(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7053146号
(P7053146)

(45)発行日　令和4年4月12日(2022.4.12)

(24)登録日　令和4年4月4日(2022.4.4)

(51)国際特許分類		FI		
C12Q 1/689(2018.01)		C12Q	1/689	Z
C12N 15/11 (2006.01)		C12N	15/11	Z ZNA
C12Q 1/686(2018.01)		C12Q	1/686	Z
G01N 33/50 (2006.01)		G01N	33/50	P

請求項の数　17　（全47頁）

(21)出願番号	特願2016-555535(P2016-555535)
(86)(22)出願日	平成27年3月3日(2015.3.3)
(65)公表番号	特表2017-508464(P2017-508464A)
(43)公表日	平成29年3月30日(2017.3.30)
(86)国際出願番号	PCT/EP2015/054451
(87)国際公開番号	WO2015/132273
(87)国際公開日	平成27年9月11日(2015.9.11)
審査請求日	平成30年2月13日(2018.2.13)
審判番号	不服2020-7210(P2020-7210/J1)
審判請求日	令和2年5月27日(2020.5.27)
(31)優先権主張番号	14382074.4
(32)優先日	平成26年3月3日(2014.3.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　516262103
フンダシオ インスティトゥート ディン ベスティガシオ ビオメディカ デ ジローナ ドクトル ジュゼップ トルエタ
スペイン国 １７１９０ サルト（ジローナ） エディフィシ エム２－パルク ホスピタラリ マルティ イ フリア セー／ドクトル カスタニー エセ／エネ
(73)特許権者　516262114
ウニベルシタ デ ジローナ
スペイン国 １７００４ ジローナ ヌメロ９ プラサ サント ドメネク
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　セラ パジェス マリオナ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　定量的ＰＣＲによってヒトの糞便試料から大腸癌を診断する方法、プライマー及びキット

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

ヒト被験体において大腸癌（ＣＲＣ）発症リスクを検出する方法であって、

ｉ）前記被験体に由来する糞便試料から、配列番号１、配列番号７、及び配列番号１０からなる群より選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的なｒＲＮＡ配列を有する核酸を定量することと、

ｉｉ）工程ｉ）で得られた被験体試料における前記核酸の量を、それぞれの配列についての対照試料における該核酸の量と比較することと、

ｉｉｉ）工程ｉ）で得られた前記核酸の量において、対照試料における該核酸の量からの存在量の減少がある場合に、リンチ症候群に関連するＣＲＣ発症リスクがあると判定すること

を含む方法。

【請求項２】

ヒト被験体において大腸癌（ＣＲＣ）をスクリーニングする方法であって、

ｉ）前記被験体に由来する糞便試料から、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的なｒＲＮＡ配列を有する核酸を定量することと、

ｉｉ）工程ｉ）で得られた被験体試料における前記核酸の量を、それぞれの配列についての対照試料における該核酸の量と比較することと、

ｉｉｉ）工程ｉ）で得られた前記核酸の量において、対照試料における該核酸の量からの

存在量の減少がある場合に、前記被験体においてＣＲＣが発症若しくは再発していると判定すること、又は前記被験体において大腸内視鏡検査を行うべきであると判定することと、を含む、方法。
【請求項３】
工程ｉ）において、２つ、３つ、又は全ての前記細菌配列のいずれか１つを有する核酸を定量することを含む、請求項２に記載の方法。
【請求項４】
前記細菌配列の定量に先立って、任意の手段による前記試料の物理的破壊及びシリカ膜カラム上でのＤＮＡ精製を含む糞便試料からのＤＮＡの抽出を行う、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
前記細菌配列の定量が定量的ＰＣＲによって行われる、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
ヒト被験体においてＣＲＣ発症リスクを検出する請求項１に記載の方法であって、
ｉ．　配列番号１、配列番号７、及び配列番号１０からなる群より選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列を有する核酸の濃度を前記被験体の糞便試料から定量的ＰＣＲによって特定することと、ここで、該濃度はＣｔ値で表わされ、
ｉｉ．　前記ｉ．で特定された前記被験体試料における少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列を有する核酸の量のＣｔ値をカットオフＣｔ値と比較することと、
ｉｉｉ．　前記ｉ．で特定された前記被験体試料における少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列を有する核酸の量のＣｔ値において、カットオフＣｔ値と比較して上昇がある場合に、該被験体においてＣＲＣ発症リスクがあると判定することと、
を含む、方法。
【請求項７】
ヒト被験体においてＣＲＣをスクリーニングする請求項２に記載の方法であって、
ｉ．　配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる群より選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列を有する核酸の濃度を前記被験体の糞便試料から定量的ＰＣＲによって特定することと、ここで、該濃度はＣｔ値で表わされ、
ｉｉ．　前記ｉ．で特定された前記被験体試料における少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列を有する核酸の量のＣｔ値をカットオフＣｔ値と比較することと、
ｉｉｉ．　前記ｉ．で特定された前記被験体試料における少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列を有する核酸のＣｔ値において、カットオフＣｔ値と比較して上昇がある場合に、該被験体においてＣＲＣが発症若しくは再発していると判定すること、又は該被験体において大腸内視鏡検査を行うべきであると判定することと、
を含む、方法。
【請求項８】
配列番号１を有する核酸の量が配列番号２及び配列番号１３に関して少なくとも９０％の同一性を有する一組のプライマーを使用して特定され、配列番号４を有する核酸の量が配列番号５及び配列番号６に関して少なくとも９０％の同一性を有する一組のプライマーを使用して特定され、配列番号７を有する核酸の量が配列番号８及び配列番号９に関して少なくとも９０％の同一性を有する一組のプライマーを使用して特定され、配列番号１０を有する核酸の量が配列番号１１及び配列番号１２に関して少なくとも９０％の同一性を有する一組のプライマーを使用して特定される、
請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
配列番号１を有する核酸の量が配列番号２及び配列番号１３の配列を有する一組のプライマーを使用して特定され、配列番号４を有する核酸の量が配列番号５及び配列番号６の配列を有する一組のプライマーを使用して特定され、配列番号７を有する核酸の量が配列番号８及び配列番号９の配列を有する一組のプライマーを使用して特定され、配列番号１０

を有する核酸の量が配列番号１１及び配列番号１２の配列を有する一組のプライマーを使用して特定される、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
ＣＲＣの指標として知られている１種又は複数種の分子バイオマーカーを検出すること及び／又は定量することを更に含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１１】
コンピュータ可読媒体に前記方法の結果を保存することを更に含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
請求項１に記載の方法によりヒト被験体において大腸癌（ＣＲＣ）発症リスクがあると判定することのためのバイオマーカーとしての、配列番号１、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的なｒＲＮＡ配列を有する核酸の定量の使用。
【請求項１３】
キットであって、
ａ．
ｉ．配列番号１、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列、若しくはそれらの相補的なｒＲＮＡ配列と特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、又は、
ｉｉ．配列番号１、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列を特異的に増幅することができる一対の核酸プライマー、
からなる群より選択される試薬
を備え、
請求項１に記載の方法のために用いられる、キット。
【請求項１４】
ｉ．の前記核酸プローブ、又はｉｉ．の前記核酸プライマーが、
（ａ）配列番号１を有する核酸の定量のために用いられる配列番号２及び配列番号１３、配列番号７を有する核酸の定量のために用いられる配列番号８及び配列番号９、並びに配列番号１０を有する核酸の定量のために用いられる配列番号１１、及び配列番号１２；及び　（ｂ）前記（ａ）の配列と少なくとも９０％の同一性を有する核酸配列
のそれぞれを有するポリヌクレオチドからなる群より選択される、請求項１３に記載のキット。
【請求項１５】
請求項２に記載の方法によりヒト被験体において大腸癌（ＣＲＣ）をスクリーニングするためのバイオマーカーとしての、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的なｒＲＮＡ配列を有する核酸の定量の使用。
【請求項１６】
キットであって、
ａ．
ｉ．配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列、又はそれらの相補的なｒＲＮＡ配列と特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、又は、
ｉｉ．配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列を特異的に増幅することができる一対の核酸プライマー、
からなる群より選択される試薬
を備え、
請求項２に記載の方法のために用いられる、キット。
【請求項１７】

ｉ．の前記核酸プローブ、又はｉｉ．の前記核酸プライマーが、
（ａ）配列番号１を有する核酸の定量のために用いられる配列番号２及び配列番号１３、配列番号７を有する核酸の定量のために用いられる配列番号８及び配列番号９、並びに配列番号１０を有する核酸の定量のために用いられる配列番号１１、及び配列番号１２；及び
（ｂ）前記（ａ）の配列と少なくとも９０％の同一性を有する核酸配列
のそれぞれを有するポリヌクレオチドからなる群より選択される、請求項１６に記載のキット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、大腸癌（ＣＲＣ）の検出の分野に関する。具体的には、本発明は、糞便中の１種又は複数種の１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列の定量に基づいてヒト被験体におけるＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの早期検出、リスクスクリーニング及びモニタリングをする方法に関する。さらに、本発明は、大腸癌及び／又は腺腫性ポリープのバイオマーカーとしての上記細菌配列の使用、上記細菌配列の定量のための試薬及び指示書を備えるキット、並びに上記１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列の定量のための核酸に関する。
【背景技術】
【０００２】
大腸癌（ＣＲＣ）は、ヨーロッパ及びアメリカ合衆国において癌による死亡原因の第２位であってヨーロッパにおいて最も頻繁に診断される癌であり、２００８年には４０００００を超える新たな症例があり、２０００００名が死亡した。これらのデータは、予防手段をとらなければならないことを反映している。
【０００３】
ＣＲＣの発症及び死亡率を減少するための最も効果的で経済的な手段は、ＣＲＣリスクのスクリーニング検査及びモニタリング検査である。スクリーニング検査は、早期に一次的に癌を検出するものと、早期に癌を検出することができ、また腺腫性ポリープを検出することができるものとに分類され、それによりポリープ切除（すなわち、ポリープの除去）による予防に対してより大きな可能性を提供する。非特許文献１、非特許文献２を参照されたい。平均的なリスクの人々、及びリスクの増した又は高リスクの人々に適用される種々のスクリーニングガイドライン（http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/moreinformation/colonandrectumcancerearlydetection/colorectal-cancer-early-detection-acs-recommendations）。
【０００４】
現在、ＣＲＣを一次的に検出する検査は糞便検査であり、ｉ）糞便の血液検査：便潜血検査（fecal occult blood test：ＦＯＢＴ）及び便免疫化学検査（fecal immunochemical test：ＦＩＴ）、並びにｉｉ）便ＤＮＡ（stool DNA）（ｓＤＮＡ）検査が挙げられる（http://www.cancer.org/cancer/colonandrectumcancer/moreinformation/colonandrectumcancerearlydetection/colorectal-cancer-early-detection-screening-tests-usedを参照されたい）。
【０００５】
ｉ）糞便の血液検査
ＦＯＢＴ及びＦＩＴはいずれも糞便試料中の血液の量を検出することによってＣＲＣをスクリーニングする。該検査は、新生物の組織、特に悪性の組織は典型的な粘膜よりも出血し、出血量はポリープの大きさ及び癌のステージと共に増加するという前提に基づく。間欠性出血のため複数の検査が推奨される。糞便の血液検査が下部結腸における幾つかの初期のステージの腫瘍を検出し得るのに対し、（ｉ）血液はいずれも代謝されるため上部結腸におけるＣＲＣ、及び／又は（ｉｉ）より小さい腺腫性ポリープを検出することができず、偽陰性をもたらす。痔、裂溝、炎症性障害（潰瘍性大腸炎、クローン病）、感染性疾患、さらには長距離ランニングによるあらゆる胃腸の出血が疑陽性をもたらす（非特許文献３）。現在のＡＣＳガイドライン（非特許文献２）は、年齢５０歳以上の平均的なリス

クの成人に対してグアヤックによる便潜血検査（Guaiac-based fecal occult blood test：ｇＦＯＢＴ）を使用する年に一度のスクリーニングを推奨している。ＦＯＢＴは、欧州連合で唯一推奨される検査である（非特許文献４）。いずれのガイドラインもいかなる陽性ＦＯＢＴ検査も大腸内視鏡検査によりフォローアップすべきことを推奨している。

【０００６】

ｉｉ）便ＤＮＡ（ｓＤＮＡ）検査

ｓＤＮＡ検査は、糞便試料に由来する多様なＤＮＡマーカーを測定する。Exact Sciences Corp.（ワイオミング州マディソン）製の現在入手可能なＣｏｌｏｇｕａｒ（商標）のｓＤＮＡ検査は、Ｋ－ｒａｓ、ＡＰＣ、及びＰ５３の遺伝子における別々の点突然変異を含む複数のマーカーパネル、ＢＡＴ－２６に対するプローブ、ＤＮＡ完全性（ＤＩＡ）に対するマーカー、及びビメンチン遺伝子のメチル化を測定する（非特許文献２）。ｓＤＮＡ検査を推奨するガイドラインもあるが、より保守的であり、ｓＤＮＡ検査を推奨しないガイドラインもある。或る研究ではあるバージョンのｓＤＮＡ検査はＦＯＢＴよりも優れていたが、依然として進行した腺腫の１５％を検出したに過ぎなかった（非特許文献５）。

【０００７】

腺腫性ポリープ及び癌を検出することができるとしてＡＣＳガイドラインに示される検査は構造検査であり、（ｉ）大腸内視鏡検査、（ｉｉ）軟性Ｓ状結腸鏡検査（ＦＳＩＧ）、（ｉｉｉ）二重造影注腸（ＤＣＢＥ）、及び（ｉｖ）ＣＴコロノグラフィー（ＣＴＣ、仮想大腸内視鏡検査）が挙げられる。これらの方法は全て、視覚化を補助するための患者の腸のパージング（purging）及び結腸への空気の注入をする必要がある。現在のガイドラインは、リソース（resorces）が利用可能であり、患者が侵襲的な検査を経ることを望む場合に早期の癌及び腺腫性ポリープの両方を検出するように設計された検査の使用を勧める。

【０００８】

大腸内視鏡検査は、１つのセッションで結腸及び直腸のポリープの全ての粘膜採取生検（mucosal extraction biopsies）の直接的な精査及び切除を可能とする侵襲的な技術である。大腸内視鏡検査は、大腸癌の進行を改善するのみならず、該疾患を予防する。しかしながら、この技術に関連する主な不利益は、訓練された人物を必要とすることから費用が高いこと、麻酔関連死のリスク、及び腸管穿孔のリスクである（非特許文献６）。

【０００９】

経験豊富な専門家の手による大腸内視鏡検査は１００％の感度であり、１００％の特異度であるが、大腸内視鏡検査のリスク及び費用のため、大腸内視鏡検査の前に、糞便中の血液の検出に関する上に言及された糞便検査等の非侵襲性検査、すなわちｇＦＯＢＴ又はＦＩＴを使用するリスク集団のスクリーニングを行うことが必要とされるが、上に言及されるように重大な数の疑陽性の結果を導くため、同数の不要な大腸内視鏡検査をもたらす。これは、効果的な非侵襲性のＣＲＣスクリーニング手段に対する必要性を反映する。現在の効率的なＣＲＣスクリーニング手段の欠如により、大腸内視鏡検査の待ち時間が長くなり（６週間超）、誤って指示された大腸内視鏡検査に対して高額な経済的資源が割り当てられている。この状況は、公的及び私的な健康の両方について著しい支出を表し、結果的にシステムの飽和をもたらす（非特許文献７）。

【００１０】

したがって、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの早期検出及びモニタリングのため実際の方法の感度、特異度、非侵襲性及び／又は対費用効果の改善が必要とされている。

【００１１】

ＣＲＣの遺伝的基礎及び自然経過（natural history）ははっきりと定義されており、５％未満のＣＲＣが遺伝性であって大半は散発性、すなわち結腸新生物の個人歴又は家族歴のない患者において診断されると考えられている。この疾患の病因はいまだに不明であるが、内因性及び外因性の因子が腫瘍の発生に積極的に関与する多因子の起源が疑われる。これらの因子は、年齢、煙草、炎症性腸疾患の個人歴、食事、生活様式、及び細菌叢である。

【００１２】
最近では、ＣＲＣ患者の結腸粘膜における細菌群が健康な個体と異なることが示され、ＣＲＣの発症及びそのステージに沿った進行における判定物質として腸内細菌叢が提案された（非特許文献８、非特許文献９、非特許文献１０、非特許文献１１）。
【００１３】
特許文献１は、細菌性のサインを使用して腺腫及び大腸癌を検出する方法に言及している。粘膜生検に由来する接着性細菌群を特性評価するため、１６ｒＲＮＡ遺伝子のピロシークエンシングを行った。腺腫の被験体と非腺腫の被験体との間の相対的存在量を計算し、腺腫の発生が腸管粘膜に存在する様々な細菌分類群の相対的存在量の変化と関連すると結論づけた。具体的には、１６Ｓ　ｒＲＮＡ遺伝子（１６ｓＤＮＡ）のｑＰＣＲ定量によって腺腫を有する又は有しない被験体の正常な直腸粘膜におけるフソバクテリウム・ヌクレアタム（Fusobacteriumnucleatum）の存在量を特定し、存在量は対照と比較して腺腫の場合でより多いと結論付けた。上記データによれば、結腸直腸の発癌のバイオマーカーとしてのＦ．ヌクレアタムの使用が示唆される。
【００１４】
また、ＣＲＣのステージを通してその発症及び進展における物質としての腸細菌叢の重要性が粘膜生検試料において本発明者らの一人によって行われた研究で確認され、大腸癌を有する患者におけるフィルミクテス（firmicutes）、アクチノバクテリア（actinobacteria）、及びエシェリキア・コリ（Escherichia coli）の存在量と、健康な被験体におけるフィーカリバクテリウム・プラウスニッツィイの存在量との関連を示す（非特許文献１２、http://hdl.handle.net/10803/94513）。
【００１５】
しかしながら、当該技術分野では、粘膜生検及び糞便試料における微生物叢の組成には差があることはよく知られている。Lepage et al.（非特許文献１３）は、所与の個体において、粘膜関連細菌叢と糞便細菌叢とで優占種が異なることを示す。同様に、Eckburg et al.（非特許文献１４）は、粘膜及び糞便の試料に見られる系統発生学上の系統間の統計学的有意差を報告し、糞便細菌叢は脱落した（shed）粘膜細菌及び別々の非接着性管腔集団の組合せを表すと主張している。
【００１６】
Nechvatal et al.（非特許文献１５）は、糞便ＤＮＡが腸内細菌及びヒト癌マーカーの疫学調査の供給源として使用され得ることを示した。特に、非特許文献１５には、ヒト糞便に由来するＤＮＡ抽出物中の細菌及びヒトの配列のリアルタイム定量的ＰＣＲによる定量が記載されている。Balamurugan et al.（非特許文献１６）には、大腸癌を有する患者の糞便中に、保護効果を有すること（すなわち、ブチレート産生細菌であるユーバクテリウム・レクタレ（Eubacterium rectale）及びフィーカリバクテリウム・プラウスニッツィイ（Faecalibacterium prausnitzii））、又は毒性若しくは発癌性であること（すなわち、デスルホビブリオ（Desulfovibrio（硫酸還元細菌）及びエンテロコッカス・フェカリス（細胞外スーパーオキシドを産生する））が知られている代謝産物を伴う特定の細菌のリアルタイム定量的ＰＣＲによる定量が記載されている。しかしながら、いずれの文献もＣＲＣに対するバイオマーカーとしてのかかる細菌配列の診断値又は予測値の特定に対しては、何ら記載していない。
【００１７】
特許文献２においてWang et al.は、ＣＲＣ患者及び対照のヒト糞便からｑＰＣＲによってＦ．ヌクレアタム（F.nucleatum：ＦＮＮ）のｎｕｓＧ遺伝子の定量を含み、感度５７％及び特異度８９．５％でＣＲＣを検出する、ＣＲＣ検出の方法を記載する。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１８】
【文献】国際公開第２０１２／１７０４７８号
米国特許出願公開第２０１４／００２４０３６号

【非特許文献】
【００１９】
【文献】American Cancer Society (ACS) 2008 screening and surveillance guidelines
Levin et al. (CA Cancer J Clinicians, 2008;58(3)130-160)
Beg et al., J Indian AcadClin Med, 2002;3(2)153-158
Segnan N. et al., 2010, European guidelines for quality assurance in colorectal cancer screening and diagnosis. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities
Imperiale et al., N Engl J Med, 2004;351:2704-2714
Garborg K. et al., Ann Oncol., 2013;24(8):1963-72
Allison J. et al., Practical Gastroenterology, 2007, 3: 21-32
Chen W et al., PLoS One, 2012;7(6):e39743
Zhu Q et al., Tumour Biol., 2013;34(3):1285-300
Ahn J et al., J Natl Cancer Inst., 2013;105(24):1907-11
Na wu et al., Microbial ecology, 2013;66(2):462-470
Mas de Xaxars T., 2012, Diposit legal: GI. 1664-2012
Inflamm Bowel Dis., 2005;11(5):473-80
Science, 2005;308(5728):1635-1638
J Microbiol Methods., 2008;72(2):124-32
J GastroenterolHepatol., 2008;23:1298-303
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００２０】
糞便中のＣＲＣに対するＤＮＡバイオマーカーの検出及び／又は定量の方法が記載されているが、依然として糞便試料からヒト被験体におけるＣＲＣの早期診断、リスクスクリーニング、又は患者モニタリングの信頼できる方法が必要とされている。かかる方法の利用可能性は、早期検出により効果的にＣＲＣを予防することができ、また最近では、ＣＲＣ検出に対して現在標準的なスクリーニング方法であるＦＯＢＴ検査及びＦＩＴ検査の精度の低さから必要以上に頻繁にＣＲＣが疑われる個体において行われている、大腸内視鏡検査等の不必要な構造を調べる検査の数を減らすことができる。
【課題を解決するための手段】
【００２１】
本発明の第１の態様は、ヒト被験体において大腸癌（ＣＲＣ）及び／又は腺腫性ポリープをスクリーニングする方法であって、
ｉ．前記被験体に由来する糞便試料から、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的な１６Ｓ　ｒＲＮＡ配列を定量することと、
ｉｉ．ヒト被験体においてＣＲＣ及び／又はポリープを診断、早期検出、再発の判定、発症リスクの判定若しくは予測をすること、又は前記ヒト被験体において大腸内視鏡検査を行うべきかどうかを判定すること、又は前記ヒト被験体がＣＲＣ及び／又はポリープを有すると診断される患者である場合の予後を判定すること、又は少なくとも１つの前記配列の定量レベルからＣＲＣ及び／又はポリープを有する患者における治療をガイドすることと、
を含む、方法に関する。
【００２２】
第２の態様では、本発明は、ヒト被験体においてＣＲＣ及び／又はポリープを診断、早期検出、再発の判定、発症リスクの判定若しくは予測をすること、又は前記ヒト被験体において大腸内視鏡検査を行うべきかどうかを判定すること、又は前記ヒト被験体がＣＲＣ及び／又はポリープを有すると診断される患者である場合に予後を判定すること、又はＣＲ

Ｃ及び／又はポリープを有する患者における治療をガイドすることに対するバイオマーカーとして配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的な１６Ｓ　ｒＲＮＡ配列の使用であって、前記細菌配列が前記ヒト被験体の糞便試料から定量される、使用に関する。

【００２３】

第３の態様では、本発明は、キットであって、

ａ．

ｉ．配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列、若しくはそれらの相補的な１６Ｓ　ｒＲＮＡ配列と特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、又は、

ｉｉ．配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列を特異的に増幅することができる一対の核酸プライマー、

からなる群より選択される試薬と、

ｂ．本発明の方法に従ってヒト糞便試料から１種又は複数種の前記配列のレベルを定量するための指示書と、

を備える、キットに関する。

【００２４】

第４の態様では、本発明は、配列番号２、配列番号１３、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群より選択されるか、又はそれらと少なくとも９０％の同一性を有する核酸配列に関する。

【００２５】

第５の態様では、本発明は、本発明のスクリーニング方法における、配列番号２、配列番号１３、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群より選択される核酸配列、又はそれらと少なくとも９０％の同一性を有する核酸配列の使用に関する。

【００２６】

図１～図７において下記の意味で以下の記号を使用する。

－＊は、統計学的有意性がｐ＝０．０５であることを意味する。

－＊＊は、統計学的有意性がｐ＝０．０１であることを意味する。

－＊＊＊は、統計学的有意製がｐ＝０．００５であることを意味する。

－図８～図２６の統計学的有意性は＊によって表され、ｐ値は対応する表に見られる。

【図面の簡単な説明】

【００２７】

【図１】２つの配列、配列番号１０／配列番号４に対するＣｔ値の比を示す図である。ＣＲＣは大腸癌患者の糞便試料から得られた値を表し、Ｃは健康な患者から得られた対照値を表す。

【図２】２つの配列、配列番号７／配列番号４に対するＣｔ値の比を示す図である。ＣＲＣは大腸癌患者の糞便試料から得られた値を表し、Ｃは健康な患者から得られた対照値を表す。

【図３】２つの配列、配列番号４／配列番号１に対するＣｔ値の比を示す図である。ＣＲＣは大腸癌患者の糞便試料から得られた値を表し、Ｃは健康な患者から得られた対照値を表す。

【図４】配列番号４の配列に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。ＣＲＣは大腸癌患者の糞便試料から得られた値を表し、Ｃは健康な患者から得られた対照値を表す。

【図５】配列番号７の配列に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。ＣＲＣは大腸癌患者の糞便試料から得られた値を表し、Ｃは健康な患者から得られた対照値を表す。

【図６】２つの配列、配列番号４／配列番号１に対するＣｔ値の比を示す図である。ＣＲＣは癌大腸癌の糞便試料から得られた値を表し、高リスクは直近の大腸内視鏡検査でポリ

ープがあり、大腸癌を発症するリスクが増したリンチ症候群の個体から得られた値を表し、低リスクは直近の大腸内視鏡検査でポリープがなかったリンチ症候群の個体から得られた値を表す。
【図７】配列番号４の配列に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。ＣＲＣは癌大腸癌の糞便試料から得られた値を表し、高リスクは直近の大腸内視鏡検査でポリープがあり、大腸癌を発症するリスクが増したリンチ症候群の個体から得られた値を表し、低リスクは直近の大腸内視鏡検査でポリープがなかったリンチ症候群の個体から得られた値を表す。
【図８ａ】Ｂ３の増幅に対するプライマーの検証を示す増幅プロットである。
【図８ｂ】Ｂ３の増幅に対するプライマーの検証を示す解離曲線である。
【図９ａ】Ｂ１０の増幅に対するプライマーの検証を示す増幅プロットである。
【図９ｂ】Ｂ１０の増幅に対するプライマーの検証を示す解離曲線である。
【図１０ａ】Ｂ４１の増幅に対するプライマーの検証を示す増幅プロットである。
【図１０ｂ】Ｂ４１の増幅に対するプライマーの検証を示す解離曲線である。
【図１１ａ】Ｂ４６の増幅に対するプライマーの検証を示す増幅プロットである。
【図１１ｂ】Ｂ４６の増幅に対するプライマーの検証を示す解離曲線である。
【図１２ａ】Ｂ４８の増幅に対するプライマーの検証を示す増幅プロットである。
【図１２ｂ】Ｂ４８の増幅に対するプライマーの検証を示す解離曲線である。
【図１３ａ】Ｂ５０の増幅に対するプライマーの検証を示す増幅プロットである。
【図１３ｂ】Ｂ５０の増幅に対するプライマーの検証を示す解離曲線である。
【図１４】ＣＲＣ群及びＣ群におけるＢ３に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図１５】ＣＲＣ群及びＣ群におけるＢ４８に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図１６】ＣＲＣ群及びＣ群におけるＢ１０に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図１７】ＣＲＣ群及びＣ群におけるＢ４６に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図１８】ＣＲＣ群、Ｌ群、及びＣ群におけるＢ３に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図１９】ＣＲＣ群、Ｌ群、及びＣ群におけるＢ４８に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図２０】ＣＲＣ群、Ｌ群、及びＣ群におけるＢ１０に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図２１】ＣＲＣ群、Ｌ群及びＣ群におけるＢ４６に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図２２】ＣＲＣ＋Ｌ対ＣにおけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６、及びＢ４８に対する絶対Ｃｔ値を示す図である。
【図２３】ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群、及びＣ群における絶対Ｃｔ値のＢ４８／Ｂ１０比を示す図である。
【図２４】ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群、及びＣ群における絶対Ｃｔ値のＢ３／Ｂ１０比を示す図である。
【図２５】ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群、及びＣ群における絶対Ｃｔ値のＢ４６／Ｂ１０比を示す図である。
【図２６】ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群、及びＣ群における絶対Ｃｔ値のＢ３／Ｂ４８比を示す図である。
【図２７】健康対ＣＲＣ分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を示す図である。
【図２８】健康対リンチ分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を示す図である。
【図２９】健康対ＣＲＣ＋リンチ分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を示す図である。
【図３０】ＣＲＣ対リンチ分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００２８】
本発明では、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの診断、早期検出、リスクスクリーニング、及びモニタリングに関連する特定の細菌配列が同定された。
【００２９】

本発明の第１の態様は、ヒト被験体において大腸癌（ＣＲＣ）及び／又は腺腫性ポリープをスクリーニングする方法であって、
ｉ．前記被験体の糞便試料から、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的なｒＲＮＡ配列を定量することと、
ｉｉ．ヒト被験体においてＣＲＣ及び／又はポリープを診断、早期検出、再発の判定、発症リスクの判定若しくは予測をすること、又は前記ヒト被験体において大腸内視鏡検査を行うべきかどうかを判定すること、又は前記ヒト被験体がＣＲＣ及び／又はポリープを有すると診断される患者である場合の予後を判定すること、又は少なくとも１つの前記配列の定量レベルからＣＲＣ及び／又はポリープを有する患者における治療をガイドすることと、
を含む、方法に関する。

【００３０】

本出願では、配列番号１によって識別される配列は「Ｂ３」とも識別される。同様に、配列番号４は「Ｂ１０」とも識別され、配列番号７は「Ｂ４６」とも識別され、配列番号１０は「Ｂ４８」とも識別され、これらの名称は互換的に使用される。Ｂ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８は、本発明を想到するため行われた全ての実験の実施の間、その配列を識別するために本出願の発明者らによって使用された名称であった。配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０によって識別される配列は、以下のアクセッション番号ＧＱ４１１１１１．１（配列番号１）、ＧＱ４１１１１８．１（配列番号４）、ＧＱ４１１１５０．１（配列番号７）、ＧＱ４１１１５２．１（配列番号１０）によりＥＭＢＬ－ＥＢＩの公的配列データベースにおいて利用可能である。

【００３１】

Ｂ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８の配列は、非培養細菌単離物から予め単離された変性剤濃度勾配ゲル電気泳動（ＤＧＧＥ）ゲルバンドに対応する。対応する細菌種を同定する目的でＢＬＡＳＴ分析を行った。

【００３２】

Ｂ３　１６Ｓ　ｒＤＮＡに対するベストマッチＢＬＡＳＴ：コリンゼラ・アエロファシエンス（Collinsella aerofaciens）、
Ｂ１０　１６Ｓ　ｒＤＮＡに対するベストマッチＢＬＡＳＴ：フィーカリバクテリウム・プラウスニッツィイ（Faecalibacterium prausnitzii）、
Ｂ４６　１６Ｓ　ｒＤＮＡに対するベストマッチＢＬＡＳＴ：フィーカリバクテリウム・プラウスニッツィイ、サブドリグラヌルム・バリアビレ、
Ｂ４８　１６Ｓ　ｒＤＮＡに対するベストマッチＢＬＡＳＴ：ルミノコッカス（Ruminococcus）、ロゼブリア（Roseburia）、コプロコッカス（Coprococcus）。

【００３３】

本明細書で使用される「大腸癌」、「ＣＣＲ」又は「ＣＲＣ」の用語は、結腸又は直腸において始まる癌に対して使用される。また、これらの癌は、どこで始まるかによって結腸癌又は直腸癌と別々に指す場合がある。結腸癌及び直腸癌は多くの共通する特徴を持つ。

【００３４】

ＡＣＳによれば、幾つかの種類の癌が結腸又は直腸で開始し得る。９５％超の大腸癌は腺癌として知られる種類の癌である。これらの癌は、結腸及び直腸の内部を滑らかにするため粘液を作製する腺を形成する細胞において始まる。また、他のあまり一般的でない種類の腫瘍も結腸及び直腸において始まる場合がある。これらとして、カルチノイド腫瘍、消化管間葉系腫瘍（ＧＩＳＴ）、リンパ腫及び肉腫が挙げられる。

【００３５】

癌スクリーニングの目標は、進行した疾患の発症の減少により死亡率を減少することである。そのため、最新のＣＲＣスクリーニングは、初期ステージの腺癌の検出、並びに一般的に絶対的ではない前癌病変（nonobligate precursor lesion）とされる腺腫性ポリープの検出及び除去によってこの目標を達成することができる。

【００３６】
「腺腫性ポリープの」は、結腸等の臓器の内壁における異常な腺細胞の非癌性の増殖物（growth）である。例えば、結腸で増殖し得るこれらの種類の腺腫性ポリープは、管状腺腫、絨毛腺腫、及び管状絨毛腺腫である。腺腫性ポリープは５０歳超の成人に一般的であるが、大半のポリープは腺癌にはならず、組織像及び大きさが臨床上の重要性を決定づける。
【００３７】
ＡＣＳによれば、ポリープを見つけ、除去することで一部の人々を大腸癌にならないようにすることから、ポリープ及び癌の両方を見つける可能性が最も高い検査が好まれる。本発明の方法は、ＣＲＣ及び腺腫性ポリープをスクリーニングする方法であることが好ましい。
【００３８】
特定の実施形態では、本発明の方法は、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの診断又は検出に対する、好ましくはＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの早期検出に対するスクリーニング方法である。「早期検出」の表現は、臨床兆候が存在する前の検出を指す。「検出」及び「診断」の用語は、本出願において互換的に使用される。本発明の方法は、早期ステージの疾患診断により大腸癌を予防する強力な手段であることがわかる。
【００３９】
特定の実施形態では、本発明のスクリーニング方法を５０歳以上の被験体において行う。５０歳以上の平均的なリスクの男女は、大腸癌のスクリーニング検査に従うように勧められる（引用することにより本明細書の一部をなす、非特許文献２の表２を参照されたい）。
【００４０】
別の実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、リスクの増した及び／又は高リスクの被験体において行われる。具体的なガイドラインは、リスクの増した又は高リスクの患者に対する適用である。
【００４１】
ＡＣＳによれば（引用することにより本明細書の一部をなす、非特許文献２の表３を参照されたい）、リスクの増した及び高リスクの被験体として以下が挙げられる。
【００４２】
リスクの増した
－先の大腸内視鏡検査でポリープの病歴のある被験体
－大腸癌の被験体、及び、
－大腸癌又は腺腫性ポリープの家族歴のある被験体。
【００４３】
高リスク
－遺伝子検査によって家族性腺腫性ポリポーシス（ＦＡＰ）と診断された、又は遺伝子検査によらずＦＡＰと疑われる被験体、
－遺伝性非ポリポーシス直腸癌（hereditary non-polyposis colon cancer）（ＨＮＰＣＣ又はリンチ症候群）の、又は遺伝子検査によらず家族歴に基づいてＨＮＰＣＣのリスクが増した被験体、及び、
－慢性潰瘍性大腸炎及びクローン病等の炎症性腸疾患の被験体。
【００４４】
本発明の一つの目標は、予備診断の手段を提供することである。具体的には、本発明は、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープを発症する素因又はリスクを有する被験体を同定することによって臨床兆候がある前に大腸癌を診断する方法を提供する。
【００４５】
特定の実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、ヒト被験体におけるＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの発症リスクを判定する方法であって、
ｉ．上記被験体の糞便試料から配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的な１６Ｓ　ｒＲＮＡ配列を定量することと、

ｉｉ．少なくとも１つの上記配列の定量レベルからＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの発症リスクを判定することと、
を含む、方法である。
【００４６】
好ましい実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、リスクの増した及び／又は高リスクの被験体において、好ましくはリンチ症候群キャリアにおいてＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの発症リスクを判定する方法である。
【００４７】
「リンチ症候群」の用語は、ヒトの大腸癌、また子宮の内壁の癌（子宮内膜癌）、卵巣癌、及び幾つかの他の癌に対するリスクを大きく増大する遺伝性の病態である遺伝性非ポリポーシス大腸癌、すなわちＨＮＰＣＣを指す。この病態の人々は、しばしば最初に多くのポリープを有さずに若くして癌を発症する傾向がある。
【００４８】
本発明のスクリーニング方法は、実施例４において（表３及び表４）、ポリープを有するリンチ症候群患者（高リスク集団）とポリープを有しないリンチ症候群患者（低リスク集団）とを統計学的に有意に識別する能力を示した。配列番号４（Ｂ１０）の定量及び配列番号７（Ｂ４６）／配列番号４（Ｂ１０）の比の決定は、実施例４の結果によれば良好な指標となるようである。したがって、配列番号４（Ｂ１０）及び配列番号７（Ｂ４６）／配列番号４（Ｂ１０）の比は、ポリープの存在をスクリーニングする本発明の方法における使用のために好ましいバイオマーカーである。
【００４９】
先の大腸内視鏡検査でポリープの病歴のある、又は癌切除後の大腸癌の病歴のある被験体では、モニタリング又はサーベイランスの目的で、すなわちそのヒト被験体における癌及び／又は腺腫性ポリープの再発を検出するためスクリーニング検査を行う。
【００５０】
更に特定の実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、ポリープ及び／又は大腸癌の既往歴のあるヒト被験体において大腸癌（ＣＲＣ）及び／又は腺腫性ポリープの検出をモニタリングする方法であって、
ｉ．上記被験体の糞便試料から配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的な１６Ｓ　ｒＲＮＡ配列を定量することと、
ｉｉ．少なくとも１つの前記配列の定量レベルからＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの再発を判定することと、
を含む、方法である。
【００５１】
本発明のスクリーニング方法は、実施例８（表８）において、ＣＲＣの既往歴があり、直近の大腸内視鏡検査でポリープがあったリンチ患者（高リスク集団）と、ＣＲＣの既往歴がなく、直近の大腸内視鏡検査でポリープがなかったリンチ患者（低リスク集団）とを統計学的に有意に識別する能力を示した。配列番号１／配列番号４（Ｂ３／Ｂ１０）、配列番号４／配列番号７（Ｂ１０／Ｂ４６）、配列番号１／配列番号１０（Ｂ３／Ｂ４８）、及び配列番号１０／配列番号４（Ｂ４８／Ｂ１０）の比を定量することにより、特に優れた結果が得られる。
【００５２】
したがって、配列番号１／配列番号４（Ｂ３／Ｂ１０）、配列番号４／配列番号７（Ｂ１０／Ｂ４６）、配列番号１／配列番号１０（Ｂ３／Ｂ４８）、及び配列番号１０／配列番号４（Ｂ４８／Ｂ１０）の比は、好ましくはＣＲＣの病歴のあるリンチ患者等のリスクの増した又は高リスクの患者においてポリープの存在をスクリーニング／モニタリングする本発明の方法における使用に好ましいバイオマーカーである。
【００５３】
更に特定の実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、ヒト被験体において大腸内視

鏡検査を行うべきかどうかを判定する方法であって、
ｉ．上記被験体の糞便試料から配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的な１６Ｓ　ｒＲＮＡ配列を定量することと、
ｉｉ．少なくとも１つの上記配列の定量レベルから上記ヒト被験体において大腸内視鏡検査を行うべきかどうかを判定することと、
を含む、方法である。

【００５４】

当業者は、本発明の細菌マーカーの定量及び分析のための幾つかの方法及びデバイスを知っている。「定量する」の用語は、試料中の特定の核酸配列の量を定量する能力を指す。標的核酸配列の量を測定する分子生物学的方法が当該技術分野でよく知られている。これらの方法として、限定されないが、エンドポイントＰＣＲ、競合的ＰＣＲ、逆転写酵素－ＰＣＲ（ＲＴ-ＰＣＲ）、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）、逆転写酵素ｑＰＣＲ（ＲＴ-ｑＰＣＲ）、ＰＣＲ－ＥＬＩＳＡ、ＤＮＡマイクロアレイ、ドットブロット又は蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションアッセイ（ＦＩＳＨ）等のｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、分岐鎖ＤＮＡ（Nolte, Adv. Clin. Chem., 1998, 33:201-235）及び上記方法の複合バージョン（例えば、Andoh et al., Current Pharmaceutical Design, 2009;15, 2066-2073を参照されたい）が挙げられる。好ましいプライマー及び／又はプローブは、典型的には、細菌核酸配列の量の増加に対して直接的な線形応答を提供することによって、予測可能に反応する。適切な標準を作製すること及びそれに対して比較することによって、試料中の所与の核酸配列の量を容易に定量することができる。

【００５５】

上記核酸配列は、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列である。

【００５６】

或る一つの特に好ましい定量方法は、個々の細菌配列の直接的な定量のためプローブハイブリダイゼーションと蛍光顕微鏡検査、共焦点レーザー顕微鏡検査、又はフローサイトメトリーとを組み合せた、ＦＩＳＨである。ＦＩＳＨの方法論の総説については、例えばHarmsen et al., Appl Environ Microbiol, 2002;68 2982-2990、Kalliomaki et al., J Allerg Clin Immunol, 2001;107 129-134、Tkachuk et al., Genet. Anal. Tech. Appl., 1991;8: 67-74、Trask et al., Trends Genet., 1991;7 (5): 149-154、及びWeier et al., Expert Rev. Mol. Diagn., 2002, 2(2):109-119、並びに米国特許第６，１７４，６８１号を参照されたい。

【００５７】

別の特に好ましい定量方法は、リアルタイムＰＣＲとしても知られる定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）である。ＰＣＲのプロセスは当該技術分野でよく知られているため、本明細書において詳述しない。ｑ－ＰＣＲ技術の大要及びプロトコルは、ＳＹＢＲ　Ｇｒｅｅｎ　ｑＰＣＲアプリケーションについてSigma-Aldrich等の販売業者から入手可能であり、例えばhttp://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/sybr-green-qpcr.html、又はhttp://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/qpcr-technical-guide.htmlを参照されたい。細菌遺伝子マーカーの存在量及び発現を定量するためのｑＰＣＲ法の総説については、例えばSmith CJ and Osborn AM., FEMS Microbiol Ecol., 2009;67(1):6-20を参照されたい。

【００５８】

「定量レベル」の用語は、濃度（容量単位当たりのＤＮＡ量）、細胞数当たりのＤＮＡ量、サイクル閾値（Ｃｔ値）又はそれらの任意の数学的変換であってもよい。好ましい実施形態では、上記細菌配列の定量はｑＰＣＲによって行われる。より好ましい実施形態では、上記細菌配列の定量はｑＰＣＲによって行われ、定量レベルはＣｔ値である。Ｃｔ（サイクル閾値）値は蛍光シグナルがその閾値を超えるのに必要なｑＰＣＲサイクルの数として定義される。Ｃｔレベルは、試料中の標的核酸の量に反比例する（すなわち、Ｃｔレベ

ルが低くなると試料中の標的核酸の量が増大する）。
【００５９】
糞便試料中の標的核酸配列（例えば配列番号１）の存在量の定量は、絶対であっても相対であってもよい。相対定量は、ユニバーサルプライマーを使用し、真正細菌の割合（例えば、配列番号１／真正細菌の比）として標的核酸配列の存在量を表す総細菌（真正細菌）の特定等、１種又は複数種の内部参照遺伝子（すなわち参照株に由来する１６Ｓ　ｒＲＮＡ）に基づく。絶対定量は、ＤＮＡ鎖との比較によって標的分子の正確な数を与える。
【００６０】
特定の実施形態では、本発明の方法は、工程ｉ）の後に被験体の試料レベルを対照試料におけるレベルと比較することを更に含み、対照試料中の各配列（複数種の場合がある）のレベルからの配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される１種又は複数種の配列のレベルの偏差（好ましくは、統計学的に有意な偏差）が存在することがＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの指標である。例えば、定量レベルが中央（カットオフ）値プラス（＋）／マイナス（－）対照試料中で測定された各レベル（複数種の場合がある）の標準偏差からの偏差を呈することは、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの指標である。
【００６１】
好ましい実施形態では、上記被験体試料中の１種又は複数種の上記配列の濃度レベルが中央（カットオフ）値マイナス対照試料中で測定された各配列（複数種の場合がある）のレベルの標準偏差よりも低いことは、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの指標である。別の実施形態では、上記被験体試料中の１種又は複数種の上記配列のＣｔレベルが中央（カットオフ）値プラス対照試料中で測定された各配列（複数種の場合がある）のレベルの標準偏差よりも高いことは、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの指標である。
【００６２】
「対照試料」の用語は、参照集団の対照試料の収集物を指す場合があり、例えば、対照試料は、健康な被験体に由来する試料、腺腫性ポリープを有しない被験体に由来する試料、腺腫性ポリープ及び／又は大腸癌の既往歴のない被験体に由来する試料、並びにそれらの組合せであってもよい。
【００６３】
参照の上述の集団の１つにおけるヒト被験体の分類を大腸内視鏡検査による調査によって行う。例えば、「健康な被験体」は、先の大腸内視鏡検査で腺腫性ポリープ又は大腸癌のいずれも呈していない者である。
【００６４】
本発明の方法は、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される２つ、３つ又は４つの配列、好ましくは４つ全ての配列を定量することを含むことが好ましい。
【００６５】
一つの特定の実施形態では、本発明の方法は、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも２つの配列を定量し、少なくとも２つの該配列間の関係を判定することを含む。２つ、３つ又は４つの上記配列間の関係（例えば、比、多変量解析等）が判定されることが好ましい。
【００６６】
好ましい実施形態では、これらの少なくとも２つの配列間の比は、第１の配列の定量レベルを第２の配列の定量レベルで除することによって得られる。例えば、配列番号１０／配列番号４の配列の濃度の比は、配列番号１０の配列の濃度を配列番号４の配列の濃度で除することによって得られる。また、配列番号１０／配列番号４の比は、配列番号１０によって同定された配列のＣｔ値を配列番号４によって同定された配列のＣｔ値で除することによっても得ることができる。
【００６７】
本発明の方法の更なる実施形態では、少なくも２つの上記細菌配列を工程ｉ）で定量し、

被験体試料中の上記配列の少なくとも１つのレベルの比を特定し、上記被験体における少なくとも１つの上記比を対照試料中の各比（複数種の場合がある）と比較することを更に含み、上記対照試料中の比からの偏差（好ましくは統計学的に有意な偏差）がＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの指標である。例えば、１種又は複数種の上記比が中央（カットオフ）値プラス（＋）／マイナス（－）対照試料において測定された各比（複数種の場合がある）の標準偏差からの偏差を呈することは、ＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの指標である。

【００６８】

検査試料と対照試料との差を指す場合、「統計学的に有意」の用語は、適切な統計学的分析を使用する場合、群が同じである確率が５％未満、例えばｐ＜０．０５の条件に関する。換言すれば、完全に無作為ベースで同じ結果を得る確率が１００の試行のうち５未満である。当業者は、どのようにして適切な統計学的分析を選択するか知っている。典型的には、適切な統計学的分析は、例えばコルモゴロフ－スミノルフの検定を使用して研究の変数が正規分布をしているかどうかに基づいて決定される。正規分布がある場合では、好ましくは、ｔ検定又はＡＮＯＶＡ検定等のパラメトリックモデルを使用してもよく、正規分布がない場合であればマン－ホイットニーＵ検定又はクラスカル－ワリス検定等のノンパラメトリックモデルを使用してもよい。

【００６９】

特定の実施形態では、感度、特異度、精度、ＲＯＣ分析の結果又はそれらの組合せを使用して、本発明のスクリーニング方法を説明する。特に、該方法がどれくらい優れていて信頼性が高いかを定量するためにそれらを使用する。

【００７０】

感度、特異度及び精度の説明と共に一般的に使用される幾つかの用語が存在する。それらの用語は、真陽性（ＴＰ）、真陰性（ＴＮ）、偽陰性（ＦＮ）、及び偽陽性（ＦＰ）である。患者において疾患が存在すると証明され、所与のスクリーニング検査も疾患の存在を示す場合、該検査結果は真陽性である。同様に、患者において疾患が存在しないと証明され、該スクリーニング検査も疾患の不在を示唆する場合、該検査結果は真陰性（ＴＮ）である。真陽性及び真陰性はいずれもスクリーニング検査と証明された状態（真基準）との間で一貫する結果を示唆する。しかしながら、医学的検査は完全ではない。スクリーニング検査が、かかる疾患を実際に有しない患者において疾患の存在を示す場合、その検査結果は疑陽性（ＦＰ）である。同様に、スクリーニング検査の結果が確実に疾患を有する患者に対してその疾患が存在しないことを示唆する場合、該検査結果は偽陰性（ＦＮ）である。疑陽性及び偽陰性はいずれも検査結果が実際の状態と逆であることを示す。

【００７１】

感度、特異度及び精度をＴＰ、ＴＮ、ＦＮ及びＦＰの用語で説明する。

【００７２】

感度＝ＴＰ／（ＴＰ＋ＦＮ）＝（真陽性と判断される数）／（全ての陽性と判断される数）

【００７３】

特異度＝ＴＮ／（ＴＮ＋ＦＰ）＝（真陰性と判断される数）／（全ての陰性と判断される数）

【００７４】

精度＝（ＴＮ＋ＴＰ）／（ＴＮ＋ＴＰ＋ＦＮ＋ＦＰ）＝（正しい判断の数）／全ての判断の数

【００７５】

好ましい実施形態では、本発明のスクリーニング方法は、統計学的に有意に少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は好ましくは１００％の感度及び／又は特異度で、ヒト被験体においてＣＲＣ及び／又はポリープを診断、早期検出、再発の判定、発症リスクの判定、若しくは予測をするか、又は上記ヒト被験体において大腸内視鏡検査を行うべきかどうかを判定するか、又は上記ヒト被験体がＣＲＣ及び／又は

ポリープを有すると診断された場合の予後を判定するか、又はＣＲＣ及び／又はポリープを有する患者における治療をガイドする。

【００７６】

上の等式によって示唆されるように、本明細書で使用される「感度」の用語は、スクリーニング検査によって正しく同定される真陽性の割合を指す。「感度」の用語は、該検査がどれほど疾患の検出に優れているかを示す。感度（「ｓｅｎｓ」）は、０（０％）＜ｓｅｎｓ＜１（１００％）の範囲にあってもよく、理想的には、ゼロに等しい又はゼロに近い偽陰性の数及び１（１００％）又は１（１００％）に近い感度であってもよい。７０％～９０％、７５％～９５％、８０％～９５％、８５％～１００％、又は９０％～１００％の感度を有することが好ましい。本発明の方法は、少なくとも８５％、例えば約８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の感度値を有することがより好ましい。

【００７７】

本明細書で使用される「特異度」の用語は、スクリーニング検査によって正しく同定される真陰性の割合を指す。「特異度」の用語は、該検査がどれほど正常（陰性）の状態を同定するのに優れているかを示唆する。特異度（「ｓｐｅｃ」）は、０（０％）＜ｓｐｅｃ＜１（１００％）の範囲にあってもよく、理想的には、ゼロに等しい又はゼロに近い偽陽性の数及び１（１００％）又は１（１００％）に近い特異度であってもよい。７０％～９０％、７５％～９５％、８０％～９５％、８５％～１００％、又は９０％～１００％の特異度を有することが好ましい。本発明の方法は、少なくとも８５％、例えば約８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の特異度値を有することがより好ましい。

【００７８】

本明細書で言及される「精度」の用語は、或る集団における真陽性又は真陰性のいずれかの真結果の割合である。「精度」は、或る状態に対するスクリーニング検査の正確性の程度、すなわち、所与の状態の判定及び除外がどれほど正確であるかを測る。精度（「ａｃｃ」）は、０（０％）＜ａｃｃ＜１（１００％）の範囲にあってもよく、理想的には、ゼロに等しい又はゼロに近い偽陽性の数及び１（１００％）又は１（１００％）に近い精度であってもよい。本発明の方法の精度は、少なくとも６０％、少なくとも６５％、少なくとも７０％、少なくとも７５％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも９０％、少なくとも９５％、又は好ましくは１００％が好ましい。好ましい実施形態では、本発明の方法は、７０％～９０％、７５％～９５％、８０％～９５％、８５％～１００％、又は９０％～１００％の精度を有する。本発明の方法は、少なくとも８５％、例えば約８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％の精度値を有することが好ましい。

【００７９】

「ＲＯＣ曲線」は、感度及び特異度の両方の関係のグラフ表示であり、スクリーニング検査に対する最善の閾値（最適カットポイント）の決定により最適なモデルを決定することを補助する。ＲＯＣ曲線下面積（ＡＵＣ）は、スクリーニング検査の精度を測定するための方法を提供する。本発明の方法のＡＵＣの範囲の値は、好ましくは０．６～１、より好ましくは０．７～１であり、より好ましい値は０．８～１、より好ましくは０．９～１の範囲である。特定の実施形態では、ＡＵＣは０．６～０．８、例えば０．６～０．７５又は０．６５～０．７５である。

【００８０】

さらに、感度、特異度及び精度は割合であるため、それによる信頼区間は当該技術分野でよく知られている割合に関する標準的な方法を使用して計算することができる。割合について２種類の９５％信頼区間が一般的に定義される。正確な信頼区間は、正確な推定を達成するように二項分布を使用して定義される。試料分布を正規近似と仮定して漸近信頼区間を計算する。当業者は、どのようにして適切な信頼区間を定義するかを知っているであろう。１又は別の種類の信頼区間の選択は、典型的には、試料の割合が正規分布に対して

よく近似するかどうかに依存する。
【００８１】
本発明の方法の特定の実施形態では、上記細菌配列の定量に先立って、糞便試料からＤＮＡを抽出する。糞便試料からのＤＮＡ抽出方法が幾つか知られており、これらの方法はいずれも化学的若しくは機械的な破壊、洗浄剤を使用する溶解、又はこれらのアプローチの組合せによる（Kennedy A. et al., PLoS One, 2014;9(2):e88982）。糞便試料中の細菌ＤＮＡの抽出方法は、例えば、M Corist et al., Journal of Microbiological Methods, 2002; 50(2):131-139、Whitney D et al., Journal of Molecular Diagnostics, American Society for Investigative Pathology, 2004;6(4):386-395、及び国際公開第２００３／０６８７８８号により知られている。
【００８２】
方法は、高速ビーズビーティング抽出（high speed bead beating extraction）等の機械的な破壊、化学的溶解、及び好ましくは商業的に入手可能なＤＮＡ抽出キット、「ＭｏｂｉｏＰｏｗｅｒＳｏｉｌ（商標） ＤＮＡ ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ ｐｒｏｃｅｄｕｒｅ」（Mo-Bio Laboratories Inc.,）、土壌処理用ＦａｓｔＤＮＡ（商標） ＳＰＩＮ Ｋｉｔ（MP biomedicals）及びＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（商標） Ｓｏｉｌ（Macherey-Nagel Gmbh& Co. KG）に含まれるもの等のシリカ膜カラムを使用する最終精製工程の組合せを使用することが好ましい。ビリルビン、胆汁酸塩及び複合多糖等の糞便試料に由来するＤＮＡ抽出物中のＰＣＲ阻害物質の存在は、糞便からのＤＮＡ抽出物中のＤＮＡバイオマーカーの特定で直面する困難の１つである（Fleckna et al., Mol Cell Probes, 2007;21(4):282-7）。好ましいＤＮＡ抽出方法は、少量、例えば５％未満、好ましくは２％未満、より好ましくは１％未満、更に好ましくは０．５％未満、例えば０．２５％未満、０．１％未満、０．０５％未満又は０．０１％未満のＰＣＲ阻害物質を含む糞便抽出物を提供するものである。
【００８３】
特定の実施形態では、本発明の方法は、
（ａ）配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる群より選択される少なくとも１つの１６Ｓ ｒＤＮＡ細菌配列のレベルを前記ヒト糞便試料から定量的ＰＣＲによって特定することであって、配列番号１のレベルが配列番号２－配列番号１３に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用して特定され、配列番号４のレベルが配列番号５－配列番号６に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用して特定され、配列番号７のレベルが配列番号８－配列番号９に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用して特定され、配列番号１０のレベルが配列番号１１－配列番号１２に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用して特定されること、及び／又は、
（ｂ）工程ａ）に記載される配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる群より選択される少なくとも２つの１６Ｓ ｒＤＮＡ細菌配列のレベルを前記ヒト糞便試料から定量的ＰＣＲによって特定し、配列番号１０／配列番号４、配列番号７／配列番号４、配列番号４／配列番号１、配列番号７／配列番号１、配列番号７／配列番号１０、及び配列番号１０／配列番号１からなる群より選択される少なくとも１つの比を特定すること、
を含む。
【００８４】
一つの好ましい実施形態では、本発明のヒト糞便試料からＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープをスクリーニングする方法は、
（ａ）配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる群より選択される少なくとも１つの１６Ｓ ｒＤＮＡ細菌配列の濃度を上記ヒト糞便試料から定量的ＰＣＲによって特定することであって、配列番号１の濃度が配列番号２－配列番号１３に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用して特定され、配列番号４の濃度が配列番号５－配列番号６に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用

して特定され、配列番号７の濃度が配列番号８－配列番号９に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用して特定され、配列番号１０の濃度が配列番号１１－配列番号１２に関して少なくとも９０％の同一性を有するプライマーを使用して特定されることと、
（ｂ）任意に、工程ａ）に記載される配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる群より選択される少なくとも２つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列のレベルを前記ヒト糞便試料から定量的ＰＣＲによって特定するとともに、配列番号１０／配列番号４、配列番号７／配列番号４、配列番号４／配列番号１、配列番号７／配列番号１、配列番号７／配列番号１０、及び配列番号１０／配列番号１からなる群より選択される少なくとも１つの濃度の比を特定することと、
（ｃ）工程（ａ）の少なくとも１つの配列の濃度及び／又は工程（ｂ）で得られた少なくとも１つの比の値からＣＲＣ及び／又は腺腫性ポリープの診断、リスクの判定又は再発の判定をすることと、
を含む。
【００８５】
本発明の方法の別の実施形態では、配列番号２－配列番号１３に関して少なくとも９０％の同一性を有する上記プライマーは配列番号２－配列番号１３に関して少なくとも９５％の同一性を有するプライマーであり、配列番号５－配列番号６に関して少なくとも９０％の同一性を有する上記プライマーは配列番号５－配列番号６に関して少なくとも９５％の同一性を有するプライマーであり、配列番号８－配列番号９に関して少なくとも９０％の同一性を有する上記プライマーは配列番号８－配列番号９に関して少なくとも９５％の同一性を有するプライマーであり、配列番号１１－配列番号１２に関して少なくとも９０％の同一性を有する上記プライマーは配列番号１１－配列番号１２に関して少なくとも９５％の同一性を有するプライマーである。
【００８６】
特に好ましい実施形態では、配列番号２－配列番号１３に関して少なくとも９５％の同一性を有する上記プライマーは、配列番号２－配列番号１３によって識別されるプライマーであり、配列番号５－配列番号６に関して少なくとも９５％の同一性を有する上記プライマーは配列番号５－配列番号６によって識別されるプライマーであり、配列番号８－配列番号９に関して少なくとも９５％の同一性を有する上記プライマーは配列番号８－配列番号９によって識別されるプライマーであり、配列番号１１－配列番号１２に関して少なくとも９５％の同一性を有する上記プライマーは配列番号１１－配列番号１２によって識別されるプライマーである。
【００８７】
本出願では、問題の配列は、問題の配列の９５％の残基が特定される配列の残基と同一である場合、特定される配列に関して９５％同一性を有する。
【００８８】
好ましい実施形態では、本発明の方法は大腸癌の診断方法であり、大腸癌は工程（ｃ）で配列番号１のＣｔ値がカットオフＣｔ値３７．２を上回る場合、又は配列番号４のＣｔ値がカットオフＣｔ値１６．５６を上回る場合、又は配列番号７のＣｔ値がカットオフＣｔ値２２．９７を上回る場合、又は配列番号１０のＣｔ値がカットオフＣｔ値１９．２４を上回る場合、又は配列番号１０／配列番号４の比の値がカットオフ値１．１６を下回る場合、又は配列番号７／配列番号４の比の値がカットオフ値１．４０を下回る場合、又は配列番号４／配列番号１の比の値がカットオフ値０．４４を上回る場合、又は配列番号７／配列番号１の比の値がカットオフ値０．６２を上回る場合、又は配列番号１０／配列番号１の比の値がカットオフ値０．５２を上回る場合、又は配列番号１０／配列番号７の比の値がカットオフ値１．２を上回る場合に診断される。
【００８９】
別の好ましい実施形態では、本発明の方法は、大腸癌の発症リスクを診断する方法であり、大腸癌の発症リスクは、工程（ｃ）で配列番号１のＣｔ値がカットオフＣｔ値３６．４

５を上回る場合、又は配列番号４のＣｔ値がカットオフＣｔ値１４．０２を上回る場合、又は配列番号７のＣｔ値がカットオフＣｔ値２４．７６を上回る場合、又は配列番号１０のＣｔ値がカットオフＣｔ値２１．４２を上回る場合、又は配列番号１０／配列番号４の比の値がカットオフ値１．５６を下回る場合、又は配列番号７／配列番号４の比の値がカットオフ値１．７８を下回る場合、又は配列番号４／配列番号１の比の値がカットオフ値０．３８を上回る場合、又は配列番号７／配列番号１の比の値がカットオフ値０．６８を上回る場合、又は配列番号１０／配列番号の１の比の値がカットオフ値０．５９を上回る場合、又は配列番号１０／配列番号７の比の値がカットオフ値１．１６を上回る場合である。

【００９０】

別の実施形態では、本発明の方法は、ＣＲＣの指標として知られている１種又は複数種の分子バイオマーカーの検出及び／又は定量を更に含む。多重マーカーパネルを使用することが好ましい。該多重マーカーパネルは、１種又は複数種の以下の遺伝子：ＡＰＣ、Ｋ－ｒａｓ、ＢＲＡＦ、ｐ５３、ＮＲＡＳ、ＰＩＫ３ＣＡ、ＣＤＫ８、ＣＭＹＣ、ＣＣＮＥ１、ＣＴＮＮＢ１、ＮＥＵ（ＨＥＲ２）、ＭＹＢ、ＦＢＸＷ７、ＰＴＥＮ、ＳＭＡＤ４、ＳＭＡＤ２、ＳＭＡＤ３、ＴＧＦβｌｌＲ、ＴＣＦ７Ｌ２、ＡＣＶＲ２及びＢＡＸ（Fearon, E. R., Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis., 2011;6:479-507）に存在する点突然変異の特定を含んでもよい。測定され得る他の既知のＣＲＣマーカーは、ＣｐＧアイランドメチル化、便単位重量当たりのヒトＤＮＡの量、及び便単位重量当たりの総ＤＮＡの量である。

【００９１】

更なる実施形態では、本発明の方法は、コンピュータ可読媒体に判定結果を保存することを更に含む。本明細書で使用される「コンピュータ可読媒体」は、本発明の方法の判定結果を含み、保存し、通信し、伝搬し、又は輸送し得る任意の装置であってもよい。該媒体は、電子、磁気、光学、電磁気、赤外線、又は半導体のシステム（又は装置若しくはデバイス）、又は伝搬媒体であってもよい。

【００９２】

第２の態様では、本発明は、ヒト被験体においてＣＲＣ及び／又はポリープを診断、早期検出、再発の判定、発症リスクの判定若しくは予測をすること、又は前記ヒト被験体において大腸内視鏡検査を行うべきかどうかを判定すること、又は前記ヒト被験体がＣＲＣ及び／又はポリープを有すると診断される患者である場合に予後を判定すること、又はＣＲＣ及び／又はポリープを有する患者における治療をガイドすることのためのバイオマーカーとしての、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列、又はそれらの相補的なｒＲＮＡ配列の使用であって、前記細菌配列が前記ヒト被験体の糞便試料から定量される、使用に関する。

【００９３】

上記核酸配列は、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列であることが好ましい。

【００９４】

本明細書で使用される「バイオマーカー」の用語は、容易に測定可能な身体試料に典型的にみられる物質である、疾患のマーカーを指す。測定量は、ＣＲＣ及び／又はポリープの有無、又は将来のＣＲＣ及び／又はポリープの可能性等の潜在的な疾患の病態生理と相関し得る。それらの状態について治療を受けている患者では、測定量は治療に対する反応性にも相関する。

【００９５】

第３の態様では、本発明は、キットであって、

ａ．

ｉ．配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列、若しくはそれらの相補的なｒＲＮＡ配列と特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、又は、

ｉｉ．配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列を特異的に増幅することができる一対の核酸プライマー、
からなる群より選択される試薬と、
ｂ．本発明の方法に従ってヒト糞便試料から１種又は複数種の前記配列のレベルを定量するための指示書と、
を備える、キットに関する。
【００９６】
本明細書で使用される「プローブ」の用語は、標的核酸配列に対する所定の条件下で特異的及び優先的なハイブリダイゼーションを可能とする特異的なヌクレオチド配列を含有し、また任意に検出に対する又はアッセイ性能の増強に対する部分を含有する、長さ１０塩基対～２８５塩基対の合成の又は生物学的に産生された核酸を指す。統計学的に特異度を得るため、また安定なハイブリダイゼーション産物を形成するため、最低限１０のヌクレオチドが一般的に必要であり、一般的に、最大で２８５のヌクレオチドが、反応パラメーターがミスマッチ配列及び優先的なハイブリダイゼーションを特定するため容易に調整され得る長さの上限を表す。プローブは、任意に、或る特定のアッセイ条件下で正しい又は最適な機能に寄与する或る特定の構成成分を含有してもよい。例えば、ヌクレアーゼ分解に対する抵抗性を改善するため（例えば、エンドキャッピングにより）、検出リガンド（例えば、フルオレセイン）を保有するため、又は固体支持体への捕捉を促進するため（例えば、ポリデオキシアデノシン「テイル」）、プローブを修飾してもよい。
【００９７】
本明細書で使用される「プライマー」の用語は、ヌクレオチド配列を増幅するためポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）等の増幅方法で使用され得るオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、特定の標的配列、例えば、１つの特異的な１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列のポリヌクレオチド配列に基づいて設計される。
【００９８】
プライマー及びプローブの設計及び検証は当該技術分野でよく知られている。定量的リアルタイムＰＣＲ法については、例えばRodriguez A et al.（Methods Mol Biol., 2015, 1275:31-56）を参照されたい。
【００９９】
本明細書で使用される「特異的」は、アッセイ条件下で或るヌクレオチド配列が所定の標的配列にハイブリダイズし／所定の標的配列を増幅し、実質的に非標的配列にハイブリダイズしない／非標的配列を増幅しないことを意味し、一般的にストリンジェントな条件が使用される。
【０１００】
本明細書で使用される「ハイブリダイゼーション」は、所定の反応条件下で、核酸塩基が互いに対をなし得る明確なルールに従って、２つの部分的又は完全な核酸の相補鎖を逆平衡の様式で集合させて、特異的で安定な水素結合を有する二本鎖核酸を形成するプロセスを指す。
【０１０１】
「実質的なハイブリダイゼーション」は、観察されるハイブリダイゼーションの量が、その結果を観察する者が陽性対照及び陰性対照のハイブリダイゼーションデータに関してその結果を陽性とし得るような量となることを意味する。「バックグラウンドノイズ」とされるデータは実質的なハイブリダイゼーションではない。
【０１０２】
「ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件」は、およそ０．９モルのＮａＣｌの塩溶液中でおよそ３５℃～６５℃を意味する。また、ストリンジェンシーは、ハイブリダイゼーション溶液中に存在するイオン種の濃度及び種類、存在する変性剤の種類及び濃度、並びにハイブリダイゼーションの温度等の反応パラメーターによって左右され得る。一般的には、ハイブリダイゼーション条件がよりストリンジェントになると、安定なハイブ

リッドが形成される場合はより長いプローブが好ましい。通例、ハイブリダイゼーションが起こる条件のストリンジェンシーは、採用される好ましいプローブの特定の特性を規定する。

【０１０３】

上記核酸配列は、配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧から選択される１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列であることが好ましい。

【０１０４】

特定の実施形態では、上記キットをヒト被験体におけるＣＲＣ及び／又はポリープの診断、早期検出、再発の判定、発症リスクの判定、若しくは予測のため、又は上記ヒト被験体において大腸内視鏡検査を行うべきかどうかの判定のため、又はＣＲＣ及び／又はポリープと診断された患者の予後を判定するため、又はＣＲＣ及び／又はポリープを有する患者において治療をガイドするため使用する。好ましい実施形態では、上記キットは、ＤＮＡ抽出手段、ハイブリダイゼーション及び／又は増幅を行う手段、検出手段、及び／又は生体試料を収集及び／又は保持するための１種若しくは複数種の容器を更に備えてもよい。

【０１０５】

特定の実施形態では、本発明は、配列番号２－配列番号１３、配列番号５－配列番号６、配列番号８－配列番号９、及び配列番号１１－配列番号１２からなる群のプライマー対の群から選択される少なくとも一対のＰＣＲプライマーを含む、ヒト糞便試料から大腸癌を診断するキットに関する。

【０１０６】

第４の態様では、本発明は、配列番号２、配列番号１３、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群より選択される核酸配列、又はそれらの少なくとも９０％の同一性を有する、好ましくはそれらの９５％の同一性を有する、より好ましくは９６％、９７％、９８％、９９％、若しくは１００％の同一性を有する核酸配列に関する。配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０からなる一覧より選択される少なくとも１つの１６Ｓ　ｒＤＮＡ配列の定量のため、上記配列を増幅アッセイ（ｑＰＣＲ等）においてプライマーとして、又はハイブリダイゼーションアッセイにおいて核酸プローブとして使用することが好ましい。

【０１０７】

特定の実施形態では、上記核酸配列は、配列番号２－配列番号１３、配列番号５－配列番号６、配列番号８－配列番号９、及び配列番号１１－配列番号１２からなる群より選択される一対のＰＣＲプライマーである。別の特定の実施形態では、上記核酸配列は、核酸プローブとして配列番号２、配列番号１３、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群より選択される。

【０１０８】

第５の態様では、本発明は、本発明のスクリーニング方法における配列番号２、配列番号１３、配列番号５、配列番号６、配列番号８、配列番号９、配列番号１１、及び配列番号１２からなる群より選択される核酸配列、又はそれらと少なくとも９０％の同一性を有する核酸配列の使用に関し、ここで、配列番号２及び／又は配列番号１３を配列番号１の定量に使用し、配列番号５及び／又は配列番号６を配列番号４の定量に使用し、配列番号８及び／又は配列番号９を配列番号７の定量に使用し、配列番号１１及び／又は配列番号１２を配列番号１０の定量に使用する。

【０１０９】

実施例に記載される特定の実施形態は解説として示されるのであって、本発明の限定として示されるものではないことが理解される。本発明の主な特徴は、本発明の範囲から逸脱することなく様々な実施形態において採用され得る。当業者は、通常の程度の実験を使用して、本明細書に記載される具体的な手順に対する数多くの等価物を認識するか、又は確認することができる。かかる等価物は、本発明の範囲に含まれるとされ、特許請求の範囲によって包含される。

【０１１０】

本明細書において言及された全ての出版物及び特許出願は、本発明が属する技術分野の当業者の技術レベルの指標である。全ての出版物及び特許出願は、個々の出版物又は特許出願が各々具体的かつ個別に引用することにより本明細書の一部をなすことが示されるのと同じ程度に引用することにより本明細書の一部をなす。

【０１１１】

「a」又は「an」の文言の使用は「１つ（one）」を意味し得るが、「１又は複数」、「少なくとも１つ」、及び「１以上」の意味とも矛盾しない。

【０１１２】

本出願を通して、「約」の用語は、その値の指示値±５％、好ましくはその値の指示値±２％を意味し、最も好ましくは用語「約」は指示値ちょうど（±０％）を意味する。

【実施例】

【０１１３】

実施例１．－材料及び方法

１．生体試料

大腸癌（ＣＲＣ）（０相～Ｉ相）と最近診断された患者２７名、リンチ症候群キャリア（Ｌ）の患者２４名、及び健康な個体（Ｃ）１９名から糞便試料を得た。全ての患者は試料収集の少なくとも１５日前に大腸内視鏡検査を行った。

【０１１４】

彼らは全員対応するインフォームドコンセントに署名した。除外基準は、研究前の１カ月以内の抗生物質による治療及び年齢１８歳未満を含んだ。

【０１１５】

２．１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列

Ｂ３、Ｂ１０、Ｂ４１、Ｂ４６、Ｂ４８及びＢ５０の配列は、無培養の細菌単離物から予め単離された変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（ＤＧＧＥ）のゲルバンドに対応する。

－ＧＱ４１１１１１．１でＥＭＢＬ－ＥＢＩ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ａｒｃｈｉｖｅ（ＥＮＡ）データベースにおいて公開された１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列　配列番号１（Ｂ３）、

－ＧＱ４１１１１８．１でＥＭＢＬ－ＥＢＩ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ａｒｃｈｉｖｅ（ＥＮＡ）データベースにおいて公開された１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列　配列番号４（Ｂ１０）、

－ＧＱ４１１１５０．１でＥＭＢＬ－ＥＢＩ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ａｒｃｈｉｖｅ（ＥＮＡ）データベースにおいて公開された１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列　配列番号７（Ｂ４６）、

－ＧＱ４１１１５２．１でＥＭＢＬ－ＥＢＩ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ａｒｃｈｉｖｅ（ＥＮＡ）データベースにおいて公開された１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列　配列番号１０（Ｂ４８）、

－ＧＱ４１１１４５．１でＥＭＢＬ－ＥＢＩ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ａｒｃｈｉｖｅ（ＥＮＡ）データベースにおいて公開された１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列Ｂ４１、及び、

－ＧＱ４１１１５４．１でＥＭＢＬ－ＥＢＩ　Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ　Ａｒｃｈｉｖｅ（ＥＮＡ）データベースにおいて公開された１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列Ｂ５０。

【０１１６】

３．試料収集、保護、及び保存

２４時間からの糞便試料を糞便容器に収集し、ＩＳＯ　９００１の条件下にて－２０℃で１カ月保存し、－８０℃の冷凍庫に移した。

【０１１７】

４．試料の加工及びＤＮＡ抽出

糞便１６ｓ－ＤＮＡ抽出ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ（商標）Ｓｏｉｌ（Macherey-Nagel）を使用した。バイオクラスＩＩ安全条件のもと、２００ｍｇ～５００ｍｇの糞便試料をＮｕ

ｃｌｅｏｓｐｉｎビーズチューブに入れた。７００μｌのＳＬ１及び１５０μｌのＥｎｈａｎｃｅｒ　ＳＸをビーズチューブに添加した。

【０１１８】

５．その後、製造業者による指示書に従ってＤＮＡを抽出し、精製し、５０ＵＩの溶離バッファー又は１０ｍＭのＴｒｉｓ　ＨＣｌ　ｐＨ＝７．４で溶離した。

【０１１９】

６．ＤＮＡ濃度の計算

Ｑｕａｎｔ－ＩＴ　ｄｓＤＮＡ　Ｂｒｏａｄ－Ｒａｎｇｅ　Ａｓｓａｙ　Ｋｉｔを使用して、キュービット（Ｑｕｂｉｔ）（登録商標）　２．０　Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｅｒカタログ番号Ｑ３２８６６による蛍光定量的分析によって上記抽出物のＤＮＡ濃度を特定した。この方法は、ＲＮＡに関してｄｓＤＮＡに高選択性であり、２ｎｇ～１０００ｎｇの範囲内で正確な定量を与える。この範囲内で蛍光はＤＮＡ濃度と線形に関連する。上記抽出物５ｕｌに対してＤＮＡ測定を行った。

【０１２０】

７．糞便試料から抽出したＤＮＡの定量的リアルタイムＰＣＲ（ｑＰＣＲ）

糞便試料に由来するＤＮＡを定量的リアルタイムＰＣＲによって分析した。特に、本発明者らは、１つの試料当たり４つの細菌集団、すなわちＢ３、Ｂ１０、Ｂ４８及びＢ４６の量を判断した。蛍光ｄｓＤＮＡ染色により定量的リアルタイムＰＣＲを使用して細菌配列を定量した。この作業において、本発明者らはPromega（米国マディソン）製のｐｒｅ－ｍｉｘ　ＢＲＹＴ（商標）使用した。Furet.et al.（FEMS Microbiol Ecol., 2009;68(3):351-62）によって記載される手順に従って真正細菌を増幅した。

【０１２１】

各試料について細菌の存在量を総ＤＮＡ濃度に対して正規化したＣｔとして表した。

【０１２２】

Ｃｔ（サイクル閾値）を、蛍光シグナルが閾値を超えるのに必要なｑ－ＰＣＲサイクル数として定義する。Ｃｔレベルは、試料中の標的核酸濃度の対数に反比例する（すなわち、Ｃｔレベルが低くなると試料中の標的核酸の量が増大する）。リアルタイムアッセイは４０サイクルの増幅を経る。

【０１２３】

８．統計学的分析の方法

データの統計学的な正規分布をコルモゴロフ－スミノルフの検定により分析した。データの統計学的正規分布が存在するか否かに応じて、以下の群を比較するための適切な統計的検定を使用した。

【０１２４】

分析した群は、ＣＲＣ対健康、ＣＲＣ対リンチ対健康、ＣＲＣ＋リンチ対健康、及びＣＲＣ対リンチ－高リスク対リンチ－低リスク対健康であった。

これらの群について、分析した変数は、

－Ｃｔで表される４つの細菌配列の定量、

－４つの細菌の定量の比、

－重量、及び、

－ＤＮＡ濃度、

であった。

【０１２５】

バイナリ回帰及びＲＯＣ分析を使用して、健康とＣＲＣ条件とリスク（一群で（in outfit）及び２つのリスク条件に分離される）との間の細菌配列（複数種の場合がある）定量の相関、並びに検査の感度及び特異度を判定した。

【０１２６】

ＤＮＡ及び重量において群間の差は観察されなかった。真正細菌（Ｅｕｂ）の量はリンチとＣＲＣ＋リンチと健康なドナー（Ｃ）との間で異なることがわかったが、疾患の状態がより少ない数のＤＮＡコピーを有する細菌を含む、系統発生コア（phylogenetic core）

の変化を暗示することから、これは正常とされた。このことは総細菌の減少を暗示するものではない（例えば、Sobhani et al., PLoS One, 2011,27;6(1):e16393を参照されたい）。この理由で、Ｅｕｂ定量を正規化目的の内部参照として使用しなかった。

【０１２７】

実施例２．プライマー設計及び確認

生検における細菌マーカーＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６、Ｂ４８、Ｂ４１及びＢ５０の定量に対するプライマーを、バイオインフォマティックツールであるEuropean Bioinformatics Institute （www.ebi.ac.uk）製のＣｌｕｓｔａｌ Ｘ、Ｎｅｔｐｒｉｍｅｒ（Premier Biosoft）及びＰｒｉｍｅｒＥｘｐｒｅｓｓ（Life Tecnologies-Thermo Fischer）を使用して系統発生学的な群から予め得られた配列との比較分析より設計した。

【０１２８】

選択された検出システムはＳｙｂｒＧｒｅｅｎ（商標）であった。近い群に関して３カ所未満の相違を有するプライマーのセットを廃棄した。予測されるものと異なる解離曲線のＴｍ値を有するプライマーのセットも廃棄した。プライマーの検証を生検試料及び糞便試料において行った。プライマーの性能を分析するため解離曲線を決定した。

【０１２９】

図８ａ～図１３ｂは、それぞれ、Ｂ３、Ｂ１０、Ｂ４６、Ｂ４８、Ｂ４１及びＢ５０の増幅に対する設計されたプライマーの検証のための増幅プロット及び解離曲線を示す。適切な解離曲線（各プライマーセットに対して単一ピーク）を示すプライマーを、糞便試料中の１６Ｓ　ｒＤＮＡの細菌定量に対して選択した。特に、Ｂ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８を増幅するプライマーを選択し、これらは下記表９に明示される。特異度がない（融解曲線において各プライマーセットに対して複数のピーク）ためＢ５１及びＢ４０を処分した。

【０１３０】

【表１】

B3 フォワード（配列番号 2）	GGAGGCCTTCGGGTCGTAA
B3 リバース（配列番号 13）	AGGTTCCGGGGGCTTCGG
B10 フォワード（配列番号 5）	CAACAAGGTAAGTGACGGC
B10 リバース（配列番号 6）	CGCCTACCTGTGCACTACTC
B46 フォワード（配列番号 8）	TCCACGTAAGTCACAAGCG
B46 リバース（配列番号 9）	CGCCTACCTGTGCACTACTC
B48 フォワード（配列番号 11）	GTACGGGGAGCAGCAGTG
B48 リバース（配列番号 12）	GACACTCTAGATGCACAGTTTCC

表９．糞便試料中の１６Ｓ　ｒＤＮＡ細菌配列Ｂ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８のｑＰＣＲ増幅のために選択されたプライマー対

【０１３１】

実施例３：大腸癌患者対健康な被験体における１６Ｓ　ｒＤＮＡバイオマーカー分析

対照７名及び大腸癌患者９名の合計１６の糞便試料を分析した。分析した糞便試料中の実施例１で引用される各細菌マーカー定量をＣｔ値で表す。Ｃｔ（サイクル閾値）を、蛍光シグナルが閾値を超えるのに必要なｑ－ＰＣＲサイクルの数として定義する。Ｃｔレベルは、試料中の標的核酸濃度の対数に反比例する（すなわち、Ｃｔレベルが低くなるほど、試料中の標的核酸の量が増大する）。リアルタイムアッセイは、４０サイクルの増幅を経る。得られた結果を下記表１及び表２に示す。表１はＣｔ絶対値を表し、表２はＣｔ比を表す。２標本ｔ検定を適用した。

【０１３２】

【表２】

表１．Ｃｔ絶対値

ID	群	状態	B48	B46	B10	B3
F10	CRC	1	18.59	22.78	16.33	33.64
F11	CRC	1	20.33	26.45	20.37	41.57
F3	CRC	1	23.52	26.2	19.8	38.45
F4	CRC	1	16.41	20.87	14.88	
F5	CRC	1	19.04	24	17.61	35.68
F6	CRC	1	23.22	27.67	21.82	
F16	CRC	1		20.75	14.35	
F7	CRC	1	23.19	28.2	22.34	
F8	CRC	1	18.82	22.04	15.61	
F12	C	0	17.55	20.9	14.95	
F13	C	0	19.36	24.78	19.22	
F14	C	0	19.46	21.44	15.07	37.34
F15	C	0	17.55	19.85	12.84	36.98
F9	C	0	17.61	21.8	15.41	35.66
F1	C	0	18.09	21.97	14.79	38.3
F2	C	0	17.07	20.57	12.76	
平均		CRC	20.39	24.329	18.12	37.34
		C	18.099	21.616	15.01	37.07
標準偏差		CRC	2.65	2.89	3.04	3.44
		C	0.94	1.58	2.15	1.09
Ｐ値		CRC 対 C	0.025	0.021	0.019	0.444
中点値（カットオフ値）			19.244	22.972	16.56	37.2
感度％			66.67	83.33	83.33	50
特異度％			55.56	60	60	50
精度＊			60	68.75	68.75	50

＊精度は（ＴＮ＋ＴＰ）／（ＴＮ＋ＴＰ＋ＦＮ＋ＦＰ）として特定される。

【０１３３】

【表３】

表２．Ｃｔ比

ID	群	状態	B48/B10	B10/B3	B46/B10	B46/B48	B46/B3	B48/B3
F10	CRC	1	1.14	0.49	1.39	1.23	0.68	0.55
F11	CRC	1	1	0.49	1.3	1.3	0.64	0.49
F3	CRC	1	1.19	0.51	1.32	1.11	0.68	0.61
F4	CRC	1	1.1		1.4	1.27		
F5	CRC	1	1.08	0.49	1.36	1.26	0.67	0.53
F6	CRC	1	1.06		1.27	1.19		
F16	CRC	1			1.45			
F7	CRC	1	1.04		1.26	1.22		
F8	CRC	1	1.21		1.41	1.17		
F12	C	0	1.17		1.4	1.19		
F13	C	0	1.01		1.29	1.28		
F14	C	0	1.29	0.4	1.42	1.1	0.57	0.52
F15	C	0	1.37	0.35	1.55	1.13	0.54	0.47
F9	C	0	1.14	0.43	1.41	1.24	0.61	0.49
F1	C	0	1.22	0.39	1.49	1.21	0.57	0.47
F2	C	0	1.34		1.61	1.21		
平均		CRC	1.1	0.5	1.35	1.22	0.67	0.55
		C	1.22	0.39	1.45	1.19	0.57	0.49
標準偏差		CRC	0.07	0.01	0.07	0.06	0.02	0.05
		C	0.13	0.04	0.11	0.06	0.03	0.02
Ｐ値		CRC対C	0.02	0.001	0.018	0.224	0.001	0.045
中点値（カットオフ値）			1.16123	0.4441	1.40243	1.20669	0.62	0.52
感度％			75	100	77.78	55.56	100.00	75.00
特異度％			71.43	100	71.43	42.86	100.00	75.00
精度＊			73.33	100	75	50	100.00	75.00

＊精度は（ＴＮ＋ＴＰ）／（ＴＮ＋ＴＰ＋ＦＮ＋ＦＰ）として特定される。

【０１３４】

大腸癌の診断の感度及び特異度は、配列番号１０／配列番号４の比に対して７５％及び７１％であり、配列番号７／配列番号４の比に対してそれぞれ７７％及び７１％であり、配列番号４／配列番号１の比に対してそれぞれ１００％及び１００％であり、配列番号７／配列番号１の比に対してそれぞれ１００％及び１００％であり、配列番号１０／配列番号１の比に対してそれぞれ７５％及び７５％である。

【０１３５】

図１、図２及び図３は、Ｃｔ値の比（配列番号１０／配列番号４、配列番号７／配列番号４、及び配列番号４／配列番号１）のグラフ表示である。

【０１３６】

図４及び図５はＣｔ絶対値（配列番号４、配列番号７）のグラフ表示である。

【０１３７】

実施例４．リンチ症候群患者における１６Ｓ　ｒＤＮＡバイオマーカー分析、ＣＲＣ対高リスク（ポリープあり）対低リスク（ポリープなし）

この分析の目的は、臨床兆候の前に大腸癌のリスクを検出するためのバイオマーカー予測値を決定することである。

【０１３８】

リンチ症候群の（大腸癌発症の遺伝的リスクの増した）合計８名の個体を分析した。全ての個体は、糞便試料の収集前、最大１年の期間で大腸内視鏡検査を受けた。内視鏡による調査によれば、上記個体のうち４名が悪性のポリープを有し（高リスクと名付けた）、４名がポリープを有しなかった（低リスクと名付けた）。

【０１３９】

分析したヒト糞便試料中の実施例１において引用された各細菌マーカーの定量を、実施例２に記載されるプライマーを使用して特定し、Ｃｔ値で定量した。

【０１４０】

得られた結果を下記表３及び表４に示す。表３は、Ｃｔ絶対値を表し、表４はＣｔ比を表す。２標本ｔ検定を適用した。

【０１４１】

【表４】

表３．Ｃｔ絶対値

ID	群	状態	B48	B46	B10	B3
F10	CRC	1	18.59	22.78	16.33	33.64
F11	CRC	1	20.33	26.45	20.37	41.57
F3	CRC	1	23.52	26.20	19.80	38.45
F4	CRC	1	16.41	20.87	14.88	
F5	CRC	1	19.04	24.00	17.61	35.68
F6	CRC	1	23.22	27.67	21.82	
F16	CRC	1		20.75	14.35	
F7	CRC	1	23.19	28.20	22.34	
F8	CRC	1	18.82	22.04	15.61	
MIL1	高リスク	2	22.58	25.87	14.56	35.56
MIL2	高リスク	2	24.53	25.79	14.73	37.06
MIL5	高リスク	2	22.56	24.57	14.16	38.44
MIL4	高リスク	2	20.00	29.90	18.41	37.99
MIL6	低リスク	3	20.15	24.90	15.20	37.58
MIL3	低リスク	3	18.11	20.45	10.34	31.16
MIL7	低リスク	3	22.81	24.70	13.35	41.40
MIL8	低リスク	3	20.60	21.88	11.38	32.42
平均		CRC	20.39	24.33	18.12	37.34
		高リスク	22.42	26.53	15.46	37.26
		低リスク	20.42	22.98	12.57	35.64
標準偏差		CRC	2.65	2.89	3.04	3.44
		高リスク	1.86	2.32	1.98	1.27
		低リスク	1.93	2.18	2.15	4.74
Ｐ値		CRC 対高リスク	0.10	0.10	0.070	0.48
		CRC 対低リスク	0.49	0.21	0.004	0.29
		高リスク対低リスク	0.09	0.03	0.047	0.27
中点値（カットオフ値）高リスク対低リスク			21.42	24.76	14.02	36.45
感度％高リスク対低リスク			75.00	75.00	80.00	60.00
特異度％高リスク対低リスク			75.00	75.00	100.00	66.67
精度高リスク対低リスク			75.00	75.00	87.50	62.50

【０１４２】

【表５】

表４．Ｃｔ比

ID	群	状態	B48/B1	B10/B3	B46/B10	B46/B48	B46/B3	B48/B3
F10	CRC	1	1.14	0.49	1.39	1.23	0.68	0.55
F11	CRC	1	1.00	0.49	1.30	1.30	0.64	0.49
F3	CRC	1	1.19	0.51	1.32	1.11	0.68	0.61
F4	CRC	1	1.10		1.40	1.27		
F5	CRC	1	1.08	0.49	1.36	1.26	0.67	0.53
F6	CRC	1	1.06		1.27	1.19		
F16	CRC	1			1.45			
F7	CRC	1	1.04		1.26	1.22		
F8	CRC	1	1.21		1.41	1.17		
MIL1	高リスク	2	1.55	0.41	1.78	1.15	0.73	0.63
MIL2	高リスク	2	1.67	0.40	1.75	1.05	0.70	0.66
MIL5	高リスク	2	1.59	0.37	1.74	1.09	0.64	0.59
MIL4	高リスク	2	1.09	0.48	1.62	1.49	0.79	0.53
MIL6	低リスク	3	1.33	0.40	1.64	1.24	0.66	0.54
MIL3	低リスク	3	1.75	0.33	1.98	1.13	0.66	0.58
MIL7	低リスク	3	1.71	0.32	1.85	1.08	0.60	0.55
MIL8	低リスク	3	1.81	0.35	1.92	1.06	0.67	0.64
平均		CRC	1.10	0.50	1.35	1.22	0.67	0.55
		高リスク	1.47	0.41	1.72	1.20	0.71	0.60
		低リスク	1.65	0.35	1.85	1.13	0.65	0.58
標準偏差		CRC	0.07	0.01	0.07	0.06	0.02	0.05
		高リスク	0.26	0.05	0.07	0.20	0.06	0.06
		低リスク	0.22	0.04	0.15	0.08	0.03	0.04
P値		CRC 対高リスク	0.001491	0.009755	0.000001	0.38	0.11	0.10
		CRC 対低リスク	0.000029	0.000159	0.000002	0.02	0.19	0.21
		高リスク低リスク	0.172991	0.044382	0.087799	0.28	0.06	0.25
中点値（カットオフ値）高リスク対低リスク			1.56	0.38	1.78	1.16	0.68	0.59
感度％高リスク対低リスク			66.67	75.00	80.00	50.00	75.00	75.00
特異度％高リスク対低リスク			60.00	75.00	100.00	50.00	75.00	75.00
精度高リスク対低リスク			62.50	75.00	87.50	50.00	75.00	75.00

【０１４３】

細菌学的な比のマーカーは、大腸癌の発症に対して高リスクの個体の群（リンチ症候群及びポリープを有する患者）を識別することができた。大腸癌高リスク集団の検出における感度及び特異度は、配列番号４に対して８０％及び１００％、配列番号４／配列番号１の比に対してそれぞれ７５％及び７５％、配列番号７／配列番号４の比に対してそれぞれ８０％及び１００％、配列番号７／配列番号１の比に対してそれぞれ７５％及び７５％、配列番号１０／配列番号１に対してそれぞれ７５％及び７５％であった。

【０１４４】

図６は、Ｃｔ値の比（配列番号４／配列番号１）のグラフ表示であり、図７はＣｔ絶対値（配列番号４）のグラフ表示である。

【０１４５】

実施例５：大腸癌患者対健康な被験体における１６Ｓ　ｒＤＮＡバイオマーカー分析

大腸癌（ＣＲＣ）（０相～Ｉ相）と最近診断された患者２７名、及び健康な個体（Ｃ）から糞便試料を得た。全ての患者は試料収集の少なくとも１５日前に大腸内視鏡検査を受けた。

【０１４６】

彼らは全員、対応するインフォームドコンセントに署名した。除外基準は、本研究前１カ

月以内の抗生物質による治療、及び年齢１８歳未満を含んだ。
【０１４７】
表５では（下記を参照されたい）、４つの細菌配列の定量が、ＣＲＣ患者の糞便において著しいＣｔの増加を呈したことを示す。この事実は、この群において上記４つの細菌の負荷がより低いことを意味する。
【０１４８】
これら４つの細菌の著しい負荷の減少は、ＣＲＣ患者をスクリーニングするための強力な手段である可能性がある。本発明者らが別々に該細菌マーカーの成績を分析すると、最良の結果は特異度９４％及び感度４８％及び精度０．７でＣＲＣ患者を同定したＢ３、２番目に特異度８４％及び感度６１．５％及び精度０．６９８でＢ４６によって得られたことがわかる。
【０１４９】
Ｂ４８及びＢ１０もまた、精度は０．６９を示すが、それぞれ特異度１００％及び感度３６％、特異度５７％及び感度８９．５％を示す。
【０１５０】
細菌配列定量のＣｔ間の比を計算した。統計学的な差は観察されないが、本発明者らは、増加した試料においてこの比を適用することは、ＣＲＣのスクリーニングを完了するための有用なアルゴリズムである可能性があると考える。この系統では、４つの配列の組合せも上記検査の感度及び特異度を増すと考えなくてはならない。
【０１５１】

【表６】

表５．健康な個体及びＣＲＣ患者における４つの細菌配列の定量（Ｃｔで表す）、２標本ｔ検定による統計学的分析及びＲＯＣ分析。

ID	群	状態	B3	B48	B10	B46
4	CRC	1	29.86	20.84	14.18	21.34
5	CRC	1	24.3	15.88	10.34	17.53
6	CRC	1	27.33	20.66	15.77	23.13
7	CRC	1	24.88	19.06	13.64	20.69
8	CRC	1	20.61	17.78	12.92	19.7
11	CRC	1	27.28	25.69	17.05	24.35
12	CRC	1	29.04	22.58	16.49	23.17
13	CRC	1	21.98	17.52	10.97	17.34
14	CRC	1	27.07	19.94	13.52	19.9
15	CRC	1	28.57	26.60	19.77	27.53
24	CRC	1	26.77	22.64	17.84	23.83
25	CRC	1	21.64	17.01	11.54	18.7
27	CRC	1	26.52	20.97	15.49	22.63
31	CRC	1	29.91	18.92	16.44	23.8
35	CRC	1	23.37	18.81	12.24	18.77
36	CRC	1	22.87	17.28	12.74	19.76
38	CRC	1		16.36	24.43	30.7
F10	CRC	1	20.49	18.59	16.33	22.78
F16	CRC	1	18.24		14.35	20.75
F11	CRC	1	29.19	20.33	20.37	26.45
F3	CRC	1	32.48	23.52	19.80	26.20
F4	CRC	1	21.76	16.41	14.88	20.87
F5	CRC	1	20.56	19.04	17.61	24.00
F6	CRC	1	31.6	23.22	21.82	27.67
F7	CRC	1	27.14	23.19	22.34	28.20
F8	CRC	1	22.37	18.82	15.61	22.04
43	CRC	1	30.9	22.46	17.12	25.57
16	C	0	22.97	20.21	15.54	23.12
17	C	0	20.4	15.84	10.71	17.54
18	C	0	22.05	15.72	12.06	17.67
23	C	0	21.79	17.16	12.59	18.89
28	C	0	20	18.86	15.29	21.33
30	C	0	26.61	20.47	12.78	20.26
32	C	0	22.76	15.07	15.95	23.09
33	C	0	23.66	18.30	13.54	19.57
34	C	0	22.01	17.73	14.29	19.07
37	C	0	24.06	19.60	14.47	19.65
F1	C	0	24.71	18.09	14.79	21.97
F12	C	0	20.79	17.55	14.95	20.90
F13	C	0	25.1	19.36	19.22	24.78
F14	C	0	21.63	19.46	15.07	21.44
F2	C	0	20.42	17.07	12.76	20.57
F15	C	0	19.69	17.55	12.84	19.85
F9	C	0	23.29	17.61	15.41	21.80
39	C	0		18.03	11.95	18.97
平均		CRC	25.64346154	20.15846154	16.13222222	22.86666667
		C	22.46705882	17.98222222	14.12111111	20.58166667
標準偏差		CRC	3.96679613	2.887129637	3.575465632	3.448853767
		C	1.948072011	1.514799756	1.957886432	1.927739456
P値（２標本ｔ検定）		CRC 対 C	0.038	0.019	0.049	0.021
CRC 対 C		中点値	26.69	20.90	15.75	22.0
		AUC	0.70	0.69	0.69	0.698
		感度	48%	36%	57%	61.5%
		特異度	94%	100%	89.5%	84%

【０１５２】

図１４～図１７は、ＣＲＣ群及び健康（Ｃ）群におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対する絶対Ｃｔ値のグラフ表示をそれぞれ提供する。

【０１５３】

図２７は、健康対ＣＲＣ分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を提供する。

【０１５４】

実施例６：１６Ｓ　ｒＤＮＡバイオマーカー分析　ＣＲＣ対リンチ（臨床兆候なし）対健康な個体

この分析の目的は、臨床兆候の前に大腸癌リスクを検出するためのバイオマーカーの予測値を決定することである。

【０１５５】

大腸癌（ＣＲＣ）（０相～Ｉ相）と最近診断された患者２７名、リンチ症候群キャリア（Ｌ）２４名、及び健康な個体（Ｃ）１９名から糞便試料を得た。全ての患者は試料収集の少なくとも１５日前に大腸内視鏡検査を受けた。

【０１５６】

彼らは全員対応するインフォームドコンセントに署名した。除外基準は、本研究の前１カ月以内の抗生物質による治療、及び年齢１８歳未満を含んだ。

【０１５７】

本発明者らは、健康な個体、ＣＲＣと最近診断された患者及びリンチ症候群キャリアの糞便試料中の上記４つの細菌配列を定量した。リンチ症候群キャリアは、遺伝的に、癌、特に大腸癌を発症しやすい。この群は、大腸癌新生物及び臨床兆候がない個体によって構成され、大腸癌リスク群とされる。

【０１５８】

本発明者らは、リンチ症候群が健康な患者の群と比較してＢ３及びＢ４８のＣｔ値の著しい増加を呈することを観察した。したがって、リンチ群では、糞便試料中のＢ３及びＢ４８の負荷がより低い。

【０１５９】

実際、リンチ群は、Ｂ１０以外について、ＣＲＣと比較して細菌配列の定量でいかなる統計学的な差も示さない。これは、リンチ群における微生物学的プロファイルが、この群においては何らの臨床上の兆候も新生物も観察されないものの、ＣＲＣに類似することを暗示する。この事実は、これら４つの細菌配列のうちの１種又は複数種の検出がＣＲＣリスクを有し、大腸内視鏡検査による調査を必要し得る人々をスクリーニングするための強力な手段であるかもしれないことを意味する。

【０１６０】

【表７】

表６．健康な個体、ＣＲＣ患者及びリンチ症候群キャリアにおける４つの細菌配列の定量（Ｃｔで表す）、一元配置ＡＮＯＶＡによる統計学的分析及びＲＯＣ分析

ID	群	状態	B3	B48	B10	B46
4	CRC	1	29.86	20.84	14.18	21.34
5	CRC	1	24.3	15.88	10.34	17.53
6	CRC	1	27.33	20.66	15.77	23.13
7	CRC	1	24.88	19.06	13.64	20.69
8	CRC	1	20.61	17.78	12.92	19.7
11	CRC	1	27.28	25.69	17.05	24.35
12	CRC	1	29.04	22.58	16.49	23.17
13	CRC	1	21.98	17.52	10.97	17.34
14	CRC	1	27.07	19.94	13.52	19.9
15	CRC	1	28.57	26.60	19.77	27.53
24	CRC	1	26.77	22.64	17.84	23.83
25	CRC	1	21.64	17.01	11.54	18.7
27	CRC	1	26.52	20.97	15.49	22.63
31	CRC	1	29.91	18.92	16.44	23.8
35	CRC	1	23.37	18.81	12.24	18.77
36	CRC	1	22.87	17.28	12.74	19.76
38	CRC	1		16.36	24.43	30.7
F10	CRC	1	20.49	18.59	16.33	22.78
F16	CRC	1	18.24		14.35	20.75
F11	CRC	1	29.19	20.33	20.37	26.45
F3	CRC	1	32.48	23.52	19.80	26.20
F4	CRC	1	21.76	16.41	14.88	20.87
F5	CRC	1	20.56	19.04	17.61	24.00
F6	CRC	1	31.6	23.22	21.82	27.67
F7	CRC	1	27.14	23.19	22.34	28.20
F8	CRC	1	22.37	18.82	15.61	22.04
43	CRC	1	30.9	22.46	17.12	25.57
16	C	0	22.97	20.21	15.54	23.12
17	C	0	20.4	15.84	10.71	17.54
18	C	0	22.05	15.72	12.06	17.67
23	C	0	21.79	17.16	12.59	18.89
28	C	0	20	18.86	15.29	21.33
30	C	0	26.61	20.47	12.78	20.26
32	C	0	22.76	15.07	15.95	23.09
33	C	0	23.66	18.30	13.54	19.57
34	C	0	22.01	17.73	14.29	19.07
37	C	0	24.06	19.60	14.47	19.65
F1	C	0	24.71	18.09	14.79	21.97
F12	C	0	20.79	17.55	14.95	20.90
F13	C	0	25.1	19.36	19.22	24.78
F14	C	0	21.63	19.46	15.07	21.44
F2	C	0	20.42	17.07	12.76	20.57
F15	C	0	19.69	17.55	12.84	19.85
F9	C	0	23.29	17.61	15.41	21.80
39	C	0		18.03	11.95	18.97
1	L	2	23.08	18.76	12.03	19.21
2	L	2	26.58	18.47	13.60	21.02
3	L	2	23.51	19.36	10.85	18.33
9	L	2		16.94	12.89	19.77
10	L	2	19.91	17.68	10.44	17.84
19	L	2	32.81	21.60	15.72	21.67
20	L	2	19.9	19.77	17.81	24.2
21	L	2	19.66	17.05	13.55	19.7
22	L	2	21.28	16.04	10.22	17.48

26	L	2	19.57	20.73	11.79	19.36
29	L	2	23.67	17.92	11.30	18.2
40	L	2	29.14	23.47	19.42	26.3
41	L	2	32.14	20.18	17.27	23.72
42	L	2	35.19	18.34	19.63	27.07
44	L	2	28.83	23.16	16.15	23.42
45	L	2	24.79	16.85	10.84	19.02
MIL1	L	2	37.1	22.60	14.69	25.52
MIL2	L	2	32.74	24.60	14.63	25.53
MIL3	L	2	27.80	18.00	10.34	20.28
MIL4	L	2	29.09	20.00	18.17	29.66
MIL5	L	2	33.45	22.60		24.81
MIL6	L	2	31.69	20.20	14.66	24.54
MIL7	L	2	35.88	22.90	13.05	24.59
MIL8	L	2	26.2	20.60	10.85	21.87
平均		CRC	25.64346154	20.15846154	16.13222222	22.86666667
		C	22.46705882	17.98222222	14.12111111	20.58166667
		リンチ	27.56565217	19.90916667	13.9076087	22.21291667
標準偏差		CRC	3.96679613	2.887129637	3.575465632	3.448853767
		C	1.948072011	1.514799756	1.957886432	1.927739456
		リンチ	5.628873475	2.403976627	3.02383331	3.369239985
P 値（一元配置 ANOVA）		CRC 対 C	0.038	0.019	0.049	0.021
		CRC 対 L	0.381	0.988	0.057	0.849
		L 対 C	0.004	0.018	0.989	0.163
C 対 L		中点値	25.65	19.69	11.87	23.27
		AUC	0.73	0.746	0.55	0.629
		感度	60.9	54.2	34.8	45.8
		特異度	88.9	94.1	94.7	94.7
L 対 CRC		中点値	31.65	19.21	14.78	21.95
		AUC	0.60	0.487	0.69	0.55
		感度	96	52	65.4	61.5
		特異度	34.8	58.3	69.6	54.2
CRC 対 C		中点値	26.69	20.90	15.75	22.0
		AUC	0.70	0.69	0.69	0.698
		感度	48%	36%	57%	61.5%
		特異度	94%	100%	89.5%	84%

【０１６１】
図１８～図２１は、それぞれ配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０の配列のＣＲＣ群、Ｌ群及びＣ群における絶対Ｃｔ値のグラフ表示を提供する。
【０１６２】
図２８は、健康（Ｃ）対リンチ（Ｌ）分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を提供する。
【０１６３】
図３０は、ＣＲＣ対リンチ分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を提供する。
【０１６４】
実施例７：１６Ｓ　ｒＤＮＡバイオマーカー分析　ＣＲＣ＋リンチ対健康な個体
実施例６の分析によれば、リンチ症候群キャリアは、糞便中にＣＲＣ患者に類似する微生物学的プロファイルを有する。したがって、本実験では、本発明者らは、大腸内視鏡検査による調査の前に、健康な個体及び大腸癌リスクの個体（ＣＲＣ＋Ｌ）における大腸癌リスク個体をスクリーニングするため上記４つの細菌配列の定量検出を使用することの潜在的な可能性を試験することを目的とする。
【０１６５】

表７では、本発明者らは、Ｃｔで表された細菌配列の定量を表す。

【０１６６】

本発明者らは、Ｂ３、Ｂ４８、及びＢ４６が大腸癌リスク群（ＣＲＣ＋Ｌ）においてＣｔ値を著しく増加することを観察している。したがって、糞便中のこれらの細菌のレベルは減少される。

【０１６７】

ＣＲＣ＋ＬにおけるＢ１０もまた、より低いレベルを呈するが、統計学的な差は観察されない（ｐ＝０．１３７）。

【０１６８】

大腸癌の検出における細菌定量の成績を評価すると、Ｂ３及びＢ４８が最も良い精度（０．７）を有することが示され、それぞれ、感度５６．２％－特異度８８．９％及び感度５１％－特異度８４％である。

【０１６９】

２番目に、Ｂ４６は０．６６５の精度、及び感度９４．７％－特異度２３．１２％を有する。最後に、Ｂ１０は０．５８の精度、及び感度４４．９％－特異度８９．５％を有する。

【０１７０】

細菌配列の定量のＣｔ間の比を計算した。統計学的な差は観察されない（マン－ホイットニーＵ検定でＢ３／Ｂ４６　ｐ＝０．０６１、２標本ｔ検定分析でＢ１０／Ｂ３　ｐ＝０．１３２、２標本ｔ検定分析でＢ４６／Ｂ１０　ｐ＝０．１２７）が、本発明者らは、増加した試料にこの比を適用することはＣＲＣのスクリーニングを完了するのに有用なアルゴリズムであるかもしれないことを考えなければならない。

【０１７１】

この系統では、上記検査の感度及び特異度を増すため、４つの配列の組合せも考慮しなければならない。

【０１７２】

【表８】

表７．健康な個体（Ｃ）及び大腸癌リスクの固体（ＣＲＣ＋Ｌ）のＣｔで表される４つの細菌配列の定量、２標本ｔ検定による統計学的分析及びＲＯＣ分析

ID	群	状態	B3	B48	B10	B46
4	CRC+L	3	29.86	20.84	14.18	21.34
5	CRC+L	3	24.3	15.88	10.34	17.53
6	CRC+L	3	27.33	20.66	15.77	23.13
7	CRC+L	3	24.88	19.06	13.64	20.69
8	CRC+L	3	20.61	17.78	12.92	19.7
11	CRC+L	3	27.28	25.69	17.05	24.35
12	CRC+L	3	29.04	22.58	16.49	23.17
13	CRC+L	3	21.98	17.52	10.97	17.34
14	CRC+L	3	27.07	19.94	13.52	19.9
15	CRC+L	3	28.57	26.60	19.77	27.53
24	CRC+L	3	26.77	22.64	17.84	23.83
25	CRC+L	3	21.64	17.01	11.54	18.7
27	CRC+L	3	26.52	20.97	15.49	22.63
31	CRC+L	3	29.91	18.92	16.44	23.8
35	CRC+L	3	23.37	18.81	12.24	18.77
36	CRC+L	3	22.87	17.28	12.74	19.76
38	CRC+L	3		16.36	24.43	30.7
F10	CRC+L	3	20.49	18.59	16.33	22.78
F16	CRC+L	3	18.24		14.35	20.75
F11	CRC+L	3	29.19	20.33	20.37	26.45
F3	CRC+L	3	32.48	23.52	19.80	26.20
F4	CRC+L	3	21.76	16.41	14.88	20.87
F5	CRC+L	3	20.56	19.04	17.61	24.00
F6	CRC+L	3	31.6	23.22	21.82	27.67
F7	CRC+L	3	27.14	23.19	22.34	28.20
F8	CRC+L	3	22.37	18.82	15.61	22.04
43	CRC+L	3	30.9	22.46	17.12	25.57
1	CRC+L	3	23.08	18.76	12.03	19.21
2	CRC+L	3	26.58	18.47	13.60	21.02
3	CRC+L	3	23.51	19.36	10.85	18.33
9	CRC+L	3		16.94	12.89	19.77
10	CRC+L	3	19.91	17.68	10.44	17.84
19	CRC+L	3	32.81	21.60	15.72	21.67
20	CRC+L	3	19.9	19.77	17.81	24.2
21	CRC+L	3	19.66	17.05	13.55	19.7
22	CRC+L	3	21.28	16.04	10.22	17.48
26	CRC+L	3	19.57	20.73	11.79	19.36
29	CRC+L	3	23.67	17.92	11.30	18.2
40	CRC+L	3	29.14	23.47	19.42	26.3
41	CRC+L	3	32.14	20.18	17.27	23.72
42	CRC+L	3	35.19	18.34	19.63	27.07
44	CRC+L	3	28.83	23.16	16.15	23.42
45	CRC+L	3	24.79	16.85	10.84	19.02
MIL1	CRC+L	3	37.1	22.60	14.69	25.52
MIL2	CRC+L	3	32.74	24.60	14.63	25.53
MIL3	CRC+L	3	27.80	18.00	10.34	20.28
MIL4	CRC+L	3	29.09	20.00	18.17	29.66
MIL5	CRC+L	3	33.45	22.60		24.81
MIL6	CRC+L	3	31.69	20.20	14.66	24.54
MIL7	CRC+L	3	35.88	22.90	13.05	24.59
MIL8	CRC+L	3	26.2	20.60	10.85	21.87
16	C	0	22.97	20.21	15.54	23.12
17	C	0	20.4	15.84	10.71	17.54
18	C	0	22.05	15.72	12.06	17.67

23	C	0	21.79	17.16	12.59	18.89
28	C	0	20	18.86	15.29	21.33
30	C	0	26.61	20.47	12.78	20.26
32	C	0	22.76	15.07	15.95	23.09
33	C	0	23.66	18.30	13.54	19.57
34	C	0	22.01	17.73	14.29	19.07
37	C	0	24.06	19.60	14.47	19.65
F1	C	0	24.71	18.09	14.79	21.97
F12	C	0	20.79	17.55	14.95	20.90
F13	C	0	25.1	19.36	19.22	24.78
F14	C	0	21.63	19.46	15.07	21.44
F2	C	0	20.42	17.07	12.76	20.57
F15	C	0	19.69	17.55	12.84	19.85
F9	C	0	23.29	17.61	15.41	21.80
39	C	0		18.03	11.95	18.97
平均		CRC+L	26.54	20.03	15.10	22.56
		C	22.46	17.98	14.12	20.58
標準偏差		CRC+L	4.86	2.64	3.48	3.39
		C	1.94	1.51	1.96	1.93
P値 （2標本t検定）		CRC+L 対 C	0.0001	0.001	0.137	0.004
		中点値	25.65	19.69	15.58	23.13
		AUC	0.71	0.70	0.580	0.665
		感度	56.2	51	44.9	94.7
		特異度	88.9	84	89.5	23.12

【０１７３】
図２２は、それぞれＣＲＣ＋リンチ（Ｌ）群及び健康（Ｃ）群における配列番号１、配列番号４、配列番号７、及び配列番号１０の配列の絶対Ｃｔ値のグラフ表示を提供する。
【０１７４】
図２９は、健康対ＣＣＲ＋リンチ分析におけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８に対するＲＯＣ曲線を提供する。
【０１７５】
実施例８：１６Ｓ　ｒＤＮＡバイオマーカー分析　ＣＲＣ対Ｌ－高リスク対Ｌ－低リスク対健康な個体
本実施例において、本発明者らは、リンチ症候群キャリアにおける細菌配列の定量を使用して種々のグレードの大腸癌のリスクを定義することを目的とする。
【０１７６】
本発明者らは、リンチ症候群キャリアを、直近の大腸内視鏡検査における結腸直腸新生物バックグラウンド及び腺腫の存在に従って高リスク（Ｌ－高リスク）及び低リスク（Ｌ－低リスク）の大腸癌に分類した。本発明者らは、６名の高リスク個体及び１８名の低リスク個体を有した。
【０１７７】
４つの細菌配列の定量を行ったところ、異なる群間で統計学的な有意差は観察されなかった。Ｂ３レベルに対してのみ、Ｃ対Ｌ－低リスク（ｐ＝０．０８８、Kruskal-Wallis検定）及びＣ対Ｌ－高リスク（ｐ＝０．１４３、クラスカル－ワリス検定）を比較するとＣｔの減少傾向があった。
【０１７８】
細菌配列定量のＣｔ間の比を計算した。
【０１７９】
クラスカル－ワリス検定を適用し、Ｂ３／Ｂ１０比及びＢ１０／Ｂ４６比は、ＣとＬ－低リスクとの間で有意差を呈する。Ｂ３／Ｂ４８比は、Ｃ対Ｌ－高リスクを比較すると有意

差を示す。Ｂ３／Ｂ１０比及びＢ４８／Ｂ１０比はＣＲＣ対Ｌ－高リスクで有意差があった。

【０１８０】

試料サイズのためＲＯＣ分析は行われなかったが、統計学的分析を考慮すると、本発明者らはＬ－低リスク群を区別できることから最良の比はＢ３／Ｂ１０の可能性があると予測する。

【０１８１】

また、この系統では上記検定の能力を高めるために４つの配列の組合せを考慮しなくてはならず、多変量ロジスティック回帰分析を行わなくてはならないが、試料サイズの増加を必要とする。

【０１８２】

【表９】

表８．健康な個体（Ｃ）、Ｌ-低リスク、Ｌ-高リスク及びＣＲＣのＣｔで表される４つの細菌配列の定量

ID	群	状態	B3	B48	B10	B46	B3/B10	B48/B10	B3/B48	B10/B46
4	CRC	1	29.86	20.84	14.18	21.34	2.11	1.47	1.43	0.66
5	CRC	1	24.3	15.88	10.34	17.53	2.35	1.54	1.53	0.59
6	CRC	1	27.33	20.66	15.77	23.13	1.73	1.31	1.32	0.68
7	CRC	1	24.88	19.06	13.64	20.69	1.82	1.40	1.31	0.66
8	CRC	1	20.61	17.78	12.92	19.7	1.60	1.38	1.16	0.66
11	CRC	1	27.28	25.69	17.05	24.35	1.60	1.51	1.06	0.70
12	CRC	1	29.04	22.58	16.49	23.17	1.76	1.37	1.29	0.71
13	CRC	1	21.98	17.52	10.97	17.34	2.00	1.60	1.25	0.63
14	CRC	1	27.07	19.94	13.52	19.9	2.00	1.47	1.36	0.68
15	CRC	1	28.57	26.60	19.77	27.53	1.45	1.35	1.07	0.72
24	CRC	1	26.77	22.64	17.84	23.83	1.50	1.27	1.18	0.75
25	CRC	1	21.64	17.01	11.54	18.7	1.88	1.47	1.27	0.62
27	CRC	1	26.52	20.97	15.49	22.63	1.71	1.35	1.26	0.68
31	CRC	1	29.91	18.92	16.44	23.8	1.82	1.15	1.58	0.69
35	CRC	1	23.37	18.81	12.24	18.77	1.91	1.54	1.24	0.65
36	CRC	1	22.87	17.28	12.74	19.76	1.80	1.36	1.32	0.64
38	CRC	1		16.36	24.43	30.7		0.67		0.80
F10	CRC	1	20.49	18.59	16.33	22.78	1.25	1.14	1.10	0.72
F16	CRC	1	18.24		14.35	20.75	1.27			0.69
F11	CRC	1	29.19	20.33	20.37	26.45	1.43	1.00	1.44	0.77
F3	CRC	1	32.48	23.52	19.80	26.20	1.64	1.19	1.38	0.76
F4	CRC	1	21.76	16.41	14.88	20.87	1.46	1.10	1.33	0.71
F5	CRC	1	20.56	19.04	17.61	24.00	1.17	1.08	1.08	0.73
F6	CRC	1	31.6	23.22	21.82	27.67	1.45	1.06	1.36	0.79
F7	CRC	1	27.14	23.19	22.34	28.20	1.21	1.04	1.17	0.79
F8	CRC	1	22.37	18.82	15.61	22.04	1.43	1.21	1.19	0.71
43	CRC	1	30.9	22.46	17.12	25.57	1.80	1.31	1.38	0.67
16	C	0	22.97	20.21	15.54	23.12	1.48	1.30	1.14	0.67
17	C	0	20.4	15.84	10.71	17.54	1.90	1.48	1.29	0.61
18	C	0	22.05	15.72	12.06	17.67	1.83	1.30	1.40	0.68
23	C	0	21.79	17.16	12.59	18.89	1.73	1.36	1.27	0.67
28	C	0	20	18.86	15.29	21.33	1.31	1.23	1.06	0.72
30	C	0	26.61	20.47	12.78	20.26	2.08	1.60	1.30	0.63
32	C	0	22.76	15.07	15.95	23.09	1.43	0.94	1.51	0.69
33	C	0	23.66	18.30	13.54	19.57	1.75	1.35	1.29	0.69
34	C	0	22.01	17.73	14.29	19.07	1.54	1.24	1.24	0.75
37	C	0	24.06	19.60	14.47	19.65	1.66	1.35	1.23	0.74
F1	C	0	24.71	18.09	14.79	21.97	1.67	1.22	1.37	0.67
F12	C	0	20.79	17.55	14.95	20.90	1.39	1.17	1.18	0.72
F13	C	0	25.1	19.36	19.22	24.78	1.31	1.01	1.30	0.78
F14	C	0	21.63	19.46	15.07	21.44	1.44	1.29	1.11	0.70
F2	C	0	20.42	17.07	12.76	20.57	1.60	1.34	1.20	0.62
F15	C	0	19.69	17.55	12.84	19.85	1.53	1.37	1.12	0.65
F9	C	0	23.29	17.61	15.41	21.80	1.51	1.14	1.32	0.71
39	C	0		18.03	11.95	18.97		1.51		0.63
1	L-低リスク	4	23.08	18.76	12.03	19.21	1.92	1.56	1.23	0.63
3	L-低リスク	4	23.51	19.36	10.85	18.33	2.17	1.78	1.21	0.59
9	L-低リスク	4		16.94	12.89	19.77		1.31		0.65
10	L-低リスク	4	19.91	17.68	10.44	17.84	1.91	1.69	1.13	0.58
19	L-低リスク	4	32.81	21.60	15.72	21.67	2.09	1.37	1.52	0.73
20	L-低リスク	4	19.9	19.77	17.81	24.2	1.12	1.11	1.01	0.74
21	L-低リスク	4	19.66	17.05	13.55	19.7	1.45	1.26	1.15	0.69
26	L-低リスク	4	19.57	20.73	11.79	19.36	1.66	1.76	0.94	0.61
29	L-低リスク	4	23.67	17.92	11.30	18.2	2.09	1.59	1.32	0.62

40	L-低リスク	4	29.14	23.47	19.42	26.3	1.50	1.21	1.24	0.74
42	L-低リスク	4	35.19	18.34	19.63	27.07	1.79	0.93	1.92	0.73
44	L-低リスク	4	28.83	23.16	16.15	23.42	1.79	1.43	1.24	0.69
MIL1	L-低リスク	4	37.1	22.60	14.69	25.52	2.53	1.54	1.64	0.58
MIL2	L-低リスク	4	32.74	24.60	14.63	25.53	2.24	1.68	1.33	0.57
MIL3	L-低リスク	4	27.80	18.00	10.34	20.28	2.69	1.74	1.54	0.51
MIL6	L-低リスク	4	31.69	20.20	14.66	24.54	2.16	1.38	1.57	0.60
MIL7	L-低リスク	4	35.88	22.90	13.05	24.59	2.75	1.75	1.57	0.53
MIL8	L-低リスク	4	26.2	20.60	10.85	21.87	2.41	1.90	1.27	0.50
2	L-高リスク	5	26.58	18.47	13.60	21.02	1.95	1.36	1.44	0.65
22	L-高リスク	5	21.28	16.04	10.22	17.48	2.08	1.57	1.33	0.58
41	L-高リスク	5	32.14	20.18	17.27	23.72	1.86	1.17	1.59	0.73
45	L-高リスク	5	24.79	16.85	10.84	19.02	2.29	1.55	1.47	0.57
MIL4	L-高リスク	5	29.09	20.00	18.17	29.66	1.60	1.10	1.45	0.61
MIL5	L-高リスク	5	33.45	22.60		24.81			1.48	
平均		CRC	25.64	20.16	16.13	22.87	1.66	1.28	1.28	0.70
		C	22.47	17.98	14.12	20.58	1.60	1.29	1.25	0.68
		L-低リスク	27.45	20.20	13.88	22.08	2.02	1.50	1.34	0.63
		L-高リスク	27.89	19.02	14.02	22.62	1.96	1.35	1.46	0.63
標準偏差		CRC	3.97	2.89	3.58	3.45	0.29	0.21	0.14	0.05
		C	1.95	1.51	1.96	1.93	0.21	0.16	0.11	0.05
		L-低リスク	6.08	2.40	2.96	3.09	0.44	0.27	0.25	0.08
		L-高リスク	4.59	2.41	3.62	4.42	0.26	0.22	0.09	0.06
P値 クラスカルーワリス検定		CRC対C	0.32							
		CRC対L	1				0.017	0.022		
		CRC対L	1							
		C対LL	0.088				0.016			0.01
		C対LH	0.143						0.031	
		LL対LH	1							

【０１８３】

図２３～図２６は、それぞれＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群及びＣ群において、以下の絶対Ｃｔ値比Ｂ４８／Ｂ１０、Ｂ３／Ｂ１０、Ｂ４６／Ｂ１０及びＢ３／Ｂ４８のグラフ表示を提供する。

【図面】

【図１】

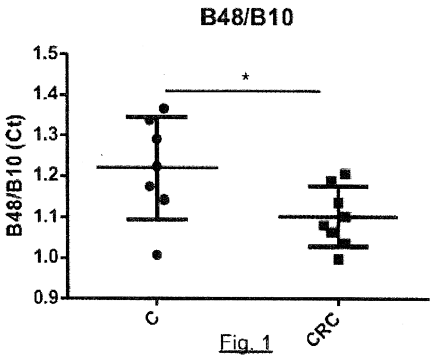


Fig. 1

【図２】

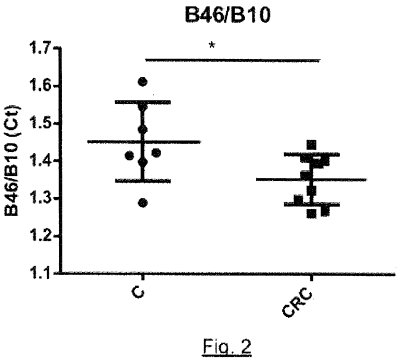


Fig. 2

【図３】

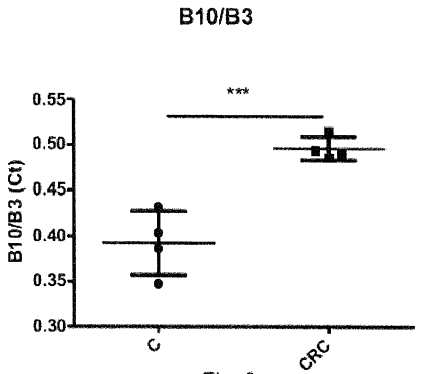


Fig. 3

【図４】

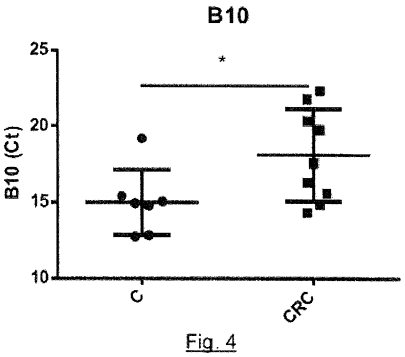


Fig. 4

【図５】

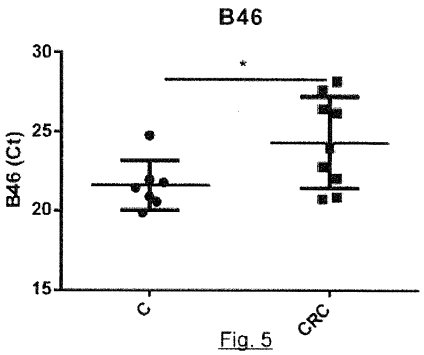


Fig. 5

【図６】

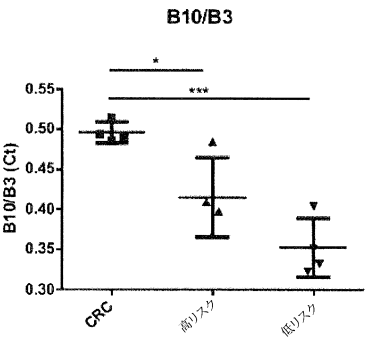


Fig. 6

【図７】

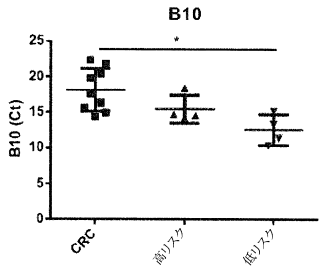


Fig. 7

【図８ａ】

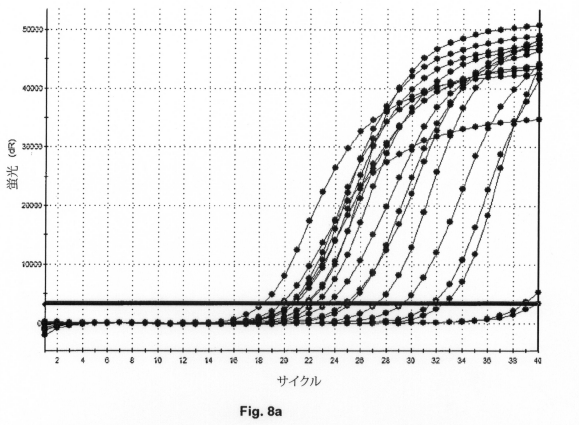


Fig. 8a

【図８ｂ】

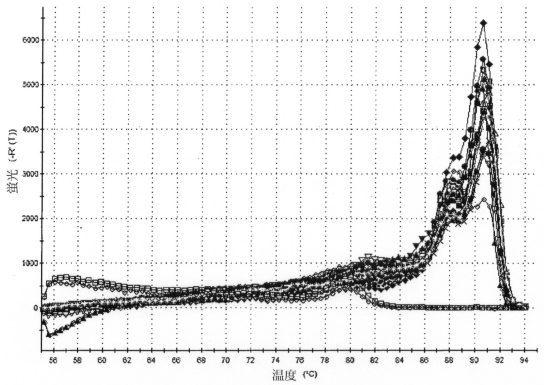


Fig. 8b

【図９ａ】

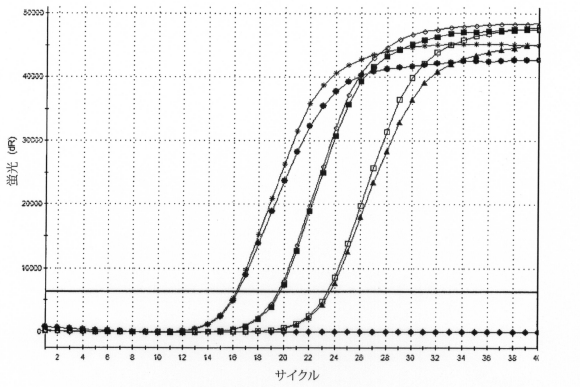


Fig. 9a

【図９ｂ】

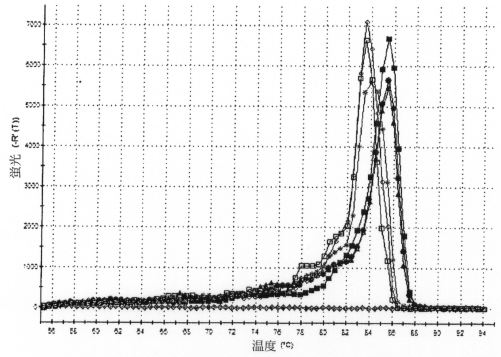


Fig. 9b

【図１０ａ】

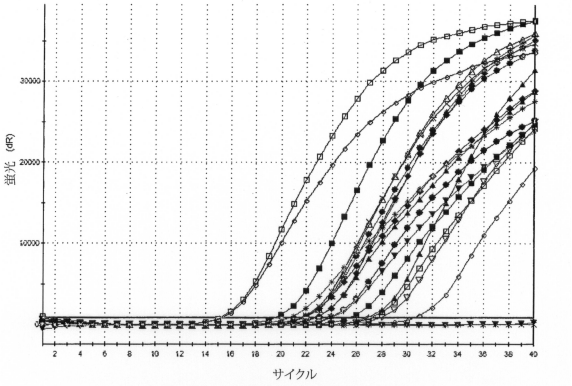


Fig. 10a

【図１０ｂ】

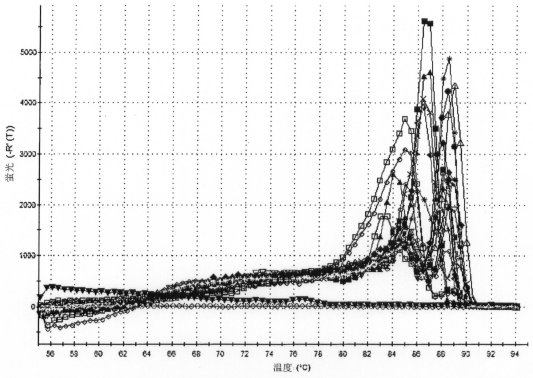


Fig. 10b

【図１１ａ】

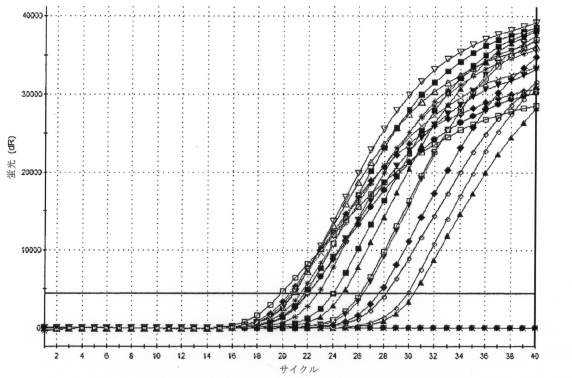


Fig. 11a

【図１１ｂ】

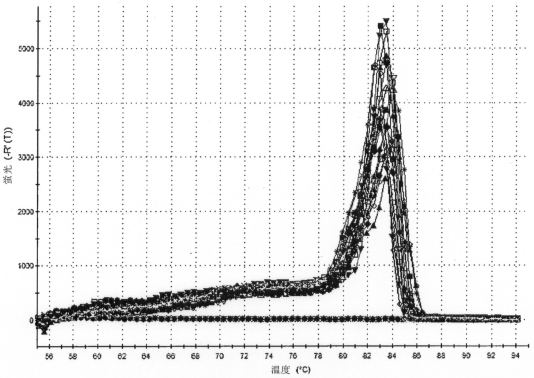


Fig. 11b

【図１２ａ】

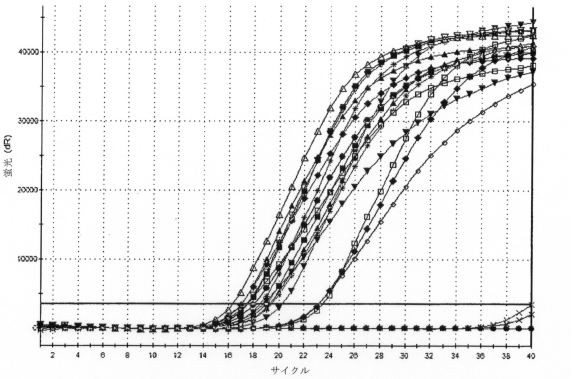


Fig. 12a

【図１２ｂ】

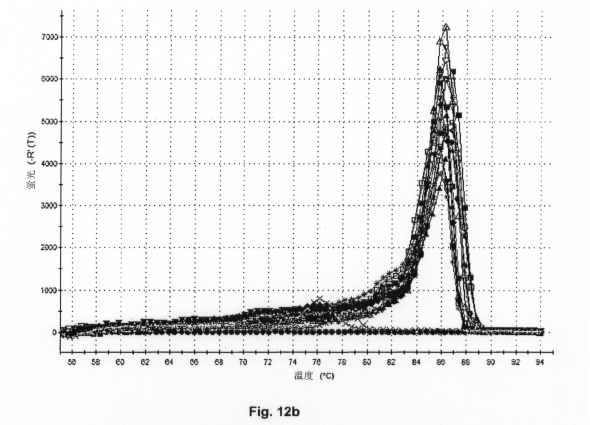


Fig. 12b

【図１３ａ】

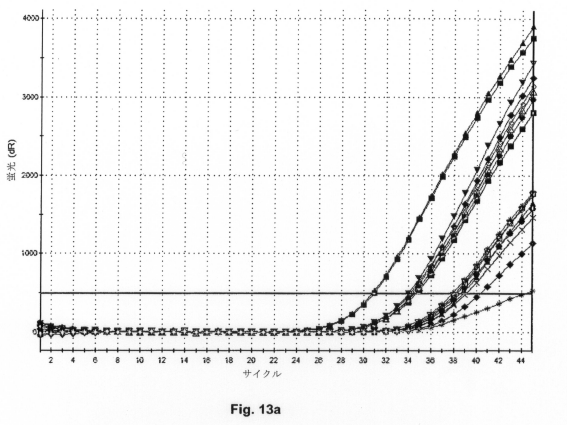


Fig. 13a

【図１３ｂ】

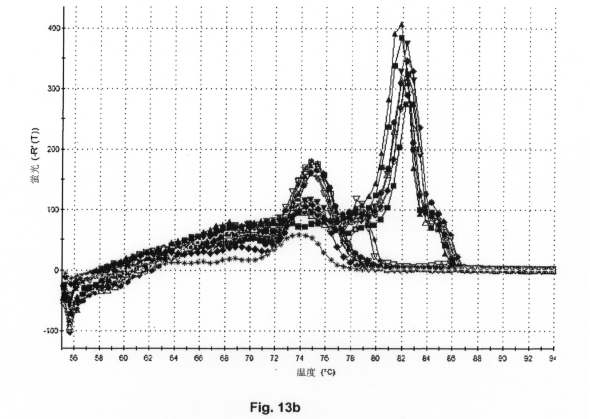


Fig. 13b

【図１４】

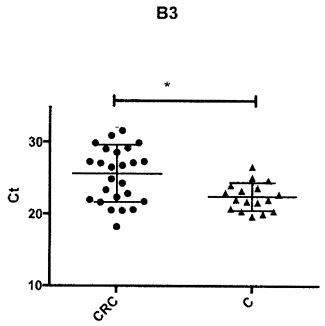


Figure 14. ＣＲＣ群及びC群のＢ３のＣｔ値

【図１５】

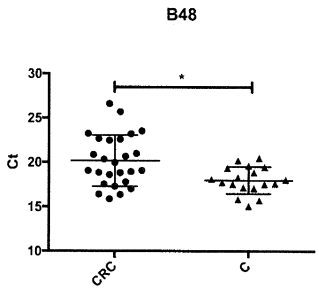


Figure 15. ＣＲＣ群及びC群のＢ４８のＣｔ値

【図１６】

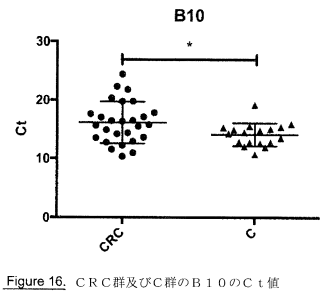


Figure 16. ＣＲＣ群及びC群のＢ１０のＣｔ値

【図１７】

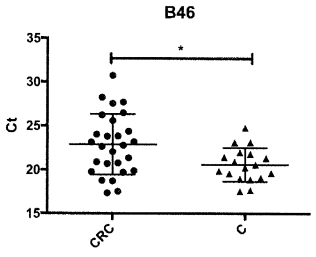


Figure 17. ＣＲＣ群及びC群のＢ４６のＣｔ値

【図１８】

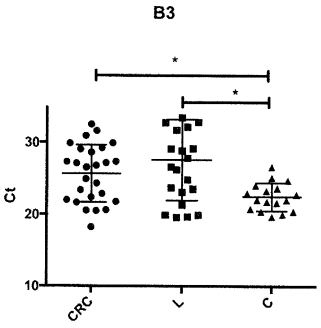


Figure 18. ＣＲＣ群、Ｌ群及びC群のＢ３のＣｔ値

【図１９】

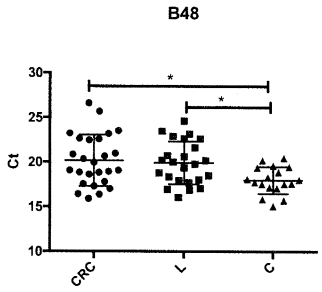


Figure 19. ＣＲＣ群、Ｌ群及びC群のＢ４８のＣｔ値

【図２０】

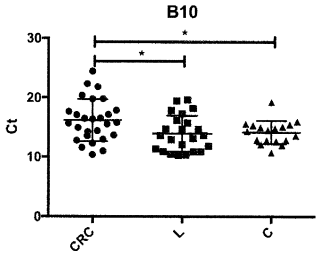


Figure 20. ＣＲＣ群、Ｌ群及びC群のＢ１０のＣｔ値

【図２１】

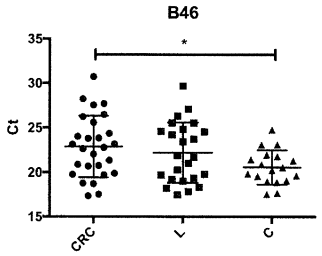


Figure 21. ＣＲＣ群、Ｌ群及びC群のＢ４６のＣｔ値

【図２２】

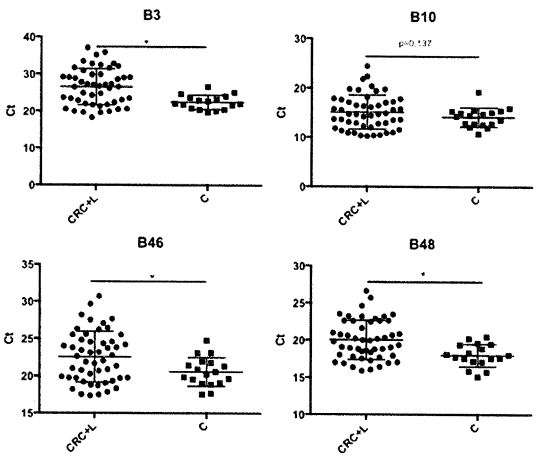


Figure 22: ＣＲＣ＋Ｌ対ＣにおけるＢ３、Ｂ１０、Ｂ４６及びＢ４８のＣｔ値

【図２３】

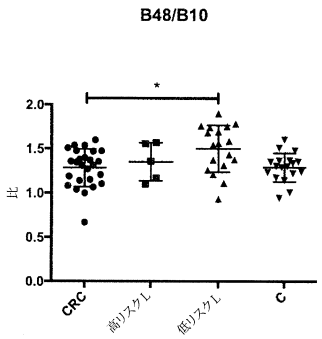


Figure 23. ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群及びＣ群におけるＢ４８／Ｂ１０比の値

【図２４】

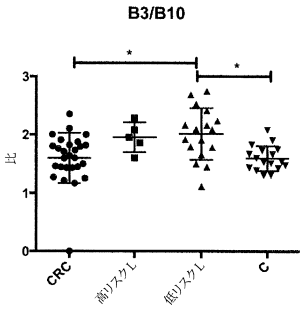


Figure 24. ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群及びＣ群におけるＢ３／Ｂ１０比の値

【図２５】

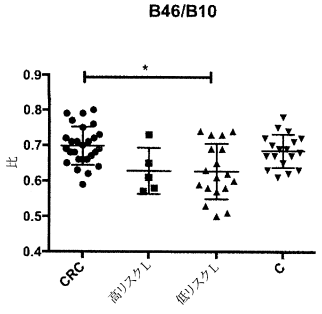


Figure 25. ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群及びＣ群におけるＢ４６／Ｂ１０比の値

【図２６】

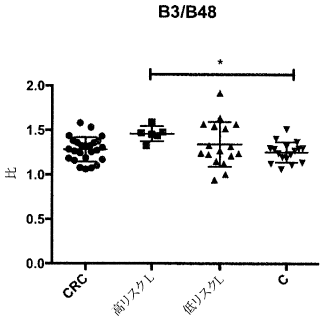


Figure 26. ＣＲＣ群、高リスクＬ群、低リスクＬ群及びＣ群におけるＢ３／Ｂ４８比の値

【図２７】

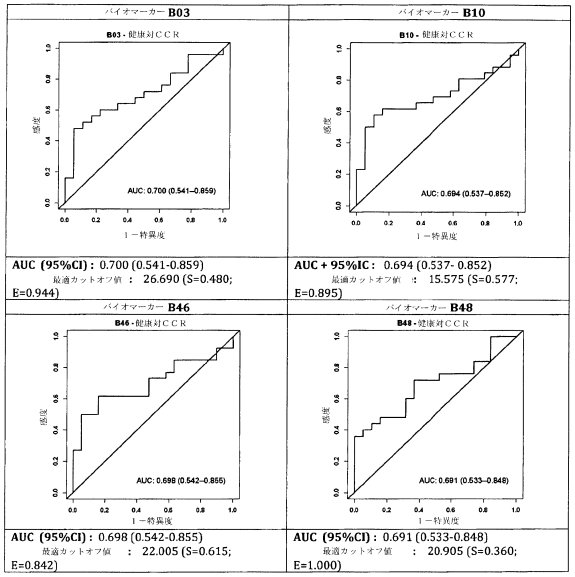


Fig. 27

【図２８】

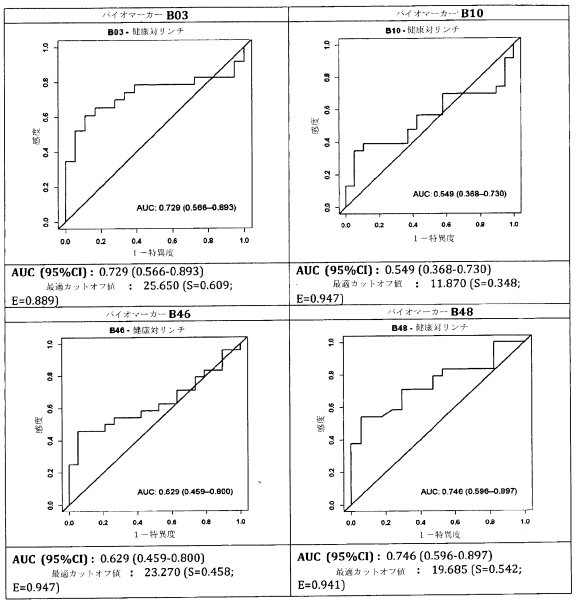


Fig. 28

【図２９】

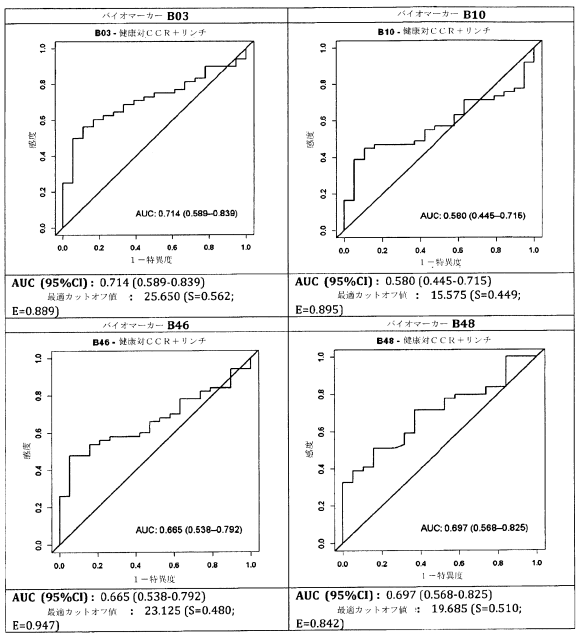


Fig. 29

【図３０】

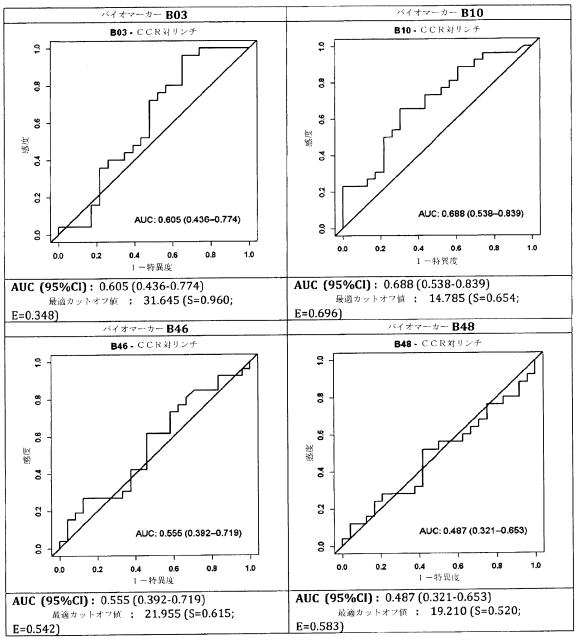


Fig. 30

【配列表】

0007053146000001.app

フロントページの続き

スペイン国 イー－１７６００ フィゲレス （ジローナ） シー／ センドラソス エヌ８ シー／オー インスティトゥート ディンベスティガシオ ビオメディカ デ ジローナ ドクトル ジュゼップ トルエタ
(72)発明者 ガルシア－ヒル ヘスス
スペイン国 イー－１７８３３ フォントコベルタ （ジローナ） プラカ パイソス カタランス ２ シー／オー ウニベルシタ デ ジローナ
(72)発明者 マス デ ササルス テレサ
スペイン国 イー－１７８３３ フォントコベルタ （ジローナ） シー／ ラモン マルガレフ ２０ シー／オー ウニベルシタ デ ジローナ
(72)発明者 アルデゲール ハビエル
スペイン国 イー－１７００３ ジローナ シー／ アルビ ２２ シー／オー インスティトゥート ディンベスティガシオ ビオメディカ デ ジローナ ドクトル ジュゼップ トルエタ

合議体
審判長 中島 庸子
審判官 平林 由利子
審判官 福井 悟

(56)参考文献 国際公開第２００９／０５７６９５（WO，Ａ１）
国際公開第２０１０／０１０９１４（WO，Ａ１）
ＴＥＲＥＳＡ ＭＡＳ ＤＥ ＸＡＸＡＲＳ ＲＩＶＥＲＯ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔａｔ ｄｅ Ｇｉｒｏｎａ，２０１２，Ｃｈ．２，ｐｐ．１１９－１４３

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ １／００－ ３／００
Ｑ０１Ｎ ３３／４８－３３／９８
Ｃ１２Ｎ １５／００－１５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡＰｌｕｓ／ＢＩＯＳＩＳ／ＥＭＢＡＳＥ／ＷＰＩＤＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ（ＳＴＮ）
ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）
ＧｅｎＢａｎｋ／ＥＭＢＬ／ＤＤＢＪ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ