(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
2024年3月7日(07.03.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/048236 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/03 (2006.01) *C12Q 1/6806* (2018.01)
C12N 15/09 (2006.01) *C12Q 1/6813* (2018.01)
C12N 15/31 (2006.01) *C12Q 1/689* (2018.01)
C12N 15/33 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2023/029165

(22) 国際出願日： 2023年8月9日(09.08.2023)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2022-139056 2022年9月1日(01.09.2022) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人物質・材料研究機構 (**NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE**) [JP/JP]; 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ Ibaraki (JP).

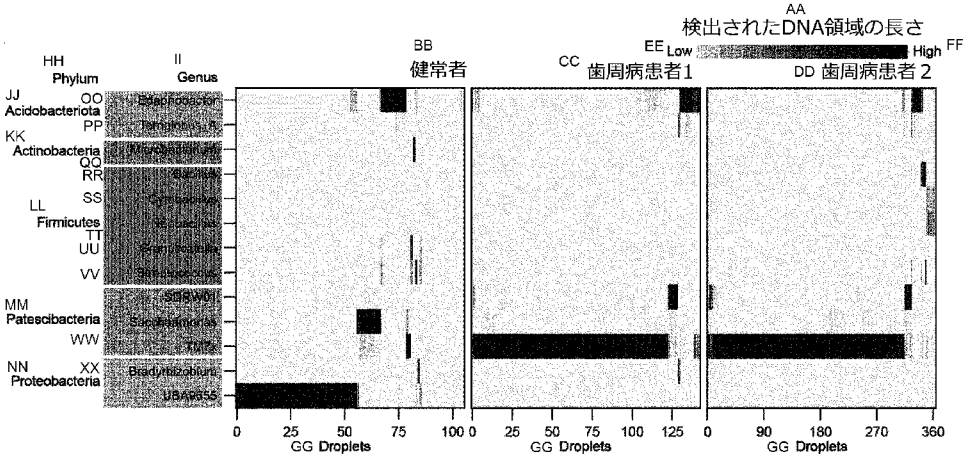
(72) 発明者: 岡 本 章 玄 (**OKAMOTO Akihiro**); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ 国立研究開発法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP). 高野 壮太朗(**TAKANO Sotaro**); 〒3050047 茨城県つくば市千現一丁目２番地１ 国立研究開発法人物質・材料研究機構内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: スプリング弁理士法人 (**SPRING IP**); 〒3001207 茨城県牛久市ひたち野東４丁目７－３ブリーズノース１０１ Ibaraki (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,

(54) **Title:** POLYNUCLEOTIDE, KIT, AND DIAGNOSIS METHOD

(54) 発明の名称： ポリヌクレオチド、キット、及び、診断方法



AA	Length of detected DNA region	MM	Patescibacteria
BB	Normal person	NN	Proteobacteria
CC	Periodontal disease patient 1	OO	Edaphobacter
DD	Periodontal disease patient 2	PP	Terrigobus_A
EE	Low	QQ	Microbacterium
FF	High	RR	Bacillus
GG	Droplets	SS	Cytobacillus
HH	Phylum	TT	Neobacillus
II	Genus	UU	Granulicatella
JJ	Acidobacteriota	VV	Streptococcus
KK	Actinobacteria	WW	Saccharimonas
LL	Firmicutes	XX	Bradyrhizobium

(57) **Abstract:** A polynucleotide comprising at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of the nucleotide sequences (a) to (c) mentioned below can be used as a marker for an in-vivo diagnosis of an infectious disease. (a) At least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:1 to 4; (b) a nucleotide sequence having 80% or higher homology to at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:1 to 4; and (c) a nucleotide sequence for a polynucleotide capable of hybridizing with a nucleic acid comprising a nucleotide

WO 2024/048236 A1

[続葉有]

CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

sequence complementary to at least one nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs:1 to 4 under stringent conditions.

(57) 要約:以下の(a)～(c)からなる群より選択される少なくとも1種の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、感染症の体外診断のマーカーとして使用され得る。(a)配列番号1～4からなる群より選択される少なくとも1種の塩基配列、(b)配列番号1～4からなる群より選択される少なくとも1種の塩基配列に対して、80%以上の相同性を有する塩基配列、(c)配列番号1～4からなる群より選択される少なくとも1種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

明　細　書

発明の名称 ： ポリヌクレオチド、キット、及び、診断方法

技術分野

[0001]　本開示は、ポリヌクレオチド、キット、及び、診断方法に関する。

背景技術

[0002]　単一細胞・粒子解析を行う方法、及び、そのための装置が知られている。

特許文献１には「２つ以上の細胞または細胞様構造物を含む試料を用い、該細胞または細胞様構造物を１細胞または構造物単位ずつ液滴中に封入する工程と、該液滴をゲル化してゲルカプセルを生成する工程と、該ゲルカプセルを１種以上の溶解用試薬に浸漬して前記細胞または細胞様構造物を溶解する工程であって、該細胞中のポリヌクレオチドが該ゲルカプセル内に溶出し該ポリヌクレオチドに結合する物質が除去された状態で前記ゲルカプセル内に保持される、工程と、該ポリヌクレオチドを増幅用試薬に接触させて該ポリヌクレオチドをゲルカプセル内で増幅する工程とを含む、細胞または細胞様構造物中のポリヌクレオチドを増幅する方法。」が記載されている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：国際公開第２０１９／２１６２７１号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004]　多様な細胞を含む生物学的サンプルに難培養性細胞やウイルス粒子が含まれる場合、その難培養性細胞・ウイルス粒子の機能解析のためには、その生物学的サンプルの全ゲノム解析が不可欠とされてきた。特許文献１に記載されるような単一細胞・粒子解析は、１細胞・１粒子を分離し、その細胞・粒子中のポリヌクレオチドを増幅して読み取ることができるため、特に難培養性細胞・ウイルス粒子の全ゲノム解析に大きく貢献している。また、個々の細胞・ウイルス粒子に分離せずに行う、従来公知の全ゲノム（メタゲノム）

解析も、依然として上記のような目的には有用である。

[0005] 近年、上記のようなゲノム解析技術を、疾病の体外診断に活用する試みが盛んになされている。特に、難培養性の細菌やウイルスが原因となる感染症では、ゲノム解析技術が有用となる。

[0006] 本開示の課題の一つは、感染症の体外診断のマーカーとして使用できる場合があるポリヌクレオチドの提供にある。また、本開示の課題の一つは、プライマーセット、及び、診断方法の提供にある。

課題を解決するための手段

[0007] 本明細書に開示されるポリヌクレオチドの実施形態の１つは、以下の（ａ）～（ｃ）［（ａ）～（ｃ）は、ａ，ｂ，ｃを意味する］からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

（ａ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列、

（ｂ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列、

（ｃ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

[0008] 本明細書に開示される、プライマーセット、及び／又は、プローブを含むキットの実施形態の１つは、配列番号１～４からなる群より選択される塩基配列から設計されるプライマーセット、及び／又は、プローブを含むキットである。

[0009] 本明細書に開示される、プライマーセット、及び／又は、プローブを含むキットの実施形態の１つは、以下の（ｅ）～（ｎ）［（ｅ）～（ｎ）はｅ，ｆ，ｇ，ｈ，ｋ，ｍ，ｎを意味する］からなる群より選択される少なくとも１種の領域から設計されるプライマーセット、及び／又は、プローブを含むキットである。

（ｅ）配列番号３の６４１塩基から、７６８塩基までの領域（配列番号５）

、

（ｆ）配列番号２の９９２塩基から、１１２９塩基までの領域（配列番号６）

（ｇ）配列番号２の１２２３塩基から、１３３８塩基までの領域（配列番号７）

（ｈ）配列番号２の６９５塩基から、７９３塩基までの領域（配列番号８）

（ｋ）配列番号４の３９３８塩基から、４０３０塩基までの領域（配列番号９）

（ｍ）配列番号４の２３７７塩基から、２４８４塩基までの領域（配列番号１０）

（ｎ）配列番号４の２７０５塩基から、２８０６塩基までの領域（配列番号１１）

[0010] 本明細書に開示されるポリヌクレオチドの実施形態の１つは、以下の（ｐ）～（ｔ）［（ｐ）～（ｔ）は、ｐ，ｒ，ｔを意味する］からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

（ｐ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

（ｒ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列

（ｔ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

発明の効果

[0011] 本開示によれば、感染症の体外診断のマーカーとして使用できる場合があるポリヌクレオチドが提供される。また、本開示によれば、プライマーセット、及び、診断方法が提供される。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]健常者サンプルと、歯周病患者サンプル内の膜小胞の塩基配列のプロフ

ァイルの比較結果である（細菌由来）。

[図2]健常者サンプルと、歯周病患者サンプル内の膜小胞の塩基配列のプロファイルの比較結果である（ウイルス由来）。

[図3]歯周病患者に特異的に検出される領域（バイオマーカー配列）の決定手順を表す図である。

[図4]歯周病患者に特異的に検出される領域（バイオマーカー配列）の決定手順を表す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下の説明は、非限定的な実施形態に基づいてなされる。なお、本明細書において、「～」を用いて表される数値範囲は、「～」の前後に記載される数値を下限値及び上限値として含む範囲を意味する。

[0014] 本明細書に開示されるポリヌクレオチドの第１の実施形態は、以下の（ａ）～（ｃ）からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0015] （ａ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

（ｂ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列

（ｃ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

[0016] 従来、試料中に含まれる膜小胞内部の全塩基配列を決定した上で、各細菌由来膜小胞に特有の塩基配列を特定し、目的とする細菌由来膜小胞の有無を検証する試みがなされていた。しかし、この特定技術をヒト由来サンプルに適用し、疾患診断技術へと確立した例はなかった。

その理由の一つは、単一の膜小胞レベルでの定量性を有する配列解析手法が確立されていなかったことである。健常者由来サンプルと、疾患患者由来サンプルとの比較は、必然的に「異なるサンプル」間での比較解析となる。特定のＤＮＡを持つ膜小胞の存在比を「異なるサンプル」間で比較検討する

には、単一の膜小胞レベルでの定量性を有する配列解析手法が要求される。

[0017] また、仮に、特定の膜小胞に特有の塩基配列が同定されたとしても、この塩基配列をＰＣＲ（ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｃｈａｉｎ ｒｅａｃｔｉｏｎ）等に適用して、疾病検出を行うためにはもう一つの問題がある。それは、偽陽性率（健常者においても目的とするシグナルが検出されてしまう事象）のリスクを低下させるために、選抜を要することである。この選抜方法も従来確立されてはいなかった。

[0018] 配列番号１～４の塩基配列は、従来知られていなかった手法により、選抜、取得されたマーカー配列であり、新規なものである。また、適切な方法によって選抜されたことにより、感染症、特に、歯周病の診断（り患の有無、進行の程度の診断）において、偽陽性率の低いマーカーとして機能し得るという、従来にない効果を有している。

[0019] 具体的な取得方法は後述されるが、配列番号１～４の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、概ね、以下の新規な手順により取得された。

まず、健常者、及び、歯周病患者から採取された唾液から膜小胞が抽出された。次に、抽出された膜小胞に含まれるＤＮＡの塩基配列が、単一細胞・粒子解析の技術により、膜小胞の個々について解析された。次に、個々の膜小胞に由来する配列に基づき、個々の膜小胞の宿主（細菌、又は、ウィルス）が同定された。次に、健常者と比較して、歯周病患者の唾液サンプルにおいて存在比が高い宿主が特定された。次に、その宿主の全ゲノム配列に対して、膜小胞由来のシークエンスリードがマッピングされ、（定量的に）多数の膜小胞から取得されたゲノム領域が特定された。次に、特定されたゲノム領域のうち、他の細菌、及び、ウィルスと相同性が低い部分がバイオマーカー配列候補と決定された。次に、バイオマーカー候補配列のうち、健常者の唾液サンプルとの比較で、アライメントスコアが低いものが選抜された。更に、同分類群の細菌（又はウィルス）のシークエンスリードが除外された。このようにして細菌由来の配列１～３、ウィルス由来の配列４が特定された。

[0020] 上述の手順を経て選抜、取得された配列１～４に由来する実施例１のポリヌクレオチドは、感染症、特に歯周病診断のマーカーとして用いられる場合、偽陽性の発生リスクを低下させ得る。また、このポリヌクレオチドは、プライマーセット、及び、プローブの設計の基礎とされ得る。

[0021] なお、本明細書において、「ポリヌクレオチド」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。この用語は上記分子の一次構造のみを指す。

[0022] （ｂ）の塩基配列は、配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して８５％以上の相同性を有することが好ましく、９０％以上の相同性を有することがより好ましく、９５％以上の相同性を有することが更に好ましく、９８％以上の相同性を有することが特に好ましい。なお、上記は、後述する（ｒ）の塩基配列においても同様である。

[0023] また、（ｃ）における、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えばポリヌクレオチドをプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法などを用いることにより得ることができる。

なお、上記は、後述する（ｔ）においても同様である。

[0024] ポリヌクレオチドのハイブリダイゼーション方法は公知であり、例えばモレキュラー・クローニング第４版［Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ（２０１２）］、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｇｅｎｅｒａｌ ａｎｄ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂａｃｔｅｒｉｏｌｏｇｙ［ＡＳＭ Ｐｒｅｓｓ（１９９４）］、Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｍｅｔｈｏｄｓ ｍａｎｕａｌ［Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ（１９９７）］の他、多数の他の標準的な教科書に従って条件を決定して行うことができる。

[0025] また、一般的なハイブリダイゼーションキットに付属した説明書に従って、ストリンジェントな条件（下）でハイブリダイズするポリヌクレオチドを取得することもできる。このようなハイブリダイゼーションキットとしては

、例えば、ランダムプライム法によりプローブを作製し、ストリンジェントな条件でハイブリダイゼーションを行うランダムプライムドＤＮＡラベリングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス社製）等が挙げられる。

[0026] より具体的には、例えば、ポリヌクレオチドを固定化したフィルターを用いて、０．７～１．０ＭのＮａＣｌ存在下、６５℃でハイブリダイゼーションを行った後、０．１～２倍濃度のＳＳＣ（ｓａｌｉｎｅ－ｓｏｄｉｕｍｃｉｔｒａｔｅ）溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、１５０ｍＭ塩化ナトリウム、１５ｍＭクエン酸ナトリウムである）を用い、６５℃の条件下でフィルターを洗浄することにより取得することもできる。

[0027] また、ストリンジェントな条件とは、例えばポリヌクレオチドを固定化したフィルターとポリヌクレオチドプローブとを５０％ホルムアミド、５×ＳＳＣ（７５０ｍＭの塩化ナトリウム、７５ｍＭのクエン酸ナトリウム）、５０ｍＭのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．６）、５×デンハルト溶液、１０％の硫酸デキストラン、及び２０μｇ／Ｌの変性させたサケ精子ＤＮＡを含む溶液中で４２℃にて一晩、インキュベートした後、例えば、約６５℃の０．２×ＳＳＣ溶液中でフィルターを洗浄する条件が挙げられる。

[0028] なお、上記の条件は、ハイブリダイゼーションのバックグラウンドを抑えるために用いるブロッキング試薬を添加、及び／又は、変更することにより設定することもできる。ブロッキング試薬の添加は、条件を適合させるために、ハイブリダイゼーション条件の変更を伴ってもよい。

[0029] 本明細書に開示されるポリヌクレオチドの第２の実施形態は、第１の実施形態において、生物学的試料から抽出された膜小胞の塩基配列から、感染症を検出するためのマーカーである、ポリヌクレオチドである。

[0030] 上述のとおり、第１の実施形態のポリヌクレオチドは、新規な手法により選抜して取得された感染症患者に特異的に発現する膜小胞由来の配列を有する。したがって、生物学的試料から抽出された膜小胞を検体とすれば、感染症（特に歯周病）を検出するための精度の高い診断用マーカとして機能し得る。

[0031] ここで、生物学的試料とは、ヒト、又は、ヒト以外の動物から所得されたサンプルを意味し、所定の前処理が行われたものであってもよい。

このようなサンプルとしては、例えば、唾液、糞便、唾液、喀痰、手術洗浄液、血液、皮膚・身体粘膜の拭い液、及び、スワブ等の採取試料であってもよく、なかでも、唾液が好ましい。

[0032] また上記サンプルは、前処理を行われてもよく、膜小胞を抽出する処理が行われることが好ましい。

[0033] 膜小胞は、上記の生物学的試料に、一形態として宿主細胞（又はウイルスに感染した宿主細胞）等とともに含まれた状態となっており、この宿主細胞から、膜小胞が分離され、取得されることが好ましい。

[0034] 生物学的試料中の宿主細胞と膜小胞とを分離する方法としては特に限定されず、公知の方法が使用され得る。例えば、遠心分離により、膜小胞を上清中に取得できる。更に、分離した遠心上清をメンブランフィルター（例えば、孔径０．１～０．９μｍ）を用いてろ過すれば、遠心上清に残留する宿主細胞等を容易に分離できる。

[0035] 遠心上清には、宿主細胞以外にもタンパク質等の夾雑物質が含まれている場合があるので、例えば、１００～２００ｋＤａカットオフフィルタで濃縮された後、超遠心によって膜小胞を沈殿させて回収する方法も使用され得る。

[0036] また、このようにして得られた沈殿物には、宿主細胞（例えば細菌）由来の構造体（例えば、せん毛、及び、べん毛等）が含まれることがあり、これらを除去するために、例えば、スクロース等を用いた密度勾配遠心法を用いて、更に精製する方法が使用されてもよい。

[0037] 上記処理を含む試料の調製方法をより具体的に説明する。

まず、生物学的試料が容量が１～１００ｍＬ（例えば５０ｍＬ）の遠心管に収容され、３０００～９０００ｒｐｍ（例えば７０００ｒｐｍ）、１～２０℃（例えば４℃）で、１～３０分間（例えば、１０分間）遠心される。

[0038] 上清と沈殿物とに分離されたら、沈殿物には宿主細胞等が含まれているた

め、これが分離され、上清が０．１～０．９μｍ（例えば、０．２２μｍ）のフィルターに通され、別の遠心管に収容され、１～１０℃（例えば、４℃）で保存される。

[0039] 次に、上清が超遠心チューブに収容され、例えば、遠心力として１５０，０００～３００，０００×ｇ（例えば、２１０，０００×ｇ）で、１～１０℃（例えば、４℃）で１～３時間（例えば、２時間）超遠心される。超遠心後、上清が破棄され、沈殿した膜小胞（ＯＭＶ）が緩衝液（例えば、ｐＨ７．４のＰＢＳバッファー）に再懸濁され、１～１０℃（例えば、４℃）で保存される。更に、この超遠心の工程は複数回繰り返えされてもよい。

[0040] なお、単位量あたりに含まれる膜小胞の数（濃度）を調整するために、得られた液は希釈されてもよい。この希釈処理により、後述する単一細胞・粒子解析において、１個体ずつの膜小胞が分離取得されやすくなる。

[0041] 希釈の方法としては特に限定されないが、例えば、動的光散乱法等により観察される液中の膜小胞の濃度に基づき、適当な濃度に希釈する方法が挙げられる。

膜小胞の濃度の観察方法は、粒子にレーザを照射し、その散乱光から各粒子のブラウン運動を追跡し（トラッキング法）、その拡散速度から、Ｓｔｏｋｅｓ－Ｅｉｎｓｔｅｉｎの式に基づき粒子の径と個数とを計算する方法が好ましい。

[0042] 膜小胞を分離して、その塩基配列を取得する方法としては、単一細胞・粒子解析が使用できる。

本明細書において、「単一細胞・粒子解析」とは、「一粒子解析」と同義であり、複数種類、及び／又は、複数個の細胞が含まれる検体（試料）から、膜小胞の１個ずつを分取しゲノム解析する方法を意味する。

単一細胞・粒子解析は、例えば、平面上に配列した多数のマイクロウェルのそれぞれに膜小胞を一つずつ分取し、その膜小胞の個々について、ゲノム解析を行う方法である。単一細胞・粒子解析には、例えば、特許文献１に記載された装置、国際公開第２０１７／０９４１０１号に記載された装置、及

び、国際公開第２０１６／０３８６７０号に記載された装置等のような公知の装置、及び／又は、方法を使用するものが挙げられる。

[0043] 本明細書における、「膜小胞」には、細菌等により産生される外膜小胞、動物細胞等により、エンドサイトーシス経路により産生、放出される「エクソソーム」、及び、アポトーシスによって生ずる「アポトーシス小体」も含まれるものとする。なかでも、歯周病菌、又は、歯周病に関連するウイルスに感染した細胞から産生される膜小胞が好ましい。

[0044] 細菌により産生される（「細菌に由来する」、又は、「細菌の」ということがある）膜小胞としては、細菌の細胞膜の一部が菌体外にくびり取られるようにして産生されたマイクロベシクルである「外膜小胞（ＯＭＶ；ｏｕｔｅｒ　ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｖｅｓｉｃｌｅ）」や細菌が破裂溶菌することによって生じる「内外膜小胞（ｏｕｔｅｒ－ｉｎｎｅｒ　ｍｅｍｂｒａｎｅ　ｖｅｓｉｃｌｅ）」等が挙げられる。その大きさは、特に限定されないが、１０～１０００ｎｍである場合が多く、グラム陰性細菌では１０～３００ｎｍであることが多く、グラム陽性細菌では５０～１５０ｎｍであることが多い。

[0045] なお、膜小胞中に、ウイルスＤＮＡが検出されることがあることを本発明者らは知見しており、本明細書に含まれる「膜小胞」には、ウイルス由来のＤＮＡが含まれていてもよい。

[0046] 本明細書に開示されるポリヌクレオチドの第３の実施形態は、第２の実施形態において、上記の感染症が、歯周病である、ポリヌクレオチドである。

[0047] 上述のとおり、配列番号１～４の塩基配列からなるポリヌクレオチドは、健常者、及び、歯周病患者の唾液から抽出された膜小胞に由来するＤＮＡ塩基配列から決定された。第３の実施形態のポリヌクレオチドは、この歯周病患者に特異的に発現し、かつ、マーカーとしての適格性が確保された配列に基づくものであり、唾液を含む検体（又は唾液そのもの）からの歯周病の検出のためのマーカーとして、偽陽性のリスクがより大きく低減される。

[0048] 本明細書に開示されるキットの第１の実施形態は、配列番号１～４からな

る群より選択される塩基配列から設計されるプライマーセット、及び／又は、プローブを含むキットである。

[0049] 上述のとおり、配列番号１～４からなる群より選択される塩基配列は、歯周病患者に特異的に発現する膜小胞のＤＮＡ塩基配列から選抜されたマーカー配列である。これをもとに設計されたプライマーセット、及び、プローブは、リアルタイムｑＰＣＲ等による、上記マーカーの増幅に適する。

[0050] 本明細書に開示されるキットの第２の実施形態は、以下の（ｅ）～（ｎ）からなる群より選択される少なくとも１種の領域から設計されるプライマーセット、及び／又は、プローブを含むキットである。

[0051] （ｅ）配列番号３の６４１塩基から、７６８塩基までの領域（配列番号５）、

（ｆ）配列番号２の９９２塩基から、１１２９塩基までの領域（配列番号６）

（ｇ）配列番号２の１２２３塩基から、１３３８塩基までの領域（配列番号７）

（ｈ）配列番号２の６９５塩基から、７９３塩基までの領域（配列番号８）

（ｋ）配列番号４の３９３８塩基から、４０３０塩基までの領域（配列番号９）

（ｍ）配列番号４の２３７７塩基から、２４８４塩基までの領域（配列番号１０）

（ｎ）配列番号４の２７０５塩基から、２８０６塩基までの領域（配列番号１１）

[0052] 配列番号５～１１は、それぞれ、配列番号１～４から選択された所定の領域である。すなわち、配列番号１～４の塩基配列の一部である。これらの配列（領域）は、特に、ｑＰＣＲ法による検出に適した１００ｂｐ程度の配列として選択されたものである。言い換えれば、上記配列（領域）に基づくプライマーセット、及び／又は、プローブを含むキットは、感染症（特に歯周病）を精度よく検出するのに使用され得る。

[0053] 本明細書に開示されるキットの第３の実施形態は、以下の（ｐ）～（ｔ）からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列からなるポリヌクレオチドである。

[0054] （ｐ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

（ｒ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列

（ｔ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

[0055] 上述のとおり、配列番号５～１１は、配列番号１～４の塩基配列の一部であり、特に、ｑＰＣＲ法による検出に適した１００ｂｐ程度の配列として選択されたものである。上記塩基配列に基づく、第３の実施形態のキットは、感染症（特に歯周病）を精度よく検出するのに使用され得る。

[0056] なお、（ｒ）の塩基配列は、配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して８５％以上の相同性を有することが好ましく、９０％以上の相同性を有することがより好ましく、９５％以上の相同性を有することが更に好ましく、９８％以上の相同性を有することが特に好ましい。

[0057] 本明細書に開示される診断方法の第１の実施形態は、生物学的試料から抽出された膜小胞の塩基配列を解析し、以下の（ａ）～（ｃ）［ａ，ｂ，ｃ］、及び、（ｐ）～（ｔ）［ｐ，ｒ，ｔ］からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列からなるポリヌクレオチド、又は、その一部の存否を確認することと、を含む、診断方法である。

（ａ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

（ｂ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列

（ｃ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

（ｐ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

（ｒ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列

（ｔ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

[0058] 上記ポリヌクレオチドは、感染症（特に歯周病）の診断のためのマーカーであり、上記診断方法は、言い換えれば、マーカーを定量的、又は、非定量的に検出することにより、生物学的試料の提供者（被験者）が感染症（典型的には歯周病）に、り患していること、又は、その進行状況を診断するための情報を得る方法である。

[0059] なお、存否の確認は、定量的であっても、非定量的であってもよい。非定量的な存否の確認は、例えば、上記マーカーが生物学的試料から分離された膜小胞の塩基配列中に存在するか否かの測定、及び、コントロール試料との比較等が挙げられる。一方、定量的な存否の確認は、上記マーカーの発言の濃度、及び／又は、量を測定する方法が挙げられる。なお、存否の確認には、上記マーカー、又は、その派生化合物と結合する他の化合物を用いることもできる。

[0060] なお、存否の確認に用いられる方法（検出方法）としては特に限定されないが、例えば、リアルタイムＰＣＲ、ｑＰＣＲ、リアルタイムｑＰＣＲ、ノーザンブロッティング、マイクロアレイ、免疫測定法、ＳＡＧＥ法、ＣＡＧＥ法、質量分析法、分子間相互作用解析、及び、次世代シークエンサー等が挙げられ、なかでも、リアルタイムＰＣＲ、又は、リアルタイムｑＰＣＲが好ましい。

[0061] リアルタイムＰＣＲ、リアルタイムｑＰＣＲは、ＰＣＲによって増幅する

核酸をリアルタイムでモニタリングする方法である。例えば、ＬｉｇｈｔＣｙｃｌｅｒ４８０ＳＹＢＲＧｒｅｅｎＩＭａｓｔｅｒ（Ｒｏｃｈｅ）等の市販のキット等を用いて実施可能である。

[0062] 上記モニタリングの方法としては、インターカレーション法、ハイブリダイゼーション法、ＬＵＸ（ＬｉｇｈｔＵｐｏｎｅＸｔｅｎｓｙｏｎ）法などが挙げられる。インターカレーション法の典型的な方法は、ＳＹＢＲＲＧｒｅｅｎＩなどの蛍光物質が二本鎖の核酸に入り込み、励起光の照射によって発光を発する特性を利用して核酸量を測定する方法である。蛍光の強さは核酸の量に比例して強くなるため、蛍光強度を測定することによって核酸の増幅量を知る事ができる。

また、リアルタイムＰＣＲを使用した定量方法では、大きく分けて絶対定量法と相対定量法の２つの定量方法がありそれらを適宜使用できる。

[0063] また、検出方法の一形態として、上記マーカー（若しくはその一部）、又は、上記マーカー由来の派生物質に結合可能な物質を標識物質で標識し、リアルタイムＰＣＲ、及び、ノーザンブロッティング等に使用することができる。この標識は公知の方法により行うことが可能である。

[0064] 標識物質としては、蛍光色素、酵素、補酵素、化学発光物質、及び、放射性物質等の当業者に公知の標識物質を用いることが可能であり、具体的な例としては、ラジオアイソトープ、フルオレセイン、ローダミン、ダンシルクロリド、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、ホースラディッシュパーオキシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、サッカリドオキシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、及び、ビオチン等が挙げられる。

[0065] なお、標識物質としてビオチンを用いる場合には、ビオチン標識抗体を添加後に、アルカリホスファターゼ等の酵素を結合させたアビジンをさらに添加してもよい。

[0066] また、本明細書において、プライマーセットとは、フォワードプライマーとリバースプライマーとからなる一組のプライマーを意味する。プライマー

は、典型的には、リアルタイム（ｑ）ＰＣＲ用であることが好ましく、このようなプライマー、及び、プローブの設計方法は公知である。リアルタイムＰＣＲ用のプローブ及びプライマーの設計は、例えば、ＰＲＩＭＥＲ　ＥＸＰＲＥＳＳ（登録商標）ソフトウェア（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、ＦｏｓｔｅｒＣｉｔｙ、ＣＡ）、Ｐｒｉｍｅｒ　Ｑｕｅｓｔソフトウェア（Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社）等のソフトウェアを使用して行うことができる。

[0067] 本明細書に開示される診断方法の第２の実施形態は、第１の実施形態において、更に、被験者から上記生物学的試料を採取することを含む、診断方法である。

[0068] 上記診断方法によれば、被験者が感染症にり患しているかを診断できる。被験者から採取される生物学的試料は特に限定されないが、唾液そのもの、又は、唾液を含む試料であることが好ましい。

[0069] 本明細書に開示される診断方法の第３の実施形態は、診断方法の第１又は第２の実施形態において、上記感染症が歯周病である、診断方法である。

[0070] 上述のとおり、配列番号１～４は健常者、及び、歯周病患者から採取された検体に基づき選抜されたマーカー配列であり、配列番号５～１１は、その一部領域である。これらに基づく診断方法においては、感染症が歯周病である場合、より正確、かつ、偽陽性のリスクが低減された精度の高い結果が得られる。

[0071] 本明細書に開示される診断方法の第４の実施形態は、感染症の診断方法であって、生物学的試料から抽出された膜小胞の塩基配列を解析し、診断方法の第１又は第２の実施形態のキットを用いて標的核酸領域の増幅を検出することで、感染の有無を診断するための情報を得る、診断方法である。

[0072] 本明細書に開示される診断方法の第５の実施形態は、第４の実施形態の診断方法において、更に、被験者から上記生物学的試料を採取することを含み、上記感染症が歯周病である、診断方法である。

[0073] なお、第４、及び、第５の実施形態の診断方法における生物学的試料は特

に限定されないが、唾液そのもの、又は、唾液を含む試料であることが好ましい。

実施例

[0074] ［検体採取］

健常者３人、及び、歯周病患者６人からそれぞれ唾液を入手した。歯周病患者については、ステージＩＩＩ・グレードＣ（アメリカ歯周病学会・ヨーロッパ歯周病連盟による歯周病分類）に分類される患者を対象とした。これらの患者については、３か月間に亘って抗生物質の投与がなく、非喫煙者であり、糖尿病、その他の全身性疾患の無いものを対象とした。唾液の採取は、Ｓａｌｉｖａ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ Ａｉｄ （Ｓａｌｉｍｅｔｒｉｃｓ ＬＬＣ． Ｃａｒｌｓｂａｄ， ＣＡ）を用いて実施された。健常者３人のサンプルを混和したものを健常者サンプルとし、歯周病患者６人のサンプルを３人分ずつ混和したものを、歯周病患者サンプル１、及び、歯周病患者サンプル２として、その後の解析に使用した。なお、以下では、健常者サンプル、歯周病患者サンプル１、及び、歯周病患者サンプル２をあわせて、「唾液サンプル」ということがある。

[0075] ［細胞膜小胞の分離］

唾液サンプルを７８００ｒｐｍ、４℃の条件で１０分間遠心し、沈殿物と上清に分離した。分離した遠心上清を、メンブレンフィルター（孔径０．２２μｍ）を用いてろ過し、上清に残留する菌体等を除去した。得られたろ過後の上清からＥｘｏＢａｃｔｅｒｉａ ＯＭＶ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ （Ｓｙｓｔｅｍ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ， ＣＡ， ＵＳＡ）によって膜小胞のみを分離した。

[0076] ［膜小胞外の核酸成分の除去］

分離後の膜小胞サンプルに対してデオキシリボヌクレアーゼ（ＤＮａｓｅ）処理を行い、膜小胞外部にある核酸成分を分解した。具体的には１００μＬの精製後の膜小胞サンプルに対して、２μＬのＤＮａｓｅ（１３ ｕｎｉｔｓ （Ｕ）／μＬ）を添加し、３７℃で３０分、８０℃で１０分の処理を

行なった。

[0077] ［濃度調整と粒子数定量］

膜小胞サンプルを希釈し、４００００粒子／μＬの濃度になるように膜小胞の濃度の調整を行なった。膜小胞の粒子数の定量方法としては、粒子にレーザを照射し、その散乱光から各粒子のブラウン運動を追跡し（トラッキング法）、その拡散速度から、Ｓｔｏｋｅｓ－Ｅｉｎｓｔｅｉｎの式に基づき粒子の径と個数とを計算する方法をとった。測定と算出には、Ｚｅｔａｖｉｅｗ（ＤＫＳＨ，Ｇｅｒｍａｎｙ）を用いた。

[0078] ［一粒子解析］

膜小胞が１粒子ずつ封入されるように濃度調整を行なった上で、膜小胞サンプルとアガロースゲルを混和し、膜小胞１粒子ごとに１ゲルビーズに封入した。

[0079] 封入後の膜小胞を下記の試薬を加えることで溶解させた。

５０U／μＬ Ｒｅａｄｙ－ｌｙｓｅ Ｌｙｓｏｚｙｍｅ Ｓｏｌｕｔｉｏｎ （Ｅｐｉｃｅｎｔｒｅ）、

２U／ｍＬ Ｚｙｍｏｌｙａｓｅ（Ｚｙｍｏ ｒｅｓｅａｒｃｈ）、

２２U／ｍＬ ｌｙｓｏｓｔａｐｈｉｎ（ＭＥＲＣＫ）、

２５０U／ｍＬ ｍｕｔａｎｏｌｙｓｉｎ（ＭＥＲＣＫ）、

この処理はＤＰＢＳ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｐｈｏｓｐｈａｔｅ－Ｂｕｆｆｅｒｅｄ Ｓａｌｉｎｅ）中、３７℃で、一晩（オーバーナイト）処理した。

[0080] 次に、０．５ｍｇ／ｍＬ ａｃｈｒｏｍｏｐｅｐｔｉｄａｓｅ（ＭＥＲＣＫ）ｉｎ ＤＰＢＳ、３７℃で８時間処理した。

最後に、１ｍｇ／ｍＬ プロテアーゼ（Ｐｒｏｔｅｉｎａｓｅ Ｋ （Ｐｒｏｍｅｇａ））と０．５％ ＳＤＳ（Ｓｏｄｉｕｍ ｄｏｄｅｃｙｌｓｕｌｆａｔｅ）をＤＰＢＳに溶解させた溶液によって、４０℃で一晩処理を行なった。

[0081] 溶解後のゲルビーズ内ＤＮＡは、ＲＥＰＬｌ－ｇ Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｅｌ

Ｉ Ｋｉｔ （ＱＩＡＧＥＮ）によって増幅操作を行なった。ＤＮＡ増幅を行なった後、ゲルビーズＤＮＡ分子を核酸染色試薬（１× ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ）によって染色し、一定以上の蛍光が観察されたゲルビーズを、セルソーター（ＦＡＣＳＭｅｌｏｄｙ ｃｅｌｌ ｓｏｒｔｅｒ （ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ））によって、９６ウェルプレートに１ゲルビーズずつ分離採取した。

[0082] 次いで、ウェルプレートに分取した上でＲＥＰＬＩ－ｇ Ｓｉｎｇｌｅ Ｃｅｌｌ Ｋｉｔ で二度目の増幅操作を行い、Ｎｅｘｔｅｒａ ＸＴ ＤＮＡ Ｌｉｂｒａｒｙ Ｐｒｅｐ Ｋｉｔ （Ｉｌｌｕｍｉｎａ） を用いてＩｌｌｕｍｉｎａ用のライブラリ作製を行なった上で、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｍｉｓｅｑ又はＨｉｓｅｑを用いて、シークエンシングを行い、ショートリードの塩基配列を得た。これらの操作を健常者サンプルについては１９２粒子、患者サンプルについては５７６粒子に対して行い、１粒子ごとに塩基配列を得た。

[0083] ［データ処理］

得られたショートリード塩基配列（１５０ｂｐ程度）の中でシークエンスのクオリティが低い配列を、ｆａｓｔｐ（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．， ｆａｓｔｐ： ａｎ ｕｌｔｒａ－ｆａｓｔ ａｌｌ－ｉｎ－ｏｎｅ ＦＡＳＴＱ ｐｒｅｐｒｏｃｅｓｓｏｒ． Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ３４，１７， ２０１８）を用いて除去した。

[0084] その後、ＳＰＡｄｅｓ（Ｂａｎｋｅｖｉｃ ｅｔ ａｌ．， ＳＰＡｄｅｓ： Ａ Ｎｅｗ Ｇｅｎｏｍｅ Ａｓｓｅｍｂｌｙ Ａｌｇｏｒｉｔｈｍ ａｎｄ Ｉｔｓ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｔｏ Ｓｉｎｇｌｅ－Ｃｅｌｌ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ． Ｊ． Ｃｏｍｐｕｔ． Ｂｉｏｌ．， １９， ５， ２０１２）を用いて、これらのショートリード配列を結合（ａｓｓｅｍｂｌｙ）させ、数ｋ～数十ｋｂｐ程度のコンティグ（ｃｏｎｔｉｇ）と呼ばれる長い塩基配列を作成した。

[0085] 各膜小胞内部の塩基配列のうちタンパク質コード領域（ＣＤＳ）をｐｒｏ

ｋｋａ（Ｓｅｅｍａｎｎ，　Ｐｒｏｋｋａ：　ｒａｐｉｄ　ｐｒｏｋａｒｙｏｔｉｃ　ｇｅｎｏｍｅ　ａｎｎｏｔａｔｉｏｎ．　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ，　３０，　１４，　２０１４）を用いて予測・検出し、それらのＣＤＳの一つ一つに対し、ＮＣＢＩの全タンパク質配列　ｎｒデータベースとＧＴＤＢデータベースをリファレンスとして相同性検索を行い、一致度の最も高いＣＤＳ領域をゲノム中に最も多く有する細菌がその粒子の宿主細菌であると判断した。

[0086] 相同性検索には、ｄｉａｍｏｎｄ（Ｂｕｃｈｆｕｎｋ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｅｎｓｉｔｉｖｅ　ｐｒｏｔｅｉｎ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔｓ　ａｔ　ｔｒｅｅ－ｏｆ－ｌｉｆｅ　ｓｃａｌｅ　ｕｓｉｎｇ　ＤＩＡＭＯＮＤ，　Ｎａｔ．　Ｍｅｔｈｏｄｓ．，　１８，　２０２１）を使用した。この際、ウイルス由来のＣＤＳが含まれる膜小胞も検出されたため、それらの膜小胞については内部のウイルス由来ＤＮＡの帰属情報（ウイルスの種）を得た。

[0087] 全粒子の解析の結果得られた膜小胞の宿主細菌プロファイルについて、健常者サンプルと患者サンプルの比較を行い、患者サンプルにおいて最も存在量比の高かった細菌分類群としてＰａｔｅｓｃｉｂａｃｔｅｒｉａ門を得た。

[0088] 図１は、健常者サンプルと、歯周病患者サンプル内の膜小胞の塩基配列のプロファイルの比較結果である。検出された塩基配列の情報を基に、各膜小胞内部の塩基配列が由来する細菌の分類群を特定した。図１は各細菌株を門レベル（ｐｈｙｌｕｍ）と属レベル（ｇｅｎｕｓ）で分けた場合の検出塩基配列長を頻度としてヒートマップで表したものである。歯周病患者サンプルでＰａｔｅｓｃｉｂａｃｔｅｒｉａ門に属するＴＭ７ｘ由来の塩基配列が高頻度に検出されることがわかった。

上記に属する宿主細菌株のうち、最も検出数の高かった細菌株Ａ（Ｐａｔｅｓｃｉｂａｃｔｅｒｉａ　ＴＭ７ｘ　ｓｐ９００５５５２６５）を歯周病患者特有の膜小胞宿主細菌株とした。

[0089] また、ウイルス由来配列を対象とした同様の比較も行った。図２はその結

果であり、各膜小胞で検出されたウイルス由来塩基配列の領域長を種ごとに表示したものである。上記比較によって、健常者に比べ歯周病患者において最も検出数の多かったウイルス種Ｂ（Ｐｏｄｖｉｒｉｄａｅ　ｃｔＵｉＢ３）を歯周病患者特有のウイルスとした。

[0090] 上記の細菌株Ａ（またはウイルス種Ｂ）の全ゲノム配列（ドラフトゲノム配列）に対して、細菌株Ａ由来と判定された膜小胞由来のシークエンスリード（又はウイルス種Ｂ由来のＣＤＳを含む膜小胞由来のシークエンスリード）をマッピングし、有意に多くの膜小胞で検出率の高かったゲノム領域をその膜小胞における頻出ＤＮＡ領域とした（Ｈｙｐｅｒ－ｇｅｏｍｅｔｒｉｃ　ｄｉｓｔｒｉｂｕｔｉｏｎ　ｔｅｓｔ：　ｐ値＜１．０$^{-06}$）。

[0091] 次に、上記頻出領域をクエリー配列とし、ＮＣＢＩに登録されている全ドメインにわたる生物のタンパク質配列（ｎｒ）をリファレンス配列として相同性検索を行った（ｄｉａｍｏｎｄ）。

ヒットしたデータベース上のタンパク質コード配列の中から、同株もしくは同種が属する分類群（細菌の場合は門、ウイルスの場合は科）の配列を除く上位２０のタンパク質コード配列のアラインメントスコア（Ｍａｘ　Ｓｃｏｒｅ）の総和を計算し、それらの値が最小となった配列のみをバイオマーカー候補配列として選択した。

[0092] 次に、上記バイオマーカー候補配列を、健常者の膜小胞から得られたコンティグに対して相同性検索を行い、上位２０のタンパク質コード配列のアラインメントスコア（Ｍａｘ　Ｓｃｏｒｅ）の総和を計算し、それらの値が最小となる配列を選抜した。

[0093] 更に、健常者で検出された膜小胞の宿主細菌の中で、上記細菌株Ａと同分類群（門レベル）に属する細菌株を宿主とする膜小胞由来シークエンスリードを、細菌株Ａのゲノムに対してマッピングした。これら健常者由来膜小胞のシークエンスリードで検出された領域を、上記バイオマーカー候補配列から除外することにより、最終的な歯周病検出用のバイオマーカー配列（配列番号１～３）を選択した。

[0094] 図３は、歯周病患者に特異的に検出される領域（バイオマーカー配列）の決定手順を表す図である。

図３（Ａ）は、歯周病患者サンプル由来の膜小胞のうち、ＴＭ７ｘ　ｓｐ９００５５５２６５　由来と判定された膜小胞内部の塩基配列を参照配列（ＴＭ７ｘ　ｓｐ９００５５５２６５のゲノム配列）にマップさせた結果の一例を表す図である。図３（Ａ）の縦軸は個々の膜小胞を表し、横軸は、ゲノム配列上の位置を表す。

また、図３（Ｂ）のヒートマップは、図３（Ａ）において、高頻度に検出されたゲノム領域を表している。横軸は、ゲノム配列上の位置を表す。

[0095] これに対し、図３（Ｃ）は、健常者由来の膜小胞のうちＴＭ７ｘ　ｓｐ９００５５５２６５が含まれる、Ｐａｔｅｓｃｉｂａｃｔｅｒｉａ門由来と判定された膜小胞を参照配列（ＴＭ７ｘ　ｓｐ９００５５５２６５のゲノム配列）にマップさせたものである。縦軸、及び、横軸は、図３（Ａ）と同様である。

図３（Ｄ）のヒートマップは、図３（Ｃ）において、高頻度に検出されたゲノム領域を表している。横軸は、ゲノム配列上の位置を表す。

[0096] 図３（Ｅ）は、上記図３（Ｂ）、図３（Ｄ）の比較から、歯周病患者に特異的に検出されたゲノム領域をマップしたものである。このそれぞれが、バイオマーカー配列となる。

[0097] ウイルス配列の場合も同様に、健常者で検出されたウイルス由来配列の中でもウイルスＢと同分類群（科レベル）に属するウイルス由来ＣＤＳを含む膜小胞由来シークエンスリードを、ウイルスＢのゲノムに対してマッピングした。健常者由来膜小胞のシークエンスリードで検出された領域は無かったため、上記で得られたバイオマーカー候補配列をそのままバイオマーカー配列とした（配列番号４）。これらの配列のうち連続した１０００ｂｐ以上のＤＮＡ領域を対象とした。

[0098] 図４は、歯周病患者に特異的に検出される領域（バイオマーカー配列）の決定手順を表す図である。

図４（Ｂ）は、歯周病患者サンプル由来の膜小胞のうち、Ｐｏｄｖｉｒｉｄａｅ　ｃｔＵｉＢ３由来と判定されたＣＤＳ領域を含む膜小胞内部の塩基配列を参照配列（ｃｔＵｉＢ３のゲノム配列）にマップさせた結果の一例を表す図である。図４（Ｂ）の縦軸は個々の膜小胞を表し、横軸は、ゲノム配列上の位置を表す。

また、図４（Ａ）は、領域ごとの検出頻度を表し、図４（Ｃ）のヒートマップは、図４（Ａ）において、高頻度に検出されたゲノム領域を表している。いずれも、横軸は、ゲノム配列上の位置を表す。このゲノム領域がバイオマーカー配列となる。

[0099] ［プライマー配列、オリゴヌクレオチドプローブ配列の選定］

得られたバイオマーカー配列の中から、プローブ法（５′－ヌクレアーゼ法）によるｑＰＣＲでの検出に適した１００ｂｐ程度の配列を複数選択した（配列番号５～８（細菌由来）、配列番号９～１１（ウイルス由来））。

この対象配列の選択ならびにプライマー配列、オリゴヌクレオチドプローブ配列の設計にあたっては、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ社が提供するＰｒｉｍｅｒ　Ｑｕｅｓｔ（登録商標）Ｔｏｏｌ（ｈｔｔｐｓ：／／ｓｇ．ｉｄｔｄｎａ．ｃｏｍ／ｐａｇｅｓ／ｔｏｏｌｓ／ｐｒｉｍｅｒｑｕｅｓｔ）を用いた

[0100] この対象配列を増幅産物に含むよう設計されたプライマー（対）とプローブを用いて、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ社Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓブランドが提供する、「ＴａｑＭａｎ（登録商標）　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｍａｓｔｅｒ　Ｍｉｘ」を組わせることで、唾液サンプルを用いた歯周病患者特有の膜小胞由来塩基配列、すなわち、歯周病の検出を行うことができる。

[0101] ［配列番号１：歯周病マーカー配列（細菌由来）］

ＧＣＡＴＡＣＡＴＣＧＴＧＡＡＴＧＡＣＡＴＣＴＴＧＴＣＣＧＡＣＣＧＡＡＣＴＣＣＴＧＧＡＣＴＴＣＡＣＧＧＣＴＧＧＡＴＧＧＧＣＧＴＣＡＡＴＧＧＣＧＴＴＣＧＡＡＣＣＴＣＴＧＣＡＡＡＧＡＣＴＧＧＴＡＣＧＴＣＡＧＡＣ

AAGGGTTCACAGCCAAAAGACCTCTGGATTATCA

ACTACAGCCCAGCTCTAGTCATGGGAATGTGGCT

CGGAAACTCCGACACTAGCGTGATTGGTACATCA

GCCTCCAACTACGGCATGCCAGTAATTAGAAGCG

TTATGGAATTTGCCCACACCCAAGTTTATGCCAA

AGAAGGCAAATGGAAGTCAGGTCAATGGTATGAG

CGACCAAGCGGAATCCAGACTGTCAACGGTGAGC

TCTACCCATCATGGTGGAATAAGAGACAAAGTCA

ATCTACAGAGAAAATCACCTTCGATAAAGTCTCT

AAGAAAAAGGCAACAAACTGTACTCCGGATGGCG

CAAGGGAAGAGATTGAAGTGACAAAGATTATCGA

TCCTTTGACTAAGAAAGAATCAATTACCGTTCCT

TCAGGATATGACGCGAACGCAGAAGATGACGTTC

ACAAGTGCGACGACACTAAACCGCAAATTGGAGC

AATATCATACACCAACAGCGGTAAGAAATATACG

ATAAATGTCGACGTTACAGCAGGAACTTGGGGCT

TATCGGCAATCGAAATTACCGTGGACGGAAAGAG

CATTAAGAGTTCAGAAATTACTTCAAGCGGCAAG

CAGACCGCTACGGTAGAGTTTGACACAACAGGAG

CGCACACAGTTTCTGTAACCGTCAGAGACTCTGC

ATATTACACTGCCACTTCAACTGGTAGCATCCAA

GTCAACTAAATAAACTATTGTTTATTCACCAAAT

TAATCAGCTCAGCCTCGTGTTGAGCTGATGTTTT

TGAGCGACCATTTGTGCGCTTCTTAGGAACGCTG

GTCTTCTGCTTTACAGGTTTTTTCTGTTCAACCA

CAAGCTTCGCAAACATCATTTTTCCAGCGTCGGT

CTGCAAACTTCGGATGATCTCAATCTTCTTCGTT

TGTCCAATGTAGCGCTTGGCGTTCTCAACAACCA

CCATCGTTCCATCTTTCAAATAGCCAACCGCTTG

ATGAGAATCTTGCCCCTTCTGCGACAACTCCAAA

TCCAGCTCGTCACCAGGTAAATAGCTCATCCTCA

AACTTTTCGCCAGCTCATTGATATTCAAAACCTT

AACGCCGTCAACTTGCGCCACCTTATTCAAATTG

TAATCAAGCGTCAATACCGCCGCATCCATTTCCT

TTGCCAATTTCAATAAGCGCGAATCCACACCTTC

CGGCACGCGAATATTGTCGTCATATAGCTCGAAT

GAAGACTTCAAAATATCCTTAAGCTCCTTCACGA

CATCCATACCGAATCGCGCCCTTTCGCGCTTGTC

ATGGTCTGCGCCGTCGGCTAATAATTGCAATTCC

GTCAACACGCTCCTTGGTACAATAACTTTTCCCA

GTAAAAATCCAGTCTTCGCCAGTTCAGTCACTCG

CCCATCCATAAGTACTGACGTGTCGACCAAAATC

GGCACCGCGCCCACAGATGAATTTCGTCGCGGTT

TTGCCAAGAAATAAACCTCAGCCGCCAAACCAAG

CAACATTATAATTATTATCAATCCGTAAAAATCT

TTCATTTTTTCCTTTCTATTGTAAATAGTCAATC

AGCGCCTGTCGCATATCGCTGACGCCTTTTATAA

ATTTATCTTTATGAACTTTCGGCGCAATCGCATA

AGTGAAGCCCAGCTTCTTCGCCTCTTTAATTCGA

GCTTGCCAATTCGTCGCCGAGCGAACCTCACCAC

CCAAACCAATCTCACCAAACACCACAGCGCCTTC

GTCCAGACTTCGCCCAGCACTAGCGCTAGCAATC

GCCATCGCCACCGCCAAATCGGCCGCTGGATCAT

TTAATTTCAGACCGCCGACCACATTGACATAAAT

ATCCTTATCCGCCAACTTCAACTTTGTTCGCTTT

TCCAAAACCGCCACCAACAGATTCAATCGATTCA

AATCAAAACCACTCGCCGTGCGCTTAGGATAGCC
GAAGTTTGTAGGGTTGACTAGCGCCTGAATCTCC
ACCAAAAGCGGACGTGCGCCTTCCATGGTCGCCA
GCACAATTGACCCATCCAGATTCTGCCGCTCTGC
CAGAAGTTCCGCCGACGGATTCTTCACGATTCTT
AATCCCTGCTCGTCCATCTCAAAAATAGCCGCTT
CGTTAGTCGAGCCGTATCTATTTTTCTGCGCCCG
AACGACTCGAAAACCGCCATATCGATCGCCCTCA
AAATTCAGCACAACATCCACCAAATGCTCCAATA
TTTTCGGACCAGCAATTGAACCCTCTTTGGTGAC
GTGACCAACCAAAATCACTGCCGTGCCCGAAGCT
TTGGCGGCACGAATAATTACATTTGACGAGTTGG
TGATTTGACTGACAGACCCTGGAGCGGAGGAAAT
CTCACTGAGAGAAATTGTCTGAACTGAATCGACA
ATTGCCAGATCATATCCGCCTTGCTGAATTGACG
CCGCAATATCTTCCGCGCTATTACTGGACGCCAG
CTGCATTTTTTCCGAATCAGCCGCACCCAAACGC
TTCGCACGAAGCTTCA

[0102] ［配列番号２：歯周病マーカー配列（細菌由来）］

CCAGCGCCTGTCCGTCTAGCGATATATATTTTCC
CAGAGGAATAACCAATAACGATGCGGTCAAAAAC
GCGATTCCCACCGCCGAGACAATTTTCTCATGTT
TTTTCTGATATCTCGGACCGCTTAAAAGAAGCAT
AATTAACGGAATCAACGTTAAGACTAATCCCGAA
ATTACACCATTTGGCAATAAACCAGTTTCCAATT
TCAAGCCGTCCAACACTCCCGTCAGCCAGCTGCC
CCACCATTCTGATAGTAAAAATCCCGTCGCCAAC
GACAACGCTAATGGACCAAATCTTCGAGATGAAA

CAAATGCAACCGCAAAAACCGTTATTAAAATTAC

TCCAAATAGAATTATTACGCTCATTTATCTTCCT

CCAAATCAAATTTTACCTGTGATCCAACTGTAGC

GCTCGCCTGCTTAGCAACTCCTGCCTTCACCTCC

AACACGTACTTTGCGGGAACCGGTGGCGCATATT

TTTCATACGGTTCAGCGTCTGACTTGACGTTATG

TTTTACATAGACAACGCGCTTTTTTATCATTAATC

CAAACCATATCAACCGAGAACTTCATATCTTTCA

TCCACATTTTTATGACGATCATTGTGATCAAAAAC

AAACAGCATGGCATAATTTTCATCAATCCCCAAT

CTTCCGGACAGACCTTTCCGCTGCGATTCTTCGT

CATTAGCAATTTCCGCCCGAAGCATCGTCTTATT

CAGGTAAATTATTTCCGTTTTTGGCGAAACTGTT

CGAAAAGCATAAAAAATTGCCCCACCAATAACCA

TCAGCATGCCGCAGATAAATATCCATTTAATAAC

AGTCTGAGTTACTGTCGAGTGACGATGCTCGTCC

ATAAACCTATTATAACAAGTTTATGCTTAAGCAC

CGATTTTATCTTTTTTATTGCCACGCTTGGCGTT

TCGATCGATGTATTCAATTATCTTTCCGGCCACA

TTTCGGCGAGTAATTTTCTCAATTCCAAATCCTG

GACTAGCATTAACTTCCAGCACCAAAGCACCACG

ACTTGATCTCATGAAGTCGACTCCAGCAACTGTC

AGTCCCATTGCCTTAGCGGCTTTCACGCACATTT

TACGTTCAGAATCTGTCAATTTTATACTGGTTCC

TTCGCCGCCCTTGTGTAAATTGCTACGAAAATCA

TCGTCCAAACTCTGACGCTTCATACTAGCCACCA

CTTGACTACCAACCACAAACGCACGAATATCGAC

ACCAGCCGACTCTCTAATAAACTCCTGAAGCAGT

ACGTTCGTGCCGTCCGAGTTGGTCAAATAGAACG
CCTGCAGAACCGACTTGGCAGCCTTTTTAGTTTC
CGCCAGAACCACGCCATTTCCGTGCGTGCCGCGC
GCCAACTTAATAATCGCCGGCATACCACCAATCT
CTTCAATGAGCGAATCAATGTCAGTTGCGTTTCG
GGAAAAGACCGTCTTCGGGATCGACACTCCAGCT
TTTACCAATAACTGCGTTGAGCGCAATTTGTCTC
GCGCCCTAGTAATTGCAATCGAGCGATTCATGAA
AAACGCCTTCGGATACATCATCTCCAATTGACGC
AAAACCGCTGTTCCATACTTTGTCATGTGGCTCG
CGATTCGCGGAATTACTACGTCAAATTCACCAAT
TTCTTTGCCTTTATAAATAACCGTCGGATGCTTT
TCGTCAATTGAAACGTAGCAGTTTTTATACTTAA
TAACTTTAACTTGATGACCGCGCTTTTCAGCCTC
TTCTTTCAGGCGAAGCGTCGAATAATTAATGTTG
CCGTTGGATAAGATTGCAATTCGCATTACTTTTC
TTCACCTTTCTGATGATATTTTTTATAAAATTCG
TATGGATTCAATTTTACTTCTTCATTAAGACTAG
CAGTTACGGACGGTTTTTTCCTGCGAACATTTTT
TCTTGATACGTCCACTAGGAATTTTCCAGAAATT
GACCGTCTTCCAATTAACACCGGAAATTCATTCT
TTGACCGATCGGATAGATTCATCAACAT

[0103] [配列番号３：歯周病マーカー配列（細菌由来）]

TCGCGTAATTTCTGGTTCGTTACGTAATTGCGAT
CATAAGTCACCACAACACCCGGCGCAATCGCCAA
AGTGTTTGAACCATCATTCCATTGCTCACGAGCA
GCAGCAATCGGATCGCCACCGCCACACTCAATCA
ACGTAACACTCGGCAAGCCAAGTGCAACTCTCAA

GACGTGTTCCAAATCTGTTTCGTGTGTAATTCGT

GGGAATGGCTGACCTTCAACCTTCTCCAAAATGA

AACAATTCATCCTGCCGCCATGGTCGCGAATCTC

TGGGTGAATCGTAAACTTATCACGATCAATCATC

GTAAACACGGTGTCTAGGTGCATAAAGGCGTGAG

ATTTTGGAATTTCCATAGCGATGACTTTCTCGAA

TTTCGAGCCAGCAAACAATTTCGTTGCCATCTTT

TCAATTGCCTCAGCAGTTGTTCGCTCTGAAACGC

CAATTGCCATAACCTTATCGCTTAATACTAATTC

GTCGCCGCCTTCCATTGAGAATTTCTCTGTGCGG

TTGTACCAAACTGGCGCACGATTAGCAAAGCGTG

GATGATGGTCGATGATATAACGCATAAATAGCGA

TTCACGACGACGAGCCGTCCAGTGCATCTTGTTG

ATTGTCAAACCGTTACCAATTGCGGCAGCTGGGT

CGCGTGTAAAGTATAGATTTGGCATTGGATCGAG

ATAGAACGGATAATGATTTTTCTCGATCATATTA

TGAAGTTGCTGATGCTGATCTGGAGGCAAAGTAA

TTTCATCCTTGCGAACACCAGCCATAATCTTGCG

AATCATAGCGTGAGTCGGCAAGTCCAACAAGAAT

TGACGCAATGTTTGAGTAACGCGGCGTGAATCCT

GCTTAGAAGCAGCCAACATTTCATCGACAAACTG

TTCACGCAATTGATCTGTGCTAATTGCCTCGGCG

ACCAATTGATCCAGATACAAAACTTCGATTCCAC

GACTTCTCAATACTTCTGCAAAAGCATCGTGTTC

AGCCTGCGCCACTTTCAGATATGGAATGTCGTCA

AATAAAAGATCGGTCAGATAGTCTGGCGTCAAAT

TTTCCAGTTCTTCACCTGGCCGATGCAATAGAAC

GGTCTTAAGTTTTCCTATTTCAGACGTGATGTGA

ATTGGTTCGTCCATCACAACCCTCCCCTGTTTAT
ATATTAGTGATGTTTTAATTGTAACACGTTTATG
TTTTTGGGCAAGAGGAGATGATTGCCAAACTGGC
CTCAGTTCTGACTGCGAATTGTCGGTTAACTTTT
AGCCATTCATCAGTGGCTTTTGCGGCGCCCGGCA
GAGCTTCATTTGCGTAATCATCGACAATAATTAT
CGCGTCTTCATTAAACTTACTTTCACAAACCCGA
AAAGAATCGACAATTGATTCGTAAAAATCGCCAT
CAAAAAACGCAAACATAATATTTTCTGGCACGTC
ATCAGAAGTAAAATCAGAAAACCAGCCTTTATGA
ATAATCGGCGACTTCAGCCCCGCTTTCTTAAAAT
TCTGGACAAACGTCTTACGCGGCGCTAATAACTC
GCCAGCCTTAAACTGATCACCCGCAGCGCTATTA
TCCTTCTGGGTTTTTTCTGGCAATCCCGCAAACG
AATCGTAAACGTGAAACTCGCCCGTAAAATCATA
AGCGTCCAGCAGTCGGCGAATAAACAAACTAGTT
GTGCCAACATAACAGCCAAACTCCACAATGTTTC
CAGTAGCGCCACGACGTAAAGTTTTTTCCAACTC
TCTTAAAAGCGCGCCAAGTTCTTTTATGTCGACT
TGGTCGGAAATGATCGGGTATTTAGTGAGGAGTT
GGCCTGCGATATTCATGACTTAATTATAAATAGT
TCGCCAAATATCGACAAATTTATCAACGACGCAG
CCCTATATATTTACAGTTTTATGAAGTAAACTAT
CAATTAGCACCTATGAATAATCACGACATTATCA
AAACATTTTTACCGAAACAACTGGACATAAGACA
GTTAAATTCGCTTCAATCCACATTGCGA

[0104] ［配列番号４：歯周病マーカー配列（ウイルス由来）］

ATTACCACTTCCATCTGGAGTAGAATTTGATAGT

CTCCATTGTAACCACGCCATCTCTCTCTGTTTAG

CTGCATTAAATGCTGCCATTTCCCTATCGTGAGC

AAAGCCTTCTCTACGAGCTTGTGTTTGATATGCT

TGTTGTTTATCGAGCATTGCGTATTGATTAACCT

ATTCTATAGGTCTAATCTTATACTCATCATTAGC

AGCAGCAACATTCTACTGTAATCTAGATTCTATT

TGTTCATTAGTTGGCTTTTCAATACCTTCTGATA

ACAATTGGTTCTTTGCTACATTTCTATAATAATC

AGCTATTTGAGAACCGTTCCATCCTGGAGTGTTT

TTAGCAGCAATATTAAGTAAGTCGTTCTTTGTGA

ATCCTGTATAATTATATCTTTTATCATACTTAAC

ACCAAAACCTTCAACTTCTTTTTGTGTAAGCGAA

TGTGGTGTTCTATTATTATACCAATTCTCTGTAG

CTTCTTTCAAAGTCATAAACTGTGATGGAGATTG

TCTTGTCCAAATACCATCTCTAAGAGTATCCCAA

TCTTCAATAGTCTTACCTCCATTTACAAAGTCTT

CATAGTCTTTATTATACCTACCTTGAGCTTCAAG

AACACCCCTATTTTTGAGATATTCTTGAGCTGTT

TTAGAAGCCATCTTTAATTTATTTATCTCTCCAA

TAGGAGCATTATTAATCCTCCTTGATATAATGGC

TCTACCTTCGGCAGACCTAAGTGGGTCGATTCCT

CTAGCATATAAGTCTTCTATGGTATCTCTCATAC

CCTAAGTAACATTGGTTGTATACCAATCCATATC

TTTCTGTATAGGACTATAGAAATCTCCATACTCC

CTTTTAAATTCTTTCATTTCATCTACACCACGCT

GATACATATCTCTTGCAGCGTTTATAGATGCCAG

CATTATCTAAGAATCATATAAATCTTTAACTGGG

AGCTGGACCCACTAATCTCTCGAGTAAACCATAT

TTTAAATAATTAATTCCAATTTAACCATCTTGGG

TCTGGATTTGTAAAATCACCAAGTTGTGGATTGT

ATGTATTGTAAGGTACAATTATATTATTTGGAAT

ACCAATAAGTCTCATTGTACCTGGTTTTGTTTTA

GTTCTTTTATTATTAGGATTGTAGTTCTTAATGT

ATGTCATAAGTTTAGTAGGCTCCTTTTGTCCAAA

AATACTATTATTAACACCAGTATTTAAACTCATT

GTTGGTACAAATTTATAAGGACTATTGTTACTAT

TAATACCATTCATAAAGTTATAATACTTTGAATA

AGAGAATGGTCTATCATTATTATCAGGTATATTA

TCATCGTTGTTGCCAGCATTAAACTTATCTCTAT

CCAAATCTACTTGTTGTTGATATAATCCAAGCAT

TCCGTTACCAGTCTTACGCTTGTATTCATTTGCT

GCGTATTGCTGTAAGTAATCCATAAAGTTACGGA

TACCCATTTGCATACCTTGTTGTCTTGCTGCGTG

TGCTTGTGATGCGTATTCTGTGTTATACTGATTA

GCTTGTTGTCTACGTTGAGCTAATGCATTGCCAG

CATTAAGTGCGGCTTCAGCCCACTTACCTCTATA

CTGATTATTAACTTCTTGTGCTTTTTGTATCACA

TCTGCTATATTACTTTGAGTACCTAATCCCATAG

CAACATTAGCTAAATACTTCTGAGAACCACTTAA

ACCACCAGCTCTATTAATTGCATATCTATTAATT

CTATCTTGCTTATATACGTCTTGTATTGCTTTAT

ATGGGTTTACGTTCAGCTTTGACATTTCGCCCAA

TGCAGCAGTTTCGTATGGGTTACCAGCGTATACA

TCGGGAGTGTGTATCTTCTAACCTCTTGCATCAA

AATATTGACCAAGACTTGTAAGCATTCCAAGACC

CATCGGTACAGCATTACTATACCAGCTCATTGGT

TCTATATAACCATACGTATTATTCTTACCTTTTG

TATATCCAGGCATATTGTAGTTATTTTGCATTTC

TTGTTGACTATGTTGAAGAGCTTGTTGCTCTGAT

AAATCTTTAAGTTTTTGAACGATAGGTTCTTTTA

ATTTATTTACTTGTTGTTGTTGTAACTCATCACT

CTATTTACCAATAGCTCCTCTAAATTTATTTATA

GAACTATTTGTTCTATTTTTCATACTTCTTGTTAA

TCTTTTCAAGGGCTTGTGTATATGGTAAAGATTG

GTCTCTAAATGTCATTCCATTTCTCCAGTCTATA

TCTTGACCTAGAACTATTGTACTGTTATTTAAAT

TTGCTAAATTTGTATCTTGTCCTAGCTTACCATC

TTTAACAACATGTCCAGTTGTTTTACTTGTATCG

TCTATATTGTCTATAATGCTTTCTCCGGCAGCAA

CTCTAGCATTAGGTGTAGTATTAACCTTTCCTTG

TGATGTATATACATTGGTTTTTACATTAATACAA

TTAGTAGAATATCCTTTATCCTTACCACGCTTAG

CATATAACACATCATCTTGAGTTGTACCATTTGT

ATTATAATAATCATTAATCATGTAATCAGATTGT

GATGAGCTCTGATTATAGTTATTTGTTGCTTCTG

CGTCTTTTCTTGCTAGTTCTAATCTCCTAAGCAT

TTTACGCTTTCTTTTAGCACCGCCAAATAAACCA

CCTATAAGACCTCCTAATGCACCTACAGCACCAC

CAATTAATCCTCCAACTGGTCCAGCGACACTTCC

AATAGTCGAACCTAATGCAGCTCCAGAACCAACA

GTTTTCATTGTATTATTTTGACTTTGTCTTCTAA

GCTCTGTTAGCTAAGCACCTCTATCTATATCATT

TATTCTCTGGTATCCGAAACCTATACCGTTTGAA

TATGATGTTCCTGTCTCATCAAGTATGTCATTTA

CACTCTTAACACCACCAAATGCATTACCTAAATC

TCCAGCAAATTGTATTCCAGAAGACATAATGTTA

CTTGCGTTATCTCCTAACTTACCAACAACTCCTT

TAATATTAGAGTTTCTTCCATTTAATGGTCTATA

CTATCCATCTATATTATAATAATCATTTGTGTCT

CCATACATGTTACGTCTTGATGCGTACCATGGTA

AATATGATGTGCCATACGCAAATCCTGGAAGATA

CTATATAGGCATTCTCATTCTTCTTTTATAATTT

AACTCCATAAAGCTCTATATTTAGTTGTTATATA

TTGTATAATAATATTATCAGCTATGTTGTTTTTA

ATATCACATTCCATAGACTTACCTCTCATTCTAT

TTCCATATAAGCCTGTATTAGAAGCTCTAGGAAT

TGCAGCTCTATAATCATAATATCTCTATGATATA

TCTTCAGGAGTTAATTCATTAGATACCTAACCTT

GAGTTGCGAATGTTTCTTTTATGTTATCTTTAAA

TTCTAGACTCCCATTAAATATTATATTATCAAAT

ACTTTAACTTGTTGATAATATTCATTAATTACAT

ACTTTAACTAGAACTCTTTAATAGTGTTAGTGTT

GTCGTTGTGTCTAACATTACCACTCTTATCGAAC

TCTATTAAGCTTTCATTACCATTAACAATGATAT

TTCTATCAAAATAGTTAATACTATCAACGTTTGC

AGATATTGTATATACAGAATGAAATAATTGAGTT

TCATCATTATAAACAAGGACTCTACTGTCGCCAT

TCCAAAACATAACTTCATTATATTTTGAATTGTA

TAATATTTTCTTTGGTCTTGGTGCTTCTAGTTTA

ACGTCTGACATACCAGCCTCTGTTGCTTTTTGAA

CACCTTTGATTCTAGATATTATACTATAAGAATT

ACCTCCAGAGTATTGACAATATTCTTTATTATCA

TAATCAATCCAGTATAAAGCTGTATTAGTAACGA
GGTCTGAGAAATTACCATCTTCCATTCCACTTAT
AGTTGATATGTAATCATATCTATCAAGAACTCCT
CCTGAGCCAAGTAATAGCTAATTACTATTATTAT
CTGTTAATGTTGTTCTTTCGTTTACAGATAGTAA
TCCGAACGCTCTCTCTTGGAAGAACACTAGACTA
TTCTTAAACGTCTTAAGTTCTGTTATCTTTCCGT
AATCTGGAGATACATCTATATAATTTGCAGCTAA
GAATTTAGTCCAAGAATCTTGTAGTTCTCCATTT
TCTTTCTTATTAGAGTATCTACACCTGTAATTAA
AATACGAATCATCTTTGTTTAGTAATGATAATCT
GATGGTATTCATCTATAATTTATAATCAGAGCTA
TATACTGTATTGTAAATAAACTGAGGTTTATCTT
GAGCTGGATTATCTAATATTCTACCAGGTTCTTC
TTGTACCCAAGTTATATTATATTCTGAGTTGTTA
TTAATAAACTGAACTCCTGACGTGTACATTAGAT
TTATACTAGTCTCAACTGGTATATAATTGACTAT
AACTGTTGTTAAAGGTCCATGTAGTTCTTTAAAC
GCAAACTTATGCAATGATATATATTCAAATGGAC
ATATATAAGTATCACCATCAAATACTTCGGCTAT
ATTTTCAATAGCTGGATTATATCTATAAACATCC
GAATAGCTGTAATATAAACTATTCTCTATACTGT
GTTTTTCATA

[0105] ［配列番号５：ＤＮＡ領域（細菌由来）］

CTGGGTCGCGTGTAAAGTATAGATTTGGCATTGG
ATCGAGATAGAACGGATAATGATTTTTCTCGATC
ATATTATGAAGTTGCTGATGCTGATCTGGAGGCA
AAGTAATTTCATCCTTGCGAACACCA

[0106] ［配列番号６：ＤＮＡ領域（細菌由来）］

ＧＣＡＴＴＡＡＣＴＴＣＣＡＧＣＡＣＣＡＡＡＧＣＡＣＣＡＣＧＡＣＴＴＧ
ＡＴＣＴＣＡＴＧＡＡＧＴＣＧＡＣＴＣＣＡＧＣＡＡＣＴＧＴＣＡＧＴＣＣ
ＣＡＴＴＧＣＣＴＴＡＧＣＧＧＣＴＴＴＣＡＣＧＣＡＣＡＴＴＴＴＡＣＧＴ
ＴＣＡＧＡＡＴＣＴＧＴＣＡＡＴＴＴＴＡＴＡＣＴＧＧＴＴＣＣＴＴＣＧＣ
ＣＧ

[0107] ［配列番号７：ＤＮＡ領域（細菌由来）］

ＡＣＡＣＣＡＧＣＣＧＡＣＴＣＴＣＴＡＡＴＡＡＡＣＴＣＣＴＧＡＡＧＣＡ
ＧＴＡＣＧＴＴＣＧＴＧＣＣＧＴＣＣＧＡＧＴＴＧＧＴＣＡＡＡＴＡＧＡＡ
ＣＧＣＣＴＧＣＡＧＡＡＣＣＧＡＣＴＴＧＧＣＡＧＣＣＴＴＴＴＴＡＧＴＴ
ＴＣＣＧＣＣＡＧＡＡＣＣＡＣ

[0108] ［配列番号８：ＤＮＡ領域（細菌由来）］

ＧＣＣＣＧＡＡＧＣＡＴＣＧＴＣＴＴＡＴＴＣＡＧＧＴＡＡＡＴＴＡＴＴＴ
ＣＣＧＴＴＴＴＴＧＧＣＧＡＡＡＣＴＧＴＴＣＧＡＡＡＡＧＣＡＴＡＡＡＡ
ＡＡＴＴＧＣＣＣＣＡＣＣＡＡＴＡＡＣＣＡＴＣＡＧＣＡＴＧＣＣＧ

[0109] ［配列番号９：ＤＮＡ領域（ウイルス由来）］

ＡＡＣＴＣＣＴＣＣＴＧＡＧＣＣＡＡＧＴＡＡＴＡＧＣＴＡＡＴＴＡＣＴＡ
ＴＴＡＴＴＡＴＣＴＧＴＴＡＡＴＧＴＴＧＴＴＣＴＴＴＣＧＴＴＴＡＣＡＧ
ＡＴＡＧＴＡＡＴＣＣＧＡＡＣＧＣＴＣＴＣＴＣＴＴＧ

[0110] ［配列番号１０：ＤＮＡ領域（ウイルス由来）］

ＧＣＡＡＣＴＣＴＡＧＣＡＴＴＡＧＧＴＧＴＡＧＴＡＴＴＡＡＣＣＴＴＴＣ
ＣＴＴＧＴＧＡＴＧＴＡＴＡＴＡＣＡＴＴＧＧＴＴＴＴＴＡＣＡＴＴＡＡＴ
ＡＣＡＡＴＴＡＧＴＡＧＡＡＴＡＴＣＣＴＴＴＡＴＣＣＴＴＡＣＣＡＣＧＣ
ＴＴＡＧＣＡ

[0111] ［配列番号１１：ＤＮＡ領域（ウイルス由来）］

ＧＴＣＣＡＧＣＧＡＣＡＣＴＴＣＣＡＡＴＡＧＴＣＧＡＡＣＣＴＡＡＴＧＣ
ＡＧＣＴＣＣＡＧＡＡＣＣＡＡＣＡＧＴＴＴＴＣＡＴＴＧＴＡＴＴＡＴＴＴ
ＴＧＡＣＴＴＴＧＴＣＴＴＣＴＡＡＧＣＴＣＴＧＴＴＡＧＣＴＡＡＧＣＡＣ

請求の範囲

[請求項1] 以下の（ａ）～（ｃ）からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（ａ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

（ｂ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列

（ｃ）配列番号１～４からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

[請求項2] 生物学的試料から抽出された膜小胞の塩基配列から、感染症を検出するためのマーカーである、請求項１に記載のポリヌクレオチド。

[請求項3] 前記感染症が、歯周病である、請求項２に記載のポリヌクレオチド。

[請求項4] 配列番号１～４からなる群より選択される塩基配列から設計されるプライマーセット、及び／又は、プローブを含むキット。

[請求項5] 以下の（ｅ）～（ｎ）からなる群より選択される少なくとも１種の領域から設計されるプライマーセット、及び／又は、プローブを含むキット。

（ｅ）配列番号３の６４１塩基から、７６８塩基までの領域（配列番号５）、

（ｆ）配列番号２の９９２塩基から、１１２９塩基までの領域（配列番号６）

（ｇ）配列番号２の１２２３塩基から、１３３８塩基までの領域（配列番号７）

（ｈ）配列番号２の６９５塩基から、７９３塩基までの領域（配列番号８）

（ｋ）配列番号４の３９３８塩基から、４０３０塩基までの領域（配

列番号９）

（ｍ）配列番号４の２３７７塩基から、２４８４塩基までの領域（配列番号１０）

（ｎ）配列番号４の２７０５塩基から、２８０６塩基までの領域（配列番号１１）

[請求項6] 以下の（ｐ）～（ｔ）からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列からなるポリヌクレオチド。

（ｐ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列

（ｒ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に対して、８０％以上の相同性を有する塩基配列

（ｔ）配列番号５～１１からなる群より選択される少なくとも１種の塩基配列に相補的な塩基配列からなる核酸に対して、ストリンジェントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチドの塩基配列

[請求項7] 感染症の診断方法であって、

生物学的試料から抽出された膜小胞の塩基配列を解析し、請求項１又は請求項６に記載のポリヌクレオチドの塩基配列、又は、その一部の存否を確認することと、を含む、診断方法。

[請求項8] 更に、被験者から前記生物学的試料を採取することを含む、請求項７に記載の診断方法。

[請求項9] 前記感染症が歯周病である、請求項７又は８に記載の診断方法。

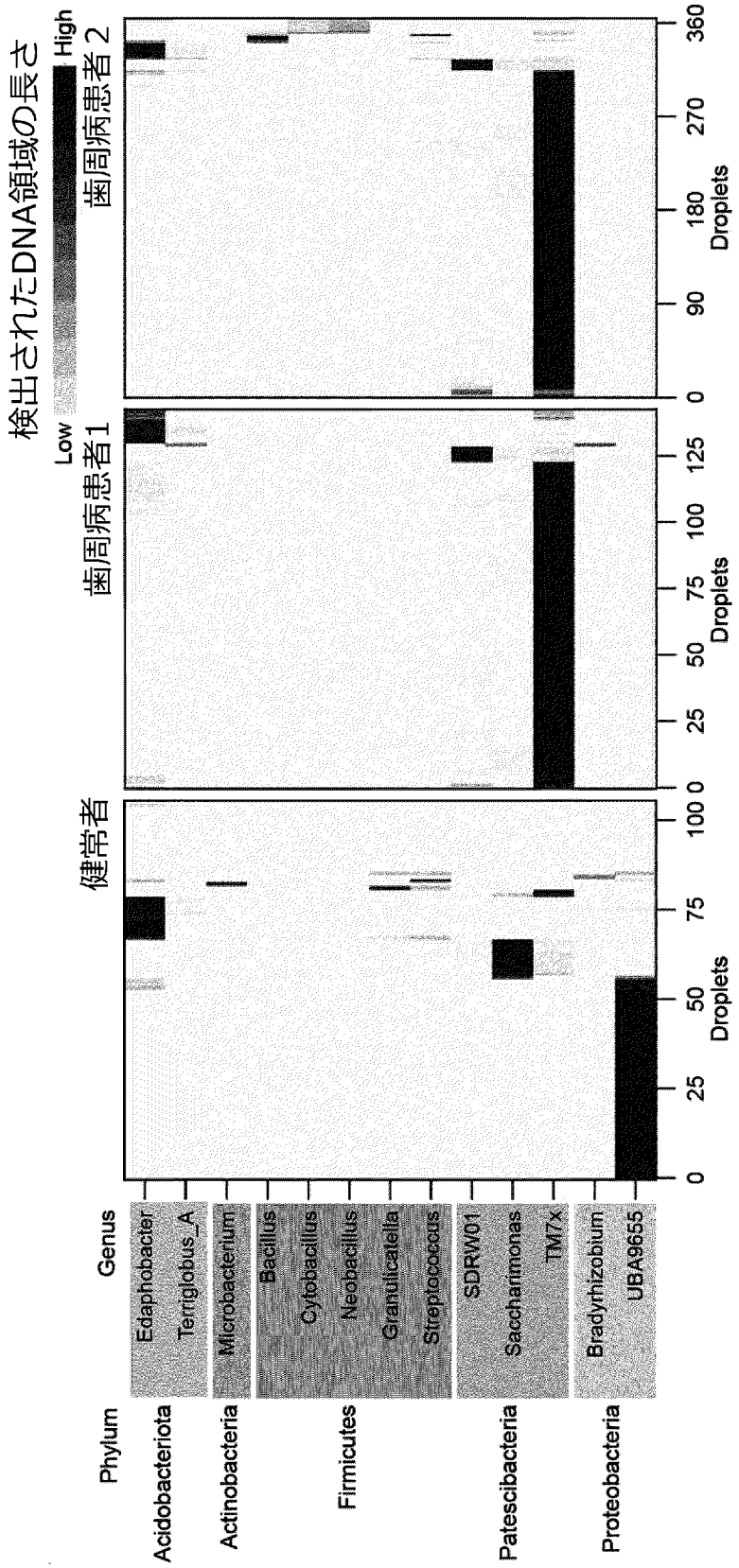
[請求項10] 感染症の診断方法であって、

生物学的試料から抽出された膜小胞の塩基配列を解析し、請求項４又は５に記載のキットを用いて標的核酸領域の増幅を検出することで、感染の有無を診断するための情報を得る、診断方法。

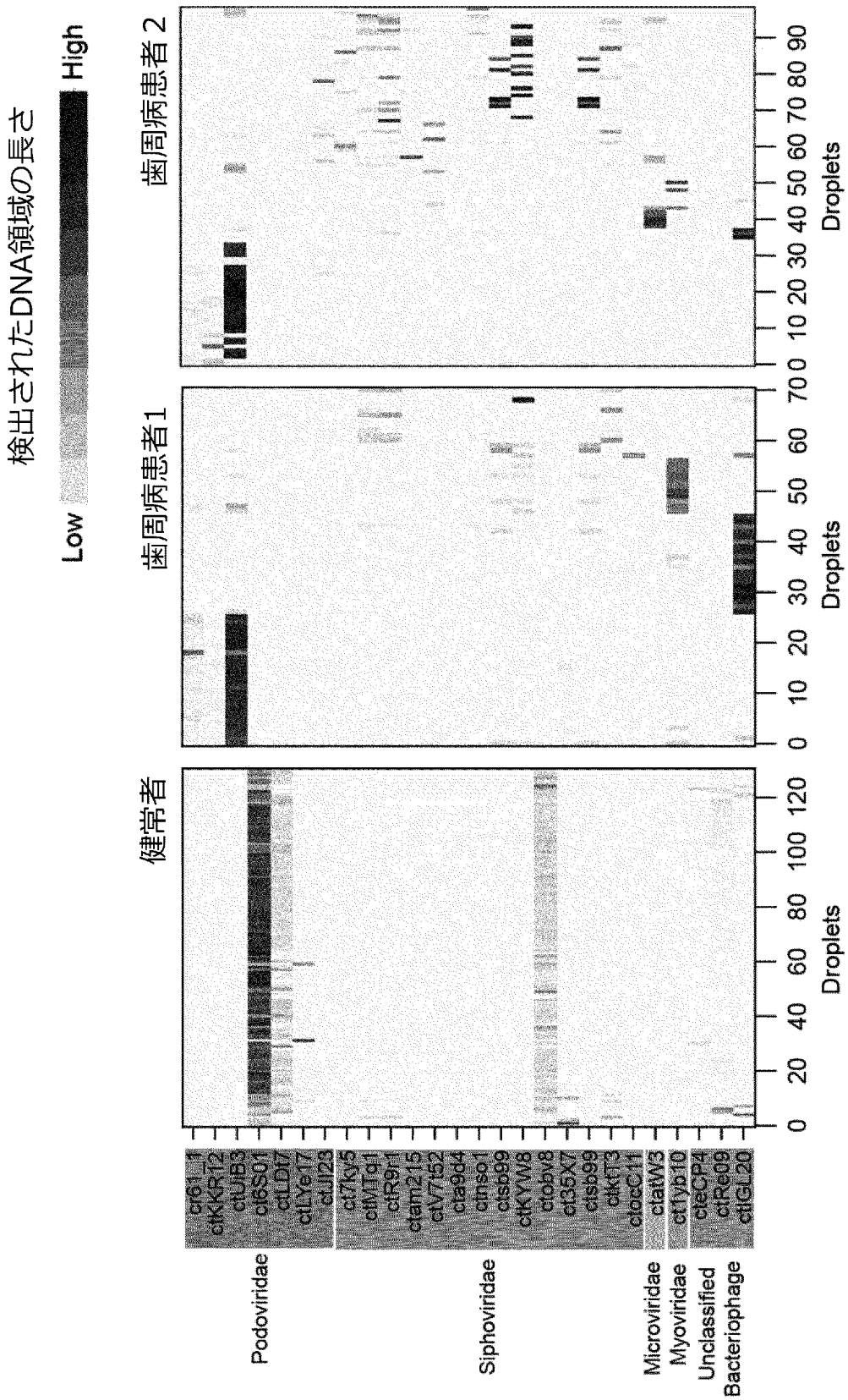
[請求項11] 更に、被験者から前記生物学的試料を採取することを含み、

前記感染症が歯周病である、請求項１０に記載の診断方法。

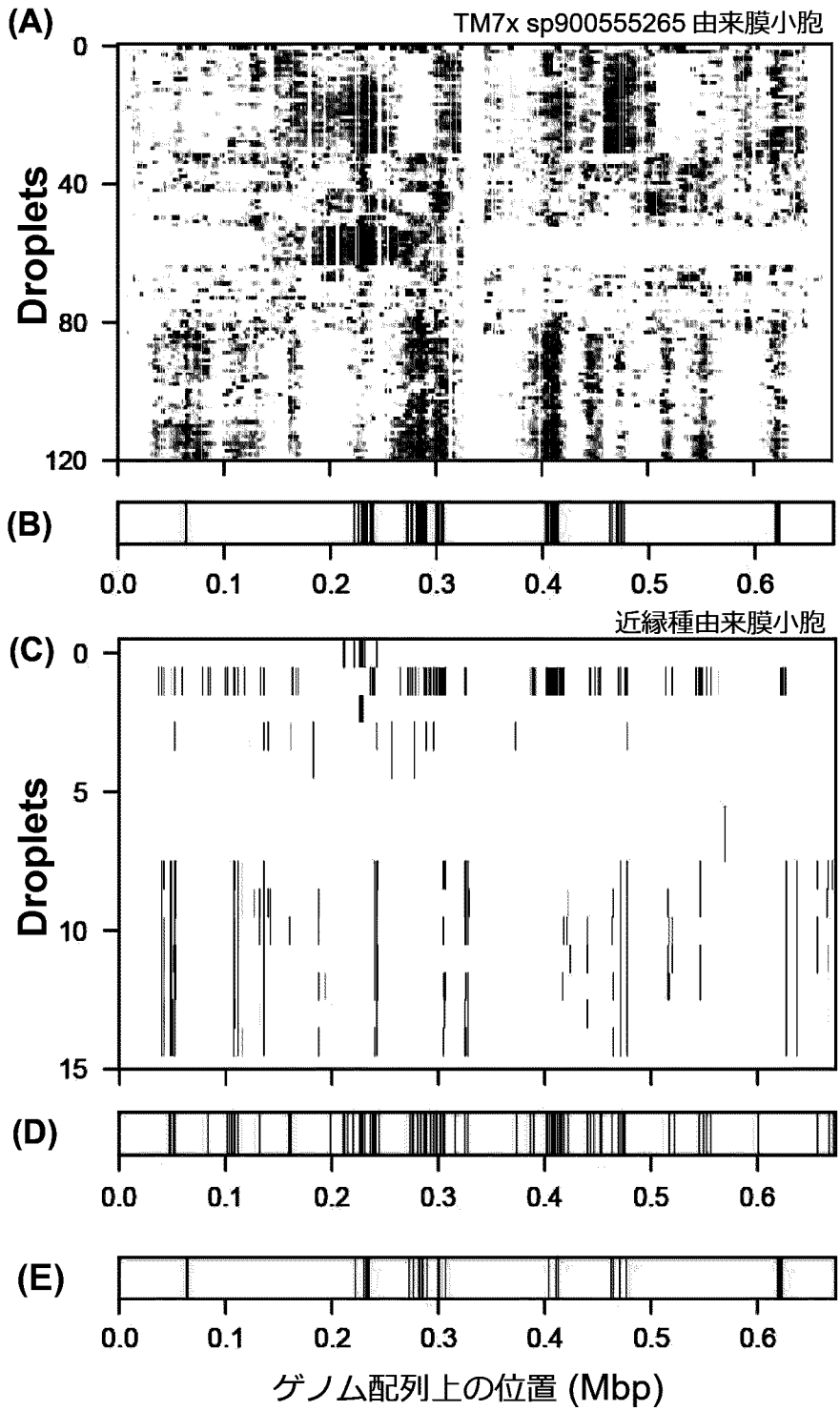
[図1]


検出されたDNA領域の長さ
High
Low
健常者
歯周病患者1
歯周病患者2
Droplets
Phylum
Genus
Acidobacteriota
Actinobacteria
Firmicutes
Patescibacteria
Proteobacteria
Edaphobacter
Terriglobus_A
Microbacterium
Bacillus
Cytobacillus
Neobacillus
Granulicatella
Streptococcus
SDRW01
Saccharimonas
TM7x
Bradyrhizobium
UBA9655

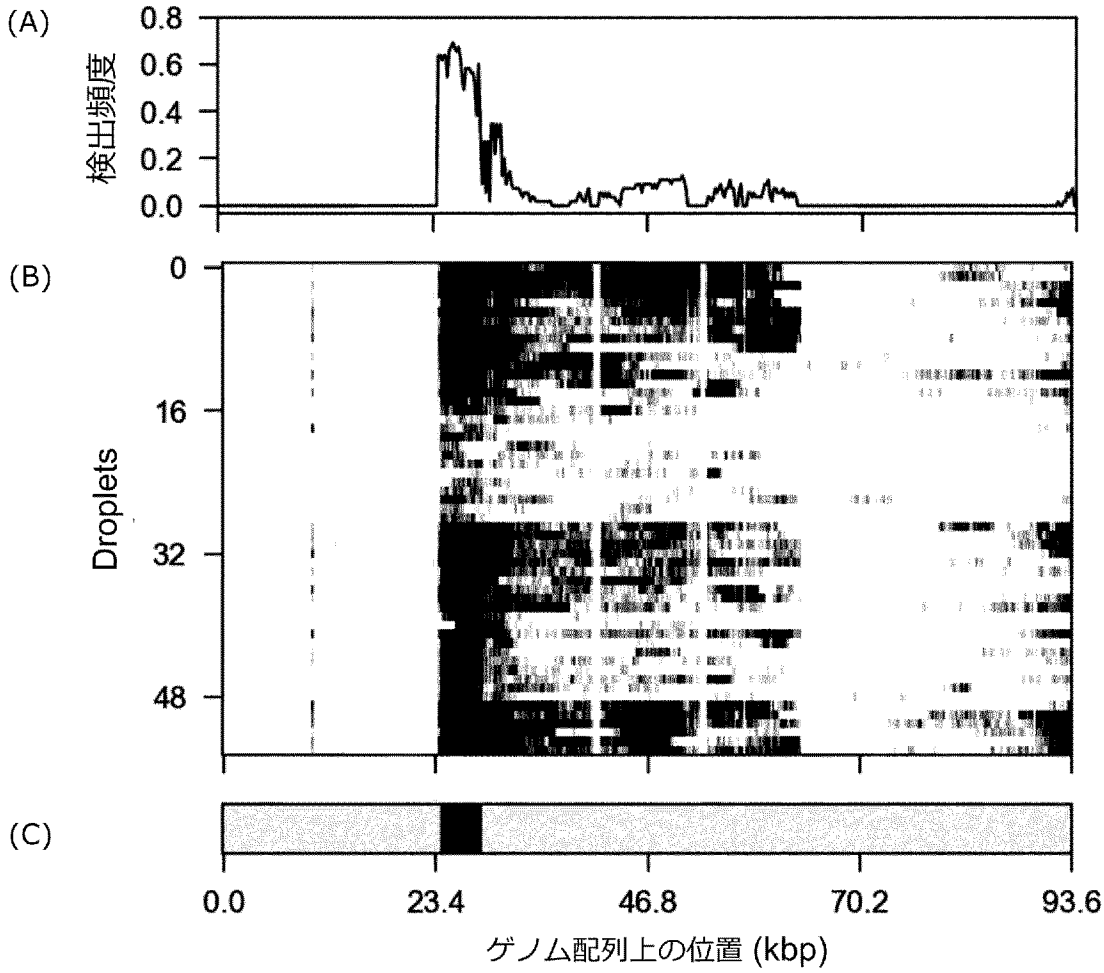
[図2]


検出されたDNA領域の長さ
Low
High
健常者
歯周病患者1
歯周病患者2
Droplets
0 20 40 60 80 100 120
0 10 20 30 40 50 60 70
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90
ctr61_1
ctKKR12
ctUB3
ct6S01
ctLDi7
ctLYe17
ctJI23
ct7kv5
ctMTq1
ctR9r1
ctam215
ctV7i52
cta9d4
ctnso1
ctsb99
ctKYW8
ctobv8
ct35X7
ctsb99
ctkT3
ctocC11
ctatW3
ct1yb10
cteCP4
ctRe09
ctGL20
Podoviridae
Siphoviridae
Microviridae
Myoviridae
Unclassified Bacteriophage

[図3]


(A)
TM7x sp900555265 由来膜小胞
Droplets
0
40
80
120
(B)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
近縁種由来膜小胞
(C)
Droplets
0
5
10
15
(D)
(E)
ゲノム配列上の位置 (Mbp)

[図4]


(A)
検出頻度
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
(B)
Droplets
0
16
32
48
(C)
0.0
23.4
46.8
70.2
93.6
ゲノム配列上の位置 (kbp)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/029165

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/03(2006.01)i; ***C12N 15/09***(2006.01)i; ***C12N 15/31***(2006.01)i; ***C12N 15/33***(2006.01)i; ***C12Q 1/6806***(2018.01)i; ***C12Q 1/6813***(2018.01)i; ***C12Q 1/689***(2018.01)i
FI: C12N15/31; C12N15/03 Z; C12N15/09 Z; C12N15/33; C12Q1/6806 Z; C12Q1/6813 Z; C12Q1/689 Z

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/03; C12N15/09; C12N15/31; C12N15/33; C12Q1/6806; C12Q1/6813; C12Q1/689

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 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BOR, B. et al. Saccharibacteria (TM7) in the Human Oral Microbiome. Journal of Dental Research. 2019, vol. 98, no. 5, pp. 500-509 entire text, particularly, abstract	1-11
A	MAG TPA_asm: Caudoviricetes sp. isolate ctUiB3, partial genome, BK052805. NATIONAL CTR. FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. [online], Published on 18 June 2021, [retrieved on 5 October 2023], [Internet <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2054690707] entire text	1-11
A	WO 2022/102246 A1 (NATIONAL INST. FOR MATERIALS SCIENCE) 19 May 2022 (2022-05-19) entire text, particularly, examples	1-11
A	HAN, P. et al. Salivary Small Extracellular Vesicles Associated miRNAs in Periodontal Status-A Pilot Study. International Journal of Molecular Sciences. 2020, vol. 21, no. 8, #2809, pp. 1-13 entire text, particularly, abstract	1-11

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
05 October 2023	**24 October 2023**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2023/029165

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

"In the form of an Annex C/ST.25 text file" above should be understood as "in ST.26 format".

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2023/029165

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2022/102246 A1	19 May 2022	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/029165

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/03(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/33(2006.01)i; C12Q 1/6806(2018.01)i; C12Q 1/6813(2018.01)i; C12Q 1/689(2018.01)i
FI: C12N15/31; C12N15/03 Z; C12N15/09 Z; C12N15/33; C12Q1/6806 Z; C12Q1/6813 Z; C12Q1/689 Z

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））

C12N15/03; C12N15/09; C12N15/31; C12N15/33; C12Q1/6806; C12Q1/6813; C12Q1/689

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	BOR B. et al., Saccharibacteria (TM7) in the Human Oral Microbiome, Journal of Dental Research, 2019, Vol. 98, No. 5, p.500-509 全文、特に、要約	1-11
A	MAG TPA_asm: Caudoviricetes sp. isolate ctUiB3, partial genome., BK052805, National Center for Biotechnology Information, [online], 2021年6月18日掲載, [検索日 2023年10月5日], [インターネット<URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/2054690707] 全文	1-11
A	WO 2022/102246 A1 (国立研究開発法人物質・材料研究機構) 19.05.2022 (2022-05-19) 全文、特に、実施例	1-11
A	HAN P. et al., Salivary Small Extracellular Vesicles Associated miRNAs in Periodontal Status - A Pilot Study, International Journal of Molecular Sciences, 2020, Vol. 21, No. 8, #2809, pp.1-13 全文、特に、要約	1-11

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

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

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
05.10.2023	24.10.2023

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）
伊達　利奈 4B 3960

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2023/029165

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。

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/JP2023/029165

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2022/102246 A1	19.05.2022	（ファミリーなし）	