(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 12 月 17 日(17.12.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/190589 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01)　*C12Q 1/68* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)　*G01N 33/569* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)　*G01N 37/00* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/066980

(22) 国際出願日: 2015 年 6 月 12 日(12.06.2015)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2014-122886 2014 年 6 月 13 日(13.06.2014) JP

(71) 出願人: 学校法人麻布獣医学園(SCHOOL CORPORATION, AZABU VETERINARY MEDICINE EDUCATIONAL INSTITUTION) [JP/JP]; 〒2525201 神奈川県相模原市中央区淵野辺１－１７－７１ Kanagawa (JP). 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 浅井　史敏(ASAI, Fumitoshi); 〒2525201 神奈川県相模原市中央区淵野辺１－１７－７１ 麻布大学内 Kanagawa (JP). 加藤　行男(KATO, Yukio); 〒2525201 神奈川県相模原市中央区淵野辺１－１７－７１　麻布大学内 Kanagawa (JP). 白井　明志(SHIRAI, Mitsuyuki); 〒2525201 神奈川県相模原市中央区淵野辺１－１７－７１　麻布大学内 Kanagawa (JP). 村上　賢(MURAKAMI, Masaru); 〒2525201 神奈川県相模原市中央区淵野辺１－１７－７１　麻布大学内 Kanagawa (JP). 仲野　和彦(NAKANO, Kazuhiko); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 野村　良太(NOMURA, Ryota); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号　国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 小野　新次郎, 外(ONO, Shinjiro et al.); 〒1000004 東京都千代田区大手町二丁目２番１号 新大手町ビル２０６区　ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: RISK DIAGNOSIS OF CANINE MITRAL INSUFFICIENCY

(54) 発明の名称 : イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断

(57) **Abstract**: Provided are: a risk diagnosis method; preventive method; and method for inhibiting the progress of canine mitral insufficiency. This risk diagnosis method for canine mitral insufficiency comprises: a step in which a sample taken from a canine subject is investigated to ascertain whether said sample includes Porphyromonas gulae type-C Fimbrillin (FimA) which contains the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6; and a step in which if the sample contains Porphyromonas gulae type-C FimA, the canine subject is deemed to run a risk of having or developing mitral insufficiency.

(57) 要約: 本発明は、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法、予防方法及び進行を抑制する方法を提供することを課題とする。 イヌ被検体から採取した試料が、SEQ ID NO: 6 のアミノ酸配列を有する、Porphyromonas gulae のタイプ C のフィンブリリン（fimbrillin)FimA を含有しているか否かを調べる工程と、前記試料が Porphyromonas gulae のタイプ C の FimA を含有する場合に、前記イヌ被検体は僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断する工程と、を有するイヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法。

WO 2015/190589 A1

明　細　書

発明の名称 ： イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断

技術分野

[0001] 本発明は、イヌ歯周病の原因菌と考えられているPorphyromonas gulaeのフィンブリリンタンパク（Fimbrillin）FimAのタイプによりイヌの僧帽弁閉鎖不全症を診断することに関する。

背景技術

[0002] 僧帽弁閉鎖不全は、イヌにおいて生じる心臓血管疾患の中でも最も一般的なタイプの疾患の一つであり（非特許文献1、非特許文献2）、そして慢性的な進行により特徴づけられ、その症状が時間の経過とともに中程度～重度へと悪化する（非特許文献3）。慢性の心疾患のイヌのおよそ75％が、僧帽弁閉鎖不全を有する（非特許文献2）。

[0003] 僧帽弁閉鎖不全症のイヌは、僧帽弁や僧帽弁を動かすための構造に変性を有しており、弁が完全には閉鎖しない。このため、左心室が収縮して全身に血液を送り出すときに、左心房に血液が逆流する。この逆流の影響で左心房が徐々に肥大していき、その後、右心系にも異常が生じる。こうして症状が進行すると、心臓に戻る血液の鬱滞が起こり、胸水や腹水が溜まるようになる。心臓機能が落ちるために疲れやすくなるほか、肺に水が溜まり呼吸困難に陥る場合もある。結果的に動物の生活の質（QOL）が大きく低下する。

[0004] 現在、健康診断では、レントゲン、心電図、エコーなどにより僧帽弁閉鎖不全の有無を確認している。しかし、このような方法では僧帽弁閉鎖不全の発生を阻止できない。

[0005] また、一旦僧帽弁閉鎖不全を発症してしまうと、僧帽弁の変性を抑制する治療方法はなく、食事療法や体重管理、運動制限、そして血管拡張剤などの投薬といった、症状を緩和させる処置が主体となる。手術により人工弁に置き換えるといった外科的な治療方法もあるが、心臓の拍動を止めて行う大掛かりな手術であり、死亡するリスクも高く、あまり行われない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Serfass, P., et al., 2006. J Vet Cardiol. 8:11-18.

非特許文献2：Atkins, C., et al., 2009. J Vet Intern Med. 23:1142-1150.

非特許文献3：Borgarelli, M., et al., 2008. J Vet Intern Med. 22:120-128.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法、予防方法及び進行を抑制する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明の発明者らは、口腔内に線毛を形成するタンパク質フィンブリリンタンパク（Fimbrillin）FimAがタイプCであるPorphyromonas gulaeが存在することとイヌの僧帽弁閉鎖不全症とのあいだに相関性を見出し、本発明を完成した。

[0009] 本発明は、一態様において、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法であって、

イヌ被検体から採取した試料中に、Porphyromonas gulaeが関連するリスク因子が存在するか否かを調べる工程と、

前記試料中に前記リスク因子が存在する場合に、前記イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断する工程と、

を有する方法を提供する。このリスク診断方法において調べる対象であるイヌ被検体から採取した試料としては、唾液、歯垢、歯石、口腔拭い液、又は血液由来試料などを使用することができる。

[0010] このリスク診断方法において、Porphyromonas gulaeが関連するリスク因子

は、

（i）イヌ被検体から採取した試料が、Porphyromonas gulaeのタイプCのフィンブリリン（fimbrillin）FimAを含有していること、または

（ii） イヌ被検体から採取した試料中に、Porphyromonas gulaeのタイプAのフィンブリリン（fimbrillin）FimA、及びPorphyromonas gulaeのタイプBのFimAの含有レベルと比較して、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いこと、

のいずれかである。この様なリスク因子は、核酸配列レベルまたはタンパク質レベルのいずれかの方法により、特定することができる。

[0011] 本発明の他の実施態様として、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制する方法であって、イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断された場合に、前記イヌ被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を低減させる工程を有する、前記方法もまた提供する。この態様において、前記イヌ被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を、前記イヌ被検体の歯垢又は歯石を除去することにより、前記イヌ被検体の口腔を洗浄することにより低減させることにより、あるいは前記イヌ被検体に医薬を投与することにより低減させることにより、低減させてもよい。前記医薬は、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体又はその誘導体を有効成分とする医薬であってもよい。

[0012] 本発明の他の実施態様として、SEQ ID NO:21のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含むか、またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列またはその部分アミノ酸配列からなるポリペプチドからなる、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクの診断用バイオマーカーを提供する。

[0013] 本発明の他の実施態様として、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体又はその誘導体を有効成分とする、

イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制するための医薬を提供する。

[0014] この他にも、本発明の実施態様として、Porphyromonas gulaeのフィンブリリン（fimbrillin)FimAのタイプA、タイプB及びタイプCに分類するためのプライマーセットを含む、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用キット；Porphyromonas gulaeのFimAのタイプA、タイプB及びタイプCそれぞれに特異的な各抗体又はそれらの誘導体を含む、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用キット；フィンブリリン（fimbrillin）fimAのタイプA、タイプB及びタイプCそれぞれに相補的な配列を有する各ヌクレオチドがそれぞれ異なるウェル内に結合されているか、またはフィンブリリン（fimbrillin）FimAのタイプA、タイプB及びタイプCそれぞれに特異的な各抗体又はそれらの誘導体がそれぞれ異なるウェル内に結合されている、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用チップ；を提供することができる。

発明の効果

[0015] 本発明の方法により、唾液、歯垢、歯石、口腔拭い液、又は血液由来試料などの容易に入手可能な試料を使用して、イヌが僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有するか診断することが可能になり、また、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制することが可能になる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1Aは、タイプA、タイプB、タイプCのfimAを有する代表的な系統の培養物から抽出したゲノムDNAを用いるPCRシステムを使用して、タイプA、タイプB、タイプCのfimAを検出した結果を示す。図1B～Dは、最初の濃度から10^{-3}にまでの容量特定されたイヌの口腔検体から抽出したDNAサンプルを使用した場合の代表的なタイプA、タイプB及びタイプCのfimAの検出結果を示す。

発明を実施するための形態

[0017] イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法

Porphyromonas gulaeはイヌの口腔内に常在する菌であり、歯周病の原因菌

であることが見出された（Kato, Y., et al., 2011. Journal of Veterinary Dentistry 28, 84-89.）。Porphyromonas gulaeのフィンブリリン（fimbrillin）FimAは、3つの主要な遺伝子タイプ；タイプA、タイプBおよびタイプCに分類することができ、そのうちタイプCが歯周炎に対して高度に病原性であり、病原性はタイプB、タイプAと弱まることが示された（WO2013/089166、Nomura, R.et al., 2012. Journal of Veterinary Medical Sciences 74, 885-891.、Yamasaki, Y. et al., 2012. Veterinary Microbiology 28, 196-205.）。

[0018] 本発明の発明者らは、Porphyromonas gulaeのフィンブリリン（fimbrillin）FimAについてさらに調査したところ、僧帽弁閉鎖不全症のイヌの口腔内には、Porphyromonas gulaeのfimAのタイプA、タイプBおよびタイプCのうち、タイプCが有意に多く含まれていることを見出した。また、この様な相関性に基づいて、Porphyromonas gulae自体がイヌの体内の僧帽弁に何らかの影響を与えていることを示唆していることから、Porphyromonas gulaeは、口腔内から体内に侵入し、菌自体もしくは菌の構成成分が血液を介して僧帽弁まで到達し、イヌの体内の僧帽弁に影響を与えていると考えられた。

[0019] 本知見に基づいて、本発明の発明者らは、イヌ被検体の口腔や体内から、唾液、歯垢、歯石、口腔拭い液、又は血液由来試料などの試料を採取して、その試料中にPorphyromonas gulaeが関連するリスク因子が存在するか否かを調べ、前記試料中に前記リスク因子が存在する場合に、イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し、又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断する、僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法の発明を完成させた。

[0020] 本発明において、「イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法」という場合、イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症に罹患しているかを診断する方法、イヌ被検体が試料を採取された時点で僧帽弁閉鎖不全症に罹患していた可能性、及び、イヌ被検体が将来僧帽弁閉鎖不全症を罹患する可能性を予測する方法などを含むことを意図している。イヌ被検体が試料を採取された時点で僧帽弁閉鎖不全症に罹患していた可能性、及び、イヌ被検体が将来僧帽弁閉鎖不

全症を罹患する可能性が高いと予測された場合には、さらなる精密検査により、実際に僧帽弁不全症を発症しているかの確認をすることができる。精密検査は、例えば、レントゲン、心電図、エコーなどにより行うことができる。

[0021] 本発明において、僧帽弁閉鎖不全症は、心臓の左心房と左心室の間の僧帽弁が、硬化、短縮などにより完全には閉じなくなり、左心室が収縮する際に血液が左心室から左心房に逆流する状態を意味する。そして、本発明において、「イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有すると診断する」とは、イヌ被検体が試料を採取された時点で僧帽弁閉鎖不全症に罹患していた可能性が高いと判定することを意味する。また、本発明において、「イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断する」とは、イヌ被検体が将来僧帽弁閉鎖不全症を罹患する可能性が高いと判定することを意味する。

[0022] 上述した本発明において、「Porphyromonas gulaeが関連するリスク因子」という場合、

（i）イヌ被検体から採取した試料が、Porphyromonas gulaeのタイプCのフィンブリリン（fimbrillin）FimAを含有していること、または

（ii） イヌ被検体から採取した試料中に、Porphyromonas gulaeのタイプAのフィンブリリン（fimbrillin）FimA、及びPorphyromonas gulaeのタイプBのFimAの含有レベルと比較して、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いこと、

を意味する。

[0023] 本発明の僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法は、イヌを被検体とするものであり、イヌであれば犬種、身体のサイズ、年齢、性別などを問わないものであり、したがって、いずれのイヌに関しても適用することができる方法である。

[0024] 本発明のイヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法の一実施形態では、リスク因子として、「（i）イヌ被検体から採取した試料が、Porphyromonas gu

laeのタイプCのフィンブリリン（fimbrillin）FimAを含有していること」を選択し、得られた試料中に、リスク因子であるPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAが含まれているか否かを調べ、試料にPorphyromonas gulaeのタイプCのFimA が含まれている場合に、その試料を採取したイヌ被検体が、僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断する。

[0025] 本発明のイヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法の別の実施形態では、リスク因子として、「（ii） イヌ被検体から採取した試料中に、Porphyromonas gulaeのタイプAのフィンブリリン（fimbrillin）FimA、及びPorphyromonas gulaeのタイプBのFimAの各含有レベルと比較して、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いこと」を選択し、イヌ被検体から採取した試料中の、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、タイプBのFimA及びタイプCのFimAの各含有レベルを調べ、それぞれを比較して、タイプA、タイプB及びタイプCの中で、タイプCのFimAの含有レベルが最も高い場合に、被検体は僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断することができる。

[0026] また、この実施形態の別の方法として、イヌ被検体から採取した試料を階段希釈して、2以上の試料を用意し、前記2以上の試料中のPorphyromonas gulaeのタイプAのFimA、タイプBのFimA及びタイプCのFimAの各含有シグナルを検出し、タイプCのFimAの含有シグナルが検出された最低濃度の試料が、タイプAのFimA及びタイプBのFimAの各含有シグナルが検出された最低濃度の各試料よりも低い濃度の試料である場合に、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高い場合に、被検体は僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断することができる。

[0027] 上述した実施態様を含む本発明は、リスク因子の存在を調べるため、

（i） イヌ被検体から採取した試料中に、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAを含有しているか否かを調べる工程、

（ii-1） Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、Porphyromonas gulaeのタ

イプBのFimA及びPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAの各含有レベルを調べ、それぞれを比較することにより、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いこと特定する工程、または

（ii-2） イヌ被検体から採取した試料を階段希釈して、2以上の試料を用意し、前記2以上の試料中のPorphyromonas gulaeのタイプAのフィンブリリン（fimbrillin）FimA、Porphyromonas gulaeのタイプBのFimA及びPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAの各含有シグナルを検出し、そしてPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有シグナルが検出された最低濃度の試料が、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA及びPorphyromonas gulaeのタイプBのFimAの各含有シグナルが検出された最低濃度の各試料よりも低い濃度の試料である場合に、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いことを特定する工程、

のいずれかを行うことを特徴とする。

[0028] 本発明においてリスク因子の存在を調べる場合、本発明において検出対象としているPorphyromonas gulaeのタイプAのFimA、タイプBのFimAおよび／またはタイプCのFimAを、定量的に調べることができることが好ましく、その様なリスク因子の存在を調べる方法として、核酸配列レベルで調べる方法またはアミノ酸配列レベルで調べる方法を使用することができる。

[0029] 本発明における検出対象（すなわち、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、タイプBのFimAおよび／またはタイプCのFimA）の存在を、核酸配列レベルで調べる方法としては、Porphyromonas gulaeのそれぞれのタイプのFimA遺伝子の発現産物を、PCR法、ノザンハイブリダイゼーション法、fimAのタイプA、タイプB及びタイプCそれぞれに相補的な配列を有する各ヌクレオチドがそれぞれ異なるウェル内に結合されている診断用チップを用いる方法など、公知の発現解析方法のいずれを使用してもよく、現状においては、PCR法またはその改変方法を使用することが一般的である。

[0030] 一方、本発明における検出対象（すなわち、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、タイプBのFimAおよび／またはタイプCのFimA）の存在を、アミノ酸

配列レベルで調べる方法としては、Porphyromonas gulaeのそれぞれのタイプのFimAタンパク質に特異的な抗体又はその誘導体を使用して、Porphyromonas gulaeのそれぞれのタイプのFimAタンパク質を、ELISA法、ウェスタンハイブリダイゼーション法、目的タンパク質に特異的な各抗体を結合した診断用チップを用いる方法など、公知のタンパク質解析方法のいずれを使用してもよく、現状においては、PCR法またはその改変方法を使用することが一般的である。

[0031] ここで、Porphyromonas gulaeのFimAのタイプAとは、Porphyromonas gulaeに特異的な配列を有するタイプであり、FimAのタイプBとは、Porphyromonas gingivalisのIII型と類似する配列を有するタイプであり、タイプCは、Porphyromonas gingivalis のIV型と類似する配列を有するタイプである。

[0032] Porphyromonas gulaeのタイプAのFimAは、他のタイプのFimA（タイプBまたはタイプC）にはない特徴的なアミノ酸配列を有する。この特徴的なアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 24のヌクレオチド配列部分に対応するアミノ酸配列部分であり、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列の1～383番目アミノ酸配列または83～145番目アミノ酸配列などを有する。

[0033] Porphyromonas gulaeのタイプBのFimAは、他のタイプのFimA（タイプAまたはタイプC）にはない特徴的なアミノ酸配列を有する。この特徴的なアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 25またはSEQ ID NO: 26のヌクレオチド配列部分に対応するアミノ酸配列部分であり、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列の1～386番目アミノ酸配列または178～295番目アミノ酸配列などを有する。

[0034] Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAは、他のタイプのFimA（タイプAまたはタイプB）にはない特徴的なアミノ酸配列を有する。この特徴的なアミノ酸配列は、SEQ ID NO: 21またはSEQ ID NO: 22のヌクレオチド配列部分に対応するアミノ酸配列部分であり、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列の11～388番目アミノ酸配列または104～313番目アミノ酸配列などを有する。

[0035] ここで、それぞれのタイプにおいて、特徴的なアミノ酸配列のアミノ酸配列部分という場合、それぞれのタイプに特徴的なヌクレオチド配列がインフ

レームのヌクレオチド配列を規定していないので、アミノ酸配列の両端は厳密に規定されたものではなくてもよい。例えば、タイプCのSEQ ID NO: 21のヌクレオチド配列を例に挙げる場合、上述したように1～388番目アミノ酸配列または104～313番目アミノ酸配列を例として挙げたが、前者の場合には両端に対してそれぞれ±2個ずつのアミノ酸の付加、短縮を許容することができる。

[0036] なお、本明細書において、タイプAのfimAを有する代表的なPorphyromonas gulaeとしてATCC51700を選択し、そのfimAのヌクレオチド配列を、SEQ ID NO: 1として示し、その配列によりコードされるタイプAのFimAのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 2として示す。タイプBのfimAを有する代表的なPorphyromonas gulaeとしてD044を選択し、そのヌクレオチド配列をSEQ ID NO: 3として示し、その配列によりコードされるタイプBのFimAのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 4として示す。そして、タイプCのfimAを有する代表的なPorphyromonas gulaeとしてD049を選択し、そのヌクレオチド配列をSEQ ID NO: 5として示し、その配列によりコードされるタイプCのFimAのアミノ酸配列をSEQ ID NO: 6として示す。これらの細菌株の他にも、タイプAのFimAを有する細菌株としては、D024、D025、D028、D034、D035、D036、D042、D043、D060、D066、D067及びD068、ATCC51700などが例として挙げられる。タイプBのFimAを有する細菌株としては、D040、D044、D052、D053、D077及びB43が例として挙げられる。タイプCのFimAを有する細菌株としては、D049が例として挙げられる。

[0037] Porphyromonas gulaeのFimAの存在を調べる工程としては、具体的には、例えば、イヌの口腔や体内（血液）から、唾液、歯垢、歯石、口腔拭い液、又は血液由来試料などの試料を採取し、この中に存在する細菌のDNAを抽出する。この細菌DNAの中に含まれているPorphyromonas gulaeのDNAを鋳型として、Porphyromonas gulaeに特異的なプライマーセット〔5'-ttg ctt ggt tgc atg atc gg-3'（SEQ ID NO: 7）および5'-gct tat tct tac ggt aca ttc aca-3'（SEQ ID NO: 8）〕を使用する初期（第一次）スクリーニングにより、Porphyromonas gulaeを検出する。この初期（第一次）スクリーニングについて

陽性であったサンプルについて、さらに、試料にPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAを含まれているか否かを調べる。

[0038] 本発明において、試料がPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAヌクレオチドを含んでいるか否かを調べるには、例えば、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimA をコードする配列のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドに対して特異的なプライマーセットを使用するPCRにより調べることができる。具体的には、例えば、SEQ ID NO: 21またはSEQ ID NO: 22（タイプC）の配列のヌクレオチド配列を増幅するが、SEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 24（タイプA）及びSEQ ID NO: 25またはSEQ ID NO: 26（タイプB）の各配列のヌクレオチド配列は増幅しないプライマーセットを使用することができる。具体的には、例えば、〔5’-cga tta tga cct tgt cgg taa gag ctt gga-3’（SEQ ID NO: 13）及び5’-tgt ggc ttc gtt gtc gca gaa tcc ggc atg-3’（SEQ ID NO: 14）のプライマーペアや、〔5’-gac ttg ctg ccc ttg cga tga cag ctt gta-3’（SEQ ID NO: 19）及び5’-ttt agt cgt ttg acg ggt cga tta cca agt-3’（SEQ ID NO: 20）のプライマーペアを使用することができる。

[0039] また、試料がPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAタンパク質を含んでいるか否かを調べるには、例えば、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAのアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的である抗体又はその抗体の抗原結合部位を含む誘導体を使用してPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAタンパク質を検出することにより調べることもできる。具体的には、例えば、SEQ ID NO: 6（タイプC）のアミノ酸配列からなるポリペプチドに対して結合するが、SEQ ID NO: 2（タイプA）及びSEQ ID NO: 4（タイプB）の各アミノ酸配列からなるポリペプチドに対して結合しない抗体又はその誘導体を使用することができる。この様な抗体又はその誘導体は、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAに特異的であれば使用可能であり、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。利用性の観点からはモノクローナル抗体であることが好ましい。本発明に使用可能なモノクローナル抗体は、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝

子を含む発現ベクターで形質転換した宿主により産生されるもの等を含む。

[0040] さらに、本実施形態で、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、タイプBのFimA及びタイプCのFimAの各含有レベルを調べる工程においては、タイプA、及びタイプBの含有レベルも、タイプCの場合と同様に調べることができる。

[0041] 例えば、Porphyromonas gulaeのFimAを核酸配列レベルで調べる場合、タイプCを調べる工程について上述したのと同様に、タイプAのfimAに特異的である各プライマーセット及びタイプBのfimAに特異的である各プライマーセットを使用してPCRにより調べてもよい。

[0042] 本実施形態で使用可能なプライマーセットは特に限定されないが、例えば、タイプAのfimAに特異的なプライマーセットとして、SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド又はSEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 24のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドに特異的なプライマーセットを、そしてタイプBのfimAに特異的なプライマーセットとして、SEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチド又はSEQ ID NO: 25またはSEQ ID NO: 26のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドに特異的なプライマーセットを、それぞれ使用することができる。具体的には、例えば、Porphyromonas gulaeのタイプAのfimAに対して特異的なプライマーセットは、〔5'-tga gaa tat caa atg tgg tgc agg ctc acg-3' (SEQ ID NO: 9) および5'-ctt gcc tgc ctt caa aac gat tgc ttt tgg-3' (SEQ ID NO: 10) 〕のプライマーセットや、〔5'-ttc ata cgt cga cga ctg cg-3' (SEQ ID NO: 15) および5'-ttg agg gtt gat tac caa gt-3' (SEQ ID NO: 16) 〕のプライマーセットを、そしてPorphyromonas gulaeのタイプBのfimAに対して特異的なプライマーセットは、〔5'-taa gat tga agt gaa gat gag cga ttc tta tgt-3' (SEQ ID NO: 11) および5'-att tcc tca gaa ctc aaa gga gta cca tca-3' (SEQ ID NO: 12) 〕のプライマーセットや、〔5'-aac tac gac gct ata tgc aa-3' (SEQ ID NO: 17) および5'-tag aca aac tat gaa agt t-3' (SEQ ID NO: 18) 〕のプライマーセットを、それぞれ使用することができる。

[0043] 例えば、本実施形態でPorphyromonas gulaeのFimAをアミノ酸配列レベルで

調べる場合、タイプCを調べる工程について上述したのと同様に、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、およびタイプBのFimAの各含有レベルを調べる工程は、Porphyromonas gulaeのタイプA、およびタイプBの各FimAに特異的な各抗体又はそれらの抗体の抗原結合部位を含む各誘導体を使用して各含有レベルを調べてもよい。

[0044] 本実施形態で使用可能な抗体又はその誘導体は特に限定されないが、例えば、タイプAのFimAに特異的な抗体又はその誘導体として、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるポリペプチド又はには結合するがSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列からなるポリペプチド（タイプB）またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチド（タイプC）には結合しない抗体又はその誘導体を、タイプBのFimAに特異的な抗体又はその誘導体として、SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列からなるポリペプチドには結合するがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるポリペプチド（タイプA）またはSEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチド（タイプC）には結合しない抗体又はその誘導体を、そしてタイプCのFimAに特異的な抗体又はその誘導体として、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチドには結合するがSEQ ID NO: 2のアミノ酸配列からなるポリペプチド（タイプA）またはSEQ ID NO: 4のアミノ酸配列からなるポリペプチド（タイプB）には結合しない抗体又はその誘導体を、それぞれ使用することができる。

[0045] Porphyromonas gulaeのタイプA、タイプB又はタイプCのFimAタンパク質に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用して、例えば、以下のようにして作製できる。まず、Porphyromonas gulaeのタイプA、タイプB又はタイプCのFimAタンパク質を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫する。免疫動物から得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させて、ハイブリドーマを得る。更に、このハイブリドーマから、通常のスクリーニング法により、目的とする抗体を産生する細胞をスクリーニングすることによってPorphyromonas gulaeのタイプA、タイプB又はタイプCのFimAに特異的な抗体を産生するハイブ

リドーマを選択できる。

[0046] また、各タイプのFimAの含有レベルの比較は、核酸配列レベルで調べる場合にはRT-PCR法など、またアミノ酸配列レベルで調べる場合にはELISA法など、いずれも公知の方法により行うことができるが、例えば、次のようにして比較することもできる。

[0047] まず、被検体から採取した試料について、その一部を希釈して希釈試料を用意する。例えば、イヌ被検体から採取した試料を階段希釈して複数の資料からなる希釈系列を作製すればよい。試料は濃度のバリエーションが多いほど正確な診断ができるため、互いに濃度の異なる試料を2つ以上用意することが好ましく、3つ以上用意することがより好ましく、4つ以上用意することがさらに好ましい。濃度の異なる試料を4つ用意する場合は、例えば、1/10の階段希釈の場合、原液の試料、並びに、試料の1/10濃度、1/100濃度及び1/1000濃度の濃度の試料を用意することが好ましい。

[0048] 次に、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、タイプBのFimA及びタイプCのFimAそれぞれの、含有シグナルが検出できる試料の最低濃度を調べる。各FimAの含有レベルの検出は、例えば、各試料中の各fimA又は各FimAの含有シグナルを調べればよい。例えば、試料中のタイプAのfimAの含有レベルはSEQ ID NO:1、SEQ ID NO: 23又はSEQ ID NO: 24、試料中のタイプBのFimAの含有レベルはSEQ ID NO:3、SEQ ID NO: 25又はSEQ ID NO: 26、試料中のタイプCのFimAの含有レベルはSEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 21又はSEQ ID NO: 22のヌクレオチド配列からなる各ポリヌクレオチドに対して特異的なプライマーセットを使用するPCRにより調べることができ、

試料中のタイプAのFimAの含有レベルはSEQ ID NO:2、試料中のタイプBのFimAの含有レベルはSEQ ID NO:4、試料中のタイプCのFimAの含有レベルはSEQ ID NO: 6のそれぞれのアミノ酸配列からなる各ポリペプチドに特異的な各抗体又はその抗体の抗原結合部位を含む誘導体を使用して調べてもよい。

[0049] 次に、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有シグナルが検出できる試料の最低濃度が、Porphyromonas gulaeのタイプA及びタイプBのFimAの各含

有シグナルが検出できる各試料の最低濃度よりも低い場合は、被検体は僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断する。

[0050] Porphyromonas gulaeのFimAのタイプA及びタイプBの含有レベルとタイプCの含有レベルとを比較する本実施形態は、Porphyromonas gulaeのFimAのタイプCの含有有無を調べる実施形態よりも、より正確な僧帽弁閉鎖不全症であるリスク又は僧帽弁閉鎖不全症を発症するリスクの診断が可能になる。

[0051] 僧帽弁閉鎖不全症は治療が困難であることから予防することが重要である。また、僧帽弁閉鎖不全症である場合には早期の発見が重要である。従って、僧帽弁閉鎖不全症であるリスクや僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを診断することのできる本発明は有用である。

[0052] イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制する方法

被検体は僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断された場合、被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を低減させることにより、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制することができる。被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を低減させるには、例えば、被検体の歯垢又は歯石の除去、被検体の口腔内の洗浄又は被検体への医薬の投与により、行うことができる。

[0053] 被検体に投与する医薬は、例えば、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体又はその抗体の抗原結合部位を含む誘導体を有効成分とする医薬を用いることができる。口腔内スプレー、ジェルなどの形状で口腔内に使用することもでき、又は、経口的又は非経口的に血液中に導入してもよい。

[0054] イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクの診断用バイオマーカー

本発明の他の実施態様は、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクの診断用バイオマーカーである。

[0055] 本発明の一実施形態に係る診断用バイオマーカーは、SEQ ID NO: 5のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる。本発明の他の実施形態に係る診断用バイオマーカーは、SEQ ID NO: 21またはSEQ ID NO: 22のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドからなる。本発明の他の実施形態に係る診断用バイオマーカーは、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその部分ポリペプチドからなる。

[0056] 本発明に係るバイオマーカーが被検体から検出された場合、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断することができる。

[0057] イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制するための医薬

本発明の他の実施態様は、SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列からなるポリペプチドまたはその部分ポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体又はその抗体の抗原結合部位を含む誘導体を有効成分とする、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制するための医薬である。

[0058] 本発明に係る医薬を、例えば、僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断された被検体に投与することにより、僧帽弁閉鎖不全症の予防又は僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制することができる。

[0059] イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用キット

本発明の他の実施態様は、Porphyromonas gulaeのFimAをタイプA、タイプB及びタイプCに分類するためのプライマーセットを含む、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用キットである。

[0060] 本発明の診断用キットの一実施形態は、Porphyromonas gulaeのタイプA、タイプB及びタイプCの各fimAに特異的なプライマーセットを含む。具体的には、例えば、Porphyromonas gulaeのタイプAのfimAに対して特異的なプライ

マーセット〔5’-tga gaa tat caa atg tgg tgc agg ctc acg-3’(SEQ ID NO: 9)および5’-ctt gcc tgc ctt caa aac gat tgc ttt tgg-3’(SEQ ID NO: 10)〕、または〔5’-ttc ata cgt cga cga ctg cg-3’(SEQ ID NO: 15)および5’-ttg agg gtt gat tac caa gt-3’(SEQ ID NO: 16)〕、Porphyromonas gulaeのタイプBのfimAに対して特異的なプライマーセット〔5’-taa gat tga agt gaa gat gag cga ttc tta tgt-3’(SEQ ID NO: 11)および5’-att tcc tca gaa ctc aaa gga gta cca tca-3’(SEQ ID NO: 12)〕、または〔5’-aac tac gac gct ata tgc aa-3’(SEQ ID NO: 17)および5’-tag aca aac tat gaa agt t-3’(SEQ ID NO: 18)〕、Porphyromonas gulaeのタイプCのfimAに対して特異的なプライマーセット〔5’-cga tta tga cct tgt cgg taa gag ctt gga-3’(SEQ ID NO: 13)および5’-tgt ggc ttc gtt gtc gca gaa tcc ggc atg-3’(SEQ ID NO: 14)〕、または〔5’-gac ttg ctg ccc ttg cga tga cag ctt gta-3’(SEQ ID NO: 19)および5’-ttt agt cgt ttg acg ggt cga tta cca agt-3’(SEQ ID NO: 20)〕、をプライマーセットとして含んでもよい。

[0061] 本発明の他の実施形態に係る診断用キットは、Porphyromonas gulaeのタイプA、タイプB及びタイプCの各FimAそれぞれに特異的な各抗体又はそれらの誘導体を含む。

[0062] イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用チップ

本発明の他の実施態様は、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用チップである。本チップに試料を添加することにより、試料中におけるPorphyromonas gulaeのタイプA、タイプB及びタイプCの各FimAの含有レベルを一度に検出してイヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断をすることができる。

[0063] 本発明の一実施形態に係るイヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用チップは、複数のウェルが設けられたチップであって、Porphyromonas gulaeのタイプA、タイプB及びタイプCの各fimAのそれぞれに相補的な配列を有する各ヌクレオチドがそれぞれ異なるウェル内に結合されている。

[0064] 本発明の他の実施形態に係るイヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用チップは、Porphyromonas gulaeのタイプA、タイプB及びタイプCの各FimAそれぞれに特異

的な各抗体又はそれらの誘導体がそれぞれ異なるウェル内に結合されている。

実施例

[0065] 実施例1：サンプルの採取

本実施例において、様々なイヌの口腔からサンプルを採取した。

[0066] まず、2012年～2013年に東京の獣医クリニックに来訪し僧帽弁閉鎖不全症と診断された25頭のイヌを、登録した（MR群）。さらに、同一のクリニックで同じ期間に健康な状態と判断され、そして年齢分布および性別分布を適合させた36頭のイヌを、対照として使用した（対照群）。この研究プロトコルは、麻布大学の動物実験委員会により承認を受けた（No. 130307-3）。サンプル採取に先立ち、飼い主に研究の目的を知らせ、そして参加の意思について承諾を受けた。サンプル採取前の過去3ヶ月の間に抗生物質治療を承けたイヌはいなかった。シードスワブ1号又は2号（Eiken Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan）を用いて各イヌの歯列全体の歯肉周縁を拭い、口腔試料を得た。

[0067] ACVIM（American College of Veterinary Internal Medicine）の機能分類（Atkins et al., 2009. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. J Vet Intern Med. 23:1142-1150.）に従って、MR群の25頭のイヌ（18頭のオス、7頭のメス；10.8±0.3歳）を、身体検査、胸部X線写真、心電図記録法、および心エコー検査での知見に基づいて診断した。MR群の犬種は、チワワ（n=8）、キャバリアキングチャールズスパニエル（n=4）、ポメラニアン（n=3）、ビーグル（n=2）、ミニチュアシュナウザー（n=2）、トイプードル（n=2）、雑種（n=2）、マルチーズ（n=1）およびヨークシャーテリア（n=1）であった。対照群における36頭の健康なイヌ（19頭のオス、17頭のメス、10.6±0.4歳）には、身体検査、胸部X線写真、心電図記録法、および心エコー検査での知見により、異常な心臓症状を示す個体はいなかった。対照群の犬種は、ミニチュアダックスフント（n=13），ヨークシャーテリア（n=3）、イングリッシュコッカースパニエル（n=2）、パピヨン（n=2）、シェットランドシープドッグ（n=2）、およびベア

デッドコリー、チワワ、ビーグル、イングリッシュセッター、ゴールデンレトリーバー、ラブラドールレトリーバー、マルチーズ、ミニチュアシュナウザー、ノーウィッチテリア、ポメラニアン、パグ、シーズー、トイプードル、および雑種が各1頭であった。

[0068] 実施例2：サンプルを採取したイヌの口腔症状の評価

本実施例では、サンプルを採取したイヌの口腔症状を、歯石体積、歯肉炎および歯周炎についての以下の様なパラメータを使用して調べた。

[0069] 歯石蓄積に関する歯石スコアは、以下の基準により代表歯（第四前臼歯もしくは第一後臼歯）の状態を評価した；（3）半分以上の領域、（2）半分以下の領域、（1）歯の辺縁に僅か、および（0）なし。歯肉炎症に関する歯肉スコアは、以下の基準により評価した；（3）歯列全体で顕著な炎症が見られる、（2）一部の歯列で顕著な炎症が見られる、（1）歯の辺縁においてのみわずかな炎症が見られる、および（0）顕著な知見なし。歯周炎に関する歯周スコアは、以下の様に評価した；（3）重度のアタッチメントロスを伴う歯のぐらつき、（2）歯全体の四分の一以上でアタッチメントロスが見られるが歯のぐらつきなし、（1）歯全体の四分の一以下でアタッチメントロスが見られる、および（0）顕著な知見なし。各スコアは、MR群及び対照群における平均値及び標準誤差を算出した。結果を表1に示す。

[0070] [表1]

	MR群（n=25）	対照群（n=36）	統計的解析
年齢 [平均±SE（範囲）]	10.8±0.3 （6～13）	10.6±0.4 （8～15）	NS[a]
口腔状態			
歯石スコア （平均±SE）	1.7±0.1	1.8±0.2	NS[a]
歯肉炎スコア （平均±SE）	0.8±0.2	0.8±0.1	NS[a]
歯周炎スコア （平均±SE）	0.6±0.2	0.3±0.1	P=0.0296

[a]NS：非有意

[0071] 歯石スコアおよび歯肉炎スコアに関しては、MR群と対照群との間で有意差はなかった。一方、MR群の歯周炎スコアは、対照群の歯周スコアと比較して有意に高かった（P＜0.05）。

[0072] 実施例3：Porphyromonas gulaeのFimAのタイプに基づいたサンプルの分類

本実施例では、各サンプルに含まれるPorphyromonas gulaeのFimAのタイプに基づいて、サンプルの分類を行った。

[0073] 表2に記載のPorphyromonas gulaeに特異的なプライマーセット（Kato et al., 2011, Molecular detection of human periodontal pathogens in oral swab specimens from dogs in Japan. Journal of Veterinary Dentistry 28, 84-89.）を使用したPCRによりPorphyromonas gulaeの検出を行った。PCRは、供給者の指示にしたがって、1μlの鋳型溶液およびEx Taqポリメラーゼ（Takara Bio. Inc., Otsu, Japan）を含む全量20μlを用いて行った。PCR増幅反応は、95℃にて4分間の初期変性の後、95℃にて30秒間、60℃にて30秒間および72℃にて30秒間のサイクルを30サイクル、そして72℃にて7分間の最終伸長とするサイクルパラメータを使用して、サーマルサイクラー（iCycler；Bio-Rad, Hercules, CA, USA）を用いて行った。得られたPCR生成物を、1.5%アガロースゲル-Tris-酢酸-EDTAバッファー中で電気泳動にかけた。その後、ゲルを0.5μg/mlのエチジウムブロマイドで染色し、UV照明の下で写真撮影して、増幅されたフラグメントを検出した。100-bp DNAラダー（New England BioLabs, Beverly, MA, USA）を分子サイズマーカーとして使用した。

[0074]

[表2]

特異的プライマー	配列（5'→3'）	増幅サイズ
P. gulae の検出		
P. gulae 16S rRNA	ttg ctt ggt tgc atg atc gg gct tat tct tac ggt aca ttc aca	314
fimA 型の詳細		
Type A fimA		
Pgufim-AF[a]	tga gaa tat caa atg tgg tgc agg ctc acg acg	190
Pgufim-AR[a]	ctt gcc tgc ctt caa aac gat tgc ttt tgg	
Type B fimA		
Pgufim-BF[a]	taa gat tga agt gaa gat gag cga ttc tta tgt	357
Pgufim-BR[a]	att tcc tca gaa ctc aaa gga gta cca tca	
Type C fimA		
Pgufim-CF[a]	cga tta tga cct tgt cgg taa gag ctt gga	631
Pgufim-CR[a]	tgt ggc ttc gtt gtc gca gaa tcc ggc atg	

[0075] 次に、Porphyromonas gulae陽性の各サンプル中の100個体以上のPorphyromonas gulaeからDNAを抽出した。

[0076] そして、1（希釈せず）、1／10、1／100、1／1000の濃度に調製した各DNA抽出サンプルについて、表2に記載の各fimA型に特異的なプライマーを用いるPCRを行い、増幅した各フラグメントを検出した(Nomura et al., 2012. Journal of Veterinary Medical Sciences 74, 885-891.、Yamasaki et al., 2012. Veterinary Microbiology 28, 196-205.Yamasaki et al., 2013)。PCR及びフラグメントの検出は上記と同様に行った。フラグメントの検出では、各fimAタイプの検出限界のサンプル濃度を特定し、その濃度の最も低いfimAタイプをそのサンプルのドミナントタイプとした。2つ以上のタイプで検出限界が同じであった場合は、優劣なしと判断した。

[0077] fimAがタイプAであるATCC51700、fimAがタイプBであるD077、及び、FimAがタイプCであるD049のゲノムDNAをテンプレートとして、表2に記載の各プライマーセットを用いてPCRを行い、各fimAのフラグメントを検出した結果を図1Aに示す。表2に記載のプライマーにより各タイプのfimAを増幅できることが確認できた。

[0078] Porphyromonas gulae陽性の各サンプルについての代表的な結果を図1B～Dに示す。

[0079] 図1Bに示すサンプルでは、タイプAについては1～10^{-3}の全てのサンプル濃度でバンドが検出されたが、タイプBについてはサンプル濃度が1、10^{-1}の場合のみ、タイプCについてはサンプル濃度が1の場合のみでバンドが検出された。このため、図1Bに示すサンプルはタイプAドミナントと分類した。

[0080] 図1Cに示すサンプルでは、タイプBについては1～10^{-3}の全てのサンプル濃度でバンドが検出されたが、タイプAについてはサンプル濃度が1の場合のみ、タイプCについてはサンプル濃度が1の場合のみでバンドが検出された。このため、図1Cに示すサンプルは、タイプBドミナントと分類した。

[0081] 図1Dでは、タイプCについては1～10^{-3}の全てのサンプル濃度でバンドが検出されたが、タイプAについてはサンプル濃度が1の場合のみ、タイプBついてはサンプル濃度が1～10^{-2}の場合のみでバンドが検出された。このため、図1Dに示すサンプルは、タイプCドミナントと分類した。

[0082] 実施例4：fimA遺伝子型と僧帽弁閉鎖不全症との相関性についての解析

本実施例では、FimAがタイプCのPorphyromonas gulaeがイヌの口腔内に存在することと、イヌが僧帽弁閉鎖不全症であることとが相関性を有することを示す。

[0083] コンピュータソフトウェアパッケージ、StatView 5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) およびPrism 4 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) を使用して、統計解析を行った。Fisherの制約付最小有意差検定により、各歯肉症状を有する各fimA遺伝子型の検出頻度を比較した。オッズ比 (OR) および95%信頼区間 (CI_{95}) 値を算出して、イヌの口腔内から採取した試料中の各fimA遺伝子型と各歯周症状との相関性を調べた。0.05未満のP値は、統計的に有意であると考えられた。

[0084] MR群および対照群から得られた口腔試料における、Porphyromonas gulaeおよびそのfimA遺伝子型の度数分布を、表3に示す。Porphyromonas gulaeは、両方の群のサンプルのほぼ全てで検出された。その一方で、対照群では、タ

イプAドミナントのサンプルがMR群と比較して有意に多かった（P＜0.05）。そして、MR群では、タイプCドミナントのサンプルが対照群と比較して有意に多かった（P＜0.05）。MR群におけるタイプAドミナントおよびタイプCドミナントの検出についてのオッズ比は、それぞれ0.22および3.82であった。

[0085] [表3]

	MR 群（n=25）	対照群（n=36）	統計的解析
PCR 検出			
P. gulae-陽性	24（96.0%）	33（91.7%）	NS[a]
			P=0.0159
A-ドミナント	5（20.0%）	19（52.8%）	OR：0.22
			(CI_{95}：0.07～0.73)
B-ドミナント	3（12.0%）	4（11.1%）	NS[a]
			P=0.0253
C-ドミナント	12（48.0%）	7（19.4%）	OR：3.82
			(CI_{95}：1.22～11.94)
A=C	2（ 8.0%）	1（2.8%）	NS[a]
A=B=C	0（ 0%）	1（2.8%）	NS[a]
型不明	2（ 8.0%）	1（2.8%）	NS[a]

[a]NS：非有意

[0086] この結果から、fimA遺伝子型がタイプCであるPorphyromonas gulaeが口腔内に存在するイヌの多くが、僧帽弁閉鎖不全症であるということが明らかになった。Porphyromonas gulaeは、口腔内から体内に侵入し、血液を介してイヌの体内の僧帽弁まで到達していると考えられた。

産業上の利用可能性

[0087] 本発明の方法により、イヌが僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有するか診断することが可能になり、また、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制することが可能になる。

配列表フリーテキスト

[0088] SEQ ID NO: 1：Porphyromonas gulaeの標準株（タイプA）であるATCC51700のフィンブリリンタンパク（Fimbrillin）、FimAをコードするfimA遺伝子の

ヌクレオチド配列。

[0089] SEQ ID NO: 2：SEQ ID NO: 1のヌクレオチド配列によりコードされるFimAのアミノ酸配列。

[0090] SEQ ID NO: 3：Porphyromonas gulaeのタイプBのFimAをコードするfimA遺伝子のヌクレオチド配列。

[0091] SEQ ID NO: 4：SEQ ID NO: 3のヌクレオチド配列によりコードされるFimAのアミノ酸配列。

[0092] SEQ ID NO: 5：Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAをコードするfimA遺伝子のヌクレオチド配列。

[0093] SEQ ID NO: 6：SEQ ID NO: 5のヌクレオチド配列によりコードされるFimAのアミノ酸配列。

[0094] SEQ ID NO: 7およびSEQ ID NO: 8：Porphyromonas gulaeに特異的なプライマーセット。

[0095] SEQ ID NO: 9およびSEQ ID NO: 10： Porphyromonas gulaeのタイプAのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列を増幅するために使用されるプライマーペア。

[0096] SEQ ID NO: 11およびSEQ ID NO: 12： Porphyromonas gulaeのタイプBのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列を増幅するために使用されるプライマーペア。

[0097] SEQ ID NO: 13およびSEQ ID NO: 14： Porphyromonas gulaeのタイプCのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列を増幅するために使用されるプライマーペア。

[0098] SEQ ID NO: 15およびSEQ ID NO: 16： Porphyromonas gulaeのタイプAのfimA遺伝子のヌクレオチド配列を増幅するために使用されるプライマーペア。

[0099] SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 18： Porphyromonas gulaeのタイプBのfimA遺伝子のヌクレオチド配列を増幅するために使用されるプライマーペア。

[0100] SEQ ID NO: 19およびSEQ ID NO: 20： Porphyromonas gulaeのタイプCのfimA遺伝子のヌクレオチド配列を増幅するために使用されるプライマーペア。

[0101] SEQ ID NO: 21：SEQ ID NO: 13およびSEQ ID NO: 14の組み合わせのプライマーペアにより増幅された、Porphyromonas gulaeのタイプCのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列。

[0102] SEQ ID NO: 22：SEQ ID NO: 19およびSEQ ID NO: 20の組み合わせのプライマーペアにより増幅された、Porphyromonas gulaeのタイプCのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列。

[0103] SEQ ID NO: 23：SEQ ID NO: 9およびSEQ ID NO: 10の組み合わせのプライマーペアにより増幅された、Porphyromonas gulaeのタイプAのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列。

[0104] SEQ ID NO: 24：SEQ ID NO: 15およびSEQ ID NO: 16の組み合わせのプライマーペアにより増幅された、Porphyromonas gulaeのタイプAのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列。

[0105] SEQ ID NO: 25：SEQ ID NO: 11およびSEQ ID NO: 12の組み合わせのプライマーペアにより増幅された、Porphyromonas gulaeのタイプBのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列。

[0106] SEQ ID NO: 26：SEQ ID NO: 17およびSEQ ID NO: 18の組み合わせのプライマーペアにより増幅された、Porphyromonas gulaeのタイプBのfimA遺伝子のヌクレオチド配列の部分配列。

請求の範囲

[請求項1] イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク診断方法であって、

イヌ被検体から採取した試料中に、Porphyromonas gulaeが関連するリスク因子が存在するか否かを調べる工程と、

前記試料中に前記リスク因子が存在する場合に、前記イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断する工程と、

を有する前記方法。

[請求項2] 前記試料が、唾液、歯垢、歯石、口腔拭い液、又は血液由来試料である、請求項1に記載の方法。

[請求項3] Porphyromonas gulaeが関連するリスク因子が、

（i）イヌ被検体から採取した試料が、Porphyromonas gulaeのタイプCのフィンブリリン（fimbrillin）FimAを含有していること、または

（ii） イヌ被検体から採取した試料中に、Porphyromonas gulaeのタイプAのフィンブリリン（fimbrillin）FimA、及びPorphyromonas gulaeのタイプBのFimAの各含有レベルと比較して、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いこと、

である、請求項1または2に記載の方法。

[請求項4] 前記リスク因子の存在を、SEQ ID NO:21またはSEQ ID NO: 22のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドに対して特異的なプライマーセットを使用するPCRによりPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAが含有されるか否かを核酸配列レベルで調べることにより特定する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[請求項5] 前記リスク因子の存在を、

SEQ ID NO:6のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的な抗体又はその誘導体を使用してPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAタンパク質を検出することによりPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAが

含有されるか否かをアミノ酸配列レベルで調べることにより特定する、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[請求項6] 前記Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、Porphyromonas gulaeのタイプBのFimA及びPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAの各含有レベルを調べ、それぞれを比較することにより、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いことを特定する、請求項3に記載の方法。

[請求項7] イヌ被検体から採取した試料を階段希釈して、2以上の試料を用意し、

前記2以上の試料中のPorphyromonas gulaeのタイプAのフィンブリリン（fimbrillin）FimA、Porphyromonas gulaeのタイプBのFimA及びPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAの各含有シグナルを検出し、

Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有シグナルが検出された最低濃度の試料が、Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA及びPorphyromonas gulaeのタイプBのFimAの含有シグナルが検出された最低濃度の試料よりも低い濃度の試料である場合に、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いことを特定する、

請求項3に記載の方法。

[請求項8] 前記Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、Porphyromonas gulaeのタイプBのFimA及びPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAを、タイプAについてはSEQ ID NO: 23またはSEQ ID NO: 24、タイプBについてはSEQ ID NO: 25またはSEQ ID NO: 26及びタイプCについてはSEQ ID NO:21またはSEQ ID NO: 22のそれぞれのヌクレオチド配列からなる各ポリヌクレオチドに特異的な各プライマーセットを使用してPCRによりPorphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いことを核酸配列レベルで調べる、請求項6または7に記載の方法。

[請求項9] 前記Porphyromonas gulaeのタイプAのFimA、前記Porphyromonas gulaeのタイプBのFimA及び前記Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAを

、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4及びSEQ ID NO:6それぞれのアミノ酸配列からなる各ポリペプチドに特異的な各抗体又はそれらの誘導体を使用して検出することにより、Porphyromonas gulaeのタイプCのFimAの含有レベルが最も高いことをアミノ酸配列レベルで調べる、請求項6または7に記載の方法。

[請求項10] 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法において、前記イヌ被検体が僧帽弁閉鎖不全症であるリスクを有し又は僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクを有すると診断された場合に、前記イヌ被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を低減させる工程を有する、

イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制する方法。

[請求項11] 前記イヌ被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を、前記イヌ被検体の歯垢又は歯石を除去することにより低減させる、請求項10に記載の方法。

[請求項12] 前記イヌ被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を、前記イヌ被検体の口腔を洗浄することにより低減させる、請求項10に記載の方法。

[請求項13] 前記イヌ被検体が口腔内又は体内に有するタイプCのFimAを有するPorphyromonas gulaeの数を、前記イヌ被検体に医薬を投与することにより低減させる、請求項10に記載の方法。

[請求項14] 前記医薬は、SEQ ID NO:6のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体又はその誘導体を有効成分とする医薬である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] SEQ ID NO:21またはSEQ ID NO: 22のヌクレオチド配列からなるポリヌクレオチドを含む、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクの診断用バイオマーカー。

[請求項16] SEQ ID NO:6のアミノ酸配列またはその部分アミノ酸配列からなる

ポリペプチドからなる、イヌの僧帽弁閉鎖不全症のリスク又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の発症リスクの診断用バイオマーカー。

[請求項17] SEQ ID NO:6のアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体又はその誘導体を有効成分とする、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の予防又はイヌの僧帽弁閉鎖不全症の進行を抑制するための医薬。

[請求項18] Porphyromonas gulaeのフィンブリリン（fimbrillin)FimAのタイプA、タイプB及びタイプCに分類するためのプライマーセットを含む、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用キット。

[請求項19] Porphyromonas gulaeのタイプAのfimAに対して特異的なプライマーセット：

〔5'-tga gaa tat caa atg tgg tgc agg ctc acg-3'（SEQ ID NO: 9）および5'-ctt gcc tgc ctt caa aac gat tgc ttt tgg-3'（SEQ ID NO: 10）〕、または

〔5'-ttc ata cgt cga cga ctg cg-3'（SEQ ID NO: 15）および5'-ttg agg gtt gat tac caa gt-3'（SEQ ID NO: 16）〕、

Porphyromonas gulaeのタイプBのfimAに対して特異的なプライマーセット：

〔5'-taa gat tga agt gaa gat gag cga ttc tta tgt-3'（SEQ ID NO: 11）および5'-att tcc tca gaa ctc aaa gga gta cca tca-3'（SEQ ID NO: 12）〕、または

〔5'-aac tac gac gct ata tgc aa-3'（SEQ ID NO: 17）および5'-tag aca aac tat gaa agt t-3'（SEQ ID NO: 18）〕、

Porphyromonas gulaeのタイプCのfimAに対して特異的なプライマーセット：

〔5'-cga tta tga cct tgt cgg taa gag ctt gga-3'（SEQ ID NO: 13）および5'-tgt ggc ttc gtt gtc gca gaa tcc ggc atg-3'（SEQ ID NO: 14）〕、または

〔5'-gac ttg ctg ccc ttg cga tga cag ctt gta-3' (SEQ ID NO: 19) および5'-ttt agt cgt ttg acg ggt cga tta cca agt-3' (SEQ ID NO: 20)〕、

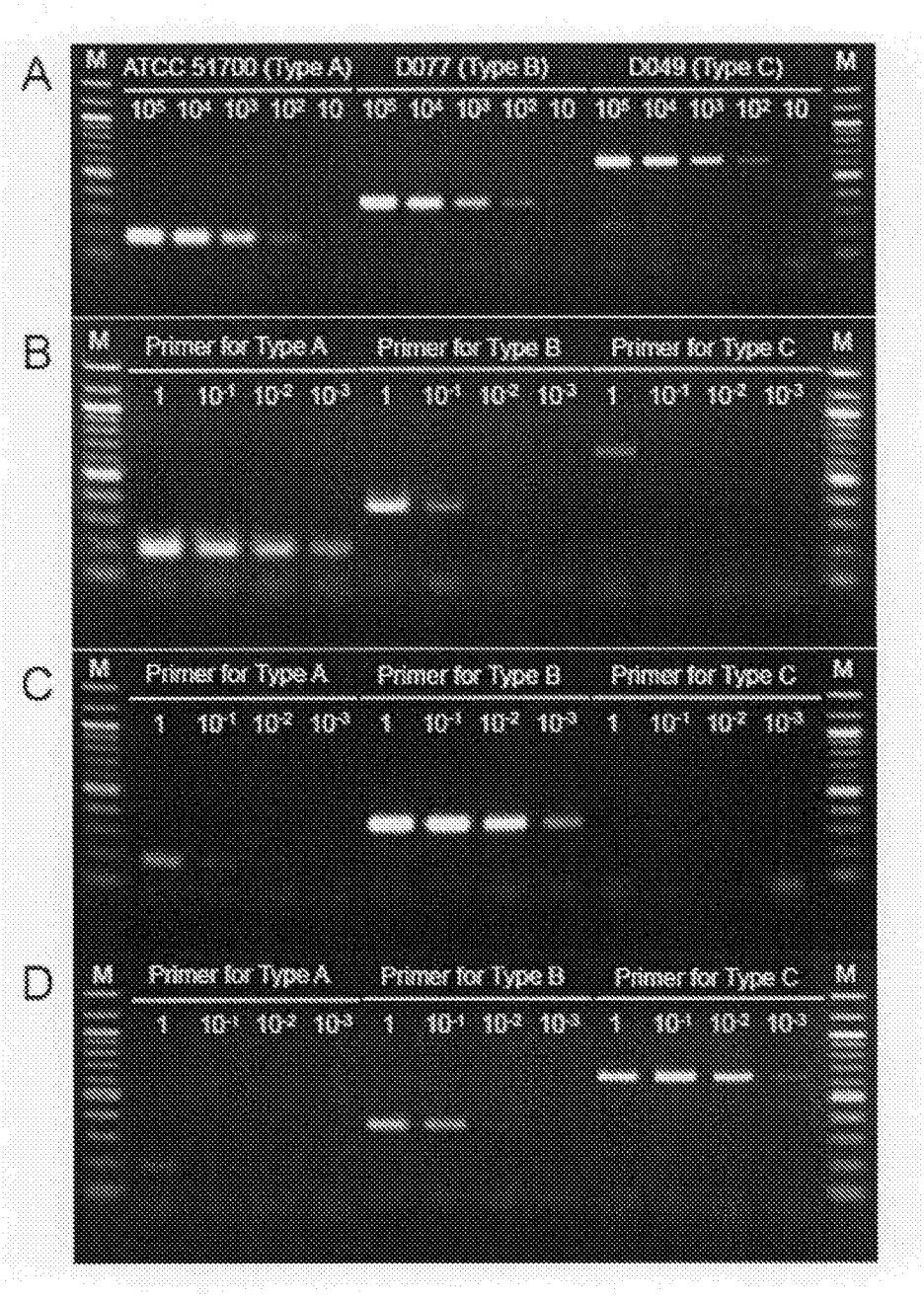
をプライマーセットとして含む、請求項18に記載のキット。

[請求項20] Porphyromonas gulaeのフィンブリリン (fimbrillin)FimAのタイプA、タイプB及びタイプCそれぞれに特異的な各抗体又はそれらの誘導体を含む、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用キット。

[請求項21] フィンブリリン (fimbrillin)fimAのタイプA、タイプB及びタイプCそれぞれに相補的な配列を有する各ヌクレオチドがそれぞれ異なるウェル内に結合されている、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用チップ。

[請求項22] フィンブリリン (fimbrillin)FimAのタイプA、タイプB及びタイプCそれぞれに特異的な各抗体又はそれらの誘導体がそれぞれ異なるウェル内に結合されている、イヌの僧帽弁閉鎖不全症の診断用チップ。

[図1]


A
M
ATCC 51700 (Type A)
D077 (Type B)
D049 (Type C)
M
10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10 10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10 10⁵ 10⁴ 10³ 10² 10
B
M
Primer for Type A
Primer for Type B
Primer for Type C
M
1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³
C
M
Primer for Type A
Primer for Type B
Primer for Type C
M
1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³
D
M
Primer for Type A
Primer for Type B
Primer for Type C
M
1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³ 1 10⁻¹ 10⁻² 10⁻³

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/066980

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P9/00*(2006.01)i, *C12M1/00*(2006.01)i, *C12Q1/68*(2006.01)i, *G01N33/569*(2006.01)i, *G01N37/00*(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/00-15/90, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	GLICKMAN L. et al., 'Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs', J. Am. Vet. Med. Assoc., 2009, 234(4), pp.486-494	1-2 1-22
X Y	Masami UECHI, "Dobutsu ni Okeru Shinzobyo Kenshin no Juyosei -Inu no Shinzobyo (Soboben Heisa Fuzensho) ni Tsuite Manabo!-", Dai 15 Kai Japanese Board of Veterinary Practitioners Forum 2013 Nen Nenji Taikai Proceeding, 2013 Nen, vol.15-2, page 236	1-2 1-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 September 2015 (02.09.15)	15 September 2015 (15.09.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/066980

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2013/089166 A1 (School Corporation, Azabu Veterinary Medicine Educational Institution), 20 June 2013 (20.06.2013), abstract; paragraphs [0007] to [0010]; examples & JP 2013-889166 A & US 2014/0335121 A1	1-22
Y	YAMASAKI Y. et al., 'Distribution and molecular characterization of Porphyromonas gulae carrying a new fimA genotype', Vet. Microbiol., 2012, 161(1-2), pp.196-205	1-22
A	JP 2008-500379 A (Pfizer Products Inc.), 10 January 2008 (10.01.2008), claims & US 2005/0010032 A1 & US 2003/0228328 A1 & US 2008/0311151 A1 & WO 2005/112993 A1 & WO 2003/054755 A2 & EP 1753454 A1	1-22
A	WO 2012/027288 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER), 01 March 2012 (01.03.2012), claims 1 to 33 & US 2013/0230462 A1 & EP 2606153 A2	1-22
P,X P,Y	Kiyoko WATANABE et al., "Inu Soboben Heisa Fuzensho no Shinzo Soshiki ni Okeru Shishubyo Kanren Saikin no Kenshutsu", Japanese journal of bacteriology, 2015 Nen 2 Gatsu, vol.70, no. 1, page 203, P2-075	1-2 1-22

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０６６９８０

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N15/00-15/90, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS /WPIDS(STN), UniProt/GeneSeq

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	GLICKMAN L. et al., 'Evaluation of the risk of endocarditis and other cardiovascular events on the basis of the severity of periodontal disease in dogs', J. Am. Vet. Med. Assoc., 2009, 234(4), pp.486-494	１－２ １－２２
X Y	上地正実, '動物における心臓病検診の重要性－犬の心臓病（僧帽弁閉鎖不全症）について学ぼう！－', 第１５回　日本臨床獣医学フォーラム　２０１３年　年次大会プロシーディング、２０１３年、１５－２巻、２３６頁	１－２ １－２２

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
０２．０９．２０１５	１５．０９．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　５０８２
竹内　祐樹
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ｙ	WO 2013/089166 A1（学校法人麻布獣医学園）2013.06.20, 要約、［０００７］－［００１０］、実施例 & JP 2013-889166 A & US 2014/0335121 A1	１－２２
Ｙ	YAMASAKI Y. et al., 'Distribution and molecular characterization of Porphyromonas gulae carrying a new fimA genotype', Vet. Microbiol., 2012, 161(1-2), pp.196-205	１－２２
Ａ	JP 2008-500379 A（ファイザー・プロダクツ・インク）2008.01.10, 特許請求の範囲 & US 2005/0010032 A1 & US 2003/0228328 A1 & US 2008/0311151 A1 & WO 2005/112993 A1 & WO 2003/054755 A2 & EP 1753454 A1	１－２２
Ａ	WO 2012/027288 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 2012.03.01, 請求項１－３３ & US 2013/0230462 A1 & EP 2606153 A2	１－２２
Ｐ，Ｘ Ｐ，Ｙ	渡辺清子、ほか１名，'イヌ僧帽弁閉鎖不全症の心臓組織における歯周病関連細菌の検出', 日本細菌学雑誌、２０１５年２月、７０巻、１号、２０３頁、Ｐ２－０７５	１－２ １－２２