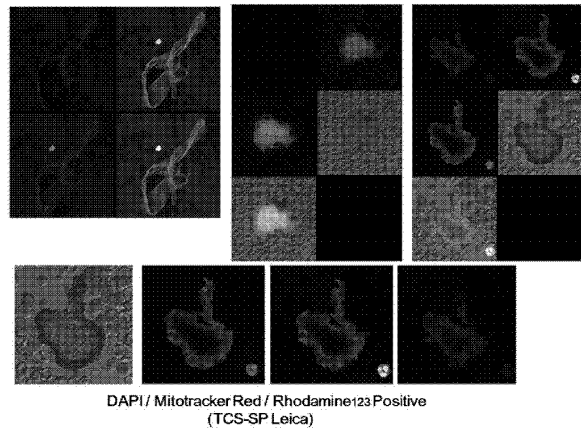
10

20

【 10 a 】



【 10 b 】

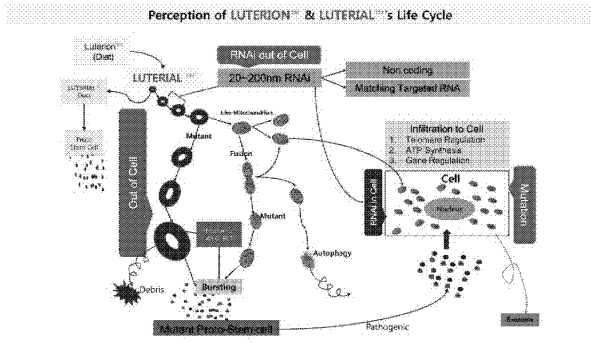


30

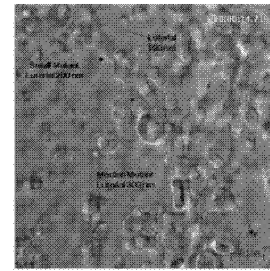
40

50

【 1 1 】

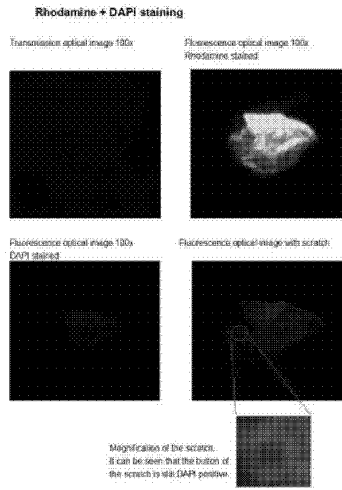


【 1 2 】

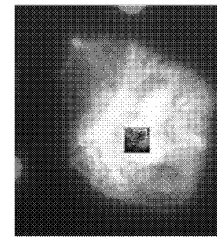


10

【 1 3 】

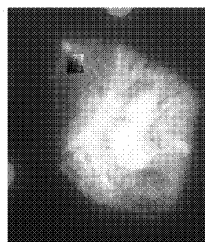


【 1 4 a 】

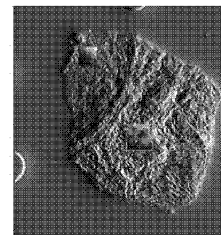


20

【 1 4 b 】



【 1 4 c 】

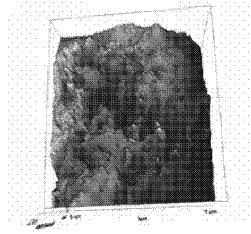


30

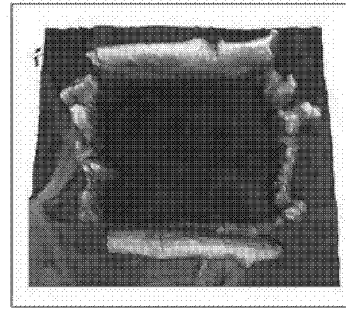
40

50

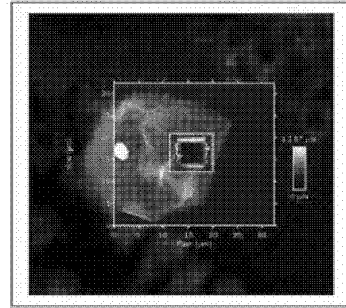
【 1 4 d 】



【 1 5 】

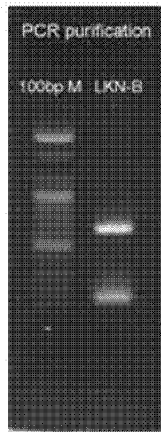


10



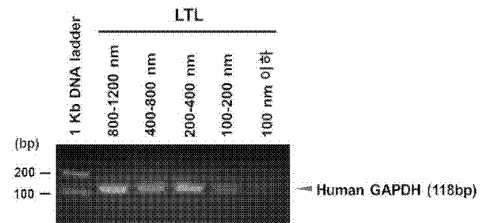
20

【 1 6 a 】



【 1 6 b 】

Loading an agarose (1%) gel after qRT-PCR



30

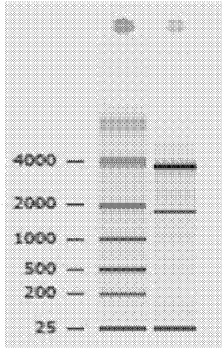
DNA Isolation,
performed by Jun
in Boston, 2013
(<100~1200nm)

	Sample Name	Conc. (Nanodrop) (ng/ul)	260/280	Volume (ul)	Total amount (ng)	QC Result
I	L(Luteal)KN-B (PCRpurification)	12.386	1.826	23.	284.847	pass

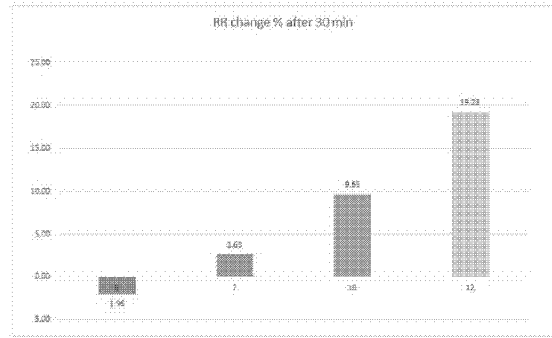
40

50

【 17 】



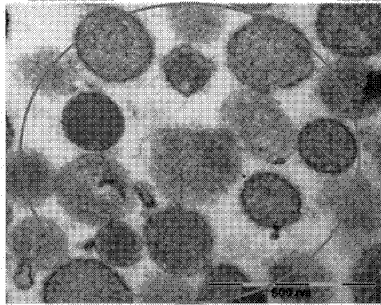
【 18 】



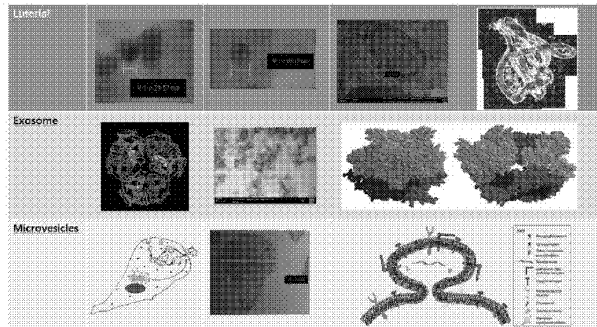
No.	Media	S1Glucose	S2 ADP	E-LTN (SSH 1H)	Description
	(10mL)	(100mg/mL, 1mL)	(1mM, 3mL)	(100mg/mL, 100μL)	
6	Deionized water	○	○	X	
7	Deionized water	○	○	○	
10	Deionized water	○	○	○	SSH 12H
12	Deionized water	○	○	○	SSF 12H

10

【 19 】



【 20 】



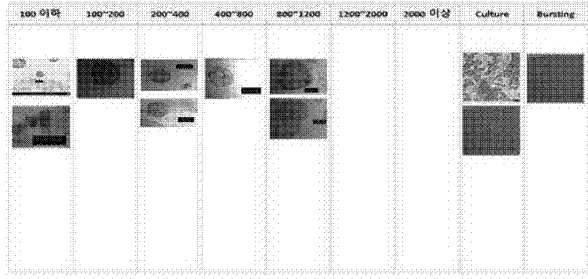
20

30

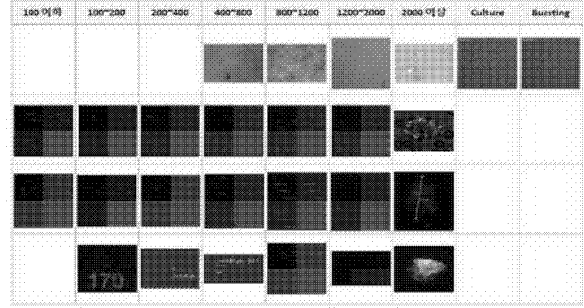
40

50

【 2 1 】

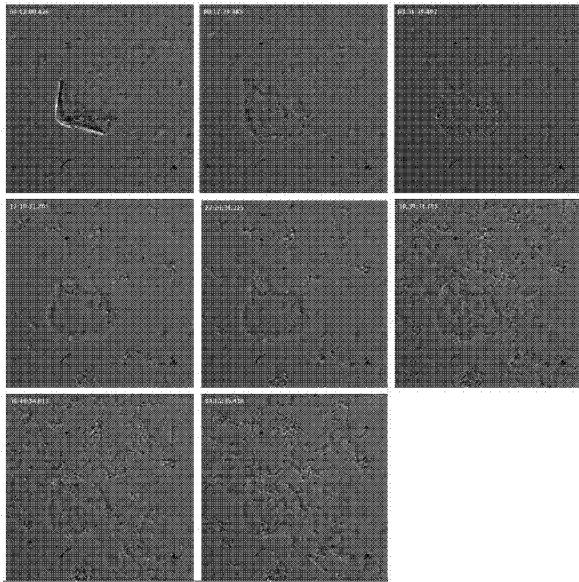


【 2 2 】

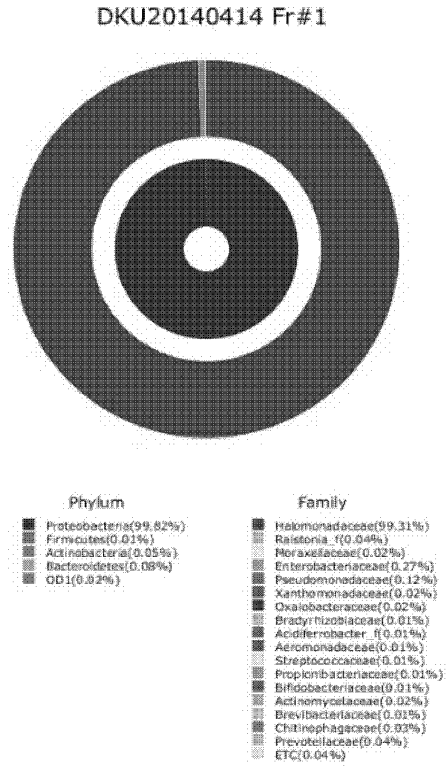


10

【 2 3 】



【 2 4 a 】



20

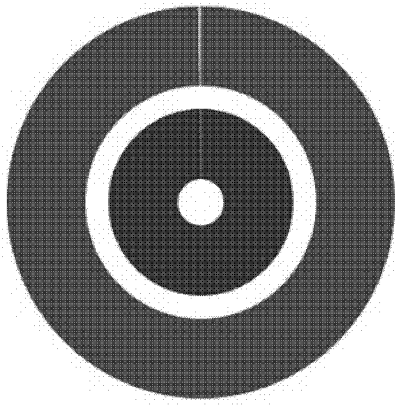
30

40

50

【 2 4 b 】

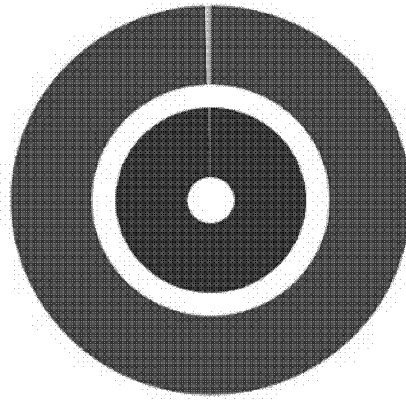
DKU20140414 Fr#2



Phylum	Family
Proteobacteria(99.87%)	Habimnadaceae(99.79%)
Firmicutes(0.02%)	Ralstonia_f(0.03%)
Bacteroidetes(0.07%)	Moraxellaceae(0.01%)
Streptophyta(0.02%)	Burkholderiaceae(0.02%)
Fusobacteria(0.02%)	Sphaerotilus_f(0.01%)
	Staphylococcaceae(0.01%)
	Streptococcaceae(0.01%)
	Chitinophagaceae(0.05%)
	Prevotellaceae(0.02%)
	ETC(0.06%)

【 2 4 c 】

DKU20140414 Fr#3



Phylum	Family
Proteobacteria(99.67%)	Habimnadaceae(99.52%)
Firmicutes(0.12%)	Ralstonia_f(0.02%)
Actinobacteria(0.05%)	Moraxellaceae(0.07%)
Acidobacteria(0.01%)	Comamonadaceae(0.01%)
Bacteroidetes(0.14%)	Sphingomonadaceae(0.01%)
OD1(0.01%)	Acetobacteraceae(0.01%)
OP3(0.01%)	Rhodobacteriaceae(0.01%)
	Rhodospirillaceae(0.01%)
	Staphylococcaceae(0.02%)
	Streptococcaceae(0.1%)
	Propionibacteriaceae(0.03%)
	EU-44539_f(0.14%)
	Chitinophagaceae(0.01%)
	Flavobacteriaceae(0.13%)
	ETC(0.05%)

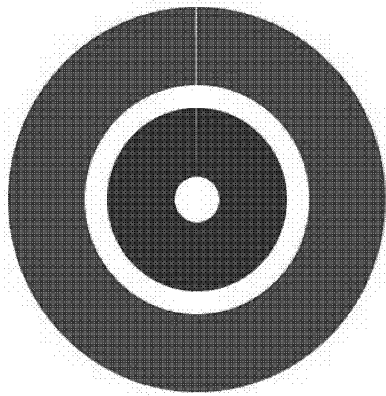
10

20

20

【 2 4 d 】

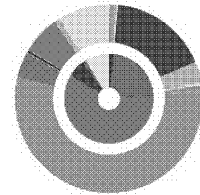
DKU20140414 Fr#4



Phylum	Family
Proteobacteria(99.93%)	Habimnadaceae(99.88%)
Acidobacteria(0.01%)	Ralstonia_f(0.03%)
Bacteroidetes(0.01%)	Burkholderiaceae(0.01%)
OD1(0.05%)	Caulobacteraceae(0.01%)
	Holophagaceae(0.01%)
	Chitinophagaceae(0.01%)
	ETC(0.05%)

【 2 5 a 】

DKU20140313DNA



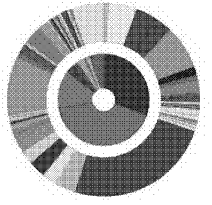
Phylum	Family
Proteobacteria(93.55%)	Ralstonia_f(0.27%)
Firmicutes(2.22%)	Comamonadaceae(0.24%)
Actinobacteria(0.01%)	Sphingomonadaceae(0.01%)
Bacteroidetes(0.24%)	Acetobacteraceae(0.01%)
Chloroflexi(0.01%)	Rhodobacteriaceae(0.01%)
OP3(0.01%)	Rhodospirillaceae(0.01%)
OP4(0.01%)	Staphylococcaceae(0.02%)
OP5(0.01%)	Streptococcaceae(0.1%)
OP6(0.01%)	Propionibacteriaceae(0.03%)
OP7(0.01%)	EU-44539_f(0.14%)
OP8(0.01%)	Chitinophagaceae(0.01%)
OP9(0.01%)	Flavobacteriaceae(0.13%)
OP10(0.01%)	ETC(0.05%)

30

40

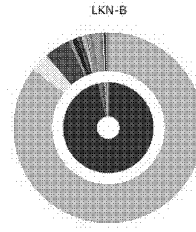
50

【 25 b 】



Phylum	Family
■ Bacteroidetes (2.1%)	■ Bacteroidia (2.1%)
■ Proteobacteria (1.1%)	■ Gammaproteobacteria (1.1%)
■ Firmicutes (1.1%)	■ Bacilli (1.1%)
■ Actinobacteria (1.1%)	■ Actinomycetia (1.1%)
■ Cyanobacteria (1.1%)	■ Cyanobacteria (1.1%)
■ Chloroflexi (1.1%)	■ Chloroflexi (1.1%)
■ Planctomycetes (1.1%)	■ Planctomycetes (1.1%)
■ Gemmatimonadetes (1.1%)	■ Gemmatimonadetes (1.1%)
■ Thaumarchaeota (1.1%)	■ Thaumarchaeota (1.1%)
■ Ascomycota (1.1%)	■ Ascomycota (1.1%)
■ Basidiomycota (1.1%)	■ Basidiomycota (1.1%)
■ Zygomycota (1.1%)	■ Zygomycota (1.1%)
■ Mucoromycota (1.1%)	■ Mucoromycota (1.1%)
■ Opisthokonta (1.1%)	■ Opisthokonta (1.1%)
■ Archaea (1.1%)	■ Archaea (1.1%)
■ Eukaryota (1.1%)	■ Eukaryota (1.1%)

【 25 c 】

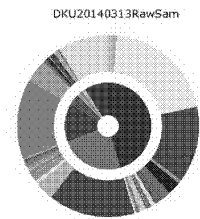


Phylum	Family
■ Proteobacteria (2.1%)	■ Gammaproteobacteria (2.1%)
■ Firmicutes (1.1%)	■ Bacilli (1.1%)
■ Actinobacteria (1.1%)	■ Actinomycetia (1.1%)
■ Cyanobacteria (1.1%)	■ Cyanobacteria (1.1%)
■ Chloroflexi (1.1%)	■ Chloroflexi (1.1%)
■ Planctomycetes (1.1%)	■ Planctomycetes (1.1%)
■ Gemmatimonadetes (1.1%)	■ Gemmatimonadetes (1.1%)
■ Thaumarchaeota (1.1%)	■ Thaumarchaeota (1.1%)
■ Ascomycota (1.1%)	■ Ascomycota (1.1%)
■ Basidiomycota (1.1%)	■ Basidiomycota (1.1%)
■ Zygomycota (1.1%)	■ Zygomycota (1.1%)
■ Mucoromycota (1.1%)	■ Mucoromycota (1.1%)
■ Opisthokonta (1.1%)	■ Opisthokonta (1.1%)
■ Archaea (1.1%)	■ Archaea (1.1%)
■ Eukaryota (1.1%)	■ Eukaryota (1.1%)

10

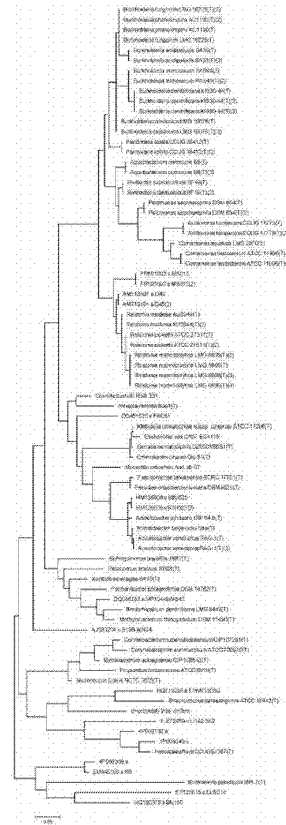
20

【 25 d 】



Phylum	Family
■ Bacteroidetes (2.1%)	■ Bacteroidia (2.1%)
■ Proteobacteria (1.1%)	■ Gammaproteobacteria (1.1%)
■ Firmicutes (1.1%)	■ Bacilli (1.1%)
■ Actinobacteria (1.1%)	■ Actinomycetia (1.1%)
■ Cyanobacteria (1.1%)	■ Cyanobacteria (1.1%)
■ Chloroflexi (1.1%)	■ Chloroflexi (1.1%)
■ Planctomycetes (1.1%)	■ Planctomycetes (1.1%)
■ Gemmatimonadetes (1.1%)	■ Gemmatimonadetes (1.1%)
■ Thaumarchaeota (1.1%)	■ Thaumarchaeota (1.1%)
■ Ascomycota (1.1%)	■ Ascomycota (1.1%)
■ Basidiomycota (1.1%)	■ Basidiomycota (1.1%)
■ Zygomycota (1.1%)	■ Zygomycota (1.1%)
■ Mucoromycota (1.1%)	■ Mucoromycota (1.1%)
■ Opisthokonta (1.1%)	■ Opisthokonta (1.1%)
■ Archaea (1.1%)	■ Archaea (1.1%)
■ Eukaryota (1.1%)	■ Eukaryota (1.1%)

【 26 a 】

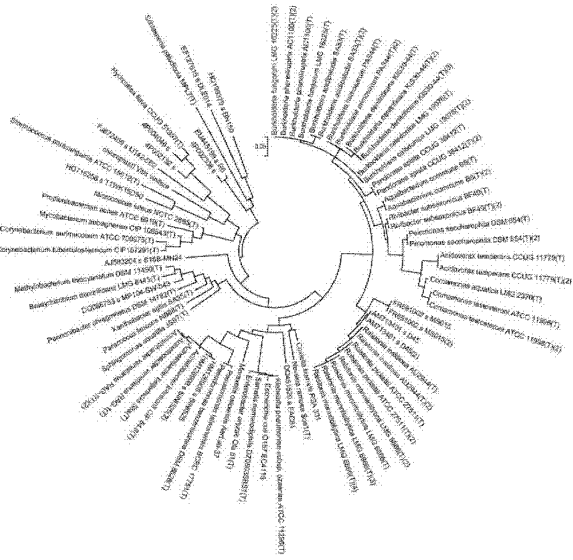


30

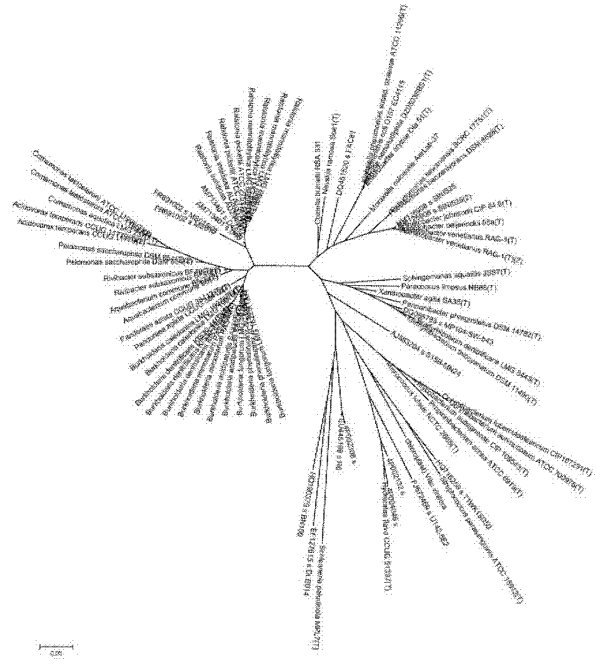
40

50

【 図 26 b 】



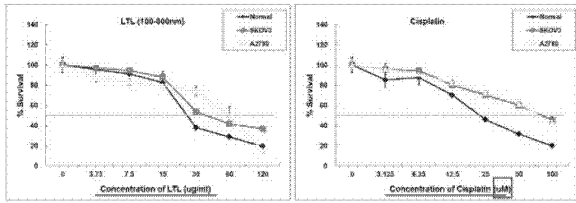
【 図 26 c 】



10

20

【 図 27 】



【 配列表 】

202305586500001.app

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和5年2月2日(2023.2.2)

【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】

次のステップを含むミトコンドリア類似ナノサイズ粒子の濃縮方法：

10

(a) 血液から血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を除去し、血小板および血液由来物質を分離させた血液を $0.8 \sim 1.2 \mu\text{m}$ の空隙を有するフィルタに通過させるステップ；

(b) 前記フィルタされた溶液を遠心分離し、ペレット中に集められたエキソソームを含む一般微小胞を除去して、上清を提供し、ミトコンドリア類似ナノサイズ粒子を含む上清を提供するステップ；

(c) 前記(a)～(b)を実行することにより得られた液体から、粒子が下記の性質の一つ以上を有するか否かを評価することで、ミトコンドリア類似ナノサイズ粒子を同定するステップ；

(i) 免疫蛍光試験で、ヤヌスグリーンB (Janus green B)、アクリジンオレンジ (Acridine Orange)、DAPIまたはローダミン123 (Rhodamine 123) に陽性の発色反応を示す；

20

(ii) 健康な状態では、プロテオバクテリア由来遺伝子とプロテオバクテリア由来遺伝子を発現し、 800 nm 未満のサイズを有する；

(iii) 疾病状態では、プロテオバクテリア由来遺伝子とプロテオバクテリア由来遺伝子だけでなく、真核細胞であるストレプトファイト (Streptophyta) 遺伝子を発現し、 800 nm を超えるサイズを有する；

(iv) 正常条件でATP生成を示す；

(v) ミトコンドリアおよびエキソソームとは全く異なる細胞または細胞類似体である；

(vi) 健常状態では円形乃至楕円形であり、疾病状態では形態が均一ではない；

30

(vii) 膜構造を有している；

(viii) 細胞内または外に存在する；

(ix) 運動性を有し、フュージョン (fusion) および/またはフィッション (fission) の生態様式を示す；

(x) 特定条件で変異ミトコンドリア類似ナノサイズ粒子はバースティング (Bursting) し、バースティング (Bursting) 後には幹細胞性 (stemness) を有する；

(xi) p53 遺伝子およびテロメア (telomere) の調節機能を有する。

【請求項2】

前記血液は哺乳動物由来であることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

40

【請求項3】

前記血液はヒト由来であることを特徴とする、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

200 nm 、 400 nm 、 600 nm 、 800 nm 、および 1000 nm のフィルタを順に用いて、各々 $50 \sim 200 \text{ nm}$ 、 $200 \sim 400 \text{ nm}$ 、 $400 \sim 600 \text{ nm}$ 、 $600 \sim 800 \text{ nm}$ 及び $800 \sim 1000 \text{ nm}$ のサイズのミトコンドリア類似ナノサイズ粒子に分類することをさらに含むことを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0110

50

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0110】

本発明によると、患者または健常人の体液中に存在する微細物質であるルテリアルを効果的に分離することができ、前記分離されたルテリアルを所定のサイズに成長するように培養することができるため、疾病の診断および治療に有用である。特に、ルテリアルは癌細胞株に対して強い抗癌効果を示すため抗癌剤として有用である。

本発明は一態様において、下記を提供する。

[項目 1]

次のステップを含むルテリアルの分離方法：

(a) 血液から血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離する第 1 の分離ステップと、

(b) 前記血小板および血小板以上のサイズを有する血液由来物質を分離させた血液を遠心分離する第 2 の分離ステップと、

(c) 前記遠心分離により得られた上清からルテリアルを分離する第 3 の分離ステップと

(d) 前記分離されたルテリアルを洗浄するステップ。

[項目 2]

前記血液は哺乳動物由来であることを特徴とする、項目 1 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 3]

前記血液はヒト由来であることを特徴とする、項目 2 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 4]

前記第 1 の分離ステップは 0.8 ~ 1.2 μm の空隙を有するフィルタに通過させ、濾過されていない物質は分離するステップをさらに含むことを特徴とする、項目 1 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 5]

200 nm、400 nm、600 nm、800 nm、および 1000 nm のフィルタを順に用いて、各々 50 ~ 200 nm、200 ~ 400 nm、400 ~ 600 nm、600 ~ 800 nm 及び 800 ~ 1000 nm のサイズのルテリアルに分類することをさらに含むことを特徴とする、項目 4 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 6]

前記第 2 の分離ステップは 1200 ~ 5000 rpm で 5 ~ 10 分間遠心分離を繰り返すことにより行うことを特徴とする、項目 1 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 7]

前記第 2 の分離ステップにおいてエキソソーム (exosome) が除去されることを特徴とする項目 1 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 8]

前記第 3 の分離ステップは遠心分離により得られた上清に可視光線を照射すること、及び可視光線が照射された位置に集まる運動性を有するルテリアル粒子をピペットを用いて分離して行うことを特徴とする項目 1 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 9]

前記洗浄するステップは前記第 3 の分離ステップから得られたルテリアルを直径 50 nm の空隙を有するフィルタに通過させること、濾過されていない部分のみを洗浄すること、それによってルテリアルを得ることにより行われることを特徴とする項目 1 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 10]

次の特性の一つ以上を有する体液由来ルテリアル：

(a) 免疫蛍光試験で、ヤヌスグリーン B (Janus green B)、アクリジンオレンジ (Acridine Orange)、およびローダミン 123 (Rhoda

10

20

30

40

50

mine 1 2 3) に陽性の発色反応を示す；

(b) 最適状態 (pH 7 . 2 ~ 7 . 4) において、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子の発現特性を示し、30 ~ 800 nm のサイズを有する；

(c) 酸性化状態では、プロテオバクテリアとプロテオバクテリア由来遺伝子だけでなく、真核細胞であるストレプトファイト (Streptophyta) 遺伝子を発現し、400 nm ~ 2000 nm またはそれ以上までサイズが大きくなる；

(d) 正常条件で ATP 生成に關与する；

(e) ミトコンドリアおよびエキソソームとは全く異なる細胞または細胞類似構造体である；

(f) 定常状態では円形または楕円形であり、患者由来の場合は、定常状態に比べてサイズ (長径 800 nm 以上) が大きく、形態が均一ではない変異ルテリアルが発生する； 10

(g) 二重膜構造を有しており、付着性がある；

(h) 細胞内または外の両方に存在可能である；

(i) 運動性を有し、融合 (fusion) および / または分裂 (fission) の生
態様式を示す；

(j) 特定条件で変異ルテリアルはバースティング (Bursting) し、バースティング (Bursting) 後には幹細胞性 (stemness) を有する；

(k) p 5 3 遺伝子およびテロメアの調節機能を有する。

[項目 1 1]

前記体液は哺乳動物由来の血液、精液、腸液、唾液、または細胞液であることを特徴とする項目 1 0 に記載のルテリアル。 20

[項目 1 2]

項目 1 0 に記載のルテリアルに水分を添加し、IR 光線照射下、18 ~ 30 で培養することを含むルテリアルの培養方法。

[項目 1 3]

前記培養前及び後において、ルテリアルのサイズは、各々 50 ~ 200 nm 及び 300 ~ 800 nm であることを特徴とする項目 1 2 に記載のルテリアルの培養方法。

[項目 1 4]

前記水分は、食塩水または PBS 溶液であることを特徴とする項目 1 3 に記載のルテリアルの培養方法。 30

[項目 1 5]

次のステップを含むルテリアルの分離方法：

(a) 体液を遠心分離して上清を得て、この上清を 2 ~ 5 μ m の孔のサイズのフィルタで濾過するステップ；と、

(b) 前記濾過された溶液を 2 次遠心分離して上清を得て、この上清を 0 . 5 ~ 2 μ m の孔のサイズのフィルタで濾過するステップ。

[項目 1 6]

(c) 前記 (b) ステップにおいて濾過された溶液に可視光線を照射して、そして可視光線が照射された位置に集まる運動性を有するルテリアル粒子をピペットを用いて分離するステップをさらに含むことを特徴とする項目 1 5 に記載のルテリアルの分離方法。 40

[項目 1 7]

前記体液は哺乳動物由来の血液、精液、腸液、唾液、または細胞液であることを特徴とする項目 1 5 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 1 8]

前記 1 次遠心分離は 2000 ~ 4000 r p m で 5 ~ 30 分行うことを特徴とする項目 1 5 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 1 9]

前記 2 次遠心分離は 3000 ~ 7000 r p m で 5 ~ 20 分行うことを特徴とする項目 1 5 に記載のルテリアルの分離方法。

[項目 2 0] 50

項目 10 に記載のルテリアルを有効成分として含有する抗癌組成物。

【外国語明細書】

2023055865000065.pdf

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 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-ロ 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-ロ 29-ギル, 71, 12
 - 1403
- (74)代理人 100114188
- 弁理士 小野 誠
- (74)代理人 100119253
- 弁理士 金山 賢教
- (74)代理人 100124855
- 弁理士 坪倉 道明
- (74)代理人 100129713
- 弁理士 重森 一輝
- (74)代理人 100137213
- 弁理士 安藤 健司
- (74)代理人 100143823
- 弁理士 市川 英彦
- (74)代理人 100196483
- 弁理士 川崎 洋祐
- (74)代理人 100160749
- 弁理士 飯野 陽一
- (74)代理人 100160255
- 弁理士 市川 祐輔
- (74)代理人 100146318
- 弁理士 岩瀬 吉和
- (74)代理人 100127812
- 弁理士 城山 康文
- (72)発明者 チョイ ウォンチョル
 大韓民国, 22143, インチョン, ナム-グ, キョンウォン-デロ, 884, ザ ワールド ステ
 イト アパートメント, 103-401
- (72)発明者 クォン ヨンア
 大韓民国, 06002, 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
- (72)発明者 チョイ ソクフン
 大韓民国, 06002, ソウル, カンナム-グ, アプクジョン-ロ 29-ギル, 71, 12-1
 403
- (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-ロ 29-ギル, 71, 12
 - 1403