

(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5月2日(02.05.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/090455 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/68 (2018.01) C12N 15/09 (2006.01)
A61K 35/74 (2015.01) C12N 15/11 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01) C12Q 1/6869 (2018.01)
C12N 1/20 (2006.01) C12Q 1/689 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2023/038423

(22) 国際出願日: 2023年10月25日(25.10.2023)

(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 2022-170932 2022年10月25日(25.10.2022) JP

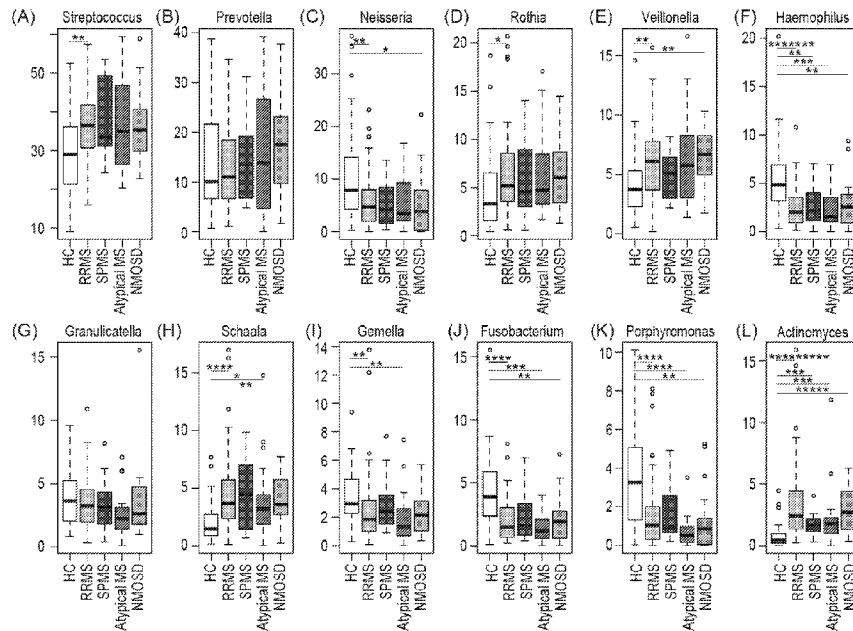
(71) 出願人: 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター(NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY AND PSYCHIATRY) [JP/JP]; 〒1878551 東京都小平市小川東町4-1-1 Tokyo (JP). 国立研究開発法人理化学研究所(RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢2番1号 Saitama (JP).

(72) 発明者: 山村 隆(YAMAMURA Takashi); 〒1878551 東京都小平市小川東町4-1-1 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP). 佐藤 和貴郎(SATO Wakiro); 〒1878551 東京都小平市小川東町4-1-1 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP). 竹脇 大貴

(54) Title: MULTIPLE SCLEROSIS DIAGNOSTIC METHOD AND DIAGNOSTIC BIOMARKER

(54) 発明の名称: 多発性硬化症の診断方法及び診断用バイオマーカー

[図4]



(57) Abstract: A multiple sclerosis diagnostic method according to the present invention comprises: a step for measuring the relative abundance of a bacterium contained in a saliva sample collected from a subject; and a step for performing (1) or (2) below. (1) If the relative abundance of a bacterium of which the nucleotide sequence for 16S ribosomal RNA genes has 97% or higher homology with the nucleotide sequence for 16S ribosomal RNA genes of any one of specified bacteria in a subject is larger in comparison to said relative abundance in a normal person, the subject is determined as

(TAKEWAKI Daiki); 〒1878551 東京都小平市
小川東町 4 - 1 - 1 国立研究開発法人国立精
神・神経医療研究センター内 Tokyo (JP). 須
田 互(SUDA Wataru); 〒3510198 埼玉県和光市
広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所
内 Saitama (JP). 高安 伶奈(TAKAYASU Lena);
〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研
究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).

(74) 代理人: 長谷川 芳樹, 外(HASEGAWA Yoshiki
et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内二
丁目 1 番 1 号丸の内 M Y P L A Z A
(明治安田生命ビル) 9 階 創英国際特
許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN,
CO, CR, CU, 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).

規則4.17に規定する申立て:

— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関
する申立て (規則4.17(v))

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))

being affected by multiple sclerosis or at high risk of being affected by multiple sclerosis; and (2) if the relative abundance of a bacterium of which the nucleotide sequence for 16S ribosomal RNA genes has 97% or higher homology with the nucleotide sequence for 16S ribosomal RNA genes of any one of specified bacteria in a subject is smaller in comparison to said relative abundance in a normal person, the subject is determined as being affected by multiple sclerosis or at high risk of being affected by multiple sclerosis.

(57) 要約: 本発明の多発性硬化症の診断方法は、被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップと、以下の(1)又は(2)を実施するステップとを備える。(1) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、所定の細菌のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配

列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して多い場合、被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する (2) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、所定の細菌のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する

明 細 書

発明の名称：多発性硬化症の診断方法及び診断用バイオマーカー
技術分野

[0001] 本発明は、多発性硬化症の診断方法及び診断用バイオマーカーに関する。

背景技術

[0002] 多発性硬化症 (multiple sclerosis; MS) は、視力低下や運動麻痺、感覚障害、高次脳機能障害など多様な症状を呈する、中枢神経系の自己免疫性脱髄疾患であり、若年成人期に発症する主要な神経疾患である。ほとんどの患者は再発の徴候を経験し、寛解の間隔は初期の臨床病期に数カ月から数年持続する。この病期にとどまる患者は再発寛解型MS (RRMS) と呼ばれる。これらの患者の一部は、MSの発症から数年後に二次進行型MS (SPMS) と呼ばれる進行性疾患形態に移行する可能性がある。SPMSへの移行が確立されると、神経学的障害が徐々にかつ不可逆的に蓄積する (非特許文献1)。

[0003] MSの診断は、臨床所見と脳・脊髄MRI、髄液検査などの検査所見を組み合わせて行われるが、異常所見が乏しい病初期の症例においては、診断が難しい場合も少なくなく、診断までに平均して約3年を要する。近年、数多くのMSの疾患修飾薬が臨床で使用可能となったが、早期に診断して治療を開始することが有意に予後を改善するという事実が多く臨床研究により示されたことで、MSの早期診断を可能にするバイオマーカーの開発に大きな関心が寄せられるようになった。

[0004] 一方で近年、腸内細菌叢がMS等の自己免疫性疾患の病因に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた (非特許文献3～6)。本発明者らは、16S リボソーマルRNA (16S rRNA) 遺伝子解析及びメタゲノム解析に基づいたMS患者の腸内細菌叢の特徴を世界に先駆けて報告し、そして糞便サンプルを用いたMS等の自己免疫性疾患の診断方法及び診断のためのバイオマーカーを提供してきた (特許文献1～2、非特許文献7～

8)。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1 : WO 2 0 1 7 / 0 3 4 0 3 1

特許文献2 : WO 2 0 2 1 / 0 3 9 9 3 2

非特許文献

[0006] 非特許文献1 : Compston et al., Multiple sclerosis. Lancet 372, 1502-1517 (2008)

非特許文献2 : Yasmine Belkaid et al., Cell, 2014, 157(1):121-141

非特許文献3 : K. Berer et al., Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. Proc Natl Acad Sci U S A 114, 10719-10724 (2017).

非特許文献4 : E. Cekanaviciute et al., Gut bacteria from multiple sclerosis patients modulate human T cells and exacerbate symptoms in mouse models. Proc Natl Acad Sci U S A 114, 10713-10718 (2017).

非特許文献5 : J. Chen et al., Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. Scientific reports 6, 28484 (2016).

非特許文献6 : S. Jangi et al., Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. Nat Commun 7, 12015 (2016).

非特許文献7 : S. Miyake et al., Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. PLoS One 10, e0137429 (2015).

非特許文献8 : D. Takewaki et al., Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. under review. PNAS, 117, (36) 22402-22412

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、多発性硬化症患者の唾液サンプルを用いた多発性硬化症の診断方法及び診断用バイオマーカーを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、唾液試料からの 16S rRNA 遺伝子データを用いて、多発性硬化症患者及び健常者からの唾液細菌叢を比較分析した。その結果、健常者と比較して多発性硬化症患者における変化した唾液細菌叢を示し、多発性硬化症患者と健常者との間で存在量に有意な変化を示す種々の微生物分類群を同定した。また、唾液細菌叢に基づいて、ランダムフォレストアルゴリズム（機械学習予測モデル）を用いた予測モデルを開発し、多発性硬化症に対する細菌叢ベースの非侵襲的診断マーカーとして予測精度を評価した。本発明は、これらの知見に基づくものである。

[0009] すなわち、本発明は、例えば、下記 [1] ～ [11] に係る発明に関する。

[0010] [1]

多発性硬化症の診断方法であって、治療前及び治療後に被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップと、以下の（１）又は（２）を実施するステップとを備える、方法。

（１）16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列が、群 A-1 の細菌属の細菌又は群 B-1 の細菌種のいずれかの 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列と 97% 以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して多い場合、上記被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する

（２）16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列が、群 A-2 の細菌属の細菌又は群 B-2 の細菌種のいずれかの 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列のいずれかと 97% 以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、上記被験者は多発性硬化

症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nanceiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus parahemolyticus*, *Solobacterium moorei*, *Alloprevotella rava*, *Prevotella melanogenica*

[2]

多発性硬化症の診断方法であって、治療前及び治療後に被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップと、以下の（

3) 又は(4)を実施するステップとを備える、方法。

(3) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当該相対存在量が治療前に比較して少ない場合、上記被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたと判定する

(4) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当該相対存在量が治療前に比較して多い場合、上記被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたと判定する

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemoph*

ilus haemolyticus, *Haemophilus para*
influenzae, *Prevotella nanceiensis*,
Fusobacterium periodonticum, *Haemop*
hilus sputorum, *Haemophilus parahae*
molyticus, *Solobacterium moorei*, *All*
oprevotella rava, *Prevotella melani*
nogenica

[3]

上記多発性硬化症が、再発寛解型多発性硬化症である、[1]又は[2]に記載の方法。

[4]

上記細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列である、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5]

上記群B-1の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～14で示される塩基配列であり、上記群B-2の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15～24に示される塩基配列である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1及び群A-2の細菌属の細菌並びに群B-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する唾液細菌からなる、多発性硬化症の診断用バイオマーカー。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *All*
oprevotella, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Sele*
nomonas infelix, *Actinomyces viscos*
us, *Streptococcus salivarius*, *Rothia*
*mucilaginos**a*, *Corynebacterium matr*
uchotii, *Streptococcus parasanguini*
s, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotell*
a histicola, *Streptococcus anginosu*
s, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella*
denticola, *Streptococcus lactarius*
, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemoph*
ilus haemolyticus, *Haemophilus para*
influenzae, *Prevotella nanceiensis*,
Fusobacterium periodonticum, *Haemop*
hilus sputorum, *Haemophilus parahae*
molyticus, *Solobacterium moorei*, *All*
oprevotella rava, *Prevotella melani*
nogenica

[7]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～24で示され
る塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する唾液細菌からなる、多
発性硬化症の診断用バイオマーカー。

[8]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1及び群A-2の細
菌属の細菌、並びにB-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16Sリボソ
ームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する唾液細菌の、多

発性硬化症の診断用バイオマーカーとしての使用。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nanceiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus parahae-molyticus*, *Solobacterium moorei*, *Alloprevotella rava*, *Prevotella melan-nogenica*

[9]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する唾液細菌の、多発性硬

化症の診断用バイオマーカーとしての使用。

[10]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分として含有する、多発性硬化症の予防剤又は治療剤。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

[11]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15~24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分として含有する、多発性硬化症の予防剤又は治療剤。

[12]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又

は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を、それを必要とする対象に投与することを含む、多発性硬化症の予防方法又は治療方法。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

[13]

16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を、それを必要とする対象に投与することを含む、多発性硬化症の予防方法又は治療方法。

[0011] 本発明はまた、下記[2-1]～[2-7]にも関する。

[2-1]

被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を網羅的に解読した塩基配列データを取得するステップ、

16SリボソームRNA遺伝子データベースに基づき、取得した塩基配列データから、群A-1及び群A-2の細菌属の細菌、並びに群B-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する塩基配列の頻度を計算し、当該塩基配列の相対存在量を算出するステップ、算出した相対存在量を予め入力された基準値と比較して多発性硬化症の病態を判定するステップ、及び得られた判定結果を出力するステップをコンピュータに実行させるプログラムが記録されたコンピュータ読み取り可能な非一時的記録媒体。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nanceiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemop*

hilus sputorum, *Haemophilus parahae*
molyticus, *Solobacterium moorei*, *All*
oprevotella rava, *Prevotella melani*
nogenica

[2-2]

上記判定するステップは、上記相対存在量が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量であり、かつ算出した相対存在量が健常人における当該相対存在量に比較して多い場合、又は、上記相対存在量が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量であり、かつ算出した相対存在量が健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、当該被験者は、多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する、[2-1]に記載の非一時的記録媒体。

[2-3]

上記多発性硬化症が、再発寛解型多発性硬化症である、[2-1]又は[2-1]に記載の非一時的記録媒体。

[2-4]

上記細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列である、[2-1]～[2-3]のいずれかに記載の非一時的記録媒体。

[2-5]

上記群B-1の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～14で示される塩基配列であり、上記B-2の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15～24に示される塩基配列である、[2-1]～[2-4]のいずれかに記載の非一時的記録媒体。

[2-6]

被験者から採取された糞便試料に含まれる細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を網羅的に解読した塩基配列データを取得する入力手段と、取得した塩基配列データに基づいて、被験者が多発性硬化症へ罹患している、又は罹患する危険性が高いことを判定する演算手段と、上記演算手段で得られた判定結果を出力する出力手段を備える、多発性硬化症の診断システム。

[2-7]

治療後に被験者から採取された糞便試料に含まれる細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を網羅的に解読した塩基配列データを取得する入力手段と、取得した塩基配列データに基づいて、被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたかを判定する演算手段と、上記演算手段で得られた判定結果を出力する出力手段を備える、再発寛解型多発性硬化症の診断システム。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、唾液細菌叢に基づいた多発性硬化症の診断方法の提供が可能となる。唾液サンプルの採取及び保管は糞便サンプルの採集及び保管よりも簡便であることから、本発明の診断方法は糞便細菌叢に基づく診断方法よりも簡便である。また、本発明によれば、多発性硬化症の診断用バイオマーカー、並びに、多発性硬化症の治療剤の提供が可能となる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]被験者の背景プロフィールを示す。

[図2]患者群と健常者群との間の唾液細菌叢における α 及び β 多様性の比較の結果を示し、A～Dは、OTU数、Chao-1、ACE及びShannon指数の、非典型MS群とHC群の比較結果（ α 多様性）、EはUniFrac距離解析に基づいて β 多様性を評価した結果（ β 多様性）を示す。

[図3]5つの対象群間で、細菌叢組成を門レベルで比較した結果を示す図である。

[図4]5つの対象群間で、細菌叢組成を属レベルで比較した結果を示す図であ

る。

[図5] 5つの対象群間で、属レベルでの細菌種の平均相対的存在量を比較した結果を示す。

[図6] 16Sデータに基づく種レベルの分類帰属により、5つの対象群のうち少なくとも1つの対象群で平均相対存在量が0.1%以上の種等価クラスターの中で統計的に有意差を認めたものを示す。

[図7] 16Sデータに基づく種レベルの分類帰属により、5つの対象群のうち少なくとも1つの対象群で平均相対存在量が0.1%以上の種等価クラスターの中で統計的に有意差を認めたものを示す。

[図8] 疾患活動性が高い群と疾患活動性が低い群の間の差異を示す図である。

[図9] 疾患活動性が高い群と疾患活動性が低い群の間の差異を示す図である。

[図10] 疾患活動性が高い群と疾患活動性が低い群の間の差異を示す図である。

[図11] 全患者において、疾患活動性が低い患者群と比較して、疾患活動性が高い患者群で存在量が有意に増加又は減少した5つの唾液細菌の相対発現量を示す図である。

[図12] R RMSの探索コホートグループ及び検証コホートグループのそれぞれの患者のプロフィールを示す。

[図13] R RMS群と健常対照群の唾液及び腸内細菌叢のランダムフォレストアルゴリズム解析の結果を示す。

[図14] ランダムフォレストアルゴリズムにより選択された14属の細菌リスト及びその存在量に基づくZスコアを示す。

[図15] ランダムフォレストアルゴリズムにより選択された24種の細菌リスト及びその存在量に基づくZスコアを示す。

[図16] R RMS群、早期発症R RMS群、軽症R RMS群及びHC群の間の属及び種レベルでの唾液細菌叢の平均AUCを示す。

[図17] R RMS群、早期発症R RMS群、軽症R RMS群及びHC群の間の属及び種レベルでの唾液及び糞便細菌叢の平均AUCを示す。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を実施するための形態について詳細に説明する。ただし、本発明は以下の実施形態に限定されるものではない。

[0015] 多発性硬化症は、自己の免疫系が自己の正常な細胞及び組織に対して反応することにより引き起こされる疾患である自己免疫疾患の1つである。多発性硬化症には、急性増悪と寛解を繰り返す再発寛解型多発性硬化症（RRMS）、RRMS病態が一定期間続いた後に進行性の病態へと移行する二次進行型多発性硬化症（SPMS）、MS特有の脳病変がほとんどない非典型多発性硬化症（Atypical MS）等のサブタイプに分類できることが知られている。また、RRMSのうち、罹病期間5年以下のRRMSを早期RRMSといい、神経障害度スコア（EDSSスコア）が1以下のRRMSを軽症RRMSという。また、多発性硬化症に罹患する患者の中では、視神経炎及び脊髄炎を主な症候とする患者が含まれており、視神経脊髄炎類縁疾患（NMOSD）として、多発性硬化症とは独立した疾患として分類されることがある。NMOSDは、抗アクアポリン4（AQP4）抗体及び脊髄長大病変の存在を特徴とする。

[0016] 〔診断方法〕

本実施形態に係る多発性硬化症の診断方法は、被験者の唾液細菌叢の構成に基づく判定を行うものであるため、多発性硬化症への罹患の有無又は罹患の危険性を判定すること、及び多発性硬化症の治療効果を判定することに用いることができる。本実施形態に係る多発性硬化症の診断方法は、診断を補助するための方法と捉えることもできる。

[0017] 一実施形態の多発性硬化症の診断方法は、被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップと、以下の（1）又は（2）を実施するステップと、を備える。

（1）16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当

該相対存在量に比較して多い場合、上記被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する

(2) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、上記被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nanceiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus parahaemolyticus*

molyticus, *Solobacterium moorei*, *All
oprevotella rava*, *Prevotella melani
nogenica*

[0018] 別の実施形態の多発性硬化症の診断方法は、治療前及び治療後に被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップと、以下の（３）又は（４）を実施するステップと、を備える。

（３）１６ＳリボソームＲＮＡ遺伝子の塩基配列が、群Ａ－１の細菌属の細菌又は群Ｂ－１の細菌種のいずれかの１６ＳリボソームＲＮＡ遺伝子の塩基配列と９７％以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当該相対存在量が治療前に比較して少ない場合、上記被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたと判定する

（４）１６ＳリボソームＲＮＡ遺伝子の塩基配列が、群Ａ－２の細菌属の細菌又は群Ｂ－２の細菌種のいずれかの１６ＳリボソームＲＮＡ遺伝子の塩基配列のいずれかと９７％以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当該相対存在量が治療前に比較して多い場合、上記被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたと判定する

[0019] 後述の実施例で詳述するとおり、健常対照と比較してＭＳ患者、特にＲＲＭＳ患者で有意に相対存在量が増加する細菌として、１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子のＶ１領域－Ｖ２領域の塩基配列によって特定された上記群Ａ－１の細菌属の細菌、及び上記群Ｂ－１の細菌種が同定された。同様に、健常対照と比較してＭＳ患者で有意に相対存在量が減少する細菌として、１６Ｓ ｒＲＮＡ遺伝子のＶ１領域－Ｖ２領域の塩基配列によって特定された上記群Ａ－２の細菌属の細菌、及び上記群Ｂ－２の細菌種が同定された。

[0020] したがって、１６ＳリボソームＲＮＡ遺伝子の塩基配列が、群Ａ－１及び群Ａ－２の細菌属の細菌並びに群Ｂ－１及び群Ｂ－２の細菌種と９７％以上の相同性を有する細菌の相対存在量を指標とすることにより、多発性硬化症への罹患の有無又は罹患の危険性を判定すること、及び多発性硬化症の治療効果を判定することが可能になる。判定精度をより高める観点から、上記相

同性は、98%以上、99%以上又は99.5%以上であることが好ましく、99.7%以上であることがより好ましく、99.9%以上であることが更に好ましく、100%であることが更に好ましい。

[0021] なお、本明細書において、「相同性」とは、2つの塩基配列のアラインメント（例えば、BLASTアルゴリズムを使用したアラインメント）を行ったとき、一致する塩基の割合を意味する。

[0022] 診断の対象である多発性硬化症は、再発寛解型多発性硬化症（RRMS）、二次進行型多発性硬化症（SPMS）、非典型多発性硬化症（Atypical MS）等のサブタイプを含み、再発寛解型多発性硬化症（RRMS）であることが好ましい。

[0023] 細菌の16S rRNA遺伝子には、多くの生物種で塩基配列の保存度が高い領域（保存領域）の他に、特定の細菌種及びその近縁種に固有の塩基配列の領域（可変領域）が存在する。16S rRNA遺伝子には、V1～V9と呼ばれる9つの可変領域が知られている。可変領域の塩基配列を同定することにより、細菌種を特定することができる。16S rRNA遺伝子のV1領域－V2領域の塩基配列とは、V1可変領域及びV2可変領域を含む塩基配列である。

[0024] 一実施形態において、細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、16S rRNA遺伝子のV1領域－V2領域の塩基配列であってよい。唾液由来の細菌の16S rRNA遺伝子のV1領域－V2領域の塩基配列を、既知の16Sデータベース（例えば、RDP又はCORE）及びNCBIゲノムデータベースにて類似検索を行い、分類学上の割り当てを行うことにより、細菌の属又は種を同定することができる。類似検索において、配列相同性の閾値（配列類似度閾値）を97%にすればよく、また、判定精度をより高める観点から、98%、99%又は99.5%であることが好ましく、99.7%であることがより好ましく、99.9%であることが更に好ましく、100%であることが更に好ましい。

[0025] Actinomyces属細菌としては、特に限定されないが、例えば、

Actinomyces graevenitzi, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces dentalis*, *Actinomyces haliotis*, *Actinomyces ihuae*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces johnsonii*, *Actinomyces massiliensis*, *Actinomyces oris*, *Actinomyces timonensis*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0026] *Selenomonas*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Selenomonas infelix*, *Selenomonas artemidis*, *Selenomonas diana*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, *Selenomonas sputigena*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0027] *Streptococcus*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus lactarius*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus alactolyticus*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus downei*, *Streptococcus dysgal*

actiae、Streptococcus equinus、Streptococcus gordonii、Streptococcus infantis、Streptococcus intermedius、Streptococcus mitis、Streptococcus mutans、Streptococcus oralis、Streptococcus pasteurianus、Streptococcus pneumoniae、Streptococcus pseudopneumoniae、Streptococcus pyogenes、Streptococcus rubneri、Streptococcus sanguinis、Streptococcus sinensis、Streptococcus sobrinus、Streptococcus vestibularisなどが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0028] Lactobacillus属細菌としては、特に限定されないが、例えばLactobacillus casei、Lactobacillus acidophilus、Lactobacillus antri、Lactobacillus crispatus、Lactobacillus delbrueckii、Lactobacillus fermentum、Lactobacillus frumenti、Lactobacillus gallinarum、Lactobacillus gasserii、Lactobacillus iners、Lactobacillus intestinalis、Lactobacillus johnsonii、Lactobacillus kitasatonis、Lactobacillus mucosae、Lactobacillus murinus、Lactobacillus paracasei、Lactobacillus pentosus、Lactobaci

Lillus pontis, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus rogosae*, *Lactobacillus ruminis*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus sanfranciscensis*, *Lactobacillus ultunensis*, *Lactobacillus vaginalis*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0029] *Corynebacterium*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Corynebacterium matruchotii*, *Corynebacterium argentoratense*, *Corynebacterium durum*, *Corynebacterium jeddahense*, *Corynebacterium kroppens tedtii*, *Corynebacterium propinquum*, *Corynebacterium renale*, *Corynebacterium simulans*, *Corynebacterium tuberculostearicum*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0030] *Rothia*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Rothia mucilaginosa*, *Rothia dentocariosa*, *Rothia endophytica*, *Rothia kristinae*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）

から入手することができる。

[0031] *Schaalia* 属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Schaalia odontolytica*、*Schaalia cardiffensis*、*Schaalia georgiae*、*Schaalia meyeri*、*Schaalia vaccimaxillae*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0032] *Atopobium* 属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Atopobium parvulum*、*Atopobium rimae*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0033] *Citrobacter* 属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Citrobacter rodentium*、*Citrobacter amalonaticus*、*Citrobacter farmeri*、*Citrobacter freundii*、*Citrobacter koseri*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0034] *Haemophilus* 属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Haemophilus haemolyticus*、*Haemophilus parainfluenzae*、*Haemophilus sputorum*、*Haemophilus parahaemolyticus*、*Haemophilus influenzae*、*Haemophilus*

parahaemolyticus, *Haemophilus pittmaniae*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0035] *Porphyromonas*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Porphyromonas pasteri*, *Porphyromonas catoniae*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas pogonae*, *Porphyromonas uenonis*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0036] *Alloprevotella*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Alloprevotella rava*, *Alloprevotella tannerae*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0037] *Gemella*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Gemella sanguinis*, *Gemella haemolysans*, *Gemella morbillorum*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0038] *Fusobacterium*属細菌としては、特に限定されないが、例えば、*Fusobacterium periodonticum* *Fusob*

acterium canifelinum、*Fusobacterium mortiferum*、*Fusobacterium necrophorum*、*Fusobacterium nucleatum*、*Fusobacterium varium*などが挙げられる。これらの細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列又は16S rRNA遺伝子のV1領域－V2領域の塩基配列は、既知のデータベース（例えば、RDP、CORE又はNCBIデータベース）から入手することができる。

[0039] 一実施形態において、群B-1の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～14で示される塩基配列であってよく、群B-2の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15～24に示される塩基配列であってよい（表1）。配列番号1～24は、表1に示すそれぞれの細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の部分配列であり、V1領域－V2領域の塩基配列を含む。

[表1]

細菌種	データベース ID	配列番号
群B－1		
<i>Actinomyces graevenitzi</i>	T-NR_042167.1	1
<i>Selenomonas infelix</i>	T-NR_028797.1	2
<i>Actinomyces viscosus</i>	T-NR_113030.1	3
<i>Streptococcus salivarius</i>	T-NR_042776.1	4
<i>Rothia mucilaginosa</i>	T-NR_044873.1	5
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	T-NR_026216.1	6
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	T-NR_115241.1	7
<i>Actinomyces naeslundii</i>	T-NR_113326.1	8
<i>Prevotella histicola</i>	T-NR_044407.1	9
<i>Streptococcus anginosus</i>	T-NR_118289.1	10
<i>Schaalia odontolytica</i>	T-NR_114395.1	11
<i>Prevotella denticola</i>	T-NR_113101.1	12
<i>Streptococcus lactarius</i>	T-NR_117425.1	13
<i>Atopobium parvulum</i>	T-NR_113159.1	14
群B－2		
<i>Porphyromonas pasteri</i>	T-NR_136788.1	15
<i>Haemophilus haemolyticus</i>	T-NR_104930.1	16
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	T-NR_116168.1	17
<i>Prevotella nanceiensis</i>	T-NR_113114.1	18
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	T-NR_117292.1	19
<i>Haemophilus sputorum</i>	T-NR_118143.1	20
<i>Haemophilus parahaemolyticus</i>	T-NR_114764.1	21
<i>Solobacterium moorei</i>	T-NR_115130.1	22
<i>Alloprevotella rava</i>	T-NR_118334.1	23
<i>Prevotella melaninogenica</i>	T-NR_102895.1	24

[0040] 一実施形態に係る多発性硬化症の診断方法は、(1) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A－1の細菌属の細菌又は群B－1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して多

い場合、前記被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定することができる。同様に、(2) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、前記被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定することができる。

[0041] 多発性硬化症への罹患の有無又は罹患の危険性の判定にあたっては、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、上記14属の細菌及び上記24種の細菌と97%以上の相同性を有する細菌の少なくとも1種について、判定を行ってもよい。判定精度をより高める観点から、上記細菌の2種以上について判定を行ってもよく、好ましくは、3種以上、4種以上、5種以上、6種以上、7種以上、8種以上、9種以上、10種以上について判定を行ってもよく、上記細菌の全てについて判定を行ってもよい。

[0042] 本明細書において、健常人における上記細菌の相対存在量は、予め測定しておいてもよい。健常人における上記細菌の相対存在量は、複数の健常人の平均値であってもよい。また、健常人における上記細菌の相対存在量の複数のデータと被験者の当該相対存在量のデータとから、統計解析（例えば、Welchのt検定）により有意差の有無を解析することもできる。

[0043] 一実施形態に係る多発性硬化症の診断方法は、(3) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当該相対存在量が治療前に比較して少ない場合、上記被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたと判定することができる。同様に、(4) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当

該相対存在量が治療前に比較して多い場合、上記被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたと判定することができる。

[0044] 本明細書において、治療前の被験者における上記細菌の相対存在量は、予め測定しておいてもよく、また治療後の被験者における上記細菌の相対存在量と略同時に測定してもよい。ここでいう「治療前」及び「治療後」とは、例えば、継続的な治療（例えば、定期的な投薬）を行っている期間の途中で施された治療（例えば、3回目の投薬）の前後を含む概念である。

[0045] 本明細書において、細菌の相対存在量とは、細菌叢全体に対し当該（特定の）細菌が占める割合を意味する。細菌の相対存在量は、例えば、細菌叢を構成する全細菌数と、細菌叢に含まれる特定の細菌の数から求めることができる。より具体的には、例えば、細菌叢に含まれる細菌に共通する塩基配列と各細菌種に特徴的な塩基配列とを有する遺伝子（例えば、16S rRNA遺伝子）を網羅的に解読し、解読した遺伝子の総数、及び特定の細菌種に帰属される遺伝子の総数を、それぞれ細菌叢を構成する全細菌数、及び特定の細菌の数として、特定の細菌の相対存在量を求めることができる。

[0046] 本実施形態に係る多発性硬化症の診断方法は、被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップを含み、当該細菌は、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌、或いは、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌である、多発性硬化症への罹患の有無又は罹患の危険性を判定するためのデータ収集方法と捉えることもできる。

[0047] 本実施形態に係る多発性硬化症の診断方法はまた、被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップを含み、当該細菌は、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌、或いは、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16Sリボソ

ームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌である、多発性硬化症の治療効果を判定するためのデータ収集方法と捉えることもできる。

[0048] 〔診断プログラム及び診断システム〕

上述した本実施形態に係る多発性硬化症の診断方法は、コンピュータを多発性硬化症の診断システムとして機能させる診断プログラムとして提供することもできる。

[0049] 一実施形態において、多発性硬化症の診断プログラムは、被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を網羅的に解読した塩基配列データを取得するステップ、16SリボソームRNA遺伝子データベースに基づき、取得した塩基配列データから、群A-1及び群A-2の細菌属の細菌、並びに群B-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する塩基配列の頻度を計算し、当該塩基配列の相対存在量を算出するステップ、算出した相対存在量を予め入力された基準値と比較して多発性硬化症の病態を判定するステップ、及び得られた判定結果を出力するステップをコンピュータに実行させる。

[0050] 一実施形態において、基準値は、健常人における対応する塩基配列の相対存在量であり、上記相対存在量が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量であり、かつ算出した相対存在量が健常人における当該相対存在量に比較して多い場合、又は、上記相対存在量が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量であり、かつ算出した相対存在量が健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、当該被験者は、多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する。

[0051] 一実施形態に係る多発性硬化症の診断システムは、被験者から採取された

唾液試料に含まれる細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を網羅的に解読した塩基配列データを取得する入力手段と、取得した塩基配列データに基づいて、被験者が多発性硬化症へ罹患している、又は罹患する危険性が高いことを判定する演算手段と、上記演算手段で得られた判定結果を出力する出力手段を備える。

[0052] 演算手段（例えば、CPU）は、入力した塩基配列データから群A-1及び群A-2の細菌属の細菌、並びに群B-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する塩基配列の少なくとも1つについて、当該塩基配列の出現頻度から相対存在量を算出するステップ、算出した相対存在量を、記憶装置（例えば、ROM、RAM）から読み出した基準値（健常人における上記相対存在量）と比較し、（ $i-1$ ）上記相対存在量が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量であり、かつ上記被験者における上記相対存在量が健常人における当該相対存在量に比較して多い場合、又は、（ $i-2$ ）上記相対存在量が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量であり、かつ上記被験者における上記相対存在量が健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、被験者は、多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定するステップを実行するものである。演算手段はまた、（ $i-1$ ）又は（ $i-2$ ）に該当しない場合、被験者は多発性硬化症に罹患していない、又は罹患する危険性が低いと判定するステップを実行してもよい。

[0053] 上述した診断プログラム及び診断システムの実施形態において、診断プログラムは、コンピュータ読み取り可能な記録媒体に記録されていてもよい。すなわち、本実施形態に係るコンピュータ読み取り可能な記録媒体は、上述したプログラムが記録されている。記録媒体は、非一時的記録媒体であってもよい。コンピュータ読み取り可能な記録媒体としては、例えば、コンピュ

ータのROM若しくはハードディスク、ネットワークに接続されたサーバ・コンピュータ等に設けられた外部記憶装置、又はフレキシブルディスク、メモリーカード、光磁気ディスク等の可搬記録媒体が挙げられる。

[0054] 入力手段は、網羅的に解読した塩基配列データをコンピュータに入力するためのものであって、例えば、マウス、キーボード、データ伝送回線、モデム等の各種インターフェースが挙げられる。判定結果は、例えば、ディスプレイ、プリンタ等の出力手段に出力される。判定結果はまた、他の情報処理端末へのデータ転送回線等を介して出力されてもよい。

[0055] 〔診断用バイオマーカー及びその使用〕

本実施形態に係る多発性硬化症の診断用バイオマーカーは、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1及び群A-2の細菌属の細菌並びに群B-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する唾液細菌からなる。群A-1及び群A-2の細菌属の細菌並びに群B-1及び群B-2は上述のとおりである。

[0056] 一実施形態の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する唾液細菌からなってもよい。配列番号1～24で示される塩基配列は、群B-1及び群B-2の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の部分塩基配列である。

[0057] 上述のとおり、16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列に基づき同定された群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種は、健常対照と比較してMS患者で有意に相対存在量が増加する。また、16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列に基づき同定された群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種は、健常対照と比較してMS患者で有意に相対存在量が減少する。

[0058] したがって、上記相対存在量の多寡に基づき、上記唾液細菌をバイオマーカーとして使用することができる。本実施形態のバイオマーカーによれば、例えば、多発性硬化症への罹患の有無又は罹患の危険性を判定すること、及

び多発性硬化症の治療効果を判定することなど、多発性硬化症を診断することができる。

[0059] 本実施形態に係る多発性硬化症の診断用バイオマーカーとしての使用は、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1及び群A-2の細菌属の細菌、並びにB-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する唾液細菌の、多発性硬化症の診断用バイオマーカーとしての使用である。一実施形態の使用は、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する唾液細菌の、多発性硬化症の診断用バイオマーカーとしての使用であってよい。

[0060] 〔予防剤又は治療剤〕

本実施形態に係る多発性硬化症の予防剤又は治療剤は、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分として含有する。

[0061] 一実施形態に係る多発性硬化症の予防剤又は治療剤は、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分として含有する。

[0062] 上述のとおり、16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列に基づき同定された群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種は、健常対照と比較してMS患者で有意に相対存在量が減少する。本実施形態に係る予防剤又は治療剤は、当該細菌又はこれら由来の生理活性物質を含有することから、多発性硬化症の予防又は治療（病態の改善、緩和、寛解）に適する。

[0063] 有効成分である細菌は、例えば、ヒトの唾液細菌叢を構成する唾液細菌を単離培養し、単離された唾液細菌の16S rRNA遺伝子のV1領域-V

2領域の塩基配列を解析し、所望の塩基配列を有する唾液細菌を特定することにより得ることができる。また、既知菌種と97%以上の類似度を有する唾液細菌は、当該菌種と同一種であるため、当該菌種をATCC等の細胞バンクから購入してもよい。唾液細菌由来の生理活性物質は、当該唾液細菌を培養し、培地中に分泌された生理活性物質を精製又は単離することで得ることができる。また、当該唾液細菌を接種及び定着させたマウス等の動物の口腔内容物から精製又は単離することで得ることもできる（*in vivo*方法）。

[0064] 予防剤又は治療剤は、有効成分のみで構成してもよく、また薬学的に許容される担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤等）又は添加剤（等張化剤、滑沢剤、矯味矯臭剤、可溶化剤、懸濁剤、希釈剤、界面活性剤、安定剤、吸収促進剤、増量剤、pH調整剤、保湿剤、吸着剤、崩壊抑制剤、コーティング剤、着色剤、保存剤、抗酸化剤、香料、風味剤、甘味剤、緩衝剤、無痛化剤等）を更に含有していてもよい。

[0065] 予防剤又は治療剤の剤形は、投与方法、処方条件に応じて適宜選択してよい。剤形としては、例えば、錠剤、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、ドロップ剤、舌下剤、トローチ剤、液剤等を挙げることができる。また、有効成分を大腸に効率良く送達するという観点から、製剤には腸溶性コーティングを施してもよい。腸溶性コーティングとしては、公知のものを特に制限なく使用することができる。

[0066] 予防剤又は治療剤の投与方法としては、経口投与、非経口投与のいずれであってもよい。予防剤又は治療剤の投与量は、例えば、ヒト成人男子（体重60kg）に投与する場合、有効成分量換算で、通常0.001mg～5000mg／日／人であり、好ましくは0.01mg～500mg／日／人である。複数回に分割して投与してもよい。

[0067] 〔予防方法又は治療方法〕

本実施形態に係る多発性硬化症の予防方法又は治療方法は、16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌

菌種のいずれかの 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列と 97% 以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも 1 種を、それを必要とする対象に投与することを含む。

[0068] 一実施形態に係る多発性硬化症の予防方法又は治療方法は、16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列が、配列番号 15～24 で示される塩基配列のいずれかと 97% 以上の相同性を有する細菌、及び上記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも 1 種を、それを必要とする対象に投与することを含む。

実施例

[0069] 以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明する。ただし、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0070] 1. 試験方法

[1. 患者、臨床データ及び健常対照]

20～80歳のMS患者91例とNMOSD患者20例を対象とした。MS患者91名全員がMcDonaldの診断基準を満たしていた。この研究では、最初に91名の患者を臨床及びMRIに基づく方法によって2つのグループに分類した。MS特異的脳MRI病変を有する71名の患者を典型的なMS群とし、MS特異的脳MRI病変を有さない20名の患者を非典型MS群とした。典型的なMSを有する71名の患者はさらに、患者の臨床経過に基づく神経科医の診断により、59名のRRMS患者及び12名のSPMS患者に分類された。すべてのNMOSD患者は血清抗AQP4抗体陽性であり、NMOSDの国際的な総意に基づく診断基準を満たしていた。また、罹病期間が5年以下の20例を早期RRMS、EDSSスコアが1以下の24例を軽症RRMSと診断した。EDSSスコアは、MSの臨床評価に基づく神経障害の尺度である(Kurtzke et al., 1983)。試験登録時に再発が認められた患者はいなかった。年間再発率(ARR)は、サンプル採取に先立つ1年間の再発回数と定義した。本研究において、「寛

解状態」とは、30日以上臨床的に安定な状態として定義され、「再発状態」は、24時間以上継続する神経症候が示された神経の増悪の開始後30日以内の期間として定義された。感染症に罹患し、糞便サンプルの回収中に抗生物質で治療された患者は、本研究から除外された。RRMS患者11名、SPMS患者2名及び非典型MS患者2名は、サンプリング前2ヶ月以内に免疫療法を受けていなかった。年齢、性別及びBMIが調整された健常者60名の唾液サンプル及び30名の糞便サンプルから16S rRNAを得た。また、MS患者及びNMOSD患者118名から、完全に一致した患者111名の糞便サンプルから16S rRNAを得た。登録患者及び健常者の詳細な図1に示す。

[0071] 本研究は国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター臨床研究審査委員会（A2016-132）及び理化学研究所生命医科学研究センター臨床研究審査委員会（H30-4（6））によって承認された。サンプルを提供したすべての被験者から署名されたインフォームド・コンセントが得られた。

[0072] [2. DNAの準備]

採取した唾液サンプルは、4℃の温度を維持しながら、実験室に輸送した。実験室では液体窒素を用いて試料を直ちに凍結し、使用時まで-80℃で保存した。

[0073] 採取した糞便サンプルは直ちに使い捨ての酸素吸収剤及び二酸化炭素発生剤を含有するプラスチックバッグ（プラスチックバッグ内は、酸素感受性嫌気性細菌が生存可能な環境である。）に入れて、4℃の温度を維持しながら、実験室へ運搬した。実験室において、20%グリセロールを含有するリン酸緩衝生理食塩水に糞便を懸濁させ、直ちに液体窒素で凍結させ、使用するまで-80℃で保管した。細菌のDNAは、酵素溶解法に従って、糞便サンプルから単離され、精製された。

[0074] [3. 16S rRNA遺伝子のV1領域-V2領域の配列決定及びデータ処理]

細菌に普遍的なプライマーセット（フォワードプライマー 27 F mod（バーコード配列を含む、配列番号 25 : 5' - a g r g t t t g a t y m t g g c t c a g - 3'）及びリバースプライマー 338 R（配列番号 26 : 5' - t g c t g c c t c c c g t a g g a g t - 3'）を用いた PCR により、各サンプル中に含まれる細菌種の 16 S rRNA 遺伝子 V1 領域 - V2 領域を網羅的に増幅した (Kim et al., an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes 20, 241-253 (2013).)。PCR 増幅産物を次世代シーケンサー MiSeq システム (illumina 社製) に供与し、各 PCR 産物の配列を決定した。

[0075] 上記で得られた 96 の配列は、理化学研究所 IMS マイクロバイオーム研究チームで構築した解析パイプラインに供与することで、細菌種の相対比率の解析を行った。本パイプラインでは、各サンプルに割り当てられたペア配列を、Fast1-join プログラムによって結合した後、平均クオリティ値が 25 未満で両方のユニバーサルプライマーと不正確な一致であるリード及びキメラの可能性であるリード（全リードに対して全部で 43-44%）が除外された。残った高品質の配列（平均クオリティ値 > 25）から、サンプル当たり 10,000 のリードがランダムに選択され、本研究で実施された分析に使用された。

[0076] 選択されたリードを平均クオリティ値の高い順序にソートし、96% のペアワイズ相同性を指標に、UC LUST アルゴリズムを用いて分類することにより、操作上の分類単位 (Operational Taxonomic Unit、OTU) にグループ化した (Said et al., DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes 21, 15-25 (2014))。GLSEARCH プログラムを用いて、既知の 16 S (RDP 及び CORE) 及び NCBI ゲノムデータベースに対して類似検索を行い、各 OTU に対する分類学上の割り当てを行った。門レベル、科レベル、属レベル及び種レベルでの分類には、それぞれ 70%、90%、94% 及び 96% の配列類似度閾値を適用した。

[0077] [4. 統計解析]

全ての統計解析には、R (version 3.3.3) 又は Prism (グラフパッドソフトウェア社製) を使用した。ウィルコクソン順位和検定は Benjamini-Hochberg 法により対象群間の細菌叢データを比較するために用いられた。スピアマンの相関係数解析は、相関関係を評価するために用いられた。クラスカルウォリス検定及びカイ二乗検定は、患者背景データの比較に用いられた。ノンパラメトリック多変量分散解析 (permutational multivariate analysis of variance、PERMANOVA) は、細菌叢全体の組成の比較に用いられた。有意水準は、 p 値 0.05 未満に設定した。

[0078] 2. 結果

[1. 患者と健常対照の背景プロフィール]

被験者の背景プロフィールを図 1 に示す。RRMS 患者 59 名 (平均年齢 39.2 歳)、SPMS 患者 12 名 (平均年齢 44.3 歳)、非典型 MS 患者 20 名 (平均年齢 42.1 歳)、NMOSD 患者 20 名 (平均年齢 43.1 歳)、健常対照者 60 名 (HC; 平均年齢 39.5 歳) が組み入れられた。

[0079] 全ての対象群間における年齢、性別及び BMI には有意差はなかった。一方、免疫療法を受けた患者の割合は、4 つの患者群と HC 群の間で実質的な差があった。しかし、RRMS 群では免疫療法を受けた患者と受けなかった患者の間に α 及び β の多様性に有意差がなかったことから、免疫療法は唾液細菌叢の構造に有意な影響を及ぼさなかった (図示せず)。

[0080] [2. 患者群と健常者群との間の唾液細菌叢における α 及び β 多様性の比較]

Miseq を用いた 16S rRNA 遺伝子 V1 領域-V2 領域のアンプリコンシーケンス解析によって、すべての被験者からの高品質 16S リードから、分析のために 1 サンプル当たり 10,000 リードを無作為に選択し、171 サンプルから合計で 1710000 リードを選択した。

[0081] 図2のA～Dは α 多様性指数の結果を示す。箱ひげ図におけるプロットは、中央値、四分位範囲、最小値及び最大値を示した。 $*$: $p < 0.05$ 、 $**$: $p < 0.01$ 及び $***$: $p < 0.001$ は、多群比較のための Benjamini-Hochberg 法を用いたウィルコクソンの順位和検定に基づいた。

[0082] (A) OTU数、(B) Chao-1、(C) ACE (abundance-based coverage estimator) 及び (D) Shannon 指数は、非典型MS群とHC群の比較を除いて、5群間で α 多様性の有意差を示さなかった(図2)。

[0083] 次に、16Sデータを用いたUniFrac距離解析に基づいて、 β 多様性を評価した。加重(weighted)PCoAプロットの2つの成分は分散の33.1%及び20.9%を説明し、非加重(unweighted)PCoAプロットの2つの成分は分散の8.1%及び6.8%を説明した(プロット図を示さず)。4つの患者群とHC群の間のノンパラメトリック多変量分散解析(PERMANOVA)における R^2 及び調整されたp値は図2 Eに示す。 $*$: Benjamini-Hochberg法によるウィルコクソン順位和検定に基づく $p < 0.05$ 。PERMANOVAは、全てのMSサブタイプ群とHC群の間で、加重(weighted)及び非加重(unweighted)UniFrac距離に対して全唾液細菌叢の β 多様性に有意差を示した(図2 E)。上述したように、RRMS群とHC群の間で観察された α 及び β の多様性の違いは、患者に投与された免疫療法の違いによる有意な影響を受けなかった。

[0084] [3. 5つの対象群間の細菌の存在量の比較]

16Sデータに基づき、様々な分類レベルで細菌存在量を比較した。各サンプルの分類帰属や存在量の定量は、16Sリードを、公開されている利用可能な細菌の16S及びゲノムデータベースにマッピングすることにより行った。

[0085] 図3は、5つの対象群の間で、細菌叢組成を門レベルで比較した結果を示

す図であり、上位6つの門の結果を示す。各箱ひげ図におけるプロットは、中央値、四分位範囲、最小値及び最大値を示した。 $*$: $p < 0.05$ 、 $**$: $p < 0.01$ 、 $***$: $p < 0.001$ 、 $****$: $p < 10^{-4}$ 、 $*****$: $p < 10^{-5}$ 、 $*****$: $p < 10^{-6}$ 、 $*****$: $p < 10^{-7}$ 、 $*****$: $p < 10^{-8}$ 、及び $*****$: $p < 10^{-9}$ は、多群比較のためのBenjamini-Hochberg法を用いたウィルコクソンの順位和検定に基づいた。

[0086] 16Sデータに基づく門レベルの分類帰属により、5つの対象群のうち少なくとも1つの対象群で平均相対存在量が0.1%以上である6つの主要な門が同定された。5つの門：Firmicutes (A)、Bacteroidetes (B)、Proteobacteria (C)、Actinobacteria (D)、Fusobacteria (E) の存在量には、2つの対象群の間で有意な変化があった（図3）。

[0087] 図4は、5つの対象群間で、細菌叢組成を属レベルで比較した結果を示す図であり、上位12の属の結果を示す。各箱ひげ図におけるプロットは、中央値、四分位範囲、最小値及び最大値を示した。 $*$: $p < 0.05$ 、 $**$: $p < 0.01$ 、 $***$: $p < 0.001$ 、 $****$: $p < 10^{-4}$ 、 $*****$: $p < 10^{-5}$ 、 $*****$: $p < 10^{-6}$ 、 $*****$: $p < 10^{-7}$ 、 $*****$: $p < 10^{-8}$ 、及び $*****$: $p < 10^{-9}$ は、多群比較のためのBenjamini-Hochberg法を用いたウィルコクソンの順位和検定に基づいた。

[0088] RRMS群とHC群の唾液マイクロバイームと比較して、4つの主要な門（Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria及びActinobacteria）、10つの属（Streptococcus、Neisseria、Rothia、Veillonella、Haemophilus、Schaalia、Gemella、Fusobacterium、Porphyromonas及びActinomyces）の存在量はそれらの間で有意に変化していた（図3及び図4

）。MS／NMOSD群の唾液細菌叢では、HC群と比較して、*Veillonella*の存在量が増加していたのに対して、*Haemophilus*及び*Porphyromonas*の存在量は減少していた（図4）。

[0089] 図5は、5つの対象群間の属レベルでの細菌種の平均相対的存在量（Average relative abundance）を比較した結果を示す。5つのグループのうち少なくとも1つで、平均相対存在量が0.1%以上の属を表す。データは平均±SEMで表す。*Benjamin-Hochberg法を用いたウィルコクソン順位和検定に基づく $p < 0.05$ 、患者群とHC群の間の相対的存在量に有意な変化があることを示している。16Sデータに基づく属レベルの分類帰属により、5つの対象群のうち少なくとも1つの対象群で平均相対存在量が0.1%以上の38属を同定し、24属の平均相対的存在量は2群間で有意な変化を示した（図5中*）。

[0090] 図6及び図7は、16Sデータに基づく種レベルの分類帰属により、5つの対象群のうち少なくとも1つの対象群で平均相対存在量が0.1%以上の種等価クラスタの存在度を比較した結果を示す。図6及び図7は、任意の2つの対象群間で存在量に有意な変化を示す細菌種のリストで、2つの群間で倍数変化（ $\log 10$ ）があった細菌種を示す。統計はBenjamin-Hochberg法を用いたウィルコクソン順位和検定に基づいた。5つの対象群のすべてのペア間の比較により、任意の2つの対象群間で存在量に有意な変化を有する合計35の異なる種が同定された（ウィルコクソン検定、 $p < 0.05$ ；図6及び図7）。RRMS群とHC群の間、SPMS群とHC群の間、非典型MS群とHC群の間、NMOSD群とHC群の間、SPMS群と非典型MS群の間で存在量に有意差を示す、29種、5種、21種、21種及び2種をそれぞれ同定した（図6及び図7）。

[0091] [4. 唾液細菌叢の変化は疾患活動性と有意に関連]

唾液細菌叢データと患者の疾患活動性の程度との関連性を、サンプル採取前の1年以内に少なくとも1回の臨床的再発を経験した患者から得られた疾患活動性が高いサンプルと、サンプル採取前の1年以上臨床的再発を経験し

ていない患者から得られた疾患活動性が低いサンプルとを比較することによって検討した。

[0092] その結果を図8～10に示す。図8～10は、4つの α 多様性指標、及び、5つの対象群の少なくとも1つにおいて相対存在量が0.1%以上の6門、38属及び84種の存在量における疾患活動性が高い群 (Recent activity patient) と疾患活動性が低い群 (Non-recent activity patient) の間の差異を示す。*を付した太字は、疾患活動性が高い群において、疾患活動性が低い群と比較して有意に変化した細菌のデータを示す。統計的手法はウィルコクソン順位和検定に基づいた。

[0093] 図11は、全患者において、疾患活動性が高い群では疾患活動性が低い群に比べて存在量が有意に増加又は減少した5つの唾液細菌の相対発現量を示す。疾患活動性が高い群と疾患活動性が低い群との間の差異を、4つの α 多様性指標及び5つの対象群の少なくとも1つにおいて相対存在量が0.1%を超える6つの門、39属及び84種の相対存在量において評価した。各箱ひげ図におけるプロットは、中央値、四分位範囲、最小値及び最大値を示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 、**** $p < 0.0001$ 、***** $p < 0.00001$ 、***** $p < 0.000001$ であった。

[0094] 有意に変化した細菌は、*Porphyromonas*、*Porphyromonas pasteri*、*Haemophilus sputorum*、*Streptococcus australis* 及び *Streptococcus gordonii* を含み、疾患活動性が低い群と比較して疾患活動性が高い群における相対存在量が有意に減少した（それぞれ $p = 0.03$ 、 0.03 、 0.03 、 0.01 及び 0.01 ；図11）。

[0095] [5. RRMSの診断マーカーとしての唾液細菌叢の可能性の評価]

ランダムフォレスト (RF) を持つRRMSの予測モデルをRRMS群とHC群の間の差に基づいて開発し、交差検証により評価した。この目的のため

めに、全てのRRMS患者を類似した被験者数を有する2つのグループ：RRMSの探索コホート（discovery cohort； $n=30$ ）と検証コホート（validation cohort； $n=29$ ）に分け、選択バイアスを最小限にするために2つのコホート間のサンプル採取日の差が最小にした（図12）。

- [0096] 図13は、RRMS群と健常対照群の唾液及び腸内細菌叢のランダムフォレストアルゴリズム（機械学習予測モデル）解析の結果を示す。ランダムフォレスト（RF）は唾液サンプルを用いて属レベル（A）と種レベル（B）で行われた。最も高い受信者動作特性曲線下面積（AUC）を有する最良のRFモデルは、各ウィンドウ内の矢印によって示される。横軸は、属又は種の数を示し、使用された細菌は上記の39属及び84種であった。
- [0097] 図14及び図15は、それぞれRFアルゴリズムにより選択された14属及び24種の細菌リストであり、各属又は種の存在量に基づくZスコアは、上に示すスケール通りの最低（Color Key：-1）から最高（Color Key：1）まで描かれている。＊：患者群とHC群の比較におけるウィルコクソン順位和検定に基づく $p<0.05$ 。
- [0098] 次に、唾液及び糞便細菌叢によるRRMS群とHC群とを診断する可能性を検討した。表2、図16及び図17は、RRMS群、早期発症RRMS群、軽症RRMS群及びHC群の間の属レベル及び種レベルでの唾液及び糞便細菌叢の平均AUCを示す。

[表2]

カテゴリー	由来	サンプル	細菌	AUC (属)	AUC (種)
RRMS 群-HC 群 (RRMS & HC 発見コホート)	唾液	RRMS: 30 HC: 30	14 属 24 種	0.94 * 交差検証	0.93 * 交差検証
RRMS 群-HC 群 (RRMS & HC 発見コホート)	糞便	RRMS: 30 HC: 30	8 属 26 種	0.82 * 交差検証	0.68 * 交差検証
RRMS 群-HC 群 (RRMS & HC 発見コホート)	唾液 & 糞便	RRMS: 30 HC: 30	18 属 30 種	0.96 * 交差検証	0.93 * 交差検証
RRMS 群-HC 群 (RRMS & HC 検証コホート)	唾液	RRMS: 29 HC: 30	14 属 24 種	0.79	0.83
早期発症 RRMS (罹病期間 ≤ 5 年) 群-HC 群 (HC 検証コホート)	唾液	RRMS: 20 HC: 30	14 属 24 種	0.84	0.84
軽症 RRMS 群 (EDSS スコア ≤ 1)-HC 群 (HC 検証コホート)	唾液	RRMS: 24 HC: 30	14 属 24 種	0.88	0.81

[0099] RRMSとHCの発見コホートからの唾液細菌叢に基づく予測モデルでは、受信者動作特性曲線下面積（AUC）は、それぞれ0.94（属レベル）と0.93（種レベル）であり（図13～15、図16 A、表2）、14属、24種（相対存在量0.1%以上）からなり、2つのコホートの識別に大きく寄与していた（図13～15）。発見コホートからの上記の予測モデルは、RRMS及びHCの検証コホートに適用することによって検証された。AUCはそれぞれ0.79（属レベル）と0.83（種レベル）であった（図16 A及びB、図17 B、表2）。

[0100] RRMS（n=30）とHC（n=30）の発見コホートで正確に一致した被験者から採取した唾液と糞便サンプルを用いて、RRMSの診断マーカーとしての唾液と糞便細菌叢の可能性を評価し、比較した。糞便サンプルに基づく予測モデルのAUCは0.82（属レベル）と0.68（種レベル）であり、唾液サンプルに基づくAUCはそれぞれ0.94（属レベル）と0.93（種レベル）であり、唾液細菌叢のモデルのRRMSの予測精度は糞便細菌叢よりも高いことが示された（表2、図17 E）。糞便及び唾液サ

ンプルに基づく予測モデルは、AUCが0.96（属レベル）及び0.93（種レベル）であり、これは唾液サンプルのみに基づくものとほぼ同等であった（表2、図17 F）。これらのデータは、唾液細菌叢に基づく予測モデルのほうが糞便細菌叢に基づく予測モデルよりも予測精度が高いことが示唆された。

[0101] 早期RRMSコホート（罹病期間5年以下）のAUCは0.84（属レベル）及び0.84（種レベル）、軽症RRMSコホート（EDSSスコアが1以下）のAUCはそれぞれ0.88（属レベル）及び0.81（種レベル）であった（表2、図16 C、図17 D）。これらのデータは唾液細菌叢がMSの早期かつ高感度な診断マーカーである可能性を示唆している。

[0102] これらの細菌のセットを用いて検証コホートのRRMS群とHC群の分別能を評価したところ、約83%の精度（area under the curve（AUC）；0.83）で2群を区別することができた。さらに、発症5年以内の早期発症RRMS患者群とHC群との比較、神経障害度スコア（EDSSスコア）が1以下の検証RRMS患者群とHC群との比較においても、それぞれ84%、88%の精度で2群を区別することができた。

請求の範囲

[請求項1]

多発性硬化症の診断方法であって、治療前及び治療後に被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップと、以下の(1)又は(2)を実施するステップとを備える、方法。

(1) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して多い場合、前記被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する

(2) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量が、健常人における当該相対存在量に比較して少ない場合、前記被験者は多発性硬化症に罹患している、又は罹患する危険性が高いと判定する

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus*

us parasanguinis, Actinomyces naeslundii, Prevotella histicola, Streptococcus anginosus, Schaaliala odontolytica, Prevotella denticola, Streptococcus lactarius, Atopobium parvulum

群B-2: Porphyromonas pasteri, Haemophilus haemolyticus, Haemophilus parainfluenzae, Prevotella nancaiensis, Fusobacterium periodonticum, Haemophilus sputorum, Haemophilus parahaemolyticus, Solobacterium moorei, Alloprevotella rava, Prevotella melaninogenica

[請求項2]

多発性硬化症の診断方法であって、治療前及び治療後に被験者から採取された唾液試料に含まれる細菌の相対存在量を測定するステップと、以下の(3)又は(4)を実施するステップとを備える、方法。

(3) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1の細菌属の細菌又は群B-1の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当該相対存在量が治療前に比較して少ない場合、前記被験者の多発性硬化症の病態は治療により改善されたと判定する

(4) 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌の相対存在量を治療前後で比較して、治療後の当該相対存在量が治療前に比較して多い場合、前記被験者の多発性硬化症の病態は治療により

改善されたと判定する

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nancaiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Solobacterium moorei*, *Alloprevotella rava*, *Prevotella melaninogenica*

[請求項3]

前記多発性硬化症が、再発寛解型多発性硬化症である、請求項1又

は2に記載の方法。

[請求項4] 前記細菌の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、16SrRNA遺伝子のV1領域-V2領域の塩基配列である、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項5] 前記群B-1の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1~14で示される塩基配列であり、前記群B-2の細菌種の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15~24に示される塩基配列である、請求項1又は2に記載の方法。

[請求項6] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1及び群A-2の細菌属の細菌並びに群B-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する唾液細菌からなる、多発性硬化症の診断用バイオマーカー。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*,

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella dentic*

ola, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nancaiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Solobacterium moorei*, *Alloprevotella rava*, *Prevotella melaninogenica*

[請求項7] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する唾液細菌からなる、多発性硬化症の診断用バイオマーカー。

[請求項8] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-1及び群A-2の細菌属の細菌、並びに群B-1及び群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する唾液細菌の、多発性硬化症の診断用バイオマーカーとしての使用。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群A-2: *Haemophilus*, *Porphyromonas*, *Alloprevotella*, *Gemella*, *Fusobacterium*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivari*

us, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

群B-2: *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nancaiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Solobacterium moorei*, *Alloprevotella rava*, *Prevotella melaninogenica*

[請求項9] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号1～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する唾液細菌の、多発性硬化症の診断用バイオマーカーとしての使用。

[請求項10] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌、及び前記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分として含有する、多発性硬化症の予防剤又は治療剤。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

[請求項11] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌、及び前記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を有効成分として含有する、多発性硬化症の予防剤又は治療剤。

[請求項12] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、群A-2の細菌属の細菌又は群B-2の細菌種のいずれかの16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する細菌、及び前記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を、それを必要とする対象に投与することを含む、多発性硬化症の予防方法又は治療方法。

群A-1: *Actinomyces*, *Selenomonas*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Schaalia*, *Atopobium*, *Citrobacter*

群B-1: *Actinomyces graevenitzi*, *Selenomonas infelix*, *Actinomyces*

viscosus, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*

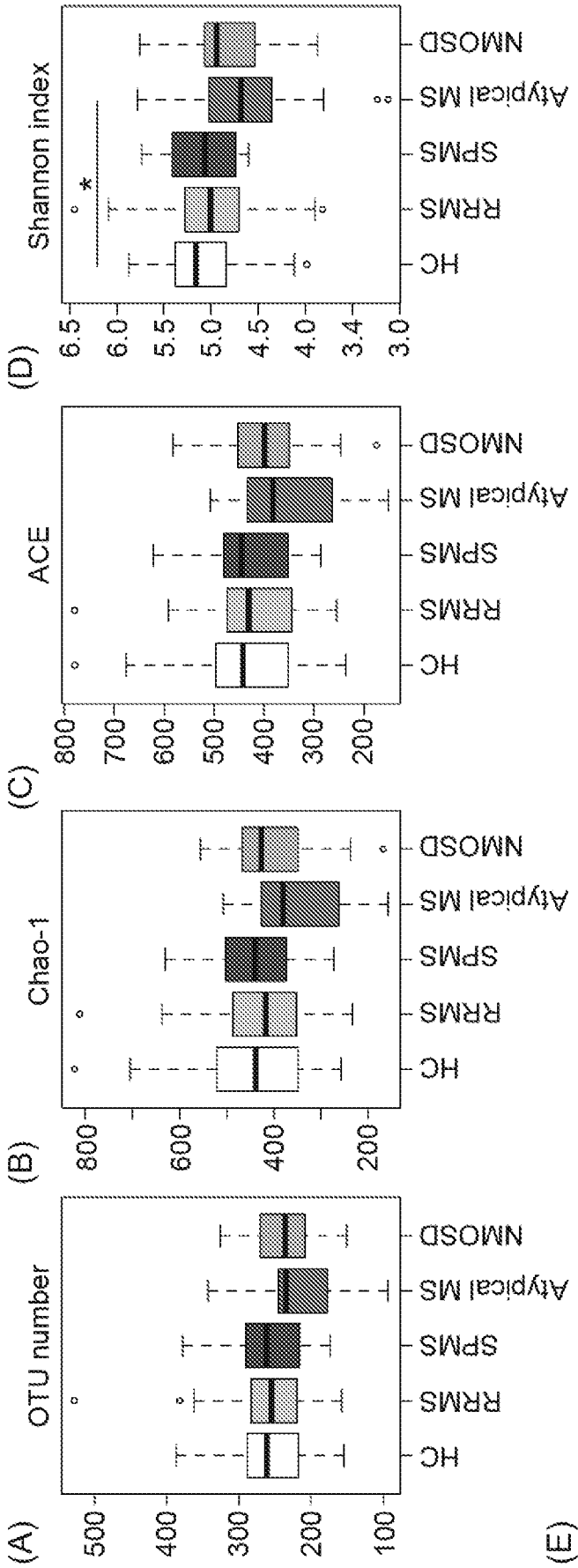
[請求項13] 16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列が、配列番号15～24で示される塩基配列のいずれかと97%以上の相同性を有する細菌、及び前記細菌に由来する生理活性物質からなる群より選択される少なくとも1種を、それを必要とする対象に投与することを含む、多発性硬化症の予防方法又は治療方法。

[図1]

	HC (n=60)	RRMS (n=59)	SPMS (n=12)	Atypical MS (n=20)	NMOSD (n=20)	p-value
Age, year	39.5 ± 1.63	39.2 ± 1.04	44.3 ± 3.19	42.1 ± 1.91	43.1 ± 2.59	0.2
Sex (female : male)	36 : 24	44 : 15	7 : 5	14 : 6	18 : 2	0.09
BMI	21.9 ± 0.32	21.8 ± 0.42	21.4 ± 0.85	22.3 ± 0.91	22.9 ± 1.03	0.74
Onset age, year		30.6 ± 1.07	27.4 ± 2.77	34.6 ± 2.10	31.9 ± 2.53	
Disease duration, year		8.6 ± 0.83	16.8 ± 1.83	7.6 ± 1.07	11.2 ± 1.77	
EDSS		1.92 ± 0.18	5.79 ± 0.79	2.30 ± 0.33	3.55 ± 0.42	
ARR		0.68 ± 0.11	0.17 ± 0.17	1.10 ± 0.26	0.95 ± 0.22	
Immunotherapy						
Oral PSL, %		41 (n = 24)	58 (n = 7)	65 (n = 13)	95 (n = 19)	
IS, %		5 (n = 3)	33 (n = 4)	25 (n = 5)	45 (n = 9)	
DMDs						
IFN-β, %		36 (n = 21)	17 (n = 2)	15 (n = 3)	0	
GA, %		5 (n = 3)	0	0	0	
FTY, %		7 (n = 4)	17 (n = 2)	5 (n = 1)	0	
NTZ, %		0	8 (n = 1)	0	0	
DMF, %		3 (n = 2)	0	0	0	

データは平均±SEMで表す。
略語:ARR=年間再発率; EDSS=総合障害度評価尺度; PSL=プレドニゾロン; IS=免疫抑制薬; DM D=疾患修飾薬;
IFN-β=インターフェロン-β; GA=グラチラマ-酢酸; FTY=フィンゴリモド; NTZ=ナタリズマブ; DMF=フマル酸ジメチル;
HC=健康対照; RRMS=再発寛解型多発性硬化症; SPMS=二次進行型多発性硬化症;
Atypical MS=非典型多発性硬化症; NMOSD=視神経脊髄炎スเปクトラム疾患

[図2]

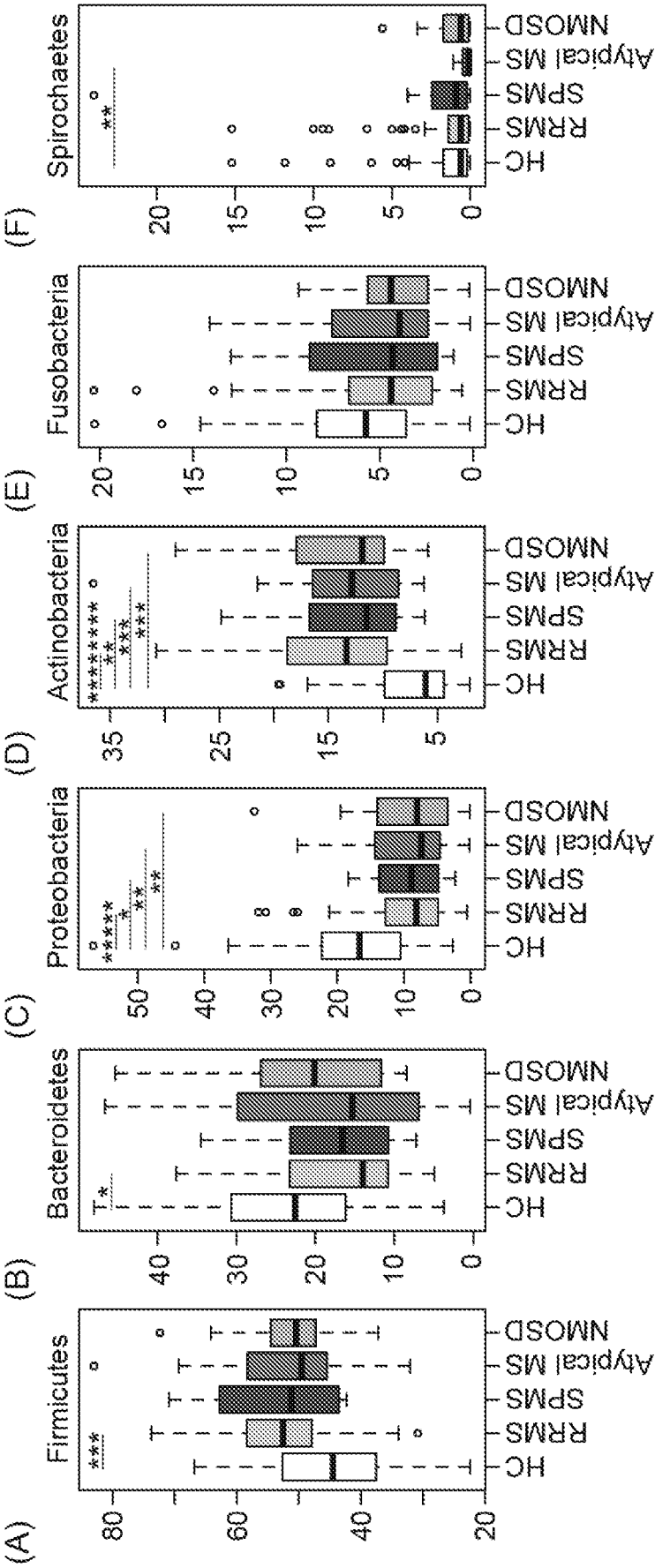


(E)

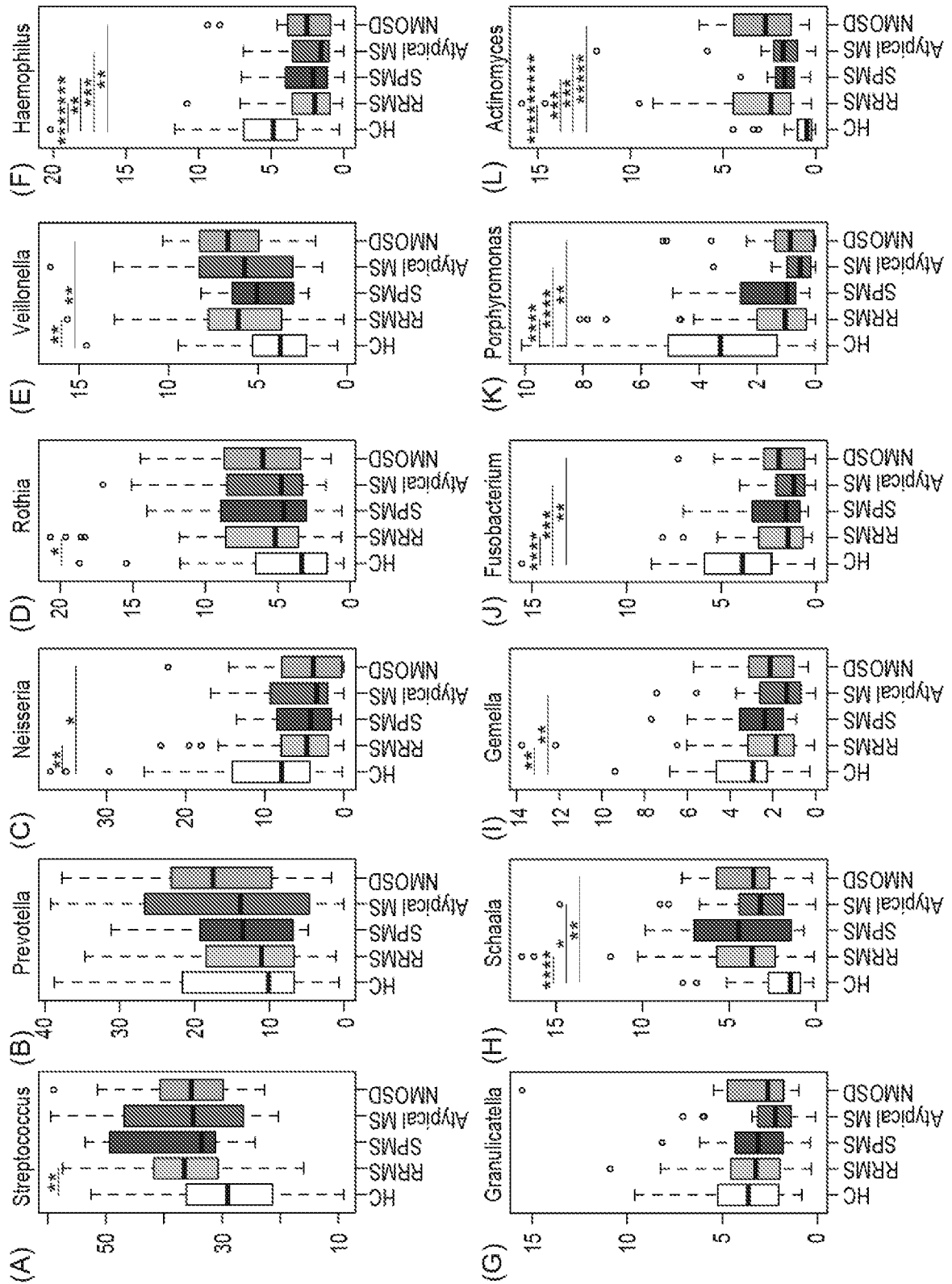
Category	No. subject	Weighted UniFrac		Unweighted UniFrac	
		R ²	adjusted p-value	R ²	adjusted p-value
RRMS vs HC	RRMS:59	0.122	< 0.001*	0.035	< 0.001*
	HC:60				
SPMS vs HC	SPMS:12	0.052	0.02*	0.026	< 0.001*
	HC:60				
Atypical MS vs HC	Atypical MS:20	0.083	0.002*	0.042	< 0.001*
	HC:60				
NMOSD vs HC	NMOSD:20	0.07	< 0.001*	0.033	< 0.001*
	HC:60				

*p < 0.05 based on the wilcoxon rank sum test with the Benjamini-Hochberg method for multiple group comparisons.

[図3]



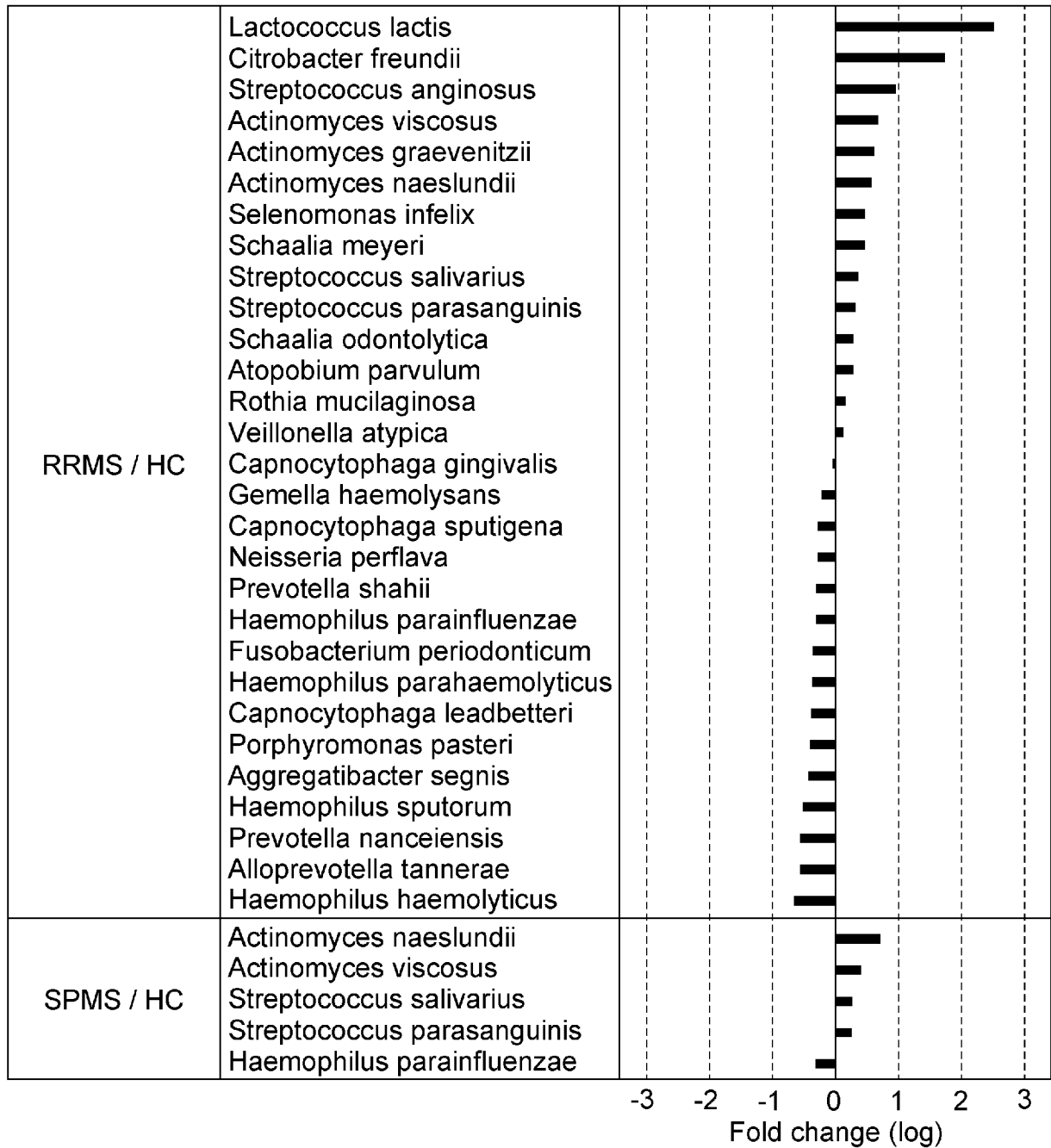
[図4]



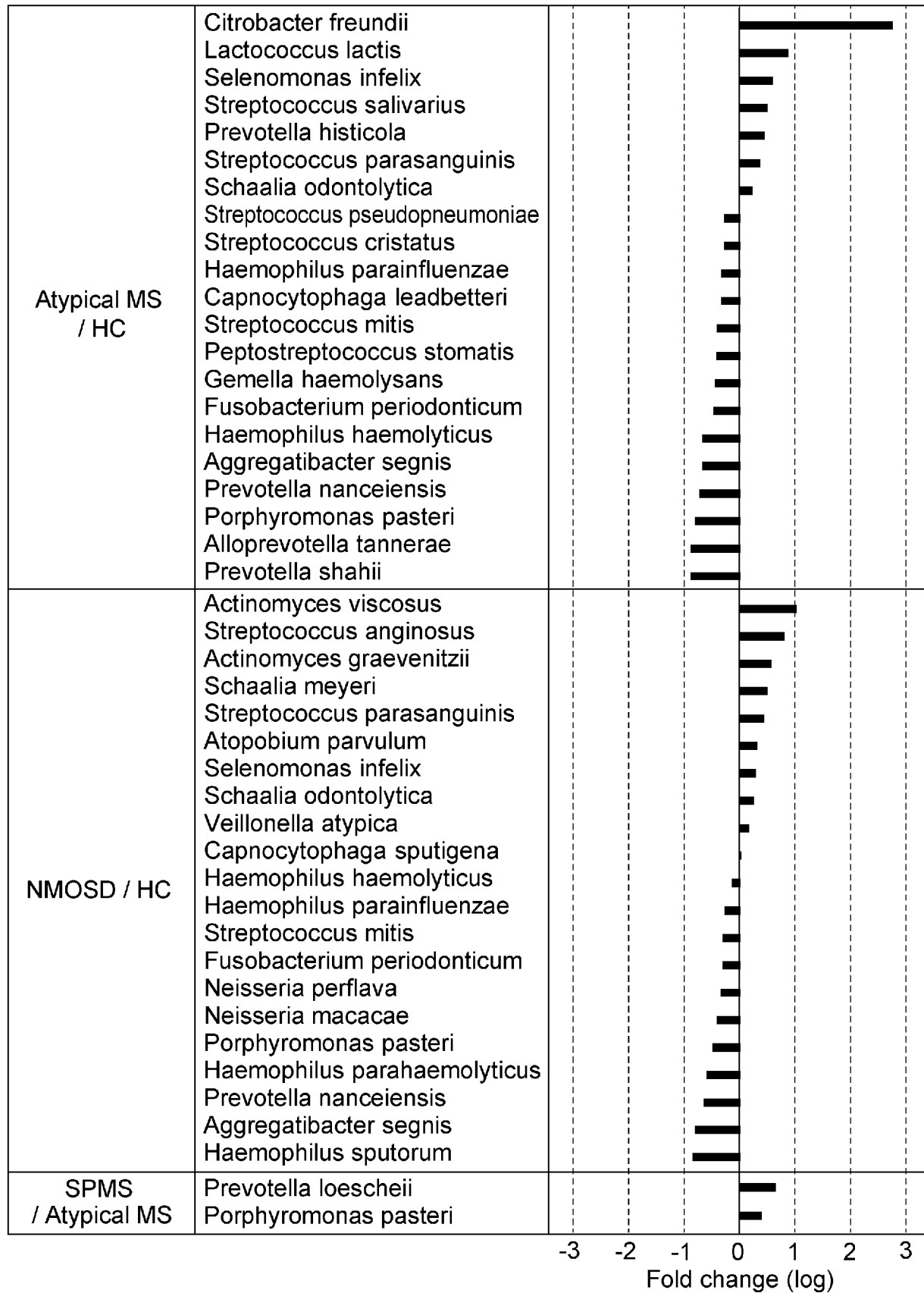
[図5]

Genus	Average relative abundance					
	HC	RRMS	SPMS	Atypical MS	NMOSD	Average
Streptococcus	29.6±1.3	36.0±1.3*	37.6±3.0	37.1±2.8	35.7±2.0	33.9
Prevotella	13.4±1.1	13.1±1.0	14.6±2.7	15.8±2.8	16.7±2.2	14.1
Neisseria	10.6±1.1	5.9±0.7*	5.4±1.3	5.8±2.8	5.3±1.4*	7.4
Rothia	4.4±0.5	6.6±0.6*	5.8±1.2	6.6±1.2	6.4±0.9	5.7
Veillonella	4.2±0.3	6.0±0.4*	5.0±0.6	6.2±0.9	6.3±0.6*	5.4
Haemophilus	5.4±0.4	2.5±0.3*	2.7±0.6*	2.5±0.5*	2.8±0.6*	3.6
Granulicatella	3.8±0.3	3.5±0.3	3.4±0.6	2.5±0.4	3.6±0.7	3.5
Schaalia	2.0±0.2	4.4±0.4*	4.6±1.0	4.0±0.8*	3.9±0.4*	3.5
Gemella	3.4±0.2	2.5±0.3*	2.9±0.6	2.0±0.4*	2.2±0.3	2.7
Fusobacterium	4.1±0.3	2.1±0.2*	2.5±0.7	1.5±0.3*	2.1±0.4*	2.7
Porphyromonas	3.6±0.4	1.6±0.2*	1.6±0.4	0.7±0.2*	1.3±0.4*	2.1
Actinomyces	0.7±0.1	3.2±0.4*	1.8±0.3*	2.2±0.6*	2.9±0.4*	2.1
Leptotrichia	1.1±0.2	2.1±0.4*	1.3±0.4	1.7±0.5	1.2±0.3	1.5
Alloprevotella	1.4±0.3	0.4±0.1*	0.3±0.1	0.4±0.2*	0.5±0.1	0.8
Capnocytophaga	0.8±0.1	0.5±0.1*	0.5±0.2	0.6±0.3*	0.6±0.2*	0.6
Oribacterium	0.6±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1	0.8±0.2	0.5±0.1	0.6
Campylobacter	0.5±0.1	0.5±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.5
Lachnoanaerobaculum	0.5±0.1	0.5±0.1	0.5±0.1	0.4±0.1	0.5±0.1	0.5
Corynebacterium	0.2±0.03	0.4±0.1	0.4±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.3
Lautropia	0.3±0.1	0.2±0.1	0.5±0.3	0.6±0.3	0.1±0.1	0.3
Solobacterium	0.3±0.04	5.4±0.4	0.3±0.1	0.2±0.04	0.4±0.1	0.3
Peptostreptococcus	0.4±0.1	0.3±0.03	0.2±0.1	0.2±0.04*	0.4±0.1	0.3
Catonella	0.3±0.1	0.3±0.1	0.4±0.1	0.2±0.04	0.2±0.03	0.3
Parvimonas	0.3±0.1	0.2±0.1	0.4±0.1*	0.1±0.03*	0.3±0.1	0.2
Abiotrophia	0.3±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1	0.2±0.1	0.1±0.1*	0.2
Aggregatibacter	0.4±0.1	0.2±0.04*	0.1±0.04*	0.1±0.04*	0.1±0.03*	0.2
Selenomonas	0.1±0.02	0.3±0.04*	0.4±0.1	0.3±0.1*	0.2±0.03*	0.2
Atopobium	0.1±0.02	0.3±0.03*	0.2±0.03	0.2±0.04	0.3±0.1*	0.2
Centipeda	0.1±0.01	0.2±0.03*	0.2±0.1	0.2±0.03*	0.1±0.03	0.1
Treponema	0.1±0.03	0.1±0.03	0.3±0.2	0.03±0.01	0.1±0.03	0.1
Lactobacillus	0.02±0.005	0.2±0.1*	0.04±0.01*	0.3±0.2*	0.1±0.02	0.1
Lactococcus	0.001±0.001	0.3±0.3*	0.001±0.001	0.01±0.003*	0.01±0.004	0.1
Kingella	0.1±0.01	0.1±0.02	0.1±0.1	0.1±0.04	0.2±0.1	0.1
Citrobacter	0.001±0.0004	0.1±0.1*	0.01±0.002	0.4±0.4*	0.1±0.04	0.1
Bifidobacterium	0.02±0.01	0.1±0.04	0.02±0.01	0.1±0.1	0.04±0.02	0.1
Filifactor	0.1±0.002	0.1±0.02	0.1±0.1	0.02±0.01	0.04±0.02	0.1
Alloscardovia	0.003±0.002	0.02±0.01	0.04±0.07	0.2±0.2	0.03±0.02	0.04
Peptoanaerobacter	0.04±0.01	0.03±0.01	0.1±0.07	0.01±0.01*	0.03±0.01	0.03

[図6]



[図7]



[図8]

Item	Microbial data	Log10 (recent activity /non-recent activity)	p-value
Alpha diversity	Observed OTU number	-0.04	0.06
	chao1	-0.04	0.11
	Ace	-0.04	0.10
	Shannon index	-0.01	0.08
Phylum	Firmicutes	0.003	0.45
	Bacteroidetes	-0.02	0.52
	Proteobacteria	-0.03	0.77
	Actinobacteria	0.04	0.39
	Fusobacteria	-0.02	0.40
	Spirochaetes	-0.04	0.48
Genus	Streptococcus	0.02	0.20
	Prevotella	-0.02	0.85
	Neisseria	-0.06	0.48
	Rothia	0.06	0.40
	Veillonella	-0.01	0.96
	Haemophilus	0.02	0.86
	Granulicatella	-0.05	0.11
	Schaalia	-0.03	0.86
	Gemella	-0.05	0.42
	Fusobacterium	-0.06	0.27
	Porphyromonas	-0.15	0.02 *
	Actinomyces	0.14	0.37
	Leptotrichia	0.12	0.34
	Alloprevotella	0.01	0.43
	Capnocytophaga	-0.09	0.74
	Oribacterium	0.01	0.74
	Campylobacter	-0.02	0.60
	Lachnoanaerobaculum	-0.05	0.36
	Corynebacterium	-0.18	0.67
	Lautropia	0.01	0.86
	Solobacterium	-0.11	0.17
	Peptostreptococcus	-0.17	0.09
	Catonella	-0.12	0.43
	Parvimonas	-0.04	0.86
	Abiotrophia	-0.18	0.21
	Aggregatibacter	-0.06	0.41
	Selenomonas	0.01	0.77
	Atopobium	0.03	0.60
	Centipeda	0.10	0.49
	Treponema	-0.04	0.62
	Lactobacillus	0.20	0.18
	Lactococcus	-1.34	0.41
	Kingella	0.23	0.95
	Citrobacter	-0.05	0.34
	Bifidobacterium	0.13	0.53
	Filifactor	-0.05	0.69
	Alloscardovia	1.28	0.23
	Peptoanaerobacter	-0.14	0.85

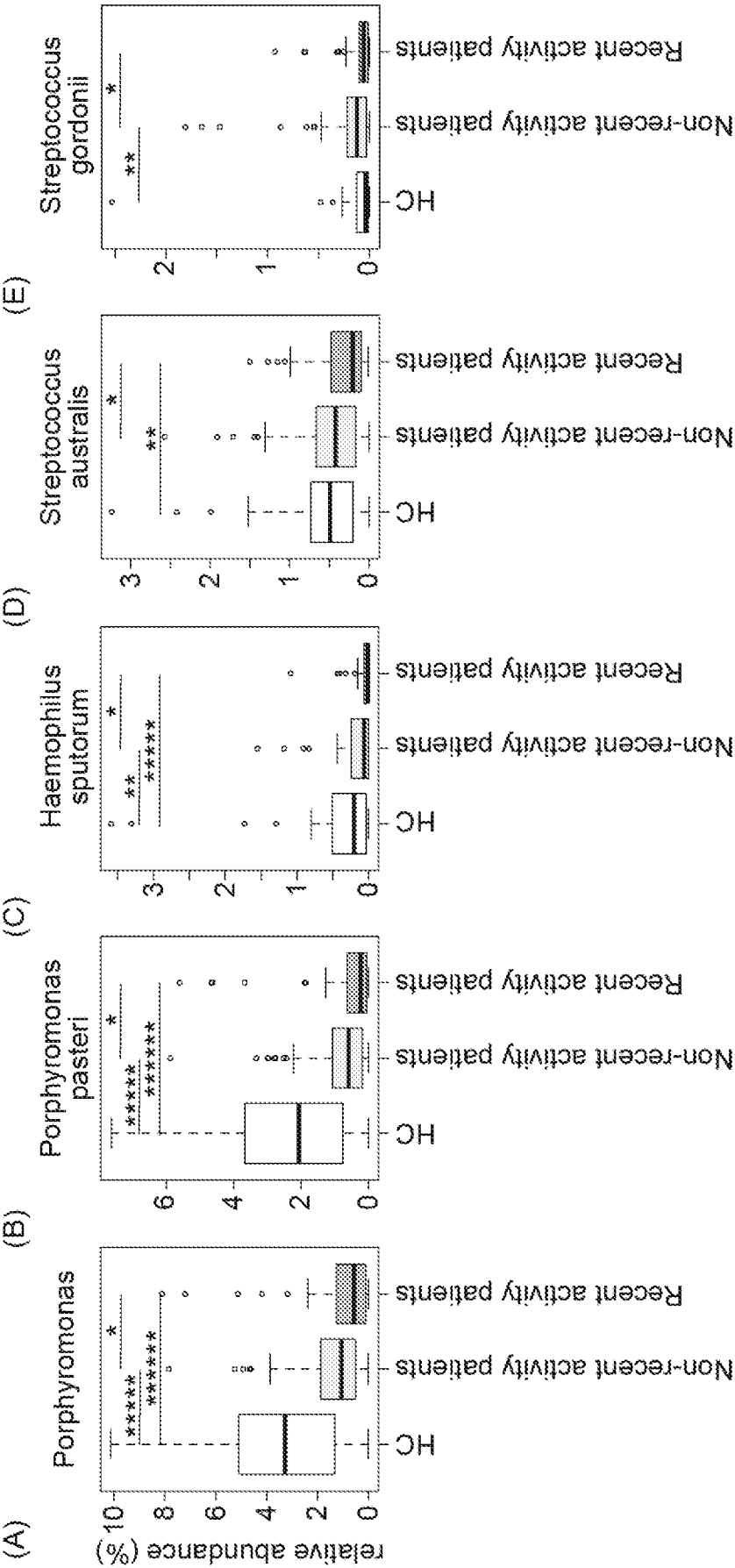
[図9]

Item	Microbial data	Log10 (recent activity /non-recent activity)	p-value
Species	<i>Streptococcus salivarius</i>	-0.03	0.64
	<i>Neisseria perflava</i>	-0.08	0.44
	<i>Prevotella melaninogenica</i>	-0.01	0.74
	<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	0.10	0.66
	<i>Rothia mucilaginosa</i>	0.06	0.52
	<i>Veillonella atypica</i>	-0.02	0.86
	<i>Streptococcus oralis</i>	0.08	0.30
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	0.01	0.93
	<i>Streptococcus infantis</i>	-0.03	0.37
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	0.03	0.66
	<i>Schaalia odontolytica</i>	-0.05	0.75
	<i>Granulicatella adiacens</i>	-0.04	0.13
	<i>Fusobacterium periodonticum</i>	-0.06	0.22
	<i>Prevotella histicola</i>	0.04	0.74
	<i>Actinomyces graevenitzi</i>	0.15	0.41
	<i>Porphyromonas pasteri</i>	-0.13	0.01 *
	<i>Prevotella pallens</i>	-0.05	0.53
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	0.27	0.69
	<i>Gemella sanguinis</i>	-0.13	0.13
	<i>Streptococcus cristatus</i>	0.06	0.93
	<i>Leptotrichia wadei</i>	0.16	0.36
	<i>Gemella haemolysans</i>	0.05	0.98
	<i>Neisseria macacae</i>	-0.08	0.89
	<i>Prevotella jejuni</i>	0.06	0.72
	<i>Prevotella nanceiensis</i>	-0.13	0.55
	<i>Prevotella salivae</i>	-0.25	0.31
	<i>Schaalia meyeri</i>	0.06	0.96
	<i>Alloprevotella tannerae</i>	-0.04	0.54
	<i>Streptococcus australis</i>	-0.16	0.04 *
	<i>Oribacterium asaccharolyticum</i>	-0.002	0.77
	<i>Alloprevotella rava</i>	0.08	0.92
	<i>Streptococcus lactarius</i>	0.03	0.83
	<i>Lautropia mirabilis</i>	0.01	0.87
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-0.10	0.24
	<i>Rothia dentocariosa</i>	0.14	0.39
	<i>Granulicatella elegans</i>	-0.20	0.80
	<i>Lachnoanaerobaculum orale</i>	-0.06	0.43
	<i>Haemophilus sputorum</i>	-0.27	0.09
	<i>Citrobacter freundii</i>	-0.42	0.37
	<i>Solobacterium moorei</i>	-0.11	0.17
	[<i>Eubacterium</i>] <i>sulci</i>	-0.06	0.64
	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	-0.17	0.08

[図10]

Item	Microbial data	Log10 (recent activity /non-recent activity)	p-value
Species	Campylobacter concisus	-0.01	0.45
	Catonella morbi	-0.12	0.44
	Haemophilus haemolyticus	0.05	0.60
	Capnocytophaga leadbetteri	-0.09	0.77
	Abiotrophia defectiva	-0.19	0.23
	Neisseria elongata	0.17	0.60
	Lactococcus lactis	-1.34	0.30
	Streptococcus mitis	0.14	0.83
	Aggregatibacter segnis	-0.14	0.48
	Atopobium parvulum	0.02	0.73
	Actinomyces viscosus	0.36	0.96
	Prevotella denticola	0.001	0.29
	Capnocytophaga gingivalis	-0.25	0.45
	Selenomonas infelix	-0.04	0.36
	Porphyromonas gingivalis	-0.29	0.60
	Prevotella intermedia	-0.30	0.03 *
	Streptococcus gordonii	-0.30	0.008 *
	Corynebacterium matruchotii	0.04	0.94
	Alloscardovia omnicolens	1.29	0.23
	Gemella morbillorum	0.14	0.98
	Neisseria oralis	0.18	0.76
	Leptotrichia buccalis	-0.22	0.56
	Lactobacillus fermentum	0.67	0.60
	Porphyromonas endodontalis	-0.19	0.004 *
	Prevotella shahii	0.06	0.77
	Parvimonas micra	-0.03	0.35
	Capnocytophaga sputigena	0.11	0.70
	Kingella oralis	0.30	0.44
	Prevotella oris	0.04	0.47
	Veillonella infantium	-0.09	0.15
	Filifactor alocis	-0.05	0.77
	[Eubacterium] saphenum	-0.23	0.29
	Corynebacterium argentoratense	-1.67	0.23
	Corynebacterium durum	-0.06	0.68
	Streptococcus anginosus	0.23	0.14
	Streptococcus constellatus	0.11	0.98
	Bifidobacterium longum	0.73	0.25
	Haemophilus parahaemolyticus	0.48	0.78
	Leptotrichia hofstadii	-0.14	0.86
	Actinomyces naeslundii	0.10	0.21
	Prevotella loescheii	0.03	0.46
	Treponema denticola	-0.22	0.97

[図11]



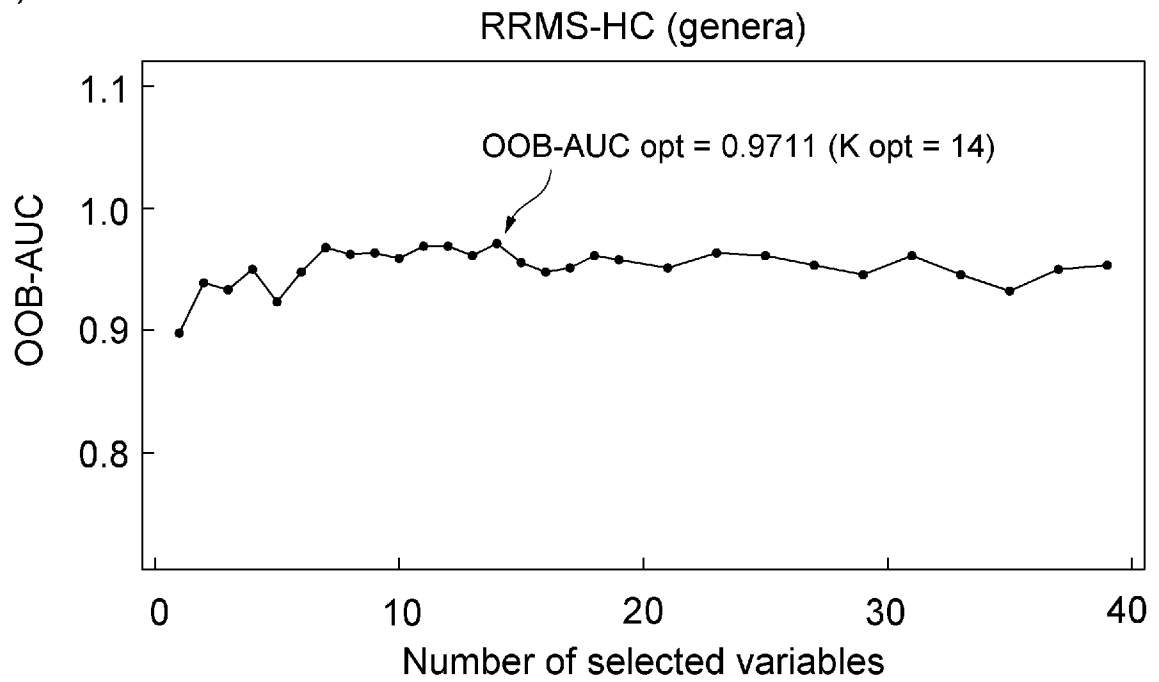
[図12]

	HC (discovery cohort; n = 30)		HC (validation cohort; n = 30)		RRMS (discovery cohort; n = 30)		RRMS (validation cohort; n = 29)		p-value
Age, year	38.2 ± 2.23		40.8 ± 2.40		38.7 ± 1.57		39.7 ± 1.37		0.59
Sex (female : male)	18 : 12		18 : 12		24 : 6		20 : 9		0.30
BMI	21.4 ± 0.39		22.4 ± 0.51		22.4 ± 0.68		21.2 ± 0.48		0.07
Onset age, year					30.1 ± 1.45		30.3 ± 1.60		
Disease duration, year					8.27 ± 0.95		9.41 ± 1.37		
EDSS					1.77 ± 0.20		2.07 ± 0.29		
ARR					0.70 ± 0.16		0.62 ± 0.16		
Immunotherapy									
Oral PSL, %					37 (n = 11)		45 (n = 13)		
IS, %					10 (n = 0)		0 (n = 3)		
DMDs									
IFN-β, %					30 (n = 9)		41 (n = 12)		
GA, %					7 (n = 2)		3 (n = 1)		
FTY, %					7 (n = 2)		7 (n = 2)		
NTZ, %					0		0		
DMF, %					3 (n = 1)		3 (n = 1)		

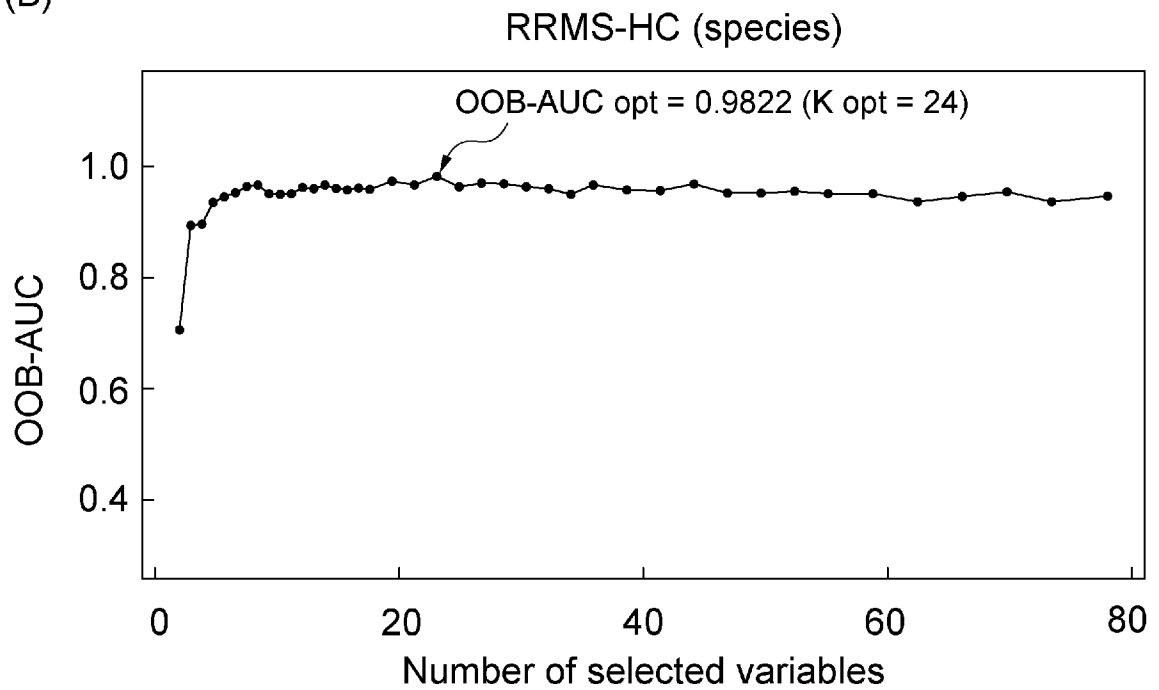
データは平均±SEMで表す。
略語:ARR=年間再発率; EDSS=総合障害度評価尺度; PSL=プレドニゾロン; IS=免疫抑制薬; DM D=疾患修飾薬;
IFN-β=インターフェロン-β; GA=グラチラマ-酢酸; FTY=フィンゴリモド; NTZ=ナタリズマブ; DMF=フマル酸ジメチル;
HC=健康対照; RRMS=再発寛解型多発性硬化症

[図13]

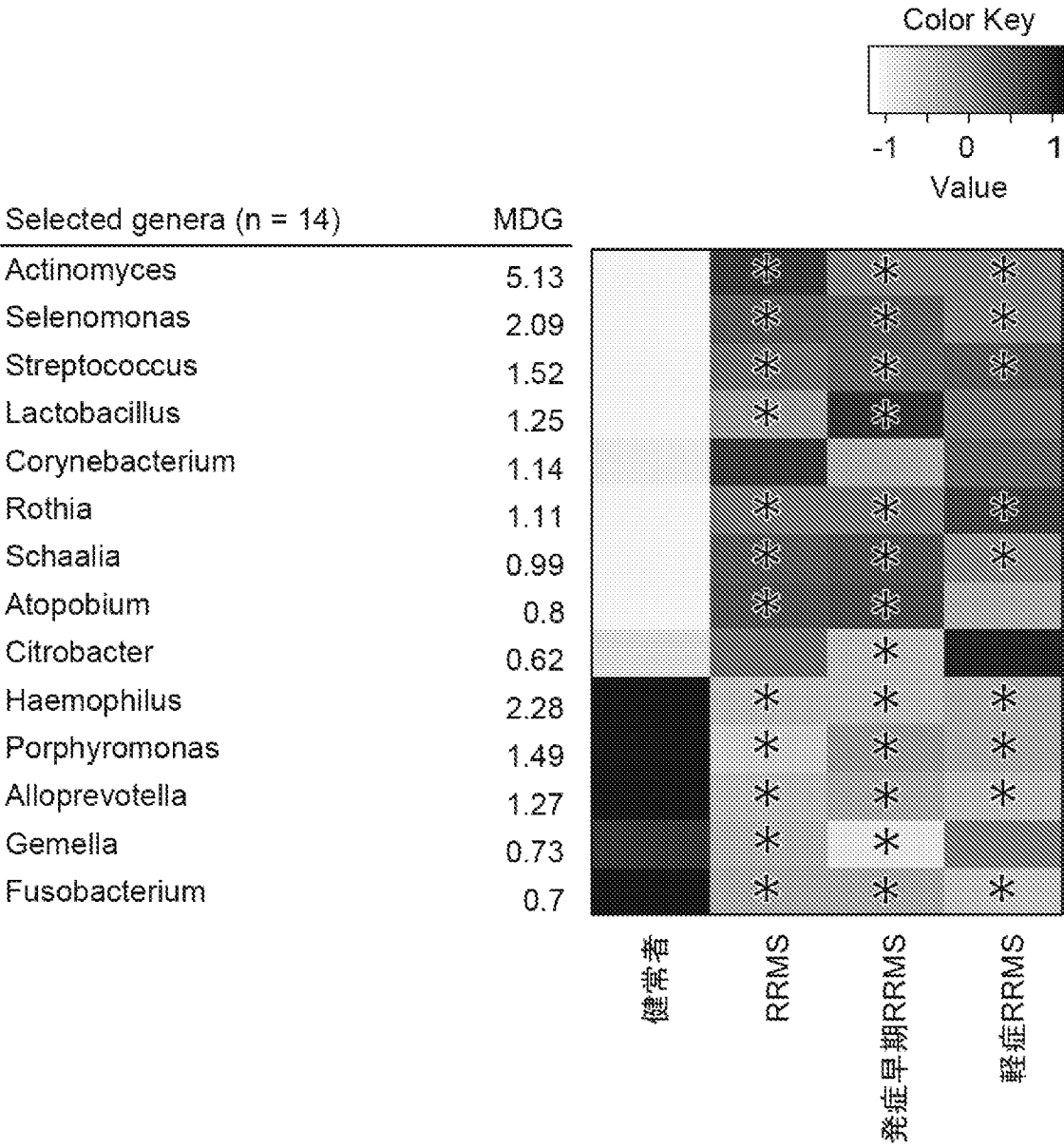
(A)



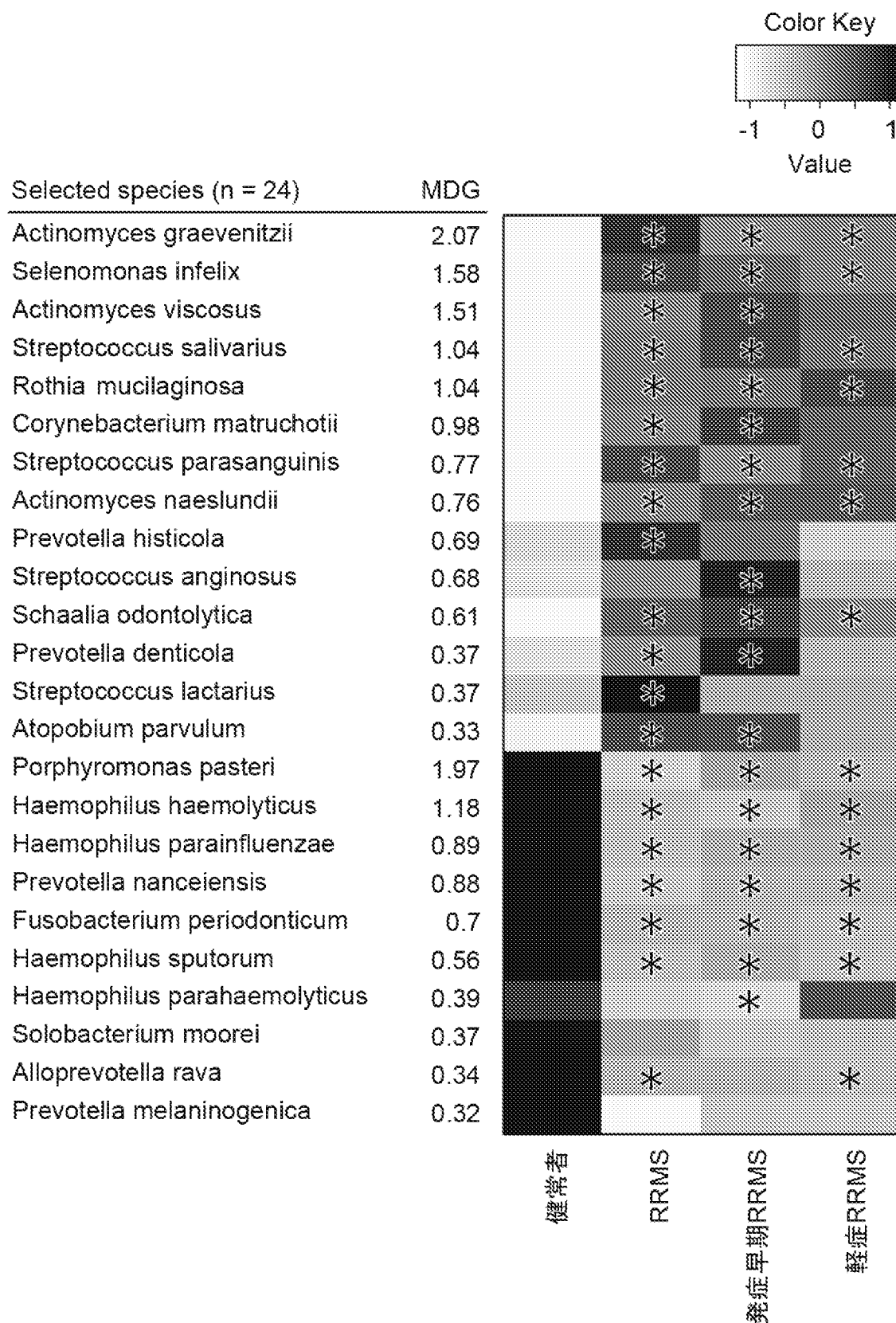
(B)



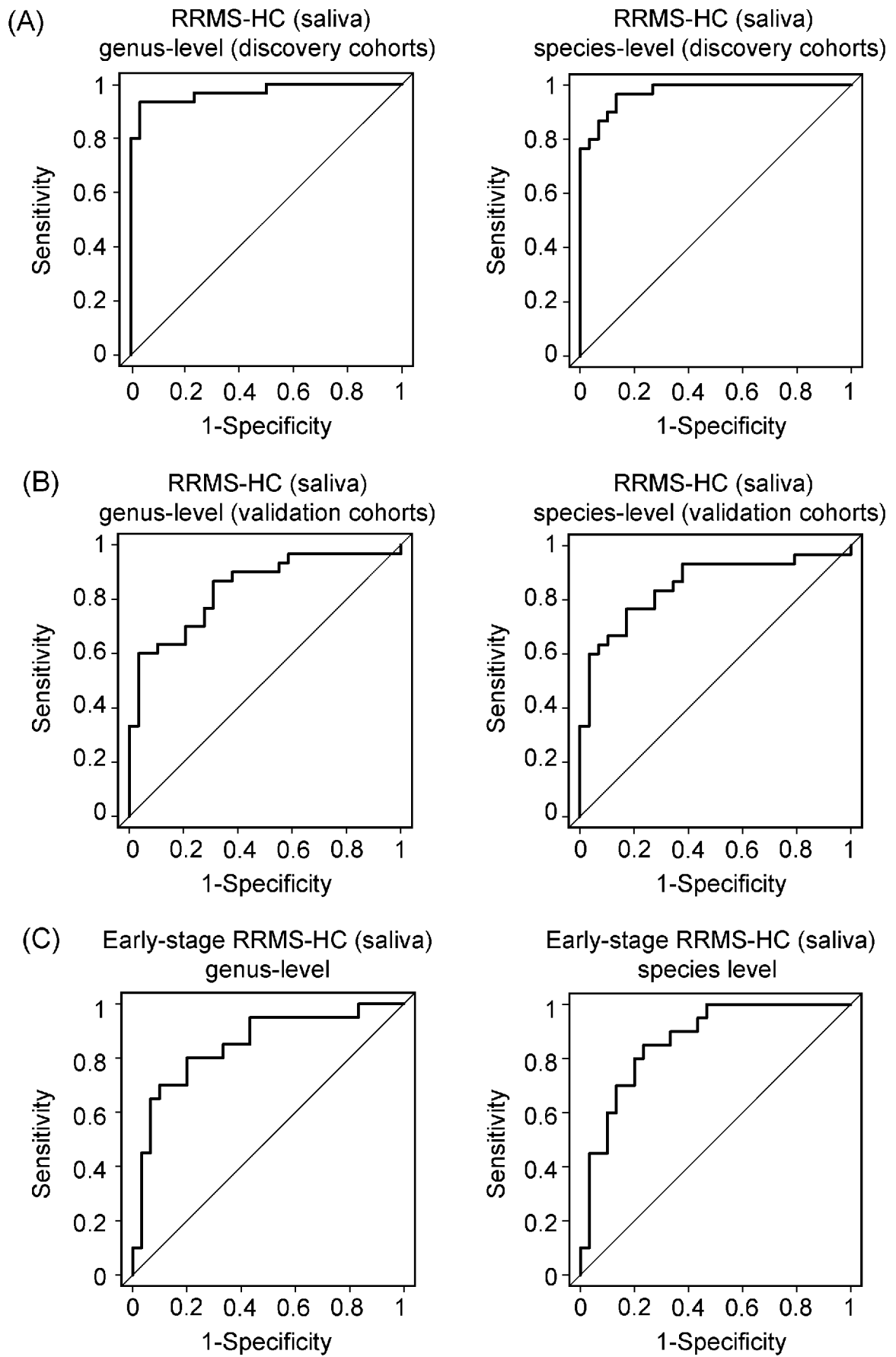
[図14]



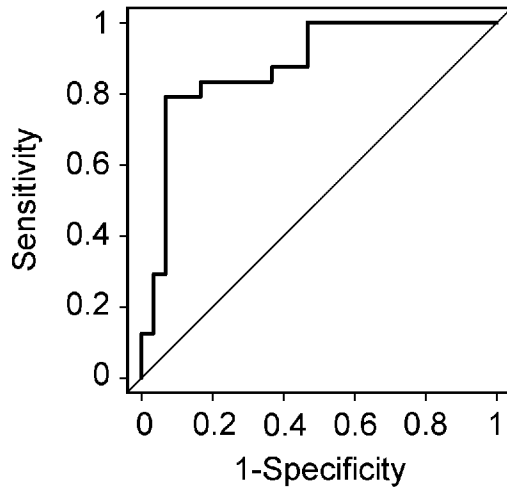
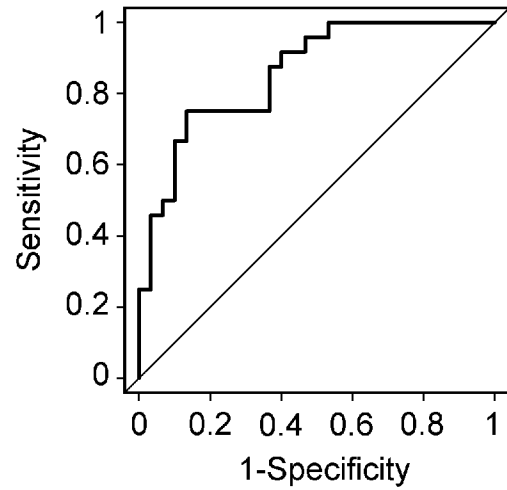
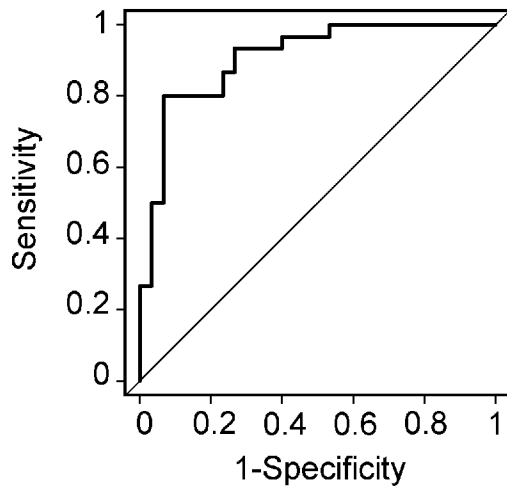
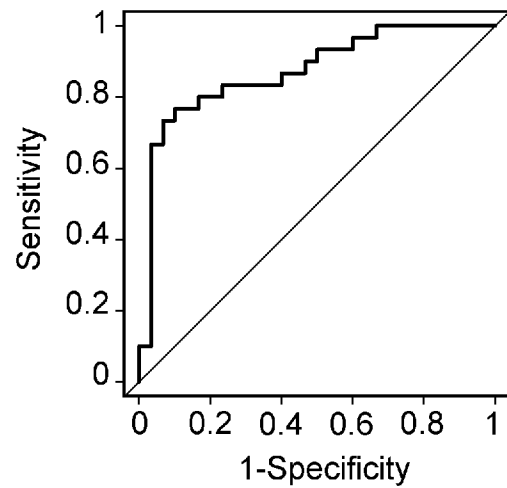
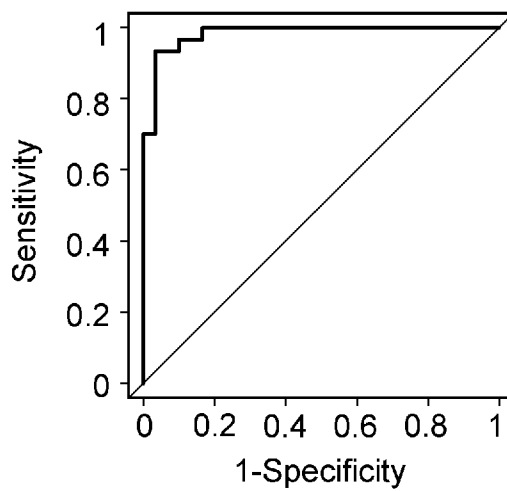
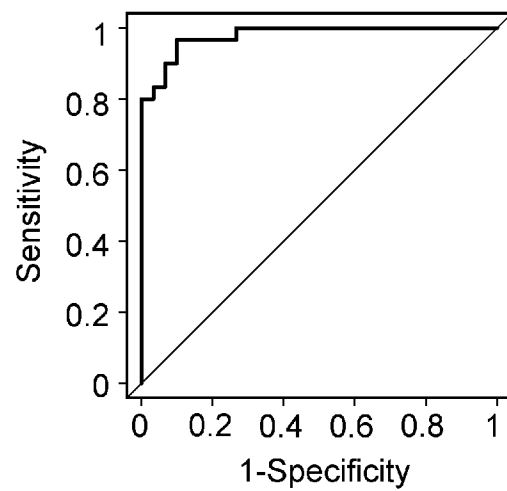
[図15]



[圖16]



[圖17]

(D) Low-severity RRMS - HC (saliva)
genus-levelLow-severity RRMS - HC (saliva)
species-level(E) RRMS - HC (feces)
genus-level (discovery cohorts)RRMS - HC (feces)
species-level (discovery cohorts)(F) RRMS - HC (saliva & feces)
genus-level (discovery cohorts)RRMS - HC (saliva & feces)
species-level (discovery cohorts)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/038423

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/68(2018.01)i; **A61K 35/74**(2015.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i; **A61P 25/00**(2006.01)i; **C12N 1/20**(2006.01)i; **C12N 15/09**(2006.01)i; **C12N 15/11**(2006.01)i; **C12Q 1/04**(2006.01)i; **C12Q 1/6869**(2018.01)i; **C12Q 1/689**(2018.01)i
 FI: C12Q1/68; C12Q1/689 Z; C12N15/09 Z; C12N15/11 Z; C12N1/20 E; C12Q1/6869 Z; A61K35/74 A; A61K38/00; A61P25/00; C12Q1/04 ZNA; A61K35/74 B; A61K35/74 D

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)

C12Q1/68; A61K35/74; A61K38/00; A61P25/00; C12N1/20; C12N15/09; C12N15/11; C12Q1/04; C12Q1/6869; 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); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2021/168119 A2 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 26 August 2021 (2021-08-26) claims, seq. ID 20	6, 7
A	claims, seq. ID 20	1-5, 8, 9
X	US 2022/0333159 A1 (THE UNITED STATES GOVERNMENT AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS) 20 October 2022 (2022-10-20) claims, examples, paragraph [0048]	1-9
Y	claims, examples, paragraph [0048]	1-9
Y	ZANGENEH, Z. et al., Bacterial variation in the oral microbiota in multiple sclerosis patients, Plos One, 2021, vol. 16, no. 11, e0260384 abstract, table 3	1-9



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

27 December 2023

Date of mailing of the international search report

16 January 2024

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/JP2023/038423

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TAKEWAKI, D. et al., Dysbiosis in the Salivary Microbiome as a Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, 15th ISNI Congress 2021 Book of Abstract, 15 November 2021, p. 86, 113, Epub. on 06 November 2021 entire text	6-9
Y	entire text	1-9
Y	TAKEWAKI, D. et al., Salivary Microbiome Dysbiosis as a Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, Actrims Forum 2022 Online Library, abstract [online], 01 February 2022, P268, [retrieved on 27 December 2023] Internet: <URL: https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/10495/presentation/611> entire text	1-9
Y	Actrims 2022, The salivary microbiome as a diagnostic biomarker in MS, The Video Journal of Neurology, website [online], 28 February 2022, [retrieved on 27 December 2023] Internet <URL: https://vjneurology.com/video/gchr6giwbq-the-salivary-microbiome-as-a-diagnostic-biomarker-in-ms/> entire text	1-9
Y	TAKEWAKI, D. et al., Dysbiosis in the Salivary Microbiome: Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, 第63回日本神経学会学術大会抄録, 02 May 2022, p. 342, AO-02-3, non-official translation (Proceedings of the 63rd Annual Meeting of the Japan Society of Neurology) entire text	1-9
Y	TAKEWAKI, D. et al., Salivary Microbiome Dysbiosis as a Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, Multiple Sclerosis Journal [online], vol. 28, issue 1, suppl., 16 May 2022, P268, [retrieved on 27 December 2023] Internet <URL: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/13524585221094745> entire text	1-9
Y	TAKEWAKI, D. et al., Dysbiosis in the Salivary Microbiome: Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, 臨床神経学 [online], 15 October 2022, vol. 62 issue 1, suppl., S200, AO-02-3, [retrieved on 27 December 2023] Internet <URL: https://www.jstage.jst.go.jp/article/clinicalneurol/62/Supplement/62_62_supplement_S199/_pdf/-char/ja>, (Clinical Neurology) entire text	1-9
A	TROCI, A. et al., B-cell-depletion reverses dysbiosis of the microbiome in multiple sclerosis patients, Scientific Reports, 08 March 2022, vol. 12, no. 1, 3728 abstract	1-9
A	ZHOU, L. J. et al., Oral Pathobionts Promote MS-like Symptoms in Mice, Journal of Dental Research, 20 October 2022, vol. 102, no. 2, pp. 217-226 abstract	1-9
A	BOULLERNE, A. I. et al., Deep DNA metagenomic sequencing reveals oral microbiome divergence between monozygotic twins discordant for multiple sclerosis severity, J. Neuroimmunol., 2020, vol. 343, 577237 abstract	1-9
A	須田 互, ヒトマイクロバイオーームと疾患, 医学のあゆみ, 2018, vol. 266, no. 5, pp. 491-496, (SUDA, Wataru, Journal of Clinical and Experimental Medicine), non-official translation (Human Microbiomes and Disease) abstract	1-9
A	WO 2021/039932 A1 (JUNTENDO EDUCATIONAL FOUNDATION) 04 March 2021 (2021-03-04) claims, examples	1-9
A	JP 2020-100582 A (NATIONAL CENTER OF NEUROLOGY & PSYCHIATRY) 02 July 2020 (2020-07-02) claims	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/038423

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".

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(Invention 1) Inventions in claims 1-9 pertaining to a salivary bacterium having a nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene that has 97% or more homology with the nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene of *Actinomyces graevenitzi*

(Inventions 2-24) Inventions in claims 1-9 or inventions in claims 1-13 respectively pertaining to salivary bacteria respectively having a nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene that has 97% or more homology with the nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene of *Selenomonas infelix*, *Actinomyces viscosus*, *Streptococcus salivarius*, *Rothia mucilaginosa*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus parasanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella histicola*, *Streptococcus anginosus*, *Schaalia odontolytica*, *Prevotella denticola*, *Streptococcus lactarius*, *Atopobium parvulum*, *Porphyromonas pasteri*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Prevotella nanceiensis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Haemophilus sputorum*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Solobacterium moorei*, *Alloprevotella rava* and *Prevotella melaninogenica*

Inventions 2-24 and the invention in invention 1 share the technical feature of a biomarker for use in diagnosis of multiple sclerosis, comprising a salivary bacterium having 16S ribosomal RNA derived from a bacterium in a salivary sample.

Meanwhile, the document indicated below discloses a biomarker for use in diagnosis of multiple sclerosis, comprising a salivary bacterium having 16S ribosomal RNA derived from a bacterium in a salivary sample, and monitoring therapeutic efficacy using the same (particularly, the claims, the examples and paragraph [0048]), and thus the technical feature is not considered to be a special technical feature. Moreover, there are no other same or corresponding special technical features among these inventions.

Document: US 2022/0333159 A1 (THE UNITED STATES GOVERNMENT AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS) 20 October 2022 (2022-10-20)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Inventions in claims 1-9 pertaining to a salivary bacterium having a nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene that has 97% or more homology with the nucleotide sequence of 16S ribosomal RNA gene of *Actinomyces graevenitzi***

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/038423

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2021/168119	A2	26 August 2021	US 2023/0151430 A1 claims, seq. ID 20 EP 4106779 A2 claims, seq. ID 20 AU 2021224185 A1 claims, seq. ID 20 CA 3177351 A1 claims, seq. ID 20	
US	2022/0333159	A1	20 October 2022	(Family: none)	
WO	2021/039932	A1	04 March 2021	(Family: none)	
JP	2020-100582	A	02 July 2020	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/68(2018.01)i; A61K 35/74(2015.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 25/00(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/11(2006.01)i; C12Q 1/04(2006.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; C12Q 1/689(2018.01)i FI: C12Q1/68; C12Q1/689 Z; C12N15/09 Z; C12N15/11 Z; C12N1/20 E; C12Q1/6869 Z; A61K35/74 A; A61K38/00; A61P25/00; C12Q1/04 ZNA; A61K35/74 B; A61K35/74 D		
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）） C12Q1/68; A61K35/74; A61K38/00; A61P25/00; C12N1/20; C12N15/09; C12N15/11; C12Q1/04; C12Q1/6869; 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); Cplus/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
X	WO 2021/168119 A2 (MEMORIAL SLOAN-KETTERING CANCER CENTER) 26.08.2021 (2021-08-26) Claims, SEQ ID 20	6, 7
A	Claims, SEQ ID 20	1-5, 8, 9
X	US 2022/0333159 A1 (THE UNITED STATES GOVERNMENT AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS) 20.10.2022 (2022-10-20) Claims, Examples, [0048]	1-9
Y	Claims, Examples, [0048]	1-9
Y	ZANGENEH Z et al., Bacterial variation in the oral microbiota in multiple sclerosis patients, PLOS ONE, 2021, Vol. 16, No. 11, e0260384 Abstract, Table3	1-9
☒ 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、一般的な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 27.12.2023		国際調査報告の発送日 16.01.2024
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） 西村 亜希子 4N 3435 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	TAKEWAKI D et al., Dysbiosis in the Salivary Microbiome as a Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, 15th ISNI Congress 2021 BOOK OF ABSTRACT, 2021.11.15, p.86, 113, Epub. on 2021.11.06 全文	6-9
Y	全文	1-9
Y	TAKEWAKI D et al., Salivary Microbiome Dysbiosis as a Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, ACTRIMS Forum 2022 online LIBRARY 抄録 [オンライン], 2022.02.01, P268, [検索日2023.12.27] インターネット : <URL:https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/10495/presentation/611> 全文	1-9
Y	ACTRIMS 2022 The salivary microbiome as a diagnostic biomarker in MS, The Video Journal of Neurology ウェブサイト[オンライン], 2022.02.28, [検索日 2023.12.27]インターネット<URL:https://vjneurology.com/video/gchr6giiwbq-the-salivary-microbiome-as-a-diagnostic-biomarker-in-ms/> 全文	1-9
Y	TAKEWAKI D et al., Dysbiosis in the Salivary Microbiome: Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, 第 6 3 回日本神経学会学術大会抄録, 2022.05.02, p.342, A0-02-3 全文	1-9
Y	TAKEWAKI D et al., Salivary Microbiome Dysbiosis as a Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, Multiple Sclerosis Journal[オンライン], Vol.28, Issuel suppl., 2022.05.16, P268, [検索日 2023年12月27日]インターネット<URL: https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/13524585221094745> 全文	1-9
Y	TAKEWAKI D et al., Dysbiosis in the Salivary Microbiome : Promising Biomarker for Early Detection of Multiple Sclerosis, 臨床神経学[オンライン], 2022.10.15, Vol.62 別冊, S200, A0-02-3, [検索日2023.12.27]インターネット<URL:https://www.jstage.jst.go.jp/article/clinicalneuro/62/Supplement/62_62_supplement_S199/_pdf/-char/ja> 全文	1-9
A	TROCI A et al., B-cell-depletion reverses dysbiosis of the microbiome in multiple sclerosis patients, Scientific reports, 2022.03.08, Vol. 12, No. 1, 3728 Abstract	1-9
A	ZHOU LJ et al., Oral Pathobionts Promote MS-like Symptoms in Mice, Journal of Dental Research, 2022.10.20, Vol.102, No.2, pp.217-226 Abstract	1-9
A	BOULLERNE AI et al., Deep DNA metagenomic sequencing reveals oral microbiome divergence between monozygotic twins discordant for multiple sclerosis severity, J. Neuroimmunol., 2020, Vol.343, 577237 Abstract	1-9
A	須田 互, ヒトマイクロバイオーームと疾患, 医学のあゆみ, 2018, Vol.266, No.5, pp.491-496 要約	1-9
A	WO 2021/039932 A1 (学校法人順天堂) 04.03.2021 (2021 - 03 - 04) 特許請求の範囲、実施例	1-9
A	JP 2020-100582 A (国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター) 02.07.2020 (2020 - 07 - 02) 特許請求の範囲	1-9

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。

第III欄

発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

（発明1） 請求項1－9に係る発明のうち、*Actinomyces graevenitzi*の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を有する唾液細菌に係る発明

（発明2－24） 請求項1－9に係る発明又は請求項1－13に係る発明のうち、それぞれ、*Selenomonas infelix*、*Actinomyces viscosus*、*Streptococcus salivarius*、*Rothia mucilaginosa*、*Corynebacterium matruchotii*、*Streptococcus parasanguinis*、*Actinomyces naeslundii*、*Prevotella histicola*、*Streptococcus anginosus*、*Schaalia odontolytica*、*Prevotella denticola*、*Streptococcus lactarius*、*Atopobium parvulum*、*Porphyromonas pasteri*、*Haemophilus haemolyticus*、*Haemophilus parainfluenzae*、*Prevotella nanceiensis*、*Fusobacterium periodonticum*、*Haemophilus sputorum*、*Haemophilus parahaemolyticus*、*Solobacterium moorei*、*Alloprevotella rava*、*Prevotella melaninogenica*の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を有する唾液細菌に係る発明

発明2－24は、発明1に係る発明と、多発性硬化症の診断に使用されるバイオマーカーであって、唾液試料に含まれる細菌由来の16SリボソームRNAを有する唾液細菌からなるバイオマーカーである点で、共通の技術的特徴を有している。

一方、下記文献には、多発性硬化症の診断に使用されるバイオマーカーであって、唾液試料に含まれる細菌由来の16SリボソームRNAを有する唾液細菌からなるバイオマーカー及びそれらを用いて治療有効性をモニタリングすることが記載されていることから（特にClaims, Examples, [0048]）、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

文献 US 2022/0333159 A1 (THE UNITED STATES GOVERNMENT AS REPRESENTED BY THE DEPARTMENT OF VETERANS AFFAIRS) 20.10.2022 (2022-10-20)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。 請求項1－9に係る発明のうち、*Actinomyces graevenitzi*の16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列と97%以上の相同性を有する16SリボソームRNA遺伝子の塩基配列を有する唾液細菌に係る発明

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

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/JP2023/038423

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2021/168119	A2	26.08.2021	US 2023/0151430 A1 Claims, SEQ ID 20 EP 4106779 A2 Claims, SEQ ID 20 AU 2021224185 A1 Claims, SEQ ID 20 CA 3177351 A1 Claims, SEQ ID 20	
US	2022/0333159	A1	20.10.2022	(ファミリーなし)	
WO	2021/039932	A1	04.03.2021	(ファミリーなし)	
JP	2020-100582	A	02.07.2020	(ファミリーなし)	