

(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
2022年9月29日(29.09.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/202099 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/06 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) *C12N 15/55* (2006.01)
A61P 1/04 (2006.01) *C12Q 1/44* (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01) *C12Q 1/68* (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2022/007951

(22) 国際出願日: 2022年2月25日(25.02.2022)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

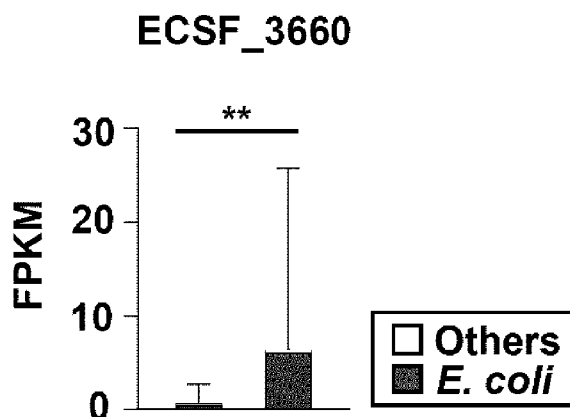
(30) 優先権データ:
特願 2021-048492 2021年3月23日(23.03.2021) JP

(71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 飯島 英樹 (IJIMA Hideki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 竹田 潔 (TAKEDA Kiyoshi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 香山 尚子 (KAYAMA Hisako); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 大竹 由利子 (OTAKE Yuriko); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 竹原 徹郎 (TAKEHARA Tetsuo); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(54) Title: METHOD FOR TESTING FOR INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

(54) 発明の名称: 炎症性腸疾患を検査する方法



(57) Abstract: [Problem] Problems addressed are: to provide a new test method for inflammatory bowel disease; to provide a method for screening substances or microorganisms for prevention or treatment of inflammatory bowel disease; and to provide a composition for prevention or treatment of inflammatory bowel disease. [Solution] Provided is a method for testing for inflammatory bowel disease that includes a step for measuring gut microbiota involved in lysophosphatidylserine production, lysophosphatidylserine, phospholipase A, or phospholipase A genes (ECSF_3660, etc.) in a sample. Provided is a screening method for substances or microorganisms for the prevention or treatment of inflammatory bowel disease that includes a step for measuring the gut microbiota count or measuring phospholipase A activity. Provided are a composition for prevention or treatment of inflammatory bowel disease that contains a substance or microorganism for removing or reducing gut microbiota involved in lysophosphatidylserine production and a composition for prevention or treatment of inflammatory bowel disease that contains a phospholipase A activity inhibitor.

(74) 代理人: 庄 司 隆, 外 (SHOJI Takashi et al.);
〒5320011 大阪府大阪市淀川区西中島五丁目 6
番 1 3 号 御幸ビル 3 0 7 号 Osaka (JP).

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

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

添付公開書類:

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

(57) 要約: 【課題】炎症性腸疾患の新たな検査方法を提供すること、炎症性腸疾患の予防または治療用の物質や微生物のスクリーニング方法を提供すること、および炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物を提供することを課題とする。【解決手段】試料中のリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物、リゾホスファチジルセリン、ホスホリパーゼA、または、ホスホリパーゼAの遺伝子 (E C S F _ 3 6 6 0 等) を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法を提供する。腸内微生物数を測定またはホスホリパーゼAの活性を測定する工程を含む、炎症性腸疾患の予防用または治療用の物質または微生物のスクリーニング方法を提供する。リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質や微生物を含有する炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物、ホスホリパーゼA活性抑制物質を含有する炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物を提供する。

明 細 書

発明の名称：炎症性腸疾患を検査する方法

技術分野

[0001] 本発明は、炎症性腸疾患の検査および治療に関する。

背景技術

[0002] 炎症性腸疾患（Inflammatory bowel disease：IBD）は腸管における免疫の過剰な活性化が関与していると考えられている。腸管に生じる難病であるが、患者数が急速に増加しており問題となっている。IBDに対する治療薬として抗TNF抗体製剤などの免疫抑制機序を持つ新規薬剤が多数登場しており、従来薬と比較して高い治療効果が見られるが、治療薬の継続使用に伴い効果減弱をきたすなど、治療に難渋する患者も少なくない。さまざまな研究が行われているが、未だ疾患の発症、増悪のメカニズムが十分に解明されたとは言えず、根治治療法も開発されていない。

[0003] 炎症性腸疾患を発症すると、根治的治療法がないため症状が軽減し寛解になっても再燃することが多く、寛解と再燃を繰り返す場合が多い。よって、発症前の発症リスクや発症後の再燃を簡便に検査できることが望まれる。また、再燃の危険性から寛解期であっても定期的な内視鏡検査が必要であるが、内視鏡検査を毎回繰り返し受けることを嫌がる患者も少なくない。よって患者に負担の少ない検査が望まれる。

[0004] 腸内微生物叢はそのホストの免疫システムにおいて重要な役割を担っている。IBDの患者の腸内微生物叢には、微生物叢の多様性の減少と構成の変化によって特徴付けられる異常（Dysbiosis）が観察される（非特許文献1）。微生物叢は食物繊維を消化して短鎖脂肪酸（SCFA）を生成する。そのSCFAは、微生物叢自身やホストの腸上皮細胞のエネルギー源になるだけでなく、T細胞などの免疫細胞を誘導することによって、ホストの腸のホメオスタシスに寄与している（非特許文献2）。

[0005] 本発明者等は、16種類のホスファチジルセリン（PS）と18：0リゾホスファチジルセリン（LysoPS）の血漿中濃度がクローン病患者では健康者に比較して2倍以上、上昇していることを報告した（非特許文献3）。PSは細胞膜の脂質二重層の中に豊富に存在し、LysoPSはホスホリパーゼA1/A2（PLA1/A2）の酵素の作用によってPSから発生して脂質メディエーターとして作用すると考えられている（非特許文献4）。しかし、LysoPSの生理学的、病理学的機能は不明である。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：Matsuoka, K. & Kanai, T. Semin Immunopathol 37, 47-55 (2015).
- 非特許文献2：Rooks, M. G. & Garrett, W. S. Nat Rev Immunol 16, 341-352 (2016).
- 非特許文献3：Iwatani, S. et al. J Gastroenterol Hepatol 35, 1355-1364 (2020).
- 非特許文献4：Kimani, S. G. et al. Front Immunol 5, 566 (2014).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、炎症性腸疾患の新たな検査方法を提供すること、炎症性腸疾患の予防または治療用の物質や微生物のスクリーニング方法を提供すること、および炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者等は、上記課題を解決すべく研究を行った結果、リゾホスファチジルセリンがある種の腸内微生物によって生成されることが、及び腸内微生物によって生成されたリゾホスファチジルセリンが、疾患の増悪に直接関与していることを見出し、本発明を完成した。即ち、本発明は以下の態様を含有す

る。

1. 被検体より得られた試料中の、リゾホスファチジルセリン、リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物、腸内微生物由来ホスホリパーゼ A をコードする遺伝子、および、ホスホリパーゼ A からなる群から選択される少なくとも 1 を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法。

2. 被検体より得られた試料中のリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物数を測定する工程を含む、前項 1 に記載の方法。

3. 前記腸内微生物がホスホリパーゼ A を発現する腸内微生物である、前項 2 に記載の方法。

4. 前記ホスホリパーゼ A を発現する腸内微生物が、ホスホリパーゼ A をコードする遺伝子 E C S F _ 3 6 6 0 を有する微生物である、前項 3 に記載の方法。

5. 前記腸内微生物数を測定する工程は、該腸内微生物由来遺伝子の量を測定する工程を含む、前項 2 ～ 4 のいずれか 1 に記載の方法。

6. 前記腸内微生物数を測定する工程は、該腸内微生物発現ホスホリパーゼ A を測定する工程を含む、前項 2 ～ 4 のいずれか 1 に記載の方法。

7. 被検体より得られた試料中の腸内微生物由来ホスホリパーゼ A をコードする遺伝子の量を測定する工程を含む、前項 1 に記載の方法

8. 前記ホスホリパーゼ A をコードする遺伝子が、E C S F _ 3 6 6 0 である前項 7 に記載の方法。

9. 被検体より得られた試料中のリゾホスファチジルセリンの濃度を測定する工程を含む、前項 1 に記載の方法。

10. さらにリゾホスファチジルコリンの濃度を測定する工程を含む前項 9 に記載の方法。

11. 被検体より得られた試料中のホスホリパーゼ A を測定する工程を含む、前項 1 に記載の方法。

12. 前記ホスホリパーゼ A が、腸内微生物由来ホスホリパーゼ A である、前項 11 に記載の方法。

13. 前記腸内微生物由来ホスホリパーゼAが、EC₅₀ 3660にコードされるホスホリパーゼAである、前項12に記載の方法。

14. 前記ホスホリパーゼAを測定する工程が、ホスホリパーゼAのタンパク質量を測定する工程またはホスホリパーゼAの活性を測定する工程である、前項11～13のいずれか1に記載の方法。

15. 前記試料が糞便サンプルである、前項1～14のいずれか1に記載の方法。

16. リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物数を測定する工程を含む、炎症性腸疾患の予防用または治療用の物質または微生物のスクリーニング方法。

17. ホスホリパーゼAの活性を測定する工程を含む、炎症性腸疾患の予防用または治療用の物質のスクリーニング方法。

18. リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質または微生物を含有する炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物。

19. ホスホリパーゼAの活性を抑制する物質を含有する炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物。

20. 被検体より得られた試料の検査値と対照試料の検査値が比較される工程をさらに含む、前項1～15のいずれか1に記載の方法。

21. 前記対照試料が、健康な被検体から得られた試料または同一被検体から得られた試料である、前項20に記載の方法。

22. リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質または微生物を投与することを含む炎症性腸疾患の予防または治療方法。

23. 腸内微生物由来ホスホリパーゼAの活性を抑制する物質を投与することを含む炎症性腸疾患の予防または治療方法。

24. 炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物の調製のためのリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質また

は微生物の使用。

25. 炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物の調製のための腸内微生物由来ホスホリパーゼAの活性を抑制する物質の使用。

発明の効果

[0009] 本発明の方法は、炎症性腸疾患に関わる腸内微生物の異常を検査できる。腸内微生物の異常（*dysbiosis*）によりホスホリパーゼAを発現する微生物が増加し、腸内でリゾホスファチジルセリン（以下、*LysoPS*ともいう）が増加する。*LysoPS*は炎症性腸疾患の発症や増悪に直接関与している。本発明の方法は、試料中のリゾホスファチジルセリン、リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物、または、リゾホスファチジルセリンを生成する酵素であるホスホリパーゼAもしくはその遺伝子を測定することにより、炎症性腸疾患を検査することができる。本発明の方法は、炎症性腸疾患の診断のための検査、炎症性腸疾患発症前の発症高リスク者の判定のための検査、炎症性腸疾患患者の経過観察のための検査等、炎症性腸疾患に関わる検査全てに使用できる。本発明の方法は、炎症性腸疾患患者または高リスク者の病状の変化を先んじて捉えることができる。また、本発明の方法は、簡便で患者に負担の少ない検査方法である。

[0010] 本発明のスクリーニング方法は、炎症性腸疾患の原因となるリゾホスファチジルセリン、それを生成するホスホリパーゼA、またはリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質または微生物をスクリーニングすることを可能にし、炎症性腸疾患の治療薬、予防薬、および、治療もしくは予防用食品を提供することを可能にする。

[0011] 本発明の組成物は、炎症性腸疾患の原因となるリゾホスファチジルセリン、それを生成するホスホリパーゼA、またはリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させることにより炎症性腸疾患の発症および再燃を予防し、炎症性腸疾患の根治療法を可能にする。本発明の組成物は、炎症性腸疾患の原因となるリゾホスファチジルセリンの生成を抑制し、炎症性腸疾患の発症および再燃を予防し、炎症性腸疾患の根治療法を可能

にする。本発明の組成物は炎症性腸疾患の原因療法であることから、予防効果および治療効果に優れ、多くの炎症性腸疾患患者の治療および再燃予防またはその予備軍の発症予防に多大な貢献をするものである。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1はクローン病患者（以下CD患者ともいう）と健常者の糞便中の18:0 L y s o P S、および18:1 L y s o P Sの濃度を示す。健常者に比較してのCD患者で高値を示した。HCは健常者（n = 12）、CDはクローン病患者（n = 11）を示す。* p < 0.05, ** p < 0.01

[図2]図2は、CD患者と健常者の糞便中のリゾホスファチジルコリン（18:0 L y s o P C、18:1 L y s o P C、および22:1 L y s o P C）の濃度を示す。健常者に比較してのCD患者で高値を示した。HCは健常者（n = 12）、CDはクローン病患者（n = 11）を示す。* p < 0.05

[図3]図3は、CD患者と健常者の糞便中リゾリン脂質トータルランクオードスコア（糞便中各リゾリン脂質濃度に、1（最も低い）から23（最も高い）の正規化された値を割り当てたスコアを合計した値）を示す。点線は、特異度100%になる最低値78ポイントを示す。CD患者6人（CD03、CD05、CD06、CD07、CD09およびCD11）は、78ポイント以上のリゾリン脂質高濃度保持者である。

[図4]図4は図3の結果のROC解析を示す。

[図5]図5は、糞便サンプル中の全微生物のゲノム情報解析（メタゲノム解析）の結果であり、腸内微生物叢の α 多様性（種多様性）を表すShannonインデックスを示すグラフである。HCは健常者（n = 40）、CDはクローン病患者（n = 43）を示す。*** p < 0.001, Student's t-test

[図6]図6は、糞便サンプル中の全微生物のゲノム情報解析（メタゲノム解析）の結果であり、 β 多様性を表すBray-Curtisインデックスを用いた2次元解析結果を示す。HCは健常者（n = 40）、CDはクローン病患者（n = 43）を示す。PERMANOVAによる解析

[図7]図7は、糞便サンプル中の全微生物のゲノム情報解析（メタゲノム解析

）の結果であり、遺伝子ECSF__3660のFPKMを示すグラフである。HCは健常者（n = 40）、CDはクローン病患者（n = 43）を示す。** $p < 0.01$, Student's t-test検定

[図8]図8は、図1から図4の解析に使用された糞便サンプル中の大腸菌数を示す。定量的PCRによって測定された。HCは健常者（n = 12）、CDはクローン病患者（n = 11）を示す。** $p < 0.01$

[図9]図9は、大腸菌数（x軸）に対するリゾリン脂質トータルランクオーダースコア（y軸）を示す。単純線形回帰によりデータは分析された。図3に示した6人のリゾリン脂質高濃度保持者のIDが表示されている。

[図10]図10は、健常者（HC）およびCD患者（CD）の糞便サンプル中の完全長ECSF__3660のバンド（PCRによって増幅）を示す。*：非特異バンド、M：マーカー

[図11]図11は、健常者およびCD患者の腸内微生物叢のマウスへの移植後10日におけるマウスの糞便中の大腸菌数を示す。各群 n = 4; **** $p < 0.001$

[図12]図12は、健常者およびCD患者の腸内微生物叢のマウスへの移植後10日におけるマウスの糞便中の完全長ECSF__3660のバンド（PCRによって増幅）を示す。*：非特異バンド、M：マーカー

[図13]図13は、健常者およびCD患者の腸内微生物叢の移植後24日におけるマウスの糞便中の18:OLysoPS、18:1LysoPS、および総LysoPS濃度を示す。各群 n = 4; * $p < 0.05$, *** $p < 0.005$

[図14]図14は、TNBS誘導大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビークルを4日間腹腔内投与したときの体重の変化を示すグラフである。n = 9, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Student's t-test

[図15]図15は、TNBS誘導大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビークルを4日間腹腔内投与した後の結腸の長さを示す写真（A）とグラフ（B）ある。n = 9, **** $p < 0.0001$, Student's t-test

[図16]図16は、TNBS誘導大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビ

ークルを4日間腹腔内投与した後の結腸の病理組織像（H & E 染色）（A）と組織学スコアのグラフ（B）である。n = 6, ** p < 0.01, Student's t-test

[図17]図17は、TNBS誘導大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビークルを4日間腹腔内投与した後の相対的サイトカイン発現量（結腸の粘膜固有層リンパ球中のサイトカインmRNA発現量）を示すグラフである。n = 9, n.s.: not significant, * p < 0.05, Student's t-test

[図18]図18は、T細胞依存的大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビークルを4日間腹腔内投与したときの体重の変化を示すグラフである。n = 4 - 5, * p < 0.05, Student's t-test

[図19]図19は、T細胞依存的大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビークルを4日間腹腔内投与した後の結腸の長さを示す写真（A）とグラフ（B）である。n = 4 - 5, ** p < 0.01, Student's t-test

[図20]図20は、T細胞依存的大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビークルを4日間腹腔内投与した後の結腸の病理組織像（H & E 染色）（A）と組織学スコアのグラフ（B）である。n = 4 - 5, **** p < 0.0001, Student's t-test

[図21]図21は、T細胞依存的大腸炎モデルマウスにLysoPSまたはビークルを4日間腹腔内投与した後の結腸の粘膜固有層リンパ球中のIFN- γ ⁺細胞、IFN- γ ⁺IL-17A⁺細胞、IL-10⁺細胞、IL-17A⁺細胞の数を示すグラフである。n = 4 - 5, n.s.: not significant, * p < 0.05, Student's t-test

発明を実施するための形態

[0013] 本発明において、リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物とは、リゾホスファチジルセリン生成に関与している腸内微生物であれば、特に限定されない。リゾホスファチジルセリン（LysoPS）はリン脂質であり、グリセロール骨格にアシル基、リン酸基、セリンが結合している構造を有している。アシル基の脂肪酸種は多様であり、結合位置はグリセロール骨

格の $s n - 1$ 位（1-アシル型）と $s n - 2$ 位（2-アシル型）の2種類がある。生体内では、細胞膜の脂質二重層を形成しているホスファチジルセリン（PS）がホスホリパーゼA1（PLA1）またはホスホリパーゼA2（PLA2）の作用を受けて、Lys o PSが生成される。本発明において、ホスホリパーゼA1（PLA1）および／またはホスホリパーゼA2（PLA2）をホスホリパーゼA（PLA）と総称する。Lys o PSはTh1細胞を過剰活性化させて炎症性腸疾患を発症させ、または症状を増悪させる。

[0014] 前記Lys o PS生成に関与する腸内微生物は、好ましくは、ホスホリパーゼAを発現する腸内微生物である。本発明において、ホスホリパーゼAを発現する腸内微生物には、ホスホリパーゼAを発現している腸内微生物とホスホリパーゼ遺伝子を有する微生物であってホスホリパーゼAを発現することができる微生物を含む。ホスホリパーゼを発現する腸内微生物は、ホストの腸管上皮細胞の細胞膜を破壊しLys o PSを生成する。

[0015] 前記ホスホリパーゼAを発現する腸内微生物は、好ましくは、ホスホリパーゼAをコードする遺伝子ECSF__3660を有する微生物である。

[0016] 前記ホスホリパーゼAを発現する腸内微生物は、好ましくは細菌であり、さらに好ましくはグラム陰性菌であり、例えば大腸菌、エルシニアおよびセラチアが挙げられる。より好ましくは大腸菌（*Escherichia coli*）であり、さらに好ましくは、ホスホリパーゼAをコードする遺伝子ECSF__3660を有する大腸菌である。

[0017] 本発明におけるリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物数を測定する方法は、該腸内微生物量を測定できればその手法は特に限定されない。たとえば、該腸内微生物由来遺伝子の量を測定する方法、該腸内微生物発現ホスホリパーゼAを測定する方法、該腸内微生物を培養した後にコロニー数を計測する方法等が挙げられる。

[0018] 前記腸内微生物由来遺伝子の量を測定する好適な方法としては、PCRによる腸内微生物由来遺伝子の量を測定する方法が挙げられ、例えば定量的リアルタイムPCR法を挙げることができる。腸内微生物数は遺伝子量から公知

の方法（例えば、Petr Kralik et al. Front Microbiol 2017 Feb 2;8:108に記載の方法）により求めることができる。

- [0019] 前記腸内微生物由来遺伝子は、特に制限されるものではなく、目的の微生物を検出するために通常用いられている遺伝子でよい。例えば、大腸菌であれば通常大腸菌の定量に用いられているプライマーを用いて定量的PCRを行うことができる。前記腸内微生物由来遺伝子として好ましくはホスホリパーゼAをコードする遺伝子が挙げられる。
- [0020] 前記ホスホリパーゼAをコードする遺伝子として、例えば、ECSE__3660が挙げられる。ECSE__3660は大腸菌 (*Escherichia coli*) およびその他の細菌（肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 等）由来のホスホリパーゼAをコードする遺伝子（配列番号1、配列番号2）である。ECSE__3660の量を測定する方法として、例えば、定量的リアルタイムPCR法が挙げられる。
- [0021] 本発明の方法の好ましい実施形態の1つは、被検体から得られた試料中のホスホリパーゼAを発現する大腸菌数を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法であり、さらに好ましくは、遺伝子ECSE__3660を定量的リアルタイムPCR法により定量して該大腸菌数を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法である。
- [0022] リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物数は、該腸内微生物が発現するホスホリパーゼAを測定することにより求めることができる。微生物表面または微生物内に存在するホスホリパーゼAを測定する方法が挙げられる。グラム陰性菌ではホスホリパーゼAが外膜に存在することより、グラム陰性菌の外膜に存在するホスホリパーゼを測定する方法が挙げられる。前記腸内微生物由来ホスホリパーゼAとしては、ECSE__3660にコードされるホスホリパーゼAが挙げられる。
- [0023] 本発明の方法の好ましい実施形態の1つは、グラム陰性菌の外膜に発現されているホスホリパーゼAを標的にしてリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物数を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法である

。ホスホリパーゼAとして、好ましくは、E C S F __ 3 6 6 0にコードされるホスホリパーゼAが挙げられる。

[0024] ホスホリパーゼAを測定する方法として、ホスホリパーゼAのタンパク質量を測定する方法とホスホリパーゼAの活性を測定する方法が挙げられる。

[0025] ホスホリパーゼAのタンパク質量の測定方法は制限されるものではなく、例えば、ホスホリパーゼAに対する抗体を用いた測定方法が挙げられる。好ましくは、E C S F __ 3 6 6 0にコードされるホスホリパーゼAに対する抗体を用いた測定方法が挙げられる。抗体を用いた測定方法の例としてE L I S A法、イムノクロマトグラフ法、ラテックス凝集法等が挙げられる。

[0026] ホスホリパーゼAの活性の測定方法は制限されるものではない。例えば酵素活性検出比色法、蛍光発生脂質を基質とする方法 (David Gonzalez-Bullon et al. Toxins 2018) が挙げられる。

[0027] 本発明の炎症性腸疾患を検査する方法は、被検体より得られた試料中の腸内微生物由来ホスホリパーゼAをコードする遺伝子の量を測定する工程を含む方法でもあり得る。

[0028] 前記腸内微生物由来ホスホリパーゼAをコードする遺伝子は、L y s o P S の生成に関与している。ホスホリパーゼAをコードする遺伝子の量を測定する方法として、例えば、定量的リアルタイムPCR法が挙げられる。腸内微生物由来ホスホリパーゼAをコードする遺伝子の好ましい遺伝子として、E C S F __ 3 6 6 0が挙げられる。E C S F __ 3 6 6 0のDNA配列（配列番号1）よりプライマーをデザインし、定量的リアルタイムPCRをすることができる。プライマーの一例を以下に示す。

[0029] F w 1 : 5' - A T G C G G A C T C T G C A G G G C T G G T T G T T G C C G - 3' (配列番号3)

R v 1 : 5' - T C A A A A C A G G T C G T T T A G C A T A A C T C C C A C - 3' (配列番号4)

[0030] 本発明の方法の好ましい実施形態の1つは、被検体から得られた試料中のE C S F __ 3 6 6 0の量を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法で

ある。

- [0031] 本発明の炎症性腸疾患を検査する方法は、被検体より得られた試料中のL y s o P Sの濃度を測定する工程を含む方法でもあり得る。
- [0032] L y s o P Sを構成しているアシル基は、10種類以上存在する。本発明の測定対象のL y s o P Sはアシル基の種類に限定されるものではないが、好ましくは、炭素数が16-22のアシル基であり、さらに好ましくは、炭素数が18-20のアシル基であり、さらに好ましくは、炭素数が18のアシル基である。最も好ましくは、18:0 L y s o P Sおよび18:1 L y s o P Sである。18:0はステアリン酸、18:1はオレイン酸を示す。
- [0033] 本発明の炎症性腸疾患を検査する方法は、少なくとも1つのL y s o P Sを測定する。好ましくは、少なくとも18:1 L y s o P Sを測定する。好ましくは、少なくとも18:1 L y s o P Sおよび18:0 L y s o P Sを測定する。
- [0034] L y s o P Sの濃度の測定方法は制限されるものではない。例えば、HPLCと質量分析の組み合わせによる測定法、酵素定量法などが挙げられる。好ましくはLC/ESI-MSによる測定法が挙げられる。
- [0035] 本発明の方法は、L y s o P Sの測定に加えて、他のリゾリン脂質の少なくとも1つを測定する工程を含み得る。他のリゾリン脂質として、好ましくはリゾホスファチジルコリン（以下、L y s o P Cともいう）が挙げられる。好ましいリゾホスファチジルコリンとしては、18:0 L y s o P C、18:1 L y s o P C、および22:1 L y s o P Cが挙げられる。1つの実施形態として、試料中の複数リゾリン脂質を測定し、その検査結果を総合して診断等を行う態様が挙げられる。他の実施形態では、試料中の複数リゾリン脂質の測定結果を総合して検査値とすることができる。例えば、18:0 L y s o P S、18:1 L y s o P S、18:0 L y s o P C、18:1 L y s o P C、および22:1 L y s o P Cの全部または一部の糞便中濃度を点数化してその合計を検査値とすることができる。好ましくは、該5つのリゾリン脂質の全部の各濃度を点数化しその合計値を検査値とする。

- [0036] 本発明の炎症性腸疾患を検査する方法は、被検体より得られた試料中のホスホリパーゼAを測定する工程を含む方法でもあり得る。
- [0037] 前記ホスホリパーゼAは、好ましくは、腸内微生物由来ホスホリパーゼAである、腸内微生物が発現するホスホリパーゼAは、ホストの腸管上皮細胞の細胞膜を破壊しL y s o P Sを生成する。
- [0038] 前記腸内微生物由来ホスホリパーゼAとしては、好ましくは、E C S F__3 6 6 0にコードされるホスホリパーゼAが挙げられる。E C S F__3 6 6 0は大腸菌 (*Escherichia coli*) およびその他の微生物 (肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 等) 由来のホスホリパーゼAをコードする遺伝子 (配列番号1、配列番号2) である。
- [0039] ホスホリパーゼAは、微生物表面、微生物内、および微生物外に存在し得、測定対象としては、微生物表面に存在するホスホリパーゼA、微生物外に存在するホスホリパーゼA、および微生物内に存在するホスホリパーゼAが挙げられる。発現ホスホリパーゼAの総量を測定できる方法でもよく、また、存在場所を特定できるような測定方法でもよい。グラム陰性菌ではホスホリパーゼAが外膜に存在することより、グラム陰性菌の外膜に存在するホスホリパーゼAを測定する方法が挙げられる。
- [0040] 本発明の方法の好ましい実施形態の1つは、グラム陰性菌の外膜に発現されているホスホリパーゼAを測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法である。ホスホリパーゼAとしては、好ましくは、E C S F__3 6 6 0にコードされるホスホリパーゼAが挙げられる。
- [0041] ホスホリパーゼAを測定する方法として、ホスホリパーゼAのタンパク質量を測定する方法とホスホリパーゼAの活性を測定する方法が挙げられる。
- [0042] 本発明の方法の好ましい実施形態の1つは、被検体から得られた試料中の腸内微生物由来ホスホリパーゼAのタンパク質量を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法である。さらに好ましくは、E C S F__3 6 6 0にコードされるホスホリパーゼAのタンパク質量を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法である。

- [0043] 腸内微生物由来ホスホリパーゼAのタンパク質量の測定方法は制限されるものではない。例えば、ホスホリパーゼAに対する抗体を用いた測定方法が挙げられる。好ましくは、E C S F__3 6 6 0にコードされるホスホリパーゼAに対する抗体を用いた測定方法が挙げられる。その測定方法の例としてE L I S A法、イムノクロマトグラフ法、ラテックス凝集法等が挙げられる。
- [0044] 本発明の方法の好ましい実施形態の1つは、被検体から得られた試料中の腸内微生物由来ホスホリパーゼAの活性を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法である。さらに好ましくは、遺伝子E C S F__3 6 6 0にコードされるホスホリパーゼAの活性を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法である。ホスホリパーゼAの活性の測定方法は制限されるものではない。例えば酵素活性検出比色法、蛍光発生脂質を基質とする方法 (David Gonzalez-Bullon et al. Toxins 2018) が挙げられる。
- [0045] 被検体としては、ヒトおよびヒト以外の動物が挙げられる。ヒト以外の動物としては好ましくは哺乳類であり、例えばイヌ、ネコ、ハムスターなどの愛玩動物、牛等の家畜等が挙げられる。好ましくはヒトである。
- [0046] 被検体から得られた試料は、好適には、腸内微生物叢を含む試料である。さらに好適には糞便サンプルである。
- [0047] 炎症性腸疾患は、腸に炎症を起こす疾患であり、本発明において炎症性腸疾患には、クローン病および潰瘍性大腸炎の他に腸管ベーチェット病、非特異性多発小腸潰瘍、家族性地中海熱関連腸炎等も含まれる。炎症性腸疾患は、慢性的な下痢や血便、腹痛などの症状を特徴とし、他にも発熱、肛門痛などの症状が含まれる。病理学的検査では、クローン病では非乾酪性類上皮細胞肉芽腫、潰瘍性大腸炎では陰窩膿瘍が特徴とされる。
- [0048] 本発明の方法は、T h 1細胞の過剰活性化を伴う炎症性腸疾患の検査に好適に用いられ得る。
- [0049] T h 1細胞の過剰活性化は、T h 1細胞からのI F N - γ 等の炎症性サイトカインの分泌量の上昇を特徴とする。T h 1細胞の過剰活性化には、細胞あたりの炎症性サイトカインの分泌量上昇、活性酸素種 (R O S) 産生亢進、

炎症性サイトカイン産生Th1細胞数の増加、ナイーブCD4+T細胞のTh1細胞への分化促進、およびTh1細胞の代謝促進（特に解糖系の促進）を含む。

[0050] クローン病と潰瘍性大腸炎は、ともに免疫細胞が関与する難治性腸管炎症性疾患であり、本発明の方法は、クローン病と潰瘍性大腸炎の検査に好適に用いられ得る。特に好適には、本発明の方法はクローン病の検査に用いられ得る。

[0051] 本発明の炎症性腸疾患を検査する方法における検査には、炎症性腸疾患と関連した全ての検査を含み、炎症性腸疾患の診断時の検査、炎症性腸疾患発症リスクの検査、および炎症性腸疾患発症後の経過観察のための検査等を含む。

[0052] 本発明の方法は、被検体より得られた試料の検査値と対照試料の検査値が比較される工程をさらに含み得る。試料中および対照試料中の同一検査対象を、同一の方法によって測定した検査値を比較する。対照試料が健常者から得られた試料である場合、被検体より得られた試料の検査値が対照試料の検査値より高値の場合は、被検体は炎症性腸疾患である、または炎症性腸疾患を発症するリスクが高いと判定され得る。健常者から得られた試料（対照試料）の検査値は、予め定められた健常者の標準値を含む。対照試料が同一被検体の過去の試料である場合は、被検体より得られた試料中の検査値が対照試料の検査値より高値の場合は、被検体は病状が悪化している、または悪化するリスクが高いと判定され得、逆に被検体より得られた試料中の検査値が対照試料の検査値より低値の場合は、被検体は病状が改善している、または改善する可能性が高いと判定され得る。

[0053] 本発明の炎症性腸疾患の予防用または治療用の物質または微生物のスクリーニング方法におけるLysoPS生成に関与する腸内微生物数の測定方法は、特に限定されるものではない。好ましい方法は、該腸内微生物の培養液と候補物質または候補微生物を接触させた後に該腸内微生物数を測定する方法が挙げられる。また、ヒトまたはヒト以外の動物に候補物質または微生物を

経口摂取させて糞便サンプル中の該腸内微生物数を測定する方法が挙げられる。手法としては、定量的リアルタイムPCR法、コロニー数計測法等が挙げられる。

[0054] 本発明の炎症性腸疾患の予防用または治療用の物質のスクリーニング方法は、ホスホリパーゼAの活性を測定する工程を含む方法であり得る。好適には、該ホスホリパーゼAは腸内微生物由来ホスホリパーゼAである。ホスホリパーゼAの活性の測定方法として好ましい方法は、ホスホリパーゼAと候補物質を接触させた後にホスホリパーゼA活性を測定する方法が挙げられる。または、前記腸内微生物の培養液と候補物質を接触させた後にホスホリパーゼA活性を測定する方法が挙げられる。該ホスホリパーゼAは、好ましくは、ホスホリパーゼA1である。

[0055] 前記候補物質は、例えば化合物ライブラリーの化合物を用いることができる。化合物ライブラリーは、公知のものでも公知でないものでもよい。公知の化合物ライブラリーとしては、既に食品（例えば、米国食品医薬品局（FDA））または医薬品（例えば、欧州医薬品審査庁（EMA））の承認を得た化合物を集めた化合物ライブラリー（例えば、PRESTWICK CHEMICALライブラリー）（これは、特許期間が満了した化合物を集めたものである）、および未だそれら食品または医薬品の承認を得ていない化合物を集めた化合物ライブラリー等が挙げられる。

[0056] 本発明のスクリーニング方法は、物質または微生物を選別する工程をさらに含んでもよい。

[0057] 本発明のスクリーニング方法で得られた物質または微生物は、炎症性腸疾患の予防または治療に用いることができる。

[0058] 本発明の炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物は、リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質または微生物を有効成分として含有する。または、本発明の炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物は、ホスホリパーゼAの活性を抑制する物質を有効成分として含有する。

- [0059] 前記予防用または治療用組成物には、薬剤、食品、飲料等が含まれる。
- [0060] 前記リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質または微生物は、前記スクリーニング方法で得られた物質または微生物であり得る。前記物質としては、例えば抗菌剤および吸着剤が挙げられる。前記微生物としては、乳酸菌、ビフィズス菌、*Xenorhabdus*、*Photobacterium* および標的微生物に感染するファージ（例えば、*Enterobacter* Phage P1 および *Enterobacter* phage μ ）等が含まれ得る。
- [0061] 前記ホスホリパーゼ A の活性を抑制する物質には、ホスホリパーゼ A の発現を抑制する物質および生合成を抑制する物質等も含まれる。ホスホリパーゼ A の活性を抑制する物質は、前記スクリーニング方法で得られた物質であり得る。前記ホスホリパーゼ A の活性を抑制する物質は、好ましくは腸内微生物由来ホスホリパーゼ A の活性を抑制する物質である。前記ホスホリパーゼ A の活性を抑制する物質としては、例えば、ホスホリパーゼ A 阻害剤、ホスホリパーゼ A に対する抗体、ホスホリパーゼ A 遺伝子のアンチセンス RNA、ホスホリパーゼ A を阻害する細菌が挙げられる。ホスホリパーゼ A 阻害剤としては、例えば、グリチルリチン酸、グリチルレチン酸、4-bromophenacyl bromide、darapladib、Anagrelide、OBAA (3-(4-octadecyl) benzoyl acrylic acid)、PACOCF₃ (palmitoyl trifluoromethyl ketone)、YM26734、LY315920 (varespladib methyl) が挙げられる。
- [0062] 本発明において、炎症性腸疾患の治療には、炎症性腸疾患の症状の改善、軽減、増悪抑制、進行の遅延、および再燃抑制等が含まれる。
- [0063] 本発明の組成物は、Th1 細胞の過剰活性化を伴う炎症性腸疾患の予防および治療に好適に用いられ得る。
- [0064] Lys o P S の作用により、Lys o P S 受容体を介して Th1 細胞の過剰活性化が発生し、炎症性腸疾患の症状が悪化する。この Th1 細胞の過剰活性化には、細胞あたりの炎症性サイトカインの分泌量上昇、炎症性サイトカ

イン産生 T h 1 細胞数の増加、R O S 産生亢進、ナイーブ C D 4 + T 細胞の T h 1 細胞への分化促進、および T h 1 細胞の代謝促進（特に解糖系の促進）を含む。本発明の組成物は、T h 1 細胞の過剰活性化を抑制することができ、T h 1 細胞の過剰活性化を伴う炎症性腸疾患を好適に予防または治療することができる。

[0065] クローン病と潰瘍性大腸炎は、ともに免疫細胞が関与する難治性腸管炎症性疾患であり、本発明の組成物は、クローン病と潰瘍性大腸炎の予防および治療に好適に用いられ得る。特に好適には、本発明の組成物はクローン病の予防および治療に用いられ得る。

[0066] 本発明の組成物は、2 種以上の有効成分を含有してもよい。他の炎症性腸疾患治療薬を含有してもよく、また、炎症性腸疾患治療薬以外の薬物を含有してもよい。本発明の組成物は他の炎症性腸疾患治療薬と併用されてもよい。

[0067] 本発明の組成物は医薬的に許容される担体を含むことができる。

[0068] その様な担体としては、賦形剤（例えば、マンニトール、ソルビトールの如き糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプンの如きデンプン誘導体；または、結晶セルロースの如きセルロース誘導体等）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウムの如きステアリン酸金属塩；またはタルク等）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはポリビニルピロリドン等）、崩壊剤（例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウムの如きセルロース誘導体等）、水、防腐剤（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベンの如きパラオキシ安息香酸エステル類；またはクロロブタノール、ベンジルアルコールの如きアルコール類等）、p H 調整剤（例えば、塩酸、硫酸またはリン酸等の無機酸、酢酸、コハク酸、フマル酸またはリンゴ酸等の有機酸、あるいはこれらの塩等）、ならびに希釈剤（例えば、注射用水等）等の通常使用される医薬製剤用担体を、単独または2 種以上を混合して配合することができる。本発明の組成物には有効成分を水に溶解させた液剤を含

む。

[0069] 本発明の組成物は、食品、飲料である場合には、既存食品または飲料と混合された形態の組成物でもよい。

[0070] 本発明の有効成分は、必要に応じて上記の担体と混合した後、錠剤、顆粒剤、カプセル剤、粉末剤、溶液製剤、懸濁液製剤、もしくは乳化液剤等の剤形で経口投与することができる。また、坐剤、経腸剤、注射剤、静脈内点滴剤、経皮剤、経粘膜剤、もしくは吸入剤等の剤形で非経口投与することができる。

[0071] 本発明の有効成分は、上記の剤形に製剤化した後、または食品や飲料に混合した後それを必要とする対象、例えばヒトまたは動物、好ましくはヒトに投与される。

[0072] 本発明の有効成分の投与量および投与回数は、症状の重篤度、患者の年齢、体重、性別、薬物の種類、剤形、投与経路等の条件によって適宜変化する。ヒトに投与する場合、有効成分は、例えば非経口的には皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、または直腸内等に、1回の投与当たり、約0.01～10mg/kg体重、好ましくは約0.1～5mg/kg体重、特に好ましくは約0.3～3mg/kg体重、また経口的には約0.01～100mg/kg体重、好ましくは約0.1～50mg/kg体重、特に好ましくは約1～30mg/kg体重投与される。また、投与回数は、1日当たり1回または複数回、例えば1日当たり1～3回、1～2回、または1回であってよい。

[0073] 本発明の有効成分は、公知の方法に従って製造できる。

[0074] 以下に、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例

[0075] <材料と試験方法>

[0076] <マウス>

C57BL/6Jのマウスは日本クレア社（東京、日本）から購入した。C57BL/6J RAG2欠損マウス（Rag2^{-/-}）はTaconic Bioscience

s, Inc. (Hudson, NY, USA)から購入した。T s l : l C R 無菌マウスは三協ラボサービス株式会社（東京、日本）から購入した。8-15週齢の雄のマウスを使用し、すべてのマウスはS P F (specific pathogen free) 環境下で維持した。

[0077] <試薬>

2、4、6-トリニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (T N B S) はSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。18:0 L y s o P S (1-stearoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt))、および18:1 L y s o P S (1-oleoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phospho-L-serine (sodium salt)) はAvanti Polar Lipids, Inc (Alabaster, AL, USA) から購入し、70%エタノールに溶解して試験に用いた。

[0078] <フローサイトメトリー>

Anti-mouse CD4-PerCP/Cy5.5 (GK1.5), anti-mouse IL-10-PE (JES5-16E3), anti-mouse IFN- γ -FITC (XMG1.2), 7-AAD, anti-human CD4-APC (clone SK3), anti-human CD45RA-Brilliant Violet 421 (HI100), anti-human CD4-Pacific Blue (RPA-T4), anti-human IFN- γ (4S.B3)は、BioLegend (San Diego, CA, USA)から購入した。Anti-mouse CD3e-PerCP/Cy7 (145-2C11), anti-mouse IL-17A-Alexa Fluor 647 (TC11-18H10) はBD Biosciences から購入した。マウスおよびヒトのC D 4 + T細胞を、GolgiStop (BD Biosciences)存在下、4 h 37℃で、完全R P M I 1640中50 ng/mlホルボールミリステートアセテート (P M A ; Sigma-Aldrich) と5 μ Mイオノマイシン (Sigma-Aldrich) によって刺激した。細胞表面/細胞内を、Cytofix/Cytoperm Kit Plusを使って染色した。フローサイトメトリー分析はFlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA)を使用したFACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences)によって実行した。

[0079] <病理組織解析>

マウスの結腸と回腸のサンプルはホルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋し、4 μ mの厚さの切片を作製し、ヘマトキシリンとエオジン (H & E)

によって染色した。評価に用いた組織学的スコアは、Iijima, H. et al, J Exp Med 199, 471-482に準じた。

[0080] <統計分析>

結果は平均と標準偏差で表される。グループ間の平均値の差は、Student's t-test、またはOne-way ANOVAによって検定した。

[0081] <実施例1：Lys o P S濃度測定（1）>

クローン病患者（以下、「CD患者」ともいう）の腸管腔の脂質プロファイルの特徴を確認した。クローン病患者と健常者からサンプル提供者を募集した。炎症性腸疾患研究の国際機関によって定められた内視鏡的、放射線学的、組織学的、臨床診断基準に従ってIBD患者を診断した。クローン病患者は、CDAIスコアが150より小さい場合に寛解期と定義される。研究はヘルシンキ宣言に従って実行され、大阪大学医学部附属病院の倫理審査委員会によって承認された。研究に参加する前に、すべての参加者に書面によるインフォームド・コンセントが行われた。クローン病患者43人（活動期19人、寛解期24人）と健常者40人から糞便サンプルを収集し、直ちに凍結した。

[0082] 報告されている方法（Muranaka et al, 2017）に少し修正を加えて、糞便サンプル中の脂質分子の濃度を測定した。すなわち、凍結された糞便サンプルを押しつぶし、いくつかの断片を1%酢酸を含むメタノールの中で均質化した（サンプル10mgあたり100 μ l）。その後60秒氷上で超音波処理した。得られたホモジネート100 μ l、内部標準を含むクロロホルム、メタノール、およびエタノール（1：2：2比率）混合液2ml、並びにクロロホルム、メタノール、エタノール、および酢酸（2：1：1：1の比率）混合液100 μ lを混合し、4℃で10分間遠心分離した。有機層を収集し、EZ-2 Plus Genevac centrifugal evaporator（SP Scientific）で濃縮した。得られた乾燥体を、クロロホルム、メタノール、およびエタノール（1：2：2比率）混合液280 μ lに溶解した。糞便中の脂質分子種を分析するために、得られた溶液の4 μ l

をUPLC-ESI-MS/MSに使用した。各人の糞便サンプルあたり2回脂質濃度を測定し、これらの濃度の平均がその後の分析のために使われた。データは、MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>) を使って分析された。

[0083] 糞便中の脂質組成は健常者とCD患者の間で明確に相違していた。血漿中リン脂質濃度(Iwatani et al. 2020)に類似して、全Lysophospholipids、18:0 Lysophospholipids、および18:1 Lysophospholipidsの濃度は、健常者よりCD患者で高かった。これは、Lysophospholipids産生がCD患者の腸の中で増加していることを示す。

[0084] <実施例2：Lysophospholipids濃度測定(2)>

さらにクローン病患者11人と健常者12人から糞便サンプル収集し、実施例1と同様の方法で糞便中の脂質を網羅的に解析した。34クラスに属する529の脂質分子を特定した。部分的最小二乗判別分析により、クローン病患者のサンプル中の脂質組成が、健常者の脂質組成と明確に異なることが明らかになった。

[0085] 15の脂質分子が健常者に比較してCD患者で増加していた。CD患者の糞便中の18:0 Lysophospholipidsおよび18:1 Lysophospholipidsの濃度は、健常者より高値を示した(図1)。Lysophospholipidsに加えて、Lysophosphatidylcholineの濃度も、CD患者において高値を示した(図2)。

[0086] CD患者の糞便中の18:0/18:1 Lysophospholipids、そして、18:0/18:1/22:1 Lysophosphatidylcholineの増加についてさらに検討するために、我々は、ランク-オーダースコアモデル(rank-order scoring model)を導入した。すなわち、各リゾリン脂質の糞便の濃度に、1(最も低い)から23(最も高い)の正規化された値を割り当てた。各スコアの合計値(トータルランク-オーダースコア)は、CD患者において明確な増加を示した(図3)。ROC解析(AUC=0.7992、p=0.0036、図4)によりカットオフ値が78ポイント(特異度が100%になるトータルランク-オーダースコアの最低値)であることが判明した。トータ

ルランク-オーダースコア78ポイント以上のCD患者6人(CD03, CD05, CD06, CD07, CD09およびCD11)を、リゾリン脂質高濃度保持者と認定した(図3)。

[0087] <実施例3：糞便サンプルのメタゲノム解析>

実施例1で収集した糞便サンプルからDNAを抽出した。糞便のサンプルをチューブに入れ、RNA later (商標)を10倍希釈ホモジネートを調製するために添加した。糞便ホモジネート(200 μ l)をPBSで2回洗い、その後、ガラスビーズ(直径0.1mm)0.3g、トリスSDS溶液300 μ l、およびTE飽和フェノール500 μ lを懸濁液に追加した。得られた混合液を、Fast Prep-24 (MP Biomedicals; Kayzersberg, France)を使って、パワーレベル5.0で30秒ボルテックスした。サンプルを遠心分離(20,000 $\times$ g、4 $^{\circ}$ C、5分間)し、得られた上清から400 μ lを分取してフェノールクロロホルム抽出を行った。フェノールクロロホルム抽出により得られた上清から250 μ lを分取し、イソプロパノールによる沈殿を得た。糞便のサンプルからのDNAをTE緩衝液50 μ lに懸濁した。

[0088] 実施例1で収集した糞便サンプル中の全微生物のゲノム情報を得るために、次世代シーケンサーを用いたメタゲノムのショットガンシーケンス(メタゲノム解析)を行った。 α 多様性をshannonインデックスで表した結果を図5に示す。健常者に比較してクローン病患者の糞便中では、腸内微生物叢の種多様性が減少していた。 β 多様性を表すBray-Curtisインデックスを用いて二次元解析を行った結果、クローン病患者と健常者では糞便サンプル中の微生物群プロファイルが明らかに相違した(図6)。クローン病患者のdysbiosisが確認された。

[0089] <実施例4：ホスホリパーゼA (PLA) をコードする遺伝子測定>

実施例3のメタゲノム解析から、ホスホリパーゼA (PLA) をコードしている遺伝子を解析した。PLAをコードすると予想される7つの遺伝子の中で、健常者のサンプルと比較してクローン病患者で顕著に増加してる遺伝子

として、主として大腸菌 (*Escherichia coli*) に由来する E C S F __ 3 6 6 0 が同定された (図 7)。

[0090] <実施例 5 : 大腸菌数測定>

実施例 2 で収集した C D 患者糞便サンプル中の大腸菌数と健常者糞便サンプルに中の大腸菌数を測定した。ヒトおよびネズミの糞便サンプル中の *E. coli* / *Shigella* group の測定について以前報告されている方法 (Pareek et al, 2019) に従って、定量的 P C R を行った。すなわち、テンプレートとして 1 0 0 倍希釈された D N A 5 μ l およびマスター混合溶液 1 5 μ l を混合して各 2 0 μ l の反応溶液を調製した。そのマスター混合溶液には、P C R グレードの水 4. 6 μ l、1 0 μ M ストックからのフォワードおよびリバースプライマー 0. 2 μ l、および G o T a q (商標) P r o b e q P C R M a s t e r M i x (Promega, Woods Hollow Road Madison, WI, USA) 1 0 μ l が含まれていた。反応は、A B B i o s y s t e m s S t e p O n e P l u s (商標) システムにおいて、以下のプログラムを使って実行された : 9 4 $^{\circ}$ C 5 分の 1 サイクル、9 4 $^{\circ}$ C 1 5 秒、6 0 $^{\circ}$ C 6 0 秒、および 7 2 $^{\circ}$ C 6 0 s の 4 0 サイクル。糞便 1 グラムあたりのコピー数は、大腸菌用に得られた標準曲線に基づいて、計算された。次のプライマーセットを使用した : 5' - G A G T A A A G T T A A T A C C T T T G C T C A T T G - 3' (配列番号 6)、および、5' - G A G A C T C A A G C T K R C C A G T A T C A G - 3' (配列番号 7)。

[0091] C D 患者サンプル中の大腸菌数は健常者と比較して有意に高かった (図 8)。

さらに、糞便中の大腸菌数はランクオーダースコアにより正規化された糞便リゾリン脂質の相対量と正に相関していた。また、実施例 2 でリゾリン脂質高濃度保持者に認定された 6 人は、多くの大腸菌を保持していた (図 9)。

[0092] <実施例 6 : 腸内微生物による L y s o P S 生成>

グラム陰性菌がホストの腸管上皮に侵襲する際に、グラム陰性菌の P L A がホストの上皮細胞膜を破壊することが報告されている (Istivan and Coloe, 2006)。一方、患者 (ホスト) 自身のホスホリパーゼ A (P L A) と腸内微生物

のPLAはいずれも、細胞膜リン脂質を加水分解し、リゾリン脂質を生成することが知られている(Tan et al. 2020)。CD患者の糞便中LysoPSの増加を引き起こすPLAが、腸内微生物叢の異常(dysbiosis)により増加した微生物由来のPLAによるものであることを確認するために、以下の試験を行った。

[0093] 健常者とCD患者から新鮮な糞便サンプルを収集し、糞便サンプル中の、CSF__3660(全長870bp)を、定量的PCRによって検出した。プライマーとして、5'-ATGCGGACTCTGCAGGGCTGGTTGTTGCCG-3'(配列番号3)、および、5'-TCAAAACAGGTCTGTTTAGCATAACTCCCAC-3'(配列番号4)を用いた。増幅条件は、94℃5分の1サイクル、94℃30秒、60℃30秒、および72℃60秒の35のサイクルとした。結果を図10に示す。健全な微生物叢を持つ4人の健常者からの糞便サンプルを混合し、また、ECSF__3660検出可能な微生物叢を保菌する2人のCD患者からの糞便サンプルを混合した。

[0094] 既報(Maeda et al. 2016)にわずかな修正を加えた方法により、無菌マウスにヒトの糞便の微生物叢を定着させた。

[0095] 各糞便のサンプルを好気性緩衝液(2% Lab-Lemco powder、0.1% L-cysteine、0.045% KH_2PO_4 、0.09% NaCl 、0.045% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.045% CaCl_2 、0.045%の MgSO_4 、および、40% グリセリン)を用いて16倍希釈(w/v)し均質化し、使用するまで-80℃で保存した。

[0096] 雄の無菌マウス(8-9週齢)にCD患者または健常者からの糞便の懸濁液250 μl を経口で移植した。これらマウスを24日の間ノトバイオートのアイソレータ中に別々に維持した。移植後10日において、CD患者微生物叢移植マウスの糞便中の大腸菌数は、健常者微生物叢移植マウスの糞便中の大腸菌数に比較して、明らかに高値を示した(図11)。加えて、CD患者微生物叢を保菌しているマウスの糞便から、微生物DNAであるECSF__

3660を検出した。一方、健常者微生物叢を保菌しているマウスの糞便からはECSF__3660は検出されなかった(図12)。我々は、移植後24日に更に121の脂質種の糞便中濃度を測定した。CD患者微生物叢保菌マウスの糞便中濃度と健常者微生物叢保菌マウスの糞便中濃度を比較すると、7つのクラスの37の脂質種の濃度が、CD患者微生物叢保菌マウスで高かった。18:0、18:1および総LysoPSの糞便中濃度は、健常者微生物叢保菌マウスと比較してCD患者微生物叢保菌マウスにおいて高値であった(図13)。これらの結果は、CD患者における異常な腸内微生物叢の保菌(dysbiotic)が腸内のLysoPSの生成に関連することを示唆する。

[0097] 以上の結果は、CD患者の腸内では、dysbiosisによりPLAを産生する大腸菌等が増加し、LysoPS濃度の上昇を引き起こしていることを示す。

[0098] 実施例7

患者の糞便サンプルにメタノール添加のうえホモジナイズし、定量的リアルタイムPCR法によりECSF__3660の量を測定する。健常者のECSF__3660の量と比較して遺伝子量が多い場合は、炎症性腸疾患のリスクが高いと判定する。

[0099] 実施例8

実施例7と同様に炎症性腸疾患患者の糞便サンプル中のECSF__3660の量を測定する。同一患者の過去の検査値と比較して患者の病状の変化を把握する。

[0100] 実施例9

CD患者と健常者から糞便サンプルを収集し、直ちに凍結した。凍結した糞便サンプルをメタノール添加のうえホモジナイズし、UPLC-ESI-MS/MSによって全LysoPS、18:0 LysoPS、および18:1 LysoPSの濃度を測定した。これらLysoPSの濃度は健常者よりクローン病患者の方が高かった。

[0101] <試験例 1 : L y s o P S による大腸炎の増悪>

L y s o P S レベル上昇が腸炎の重症度に与える影響を 2 種類の大腸炎モデルマウスを用いて解析した。

[0102] A. T N B S 誘導大腸炎モデルマウス (クローン病モデルマウス)

T N B S 誘導大腸炎モデルマウスを以前報告した方法 (Iijima, H. et al. J Exp Med 199, 471-482, (2004)) にわずかな修正を加えて作製した。すなわち、野生型 C 5 7 B L / 6 J マウス (雄、8 - 1 0 週齢) を d a y 1 に 5 0 % のエタノール中 3 . 7 5 % T N B S 溶液 1 5 0 μ l を背皮膚へ塗布することにより感作した。d a y 8 に、5 0 % エタノール中 2 % T N B S 溶液 1 5 0 μ l を経肛門投与した。d a y 8 から d a y 1 1 まで毎日 1 回 1 8 : 1 L y s o P S を 2 . 5 m g / k g の投与量で腹腔内投与し、d a y 1 2 にマウスを解析に用いた。コントロールマウスにはビークル (7 0 % エタノール) を投与した。

[0103] L y s o P S 投与マウスでは、コントロールマウスと比較して、体重減少と結腸の短縮が観察され (図 1 4、図 1 5)、病理組織解析においても悪化は明らかであった (図 1 6)。結腸の粘膜固有層リンパ球中のサイトカイン m R N A 発現量を q R T - P C R を用いて測定したところ、L y s o P S 投与マウスでは、コントロールマウスに比較して、I f n γ と I l 1 7 a の発現量が高かったが、I l 1 0、I l 1 2 b、および I l 2 3 a の発現量に有意差はなかった (図 1 7)。

[0104] B. T 細胞依存的な大腸炎モデルマウス (クローン病モデルマウス)

C D 4 + T 細胞依存的な大腸炎モデルマウスを文献 (Ostanin, D. V. et al. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 296, G135-146, (2009)) に記載の方法にわずかな修正を加えて作製した。単離したナイーブ C D 4 + T 細胞を冷リン酸緩衝液 (P B S) で終濃度 1×10^6 c e l l s / m l に希釈して、5 0 0 μ l (5×10^5 c e l l s) を R a g 2 ^{-/-} マウス (雄、8 - 1 5 週齢) に腹腔内投与した。ナイーブ C D 4 + T 細胞を投与した 1 7 日後、連続 4 日間 1 8 : 1 L y s o P S (2 . 5 m g / k g) またはビークル (7 0 % エ

タノール)を腹腔内に投与した。

[0105] L y s o P S 投与マウスで、結腸の短縮、体重減少が観察された(図18、図19)。さらに、病理組織解析ではL y s o P S による大腸組織病変の顕著な増悪が観察された(図20)。結腸の病理組織による重症度の評価は、L i u, Z. et al. J Immunol 164, 6005-6014に記載の方法に準じて行った。大腸の粘膜固有層のC D 4 + T 細胞中のサイトカイン産生細胞数をフローサイトメトリー法で解析したところ、コントロールマウスと比較して、L y s o P S 投与マウスでは大腸炎の増悪に伴いI F N - γ + 細胞およびI F N - γ + I L - 1 7 A + 細胞が増加したが、I L - 1 7 A + 細胞およびI L - 1 0 + 細胞は増加しなかった(図21)。

[0106] これら結果は、L y s o P S が粘膜固有層において免疫病理学的なT h 1 応答を呼び起すことによって大腸炎を悪化させることを示す。すなわち、L y s o P S は腸粘膜においてT h 1 細胞の過剰活性化を引き起こして炎症性腸疾患を悪化させる。

産業上の利用可能性

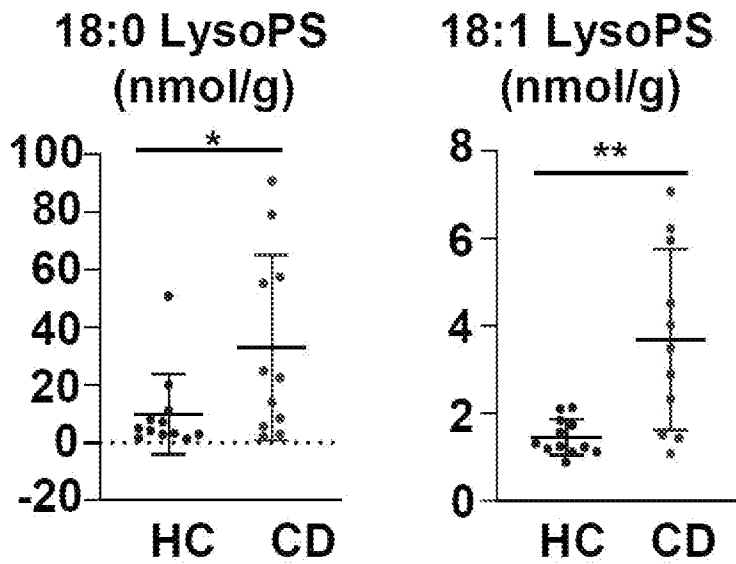
[0107] 本発明は、炎症性腸疾患の検査並びに炎症性腸疾患の予防および治療に貢献する。

請求の範囲

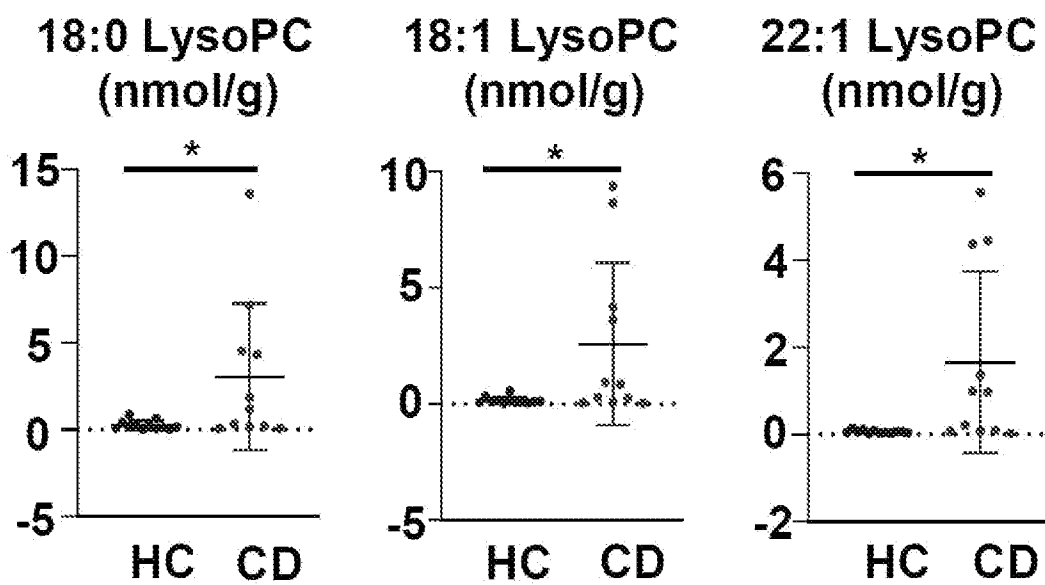
- [請求項1] 被検体より得られた試料中の、リゾホスファチジルセリン、リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物、腸内微生物由来ホスホリパーゼAをコードする遺伝子、および、ホスホリパーゼAからなる群から選択される少なくとも1を測定する工程を含む炎症性腸疾患を検査する方法。
- [請求項2] 被検体より得られた試料中のリゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物数を測定する工程を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記腸内微生物がホスホリパーゼAを発現する腸内微生物である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] 前記ホスホリパーゼAを発現する腸内微生物が、ホスホリパーゼAをコードする遺伝子ECSF__3660を有する微生物である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記腸内微生物数を測定する工程は、該腸内微生物由来遺伝子の量を測定する工程を含む、請求項2～4のいずれか1に記載の方法。
- [請求項6] 前記腸内微生物数を測定する工程は、該腸内微生物発現ホスホリパーゼAを測定する工程を含む、請求項2～4のいずれか1に記載の方法。
- [請求項7] 被検体より得られた試料中の腸内微生物由来ホスホリパーゼAをコードする遺伝子の量を測定する工程を含む、請求項1に記載の方法
- [請求項8] 前記ホスホリパーゼAをコードする遺伝子が、ECSF__3660である請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 被検体より得られた試料中のリゾホスファチジルセリンの濃度を測定する工程を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項10] さらにリゾホスファチジルコリンの濃度を測定する工程を含む請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 被検体より得られた試料中のホスホリパーゼAを測定する工程を含む、請求項1に記載の方法。

- [請求項12] 前記ホスホリパーゼAが、腸内微生物由来ホスホリパーゼAである、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 前記腸内微生物由来ホスホリパーゼAが、EC₃.6.6.0にコードされるホスホリパーゼAである、請求項12に記載の方法。
- [請求項14] 前記ホスホリパーゼAを測定する工程が、ホスホリパーゼAのタンパク質量を測定する工程またはホスホリパーゼAの活性を測定する工程である、請求項11～13のいずれか1に記載の方法。
- [請求項15] 前記試料が糞便サンプルである、請求項1～14のいずれか1に記載の方法。
- [請求項16] リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物数を測定する工程を含む、炎症性腸疾患の予防用または治療用の物質または微生物のスクリーニング方法。
- [請求項17] ホスホリパーゼAの活性を測定する工程を含む、炎症性腸疾患の予防用または治療用の物質のスクリーニング方法。
- [請求項18] リゾホスファチジルセリン生成に関与する腸内微生物を除去または減少させる物質または微生物を含有する炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物。
- [請求項19] ホスホリパーゼAの活性を抑制する物質を含有する炎症性腸疾患の予防用または治療用組成物。

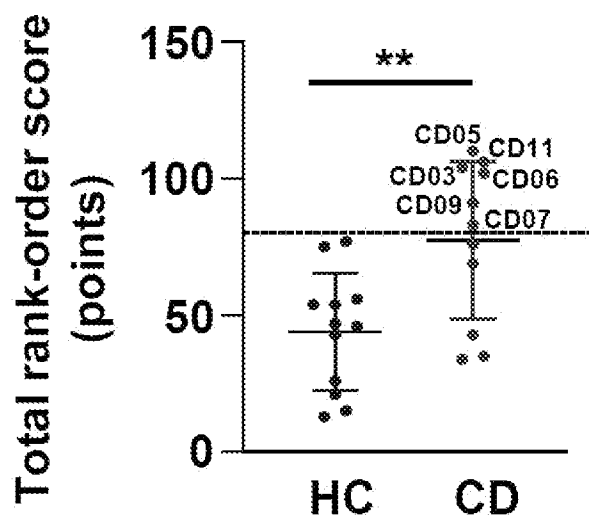
[図1]



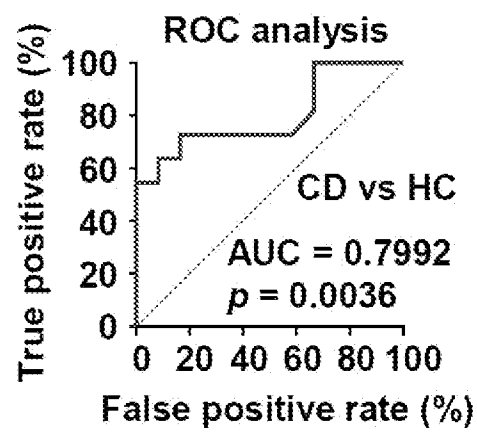
[図2]



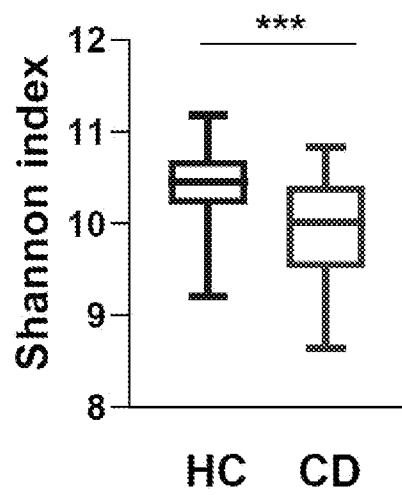
[図3]



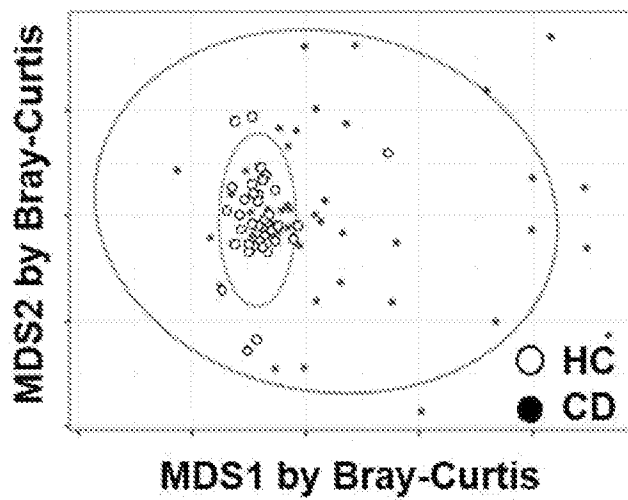
[図4]



[図5]

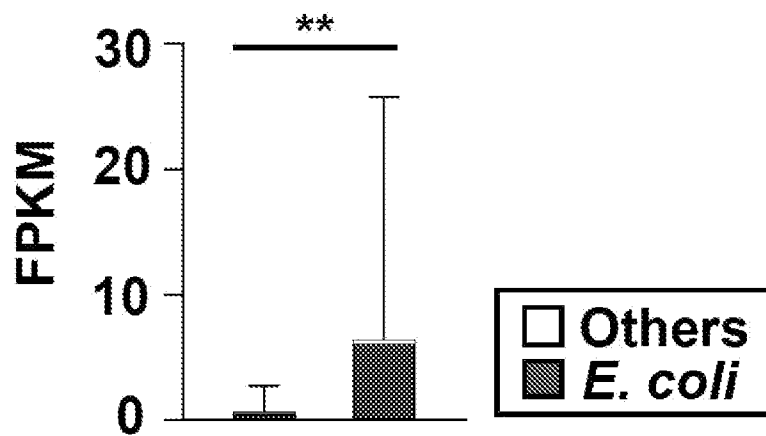


[図6]

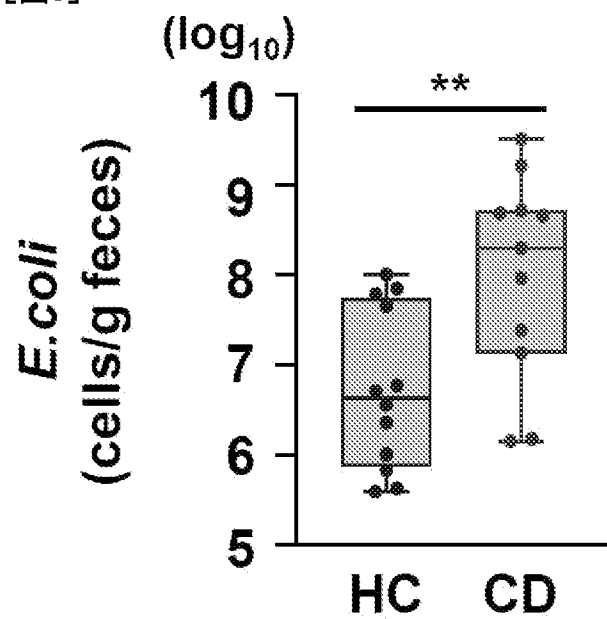


[図7]

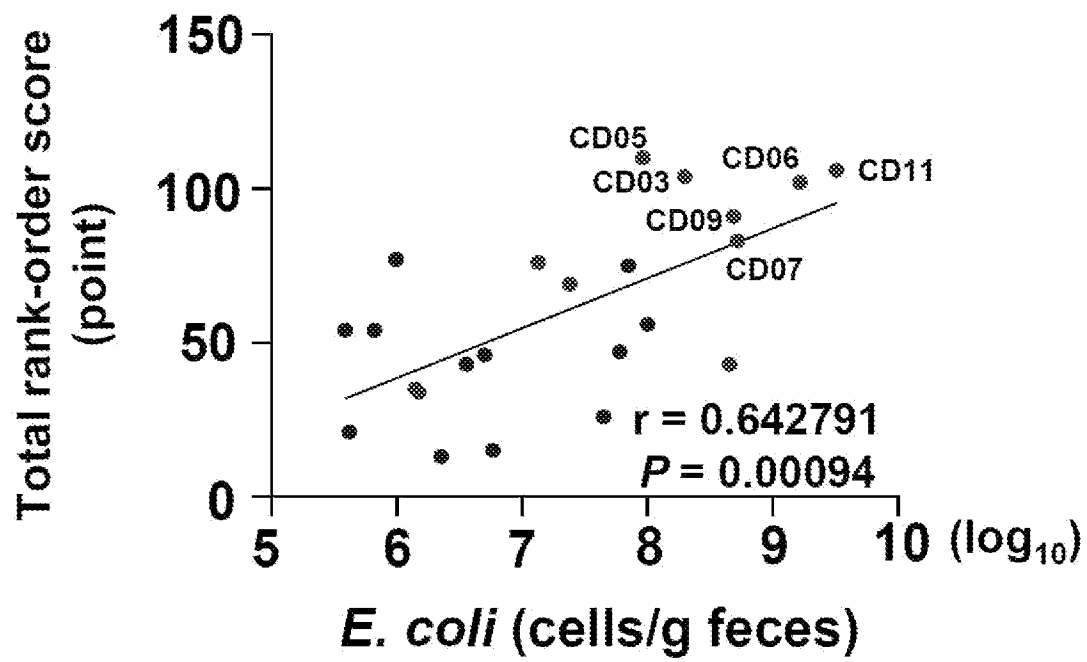
ECSF_3660



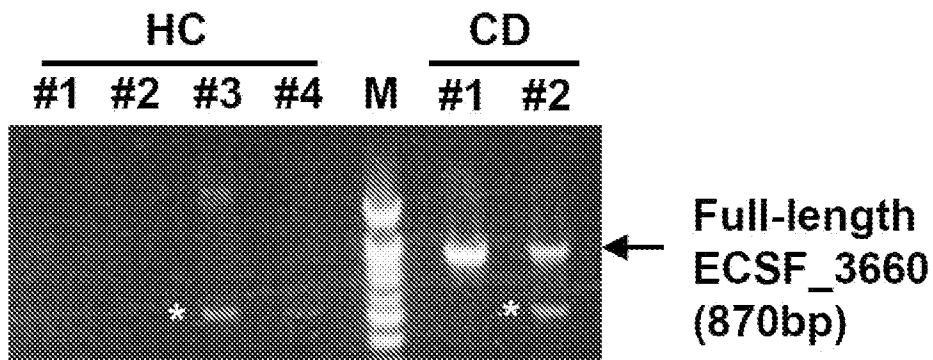
[図8]



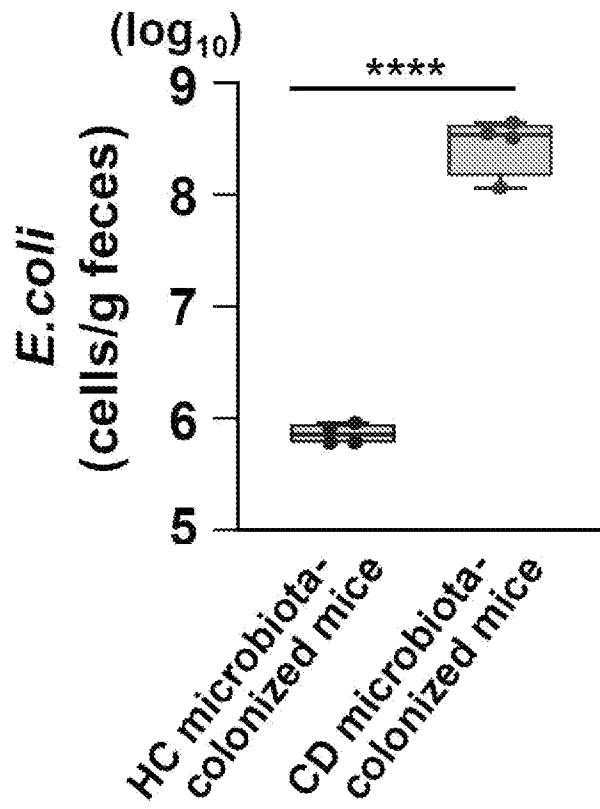
[図9]



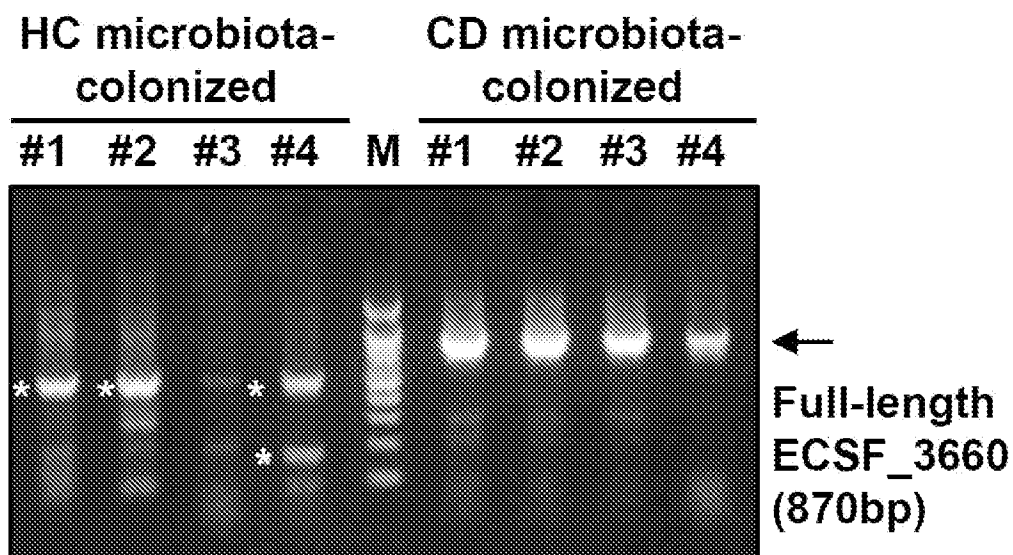
[図10]



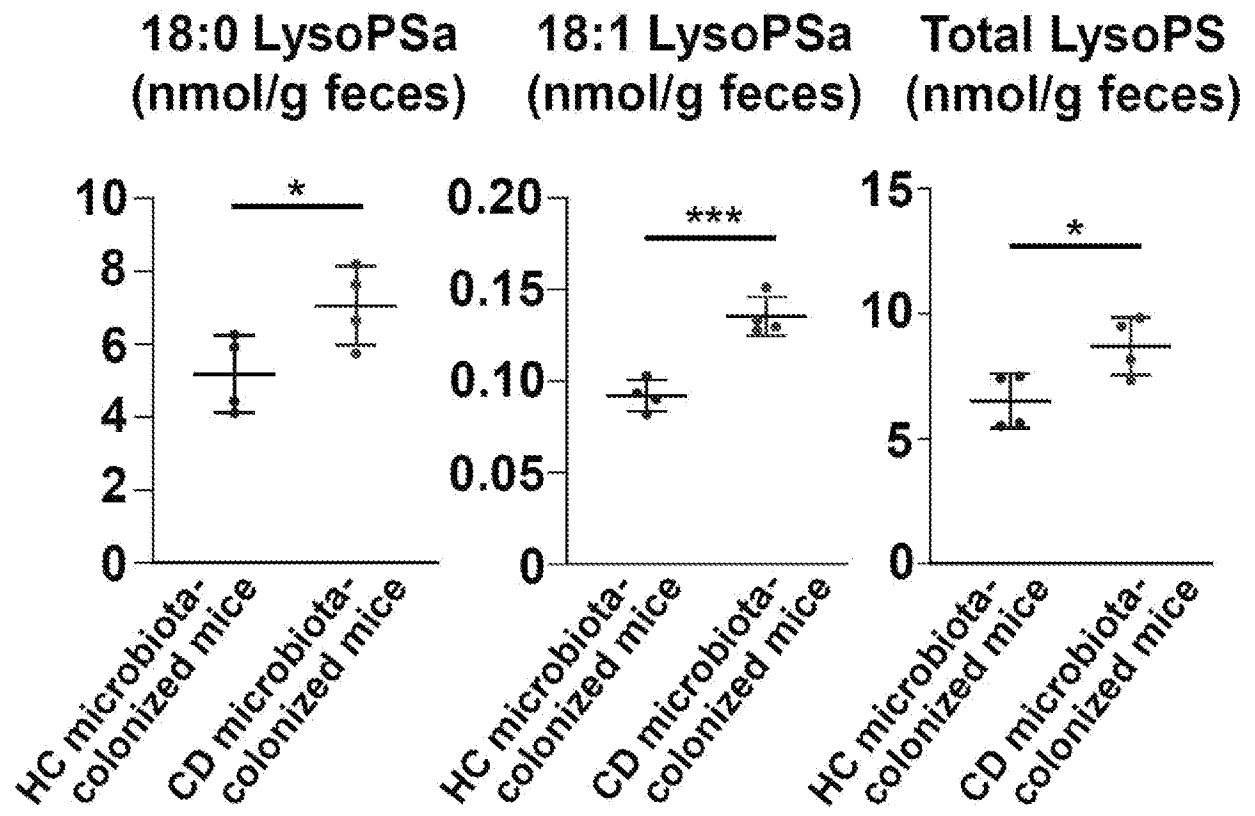
[図11]



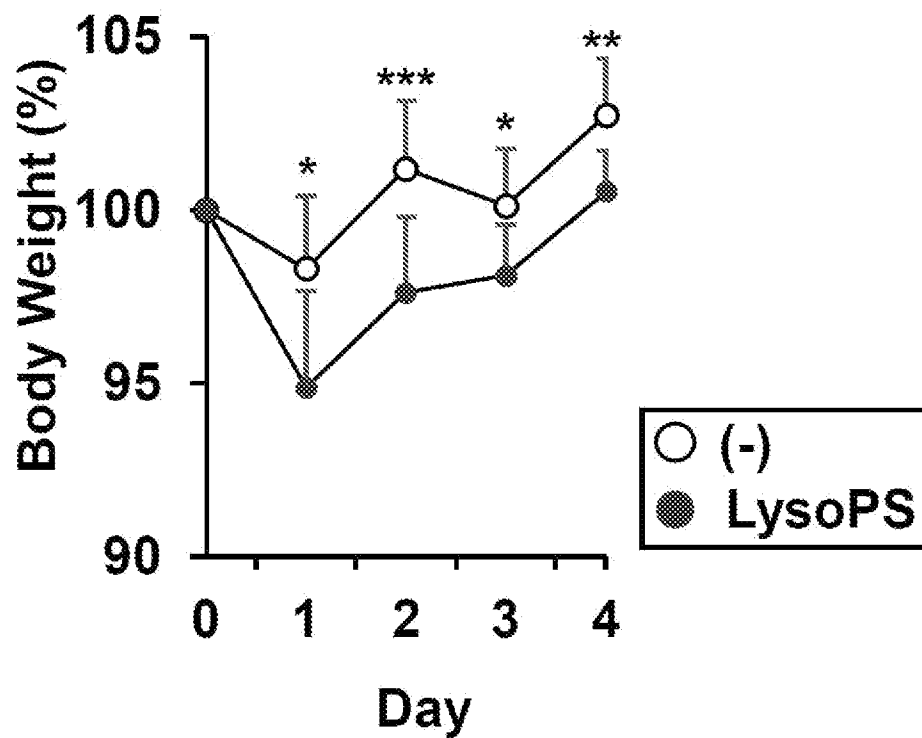
[図12]



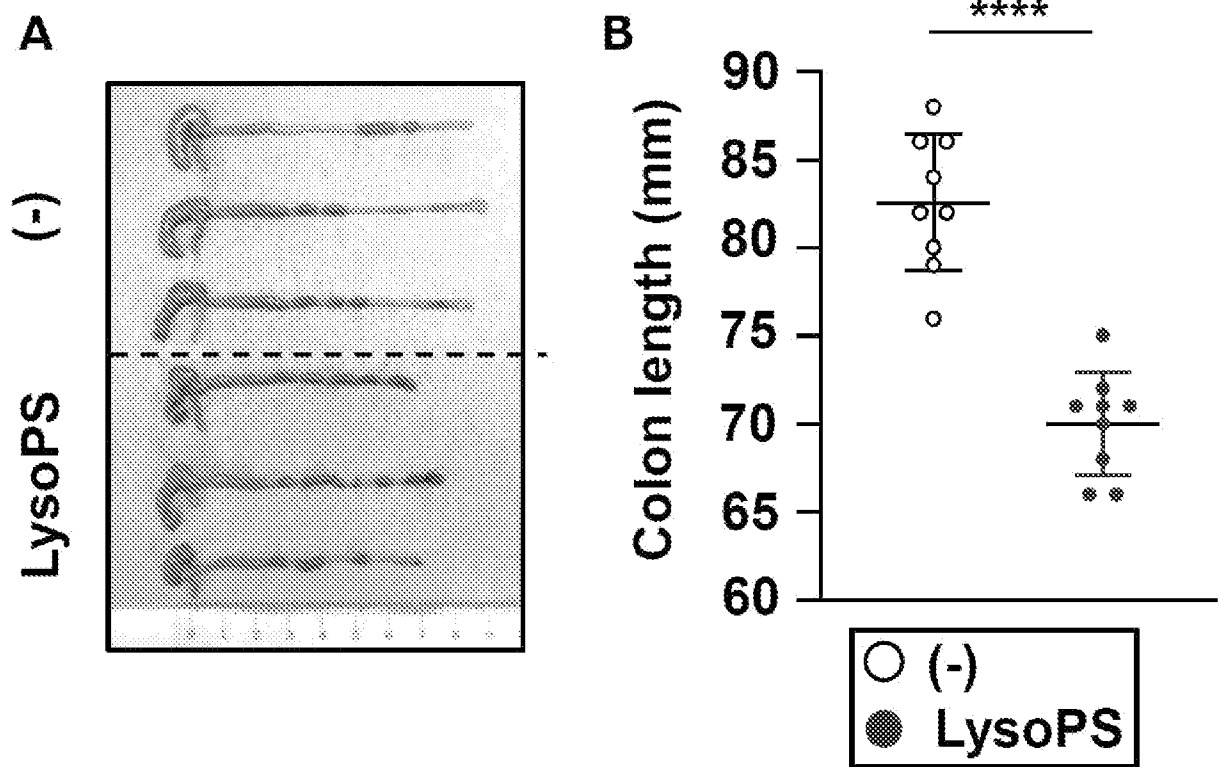
[図13]



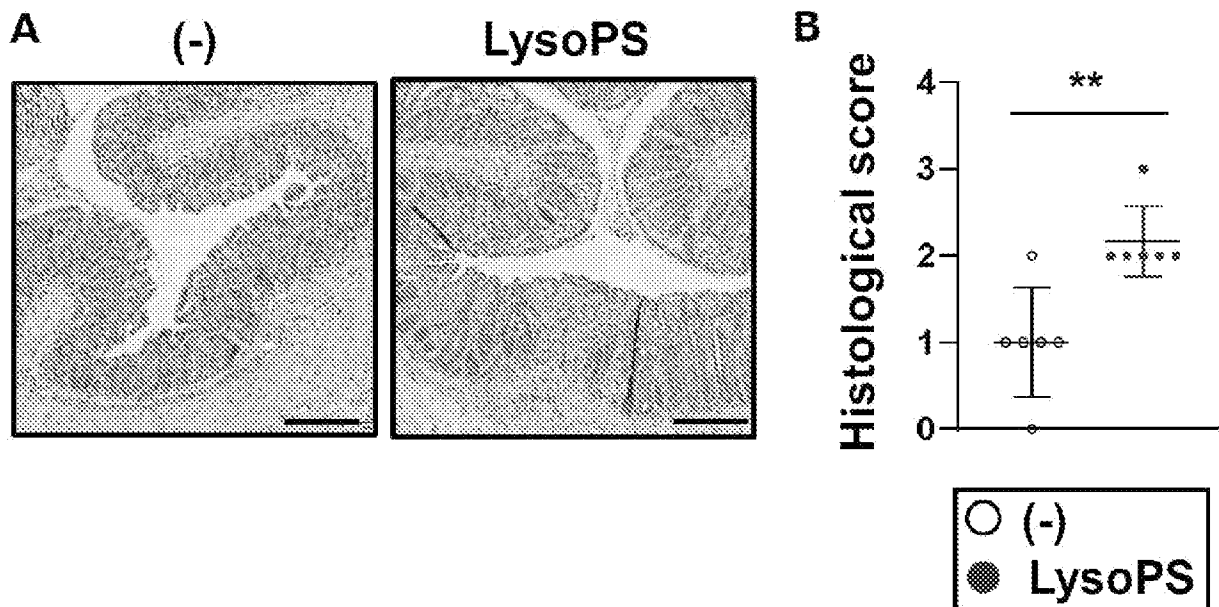
[図14]



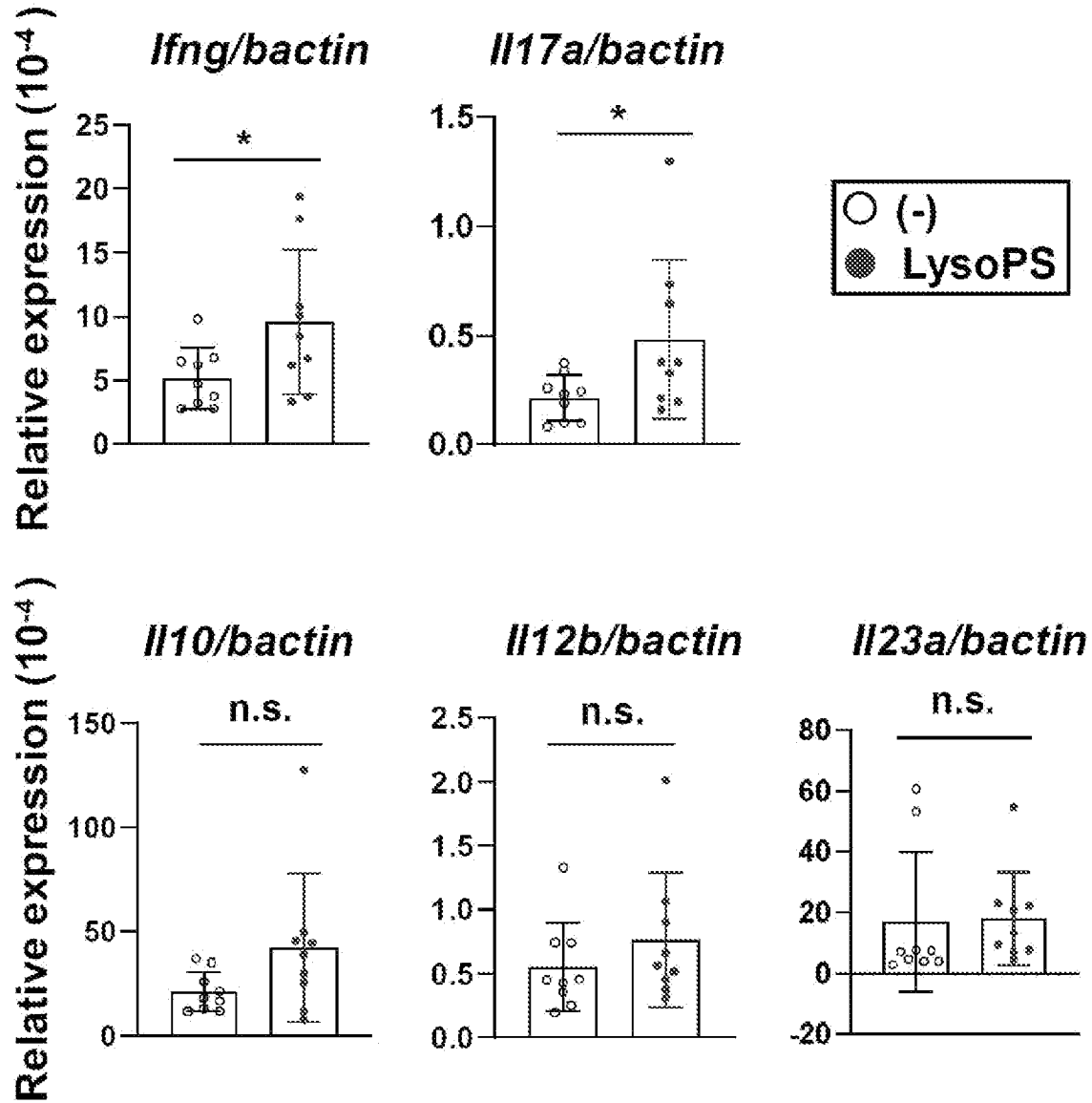
[図15]



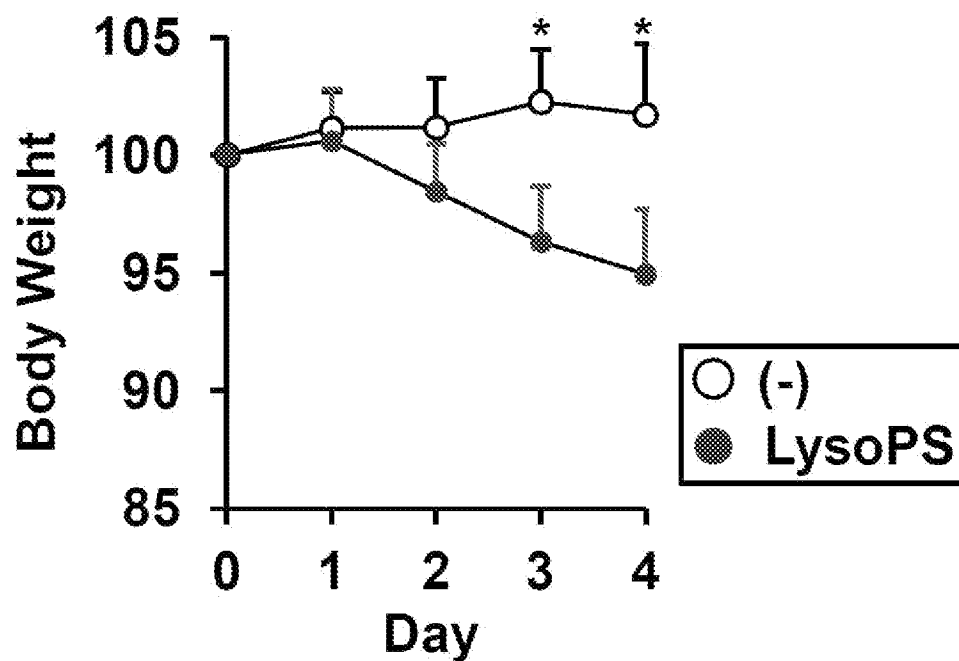
[図16]

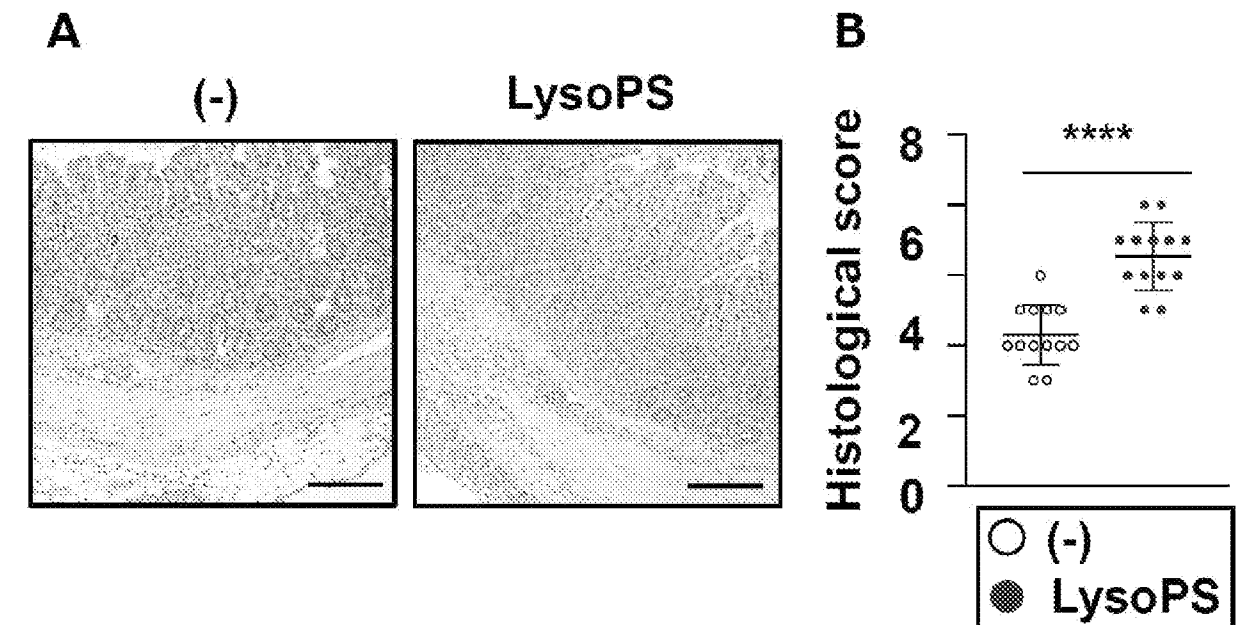
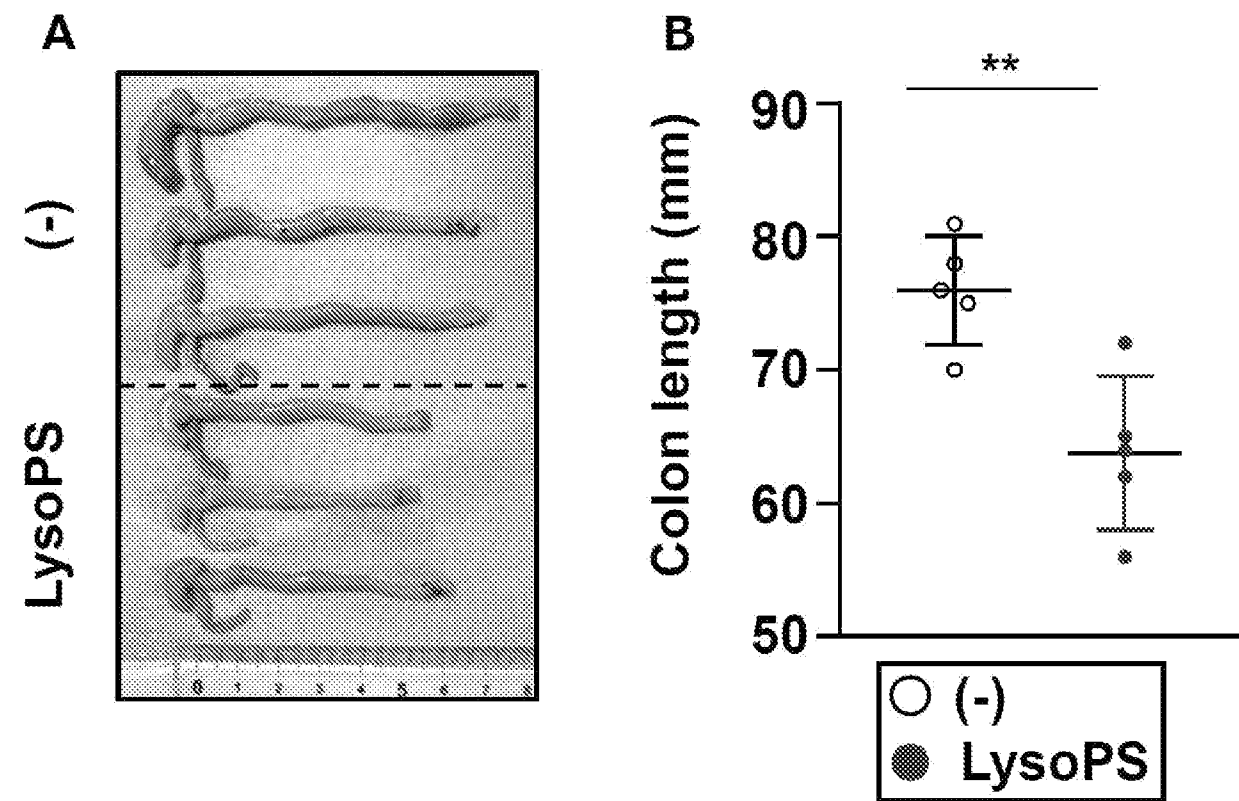


[図17]

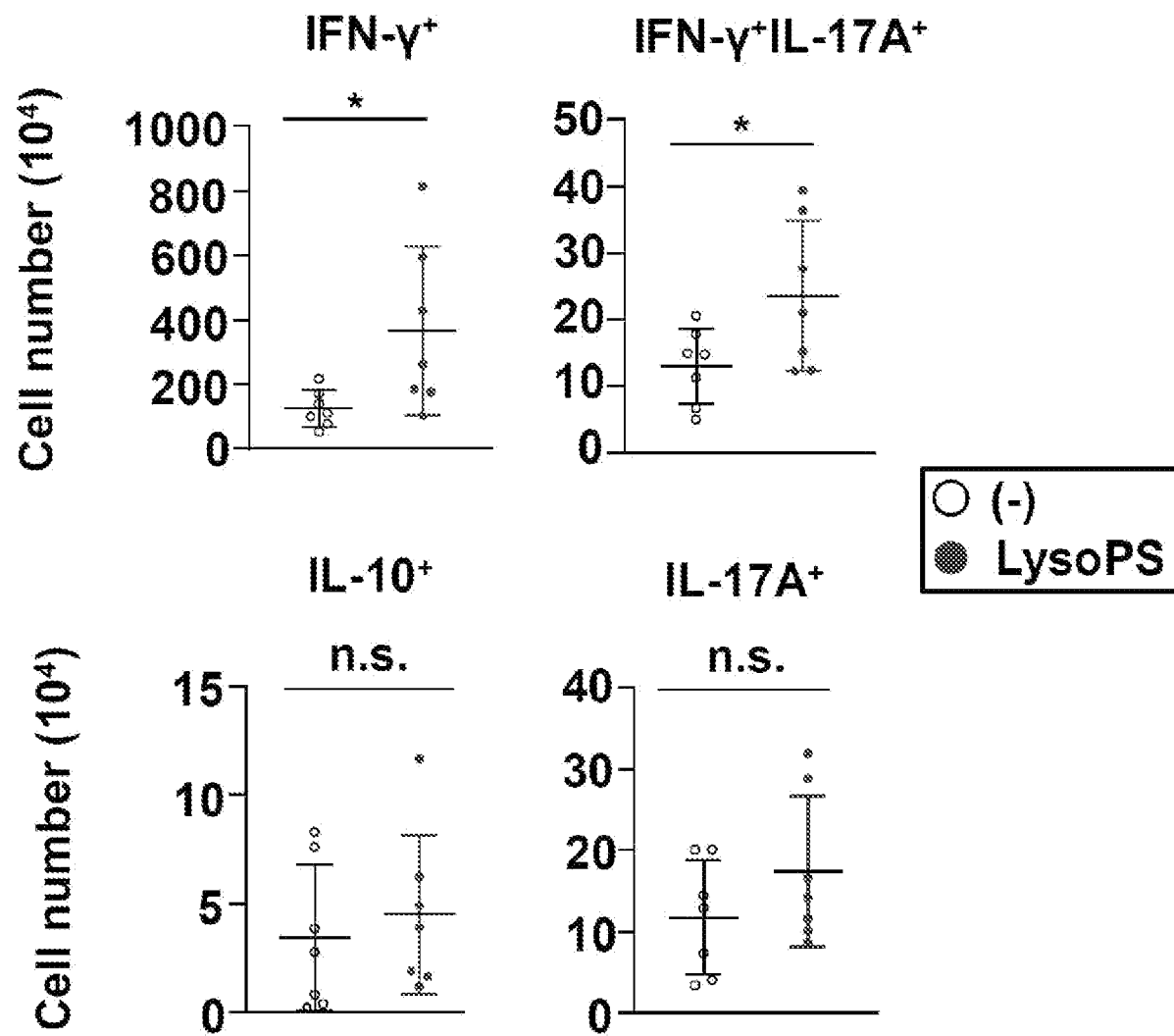


[図18]





[図21]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2022/007951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/06(2006.01)i; **A61K 45/00**(2006.01)i; **A61P 1/04**(2006.01)i; **C12N 9/16**(2006.01)i; **C12N 15/31**(2006.01)i;
C12N 15/55(2006.01)i; **C12Q 1/44**(2006.01)i; **C12Q 1/68**(2018.01)i
 FI: C12Q1/06 ZNA; C12Q1/68; C12N9/16 D; C12Q1/44; A61P1/04; A61K45/00; C12N15/31; C12N15/55

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)

C12Q1/06; A61K45/00; A61P1/04; C12N9/16; C12N15/31; C12N15/55; C12Q1/44; C12Q1/68

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 1971-2022
 Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
 Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IWATANI, S. et al., Novel mass spectrometry-based comprehensive lipidomic analysis of plasma from patients with inflammatory bowel disease, J. Gastroenterol. Hepatol., 2020, vol. 35, pp. 1355-1364 abstract, p. 1362, right column, lines 20-23, fig. 1	1, 9
Y	abstract, p. 1362, right column, lines 20-23, fig. 1	1, 7-15, 17, 19
Y	OTAKE, Y. et al., Lysophosphatidylserine deteriorates murine TNBS-induced colitis, Gastroenterology, 2019, vol. 156, issue 6, supplement 1, p. S-651, Su1893 entire text	1, 7-15, 17, 19
Y	TANG, X. et al., Gut microbiota-mediated lysophosphatidylcholine generation promotes colitis in intestinal epithelium-specific Fut2 deficiency, J. Biomed. Sci., 2021, 28:20, Published: 15 March 2021 p. 8, left column, lines 44-11, fig. 5h, 5i, table 1	1-19
Y	JP 2020-125351 A (4D PHARMA RESEARCH LTD.) 20 August 2020 (2020-08-20) paragraph [0003]	1-8, 11-19

☐ 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

19 April 2022

Date of mailing of the international search report

10 May 2022

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/JP2022/007951

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2022/007951

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2020-125351	A	20 August 2020	US 2017/0143775 A1 paragraph [0005]	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12Q 1/06(2006.01)i; A61K 45/00(2006.01)i; A61P 1/04(2006.01)i; C12N 9/16(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12Q 1/44(2006.01)i; C12Q 1/68(2018.01)i FI: C12Q1/06 ZNA; C12Q1/68; C12N9/16 D; C12Q1/44; A61P1/04; A61K45/00; C12N15/31; C12N15/55										
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）） C12Q1/06; A61K45/00; A61P1/04; C12N9/16; C12N15/31; C12N15/55; C12Q1/44; C12Q1/68										
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2022年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2022年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2022年	日本国実用新案登録公報	1996-2022年	日本国登録実用新案公報	1994-2022年
日本国実用新案公報	1922-1996年									
日本国公開実用新案公報	1971-2022年									
日本国実用新案登録公報	1996-2022年									
日本国登録実用新案公報	1994-2022年									
国際調査で利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); CAlplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)										
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	IWATANI S. et al., Novel mass spectrometry-based comprehensive lipidomic analysis of plasma from patients with inflammatory bowel disease, J. Gastroenterol. Hepatol., 2020, Vol. 35, pp.1355-1364 要約, 第1362頁右欄第20-23行, 図1	1, 9								
Y	要約, 第1362頁右欄第20-23行, 図1	1, 7-15, 17, 19								
Y	OTAKE Y. et al., Lysophosphatidylserine deteriorates murine TNBS-induced colitis, Gastroenterology, 2019, Vol. 156, Issue 6, Supplement 1, p.S-651, S1893 全文	1, 7-15, 17, 19								
Y	TANG X. et al., Gut microbiota-mediated lysophosphatidylcholine generation promotes colitis in intestinal epithelium-specific Fut2 deficiency, J. Biomed. Sci., 2021, 28:20, Published: 15 March 2021 第8頁左欄第44行-11行, 図5h, 図5i, 表1	1-19								
Y	JP 2020-125351 A (フォーディー ファーマ リサーチ リミテッド) 20.08.2020 (2020-08-20) 段落[0003]	1-8, 11-19								
☐ 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 19.04.2022		国際調査報告の発送日 10.05.2022								
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） 市島 洋介 4N 5804 電話番号 03-3581-1101 内線 3448								

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:

国際出願番号
PCT/JP2022/007951

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP2020-125351A	20.08.2020	US2017/0143775A1	
段落[0005]			