

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6878284号
(P6878284)

(45) 発行日 令和3年5月26日 (2021.5.26)

(24) 登録日 令和3年5月6日 (2021.5.6)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31 Z N A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z
C 1 2 Q 1/6844 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6844 Z

請求項の数 9 (全 44 頁)

(21) 出願番号	特願2017-541052 (P2017-541052)	(73) 特許権者	519414848
(86) (22) 出願日	平成28年2月19日 (2016.2.19)		エボニック オペレーションズ ゲーエム ベーハー
(65) 公表番号	特表2018-508204 (P2018-508204A)		ドイツ連邦共和国 4 5 1 2 8 エッセン レリングハウザー シュトラーセ 1 - 1 1
(43) 公表日	平成30年3月29日 (2018.3.29)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/053502	(74) 代理人	110002538
(87) 国際公開番号	W02016/142146		特許業務法人あしたば国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成28年9月15日 (2016.9.15)	(72) 発明者	エメカ イグナティウス イグヴェ
審査請求日	平成31年2月12日 (2019.2.12)		ドイツ連邦共和国 8 0 3 3 3 ミュンヘン テレジエンシュトラーセ 1 2 0
(31) 優先権主張番号	62/129,293		
(32) 優先日	平成27年3月6日 (2015.3.6)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	15174270.7		
(32) 優先日	平成27年6月29日 (2015.6.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 鳥類壊死性腸炎を検出する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、体液あるいは身体からの排泄物から微小胞を単離するステップと、それに続いて、壊死性腸炎を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／または発現レベルを特定するステップとを含み、非感染の対照との比較における該少なくとも1種のマーカーの存在および／または発現レベルの増加が壊死性腸炎を示し、

前記マーカーが、以下の配列：

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号4に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号5に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

20

e) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号9に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号16に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

i) 配列番号10に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) 配列番号11に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

k) 配列番号12に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

20

l) 配列番号13に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

m) (a) から (l) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

n) (m) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

o) (a) から (n) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される、方法。

【請求項2】

30

壊死性腸炎の検出が、以下の配列：

a) 配列番号1の位置1から630のヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号3の位置600から1000のヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号4の位置60から240のヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

40

d) 配列番号5の位置1300から1800の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号7の位置1から591のヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8の位置240から540のヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号9の位置12から418のヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続

50

するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号 16 の位置 673 から 5628 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号 10 の位置 14 から 25 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) 配列番号 11 の位置 44 から 65 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

k) 配列番号 12 の位置 3 から 24 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

l) 配列番号 13 の位置 45 から 66 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

m) (a) から (l) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

n) (m) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

o) (a) から (n) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
のうちの少なくとも 1 種を検出することによって実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、壊死性腸炎の検出が、鳥類試料における以下の配列：

a) 配列番号 1 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号 3 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号 4 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号 7 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号 9 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号 10 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号 11 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号 12 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号 13 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) (a) から (i) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

k) (j) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

l) (a) から (k) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
のうちの少なくとも1種の存在および／または量を検出することによって実施される、方法。

【請求項4】

鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、鳥類試料から微小胞を単離するステップと、
それに続いて、該感染症を示す少なくとも1種の鳥類マーカーの存在および／または発現
レベルを特定するステップとを含み、非感染の対照との比較における該少なくとも1種の
鳥類マーカーの存在および／または発現レベル増加が該感染症を示し、該少なくとも1種
の鳥類マーカーが、鳥類のmiRNAであり、

a) 配列番号10に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク
レオチド；

b) 配列番号11に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク
レオチド；

c) 配列番号12に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク
レオチド；

d) 配列番号13に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク
レオチド；

e) (a) から (d) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および
RNA) ；

f) (e) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

g) (a) から (f) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
からなる群より選択される、方法。

【請求項5】

前記鳥類試料は、体液、あるいは身体からの排泄物である、請求項3又は4に記載の方
法。

【請求項6】

鳥類壊死性腸炎を検出するための方法であって、鳥類の糞便排泄物における壊死性腸炎
を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／または発現レベルを特定するステップを
含み、非感染の対照との比較における該少なくとも1種のマーカーの存在および／または
発現レベルの増加が壊死性腸炎を示し、ならびに該マーカーが、

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク
レオチド；

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク
レオチド；

c) 配列番号4に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク
レオチド；

d) 配列番号5に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレ
オチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌク

10

20

30

40

50

オチド；

e) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号9に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) (a) から (g) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

i) (h) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

j) (a) から (i) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
から選択される、方法。

【請求項7】

鳥類壊死性腸炎を検出するための方法であって、

鳥類の盲腸排泄物における壊死性腸炎を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／または発現レベルを特定するステップを含み、非感染の対照との比較における該少なくとも1種のマーカーの存在および／または発現レベルの増加が壊死性腸炎を示し、ならびに該マーカーが、

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号4に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号5に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号9に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号13に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) (a) から (h) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

j) (i) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

k) (a) から (j) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
から選択される、方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8】

鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、鳥類の血液における壊死性腸炎を示す少なくとも 1 種のマーカーの存在および／または発現レベルを特定するステップを含み、非感染の対照との比較における該少なくとも 1 種のマーカーの存在および／または発現レベルの増加が壊死性腸炎を示し、ならびに該少なくとも 1 種のマーカーが、

a) 配列番号 10 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号 11 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号 12 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) (a) から (c) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA)；

e) (d) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA)；

f) (a) から (e) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド；

から選択される、方法。

【請求項 9】

請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法を実施するステップと、壊死性腸炎感染症の処置のために鳥類対象に治療薬を投与するステップとを含む、処置方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、鳥類壊死性腸炎を検出するための、微小胞に基づく方法、ならびにウェルシュ菌 (クロストリジウム・パーフリンジェンス) (*Clostridium perfringens*) の関与する鳥類壊死性腸炎および／または鳥感染症の検出にとって好適であるとして特定された新規のマーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

ウェルシュ菌は、1961 年に最初に報告された家禽類の腸疾患である鳥類の壊死性腸炎 (NE) の主な病原体である。鶏における NE は、急性または慢性の腸管毒血症として現れる。当該急性疾患は、結果として、腸壁における壊死病斑の発症に起因したかなりのレベルの死亡率を生じるが、その一方で、当該慢性疾患は、生産性および家畜福祉の著しい損失を生じる。当該疾患による損害は、養鶏産業において年間数十億米ドルと見積もられている。

【0003】

ウェルシュ菌は、一般的に、家禽の胃腸管において見出されるが、ただし、壊死性腸炎の発症は散在的である。ウェルシュ菌は、グラム陽性で、桿菌様の、孢子形成性の酸素耐性嫌気性菌である。ウェルシュ菌種は、4 種の疑わしい主要毒素 (α 、 β 、 ϵ 、および ι) の産生に基づいて、5 つの毒素タイプ (A、B、C、D、および E) に分類される。タイプ A は、常に、鶏の腸から回収されるが、他のタイプは、それほど一般的ではない。

【0004】

NE に関する初期の研究は、当該疾患に関与する主な病原性因子が細菌によって分泌されることを示唆しており、これは、 α 毒素と呼ばれるホスホリパーゼ C 酵素が、病因に関与する主要な毒素であるという提案につながった。しかし、最近の研究では、 α 毒素変異体菌株が NE を生じることが可能であることから α 毒素は本質的な病原性因子ではないように思われることを示しており、これは、概して、当該疾患における α 毒素の役割に疑問を投げかけるものである。より最近の研究では、新規の小孔形成毒素 Net B が、この

10

20

30

40

50

疾患の発症における主要で重要な役割を果たすことが示唆されている。

【0005】

NEの発症に対する当該病原性因子自体の単純な関係性とは別に、鳥または家禽における当該疾患の確立に対してこれらの因子の機序を示すのは、依然として容易ではない。その上、鳥を屠殺することなくその検査を保証するような証拠がないため、これらの病原性因子のいずれかに対して無症候性NE感染症を関連付けるのは、達成するのが極めて困難である。したがって、NEおよび最も重要なことにはNEの無症候性の形態を早期に検出する方法が、依然として必要とされている。

【0006】

従来、疾患に対するバイオマーカーの発見および検証は、新鮮で凍結された組織、または、より一般的にはホルマリンで固定されパラフィン包埋された組織の使用を必要とする。これは、とりわけmRNAベースのバイオマーカーに当てはまるが、というのも、単離されたRNAにおけるRNAseの劣化は、組織ベースのバイオマーカーを血液などの生体液または糞便/盲腸試料に関連付けることを非常に困難にするためである。しかし、結果として、農場動物の場合などのように試料の数が多い場合、組織バイオマーカーのモニタリングは、その侵襲的性質から、時間がかかり、実用的ではない。

【0007】

鳥における疾患の検出を目的とした、血液パラメータの測定などの非侵襲的方法が報告されている(Chukura, 2012; Ade, 2012; Saleem, 2012)。Gulbeena Saleem(2012)は、無症候性NEの検出のための代替的アプローチとして、鶏の血清中における、ウェルシュ菌のチャレンジに応答したセルロプラスミン、PIT54、およびオボトランスフェリンなどの急性期タンパク質のレベルの測定を提案している。これにより、セルロプラスミンのみが、無症候性NEの発症に関連する好適な急性期タンパク質であると思われるということが明かとなった。にもかかわらず、これには問題があると考えられる。セルロプラスミンは、NEに対する特異的マーカーではなく、他の細菌性病原体によって引き起こされる疾患のマーカーでもあるためである(collibacillosis in chicken, Piercy, 1979; salmonella infection in commercial layers, Garcia, 2009)。

【0008】

しかしながら、バイオマテリアル中に見出されるエキソソームおよび他の膜小胞が、疾患状態に対する高い特異性を伴って、mRNA、miRNA、および他の非コーディングRNAなどの、ヒトドナー細胞由来の安定なRNAを含むことが、最近発見された(Skog, 2008; Nilsson, 2009; Li, 2009; Shao, 2012)。

【0009】

したがって、本出願の発明者らは、無症候性壊死性腸炎を示す家禽を特定するために、家禽の体液または排泄物から単離された膜小胞を使用することができないだろうかと考えた。これは、疾患に対して相関を示す特異的ホストmiRNAの蓄積によるものとして特に当てはまり得る。

【0010】

驚くべきことに、鳥類の体液または鳥類の排泄物から単離された微小胞が、壊死性腸炎の存在に応じた、検出可能なRNAの含有量の変化を示すことが見出された。ウェルシュ菌による感染に起因した特異的ホストmiRNAの増加に加えて、驚くべきことに、ウェルシュ菌のmRNA配列も、微小胞画分において検出することができ、したがって、これらは、疾患特異的病原性因子として分類され、したがって、壊死性腸炎を示す好適なバイオマーカーとして分類される。

【0011】

微小胞画分におけるウェルシュ菌のmRNAの出現は、適用された単離手順が、家禽の微小胞の濃縮だけでなく、感染性細菌の微小胞の濃縮も生じるという事実によって説明さ

10

20

30

40

50

れ得る。驚くべきことに、n e t Bのような既知の推定毒性因子に加えて、以前は疑われていなかったRNA配列も、壊死性腸炎に相関があるとして特定することができた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

したがって、本発明の第1の目的は、好ましくは家禽における、より好ましくは鶏における鳥類壊死性腸炎、特に、無症候性の鳥類壊死性腸炎を特定するための、迅速で信頼性の高い、好ましくは非侵襲的な方法を提供すること、および／または壊死性腸炎に罹患した鳥類対象を識別することであった。

【0013】

本発明のさらなる目的は、そのような方法において用いることができる、好適なマーカー、好ましくは疾患特異的マーカーを識別することであった。

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって、本発明の第1の主題は、鳥類壊死性腸炎、特に無症候性の鳥類壊死性腸炎を検出するための方法であって、鳥類試料、特に鳥類の体液または鳥類の排泄物から微小胞を単離するステップと、それに続いて、これらの微小胞中において壊死性腸炎を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／またはレベルを特定するステップとを含み、非感染の対照との比較における、この少なくとも1種のマーカーの当該存在および／またはレベルの増加が壊死性腸炎を示す、方法である。

【0015】

本発明による壊死性腸炎を示すマーカーは、好ましくは以下のウェルシュ菌の配列および相同物およびそれらの断片：SAM領域（配列番号1）、swim垂鉛フィンガー領域（配列番号3）、scRNA（配列番号4）、colA領域（配列番号5）、CPEO956領域（配列番号7）、netB領域（配列番号8）、virX領域（配列番号9）、およびTypeL領域（配列番号16）；ならびに以下の鳥類の配列および相同物およびそれらの断片：mir-16（配列番号10）、mir-24（配列番号11）、mir-155（配列番号12）、mir-206（配列番号13）、から選択される。

【0016】

したがって、本発明の好ましい主題は、鳥類壊死性腸炎、特に無症候性の鳥類壊死性腸炎を検出するための方法であって、鳥類試料、特に鳥類の体液または鳥類の排泄物から微小胞を単離するステップと、それに続いて、これらの微小胞中において壊死性腸炎を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／またはレベルを特定するステップとを含み、非感染の対照との比較における、この少なくとも1種のマーカーの当該存在および／またはレベルの増加が壊死性腸炎を示し、ならびに当該マーカーが、以下の群（「リストI」）：

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号4に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一

10

20

30

40

50

性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号5に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

f) 配列番号8に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号9に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

20

h) 配列番号16に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号10に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、60個、または80個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

30

j) 配列番号11に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

k) 配列番号12に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

40

l) 配列番号13に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

m) (a) から (l) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

n) (m) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

o) (a) から (n) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、

50

から選択される、方法である。

【0017】

この方法において、当該配列は、好ましくは、以下の群（「リスト I I」）：

a) 配列番号 1 の位置 1 から 630、特に 420 から 630、好ましくは 460 から 560 のヌクレオチド配列の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号 3 の位置 600 から 1000、特に 670 から 760 のヌクレオチド配列の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号 4 の位置 60 から 240、特に 80 から 220 のヌクレオチド配列の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号 5（に表される配列）の位置 1300 から 1800、特に 1400 から 1700 の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号 7 の位置 1 から 591、特に 100 から 280 のヌクレオチド配列の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号 8 の位置 240 から 540、特に 300 から 540 のヌクレオチド配列の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号 9 の位置 12 から 418、特に 240 から 400 のヌクレオチド配列の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号 16 の位置 673 から 5628 のヌクレオチド配列の、少なくとも 10 個、好ましくは少なくとも 15 個、20 個、25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号 10 の位置 14 から 25 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80%、好ましくは少なくとも 85%、90%、または 95%、最も好ましくは 100% の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) 配列番号 11 の位置 44 から 65 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、または 20 個の連続する

10

20

30

40

50

ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

k) 配列番号 12 の位置 3 から 24 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、または 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

l) 配列番号 13 の位置 45 から 66 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、または 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

m) (a) から (l) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

n) (m) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

o) (a) から (n) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される。

【0018】

より好ましくは、当該配列は、好ましくは、以下の群 (「リスト I I I」) ；

a) 配列番号 1 の位置 460 から 560 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号 3 の位置 670 から 760 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号 4 の位置 80 から 220 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号 5 の位置 1400 から 1700 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号 7 の位置 100 から 280 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号 8 の位置 300 から 540 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号 9 の位置 240 から 400 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号 16 の位置 673 から 5628 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオ

10

20

30

40

50

チドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号10の位置14から25のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) 配列番号11の位置44から65のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

k) 配列番号12の位置3から24のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

l) 配列番号13の位置45から66のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

20

m) (a) から (l) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

n) (m) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

o) (a) から (n) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される。

【0019】

当該ポリヌクレオチド／マーカの本発明の組み合わせの好ましい実施形態において、好ましくは、当該マーカの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、または7個の組み合わせが、壊死性腸炎を検出するために使用される。

30

【0020】

本発明の別の主題は、感染症、特に壊死性腸炎に関連するウェルチ菌を検出するための方法であって、鳥類試料から微小胞を単離するステップと、それに続いて、これらの微小胞中における、感染症、特に壊死性腸炎に関連するウェルチ菌の存在を示す少なくとも1種のマーカの存在および／またはレベルを特定するステップとを含み、非感染の対照との比較における、この少なくとも1種のマーカの当該存在および／またはレベルの増加が、当該疾患、特に壊死性腸炎を示す、方法である。この方法において、当該少なくとも1種のマーカは、好ましくは、リストIの(a)から(h)のポリヌクレオチドならびにこれらの配列に相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) から選択される。より好ましくは、当該マーカは、リストIIの(a)から(h)のポリヌクレオチドならびにこれらの配列に相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) から選択される。さらにより好ましくは、当該マーカは、リストIIIの(a)から(h)のポリヌクレオチドならびにこれらの配列に相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) から選択される。

40

【0021】

本発明の別の主題は、感染症、特に壊死性腸炎に関連する鳥類miRNAを検出するための方法であって、鳥類試料から微小胞を単離するステップと、それに続いて、これらの微小胞中における、感染症、特に壊死性腸炎に関連するmiRNAの存在および／またはレベルを特定するステップとを含み、非感染の対照との比較における、この少なくとも1種のマーカの当該存在および／またはレベルの増加が、当該疾患、特に壊死性腸炎を示

50

す、方法である。この方法において、当該少なくとも1種のマーカーは、好ましくは、リストIの(i)から(l)のポリヌクレオチドならびにこれらの配列に相補的なポリヌクレオチド(DNAおよびRNA)から選択される。より好ましくは、当該マーカーは、リストIIの(i)から(l)のポリヌクレオチドならびにこれらの配列に相補的なポリヌクレオチド(DNAおよびRNA)から選択される。さらにより好ましくは、当該マーカーは、リストIIIの(i)から(l)のポリヌクレオチドならびにこれらの配列に相補的なポリヌクレオチド(DNAおよびRNA)から選択される。

【0022】

驚くべきことに、鳥類壊死性腸炎を検出するためのマーカーとして、SAM領域(配列番号1)、swim垂鉛フィンガー領域(配列番号3)、scRNA(配列番号4)、CPE0956領域(配列番号7)、virX領域(配列番号9)、ならびにmir-16(配列番号10)、mir-24(配列番号11)、mir-155(配列番号12)、およびmir-206(配列番号13)を使用することができるので、本発明のさらなる主題は、鳥類壊死性腸炎、特に無症候性の鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、壊死性腸炎の検出が、鳥類試料、好ましくは鳥類試料中の微小胞における以下の配列(「リストIV」):

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド;

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド;

c) 配列番号4に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド;

d) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド;

e) 配列番号9に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド;

f) 配列番号10に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、60個、または80個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド;

g) 配列番号11に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を

10

20

30

40

50

有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号 12 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、20 個、25 個、40 個、または 60 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号 13 に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、20 個、25 個、40 個、または 60 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) (a) から (i) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

k) (j) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

l) (a) から (k) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
 のうちの少なくとも 1 種の存在および／または量を、非感染鳥類の対照試料との比較において検出することによって行われ、非感染の対照との比較におけるこれらの配列のうちの少なくとも 1 つの存在および／またはレベルの増加が、壊死性腸炎を示す、方法である。

【0023】

この方法において、当該配列は、好ましくは、以下の群(「リスト V」)：

a) 配列番号 1 の位置 1 から 630、特に 420 から 630、好ましくは 460 から 560 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号 3 の位置 600 から 1000、特に 670 から 760 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号 4 の位置 60 から 240、特に 80 から 220 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号 7 の位置 1 から 591、特に 100 から 280 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号 9 の位置 12 から 418、特に 240 から 400 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 25 個、40 個、60 個、100 個、150 個、180 個、または 200 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号 10 の位置 14 から 25 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号 11 の位置 44 から 65 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 1

10

20

30

40

50

0 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、または 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号 12 の位置 3 から 24 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、または 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号 13 の位置 45 から 66 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、または 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 80 %、好ましくは少なくとも 85 %、90 %、または 95 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) (a) から (i) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA)；

k) (j) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA)；

l) (a) から (k) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
から選択される。

【0024】

より好ましくは、当該配列は、好ましくは、以下の群 (「リスト VI」)：

a) 配列番号 1 の位置 460 から 560 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、98 %、または 99 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号 3 の位置 670 から 760 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、98 %、または 99 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号 4 の位置 80 から 220 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、98 %、または 99 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号 7 の位置 100 から 280 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、98 %、または 99 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号 9 の位置 240 から 400 のヌクレオチド配列の、少なくとも 20 個、好ましくは少なくとも 30 個または 40 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、98 %、または 99 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号 10 の位置 14 から 25 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、98 %、または 99 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号 11 の位置 44 から 65 のヌクレオチド配列の、少なくとも 8 個または 10 個、好ましくは少なくとも 12 個、14 個、16 個、18 個、または 20 個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも 90 %、好ましくは少なくとも 95 %、98 %、または 99 %、最も好ましくは 100 % の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

h) 配列番号12の位置3から24のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) 配列番号13の位置45から66のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

j) (a) から (i) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

k) (j) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

l) (a) から (k) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される。

【0025】

当該ポリヌクレオチドの本発明の組み合わせの好ましい実施形態において、好ましくは、当該ポリヌクレオチドの少なくとも2個、3個、4個、5個、6個、または7個の組み合わせが、壊死性腸炎を検出するために使用される。

【発明を実施するための形態】

【0026】

本発明による鳥類試料は、組織試料、好ましくは腸管試料、特に十二指腸または空腸試料であり得る。

【0027】

好ましくは、当該鳥類試料は、鳥類の体液および鳥類の排泄物ならびにそれらの溶液および懸濁液から選択される。

【0028】

本発明による鳥類の体液は、好ましくは血液、血清、または血漿である。

【0029】

本発明による鳥類の排泄物は、好ましくは、糞便および盲腸排泄物から選択される。

【0030】

好適な試料の体積は、例えば、0.1から20ml、特に0.2から10ml、好ましくは0.5から5mlである。好適な試料の質量は、例えば、0.1から20g、特に0.2から10g、好ましくは0.5から5gである。

【0031】

本発明による鳥類対象は、好ましくは家禽である。

【0032】

本発明による好ましい家禽は、鶏、七面鳥、アヒル、およびガチョウである。当該家禽は、若いストックを生産するために最適化することができる。このタイプの家禽は、親動物とも呼ばれる。

【0033】

したがって、好ましい親動物は、親ブロイラー、親アヒル、親七面鳥、および親ガチョウである。

【0034】

本発明による家禽は、観賞用家禽および野鳥から選択することもできる。

【0035】

好ましい観賞用家禽または野鳥は、クジャク、キジ、ヤマウズラ、ホロホロチョウ、ウズラ、オオライチョウ、ライチョウ、ハト、または白鳥である。

【0036】

本発明によるさらなる好ましい家禽は、ダチョウおよびオウムである。

10

20

30

40

50

【0037】

本発明による最も好ましい家禽は鶏である。

【0038】

本明細書において使用される場合、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、DNAおよびRNAを意味する。当該ポリヌクレオチドおよび核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。

【0039】

鳥類の排泄物からの微小胞の単離と、その後の、鳥類感染症、特に鳥類の細菌感染症、より具体的には壊死性腸炎を特定するためのそれらの使用は、以前に開示されたことがない。

10

【0040】

したがって、本発明のさらなる主題は、鳥類感染症、特に無症候性の鳥類感染症、好ましくは鳥類の細菌感染症、特に無症候性の鳥類の細菌感染症、より好ましくは壊死性腸炎、特に無症候性の壊死性腸炎を検出する方法であって、鳥類の排泄物、特に糞便または盲腸排泄物から単離された微小胞における当該疾患を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／または量を特定するステップを含み、非感染の対照との比較におけるこの少なくとも1種のマーカーの存在および／またはレベル増加が当該疾患を示す、方法である。この方法において、好ましくは、当該少なくとも1種のマーカーは、リストIにおいて開示されるような、好ましくはリストIIにおいて開示されるような、より好ましくはリストIIIにおいて開示されるようなポリヌクレオチドのいずれかから選択される。

20

【0041】

壊死性腸炎を示すマーカーの出現は試料特異的であること、すなわち、異なるマーカーの検出可能な量は、当該試料のタイプに依存することが判明した。

【0042】

そのため、糞便排泄物において、最も良好なマーカーは、SAM領域であり、それに続いて、scRNA、netB領域、virX領域、colA領域、swim垂鉛フィンガー領域、およびCPE0956領域であることが見出された。

【0043】

対照的に、盲腸排泄物でも、最も良好なマーカーはSAM領域であるが、それに続くのは、swim垂鉛フィンガー領域、scRNA、mir206、virX領域、netB領域、CPE0956領域、およびcolA領域である。

30

【0044】

さらに、血液試料では、最も良好なマーカーはmir16であり、それに続いてmir155およびmir24である。

【0045】

したがって、本出願の好ましい実施形態は、鳥類壊死性腸炎、特に無症候性の鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、鳥類の糞便排泄物、好ましくは鳥類の糞便排泄物から単離された微小胞における壊死性腸炎を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／またはレベルを特定するステップを含み、非感染の対照と比較した場合のこの少なくとも1種のマーカーの存在および／またはレベル増加が壊死性腸炎を示し、当該マーカーが、好ましくは、

40

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌ

50

クレオチド、

c) 配列番号4に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号5に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

e) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

20

g) 配列番号9に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) (a) から (g) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

i) (h) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

j) (a) から (i) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
から選択される、方法である。

30

【0046】

この方法において、当該配列は、好ましくは、以下の群：

a) 配列番号1の位置1から630、特に420から630、好ましくは460から560のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、または100個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号3の位置600から1000、特に670から760のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、または90個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

40

c) 配列番号4の位置60から240、特に80から220のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、または140個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号5の位置1300から1800、特に1400から1700の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180

50

個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号7の位置1から591、特に100から280のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、または180個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8の位置240から540、特に300から540のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号9の位置12から418、特に240から400のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、または160個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) (a) から (g) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

i) (h) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

j) (a) から (i) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される。

【0047】

したがって、本出願の別の好ましい実施形態は、鳥類壊死性腸炎、特に無症候性の鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、鳥類の盲腸排泄物、特に鳥類の盲腸排泄物から単離された微小胞における壊死性腸炎を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／またはレベルを特定するステップを含み、非感染の対照との比較における、この少なくとも1種のマーカーの当該存在および／またはレベルの増加が壊死性腸炎を示し、ならびに当該マーカーが、好ましくは、

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

c) 配列番号4に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号5に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

20

30

40

50

e) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

g) 配列番号9に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号13に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

20

i) (a) から (h) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

j) (i) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

k) (a) から (j) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される、方法である。

【0048】

この方法において、当該配列は、好ましくは、以下の群：

a) 配列番号1の位置1から630、特に420から630、好ましくは460から560のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、または100個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

30

b) 配列番号3の位置600から1000、特に670から760のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、または90個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド、

c) 配列番号4の位置60から240、特に80から220のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、または140個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

40

d) 配列番号5の位置1300から1800、特に1400から1700の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号7の位置1から591、特に100から280のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、または180個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80

50

%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

f) 配列番号8の位置240から540、特に300から540のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) 配列番号9の位置12から418、特に240から400のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、または160個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

h) 配列番号13の位置45から66のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

i) (a) から (h) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

j) (i) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

k) (a) から (j) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される。

【0049】

したがって、本出願の別の好ましい実施形態は、鳥類壊死性腸炎、特に無症候性の壊死性腸炎を検出する方法であって、鳥類の血液、特に鳥類の血液から単離された微小胞における壊死性腸炎を示す少なくとも1種のマーカーの存在および／またはレベルを特定するステップを含み、非感染の対照との比較における、この少なくとも1種のマーカーの当該存在および／またはレベルの増加が壊死性腸炎を示し、ならびに当該少なくとも1種のマーカーが、好ましくは、

a) 配列番号10に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、60個、または80個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号11に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号12に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) (a) から (c) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

e) (d) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

f) (a) から (e) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、から選択される、方法である。

【0050】

この方法において、当該配列は、好ましくは、以下の群：

a) 配列番号10の位置14から25のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号11の位置44から65のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号12の位置3から24のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) (a) から (c) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

e) (d) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

f) (a) から (e) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
から選択される。

【0051】

本発明のさらなる主題は、上記において説明されるような壊死性腸炎を検出する方法を実施するステップと、それに続いて壊死性腸炎の処置のために治療薬を投与するステップとを含む、壊死性腸炎の処置方法である。

【0052】

本発明のさらなる主題は、鳥類壊死性腸炎を検出するためのヌクレオチドアレイであって、リストIVに示されるような、好ましくはリストVに表されるような、より好ましくはリストVIに表されるようなポリヌクレオチドから選択される、少なくとも1種のマーカー、好ましくは少なくとも2種、3種、4種、または5種のマーカーを含む、ヌクレオチドアレイでもある。

【0053】

本発明のさらなる主題は、壊死性腸炎に関連する少なくとも1種のポリヌクレオチドを増幅するためのオリゴヌクレオチドのセットを含むキットであって、当該少なくとも1種のポリヌクレオチドが、リストIVに表されるような、好ましくはリストVに表されるような、より好ましくはリストVIに表されるようなポリヌクレオチドから選択される、キットでもある。

NetBおよびTpeLについて、既に、壊死性腸炎の病因に関与する主要毒素であることが議論されている (Keyburnら, 2010; 国際公開第2008/148166号; Shojadoostら, 2012)。

【0054】

ColAは、ウェルシュ菌のコラゲナーゼAを表し、この遺伝子は、この病原菌における想定される主要毒素の1つである、いわゆるκ毒素に対する類似性から、NEの病因に関連しているかもしれない (Obanaら, 2013)。

【0055】

それにもかかわらず、微小胞におけるこれらの遺伝子の出現ならびに脱調節は、予想されなかった。

【0056】

virX遺伝子は、ウェルシュ菌におけるplx、colA、およびpfOAを調節することが知られているが (Ohtaniら, 2002)、NEの病因への関与は、今まで報告されていない。

【0057】

ウェルシュ菌の孢子形成機構に関与する、進化的に保存されたシグナル識別粒子様RNAファミリーのメンバーである低分子量細胞質RNA (scRNA) (Nakamuraら, 1995) も、鶏のNEに直接関連していることは今まで報告されていない。

【0058】

さらに、壊死性腸炎の病因におけるSAMドメイン、swim垂鉛フィンガードメイン、およびCPE0956領域の関与は、これらの配列が今までに知られていない機能を有する配列であるため、今までに開示されておらず、予想され得なかったであろう。

【0059】

したがって、本発明のさらなる主題は、

10

a) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号1に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

20

b) 配列番号3に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

30

f) 配列番号7に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) (a) から (f) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNAおよびRNA) ；

h) (a) から (g) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
からなる群より選択される、好ましくは壊死性腸炎に関与する毒素活性および／または病原性因子を有するポリペプチドをコード化する、ポリヌクレオチドである。

40

【0060】

特に好ましいのは、

a) 配列番号1の位置1から630、特に420から630、好ましくは460から560のヌクレオチド配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して、少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号1の位置1から630、特に420から630、好ましくは460から5

50

60のヌクレオチド配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号3の位置600から1000、特に670から760のヌクレオチド配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

10

d) 配列番号3の位置600から1000、特に670から760のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) 配列番号7の位置1から591、特に100から280のヌクレオチド配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

20

f) 配列番号7の位置1から591、特に100から280のヌクレオチド配列の、少なくとも20個、好ましくは少なくとも25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、98%、または99%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

g) (a)から(f)に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド(DNAおよびRNA)；

h) (a)から(g)に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、からなる群より選択されるポリヌクレオチドである。

【0061】

30

したがって、本発明のさらなる主題は、

a) 配列番号2に表されるアミノ酸配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

b) 配列番号14に表されるアミノ酸配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、または70個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

40

c) 配列番号15に表されるアミノ酸配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または190個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

d) (a)から(c)に記載のポリペプチドを含むポリペプチド、からなる群より選択される、好ましくは壊死性腸炎に関与する毒素および／または病原性因子であるポリペプチドでもある。

【0062】

特に好ましいのは、

50

a) 配列番号2に表されるアミノ酸配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または200個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

b) 配列番号14に表されるアミノ酸配列の、少なくとも40個、好ましくは少なくとも60個または70個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

c) 配列番号15に表されるアミノ酸配列の、少なくとも100個、好ましくは少なくとも150個、180個、または190個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

d) (a) から (c) に記載のポリペプチドを含むポリペプチド、
からなる群より選択されるポリペプチドである。

【0063】

したがって、本発明のさらなる主題は、動物において免疫反応を高める方法であって、上記において言及されるような、特に、

a) 配列番号2に表されるアミノ酸配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または200個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

b) 配列番号14に表されるアミノ酸配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、または70個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

c) 配列番号15に表されるアミノ酸配列の、少なくとも10個、好ましくは少なくとも15個、20個、25個、40個、60個、100個、150個、180個、または190個の、特に全ての、連続するアミノ酸を含むポリペプチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリペプチド；

d) (a) から (c) に記載のポリペプチドを含むポリペプチド、
からなる群より選択される、ポリペプチドを当該動物に投与するステップを含む方法でもある。

【0064】

本発明によるポリペプチドは、好ましくは、毒素活性を示し、ならびに好ましくは、ウェルチ菌から入手可能である。より好ましくは、本発明によるポリペプチドは、NE関連病原性因子である。

【0065】

本発明のさらなる主題は、本発明によるポリヌクレオチドを含む、ベクター、特に、クローニングベクターおよび発現ベクターならびにウイルスベクターおよびプラスミドベクターである。

【0066】

本発明のさらなる主題は、本発明によるポリヌクレオチド、ポリペプチド、および／またはベクターを含む、細胞、特に細菌細胞、好ましくは大腸菌 (E. coli) 細胞でもある。

【0067】

本発明のさらなる主題は、本発明による毒素活性を有するポリペプチドに特異的に結合する、特に本発明によるNE関連病原性因子に特異的に結合する、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体あるいはそれらの断片である。

【0068】

本発明のさらなる主題は、本発明によるポリヌクレオチド、ポリペプチド、ベクター、細胞、または抗体を含む、組成物である。

【0069】

本発明のさらなる主題は、本発明によるポリヌクレオチドまたは抗体を含む診断キットである。当該キットはさらに、下記においてより詳細に説明されるように、不要粒子、破片、および小分子から、生物試料由来の微小胞を分離するのに好適な捕捉表面機器を含み得る。当該キットは、さらに、その使用のための、特に、微小胞の任意選択の単離および溶解ならびにその後の本発明によるマーカーのうちの少なくとも1種の存在の定性的または定量的測定において当該コンポーネントを使用するための、取扱説明書を備え得る。

10

【0070】

本発明のさらなる主題は、本発明によるポリペプチドと補助剤および／または薬学的に許容される担体とを含む免疫原性組成物である。

【0071】

本発明のさらなる主題は、本発明によるポリペプチドと、好ましくは補助剤および／または薬学的に許容される担体とを含むワクチンでもある。

【0072】

本発明による微小胞は、細菌由来の、特にウェルチ菌由来の、ならびに宿主由来の、特に鶏由来の膜小胞を含む。

【0073】

20

真核生物の膜小胞は、エキソソームとも呼ばれる。エキソソームは、典型的には、30～200nmの直径を有する。それらは、全ての体液中を流れ、それらによって、多くの無傷のタンパク質およびオリゴヌクレオチドを運ぶが、これは、それらがRNAseによる劣化から保護されるためである（Kogara, 2011）。

【0074】

エキソソームは、特に癌および免疫細胞において研究されてきた。

【0075】

細菌由来の微小胞は、細胞外膜小胞（MV）または外膜小胞（OMV）とも呼ばれる。それらは、典型的には20～500nmの平均直径を有する球状の二層構造である。細菌性微小胞は、最初、グラム陰性菌について報告されたが、後に、いくつかのグラム陽性菌も報告されている。最近の研究では、微小胞はウェルシュ菌のタイプA菌種によっても産生および放出され、先天的および順応性の免疫反応を引き起こすことが報告された。さらに、これらの研究の過程において、α毒素およびNetBのような重要な病原性因子が、当該膜小胞に存在しないことが分かり、その一方で、β2毒素が膜小胞において見出された（Jiangら, (2014)）。

30

【0076】

マイクロRNA（miRNA）は、通常は18～23個のヌクレオチドのサイズの低分子非コーディングRNAであり、遺伝子発現の調節において重要な役割を果たすことが示唆されていた。特に、免疫反応に関連する遺伝子は、miRNAによって非常に標的化されることが報告されている。鶏において、miRNA発現は、胎児の発育過程、生殖細胞発達、免疫器官、および疾患において研究されている。

40

【0077】

最近の研究において、ウェルシュ菌に感染した、2種の異なる非常に近交系のホワイトレグホーン鶏菌種のmiRNAプロファイルについて調査された（Dinhら, 2014; Hongら, 2014）。脾臓および腸管粘膜の組織によってRNA分析が実施された。その結果は、いくつかのmiRNAは、壊死性腸炎に対応して差次的に変化し、それらの標的遺伝子の発現を調節するということを示唆するものである。微小胞は、これらの研究では調査されていない。

【0078】

本発明による壊死性腸炎に関連することが見出されるmiRNAは、以前に、Wang

50

らによって鳥インフルエンザウイルスに感染したブロイラーに関して調査された（Wangら，2012）。Wangらは、miR-155、miR-16-1、およびmiR-24のmiRNAが、非感染のブロイラーよりも感染したブロイラーの肺においてより強く発現されることを見出したが、彼らはさらに、対照的に、miR-206は、感染したブロイラーよりも非感染のブロイラーにおいてより強く発現されることも見出した。したがって、細菌感染症のためのマーカーとしてのmiR-206の使用は、本出願において初めて開示されるものである。さらに、Wangらとは対照的に、本発明により、全てのmiRNAは、組織においてではなく、微小胞において検出された。

【0079】

したがって、本発明のさらなる主題は、鳥類細菌感染症、特に鳥類壊死性腸炎を検出するための方法であって、鳥類試料から微小胞を単離するステップと、それに続いて、感染症を示す少なくとも1種の鳥類マーカーのレベルを特定するステップとを含み、非感染の対照との比較におけるこの少なくとも1種の鳥類マーカーのレベル増加が、当該感染症を示し、当該少なくとも1種の鳥類マーカーが、鳥類のmiRNAであり、好ましくは、

a) 配列番号10に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、60個、または80個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号11に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号12に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号13に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) (a) から (d) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド（DNAおよびRNA）；

f) (e) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド（DNAおよびRNA）；

g) (a) から (f) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
からなる群より選択される、方法である。

【0080】

この方法において、当該配列は、好ましくは、以下の群：

a) 配列番号10の位置14から25のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) 配列番号11の位置44から65のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

c) 配列番号12の位置3から24のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

d) 配列番号13の位置45から66のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

e) (a) から (d) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

f) (e) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

g) (a) から (f) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド。

から選択される。

【0081】

初めて、mir-206を鳥類感染症に対するマーカーとして特定することができたので、本発明のさらなる主題は、鳥類感染症、好ましくは鳥類細菌感染症、より好ましくは鳥類壊死性腸炎を検出する方法であって、非感染の対照との比較における少なくとも1種の鳥類マーカーのレベル増加が、当該感染症を示し、当該少なくとも1種の鳥類マーカーが、

a) 配列番号13に表されるヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、20個、25個、40個、または60個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) (a) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

c) (a) から (b) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
からなる群より選択される、方法である。

【0082】

この方法において、当該配列は、好ましくは、以下の群：

a) 配列番号13の位置45から66のヌクレオチド配列の、少なくとも8個または10個、好ましくは少なくとも12個、14個、16個、18個、または20個の連続するヌクレオチドを含むポリヌクレオチドに対して少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%、90%、または95%、最も好ましくは100%の配列同一性を有するポリヌクレオチド；

b) (a) に記載の配列に対して相補的なポリヌクレオチド (DNA および RNA) ；

c) (a) から (b) に記載のポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、
から選択される。

【0083】

本発明による方法の用途は、例えば、(i) 鳥類壊死性腸炎の診断および／または予後に役立てること、(ii) 鳥類壊死性腸炎の進行または再発の監視、または(iii) 壊死性腸炎の処置を受けるかまたは処置を想到する鳥類対象に対する治効の評価に役立てること、であり、この場合、当該方法から得られる核酸抽出物において前に言及したバイオマーカーの1種または複数種の存在または不在が特定され、当該1種または複数種のバイオマーカーは、それぞれ、壊死性腸炎の診断、進行もしくは再発、または治効に関連付けられる。

【0084】

本発明の用途は、体重増加および飼料要求率のような鳥類の性能における損失を避けることに役立つ。

10

20

30

40

50

【0085】

微小胞の単離

核酸の抽出の前に生物試料からの微小胞を単離することは有利であり、というのも、最初に微小胞を単離することなく体液試料または排泄物から直接的に核酸を抽出することによって得られる収率／無欠陥性と比較して、核酸含有微小胞は、より高い無欠陥性において、非常に高い収率で核酸種を産生するためである。さらに、低レベルにおいて発現される核酸を検出することも可能である。微小胞の単離により、タンパク質、脂質、細胞破片、細胞、ならびに生物試料内に天然において見出される他の潜在的混在物およびPCR阻害物の排除も可能となる。

【0086】

生物試料からの膜小胞の単離、およびそれに続く核酸の抽出は、例えば、超遠心分離によって、例えば、10,000gを超える速度で1〜3時間にわたって回転させ、その後上澄みを除去し、ペレットを洗浄し、当該ペレットを溶解させ、カラムにおいて核酸を精製することによって実施することができる。代替法は、例えば100kDフィルターを使用した限外ろ過、ポリマー沈殿技術、および／またはサイズに基づくろ過である。

【0087】

さらなる代替法は、Raposoら(1996)、Skogら(2008)、およびNilssonら(2009)によって報告されるような分画遠心法；米国特許第6,899,863号および同第6,812,023号に記載されるイオン交換法および／またはゲル透過クロマトグラフィ；米国特許第7,198,923号に記載されるショ糖密度勾配またはオルガネラ電気泳動法；TaylorおよびGerceland-Taylor(2008)によって報告される磁気細胞分離法(magnetic activated cell sorting)(MACS)；Cheruvankyら(2007)によって報告されるナノ膜限外ろ過濃縮法(nanomembrane ultrafiltration concentration)；Mirandara(2010)によって報告されるPercoll勾配単離法；およびChenら(2010)によって報告されるマイクロ流体素子による単離である。

【0088】

国際公開第2014/107571号による捕捉表面に基づく微小胞の単離

好ましい実施形態において、当該微小胞画分は、捕捉表面、特に、国際公開第2014/107571号に記載されるような、膜、フィルター、または表面改質ビーズに結合される。

【0089】

当該生物試料は、好ましくは、好ましくは4〜8、より好ましくは5〜7のpHを有するローディングバッファーに溶解される。したがって、捕捉表面への結合は、好ましくは、4〜8、より好ましくは5〜7のpHにおいて生じる。好ましくは、生物試料を捕捉表面に接触させた後、1回または複数回の洗浄ステップが実施される。

【0090】

本発明に従って使用することができるローディングバッファーおよび洗浄バッファーは、高イオン強度または低イオン強度であり得る。したがって、塩濃度、例えば、NaCl濃度は、0から2.4Mであり得る。好ましくは、当該バッファーは、以下の成分：Tris、Bis-Tris、Bis-Tris-プロパン、イミダゾール、シトレート、メチルマロン酸、酢酸、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン(TEA)、およびリン酸ナトリウムのうちの1種または複数種を含む。

【0091】

洗浄ステップは、好ましくは、250mMのBis-Tris-プロパンを含みかつ6.5〜7.0のpHを示す洗浄バッファーを使用することによって実施される。

【0092】

洗浄バッファーに洗浄剤を加えることによって、非特異的結合が抑制される。使用に好適な洗浄剤としては、これらに限定されるわけではないが、ドデシル硫酸ナトリウム(S

10

20

30

40

50

DS)、Tween-20、Tween-80、Triton X-100、Nonidet P-40 (NP-40)、Brij-35、Brij-58、オクチルグルコシド、オクチルチオグルコシド、CHAPS、またはCHAPSOが挙げられる。

【0093】

捕捉表面を洗浄した後、当該核酸は、固定された微小胞を溶解させることによって放出させることができる。当該固定された微小胞を溶解させるため、好ましくは、QIAzol (登録商標) 溶解試薬 (Qiagen、ドイツ) のようなフェノールベースの溶解バッファーが使用される。次いで、PLG管を使用したクロロホルム抽出と、その後のエタノールコンディショニングによって、当該核酸の精製を実施することができる。次いで、当該核酸をシリカカラムに結合させた後、洗浄および溶出することができる。

10

【0094】

微小胞の溶解および核酸の抽出は、市販のQiagen RNeasy Plusキット、市販のQiagen miRNeasyキットを使用することによって、または当技術分野において既知の標準的手法および技術に従ってフェノールクロロホルムを使用することによって達成することもできる。そのような方法では、微小胞内に含まれる核酸を捕捉するために、核酸結合性カラムを使用することもできる。核酸は、カラムに結合させた後、当該核酸と結合カラムとの間の相互作用を分断するのに好適なバッファーまたは溶液を使用して溶出させることができる。

【0095】

当該核酸抽出法は、RNase阻害剤、例えば、Superase-In (Ambion Inc. から市販) またはRNaseINplus (Promega Corp. から市販) など; プロテアーゼ (RNase阻害剤としても機能し得る); DNase; 還元剤; 偽基質、例えば、合成RNAおよび/またはキャリアRNA; RNaseに結合することができる可溶性レセプター; 低分子干渉RNA (siRNA); RNA結合性分子、例えば、抗-RNA抗体、塩基性タンパク質、またはシャペロンタンパク質など; RNase変性物質、例えば、高浸透圧溶液、洗浄剤、またはそれらの組み合わせなどのようなさらなる薬剤の使用も含み得る。

20

【0096】

核酸の抽出前に、当該RNase阻害剤ならびにさらなる薬剤が、生物試料および/または単離された微小胞画分に加えられ得る。

30

【0097】

これらのさらなる薬剤は、様々な方法、例えば、RNase活性を阻害することにより (例えば、RNase阻害剤)、タンパク質の遍在的分解により (例えば、プロテアーゼ)、あるいはRNAに結合し保護するシャペロンタンパク質により (例えば、RNA結合性タンパク質)、それらの機能を発揮し得る。いかなる場合においても、そのような抽出増進剤は、生物試料中の有害因子またはそのままでは単離された粒子からの核酸の高品質な抽出を阻むかまたは邪魔するであろう単離された粒子に関連する有害因子のうちのいくつかまたは全てを除去するかまたは少なくとも緩和する。

【0098】

抽出された18S rRNAおよび28S rRNAの定量測定を使用することにより、核酸抽出の品質を特定することができる。

40

【0099】

補足表面は、中性であっても、負に帯電していても、または正に帯電していてもよい。それは、原則として、任意の種類の補足表面を使用することができるということを意味する。膜材料に応じて、当該膜の孔径は、20 nmから5 μ mの範囲であり得る。

【0100】

特に、当該補足表面は、PALL Corporation製のMustang (登録商標) Ion Exchange Membrane; Vivapure (登録商標) Q、Vivapure (登録商標) Q Maxi H; Sartorius AG製のSartobind (登録商標) D、Sartobind (S), Sartobin

50

d (登録商標) Q、Sartobind (登録商標) IDA、またはSartobind (登録商標) Aldehyde; Sigma製のWhatman (登録商標) DE81; EMD Millipore製のFast Trap Virus Purification Column; またはThermo Scientific* Pierce Strong Cation and Anion Exchange Spin Columnのような市販の膜であってもよい。

【0101】

核酸を固定するために膜が使用される場合、当該膜は、様々な好適な材料から作製することができ、例えば、それは、ポリエーテルスルホン (PES) (例えば、Millipore製またはPALL Corp. 製) または再生セルロース (RC) (例えば、SartoriusまたはPierce製) であり得る。

10

【0102】

負帯電膜が使用される場合、捕捉表面は、好ましくは、S膜であり、これは、負に帯電した膜であって、スルホン酸基を有するカチオン交換体である。好ましくは、当該S膜は、スルホン酸である $R-CH_2-SO_3^-$ で官能化される。あるいは、当該負に帯電した捕捉表面は、D膜であり、これは、ジエチルアミン基である $R-CH_2-N^+(C_2H_5)_2$ を有する弱塩基性のアニオン交換体である。あるいは、当該捕捉表面は、金属キレート膜である。例えば、当該膜は、イミノ二酢酸である $-N(CH_2COOH)_2$ で官能化されたIDA膜である。いくつかの実施形態において、当該捕捉表面は、アルデヒド基である $-CHO$ で官能化された微細孔膜である。他の実施形態において、当該膜は、ジエチルアミノエチル (DEAE) セルロースを有する弱塩基性のアニオン交換体である。

20

【0103】

中性捕捉表面が使用される場合、当該捕捉表面は、好ましくは、20 nm中性PESシリンジろ過 (TischおよびExomir)、30 nm中性PESシリンジろ過 (Sterlitech)、50 nm中性PESシリンジろ過 (Sterlitech)、0.2 μm 中性PESホームメイドスピнкаラムろ過 (Pall)、0.8 μm 中性PESホームメイドスピнкаラムろ過 (Pall)、および0.8 μm 中性PESシリンジろ過 (Pall) からなる群より選択されるフィルターである。捕捉表面が中性である実施形態において、好ましくは、当該中性捕捉表面は、シリンジフィルターに収容されていない。

【0104】

当該帯電表面は、好ましくは、0.65 μm 正帯電Q PES吸引ろ過、3~5 μm 正帯電Q RCスピнкаラムろ過、0.8 μm 正帯電Q PESホームメイドスピнкаラムろ過、0.8 μm 正帯電Q PESシリンジろ過、0.8 μm 負帯電S PESホームメイドスピнкаラムろ過、0.8 μm 負帯電S PESシリンジろ過、および50 nm負帯電ナイロンシリンジろ過からなる群より選択される。

30

【0105】

好ましい実施形態において、当該表面が正帯電膜である場合、Q膜を使用することができ、これは、正帯電膜であり、第四級アミンを有するアニオン交換体である。好ましい実施形態において、当該Q膜は、第四級アンモニウムである $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$ で官能化される。

40

【0106】

非常に好ましい実施形態において、当該正帯電膜は、再生セルロースの強塩基性アニオン交換体 (「RC/SBAE」) 膜であり、これは第四級アミンを有するアニオン交換体である。好ましい実施形態において、当該RC/SBAE膜は、第四級アンモニウムである $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$ で官能化される。当該膜の孔径は、好ましくは、少なくとも3 μm である。

【0107】

当該捕捉表面、例えば、膜は、遠心分離に使用される装置、例えば、スピнкаラム、または真空用途のための装置、例えば、真空フィルターホルダー、または加圧ろ過のための装置、例えば、シリンジフィルター、などの中に収容することができる。

50

【0108】

スピンカラムベースの精製プロセスにおいて、好ましくは2つ以上の膜、好ましくは2枚から5枚の膜が、管中において平行に使用され、この場合、当該膜は、好ましくは全て、当該カラムの片端において直接的にお互いに隣接している。当該収集管は、50mlのファルコン管など、市販され得る。当該カラムは、好ましくは、スピンにとって好適であり、すなわち、そのサイズは、標準的遠心分離機およびマイクロ遠心分離機に適合する。

【0109】

当該核酸を捕捉するために、膜の代わりに、同じ表面改質を有するビーズを使用することもできる。ビーズが使用される場合、それらは、磁性であってもまたは非磁性であってもよい。

10

【0110】

試料として血液が使用される場合、血液は、例えば、K2 EDTA管に収集され得て、完全反転によってよく混合され得る。次いで、当該管は、1300xgにおいて10分間遠心分離され、血液細胞と血漿とが分離される。次いで、血漿が除去され、0.8µmフィルターでろ過することにより、細胞破片および血小板が除去される。全ての血漿試料が、1mlのクライオバイアル中へと分注され、使用まで-80℃で保存される。

【0111】

RNA単離の前に、当該膜は、好ましくは、平衡バッファーを通すことによってコンディショニングされる。解凍された血漿試料は、ローディングバッファーで希釈される。当該希釈された血漿試料は、微小胞を吸収する膜をゆっくりと通過させられる。次いで、当該膜は、洗浄バッファーによって洗浄され、全ての弱く結合した血漿成分が除去される。次いで、溶解試薬が当該膜を通して、当該微小胞が溶解される。miRNeasyキット(Qiagen)を使用して、RNAが単離される。

20

【0112】

RNAは、RNA 6000 Pico Chipを使用して、2100 Bioanalyzer(Agilent)によって、品質および濃度について評価することができる。抽出されたRNAの相対量は、Applied Biosystems製の選択されたヒト遺伝子発現アッセイ(Taqman Assay)を使用して、RT-qPCRによって測定される。

【0113】

30

好ましい実施形態において、特に、溶かされた糞便または盲腸試料が使用される場合、微小胞の単離、精製、または濃縮の前に、大きい不要粒子、細胞、および／または細胞破片、ならびに生物試料中に存在する他の混在物を除去するために、前処理が実施される。当該前処理ステップは、1つまたは複数の遠心分離ステップ(例えば、分画遠心分離法)あるいは1つまたは複数のろ過ステップ(例えば、限外ろ過)、あるいはそれらの組み合わせによって達成され得る。複数の遠心分離前処理ステップが実際される場合、生物試料は、最初に低速において、次いで高速において遠心分離され得る。所望の場合、さらなる好適な遠心分離前処理ステップを実施してもよい。当該1つまたは複数の遠心分離前処理ステップと二者択一的に、あるいはそれらに加えて、当該生物試料をろ過してもよい。例えば、生物試料は、最初に約100~500g、好ましくは250~300gの低速において、その後、約2,000から約200,000g、好ましくは約20,000gの高速において10分から1時間にわたって、好ましくは0~10℃において遠心分離することによって、大きな不要粒子を除去してもよく；次いで、当該試料を、例えば、0.1から1.0µmの排除サイズのフィルターを使用することによって、ろ過することができる。

40

【0114】

高速での遠心分離によって得られるペレット中の微小胞は、当該プロセスの後続のステップのために、より少量の好適なバッファーによって再構成され得る。当該濃縮ステップは、限外ろ過によって実施してもよい。実際に、この両方の限外ろ過は、生物試料を濃縮し、微小胞画分のさらなる精製を実施する。別の実施形態において、当該ろ過は、限外ろ

50

過であり、好ましくは接線限外ろ過である。接線限外ろ過は、決められたカットオフ閾値の膜によって分離された、2つのコンパートメント（ろ液および未透過物）の間での溶液の濃縮および分画からなる。当該分離は、未透過コンパートメントへの流れと、このコンパートメントとろ液コンパートメントとの間の膜貫通圧力を適用することによって実施される。限外ろ過を実施するために、様々なシステム、例えば、スパイラル型膜（Millipore、Amicon）、平膜、または中空糸（Amicon、Millipore、Sartorius、Pall、GF、Sepracor）などを使用することができる。本発明の範囲内において、1000kDa未満、好ましくは100kDaと1000kDaの間、さらにより好ましくは100kDaと600kDaの間のカットオフ閾値を有する膜の使用が有利である。

10

【0115】

追加または代替の予備処理ステップとして、生物試料を捕捉表面に接触させる前または後に、サイズ排除クロマトグラフィ、ゲル透過クロマトグラフィ、または親和クロマトグラフィを実施してもよい。

【0116】

ゲル透過クロマトグラフィステップを実施するために、シリカ、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、エチレングリコールメタクリレートコポリマー、またはそれらの混合物、例えば、アガロース-デキストラン混合物など、から選択される支持体が好ましく使用される。例えば、そのような支持体としては、これらに限定されるわけではないが、SUPERDEX（登録商標）200HR（Pharmacia）、TSK G6000（TosoHaas）、またはSEPHACRYL（登録商標）S（Pharmacia）が挙げられる。

20

【0117】

親和クロマトグラフィは、例えば、様々な支持体、樹脂、ビーズ、抗体、アプタマー、アプタマー類似物、分子インプリントポリマー、または微小胞上の所望の表面分子を特異的に標的とする当技術分野において既知の他の分子を使用することによって実施することができる。

【0118】

任意選択により、微小胞精製および／または核酸抽出の効率または品質を評価するための内部対照として役立つために、微小胞単離または核酸抽出の前に当該試料に対照粒子を加えてもよい。これらの対照粒子としては、Q-βバクテリオファージ、ウイルス粒子、または、天然に存在し得るかもしくは遺伝子組み換え技術によって設計され得る対照核酸（例えば、少なくとも1つの対照標的遺伝子）を含有する任意の他の粒子が挙げられる。当該対照標的遺伝子は、リアルタイムPCR分析を使用して定量化することができる。

30

【0119】

好ましくは、当該対照粒子は、Q-βバクテリオファージであり、本明細書では「Q-β粒子」と呼ぶ。当該Q-β粒子は、天然に存在するウイルス粒子であってもよく、または遺伝子組み換えウイルスまたは改変されたウイルスであってもよく、その場合、当該ウイルス粒子の少なくとも1つの構成要素（例えば、ゲノムまたは外被タンパク質の一部）は、当技術分野において既知の遺伝子組み換え技術または分子生物学的技術によって合成される。Q-βは、レヴィウイルス科であり、4つのウイルスタンパク質：外被タンパク質、成熟タンパク質、溶解タンパク質、およびRNAレプリカーゼをコード化する3つの遺伝子からなる直鎖状の一本鎖RNAゲノムによって特徴付けられる。Q-βは、そのサイズが平均的微小胞のサイズとほぼ同じであるために、本明細書において説明されるように、微小胞を単離するために使用されるのと同じ精製方法を使用して、生物試料から容易に精製することができる。さらに、Q-βウイルスの一本鎖遺伝子構造の低複雑性は、増幅ベースの核酸アッセイにおける対照としての使用に有利である。当該Q-β粒子は、試料中におけるQ-β粒子の量の定量化のために検出または測定される対照標的遺伝子または対照標的配列を含有する。例えば、当該標的遺伝子は、Q-β外被タンパク質遺伝子である。生物試料にQ-β粒子を加えた後、当該Q-β粒子由来の核酸が、本明細書におい

40

50

て説明される抽出方法および／またはキットを使用して、当該生物試料から核酸と共に抽出される。Q-β 対照標的遺伝子の検出は、関心対象のバイオマーカー（すなわち、B R A F）と同時に、例えば、R T-PCR 分析によって特定することができる。対照標的遺伝子の 10 倍希釈における少なくとも 2 つ、3 つ、または 4 つの既知の濃度の標準曲線を使用して、コピー数を特定することができる。検出されたコピー数および加えられた Q-β 粒子の量を比較することにより、単離および／または抽出プロセスの品質を特定することができる。

【0120】

したがって、Q-β 粒子の 50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、1,000、または 5,000 のコピーを、体液試料に加えた。好ましい実施形態では、Q-β 粒子の 100 のコピーを体液試料に加える。Q-β 粒子のコピー数は、標的細胞に感染する Q-β 粒子バクテリオファージの能力に基づいて算出することができる。したがって、Q-β 粒子のコピー数は、Q-β 粒子バクテリオファージのコロニー形成単位と相関がある。

【0121】

核酸バイオマーカーの検出

R N A の検出のため、当該 R N A は、好ましくは、さらなる増幅の前に、相補的 D N A（c D N A）へと逆転写される。そのような逆転写は、単独においてまたは増幅ステップとの組み合わせにおいて実施することができる。逆転写と増幅ステップとを組み合わせる方法の一例は、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法（R T-PCR）であり、これは、例えば、米国特許第 5,639,606 号に記載されるような定量的 R T-PCR など、定量的となるようにさらに変更することができる。当該方法の別の例は、2 つの分離ステップ：R N A を c D N A へと変換する逆転写の第 1 ステップおよび定量的 P C R を使用して c D N A の量を定量する第 2 ステップを含む。

【0122】

R T-PCR 分析は、各反応に対する C t 値（サイクル閾値）を特定する。R T-PCR において、陽性反応は、蛍光信号の蓄積によって検出される。C t 値は、蛍光信号が当該閾値を超える（すなわち、バックグラウンドレベルを超える）ために必要なサイクルの数として定義される。C t レベルは、試料中における標的核酸の量、または対照核酸の量に反比例する（すなわち、C t レベルが低いほど、試料中の対照核酸の量が多い）。あるいは、対照核酸のコピー数は、当技術分野において認識される別の技術を使用して測定することもできる。

【0123】

単離された粒子中に存在する核酸の分析は、定量的および／または定性的である。定量的分析の場合、単離された粒子内の関心対象の特定の核酸の相対的または絶対的な量（発現レベル）は、当技術分野において既知の方法によって測定される。定性的分析の場合、単離された微小胞内の関心対象の特定の核酸の種が、当技術分野において既知の方法によって識別される。

【0124】

作業例

接種準備

n e t B および t p e L に対して陽性であるウェルシュ菌の分離株を、-80℃の貯蔵庫から取り出して、5%のヒツジの血液を含有するトリプチケースソイ寒天プレートに無菌においてストリーキングした。プレートを、嫌気性条件下において 37℃で一晩インキュベートした。接種菌培養を開始する 15 時間前に、当該一晩おいたプレートから単離したコロニーを、前還元した 50 ml の B H I ブロスに再植菌し、嫌気性条件下において 37℃で約 15 時間インキュベートした。次いで、50 μ l の当該培養物を、2 × 100 ml の前還元した B H I ブロスに加えた。結果として得られるブロー培養物を、高投与量および低投与量が同時にそれらの最終濃度（それぞれ、109 c f u / m l および 106 c f u / m l）に達するように揺動させた。培養期間の終了時に各培養物の一定分量を採

取し、細菌濃度を確かめるため、5%のヒツジの血液を加えたTSA II寒天に、順次、植菌した。

動物実験

【0125】

720匹の雄のブロイラーを、36のバッテリーケージにおいて30日間飼育した。4つの処理群（陰性対照、偽、低投与量強制飼養、および高投与量強制飼養）のうちの1つに、鳥を均等かつランダムに割り当てた（それぞれ9ペン）。当該鳥は、抗菌抗生物質を含まない標準的トウモロコシ／大豆飼料を与えた。飼育の13日目に、体重超過または体重不足の鳥を全てのケージから除去して実験から排除した。次いで、正常な体重範囲の鳥に対して、1mlのnet Bプラスミドを有するウェルシュ菌種によって経口によりチャレンジを行い、その後、14、15、および16日目にTpeL遺伝子に対して陽性であった。偽群に対して、1mlのPBSによりチャレンジを行い、その一方で、陰性対照グループは、ストレスまたは病原体チャレンジを行わなかった。最初の接種（14日目）の前に、各ケージから3羽の鳥を無作為に選択し、血液および消化物飼料の採取のために屠殺した。15日目の2回目のチャレンジの12時間後に、血液および消化物の試料のために各ケージから3羽の鳥を再び屠殺した。以前に報告されているように（Heikinheimoら、2004）、栄養細胞に対する孢子形成ウェルシュ菌の比率を特定するために、全ての屠殺した鳥の消化管内容物を一晚培養した。チャレンジが成功であるかどうかを評価するために、消化管内容物のNet BおよびTpeL遺伝子のPCRを実施した。試験の終了まで、それぞれのケージにおいて少なくとも10羽の鳥を残した。全ての鳥を屠殺して各群から3種のプールされた血液試料が得られる20日目において研究が終了するまで、周期的に排泄物試料を採取した。NEに典型的な徴候／病巣に対して鳥のGITを試験し、組織病理学的分析のために十二指腸および空腸から胃腸管の部検を採取した。死亡率、飼料消費量、および群病理学などのブロイラーの性能指標を特定した（表3）。

試料採取

1. 糞便および盲腸の排泄物試料の採取

【0126】

最初のチャレンジから2回目の接種（15日目）の12時間後まで、2時間毎に、プールされた糞便およびプールされた盲腸試料を採取するために紙のシートをケージに置いた。その後は、17日目まで4時間毎に試料を採取した。20日目の試験の終了時にも、糞便および盲腸試料を採取した。いずれの採取イベントにおいても、各ケージから糞便および盲腸の少なくとも1グラムを得て、試料を-80℃で貯蔵した。

【0127】

2. 血液採取

血液は、18ゲージ針を使用して心臓から直接採取した。合計約5~6mlの血液を、各ケージ毎に無作為に選択した3羽の鳥から採取し、EDTAを含有する採取管に移した。冷却遠心機を使用して、1,000~2,000xgにおける10分間の遠心分離によって血漿から細胞を取り除いた。遠心分離の後で、液体成分（血漿）を直ちに清浄なポリプロピレン管に移して、-20℃で貯蔵した。

【0128】

3. 消化管内容物の採取

消化管内容物を、およそ20cmの長さの腸から採取した。消化管内容物を排出させ、PBS+20%グリセロール中へと切除し、すぐに-20℃で冷凍した。孢子形成ウェルシュ菌に対する増殖期ウェルシュ菌の定量化ならびにnet BおよびtpeLのPCR検出に試料を使用した。

【0129】

鶏の腸の組織構造

1. 組織採取および処理

十二指腸ループに続く5cmの部分を実験鳥から取り出し、10%ホルマリンに入れ、容器を穏やかに揺動させて、餌料を除去し、ホルマリンを腸内に導入した。固定化の後、組

10

20

30

40

50

組織をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で数回にわたって十分に洗浄し、70%エタノールに入れて貯蔵した。5 μMの切片を作製する前にパラフィンによる組織の処理および組織の浸透のために、組織を、70%および95%のエタノール溶液による2分間の洗浄を順次行うことによって脱水し、次いで、100%のエタノール溶液による2分間の洗浄を2回行った。最後に、組織をキシレンで1分間濯ぐことを2回繰り返し、その後、パラフィン中に埋め込んだ。次いで、処理した組織を型に揃えて、パラフィンプロック内に埋め込み、5 μMの切片を作製するためにミクロトームで切断した。組織スライスを、ポリ-L-リシン（PLL）改質スライドの上に浮かべる。当該スライドを乾燥させ、オーブンに入れて当該パラフィンを「ベーク処理」する。

【0130】

2. ハリスヘマトキシリンおよびエオシンによる組織切片の染色

簡潔には、組織切片を、順次、濃度を減少させたエタノール：100%エタノールによって3分間を2回、95%エタノールによって3分間を2回、および70%エタノールによって3分間を1回によって再水和させた。次いで、スライドを蒸留水で5分間濯ぎ、次いで、ヘマトキシリン溶液（ハリスヘマトキシリン、Sigma、HHS-32）で6分間染色した。スライドを、水道からの流水で約20分間濯ぎ、酸アルコール（95%のエタノール 2578 ml、dH₂O 950 ml、HCL 9 ml）中において1~3秒間脱色した。スライドを再び、水道からの流水で5分間濯ぎ、炭酸リチウムに3秒間浸し、次いで水道水で5分間濯いだ。組織を、エオシン希釈標準溶液（100 mlのストックエオシン（1%のエオシン-Y水溶液および1%のフロキシシンB）、10 mlのストックフロキシシンB、780 mlの95%エタノール、4 mlの水酢酸）15秒間で対比染色し、順次、エタノール溶液（95%エタノール溶液により3分を2回および100%エタノール溶液により3分を2回）においてインキュベートすることによって再水和させた。最後に、組織をキシレン溶液中で5分間インキュベートし、次いで、分析のためにサイトシール（cytoseal）で固定した。

【0131】

PCRによるウェルシュ菌のnet Bおよびtpel遺伝子の検出

【0132】

【表1】

表1：鶏の腸からのウェルシュ菌分離株におけるnet Bおよびtpel遺伝子の検出のために使用したプライマー対

プライマーID	配列	標的遺伝子	産物の長さ
net B 5 F	CGCTTCACA TAAAGGTTG GAAGGC	net B	316
net B 5 R	TCCAGCACCC AGCAGTTTT TCCT	net B	316
AKP 80 F	ATATAGAGT CAAGCAGTG GAG	tpel	466
AKP 81 R	GGAATACCA CTTGATATA CCTG	tpel	466

【0133】

1. DNA抽出およびDNA濃度の定量化

腸内容物から単離されたウェルシュ菌種からのDNAの抽出は、Qiagen（ヒルデン、ドイツ）製の市販のDNA抽出キットにより、メーカーの取扱説明書に従って実施した。

【0134】

2. DNAの増幅

1 ngのDNAテンプレートと、増幅される遺伝子または検出される遺伝子に対する各プライマーの0.2 μMと、1.2単位/25 μLのTaq DNAポリメラーゼからなる1×PCRマスターミックスの12 μlとを含有する25 μlの最終体積において、PCR増幅を実施した。当該増幅は、遺伝子増幅PCRシステムである9600 Thermocycler (Master cycler eppendorf、ドイツ)において実施した。初期変性は、95℃で5分間であり、それに続いて、95℃で30秒を40サイクル、55℃で30秒のアニール処理および72℃で30秒間の延長、ならびに72℃で7分間の最終延長の後、40℃で保持した。

【0135】

10

試料の処理

合計で36個の血漿試料、96個の糞便試料、および87個の盲腸試料を、微小胞全RNAの単離および抽出のために処理した。血漿量は、異なる動物において0.5 mlから3 mlの間で変わった。

【0136】

血漿の準備

簡潔には、血液をK2 EDTA管に採取し、完全反転によってよく混合した。次いで、当該管を、1300 x gで10分間遠心分離することにより、血液細胞と血漿を分離した。次いで、血漿を除去し、0.8 μmのフィルターに通してろ過して細胞破片および血小板を除去した。次いで、全ての血漿試料を、1 mlのクライオバイアルに分注し、使用

20

【0137】

微小胞の単離およびRNA抽出

バイオマテリアル、例えば、血液、脳脊髄液、組織、および細胞培養物など、からの微小胞の抽出および微小胞(MV)の内容物のさらなる精製における現状技術水準の方法は、以前に、米国特許第6899863号(Dhellinら、2005)、欧州特許出願公開第2495025(A1)号、国際公開第2014107571(A)号、および同第20140178885(A1)号に記載されている。この方法は、高速超遠心分離の使用、または細胞破片を分離するための低速遠心分離の使用とその後のサイズ排除または特定の膜に対する親和結合またはろ過を含む(Witwer & Colleagues (2013)によるレビューを参照されたい)。微小胞を精製するためのいくつかの免疫学的方法も記載されている(Theryら、2016; Claytonら、2001; Wubboltsら、2003)。微小胞は、所望の集団を明確に選択するために微小胞の表面タンパク質に結合する抗体により、または他の細胞成分の喪失に対してそれらの細胞の表面タンパク質に結合する抗体により官能化されたマトリックス、ビーズ、磁性粒子の使用によって精製することができる(Kimら、2012およびMathivananら、2010)。研究に利用することができる微小胞の単離の迅速な方法としては、マイクロ流体素子(2010, Chenら2010; 欧州特許出願公開第2740536(A2)号)および市販のキット(例えば、SeraMir(商標)(System Biosciences)、ExoSpin(商標)(Cell Guidance)、ExoMir(商標)(Bioo Scientifics)、miRCURY(商標)(Exiqon))が挙げられ、これらは専門的な研究所設備をほとんどまたは全く必要としない。

30

40

【0138】

本明細書において、血漿、糞便および盲腸試料からの微小胞の抽出は、国際公開第2014/107571(A1)号(Enderleら、2014)に記載の方法によって実施した。当該方法は、Q官能化膜フィルター(Exo50, Exosome Diagnostics)の表面に微小胞を捕捉することによる、生物体液からの微小胞の単離を伴った。捕捉された微小胞のRNA内容物を、Qiazolによる溶解によって放出させ、次いで、当該RNAを、クロロホルム抽出によって、または市販のQiagen製のRN

50

A e s a yキットによって精製した。簡潔には、血漿試料を氷上においてゆっくりと解凍し、PBSまたは0.9%のNaOHで1:1希釈して、当該血漿溶液を、300gで10分間遠心分離して細胞および破片を除去した。上澄みを0.8μmのフィルターを通し、次いでフロースルーを4℃において20,000gで30分間遠心分離することにより、全ての残留細胞破片を除去した。微小胞に結合する親和性膜を備えるExo50カラムを、5mlのローディングバッファー（2回）、100mMのリン酸緩衝液、370mMのNaClを流すことによって事前コンディショニングを行った。次いで、第2遠心分離ステップから得られる微小胞を含有する上澄みを、Q-β粒子の1000コピーまでスパイクして、当該事前コンディショニングを行ったスピンカラムへのロードにおける抽出および回収効率を調べた。当該カラムを手短にスピンし、フロースルーを破棄した。当該カラムを2mlの洗浄バッファー（250mMのBis-Tris-プロパン、pH6.5〜7、および1X）50mMのリン酸緩衝液、185mMのNaCl）で2回洗浄し、二度目の洗浄の後、当該カラムを手短にスピンしてフロースルーを破棄した。当該膜に結合した微小胞に5ml（2.25ml）の溶解バッファー（Qiazol）を加えることにより、溶解させて内容物を放出させ、スピンさせて溶解物を収集した。RNeasyキット（Qiagen）により、メーカーの取扱説明書に従って、当該溶解物からRNAを抽出した。試料あたり46μlの総量を得るために、RNase不含有で溶出させたRNAを、複製試料のためにプールした。1μLのRNAをAgilent RNA 6000 Nano Kitに適用して、当該RNAの品質および濃度を評価し、その一方で、残りのRNAは、さらなる下流での使用（QPCRまたは順序付け）のために、-80℃で貯蔵した。抽出したRNAにおけるQ-β対照標的遺伝子（Q-β外被タンパク質遺伝子）発現を、RT-PCR分析によって関心対象の標的遺伝子と比較することにより、RNA抽出の抽出効率および品質を評価した。対照標的遺伝子の10倍希釈における少なくとも2つ、3つ、または4つの既知の濃度の標準曲線を使用して、コピー数を特定した。検出されたコピー数および加えられたQ-β粒子の量を比較することにより、単離および/または抽出プロセスの品質を特定した。

10

20

【0139】

糞便および盲腸試料

血漿および盲腸試料は、大きい粗材料を含有しているため、血漿試料に対して、上記において説明したようなExo50キットおよび関連する方法を使用して微小胞単離およびRNA抽出を実施する前に、追加の前処理ステップが適用される。例えば、200mgの糞便試料をゆっくりと解凍し、次いで、1mlの冷PBSまたは0.9%の無菌NaOHを加えて、当該糞便/盲腸試料を均一化し、その後に約1分間ボルテックスした。結果として得られる懸濁液を、PBSで1:1希釈し、次いで、4℃において20,000gで30分間遠心分離し、嵩高の不要粒子を除去した。上澄みを、0.8μmの混合セルロースエステルフィルター（例えば、ミリポアフィルター）を通してろ過し、上記において血漿試料に対して説明したようなさらなる使用または処理まで当該ろ液を4℃で貯蔵した。

30

【0140】

表2：標的の発現レベルを定量化するためにqPCRに使用したプライマーおよびプローブのリスト。miRNAはLife Technologiesから購入し、社内設計したプライマーおよびプローブは、IDT（Integrated DNA Technologies、米国）によって合成した。

40

【0141】

【表 2】

標的	アッセイID／プライマーおよびプローブ（適用される場合）
miR-155	TM: 000479 (Life Technologies #4427975)
miR-16	TM: 000391 (Life Technologies #4427975)
miR-24	TM: 000402 (Life Technologies #4427975)
miR-206	TM: 000510 (Life Technologies #4427975)
virX (IDT)	フォワード: 5' - TCGTATTCACTGTAGGAGAA CAAG-3' リバーズ: 5' - TGAGCTTTTCTTGCTTTTCTG C-3' プローブ: 5' - /56-FAM/ACGATCCAG/ZEN /TTAGATGCCAGCTTG/3IABkFQ/-3'
NetB (IDT)	フォワード: 5' - TGGTGCTGGAATAAATGCTT CA-3' リバーズ: 5' - ACCGTCCTTAGTCTCAACAA- 3' プローブ: 5' - /56-FAM/TGATGCAAA/ZEN /TTTAGCATCATGGGA/3IABkFQ/-3'
SAM (IDT) SybrGreen アッセイ	フォワード: 5' - AAATAAGGAGTTGATAAACA TGAAA-3' リバーズ: 5' - TGTTACTGGTGAACAACAAAA AT-3'
colA (IDT)	フォワード: 5' - TGAAAGAACACCAGAGGAAA GT-3' リバーズ: 5' - CCTGCAAAGAACTCTGCTGT- 3' プローブ: 5' - /56-FAM/TGATGCAAA/ZEN /GTGGGGGGCAAGGA/3IABkFQ/-3'
CPE0956 (IDT) SybrGreen アッセイ	フォワード: 5' - AATAGGATTTATAGCTGGAT -3' リバーズ: 5' - AGTTAGTTTTTCCAAGGATAG- 3'
scRNA (IDT) SybrGreen アッセイ	フォワード: 5' - TATGTAAGTGGTGTGAGAG -3' リバーズ: 5' - ATGAAAATGACTGCTTATC-3 ,

【0142】

糞便／盲腸由来のRNAのQRT-PCR

SuperScript VIL0 cDNA Synthesis Kitにより、メーカーの取扱説明書に従って、ならびに以下の変更: 11 μl (5×VIL0反応ミックス)、5.5 μl (10×SS酵素ミックス)、5.5 μl (ヌクレアーゼ不含H₂O)、および33 μl (RNA) からなるRT反応において、糞便および盲腸RNAの逆転写を実施した。

この場合、当該RTサイクルプロファイルは、4つの連続するインキュベーションサイクル／25℃で10分間、42℃で60分間、85℃で5分間の保持ステップ、および4℃での最終保持ステップからなった。

【0143】

血漿および糞便／盲腸由来のmiRNAに対するqRT-PCR:

TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kitを使用してRNAの逆転写を用いることにより、以下のRTマスターミックスレシピおよびサイクルプロファイル：6 μ l (RTプライマープール)、0.3 μ l (100mMのdNTP)、1.5 μ l (10 $\times$ RTバッファー)、0.2 μ lのRNase阻害剤、3.0 μ lのMultiScribe RT、および4 μ l (糞便および盲腸試料の場合には4 μ lのRNA、血漿試料の場合には2 μ lのRNA+2 μ lのTE緩衝液)からなるRT反応において、各試料に対してmiRNAの逆転写を三重に実施した。この場合、当該RTサイクルプロファイルは、4つの連続するインキュベーションサイクル／16℃で30分間、42℃で30分間、85℃で5分間の保持ステップ、および4℃での最終保持ステップからなった。当該RTプライマープールは、それぞれのRTプライマーの10マイクロリットルをプールし、TEバッファーで1mlに希釈することにより得て、これにより、各プライマーの最終濃度を0.05倍にした。5種(5 $\times$)のカスタマイズしたmiRNAアッセイ(miR-16、miR-21、miR-24、miR-155、およびmiR-206)を、それぞれのRTプライマープールに加えた。

10

【0144】

糞便／盲腸RNAのqPCR

RNA遺伝子に対するプローブベースのアッセイのために、Qiagen Rotor-Gene Qを使用して、メーカーの取扱説明書に従って、qPCRを実施した。vireX、colA、およびnetBアッセイのアニール温度は57℃であり、その一方で、ウェルシュ菌の16S rRNAの分析のためのアニール温度は60℃であった。当該アッセイのためのマスターミックス反応は、5.5 μ l (ヌクレアーゼ不含水)、10 μ l (Amperase UNGを含まないTaqMan Fast Universal PCR Master Mix)、0.5 μ lのフォワードプライマー(20 μ M)、1.5 μ lのリバースプライマー(20 μ M)、0.25 μ lのプローブ(20 μ M)、0.25 μ lのUNG (ウラシル-N-グリコシラーゼ)、および2 μ lのcDNAからなった。16S RNAの増幅のために、フォワードおよびリバースのそれぞれ1 μ lを使用した。

20

【0145】

低分子非コーディングRNAであるVR-RNA、e45nt、およびscRNAに対して、Rotor-Gene SYBR Green PCR Kitを実施した。当該アッセイのためのマスターミックス反応は、5.75 μ l (ヌクレアーゼ不含水)、10 μ l (Rotor-Gene SYBR 2 $\times$ Master Mix)、0.5 μ lのフォワードプライマー(20 μ M)、1.5 μ lのリバースプライマー(20 μ M)、0.25 μ lのプローブ(20 μ M)、0.25 μ lのUNG (ウラシル-N-グリコシラーゼ)、および2 μ lのcDNAからなった。以下の条件：50℃で2分間の第1保持ステップ、続く95℃で10分間のさらなる保持、次いで、95℃で2秒間、60℃で15秒間、72℃で20秒間からなる40サイクルに従って増幅を実施した。

30

【0146】

統計解析

全ての統計的計算は、統計ソフトウェアRを使用して行った。アッセイの化学量論および分析プロトコルの全体的効率の結果として、正規化の前に欠測値(信号なし)を40で補完したが、これは、40増幅サイクルのqPCRにおける最も可能性の高いCT値である。処理群の一対比較のための適度な統計を、パッケージlimma(limma:マイクロアレイデータのための線形モデル、Smyth G. K. In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor, Springer, New York, pp 397-420、Rパッケージバージョン2.16.5)におけるlmFit関数を用いて計算し、結果として得られるp値を、BenjaminiおよびHochberg(1995)の方法に従って調節することにより、q値(偽発見率: false discovery rate)を得た。

40

50

【0147】

多変量解析 (ANOVA)

時間、処理、および試料タイプの間の依存性を定性的に調べた。可能な関連性の正式な定量的評価は、2way-ANOVAおよびノンパラメトリックKruskal-Wallis検定を行うことによって実施した。両方の方法を、miRNAおよび細菌性RNAデータに対して独立して適用した。2way-ANOVAは、2つの主要効果および相互作用について検定するために使用した。第1の主要効果は、処理後の時間（単位：時間）であり、第2の主要効果は、処理のタイプ（対照、偽、高投与量、低投与量）であった。Kruskal-Wallis検定は、時間および処理に対して別々に適用して、遺伝子発現とこれらの因子との関係性について検定した。この方法では、多変数相互関係は評価しなかった。3つの試料タイプ（盲腸、排泄物、および血漿）を、4つのmiRNA（miR-16、miR-24、miR-155、およびmiR-206）について分析し、合計で216の重複データが利用可能であった。さらに6つの細菌性標的を、2つの試料タイプ（盲腸および排泄物）において分析し、合計で108の重複データが利用可能であった。重複データの平均（各試料の平均Ct値）を、さらなる統計解析に使用した。解析は、生データおよび正規化データの両方において実施した。マイクロRNA解析に対し、ノーマライザーとしてMiR-191を使用し、その一方で、細菌性標的に対しては、ノーマライザーとしてウェルシュ菌の16S rRNAのCt値を使用した。ANOVA線形モデル（ANOVA（1m（式～時間+処理+時間×処理））は、正規化データおよび生データについて3つの因子（時間の効果、処理の効果、相互作用）に対するp値を生成し、その一方で、2つのp値（時間の効果および処理の効果）は、正規化データおよび生データに対するKruskal-Wallis検定による解析から生成した。

【0148】

結果：

表3：ウェルシュ菌チャレンジ後の群あたりの死んだ鳥の数。以下の群：低投与量強制飼養群、偽群、および陰性対照群のそれぞれにおいて1羽の鳥が死んだ。ウェルシュ菌の高投与量によるチャレンジの鳥の群では4羽の鳥が死んだ。

【0149】

【表3】

群	初期の群 サイズ	14日目 および1 5日目で の血液採 取のため に屠殺し た鳥	ウェルシ ュ菌接種 後に失っ た鳥	AFCR* ーチャレ ンジ後	典型的な 肉眼所見 を有する パーセン ト	性能損失 および疾 患の徴候 なし
高投与量 強制飼養	180	54	4	1.60	50.70	49.30%
低投与量 強制飼養	180	54	1	1.60	42.12	57.88%
偽	180	54	1	1.57	6.06 ^b	93.94%
陰性対照	180	54	1	1.56	3.13	96.87%
P値			0.200	0.746	<0.001	

【0150】

* AFCR (adjusted feed conversion ratio)：死亡率およびチャレンジ前での鳥の体重に起因して除外された鳥の数により修正した、消費された餌料の量を鳥の体重で割ることによって特定したAFCR（調節された飼料要求率）

【0151】

表4：盲腸排泄物の膜小胞における出現の増加が有意なマーカー

【0152】

【表 4】

マーカー	生 F D R	正規化 F D R
S a m 領域	1. 21E-09	9. 24E-02
S w i m 亜鉛フィンガー領域	9. 52E-09	9. 78E-02
s c R N A	3. 21E-05	7. 93E-03
M i r 2 0 6	8. 55E-05	9. 13E-04
v i r X	2. 95E-04	5. 93E-03
n e t B	1. 04E-03	1. 30E-03
V R. R N A	2. 89E-03	3. 21E-05
c o l A	6. 11E-03	3. 73E-04

10

【0153】

表 5：糞便排泄物の膜小胞における出現の増加が有意なマーカー

【0154】

【表 5】

マーカー	生 F D R	正規化 F D R
S a m 領域	2. 63E-11	8. 18E-03
s c R N A	8. 94E-05	8. 64E-04
n e t B	2. 45E-04	2. 75E-03
v i r X	3. 24E-03	9. 78E-02
c o l A	5. 01E-03	8. 68E-04
S w i m 亜鉛フィンガー領域	5. 81E-02	2. 26E-03
V R. R N A	1. 36E-01	1. 03E-04

20

【0155】

表 6：血液試料の膜小胞における出現の増加が有意なマーカー

【0156】

【表 6】

マーカー	正規化 F D R
M i r 1 6	6. 98E-03
M i r 1 5 5	1. 56E-02
M i r 2 4	9. 40E-02

30

【配列表】

0006878284000001.app

フロントページの続き

前置審査

- (72)発明者 ホルガー ヴァルメイヤー
ドイツ連邦共和国 6 5 8 4 3 ズルツバハ タウヌス コンドル サイエнтиフィック コン
ピューティング アンド コンサルティング ゴッセンハイム ウェグ 1 3
- (72)発明者 ステファン ペルツァー
ドイツ連邦共和国 3 3 3 3 5 ギュータースロー ルートヴィヒ ウーラント シュトラーセ
3 3 エー
- (72)発明者 モニカ フリュージェル
ドイツ連邦共和国 3 3 8 0 3 シュタインハーゲン ブランデンブルガー シュトラーセ 3 4
- (72)発明者 トーマス ベケル
ドイツ連邦共和国 3 3 7 9 0 ハレ ヴェストハーレン ベルクハーゲン 2 1

審査官 川合 理恵

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 4 / 0 1 2 1 6 8 (WO, A 1)
特表 2 0 1 2 - 5 0 8 5 7 7 (JP, A)
特表 2 0 1 0 - 5 2 9 8 3 8 (JP, A)
"Clostridium perfringens strain NE_10 plasmid pNetB-NE10, complete sequence" [04-DEC-2
012] Retrieved from GenBank [online] Accession no.JQ655731 [retrieved on 14 Nov 2019]
URL:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/409121940?sat=46&satkey=24278845]
"putative radical SAM domain-containing protein (plasmid) [Clostridium perfringens]" [1
7-DEC-2014] Retrieved from NCBI Reference Sequence [online] Accession no.YP_007079046
[retrieved on 14 Nov 2019] URL:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/YP_007079046.1/]
"Clostridium perfringens plasmid pCPPB-1 DNA, complete sequence" [24-JUN-2011] Retrie
ved from GenBank [online] Accession no.AB604032 [retrieved on 14 Nov 2019] URL:[https://
www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/338160374?sat=46&satkey=15616090]
"Clostridium perfringens DNA for ORF10291-1, ORF10291-2, ORF10291-3, partial and compl
ete cds" [14-MAR-2000] Retrieved from GenBank [online] Accession no.AB004104 [retriev
ed on 14 Nov 2019] URL:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/5139684?sat=46&satkey=1584
4700]
"swim zinc finger domain protein (plasmid) [Clostridium perfringens]" [24-JUN-2011] Re
trieved from GenBank [online] Accession no.BAK40949 [retrieved on 14 Nov 2019] URL:[ht
tps://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/338160403?sat=46&satkey=15616090]
"ORF10291-2 [Clostridium perfringens]" [14-MAR-2000] Retrieved from GenBank [online] A
ccession no.BAA81691 [retrieved on 14 Nov 2019] URL:[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pro
tein/5139686?sat=46&satkey=15844700]
FEMS Microbiol. Lett., 2002, Vol. 209, pp. 113-118
PLOS ONE, 2012, Vol. 7, Issue 11, e49753
Cell. Microbiol., 2013, Vol. 15, No. 9, pp. 1496-1507

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q
P u b M e d

