

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-194600

(P2019-194600A)

(43) 公開日 令和1年11月7日(2019.11.7)

(5) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	2 G O 4 5
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	4 B O 6 3
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	
C 1 2 Q 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z	
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844 Z	

審査請求 有 請求項の数 17 O L 外国語出願 (全 68 頁)

(21) 出願番号 特願2019-104805 (P2019-104805)  
 (22) 出願日 令和1年6月4日 (2019.6.4)  
 (62) 分割の表示 特願2016-514524 (P2016-514524) の分割  
 原出願日 平成26年5月22日 (2014.5.22)  
 (31) 優先権主張番号 61/827,506  
 (32) 優先日 平成25年5月24日 (2013.5.24)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 590002013  
 ソシエテ・デ・プロデュイ・ネスレ・エス・アー  
 スイス, 1800 ヴェヴェー, アントルードューーヴィル  
 (74) 代理人 100088155  
 弁理士 長谷川 芳樹  
 (74) 代理人 100107456  
 弁理士 池田 成人  
 (74) 代理人 100162352  
 弁理士 酒巻 順一郎  
 (74) 代理人 100140453  
 弁理士 戸津 洋介  
 (74) 代理人 100140888  
 弁理士 渡辺 欣乃

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 過敏性腸症候群を診断するための経路特異的マーカー

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 IBS 診断のためのバイオマーカーの提供。

【解決手段】 本発明は、個体における過敏性腸症候群 (IBS) の診断を補助する方法を提供する。特に、本発明は、個体がセリアック病又は炎症性腸疾患 (IBD) を有さず、IBS 及び/又はそのサブタイプを有するかどうかを判断するのに有用である。したがって、本発明は、IBS の正確な診断予測を提供し、療法の決定の手引きとするのに有用である。

【選択図】 図 5

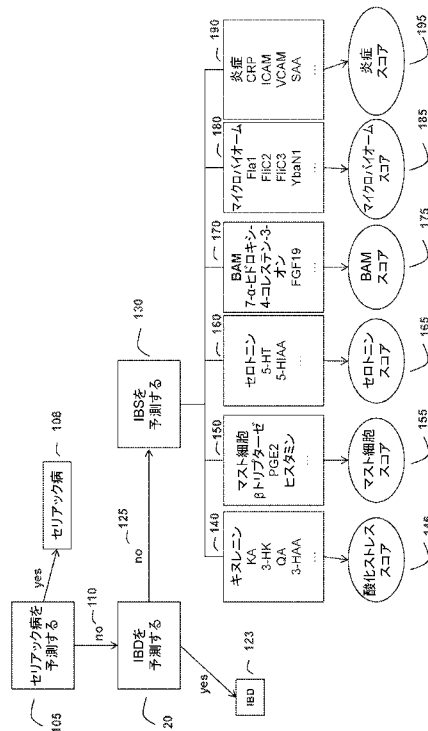


FIG. 5

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

対象における過敏性腸症候群（IBS）及び／又はその臨床的サブタイプの診断を補助する方法であって、

（a）試料中のマーカーのパネルを検出して、炎症性腸疾患及びセリアック病（CD）の診断を除外するステップと、

（b）前記試料中のマーカーのパネルを検出して、IBSの診断を決定するステップとを含む、方法。

## 【請求項 2】

以下の（a）～（h）のスコアの1つ又は複数のもを得るステップと：

（a）前記対象から得られた前記試料中の抗グリアジン Ig A 抗体、抗グリアジン Ig G 抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ（tTG）抗体及び抗筋内膜抗体の有無を検出して、セリアック病（CD）スコアを得るステップ、

（b）前記試料中の少なくとも以下のマーカーのそれぞれの存在又はレベル又は遺伝子型を検出して、炎症性腸疾患（IBD）スコアを得るステップ：

（i）血清学的マーカー ASCA - A、ASCA - G、ANCA、pANCA、抗 OmpC 抗体、抗 C Bir 1 抗体、抗 Fla X 抗体及び抗 A 4 - Fla 2 抗体のそれぞれの存在又はレベル、

（ii）炎症マーカー VEGF、ICAM、VCAM、SAA 及び CRP のそれぞれの存在又はレベル、並びに

（iii）遺伝マーカー ATG 16 L 1、ECM 1、NKX 2 - 3 及び STAT 3 のそれぞれの遺伝子型、

（c）前記試料中の少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーのレベルを検出して、マイクロバイームスコアを得るステップ、

（d）前記試料中の少なくとも1つのマスト細胞マーカーのレベルを検出して、マスト細胞スコアを得るステップ、

（e）前記試料中の少なくとも1つの炎症性細胞マーカーのレベルを検出して、炎症スコアを得るステップ、

（f）前記試料中の少なくとも1つの胆汁酸吸収不良（BAM）マーカーのレベルを検出して、BAMスコアを得るステップ、

（g）前記試料中の少なくとも1つのキヌレニンマーカーのレベルを検出して、酸化ストレススコアを得るステップ、

（h）前記試料中の少なくとも1つのセロトニンマーカーのレベルを検出して、セロトニンスコアを得るステップ、

（i）前記 CD スコアに決定木又はルールセットを適用して、前記試料が CD 試料であるか、又は非 CD 試料であるかどうかの判定を得るステップと、

（j）前記試料が非 CD 試料である場合、前記 IBD スコアにランダムフォレスト統計解析を適用して、試料が IBD 試料であるか、又は非 IBD 試料であるかどうかの判定を得るステップと、

（k）前記試料が非 IBD 試料である場合、前記マイクロバイームスコア、前記マスト細胞スコア、前記炎症スコア、前記 BAM スコア、前記酸化ストレススコア及び前記セロトニンスコアの1つ又は複数のもに統計アルゴリズムを適用して、疾患スコアを得るステップと、

（l）疾患スコア、並びに、患者の後ろ向きコホートからのマイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアを含む診断モデルに基づいて IBS を有する確率を生成する統計アルゴリズムに基づいて、前記対象における IBS の診断を確定するステップと

を含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーが抗 Fla 1 抗体、抗 Fla 2 抗体、抗 F

10

20

30

40

50

l a A 抗体、抗 F l i C 抗体、抗 F l i C 2 抗体、抗 F l i C 3 抗体、抗 Y B a N 1 抗体、抗 E C F l i C 抗体、抗 E c 0 F l i C 抗体、抗 S e F l j B 抗体、抗 C j F l a A 抗体、抗 C j F l a B 抗体、抗 S f F l i C 抗体、抗 C j C g t A 抗体、抗 C j d m h 抗体、抗 C j G T - A 抗体、抗 E c Y i d X 抗体、抗 E c E r a 抗体、抗 E c F r v X 抗体、抗 E c G a b T 抗体、抗 E c Y e d K 抗体、抗 E c Y b a N 抗体、抗 E c Y h g N 抗体、抗 R t M a g a 抗体、抗 R b C p a F 抗体、抗 R g P i l D 抗体、抗 L a F r c 抗体、抗 L a E n o 抗体、抗 L j E F T u 抗体、抗 B f O m p a 抗体、抗 P r O m p A 抗体、抗 C p 1 0 b A 抗体、抗 C p S p A 抗体、抗 E f S a n t 抗体、抗 L m O s p 抗体、抗 S f E T - 2 抗体、抗 C p a t o x 抗体、抗 C p b t o x 抗体、抗 E c S t a 2 抗体、抗 E c 0 S t x 2 A 抗体、抗 C j c d t B / C 抗体、抗 C d t c d A / B 抗体及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

10

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つのマスト細胞マーカーが - トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジン E 2 ( P G E 2 ) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの炎症マーカーが C R P 、 I C A M 、 V C A M 、 S A A 、 G R O 及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの胆汁酸吸収不良マーカーが 7 - ヒドロキシ - 4 - コレステン - 3 - オン、F G F 1 9 及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つのキヌレニンマーカーがキヌレニン ( K ) 、キヌレン酸 ( K y A ) 、アントラニル酸 ( A A ) 、3 - ヒドロキシキヌレニン ( 3 - H K ) 、3 - ヒドロシアントラニル酸 ( 3 - H A A ) 、キサンツレン酸 ( X A ) 、キノリン酸 ( Q A ) 、トリプトファン、5 - ヒドロキシトリプトファン ( 5 - H T P ) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つのセロトニンマーカーがセロトニン ( 5 - H T ) 、5 - ヒドロキシインドール酢酸 ( 5 - H I A A ) 、セロトニン - O - 硫酸、セロトニン - O - リン酸及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 9】

前記診断モデルを、I B S 及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

前記診断モデルを、I B S の臨床サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 11】

I B S の診断を、便秘型 I B S ( I B S - C ) 、下痢型 I B S ( I B S - D ) 、混合型 I B S ( I B S - M ) 、交替型 I B S ( I B S - A ) 又は感染後 ( I B S - P I ) として分類するステップをさらに含む、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 12】

前記細菌抗原抗体マーカー、前記マスト細胞マーカー、前記炎症性細胞マーカー、前記 B A M マーカー、前記キヌレニンマーカー又は前記セロトニンマーカーのレベルを、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースのアッセイ、免疫測定法、免疫組織化学測定法又は移動度アッセイにより独立に検出する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

前記ハイブリダイゼーションアッセイが E L I S A 又は C E E R ( 商標 ) アッセイを含む、請求項 1 2 に記載の方法。

50

## 【請求項 14】

前記試料が、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便、涙液、その他の体液、組織試料及びその細胞抽出物からなる群から選択される、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記試料が血清である、請求項 14 に記載の方法。

## 【請求項 16】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも 2 つのメンバーを測定する、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 17】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも 3 つのメンバーを測定する、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 18】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも 4 つのメンバーを測定する、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 19】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも 5 つのメンバーを測定する、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 20】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群のすべてのメンバーを測定する、請求項 16 に記載の方法。

## 【請求項 21】

対象における過敏性腸症候群 ( I B S ) 及び / 又はその臨床的サブタイプの診断を補助する方法であって、

以下の ( a ) ~ ( f ) のスコアの 1 つ又は複数のもを得るステップと :

( a ) 前記対象から得られた試料中の少なくとも 1 つの細菌抗原抗体マーカーのレベルを検出して、マイクロバイームスコアを得るステップ、

( b ) 前記試料中の少なくとも 1 つのマスト細胞マーカーのレベルを検出して、マスト細胞スコアを得るステップ、

( c ) 前記試料中の少なくとも 1 つの炎症性細胞マーカーのレベルを検出して、炎症スコアを得るステップ、

( d ) 前記試料中の少なくとも 1 つの胆汁酸吸収不良 ( B A M ) マーカーのレベルを検出して、B A Mスコアを得るステップ、

( e ) 前記試料中の少なくとも 1 つのキヌレンンマーカーのレベルを検出して、酸化ストレススコアを得るステップ、

( f ) 前記試料中の少なくとも 1 つのセロトニンマーカーのレベルを検出して、セロトニンスコアを得るステップ、

( g ) 前記マイクロバイームスコア、前記マスト細胞スコア、前記炎症スコア、前記 B A Mスコア、前記酸化ストレススコア及び前記セロトニンスコアに統計アルゴリズムを適用して、疾患スコアを得るステップと、

( h ) 疾患スコア、並びに、後ろ向きコホートからのマイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアを含む診断モデルに基づいて I B S を有する確率を生成する統計アルゴリズムに基づいて、前記対象における I B S の診断を確定するステップとを含む、方法。

## 【請求項 22】

10

20

30

40

50

前記少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーが抗Fla1抗体、抗Fla2抗体、抗FlaA抗体、抗FlaC抗体、抗FlaC2抗体、抗FlaC3抗体、抗YBaN1抗体、抗ECFlaC抗体、抗EcOFlaC抗体、抗SeFljB抗体、抗CjFlaA抗体、抗CjFlaB抗体、抗SfFlaC抗体、抗CjCgtA抗体、抗Cjdmh抗体、抗CjGT-A抗体、抗EcYidX抗体、抗EcEra抗体、抗EcFrVX抗体、抗EcGabT抗体、抗EcYedK抗体、抗EcYbaN抗体、抗EcYhgN抗体、抗RtMaga抗体、抗RbCpaF抗体、抗RgPild抗体、抗LaFrc抗体、抗LaEno抗体、抗LjEFTu抗体、抗BfOmpa抗体、抗PrOmpA抗体、抗Cp10bA抗体、抗CpSpA抗体、抗EfSant抗体、抗LmOsp抗体、抗SfET-2抗体、抗Cpatox抗体、抗Cpbtox抗体、抗EcSta2抗体、抗EcOStx2A抗体、抗CjcdtB/C抗体、抗CdtcdA/B抗体及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

10

【請求項23】

前記少なくとも1つのマスト細胞マーカーが -トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE2 (PGE2) 及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項24】

前記少なくとも1つの炎症マーカーがCRP、ICAM、VCAM、SAA、GRO及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項25】

前記少なくとも1つの胆汁酸吸収不良マーカーが7 -ヒドロキシ-4 -コレステレン-3 -オン、FGF19及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

20

【請求項26】

前記少なくとも1つのキヌレニンマーカーがキヌレニン(K)、キヌレン酸(KyA)、アントラニル酸(AA)、3 -ヒドロキシキヌレニン(3 -HK)、3 -ヒドロキシアントラニル酸(3 -HAA)、キサントレン酸(XA)、キノリン酸、トリプトファン、5 -ヒドロキシトリプトファン(5 -HTP)及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

【請求項27】

前記少なくとも1つのセロトニンマーカーがセロトニン(5 -HT)、5 -ヒドロキシインドール酢酸(5 -HIAA)、セロトニン-O -硫酸、セロトニン-O -リン酸及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項21に記載の方法。

30

【請求項28】

前記診断モデルを、IBS及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する、請求項21に記載の方法。

【請求項29】

前記診断モデルを、IBSの臨床サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する、請求項21に記載の方法。

【請求項30】

IBSの診断を、便秘型IBS (IBS - C)、下痢型IBS (IBS - D)、混合型IBS (IBS - M)、交替型IBS (IBS - A)又は感染後 (IBS - PI)として分類するステップをさらに含む、請求項21に記載の方法。

40

【請求項31】

前記細菌抗原抗体マーカー、前記マスト細胞マーカー、前記炎症性細胞マーカー、前記BAMマーカー、前記キヌレニンマーカー又は前記セロトニンマーカーのレベルを、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースのアッセイ、免疫測定法、免疫組織化学測定法又は移動度アッセイにより独立に検出する、請求項21に記載の方法。

【請求項32】

前記ハイブリダイゼーションアッセイがELISA又はCEER (商標)アッセイを含

50

む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

マイクロバイームスコア、前記マスト細胞スコア、前記炎症スコア、前記 B A M スコア、前記酸化ストレススコア及び前記セロトニンスコアの群から選択される少なくとも 2 つのメンバーを測定する、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも 3 つのメンバーを測定する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも 4 つのメンバーを測定する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 6】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも 5 つのメンバーを測定する、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 7】

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群のすべてのメンバーを測定する、請求項 3 3 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

[0001]本出願は、その開示がすべての目的のためにその全体として参照により本明細書に組み込まれる、2013年5月24日に提出した米国仮特許出願第61/827506号の優先権を主張するものである。本出願は、代理人整理番号88473-909072-026620PCを有する本出願と同一の日付で提出したPCT出願を参照により本明細書に組み込む。

【発明の背景】

【0002】

[0002]過敏性腸症候群 ( I B S ) は、すべての消化管障害のうちの最も一般的なものであり、一般人口の10~20%が罹患していて、消化器系の病訴を有するすべての患者の50%超を占めている。しかし、I B S に罹患している患者の約10%~50%が実際に医師の診察を受けているにすぎないことが研究によって示唆されている。I B S を有する患者は、例えば、主として排便に関連する腹痛、下痢、便秘又は下痢便秘交替症、腹部膨満、ガス及び糞便における過剰粘液などの、異種の症状を呈する。I B S 患者の40%超は、仕事を休み、社会生活を縮小し、性交を避け、予約を解約し、旅行を中止し、薬を服用し、当惑することの恐れのために家に引きこもらなければならないほど重度の症状を有する。米国におけるI B S の推定医療費は、年80億ドルである ( T a l l e y ら、G a s t r o e n t e r o l . 、 1 0 9 巻、1736~1741頁 ( 1 9 9 5 年 ) ) 。

【0003】

[0003]I B S 患者は、主な腸症状によって次の3群に分類される：便秘優勢型I B S ( I B S - C )、下痢優勢型I B S ( I B S - D ) 及び下痢と便秘の交替症状を呈するI B S ( I B S - M )、並びに分類不能型I B S ( I B S - U )。現在の臨床診療においては、I B S の診断はローマIII診断基準に基づいており、患者が呈する症状に加えて他のG I 障害の除外によって行われる。この障害を同定するために用いることができる特定の生物学的、X線撮影上、内視鏡的又は生理学的バイオマーカーは、存在しない。

【0004】

[0004]過敏性腸症候群は、異種性の消化管 ( G I ) 機能障害である。その病因に免疫系

10

20

30

40

50

が関与することを示す証拠が増加しつつある。GI感染は、IBS症状の発症を引き起こす誘因であり得る。他方で、IBSは、「脳-腸障害」としばしば記載される。5-HTシグナル伝達経路の調節障害によって媒介されるGI運動性及び排泄の変化は、排便習慣の不規則性の基礎となり得る。結腸神経に近接するマスト細胞の活性化は、IBSを有する患者が経験する異常な疼痛と相関する。マスト細胞は、活性化により種々の炎症性メディエータを産生し、放出することができることが周知である。しかし、これらの様々な経路が互いにどのように連絡するのか、またそれらの相互作用がIBS患者において健常対象におけるのと同様に挙動するかどうかは、明らかではない。

#### 【0005】

[0005] IBSの正確な病態生理は、依然として解明されていない。腸運動不全及び内臓知覚の変化が、症状の病因の重要な寄与因子であると考えられている(Quigley Scand J., Gastroenterol., 38巻(補遺237)、1~8頁(2003年)、Mayerら、Gastroenterol., 122巻、2032~2048頁(2002年))が、この状態は、脳-腸連絡の妨害、腸管感染、腸炎症及び/又は細菌叢の変化によって特徴付けられるストレス関連障害であるとみられている(図1参照)。最近、腸管感染及び腸炎症の役割も提案された。研究により、細菌学的に確認された胃腸炎の後のIBSの発症が実証された一方で、他の研究により、IBSにおける軽度の粘膜炎症(Spillerら、Gut, 47巻、804~811頁(2000年)、Dunlopら、Gastroenterol., 125巻、1651~1659頁(2003年)、Cumberlandら、Epidemiol. Infect., 130巻、453~460頁(2003年))及び免疫活性化(Gweeら、Gut, 52巻、523~526頁(2003年)、Pimentelら、Am. J. Gastroenterol., 95巻、3503~3506頁(2000年))の証拠が提供された。腸内フローラ(例えば、腸内マイクロバイーム)も関連付けられてきており、最近の研究により、免疫活性の調節による該障害の治療における共生生物であるビフィドバクテリウム属(*Bifidobacterium*)の有効性が示された(Simrenら、Gut, 62巻、159~176頁(2013年))。

#### 【0006】

[0006] 様々な腸疾患又は障害における抗微生物抗体、ストレスホルモン、炎症性サイトカイン及びマスト細胞マーカーの役割を裏付ける証拠が増加している。例えば、抗微生物抗体であるOmpC、Cbir1、FlaX及びFla2は、炎症性腸疾患(IBD)の有用なバイオマーカーであることが証明された。大腸菌(*Escherichia coli*) K12タンパク質(例えば、Era、FocA、FrvX、GabT、YbaN、YcdG、YhgN、及びYidX)に対する抗体のサブセットは、クローン病(CD)を有する個体と健常対照とを、またCDを有する個体と潰瘍性大腸炎を有する個体とを区別するのに用いることができる(Chenら、Mol. Cell Proteomics, 8巻、1765~1776頁、(2009年))。カンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*) (C. jejuni, Cj)、大腸菌(*E. coli*, Ec)、腸炎菌(*Salmonella enteritidis*) (S. enteritidis, Se)、フレキシナ赤痢菌(*Shigella flexneri*) (S. flexneri, Sf)による感染によりしばしば引き起こされるIBSに随伴する感染後小腸細菌過剰増殖(SIBO)を有する個体は、感染菌のフラジェリタンパク質に対する抗体を保有することがある(Spiller R及びGarsed K., Gastroenterology, 136巻、1979~1988頁(2009年))。

#### 【0007】

[0007] 腸の遠位区域におけるマスト細胞浸潤の増大及び活性化は、IBSの症状発現及び重症度に関連する。これらの細胞は、IBS患者における粘膜刺激に対する内臓求心性神経の応答の増大にも関連付けられている。マスト細胞の過形成は、感染後IBS及び非感染後IBSの両方におけるこれらの細菌による感染の後に一般的に観察される。 - ト

10

20

30

40

50

リプターゼ、ヒスタミン及びプロスタグランジンE2 (PGE2) などのマスト細胞マーカーの測定は、IBSの臨床診断に重要な意味を有する。IBSの診断を補助するマスト細胞マーカーを用いる詳細な方法は、それらの開示がすべての目的のためにそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,114,616号及び第8,709,733号に記載されている。

#### 【0008】

[0008] IBS患者は、一般的に脳-腸軸及び腸内微生物相により媒介される異常な腸運動及び内臓過敏症を経験する(図1)。IBSを含むストレス感受性障害においては、腸ホルモン、セロトニン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン及びカテコールアミンなどの、視床下部-下垂体-副腎軸(HPA)軸のストレスホルモンが放出され、それにより、例えば、腸の生理機能が制御される。トリプトファン経路、キヌレニン経路及びセロトニン経路などの、代謝物駆動経路(metabolite driven pathway)(図2)を含む脳-腸軸の調節障害は、運動性を減少させ、疼痛又は不快感を亢進させることにより消化管機能に悪影響を及ぼし得る。セロトニン経路を対象とする治療薬は、IBSの治療用に現在研究中である。腸内胆汁酸分泌及び吸収の調節不全もIBSに関連する(図3)。いくつかの研究で、消化管機能が腸内マイクロバイオーームによる影響を受けることも示された(図4)。例えば、食事、抗生物質、病原体及び宿主の免疫応答は、腸のマイクロバイオーームコミュニティを変化させる可能性があり、これがひいては、腸の機能を変化させる可能性がある。

#### 【0009】

[0009] 上記のことに鑑みれば、脳-腸-マイクロバイオーーム軸をモニタリングすることによって個体におけるIBSを診断する方法の必要性が当技術分野に存在する。本発明は、この必要性及び他の必要性を満たす。

#### 【発明の簡単な概要】

#### 【0010】

[0010] いくつかの態様において、本明細書で提供するものは、対象における過敏性腸症候群(IBS)及び/又はその臨床的サブタイプの診断を補助する方法である。方法は、

(a) 試料中のマーカーのパネルを検出して、炎症性腸疾患及びセリアック病(CD)の診断を除外するステップと、

(b) 試料中のマーカーのパネルを検出して、IBSの診断を決定する(rule-in)ステップを含む。

#### 【0011】

[0011] 特定の例において、本方法は、以下のスコア(a)~(h)の1つ又は複数のものを得るステップと：(a) 上記対象から得られた試料中の抗グリアジンIgA抗体、抗グリアジンIgG抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ(tTG)抗体及び抗筋内膜抗体の有無を検出して、セリアック病(CD)スコアを得るステップ、(b) 上記試料中の以下のマーカーの少なくともそれぞれの存在又はレベル又は遺伝子型を検出して、炎症性腸疾患(IBD)スコアを得るステップ：(i) 血清学的マーカーASCA-A、ASCA-G、ANCA、pANCA、抗OmpC抗体、抗Cbir1抗体、抗Flax抗体及び抗A4-Fla2抗体のそれぞれの存在又はレベル、(ii) 炎症マーカーVEGF、ICAM、VCAM、SAA及びCRPのそれぞれの存在又はレベル、並びに(iii) 遺伝マーカーATG16L1、ECM1、NKX2-3及びSTAT3のそれぞれの遺伝子型、(c) 上記試料中の少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーのレベル(例えば、濃度)を検出して、マイクロバイオーームスコアを得るステップ、(d) 上記試料中の少なくとも1つのマスト細胞マーカーのレベル(例えば、濃度)を検出して、マスト細胞スコアを得るステップ、(e) 上記試料中の少なくとも1つの炎症性細胞マーカーのレベル(例えば、濃度)を検出して、炎症スコアを得るステップ、(f) 上記試料中の少なくとも1つの胆汁酸吸収不良(BAM)マーカーのレベル(例えば、濃度)を検出して、BAMスコ

10

20

30

40

50

アを得るステップ、(g)上記試料中の少なくとも1つのキヌレニンマーカのレベル(例えば、濃度)を検出して、酸化ストレススコアを得るステップ、(h)上記試料中の少なくとも1つのセロトニンマーカのレベル(例えば、濃度)を検出して、セロトニンスコアを得るステップ、

(j)上記試料が非CD試料である場合、上記IBDスコアにランダムフォレスト統計解析を適用して、試料がIBD試料であるか、又は非IBD試料であるかどうかの判定を得るステップと、

(k)上記試料が非IBD試料である場合、上記マイクロバイームスコア、上記マスト細胞スコア、上記炎症スコア、上記BAMスコア、上記酸化ストレススコア及び上記セロトニンスコアに統計アルゴリズムを適用して、疾患スコアを得るステップと、並びに、

(l)疾患スコア並びに患者の後ろ向きコホートからのマイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアを含む診断モデルに基づいてIBSを有する確率を発生する統計アルゴリズムに基づいて、上記対象におけるIBSの診断を確定するステップと、を含む。

#### 【0012】

[0012]いくつかの実施形態において、少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカ-は、抗Fla1抗体、抗Fla2抗体、抗FlaA抗体、抗FlaC抗体、抗FlaC2抗体、抗FlaC3抗体、抗YbaN1抗体、抗EcFlaC抗体、抗EcOFlaC抗体、抗SeFljB抗体、抗CjFlaA抗体、抗CjFlaB抗体、抗SfFlaC抗体、抗CjCgtA抗体、抗Cjdmh抗体、抗CjGT-A抗体、抗EcYidX抗体、抗EcEra抗体、抗EcFrVX抗体、抗EcGabT抗体、抗EcYedK抗体、抗EcYbaN抗体、抗EcYhgN抗体、抗RtMaga抗体、抗RbCpaF抗体、抗RgPilD抗体、抗LaFrc抗体、抗LaEno抗体、抗LjEFTu抗体、抗BfOmpa抗体、抗PrOmpA抗体、抗Cp10bA抗体、抗CpSpA抗体、抗EfSant抗体、抗Lmosp抗体、抗SfET-2抗体、抗Cpatox抗体、抗Cpbtox抗体、抗EcSta2抗体、抗EcOStx2A抗体、抗CjcdtB/C抗体、抗CdtcdA/B抗体及びそれらの組合せからなる群から選択される。

#### 【0013】

[0013]いくつかの実施形態において、少なくとも1つのマスト細胞マーカ-は、トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE2(PGE2)及びそれらの組合せからなる群から選択される。

#### 【0014】

[0014]いくつかの実施形態において、少なくとも1つの炎症マーカ-は、CRP、ICAM、VCAM、SAA、GRO及びそれらの組合せからなる群から選択される。

#### 【0015】

[0015]いくつかの実施形態において、少なくとも1つの胆汁酸吸収不良マーカ-は、7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン、FGF19及びそれらの組合せからなる群から選択される。

#### 【0016】

[0016]いくつかの実施形態において、少なくとも1つのキヌレニンマーカ-は、キヌレニン(K)、キヌレン酸(KyA)、アントラニル酸(AA)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キサントレン酸(XA)、キノリン酸(QA)、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)及びそれらの組合せからなる群から選択される。

#### 【0017】

[0017]いくつかの実施形態において、少なくとも1つのセロトニンマーカ-は、セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、セロトニン-O-硫酸、セロトニン-O-リン酸及びそれらの組合せからなる群から選択される。

#### 【0018】

[0018]いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBS及び健常対照の既知の転帰

10

20

30

40

50

を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する。他の実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床的サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する。

【0019】

[0019]いくつかの実施形態において、本方法は、IBSの診断を、便秘型IBS (IBS-C)、下痢型IBS (IBS-D)、混合型IBS (IBS-M)、交替型IBS (IBS-A)又は感染後 (IBS-PI)として分類するステップをさらに含む。

【0020】

[0020]いくつかの実施形態において、上記細菌抗原抗体マーカー、上記マスト細胞マーカー、上記炎症性細胞マーカー、上記BAMマーカー、上記キヌレニンマーカー又は上記セロトニンマーカーのレベルは、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースのアッセイ、免疫測定法、免疫組織化学測定法、又は移動度アッセイにより独立に検出する。いくつかの例において、ハイブリダイゼーションアッセイは、ELISA又はCEER (商標)アッセイを含む。

10

【0021】

[0021]いくつかの実施形態において、試料は、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便、涙液、あらゆる他の体液、組織試料及びその細胞抽出物からなる群から選択される。いくつかの例において、試料は血清である。

【0022】

[0022]いくつかの実施形態において、以下のスコアの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つを測定する：マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコア。

20

【0023】

[0023]いくつかの態様において、本明細書で提供するのは、対象における過敏性腸症候群 (IBS) 及び/又はその臨床的サブタイプの診断を補助する方法である。本方法は、以下の (a) ~ (f) のスコアの1つ又は複数のものであるステップと：(a) 上記対象から得られた試料中の少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーのレベルを検出して、マイクロバイームスコアを得るステップ、(b) 上記試料中の少なくとも1つのマスト細胞マーカーのレベルを検出して、マスト細胞スコアを得るステップ、(c) 上記試料中の少なくとも1つの炎症性細胞マーカーのレベルを検出して、炎症スコアを得るステップ、(d) 上記試料中の少なくとも1つの胆汁酸吸収不良 (BAM) マーカーのレベルを検出して、BAMスコアを得るステップ、(e) 上記試料中の少なくとも1つのキヌレニンマーカーのレベルを検出して、酸化ストレススコアを得るステップ、(f) 上記試料中の少なくとも1つのセロトニンマーカーのレベルを検出して、セロトニンスコアを得るステップ、

30

(g) 上記マイクロバイームスコア、上記マスト細胞スコア、上記炎症スコア、上記BAMスコア、上記酸化ストレススコア及び上記セロトニンスコアに統計アルゴリズムを適用して、疾患スコアを得るステップと、並びに、

(h) 疾患スコア並びに後ろ向きコホートからのマイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアを含む診断モデルに基づいてIBSを有する確率を発生する統計アルゴリズムに基づいて、上記対象におけるIBSの診断を確定するステップと、を含む。

40

【0024】

[0024]いくつかの実施形態において、少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーは、抗Fla1抗体、抗Fla2抗体、抗FlaA抗体、抗FlaC抗体、抗FlaC2抗体、抗FlaC3抗体、抗YbaN1抗体、抗ECFlaC抗体、抗EcOFlaC抗体、抗Sefljb抗体、抗CjflaA抗体、抗CjflaB抗体、抗SfflC抗体、抗CjCgtA抗体、抗Cjdmh抗体、抗CjGT-A抗体、抗EcYidX抗体、抗EcEra抗体、抗EcFrVX抗体、抗EcGabT抗体、抗EcYedK抗体、抗EcYbaN抗体、抗EcYhgN抗体、抗RtMaga抗体、抗RbCpaF抗体、抗RgP

50

i l D抗体、抗 L a F r c抗体、抗 L a E n o抗体、抗 L j E F T u抗体、抗 B f O m p a抗体、抗 P r O m p A抗体、抗 C p 1 0 b A抗体、抗 C p S p A抗体、抗 E f S a n t抗体、抗 L m O s p抗体、抗 S f E T - 2抗体、抗 C p a t o x抗体、抗 C p b t o x抗体、抗 E c S t a 2抗体、抗 E c O S t x 2 A抗体、抗 C j c d t B / C抗体、抗 C d t c d A / B抗体及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 0 2 5 】

[0025]いくつかの実施形態において、少なくとも1つのマスト細胞マーカーは、 - トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE2 ( P G E 2 ) 及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 0 2 6 】

[0026]いくつかの実施形態において、少なくとも1つの炎症マーカーは、 C R P、 I C A M、 V C A M、 S A A、 G R O 及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 0 2 7 】

[0027]いくつかの実施形態において、少なくとも1つの胆汁酸吸収不良マーカーは、 7 - ヒドロキシ - 4 - コレステレン - 3 - オン、 F G F 1 9 及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 0 2 8 】

[0028]いくつかの実施形態において、少なくとも1つのキヌレニンマーカーは、キヌレニン ( K )、キヌレン酸 ( K y A )、アントラニル酸 ( A A )、3 - ヒドロキシキヌレニン ( 3 - H K )、3 - ヒドロキシアントラニル酸 ( 3 - H A A )、キサントレン酸 ( X A )、キノリン酸 ( Q A )、トリプトファン、5 - ヒドロキシトリプトファン ( 5 - H T P ) 及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 0 2 9 】

[0029]いくつかの実施形態において、少なくとも1つのセロトニンマーカーは、セロトニン ( 5 - H T )、5 - ヒドロキシインドール酢酸 ( 5 - H I A A )、セロトニン - O - 硫酸、セロトニン - O - リン酸及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 0 3 0 】

[0030]いくつかの実施形態において、診断モデルは、 I B S 及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する。他の実施形態において、診断モデルは、 I B S の臨床的サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する。

【 0 0 3 1 】

[0031]いくつかの実施形態において、本方法は、 I B S の診断を便秘型 I B S ( I B S - C )、下痢型 I B S ( I B S - D )、混合型 I B S ( I B S - M )、交替型 I B S ( I B S - A ) 又は感染後 ( I B S - P I ) として分類するステップをさらに含む。

【 0 0 3 2 】

[0032]いくつかの実施形態において、以下のスコアの少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つを測定する：マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコア。

【 0 0 3 3 】

[0033]いくつかの実施形態において、上記細菌抗原抗体マーカー、上記マスト細胞マーカー、上記炎症性細胞マーカー、上記 B A M マーカー、上記キヌレニンマーカー又は上記セロトニンマーカーの有無又はレベルは、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースのアッセイ、免疫測定法、免疫組織化学測定法、又は移動度アッセイにより独立に検出する。いくつかの例において、ハイブリダイゼーションアッセイは、 E L I S A 又は C E E R ( 商標 ) アッセイを含む。

【 0 0 3 4 】

[0034]本発明の他の目的、特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び図面から当業者には明らかである。

【 図面の簡単な説明 】

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 5 】

【図 1】脳 - 腸 - マイクロバイーム軸及び I B S の複雑な病態生理を示す図である。図では、I B S 及び / 又はそのサブタイプの診断に用いることができる本明細書で述べたバイオマーカーの一部を強調している。

【図 2】代謝物駆動経路及び I B S 患者において調節不全となっている酵素を示す図である。I B S - D を有する患者では、トリプトファンレベルが増加している一方で、キヌレン酸 ( K A )、3 - ヒドロキシキヌレニン ( 3 - H K ) 及び 3 - ヒドロキシアントラニル酸 ( 3 - H A A ) レベルは、低下している。さらに、トリプトファンジオキシゲナーゼ / インドールアミン - 2 , 3 - ジオキシゲナーゼ ( T D O / I D O )、キヌレニンヒドロキシラーゼ及びキヌレニナーゼなどの酵素の活性は、より低い ( 低下している ) 。

10

【図 3】腸内胆汁酸の分泌及び吸収経路を示す図である。

【図 4】腸内マイクروバイームの多様性を示す図である。

【図 5】本発明の方法の具体例としての実施形態を示す図である。

【図 6】本明細書で述べたバイオマーカーの統計解析の具体例としての実施形態を示す図である。図 6 A ( F I G . 6 A ) には、細菌抗原抗体マーカー及び 1 つの炎症マーカーが I B S を予測するものであることが示されている。図 6 B ( F I G . 6 B ) には、細菌抗原抗体マーカー、1 つの炎症マーカー及び 1 つのマスト細胞マーカーが I B S を予測するものであることが示されている。

【図 7】1 つの炎症マーカー ( s V C A M 1 ) 及びいくつかのマイクロバイームマーカー ( E c G a b T、E c O F l i C、E c E r a 及び E c Y b a N ) を用いたツリー構築過程を示す図である。

20

【図 8】健常対照及び I B S 患者における特定の細菌抗原抗体マーカーのレベルを示す図である。マイクロバイームマーカーは、E c E r a ( 図 8 A ( F I G . 8 A ) )、E c F l i C ( 図 8 B ( F I G . 8 B ) )、E c F r v X ( 図 8 C ( F I G . 8 C ) )、E c G a b T ( 図 8 D ( F I G . 8 D ) )、E c Y e d K ( 図 8 E ( F I G . 8 E ) )、E c Y b a N ( 図 8 F ( F I G . 8 F ) )、E c O F l i C ( 図 8 G ( F I G . 8 G ) )、C j F l a A ( 図 8 H ( F I G . 8 H ) )、C j F l a B ( 図 8 I ( F I G . 8 I ) )、C j G T - A ( 図 8 J ( F I G . 8 J ) )、C j C g t A ( 図 8 K ( F I G . 8 K ) )、C j d m h ( 図 8 L ( F I G . 8 L ) )、S e F l j B ( 図 8 M ( F I G . 8 M ) ) 及び S f F l i C ( 図 8 N ( F I G . 8 N ) ) を含む。

30

【図 9】バイオマーカースコア及びスコア四分位数を計算するために用いた図である。図 9 A ( F I G . 9 A ) 及び図 9 B ( F I G . 9 B ) には、バイオマーカー ( 例えば、E c E r a 及び E c F l i C ) の重みが、疾患コホートと健常対照との間の回帰係数又は勾配から決定されることが示されている。図 9 A 及び図 9 B における直線は、 を表す。正の勾配は I B S を示し、負の勾配は健常対照を示す。各個体について、重み付き四分位数和スコアは、すべてのマーカーにわたる \* 四分位数として表され、 はコホート間の回帰係数又は勾配を表す ( 図 9 C ( F I G . 9 C ) )。係数は他のマーカーの存在のために調整される。図 9 C に本明細書で述べる四分位解析の具体例としての実施形態を示す。

【図 10】健常対照コホートにおける対象のマイクロバイームスコア ( 図 10 A ( F I G . 10 A ) ) 及びマイクロバイームスコアの百分位数 ( 図 10 B ( F I G . 10 B ) ) のグラフである。グラフに、健常対照と比較して代表的な I B S 患者のマイクロバイームスコアも示す。

40

【図 11】健常対照及び I B S - D / M 患者におけるマイクロバイームスコア ( 図 11 A ( F I G . 11 A ) ) 及びそのスコアの分布 ( 図 11 B ( F I G . 11 B ) ) を示すグラフである。

【図 12 - 1】健常対照及び I B S - D / M 患者を含むコホート # 1 における各種細菌抗原抗体マーカーのレベルを示す図である。示すマーカーは、L a E n o ( 図 12 A ( F I G . 12 A ) )、L a F r c ( 図 12 B ( F I G . 12 B ) ) 及び L j E F t u ( 図 12 C ( F I G . 12 C ) ) である。

【図 12 - 2】健常対照及び I B S - D / M 患者を含むコホート # 1 における各種細菌抗

50

原抗体マーカーのレベルを示す図である。示すマーカーは、BfOmpA(図12D(FIG. 12D))及びPrOmpA(図12E(FIG. 12E))である。

【図13-1】健常対照、並びにIBS患者(IBS-Cを有する患者及びIBS-Dを有する患者を含む)を含むコホート#2における各種細菌抗原抗体マーカーのレベルを示す図である。示すマーカーは、EcGabT(図13A(FIG. 13A))、EcEra(図13B(FIG. 13B))及びEcOfliC(図13C(FIG. 13C))である。

【図13-2】健常対照、並びにIBS患者(IBS-Cを有する患者及びIBS-Dを有する患者を含む)を含むコホート#2における各種細菌抗原抗体マーカーのレベルを示す図である。示すマーカーは、SfFliaB(図13D(FIG. 13D))、CjFliaA(図13E(FIG. 13E))、CjFliaA(図13F(FIG. 13F))及びEcFliaC(図13G(FIG. 13G))である。

【図13-3】健常対照、並びにIBS患者(IBS-Cを有する患者及びIBS-Dを有する患者を含む)を含むコホート#2における各種細菌抗原抗体マーカーのレベルを示す図である。示すマーカーは、RtMaga(図13H(FIG. 13H))、RfPilD(図13I(FIG. 13I))並びにRbCpaF(図13J(FIG. 13J))及び図13K(FIG. 13K))である。

【図14-1】健常対照及びIBS患者を含むコホート#3における各種細菌抗原抗体マーカーのレベルを示す図である。示すマーカーは、SfFliaC(図14A(FIG. 14A))、CjFliaB(図14B(FIG. 14B))、CjFliaA(図14C(FIG. 14C))及びEcFliaC(図14D(FIG. 14D))である。

【図14-2】健常対照及びIBS患者を含むコホート#3における各種細菌抗原抗体マーカーのレベルを示す図である。示すマーカーは、EcGabT(図14E(FIG. 14E))、EcEra(図14F(FIG. 14F))及びEcOfliC(図14G(FIG. 14G))である。

【図15】HPLCにより測定した健常対照及びIBS患者におけるセロトニンのレベルを示す図である。図15A(FIG. 15A)は、セロトニンレベルを示すグラフである。図15B(FIG. 15B)は、セロトニン及びセロトニン代謝物のクロマトグラムである。図15C(FIG. 15C)は、セロトニンのレベルを示す表である。

【図16】新規競合ELISAにより測定した健常対照及びIBS-D患者におけるセロトニンのレベルを示す図である。図16A(FIG. 16A)は、IBS-D患者におけるセロトニンのレベルを示すグラフである。図16B(FIG. 16B)は、健常対照及びIBS-D患者におけるセロトニンのレベルの結果の表である。

【発明の詳細な説明】

【0036】

I. イントロダクション

[0051] IBSと他の腸疾患又は障害とで症状が類似しているため、患者を過敏性腸症候群と診断することは、能力を必要とするものであり得る。バイオマーカーに基づくアッセイは、IBSと他の疾患及び障害とを区別するための迅速且つ正確な診断方法をもたらし得る。

【0037】

[0052] IBSの正確な病態生理は依然として解明されていないが、IBSは、一部は、宿主の腸内微生物バイオーム及びストレスホルモンの調節不全により引き起こされると考えられている。研究により、消化管微生物叢が宿主に影響を及ぼし、粘膜の炎症及び免疫活性化をもたらし得ること、並びにコルチゾールレベルがIBSを有する女性において高いことがあり得ることが示された(Heitkemperら、Am J Gastroenterol、91巻(5号)、906~13頁(1996年))。

【0038】

[0053] この理論を裏付ける所見は、IBSと診断された患者の消化管粘膜にマスト細胞の数の増加を見いだすことができるという所見を含む(Guillarte, M.ら、G

10

20

30

40

50

ut、56巻、203～209頁(2007年)、Walker, M. M.ら、Pharmacol. Ther., 29巻、765～773頁(2009年)、Akbar, A.ら、Gut、57巻、923～929頁(2008年)、Barbara, G.ら、Gastroenterology、126巻、693～702頁(2004年)、Barbara, G.ら、Gastroenterology、132巻、26～37頁(2007年)、Cremon, C.ら、Am. J. Gastroenterol., 104巻、392～400頁(2009年)及びO'Sullivan, M.ら、Neurogastroenterol. Motil., 12巻、449～457頁(2000年)。同様に、いくつかの研究で、ヒスタミン及びセリンプロテアーゼ(例えば、トリプターゼ)を含む、これらの細胞から放出されるメディエーターのレベルがIBS患者の結腸粘膜に認められることも見いだされた(Buhnerら、Gastroenterology、137(4)、(2009年)、Barbaraら、Gastroenterology、122(4)、Suppl. 1:A-276、(2002年))。

#### 【0039】

[0054]ヒト消化管微生物叢は、少なくとも1000種の細菌を含み、約160種の様々な種の約 $10^{14}$ 個の個別の細菌細胞が各個体の腸に生息している(Oinら、Nature、464巻、59～65頁(2010年))。宿主の(例えば、個体の)遺伝組成及び免疫組成、並びに環境因子が消化管微生物叢に影響を及ぼし、これがひいては、宿主の消化管内の免疫及び生理を形作ることが理論化された。この理論は、健常者(例えば、腸障害又は疾患でない)が彼/彼女の腸にコロニーを形成している微生物叢との共生関係を維持しているのに対して、IBSを有する者は、この微生物叢-免疫相互作用が不均衡であることを示唆している。

#### 【0040】

[0055]セロトニン経路は、消化管運動性、分泌及び感覚の調節に重要な役割を果たしている。腸神経系内のこの経路における不均衡は、IBS、機能性消化不良、非心臓性胸痛、自閉症及び胃潰瘍形成などの、様々な障害と関連付けられた。トリプトファン/セロトニン/キヌレニン代謝及び異化経路(図2)の著しい変化は、IBS-Dに関連付けられた(Christmasら、Nutrition Research、2010、30巻、678～688頁)。

#### 【0041】

[0056]本発明は、対象における過敏性腸症候群(IBS)を診断する方法を提供する。本方法は、対象から採取した生体試料中のセリアック病(CD)マーカー、IBDマーカー、マイクロバイオームマーカー、マスト細胞マーカー、炎症マーカー、胆汁酸吸収不良マーカー、キヌレニンマーカー及びセロトニンマーカーのレイのレベルを測定するステップと、一連のバイオマーカースコアを得るステップと、アルゴリズムを用いて、対象がCD又はIBDを有さず、健常対照であることと比較してIBSを有する可能性の増大を有するかどうかを判定するステップを含む。本発明はまた、様々なバイオマーカーのレベルを測定するための方法及びアッセイを提供する。

#### 【0042】

##### II. 定義

[0057]本明細書で用いているように、以下の用語は、特別の定めのない限り、それらに帰する意味を有する。

#### 【0043】

[0058]「過敏性腸症候群」及び「IBS」という用語は、一般的に明らかな構造異常がない状況での、腹痛、腹部不快感、排便パターンの変化、軟便又はより頻繁な便通、下痢、並びに便秘を含むが、これらに限定されない1つ又は複数の症状によって特徴付けられる機能性腸障害の群を含む。どの症状が優勢であるかによって、(1)下痢優勢型(IBS-D)、(2)便秘優勢型(IBS-C)及び交替排便パターンを有するIBS(IBS-A)などの少なくとも3つの型のIBSが存在する。IBSは、症状の混合型(IBS

S - M)でも起こり得る。感染後IBS (IBS - PI)などの、IBSの様々な臨床的サブタイプも存在する。

【0044】

[0059]「セリアック病」及び「CD」という用語は、絨毛萎縮、陰窩過形成及びノ小腸の粘膜内層の炎症を一般的に伴う腸粘膜の障害を意味する。栄養素の吸収不良に加えて、セリアック病を有する患者は、ミネラル欠乏、ビタミン欠乏、骨粗鬆症、自己免疫疾患及び腸悪性腫瘍（例えば、リンパ腫及び癌）のリスクがある。特定の理論により拘束されるものではないが、特異な遺伝及び環境状況におけるグルテンなどのタンパク質（例えば、コムギ、ライムギ、オオムギ、オートムギ、キビ、ライコムギ、スペルトコムギ及びカムットに存在するグルテン及びプロラミンタンパク質）への曝露がセリアック病を引き起こす原因であると考えられる。

10

【0045】

[0060]「炎症性腸疾患」又は「IBD」という用語は、例えば、クローン病 (CD)、潰瘍性大腸炎 (UC)、不確定大腸炎 (IC) 及びCDかUCかが決定的でないIBD (「非決定的」) などの消化管障害を含む。炎症性腸疾患 (例えば、CD、UC、IC及び非決定的) は、過敏性腸症候群 (IBS) を含む、胃腸管のすべての他の障害、症候群及び異常と区別される。IBSの診断の方法の詳細な記述は、内容がすべての目的のためにそれらの全体として参照により本明細書に組み込まれる、例えば、米国特許第7, 873, 479号及び第8, 715, 943号に見いだされる。

20

【0046】

[0061]「微生物叢」、「微生物相」及び「微生物バイオーム」という用語は、身体器官又は部分に一般的に生息する生存微生物の群集を意味する。消化管微生物叢のメンバーは、フィルミクテス (Firmicutes)、バクテロイデス (Bacteroidetes)、プロテオバクテリア (Proteobacteria)、イプシロンプロテオバクテリア (Epsilonproteobacteria)、フソバクテリア (Fusobacteria)、アルファプロテオバクテリア (Alphaproteobacteria)、ベータプロテオバクテリア (Betaproteobacteria)、ガンマプロテオバクテリア (Gammaproteobacteria)、ベルミクロビウム (Verruimicrobia)、デルタプロテオバクテリア (Deltaproteobacteria)、分類されていないシアノバクテリア近縁及びアクチノバクテリア (Actinobacteria) の門の微生物；バクテロイデス (Bacteroides)、プレボテラ (Prevotella) 又はルミノコッカス (Ruminococcus) 属の微生物；ビフィドバクテリア (Bifidobacteria)、腸内細菌科 (Enterobacteraceae)、ラクトバチルス属 (Lactobacillus)、ベイロネラ属 (Veillonella)、バクテロイデス属 (Bacteroides)、連鎖球菌 (Streptococcus)、アクチノマイシナエ (Actinomycinaea)、ヘリコバクター属 (Helicobacter)、ペプトストレプトコッカス属 (Peptostreptococcus)、コリンセラ属 (Collinsella)、クロストリジウム属 (Clostridium)、腸球菌 (Enterococcus)、コプロコッカス属 (Coproccoccus)、コプロバチルス属 (Coproccillus)、プロテオバクテリア属 (Proteobacteria)、ラクトバチルス属 (Lactobacillus)、ルミノコッカス属 (Ruminococcus)、ユーバクテリウム属 (Eubacterium)、ドレア属 (Dorea)、アシネトバクター属 (Acinetobacter) 及び大腸菌の種の微生物；ルミノコッカス・トルクエス (Ruminococcus torques)、ルミノコッカス・トルクエス様 (R. torques-like)、コリンセラ・アエロファシエンス様 (Collinsella aerofaciens-like)、クロストリジウム・コクレアタム (Clostridium coccleatum)、ユーバクテリウム・レクタレ (Eubacterium rectale)、クロストリジウム・コッコイデス (Clostridium coccooides)、リノバトス・プロダクタ

30

40

50

タス (*Rhinobatos productus*) 型の微生物を含むが、これらに限定されない。ある例において、消化管微生物叢は、消化管の表面又は頂端部に位置する粘膜関連微生物叢、及び消化管の内腔に認められる内腔関連微生物叢を含む。

【0047】

[0062] 「バイオマーカー」又は「マーカー」という用語は、個体からの試料をIBS試料と分類するために、或いは、個体からの試料におけるIBS様症状を随伴する1つ又は複数の疾患又は障害を除外するために用いることができる、生化学的マーカー、血清学的マーカー、遺伝マーカー、微生物マーカー、又は他の臨床的若しくは超音波検査特性などの診断マーカーを含む。「バイオマーカー」又は「マーカー」という用語は、IBSをその様々な型又は臨床的サブタイプに分類するために用いることができる、抗体マーカー、生化学的マーカー、血清学的マーカー、遺伝マーカー、ホルモンマーカー、微生物マーカー、又は他の臨床的若しくは超音波検査特性などの分類マーカーも含む。本発明に用いるのに適する診断マーカーの非限定的な例は、以下に記載のものであり、細菌抗原に対する抗体、細菌抗原、フラジェリン、サイトカイン、増殖因子、ストレスホルモン、抗好中球抗体、抗サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 抗体、抗微生物抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ (tTG) 抗体、リポカリン、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 (TIMPs)、アルファ-グロブリン、アクチン切断タンパク質、S100タンパク質、フィブリノペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、タチキニン、グレリン、ニューロテンシン、セロトニン、コルチコトロピン放出ホルモン (CRH)、セリンプロテアーゼ (例えば、トリプターゼ、エラスターゼ)、プロスタグランジン (例えば、PGE<sub>2</sub>)、ヒスタミン、C反応タンパク質 (CRP)、ラクトフェリン、抗ラクトフェリン抗体、カルプロテクチン、ヘモグロビン、NOD2/CARD15、セロトニン再取込み輸送体 (SERT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ-1, 5-ヒドロキシトリプタミン (5-HT)、ラクツロースなどを含む。好ましい実施形態において、本発明に用いるのに適する診断マーカーは、本明細書に記載のものであり、大腸菌Fl i C、フレキシナ赤痢菌Fl i C、カンピロバクター・ジェジュニFl a A、カンピロバクター・ジェジュニFl a B、大腸菌O157:H7Fl i C、大腸菌Fr v X、大腸菌G a b T、カンピロバクター・ジェジュニ81-045、カンピロバクター・ジェジュニ81-128及びカンピロバクター・ジェジュニ81-008、大腸菌Er a、大腸菌F o c A、大腸菌Fr v X、大腸菌G a b T、大腸菌Y b a N、大腸菌Y c d G、大腸菌Y h g N、大腸菌Y e d K、大腸菌Y i d X、アシドフィルス菌、Fr c、アシドフィルス菌En o、ラクトバチルス・ジョンソニイE F T u、バクテロイデス・フラジリスO m p A、プレボテラ属O m p A、ウェルシュ菌10b A、ウェルシュ菌S p A、フェカリス菌S a n t、リステリア菌O s p及びそれらの混合物からなる群から選択される微生物叢抗原に結合する抗体を含むが、これらに限定されない。分類マーカーの例は、制限なしに、レプチン、SERT、トリプトファンヒドロキシラーゼ-1, 5-HT、洞粘膜タンパク質8、ケラチン8、クラウジン8、ゾヌリン、コルチコトロピン放出ホルモン受容体1 (CRHR1)、コルチコトロピン放出ホルモン受容体2 (CRHR2)、トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) などを含む。いくつかの実施形態において、診断マーカーは、IBSをその様々な形又は臨床サブタイプに分類するために用いることができる。他の実施形態において、分類マーカーは、試料をIBS試料と分類するために或いはIBS様症状を随伴する1つ又は複数の疾患又は障害を除外するために用いることができる。当業者は、本発明に用いるのに適する付加的な診断及び分類マーカーについて知っている。

【0048】

[0063] 「推定値」という用語は、ロジスティック回帰モデルの推定される部分相関係数を意味する。

【0049】

[0064] 「生体試料」は、個体から得られた生物学的検体を含む。本発明において用いる

10

20

30

40

50

適切な試料は、制限なしに、全血、血漿、血清、唾液、尿、便（すなわち、糞便）、涙液及び他の体液、又は小腸若しくは結腸試料などの組織試料（すなわち、生検材料）、並びにその細胞抽出物（例えば、赤血球抽出物）を含む。好ましい実施形態において、試料は、血液、血漿又は血清試料である。より好ましい実施形態において、試料は、血清試料である。特定の例において、「試料」という用語は、血液、身体組織、血清、リンパ液、リンパ節組織、脾臓組織、骨髄又は1つ若しくは複数のこれらの組織から得られた免疫グロブリン濃縮画分を含むが、これらに限定されない。血清、唾液及び尿などの試料の使用は、当技術分野で周知である（例えば、Hashidaら、J. Clin. Lab. Anal., 11巻、267～86頁（1977年））。当業者は、血清及び血液試料などの試料は、マーカーレベルの解析の前に希釈することができることを理解する。

10

**【0050】**

[0065]「個体」、「対象」又は「患者」という用語は、一般的にヒトを意味するが、例えば、他の霊長類、げっ歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどを含む他の動物をも意味する。

**【0051】**

[0066]「分類すること」という用語は、疾患状態を伴う試料を「関連付けること」又は「類別すること」を含む。特定の例において、「分類すること」は、統計的証拠、経験的証拠又は両方に基づいている。特定の実施形態において、分類する方法及びシステムは、疾患状態が既知である試料のいわゆる訓練セットを使用する。確立されたならば、訓練データセットは、試料の未知の疾患状態を分類するために、未知試料の特徴と比較する基準、モデル又はテンプレートとしての役割を果たす。特定の例において、試料を分類することは、試料の疾患状態を診断することに類似している。特定の他の例において、試料を分類することは、試料の疾患状態と他の疾患状態とを区別することに類似している。

20

**【0052】**

[0067]本明細書で用いているように、「スコア」又は「プロファイル」という用語は、IBSなどの疾患又は障害に関連する顕著な特徴又は特性を表すデータの組を含む。該用語は、試料中の1つ又は複数の診断マーカーを解析する「疾患スコア」又は「診断スコア」を含む。例えば、「疾患スコア」は、IBSに関連する1つ又は複数の診断マーカーの存在又はレベルを表すデータの組を含み得る。

**【0053】**

[0068]いくつかの実施形態において、上述の1つ又は複数の診断マーカー及び/又は診断モデルを測定するためのパネルは、試料をIBS試料又は非IBS試料と分類するために構築し、用いることができる。当業者は、複数の診断マーカーの存在又はレベルを、例えば、個体の試料の一部試料又は希釈物を用いて同時に又は連続的に判定することができることを理解する。特定の例において、個体の試料中の特定の診断マーカーのレベルが比較試料（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料）又は試料の集団中の同じマーカーのレベルより少なくとも約10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%又は1000%大きい（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料の比較集団中の同じマーカーのレベルの中央値より大きい）場合、個体の試料中の特定の診断マーカーのレベルは、上昇していると考えられる。特定の他の例において、個体の試料中の特定の診断マーカーのレベルが比較試料（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料）又は試料の集団中の同じマーカーのレベルより少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%小さい（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料の比較集団中の同じマーカーのレベルの中央値より小さい）場合、個体の試料中の特定の診断マーカーのレベルは、低下していると考えられる。

30

40

**【0054】**

50

[0069]本明細書で用いているように、「実質的に同じアミノ酸配列」という用語は、天然に存在するアミノ酸配列と類似しているが、同一でないアミノ酸配列を含む。例えば、天然に存在するペプチド、ポリペプチド又はタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するアミノ酸配列は、修飾された配列が天然に存在するペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の免疫反応性などの少なくとも1つの生物学的活性を保持するならば、天然に存在するペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列と比べてアミノ酸付加、欠失又は置換などの1つ又は複数の修飾を有し得る。アミノ酸配列間の実質的類似性の比較は、約6~100残基、好ましくは約10~100残基、より好ましくは約25~35残基を用いて通常実施する。本発明のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、或いはその断片の特に有用な修飾は、例えば、安定性の増大を付与する修飾である。1つ又は複数のD-アミノ酸の組み込みは、ポリペプチド又はポリペプチド断片の安定性の増大に有用な修飾である。同様に、リシン残基の欠失又は置換は、ポリペプチド又はポリペプチド断片を分解から保護することにより安定性を増大させ得る。

10

#### 【0055】

[0070]「複合体」、「免疫複合体」、「コンジュゲート」及び「免疫コンジュゲート」という用語は、抗体又は抗体断片に結合した（例えば、非共有結合手段により）ペプチド又は抗原を含むが、これらに限定されない。

#### 【0056】

[0071]「IBSの進行及び退行をモニタリングすること」という用語は、個体の疾患状態（例えば、IBSの存在又は重症度）を判定するための本発明の方法、システム及びコードの使用を含む。いくつかの実施形態において、本発明の方法、システム及びコードは、例えば、診断マーカーの解析及び/又はIBSに関連する症状の同定に基づいてIBSが個体において速やか又は徐々に進行する可能性を判定することによりIBSの進行を予測するために用いることができる。他の実施形態において、本発明の方法、システム及びコードは、例えば、診断マーカーの解析及び/又はIBSに関連する症状の同定に基づいてIBSが個体において速やか又は徐々に退行する可能性を判定することによりIBSの退行を予測するために用いることができる。

20

#### 【0057】

[0072]「細菌抗原抗体マーカースコア」、「細菌抗原抗体スコア」、「マイクロバイームマーカースコア」又は「マイクロバイームスコア」という用語は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、Fla1、Fla2、FlaA、FluC、FluC2、FluC3、YBaN1、ECFluic、EcOFluic、SeFljB、CjFlaA、CjFlaB、SfFluic、CjCgtA、Cjdmh、CjGT-A、EcYidX、EcEra、EcFrvX、EcGabt、EcYedK、EcYbaN、EcYhgN、RtMaga、RbCpaF、RgPild、LaFrc、LaEno、LjEFTu、BfOmpa、PrOmpA、Cp10bA、CpSpA、EfSant、LmOsp、SfET-2、Cpatox、Cpbtox、EcSta2、EcOstx2A、CjcdtB/C、CdtcdA/Bなどのような、細菌抗原を認識する（例えば、それに特異的に結合して、複合体を形成する）抗体などであるが、これらに限定されない、細菌抗原抗体マーカーであり得る。統計解析は、細菌抗原抗体マーカー（複数可）のレベルを細菌抗原抗体マーカープロファイルに変換し得る。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを作出することができる。1つの態様において、単一学習統計分類システム（a single learning statistical classifier system）を含む統計処理を細菌抗原抗体マーカープロファイルのデータセットに適用して、細菌抗原抗体マーカープロファイルに基づき試料をIBS試料又は非IBS試料（例えば、健常対照試料）と分類する、統計学による決定をもたらす、細菌抗原抗体マーカープロファイルは、少なくとも1つ

30

40

50

の細菌抗原抗体マーカーのレベルを示している。

【 0 0 5 8 】

[0073]「マスト細胞マーカースコア」又は「マスト細胞スコア」という用語は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、トリプターゼ、ヒスタミン及びプロスタグランジンE<sub>2</sub>などであるが、これらに限定されない、マスト細胞マーカーであり得る。統計解析は、マスト細胞マーカー（複数可）のレベルをマスト細胞マーカースコアに変換する。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを作出することができる。1つの態様において、単一学習統計分類システムを含む統計処理をマスト細胞マーカースコアのデータセットに適用して、マスト細胞マーカーに基づき試料をIBS試料又は非IBS試料と分類する、統計学による決定をもたらす、マスト細胞マーカースコアは、少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーのレベルを示している。

10

【 0 0 5 9 】

[0074]「炎症性細胞マーカースコア」、「炎症マーカースコア」又は「炎症スコア」という用語は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、CRP、ICAM、VCAM、SAA、GRO及びそれらの組合せなどであるが、これらに限定されない、炎症性細胞マーカーであり得る。統計解析により、炎症性細胞マーカー（複数可）のレベルを炎症スコアに変換する。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを得ることができる。1つの態様において、単一学習統計分類システムを含む統計解析を炎症性細胞マーカースコアのデータセットに適用して、炎症性細胞マーカーに基づいて試料をIBS試料又は非IBS試料と分類する統計的に得られる判定をくだす。この場合、炎症スコアは、少なくとも1つの炎症性細胞マーカーのレベルを示す。

20

【 0 0 6 0 】

[0075]「キヌレニンマーカースコア」、「キヌレニンスコア」又は「酸化ストレススコア」という用語は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、キヌレニン(K)、キヌレン酸(KyA)、アントラニル酸(AA)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キサントレン酸(XA)、キノリン酸(QA)、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)及びそれらの組合せなどであるが、これらに限定されない、キヌレニン細胞マーカーであり得る。統計解析により、キヌレニンマーカー（複数可）のレベルをキヌレニンスコアに変換する。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを得ることができる。1つの態様において、単一学習統計分類システムを含む統計解析をキヌレニンマーカースコアのデータセットに適用して、キヌレニンマーカーに基づいて試料をIBS試料又は非IBS試料と分類する統計的に得られる判定をくだす。この場合、キヌレニンスコアは、少なくとも1つのキヌレニンマーカーのレベルを示す。

30

40

【 0 0 6 1 】

[0076]「セロトニンマーカースコア」又は「セロトニンスコア」という用語は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、セロトニン-O-硫酸、セロトニン-O-リン酸及びそれらの組合せなどであるが、これらに限定されない、セロトニンマーカーであり得る。統計解析により、セロトニンマーカー（複数可）のレベルをセロトニンスコアに変換する。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを得ることができる。1つの態様において、単一学習統計分類システムを含む統計解析をセロトニン

50

マーカースコアのデータセットに適用して、セロトニンマーカーに基づいて試料をIBS試料又は非IBS試料と分類する統計的に得られる判定をください。この場合、セロトニンスコアは、少なくとも1つのセロトニンマーカーのレベルを示す。

【0062】

[0077]「炎症性腸疾患マーカースコア」、「炎症性腸疾患スコア」、「IBDマーカースコア」又は「IBDスコア」という用語は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、抗好中球細胞質抗体(ANCA)、抗サッカロミセス・セレビスエ(*Saccharomyces cerevisiae*)免疫グロブリンA(ASCA-IgA)、抗サッカロミセス・セレビスエ免疫グロブリンG(ASCA-IgG)、抗外膜タンパク質C(抗OmpC)抗体、抗フラジェリン抗体、核周囲抗好中球細胞質抗体(pANCA)、抗Fla2抗体、抗FlaX抗体、抗CBir抗体、ICAM-1、VCAM-1、VEGF、CRP、SAA及びそれらの組合せなどであるが、これらに限定されない、IBDマーカーであり得る。統計解析により、IBDマーカー(複数可)のレベルをIBDスコアに変換する。さらなるIBDの遺伝マーカーは、そのATG16L1、ECM1、NKX2-3、STAT3及びSNPM1を含む。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを得ることができる。1つの態様において、単一学習統計分類システムを含む統計解析をIBDマーカースコアのデータセットに適用して、IBDマーカーに基づいて試料をIBD試料又は非IBD試料と分類する統計的に得られる判定をください。この場合、IBDスコアは、少なくとも1つのIBDマーカーのレベルを示す。

10

20

【0063】

[0078]「胆汁酸吸収不良マーカースコア」、「胆汁酸吸収不良スコア」又は「BAMスコア」という用語は、個体の1、2種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、7- $\alpha$ -ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン及びFGF19などであるが、限定されない、BAMマーカーであり得る。統計解析により、BAMマーカー(複数可)のレベルをBAMスコアに変換する。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを得ることができる。1つの態様において、単一学習統計分類システムを含む統計解析をBAMマーカースコアのデータセットに適用して、BAMマーカーに基づいて試料をIBS試料又は非IBS試料と分類する統計的に得られる判定をください。この場合、BAMスコアは、少なくとも1つのBAMマーカーのレベルを示す。

30

【0064】

[0079]「セリアック病マーカースコア」、「セリアック病スコア」、「CDマーカースコア」又は「CDスコア」という用語は、個体の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20種又はそれ以上のマーカーのレベルを含み、マーカーは、抗グリアジンIgA抗体、抗グリアジンIgG抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ(tTG)抗体、抗筋内膜抗体及びそれらの組合せなどであるが、これらに限定されない、CDマーカーであり得る。統計解析により、CDマーカー(複数可)のレベルをCDスコアに変換する。いくつかの例において、統計解析は、四分位数スコアであり、マーカーのそれぞれの四分位数スコアを合計して、四分位数和スコアを得ることができる。1つの態様において、単一学習統計分類システムを含む統計解析をCDマーカースコアのデータセットに適用して、CDマーカーに基づいて試料をCD試料又は非CD試料と分類する統計的に得られる判定をください。この場合、CDスコアは、少なくとも1つのCDマーカーのレベルを示す。

40

【0065】

[0080]四分位解析において、データの範囲を4つの等しい部分に分割する3つの数(値)が存在する。第1四分位数(「下側四分位数」とも呼ぶ)は、それより下に下部データの25パーセントがある数である。第2四分位数(「中央四分位数」)は、範囲を中間に

50

分け、それより下にデータの50パーセントを有する。第3四分位数（「上側四分位数」とも呼ぶ）は、それより下にデータの75パーセント及びそれより上にデータの上位25パーセントを有する。非限定的な例として、四分位解析は、第1四分位数におけるマーカーレベル（< 25%）に1の値を割り当て、第2四分位数におけるマーカーレベル（25~50%）に2の値を割り当て、第3四分位数におけるマーカーレベル（51~< 75%）に3の値を割り当て、第4四分位数におけるマーカーレベル（75~100%）に4の値を割り当てるように、抗体又は本明細書に記載の他のタンパク質などのマーカーの濃度レベルに適用することができる。

#### 【0066】

[0081]本明細書で用いているように、「四分位数和スコア」又は「QSS」は、対象のマーカーのすべての四分位数スコアの和を含む。非限定的な例として、6種のマーカーのパネルの四分位数和スコアは、6~24の範囲にある可能性があり、この場合、マーカーの有無、又はマーカーのレベルに基づいて、個々のマーカーのそれぞれに1~4の四分位数スコアが割り当てられる。

#### 【0067】

[0082]「統計アルゴリズム」又は「統計解析」という用語は、学習統計分類子システムを含む。いくつかの例において、学習統計分類子システムは、ランダムフォレスト、分類及び回帰木、ブースト木、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、一般カイ二乗自動相互作用検出器モデル、相互作用木、多変量適応型回帰スプライン、機械学習分類子並びにその組合せからなる群から選択される。特定の例において、統計アルゴリズムは、単一学習統計分類子システムを含む。他の実施形態において、統計アルゴリズムは、少なくとも2つの学習統計分類子システムの組合せを含む。いくつかの例において、少なくとも2つの学習統計分類子システムを相前後して適用する。本発明に用いるのに適する統計アルゴリズム及び統計解析の非限定的な例は、その開示がすべての目的のためにその全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2011/0045476号に記載されている。

#### 【0068】

[0083]「診断モデル」という用語は、キヌレニンスコア、マスト細胞スコア、セロトニンスコア、胆汁酸吸収不良スコア、マイクロバイームスコア、炎症スコア及びそれらの組合せを含む。好ましい態様において、後ろ向き解析は、既知の合併症を含む既知の疾患転帰及び実施された外科的処置並びに健常対照のコホートについて行う。1つの態様において、回帰分析（例えば、ロジスティック回帰）は、診断モデルを発展させるために1つ若しくは複数のキヌレニンマーカーのレベル、1つ若しくは複数のマスト細胞マーカーのレベル、1つ若しくは複数のセロトニンマーカーのレベル、1つ若しくは複数の胆汁酸吸収不良マーカーのレベル、1つ若しくは複数のマイクロバイームマーカーのレベル、及び/又は1つ若しくは複数の炎症マーカーのレベルについて実施することができる。

#### 【0069】

### III. 実施形態の説明

#### A. 過敏性腸症候群の診断を補助する方法

[0084]1つの態様において、本発明は、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法を提供する。

#### 【0070】

[0085]図5に本発明のIBS診断アッセイの具体例としての実施形態のフローチャートを示す。特定の実施形態において、診断アッセイをセリアック病（CD）マーカーの測定に適用し、CD対非CDを予測するための第1の統計アルゴリズムに基づいてセリアック病スコアを計算する（105）。統計モデルは、患者がCDを有するかどうかを判定する。対照スコアと比較したセリアック病スコアが患者が非CDであることを予測する場合（110）、試料は、本方法の次のステップに進む。このステップを炎症性腸疾患（IBD）マーカーの測定に適用し、IBD対非IBDを予測するための第2の統計アルゴリズムに基づいてIBDスコアを計算する（120）。対照スコアと比較した患者のIBDスコ

10

20

30

40

50

アが患者が非IBDであることを予測する場合(125)、試料は、非IBSからIBSを予測するために用いるアッセイの次のステップに進む(130)。このステップを、それぞれ細菌抗原抗体マーカー(180)、マスト細胞マーカー(150)、炎症マーカー(190)、胆汁酸吸収不良マーカー(170)、キヌレニンマーカー(140)及びセロトニンマーカー(160)の測定に基づく患者のマイクロバイームスコア(185)、マスト細胞スコア(155)、炎症スコア(195)、胆汁酸吸収不良スコア(175)、酸化ストレススコア(145)及びセロトニンスコア(165)の組合せに適用して、IBS対非IBSを予測するための疾患スコアを計算する。患者の疾患スコアがカットオフより小さい場合、アルゴリズムは、患者が非IBSであることを予測する。患者の疾患スコアがカットオフより大きい場合、患者は、IBSを有すると予測される。

10

**【0071】**

[0086]いくつかの実施形態において、本明細書で提供する方法は、(a)対象から採取した生体試料中のセリアック病(CD)マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、(b)CDマーカーのアレイの測定レベルに統計解析を適用して、CDスコアを得るステップと、(c)CDスコアを、CDを有する患者などの対照コホートのCDスコアと比較することに基づいて、対象がCDを有することを判定するステップとを含む。

**【0072】**

[0087]いくつかの実施形態において、CDマーカーは、抗グリアジンIgA抗体、抗グリアジンIgG抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ(tTG)抗体、抗筋内膜抗体及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、CDマーカーのアレイのレベルをCDスコアに変換する。いくつかの実施形態において、CDスコアは、複数のCDマーカーの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカーの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータに常駐するアルゴリズムにより指標(index)に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値(複数可)である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。いくつかの実施形態において、統計解析は、CDマーカーのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカーの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア(QSS)をおよそ得るためにCDマーカーに四分位解析を適用することを含む。

20

30

**【0073】**

[0088]いくつかの実施形態において、本方法は、(a)対象から採取した生体試料中の炎症性腸疾患(IBD)マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、(b)IBDマーカーのアレイの測定レベルに統計解析を適用して、IBDスコアを得るステップと、(c)IBDスコアを、IBDを有する患者などの対照コホートのIBDスコアと比較することに基づいて、対象がCDを有することを判定するステップとを含む。

**【0074】**

[0089]いくつかの実施形態において、IBDマーカーは、抗好中球細胞質抗体(ANCA)、抗サッカロミセス・セレピシエ免疫グロブリンA(ASCA-IgA)、抗サッカロミセス・セレピシエ免疫グロブリンG(ASCA-IgG)、抗外膜タンパク質C(抗OmpC)抗体、抗フラジェリン抗体、核周囲抗好中球細胞質抗体(pANCA)、抗Fla2抗体、抗FlaX抗体、抗Cbir抗体、ICAM-1、VCAM-1、VEGF、CRP、SAA及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、IBDマーカーのアレイのレベルをIBDスコアに変換する。いくつかの実施形態において、IBDスコアは、複数のIBDマーカーの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカーの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータ搭載のアルゴリズムにより指標に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値(複数可)である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。いくつかの実施形態において、統計

40

50

解析は、IBDマーカーのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカーの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア(QSS)をおよそ得るためにIBDマーカーに四分位解析を適用することを含む。

【0075】

[0090]いくつかの実施形態において、本方法は、(a)対象から採取した生体試料中の細菌抗原抗体マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、(b)細菌抗原抗体マーカーのアレイの測定レベルに統計解析を適用して、細菌抗原抗体マーカースコアを得るステップとを含む。いくつかの実施形態において、細菌抗原抗体マーカーは、細菌抗原に対する抗体であり、細菌抗原は、Fla1、Fla2、FlaA、FluC、FluC2、FluC3、YBaN1、ECFluC、EcOFluC、SeFljB、CjFlaA、CjFlaB、SfFluC、CjCgtA、Cjdmh、CjGT-A、EcYidX、EcEra、EcFrvX、EcGabt、EcYedK、EcYbaN、EcYhgN、RtMaga、RbCpaF、RgPild、LaFrc、LaEno、LjEFtu、BfOmpa、PrOmpA、Cp10bA、CpSpA、EfSant、LmOssp、SfET-2、Cpatox、Cpbtox、EcSta2、EcOstx2A、CjcdtB/C、CdtcdA/B、及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、細菌抗原抗体マーカーのアレイのレベルをマイクロバイームスコアに変換する。いくつかの実施形態において、マイクロバイームスコアは、複数の細菌抗原抗体マーカーの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカーの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータに常駐するアルゴリズムにより指標に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値(複数可)である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。いくつかの実施形態において、統計解析は、細菌抗原抗体マーカーのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカーの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア(QSS)をおよそ得るために細菌抗原抗体マーカーに四分位解析を適用することを含む。

10

20

【0076】

[0091]いくつかの実施形態において、診断モデルはマイクロバイームスコアを含む。いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床的サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートを用いて確立する。いくつかの実施形態において、マイクロバイームスコアは、後ろ向きコホートにおいて決定された1つ又は複数の細菌抗原抗体マーカーのレベルにロジスティック回帰分析を適用することによって得られる。

30

【0077】

[0092]いくつかの実施形態において、本方法は、(a)対象から採取した生体試料中のマスト細胞マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、(b)マスト細胞マーカーのアレイの測定レベルに統計解析を適用して、マスト細胞マーカースコアを得るステップとを含む。いくつかの実施形態において、マスト細胞マーカーは、トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE2及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、マスト細胞マーカーのアレイのレベルをマスト細胞スコアに変換する。いくつかの実施形態において、マスト細胞スコアは、複数のマスト細胞マーカーの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカーの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータに常駐するアルゴリズムにより指標に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値(複数可)である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。マスト細胞スコアは、経時的に複数回測定することができる。1つの態様において、アルゴリズムは、既知試料を用いて訓練し、その後、特性(identity)が既知である試料を用いて検証することができる。いくつかの実施形態において、統計解析は、マ

40

50

スト細胞マーカーのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカーの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア（QSS）をおよそ得るためにマスト細胞マーカーに四分位解析を適用することを含む。

【0078】

[0093]いくつかの実施形態において、診断モデルはマスト細胞スコアを含む。いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートを用いて確立する。いくつかの実施形態において、マスト細胞スコアは、後ろ向きコホートにおいて決定された1つ又は複数のマスト細胞マーカーのレベルにロジスティック回帰分析を適用することによって得られる。

【0079】

[0094]いくつかの実施形態において、本方法は、(a)対象から採取した生体試料中の炎症マーカーのアレイのレベルを測定するステップと、(b)炎症マーカーのアレイの測定レベルに統計解析を適用して、炎症マーカースコアを得るステップとを含む。いくつかの実施形態において、炎症マーカーは、BDNF、EGF、VEGF、アンフィレギュリン、NGAL、TWEAK、GRO- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-8、TIMP1、CRP、SAA、ICAM-1、VCAM-1及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、炎症マーカーのアレイのレベルを炎症スコアに変換する。いくつかの実施形態において、炎症スコアは、複数の炎症マーカーの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカーの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータに常駐するアルゴリズムにより指標に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値（複数可）である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。炎症スコアは、経時的に複数回測定することができる。1つの態様において、アルゴリズムは、既知試料を用いて訓練し、その後、特性が既知である試料を用いて検証することができる。いくつかの実施形態において、統計解析は、炎症マーカーのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカーの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア（QSS）をおよそ得るために炎症マーカーに四分位解析を適用することを含む。

【0080】

[0095]いくつかの実施形態において、診断モデルは炎症スコアを含む。いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床的サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートを用いて確立する。いくつかの実施形態において、炎症スコアは、後ろ向きコホートにおいて決定された1つ又は複数の炎症マーカーのレベルにロジスティック回帰分析を適用することによって得られる。

【0081】

[0096]いくつかの実施形態において、本方法は、(a)対象から採取した生体試料中のキヌレニンマーカーのアレイのレベルを測定するステップと、(b)キヌレニンマーカーのアレイの測定レベルに統計解析を適用して、キヌレニンスコア（例えば、酸化ストレススコア）を得るステップとを含む。いくつかの実施形態において、キヌレニンマーカーは、キヌレニン（K）、キヌレン酸（KyA）、アントラニル酸（AA）、3-ヒドロキシキヌレニン（3-HK）、3-ヒドロキシアントラニル酸（3-HAA）、キサントレン酸（XA）、キノリン酸（QA）、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン（5-HTP）及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、キヌレニンマーカーのアレイのレベルをキヌレニンスコアに変換する。いくつかの実施形態において、キヌレニンスコアは、複数のキヌレニンマーカーの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカーの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータに常駐するアルゴリズムにより指標に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値（複数可）である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。キヌレニンスコアは

10

20

30

40

50

、経時的に複数回測定することができる。1つの態様において、アルゴリズムは、既知試料を用いて訓練し、その後、特性が既知である試料を用いて検証することができる。いくつかの実施形態において、統計解析は、キヌレニンマーカのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア(QSS)をおよそ得るためにキヌレニンマーカに四分位解析を適用することを含む。

【0082】

[0097]いくつかの実施形態において、診断モデルはキヌレニンスコアを含む。いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床的サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する。いくつかの実施形態において、キヌレニンスコアは、後ろ向きコホートにおいて決定された1つ又は複数のキヌレニンマーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することによって得られる。

10

【0083】

[0098]いくつかの実施形態において、本方法は、(a)対象から採取した生体試料中のセロトニンマーカのアレいのレベルを測定するステップと、(b)セロトニンマーカのアレいの測定レベルに統計解析を適用して、セロトニンスコアを得るステップとを含む。いくつかの実施形態において、セロトニンマーカは、セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、セロトニン-O-硫酸、セロトニン-O-リン酸及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、セロトニンマーカのアレいのレベルをセロトニンスコアに変換する。いくつかの実施形態において、セロトニンスコアは、複数のセロトニンマーカの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータに常駐するアルゴリズムにより指標に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値(複数可)である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。セロトニンスコアは、経時的に複数回測定することができる。1つの態様において、アルゴリズムは、既知試料を用いて訓練し、その後、特性が既知である試料を用いて検証することができる。いくつかの実施形態において、統計解析は、セロトニンマーカのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア(QSS)をおよそ得るためにセロトニンマーカに四分位解析を適用することを含む。

20

30

【0084】

[0099]いくつかの実施形態において、診断モデルはセロトニンスコアを含む。いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床的サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する。いくつかの実施形態において、セロトニンスコアは、後ろ向きコホートにおいて決定された1つ又は複数のセロトニンマーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することによって得られる。

【0085】

[0100]いくつかの実施形態において、本方法は、(a)対象から採取した生体試料中の胆汁酸吸収不良(BAM)マーカのアレいのレベルを測定するステップと、(b)BAMマーカのアレいの測定レベルに統計解析を適用して、BAMスコアを得るステップとを含む。いくつかの実施形態において、BAMマーカは、7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン、FGF19及びそれらの組合せからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、統計解析により、BAMマーカのアレいのレベルをBAMスコアに変換する。いくつかの実施形態において、BAMスコアは、複数のBAMマーカの分析に基づく経験的に得られるプロファイルを含む。1つの態様において、マーカの濃度又はそれらの測定濃度値をコンピュータに常駐するアルゴリズムにより指標に変換する。特定の態様において、スコアは、生物学的データを数字で表す、人工の若しくはヒトによるアウトプット、プロファイル又はカットオフ値(複数可)である。スコアは、臨床診断決定を確定又は下す又は下すことを補助するのに用いることができる。BAMスコアは、

40

50

経時的に複数回測定することができる。1つの態様において、アルゴリズムは、既知試料を用いて訓練し、その後、特性が既知である試料を用いて検証することができる。いくつかの実施形態において、統計解析は、BAMマーカのレベルの存在を四分位数スコアに変換し、各マーカの四分位数スコアを合計することによって対象の四分位数和スコア(QSS)をおよそ得るためにBAMマーカに四分位解析を適用することを含む。

【0086】

[0101]いくつかの実施形態において、診断モデルはBAMスコアを含む。いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床的サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートをを用いて確立する。いくつかの実施形態において、BAMスコアは、後ろ向きコホートにおいて決定された1つ又は複数のBAMマーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することによって得られる。

10

【0087】

[0102]いくつかの実施形態において、対象のマイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、BAMスコア、キヌレニンスコア及びセロトニンスコアを集約するアルゴリズムを用いることによって対象について疾患スコアが得られる。対象の疾患スコアを診断モデルと比較して、対象が健常対照であることと比較してIBSを有する可能性の増大を有するかどうかを判定することができる。

【0088】

[0103]いくつかの実施形態において、診断モデルは、IBS転帰が既知である患者及び健常対照の後ろ向きコホートからの、マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、キヌレニンスコア及びセロトニンスコアの組合せに基づいている。例えば、診断モデルは、IBS転帰が既知である患者及び健常対照の後ろ向きコホートの疾患スコアを示し得る。いくつかの実施形態において、診断モデルはロジスティック回帰モデルを含む。

20

【0089】

[0104]いくつかの実施形態において、診断モデルはIBS診断カットオフ値を含み、カットオフ値より高い疾患スコアは、対象がIBS及び/又はIBSのサブタイプを有することを示している。他の例において、カットオフ値より低い疾患スコアは、対象がIBSを有さないことを示し得る。

【0090】

[0105]少なくとも1つのバイオマーカのレベルを検出又は判定するために用いる試料は、一般的に全血、血漿、血清、唾液、尿、便(すなわち、糞便)、涙液及び他の体液又は小腸若しくは結腸試料などの組織試料(すなわち、生検材料)である。試料は、血清、全血、血漿、便、尿又は組織生検材料であることが好ましい。特定の例において、本発明の方法は、試料中の少なくとも1つのバイオマーカのレベルを検出又は判定する前に個体から試料を得るステップをさらに含む。好ましい実施形態において、さらなるバイオマーカが血液又は血清試料から検出される。他の実施形態において、バイオマーカは、対象の唾液試料、尿試料、糞便試料又は腸の生検材料から検出される。

30

【0091】

B. 細菌抗原抗体マーカ(例えば、マイクロバイームマーカ)

40

[0106]本明細書で用いているように、「細菌抗原抗体」という用語は、抗細菌抗原抗体のような、細菌抗原又はその抗原性断片に特異的に結合する抗体を意味する。特定の理論に拘束されるものではないが、消化管微生物叢に関わるIBS又は他の障害を有する人は、抗細菌抗原抗体を発現し得る。

【0092】

[0107]1つの態様において、本発明は、試料中の少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカのレベルを検出することによりIBS及び/又はIBSのサブタイプの診断を補助する方法を提供する。細菌抗原抗体マーカは、Fla1、Fla2、FlaA、FluC、FluC2、FluC3、YBaN1、ECFluC、Ec0FluC、SeFljB、CjFlaA、CjFlaB、SfFluC、CjCgtA、Cjdmh、CjGT-A

50

、EcYidX、EcEra、EcFrVX、EcGabT、EcYedK、EcYbaN、EcYhgN、RtMaga、RbCpaF、RgPilD、LaFrc、LaEno、LjEFTu、BfOmpa、PrOmpA、Cp10bA、CpSpA、EfSant、LmOsp、SfET-2、Cpatox、Cpbtox、EcSta2、Ec0Stx2A、CjcdtB/C、CdtcdA/B及びそれらの組合せを含むが、これらに限定されない細菌抗原に特異的に結合する抗体を含む。

【0093】

[0108]いくつかの実施形態において、本方法は、対象から採取した生体試料中の少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーのレベルを測定することを含む。いくつかの例において、細菌抗原抗体の1ダブル(tuple)、2ダブル、3ダブル、4ダブル、5ダブル、6ダブル、7ダブル、8ダブル、9ダブル、10ダブル、11ダブル、12ダブル、13ダブル、14ダブル、15ダブル、16ダブル、17ダブル、18ダブル、19ダブル、20ダブル、21ダブル、22ダブル、23ダブル、24ダブル、25ダブル、26ダブル、27ダブル、28ダブル、29ダブル、30ダブル、31ダブル、32ダブル、33ダブル、34ダブル又は35ダブルを測定することができる。

10

【0094】

[0109]いくつかの実施形態において、少なくとも1種の細菌抗原抗体マーカー、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35種又はそれ以上の細菌抗原抗体マーカーのレベルは、IBSを有する個体において健常対照と比較して増加している。他の実施形態において、少なくとも1種の細菌抗原抗体マーカー、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35種又はそれ以上の細菌抗原抗体マーカーのレベルは、IBSを有する個体において健常対照と比較して低下している。いくつかの実施形態において、細菌抗原抗体マーカーのアレイのレベルは、健常対照からの試料と比較してIBSを有する個体から採取した試料において調節不全の状態である。

20

【0095】

[0110]いくつかの実施形態において、本方法は、a)試料中に存在する細菌抗原抗体を細菌抗原抗体及び細菌抗原ポリペプチド又はその断片を含む複合体に変換するのに適する条件下で対象からの生体試料を細菌抗原ポリペプチド又はその抗原性断片と接触させるステップと、b)複合体のレベルを判定し、それにより、試料中に存在する細菌抗原のレベルを判定するステップとを含む。いくつかの実施形態において、本方法は、c)試料中に存在する細菌抗原抗体のレベルを細菌抗原抗体の対照レベルと比較するステップをさらに含み、細菌抗原抗体のレベルが、対象がIBSを有する可能性の増大を示す。

30

【0096】

[0111]細菌抗原ポリペプチド又はその断片は、測定されるべき細菌抗原抗体に選択的に結合する。例えば、細菌フラジェリン(例えば、SfFlc)に対する抗体のレベルは、フラジェリンポリペプチド又はその抗原性断片を用いて測定することができる。

40

【0097】

[0112]特定の実施形態において、本発明は、a)細菌抗原抗体を、細菌抗原及び捕捉細菌抗原抗体を含む複合体に変換するのに適する条件下で、上記細菌抗原抗体を含有する試料を接触させるステップと、b)上記複合体を酵素標識インジケータ抗体と接触させて、上記複合体を標識複合体に変換するステップと、c)標識複合体を酵素の基質と接触させるステップと、d)試料中の細菌抗原抗体の存在又はレベルを検出するステップとを含む、IBSの診断を補助する方法を提供する。

【0098】

[0113]特定の他の実施形態において、少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーのレベルは、免疫測定法(例えば、ELISA)又は免疫組織化学測定法を用いて判定する。本発

50

明の方法に用いるのに適する免疫測定法の非限定的な例は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を含む。本発明の方法に用いるのに適する免疫組織化学測定法の例は、直接蛍光抗体測定法、間接蛍光抗体（IFA）測定法、抗補体免疫蛍光測定法及びアビジン-ビオチン免疫蛍光測定法などの免疫蛍光測定法を含むが、これらに限定されない。他のタイプの免疫組織化学測定法は、免疫ペルオキシダーゼ測定法を含む。血清、血漿、唾液又は尿試料中の細菌抗原の存在又はレベルを判定するための適切なELISAキットは、例えば、Antigenix America Inc. (Huntington station, NY)、Promega (Madison, WI)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Life Technologies (Carlsbad, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、Peprotech (Rocky Hill, NJ)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)及び/又はAbazyme (Needham, MA)から入手できる。

10

20

30

40

50

#### 【0099】

[0114] 1つの態様において、本発明は、方法が（a）固相表面を細菌抗原又はその抗原性断片で被覆するステップと、（b）試料中に存在する細菌抗原抗体を、細菌抗原及び細菌抗原抗体を含む複合体に変換するのに適する条件下で、固相表面を試料と接触させるステップと、（c）三元複合体を形成するのに適する条件下で、細菌抗原及び細菌抗原抗体を検出抗体と接触させるステップと、（d）三元複合体を発光又は化学発光基質と接触させるステップとを含む、試料中の細菌抗原抗体マーカーの検出のためのアッセイを提供する。

#### 【0100】

[0115] 1つの実施形態において、検出抗体をアルカリホスファターゼにコンジュゲートさせる。他の実施形態において、検出抗体を酵素にコンジュゲートさせず、方法は、（i）四元複合体を形成するのに適する条件下で、三元複合体を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートさせた第3の抗体と接触させるステップと、（ii）四元複合体を発光又は化学発光基質と接触させるステップとをさらに含む。

#### 【0101】

[0116] 適切な抗体対をサンドイッチELISAにおける捕捉及び検出抗体に用いることができる。当業者は、アッセイのための適切な抗体対をどのようにして選択するかを知り、認識する。一般的に、第1の（捕捉）抗体の結合が第2の（検出）抗体を妨害しないように異なるエピトープにおいて対象の標的（例えば、トリプターゼ）、に結合する2つの抗体を選択する。特定の実施形態において、検出抗体を酵素、例えば、アルカリホスファターゼにコンジュゲートさせて、複合体の検出を補助する。他の実施形態において、検出抗体に結合している、酵素（例えば、アルカリホスファターゼ）にコンジュゲートさせた第2の抗体をアッセイに用いることができる。

#### 【0102】

[0117] 一般的に、複合体は、発光基質、例えば、Ultra LITE (NAG Research Laboratories)、Sensolyte (AnaSpec)、SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific)、SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) 又はCPSD (二ナトリウム3-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ[3.3.1.1<sup>3,7</sup>]}-4-イル)フェニルホスフェート; Tropix, Inc.) などのキットに見いだされる発光基質を用いることにより検出される。

#### 【0103】

[0118] 細菌抗原の抗原性断片のアミノ酸配列は、EMBOSSなどのソフトウェアアル

ゴリズムを用いて *in silico* で免疫原性部位を予測することにより同定することができる。例えば、抗原タンパク質の一連のペプチド断片の疎水性、近接性及び柔軟性などの性質を評価して、最も抗原性である（例えば、最高の抗原性スコアを有する）と予測されるペプチド断片を決定する。

【0104】

[0119] 特定の実施形態において、様々な細菌抗原が、IBSの診断を補助する本発明の方法に特に有用である。細菌抗原の非限定的な例は、消化管微生物叢により発現されるフラジェリンポリペプチド又はその断片及び他のポリペプチド又はその断片を含む。微生物フラジェリンは、それ自体を中空円柱に配置してフィラメントを形成する細菌鞭毛に見いだされるタンパク質である。フラジェリンポリペプチド又はその断片は、クロストリジウム属、ラクノスピラ科細菌 A 4、大腸菌 K 1 2、大腸菌 O 1 5 7 : H 7、フレキシナ赤痢菌、カンピロバクター・ジェジュニ及び腸炎菌を含む細菌により一般的に発現される。

10

【0105】

[0120] 個体からの試料中の抗フラジェリン抗体の存在は、フラジェリンタンパク質又はその免疫反応性断片などのその断片を用いて判断することができる。試料中の抗フラジェリン抗体レベルを測定するのに有用な適切なフラジェリン抗原は、制限なく、CBir-1、Fl i C、Fl j B、フラジェリン、フラジェリン X (Fl a - X)、フラジェリン A (Fl a - A)、フラジェリン B (Fl a - B)、フラジェリン 2 (Fl a 2) などのフラジェリンタンパク質、それらの断片及びそれらの組合せ、フラジェリンタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するフラジェリンポリペプチド、又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。本明細書で用いているように、フラジェリンポリペプチドは、一般的に、天然に存在するフラジェリンタンパク質と約 50% 超の同一性、好ましくは約 60% 超の同一性、より好ましくは約 70% 超の同一性、より好ましくは約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98% 又は 99% 超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、CLUSTALW などの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのようなフラジェリン抗原は、例えば、ヘリコバクター・ピリス (*Helicobacter bilis*)、ヘリコバクター・ムステレ (*Helicobacter mustelae*)、ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*)、ラクノスピラ菌 (*Lachnospiraceae bacterium*) A 4、フレキシナ赤痢菌 (*Shigella flexneri*)、大腸菌、腸炎菌 (*Salmonella enteritidis*)、カンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*)、ブチリビブリオ・フィブリソルベンス (*Butyrivibrio fibrisolvens*) 及び盲腸に見いだされる細菌などの細菌からの精製により、フラジェリン抗原をコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

20

30

【0106】

[0121] 細菌抗原の非限定的な例を表 1 に示す。

【表 1】

表1. 細菌抗原

抗原	グループ ング	門	株	UniProt 受託番号
EcFliC	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	P04949
EcOFliC	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌H7:0157	Q7AD06
SeFliB	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	腸炎菌	B5R0Z9
CjFlaA	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	カンピロバクター・ ジェジュニ	Q2M5R2
CjFlaB	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	カンピロバクター・ ジェジュニ	A1W0V5
SfFliC	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	フレキシナ赤痢菌	Q08860
CjCgtA	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	カンピロバクター・ ジェジュニ	Q50FZ3
Cjdmh	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	カンピロバクター・ ジェジュニ	Q50FQ7
CjGT-A	感染	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	カンピロバクター・ ジェジュニ	Q50FX0
EcYidX	共生	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	P0ADM6
EcEra	共生	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	U6NG20
EcFrvX	共生	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	P32153
EcGabT	共生	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	P22256
EcYedK	共生	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	P76318
EcYbaN	共生	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	P0AAR5
EcYhgN	共生	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	P67143

10

20

30

40

RtMaga	ムチン分解	フィルミクテス (Firmicutes)	ルミノコッカス・トルクエス(R.torques)	D4M4S6	
RbCpaF	ムチン分解	フィルミクテス (Firmicutes)	ルミノコッカス・ブロマイ(R.bromii)	D4L5L7	
RgPilD	ムチン分解	フィルミクテス (Firmicutes)	ルミノコッカス・グナブス(R.gnavus)	A7B5T4	
LaFrc	共生	フィルミクテス (Firmicutes)	アシドフィルス菌 (L.acidophilus)	R4JZC5	
LaEno	共生	フィルミクテス (Firmicutes)	アシドフィルス菌 (L.acidophilus)	Q5FKM6	10
LjEFTu	共生	フィルミクテス (Firmicutes)	ラクトバチルス・ジョンソニー (L.johnsonii)	Q74JU6	
BfOmpA	共生	バクテロイデス (Bacteroidetes)	バクテロイデス・フラジリス (Bacteroidetes)	Q64VP7	
PrOmpA	共生	バクテロイデス (Bacteroidetes)	プレボテラ属菌 (Prevotella spp)	C9PT48	
Cp10bA	共生	フィルミクテス (Firmicutes)	ウェルシュ菌 (C.perfringens)	B1V1I2	20
CpSpA	共生	フィルミクテス (Firmicutes)	ウェルシュ菌 (C.perfringens)	Q5DWA9	
EfSant	共生	フィルミクテス (Firmicutes)	フェカリス菌 (E.faecalis)	C7W575	
LmOsp	共生	フィルミクテス (Firmicutes)	リステリア菌 (L.monocytogenes)	B8DFK3	
SfET-2	毒素	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	フレキシナ赤痢菌	Q7BEN0	30
Cpatox	毒素	フィルミクテス (Firmicutes)	ウェルシュ菌 (C.perfringens)	Q3HR45	
Cpbtox	毒素	フィルミクテス (Firmicutes)	ウェルシュ菌 (C.perfringens)	B1R976	
EcSta2	毒素	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌	Q2WE95	
Ec0Stx2A	毒素	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	大腸菌H7:0157	B6ZXF5	
CjcdtB/C	毒素	プロテオバクテリア (Proteobacteria)	カンピロバクター・ジェジュニ	Q46101/Q46102	40
CdtcdA/B	毒素	フィルミクテス (Firmicutes)	クロストリジウム・ディフィシル (C.difficile)	P16154/P18177	

## 【 0 1 0 7 】

[0122] 「E c F l i C」という用語は、抗F l i C抗体との免疫反応性を示す大腸菌株K 1 2のフラジェリンを意味する。試料中の抗F l i C抗体レベルを判定するのに有用である適切なE c F l i C抗原は、制限なしに、大腸菌株K 1 2のF l i Cタンパク質、大腸菌株K 1 2のF l i Cタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するF l i Cポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。大腸菌株K 1 2のF l i Cポリペ

プチドは、一般的に大腸菌株 K 1 2 の F l i C タンパク質との約 5 0 % より大きい同一性、好ましくは約 6 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 7 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌などの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号 A A A 2 3 9 5 0 . 1 などの F l i C ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

【 0 1 0 8 】

[0123] 「E c O F l i C」という用語は、抗 F l i C 抗体との免疫反応性を示す大腸菌株 O 1 5 7 : H 7 のフラジェリンを意味する。試料中の抗 F l i C 抗体レベルを判定するのに有用である適切な F l i C 抗原は、制限なしに、F l i C タンパク質、F l i C タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する F l i C ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。F l i C ポリペプチドは、一般的に F l i C タンパク質との約 5 0 % より大きい同一性、好ましくは約 6 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 7 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌株 O 1 5 7 : H 7 などの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号 B A B 3 6 0 8 5 . 1 などの F l i C ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

10

20

【 0 1 0 9 】

[0124] 「S e F l j B」という用語は、抗 F l j B 抗体と免疫反応性である腸炎菌のフラジェリンタンパク質を意味する。試料中の抗 F l j b 抗体レベルを測定するのに有用である適切な S e F l j B 抗原は、制限なしに、F l j b タンパク質、F l j b タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する F l j b ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。F l j b ポリペプチドは、一般的に、F l j b タンパク質と約 5 0 % 超の同一性、好ましくは約 6 0 % 超の同一性、より好ましくは約 7 0 % 超の同一性、より好ましくは約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 超の

30

【 0 1 1 0 】

[0125] 「C j F l a A」という用語は、抗 F l a A 抗体との免疫反応性を示すカンピロバクター・ジェジュニのフラジェリンサブユニットを意味する。試料中の抗 F l a A 抗体レベルを判定するのに有用である適切な C j F l a A 抗原は、制限なしに、F l a A タンパク質、F l a A タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する F l a A ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。F l a A ポリペプチドは、一般的に F l a A タンパク質との約 5 0 % より大きい同一性、好ましくは約 6 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 7 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、カンピロバクター・ジェジュニなどの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号 A B C 6 9 2 7 6 . 1 などの F l a A ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

40

【 0 1 1 1 】

50

[0126] 「C j F l a B」という用語は、抗F l a B抗体との免疫反応性を示すカンピロバクター・ジェジュニのフラジェリンBを意味する。試料中の抗F l a B抗体レベルを判定するのに有用である適切なC j F l a B抗原は、制限なしに、F l a Bタンパク質、F l a Bタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するF l a Bポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。F l a Bポリペプチドは、一般的にF l a Bタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、カンピロバクター・ジェジュニなどの腸内細菌からの精製により、NCBI受託番号E A Q 7 2 8 8 3 . 1などのF l a Bペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

10

## 【0112】

[0127] 「S f F l i C」という用語は、抗F l i C抗体との免疫反応性を示すフレキシナ赤痢菌のフラジェリンを意味する。試料中の抗F l i C抗体レベルを判定するのに有用である適切なS f F l i C抗原は、制限なしに、F l i Cタンパク質、F l i Cタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するF l i Cポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。F l i Cポリペプチドは、一般的にF l i Cタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、フレキシナ赤痢菌などの腸内細菌からの精製により、NCBI受託番号B A A 0 4 0 9 3 . 1などのF l i Cペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。当業者は、フレキシナ赤痢菌F l i Cが鞭毛フィラメント構造タンパク質、フラジェリン及びH-抗原としても公知であることを認識する。

20

## 【0113】

[0128] 「C j 8 1 - 0 4 5」又は「C j G T - A」という用語は、抗C j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)抗体との免疫反応性を示すカンピロバクター・ジェジュニ膜タンパク質を意味する。試料中の抗C j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)抗体レベルを判定するのに有用である適切なC j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)抗原は、制限なしに、C j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)タンパク質、C j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するC j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。C j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)ポリペプチドは、一般的にC j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)タンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、カンピロバクター・ジェジュニなどの腸内細菌からの精製により、NCBI受託番号A A W 5 6 1 2 4 . 1などのC j 8 1 - 0 4 5 (C j G T - A)ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

30

40

## 【0114】

[0129] 「C j 8 1 - 1 2 8」又は「C j d m h」という用語は、抗C j 8 1 - 1 2 8 (C j d m h)抗体との免疫反応性を示すカンピロバクター・ジェジュニ膜タンパク質を意味する。試料中の抗C j 8 1 - 1 2 8 (C j d m h)抗体レベルを判定するのに有用である適切なC j 8 1 - 1 2 8 (C j d m h)抗原は、制限なしに、C j 8 1 - 1 2 8 (C j

50

d m h ) タンパク質、C j 8 1 - 1 2 8 ( C j d m h ) タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するC j 8 1 - 1 2 8 ( C j d m h ) ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。C j 8 1 - 1 2 8 ( C j d m h ) ポリペプチドは、一般的にC j 8 1 - 1 2 8 ( C j d m h ) タンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、カンピロバクター・ジェジュニなどの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号A A W 5 6 1 8 7 . 1などのC j 8 1 - 1 2 8 ( C j d m h ) ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

10

## 【0115】

[0130]「C j 8 1 - 0 0 8」又は「C j C g t A」という用語は、抗C j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) 抗体との免疫反応性を示すカンピロバクター・ジェジュニのベータ - 1 , 4 - N - アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼを意味する。試料中の抗C j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) 抗体レベルを判定するのに有用である適切なC j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) 抗原は、制限なしに、C j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) タンパク質、C j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するC j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。C j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) ポリペプチドは、一般的にC j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) タンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、カンピロバクター・ジェジュニなどの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号A A W 5 6 1 0 1 . 1などのC j 8 1 - 0 0 8 ( C j C g t A ) ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

20

30

## 【0116】

[0131]「E c Y i d X」という用語は、抗Y i d X抗体との免疫反応性を示す大腸菌株K 1 2の推定レプリカーゼを意味する。Y i d Xは、リポタンパク質Cであると予測される。試料中の抗Y i d X抗体レベルを判定するのに有用である適切なY i d X抗原は、制限なしに、大腸菌株K 1 2のY i d Xタンパク質、Y i d Xタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するY i d Xポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。Y i d Xポリペプチドは、一般的に大腸菌株K 1 2のY i d Xタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌などの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号A A T 4 8 2 0 0 . 1などのY i d Xペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。当業者は、Y i d Xが予測リポタンパク質Cとしても公知であることを認識する。

40

## 【0117】

[0132]「E c E r a」という用語は、抗E r a抗体との免疫反応性を示す大腸菌株K 1 2のR a s様膜結合性リポソーム結合G T Pアーゼを意味する。試料中の抗E r a抗体レベルを判定するのに有用である適切なE c E r a抗原は、制限なしに、大腸菌株K 1 2の

50

Eraタンパク質、大腸菌株K12のEraタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するEraポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。大腸菌株K12のEraポリペプチドは、一般的に大腸菌株K12のEraタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌株K12などの腸内細菌からの精製により、NCBI受託番号AAA03242.1などのEraペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。当業者は、Eraが膜結合性16SrRNA結合GTPアーゼ、B2566、SdgE及びRbaAとしても公知であることを認識する。

10

20

30

40

50

**【0118】**

[0133]「EcfvX」という用語は、抗FrvX抗体との免疫反応性を示す大腸菌株K12のfrvオペロンタンパク質を意味する。FrvXは、エンド-1,4-ベータグルカナーゼであると予測されている。試料中の抗FrvX抗体レベルを判定するのに有用である適切なEcfvX抗原は、制限なしに、大腸菌株K12のFrvXタンパク質、大腸菌株K12のFrvXタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するFrvXポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。大腸菌株K12のFrvXポリペプチドは、一般的に大腸菌株K12のFrvXタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌などの腸内細菌からの精製により、NCBI受託番号AAB03031.1などのFrvXペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

**【0119】**

[0134]「EcGAbT」という用語は、抗GAbT抗体との免疫反応性を示す大腸菌株K12のPLP依存性4-アミノ酪酸アミノトランスフェラーゼを意味する。試料中の抗GAbT抗体レベルを判定するのに有用である適切なGAbT抗原は、制限なしに、大腸菌株K12のGAbTタンパク質、大腸菌株K12のGAbTタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するGAbTポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。GAbTポリペプチドは、一般的に大腸菌株K12のGAbTタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌などの腸内細菌からの精製により、NCBI受託番号AAC36832.1などのGAbTペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、或いはファージディスプレイを用いることにより調製することができる。当業者は、GAbTが(S)-3-アミノ-2-メチルプロピオン酸トランスアミナーゼ、GABAアミノトランスフェラーゼ、GABA-AT、ガンマ-アミノ-N-酪酸トランスアミナーゼ及びグルタミン酸-コハク酸セミアルデヒドトランスアミナーゼL-AIBATとしても公知であることを認識する。

**【0120】**

[0135]「EcYedK」という用語は、抗YedK抗体との免疫反応性を示す大腸菌株K12の予測タンパク質を意味する。試料中の抗YedK抗体レベルを判定するのに有用である適切なEcYedK抗原は、制限なしに、大腸菌株K12のYedKタンパク質、

大腸菌株 K 1 2 の Y e d K タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する Y e d K ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。Y h g N ポリペプチドは、一般的に大腸菌株 K 1 2 の Y e d K タンパク質との約 5 0 % より大きい同一性、好ましくは約 6 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 7 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌などの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号 A A 4 8 1 3 9 などの Y e d K ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、或いはファージディスプレイを用いることにより調製することができる。

10

## 【 0 1 2 1 】

[0136] 「E c Y b a N」という用語は、大腸菌株 K 1 2 の内膜タンパク質 Y b a N を意味し、抗 Y b a N 抗体と免疫反応性である。試料中の抗 Y b a N 抗体レベルを測定するのに有用である適切な E c Y b a N 抗原は、制限なしに、大腸菌株 K 1 2 の Y b a N タンパク質、大腸菌株 K 1 2 の Y b a N タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する Y b a N ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。Y b a N ポリペプチドは、一般的に、大腸菌株 K 1 2 の Y b a N タンパク質と約 5 0 % 超の同一性、好ましくは約 6 0 % 超の同一性、より好ましくは約 7 0 % 超の同一性、より好ましくは約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % 超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、大腸菌のような腸内細菌からの精製により、U n i p r o t 番号 P 0 A A R 5 のような Y b a N ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、又はファージディスプレイを使用して、調製することができる。

20

## 【 0 1 2 2 】

[0137] 「E c Y h g N」という用語は、抗生物質トランスポーターとして機能すると予測され、抗 Y h g N 抗体との免疫反応性を示す大腸菌株 K 1 2 膜タンパク質を意味する。試料中の抗 Y h g N 抗体レベルを判定するのに有用である適切な E c Y h g N 抗原は、制限なしに、大腸菌株 K 1 2 の Y h g N タンパク質、大腸菌株 K 1 2 の Y h g N タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する Y h g N ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。Y h g N ポリペプチドは、一般的に大腸菌株 K 1 2 の Y h g N タンパク質との約 5 0 % より大きい同一性、好ましくは約 6 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 7 0 % より大きい同一性、より好ましくは約 8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、大腸菌などの腸内細菌からの精製により、N C B I 受託番号 A A A 5 8 2 3 2 . 1 などの Y h g N ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、或いはファージディスプレイを用いることにより調製することができる。当業者は、Y h g N が予測された抗生物質トランスポーターとしても公知であることを認識する。

30

40

## 【 0 1 2 3 】

[0138] 「R t M a g a」という用語は、ルミノコッカス・トルクエスのマンノース糖タンパク質エンド - N - アセチルグルコサミニダーゼを意味し、抗 M a g a 抗体と免疫反応性である。試料中の抗 M a g a 抗体レベルを測定するのに有用である適切な R t M a g a 抗原は、制限なしに、ルミノコッカス・トルクエスの M a g a タンパク質、ルミノコッカス・トルクエスの M a g a タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する M a g a ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。M a g a ポリペプチドは、一

50

一般的に、ルミノコッカス・トルクエスのM a g aタンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、ルミノコッカス・トルクエスのような腸内細菌からの精製により、U n i p r o t 番号D 4 M 4 S 6のようなM a g aペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、又はファージディスプレイを使用して、調製することができる。

【0124】

[0139]「R b C p a F」という用語は、ルミノコッカス・プロミイの繊毛アセンブリタンパク質A T PアーゼC p Fを意味し、抗C p a F抗体と免疫反応性である。試料中の抗C p a F抗体レベルを測定するのに有用である適切なR b C p a F抗原は、制限なしに、ルミノコッカス・プロミイのC p a Fタンパク質、ルミノコッカス・プロミイのC p a Fタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するC p a Fポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。C p a Fポリペプチドは、一般的に、ルミノコッカス・プロミイのC p a Fタンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、ルミノコッカス・プロミイのような腸内細菌からの精製により、U n i p r o t 番号D 4 L 5 L 7のようなC p a Fペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、又はファージディスプレイを使用して、調製することができる。

【0125】

[0140]「R g P i l D」という用語は、ルミノコッカス・グナブスの繊毛イソペプチド結合ドメインタンパク質を意味し、抗P i l D抗体と免疫反応性である。試料中の抗P i l D抗体レベルを測定するのに有用である適切なR g P i l D抗原は、制限なしに、ルミノコッカス・グナブスのP i l Dタンパク質、ルミノコッカス・グナブスのP i l Dタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するP i l Dポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。P i l Dポリペプチドは、一般的に、ルミノコッカス・グナブスのP i l Dタンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、ルミノコッカス・グナブスのような腸内細菌からの精製により、U n i p r o t 番号A 7 B 5 T 4のようなP i l Dペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、又はファージディスプレイを使用して、調製することができる。

【0126】

[0141]「L a F r c」という用語は、抗F r c抗体との免疫反応性を示すアシドフィルス菌のタンパク質を意味する。F r cは、ホルミルC o Aトランスフェラーゼであると予測される。試料中の抗F r c抗体レベルを判定するのに有用である適切なF r c抗原は、制限なしに、アシドフィルス菌のF r cタンパク質、アシドフィルス菌のF r cタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するF r cポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。アシドフィルス菌のF r cポリペプチドは、一般的にアシドフィルス菌のF r cタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有す

10

20

30

40

50

るアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、アシドフィルス菌などの腸内細菌からの精製により、N C B I Ref . Seq . 番号Y P \_ 1 9 3 3 1 7又はUniProt . 番号Q 5 F L Y 8などのFrcペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

【0127】

[0142]「LaEno」という用語は、抗Eno抗体との免疫反応性を示すアシドフィルス菌のタンパク質を意味する。Enoは、ホスホピルビン酸ヒドラターゼ（エノラーゼ）であると予測される。試料中の抗Eno抗体レベルを判定するのに有用である適切なLaEno抗原は、制限なしに、アシドフィルス菌のEnoタンパク質、アシドフィルス菌のEnoタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するEnoポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。アシドフィルス菌のEnoポリペプチドは、一般的にアシドフィルス菌のEnoタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、アシドフィルス菌などの腸内細菌からの精製により、N C B I Ref . Seq . 番号Y P \_ 1 9 3 7 7 9又はUniProt . 番号Q 5 F K M 6などのEnoペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

10

20

【0128】

[0143]「LiEFtu」という用語は、抗EFtu抗体との免疫反応性を示すラクトバチルス・ジョンソニイのタンパク質を意味する。EFtuは、伸長因子Tuであると予測される。試料中の抗EFtu抗体レベルを判定するのに有用である適切なEFtu抗原は、制限なしに、ラクトバチルス・ジョンソニイのEFtuタンパク質、ラクトバチルス・ジョンソニイのEFtuタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するEFtuポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。ラクトバチルス・ジョンソニイのEFtuポリペプチドは、一般的にラクトバチルス・ジョンソニイのEFtuタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、ラクトバチルス・ジョンソニイなどの腸内細菌からの精製により、N C B I Ref . Seq . 番号N P \_ 9 6 4 8 6 5又はUniProt . 番号Q 7 4 J U 6などのEFtuペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

30

【0129】

[0144]「BfOmpA」という用語は、抗OmpA抗体との免疫反応性を示すバクテロイデス・フラジリスのタンパク質を意味する。OmpAは、主要な外膜タンパク質Aであると予測される。試料中の抗OmpA抗体レベルを判定するのに有用である適切なOmpA抗原は、制限なしに、バクテロイデス・フラジリスのOmpAタンパク質、バクテロイデス・フラジリスのOmpAタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するOmpAポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。バクテロイデス・フラジリスのOmpAポリペプチドは、一般的にバクテロイデス・フラジリスのOmpAタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有す

40

50

るポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、バクテロイデス・フラジリスなどの腸内細菌からの精製により、NCBI Ref. Seq. 番号YP\_098863又はUniProt. 番号Q64VP7などのOmpAペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

#### 【0130】

[0145]「PrOmpA」という用語は、抗OmpA抗体との免疫反応性を示すプレボテラ属種、例えば、プレボテラ属種オーラル分類群472株F0295、のタンパク質を意味する。OmpAは、免疫反応性抗原PG33又は主要外膜タンパク質Aであると予測される。試料中の抗OmpA抗体レベルを判定するのに有用である適切なOmpA抗原は、制限なしに、プレボテラ属種のOmpAタンパク質、プレボテラ属種のOmpAタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するOmpAポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。プレボテラ属種のOmpAポリペプチドは、一般的にプレボテラ属種のOmpAタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、プレボテラ属種などの腸内細菌からの精製により、NCBI GenBank 受託番号EEX54413又はUniProt. 番号C9PT48などのOmpAペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

10

20

#### 【0131】

[0146]「Cp10bA」という用語は、抗10bA抗体との免疫反応性を示すウェルシュ菌のタンパク質を意味する。10bAは、10b抗原であると予測される。試料中の抗10bA抗体レベルを判定するのに有用である適切な10bA抗原は、制限なしに、ウェルシュ菌の10bAタンパク質、ウェルシュ菌の10bAタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する10bAポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。ウェルシュ菌の10bAポリペプチドは、一般的にウェルシュ菌の10bAタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、ウェルシュ菌などの腸内細菌からの精製により、NCBI GenBank 受託番号EDT72304又はUniProt. 番号B1V1I2などの10bAペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

30

#### 【0132】

[0147]「CpSpA」という用語は、抗SpA抗体との免疫反応性を示すウェルシュ菌のタンパク質を意味する。SpAは、表面保護抗原SpA類似体であると予測される。試料中の抗SpA抗体レベルを判定するのに有用である適切なSpA抗原は、制限なしに、ウェルシュ菌のSpAタンパク質、ウェルシュ菌のSpAタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するSpAポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。ウェルシュ菌のSpAポリペプチドは、一般的にウェルシュ菌のSpAタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、ウェルシュ菌などの腸内

40

50

細菌からの精製により、NCBI Ref. Seq. 番号YP\_209686又はUniProt. 番号Q5DWA9などのSpAペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

【0133】

[0148]「EfSant」という用語は、抗Sant抗体との免疫反応性を示すフェカリス菌のタンパク質を意味する。Santは、表面抗原であると予測される。試料中の抗Sant抗体レベルを判定するのに有用である適切なSant抗原は、制限なしに、フェカリス菌のSantタンパク質、フェカリス菌のSantタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するSantポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。フェカリス菌のSantポリペプチドは、一般的にフェカリス菌のSantタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、フェカリス菌などの腸内細菌からの精製により、NCBI GenBank受託番号EEU72780又はUniProt. 番号C7W575などのSantペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

10

【0134】

[0149]「LmOsp」という用語は、抗Osp抗体との免疫反応性を示すリステリア菌(Listeria monocytogenes)のタンパク質を意味する。Ospは、外表面抗原であると予測される。試料中の抗Osp抗体レベルを判定するのに有用である適切なOsp抗原は、制限なしに、リステリア菌のOspタンパク質、リステリア菌のOspタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するOspポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。リステリア菌のOspポリペプチドは、一般的にリステリア菌のOspタンパク質との約50%より大きい同一性、好ましくは約60%より大きい同一性、より好ましくは約70%より大きい同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%より大きいアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて判定する。そのような抗原は、例えば、リステリア菌などの腸内細菌からの精製により、NCBI Ref. Seq. 番号YP\_002349810又はUniProt. 番号B8DFK3などのOspペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により調製することができる。

20

30

【0135】

[0150]「SfET-2」という用語は、抗腸毒素ET-2抗体と免疫反応性であるフレキシナ赤痢菌のタンパク質を意味する。ET-2は、腸毒素であると予測される。試料中の抗ET-2抗体レベルを測定するのに有用である適切なET-2抗原は、制限なしに、フレキシナ赤痢菌のET-2タンパク質、フレキシナ赤痢菌のET-2タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するET-2ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。フレキシナ赤痢菌のET-2ポリペプチドは、一般的に、フレキシナ赤痢菌のET-2タンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、CLUSTALWなどの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、フレキシナ赤痢菌のような腸内細菌からの精製により、UniProt番号Q7BEN0のようなET-2ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

40

【0136】

50

[0151]「C p a t o x」という用語は、抗アルファ毒素抗体と免疫反応性であるウェルシュ菌のタンパク質を意味する。t o xは、アルファ毒素であると予測される。試料中の抗 t o x抗体レベルを測定するのに有用である適切な t o x抗原は、制限なしに、ウェルシュ菌の t o xタンパク質、ウェルシュ菌の t o xタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する t o xポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。ウェルシュ菌の t o xポリペプチドは、一般的に、ウェルシュ菌の t o xタンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、ウェルシュ菌のような腸内細菌からの精製により、UniProt番号Q3HR45のような t o xペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

10

## 【0137】

[0152]「C p b t o x」という用語は、抗ベータ2毒素抗体と免疫反応性であるウェルシュ菌のタンパク質を意味する。t o xは、ベータ毒素であると予測される。試料中の抗 t o x抗体レベルを測定するのに有用である適切な t o x抗原は、制限なしに、ウェルシュ菌の t o xタンパク質、ウェルシュ菌の t o xタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する t o xポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。ウェルシュ菌の t o xポリペプチドは、一般的に、ウェルシュ菌の t o xタンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、ウェルシュ菌のような腸内細菌からの精製により、UniProt番号B1R976のような t o xペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

20

## 【0138】

[0153]「E c S t a 2」という用語は、抗熱安定性毒素S t a 2抗体と免疫反応性である大腸菌のタンパク質を意味する。S t a 2は、熱安定性毒素であると予測される。試料中の抗S t a 2抗体レベルを測定するのに有用である適切なS t a 2抗原は、制限なしに、大腸菌のS t a 2タンパク質、大腸菌のS t a 2タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するS t a 2ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。大腸菌のS t a 2ポリペプチドは、一般的に、大腸菌のS t a 2タンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、より好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L Wなどの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、大腸菌のような腸内細菌からの精製により、UniProt番号Q2WE95のようなS t a 2ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

30

40

## 【0139】

[0154]「E c O S t x 2 a」という用語は、抗S t x 2 a抗体と免疫反応性である大腸菌H7:O157のタンパク質を意味する。S t x 2 aは、志賀毒素サブユニットAであると予測される。試料中の抗S t x 2 a抗体レベルを測定するのに有用である適切なS t x 2 a抗原は、制限なしに、大腸菌H7:O157のS t x 2 aタンパク質、大腸菌のS t x 2 aタンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有するS t x 2 aポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。大腸菌H7:O157のS t x 2 aポリペプチ

50

ドは、一般的に、大腸菌 H7 : O157 の S t x 2 a タンパク質と約 50 % 超の同一性、好ましくは約 60 % 超の同一性、より好ましくは約 70 % 超の同一性、より好ましくは約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、大腸菌 H7 : O157 のような腸内細菌からの精製により、U n i p r o t 番号 B 6 Z X F 5 のような S t x 2 a ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

#### 【0140】

[0155] 「C j C d t B / C」という用語は、抗 C d t B / C 抗体と免疫反応性であるカンピロバクター・ジェジュニのタンパク質を意味する。C d t B は細胞致死性膨張性毒素サブユニット B であると予測され、C d t C は細胞致死性膨張性毒素サブユニット C であると予測される。試料中の抗 C d t B / C 抗体レベルを測定するのに有用である適切な C d t B / C 抗原は、制限なしに、カンピロバクター・ジェジュニの C d t B / C タンパク質、カンピロバクター・ジェジュニの C d t B / C タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する C d t B / C ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。カンピロバクター・ジェジュニの C d t B / C ポリペプチドは、一般的に、カンピロバクター・ジェジュニの C d t B / C タンパク質と約 50 % 超の同一性、好ましくは約 60 % 超の同一性、より好ましくは約 70 % 超の同一性、より好ましくは約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、カンピロバクター・ジェジュニのような腸内細菌からの精製により、U n i p r o t 番号 Q 4 6 1 0 1 及び Q 4 6 1 0 2 のような C d t B / C ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

10

20

#### 【0141】

[0156] 「C j C d A / B」という用語は、抗毒素 A / B 抗体と免疫反応性であるクロストリジウム・ディフィシルのタンパク質である。C d A は毒素 A であると予測され、C d B は毒素 B であると予測される。試料中の抗 C d A / B 抗体レベルを測定するのに有用である適切な C d A / B 抗原は、制限なしに、クロストリジウム・ディフィシルの C d A / B タンパク質、クロストリジウム・ディフィシルの C d A / B タンパク質と実質的に同じアミノ酸配列を有する C d A / B ポリペプチド又はその免疫反応性断片などのその断片を含む。クロストリジウム・ディフィシルの C d A / B ポリペプチドは、クロストリジウム・ディフィシルの C d A / B タンパク質と約 50 % 超の同一性、好ましくは約 60 % 超の同一性、より好ましくは約 70 % 超の同一性、より好ましくは約 80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 % 又は 99 % 超のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを記述するものであり、アミノ酸の同一性は、C L U S T A L W などの配列アライメントプログラムを用いて決定される。そのような抗原は、例えば、クロストリジウム・ディフィシルのような腸内細菌からの精製により、U n i p r o t 番号 P 1 6 1 5 4 及び P 1 8 1 7 7 のような C d A / B ペプチドをコードする核酸の組換え発現により、溶液又は固相ペプチド合成などの合成手段により、調製することができる。

30

40

#### 【0142】

[0157] いくつかの実施形態において、本方法は、個体からの試料中に存在する細菌抗原に対する抗体のレベルを測定することにより、少なくとも 1 種の細菌抗原抗体マーカー、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34 又は 35 種のマーカーのレベルを測定する方法を含む。いくつかの例において、個体が健常対照より高い又は低いレベルの少なくとも 1 種の細菌抗原抗体を有する場合、それは、個体が I B S を有することを示唆するものである。個

50

体における細菌抗原抗体の存在又はレベルは、疾患のレベルと相関し得る。

【0143】

[0158]いくつかの実施形態において、患者試料中の共生細菌抗原に対する少なくとも1つの抗体のレベルは、患者がIBSを有することを示し、共生細菌抗原は、LaFrc、LaEno、LjEFTu、BfOmpA、PrOmpA、Cp10bA、CpSpA、EfSant、LmOsp及びその組合せからなる群から選択される。細菌綱バクテロイデス・フラジリス又はプレボテラ属種からの細菌抗原に対する抗体のレベルが、正常対照試料におけるレベルと比較して個体から採取した試料において低下していると判定される場合、個体はIBSを有すると診断される。ウェルシュ菌、腸球菌、リステリア属及び他のファーミキューテス門の綱からなる群から選択される細菌綱の細菌抗原に対する抗体のレベルが、健常対照試料と比較して個体の試料において高いと判定される場合、個体はIBSを有すると診断される。

10

【0144】

[0159]いくつかの実施形態において、健常対照と比較してバクテロイデス綱細菌に対する抗体のより低いレベルを有する対象は、IBSを有する可能性がより高い。これと対照的に、健常対照と比較してクロストリジウム、モリキューテス及び/又は桿菌綱の細菌に対する抗体のより高いレベルを有する対象は、IBSを有する可能性がより高い。

【0145】

[0160]他の実施形態において、本明細書で提供する方法は、BfOmpA及びPrOmpA抗原などのバクテロイデス抗原と比べて、LaFrc、LaEno、LjEFTu、Cp10ba、CpSpaA、EfSant及びLmOsp抗原などのファーミキューテス抗原に対する抗体のレベル(例えば、量、濃度、比率)が増加している対象は、IBSを有する可能性が高くなると予測されることを判定するために用いる。

20

【0146】

C. マスト細胞マーカー

1. -トリプターゼ

[0161]1つの態様において、a)対象からの試料中に存在する -トリプターゼのレベルを判定するステップと、b)試料中に存在する -トリプターゼのレベルを対照レベルと比較するステップとを含み、対象からの試料中に存在する -トリプターゼのレベルが増加していると、対象がIBSを有する可能性が高いことを示す、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法を提供する。

30

【0147】

[0162]いくつかの実施形態において、対象からの試料中に存在する -トリプターゼのレベルを判定する方法は、a)試料中に存在する -トリプターゼを -トリプターゼ及び -トリプターゼ結合部分を含む複合体に変換するのに適する条件下で、対象からの生体試料を -トリプターゼ結合部分と接触させるステップと、b)複合体のレベルを判定し、それにより、試料中に存在する -トリプターゼのレベルを判定するステップとを含む。

【0148】

[0163]特定の実施形態において、対象からの試料中に存在する -トリプターゼのレベルを判定する方法は、 -トリプターゼを、 -トリプターゼ及び捕捉抗トリプターゼ抗体を含む複合体に変換するのに適する条件下で、 -トリプターゼを含有する試料を接触させるステップと、(b)複合体を酵素標識インジケーター抗体と接触させて、複合体を標識複合体に変換するステップと、(c)標識複合体を酵素の基質と接触させるステップと、d)試料中の -トリプターゼの存在又はレベルを検出するステップとを含む。

40

【0149】

[0164]対象からの試料中に存在する -トリプターゼのレベルを判定する方法の具体例としての実施形態は、その開示がすべての目的のために全体として参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第8,114,616号に記載されている。

【0150】

50

[0165]特定の例では、バイオマーカーは、例えば、同じ時点又は異なる時点に同じ個体から採取した試料中で検出することができるが、好ましい実施形態においては、トリプターゼ、ヒスタミン及びノ又はPGE2は、同じ試料から検出する。特定の実施形態において、バイオマーカーは、対象からの血液又は血清試料の異なる一部試料を用いて実施される別個のアッセイで検出する。他の実施形態において、バイオマーカーは、単一マルチプレックス検出アッセイ、例えば、Luminex xAMPアッセイで検出する。

【0151】

## 2. ヒスタミン

[0166]特定の実施形態において、本発明は、a)アセチル化ヒスタミンを、ヒスタミン及び捕捉抗ヒスタミン抗体を含む複合体に変換するのに適する条件下で、ヒスタミンを含有する試料を接触させるステップと、b)複合体を酵素標識インジケータ抗体と接触させて、複合体を標識複合体に変換するステップと、c)標識複合体を酵素の基質と接触させるステップと、d)試料中のヒスタミンのレベルを検出するステップとを含む、IBSの診断を補助するための方法を提供する。

10

【0152】

[0167]アッセイの具体例としての実施形態は、EIA Histamine Assay (カタログ番号IM2015、ImmunoTech)などのヒスタミン酵素免疫測定法である。簡潔に述べると、25µlのアシル化緩衝液、100µlの試料、キャリアプレート又は対照、及び25µlのアシル化試薬を混合し、直ちにボルテックス混合機で混合することにより、試料中に存在するヒスタミン、キャリアプレート又は対照をアセチル化する。50µlのアシル化試料、キャリアプレート又は対照をマイクロタイターアッセイプレートの抗ヒスタミン抗体被覆ウエルに加える。次いで、200µlのアルカリホスファターゼ-ヒスタミンコンジュゲートをプレートに加える。プレートを2~8で振とうしながら2時間インキュベートする。ウエルを洗浄溶液で洗浄し、200µlの発色基質をウエルに加える。プレートを暗所で18~25で振とうしながら30分間インキュベートする。次いで、発光プレートリーダーで発光を読み取る前に50µlの反応停止溶液を加える。Graphpad (Prism)などのグラフ化ソフトウェアを用いてキャリアプレートの相対発光単位(RLU)とヒスタミン濃度をプロットする。試料及び対照中のヒスタミンのレベルは、試料と同じアッセイで実施される検量曲線から補間により計算する。

20

【0153】

## 3. プロスタグランジンE2

[0168]特定の実施形態において、本発明は、a)プロスタグランジンE2を、プロスタグランジンE2及び捕捉抗プロスタグランジンE2抗体を含む複合体に変換するのに適する条件下で、プロスタグランジンE2を含有する試料を接触させるステップと、b)複合体を酵素標識インジケータ抗体と接触させて、複合体を標識複合体に変換するステップと、c)標識複合体を酵素の基質と接触させるステップと、d)試料中のプロスタグランジンE2のレベルを検出するステップとを含む、IBSの診断を補助するための方法を提供する。

30

【0154】

[0169]アッセイの具体例としての実施形態は、Prostaglandin E2 EIA-Monoclonal (カタログ番号514010、Cayman Chemical)などのPGE2競合酵素免疫測定法である。簡潔に述べると、50µlのキャリアプレート(標準)又は試料をあらかじめ被覆したヤギ抗マウスIgGマイクロタイターアッセイプレートのウエルに加える。50µlのPGE2トレーサー(共有結合によりコンジュゲートしたPGE2及びアセチルコリンエステラーゼ)を加え、次いで50µlの抗PGE2マウスIgGを加える。プレートを4で振とうしながら18時間インキュベートする。プレートを洗浄緩衝液で5分間洗浄する。200µlの発色試薬(例えば、エルマン試薬)をウエルに加える。プレートを暗所で振とうしながら60~90分間インキュベートする。発光を発光プレートリーダーで405nmで読み取る。Graphpad Prism (Graphpad Software, La Jolla, CA)などのグラフ

40

50

化ソフトウェアを用いてキャリブレーションの相対発光単位 (RLU) とプロスタグランジン E<sub>2</sub> 濃度をプロットする。試料及び対照中のプロスタグランジン E<sub>2</sub> のレベルは、試料と同じアッセイで実施される検量曲線から補間により計算する。

【0155】

D. 胆汁酸吸収不良マーカー

[0170]いくつかの実施形態において、本発明に用いる胆汁酸吸収不良 (BAM) マーカーは、胆汁酸、FXR、コレステロール、7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン (C4)、FGF19、CYP7A及びそれらの組合せからなる群から選択される。

【0156】

[0171]いくつかの実施形態において、7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン及びFGF19などのBAMマーカーのレベルを競合酵素免疫測定法により検出する。いくつかの例において、7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オンに対する抗体を用いる。いくつかの例において、FGF19に対する抗体を用いる。7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オンを測定するためのアッセイは、例えば、代理人整理番号88473-909072-026620PCを有する2014年5月27日に出願したPCT出願に記載されている。7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オンを測定する他の方法は、例えば、Camilleriら、Neurogastroenterology、2009、21巻(7号)、734-e43頁に記載されている高圧液体クロマトグラフィー、タンデム質量分析(HPLC-MS/MS)又は例えば、Hondaら、J Lipid Research、2007、48巻、458~464頁に記載されているエレクトロスプレーイオン化液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析(ESI-LC-MS/MS)を含む。

10

20

【0157】

E. セロトニンマーカー

[0172]いくつかの実施形態において、本発明に用いるセロトニンマーカーは、セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、セロトニン-O-硫酸、セロトニン-O-リン酸及びそれらの組合せからなる群から選択される。1つ又は複数のセロトニンマーカーのレベルは、競合酵素免疫測定法を用いて測定することができる。いくつかの例において、セロトニンマーカーの誘導体又は類似体を用いる。他の例において、セロトニン又はその代謝物に対する抗体を、個体からの生体試料中のセロトニンマーカーを検出するために用いることができる。セロトニン及びその代謝物を測定するためのアッセイは、例えば、代理人整理番号88473-909072-026620PCを有する2014年5月22日に出願したPCT出願に記載されている。

30

【0158】

[0173]セロトニン又はその代謝物のレベルは、液体クロマトグラフィー、HPLC/MSなどの他の方法、又は例えば、Abcam(Cambridge, MA)、Dako(Carpinteria, CA)及びSanta Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA)製の市販のセロトニン特異抗体を用いることなどの免疫学的方法により測定することができる。

40

【0159】

[0174]いくつかの実施形態において、試料を誘導体化して、セロトニン又はその代謝物の、レベルの測定の前の安定性を増大させる。例えば、試料を、0.1M CAPS緩衝液(pH 11.0)、0.1M p-(アミノメチル)ベンジル化合物、0.05Mヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム及びメタノールを10:11:22:23(体積:体積:体積)の比率で含むものなどの、誘導体化ミックスと混合することができる。

【0160】

F. キヌレニンマーカー

[0175]IBSにおけるセロトニン機能の変則性は、セロトニン前駆体のL-トリプトファンの代謝の変化に起因する可能性がある。トリプトファンは、セロトニンの前駆体としての役割を果たす必須アミノ酸であるが、代替的にキヌレニン経路に沿って代謝され得る

50

。これは、ひいては、他の神経刺激性物質の産生につながる。キヌレニンレベル及びキヌレニン：トリプトファン比がIBSにおいて増大していることが示された。

#### 【0161】

[0176]いくつかの実施形態において、本発明に用いるキヌレニンマーカーは、キヌレニン(K)、キヌレン酸(KyA)、アントラニル酸(AA)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キサントレン酸(XA)、キノリン酸(QA)、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)及びそれらの組合せからなる群から選択される。1つ又は複数のキヌレニンマーカーのレベルは、競合酵素免疫測定法を用いて測定することができる。いくつかの例において、キヌレニンマーカーの誘導体又は類似体をアッセイに用いる。他の例において、キヌレニン又はその代謝物に対する抗体を、個体からの生体試料中のキヌレニンマーカーを検出するために用いることができる。トリプトファン、キヌレニン及びその代謝物を測定するためのアッセイは、例えば、代理人整理番号88473-909072-026620PCを有する2014年5月22日に出願したPCT出願に記載されている。キヌレニンマーカーのレベルは、液体クロマトグラフィー、例えば、HPLC、HPLC/MSなどのような他の方法によっても測定することができる。

10

#### 【0162】

##### G. 炎症マーカー

[0177]生化学的マーカー、血清学的マーカー、タンパク質マーカー及び他の臨床的特性を含む様々な炎症マーカーが、IBS及び/又はそのサブタイプを診断するために本発明の方法に用いるのに適している。特定の態様において、本明細書で述べる方法は、対象がIBS及び/又はそのサブタイプを有することを予測するのを補助又は援助するために1つ又は複数の炎症マーカーについて決定された存在、濃度レベル及び/又は遺伝子型へのアルゴリズム(例えば、統計解析)の適用を利用するものである。

20

#### 【0163】

[0178]炎症マーカーの非限定的な例は、例えば、インターロイキンを含むサイトカイン、急性期タンパク質、細胞接着分子及びそれらの組合せなどの生化学的、血清学的及びタンパク質マーカーを含む。

#### 【0164】

##### 1. サイトカイン

[0179]試料中の少なくとも1つのサイトカインの存在又はレベルの決定は、本発明において特に有用である。本明細書で用いているように、「サイトカイン」という用語は、一連の免疫系機能を調節する免疫細胞により分泌される様々なポリペプチド又はタンパク質のいずれかを含み、ケモカインなどの小サイトカインを含む。「サイトカイン」という用語は、例えば、体重、造血、血管新生、創傷治癒、インスリン抵抗性、免疫応答及び炎症反応の調節において機能する脂肪細胞により分泌されるサイトカインの群を含む、アディポサイトカインも含む。

30

#### 【0165】

[0180]特定の態様において、TNF-、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、オステオプロテジェリン(OPG)、IFN-、IFN-、IFN-、IL-1、IL-1、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、可溶性IL-6受容体(sIL-6R)、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23及びIL-27を含むが、これらに限定されない少なくとも1つのサイトカインの存在又はレベルを試料中で決定する。特定の他の態様において、例えば、CXCL1/GRO1/GRO、CXCL2/GRO2、CXCL3/GRO3、CXCL4/PF-4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL9/MIG、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15、CXCL16、CXCL17/DMC、CCL1、CCL2/MCP-1、CCL3/M

40

50

IP - 1、CCL4/MIP - 1、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP - 3、CCL8/MCP - 2、CCL9/CCL10、CCL11/エオタキシン、CCL12/MCP - 5、CCL13/MCP - 4、CCL14/HCC - 1、CCL15/MIP - 5、CCL16/LEC、CCL17/TARC、CCL18/MIP - 4、CCL19/MIP - 3、CCL20/MIP - 3、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF1、CCL24/エオタキシン - 2、CCL25/TECK、CCL26/エオタキシン - 3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CL1、CL2、及びCX<sub>3</sub>CL1などの少なくとも1つのケモカインの存在又はレベルを試料中で決定する。特定のさらなる態様において、レプチン、アディポネクチン、レズスチン、活性又は総プラスミノゲン活性化抑制因子1 (PAI - 1)、ビスファチン及びレチノール結合タンパク質4 (RBP4)を含むが、これらに限定されない少なくとも1つのアディポサイトカインの存在又はレベルを試料中で決定する。TNF - 、IL - 6、IL - 1、IFN - 及び/又はIL - 10の存在又はレベルを決定することが好ましい。

10

#### 【0166】

[0181]特定の例において、特定のサイトカインの存在又はレベルを、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースのアッセイなどのアッセイによりmRNA発現のレベルで検出する。特定の他の例において、特定のサイトカインの存在又はレベルを、例えば、免疫測定法 (例えば、ELISA) 又は免疫組織化学測定法を用いてタンパク質発現のレベルで検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のIL - 6、IL - 1又はTWEAKなどのサイトカインの存在又はレベルを決定するための適切なELISAキットは、例えば、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI)、BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA)、Invitrogen (Camarillo, CA)、Calbiochem (San Diego, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、QIAGEN Inc. (Valencia, CA)、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) 及び/又はBender MedSystems Inc. (Burlington, CA) から入手できる。

20

30

#### 【0167】

##### 2. 急性期タンパク質

[0182]試料中の1つ又は複数の急性期タンパク質の存在又はレベルの決定も本発明において有用である。急性期タンパク質は、炎症にตอบสนองして血漿濃度が増加する (正の急性期タンパク質) 又は減少する (負の急性期タンパク質) タンパク質のクラスである。このตอบสนองは、急性期反応と呼ばれている (急性期応答とも呼ばれている)。正の急性期タンパク質の例は、C反応性タンパク質 (CRP)、Dダイマータンパク質、マンノース結合タンパク質、アルファ1アンチトリプシン、アルファ1アンチキノトリプシン、アルファ2マクログロブリン、フィブリノゲン、プロトロンビン、第VII因子、フォンヴィレブランド因子、プラスミノゲン、補体因子、フェリチン、血清アミロイドP成分、血清アミロイドA (SAA)、オロソムコイド (アルファ1酸糖タンパク質、AGP)、セルロプラスミン、ハプトグロビン及びそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。負の急性期タンパク質の例は、アルブミン、トランスフェリン、トランスチレチン、トランスコルチン、レチノール結合タンパク質及びそれらの組合せを含むが、これらに限定されない。CRP及び/又はSAAの存在又はレベルを決定することが好ましい。

40

#### 【0168】

[0183]特定の例において、特定の急性期タンパク質の存在又はレベルを、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースのアッセイなどのアッセイによりmRNA発

50

現のレベルで検出する。特定の例において、特定の急性期タンパク質の存在又はレベルを、例えば、免疫測定法（例えば、ELISA）又は免疫組織化学測定法を用いてタンパク質発現のレベルで検出する。例えば、Alpco Diagnostics (Salem, NH) から入手できるサンドイッチ比色ELISAアッセイは、血清、血漿、尿又は糞便試料中のCRPのレベルを測定するために用いることができる。同様に、Biomedical Corporation (Foster City, CA) から入手できるELISAキットは、試料中のCRPレベルを検出するために用いることができる。試料中のCRPのレベルを測定する他の方法は、例えば、米国特許第6,838,250号及び第6,406,862号並びに米国特許出願公開第20060024682号及び第20060019410号に記載されている。CRPのレベルを測定するさらなる方法は、例えば、免疫比濁法、迅速免疫拡散法及び可視凝集アッセイを含む。血清、血漿、唾液、尿又は糞便などの試料中のSAAの存在又はレベルを決定するための適切なELISAキットは、例えば、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Abazyme (Needham, MA)、USCN Life (Missouri City, TX) 及び/又はU.S. Biological (Swampscott, MA) から入手できる。

10

#### 【0169】

[0184] C反応性タンパク質（CRP）は、炎症に応答して血液中に見いだされるタンパク質（急性期タンパク質）である。CRPは、一般的に肝臓及び脂肪細胞（脂肪細胞（adipocytes））により産生される。CRPは、タンパク質のペントラキシンファミリーのメンバーである。ヒトCRPポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_000558に示されている。ヒトCRP mRNA（コーディング）配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_000567に示されている。当業者は、CRPがPTX1、MGC88244及びMGC149895としても公知であることを理解する。

20

#### 【0170】

[0185] 血清アミロイドA（SAA）タンパク質は、血漿中の高密度リポタンパク質（HDL）と結合するアポリポタンパク質のファミリーである。SAAの種々のアイソフォームが、異なるレベルで構成的に（構成性SAA<sub>s</sub>）又は炎症性刺激に応答して（急性期SAA<sub>s</sub>）発現する。これらのタンパク質は、主として肝臓により産生される。無脊椎動物及び脊椎動物にわたってこれらのタンパク質が保存されていることから、SAA<sub>s</sub>がすべての動物において極めて本質的な役割を果たしていることが示唆される。急性期血清アミロイドAタンパク質（A-SAA<sub>s</sub>）は、炎症の急性期において分泌される。ヒトSAAポリペプチド配列は、例えば、Genbank受託番号NP\_000322に示されている。ヒトSAA mRNA（コーディング）配列は、例えば、Genbank受託番号NM\_000331に示されている。当業者は、SAAがPIG4、TP53I4、MGC111216及びSAA1としても公知であることを理解する。

30

#### 【0171】

### 3. 細胞接着分子（IgSF CAMs）

[0186] 試料中の1つ又は複数の免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子の存在又はレベルの決定も本発明において有用である。本明細書で用いているように、「免疫グロブリンスーパーファミリー細胞接着分子（IgSF CAM）」という用語は、1つ又は複数の免疫グロブリン様フォールドドメインを有し、細胞間接着及び/又はシグナル伝達において機能する細胞表面上にある様々なポリペプチド又はタンパク質のいずれかを含む。多くの場合において、IgSF CAMsは、膜貫通タンパク質である。IgSF CAMsの非限定的な例は、神経細胞接着分子（NCAMs、例えば、NCAM-120、NCAM-125、NCAM-140、CAM-145、CAM-180、CAM-185等）、細胞間接着分子（ICAMs、例えば、ICAM-1、ICAM-2、ICAM-3、ICAM-4及びICAM-5）、血管細胞接着分子1（VCAM-1）、血小板内皮細胞接着分子1（PECAM-1）、L1細胞接着分子（L1CAM）、L1CA

40

50

Mとの相同性を有する細胞接着分子(L1の近縁相同体)(CHL1)、シアル酸結合Ig様レクチン(SIGLECs、例えば、SIGLEC-1、SIGLEC-2、SIGLEC-3、SIGLEC-4等)、ネクチン(例えば、ネクチン1、ネクチン2、ネクチン3等)並びにネクチン様分子(例えば、Nec1-1、Nec1-2、Nec1-3、Nec1-4及びNec1-5)を含む。好ましくは、ICAM-1及び/又はVCAM-1の存在又はレベルを決定する。

#### 【0172】

[0187] ICAM-1は、白血球及び内皮細胞の膜に低濃度で持続的に存在する膜貫通細胞接着タンパク質である。サイトカイン刺激時に、濃度が著しく増加する。ICAM-1は、IL-1及びTNFにより誘導することができ、血管内皮、マクロファージ及びリンパ球により発現される。IBDにおいて、炎症性サイトカインが、ICAM-1及びVCAM-1などの接着分子の発現を上方制御することにより炎症を引き起こす。接着分子の発現が増大することで、感染組織により多くのリンパ球が動員され、組織の炎症がもたらされる(Gokeら、J. Gastroenterol.、32巻、480頁(1997年)及びRijckenら、Gut、51巻、529頁(2002年)参照)。ICAM-1は、細胞内接着分子1遺伝子(ICAM1; Entrez Gene ID: 3383; Genbank 受託番号NM\_000201)によりコードされ、細胞内接着分子1前駆体ポリペプチド(Genbank 受託番号NP\_000192)の処理後に生成される。

10

#### 【0173】

[0188] VCAM-1は、血管内皮へのリンパ球、単球、好酸球及び好塩基球の接着を媒介する膜貫通細胞接着タンパク質である。サイトカインによる内皮細胞におけるVCAM-1の上方制御は、遺伝子転写の増大(例えば、腫瘍壊死因子アルファ(TNF)及びインターロイキン1(IL-1)に回答して)の結果として起こる。VCAM-1は、血管細胞接着分子1遺伝子(VCAM1; Entrez Gene ID: 7412)によりコードされ、転写物(Genbank 受託番号NM\_001078(変異体1)又はNM\_080682(変異体2))の差別的スプライシング及び前駆体ポリペプチドスプライスアイソフォーム(Genbank 受託番号NP\_001069(アイソフォームa)又はGenbank 受託番号NP\_542413(アイソフォームb))のプロセッシングの後に生成される。

20

30

#### 【0174】

[0189] 特定の例において、IgSF CAMの存在又はレベルを、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースのアッセイなどのアッセイによりmRNA発現のレベルで検出する。特定の例において、IgSF CAMの存在又はレベルを、例えば、免疫測定法(例えば、ELISA)又は免疫組織化学測定法を用いてタンパク質発現のレベルで検出する。組織試料、生検材料、血清、血漿、唾液、尿又は糞便などの試料中のICAM-1及び/又はVCAM-1の存在又はレベルを決定するための適切な抗体及び/又はELISAキットは、Invitrogen(Camarillo, CA)、Santa Cruz Biotechnology, Inc.(Santa Cruz, CA)及び/又はAbcam Inc.(Cambridge, MA)から入手できる。

40

#### 【0175】

##### H. 診断モデル

[0190] 本発明のいくつかの実施形態において、診断モデルは、IBSの臨床サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートを用いて確立する。いくつかの例において、診断モデルは、酸化ストレススコア、マスト細胞スコア、セロトニンスコア、BAMスコア、マイクロバイオームスコア及び炎症スコアを含む。診断モデルは、IBSを有する個体及び健常対照に関する後ろ向きデータを統計アルゴリズムに適用することにより得られる。いくつかの実施形態において、酸化ストレススコアは、後ろ向きコホートにおいて測定された1つ又は複数のキヌレンンマーカーのレベルにロジスティック回帰分析を適用することにより得られる。いくつかの実施形態において、マスト細胞スコアは、

50

後ろ向きコホートにおいて測定された1つ又は複数のマスト細胞マーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することにより得られる。いくつかの実施形態において、セロトニンスコアは、後ろ向きコホートにおいて測定された1つ又は複数のセロトニンマーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することにより得られる。いくつかの実施形態において、胆汁酸吸収不良スコアは、後ろ向きコホートにおいて測定された1つ又は複数の胆汁酸吸収不良マーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することにより得られる。いくつかの実施形態において、マイクロバイームスコアは、後ろ向きコホートにおいて測定された1つ又は複数の細菌抗原抗体マーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することにより得られる。いくつかの実施形態において、炎症スコアは、後ろ向きコホートにおいて測定された1つ又は複数の炎症性マーカのレベルにロジスティック回帰分析を適用することにより得られる。例えば、診断モデルは、キヌレニンマーカ、マスト細胞マーカ、セロトニンマーカ、BAMマーカ、細菌抗原抗体マーカ及び炎症マーカの後ろ向きデータをロジスティック回帰機械学習アルゴリズムと組み合わせて用いて得られた。

10

20

30

40

50

#### 【0176】

##### I. 統計解析

[0191]特定の例において、統計アルゴリズム又は統計解析は、学習統計分類子システムである。1つの態様において、アルゴリズムは、既知試料を用いて訓練し、その後、特性が既知である試料を用いて検証することができる。本明細書で用いているように、「学習統計分類子システム」という用語は、複合データセット（例えば、対象のマーカのパネル及び/又はIBS関連症状のリスト）に適応し、そのようなデータセットに基づいて決定を下すことができる機械学習アルゴリズム技術を含む。学習統計分類子システムは、ランダムフォレスト(RF)、分類及び回帰木(C&RT)、ブースト木、ニューラルネットワーク(NN)、サポートベクターマシン(SVM)、一般カイ二乗自動相互作用検出器モデル、相互作用木、多変量適応型回帰スプライン、機械学習分類子並びにその組合せからなる群から選択することができる。学習統計分類子システムは、木に基づく統計アルゴリズム（例えば、RF、C&RT等）及び/又はNN（例えば、人工NN等）であることが好ましい。本発明に用いるのに適する学習統計分類子システムのさらなる例は、米国特許出願公開第2008/0085524号、第2011/0045476号及び第2012/0171672号に記載されている。特定の実施形態において、方法は、対象からの試料をIBS試料又は非IBS試料（例えば、健常対照からの試料）と分類するステップを含む。

#### 【0177】

[0192]特定の例において、統計アルゴリズムは、単一学習統計分類子システムである。単一学習統計分類子システムは、RF又はC&RTなどの木に基づく統計アルゴリズムを含むことが好ましい。非限定的な例として、単一学習統計分類子システムは、予測若しくは確率値並びに単独での又は少なくとも1つの症状の存在若しくは重症度（すなわち、症状プロファイル）と組み合わせた、少なくとも1つの診断マーカの存在又はレベル（すなわち、細菌抗原抗体マーカプロファイル及び/又はマスト細胞マーカプロファイル）に基づいて試料をIBS試料又は非IBS試料（例えば、健常対照）と分類するために用いることができる。単一学習統計分類子システムの使用により、感度、特異度、正の予測値、負の予測値及び/又は少なくとも75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の全体の精度で試料がIBS試料と一般的に分類される。したがって、IBS試料又は非IBS試料としての試料の分類は、対象におけるIBSの診断を補助するのに有用である。

#### 【0178】

[0193]特定の他の例において、統計アルゴリズムは、少なくとも2つの学習統計分類子システムの組合せである。学習統計分類子システムの組合せは、例えば、相前後して又は

並行して用いられるRF及びNNを含むことが好ましい。非限定的な例として、RFを最初に用いて、単独での又は症状プロファイルと組み合わせた、診断マーカープロファイルに基づいて予測又は確率値を作出することができ、NNを次に用いて、予測又は確率値及び同じ若しくは異なる診断マーカープロファイル又はプロファイルの組合せに基づいて試料をIBS試料又は非IBS試料と分類することができる。本発明のハイブリッドRF/NN学習統計分類子システムは、試料を感度、特異度、正の予測値、負の予測値及び/又は少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の全体の精度で試料をIBS試料と分類することが有利である。特に好ましい実施形態において、統計アルゴリズムは、ランダムフォレスト分類子又はランダムフォレスト分類子及びニューラルネットワーク分類子の組合せである。

#### 【0179】

[0194]いくつかの例において、学習統計分類子システム又は複数の学習統計分類子システムを用いることにより得られたデータは、処理アルゴリズムを用いて処理することができる。そのような処理アルゴリズムは、例えば、多層パーセプトロン、バックプロパゲーションネットワーク及びレベンバーグ-マーカート(Levenberg-Marquardt)アルゴリズムからなる群から選択することができる。他の例において、並行又は連続式などの、そのような処理アルゴリズムの組合せを用いることができる。

#### 【0180】

[0195]本明細書に記載の種々の統計学的方法及びモデルは、健常者及びIBS患者からの試料のコホートを用いて訓練し、試験することができる。例えば、医師により、好ましくは胃腸病専門医により、例えば、米国特許出願公開第2010/0094560号に記載されているように生検、結腸鏡検査法又は免疫測定法を用いてIBS又はその臨床サブタイプを有すると診断された患者からの試料は、本発明の統計学的方法及びモデルを訓練し、試験するのに用いるのに適している。IBSを有すると診断された患者からの試料は、例えば、米国特許第8,463,553号並びに米国特許出願公開第2010/0094560号及び第2008/0085524号に記載されているように免疫測定法を用いてIBSサブタイプに層別化することもできる。健常者からの試料は、IBS試料と同定されなかったものを含み得る。当業者は、本発明の統計学的方法及びモデルを訓練し、試験するのに用いることができる患者試料のコホート得るためのさらなる手法及び診断基準について知っている。

#### 【0181】

##### J. セリアック病(CD)を予測する方法

[0196]いくつかの実施形態において、対象からの試料を分析して、それがセリアック病試料であるか又は非セリアック病試料であるかを判定する。それが非セリアック病試料であると予測される場合、次のモジュールに進み、試料が炎症性腸疾患(IBD)試料であるか又は非IBD試料であるかを判定する。

#### 【0182】

[0197]いくつかの実施形態において、試料がCD試料であるか又は非CD試料であるかを判定する方法は、抗グリアジンIgA抗体、抗グリアジンIgG抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ(tTG)抗体、抗筋内膜抗体(EMA)及びそれらの組合せなどであるが、これらに限定されない、1つ又は複数のCDマーカーのレベルを測定するステップを含む。他の実施形態において、本方法は、以下のCDマーカーのそれぞれのレベルを測定するステップを含む：抗グリアジンIgA抗体、抗グリアジンIgG抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ(tTG)抗体及び抗筋内膜抗体(EMA)。

#### 【0183】

[0198]特定の例において、CDのマーカーの有無を免疫測定法又は免疫組織化学測定法を用いて判定する。本発明の方法に用いるのに適する免疫測定法の非限定的な例は、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)を含む。本発明の方法に用いるのに適する免疫組織化

学測定法の例は、直接蛍光抗体測定法、間接蛍光抗体（IFA）測定法、抗補体免疫蛍光測定法及びアビジン - ビオチン免疫蛍光測定法などの免疫蛍光測定法を含むが、これらに限定されない。他の種類の免疫組織化学測定法は、免疫ペルオキシダーゼ測定法を含む。抗グルテン抗体、抗tTG抗体及び抗筋内膜抗体の有無は、免疫測定法（例えば、ELISA）又は免疫組織化学測定法（例えば、IFA）を用いてそれぞれ独立に判定することが好ましい。

【0184】

[0199]いくつかの実施形態において、CD又は非CDを有する対象の同定は、統計アルゴリズムと組み合わせたCDのマーカーの有無に基づいている。有用な統計アルゴリズムの詳細な説明は、上文に記載されている。

10

【0185】

[0200]いくつかの実施形態において、EMA及び抗tTG抗体の存在は、CDを予測するものである。他の実施形態において、抗グリアジンIgA抗体及び抗グリアジンIgG抗体の非存在下でのEMA又は抗tTG抗体の存在は、CDを予測するものである。他の実施形態において、EMA及び抗tTG抗体の非存在下での抗グリアジンIgA抗体又は抗グリアジンIgG抗体の存在は、非CDを予測するものである。いくつかの実施形態において、EMA、抗tTG抗体、抗グリアジンIgA抗体及び抗グリアジンIgG抗体の非存在は、非CDを予測するものである。

【0186】

[0201]対象の試料が非CDであると判定される場合、試料をIBDモジュールにおいて分析して、それが炎症性腸疾患試料（IBD）であるか又は非IBD試料であるかを予測する。

20

【0187】

K. 炎症性腸疾患（IBD）を予測する方法

[0202]いくつかの実施形態において、試料がIBD試料であるか又は非IBD試料であるかどうかを判定する方法は、抗好中球細胞質抗体（ANCA）、抗サッカロミセス・セレピシエ免疫グロブリンA（ASCA-IgA）、抗サッカロミセス・セレピシエ免疫グロブリンG（ASCA-IgG）、抗外膜タンパク質C（抗OmpC）抗体、抗フラジェリン抗体、核周囲抗好中球細胞質抗体（pANCA）、抗I2抗体、抗Fla2抗体、抗Flax抗体、抗Cbir抗体、ICAM-1、VCAM-1、VEGF、C反応性タンパク質（CRP）、SAA及びそれらの組合せなどであるが、これらに限定されない、1つ又は複数のIDBマーカーのレベルを測定するステップを含む。さらなるIDBマーカーは、ラクトフェリン、抗ラクトフェリン抗体、エラスターゼ、カルプロテクチン、ヘモグロビン、NOD2/CARD15及びそれらの組合せを含む。他の実施形態において、本方法は、遺伝マーカーATG16L1、ECM1、NKX2-3及びSTAT3のそれぞれの遺伝子型を決定するステップも含む。いくつかの例において、遺伝マーカーのそれぞれを遺伝子型判定するステップは、ATG16L1のrs2241880、ECM1のrs3737240、NKX2-3のrs10883365及び/又はSTAT3のrs744166などの、遺伝マーカーのそれぞれにおける一塩基多形（SNP）の有無を検出することを含む。

30

40

【0188】

[0203]特定の例において、少なくとも1つのマーカーの存在又はレベルを免疫測定法又は免疫組織化学測定法を用いて決定する。本発明の方法に用いるのに適する免疫測定法の非限定的な例は、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）を含む。本発明の方法に用いるのに適する免疫組織化学測定法の例は、直接蛍光抗体測定法、間接蛍光抗体（IFA）測定法、抗補体免疫蛍光測定法及びアビジン - ビオチン免疫蛍光測定法などの免疫蛍光測定法を含むが、これらに限定されない。他の種類の免疫組織化学測定法は、免疫ペルオキシダーゼ測定法を含む。

【0189】

[0204]炎症性腸疾患を予測する方法の詳細な説明は、その開示がすべての目的のために

50

参照により本明細書に組み込まれる、例えば、米国特許第7,873,479号、第8,315,818号及び第8,715,943号並びに米国特許出願公開第2013/0225439号に見いだされる。

【実施例】

【0190】

IV. 実施例

[0205]以下の実施例は、請求の範囲に記載されている発明を例示するために提示するが、限定するものではない。

【0191】

実施例1. 過敏性腸症候群 (IBS) を予測するための診断方法

[0206] IBSは、病態生理の広範な組合せを伴う異種性疾患である。IBSを正確に診断するためには、以下の7つのクラスのバイオマーカーのレベルを評価することが必要である：炎症性腸疾患バイオマーカー（例えば、ANCA、ASCA、Cbir1、Flax等）、マスト細胞マーカー（例えば、トリプターゼ、PGE2及びヒスタミン）、マイクロバームマーカー（例えば、Fla1、Fla2、FlaA、FliaC、FliaC2、FliaC3、EcFliaC、Ec0FliaC、SeFliaB、CjFliaA、CjFliaB、SfFliaC、CjCgtA、Cjdmh、CjGT-A、EcYidX、EcEra、EcFrvX、EcGabt、EcYedK、EcYabN、EcYhgN、RtMaga、RbCpaF、RgPild、LaFrc、LaEno、LjEftu、BfOmpA、PrOmpA、Cp10bA、CpSpA、EfSant、LmOsp、SfET-2、Cpatox、Cpbtox等に対する抗体）、キヌレニン経路のマーカー（例えば、KA、3-OHK、QA及び3-OHAA）、セロトニン経路のマーカー（例えば、5-HT、3-HIAA、5-HTP及び3-HK）、胆汁酸吸収不良経路のマーカー（例えば、7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン及びFGF19）並びに炎症マーカー（例えば、CRP、ICAM、VCAM、SAA等）。

【0192】

[0207]この実施例では、いくつかの診断バイオマーカーモジュールのバイオマーカースコアに基づいて個体におけるIBSを予測する方法を例示する。図5を参照のこと。各スコアは、個体からの試料中の少なくとも1つのバイオマーカーの存在又はレベル（例えば、濃度）からアルゴリズムの適用により得られる。IBSの診断方法は、IBDを非IBDと対比して予測するための統計アルゴリズム（例えば、決定木法又はランダムフォレストアルゴリズム）に基づくIBSスコアを計算するために少なくとも6つのバイオマーカーモジュールからの測定を用いるものである。

【0193】

[0208]第1のランダムモデルを用いて、患者の試料がセリアック病 (CD) 試料であるか又は非セリアック病試料であるかを判定する (105)。スコアがCD対非CDカットオフより高い (大きい) 場合、試料は、CDを有する患者からのもの、すなわち、CD試料であると予測される (108)。そうでない場合は、試料は、非CDである患者からのものであると予測される (110)。非CD試料は、アルゴリズムの次のステップ、例えば、IBD対非IBDを予測するステップ (120) に進む。CDスコアは、抗グリアジンIgA抗体、抗グリアジンIgG抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ (tTG) 抗体及び抗筋内膜抗体などのCDマーカーの測定結果を利用した。

【0194】

[0209]他のランダムモデルを用いて、患者の試料がIBD試料であるか又は非IBD試料であるかを判定する (120)。炎症性腸疾患 (IBD) スコアは、ANCA、ASCA-A、ASCA-G、Flax、Fla2、pANCA、OmpC、Cbir1及びそれらの組合せなどの血清学マーカーの測定結果を用いるものである。スコアがIBD対非IBDカットオフより高い (大きい) 場合、試料は、IBDを有する患者からのもの、すなわち、IBD試料であると予測される (123)。そうでない場合は、試料は、非IBDである患者からのものであると予測される (125)。

10

20

30

40

50

## 【0195】

[0210]非IBDであると予測された試料は、IBSを決定するようにデザインされた決定木又はルールセットである、アルゴリズムの次のステップに進む(130)。IBSルールは、キヌレニン(140)、マスト細胞(150)、セロトニン(160)、胆汁酸吸収不良(170)、マイクロバイーム(180)及び炎症モジュール(190)を含む、6つのバイオマーカーモジュールの1つ又は複数に基づいている。酸化ストレススコア(145)は、キヌレニン経路、トリプトファン経路並びにその代謝物(例えば、キヌレニン(K)、キヌレン酸(KA)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-OHK又は3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-OHAA)、キノリン酸(QA)、アントラニル酸(AA)、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)及び3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)など)の測定結果を用いるものである。マスト細胞スコア(155)は、トリプターゼ、プロスタグランジンE2及びヒスタミンなどのマスト細胞マーカーのレベルに基づいている。セロトニンスコア(165)は、セロトニン経路並びにその代謝物(セロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、セロトニン-O-硫酸及びセロトニン-O-リン酸を含む)の測定結果を用いるものである。胆汁酸吸収不良(BAM)スコア(175)は、7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン及びFGF19などのBAMマーカーのレベル(例えば、濃度)から得られる。マイクロバイームスコア(185)は、Fla1、Fla2、FlaA、FliC、FluA、FluB、FluC、FluD、FluE、FluF、FluG、FluH、FluI、FluJ、FluK、FluL、FluM、FluN、FluO、FluP、FluQ、FluR、FluS、FluT、FluU、FluV、FluW、FluX、FluY、FluZ、FluAA、FluAB、FluAC、FluAD、FluAE、FluAF、FluAG、FluAH、FluAI、FluAJ、FluAK、FluAL、FluAM、FluAN、FluAO、FluAP、FluAQ、FluAR、FluAS、FluAT、FluAU、FluAV、FluAW、FluAX、FluAY、FluAZ、FluBA、FluBB、FluBC、FluBD、FluBE、FluBF、FluBG、FluBH、FluBI、FluBJ、FluBK、FluBL、FluBM、FluBN、FluBO、FluBP、FluBQ、FluBR、FluBS、FluBT、FluBU、FluBV、FluBW、FluBX、FluBY、FluBZ、FluCA、FluCB、FluCC、FluCD、FluCE、FluCF、FluCG、FluCH、FluCI、FluCJ、FluCK、FluCL、FluCM、FluCN、FluCO、FluCP、FluCQ、FluCR、FluCS、FluCT、FluCU、FluCV、FluCW、FluCX、FluCY、FluCZ、FluDA、FluDB、FluDC、FluDD、FluDE、FluDF、FluDG、FluDH、FluDI、FluDJ、FluDK、FluDL、FluDM、FluDN、FluDO、FluDP、FluDQ、FluDR、FluDS、FluDT、FluDU、FluDV、FluDW、FluDX、FluDY、FluDZ、FluEA、FluEB、FluEC、FluED、FluEE、FluEF、FluEG、FluEH、FluEI、FluEJ、FluEK、FluEL、FluEM、FluEN、FluEO、FluEP、FluEQ、FluER、FluES、FluET、FluEU、FluEV、FluEW、FluEX、FluEY、FluEZ、FluFA、FluFB、FluFC、FluFD、FluFE、FluFF、FluFG、FluFH、FluFI、FluFJ、FluFK、FluFL、FluFM、FluFN、FluFO、FluFP、FluFQ、FluFR、FluFS、FluFT、FluFU、FluFV、FluFW、FluFX、FluFY、FluFZ、FluGA、FluGB、FluGC、FluGD、FluGE、FluGF、FluGG、FluGH、FluGI、FluGJ、FluGK、FluGL、FluGM、FluGN、FluGO、FluGP、FluGQ、FluGR、FluGS、FluGT、FluGU、FluGV、FluGW、FluGX、FluGY、FluGZ、FluHA、FluHB、FluHC、FluHD、FluHE、FluHF、FluHG、FluHH、FluHI、FluHJ、FluHK、FluHL、FluHM、FluHN、FluHO、FluHP、FluHQ、FluHR、FluHS、FluHT、FluHU、FluHV、FluHW、FluHX、FluHY、FluHZ、FluIA、FluIB、FluIC、FluID、FluIE、FluIF、FluIG、FluIH、FluII、FluIJ、FluIK、FluIL、FluIM、FluIN、FluIO、FluIP、FluIQ、FluIR、FluIS、FluIT、FluIU、FluIV、FluIW、FluIX、FluIY、FluIZ、FluJA、FluJB、FluJC、FluJD、FluJE、FluJF、FluJG、FluJH、FluJI、FluJJ、FluJK、FluJL、FluJM、FluJN、FluJO、FluJP、FluJQ、FluJR、FluJS、FluJT、FluJU、FluJV、FluJW、FluJX、FluJY、FluJZ、FluKA、FluKB、FluKC、FluKD、FluKE、FluKF、FluKG、FluKH、FluKI、FluKJ、FluKK、FluKL、FluKM、FluKN、FluKO、FluKP、FluKQ、FluKR、FluKS、FluKT、FluKU、FluKV、FluKW、FluKX、FluKY、FluKZ、FluLA、FluLB、FluLC、FluLD、FluLE、FluLF、FluLG、FluLH、FluLI、FluLJ、FluLK、FluLL、FluLM、FluLN、FluLO、FluLP、FluLQ、FluLR、FluLS、FluLT、FluLU、FluLV、FluLW、FluLX、FluLY、FluLZ、FluMA、FluMB、FluMC、FluMD、FluME、FluMF、FluMG、FluMH、FluMI、FluMJ、FluMK、FluML、FluMN、FluMO、FluMP、FluMQ、FluMR、FluMS、FluMT、FluMU、FluMV、FluMW、FluMX、FluMY、FluMZ、FluNA、FluNB、FluNC、FluND、FluNE、FluNF、FluNG、FluNH、FluNI、FluNJ、FluNK、FluNL、FluNM、FluNO、FluNP、FluNQ、FluNR、FluNS、FluNT、FluNU、FluNV、FluNW、FluNX、FluNY、FluNZ、FluOA、FluOB、FluOC、FluOD、FluOE、FluOF、FluOG、FluOH、FluOI、FluOJ、FluOK、FluOL、FluOM、FluON、FluOO、FluOP、FluOQ、FluOR、FluOS、FluOT、FluOU、FluOV、FluOW、FluOX、FluOY、FluOZ、FluPA、FluPB、FluPC、FluPD、FluPE、FluPF、FluPG、FluPH、FluPI、FluPJ、FluPK、FluPL、FluPM、FluPN、FluPO、FluPP、FluPQ、FluPR、FluPS、FluPT、FluPU、FluPV、FluPW、FluPX、FluPY、FluPZ、FluQA、FluQB、FluQC、FluQD、FluQE、FluQF、FluQG、FluQH、FluQI、FluQJ、FluQK、FluQL、FluQM、FluQN、FluQO、FluQP、FluQQ、FluQR、FluQS、FluQT、FluQU、FluQV、FluQW、FluQX、FluQY、FluQZ、FluRA、FluRB、FluRC、FluRD、FluRE、FluRF、FluRG、FluRH、FluRI、FluRJ、FluRK、FluRL、FluRM、FluRN、FluRO、FluRP、FluRQ、FluRR、FluRS、FluRT、FluRU、FluRV、FluRW、FluRX、FluRY、FluRZ、FluSA、FluSB、FluSC、FluSD、FluSE、FluSF、FluSG、FluSH、FluSI、FluSJ、FluSK、FluSL、FluSM、FluSN、FluSO、FluSP、FluSQ、FluSR、FluSS、FluST、FluSU、FluSV、FluSW、FluSX、FluSY、FluSZ、FluTA、FluTB、FluTC、FluTD、FluTE、FluTF、FluTG、FluTH、FluTI、FluTJ、FluTK、FluTL、FluTM、FluTN、FluTO、FluTP、FluTQ、FluTR、FluTS、FluTT、FluTU、FluTV、FluTW、FluTX、FluTY、FluTZ、FluUA、FluUB、FluUC、FluUD、FluUE、FluUF、FluUG、FluUH、FluUI、FluUJ、FluUK、FluUL、FluUM、FluUN、FluUO、FluUP、FluUQ、FluUR、FluUS、FluUT、FluUU、FluUV、FluUW、FluUX、FluUY、FluUZ、FluVA、FluVB、FluVC、FluVD、FluVE、FluVF、FluVG、FluVH、FluVI、FluVJ、FluVK、FluVL、FluVM、FluVN、FluVO、FluVP、FluVQ、FluVR、FluVS、FluVT、FluVU、FluVV、FluVW、FluVX、FluVY、FluVZ、FluWA、FluWB、FluWC、FluWD、FluWE、FluWF、FluWG、FluWH、FluWI、FluWJ、FluWK、FluWL、FluWM、FluWN、FluWO、FluWP、FluWQ、FluWR、FluWS、FluWT、FluWU、FluWV、FluWW、FluWX、FluWY、FluWZ、FluXA、FluXB、FluXC、FluXD、FluXE、FluXF、FluXG、FluXH、FluXI、FluXJ、FluXK、FluXL、FluXM、FluXN、FluXO、FluXP、FluXQ、FluXR、FluXS、FluXT、FluXU、FluXV、FluXW、FluXX、FluXY、FluXZ、FluYA、FluYB、FluYC、FluYD、FluYE、FluYF、FluYG、FluYH、FluYI、FluYJ、FluYK、FluYL、FluYM、FluYN、FluYO、FluYP、FluYQ、FluYR、FluYS、FluYT、FluYU、FluYV、FluYW、FluYX、FluYY、FluYZ、FluZA、FluZB、FluZC、FluZD、FluZE、FluZF、FluZG、FluZH、FluZI、FluZJ、FluZK、FluZL、FluZM、FluZN、FluZO、FluZP、FluZQ、FluZR、FluZS、FluZT、FluZU、FluZV、FluZW、FluZX、FluZY、FluZZ

10

20

## 【0196】

[0211]試料がIBSルールのパターンに一致する場合、アルゴリズムは、試料がIBSであることを予測する。そうでない場合は、試料は、健常患者からのものであると予測される。言い換えれば、スコアがIBS対健常カットオフより低い場合、アルゴリズムは、試料が非IBSであると予測する。スコアがカットオフより大きい場合、アルゴリズムは、試料がIBSを有すると予測する。IBSスコアは、便秘型IBS(IBS-C)、下痢型IBS(IBS-D)、混合型IBS(IBS-M)、交替型IBS(IBS-A)又は感染後IBS(IBS-PI)試料として、試料を分類するためにも用いることができる。

30

## 【0197】

[0212]この方法は、IBDスコア、酸化ストレス(キヌレニン)スコア、マスト細胞スコア、セロトニンスコア、胆汁酸吸収不良(BAM)スコア、マイクロバイームスコア及び炎症スコアを含む種々のバイオマーカーモジュールからの発現データを集約して、標準化診断スケール又は参照テーブルと比較することができる予測指標(プロファイル、スコアなど)を得る。

40

## 【0198】

実施例2. マイクロバイームスコアの計算

[0213]この実施例では、IBSを示唆する予測的細菌抗原抗体バイオマーカー(例えば、マイクロバイームマーカー)を特定する方法を例示する。この実施例では、試料がIBSを有する患者からのものであるかどうかを判定するためにこれらのバイオマーカーを用いることができることも示す。さらに、本実施例では、マイクロバイームスコアを計算する方法を例示する。

50

## 【0199】

[0214]本試験では、健常対照及びIBS（例えば、IBS-D/M）を有すると診断された患者からの試料中の細菌抗原に対する抗体のレベルを測定した。細菌抗原抗体は、EcFliC、EcOFliC、SeFliB、CjFlaA、CjFlaB、SfFliC、CjCgtA、Cjdmh、CjGT-A、EcYidX、EcEra、EcFrvX、EcGabT、EcYedK、EcYabN、EcYhgN、RtMaga、RbCpaF、RgPilD、LaFrc、LaEno、LjEftu、BfOmpA、PrOmpA、Cp10bA、CpSpA、EfSant、LmOsp、SfET-2、Cpatox及びCpbtoxなどの細菌抗原に対する抗体を含んでいた。分析した約200の健常対照試料と200のIBS-D/M試料が存在した。少なくとも1つの炎症マーカー及び少なくとも1つのマスト細胞マーカーのレベルも測定した。バイオマーカーの存在又はレベル（例えば、濃度）は、PCRなどの増幅ベースのアッセイ、ELISA、競合ELISA、CEER（商標）若しくは免疫組織化学測定法などのハイブリダイゼーションアッセイ、又は分離クロマトグラフィー、HPLC若しくはHMSAなどの移動度アッセイなどの方法を用いて決定した。有用なアッセイの詳細な説明は、例えば、米国特許第8,278,057号及び第8,114,616号、米国特許出願公開第2012/0244558号及び第2012/0315630号に見いだされる。

10

## 【0200】

[0215]ロジスティック回帰モデルを用いて、健常対照とIBS患者の間で統計的に有意な差を示したマーカーを特定した。表2に結果を示す。

20

## 【表2】

表2.

	推定値	標準誤差	z値	Pr(> z )	
切片	1.6916	0.4957	3.4123	0.0006	***
CjFlaA	-1.1594	0.5771	-2.0091	0.0445	*
CjFlaB	0.8389	0.4305	1.9484	0.0514	.
CjGT.A	-0.7189	0.3188	-2.2549	0.0241	*
EcEra	3.9686	0.7035	5.6417	0.0000	***
EcGabT	-4.4100	0.7601	-5.8015	0.0000	***
EcOFliC	-1.5502	0.2244	-6.9073	0.0000	***
EcYbaN	2.8258	0.6672	4.2352	0.0000	***
SeFliB	-1.4180	0.5912	-2.3987	0.0165	*
SfFlic	1.0425	0.2151	4.8472	0.0000	***

30

40

## 【0201】

[0216]実行した1000の反復のうち、2/3は訓練セットのためであり、1/3は検証セットのためであった。図6Aに細菌抗原マーカー及び炎症マーカーを解析した場合の

50

ROC AUC (0.843)を示す。図6Bに細菌抗原マーカー、炎症マーカー及びマスト細胞マーカーを評価した場合のROC AUC (0.9)を示す。データから、少なくとも1つの炎症マーカーと組み合わせたマイクロバイームマーカーがIBSを予測するものであることがわかる。さらに、少なくとも1つのマスト細胞マーカーの追加も、健常対照と比してIBSを予測するものである。

【0202】

[0217]モデルアルゴリズムにおけるマーカーとバイオマーカークラスとの相互作用を理解するために、決定木を用いた。木の構築過程のステップは、1)例えば、最低p値により、IBS患者を健常対照と最もよく区別するマーカーを特定するステップと、2)IBS患者を健常対照と最もよく分離する(区別する)マーカーのカットオフ値を特定するステップと、次いで、決定木の次のノードに移り、ステップ1及び2を反復するステップとを含んでいた(図7)。

10

【0203】

[0218]マイクロバイームスコア及び百分位数スコアをIBSを有すると診断された患者及び健常対照について計算した。以下の細菌抗原に対する抗体のレベルを測定した: EcEra、EcFlc、EcFrvX、EcGabT、EcYedK、EcYbaN、EcOfliC、CjFlaA、CjFlaB、CjGTA、CjCgtA、Cjdmh、SeFljB及びSfFlc(図8A~8N)。

【0204】

[0219]重み付き四分位数和スコアを得ることにより、個々のスコアを計算した。すべてのマーカーについて健常対IBSなどの疾患状態のロジスティック回帰モデルを用いて、回帰係数又は勾配を算定した。正の勾配は、マーカーがIBSを予測することを示し、負の勾配は、マーカーが健常な状態を予測することを示す(それぞれ図9A及び9B)。係数は、他のマーカーの存在について調整した。健常対照を用いて、四分位数カットオフを得た(図9C)。各個体について、マイクロバイームスコア=解析したすべてのマーカーについての四分位数であり、は、疾患コホート間の回帰係数又は勾配を表す(図9C)。

20

【0205】

[0220]図10A及びBに健常対照コホートのマイクロバイームスコア(図10A)及びマイクロバイームスコア百分位数(図10B)のグラフを示す。グラフに対照コホートと比較して1例の代表的なIBS患者のマイクロバイームスコアも示す。

30

【0206】

[0221]図11A及びBに健常対照コホート及びIBS-D/M患者コホートのマイクロバイームスコア(図11A)及びマイクロバイームスコア百分位数(図11B)のグラフを示す。結果から、IBS-D/M患者が健常対照より高いマイクロバイームスコアを有することがわかる。

【0207】

[0222]マイクロバイームスコアを計算し、四分位数を作出するための本明細書で述べた方法は、他のモジュールスコア、例えば、IBDスコア、酸化ストレススコア、マスト細胞スコア、セロトニンスコア、BAMスコア及び炎症スコアを決定するための模範的なモデルとして用いることができる。

40

【0208】

実施例3. IBSの予測的マイクロバイームマーカー

[0223]この実施例では、マイクロバイームマーカー(例えば、細菌抗原に対する抗体)がIBSを予測するものであることを示す。この実施例は、健常対照及びIBS-D/Mを有する患者におけるバイオマーカーのレベルの比較を可能にするものである。

【0209】

[0224]健常対照及びIBS-D/Mを有する患者から血清試料を得て、表1に示す細菌抗原(上記参照)に対する抗体のレベルをELISA法を用いて測定した。

【0210】

50

[0225] マイクロバイオームマーカーを3例の患者コホート(#1~3)において分析した。コホート#1については、健常対照(n=295)とIBS-D/M患者(n=229)との対比で抗LaEno抗体(図12A)、抗LaFrc抗体(図12B)及び抗LjEFYu抗体(図12C)のレベルの差はなかった。抗BfOmpA抗体(図12D)のレベルも健常対照(n=96)とIBS患者(n=104)とで同様であった。抗PrOmpA抗体については、2群間に差があった(p<0.0232、図12E)。特に、IBS患者は、PrOmpAマーカーのより低いレベルを有していた。コホート#2については、抗EcGabT抗体(図13A)、抗EcEra抗体(図13B)、抗SfFl iC抗体(図13D)及び抗CjFl aB抗体(図13E)がIBS患者でより高かった。抗EcOFl iC(図13C)、抗CjFl aA(図13F)、抗EcFl iC(図13G)、抗RtMaga(図13H)、抗RgP iL D(図13I)、抗RbCpaF(図13J)抗体については、差は検出されなかった。健常対照又はIBS-C患者をIBS-D患者と比較した場合、抗RbCpaF抗体レベルの統計的差があった(図13K)。このマーカーに関して、IBS-D患者はより高いレベルを有していた。コホート#3については、両群は、抗CjFl aA(図14C)、抗EcFl iC(図14D)、抗EcGabT(図14E)及び抗EcEra(図14F)抗体の同様のレベルを有していた。抗SfFl iC抗体(図14A)、抗CjFl aB(図14B)及び抗EcOFl iC(図14G)抗体のレベルは、IBS患者において健常対照と比較して低かった。

10

【0211】

[0226] この実施例で、IBS患者を健常対照と区別するのにマイクロバイオームマーカー(例えば、細菌抗原に対する抗体)を用いることができることがわかる。したがって、これらのマーカーは、IBSを診断する方法に用いることができる。

20

【0212】

実施例4. IBS患者におけるセロトニン機能不全の検出

[0227] この実施例では、IBSを有する患者が健常対照と比較して高いセロトニンレベルであることを示す。セロトニンレベルは、その開示がすべての目的のためにその全体として参照により本明細書に組み込まれる、代理人整理番号が88473-909072-026620PCで、2014年5月22日に出願の「過敏性腸症候群診断の予測のための経路特異的アッセイ(Pathway Specific Assays for Predicting Irritable Bowel Syndrome Diagnosis)」と題するPCT出願に詳細に記載されているHPLC及び新規セロトニン競合ELISAを用いて測定した。

30

【0213】

[0228] 健常対照及び下痢型IBS(IBS-D)を有する患者の血清試料を入手し、誘導体化して、セロトニン及びその代謝物を安定化した。簡潔に述べると、50µlの試料を50µlの誘導体化ミックスとともに37℃で30分間インキュベートした。誘導体化ミックスは、0.1M CAPS緩衝液(pH11.0)、0.1M p-(アミノメチル)ベンジル化合物、0.05Mヘキサシアノ鉄(III)酸カリウム及びメタノールを10:11:22:23(体積:体積:体積:体積)の比率で含んでいた。誘導体化反応の後、試料をアセトニトリル(ACN)(例えば、1:2体積/体積血清:ACN)で除タンパクした。次いで、除タンパク試料を14000rpmで20分間遠心分離した。その後、それを0.2µmフィルターによりろ過し、次いで、逆相C18カラムであるHPLCカラムに注入した。方法については、移動相は、15mM酢酸ナトリウム、pH4.5を1mMオクタンスルホン酸、ナトリウム塩とともに含んでいた。勾配は、アセトニトリルを溶媒Bとして用いて発生させ、条件は以下の通りであった:0分に20%溶媒B、2分に26%溶媒B、12分に28%溶媒B、12.5分に80%溶媒B、14.5分に80%溶媒B、15分に0%溶媒B、16.5分に0%溶媒B、17.5分に20%溶媒B、及び20分に20%溶媒B。蛍光検出は、345nmの励起及び480nmの発光を用いた。誘導体化セロトニン及びその誘導体化代謝物は、HPLCにより検出され、分離された。特に、誘導体化5-HTP、3-HK、5-HT、5-HIAA及び5-HIが

40

50

別個の独立したピークに分解された(図15B)。

【0214】

[0229]セロトニンレベルは、IBS-D患者において健常対照と比較して高かった(図15A)。平均レベルは、IBS-Dで $55 \pm 10$  nMセロトニンであり、健常で $33 \pm 10$  nMセロトニンであった。四分位解析により、四分位数3(Q3)及び四分位数4(Q4)にある患者は、セロトニンの有意により高いレベル(それぞれ $64.9$  nM及び $140$  nM)を有していたことが明らかになった。健常対照と異なり、これらのIBS-D患者は、セロトニン機能不全(serotonin dysfunction)を示した。

【0215】

[0230]セロトニンレベルは、競合ELISAを用いることによっても測定した。ビオチニル化誘導体化セロトニン(例えば、Ser-D)類似体をストレプトアビジンプレートに被覆した。血清試料を上述のように誘導体化し、ウサギにおいて発現させた新規抗Ser-D抗体とともにインキュベートした(代理人整理番号が88473-909072-026620PCで、2014年5月22日に出願の「過敏性腸症候群診断の予測のための経路特異的アッセイ(Pathway Specific Assays for Predicting Irritable Bowel Syndrome Diagnosis)」と題するPCT出願を参照)。試料混合物をプレートに加え、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で数回洗浄した。ヤギ抗ウサギ抗体-HRPコンジュゲート溶液を加え、RTで1時間インキュベートした。プレートを洗浄緩衝液で数回洗浄した。発色基質を比色反応のために加え、プレートを $405$  nmで読み取る前に停止溶液を加えた。IBS-D患者のセロトニンレベルを図16Aに示す。IBS-D患者におけるセロトニンの平均量は、 $50 \pm 20$  nMであったのに対して、健常対照では $23 \pm 10$  nMであった(図16B)。四分位解析によっても四分位数3及び4にある患者が健常対照と比較して有意に高いレベルを有していたことが示された。ELISAデータは、HPLC法の所見を裏付けている。実験により、IBS-Dを有する患者がセロトニン機能不全を経験することが示されている。したがって、セロトニン及びその代謝物は、IBS-Dの予測指標としての役割を果たし得る。

【0216】

[0231]本明細書で引用したすべての刊行物及び特許出願は、各個別の刊行物又は特許出願が参照により明確且つ個別に示されたかのように、参照により本明細書に組み込まれる。理解を明確にする目的のために例示及び実施例により、前述の発明をある程度詳細に記載したが、添付の特許請求の範囲の精神又は範囲から逸脱することなく、それに対する特定の変更及び修正を行うことができることは、当業者には容易に明らかになる。

10

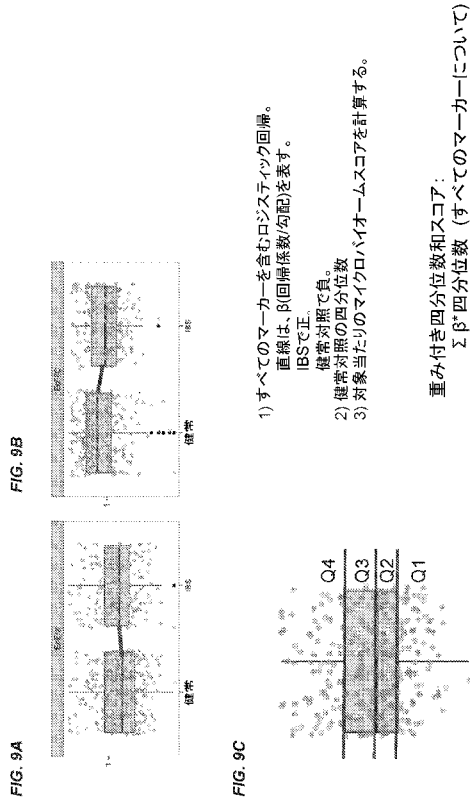
20

30

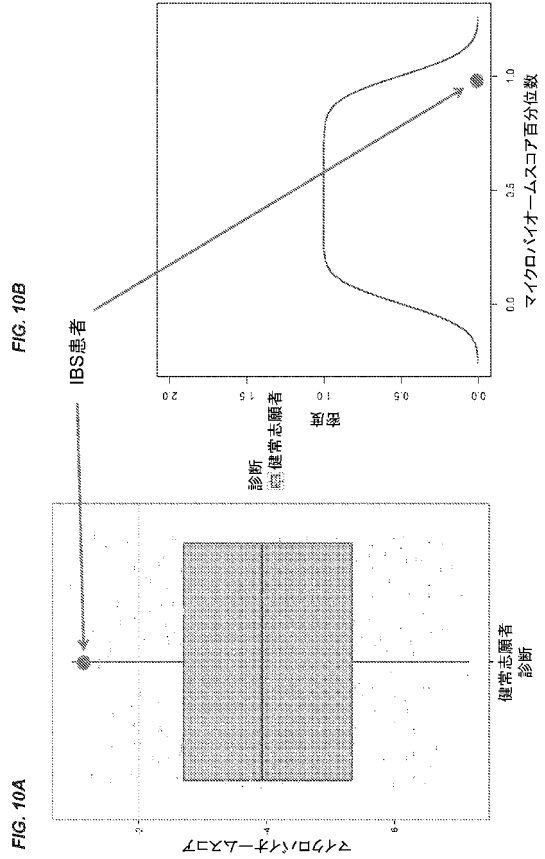




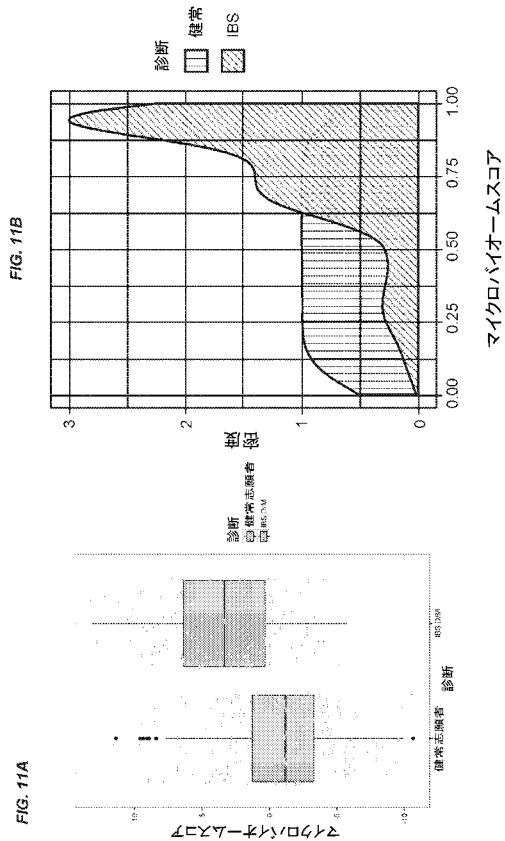
【 図 9 】



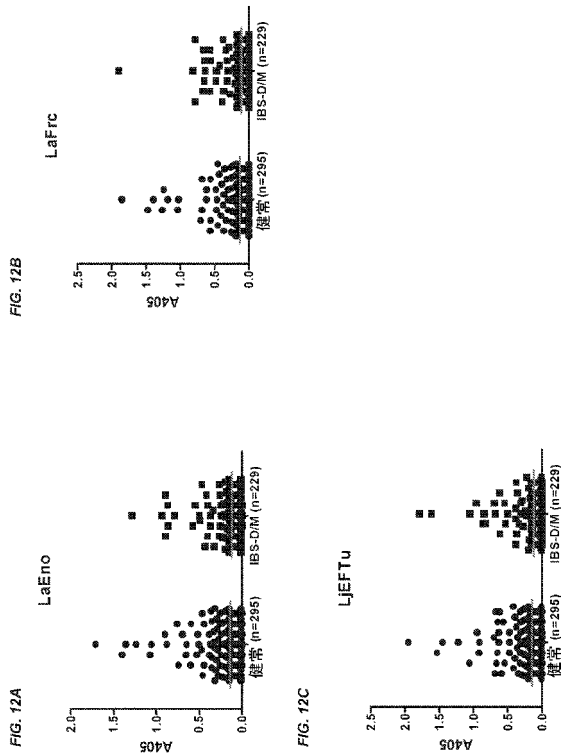
【 図 10 】



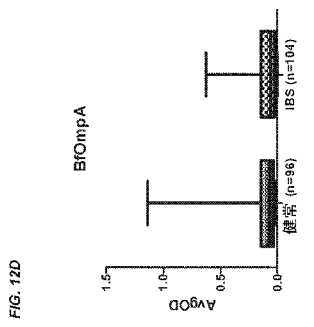
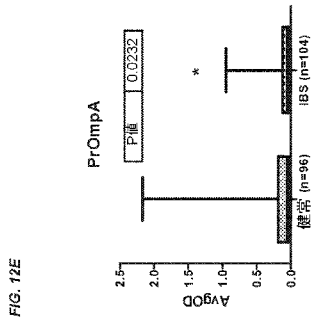
【 図 11 】



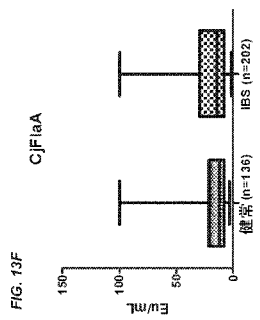
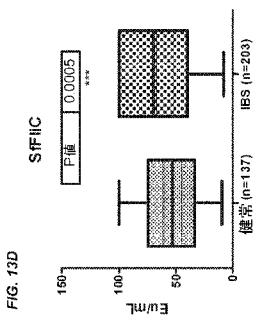
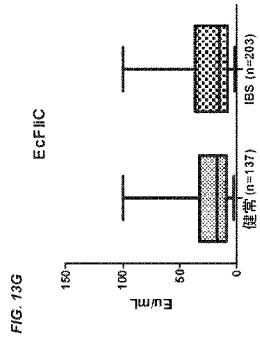
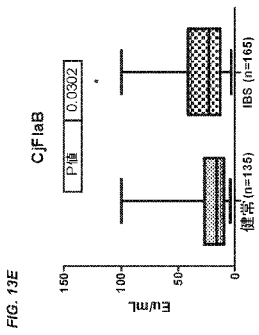
【 図 12 - 1 】



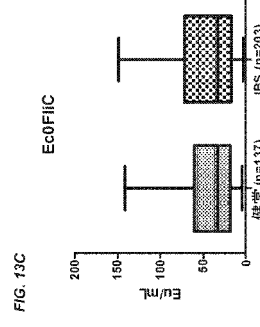
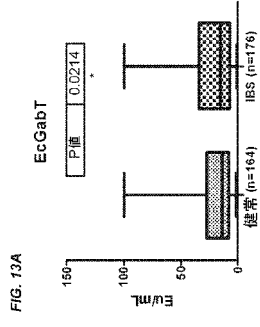
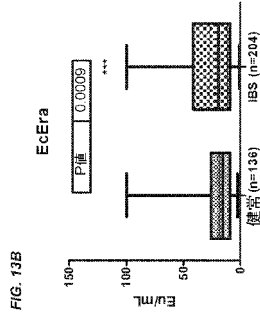
【 図 1 2 - 2 】



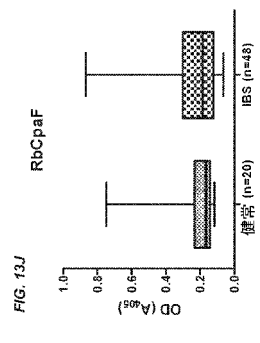
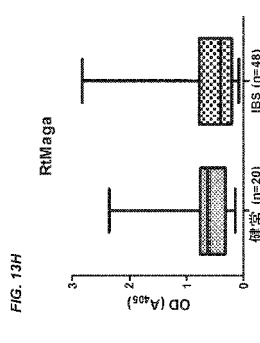
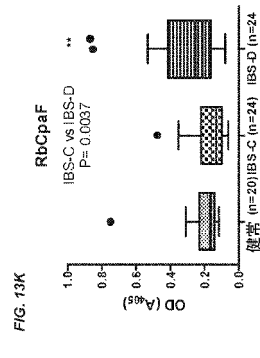
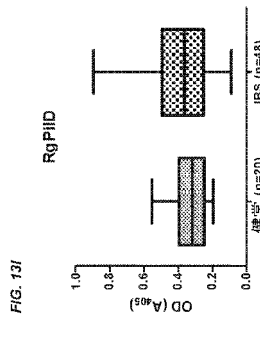
【 図 1 3 - 2 】



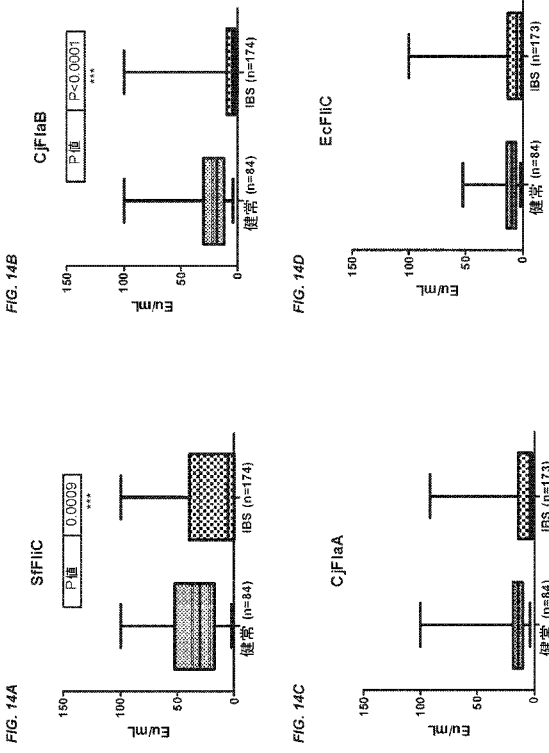
【 図 1 3 - 1 】



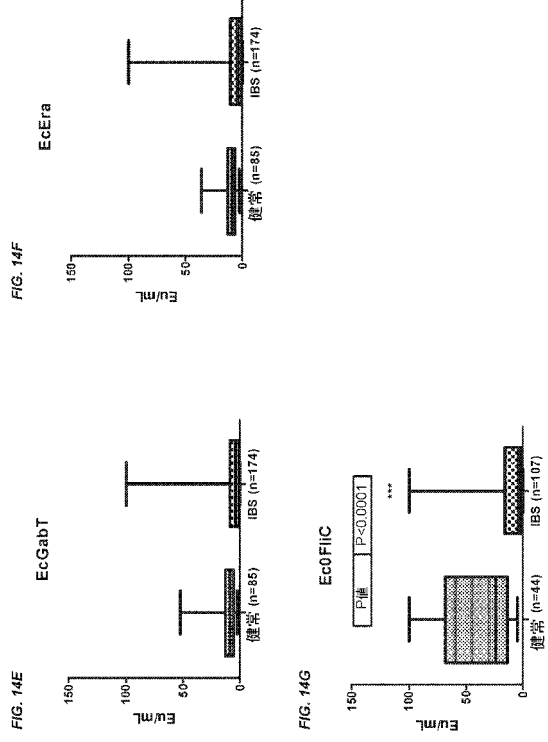
【 図 1 3 - 3 】



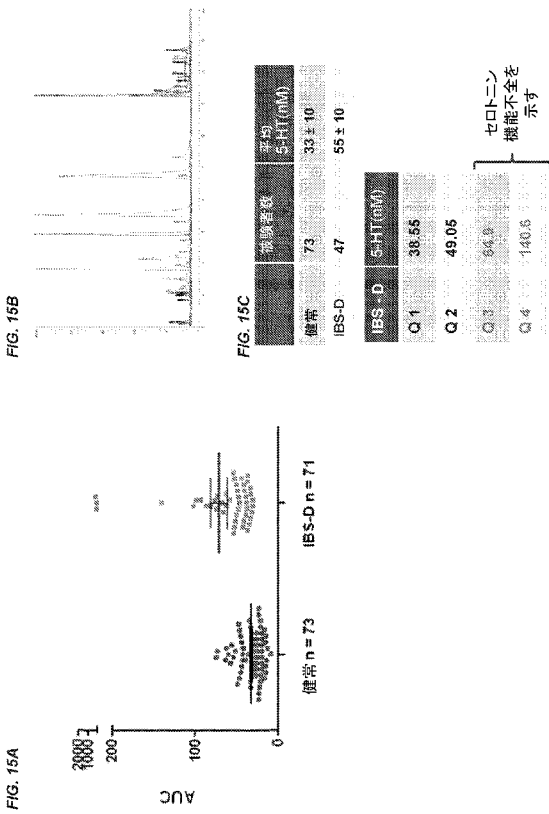
【 図 1 4 - 1 】



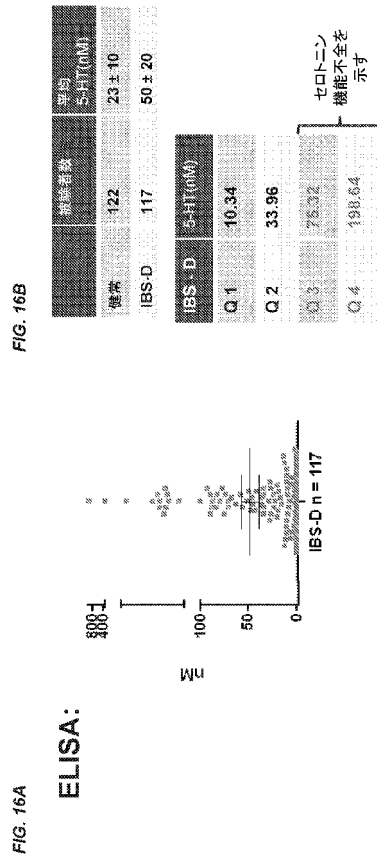
【 図 1 4 - 2 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



## 【手続補正書】

【提出日】令和1年7月2日(2019.7.2)

## 【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】

対象における過敏性腸症候群（IBS）及び/又はその臨床的サブタイプの診断を補助する方法であって、

以下の（a）～（f）のスコアの少なくとも2つを得るステップと：

（a）前記対象から得られた試料中の少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーのレベルを検出して、マイクロバイームスコアを得るステップ、

（b）前記試料中の少なくとも1つのマスト細胞マーカーのレベルを検出して、マスト細胞スコアを得るステップ、

（c）前記試料中の少なくとも1つの炎症性細胞マーカーのレベルを検出して、炎症スコアを得るステップ、

（d）前記試料中の少なくとも1つの胆汁酸吸収不良（BAM）マーカーのレベルを検出して、BAMスコアを得るステップ、

（e）前記試料中の少なくとも1つのキヌレニンマーカーのレベルを検出して、酸化ストレススコアを得るステップ、

（f）前記試料中の少なくとも1つのセロトニンマーカーのレベルを検出して、セロトニンスコアを得るステップ、

（g）前記マイクロバイームスコア、前記マスト細胞スコア、前記炎症スコア、前記BAMスコア、前記酸化ストレススコア及び前記セロトニンスコアの少なくとも2つに統計アルゴリズムを適用して、疾患スコアを得るステップと、

（h）疾患スコア、並びに、後向きコホートからのマイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア、セロトニンスコア及びこれらの組み合わせの少なくとも2つを含む診断モデルに基づいてIBSを有する確率を生成する統計アルゴリズムに基づいて、前記対象におけるIBSの診断を確定するステップと

を含む、方法。

## 【請求項2】

前記少なくとも1つの細菌抗原抗体マーカーが抗Fla1抗体、抗Fla2抗体、抗FlaA抗体、抗FlaC抗体、抗FlaC2抗体、抗FlaC3抗体、抗YBaN1抗体、抗ECFlaC抗体、抗EcOFlaC抗体、抗SeFljB抗体、抗CjFlaA抗体、抗CjFlaB抗体、抗SfFlaC抗体、抗CjCgtA抗体、抗Cjdmh抗体、抗CjGT-A抗体、抗EcYidX抗体、抗EcEra抗体、抗EcFrVX抗体、抗EcGabT抗体、抗EcYedK抗体、抗EcYbaN抗体、抗EcYhgN抗体、抗RtMaga抗体、抗RbCpaF抗体、抗RgPilD抗体、抗LaFrc抗体、抗LaEno抗体、抗LjEFTu抗体、抗BfOmpa抗体、抗PrOmpA抗体、抗Cp10bA抗体、抗CpSpA抗体、抗EfSant抗体、抗LmOsp抗体、抗SfET-2抗体、抗Cpatox抗体、抗Cpbtox抗体、抗EcSta2抗体、抗EcOStx2A抗体、抗CjcdtB/C抗体、抗CdtcdA/B抗体及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】

前記少なくとも1つのマスト細胞マーカーが -トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE2（PGE2）及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 4】**

前記少なくとも1つの炎症マーカーがCRP、ICAM、VCAM、SAA、GRO及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 5】**

前記少なくとも1つの胆汁酸吸収不良マーカーが7-ヒドロキシ-4-コレステレン-3-オン、FGF19及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記少なくとも1つのキヌレニンマーカーがキヌレニン(K)、キヌレン酸(KyA)、アントラニル酸(AA)、3-ヒドロキシキヌレニン(3-HK)、3-ヒドロキシアントラニル酸(3-HAA)、キサンツレン酸(XA)、キノリン酸、トリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン(5-HTP)及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記少なくとも1つのセロトニンマーカーがセロトニン(5-HT)、5-ヒドロキシインドール酢酸(5-HIAA)、セロトニン-O-硫酸、セロトニン-O-リン酸及びそれらの組合せからなる群から選択される、請求項1に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記診断モデルを、IBS及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートを用いて確立する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 9】**

前記診断モデルを、IBSの臨床サブタイプ及び健常対照の既知の転帰を使用する後ろ向きコホートを用いて確立する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 10】**

IBSの診断を、便秘型IBS(IBS-C)、下痢型IBS(IBS-D)、混合型IBS(IBS-M)、交替型IBS(IBS-A)又は感染後(IBS-PI)として分類するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

**【請求項 11】**

前記細菌抗原抗体マーカー、前記マスト細胞マーカー、前記炎症性細胞マーカー、前記BAMマーカー、前記キヌレニンマーカー又は前記セロトニンマーカーのレベルを、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースのアッセイ、免疫測定法、免疫組織化学測定法又は移動度アッセイにより独立に検出する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記ハイブリダイゼーションアッセイがELISA又はCEER(商標)アッセイを含む、請求項11に記載の方法。

**【請求項 13】**

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも3つのメンバーを測定する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 14】**

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも4つのメンバーを測定する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 15】**

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群から選択される少なくとも5つのメンバーを測定する、請求項1に記載の方法。

**【請求項 16】**

マイクロバイームスコア、マスト細胞スコア、炎症スコア、胆汁酸吸収不良スコア、酸化ストレススコア及びセロトニンスコアの群のすべてのメンバーを測定する、請求項1

に記載の方法。

【請求項 17】

前記少なくとも2つのメンバーが胆汁酸吸収不良スコア及びセロトニンスコアである、  
請求項1に記載の方法。

## フロントページの続き

- (72)発明者 ウェスティン, ステファン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サンディエゴ, フォレスト アベニュー 1301
- (72)発明者 セルヴァラジ, ファビヨラ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州, サンディエゴ, レン ブラッフ ドライヴ 9704
- (72)発明者 プリンセン, フレッド  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ラホーヤ, カークウッド プレイス 610
- (72)発明者 シン, シャラット  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州, ランチョ サンタフェ, トップ オブ ザ モーニン  
グ ウェイ 8171

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA02 DA17 DA35 DA36 DA37 FB02 FB03  
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR35 QR55  
QR62 QS25 QS34

【外国語明細書】

2019194600000001.pdf

专利名称(译)	诊断肠易激综合征的途径特异性标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019194600A</a>	公开(公告)日	2019-11-07
申请号	JP2019104805	申请日	2019-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	雀巢制品公司		
申请(专利权)人(译)	兴业德Purodeyui, 雀巢上课啊		
[标]发明人	ウエスティンステファン セルヴァラジファビヨラ プリンセンフレッド シンシャラット		
发明人	ウエスティン, ステファン セルヴァラジ, ファビヨラ プリンセン, フレッド シン, シャラット		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 G01N33/50 C12Q1/6813 C12Q1/6844		
CPC分类号	C07D495/04 C07D498/04 C07D519/00 C07K16/12 C07K16/26 G01N33/6893 G01N2800/065 C07K16/44 C07K2317/33 G01N33/6812 G01N33/942 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/68 G01N33/50.Z C12Q1/6813.Z C12Q1/6844.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA02 2G045/DA17 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/FB02 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS34		
代理人(译)	长谷川良树 池田 成人 小泉纯酒卷		
优先权	61/827506 2013-05-24 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

为了提供用于IBS诊断的生物标记物。解决方案：本发明提供一种用于辅助诊断个人肠易激综合症 (IBS) 的方法。特别地，本发明对于确定个体是否不患有乳糜泻或炎症肠病 (IBD) 并且具有IBS和/或其亚型是有用的。因此，本发明提供了IBS的准确诊断预测，并且对于指导治疗决策是有用的。选图：图5

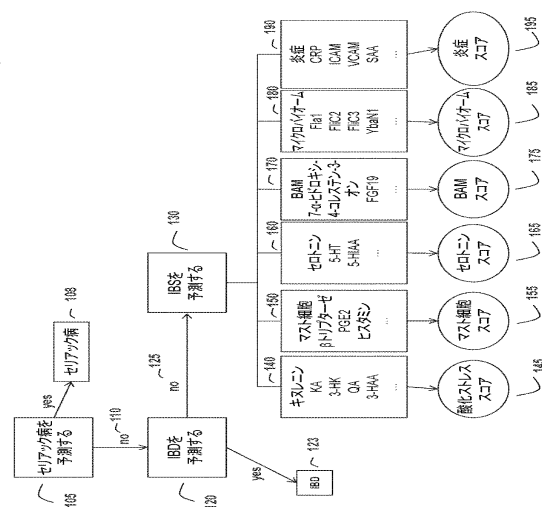


FIG. 5