

(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
2021年8月26日(26.08.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/167088 A1

(51) 国際特許分類:

A61K 45/00 (2006.01) *A61K 38/08* (2019.01)
A61P 9/12 (2006.01) *C12N 9/99* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01) *A61K 31/4164* (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 31/43* (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01) *A61K 31/7036* (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

特願 2020-028865 2020年2月21日(21.02.2020) JP

(71) 出願人: J S R 株式会社 (JSR Corporation)
[JP/JP]; 〒1058640 東京都港区東新橋一丁目9番2号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(71) 出願人: 中岡 良和 (NAKAOKA Yoshikazu) [JP/JP]; 〒5648565 大阪府吹田市岸部新町6番1号 国立研究開発法人国立循環器病研究センター内 Osaka (JP). 浅野 遼太郎 (ASANO Ryotaro) [JP/JP]; 〒5648565 大阪府吹田市岸部新町6番1号 国立研究開発法人国立循環器病研究センター内 Osaka (JP). 大郷 剛 (OGO Takeshi) [JP/JP]; 〒5648565 大阪府吹田市岸部

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/006448

(22) 国際出願日: 2021年2月19日(19.02.2021)

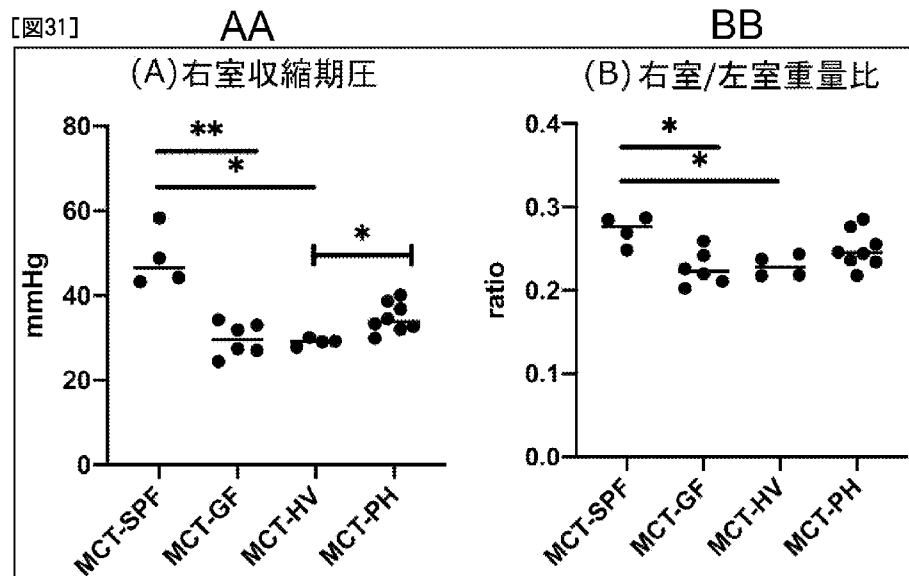
(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

(54) **Title:** COMPOSITION FOR ALLEVIATING PULMONARY HYPERTENSION, METHOD FOR PREDICTING PROGNOSIS OF PULMONARY HYPERTENSION, METHOD FOR ASSISTING IN DETERMINING SEVERITY OF PULMONARY HYPERTENSION, AND METHOD FOR ASSISTING IN DIAGNOSING PULMONARY HYPERTENSION

(54) 発明の名称: 肺高血圧症改善用組成物、肺高血圧症の予後予測方法、肺高血圧症の重症度判定補助方法および肺高血圧症の診断補助方法



AA Right ventricular systolic pressure

BB Weight ratio of right ventricle to left ventricle

(57) **Abstract:** The present invention provides: (1) a composition which is for alleviating pulmonary hypertension and contains, as an active ingredient, at least one substance that normalizes the intestinal flora of patients with pulmonary

新町 6 番 1 号 国立研究開発法人国立循環
器病研究センター内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 岩谷 龍 (IWATANI RYO); 〒5300003
大阪府大阪市北区堂島 2 丁目 1 番 3 1 号
京阪堂島ビル 6 階 Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN,
HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, 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,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, WS, 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))

hypertension; (2) a method for predicting the prognosis of patients with pulmonary hypertension or for assisting in determining the severity of pulmonary hypertension, the method comprising a step for detecting at least one kind of bacteria selected from among bacteria belonging to the genus Micrococcaceae, bacteria belonging to the genus Streptococcaceae, bacteria belonging to the genus Pasteurellaceae, bacteria belonging to the genus Veillonellaceae, and bacteria belonging to the genus Lactobacillaceae, in the intestinal flora of the patients with pulmonary hypertension; and (3) a method for assisting in diagnosing pulmonary hypertension, the method comprising comparing the IgA concentration in the feces of a subject with that of a healthy subject.

(57) 要約: 本発明は、(1) 肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させる少なくとも1つの物質を有効成分として含有する肺高血圧症改善用組成物、(2) 肺高血圧症患者の腸内細菌叢において、マイクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、パストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌および乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含む肺高血圧症患者の予後を予測、または、重症度の判定を補助する方法、(3) 被験者の糞便中 IgA 濃度を健常者と比較することを含む肺高血圧症の診断を補助する方法、を提供する。

明 細 書

発明の名称：

肺高血圧症改善用組成物、肺高血圧症の予後予測方法、肺高血圧症の重症度判定補助方法および肺高血圧症の診断補助方法

技術分野

[0001] 本発明は、肺高血圧症改善用組成物、肺高血圧症の予後予測方法、肺高血圧症の重症度判定補助方法および肺高血圧症の診断補助方法に関するものである。

背景技術

[0002] 肺高血圧症は、肺動脈に血管リモデリング（狭窄や閉塞）を来たして肺動脈圧の上昇から右心不全に至る予後不良の難病である。肺高血圧症は、病態の主座から1群から5群に分類される（表1参照）。中でも、肺動脈中膜肥厚や内膜増殖病変といった肺動脈リモデリングにより肺高血圧症をきたす肺動脈性肺高血圧症、慢性的な肺動脈内血栓閉塞により肺高血圧症をきたす慢性血栓塞栓性肺高血圧症は、厚生労働省指定難病である。

[0003] 現在本邦で使用可能な肺高血圧症治療には、エンドセリン受容体拮抗薬（ボセンタン、アンブリセンタン、マシテンタンなど）、ホスホジエステラーゼ（PDE）5阻害薬（シルデナフィル、タダラフィルなど）、可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）刺激薬（リオシグアトなど）、プロスタグランジンI₂およびその誘導体（エポプロステノール、セレキシパグ、イロprost、トレプロスチニルなど）などの薬剤が現在の実地臨床で治療に使用されている。しかしこれらの治療に抵抗性の患者も存在し、そのような患者は非常に予後不良であるため、新規治療法やバイオマーカーの開発が必要である。

[0004] 肺高血圧症の遺伝性素因にはBMPR2シグナル関連遺伝子が知られるが、疾患浸透率は約20%と低く、肺高血圧症発症には炎症や外来化学物質の曝露が重要と考えられている。本発明者らは、interleukin-6(IL-6)/Th17細胞/IL-21シグナル軸が肺高血圧症病態形成に重要であることを報告した（非特許文献

1)。このシグナル軸で重要な働きをするTh17細胞は、腸管に最も多く分布し、腸内細菌叢との相互作用がその分化誘導に重要であることを踏まえ、肺高血圧症病態における腸内細菌叢の役割を検討した。

[0005] [表1]

第1群．肺動脈性肺高血圧症（PAH）	第2群．左心疾患に伴う肺高血圧症
1) 特発性肺動脈性肺高血圧症（idiopathic PAH：IPAH） 2) 遺伝性肺動脈性肺高血圧症（heritable PAH：HPAH） 1. BMPR2 2. ALK1, endoglin, SMAD9, CAV1, KCNK3 3. 未知・不明 3) 薬物・毒物誘発性肺動脈性肺高血圧症 4) 各種疾患に伴う肺動脈性肺高血圧症（associated PAH：APAH） 1. 膠原病性 2. エイズウイルス感染症 3. 門脈肺高血圧 4. 先天性短絡性疾患 5. 住血吸虫症	1) 収縮不全 2) 拡張不全 3) 弁膜疾患 4) 先天性・後天性 左心流入路流出路閉塞
	第3群．肺疾患および/または低酸素血症に伴う肺高血圧症 1) 慢性閉塞性肺疾患 2) 間質性肺疾患 3) 拘束性と閉塞性の混合障害を伴う他の肺疾患 4) 睡眠呼吸障害 5) 肺胞低換気障害 6) 高所における慢性暴露 7) 発育障害
	第4群．慢性血栓性肺高血圧症（CTEPH）
1'．肺静脈閉塞性疾患（PVOD）および/または肺毛細血管腫症（PCH） 1''．新生児持続性肺高血圧症	第5群．詳細不明な多因子のメカニズムに伴う肺高血圧症 1) 血液疾患（慢性溶血性貧血、骨髄増殖性疾患、脾摘出） 2) 全身性疾患（サルコイドーシス、肺ランゲルハンス細胞組織球症、リンパ管炎、神経線維腫症、血管炎） 3) 代謝性疾患（糖尿病、ゴーンシエ病、甲状腺疾患） 4) その他（腫瘍塞栓、線維性縦隔炎、血液透析中の慢性腎不全、Segmental PH）

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1 : Hashimoto-Kataoka T, et al. Proc Natl Acad Sci USA 112, E2677-2686(2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、肺高血圧症患者の腸内細菌に作用して肺高血圧症を改善する組成物を提供することを課題とする。また、本発明は、肺高血圧症患者の特定の腸内細菌を検出することにより肺高血圧症患者の予後を予測する方法および肺高血圧症患者の重症度の判定を補助する方法を提供することを課題とする。さらに、被験者の糞便を用いて肺高血圧症の診断を補助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] 本発明は、上記の課題を解決するために以下の各発明を包含する。

[1] 肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させる少なくとも 1 つの物質を有効成分として含有する肺高血圧症改善用組成物。

[2] 前記物質が、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌を低減させる物質である前記 [1] に記載の組成物。

[3] 前記増加する腸内細菌が、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌、パストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、クロストリジウム科 (Clostridiaceae) 細菌またはサテラ科 (Sutterellaceae) 細菌である前記 [2] に記載の組成物。

[3 - 1] 前記増加する腸内細菌が、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌、パストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、フソバクテリア科 (Fusobacteriaceae) 細菌、乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌、腸内細菌科

(Enterobacteriaceae) 細菌、コリオバクテリウム科 (Coriobacteriaceae) 細菌またはサテラ科 (Sutterellaceae) 細菌である前記 [2] に記載の組成物。

[4] 前記増加する腸内細菌が、アクチノマイセス属 (Actinomyces) 細菌、ロシア属 (Rothia) 細菌、シトロバクター属 (Citrobacter) 細菌、ベイロネラ属 (Veillonella) 細菌、大腸菌属 (Escherichia) 細菌、ゲメラ属 (Gemella) 細菌、グラニュリカテラ属 (Granulicatella) 細菌、アトポビウム属 (Atopobium) 細菌、クロストリジウム属 (Clostridium) 細菌、エンテロバクター属 (Enterobacter) 細菌、レンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌、アビオトロフィア属 (Abitrophia) 細菌、クレブシエラ属 (Klebsiella) 細菌、クロノバクター属 (Cronobacter) 細菌、赤痢菌属 (Shigella) 細菌、サルモネラ属 (Salmonella) 細菌、サテラ属 (Sutterella) 細菌またはヘモフィルス属 (Haemophilus) 細菌である前記 [2] に記載の組成物。

[4-1] 前記増加する腸内細菌が、アクチノマイセス属 (Actinomyces) 細菌、ロシア属 (Rothia) 細菌、シトロバクター属 (Citrobacter) 細菌、ベイロネラ属 (Veillonella) 細菌、大腸菌属 (Escherichia) 細菌、ゲメラ属 (Gemella) 細菌、グラニュリカテラ属 (Granulicatella) 細菌、アトポビウム属 (Atopobium) 細菌、エンテロバクター属 (Enterobacter) 細菌、レンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌、アビオトロフィア属 (Abitrophia) 細菌、クレブシエラ属 (Klebsiella) 細菌、クロノバクター属 (Cronobacter) 細菌、赤痢菌属 (Shigella) 細菌、サルモネラ属 (Salmonella) 細菌、サテラ属 (Sutterella) 細菌、ラクノクロストリジウム属 (Lachnoclostridium) 細菌、フソバクテリウム属 (Fusobacterium) 細菌、乳酸桿菌属 (Lactobacillus) 細菌、エリシペラトクロストリジウム属 (Erysipelatoclostridium) 細菌。コリンセラ属 (Collinsella) 細菌、ティゼラ属 (Tyzzerella) 細菌またはヘモフィルス属 (Haemophilus) 細菌である前記 [2] に記載の組成物。

[5] 前記増加する腸内細菌が、ストレプトコッカス・インファンティス (Streptococcus_infantis)、ストレプトコッカス・パラサンギニス (Strepto

coccus_parasanguinis) ルミノコッカス・グナブス (*Ruminococcus_gnavus*)、クロストリジウム・ボルテエ (*Clostridium_bolteae*)、サテセラ・ワズワーセンシス (*Sutterella_wadsworthensis*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella_pneumoniae*)、ロシア・ムシラギノーサ (*Rothia_mucilaginosa*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus_mitis*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus_oralis*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus_pneumoniae*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus_salivarius*)、ヘモフィルス・パラインフルエンザ (*Haemophilus_parainfluenzae*)、ベイロネラ・パルブラ (*Veillonella_parvula*) またはベイロネラ属未分類種細菌である前記〔2〕に記載の組成物。

〔6〕前記物質が、口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤である前記〔1〕または〔2〕に記載の組成物。

〔7〕前記口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤が、ペニシリン系、セフェム系、ペネム系、カルバペネム系、マクロライド系、リンコマイシン系、ケトライド系、ニューキノロン系、グリコペプチド系、ストレプトグラミン系、テトラサイクリン系、クロラムフェニコール系、キノロン系、ペプチド系、アミノグリコシド系、モノバクタム系、ニトロイミダゾール系またはホスホマイシン系の薬剤である前記〔6〕に記載の組成物。

〔8〕前記物質が、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌に対して溶菌活性を示すファージである前記〔1〕または〔2〕に記載の組成物。

〔9〕前記物質が、肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌を増加させる物質である前記〔1〕に記載の組成物。

〔10〕前記減少する腸内細菌が、リケネラ科 (*Rikenellaceae*) 細菌、コリオバクテリウム科 (*Coriobacteriaceae*) 細菌、ルミノコッカス科 (*Ruminococcaceae*) 細菌、アルカリゲネス科 (*Alcaligenaceae*)、バクテロイデス科 (*Bacteroidaceae*) 細菌、ユウバクテリウム科 (*Eubacteriaceae*) 細菌、ラクノスピラ科 (*Lachnospiraceae*) 細菌、デスルフォビブリオ科 (*Desulfovibrio*) 細菌、

rionaceae) 細菌、ビフィドバクテリウム科 (Bifidobacteriaceae) 細菌、サテラ科 (Sutterellaceae) 細菌、ラクノスピラ科 (Lachnospiraceae) 細菌またはポルフィロモナス科 (Porphyromonadaceae) 細菌である前記 [9] に記載の組成物。

[10-1] 前記減少する腸内細菌が、リケネラ科 (Rikenellaceae) 細菌、ルミノコッカス科 (Ruminococcaceae) 細菌、アルカリゲネス科 (Alcaligenaceae)、バクテロイデス科 (Bacteroidaceae) 細菌、ユウバクテリウム科 (Eubacteriaceae) 細菌、ラクノスピラ科 (Lachnospiraceae) 細菌、デスルフォビブリオ科 (Desulfovibrionaceae) 細菌、ビフィドバクテリウム科 (Bifidobacteriaceae) 細菌、サテラ科 (Sutterellaceae) 細菌、プレボテラ科 (Prevotellaceae) 細菌、クロストリジウム科 (Clostridiaceae) 細菌、エッガーセラ科 (Eggerthellaceae) 細菌またはポルフィロモナス科 (Porphyromonadaceae) 細菌である前記 [9] に記載の組成物。

[11] 前記増加する腸内細菌が、ブチリシモナス属 (Butyricimonas) 細菌、アリスチペス属 (Alistipes) 細菌、ルミノコッカス属 (Ruminococcus) 細菌、アドレクルーツィア属 (Adlercreutzia) 細菌、アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus) 細菌、サテラ属 (Sutterella) 細菌、オシロスピラ属 (Oscillospira) 細菌、リケネラ属 (Rikenella) 細菌、ラクノスピラ属 (Lachnospira) 細菌、コリンゼラ属 (Collinsella) 細菌、ホールディマニア属 (Holdemanella) 細菌、ユウバクテリウム属 (Eubacterium) 細菌、サブドリグラヌルム属 (Subdoligranulum) 細菌、ピロフィラ属 (Bilophila) 細菌、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium) 細菌、パラサテラ属 (Parasutterella) 細菌、ロゼブリア属 (Roseburia) 細菌、フィーカリバクテリウム属 (Faecalibacterium) 細菌、パラバクテロイデス属 (Parabacteroides) 細菌またはバクテロイデス属 (Bacterioides) 細菌である前記 [9] に記載の組成物。

[11-1] 前記減少する腸内細菌が、ブチリシモナス属 (Butyricimonas) 細菌、アリスチペス属 (Alistipes) 細菌、ルミノコッカス属 (Ruminococcus)

）細菌、アドレクルーツィア属（*Adlercreutzia*）細菌、アシダミノコッカス属（*Acidaminococcus*）細菌、サテラ属（*Sutterella*）細菌、オシロスピラ属（*Oscillospira*）細菌、リケネラ属（*Rikenella*）細菌、ラクノスピラ属（*Lachnospira*）細菌、ホールディマニア属（*Holdeman*）細菌、ユウバクテリウム属（*Eubacterium*）細菌、サブドリグラヌルム属（*Subdoligranulum*）細菌、ビロフィラ属（*Bilophila*）細菌、ビフィドバクテリウム属（*Bifidobacterium*）細菌、パラサテラ属（*Parasutterella*）細菌、ロゼブリア属（*Roseburia*）細菌、フィーカリバクテリウム属（*Faecalibacterium*）細菌、パラバクテロイデス属（*Parabacteroides*）細菌、メガモナス属（*Megamonas*）細菌、ファスコラクトバクテリウム属（*Phascolarctobacterium*）細菌、アガトバクター属（*Agathobacter*）細菌、ヒドロジェノアネロバクテリウム属（*Hydrogenoanaerobacterium*）細菌、ブラウチア属（*Blautia*）細菌、ルミノニコストリジウム属（*Ruminiclostridium*）細菌、パラプレボテラ属（*Paraprevotella*）細菌、アセトアネロバクテリウム属（*Acetanaerobacterium*）細菌、ドレア属（*Dorea*）細菌、フシカテニバクター属（*Fusicatenibacter*）細菌、コプロコッカス属（*Coprococcus*）細菌、ゴードニバクター属（*Gordonibacter*）細菌、コプロバクター属（*Coprobacter*）細菌、オシリバクター属（*Oscilibacter*）細菌、アネロスティペス属（*Anaerostipes*）細菌またはバクテロイデス属（*Bacteriodes*）細菌である前記〔9〕に記載の組成物。

〔12〕前記減少する腸内細菌が、ユウバクテリウム・ハリイ（*Eubacterium_hallii*）、ビロフィラ属（*Bilophila*）未分類種細菌、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス（*Bifidobacterium_adolescentis*）、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラツム（*Bifidobacterium_pseudocatenulatum*）、パラサテラ・エクスクレメンティホミニス（*Parasutterella_excrementihominis*）、ロゼブリア・ホーミニス（*Roseburia_hominis*）、アリスチペス・オンデルドンキイ（*Alistipes_nderdonkii*）、フィーカリバクテリウム・プラウスニッツィイ（*Faecalibacterium_prausnitzii*）、ユウバクテリウム・ベントリオサム（*Eubacterium_ventriosum*）、ロゼブリア・インテスティナ

ーリス (*Roseburia_intestinalis*)、パラバクテロイデス・ジョンソニー (*Parabacteroides_johnsonii*)、バクテロイデス・セルロシリティカス (*Bacteroides_cellulosilyticus*)、バクテロイデス・ユニフォルミス (*Bacteroides_uniformis*)、ユウバクテリウム・エリゲンス (*Eubacterium_eligens*)、*Alistipes* sp. AP11、*Bacteroidales bacterium* ph8、*Subdoligranulum* sp. 4_3_54A2FAAまたは*Lachnospiraceae bacterium* 1_1_57FAAである前記 [9] に記載の組成物。

[13] 前記 [10] ~ [12] のいずれかに記載の細菌の1種以上を有効成分とする前記 [9] に記載の組成物。

[13-1] 前記 [10-1] ~ [12] のいずれかに記載の細菌の1種以上を有効成分とする前記 [9] に記載の組成物。

[14] メバロン酸経路、マンノシルグリセリン酸合成経路、メチルグリオキサール分解経路、D-グルカル酸分解経路、TCAサイクルVIII経路、ヘム生合成経路、および硝酸代謝経路からなる群より選択される少なくとも1つの経路を阻害する物質を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物。

[15] メバロン酸経路を阻害する物質がHMG-CoA還元酵素阻害薬である前記 [14] に記載の組成物。

[16] 肺高血圧症患者の予後を予測する方法であって、肺高血圧症患者の腸内細菌叢において、ミクロコッカス科 (*Micrococcaceae*) 細菌、レンサ球菌科 (*Streptococcaceae*) 細菌およびパスツレラ科 (*Pasteurellaceae*) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

[16-1] 肺高血圧症患者の予後を予測する方法であって、肺高血圧症患者の腸内細菌叢において、ミクロコッカス科 (*Micrococcaceae*) 細菌、レンサ球菌科 (*Streptococcaceae*) 細菌、パスツレラ科 (*Pasteurellaceae*) 細菌、ベイロネラ科 (*Veillonellaceae*) 細菌および乳酸桿菌科 (*Lactobacillaceae*) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

〔17〕肺高血圧症患者の重症度の判定を補助する方法であって、肺高血圧症患者の腸内細菌叢において、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌およびパストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

〔17-1〕肺高血圧症患者の重症度の判定を補助する方法であって、肺高血圧症患者の腸内細菌叢において、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、パストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌および乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

〔18〕前記ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌がロシア属 (Rothia) 細菌であり、前記レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌がレンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌である、前記〔17〕に記載の方法。

〔18-1〕前記ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌がロシア属 (Rothia) 細菌であり、前記レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌がレンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌であり、前記ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌がベイロネラ属 (Veillonella) 細菌である、前記〔17-1〕に記載の方法。

〔19〕肺高血圧症の診断を補助する方法であって、被験者の糞便中lgA濃度を測定し、健常者の糞便中lgA濃度と比較することを含むことを特徴とする方法。

〔20〕短鎖脂肪酸またはその塩を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物。

〔21〕門脈圧亢進に伴う肺高血圧症の診断を補助する方法であって、被験者の腸内細菌叢において、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium) 細菌、ドレア属 (Dorea) 細菌およびブラウチア属 (Blautia) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

〔22〕慢性血栓塞栓性肺高血圧症の診断を補助する方法であって、被験者の腸内細菌叢においてクレブシエラ属（*Klebsiella*）細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

発明の効果

[0009] 本発明により、肺高血圧症患者の腸内細菌に作用して肺高血圧症を改善する組成物を提供することができる。また、肺高血圧症患者の特定の腸内細菌を検出することにより肺高血圧症患者の予後を予測する方法および肺高血圧症患者の重症度の判定を補助する方法を提供することができる。さらに、被験者の糞便を用いて肺高血圧症の診断を補助する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]肺高血圧症モデルラット作製手順を示す図であり、上段が低酸素負荷、中段がモノクロタリン負荷、下段がSugen5416/低酸素/正酸素負荷による肺高血圧症モデルラット作製手順である。

[図2]野生型ラットに対して低酸素負荷（Hx）、モノクロタリン負荷（MCT）またはSugen5416/低酸素/正酸素負荷（SuHx）の各処理を行って作製した3種類の肺高血圧症モデルラット、Sugen5416/低酸素/正酸素負荷（SuHx）処理した芳香族炭化水素受容体（Aryl hydrocarbon Receptor : AHR）欠損ラット、および無処置ラット（対照群）の糞便中DNAの16SrRNAメタゲノム解析を行い、腸内細菌叢の構成を科レベルで解析した結果を示す図である。

[図3]（A）は各群の腸内細菌叢におけるS24-7の存在率を示した図であり、（B）は、対照群、Hx群、MCT群およびSuHx群の腸内細菌叢におけるLachnospiraceaeの存在率を示した図である。

[図4]低酸素負荷肺高血圧症モデルラット（Hx）に抗生剤カクテルを投与し、肺高血圧症病態の変化を検討した結果を示す図である。

[図5]モノクロタリン負荷肺高血圧症モデルラット（MCT）に抗生剤カクテルを投与し、肺高血圧症病態の変化を検討した結果を示す図である。

[図6]Sugen5416/低酸素/正酸素負荷肺高血圧症モデルラット（SuHx）に抗生

剤カクテルを投与し、肺高血圧症病態の変化を検討した結果を示す図である。

[図7]肺高血圧症患者および健常者の糞便中DNAの16SrRNAメタゲノム解析を行い、腸内細菌叢の構成を科レベルで解析した結果を示す図である。

[図8]肺高血圧症患者および健常者の腸内細菌叢の α 多様性を評価した結果を示す図であり、(A)はShannon indexの結果、(B)はChao indexの結果である。

[図9]肺高血圧症患者および健常者の腸内細菌叢の β 多様性を主成分解析で評価した結果を示す図である。

[図10]肺高血圧症患者において増加する腸内細菌について、個々の健常者および個々の肺高血圧症患者における存在率を示すと共に、健常者群および肺高血圧症患者群の存在率を比較した結果を示す図であり、(A)はStreptococcaceae科の結果、(B)はMicrococcaceae科の結果、(C)はPasteurellaceae科の結果である。

[図11]肺高血圧症患者における腸内細菌の変化と重症度の関係を検討した結果を示す図であり、(A)はMicrococcaceae科の結果、(B)はStreptococcaceae科の結果、(C)はPasteurellaceae科の結果である。

[図12]肺高血圧症患者における腸内細菌の変化と予後の関係を検討した結果を示す図であり、(A)はMicrococcaceae科の結果、(B)はStreptococcaceae科の結果、(C)はPasteurellaceae科の結果である。

[図13]肺高血圧症患者における血清中芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon Receptor : AHR) 活性と重症度の関係を検討した結果を示す図であり、(A)は肺高血圧症患者および健常者の血清AHR活性を測定した結果、(B)はWHO重症度1-2の患者群、WHO重症度3-4の患者群および健常者の血清AHR活性を測定した結果、(C)は肺高血圧症患者の肺血管抵抗 (pulmonary vascular resistance: PVR) と血清AHR活性との相関を検討した結果を示す図である。

[図14]肺高血圧症患者における腸内細菌の変化と血清AHR活性との関係を検討した結果を示す図である。

[図15]肺高血圧症患者において増加する腸内細菌を属レベルで比較した結果を示す図であり、(A)はActinomyces、(B)はRothia、(C)はCitrobacter、(D)はVeillonella、(E)はEscherichia、(F)はGemella、(G)はGranulicatella、(H)はAtopobium、(I)はClostridium、(J)はEnterobacter、(K)はStreptococcus、(L)はAbiotrophia、(M)はKlebsiella、(N)はCronobacter、(O)はShigella、および(P)はSalmonellaである。

[図16]肺高血圧症患者において減少する腸内細菌について、個々の健常者および個々の肺高血圧症患者における存在率を示すと共に、健常者群および肺高血圧症患者群の存在率を比較した結果を示す図であり、(A)はRikenellaceaeの結果、(B)はCoriobacteriaceaeの結果、および(C)はAlcaligenaceaeの結果である。

[図17]肺高血圧症患者において減少する腸内細菌を属レベルで比較した結果を示す図であり、(A)はButyrivibrio、(B)はAlistipes、(C)はRuminococcus、(D)はAdlercreutzia、(E)はAcidaminococcus、(F)はSutterella、(G)はOscillospira、(H)はRikenella、(I)はLachnospira、(J)はCollinsella、および(K)はHoldemaniaである。

[図18]肺高血圧症患者および健常者の糞便中DNAのフルメタゲノム解析を行った結果を示す図である。

[図19]フルメタゲノム解析で得られたデータを用いて腸内細菌叢のもつ機能的代謝プロファイルを解析した結果を示す図である。

[図20]糞便中IgA濃度を測定した結果を示す図であり、(A)が肺高血圧症モデルラットの結果、(B)が肺高血圧症患者の結果である。

[図21]肺高血圧症患者および健常者の腸内細菌叢について、PLS-DA解析した結果を示す図である。

[図22]肺高血圧症患者および健常者の腸内細菌叢の α 多様性を評価した結果を示す図であり、(A)はFaith's phylogenetic diversityの結果、(B)はShannon indexの結果、(C)はObserved OTUsの結果である。

[図23]LDAスコア3.0以上をカットオフとして、肺高血圧症肺高血圧症患者で統計学的有意に増加または減少した菌（属レベル）を示す図である。

[図24]健常者および肺高血圧症患者に存在する属レベルの腸内細菌の相対頻度と、肺高血圧症患者での変化量（Effect size）、変化に関する有意差[$-\log_{10}(p\text{-value})$]から作成したvolcano plotを示す図である。

[図25]LDAスコアとVolcano plotの結果から、属レベルで有意に変化した腸内細菌をCladogramで作図した結果を示す図である。

[図26]肺高血圧症のサブグループ毎に増減する18菌種（属レベル）の頻度を比較した結果を示す図であり、（A）はRothia、（B）はBifidobacterium、（C）はKlebsiella、（D）はVeillonella、（E）はErysipelatoclostridium、（F）はRuminococcus gnavus group、（G）はTyzzerella、（H）はStreptococcus、（I）はAlistipes、（J）はSubdoligranulum、（K）はRuminiclostridium5、（L）はEubacterium hallii group、（M）はRoseburia、（N）はFusicatenibacter、（O）はDorea、（P）はCoprococcus、（Q）はBlautia、および（R）はAnaerostipesの結果である。

[図27]肺高血圧症関連イベント（右心不全、肺移植、死亡の複合イベント）の発生と関連する腸内細菌をランダムフォレスト解析によりランク付けした結果を示す図である。

[図28]ROC解析から算出した複合イベント発生を最も予測できるcut-off値によって2群に分けて、肺高血圧症の重症度（WHO肺高血圧症機能分類）との関連を解析した結果を示す図であり、（A）はRothia、（B）はVeillonella、（C）はStreptococcusの結果である。

[図29]肺高血圧症関連イベント発生について、Rothia、Veillonella、Streptococcusのcut-off値によって患者を2群に分けて、Kaplan-Meier法で無イベント生存率を比較した図であり、（A）はRothia、（B）はVeillonella、（C）はStreptococcusの結果である。

[図30]腸内細菌（属レベル）の相対割合と血清IL-6濃度の相関係数を総当たりで算出し、相関係数（ r ） >2 の腸内細菌のネットワークを示す図である。

[図31]健常者便を移植した肺高血圧症モデルノトバイオトラットと肺高血圧症患者便を移植した肺高血圧症モデルノトバイオトラットの肺高血圧症病態を評価した結果を示す図であり、(A)は右室収縮期圧の結果、(B)は右室/左室重量比(右室肥大)の結果である。

[図32]健常者および肺高血圧症患者の糞便中の酢酸 (Acetic acid)、プロピオン酸 (Propionic acid) および酪酸 (Butyric acid) の濃度を測定した結果を示す図である。

[図33]酪酸塩水を投与し肺高血圧症モデルラットの肺高血圧症病態を評価した結果を示す図であり、(A)は右室収縮期圧の結果、(B)は右室/左室重量比(右室肥大)の結果である。

発明を実施するための形態

[0011] 〔肺高血圧症改善用組成物〕

本発明は、肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させる少なくとも1つの物質を有効成分として含有する肺高血圧症改善用組成物(以下、「本発明の組成物」と記す)を提供する。本発明者らは、肺高血圧症患者および健常者の糞便中DNAのメタゲノム解析により両者の腸内細菌叢の構成を比較した結果、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌および減少する腸内細菌が存在することを見出した。したがって、肺高血圧症患者の腸内細菌叢の構成を正常化すること、すなわち肺高血圧症患者の腸内細菌叢の構成を健常者の腸内細菌叢の構成に近づけることにより、肺高血圧症の病態を改善できると考えられる。

[0012] 肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌(科レベル)としては、例えばレンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌、パストゥレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、フソバクテリア科 (Fusobacteriaceae) 細菌、乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) 細菌、コリオバクテリウム科 (Coriobacteriaceae) 細菌、サテラ科 (Sutterellaceae) 細菌などが挙げられる。

[0013] 肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌（属レベル）としては、例えばアクチノマイセス属（*Actinomyces*）細菌、ロシア属（*Rothia*）細菌、シトロバクター属（*Citrobacter*）細菌、ベイロネラ属（*Veillonella*）細菌、大腸菌属（*Escherichia*）細菌、ゲメラ属（*Gemella*）細菌、グラニュリカテラ属（*Granulicatella*）細菌、アトポビウム属（*Atopobium*）細菌、エンテロバクター属（*Enterobacter*）細菌、レンサ球菌属（*Streptococcus*）細菌、アビオトロフィア属（*Abiotrophia*）細菌、クレブシエラ属（*Klebsiella*）細菌、クロノバクター属（*Cronobacter*）細菌、赤痢菌属（*Shigella*）細菌、サルモネラ属（*Salmonella*）細菌、サテレラ属（*Sutterella*）細菌、ラクノクロストリジウム属（*Lachnoclostridium*）細菌、フソバクテリウム属（*Fusobacterium*）細菌、乳酸桿菌属（*Lactobacillus*）細菌、エリシペラトクロストリジウム属（*Erysipelatoclostridium*）細菌。コリンセラ属（*Collinsella*）細菌、ティゼレラ属（*Tyzzera*）細菌、ヘモフィルス属（*Haemophilus*）細菌などが挙げられる。

[0014] 肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌（種レベル）としては、例えばストレプトコッカス・インファンティス（*Streptococcus infantis*）、ストレプトコッカス・パラサンギニス（*Streptococcus parasanguinis*）、ルミノコッカス・グナブス（*Ruminococcus gnavus*）、クロストリジウム・ボルテエ（*Clostridium bolteae*）、サテレラ・ワズワーセンシス（*Sutterella wadsworthensis*）、クレブシエラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）、ロシア・ムシラギノーサ（*Rothia mucilaginosa*）、ストレプトコッカス・ミティス（*Streptococcus mitis*）、ストレプトコッカス・オラリス（*Streptococcus oralis*）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）、ストレプトコッカス・サリバリウス（*Streptococcus salivarius*）、ヘモフィルス・パラインフルエンザ（*Haemophilus parainfluenzae*）、ベイロネラ・パルブラ（*Veillonella parvula*）、ベイロネラ属未分類種細菌などが挙げられる。

[0015] 肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌（科レベル）

としては、例えばリケネラ科 (Rikenellaceae) 細菌、ルミノコッカス科 (Ruminococcaceae) 細菌、アルカリゲネス科 (Alcaligenaceae)、バクテロイデス科 (Bacteroidaceae) 細菌、ユウバクテリウム科 (Eubacteriaceae) 細菌、ラクノスピラ科 (Lachnospiraceae) 細菌、デスルフォビブリオ科 (Desulfovibrionaceae) 細菌、ビフィドバクテリウム科 (Bifidobacteriaceae) 細菌、サテレラ科 (Sutterellaceae) 細菌、プレボテラ科 (Prevotellaceae) 細菌、クロストリジウム科 (Clostridiaceae) 細菌、エグガーセラ科 (Eggerthellaceae) 細菌、ポルフィロモナス科 (Porphyromonadaceae) 細菌などが挙げられる。

- [0016] 肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌 (属レベル) としては、例えばブチリシモナス属 (Butyricimonas) 細菌、アリスチペス属 (Alistipes) 細菌、ルミノコッカス属 (Ruminococcus) 細菌、アドレクルーツィア属 (Adlercreutzia) 細菌、アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus) 細菌、サテレラ属 (Sutterella) 細菌、オシロスピラ属 (Oscillospira) 細菌、リケネラ属 (Rikenella) 細菌、ラクノスピラ属 (Lachnospira) 細菌、ホールディマニア属 (Holdemania) 細菌、ユウバクテリウム属 (Eubacterium) 細菌、サブドリグラヌルム属 (Subdoligranulum) 細菌、ビロフィラ属 (Bilophila) 細菌、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium) 細菌、パラサテレラ属 (Parasutterella) 細菌、ロゼブリア属 (Roseburia) 細菌、フィーカリバクテリウム属 (Faecalibacterium) 細菌、パラバクテロイデス属 (Parabacteroides) 細菌、メガモナス属 (Megamonas) 細菌、ファスコラクトバクテリウム属 (Phascolarctobacterium) 細菌、アガトバクター属 (Agathobacter) 細菌、ヒドロジェノアナエロバクテリウム属 (Hydrogenoanaerobacterium) 細菌、ブラウチア属 (Blautia) 細菌、ルミノニコストリジウム属 (Ruminiclostridium) 細菌、パラプレボテラ属 (Paraprevotella) 細菌、アセトアナエロバクテリウム属 (Acetanaerobacterium) 細菌、ドレア属 (Dorea) 細菌、フシカテニバクター属 (Fusicatenibacter) 細菌、コプロコッカス属 (Coprococcus) 細菌、ゴードニバクター属 (Gordonibacter) 細菌、コプロ

バクター属 (*Coprobacter*) 細菌、オシリバクター属 (*Oscillibacter*) 細菌、アネロスティペス属 (*Anaerostipes*) 細菌、バクテロイデス属 (*Bacteroides*) 細菌などが挙げられる。

[0017] 肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌 (種レベル) としては、例えばユウバクテリウム・ハリイ (*Eubacterium_hallii*)、ビロフィラ属 (*Bilophila*) 未分類種細菌、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス (*Bifidobacterium_adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラツム (*Bifidobacterium_pseudocatenulatum*)、パラサテラ・エクスクレメンティホミニス (*Parasutterella_excrementihominis*)、ロゼブリア・ホーミニス (*Roseburia_hominis*)、アリスチペス・オンデルドンキイ (*Alistipes_onderdonkii*)、フィーカリバクテリウム・プラウスニッツィイ (*Faecalibacterium_prausnitzii*)、ユウバクテリウム・ベントリオサム (*Eubacterium_ventriosum*)、ロゼブリア・インテスティナリス (*Roseburia_intestinalis*)、パラバクテロイデス・ジョンソニー (*Parabacteroides_johnsonii*)、バクテロイデス・セルロシリティカス (*Bacteroides_cellulosilyticus*)、バクテロイデス・ユニフォルミス (*Bacteroides_uniformis*)、ユウバクテリウム・エリゲンス (*Eubacterium_eligens*)、*Alistipes* sp. AP11、*Bacteroidales bacterium* ph8、*Subdoligranulum* sp. 4_3_54A2FAA、*Lachnospiraceae bacterium* 1_1_57FAAなどが挙げられる。

[0018] 本発明の組成物は、肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させる少なくとも1つの物質を有効成分として含有するものであればよい。対象疾患である肺高血圧症は、表1に示される第1群であってもよく、第2群であってもよく、第3群であってもよく、第4群であってもよく、第5群であってもよい。

[0019] 本発明の組成物の有効成分は、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌を低減させる物質であってもよい。このような物質は口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤であってもよい。上記の肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌には、口腔内常在菌が多く

含まれており、口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤は、本発明の組成物の有効成分として有用である。口腔内常在菌としては、例えば、ストレプトコッカス・インファンティス (*Streptococcus infantis*)、ストレプトコッカス・パラサンギニス (*Streptococcus parasanguinis*)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*)、ロシア・ムシラギノーサ (*Rothia mucilaginosa*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus mitis*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus oralis*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus pneumoniae*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus salivarius*)、ベイロネラ・パルブラ (*Veillonella parvula*)、ベイロネラ属未分類種細菌などが挙げられる。

[0020] 口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤は、ペニシリン系抗菌化合物（例えばメチシリン、オキサシリン、ナフシリン、クロキサシリン、ジクロキサシリン、フルクロキサシリン、チモシリン、アモキシシリン、ピペラシリン、タランピシリン、バカンピシリン、アンピシリン、チカルシリン、ベンジルペニシリン、カルベニシリン等）、セフェム系抗菌化合物（例えばセファロチン、セファゾリン、セフォチアム、セフメタゾール、セフォタキシム、セフメノキシム、セフォジジム、セフトリアキソン、セフトラジジム、セフォペラゾン、セフミノクス、ラタモキシフ、フロモキシフ、セフピロム、セフェピム、セフォゾプラン、セファレキシン等）、ペネム系抗菌化合物（例えばファロペネム等）、カルバペネム系抗菌化合物（例えばイミペネム、パニペネム、メロペネム、ピアペネム、ドリペネム、エルタペネム、テビペネム等）、マクロライド系抗菌化合物（例えばアジスロマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン、トロレアンドマイシン等）、リンコマイシン系抗菌化合物（例えばリンコマイシン、クリンダマイシン、ピルリマイシン等）、ケトライド系抗菌化合物（例えばテリスロマイシン等）、ニューキノロン系抗菌化合物（例えばシプロフロキサシン、オフロキサシン、シタフロキサシン等）、グリコペプチド系抗菌化合物（例えばバンコマイシン、テイコプラニン等）、ストレプトグラミン系抗菌化合物（

例えばキヌプリスチン、ダルホプリスチン)、テトラサイクリン系抗菌化合物(例えばデメクロサイクリン、ドキシサイクリン、ミノサイクリン、オキシテトラサイクリン、テトラサイクリン等)、クロラムフェニコール系抗菌化合物(例えばクロラムフェニコール等)、キノロン系抗菌化合物(例えばシプロフロキサシン、エノキサシン、ガチフロキサシン、レボフロキサシン、ロメフロキサシン、モキシフロキサシン、ノルフロキサシン、オフロキサシン、トロバフロキサシン等)、ペプチド系抗菌化合物(例えばバシトラシン、コリスチン、ポリミキシンB等)、アミノグリコシド系抗菌化合物(例えばアミカシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、カプレオマイシン、ネオマイシン、ネチルマイシン、ストレプトマイシン、トブラマイシン等)、モノバクタム系抗菌化合物(例えばアズトレオナム等)、ニトロイミダゾール系抗菌化合物(例えばメトロニダゾール等)またはホスホマイシン系抗菌化合物(例えばホスホマイシン等)であってもよい。

[0021] 口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤は、1種類を使用してもよく、2種類、3種類、4種類、5種類、6種類、7種類、8種類、9種類、10種類以上を組み合わせ使用してもよい。

[0022] 本発明の組成物の有効成分は、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌に対して溶菌活性を示すファージであってもよい。遺伝子工学的手法を用いて特定の細菌に対して溶菌活性を示すファージを作製、もしくは環境より単離培養することが既に行われており(Trends Biotechnol. 2010 Dec;28(12):591-595. doi: 10.1016/j.tibtech.2010.08.001. Epub 2010 Aug 31, Bacteriophage. 2011 Mar-Apr; 1(2): 111-114. doi: 10.4161/bact.1.2.14590) 肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌に対して溶菌活性を示すファージは、本発明の組成物の有効成分として有用である。

[0023] 本発明の組成物は、肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌を増加させる物質であってもよい。肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌を増加させる物質を含む組成物は、上記の肺高血

圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌を含む組成物（以下、「腸内細菌を含む組成物」と記す）であってもよい。肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌は、ヒトの糞便から定法にしたがって単離することができる。また、肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌は、過去に単離されストックされている細菌を用いることができる。腸内細菌を含む組成物に含まれる腸内細菌は、上記の肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌の１種以上であればよく、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０種を組み合わせ使用してもよい。２種以上の細菌を用いる場合、その含有比率は特に限定されず、肺高血圧症患者の年齢、病態、重症度等に応じて適宜設定することができる。

[0024] 腸内細菌を含む組成物には、該細菌を培養した培地を含んでいてもよい。また、肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌を含む組成物には、該細菌によって産生される分泌産物や代謝産物を含む培地の画分が含まれていてもよい。

[0025] 腸内細菌を含む組成物に含まれる細菌は、生菌であってもよく、弱毒化または不活化された細菌であってもよく、殺菌された細菌（例えば、熱殺菌）であってもよい。

[0026] 腸内細菌を含む組成物は、医薬組成物の形態で実施してもよい。腸内細菌を含む組成物を医薬組成物の形態で実施する場合、腸内細菌を含む組成物は、公知の薬物製剤化方法により製剤化することができる。例えば、腸内細菌を含む組成物は、カプセル剤、タブレット剤、丸剤、サシェ剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、チュアブル剤、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤またはエマルジョン剤の形態において経口的に使用することができる。また、坐剤またはかん腸剤として使用することができる。

[0027] 腸内細菌を含む組成物は、食品組成物の形態で実施してもよい。食品には、サプリメント、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、病者用食品等が

含まれる。食品組成物の形態は特に限定されず、例えば茶飲料、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料等の飲料、そば、うどん、中華麺、即席麺等の麺類、飴、キャンディー、ガム、チョコレート、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、焼き菓子、パン等の菓子およびパン類、かまぼこ、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品、加工乳、発酵乳等の乳製品、サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂および油脂加工食品、ソース、たれ等の調味料、カレー、シチュー、丼、お粥、雑炊等のレトルトパウチ食品、アイスクリーム、シャーベット、かき氷等の冷菓などを挙げることができる。

[0028] 腸内細菌を含む組成物を製剤化するために、薬理的に許容される担体、食品または飲料等での摂取が許容される担体を使用することができる。例えば滅菌水、生理食塩水、植物油、溶剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、芳香剤、賦形剤、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤などを使用することができる。

[0029] 腸内細菌を含む組成物は、該組成物を経口摂取した場合に細菌を大腸に効率的に送達することを可能にする追加成分を含むことができる。例えば、pH感受性組成物が挙げられる。より具体的には、緩衝化小袋製剤 (buffered sachet formulation) または腸溶性ポリマーが胃を通過後pHがアルカリ性になったときに内容物を放出する腸溶性ポリマーが挙げられる。pH感受性組成物を使用して腸内細菌を含む組成物を製剤化する場合、pH感受性組成物の分解されるpHの閾値が、胃の遠位部においてアルカリ側へ移行するpH範囲であることが好ましい。具体的にはpH感受性組成物は分解されるpHの閾値が、約6.8～約7.5であることが好ましい。

[0030] 腸内細菌を含む組成物を経口摂取した場合に細菌を大腸に効率的に送達することを可能にする追加成分として、内容物（例えば本発明の腸内細菌を含む組成物）の放出を、小腸通過時間に相当する約3～5時間後へと遅らせる

ことによって大腸への送達確保するものが挙げられる。例えば、ハイドロゲルを殻としてとして用いる製剤が挙げられる。該ハイドロゲルは胃腸液と接触すると水和して膨張し、その結果、内容物が効率的に溶出される（主として大腸で放出される）。

[0031] 腸内細菌を含む組成物を経口摂取した場合に細菌を大腸に効率的に送達することを可能にする追加成分として、生体内分解性ポリマー、徐々に加水分解されていくポリマー、徐々に水溶していくポリマー、酵素分解性ポリマー等の選択的コーティング材料を用いることができる。放出を効率的に遅らせるコーティング材料としては、例えばヒドロキシプロピルセルロース等のセルロース系ポリマー、メタクリル酸ポリマー等のアクリル酸ポリマーおよびコポリマー、ポリビニルピロリドン等のビニルポリマーおよびコポリマーが挙げられる。

[0032] 大腸への送達を可能とする組成物としては、大腸粘膜特異的に接着する生体接着性組成物（例えば米国特許第6,368,586号明細書に記載のポリマー）、消化管において特に生物学的製剤をタンパク質分解酵素活性による分解から守るためにプロテアーゼ阻害剤を組み込んだ組成物が挙げられる。

[0033] 本発明の腸内細菌を含む組成物は、他のヒト共生細菌種の増殖よりも該組成物中の細菌種の増殖が選択的に有利になるように働くプレバイオティクス物質と組み合わせて使用してもよい。プレバイオティクス物質としては、例えば難消化性オリゴ糖、難消化デンプン、食物繊維などが挙げられる。

[0034] 腸内細菌を含む組成物の有効成分である細菌は発酵技術を用いて製造できる。例えば、細菌の急速な増殖をサポートし得る嫌気発酵槽を用いて細菌有効成分を製造してもよい。嫌気発酵槽は、例えば攪拌槽型反応器、使い捨てのウェーブバイオリアクターであってもよい。BL寒天培地、動物性成分を含まないこれらと類似するタイプの培地等の培養培地を用いて、細菌有効成分を増殖させてもよい。細菌有効成分は、遠心分離、ろ過等の技術によって発酵ブロスから精製、濃縮が可能することができる。細菌有効成分は、乾燥または凍結乾燥させてもよい。

- [0035] 腸内細菌を含む組成物の投与量または摂取量は、肺高血圧症患者の年齢、体重、性別、症状、健康状態等の因子、組成物の種類（医薬品、食品、飲料）を考慮に入れて経験的に決定され得る。例えば、1回当たりの投与量または摂取量は、通常 0.01 mg/kg 体重 $\sim 100\text{ mg/kg}$ 体重であり、 1 mg/kg 体重 $\sim 10\text{ mg/kg}$ 体重であってもよい。
- [0036] 肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌を増加させる物質を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物は、上記の肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌を低減させる物質を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物、後述の特定の代謝経路を阻害する物質を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物および／または後述の短鎖脂肪酸またはその塩を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物と組み合わせて使用してもよい。本明細書において「組み合わせて使用する」とは、2以上の組成物または薬剤の適用時期が重複していることを意味し、同時に投与または摂取することを要するものではない。
- [0037] 本発明者らは、肺高血圧症患者および健常者の腸内細菌叢のデータを用いて腸内細菌叢のもつ機能的代謝プロファイルを解析した結果、いくつかの代謝経路に関連する機能が肺高血圧症患者で上昇していることを見出した。該当する代謝経路としては、メバロン酸経路、マンノシルグリセリン酸合成経路、メチルグリオキサール分解経路、D-グルカル酸分解経路、TCAサイクルVII経路、ヘム生合成経路、硝酸代謝経路などが挙げられる。したがって、本発明の組成物は、メバロン酸経路、マンノシルグリセリン酸合成経路、メチルグリオキサール分解経路、D-グルカル酸分解経路、TCAサイクルVIII経路、ヘム生合成経路、および硝酸代謝経路からなる群より選択される少なくとも1つの経路を阻害する物質を有効成分とするものであってもよい。
- [0038] 本発明の組成物の有効成分はHMG-CoA還元酵素阻害薬であってもよい。HMG-CoA還元酵素阻害薬は、メバロン酸経路を阻害する物質として公知である。HMG-CoA還元酵素阻害薬は、例えば、メバスタチン（コンパクチン）（USP3983140参照）、プラバスタチン（特開昭57-2240号公報（USP4346227）参照）、ロ

バスタチン（特開昭57-163374号公報（USP4231938）参照）、シンバスタチン（特開昭56-122375号公報（USP4444784）参照）、フルバスタチン（特表昭60-500015号公報（USP4739073）参照）、アトルバスタチン（特開平3-58967号公報（USP5273995）参照）、ロスバスタチン（特開平5-178841号公報（USP5260440）参照）、ピタバスタチン（特開平1-279866号公報（USP5854259およびUSP5856336）参照）を含むが、これらに限定されない。

[0039] 本発明者らは、肺高血圧症患者の糞便中の短鎖脂肪酸濃度が、健常者の糞便中の濃度と比較して有意に低下していることを見出した。さらに、低酸素負荷による肺高血圧症モデルラットに短鎖脂肪酸を経口投与すると、溶媒投与群と比較して肺高血圧症の病態が改善することを見出した。これらの知見から、短鎖脂肪酸は、肺高血圧症患者の腸内環境を健常者の腸内環境に近づける作用を有するものと考えられる。短鎖脂肪酸は肺高血圧症患者の腸内細菌叢の構成を健常者の腸内細菌叢の構成に近づける作用を有するものと考えられる。したがって、本発明の組成物有効成分は、短鎖脂肪酸またはその塩であってもよい。すなわち、本発明は、短鎖脂肪酸またはその塩を有効成分として含有する肺高血圧症改善用組成物（以下、「短鎖脂肪酸を含む組成物」と記す）を提供する。

[0040] 短鎖脂肪酸としては炭素数が6以下の脂肪酸が挙げられ、具体的には、例えば、酢酸、プロピオン酸、酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、カプロン酸、乳酸、コハク酸などが挙げられる。好ましくは酪酸、イソ酪酸、吉草酸、イソ吉草酸、プロピオン酸、酢酸およびコハク酸、乳酸であり、より好ましくは酪酸である。

[0041] 脂肪酸は遊離の形態でもよく、塩の形態でもよい。塩にすることにより水溶性を向上させ、生理学的有効性を増大させることができる。脂肪酸の塩としては、薬学的に許容される塩であればよい。例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属塩；マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属塩；水酸化アンモニウム等の無機塩基との塩；アルギニン、リジン、ヒスチジン、オルニチン等の塩基性アミノ酸との塩；モノエタノールアミ

ン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等の有機塩基との塩などが挙げられる。好ましくは、アルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩である。

[0042] 短鎖脂肪酸を含む組成物は、医薬組成物の形態で実施してもよい。短鎖脂肪酸を含む組成物を医薬組成物の形態で実施する場合、短鎖脂肪酸を含む組成物は、公知の薬物製剤化方法により製剤化することができる。例えば、短鎖脂肪酸を含む組成物は、カプセル剤、タブレット剤、丸剤、サシェ剤、液剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、トローチ剤、舌下剤、チュアブル剤、バツカル剤、ペースト剤、シロップ剤、懸濁剤、エリキシル剤またはエマルション剤の形態において経口的に使用することができる。また、坐剤またはかん腸剤として使用することができる。

[0043] 短鎖脂肪酸を含む組成物は、食品組成物の形態で実施してもよい。食品には、サプリメント、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、病者用食品等が含まれる。食品組成物の形態は特に限定されず、例えば茶飲料、清涼飲料、炭酸飲料、栄養飲料、果実飲料、乳酸飲料等の飲料、そば、うどん、中華麺、即席麺等の麺類、飴、キャンディー、ガム、チョコレート、スナック菓子、ビスケット、ゼリー、ジャム、クリーム、焼き菓子、パン等の菓子およびパン類、かまぼこ、ハム、ソーセージ等の水産・畜産加工食品、加工乳、発酵乳等の乳製品、サラダ油、てんぷら油、マーガリン、マヨネーズ、ショートニング、ホイップクリーム、ドレッシング等の油脂および油脂加工食品、ソース、たれ等の調味料、カレー、シチュー、丼、お粥、雑炊等のレトルトパウチ食品、アイスクリーム、シャーベット、かき氷等の冷菓などを挙げることができる。

[0044] 短鎖脂肪酸を含む組成物を製剤化するために、薬理学的に許容される担体、食品または飲料等での摂取が許容される担体を使用することができる。例えば滅菌水、生理食塩水、植物油、溶剤、基剤、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、芳香剤、賦形剤、防腐剤、結合剤、希釈剤、等張化剤、無痛化剤、増量剤、崩壊剤、緩衝剤、コーティング剤、滑沢剤、着色剤、

甘味剤、粘稠剤、矯味矯臭剤、溶解補助剤などを使用することができる。

[0045] 短鎖脂肪酸を含む組成物の投与量または摂取量は、肺高血圧症患者の年齢、体重、性別、症状、健康状態等の因子、組成物の種類（医薬品、食品、飲料）を考慮に入れて経験的に決定され得る。例えば、1回当たりの投与量または摂取量は、通常0.01mg/kg体重～100mg/kg体重であり、1mg/kg体重～10mg/kg体重であってもよい。

[0046] 〔肺高血圧症患者の予後を予測する方法〕

本発明は、肺高血圧症患者の予後を予測する方法（以下、「本発明の予後予測方法」と記す）を提供する。本発明の予後予測方法は、ミクロコッカス科（Micrococcaceae）細菌、レンサ球菌科（Streptococcaceae）細菌、パスツレラ科（Pasteurellaceae）細菌、ベイロネラ科（Veillonellaceae）細菌および乳酸桿菌科（Lactobacillaceae）細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むものであればよい。本発明の予後予測方法において、予後不良とは、将来肺移植登録をする可能性が高いこと、将来右心不全を発症する可能性が高いこと、および／または、将来肺高血圧症に関連して死亡する可能性が高いことを意味する。

[0047] より具体的には、本発明の予後予測方法は以下の工程を含むことが好ましい。

（1）被験肺高血圧症患者の糞便からDNAを抽出し、ミクロコッカス科細菌、レンサ球菌科細菌、パスツレラ科（Pasteurellaceae）細菌、ベイロネラ科（Veillonellaceae）細菌および乳酸桿菌科（Lactobacillaceae）細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程、および

（2）前記1種以上の細菌が検出された場合に被験肺高血圧症患者は予後不良であると判断する工程。

[0048] ミクロコッカス科細菌はロシア属（*Rothia*）細菌であってもよく、*Rothia_mucilaginosa*、*Rothia_dentocariosa*、*Rothia_aeria*であってもよい。レンサ球菌科細菌はレンサ球菌属（*Streptococcus*）細菌であってもよく、*Streptococcus_salivarius*、*Streptococcus_parasanguinis*、*Streptococcus_vestibul*

ularis、Streptococcus_oligofermentans、Streptococcus_anginosus、Streptococcus_mitis、Streptococcus_oralis、Streptococcus_pneumoniae、Streptococcus_mutans、Streptococcus_intermedius、Streptococcus_peroris、Streptococcus_tigurinusであってもよい。パスツレラ科細菌はヘモフィルス属 (Haemophilus) 細菌であってもよく、Haemophilus_parainfluenzaであってもよい。ベイロネラ科細菌はベイロネラ属 (Veillonella) 細菌であってもよく、Veillonella_parvula、Veillonella_atypica、Veillonella_disper、Veillonella_denticariosi、Veillonella_rogosaeであってもよい。乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌は乳酸桿菌属 (Lactobacillus) 細菌であってもよく、Lactobacillus_delbrueckii、Lactobacillus_acidophilus、Lactobacillus_crispatus、Lactobacillus_gasseri、Lactobacillus_helveticus、Lactobacillus_johnsonii、Lactobacillus_kefiranoferens、Lactobacillus_paragasseri、Lactobacillus_casei、Lactobacillus_paracasei、Lactobacillus_rhamnosus、Lactobacillus_sakei、Lactobacillus_curvatus、Lactobacillus_salivarius、Lactobacillus_plantarum、Lactobacillus_pentosus、Lactobacillus_fermentum、Lactobacillus_reuteri、Lactobacillus_brevis、Lactobacillus_fructivorans、Lactobacillus_lindeneri、Lactobacillus_sanfranciscensis、Lactobacillus_kunkeeiであってもよい。

[0049] 糞便からのDNA抽出は公知のDNA抽出方法を用いて行うことができる。細菌の検出は、例えば、メタゲノム解析、PCR、ELISA、便培養検査、抗原検査等により行うことができる。メタゲノム解析は16SrRNAメタゲノム解析でもよく、フルメタゲノム解析でもよい。メタゲノム解析は、公知の方法を用いて行うことができる。PCRは、糞便から抽出したDNAを鋳型として公知の方法を用いて行うことができる。PCRで用いるプライマーとしては、例えば以下のプライマーが使用できるが、これらに限定されない。

・全ての細菌を検出可能な16Sプライマーセット

16S(Total Bacteria)_F : GTGSTGCAYGGYTGTCTGTCA (配列番号 1)

16S(Total Bacteria)_R : ACGTCRTCCMCACCTTCCTC (配列番号 2)

- ・ミクロコッカス科細菌を検出可能なプライマーセット

RM_F : GCCTAGCTTGCTAGGTGGAT (配列番号3)

RM_R : GCAGGTACCGTCAATCTCTC (配列番号4)

- ・レンサ球菌科細菌を検出可能なプライマーセット

Str1_F : GTACAGTTGCTTCAGGACGTATC (配列番号5)

Str2_R : ACGTTCGATTTTCATCACGTTG (配列番号6)

- ・パスツレラ科細菌を検出可能なプライマーセット

p84_F : GACGGAAAGACCCCGTGAACCT (配列番号7)

p85_R : GGCAAGTTTCGTGCTTAGAT (配列番号8)

属レベル、種レベルでの検出には、公知のデータベースから検出対象細菌ゲノムの塩基配列を取得して、適切なプライマーセットを設計して使用することができる。

[0050] ミクロコッカス科細菌、レンサ球菌科細菌、パスツレラ科 (*Pasteurellaceae*) 細菌、ベイロネラ科 (*Veillonellaceae*) 細菌および乳酸桿菌科 (*Lactobacillaceae*) 細菌のいずれか1種が検出された場合に、被験肺高血圧症患者は予後不良であると判断することができる。レンサ球菌科細菌を検出対象とする場合、レンサ球菌科細菌の存在割合が1%以上であった場合に被験肺高血圧症患者は予後不良と判断してもよい。パスツレラ科細菌を検出対象とする場合、パスツレラ科細菌の存在割合が0.1%以上であった場合に被験肺高血圧症患者は予後不良と判断してもよい。

[0051] [肺高血圧症患者の重症度の判定を補助する方法]

本発明は、肺高血圧症患者の重症度の判定を補助する方法（以下、「本発明の重症度判定補助方法」と記す）を提供する。本発明の重症度判定補助方法は、ミクロコッカス科 (*Micrococcaceae*) 細菌、レンサ球菌科 (*Streptococcaceae*) 細菌、パスツレラ科 (*Pasteurellaceae*) 細菌、ベイロネラ科 (*Veillonellaceae*) 細菌および乳酸桿菌科 (*Lactobacillaceae*) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むものであればよい。肺高血圧症患者の重症度は、例えば、WHO肺高血圧症機能分類（表2）に基づいて判定する

ことができる。

[0052] [表2]

WHO 肺高血圧症機能分類

I 度	身体活動に制限のない肺高血圧症患者。 普通の身体活動では呼吸困難や疲労、胸痛や前失神など生じない。
II 度	身体活動に軽度の制限のある肺高血圧症患者。 安静時には自覚症状がない。普通の身体活動で呼吸困難や疲労、胸痛や前失神などが起こる。
III 度	身体活動に著しい制限のある肺高血圧症患者。 安静時に自覚症状がない。普通以下の軽度の身体活動では呼吸困難や疲労、胸痛や前失神などが起こる。
IV 度	どんな身体活動もすべて苦痛となる肺高血圧症患者。 これらの患者の一部は右心不全の症状を呈している。 安静時にも呼吸困難および/または疲労がみられる。 どんな身体活動でも自覚症状の増悪がある。

[0053] 本発明の重症度判定補助方法は以下の工程を含むことが好ましい。

(1) 被験肺高血圧症患者の糞便からDNAを抽出し、ミクロコッカス科細菌、レンサ球菌科細菌、パストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌および乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程、および

(2) ミクロコッカス科細菌が検出された場合、レンサ球菌科細菌が検出されかつその存在割合が0.5%以上であった場合、および/またはパストレラ科細菌が検出されかつその存在割合が0.1%以上であった場合に、被験肺高血圧症患者は重症度が高いとの判定を補助する工程。

[0054] ミクロコッカス科細菌はロシア属 (Rothia) 細菌であってもよく、*Rothia_mucilaginosa*、*Rothia_dentocariosa*、*Rothia_aeria*であってもよい。レンサ球菌科細菌はレンサ球菌属 (*Streptococcus*) 細菌であってもよく、*Streptococcus_salivarius*、*Streptococcus_parasanguinis*、*Streptococcus_vestibularis*、*Streptococcus_oligofermentans*、*Streptococcus_anginosus*、*Streptococcus_mitis*、*Streptococcus_oralis*、*Streptococcus_pneumoniae*、*Streptococcus_mutans*、*Streptococcus_intermedius*、*Streptococcus_peroris*、*Streptococcus_tigurinus*であってもよい。パストレラ科細菌はヘモフィルス属

(Haemophilus) 細菌であってもよく、Haemophilus_parainfluenzaであってもよい。ベイロネラ科細菌はベイロネラ属 (Veillonella) 細菌であってもよく、Veillonella_parvula、Veillonella_atypica、Veillonella_disper、Veillonella_denticariosi、Veillonella_rogosaeであってもよい。乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌は乳酸桿菌属 (Lactobacillus) 細菌であってもよく、Lactobacillus_delbrueckii、Lactobacillus_acidophilus、Lactobacillus_crispatus、Lactobacillus_gasseri、Lactobacillus_helveticus、Lactobacillus_johnsonii、Lactobacillus_kefiranofaciens、Lactobacillus_paragasseri、Lactobacillus_casei、Lactobacillus_paracasei、Lactobacillus_rhamnosus、Lactobacillus_sakei、Lactobacillus_curvatus、Lactobacillus_salivarius、Lactobacillus_plantarum、Lactobacillus_pentosus、Lactobacillus_fermentum、Lactobacillus_reuteri、Lactobacillus_brevis、Lactobacillus_fructivorans、Lactobacillus_lindeneri、Lactobacillus_sanfranciscensis、Lactobacillus_kunkeeiであってもよい。

[0055] 本発明の重症度判定補助方法は、レンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌、ロシア属 (Rothia) 細菌およびベイロネラ属 (Veillonella) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むものであってもよい。この場合、以下の工程を含むことが好ましい。

(I) 被験肺高血圧症患者の糞便からDNAを抽出し、レンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌、ロシア属 (Rothia) 細菌およびベイロネラ属 (Veillonella) 細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程、および

(II) レンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌が検出されかつその存在割合が10.8%以上であった場合、ロシア属 (Rothia) 細菌が検出されかつその存在割合が0.33%以上であった場合、および／またはベイロネラ属 (Veillonella) 細菌が検出されかつその存在割合が4.56%以上であった場合に、被験肺高血圧症患者は重症度が高いとの判定を補助する工程。

[0056] 糞便からのDNA抽出は公知のDNA抽出方法を用いて行うことができる。細菌の検出は、例えば、メタゲノム解析、PCR、ELISA、便培養検査、抗原検査等

により行うことができる。メタゲノム解析は16SrRNAメタゲノム解析でもよく、フルメタゲノム解析でもよい。メタゲノム解析は、公知の方法を用いて行うことができる。PCRは、糞便から抽出したDNAを鋳型として公知の方法を用いて行うことができる。PCRで用いるプライマーとしては、上記本発明の予後予測方法で説明したプライマーセットを好適に使用することができる。

[0057] ミクロコッカス科細菌、レンサ球菌科細菌およびパストレラ科細菌のいずれか1種が上記工程(2)に記載の基準を超える場合に、被験肺高血圧症患者は重症度が高いとの判定の補助を行うことができる。または、レンサ球菌属(*Streptococcus*)細菌、ロシア属(*Rothia*)細菌およびベイロネラ属(*Veillonella*)細菌のいずれか1種が上記工程(11)に記載の基準を超える場合に、被験肺高血圧症患者は重症度が高いとの判定の補助を行うことができる。

[0058] [肺高血圧症の診断を補助する方法]

本発明は、肺高血圧症の診断を補助する方法(以下、「本発明の肺高血圧症診断補助方法」と記す)を提供する。本発明の肺高血圧症診断補助方法は、被験者の糞便中1g A濃度を測定し、健常者の糞便中1g A濃度と比較することを含む方法であればよい。

[0059] 本発明の肺高血圧症診断補助方法は以下の工程を含むことが好ましい。

(1) 被験者の糞便中1g A濃度を測定する工程、および

(2) 被験者の糞便中1g A濃度が健常者の糞便中1g A濃度より高い場合に、被験者は肺高血圧症であるとの診断を補助する工程。

[0060] 糞便中1g A濃度は、糞便をPBS等の適当な溶液に懸濁、希釈し、この希釈懸濁液中の1g A濃度を市販の1g A測定キット等を用いて測定することができる。対照とする健常者の糞便中1g A濃度は、同時に測定したものをを用いてもよいが、蓄積された健常者の糞便中1g A濃度を用いてもよい。健常者の糞便中1g A濃度と比較して被験者の糞便中1g A濃度が高い場合に、被験者が肺高血圧症を発症しているとの診断の補助を行うことができる。健常者の糞便中1g A濃度と比較して被験者の糞便中1g A濃度が120%以

上、130%以上、140%以上、150%以上、170%以上、180%以上、190%以上、200%以上高い場合に、被験者が肺高血圧症を発症しているとの診断の補助を行ってもよい。

[0061] 〔門脈圧亢進に伴う肺高血圧症の診断を補助する方法〕

本発明は、門脈圧亢進に伴う肺高血圧症の診断を補助する方法（以下、「本発明の門脈圧亢進に伴う肺高血圧症診断補助方法」と記す）を提供する。本発明の門脈圧亢進に伴う肺高血圧症診断補助方法は、被験者の腸内細菌叢において、ビフィドバクテリウム属（*Bifidobacterium*）細菌、ドレア属（*Dorea*）細菌およびブラウチア属（*Blautia*）細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程を含むものであればよい。

[0062] 本発明の門脈圧亢進に伴う肺高血圧症診断補助方法は以下の工程を含むことが好ましい。

（1）被験者の糞便からDNAを抽出し、ビフィドバクテリウム属（*Bifidobacterium*）細菌、ドレア属（*Dorea*）細菌およびブラウチア属（*Blautia*）細菌から選択される1種以上の細菌を検出する工程、および

（2）上記いずれかの細菌が検出された場合に、被験者は門脈圧亢進に伴う肺高血圧症であるとの診断を補助する工程。

[0063] 糞便からのDNA抽出は公知のDNA抽出方法を用いて行うことができる。細菌の検出は、例えば、メタゲノム解析、PCR、ELISA、便培養検査、抗原検査等により行うことができる。メタゲノム解析は16SrRNAメタゲノム解析でもよく、フルメタゲノム解析でもよい。メタゲノム解析は、公知の方法を用いて行うことができる。PCRは、糞便から抽出したDNAを鋳型として公知の方法を用いて行うことができる。

[0064] 〔慢性血栓塞栓性肺高血圧症の診断を補助する方法〕

本発明は、慢性血栓塞栓性肺高血圧症の診断を補助する方法（以下、「本発明の慢性血栓塞栓性肺高血圧症診断補助方法」と記す）を提供する。本発明の慢性血栓塞栓性肺高血圧症診断補助方法は、被験者の腸内細菌叢においてクレブシエラ属（*Klebsiella*）細菌を検出する工程を含むものであればよ

い。

[0065] 本発明の慢性血栓塞栓性肺高血圧症診断補助方法は以下の工程を含むことが好ましい。

(1) 被験者の糞便からDNAを抽出し、クレブシエラ属 (*Klebsiella*) 細菌を検出する工程、および

(2) クレブシエラ属が検出された場合に、慢性血栓塞栓性肺高血圧症であるとの診断を補助する工程。

[0066] 糞便からのDNA抽出は公知のDNA抽出方法を用いて行うことができる。細菌の検出は、例えば、メタゲノム解析、PCR、ELISA、便培養検査、抗原検査等により行うことができる。メタゲノム解析は16SrRNAメタゲノム解析でもよく、フルメタゲノム解析でもよい。メタゲノム解析は、公知の方法を用いて行うことができる。PCRは、糞便から抽出したDNAを鋳型として公知の方法を用いて行うことができる。

[0067] 本発明には、以下の各発明が含まれる。

[a 1] 肺高血圧症患者に口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤の有効量を投与することにより、肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善する方法。

[a 2] 肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌に対して溶菌活性を示すファージの有効量を肺高血圧症患者に投与することにより肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化して肺高血圧症を改善する方法。

[a 3] 肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する少なくとも1種の腸内細菌の有効量を肺高血圧症患者に投与することにより肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善する方法。

[a 4] 肺高血圧症患者にHMG-CoA還元酵素阻害薬の有効量を投与することにより肺高血圧症を改善する方法。

[a 5] 肺高血圧症患者に短鎖脂肪酸またはその塩の有効量を投与することにより肺高血圧症を改善する方法。

[b 1] 肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善する

ために使用する、口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤。

〔b 2〕肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善するために使用する、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌に対して溶菌活性を示すファージ。

〔b 3〕肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善するために使用する、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する少なくとも 1 種の腸内細菌。

〔b 4〕肺高血圧症を改善するために使用する、HMG-CoA還元酵素阻害薬。

〔b 5〕肺高血圧症を改善するために使用する、短鎖脂肪酸またはその塩。

〔c 1〕肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善する医薬を製造するための、口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤の使用。

〔c 2〕肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善する医薬を製造するための、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌に対して溶菌活性を示すファージの使用。

〔c 3〕肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させて肺高血圧症を改善する医薬または食品組成物を製造するための、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する少なくとも 1 種の腸内細菌の使用。

〔c 4〕肺高血圧症を改善する医薬を製造するための、HMG-CoA還元酵素阻害薬の使用。

〔c 5〕肺高血圧症を改善する医薬を製造するための、短鎖脂肪酸またはその塩の使用。

実施例

[0068] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0069] 〔実施例 1：肺高血圧症モデル動物の腸内細菌叢の検討〕

A. 実験材料と方法

（1）肺高血圧症モデル動物の作製（図 1）

(1-1) 低酸素負荷による肺高血圧症モデルラットの作製

6週齢の雄SDラット（オリエンタル酵母より購入）を使用した。ラットを10%酸素の低酸素チャンバー内で持続的に3週間飼育し、低酸素負荷による肺高血圧症モデルラット（以下「Hx」と記す）を作製した。

[0070] (1-2) モノクロタリン負荷による肺高血圧症モデルラットの作製

6週齢の雄SDラット（オリエンタル酵母より購入）を使用した。Crotaline（Sigma）を60mg/kgで皮下注射して通常酸素濃度環境（正酸素）で3週間飼育し、モノクロタリン負荷による肺高血圧症モデルラット（以下「MCT」と記す）を作製した。

[0071] (1-3) Sugen5416/低酸素/正酸素負荷による肺高血圧症モデルラットの作製

6週齢の雄SDラット（オリエンタル酵母より購入）を使用した。VEGFR2阻害薬であるSugen5416（MedChemExpress）を20mg/kgで皮下投与後10%酸素の低酸素チャンバー内で持続的に3週間飼育し、その後通常酸素濃度環境（正酸素）で2週間飼育することによりSugen5416/低酸素/正酸素負荷による肺高血圧症モデルラットを（以下「(SuHx)」と記す）作製した。

[0072] (1-4) 対照動物

無処置の6週齢の雄SDラット（オリエンタル酵母より購入）を対照群とした。また、芳香族炭化水素受容体（Aryl hydrocarbon Receptor : AHR）欠損ラット（以下「AHRK0ラット」と記す）にSugen5416/低酸素/正酸素負荷処理を行った動物も、コントロール動物として使用した。AHRK0ラットは、大阪大学医学部附属動物実験施設に委託して作製した。具体的には、AHR遺伝子のExon -2のPAM配列に隣接した標的部位に対するガイドRNAを設計し、SDラットに対してCRISPR-Cas9システムを用いた遺伝子編集を行って作製した。

[0073] (2) 右室収縮期圧測定

ラットはイソフルラン（Pfizer）による吸入麻酔によって鎮静・鎮痛化を行った。手技間のラットの体温を直腸温モニターと連動したサーモスタット制御のヒートパッドで37℃～38℃に維持した。気管切開し、ラット用人工呼吸器（Harvard apparatus）で1回換気量10μL/g、70回/分で換気した。ポリ

エチレンチューブを右外頸静脈に挿入して右室まで進めて右室圧（RVP）を測定した。RVPシグナルは圧トランスデューサー（MLT0670; ADインスツルメンツ）で検出し、圧アンプリファイアー（ML117; ADインスツルメンツ）でそのシグナルを中継して、持続的にPower Labシステム（ADインスツルメンツColorado Springs, CO）でサンプリングして、Chart software（ADインスツルメンツ）を用いてコンピューターに記録した。心拍数は右室収縮期のピークに基づいて算出した。

[0074] （３）右室/左室重量比

右室収縮期圧測定後、ラットを過剰量の麻酔薬投与で安楽死させ心臓を摘出した。心房を外した上で、右心室（RV）を左心室（LV）と中隔(septum)から分離した。水分を吸い取った後、右心室重量と左心室＋中隔の重量を測定し、両者の重量比（右室/左室重量比）を算出して右心室の肥大を評価した。

[0075] （４）腸内細菌叢の16SrRNAメタゲノム解析

糞便からNecleoSpin DNA stool（Macherey-Nagel）を用いてDNAを抽出した。16S Metagenomic Sequencing Library Preparation（Illumina）および16S リボソームRNAのV1-V2をターゲットとしたプライマーセット（27Fmod: 5' - AGRGTTTGATCMTGGCTCAG-3'（配列番号9）および 338R: 5' -TGCTGCCTCCCGTAG GAGT-3'（配列番号10））を用いて、製品のプロトコールに従ってライブラリーを作製した。MiSeq System（Illumina）を用いて、251塩基のアンプリコンをシークエンシングした。得られたペアエンドリードはPEAR（sco.h-its.org/exelixis/web/software/pear/）を用いてマージされ、BBtrim（bbmap.sourceforge.net）によってトリミングされた。さらにrandom_sequence_sample.pl（ualberta.ca/~stothard/software.html）によって、サンプルにつき20000リードにまで無作為に抽出した。処理されたシークエンスは、UCLUST version 1.2.33qをもとに、97%相同性からOTUs（operational taxonomic units）にクラスター化した。それぞれのOTUsはRDP Classifier version 2.2とGreen genes 13_8データベースを参照して分類学的に分けられ、QIIME version 1.9.1により生物情報学的な菌叢解析を行った。

[0076] (5) 抗生剤カクテル投与による肺高血圧症病態の評価

(5-1) Hxへの抗生剤カクテル投与

6週齢の雄SDラットを10%酸素の低酸素チャンバー内で3週間飼育し、飼育期間中4種類の抗生剤（アンピシリン1g/L、フラジオマイシン1g/L、メトロニダゾール1g/L、バンコマイシン0.5g/L）を含むオートクレーブ滅菌水を飲料水として与えた（Hx抗生剤群）。対照として、10%酸素の低酸素チャンバー内で持続的に3週間飼育し、オートクレーブ滅菌水を飲料水として与えた群（Hx群）および通常酸素濃度環境（正酸素）で3週間飼育し、オートクレーブ滅菌水を飲料水として与えた群（対照群）を設けた。試験期間終了後、右室収縮期圧の測定および右室/左室重量比を求めた。

[0077] (5-2) MCTへの抗生剤カクテル投与

6週齢の雄SDラットにCrotaline（Sigma）を60mg/kgで皮下注射して通常酸素濃度環境（正酸素）で3週間飼育し、飼育期間中4種類の抗生剤（アンピシリン1g/L、フラジオマイシン1g/L、メトロニダゾール1g/L、バンコマイシン0.5g/L）を含む3%シヨ糖水を飲料水として与えた（MCT抗生剤群）。対照として、Crotaline投与後通常酸素濃度環境（正酸素）で3週間飼育し、シヨ糖水を飲料水として与えた群（MCT群）およびCrotaline投与せずに通常酸素濃度環境（正酸素）で3週間飼育し、シヨ糖水を飲料水として与えた群（対照群）を設けた。試験期間終了後、右室収縮期圧の測定および右室/左室重量比を求めた。

[0078] (5-3) SuHxへの抗生剤カクテル投与

6週齢の雄SDラットにSugen5416皮下投与後10%酸素の低酸素チャンバー内でオートクレーブ滅菌水を飲料水として3週間飼育し、その後通常酸素濃度環境（正酸素）で2週間飼育し、通常酸素濃度環境での飼育期間中、4種類の抗生剤（アンピシリン1g/L、フラジオマイシン1g/L、メトロニダゾール1g/L、バンコマイシン0.5g/L）を含む3%シヨ糖水を飲料水として与えた（SuHx抗生剤群）。対照として、Sugen5416投与後低酸素チャンバー内で3週間飼育し、その後通常酸素濃度環境（正酸素）で2週間飼育し、通常酸素濃度環境での飼育

期間中3%ショ糖水を飲料水として与えた群（SuHx群）およびSugen5416を投与せず通常酸素濃度環境（正酸素）で5週間飼育し、飼育期間中オートクレーブ滅菌水を飲料水として与えた群（対照群）を設けた。試験期間終了後、右室収縮期圧の測定および右室/左室重量比を求めた。

[0079] （6）統計解析

全てのデータは平均値±標準誤差で表現されている。多群間での有意差検定は1-way ANOVAで行い、Scheffe'sの方法で検定した。2群間の検定はステューデントt検定で解析した。P値0.05未満を統計的有意差ありとした。

[0080] B. 結果

（1）腸内細菌叢の変容

低酸素負荷（Hx）、モノクロタリン負荷（MCT）、Sugen5416/低酸素/正酸素負荷（SuHx）の各肺高血圧症モデルラット、および無処置ラット（対照群）の糞便中DNAの16SrRNAメタゲノム解析を行い、腸内細菌叢の構成を科レベルで解析した。結果を図2示した。肺高血圧症モデルラットでは共通してS24-7が増加し、RuminococcaceaeとLachnospiraceaeが減少していた。Sugen5416/低酸素/正酸素負荷（SuHx）処理したAHRK0ラットの腸内細菌叢の構成は、無処置ラット（対照群）に近いものとなっていた。

[0081] 図3（A）は、対照群、Hx群、MCT群およびSuHx群の腸内細菌叢におけるS24-7の存在率を示した図である。いずれの肺高血圧症モデルラットにおいても、対照群と比較してS24-7の存在率が増加していることが示された。図3（B）は、対照群、Hx群、MCT群およびSuHx群の腸内細菌叢におけるLachnospiraceaeの存在率を示した図である。いずれの肺高血圧症モデルラットにおいても、Lachnospiraceaeの存在率が減少していることが示された。

[0082] （2）抗生剤を用いた腸内細菌叢への介入による肺高血圧症病態への影響

（2-1）低酸素負荷モデル

結果を図4に示した。（A）は右室収縮期圧の結果、（B）は右室/左室重量比の結果である。抗生剤カクテルを投与していない低酸素負荷モデルラット（Hx群）では、対照群と比較して右室収縮期圧および右室/左室重量比はい

ずれも上昇し、肺高血圧症の病態を呈していた。一方、抗生剤カクテルと投与していない低酸素負荷モデルラット（Hx抗生剤群）では、右室収縮期圧の上昇および右室/左室重量比の上昇がいずれも抑制され、肺高血圧症の病態が改善していることが示された。

[0083] (2-2) モノクロタリン負荷モデル

結果を図5に示した。(A)は右室収縮期圧の結果、(B)は右室/左室重量比の結果である。抗生剤カクテルを投与していないモノクロタリン負荷モデルラット（MCT群）では、対照群と比較して右室収縮期圧および右室/左室重量比はいずれも上昇し、肺高血圧症の病態を呈していた。一方、抗生剤カクテルを投与したモノクロタリン負荷モデルラット（MCT抗生剤群）では、右室収縮期圧の上昇および右室/左室重量比の上昇がいずれも抑制され、肺高血圧症の病態が改善していることが示された。

[0084] (2-3) Sugen5416/低酸素/正酸素負荷モデル

結果を図6に示した。(A)は右室収縮期圧の結果、(B)は右室/左室重量比の結果である。抗生剤カクテルを投与していないSugen5416/低酸素/正酸素負荷モデルラット（SuHx群）では、対照群と比較して右室収縮期圧および右室/左室重量比はいずれも上昇し、肺高血圧症の病態を呈していた。一方、抗生剤カクテルと投与していないSugen5416/低酸素/正酸素負荷モデルラット（SuHx抗生剤群）では、右室収縮期圧の上昇および右室/左室重量比の上昇がいずれも抑制され、肺高血圧症の病態が改善していることが示された。

[0085] 〔実施例2：肺高血圧症患者の腸内細菌叢の検討（1）〕

A. 実験材料と方法

(1) 16SrRNAメタゲノム解析による腸内細菌叢解析

(1-1) 被験者

肺高血圧症患者25例、健常者25例を被験者とした。肺高血圧症患者は特発性・遺伝性肺動脈性肺高血圧症11例、膠原病性肺高血圧症4例、門脈圧亢進に伴う肺高血圧症1例、薬剤誘発性肺高血圧症2例、慢性血栓塞栓性肺高血圧症3例、先天性短絡性疾患に伴う肺高血圧症4例であった。

[0086] (1-2) 16SrRNAメタゲノム解析

実施例1と同じ方法で、16SrRNAメタゲノム解析を行った。

[0087] (1-3) α 多様性の評価

糞便中に含まれる菌種の数やその構成比率、菌種の系統関係にどれだけ偏りがあるかを示すShannon index、Chao indexにより α 多様性を評価した。いずれもQIIME version 1.9.1により算出した。

[0088] (1-4) β 多様性の評価

各個体における菌種の構成やその比率から、個体間の腸内細菌構成の相違を評価するため主成分解析にて β 多様性を評価した。QIIME version 1.9.1により算出した。

[0089] (1-5) 芳香族炭化水素受容体 (Aryl hydrocarbon Receptor : AHR) 活性の測定

Human AhR Reporter Assay System (INDIGO Biosciences社) を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより血清中のAHR活性を測定した。刺激条件以外は製造業者の手順書に従って実施した。刺激は、手順書に記載の培地に血清を最終濃度10%となるように添加した。

[0090] (2) フルメタゲノム解析による腸内細菌叢解析腸内細菌叢解析

(2-1) 被験者

肺高血圧症患者5例と健常者5例を被験者とした。

(2-2) フルメタゲノム解析

全ゲノムシーケンシングは、DNBSEQ-G400 (MGI Tech) にて実行され、150塩基のペアエンドリードが生成された。fastp version 0.20.0を用いて低クオリティリードを除外し、bowtie2 version 2.3.5を用いてヒトリファレンスゲノムデータ (GRCh38) と一致する宿主由来リードを除外した。続いてMetaPhlAn2 version 2.6.0を用いて構成細菌種を同定し、hclust2.pyを用いてヒートマップを作成した。

[0091] (3) 腸内細菌叢の機能解析

腸内細菌叢のもつ機能的代謝プロファイルはHUMAN2 version 0.9.9によっ

て解析した。

[0092] (4) 糞便中IgA濃度測定

糞便を計量し、1000倍希釈になるようPBSで希釈し、希釈懸濁液を調製した。Human IgA ELISA kit (Bethyl Laboratories inc.) キットを用いて懸濁液中のIgA濃度を測定した。ラットの糞便中IgA濃度も同様に、Rat IgA ELISA Kit (Genway) を用いて測定した。

[0093] (5) 統計解析

実施例1と同じ方法で統計解析を行った。

[0094] B. 結果

(1) 糞便中DNAの16SrRNAメタゲノム解析結果

(1-1) 糞便中DNAの16SrRNAメタゲノム解析による腸内細菌叢の変容

肺高血圧症患者および健常者の糞便中DNAの16SrRNAメタゲノム解析を行い、腸内細菌叢の構成を科レベルで解析した。結果を図7に示した。肺高血圧症患者において健常者より増加している腸内細菌 (Streptococcaceae、Micrococcaceae、Pasteurellaceae、Veillonellaceaeなど) が存在していた。また、肺高血圧症患者において健常者より減少している腸内細菌 (Rikenellaceae、Ruminococcaceae、Coriobacteriaceaeなど) が存在していた。

[0095] (1-2) α 多様性の評価

結果を図8に示した。(A)はShannon indexの結果、(B)はChao indexの結果である。肺高血圧症患者では、どちらの指標についても健常者と比較して有意に減少していた。

[0096] (1-3) β 多様性の評価

主成分解析の結果を図9に示した。健常者と肺高血圧症患者では別々にクラスター形成され、腸内細菌叢の構成が健常者と肺高血圧症患者では明らかに異なっていることが示された。

[0097] (1-4) 肺高血圧症患者において増加する腸内細菌の詳細な検討

図10に、(A) Streptococcaceae、(B) Micrococcaceae、および(C) Pasteurellaceaeの各科に属する菌について、個々の健常者および個々の

肺高血圧症患者における存在率をプロットし、両群の存在率の平均値を比較した結果を示した。また、肺高血圧症患者のうち、その後肺高血圧症に関連して死亡した患者およびその後肺移植登録をした患者を表示した。いずれの細菌（科）も、肺高血圧症患者群で健常者群より有意に増加していた。また、これらの細菌の存在率が高い肺高血圧症患者は、その後肺高血圧症に関連して死亡したり、肺移植登録をする確率が高いことが示された。

[0098] 肺高血圧症患者における腸内細菌の変化と重症度の関係を検討した結果を図 1 1 に示した。肺高血圧症の重症度は上記のWHO肺高血圧症機能分類（表 2）に基づいて判定した。（A）は、Micrococcaceae科細菌が検出されなかった肺高血圧症患者と、Micrococcaceae科細菌が検出された肺高血圧症患者における重症度を比較した結果であり、（B）は、Streptococcaceae科細菌の存在率が1%未満の肺高血圧症患者と、Streptococcaceae科細菌の存在率が1%以上の肺高血圧症患者における重症度を比較した結果であり、（C）はPasteurellaceae科細菌の存在率が0.1%未満の肺高血圧症患者と、Pasteurellaceae科細菌の存在率が0.1%以上の肺高血圧症患者における重症度を比較した結果である。（A）ではMicrococcaceae科細菌が検出された肺高血圧症患者のほうが重症度が高く、（B）ではStreptococcaceae科細菌の存在率が1%以上の肺高血圧症患者のほうが重症度が高く、（C）ではPasteurellaceae科細菌の存在率が0.1%以上の肺高血圧症患者のほうが重症度が高いことが示された。この結果から、肺高血圧症患者の腸内細菌叢の変化は肺高血圧症患者の重症度を反映していることが明らかになった。それゆえ、肺高血圧症患者の腸内細菌を調べることにより肺高血圧症患者の重症度の判定を補助し得ると考えられる。

[0099] 肺高血圧症患者における腸内細菌の変化と予後の関係を検討した結果を図 1 2 に示した。予後のイベントは、肺高血圧症関連死および肺移植登録とした。（A）は、Micrococcaceae科細菌が検出されなかった肺高血圧症患者と、Micrococcaceae科細菌が検出された肺高血圧症患者におけるイベント発生の有無を比較した結果であり、（B）は、Streptococcaceae科細菌の存在率

が1%未満の肺高血圧症患者と、Streptococcaceae科細菌の存在率が1%以上の肺高血圧症患者におけるイベント発生の有無を比較した結果であり、（C）はPasteurellaceae科細菌の存在率が0.1%未満の肺高血圧症患者と、Pasteurellaceae科細菌の存在率が0.1%以上の肺高血圧症患者におけるイベント発生の有無を比較した結果である。（A）ではMicrococcaceae科細菌が検出された肺高血圧症患者のみにイベントが発生し、（B）ではStreptococcaceae科細菌の存在率が1%以上の肺高血圧症患者のみにイベントが発生し、（C）ではPasteurellaceae科細菌の存在率が0.1%以上の肺高血圧症患者のほうに有意にイベント発生患者数が多いことが示された。この結果から、肺高血圧症患者の腸内細菌を調べることにより、肺高血圧症患者の予後を予測し得ることが明らかになった。

[0100] 肺高血圧症患者における腸内細菌の変化と患者血清中のAHR活性の関係を検討した。図13（A）は、健常者の血清AHR活性と肺高血圧症患者の血清AHR活性を測定した結果である。肺高血圧症患者のほうに健常者より血清AHR活性が有意に高いことが示されている。図13（B）は、肺高血圧症患者をWHO肺高血圧症機能分類（表2）の重症度1-2の患者群と重症度3-4の患者群に分け、健常者群との3群における血清AHR活性を測定した結果である。重症度が高いほど血清AHR活性が有意に高いことが示されている。図13（C）は、肺高血圧症患者の肺血管抵抗（pulmonary vascular resistance: PVR）と血清AHR活性との相関を示す図である。肺高血圧症患者のPVRと血清AHR活性との間に、有意な正の相関が認められた。これらの結果は、肺高血圧症患者の血清AHR活性は、患者の重症度と相関することを示すものである。

[0101] 次に、Streptococcaceae科細菌の存在率が0.5%未満の肺高血圧症患者と、Streptococcaceae科細菌の存在率が0.5%以上の肺高血圧症患者における血清AHR活性を比較した結果を図14に示した。Streptococcaceae科細菌の存在率が0.5%以上の肺高血圧症患者の方が0.5%未満の肺高血圧症患者より、有意に血清AHR活性が高いことが示された。したがって、この結果もまた、肺高血圧症患者の腸内細菌を調べることにより肺高血圧症患者の重症度の判定を補

助し得ることをサポートするものである。

[0102] 図15に、肺高血圧症患者において増加する腸内細菌を属レベルで比較した。(A) *Actinomyces*、(B) *Rothia*、(C) *Citrobacter*、(D) *Veillonella*、(E) *Escherichia*、(F) *Gemella*、(G) *Granulicatella*、(H) *Atopobium*、(I) *Clostridium*、(J) *Enterobacter*、(K) *Streptococcus*、(L) *Abiotrophia*、(M) *Klebsiella*、(N) *Cronobacter*、(O) *Shigella*、および(P) *Salmonella*が、健常者群と比較して肺高血圧症患者群で有意に増加していた。

[0103] (1-5) 肺高血圧症患者において減少する腸内細菌の詳細な検討

図16に、(A) *Rikenellaceae*、(B) *Coriobacteriaceae*、および(C) *Alcaligenaceae*の各科に属する菌について、個々の健常者および個々の肺高血圧症患者における存在率をプロットし、両群の存在率の平均値を比較した結果を示した。いずれの細菌(科)も、肺高血圧症患者群で健常者より有意に減少していた。

[0104] 図17に、肺高血圧症患者において減少する腸内細菌を属レベルで比較した。(A) *Butyricimonas*、(B) *Alistipes*、(C) *Ruminococcus*、(D) *Aldercruzia*、(E) *Acidaminococcus*、(F) *Sutterella*、(G) *Oscillospira*、(H) *Rikenella*、(I) *Lachnospira*、(J) *Collinsella*、および(K) *Holdemania*が、健常者群と比較して肺高血圧症患者群で有意に減少していた。

[0105] (2) 糞便中DNAのフルメタゲノム解析結果

(2-1) 糞便中DNAのフルメタゲノム解析による腸内細菌叢の変容

肺高血圧症患者および健常者の糞便中DNAのフルメタゲノム解析を行った。結果を図18に示した。*Veillonella_unclassified*、*Streptococcus_infantis*、*Streptococcus_parasanguinis*、*Ruminococcus_gnavus*、*Clostridium_bolteae*、*Sutterella_wadsworthensis*、*Klebsiella_pneumoniae*、*Rothia_mucilaginosa*、*Streptococcus_mitis_oralis_pneumoniae*、*Streptococcus_salivarius*、*Haemophilus_parainfluenzae*、*Veillonella_parvula*が肺高血圧症患者で

増加していた。これの中で、*Ruminococcus_gnavus*、*Clostridium_bolteae*、*Sutterella_wadsworthesis*、および*Haemophilus_parainfluenzae*以外は、口腔内常在菌であった（図中下線を付した細菌）。一方、*Alistipes_sp_AP11*、*Bacteroides_Bacterium*、*Eubacterium_hallii*、*Subdoligranulum_sp_4_3_54A2F_AA*、*Lachnospiraceae_bacterium_1_1_57FAA*、*Bilophila_unclassifieds*、*Bifidobacterium_adolescentis*、*Bifidobacterium_pseudocatenulatum*、*Parasutterella_excrementihominis*、*Roseburia_hominis*、*Alistipes_onderdonkii*、*Faecalibacterium_prausnitzii*、*Eubacterium_ventriosum*、*Roseburia_intestinalis*、*Parabacteroides_johnsonii*、*Bacteroides_cellulosilyticus*、*Bacteroides_uniformis*、*Eubacterium_eligens*が肺高血圧症患者で減少していた。

[0106] (2-2) 腸内細菌叢の機能解析

フルメタゲノム解析で得られたデータを用いて腸内細菌叢のもつ機能的代謝プロファイルを解析した結果を図19に示した。メバロン酸経路、マンノシルグリセリン酸合成経路、メチルグリオキサール分解経路、D-グルカル酸分解経路、TCAサイクルVIII経路、ヘム生合成経路、硝酸代謝経路に関連する機能などが肺高血圧症患者で上昇していることが明らかになった。

[0107] (3) 糞便中IgA濃度

結果を図20に示した。(A)がラットの結果、(B)がヒトの結果である。ラットの場合、低酸素負荷モデルラット(Hx群)およびSugen5416/低酸素/正酸素負荷モデルラット(SuHx群)では、対照群と比較して糞便中IgA濃度が上昇していた。ヒトの場合、肺高血圧症患者群では、健常者群と比較して糞便中IgA濃度が上昇していた。

[0108] [実施例3：肺高血圧症患者の腸内細菌叢の検討(2)]

A. 実験材料と方法

(1) 被験者

肺高血圧症患者57例、健常者57例を被験者とした。患者57例は、特発性・遺伝性肺動脈性肺高血圧症(I/HPAH)25例、膠原病性肺動脈性肺高血圧症(C

TD-PAH) 12例、先天性短絡性疾患に伴う肺高血圧症 (CHD-PAH) 6例、門脈圧亢進に伴う肺高血圧症 (PoPH) 3例、慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) 4例、その他 (薬剤誘発性肺高血圧症など) 7例を含んでいた。

[0109] (2) 16SrRNAメタゲノム解析

実施例1と同じ方法で、16SrRNAメタゲノム解析を行った。肺高血圧症患者と健常者の腸内細菌叢16SrRNAメタゲノム情報の生物学的特徴を明らかにするために、Bioconda環境下でLinear Discriminant Analysis (LDA) スコアを算出した。PH患者の腸内細菌叢の系統学的特徴を明らかにするために、LDA effect size (LEfSe) 解析によりCladogramを作図した。複合イベントを「死亡、肺移植、右心不全による入院」と定義して、そのイベント発生と関連する腸内細菌 (属レベル) をランダムフォレスト解析によりランク付けし、複合イベント (死亡、肺移植、右心不全による入院) と関連する腸内細菌の絞り込みを行った。

[0110] (3) 血清IL-6濃度測定

患者血清IL-6濃度の測定は、R&D systems社IL-6 ELISA kitを用いて行った。採血は糞便採取と同時期に行った。

[0111] B. 結果

(1) 糞便中DNAの16SrRNAメタゲノム解析結果

(1-1) PLS-DA解析 (部分的最小二乗判別分析)

PLS-DA解析の結果を図21に示した。PLS-DA解析は、部分的最小二乗判別分析であり、今回の解析では、健常者と肺高血圧症患者を分類するために、腸内細菌の頻度情報を説明変数として3次元的に展開し可視化した。図中Controlは健常者、PHは肺高血圧症患者を示す。健常者と肺高血圧症患者では明らかに異なったクラスターを形成した。

[0112] (1-2) α 多様性

α 多様性を評価した結果を図22に示した。(A) はFaith's phylogenetic diversityの結果、(B) はShannon indexの結果、(C) はObserved OTUsの結果である。肺高血圧症患者では、いずれの指標についても健常者と比較し

て有意に減少していた。

[0113] (1-3)

LDAスコア3.0以上をカットオフとして、肺高血圧症肺高血圧症患者で統計学的有意に増加または減少した菌（属レベル）を図23に示した。増加した菌は、*Streptococcus*, *Veillonella*, *Lachnoclostridium*, *Fusobacterium*, [*Ruminococcus*] *gnavus* group, *Lactobacillus*, *Erysipelatoclostridium*, *Bifidobacterium*, *Klebsiella*, *Escherichia-Shigella*, *Collinsella*, *Tyzzerella*, *Haemophilus*, *Rothia*であった。一方、減少した菌は、*Alistipes*, *Megamonas*, *Phascolarctobacterium*, uncultured bacterium (*Coriobacteriales*), *Acidaminococcus*, *Agathobacter*, *Prevotellaceae* NK3B31 group, [*Eubacterium*] *coprostanoligenes* group, *Subdoligranulum*, *Hydrogenoanaerobacterium*, *Ruminococcaceae* UCG-002, *Blautia*, *Ruminiclostridium* 5, *Paraprevotella*, [*Ruminococcus*] *torques* group, *Roseburia*, *Ruminococcaceae* UCG-013, *Lachnospira*, *Ruminococcaceae* NK4A214 group, *Acetanaerobacterium*, *Ruminococcus* 1, *Dorea*, *Fusicatenibacter*, uncultured (*Erysipelotrichaceae*), [*Eubacterium*] *halli* group, *Coprococcus* 3, *Gordonibacter*, *Coproobacter*, uncultured (*Ruminococcaceae*), *Oscillibacter*, uncultured (*Christensenellaceae*), *Anaerostipes*であった。

[0114] (1-4)

より有意に大きく変化している腸内細菌を同定するために、健常者および肺高血圧症患者に存在する属レベルの腸内細菌の相対頻度と、肺高血圧症患者での変化量 (Effect size)、変化に関する有意差 [$-\text{Log}_{10}(\text{p-value})$] から作成したvolcano plotを図24に示した。

[0115] (1-5)

LDAスコアとVolcano plotの結果から、属レベルで有意に変化した腸内細菌をCladogramで作図した結果を図25に示した。*Micrococcaceae*科*Rothia* (属)、*Bifidobacteriaceae*科*Bifidobacterium*、*Fusobacteriaceae*科*Fusobacterium*、*Veillonellaceae*科*Veillonella*、*Erysipelotrichaceae*科*Erysipelatoclo*

stridium、Lachnospiraceae科Ruminococcus gnavus group、Lachnospiraceae科Tyzzerella、Streptococcaceae科Streptococcusが特に増加しており多くは口腔内常在菌であった。またRikenellaceae科Alistipes、Ruminococcaceae科Subdoligranulum、Ruminococcaceae科Ruminiclostridium5、Lachnospiraceae科Eubacterium hallii group、Lachnospiraceae科Roseburia、Lachnospiraceae科Fusicatenibacter、Lachnospiraceae科Dorea、Lachnospiraceae科Coprococcus、Lachnospiraceae科Blautia、Lachnospiraceae科Anaerostipesが特に減少しており、多くはClostridium cluster IV/XIVaに属していた。

[0116] (1-6)

肺高血圧症のサブグループ毎に増減する18菌種（属レベル）の頻度を比較した結果を図26に示した。（A）はRothia、（B）はBifidobacterium、（C）はKlebsiella、（D）はVeillonella、（E）はErysipelatoclostridium、（F）はRuminococcus gnavus group、（G）はTyzzerella、（H）はStreptococcus、（I）はAlistipes、（J）はSubdoligranulum、（K）はRuminiclostridium5、（L）はEubacterium hallii group、（M）はRoseburia、（N）はFusicatenibacter、（O）はDorea、（P）はCoprococcus、（Q）Blautia、および（R）はAnaerostipesの結果である。図中、Controlは健常者、I/HPAHは特発性・遺伝性肺動脈性肺高血圧症、CTD-PAHは膠原病性肺動脈性肺高血圧症、CHD-PAH先天性短絡性疾患に伴う肺高血圧症、PoPHは門脈圧亢進に伴う肺高血圧症、CTEPHは慢性血栓塞栓性肺高血圧症、Othersはその他（薬剤誘発性肺高血圧症など）を示す。（B）Bifidobacterium、（O）Dorea、（Q）Blautiaは門脈圧亢進に伴う肺高血圧症において、特異的かつ有意に増加していた。また、（C）Klebsiellaは慢性血栓塞栓性肺高血圧症において、特異的かつ有意に増加していた。

[0117] (1-7)

肺高血圧症関連イベント（右心不全、肺移植、死亡の複合イベント）の発生と関連する腸内細菌をランダムフォレスト解析によりランク付けした結果を図27に示した。Rothia、Streptococcus、Haemophilus、Veillonellaが複

合イベント発生と関連していた。

[0118] (1-8)

複合イベント発生も予測する最適なcut-off値を算出するために、Receiver operating characteristics curve (ROC) 解析を行った。算出した複合イベント発生を最も予測できるcut-off値によって2群に分けて、肺高血圧症の重症度 (WHO肺高血圧症機能分類、表2参照) との関連を解析した結果を図28に示した。(A)はRothiaの結果(B)はVeillonellaの結果、(C)はStreptococcusの結果である。WHO肺高血圧症機能分類は、Rothia>0.33%、Streptococcus>10.8%の腸内細菌を保有する患者で有意に重症であった。

[0119] (1-9)

肺高血圧症関連イベント発生について、Rothia、Veillonella、Streptococcusのcut-off値によって患者を2群に分けて、Kaplan-Meier法で無イベント生存率を比較した結果を図29に示した。(A)はRothiaの結果(B)はVeillonellaの結果、(C)はStreptococcusの結果である。Rothia>0.33%、Veillonella>4.56%、Streptococcus>10.8%を保有する患者群では、Rothia<0.33%、Veillonella<4.56%、Streptococcus<10.8%を保有する患者群と比較して、死亡や右心不全、肺移植といった複合イベントが多く発生していた。

[0120] (2) 腸内細菌と血清IL-6濃度の相関

腸内細菌 (属レベル) の相対割合と血清IL-6濃度の相関係数を総当たりで算出し、相関係数 (r) >2の腸内細菌のネットワークを図30に示した。Haemophilus属、Klebsiella属、Fusobacterium属およびRothia属の相対割合 (Relative abundance) はELISA法で定量化した血清IL-6濃度と相関していた。

[0121] [実施例4：肺高血圧症モデルノトバイオトラットを用いた腸内細菌叢の検討]

A. 実験材料と方法

(1) 肺高血圧症モデルノトバイオトラットの作製

日本エスエルシー株式会社より無菌F344ラット雄を購入し、無菌アイソレーター環境下で飼育した。11週齢ラットに対して健常者由来便または肺高血

圧症患者由来便を投与し、15週齢ラットに対してモノクロタリンを投与して肺高血圧症モデルノトバイオトラットを作製した。具体的には、まず4人の健常者由来便を嫌気性チャンバー内で混合し嫌気性輸送培地（1000mL中にLab lemco powder 20g, L-システイン 1g, KH_2PO_4 0.45g, NaCl 0.9g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.45g, CaCl_2 0.045g, MgSO_4 0.045g, グリセロール400mL, 蒸留水 600mLを含む）で希釈した健常者便希釈液と、4人の患者由来便を同様に嫌気性チャンバー内で混合し嫌気性輸送培地で希釈した患者便希釈液を作製した。続いて11週齢ラットに対して別々のアイソレーター内で健常者便希釈液または患者便希釈液をそれぞれ経口投与して、健常者と患者の腸内細菌叢を再現したノトバイオトラットを作製した。便移植の4週間後（15週齢）にモノクロタリン60mg/kgを皮下注射し、その後3週間アイソレーター内で飼育し、モノクロタリン負荷による肺高血圧症モデルノトバイオトラットを作製した。

[0122] （2）対照動物

便希釈液を投与していない15週齢の無菌F344ラット雄にモノクロタリン60mg/kgを皮下注射し、その後3週間アイソレーター内で飼育したモノクロタリン負荷による肺高血圧症モデル無菌F344ラットを対照ラットとした。また、日本エスエルシー株式会社より購入し、国立循環器病研究センターのSPF環境で飼育した15週齢のF344ラット雄にモノクロタリン60mg/kgを皮下注射し、その後3週間SPF環境で飼育したモノクロタリン負荷による肺高血圧症モデルSPF F344ラットも対照ラットとした。

[0123] いずれのラットも、18週齢で右室収縮期圧および右室肥大を測定した。右室収縮期圧の測定は実施例1の「A. 実験材料と方法」（2）と同じ方法で行った。右室肥大の測定は、「A. 実験材料と方法」（3）右室/左室重量比に記載の方法で行った。

[0124] B. 結果

結果を図31に示した。（A）は右室収縮期圧の結果、（B）は右室/左室重量比（右室肥大）の結果である。図中、MCT-SPFはSPF環境飼育F344ラット、MTC-GFは無菌環境飼育F344ラット、MTC-HVは健常者便移植F344ラット、MTC

-PHは患者便移植F344ラットを示す。無菌環境飼育F344ラットは、右室収縮期圧および右室/左室重量比ともにSPF環境飼育F344ラットと比較して低下しており、モノクロタリン誘発性肺高血圧症が有意に抑制されていた。健常者便移植F344ラットは、無菌環境飼育F344ラットと同程度の右室収縮期圧および右室/左室重量比を示し、モノクロタリン誘発性肺高血圧症が有意に抑制されていることが示された。患者便移植F344ラットは、健常者便移植F344ラットと比較して右室収縮期圧が有意に上昇していた。

[0125] 〔実施例 5：ヒト糞便中の短鎖脂肪酸濃度測定〕

高速液体クロマトグラフィー（島津有機酸分析システム）を用いて、健常者および肺高血圧症患者の糞便中の酢酸（Acetic acid）、プロピオン酸（Propionic acid）および酪酸（Butyric acid）の濃度を測定した。

[0126] 結果を図 3 2 に示した。（A）は酢酸濃度、（B）はプロピオン酸濃度、（C）は酪酸濃度の結果である。肺高血圧症患者の糞便中の酢酸濃度、プロピオン酸濃度および酪酸濃度はいずれも、健常者の糞便中の濃度より有意に低下していた。

[0127] 〔実施例 6：短鎖脂肪酸投与による肺高血圧症の改善〕

実施例 1 に記載のように、6週齢の雄SDラット（オリエンタル酵母）を10%酸素の低酸素チャンバー内で持続的に3週間飼育し、低酸素負荷による肺高血圧症モデルラットを作製した。低酸素飼育開始時から3週間、100mM酪酸塩水または溶媒をラットに自由飲水にて経口投与した。酪酸塩水は、酪酸ナトリウム（SIGMA）を蒸留水に溶かし100mMとなるように調整した。9週齢時に右室収縮期圧および右室肥大を測定した。右室収縮期圧の測定は実施例 1 の「A. 実験材料と方法」（2）と同じ方法で行った。右室肥大の測定は、「A. 実験材料と方法」（3）右室/左室重量比に記載の方法で行った。

[0128] 結果を図 3 3 に示した。（A）は右室収縮期圧の結果、（B）は右室/左室重量比（右室肥大）の結果である。溶媒投与群（Vehicle）と比較して、酪酸塩投与群（Butyrate）は有意に右室収縮期圧および右室肥大が抑制されていた。実施例 5 および実施例 6 の結果より、肺高血圧症患者は、糞便中の短鎖

脂肪酸濃度が健常者の糞便中の濃度と比較して有意に低下しており、短鎖脂肪酸を経口投与することによって、肺高血圧症の病態が改善する可能性が示唆された。

[0129] なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

請求の範囲

- [請求項1] 肺高血圧症患者の腸内細菌叢を正常化させる少なくとも1つの物質を有効成分として含有する肺高血圧症改善用組成物。
- [請求項2] 前記物質が、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌を低減させる物質である請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 前記増加する腸内細菌が、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌、パスツレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、フソバクテリア科 (Fusobacteriaceae) 細菌、乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌、腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) 細菌、コリオバクテリウム科 (Coriobacteriaceae) 細菌またはサテレラ科 (Sutterellaceae) 細菌である請求項2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記増加する腸内細菌が、アクチノマイセス属 (Actinomyces) 細菌、ロシア属 (Rothia) 細菌、シトロバクター属 (Citrobacter) 細菌、ベイロネラ属 (Veillonella) 細菌、大腸菌属 (Escherichia) 細菌、ゲメラ属 (Gemella) 細菌、グラニューリカテラ属 (Granulicatella) 細菌、アトポビウム属 (Atopobium) 細菌、エンテロバクター属 (Enterobacter) 細菌、レンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌、アビオトロフィア属 (Abitrophia) 細菌、クレブシエラ属 (Klebsiella) 細菌、クロノバクター属 (Cronobacter) 細菌、赤痢菌属 (Shigella) 細菌、サルモネラ属 (Salmonella) 細菌、サテレラ属 (Sutterella) 細菌またはヘモフィルス属 (Haemophilus) 細菌である請求項2に記載の組成物。
- [請求項5] 前記増加する腸内細菌が、ストレプトコッカス・インファンティス (Streptococcus_infantis)、ストレプトコッカス・パラサンギニス (Streptococcus_parasanguinis) ルミノコッカス・グナブス (Ruminococcus_gnavus)、クロストリジウム・ボルテエ (Clostridium_botteae)、サテレラ・ワズワーセンシス (Sutterella_wadsworthensis)

）、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella_pneumoniae*)、ロシア・ムシラギノーサ (*Rothia_mucilaginosa*)、ストレプトコッカス・ミティス (*Streptococcus_mitis*)、ストレプトコッカス・オラリス (*Streptococcus_oralis*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ (*Streptococcus_pneumoniae*)、ストレプトコッカス・サリバリウス (*Streptococcus_salivarius*)、ヘモフィルス・パラインフルエンザ (*Haemophilus_parainfluenzae*)、ベイロネラ・パルブラ (*Veillonella_parvula*) またはベイロネラ属未分類種細菌である請求項2に記載の組成物。

[請求項6] 前記物質が、口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤である請求項1または2に記載の組成物。

[請求項7] 前記口腔内常在菌に対して抗菌活性を有する薬剤が、ペニシリン系、セフェム系、ペネム系、カルバペネム系、マクロライド系、リンコマイシン系、ケトライド系、ニューキノロン系、グリコペプチド系、ストレプトグラミン系、テトラサイクリン系、クロラムフェニコール系、キノロン系、ペプチド系、アミノグリコシド系、モノバクタム系、ニトロイミダゾール系またはホスホマイシン系の薬剤である請求項6に記載の組成物。

[請求項8] 前記物質が、肺高血圧症患者において健常者と比較して増加する腸内細菌に対して溶菌活性を示すファージである請求項1または2に記載の組成物。

[請求項9] 前記物質が、肺高血圧症患者において健常者と比較して減少する腸内細菌を増加させる物質である請求項1に記載の組成物。

[請求項10] 前記減少する腸内細菌が、リケネラ科 (*Rikenellaceae*) 細菌、ルミノコッカス科 (*Ruminococcaceae*) 細菌、アルカリゲネス科 (*Alcaligenaceae*)、バクテロイデス科 (*Bacteroidaceae*) 細菌、ユウバクテリウム科 (*Eubacteriaceae*) 細菌、ラクノスピラ科 (*Lachnospiraceae*) 細菌、デスルフォビブリオ科 (*Desulfovibrionaceae*) 細菌、ピ

フィドバクテリウム科 (Bifidobacteriaceae) 細菌、サテラ科 (Sutterellaceae) 細菌、プレボテラ科 (Prevotellaceae) 細菌、クロストリジウム科 (Clostridiaceae) 細菌、エッガーセラ科 (Eggerthellaceae) 細菌またはポルフィロモナス科 (Porphyromonadaceae) 細菌である請求項 9 に記載の組成物。

[請求項11]

前記減少する腸内細菌が、ブチリシモナス属 (Butyricimonas) 細菌、アリスチペス属 (Alistipes) 細菌、ルミノコッカス属 (Ruminococcus) 細菌、アドレクルーツィア属 (Adlercreutzia) 細菌、アシダミノコッカス属 (Acidaminococcus) 細菌、サテラ属 (Sutterella) 細菌、オシロスピラ属 (Oscillospira) 細菌、リケネラ属 (Rikenellia) 細菌、ラクノスピラ属 (Lachnospira) 細菌、ホールディマニア属 (Holdemania) 細菌、ユウバクテリウム属 (Eubacterium) 細菌、サブドリグラヌルム属 (Subdoligranulum) 細菌、ビロフィラ属 (Bilophila) 細菌、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium) 細菌、パラサテラ属 (Parasutterella) 細菌、ロゼブリア属 (Roseburia) 細菌、フィーカリバクテリウム属 (Faecalibacterium) 細菌、パラバクテロイデス属 (Parabacteroides) 細菌、メガモナス属 (Megamonas) 細菌、ファスコラクトバクテリウム属 (Phascolarctobacterium) 細菌、アガトバクター属 (Agathobacter) 細菌、ヒドロジェノアナエロバクテリウム属 (Hydrogenoanaerobacterium) 細菌、ブラウチア属 (Blautia) 細菌、ルミノニコストリジウム属 (Ruminiclostridium) 細菌、パラプレボテラ属 (Paraprevotella) 細菌、アセトアナエロバクテリウム属 (Acetanaerobacterium) 細菌、ドレア属 (Dorea) 細菌、フシカテニバクター属 (Fusicatenibacter) 細菌、コプロコッカス属 (Coprococcus) 細菌、ゴードニバクター属 (Gordonibacter) 細菌、コプロバクター属 (Coprobacter) 細菌、オシリバクター属 (Oscillibacter) 細菌、アナエロスティペス属 (Anaerostipes) 細菌またはバクテロイデス属 (Bacterioides) 細菌である請求項 9 に記載の組成

物。

[請求項12] 前記減少する腸内細菌が、ユウバクテリウム・ハリイ (*Eubacterium hallii*)、ビロフィラ属 (*Bilophila*) 未分類種細菌、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラツム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、パラサテラ・エクスクレメンティホミニス (*Parasutterella excrementihominis*)、ロゼブリア・ホーミニス (*Roseburia hominis*)、アリスチペス・オンデルドンキイ (*Alistipes onderdonkii*)、フィーカリバクテリウム・プラウスニッツィイ (*Faecalibacterium prausnitzii*)、ユウバクテリウム・ベントリオサム (*Eubacterium ventriosum*)、ロゼブリア・インテスティナリス (*Roseburia intestinalis*)、パラバクテロイデス・ジョンソニイ (*Parabacteroides johnsonii*)、バクテロイデス・セルロシリティカス (*Bacteroides cellulosilyticus*)、バクテロイデス・ユニフォルミス (*Bacteroides uniformis*)、ユウバクテリウム・エリゲンス (*Eubacterium eligens*)、*Alistipes* sp. AP11、*Bacteroidales bacterium* ph8、*Subdoligranulum* sp. 4_3_54A2FAAまたは*Lachnospiraceae bacterium* 1_1_57FAAである請求項9に記載の組成物。

[請求項13] 請求項10～12のいずれか1項に記載の細菌の1種以上を有効成分とする請求項9に記載の組成物。

[請求項14] メバロン酸経路、マンノシルグリセリン酸合成経路、メチルグリオキサール分解経路、D-グルカル酸分解経路、TCAサイクルVIII経路、ヘム生合成経路、および硝酸代謝経路からなる群より選択される少なくとも1つの経路を阻害する物質を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物。

[請求項15] メバロン酸経路を阻害する物質がHMG-CoA還元酵素阻害薬である請求項14に記載の組成物。

[請求項16] 肺高血圧症患者の予後を予測する方法であって、肺高血圧症患者の

腸内細菌叢において、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、パストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌および乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌から選択される 1 種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

[請求項17] 肺高血圧症患者の重症度の判定を補助する方法であって、肺高血圧症患者の腸内細菌叢において、ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌、レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌、パストレラ科 (Pasteurellaceae) 細菌、ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌および乳酸桿菌科 (Lactobacillaceae) 細菌から選択される 1 種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

[請求項18] 前記ミクロコッカス科 (Micrococcaceae) 細菌がロシア属 (Rothia) 細菌であり、前記レンサ球菌科 (Streptococcaceae) 細菌がレンサ球菌属 (Streptococcus) 細菌であり、前記ベイロネラ科 (Veillonellaceae) 細菌がベイロネラ属 (Veillonella) 細菌である、請求項 17 に記載の方法。

[請求項19] 肺高血圧症の診断を補助する方法であって、被験者の糞便中 I g A 濃度を測定し、健常者の糞便中 I g A 濃度と比較することを含むことを特徴とする方法。

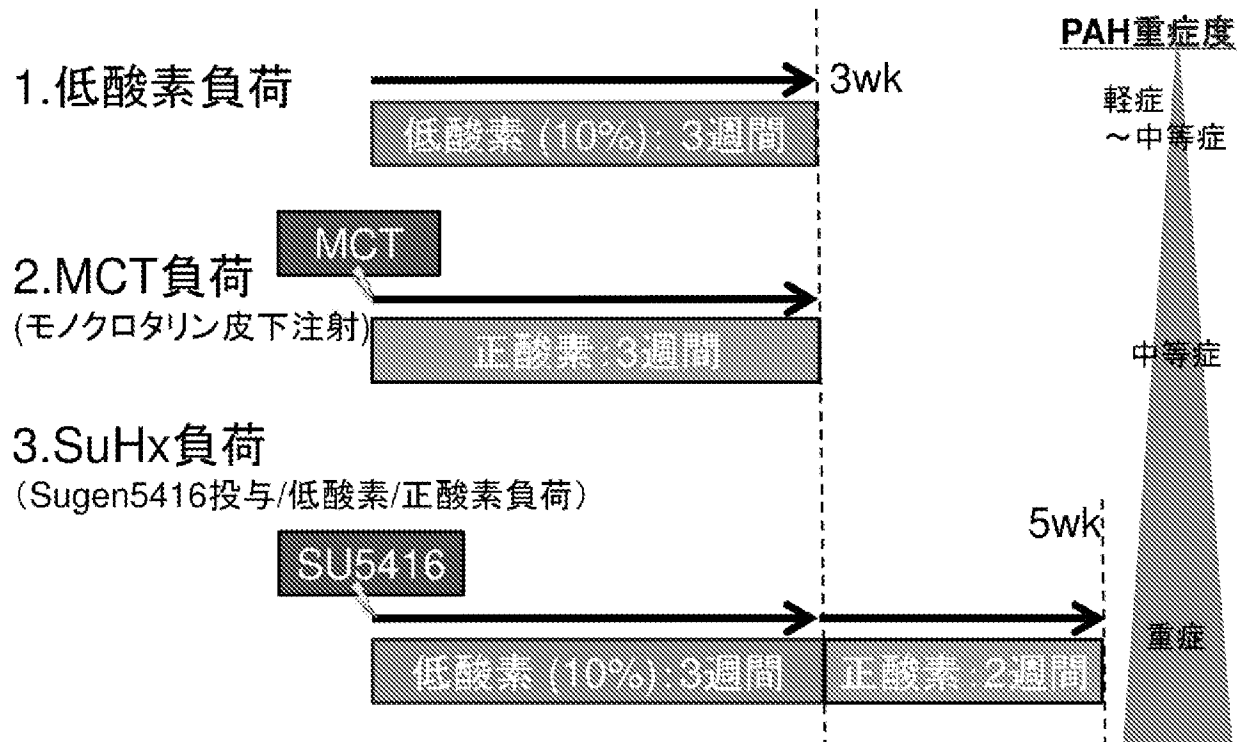
[請求項20] 短鎖脂肪酸またはその塩を有効成分とする肺高血圧症改善用組成物。

[請求項21] 門脈圧亢進に伴う肺高血圧症の診断を補助する方法であって、被験者の腸内細菌叢において、ビフィドバクテリウム属 (Bifidobacterium) 細菌、ドレア属 (Dorea) 細菌およびブラウチア属 (Blautia) 細菌から選択される 1 種以上の細菌を検出する工程を含むことを特徴とする方法。

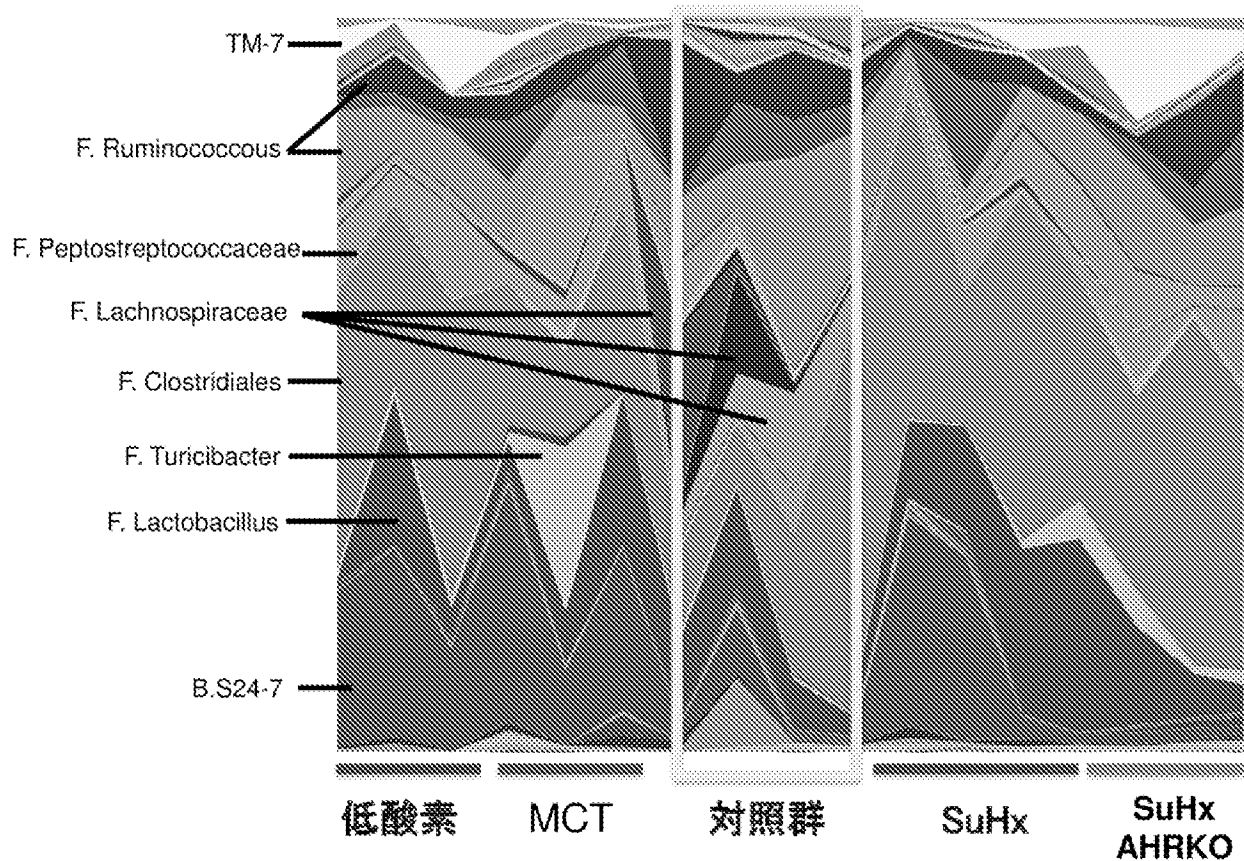
[請求項22] 慢性血栓塞栓性肺高血圧症の診断を補助する方法であって、被験者の腸内細菌叢においてクレブシエラ属 (Klebsiella) 細菌を検出する

工程を含むことを特徴とする方法。

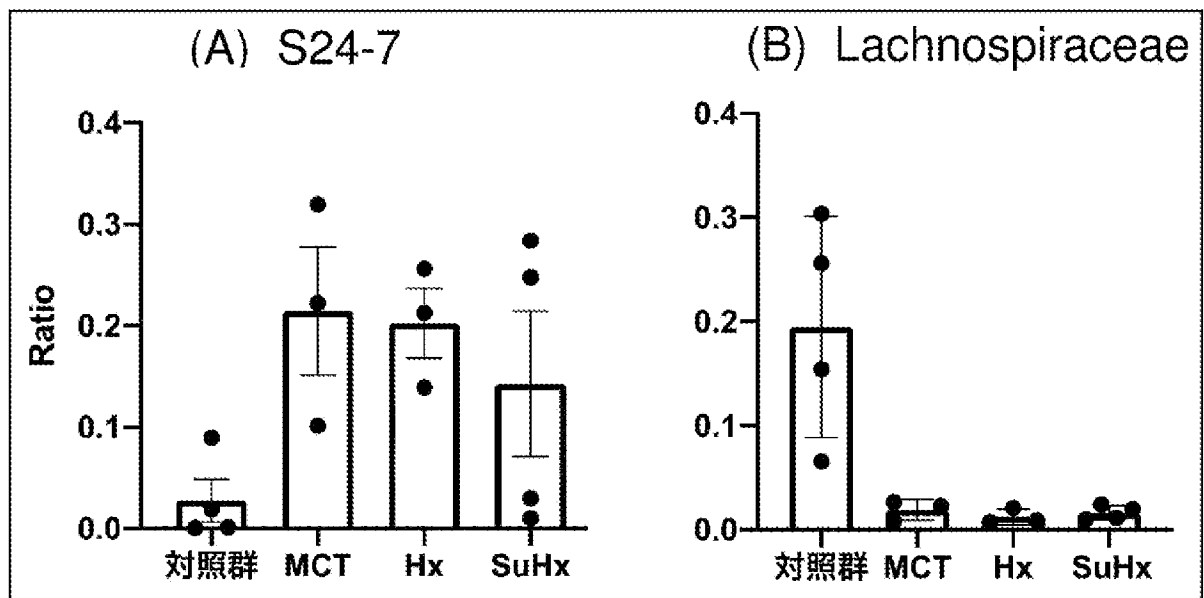
[図1]



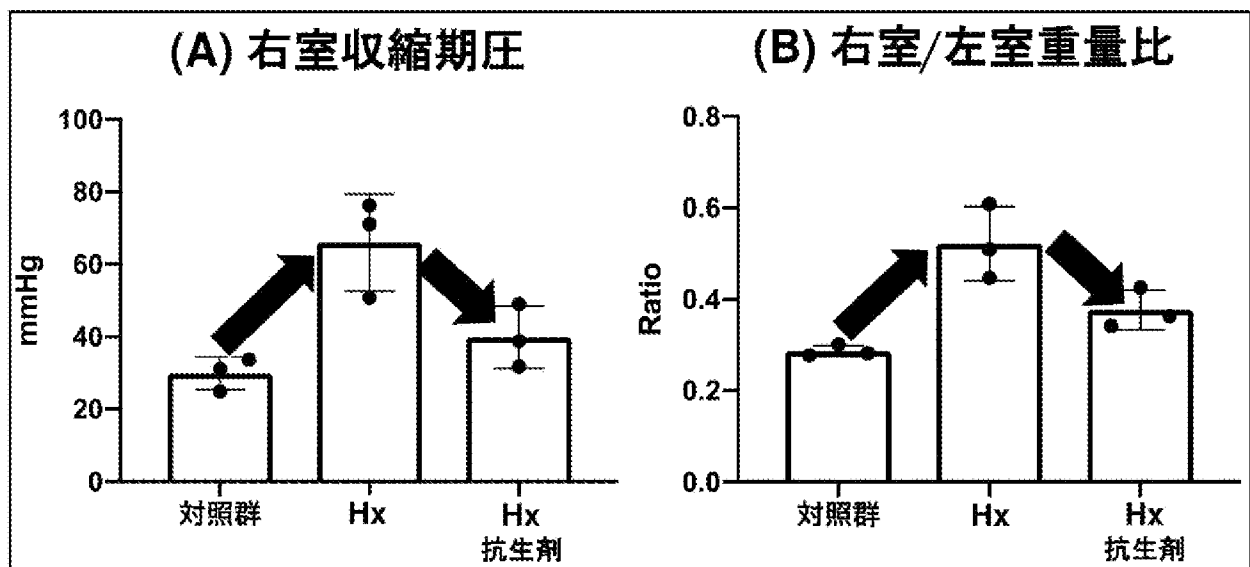
[図2]



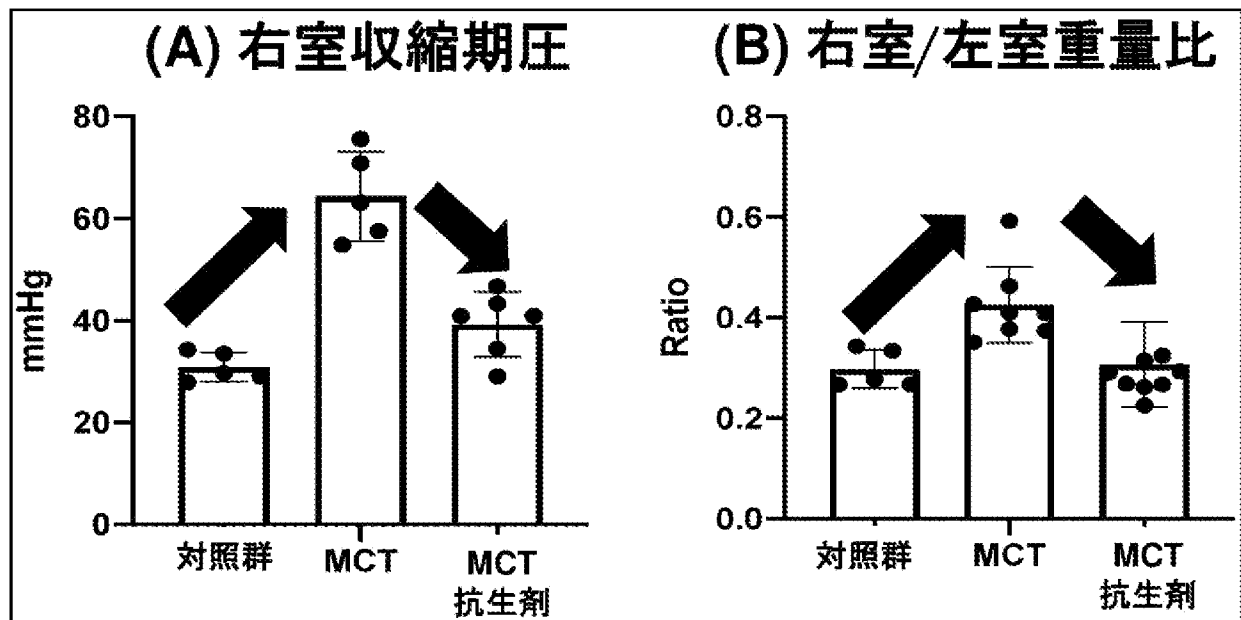
[図3]



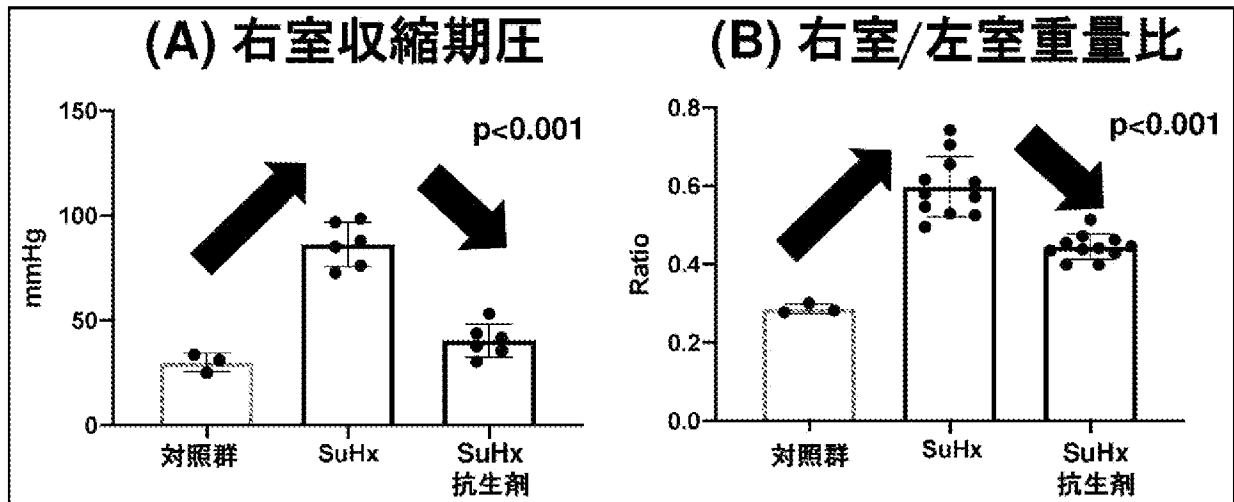
[図4]



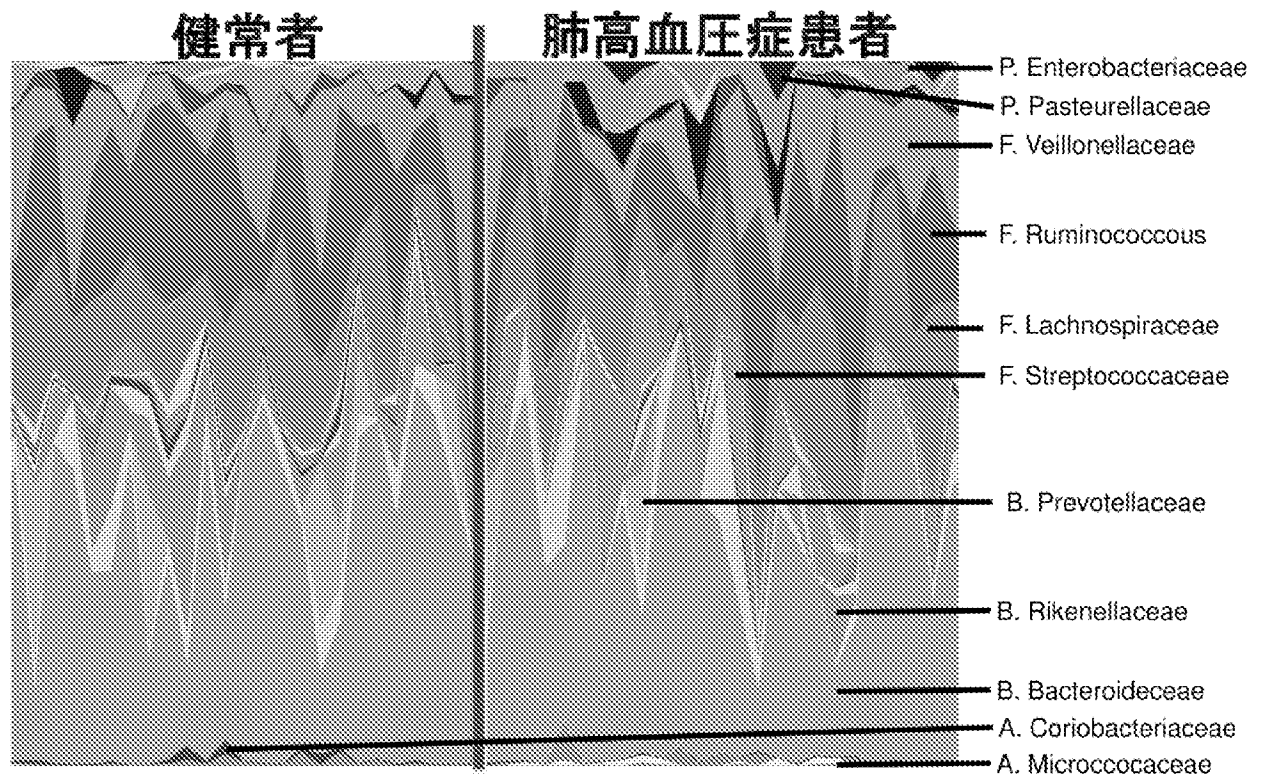
[図5]



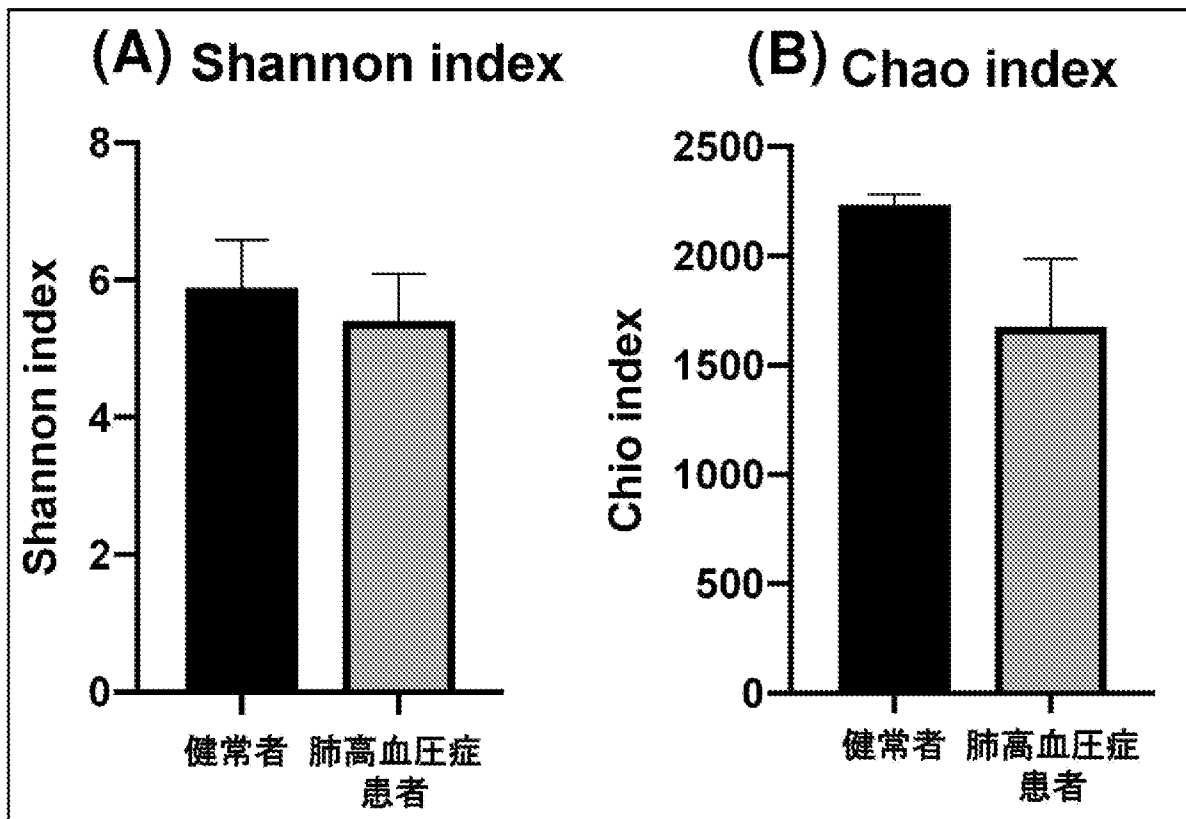
[図6]



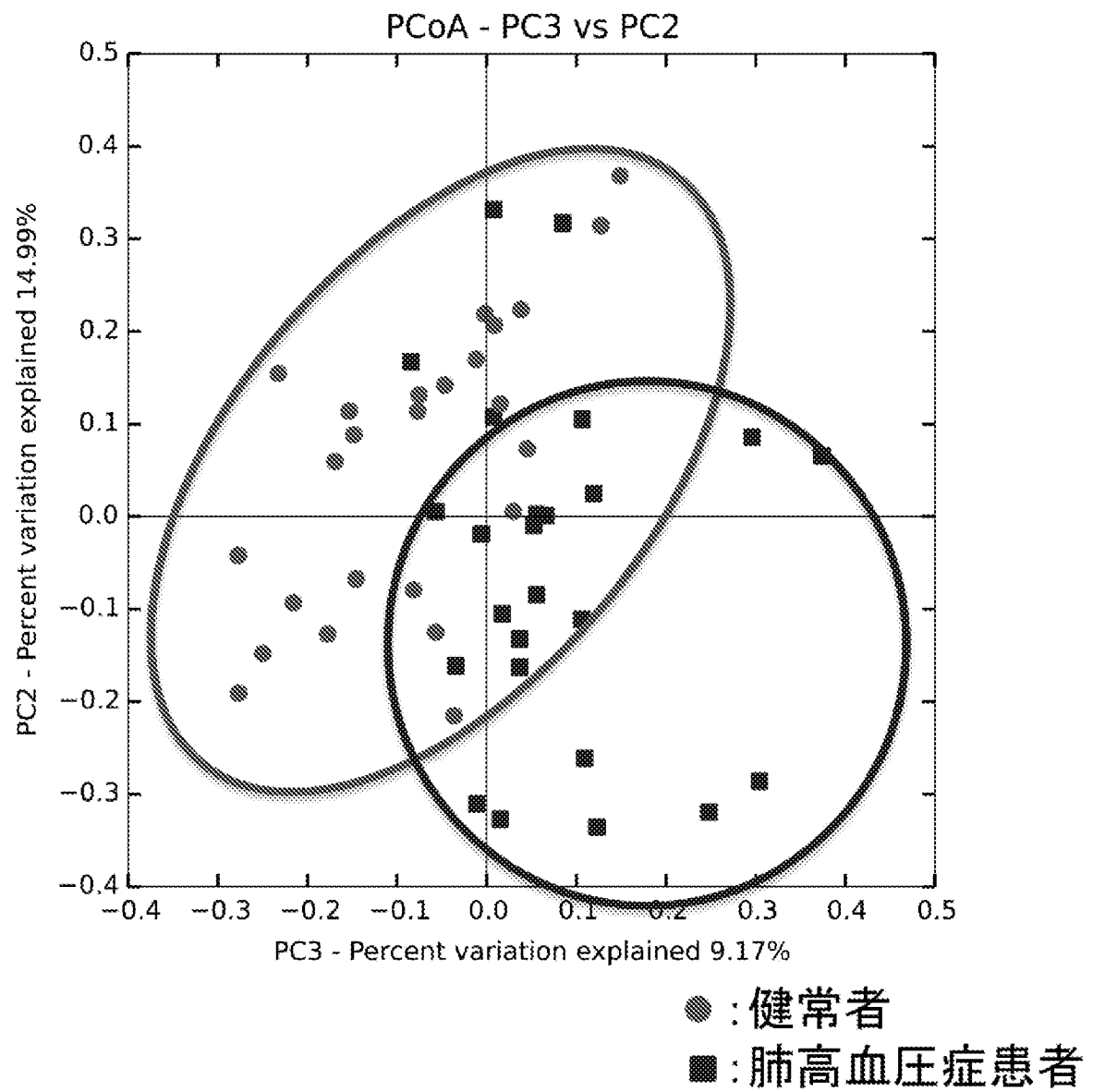
[図7]



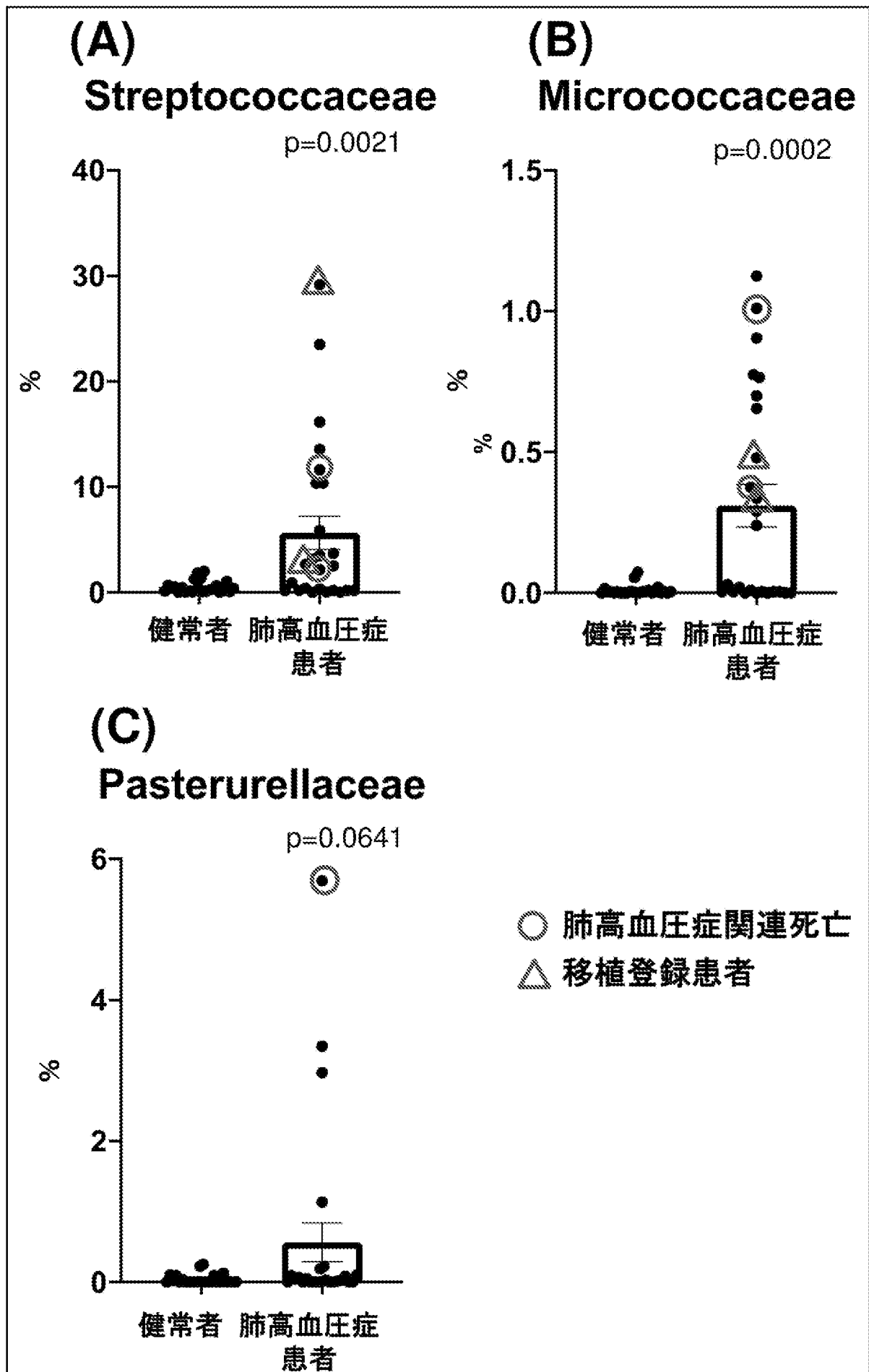
[図8]



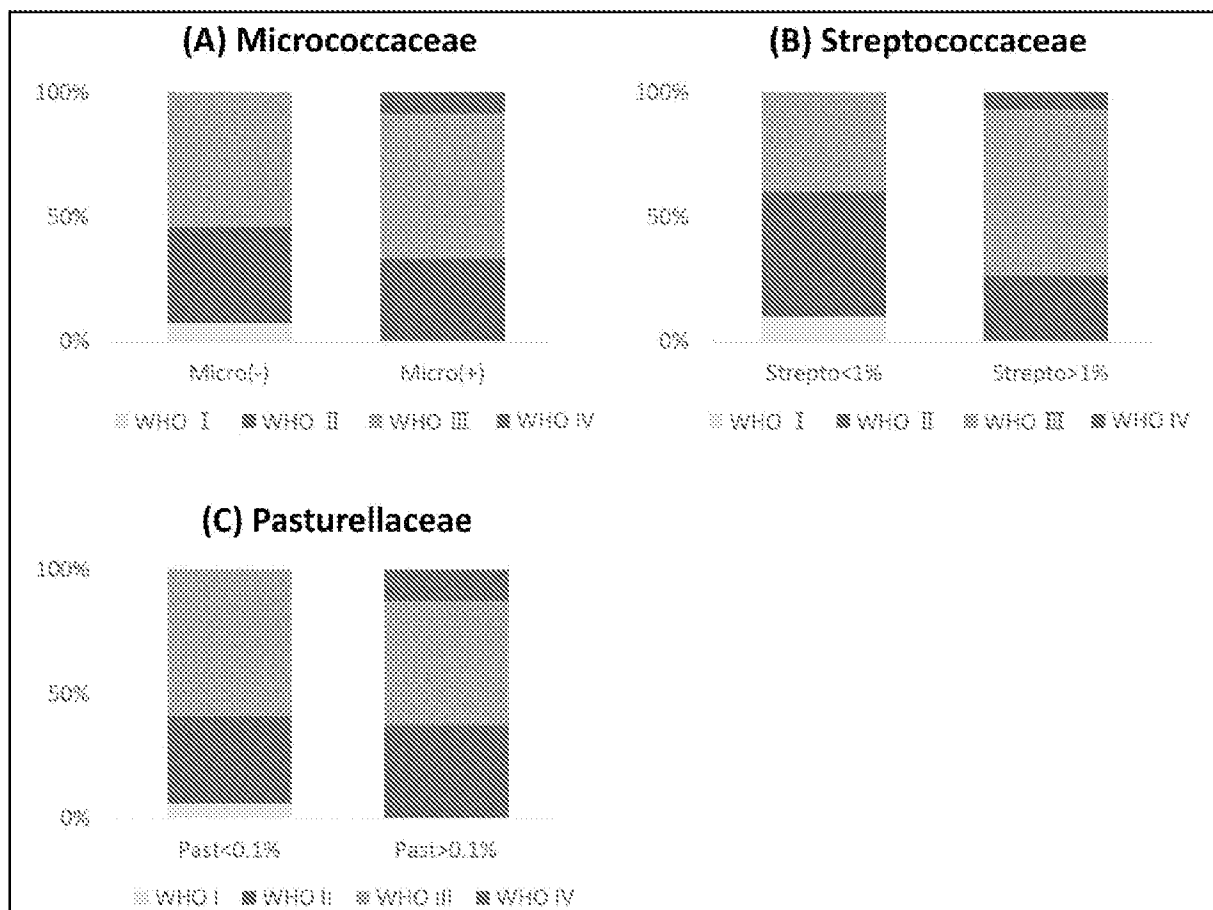
[図9]



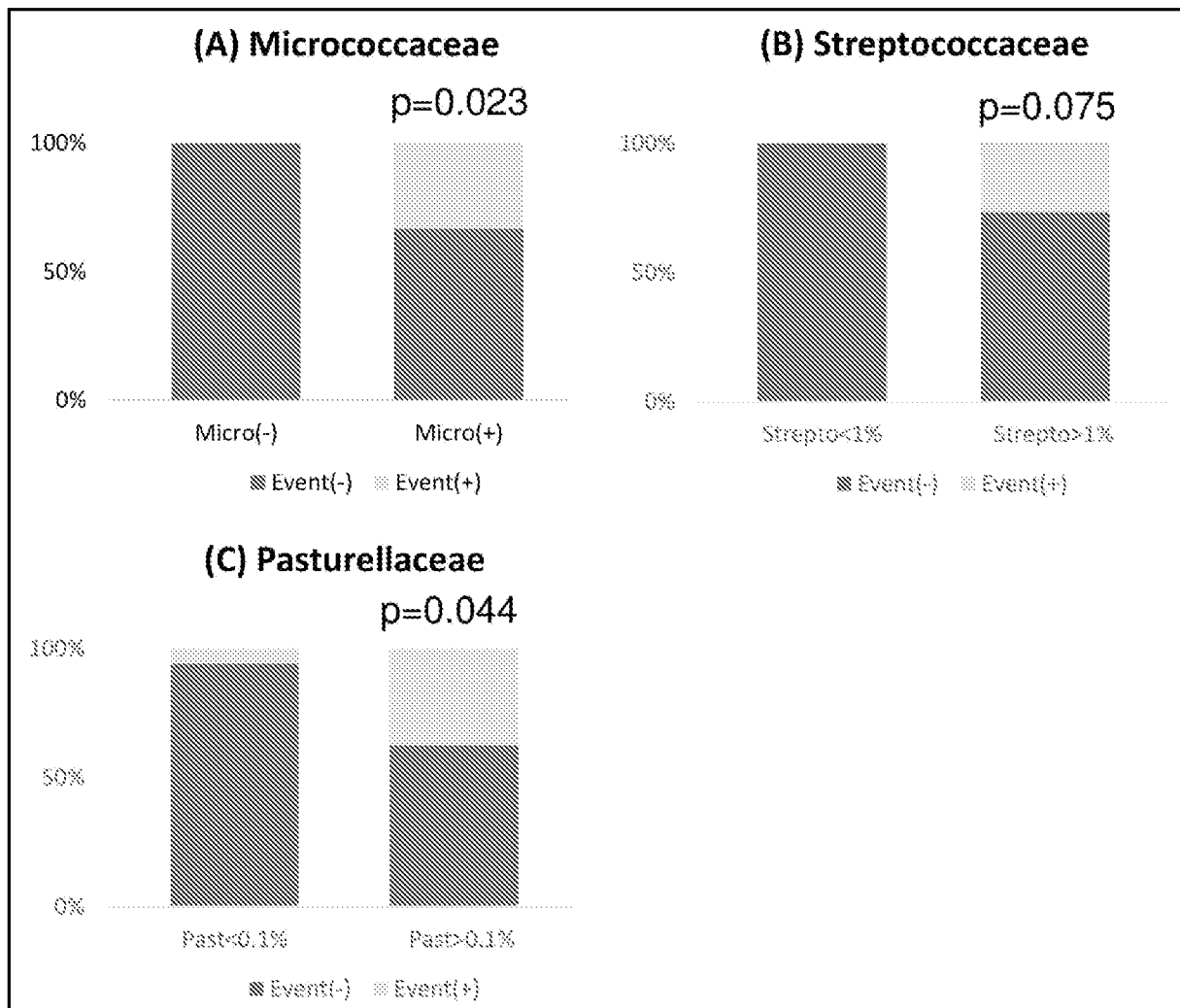
[図10]



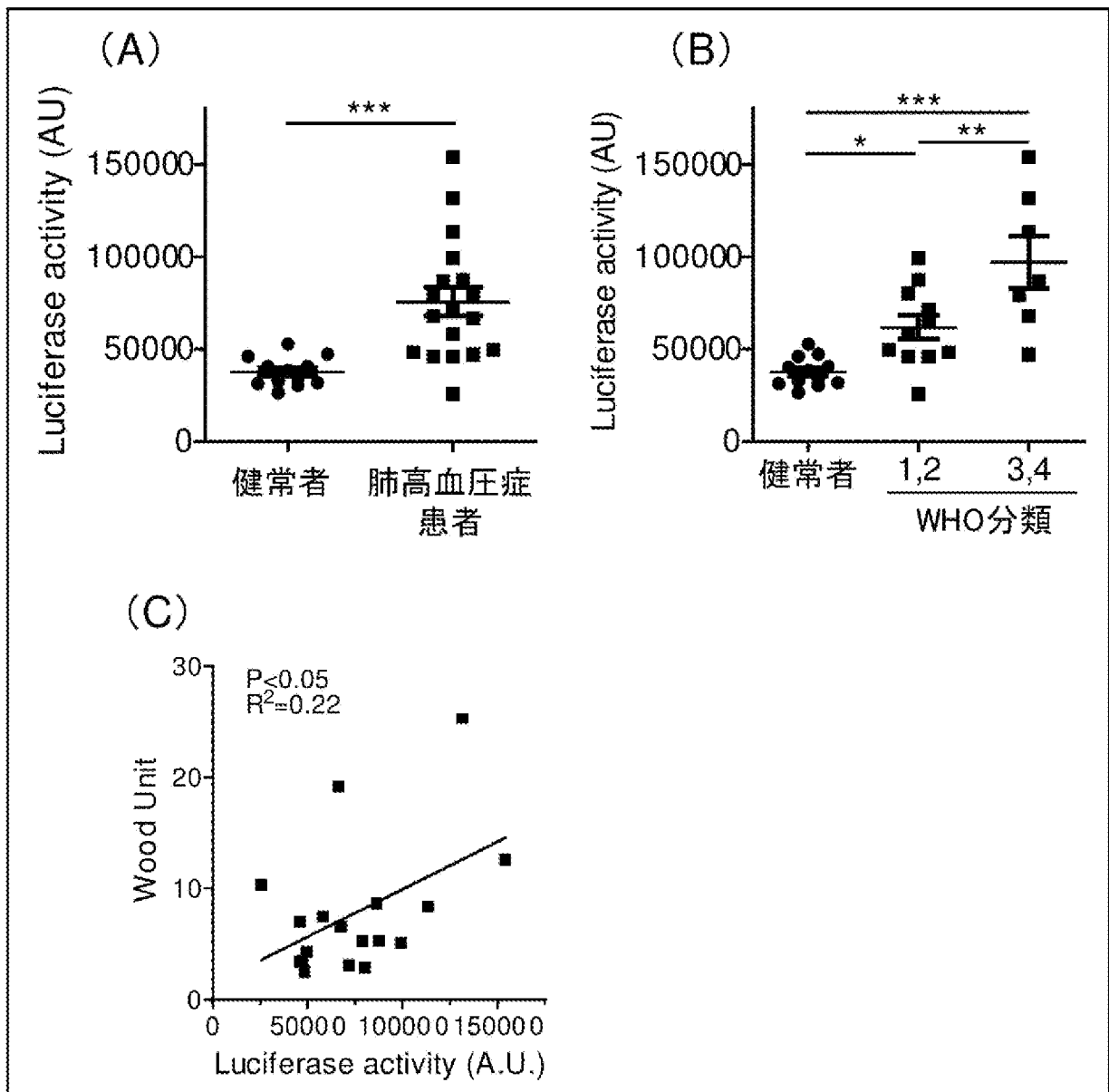
[図11]



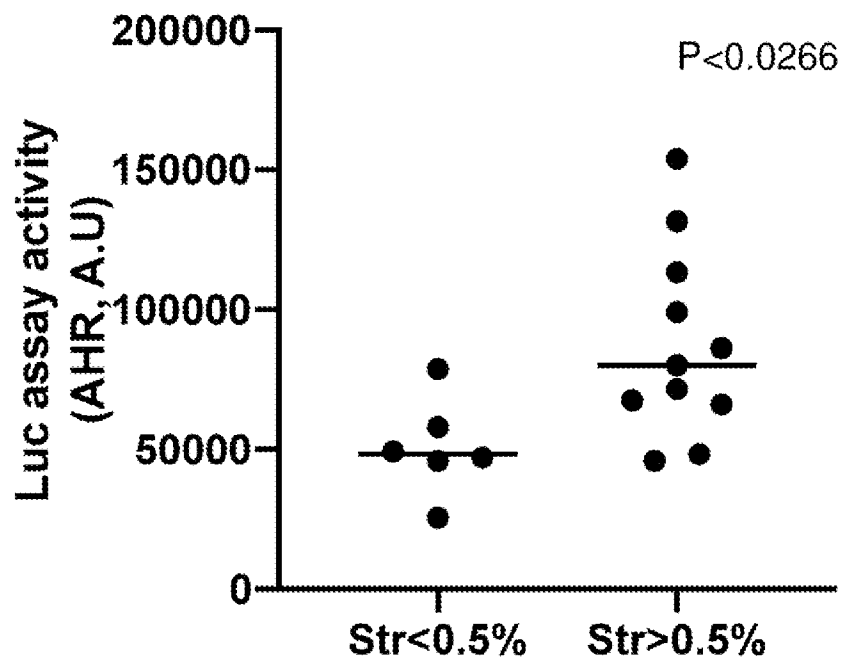
[図12]



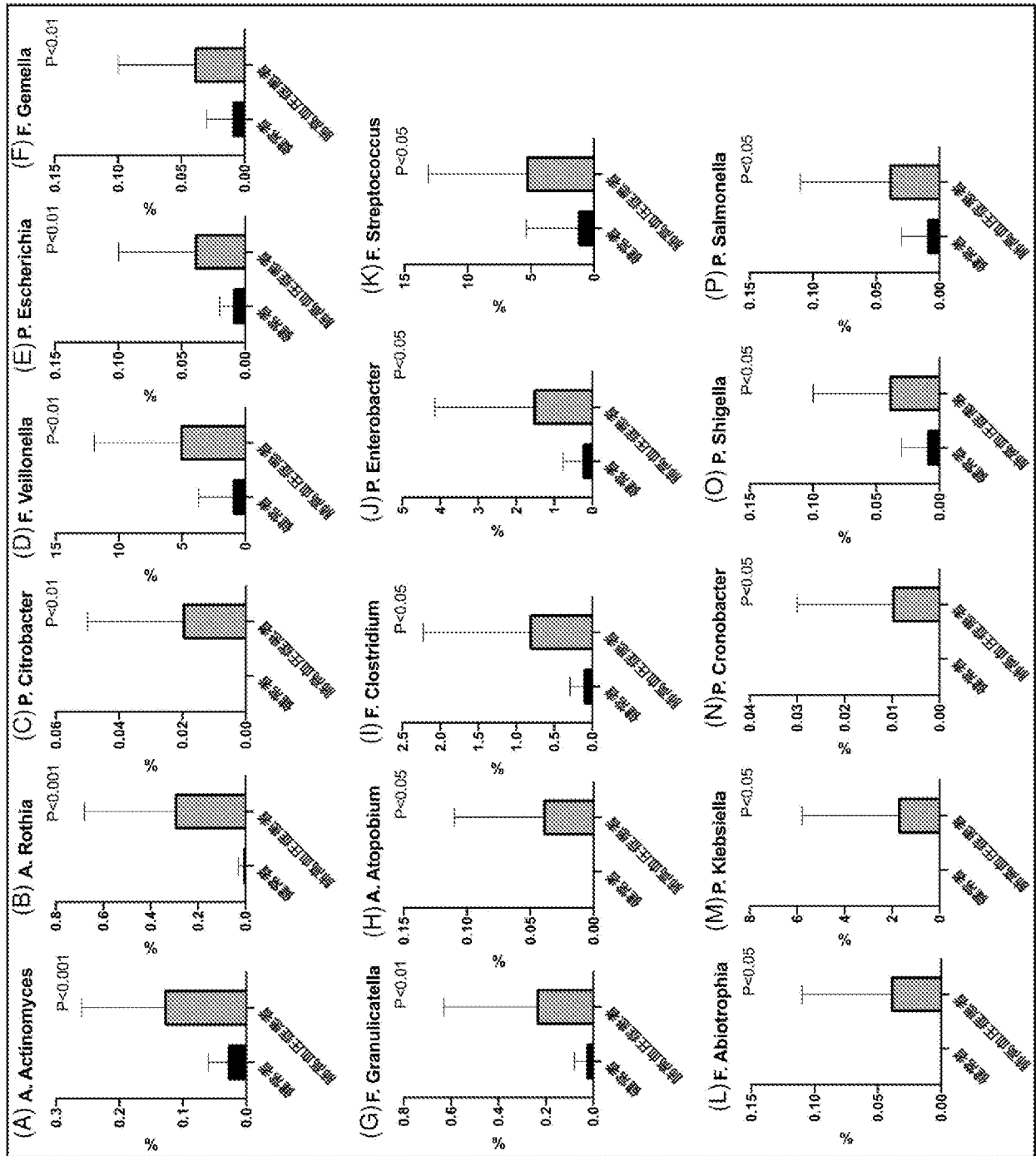
[図13]



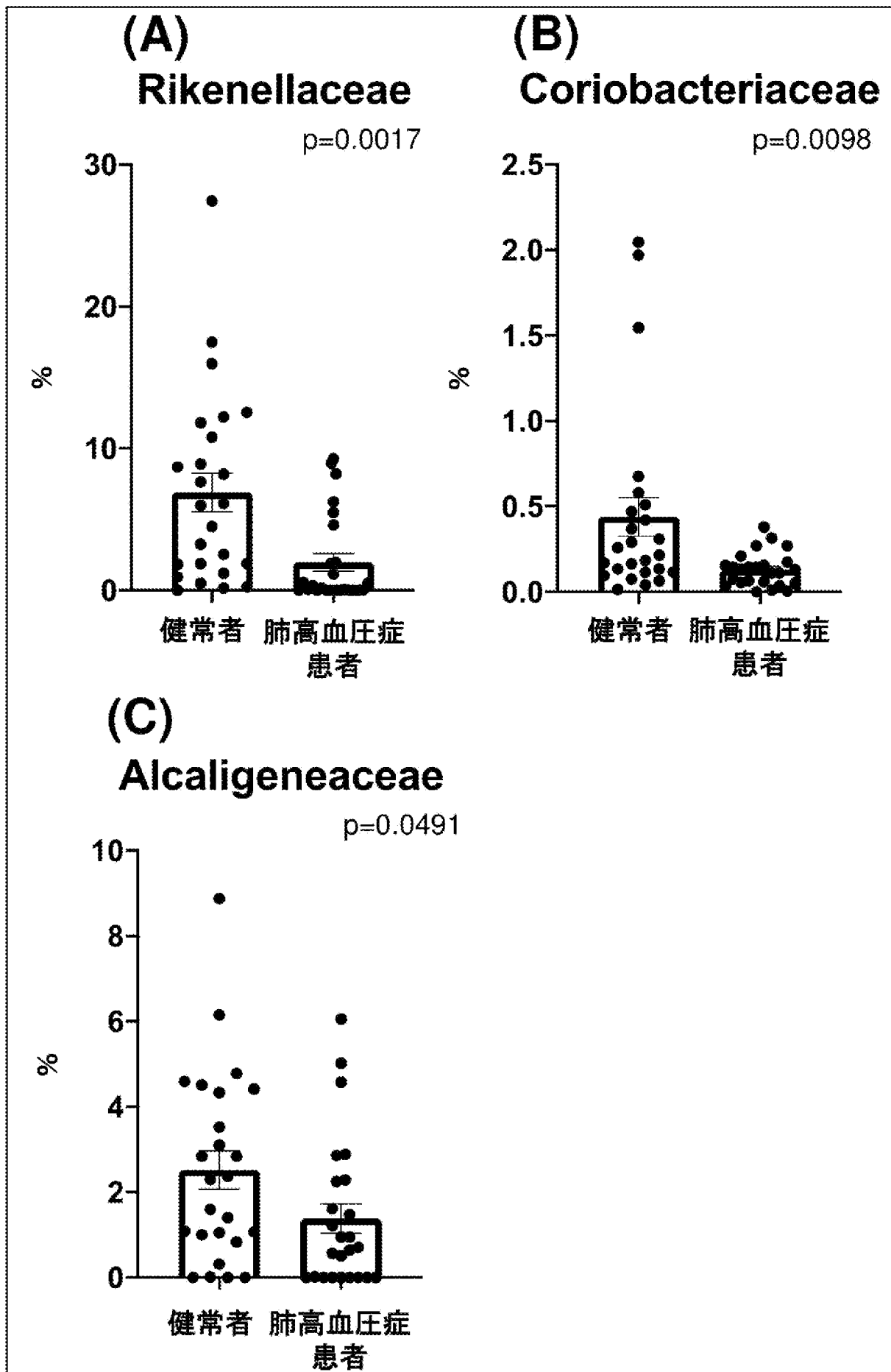
[図14]



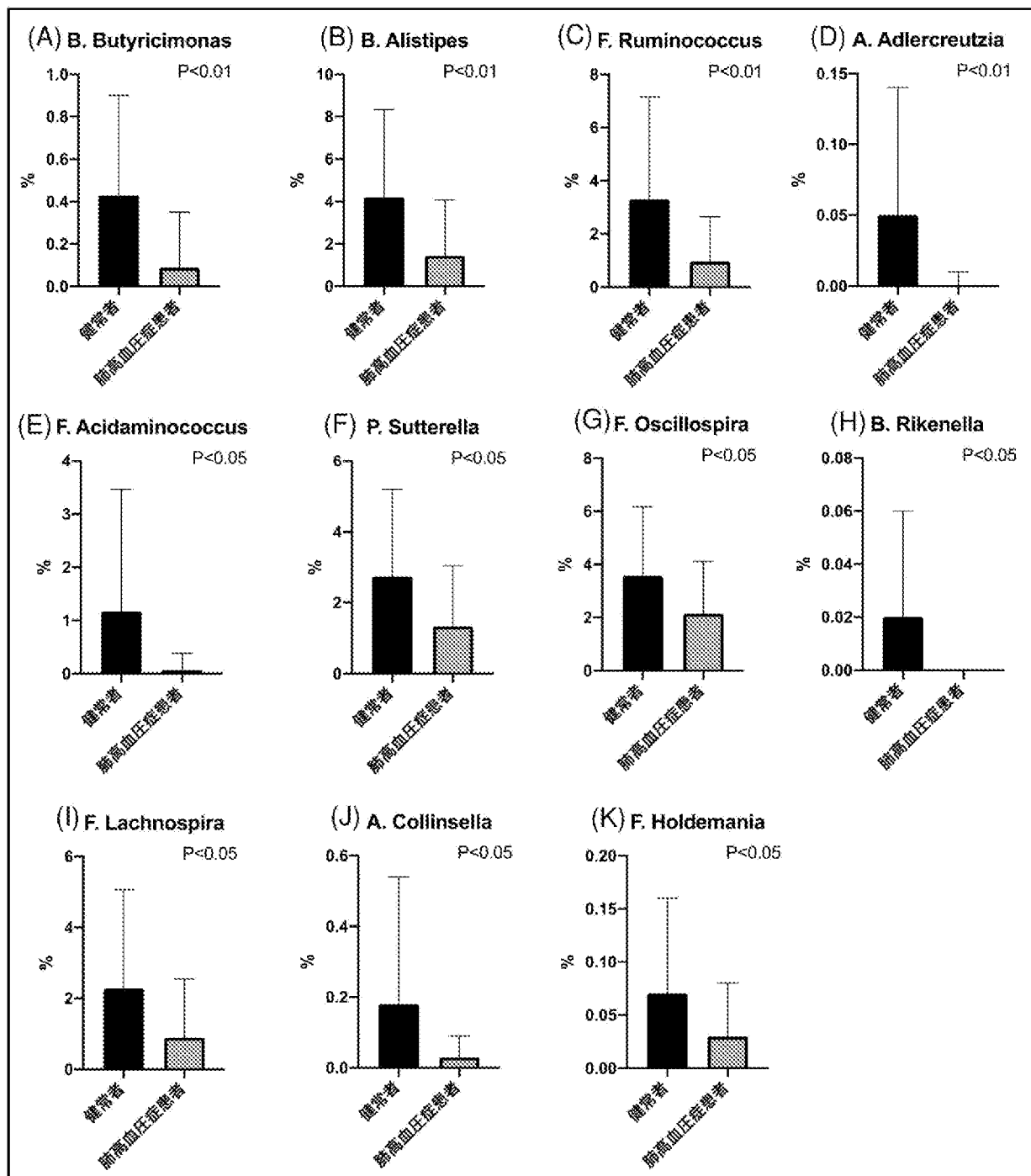
[図15]



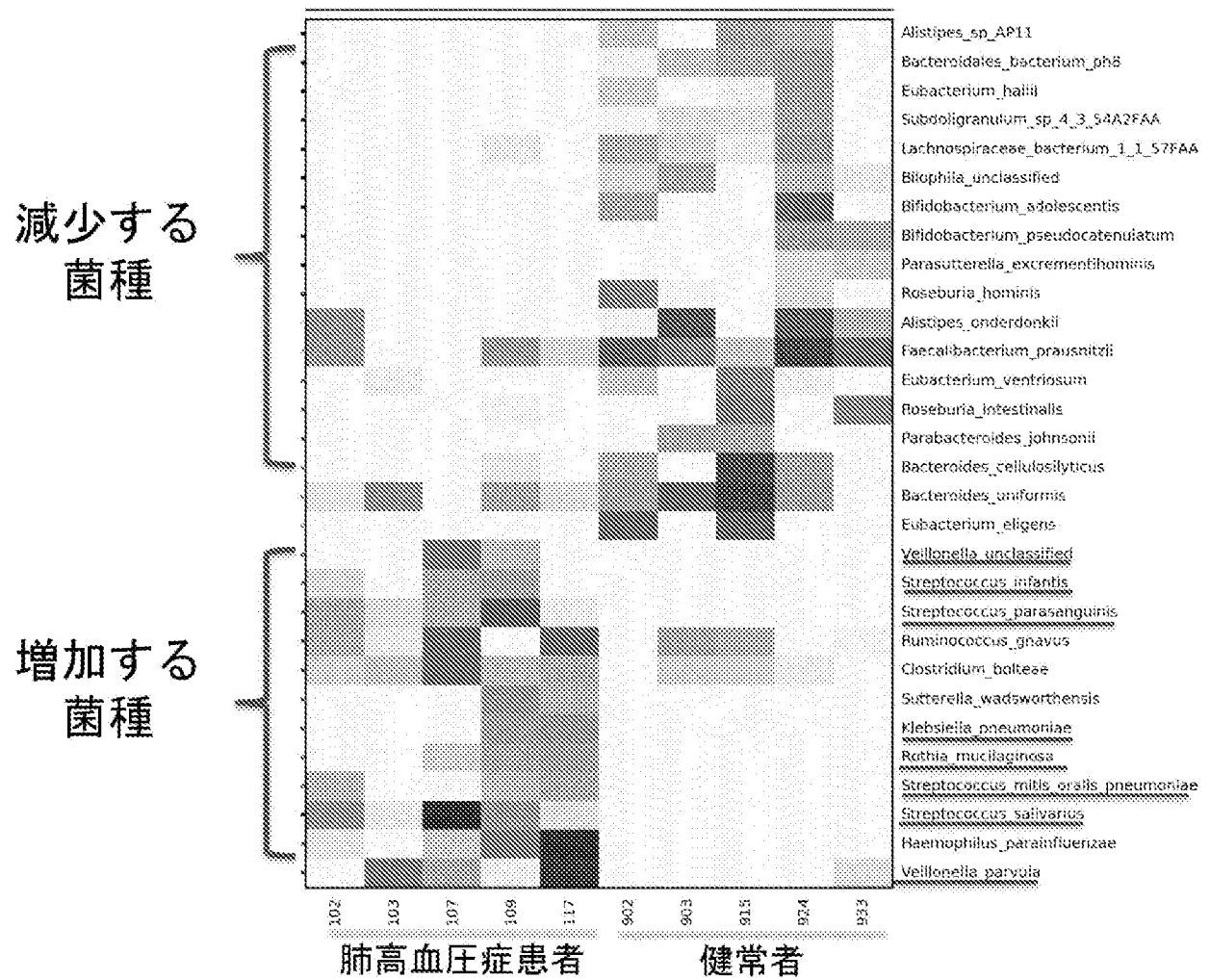
[図16]



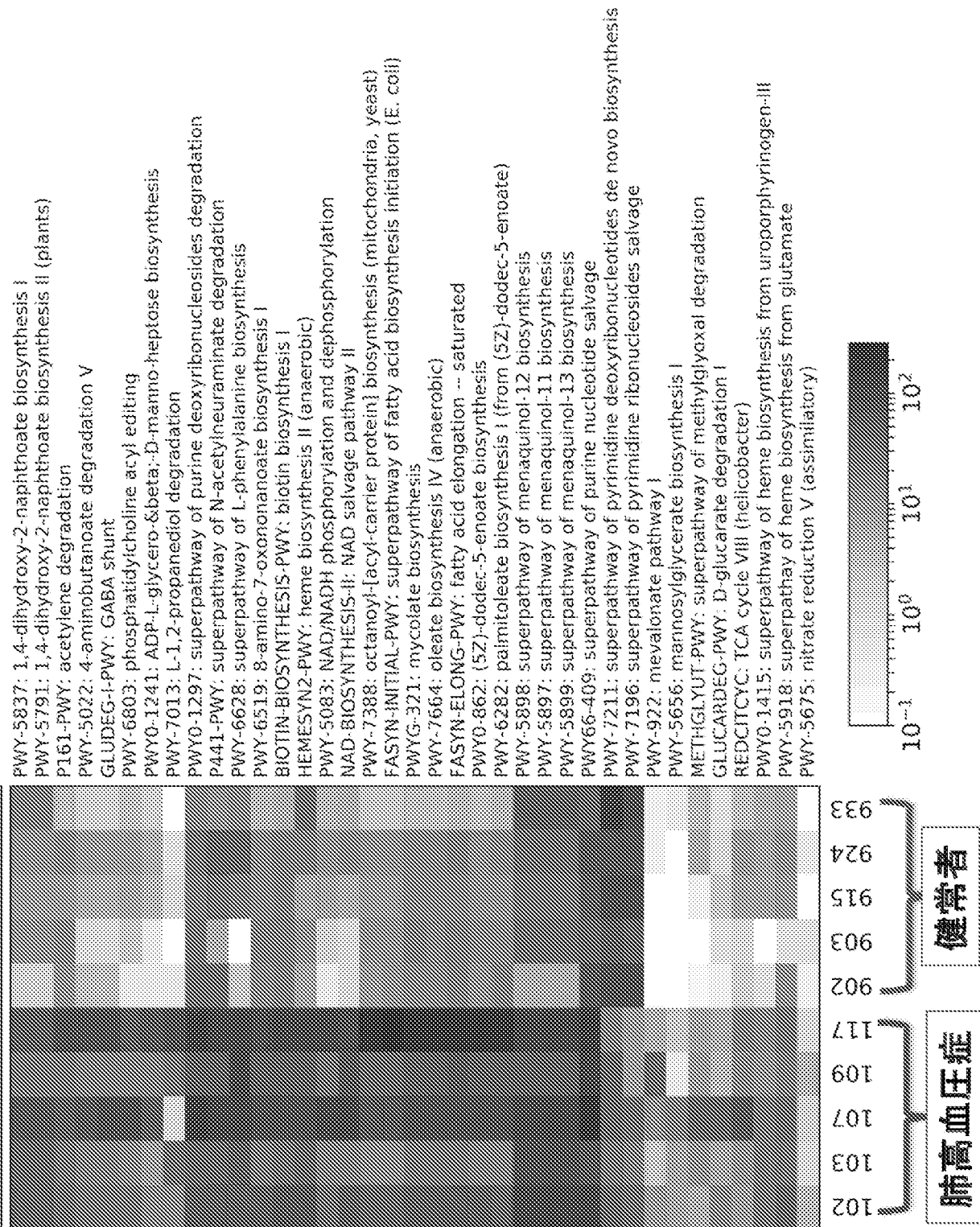
[図17]



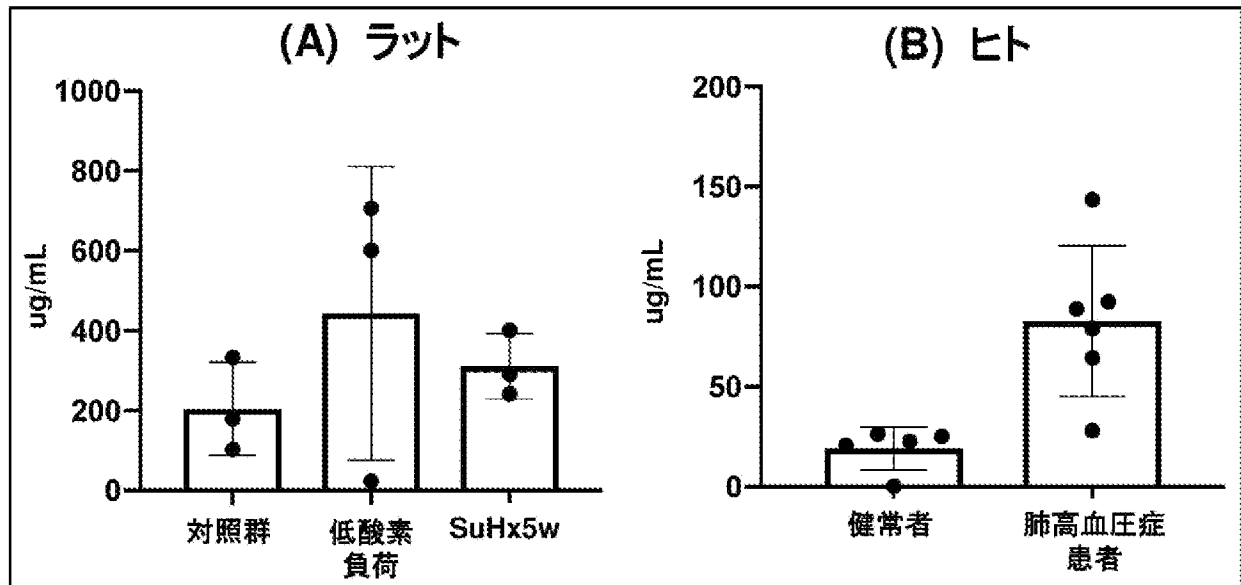
[図18]



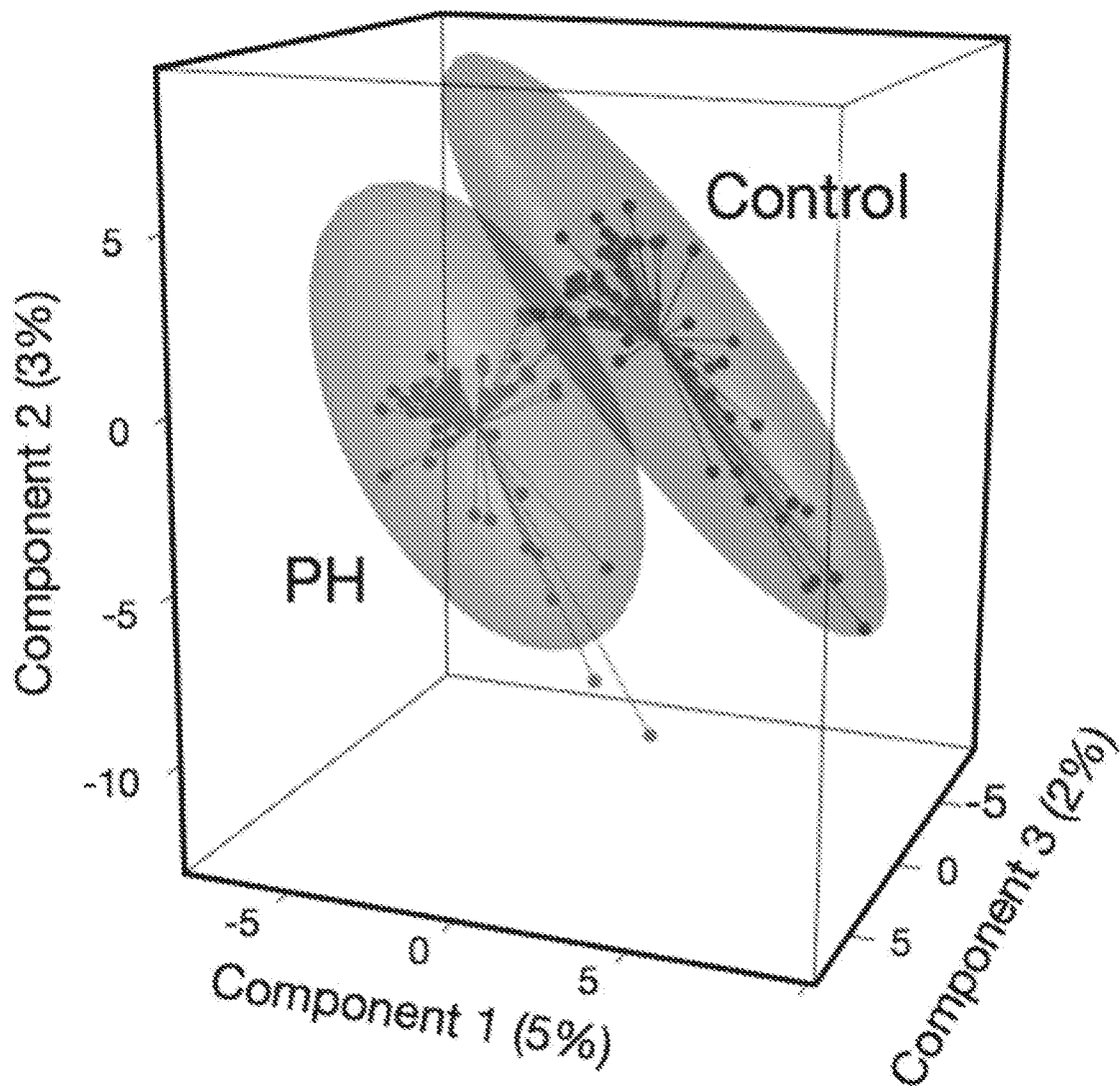
[図19]



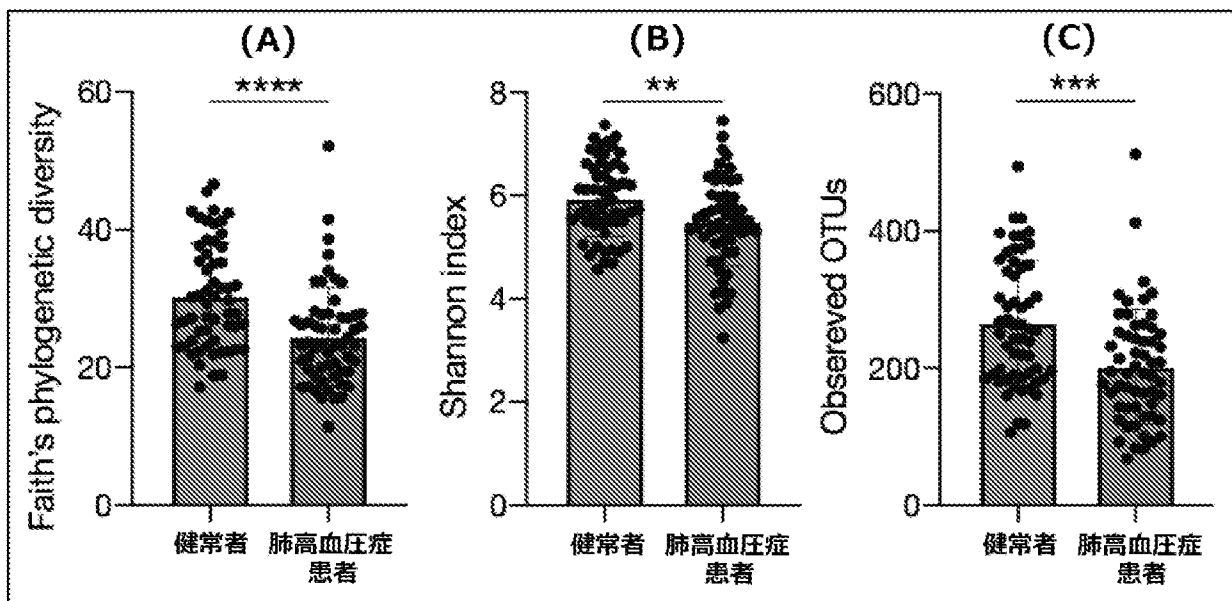
[図20]



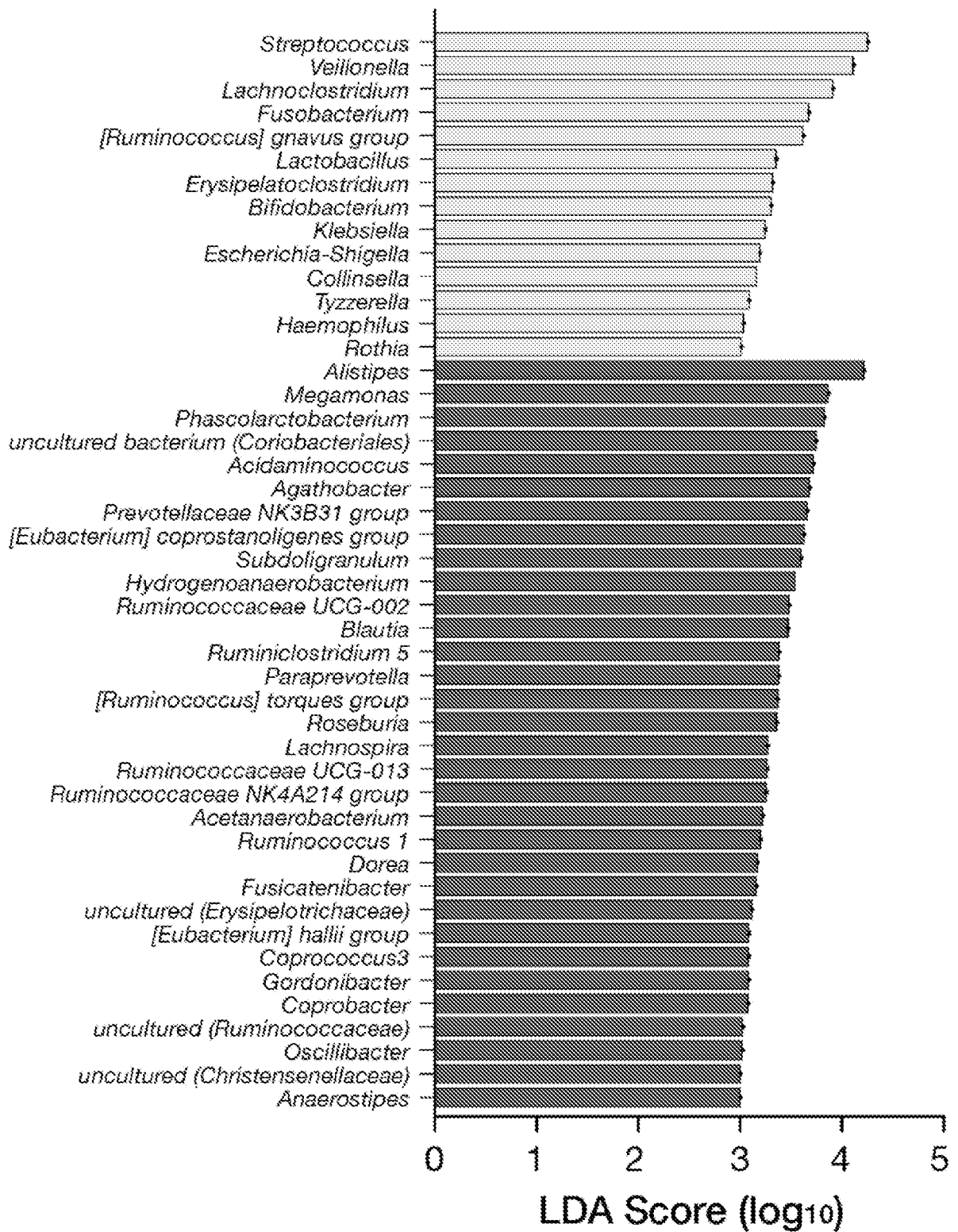
[図21]



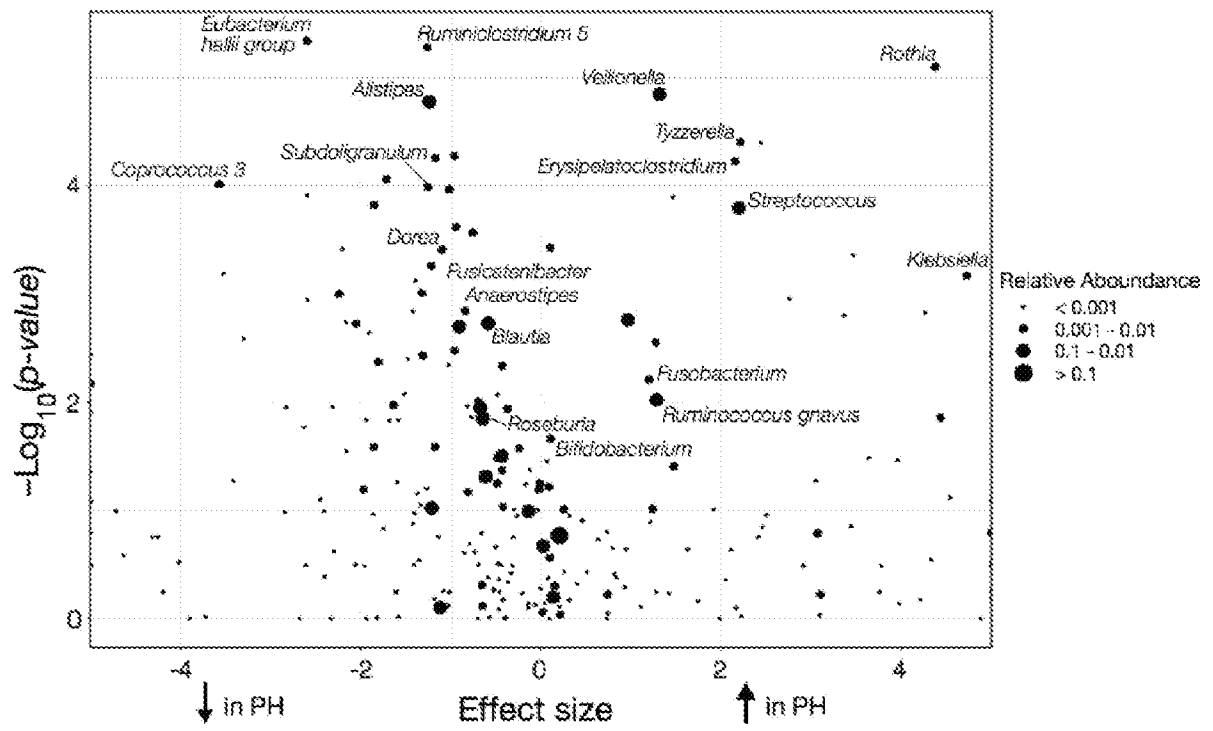
[図22]



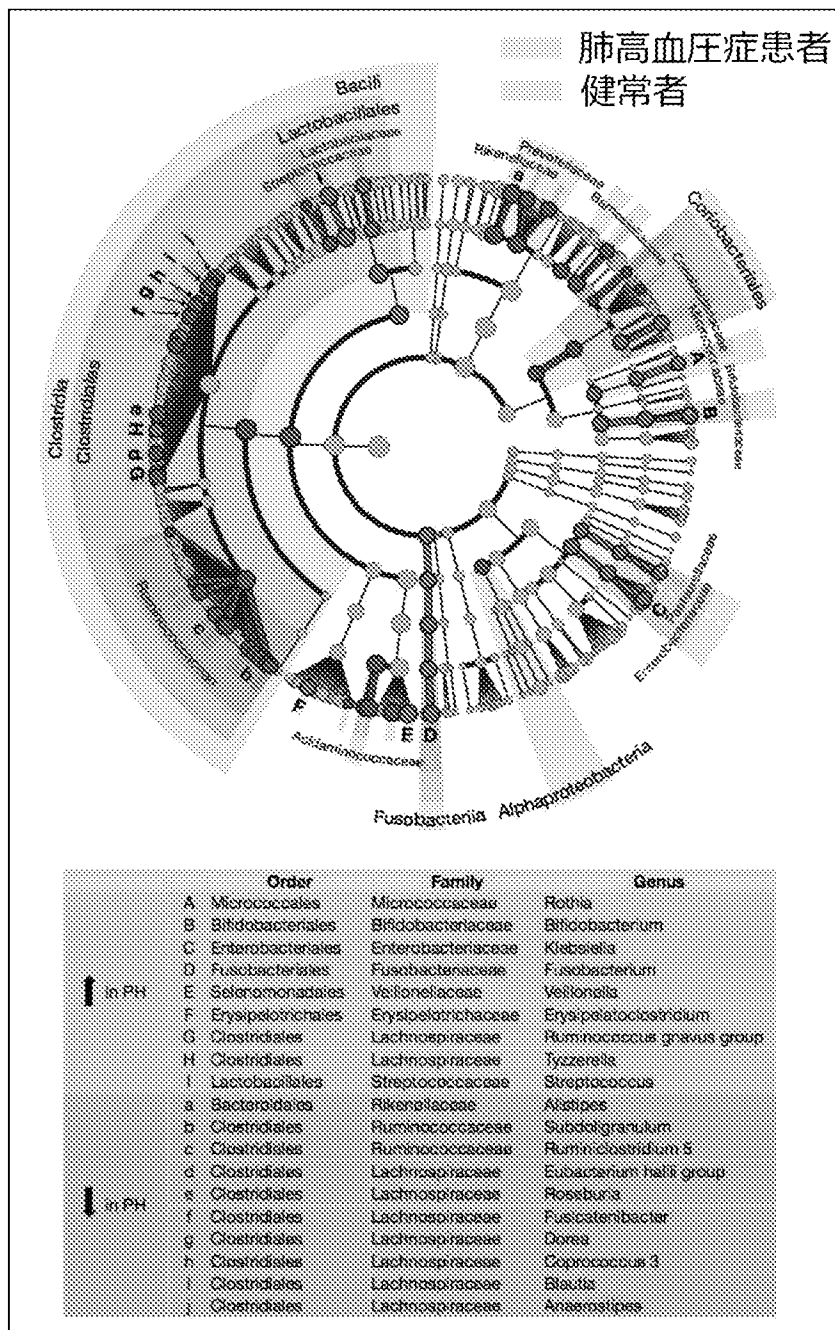
[図23]



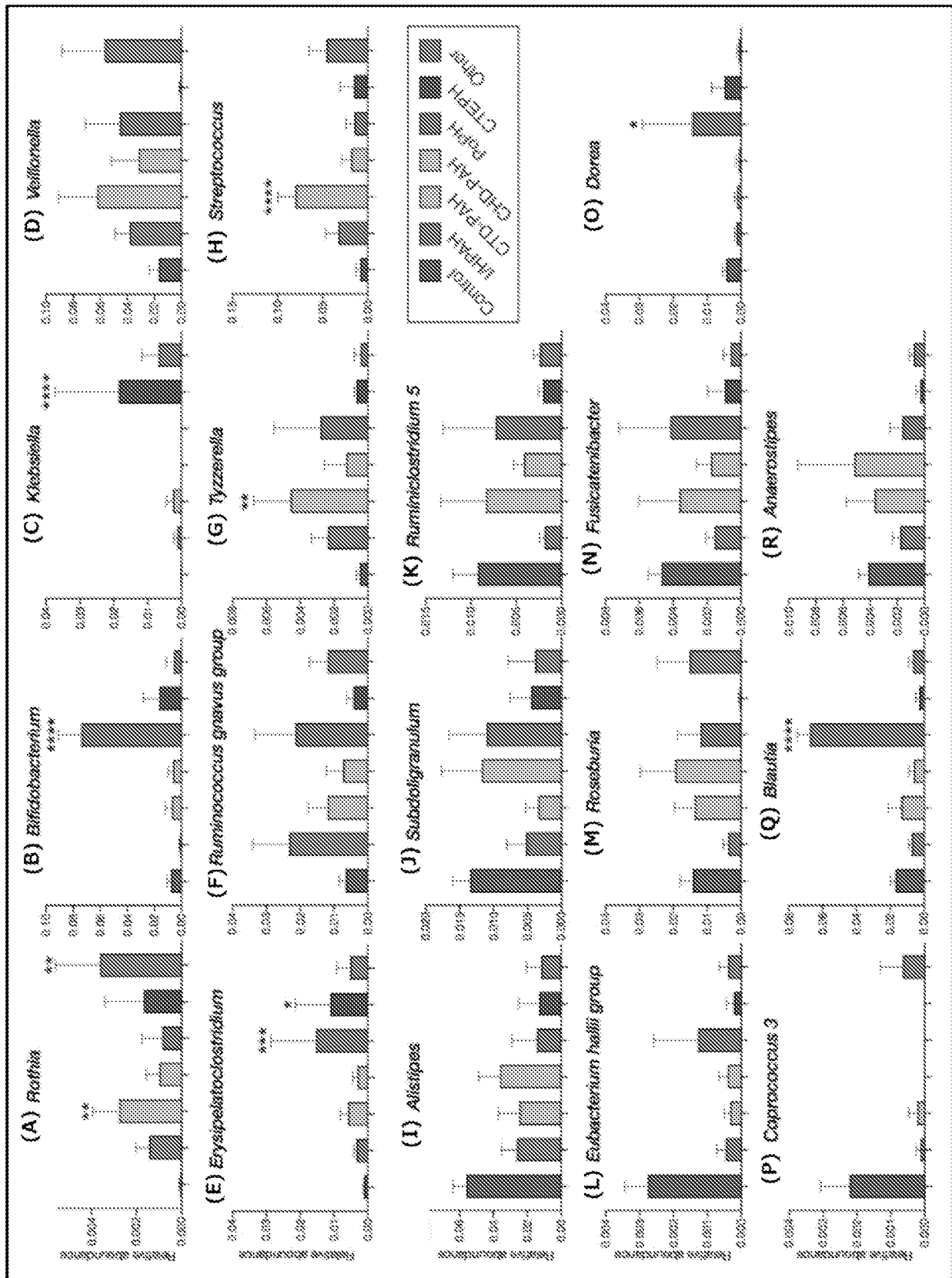
[図24]



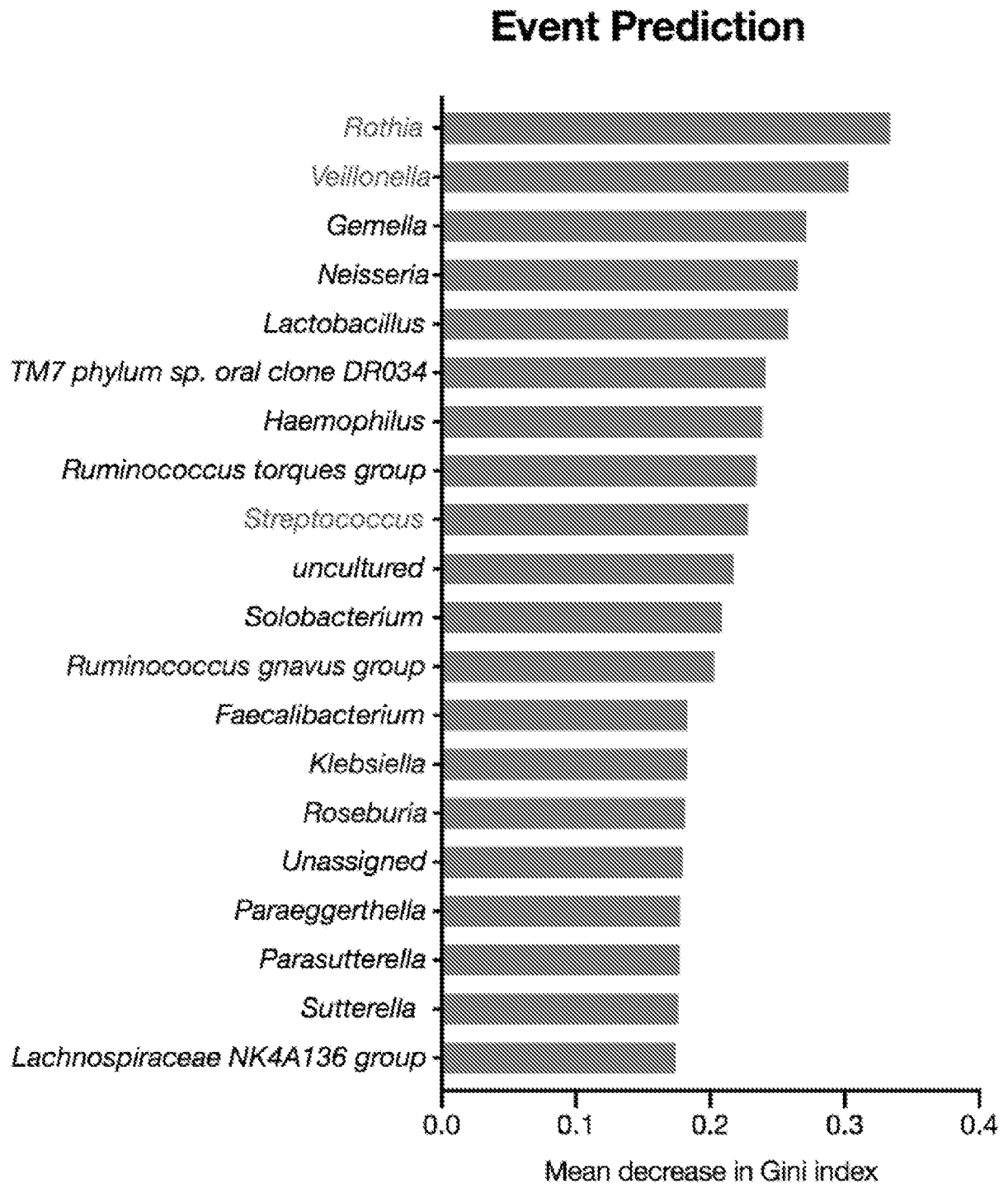
[図25]



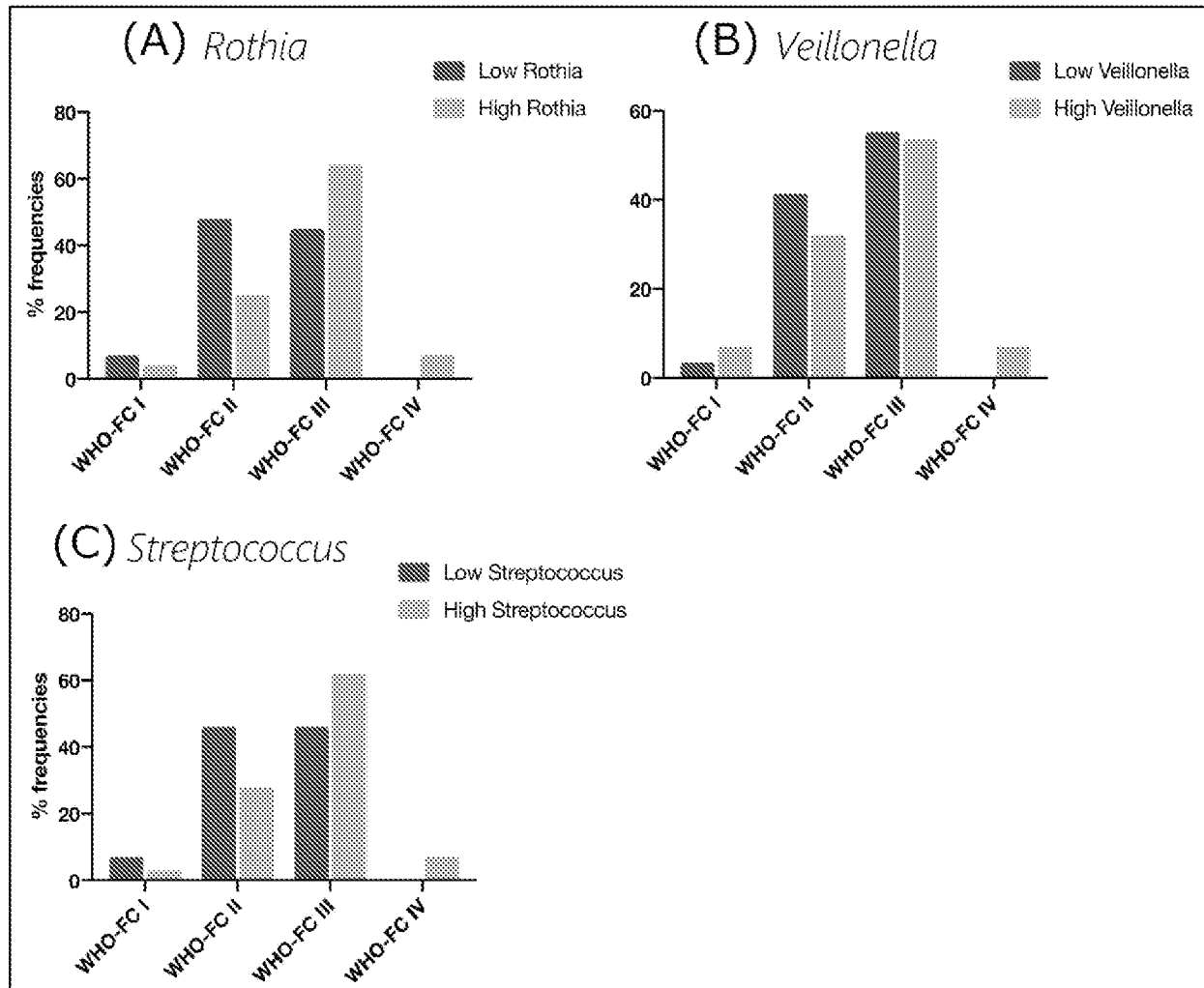
[図26]



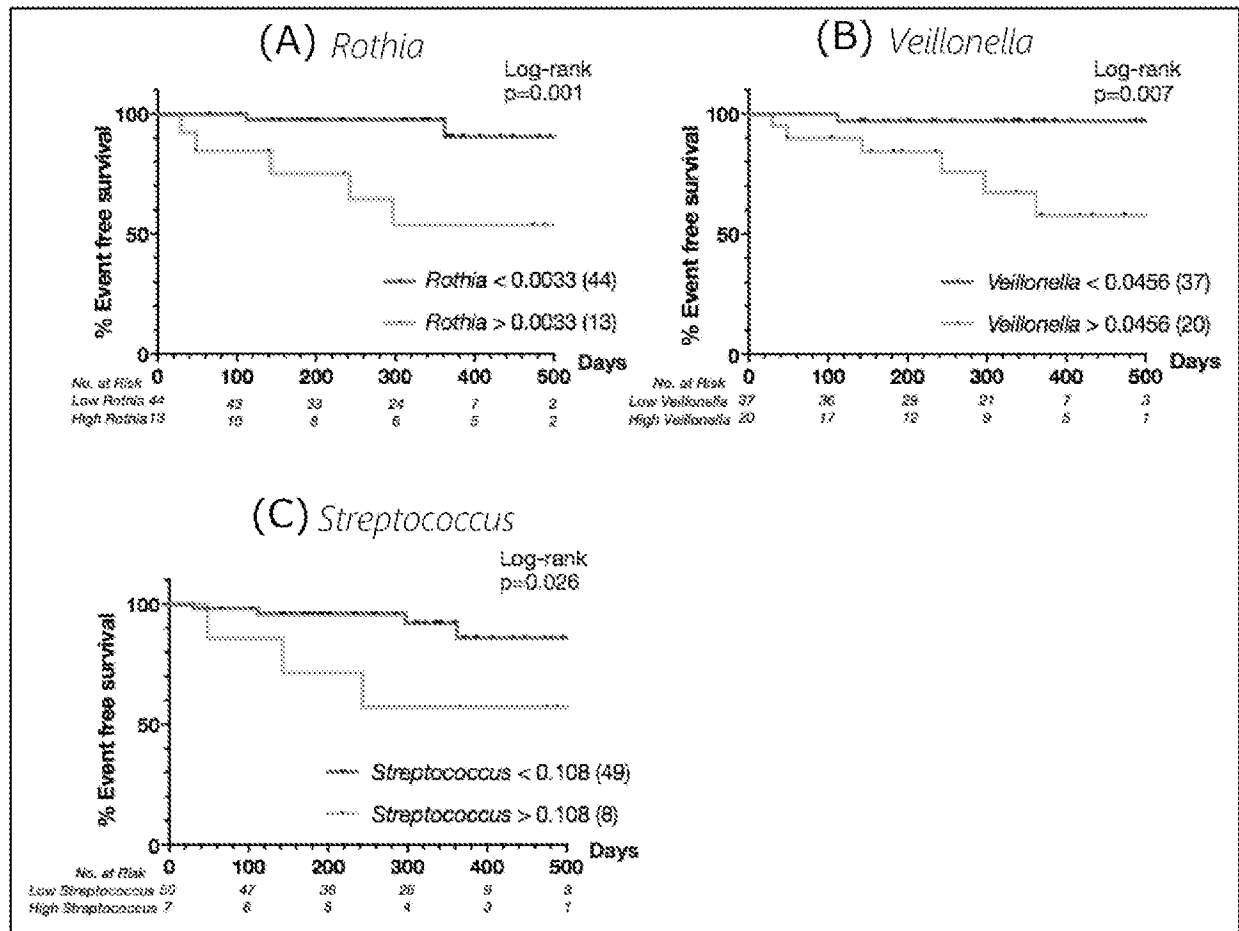
[図27]



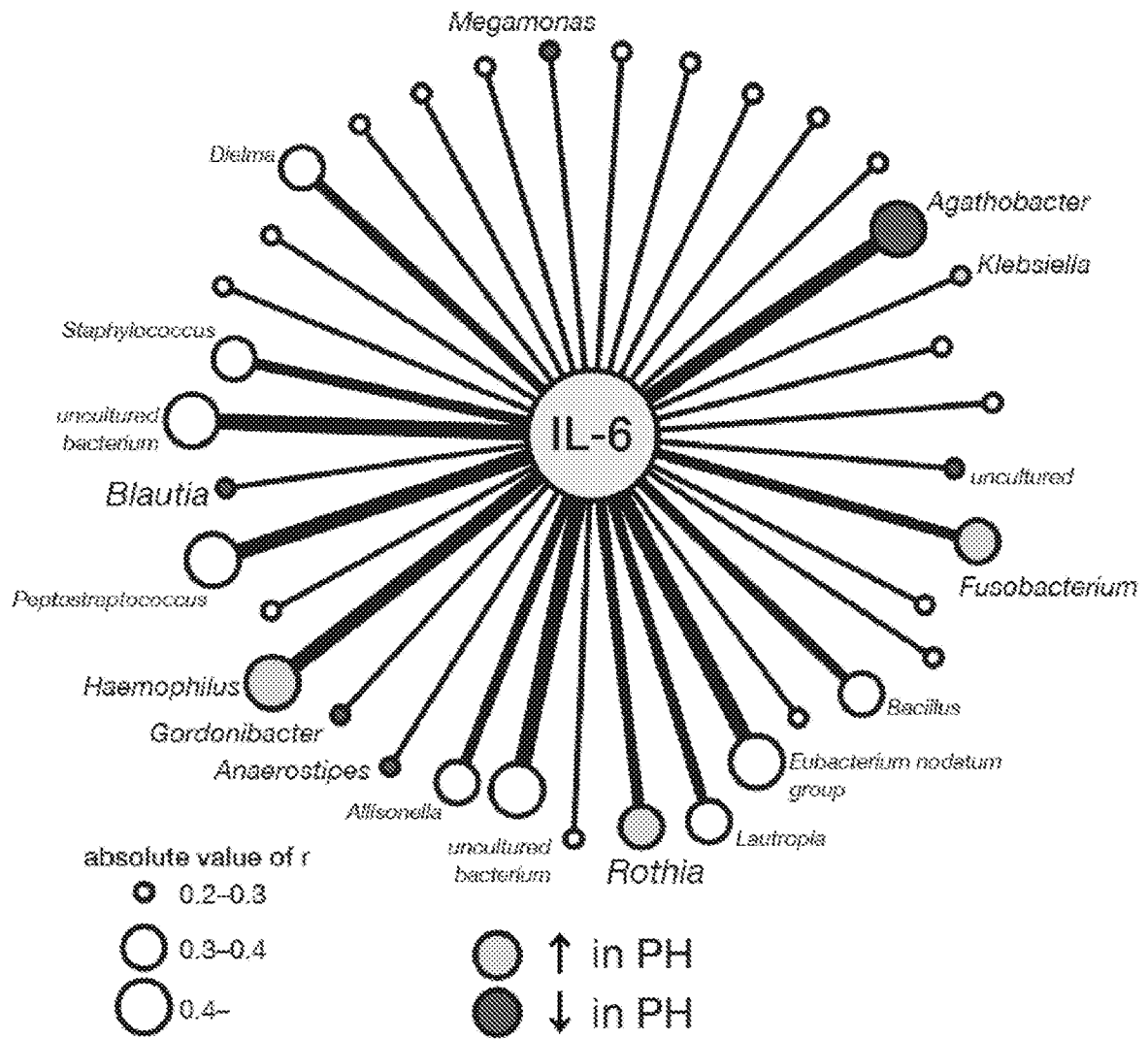
[図28]



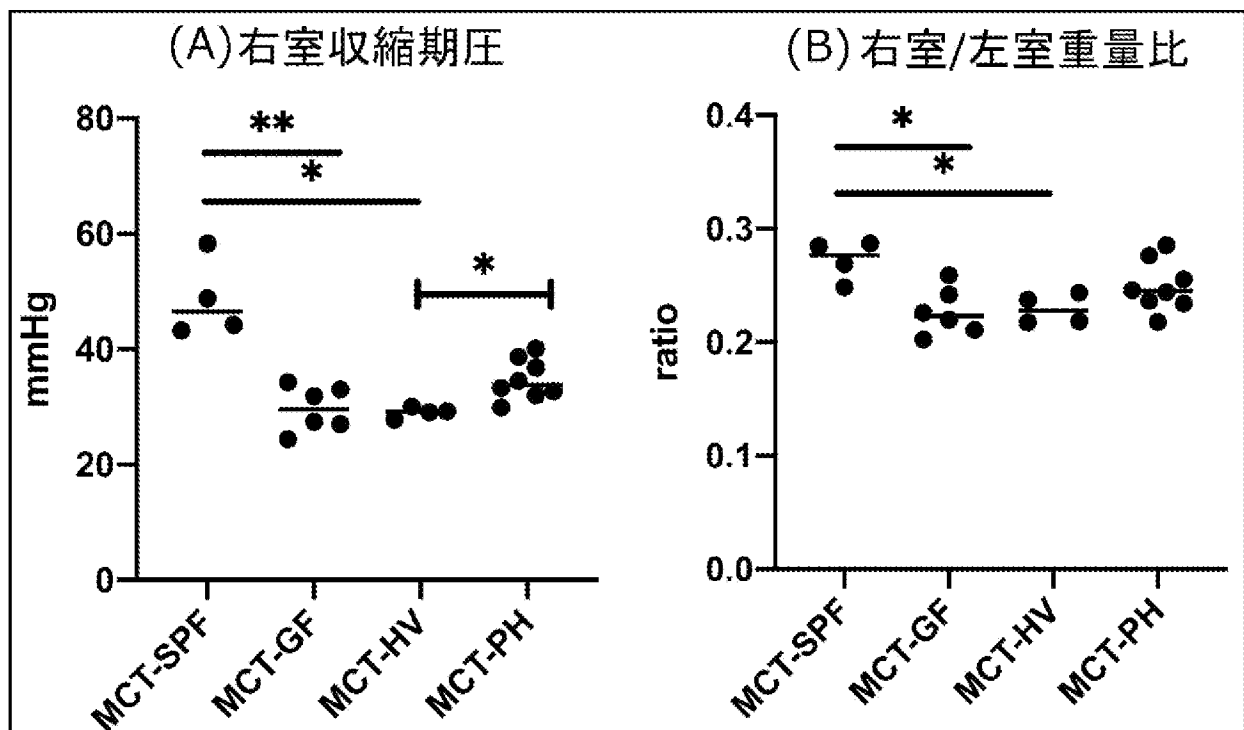
[図29]



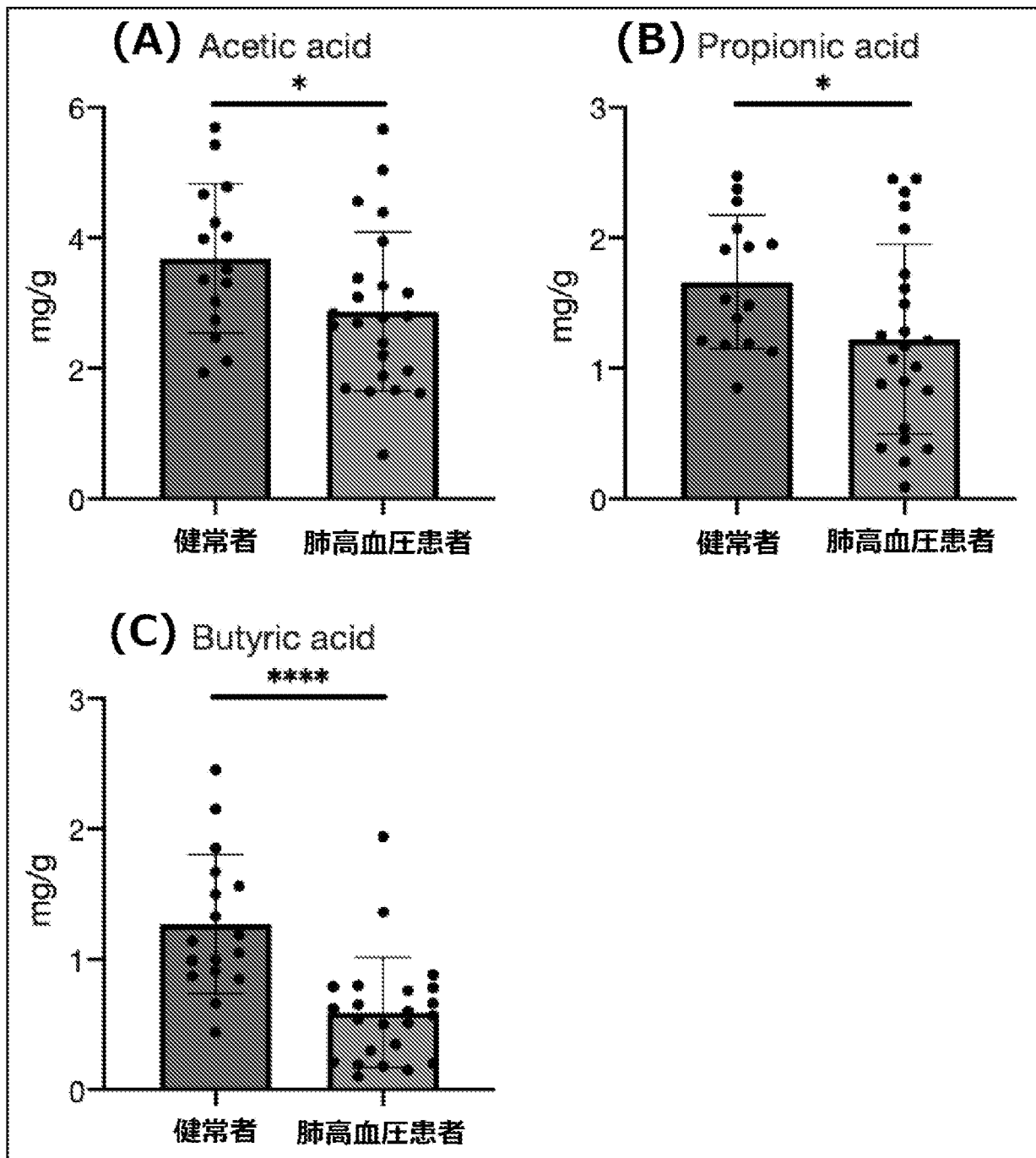
[図30]



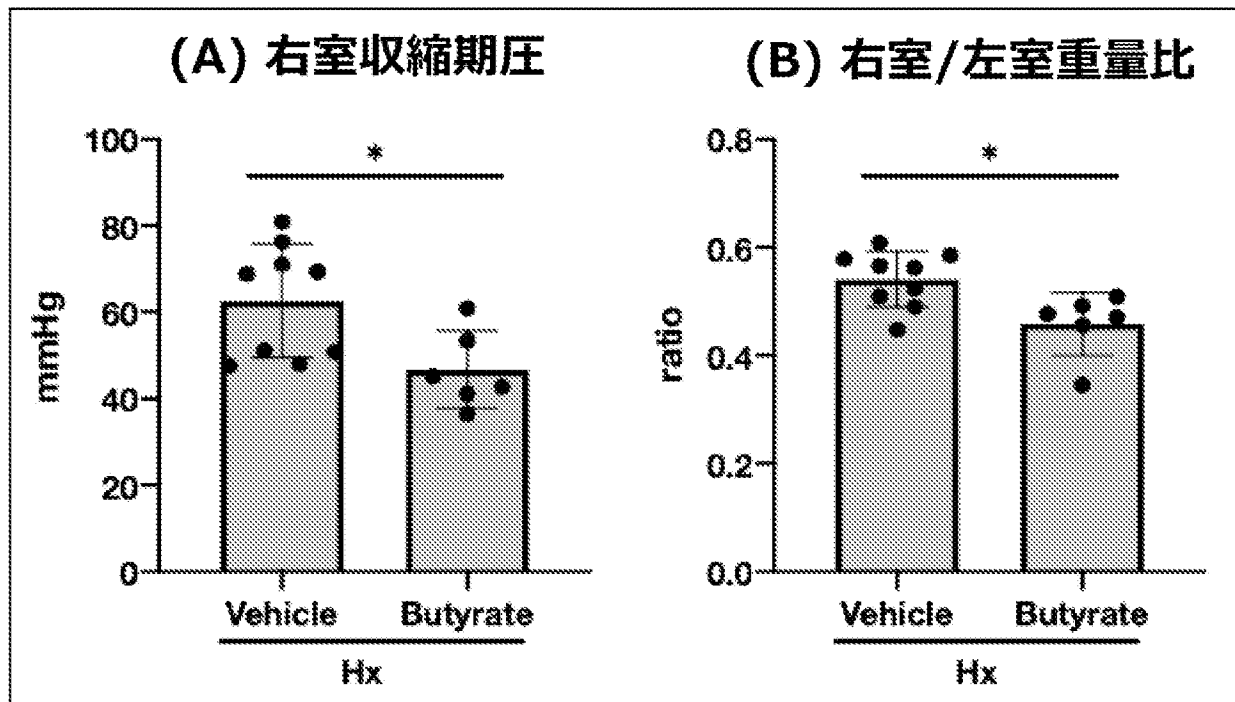
[図31]



[図32]



[図33]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/006448

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 45/00(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 7/00(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; C12N 9/99(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 31/4164(2006.01)i; A61K 31/43(2006.01)i; A61K 31/7036(2006.01)i
 FI: A61K45/00; A61P9/12; A61P31/04; A61P43/00 121; A61K31/43; A61K31/7036; A61K31/4164; A61K38/08; A61P11/00; C12Q1/04; G01N33/68; G01N33/50 T; C12N1/20 Z; C12N9/99; C12N7/00 ZNA

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)

A61K45/00; A61P9/12; A61P11/00; A61P31/04; A61P43/00; C12N7/00; C12N1/20; C12Q1/04; A61K38/08; C12N9/99; G01N33/50; G01N33/68; A61K31/4164; A61K31/43; A61K31/7036

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII);
 CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WEDGEWOOD, Stephen et al., "The developing gut-lung axis: postnatal growth restriction, intestinal dysbiosis, and pulmonary hypertension in a rodent model", <i>Pediatr Res</i> , 19 September 2019, vol. 87, pp. 472-479, in particular, abstract, fig. 3, p. 473, section "Impact of probiotic <i>Lactobacillus</i> on PNCR and hyperoxia"	1-5, 9, 16-18, 22
Y		10-13

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

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 02 April 2021 (02.04.2021)	Date of mailing of the international search report 20 April 2021 (20.04.2021)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/006448

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2010/071421 A1 (N. V. NUTRICIA) 24 June 2010 (2010-06-24) claims, p. 3, section "probiotics", examples	1, 9-13, 16, 17, 21 10-13
X	US 2015/0110745 A1 (RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD.) 23 April 2015 (2015-04-23) claims 14, 26	8
X	US 2019/0263878 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INCORPORATED) 29 August 2019 (2019-08-29) claims, examples	1, 6, 7, 9, 13
X	WO 2008/139703 A1 (KYUSHU UNIVERSITY) 20 November 2008 (2008-11-20) claims, examples	14, 15
X	岡田 修、ほか 8 名、慢性血栓塞栓性肺高血圧症における遺伝学的素因に関する検討、厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班呼吸不全調査研究班平成 9 年度研究報告書, pp. 140-145, 31 March 1998, in particular, p. 140, right column, paragraph [0003], fig. 2, non-official translation (OKADA, Osamu et al., "Examination of genetic predispositions in chronic thrombus embolic pulmonary hypertension", Special diseases designated by the Ministry of Health and Welfare: Respiratory Disease survey research group, Respiratory failure survey research group, Study report in 1997)	19
X	SHENOY, V. et al., "The microbial metabolite, butyrate attenuates pulmonary hypertension", J Hypertension, vol. 33, e-Suppl. 1, e327, in particular, subject number PP.21.33	20
P, X	SANADA, J. Takayuki et al., "Gut microbiota modification suppresses the development of pulmonary arterial hypertension in an SU5416/hypoxia rat model", Pulm Circ, 27 August 2020, in particular, abstract, fig. 3, 4	1-5, 9-13, 16-19, 21, 22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/006448

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2010/071421 A	24 Jun. 2010	(Family: none)	
US 2015/0110745 A1	23 Apr. 2015	WO 2013/138716 A1	
		claims 14, 26	
		EP 2825201 A1	
US 2019/0263878 A1	29 Aug. 2019	WO 2018/053049 A1	
		claims, examples	
WO 2008/139703 A1	20 Nov. 2008	US 2010/0086615 A1	
		claims, examples	
		EP 2140882 A1	
		CN 101668542 A	
		KR 10-2010-0015758 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61K 45/00(2006.01)i; A61P 9/12(2006.01)i; A61P 11/00(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; A61P 43/00(2006.01)i; C12N 7/00(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; C12N 9/99(2006.01)i; G01N 33/50(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 31/4164(2006.01)i; A61K 31/43(2006.01)i; A61K 31/7036(2006.01)i FI: A61K45/00; A61P9/12; A61P31/04; A61P43/00 121; A61K31/43; A61K31/7036; A61K31/4164; A61K38/08; A61P11/00; C12Q1/04; G01N33/68; G01N33/50 T; C12N1/20 Z; C12N9/99; C12N7/00 ZNA																				
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）） A61K45/00; A61P9/12; A61P11/00; A61P31/04; A61P43/00; C12N7/00; C12N1/20; C12Q1/04; A61K38/08; C12N9/99; G01N33/50; G01N33/68; A61K31/4164; A61K31/43; A61K31/7036 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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2021年</td> </tr> </table> 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); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2021年	日本国実用新案登録公報	1996-2021年	日本国登録実用新案公報	1994-2021年										
日本国実用新案公報	1922-1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971-2021年																			
日本国実用新案登録公報	1996-2021年																			
日本国登録実用新案公報	1994-2021年																			
C. 関連すると認められる文献 <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WEDGEWOOD, Stephen et al., The developing gut-lung axis: postnatal growth restriction, intestinal dysbiosis, and pulmonary hypertension in a rodent model, <i>Pediatr Res</i>, 2019.09.19, Vol.87, pp.472-479 特に、Abstract, Fig.3, p.473 Impact of probiotic <i>Lactobacillus</i> on PNCR and hyperoxiaの項目</td> <td>1-5, 9, 16-18, 22</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>10-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2010/071421 A1 (N. V. NUTRICIA) 24.06.2010 (2010-06-24) 特許請求の範囲、p.3 Probioticsの項目、実施例</td> <td>1, 9-13, 16, 17, 21</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>10-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>US 2015/0110745 A1 (RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD.) 23.04.2015 (2015-04-23) 請求項14, 26</td> <td>8</td> </tr> </tbody> </table>			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	WEDGEWOOD, Stephen et al., The developing gut-lung axis: postnatal growth restriction, intestinal dysbiosis, and pulmonary hypertension in a rodent model, <i>Pediatr Res</i> , 2019.09.19, Vol.87, pp.472-479 特に、Abstract, Fig.3, p.473 Impact of probiotic <i>Lactobacillus</i> on PNCR and hyperoxiaの項目	1-5, 9, 16-18, 22	Y		10-13	X	WO 2010/071421 A1 (N. V. NUTRICIA) 24.06.2010 (2010-06-24) 特許請求の範囲、p.3 Probioticsの項目、実施例	1, 9-13, 16, 17, 21	Y		10-13	X	US 2015/0110745 A1 (RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD.) 23.04.2015 (2015-04-23) 請求項14, 26	8
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	WEDGEWOOD, Stephen et al., The developing gut-lung axis: postnatal growth restriction, intestinal dysbiosis, and pulmonary hypertension in a rodent model, <i>Pediatr Res</i> , 2019.09.19, Vol.87, pp.472-479 特に、Abstract, Fig.3, p.473 Impact of probiotic <i>Lactobacillus</i> on PNCR and hyperoxiaの項目	1-5, 9, 16-18, 22																		
Y		10-13																		
X	WO 2010/071421 A1 (N. V. NUTRICIA) 24.06.2010 (2010-06-24) 特許請求の範囲、p.3 Probioticsの項目、実施例	1, 9-13, 16, 17, 21																		
Y		10-13																		
X	US 2015/0110745 A1 (RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD.) 23.04.2015 (2015-04-23) 請求項14, 26	8																		
☒ 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。																				
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td>“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</td> </tr> <tr> <td>“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）</td> <td>“&” 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>“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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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	“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	“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	“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）	“&” 同一パテントファミリー文献	“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							
* 引用文献のカテゴリー	“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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																			
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	“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																			
“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	“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																			
“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）	“&” 同一パテントファミリー文献																			
“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																				
国際調査を完了した日		国際調査報告の発送日																		
02.04.2021		20.04.2021																		
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 渡部 正博 4U 5801 電話番号 03-3581-1101 内線 3452																		

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	US 2019/0263878 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INCORPORATED) 29.08.2019 (2019 - 08 - 29) 特許請求の範囲、実施例	1, 6, 7, 9, 13
X	WO 2008/139703 A1 (国立大学法人九州大学) 20.11.2008 (2008 - 11 - 20) 特許請求の範囲、実施例	14, 15
X	岡田 修、ほか8名、慢性血栓塞栓性肺高血圧症における遺伝学的素因に関する検討、厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班呼吸不全調査研究班平成9年度研究報告書、pp.140-145, 1998.03.31 特に、p.140右欄第3段落、図2	19
X	SHENOY, V. et al., The microbial metabolite, butyrate attenuates pulmonary hypertension, J Hypertension, Vol.33, e-Suppl.1, e327 特に、演題番号PP.21.33	20
P, X	SANADA, J. Takayuki et al., Gut microbiota modification supresses the development of pulmonary arterial hypertension in an SU5416/hypoxia rat model, Pulm Circ, 2020.08.27 特に、Abstract, Figs. 3, 4	1-5, 9-13, 16-19, 21, 22

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/006448

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2010/071421	A1	24.06.2010	(ファミリーなし)	
US	2015/0110745	A1	23.04.2015	WO 2013/138716	A1
				Claims 14, 26	
				EP 2825201	A1
US	2019/0263878	A1	29.08.2019	WO 2018/053049	A1
				Claims, Examples	
WO	2008/139703	A1	20.11.2008	US 2010/0086615	A1
				Claims, Examples	
				EP 2140882	A1
				CN 101668542	A
				KR 10-2010-0015758	A