

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-523492

(P2018-523492A)

(43) 公表日 平成30年8月23日 (2018. 8. 23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6837 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6837 Z	
C 1 2 Q 1/6841 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6841	
C 1 2 Q 1/6874 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6874 Z	
G O 1 N 33/569 (2006.01)	G O 1 N 33/569	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 50 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-523366 (P2018-523366)	(71) 出願人	518024286
(86) (22) 出願日	平成28年7月21日 (2016. 7. 21)		ディシティスディーエックス インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成30年3月6日 (2018. 3. 6)		アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア ラホヤ プロスペクト ストリート 888 스위트 200
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/043295	(74) 代理人	110000796
(87) 国際公開番号	W02017/019440		特許業務法人三枝国際特許事務所
(87) 国際公開日	平成29年2月2日 (2017. 2. 2)	(72) 発明者	カプール マヌ
(31) 優先権主張番号	62/196, 508		アメリカ合衆国 92037 カリフォルニア ラホヤ プロスペクト ストリート 888 스위트 200 シー/オー
(32) 優先日	平成27年7月24日 (2015. 7. 24)		ディシティスディーエックス インコーポレイテッド
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
		最終頁に続く	

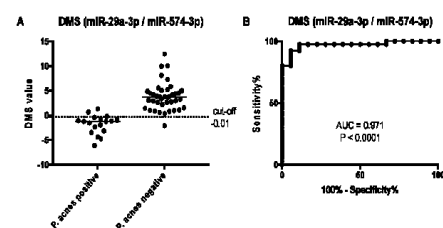
(54) 【発明の名称】 低毒性感染症の検出及び治療方法

(57) 【要約】

本発明は、患者における低毒性感染症を、真正感染症と偽陽性とを判別することによって検出する方法を提供する。本方法は、患者試料中の片利共生微生物（複数可）の存在または量を試験することを含み、特に、片利共生微生物は低毒性感染症の原因になり得るものである。片利共生微生物の試験を行うと、試料汚染が頻繁なせいで多数の偽陽性が検出されるので、これらの偽陽性と真正の慢性感染症とを判別するための試験も行われる。本発明によれば、試料からの核酸プロファイルを評価することによって、偽陽性が判別される。

【選択図】 図 6

FIGURE 6



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における低毒性感染症の検出方法であって、

低毒性感染症の原因となる片利共生微生物が患者試料中に存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験することと、

前記試料由来のRNAプロファイルを低毒性感染症を示すRNAシグニチャについて評価して、偽陽性及び/または偽陰性と真正の低毒性感染症とを判別することと

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記患者が炎症状態の症状を有する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記炎症状態の症状が、変性椎間板疾患（DDD）、慢性腰痛（CLBP）、関節もしくは軟骨の炎症、インプラントもしくは補綴に付随する炎症、心内膜炎、感染の疑いのある静脈ポートシステム、または胃潰瘍、前立腺炎、前立腺癌から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試料が軟骨、または好気性環境からの組織もしくは細胞を含む、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料が椎間板組織である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

前記患者は椎間板手術がスケジュールされている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記椎間板手術が、椎間板ヘルニアの修復、主腰椎固定手術、または主椎間板の関節形成術である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記患者が慢性腰痛（CLBP）及び/または脊椎手術後疼痛症の既往歴を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記患者が偽関節症の既往歴を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 10】

手術時に前記試料が採取される、請求項 5 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

手術に先立って前記試料が生検で採取される、請求項 5 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料の一部に *Propionibacterium acne* が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記試料中に *Staphylococcus* 種、*Corynebacterium* 種、*Lactobacillus* 種、*Pseudomonas* 種、*Enterococcus* 種、*Streptococcus* 種、*Bacillus* 種、*Citrobacter* 種、*E. coli*、*Moraxella* 種、*Haemophilus* 種、*Neisseria* 種、*Clostridium* 種、*Enterobacter* 種、及び *Klebsiella* 種のうちの 1 種以上が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 14】

前記試料の少なくとも一部が消化され、DNA が単離される、請求項 12 または 13 に記載の方法。

【請求項 15】

50

前記片利共生微生物のDNAが増幅される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記試料中の前記片利共生微生物（複数可）が、PCR、培養、免疫化学法、分光法、インサイチュ・ハイブリダイゼーションもしくはメタゲノム分析で検出または定量される、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記RNAシグニチャが、感染性臨床試料由来のRNAプロファイル及び非感染性臨床試料由来のRNAプロファイルでトレーニングされる、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記片利共生微生物の存在に対して試験結果が陽性（すなわち高含量）である臨床試料、及び前記片利共生微生物の存在に対して試験結果が陰性（すなわち低含量）である臨床試料由来のRNAプロファイル用いて、RNAシグニチャをトレーニングする、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記片利共生微生物が存在するかどうか、定量的PCRまたはシーケンシング（培養、免疫化学法、分光法もしくはインサイチュ・ハイブリダイゼーションの少なくとも1つを用いたもの）から任意選択的に選択される少なくとも2つの検出方法により判別される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記RNAシグニチャが、片利共生微生物及び非感染性細胞に感染した細胞培養からのRNAプロファイルでトレーニングされたクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記細胞培養がNP細胞である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記RNAシグニチャがマイクロRNAシグニチャである、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記RNAシグニチャが、長いノンコーディングRNAシグニチャであり、任意選択的にlncRNA、linRNAまたはT-UCRの1つ以上を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記RNAシグニチャが、小型ノンコーディングRNAを含み、任意選択的にpiRNA、snRNA、snoRNA、及びcircRNAの1つ以上を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記RNAシグニチャがmRNAシグニチャである、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記細胞が片利共生病原体にインビトロ感染する、請求項20または21に記載の方法。

【請求項27】

慢性感染症をモデリングするため、前記細胞を少なくとも1週間インビトロ感染させる、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記RNAシグニチャが、教師付き、教師無し、または半教師付きクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項1～27のいずれか1項に記載の方法。

【請求項29】

前記RNAシグニチャが、100以下のRNA、または75以下のRNA、または50

10

20

30

40

50

以下のRNA、または25以下のRNA、または10以下のRNA、または5以下のRNA、または4以下のRNAの相対的発現を含む、請求項1～28のいずれか1項に記載の方法。

【請求項30】

前記RNAシグニチャが、2つまたは3つのRNAの相対的発現を含む、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

前記RNAが、表2から選択されるmiRNAである、請求項29または30に記載の方法。

【請求項32】

前記RNAが、表4、表5、または図8から選択されたmiRNAである、請求項29または30に記載の方法。

【請求項33】

前記RNAシグニチャが、miR-29a-3p及びmiR-574-3pの一方または両方の相対的発現量を含む、請求項29～32のいずれか1項に記載の方法。

【請求項34】

手術時に陽性試料に対して局所抗生物質または消毒剤リンスが施される、請求項11に記載の方法。

【請求項35】

手術に先立って陽性試料に対して経口または局所抗生物質レジメンが投与される、請求項11に記載の方法。

【請求項36】

手術後に陽性試料に対して経口、IVまたは椎間抗生物質レジメンが投与される、請求項10に記載の方法。

【請求項37】

臨床組織試料中の片利共生微生物の低毒性感染症を検出する方法であって、前記方法が、

前記組織中のmiRNAプロファイルを検出することと、

低毒性感染症を示すmiRNAシグニチャに対して前記miRNAプロファイルを評価することと

を含み、

前記miRNAシグニチャは、少なくとも2つの検出方法で前記片利共生微生物の存在に対して陽性（すなわち高含量）である組織試料由来のmiRNAプロファイル、及び前記少なくとも2つの方法で前記片利共生微生物の存在に対して陰性（すなわち低含量）である組織試料由来のmiRNAプロファイルを用いてトレーニングされる、前記方法。

【請求項38】

前記検出方法が、核酸増幅、DNAシーケンシング、微生物培養、免疫化学法、分光法及びインサイチュ・ハイブリダイゼーションから選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

前記検出方法が定量的PCR及び微生物培養である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記RNAシグニチャが、教師付き、教師無し、または半教師付きクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項37～39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

前記RNAシグニチャが、10以下のRNA、または5以下のRNA、または4以下のRNAの相対的発現を含む、請求項37～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

前記RNAシグニチャが、2つまたは3つのRNAの相対的発現を含む、請求項41に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

前記 RNA が、表 2 から選択される miRNA である、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記 RNA が、表 4 または表 5 から選択される miRNA である、請求項 4 1 または 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記 RNA シグニチャが、miR - 29a - 3p 及び miR - 574 - 3p の一方または両方の相対的発現量を含む、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記患者が、慢性腰痛 (CLBP)、関節もしくは軟骨の炎症、インプラントもしくは補綴に付随する炎症、心内膜炎、感染の疑いのある静脈ポートシステム、または胃潰瘍から選択される炎症状態を有する、請求項 3 7 ~ 4 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 4 7】

前記試料が軟骨、または好気性環境からの組織もしくは細胞を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記試料が椎間板組織である、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記患者は椎間板手術がスケジュールされている、請求項 4 8 に記載の方法。

20

【請求項 5 0】

前記椎間板手術が、椎間板ヘルニアの修復、主腰椎固定手術、または主椎間板の関節形成術である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記患者が慢性腰痛 (CLBP) 及び / または脊椎手術後疼痛症の既往歴を有する、請求項 4 6 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記患者が偽関節症の既往歴を有する、請求項 4 6 ~ 5 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 3】

手術時に前記試料が採取される、請求項 3 7 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 5 4】

手術に先立って前記試料が生検で採取される、請求項 3 7 ~ 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記試料中に *Propionibacterium acne* が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を更に試験する、請求項 3 7 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記試料中に *Staphylococcus* 種、*Corynebacterium* 種、*Lactobacillus* 種、*Pseudomonas* 種、*Enterococcus* 種、*Streptococcus* 種、*Bacillus* 種、*Citrobacter* 種、*E. coli*、*Moraxella* 種、*Haemophilus* 種、*Neisseria* 種、*Clostridium* 種、*Enterobacter* 種、及び *Klebsiella* 種のうちの 1 種以上が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項 3 7 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 5 7】

前記試料の一部が消化され、DNA が単離される、請求項 4 7 または 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 8】

DNA が増幅される、請求項 5 7 に記載の方法。

50

【請求項 59】

前記試料中の前記片利共生微生物（複数可）が、PCR、培養、免疫化学法、分光法、インサイチュ・ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、及びメタゲノム分析の1つ以上で検出または定量される、請求項55～58のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 60】

前記試料中に前記片利共生病原体が存在するかどうかの他の技法では試験されない、請求項37に記載の方法。

【請求項 61】

前記試料中に前記片利共生病原体が存在するかどうかのPCR及び/または培養では試験されない、請求項37に記載の方法。

10

【請求項 62】

手術時に陽性試料に対して局所抗生物質または消毒剤リンスが施される、請求項37に記載の方法。

【請求項 63】

手術に先立って陽性試料に対して経口または局所抗生物質レジメンが投与される、請求項37に記載の方法。

【請求項 64】

手術後に陽性試料に対して経口、IVまたは椎間抗生物質レジメンが投与される、請求項37に記載の方法。

【請求項 65】

低毒性感染症の治療方法であって、低毒性感染症を有すると判定された患者に抗生物質を投与することを含み、前記低毒性感染症が、前記部位からの細胞中のRNAシグニチャの存在によって検出され、前記RNAシグニチャが低毒性感染症を示す、前記方法。

20

【請求項 66】

前記患者において前記片利共生微生物が存在することが、任意選択的にPCR、培養、または顕微鏡検査のうちの1つ以上で、低毒性感染症の症状を呈する部位から採取された試料中に検出される、請求項65に記載の方法。

【請求項 67】

前記抗生物質が局所的に前記部位に投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項 68】

前記抗生物質が全身的に投与される、請求項67に記載の方法。

30

【請求項 69】

前記RNAシグニチャは、少なくとも2つの検出方法で前記片利共生微生物に対して陽性である組織試料由来のRNAプロファイル、及び前記少なくとも2つの方法で前記片利共生微生物に対して陰性である組織試料由来のRNAプロファイルを用いてトレーニングする、請求項65～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 70】

前記検出方法が、核酸増幅、DNAシーケンシング、微生物培養、免疫化学法、分光法及びインサイチュ・ハイブリダイゼーションから選択される、請求項69に記載の方法。

40

【請求項 71】

前記検出方法が定量的PCR及び微生物培養である、請求項70に記載の方法。

【請求項 72】

前記RNAシグニチャが、教師付き、教師無し、または半教師付きクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項65～71のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 73】

前記RNAシグニチャが、10以下のRNA、または5以下のRNA、または4以下のRNAの相対的発現を含む、請求項65～71のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 74】

前記RNAシグニチャが、2つまたは3つのRNAの相対的発現を含む、請求項73に

50

記載の方法。

【請求項 75】

前記RNAが、表2から選択されるmiRNAである、請求項73または74に記載の方法。

【請求項 76】

前記RNAが、表4または表5から選択されるmiRNAである、請求項73または74に記載の方法。

【請求項 77】

前記核酸シグニチャが、miR-29a-3p及びmiR-574-3pの一方または両方の相対的発現量を含む、請求項65に記載の方法。

10

【請求項 78】

前記患者が、慢性腰痛(CLB P)、関節もしくは軟骨の炎症、インプラントもしくは補綴に付随する炎症、心内膜炎、感染の疑いのある静脈ポートシステム、または胃潰瘍から選択される炎症状態の症状を有する、請求項65～77のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 79】

前記試料が軟骨、または好気性環境からの組織もしくは細胞を含む、請求項78に記載の方法。

【請求項 80】

前記試料が椎間板組織である、請求項65に記載の方法。

【請求項 81】

20

前記患者は椎間板手術がスケジュールされている、請求項80に記載の方法。

【請求項 82】

前記椎間板手術が、椎間板ヘルニアの修復、主腰椎固定手術、または主椎間板の関節形成術である、請求項81に記載の方法。

【請求項 83】

前記患者が慢性腰痛(CLB P)及び/または脊椎手術後疼痛症の既往歴を有する、請求項78～82のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 84】

前記患者が偽関節症の既往歴を有する、請求項78～83のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 85】

手術時に前記試料が採取される、請求項78～83のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 86】

手術に先立って前記試料が生検で採取される、請求項78～83のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 87】

前記試料中にPropionibacterium acneが存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を更に試験する、請求項65～86のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 88】

前記試料中にStaphylococcus種、Corynebacterium種、Lactobacillus種、Pseudomonas種、Enterococcus種、Streptococcus種、Bacillus種、Citrobacter種、E.coli、Moraxella種、Haemophilus種、Neisseria種、Clostridium種、Enterobacter種、及びKlebsiella種のうちの1種以上が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項65～87のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 89】

前記試料の一部が消化され、DNAが単離される、請求項87または88に記載の方法。

【請求項 90】

50

前記片利共生微生物のDNAが増幅される、請求項89に記載の方法。

【請求項91】

前記試料中の前記片利共生微生物（複数可）が、PCR、培養、免疫化学法、分光法、インサイチュ・ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、及びメタゲノム分析の1つ以上で検出または定量される、請求項87～90のいずれか1項に記載の方法。

【請求項92】

手術時に陽性試料に対して局所抗生物質が施される、請求項65に記載の方法。

【請求項93】

手術に先立って陽性試料に対して経口または局所抗生物質レジメンが投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項94】

手術後に陽性試料に対して経口、IVまたは椎間抗生物質レジメンが投与される、請求項65に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権

本出願は、2015年7月24日に出願された米国仮特許出願第62/196,508号の優先権の利益を主張するものであり、その全容は、本明細書において参照により援用される。

【背景技術】

【0002】

ヒト身体は、その内部で数千もの微生物種が人体と絶えず相互作用している超個体である。2014年3月の時点で、Genomes Onlineデータベースには、ヒト身体内に検出された細菌ゲノム（完成し且つ発行された2,723種、ならびに進行中の少なくとも14,867種）が列挙されている。数々の研究によって、以前には未知であった数千もの微生物がヒト組織及び血液中に存在することが、明らかにされている。実際に、以前は無菌であると考えられていた環境において、多菌性及び慢性病原体が検出されるようになった。結果として、一連の身体及び神経の炎症性疾患は微生物叢組成のシフトに付随したものであると、昨今では考えられるようになってきている。例えば、ヒト皮膚の常在菌であるPropionibacterium acnes（P.acnes）などの片利共生細菌が、慢性腰痛及び椎間板疾患に関連する低毒性感染症をはじめとする低毒性感染症を引き起こす可能性のあることを示唆する証拠が存在している。

【0003】

病原体によっては、（例えば、片利共生病原体）は、培養技術またはPCRなどの分子技術で、生物学的組織において検出される可能性もあるが、診断目的に用いられる標準の条件下では、微生物の圧倒的大多数が培養不可能である。更に、疑わしい病原体が、或る宿主組織内に遍在する片利共生微生物である場合は試料の汚染が原因で、特に分子検出アッセイを用いたときに、偽陽性の存在率が許容できないほど高くなる。

【0004】

本発明は、真正感染症と偽陽性とを判別することによって、信頼でき且つ費用効果的な医療ケアを支持することを含む、低毒性感染症（例えば、片利共生病原体による感染）を同定する方法を提供する。本発明は更に、椎間板疾患または慢性腰痛に付随する感染症を含む、低毒性感染症の治療方法を提供する。本発明の他の目的は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。

【発明の概要】

【0005】

一態様において、本発明は、患者試料中の片利共生病原体の存在を判別し、片利共生微生物による慢性感染症例と偽陽性症例とを判別する（例えば、感染症と片利共生微生物叢による試料汚染とを判別する）ことによって、低毒性感染症を同定する方法を提供するも

10

20

30

40

50

のである。これらの実施形態において本発明は、椎間板感染症などの低毒性感染症の診断に有用である。例えば、微生物学的な培養、DNA分析、免疫化学法、及び顕微鏡検査のうちの1つ以上によって、片利共生微生物叢に対する試験結果が陽性であった試料を宿主細胞のRNAシグニチャに対して評価し、（それにより低毒性感染症を確認して）偽陽性を除外する。続いて、外科医または治療医は、低毒性感染症に罹患していると同定された患者に対し、適切な治療薬を投与できる。

【0006】

他の態様において、本発明は、（例えば、P. acnesによる）低毒性感染症に対して陽性（高感受性且つ特異性）である試料と低毒性感染症に対して陰性である試料とを判別するmiRNAシグニチャを提供する。これらの試験を、分子アッセイ、微生物培養、及び試料の鏡検による分析と併用することによって、偽陽性を判別することもできるし、あるいは、一部の実施形態では、これらを独立に使用することによって陽性試料を同定することもできる。P. acnes感染症に関する例示的なmiRNAスコアは、miR-29a-3p及びmiR-574-3pに対する相対的発現量をスコアすることによって算出できる。次式に基づく診断miRNAスコア(DMS)は、検証研究において精度が95%に達し、陽性試料のスコアは-0.01に等しいかまたはそれ未満であった。

$$DMS = 18.71 - 11.24 * \log_{10}(miR-29a-3p) + 10.4 * \log_{10}(miR-574-3p)。$$

【0007】

P. acnes（もしくは他の片利共生微生物）に対して陽性（すなわち高含量）である試料、及びP. acnesに対して試験結果が陰性（すなわち低含量）である試料に由来するRNAプロファイルから、他のRNAシグニチャがトレーニングされる場合がある。例えば、定量的PCR及び少なくとも1つの他の技法（微生物培養、免疫化学法または分光法など）による片利共生微生物の検出（または検出レベル）に基づいて、試料同士をビンニングする場合もある。

【0008】

さまざまな実施形態では、試料中の宿主細胞のコーディング及び/またはノンコーディングRNAのプロファイルを診断試験で使用することによって、低毒性感染症と非感染試料との判別（また、更に一部の実施形態では偽陽性との判別）を行う。慢性低毒性感染症は、それらの低悪性度の感染症によって引き起こされる炎症反応は局所レベル且つ最小限のものにすぎないが、宿主組織のRNAプロファイル（例えば、mRNAまたはmiRNAプロファイル）により判別できる。

【0009】

本発明は、術後医療ケア導入時に外科試料に適用することも、あるいは術前治療導入時に生検試料に適用することも可能であるし、且つ/あるいは低毒性感染症の治療によって高侵襲性手技の必要性を減ずることも可能である。

【0010】

別の態様において、本発明は、低毒性感染症の治療方法を提供する。さまざまな実施形態において、本方法は、全身的に投与される抗生物質で、または局所的に投与される抗生物質もしくは消毒剤で、低毒性感染症を治療することを含む。低毒性感染症は、本明細書中に記載されている方法に従って同定できる。

【0011】

本発明の他の態様及び実施形態は、以下の詳細な説明から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】変性椎間板疾患の説明図が提供されている。

【図2】患者の椎間板手術がスケジュールされ、且つ手術部位から椎間板試料が採取される、本発明の実施形態に関するフローチャートである。試料に対する診断試験（PCRアッセイなど）を実施することによって、試料中の片利共生病原体の存在もしくは不在の検出、または定量を行う。試料が片利共生病原体に対して陽性である場合は、miRNAプ

10

20

30

40

50

ロファイルの実行によって、偽陽性（汚染）と真正感染症とを判別する。低毒性感染症が確認された場合、患者にさらなる治療（例えば、経口、静脈もしくは椎間抗生物質、局所消毒剤治療、または更なる外科的治療）を薦める。

【図3】ヒト椎骨及び椎間板（IVD）の概略図である。（a）腰椎の側面図である。（b）AF薄板を部分的に除去し、前方角度から見たIVDである。（c）隣接する2つの脊椎と、典型的動作を示す座標系に介在するIVDと、からなる脊髓部分である。

【図4】*P. acnes* 陽性及び陰性の椎間板組織内で、それぞれ異なる様式で発現したマイクロRNA（*miR-574-3p*、*miR-29a-3p*、*miR-497-5p*、*miR-29c-3p*及び*miR-99b-5p*）の正規化発現量を示す。

【図5】基準*P. acnes* 陽性例及び陰性例について計算された、診断*miRNA*スコア（DMS）値を示す。*P. acnes* 陽性のカットオフDMS値は、 -0.01 である（左パネル）。DMS値のROC分析は、*P. acnes* 含量の多い症例（培養及びリアルタイムPCR）と陰性例とを、DMSが強力に判別できることを示している（右パネル）。

【図6】基準*P. acnes* 陽性例及び陰性例の独立検証について計算されたDMS値を示す（左パネル）。DMS値のROC分析は、*P. acnes* 含量の多い症例（培養及びリアルタイムPCR）と陰性例とを、DMSが強力に判別できることを示している（右パネル）。

【図7】コアグラゼ陰性の*Staphylococci*に対して陽性の培養物を含む椎間板組織が、*P. acnes* 陰性試料に特徴的なDMS値（ $DMS > -0.01$ ）を有することを示している。

【図8】*P. acnes* 含量の多い椎間板組織内で脱調節された*miRNA*の配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

一態様において、本発明は、患者における低毒性感染症を、例えば、真正感染症と偽陽性及び偽陰性を含む非感染試料とを判別することによって検出する方法を提供する。一部の実施形態において、本方法は、患者試料中の片利共生微生物（複数可）の存在または量を試験することを含む。片利共生微生物の試験を行うと、試料汚染が頻繁なせいで多数の偽陽性が検出されるので、これらの偽陽性と真正の慢性感染症とを判別するための試験も行われる。本発明によれば、試料由来のRNAプロファイル（コーディングRNAまたはノンコーディングRNAのいずれか）、例えばmRNAまたは小型RNA（*miRNA*等）のプロファイルを評価することによって、偽陽性を判別する。本明細書に記載されているように、慢性低毒性感染症は、それらの低悪性度の感染症によって引き起こされる炎症反応は局所レベル且つ最小限のものにすぎないが、宿主組織/細胞のRNAプロファイルにより判別できる。

【0014】

本明細書において用いられている「低毒性感染症」という用語は、片利共生微生物に関連する慢性の低悪性度感染症である。例示的な片利共生微生物としては、宿主組織試料中に分子的に検出できる片利共生生物、または実験室の培養で特定できる片利共生生物のいずれかが挙げられ、限定されるものではないが、*Propionibacterium*種（*P. acnes*）*Staphylococcus*種（例えば、*coagulase*陰性*Staphylococcus*、または*Staphylococcus aureus*または*Staphylococcus epidermidis*）、*Corynebacterium*、*Lactobacillus*種、*Pseudomonas*種（例えば、*Pseudomonas aeruginosa*）、*Enterococcus*種、*Streptococcus*種（例えば、*S. pneumoniae*）、*Bacillus*種（例えば、*Bacillus cereus*）、*Citrobacter*種、*E. coli*、*Moraxella*種、*Haemophilus*種、*Neisseria*種、*Clostridium*種、*Enterobacter*種、及び*Klebsiella*種が挙げられ

る。一部の実施形態では、片利共生微生物は、培養するのが困難かまたは培養不可能である。一部の実施形態では、微生物は、バイオフィーム形成表現型を有する。

【0015】

一部の実施形態において、本方法は、患者試料中の *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) を検出または定量することを含む。*P. acnes* は、皮膚、口腔及び胃腸管ならびに尿生殖器官の正常常在微生物の一部を形成する、グラム陽性の耐気性嫌気性菌である。*P. acnes* は、インプラント感染、椎間板炎、筋骨格病態（例えば、骨炎、骨髄炎、滑膜炎 - ゴーグ（*acne*） - 膿疱症 - 骨化症 - 骨炎（*SAPHO*）症候群）、サルコイドーシス、慢性前立腺炎及び前立腺癌をはじめとする多様な感染症ならびに病態に関連づけられている、日和見病原体でもある。

10

【0016】

一部の実施形態において、本方法は、試料中の片利共生及び／または病原体微生物含量の、相対的もしくは絶対的に多いかどうかの判別等、試料の微生物叢組成を判別することを含む。試料の微生物叢組成は、例えば、*rRNA* シークエンシング（例えば、*16S rRNA* シークエンシング）によって判別できる。

【0017】

低毒性感染症は、いくつかある慢性病態のいずれかを引き起こす原因または要因となりうる。本発明は、低毒性感染症の疑いがある任意の慢性病態に適用できる。ゆえに、一部の実施形態において、患者は、慢性腰痛（*CLBP*）、関節もしくは軟骨の炎症、インプラントもしくは補綴に付随する炎症、心内膜炎、感染の可能性のある静脈ポートシステム、または胃潰瘍から選択される病態を有する。患者は、ヒトまたは動物患者でありうる。概して、試料は、低毒性感染症の疑いがある、炎症もしくは損傷のある組織の外科試料または生検試料である。一部の実施形態において、試料は、コロニー形成され易い部位、または嫌気性片利共生細菌による感染に罹り易い部位から採取されたものである。

20

【0018】

一部の実施形態において、患者は、構造上の椎間板損傷及び／または低毒性感染症と一致する、慢性腰痛を有する。一部の実施形態において、患者は、椎間板手術候補になりうると共に、椎間板手術のスケジュールを組まれる場合がある。低毒性感染症に罹患した患者は、適正な診断及び適切な治療を受けない限り、*CLBP* を発症するリスクが高まる場合もあれば、且つ／あるいは「脊椎手術後疼痛症」になるおそれもある。例えば、椎間板手術を受ける患者のなかには、手術を必要とする急性症状を患う前に、*CLBP* をも患うことになる患者もいる。また、椎間板手術を受けた患者で、フォローアップにおいて *CLBP* を発症する患者は、或る比率（約 5 ~ 10 %）に達しており、時には「脊椎手術後疼痛症」患者または「椎間板切除後症候群」と呼ばれることもある。これらの病態は、統計的に低毒性感染症に関連する。

30

【0019】

椎間板炎は、臨床的に明らかになるのがきわめて速やかな場合もあれば、適切な診断方法によってごく容易に診断される場合もあり、あるいは「低悪性度」の「くすぶり」感染症に一変する可能性もある。この感染症は、或る変性プロセスと判別するのが極端に困難な場合もあれば、また、脊髄の疼痛を引き起こすおそれもある。第 1 の症例では、明らかな局所症状及び全身症状を伴ういわゆる「化膿感染」に帰結することにもなりかねない。そのような「高悪性度」の感染症は、敗血症に進展することもしばしばであり、無処置のまま放置された場合は、敗血症ショックを起こすことさえある。第 2 の症例において、臨床的特徴は、全身性反応を伴わない局所的疼痛といったような、比較的軽度で且つ非特異的なものでありうる。そのような現象はまた、肩、殿部、及び膝関節の関節形成術後の人工関節周囲の感染症との関連において公知である。特に、罹患患者におけるそのような低悪性度の感染症、症状、及び愁訴は、典型的に感染に関連するものというよりも寧ろ、変性または機械的な脊髄の問題を伴うものに類する傾向がある。核脱水及び環状亀裂などの退行性変化が先在する *IVD* の場合、健康な *IVD* とは対照的に、低毒性感染症薬を使用した場合にコロニーを形成する傾向が強くなるので、このことが特に当てはまる。

40

50

【0020】

ゆえに、一部の実施形態において、患者は、椎間板疾患を有する。例えば、試料は、手術中に採取される椎間板切除物でありうる。更に他の実施形態では、患者の椎間板手術をスケジュールし、手術に先立って試験用の細針生検試料を分離する。例示的な椎間板手術としては、椎間板ヘルニア修復手術、主腰椎固定手術、または主椎間板関節形成術が挙げられる。これらの実施形態において、本発明は、椎間板組織において1つ以上の片利共生病原体（例えば、*P. acnes*）が存在するかどうか、及び/または低毒性感染症を示すRNAシグニチャが存在するかどうかの分析を伴う。

【0021】

一部の実施形態では、本発明は、微生物の培養、または遺伝学的、免疫化学的もしくは分光学的分析による、椎間板組織試料中の片利共生病原体（複数可）（例えば、*P. acnes*）の検出または定量を伴う。本発明は、RNA（例えば、miRNA）を評価して、プロファイル、低毒性感染症を示すプロファイルまたは低毒性感染症を示さないプロファイルとして分類することを更に含む。一部の実施形態では、RNAプロファイルを独立に評価することによって（つまり、PCR、培養または顕微鏡検査などの他の技法を使用することなしに）、低毒性感染症が存在するかどうかを判別される。

【0022】

一部の実施形態では、種を好氣的及び/もしくは嫌氣的に培養し、且つ以後に生化学的及び分光的に（例えば、MALDI-TOF MS）同定することを含む培養によって、片利共生微生物が存在するかどうかを評価する。例えば、組織試料を滅菌条件下で処理してから、（例えば、滅菌済の生理食塩水中で）均質化することによって処理することもできる。均質化技法としては、殺菌済の海砂を実験用乳鉢すなわちStomacher（Seward, UK）に入れてすりつぶすことを含む、多様な技法を利用できる。均質化試料が好気性培養物及び嫌気性培養物の寒天表面上に接種される。例えば、好気性培養では、ヒツジ血液（CBA製）7%をコロンビア血液寒天（Oxoid製）に添加して使用でき、嫌気性培養ではヒツジ血液7%及びビタミンK（WCHA製）をWilkins Chalgren Anaerobic Agar（Hi Media製）に添加して使用できる。接種されたWCHAプレートを、37℃にて嫌氣的に（窒素80%、CO₂10%、及びH₂10%）、最小限14日間インキュベートする。CBAプレートを、37℃にて約7日間、好氣的にインキュベートする。一部の実施形態では、均質化組織の一部分を、プロス（例えば、VLプロス（Merck製）10ml）が入っている試験管に移し、その後、滅菌パラフィン油で覆って酸素の出入を防ぎ、37℃にて約7日間インキュベートし、好気状態にて37℃で最小限7日間WCHAに接種する。微生物が増殖した徴候が現れたら、そのような管の中身を、CBA及びWCHAに接種して、上記のようにインキュベートする。

【0023】

得られた分離株をWCHAプレート（嫌気性雰囲気にて7日間のインキュベーション）、及びCBA（好気性雰囲気にて1日のインキュベーション）で継代培養することにより、今後の分析に備えて、別個のコロニーを得ることができる。分離株は、増殖特性、コロニー形態、グラム蛍光色素、及び試験カタラーゼにより特徴づけることができる。推定*P. acnes*分離株は、例えば、Rapid ID ANA II System（Remel）またはMALDI-TOF MS（microflex（商標）LT MALDI-TOF MS System+ソフトウェア+バクテリアスペクトルライブラリ、Bruker Corp）を使用した生化学的分析によって同定できる。

【0024】

分子分析用の試料は、新鮮な組織試料としてもよいし、あるいは、例えばFFPE試料としてまたは他の保存技術で保存することもできる。一部の実施形態では、試料を分子分析用に、手術後もしくは生検後約24時間、または手術後もしくは生検後約48時間、または約72時間、または96時間、保存あるいは処理する。

【0025】

遺伝子分析に備えて、分析対象の試料から核酸（例えば、DNA及び/またはRNA）を単離する。多量の軟骨（例えば、関節もしくは椎間板組織）が試料に含まれる一部の実施形態では、試料を、コラーゲナーゼ（例えば、コラーゲナーゼA）及び/またはプロテイナーゼ（例えば、プロテイナーゼK）あるいは細胞外基質の分解に有用な他の酵素で消化することによって処理する。

【0026】

更に他の実施形態では、免疫化学法（例えば、免疫組織化学染色またはELISA）を使用して、片利共生生物のタンパク質エピトープを検出する場合がある。保存済または新鮮な組織試料に対して、免疫組織化学染色を行うことができる。例えば、P. acnes に対するモノクローナル抗体を使用でき、限定されるものではないが、細胞膜に結合した

10

【0027】

陽性試料を同定する際には、組織試料の鏡検などの他の技法を使用することもできるし、適切な染色試薬（例えば、グラム染色もしくは蛍光インサイチュ・ハイブリダイゼーション（FISH））または対象となる片利共生微生物に特異的な他の免疫試薬を使用することもできる。一部の実施形態では、顕微鏡検査を使用して、細胞内の細菌を同定する。組織内のP. acnesの明視化に関するFISHの応用例は、Alexeyev OA, et al. Direct visualization of Propionibacterium acnes in prostate tissue by multicolor fluorescent in situ hybridization assay. J Clin Microbiol. 2007 Nov; 45(11): 3721-8に記載されている。

20

【0028】

一部の実施形態では、細胞内の細菌の核酸を含みうる椎間板（IVD）組織から核酸を単離する。IVDは、脊髄の主要な運動関節であって、横断面内で腎臓の形に類する外観をしており、中央のゼラチン状髄核（NP）、このNPを円周方向に囲繞する膠原性線維輪（AF）、ならびにAF及びNPを椎体から隔てている軟骨終板（CEP）の、3つの異なる構造からなる（図3B及びB）。椎骨または骨の終板と称される、椎体のIVD側の境界部は、半多孔性の肥厚海綿骨の層から構成され、CEPと共に終板（EP）を形成

30

【0029】

IVDの99.5%は、細胞外基質で占められる。NP、AF及びCEPは、基本的な生化学的成分が同じ、つまり、水、プロテオグリカン（PG）及びコラーゲンであるが、それらの相対的比率は異なる。IVDの主要PGはアグリカンであり、アグリカンは、最高100個のケラチン及びコンドロイチン硫酸が共有結合されているコアタンパク質からなる。これらは、強い負電荷を持つグリコサミノグリカン（GAG）であり、水を吸収して、組織に対し（特に、高次に水和されたNPに対し）粘弾性挙動を与える。I型及びI型コラーゲンは、総IVDコラーゲンのおよそ90%を構成している。コラーゲン繊維は、NP内では不規則に配向され、AF内では、単方向的に整列配置された10~25個の薄板に編成される。これらの薄板は、内側ゾーンではNPを囲繞し且つCEPに付着する一方、外側ゾーンでは椎骨の終板に付着する（図3B）。IVD内で最も含量の多い非構造タンパク質は、MMP（マトリックス・メタロプロテイナーゼ）ならびにADAMTS（トロンボスポンジン・モチーフを有するディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ）の系統群である。これらは、亜鉛に依存するプロテイナーゼであり、ECMのほとんど全ての成分を開裂しうる。

40

【0030】

IVDの細胞は、細胞外基質（「ECM」）を合成し、維持する。これらの細胞によっ

50

て、ECMの合成と分解のホメオスタシスが制御される。他の組織と比較して、広範なECMの維持を司る細胞が比較的少ないせいで、ECMタンパク質の代謝回転には数か年を要する結果となっている。NP及びAF内では、脊索細胞（NC）、NP細胞及びAF細胞の、3種類の主要な細胞が判別される。NCは、胎生期脊索からの残存物であり、主たるNPを構成している。小児期初期に、NCはNP細胞で置き換えられる。AF細胞及びNP細胞は、間葉起源のものであり、これら両細胞の遺伝子形質発現プロファイルによれば、AF細胞は線維細胞であり、NP細胞は軟骨細胞である。AF細胞はI型コラーゲンを、NP細胞はアグリカン及びII型コラーゲンを、主要な構造タンパク質として合成する。3つの細胞型のいずれもが維持している細胞周囲基質は、軟骨細胞のコンドロロンに類するが、その組成は細胞間基質とは異なっている。

10

【0031】

本発明の実施形態に従って、NPの細胞から片利共生病原体を培養することも、あるいは遺伝学的分析用に核酸を単離することも、あるいはNPの細胞を細菌性抗原に対して評価することもある。

【0032】

一部の実施形態では、炎症を起こした組織から採取された細胞において、片利共生病原体の存在が検出される。例えば、P. acnesが細胞内に存在することは、P. acnesが宿主内に長期にわたって持続することを裏付けるものであり、結果として慢性炎症状態を引き起こしかねない。

【0033】

一部の事例では、細菌培養を成就させようという試みが、諸々の理由から失敗する可能性がある。その典型的な理由としては、(1)整形外科関連のバイオフィームによる感染が、多くの場合、培養陰性であること[Achermann Y, et al.]「Propionibacterium acnes: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen」Clin Microbiol Rev 2014; 27: 419-40」、(2)試料の採取に先立って抗菌治療を開始したこと、(3)生検では、十分な組織/コロニー形成ユニット(CFU)が産生されなかったこと、(4)病巣の末梢/非代表的区域から生検材料を採取したこと、(5)(結核、他の細胞内の病原体、及び特定の嫌気性細菌または真菌の症例によくあるように)特異的な感染体には培養培地が不適切であること、(6)ラボで検体を処理するまでの輸送条件が不適切で遅延が発生したこと、(7)ラボの条件下では(例えば、結核の)増殖率がきわめて低いこと、ならびに(8)微生物学的ラボ内では培養物が繁殖不能に見え、嫌気性菌を探すことに十分な時間をかけてインキュベートせずに、時期早尚に棄ててしまうことが挙げられる。そのほか、微生物学的診断(とりわけ、低悪性度の椎間板感染症は、しばしば嫌気性菌に起因するため)、この診断を確定するのに失敗した場合、さまざまな原因が考えられる。

20

30

【0034】

一部の実施形態では、(培養の代わりに、もしくは培養に加えて)微生物核酸のハイブリダイゼーションまたは増幅により、片利共生病原体の存在もしくは濃度が定量される。例えば、検出アッセイとしては、リアルタイム・ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)エンドポイントPCR、マイクロアレイへの核酸ハイブリダイゼーションもしくは核酸シーケンシングが挙げられる。検出アッセイには、ゲノムDNAまたはRNAの検出を含めることができる(一部の実施形態では、この検出を逆転写後に含める)。一部の実施形態では、試料を「ディープシーケンシング」に供して、絶対的または相対的に微生物の含量の多い試料を調製する。シーケンシング方式としては、パイロシーケンシング(例えば、454 Life Sciencesから入手可能)、ナノポアシーケンシング、電子シーケンシング(Genapsys, Inc., Redwood City, CA)、及びSangerシーケンシングをはじめとするさまざまな種類のものが知られている。

40

【0035】

50

これらの分子技術は、きわめて高感受性で且つ特異的であり、従来の微生物学的培養に関連した上述の問題の多くを被らずに済んでいる。しかしながら、これらの技法はきわめて高感受性であり、片利共生細菌が数多く遍在していることから、試料の汚染される可能性が常に懸念され、偽陽性の検査結果が許容不可能な比率になる可能性がある。しかも、*P. acnes* の DNA が、市販の Taq ポリメラーゼ、及び PCR 溶液を頻繁に汚染することも、明らかにされている。Lupan I, et al. 「The evidence of contaminant bacterial DNA in several commercial Taq polymerases」*Rom Biotech Lett* 2013; 18: 8007 - 12 を参照。

【0036】

一部の実施形態では、分子検出アッセイを培養と共に実施する。分子アッセイでは、原因病原体を同定できるが、さまざまな抗菌薬に対する原因病原体に特異的な感受性または耐性に関するデータが必ずしも提供されるわけではないので、最適な治療法を開始するのに役立つ追加的な情報を培養により提供する場合がある。

【0037】

一部の実施形態では、微生物培養、PCR、顕微鏡検査、及びその他の技法を試料のコホートに対して使用して、片利共生病原体（例えば、*P. acnes* またはその他）を同定し、且つ *P. acnes*（または他の片利共生病原体）の高含量レベルに相関するコホートにおいて RNA シグニチャを同定する。この RNA シグニチャは、他の片利共生病原体検出方法の代替として、つまり、微生物培養、PCR または他の技法を実行する必要なしに、独立に他の試料に対して使用できる。

【0038】

進行中の感染症の毒性が低いほど、感染症の診断は困難である。これらの、いわゆる低悪性度の感染が引き起こす炎症反応は、局所レベルでは有意に軽度で、全身レベルでは皆無またはごく最小限である。これは、次いで、撮像研究及びラボ試験がそのような感染を的確に診断する能力にマイナスの影響を与えるが、それに加えて、より重要なことには、そのような感染症が存在するかどうか及び患者の症状の原因に対する一次的な臨床的疑いを早々抑制しうる。例えば、MRI（腰痛用に最もよく用いられていて、CR を凌ぐ先進の診断撮像研究）では、椎間板感染症が、しばしば軽度で且つ非特異的であることにより特徴づけられる。感染した椎間板に隣接する椎骨終板において最もよく観察される変化は、多かれ少なかれ顕著な（タイプ I のモディック変化と同等な）骨髄浮腫であり、活性化された骨軟骨症など、よく起こるある特定の变性症状を伴うのが観察される場合もある。

【0039】

一部の実施形態では、16S 及び / または 23S rRNA 遺伝子、ならびに特に 16S の可変領域などの微生物のリボソーム RNA (rRNA) 遺伝子が、分子検出アッセイで検出される。例えば、身体部位における微生物コミュニティの複雑さを特徴評価するには、16S rRNA シークエンシングを使用できる。16S rRNA シークエンシングは、微生物分類群、例えば、種または高等な分類学的レベルの認識を促し、以前には未知であった微生物の事例では、一般分類（例えば、族、系統）を可能にする。メタゲノムホールゲノムショットガン (WGS) シークエンシングは、微生物コミュニティ内に存在する機能及び経路に対する洞察を提供するものである。

【0040】

16S rRNA 配列には、両方の高度に保存された領域及び可変領域が含まれる。これらの可変領域（V1 ~ V9 の、9 とおりの数）を使用して、系統発生に従って生物分類を行うことによって、16S rRNA シークエンシングが、試料中に存在する分類群を同定するうえでの一助となり、メタゲノムにおいて特に有用なものになる。これらの配列は、チップ技術、RT-PCR、またはディープシークエンシングを使用して調べることができる。

【0041】

一部の実施形態では、片利共生病原体の存在は、マイクロアレイなどのハイブリダイゼ

10

20

30

40

50

ーションベースのアッセイで判別される。例えば、PhyloChip手法は、特に、相対的に含量の多い50,000超の個々の微生物分類群を同定し測定する、マイクロアレイベースの方法である。この手法は、全ての細菌ゲノム内に存在する16SリボソームRNA遺伝子配列全体を分析することによるものであるが、特定の微生物タイプに対するフィンガープリントを提供するという点では相違している。マイクロアレイベースのハイブリダイゼーション手法を使用すれば、低含量の重要な細菌の測定値よりも、微生物群落において圧倒的大多数を占めるメンバの測定値の方が優先されるのを確実に回避できる。

【0042】

一部の実施形態において、検出アッセイは、P. acnesなどの重要な片利共生物の型判定を可能にし、汚染の可能性を判別し、あるいは感染に対して効能がある可能性の高い有望な治療薬を同定する助けとなる。一部の実施形態において、本方法は、組織試料（例えば、椎間板組織）中、及び誘導済P. acnesコロニー中の片利共生病原体菌株（例えば、P. acnes）を、PCRまたは他の分子技術で型判定することを含む。P. acnesが汚染の結果生じたものではない場合、両方における菌株は同じであるはずである。ゆえに、培養及びPCRの両方で、高レベルの同じP. acne菌株に対して陽性である症例は、格好の基準であると見なされ、且つマイクロRNAプロファイリングに対して真陽性として表される。

【0043】

【表 1】

表 1 : P. a c n e 検出用の例示的なプローブ及びプライマー

リアルタイムPCRアッセイ	
P. acnes 16S rRNA の13-1bp部分	フォワード : GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA (配列番号 1) リバーズ : TTCCGACGCGATCAACCA (配列番号 2)
エンドポイントPCRアッセイ	
16S rRNA遺伝子の 600bp領域	フォワード : GGGTTGTAAACCGCTTTTCGCCT (配列番号 3) リバーズ : GGCACACCCATCTCTGAGCAC (配列番号 4)
P. acnes菌株の型判定のための多重PCR	
16S rRNA(全ての P. acnes)	フォワード : AAGCGTGAGTGACGGTAATGGGTA (配列番号 5) リバーズ : CCACCATAACGTGCTGGCAACAGT (配列番号 6)
ATPアーゼ(タイプ IA1/IA2/IC)	フォワード : GCGTTGACCAAGTCCGCCGA (配列番号 7) リバーズ : GCAAATTCGCACCGCGGAGC (配列番号 8)
sodA(タイプ IA2/IB)	フォワード : CGGAACCATCAACAACTCGAA (配列番号 9) リバーズ : GAAGAACTCGTCAATCGCAGCA (配列番号 10)
トキシン、Ficファ ミリー(タイプIC)	フォワード : AGGGCGAGGTCCTCTTCTACCAGCG (配列番号 11) リバーズ : ACCCTCCAACCTGCAACTCTCCGCCT (配列番号 12)
atpD(タイプII)	フォワード : TCCATCTGGCCGAATACCAGG (配列番号 13) リバーズ : TCTTAACGCCGATCCCTCCAT (配列番号 14)
recA(タイプIII)	フォワード : GCGCCCTCAAGTTCTACTCA (配列番号 15) リバーズ : CGGATTTGGTGATAATGCCA (配列番号 16)
シーケンシング (P. acnes菌株を判別するためのrecA)	
1201bpアンプリコ ン	AGCTCGGTGGGGTTCTCTCATC (-96~-75) (配列番号 17) GCTTCCTCATACCACTGGTCATC (+1105~+1083) (配列番号 18)
FISH	
Cy3タグ付きノン センスEUB338プロ ープ	6-カルボキシフルオレセイン (FAM) タグ付き真正細 菌EUB338プローブ
P. acnes 23S rRNA に特異的なCy3.5 タグ付きプローブ	GAGTGTGTGAACCGATCATGTAGTAGGCAA (配列番号 19)

10

20

30

40

50

【0044】

一部の実施形態では、分子検出アッセイでは、リアルタイムPCRを使用して、検量線に基づいて、P. a c n e s (または他の片利共生病原体) 遺伝子コピーの絶対的定量が行われる。

【0045】

培養、PCR、ハイブリダイゼーション、顕微鏡検査または免疫化学法のうちの1つ以上で検出を行った際、1種以上の片利共生病原体が陽性となる場合、概して容認し難いほど偽陽性の比率が高い。その原因として最も可能性が高いのは、微生物叢による頻繁な試料汚染である。これらの偽陽性を判別するため、試料のRNAプロファイルを、低悪性度または低毒性感染症を示すRNAシグニチャ(例えば、mRNAもしくはmiRNAシグニチャ)が存在するかどうかについて評価する。例えば、試料中の宿主細胞からRNAを

単離することもできるし、(例えば)いくつかある利用可能なmiRNA検出プラットフォームのいずれかを介して、miRNAが相対的に高含量かどうかを評価することもできる。これらには、リアルタイムPCR(例えば、Exiqon、TaqMan Low-Density Arrays(TLDA) Human マイクロRNA Panel、Life Technologies、QIAGEN SYBR(登録商標)miScript PCR Systemを使用したGreen色素でのmiRNAのリアルタイムPCRプロファイリング)、マイクロアレイベースのプラットフォーム(例えば、Affymetrix GeneChip MiRNA、Agilent SurePrint Human miRNAマイクロアレイ、Exiqon製miRCURY LNA(商標)マイクロRNA Arrays)、次世代シーケンシングベースのプラットフォーム(例えば、Illumina製の小型RNAシーケンシング、Ion Torrent製の小型RNAシーケンシング)、及びFFPE組織におけるインサイチュマイクロRNAハイブリダイゼーションが挙げられる。概して、RNAプロファイルは、増幅、ハイブリダイゼーション、及び/またはシーケンシング技術で定量できる。

【0046】

RNA(例えば、miRNA)シグニチャは、細菌種には関係なく低毒性感染症に相関する場合もあれば、あるいはP. acnes、コアグラゼ陰性Staph、E. coli、もしくはCorynebacteriumなどの細菌種または菌株に対して特異的である場合もある。一部の実施形態では、感染細胞及び非感染細胞由来のRNAプロファイルを用いてクラシファイア・アルゴリズムをトレーニングすることによって、RNAシグニチャを特定する。細胞はインビトロ感染する場合もあれば、またはインビボ感染細胞(臨床試料から採取された感染細胞)である場合もある。一部の実施形態では、細胞は、P. acnesの臨床分離株または他の片利共生病原体にインビトロ感染する。一部の実施形態では、感染培養物を少なくとも1日、少なくとも1週間または少なくとも2週間維持管理し、RNAプロファイルの判別に先立って、慢性感染を綿密にモデリングする。一連の片利共生病原体に感染した細胞を使用して、細菌に特異的なシグニチャ及び細菌に非特異的なシグニチャを作製できる。一部の実施形態では、NP細胞をインビトロで培養し、P. acnesなどの片利共生病原体に感染させ、結果として得られたRNAプロファイルを使用して、P. acnes感染細胞を非感染細胞と判別するクラシファイア・アルゴリズムをトレーニングする。P. acnes陽性細胞とその対照であるP. acnes陰性細胞、コアグラゼ陰性Staphylococcus陽性細胞とその対照であるコアグラゼ陰性Staphylococcus陰性細胞、ならびにP. acnes及びコアグラゼ陰性Staph陽性細胞とその対照である両方に陰性の細胞を使用して、クラシファイアをトレーニングできる。

【0047】

一部の実施形態では、感染細胞(例えば、P. acnesに感染したNP細胞)、及び汚染された細胞を使用して、汚染に起因する真正の慢性感染症と急性「感染症」とを判別することによってRNAシグニチャをトレーニングする。同様に、RNAシグニチャをトレーニングすることによって、細菌、ウイルス、真菌、及び寄生生物などの生物を判別することができ、一部の実施形態では、グラム陽性細菌とその対照であるグラム陰性細菌、及び/または細菌種もしくは菌株を判別することができる。

【0048】

一部の実施形態では、片利共生微生物のレベルに対して試験結果が陽性(すなわち高含量)の試料と、その対照である陰性(すなわち低含量)の試料とを使用して、RNAシグニチャをトレーニングする。一部の実施形態では、少なくとも1つの分子技術(例えば、定量的PCR)で、任意選択的に培養または顕微鏡検査で同様に、(例えば、コホート内の試料の少なくとも上位50%、60%、70%、75%、80%もしくは90%中の)片利共生微生物に対して陽性試料は高含量とされる。一部の実施形態では、陽性試料は、培養により、少なくとも約 10^3 CFU/mL、または約 10^4 CFU/mL超を生成する。定量的PCRなどの分子技術では、陰性試料は概して陰性であり、すなわち定量的に

10

20

30

40

50

は少なくとも下位 1 / 4、下位 20 % または下位 10 % である。陰性試料は概して、培養または顕微鏡検査では実質的に陰性である。例えば、一部の実施形態では、陰性試料は、培養で、約 10^3 CFU / mL 未満、または約 10^2 CFU / mL 未満、または約 10 CFU / mL 未満を生成する。これに関連して、培養方法には、実施例 3 に示すプロセスを使用できる。一部の実施形態では、陰性試料は、培養で確定された CFU / mL に関して下位 1 / 4、または下位 20 %、または下位 10 % である。

【0049】

一部の実施形態では、メタゲノム分析の結果を基に、つまり、ディープシーケンシングもしくはハイブリダイゼーションアレイで同定された微生物を絶対的または相対的に高含量で使用して、感染性の臨床試料由来の RNA シグニチャをトレーニングする。

10

【0050】

mRNA もしくは miRNA シグニチャを判別または分類するための例示的な計算ツールとしては、主成分分析、単純ベイズ、サポートベクターマシン、近傍法、決定木、ロジスティック、人工ニューラルネットワーク、及びルールベースのスキーマが挙げられる。コンピュータシステムでは、判別アルゴリズムまたは「クラス予測」を使用することもできる。これらのアルゴリズムは、その全容が本明細書において参照により援用されている R. Simon、*「Diagnostic and prognostic prediction using gene expression profiles in high-dimensional microarray data」*、British Journal of Cancer (2003) 89, 1599 - 1604 に記載されている。クラシファイア・アルゴリズムは、教師付き、教師無し、または半教師付きでありうる。

20

【0051】

一部の実施形態では、発現制御を含まない 1 フィーチャ、2 フィーチャ、3 フィーチャ、4 フィーチャ、または 5 フィーチャ（例えば、mRNA または miRNA）が、クラシファイアに使用される。一部の実施形態では、シグニチャを含めるため 2 ~ 約 100 フィーチャ（mRNA もしくは miRNA）が、アルゴリズムに使用される。一部の実施形態では、シグニチャを含めるため 2 ~ 約 50 フィーチャ、または 2 ~ 約 30 フィーチャ、または 2 ~ 約 20 フィーチャ、または 2 ~ 約 10 フィーチャが、アルゴリズムに使用される。一部の実施形態において、クラシファイアは、5 ~ 50 フィーチャ、または 10 ~ 50 フィーチャ、または 20 ~ 50 フィーチャに基づく。例示的なヒトの miRNA を、表 2 及び表 8 に示す。

30

【0052】

マイクロ RNA (miRNA) は、高含量クラスの内在性の小型ノンコーディング RNA (18 ~ 25 ヌクレオチド長) を含む、遺伝子発現に重要な調節因子であり、mRNA の分解を促進する能力またはタンパク翻訳を減衰する能力を有する。バイオインフォマティクス研究が推定したところによれば、マイクロ RNA は、全てのヒト遺伝子の 50 % 超を調節できると共に、各 miRNA は数百もの遺伝子標的を制御できる。miRNA によっては、細胞に特異的な組織に特異的な及び / または開発ステージに特異的な様式にて発現するものもある一方、遍在して発現するものもある。検証済 miRNA の数は増加の一途をたどっており、最新版のウェブベースのデータベースである miRBase は、ヒトゲノム内の 1800 前駆体、及び 2342 成熟配列に対して注釈付けしてある。miRNA の大半が（注釈付きまたは予測された遺伝子から 1 kb を超えて離間している）遺伝子間領域に位置することを示唆する、miRNA のゲノム位置に関する注釈に基づいて、ほとんどの miRNA 遺伝子が自律転写ユニットとして転写されることが想定されている。miRNA は、胚形成、器官形成、細胞分化、増殖、アポトーシスなどの多くの基本的な生物学的プロセスのマスター調節因子としての役目を果たすことができ、幹細胞系及び免疫系などの主要な生体系に対し影響を及ぼす。他の小型ノンコーディング RNA（例えば、piRNA、snRNA、snoRNA、及び circRNA）または長いノンコーディング RNA（例えば、lncRNA、linRNA、T-UCR）は、本開示に従っ

40

50

て低毒性感染症を検出するのに用いられる場合がある。

【0053】

結果として、多様なヒト癌、ならびに心血管、尿、及び他の器官系統の病理において、miRNA調節解除の特異的なパターンが同定されている。ウイルス感染と比較して、細菌性病原体に対するmiRNAの応答は、さほど探究されてこなかった。

【0054】

一部の実施形態では、2～約1000のレベルのRNA（例えば、mRNAまたはmiRNA）が、患者試料から単離されたRNAにおいて検出される。例えば、約2～約500、もしくは2～約300、もしくは2～約200、もしくは2～約100、もしくは2～10のmRNAまたはmiRNAが検出される。一部の実施形態では、少なくとも50のmRNAまたはmiRNAが検出される。これらの実施形態または他の実施形態では、500以下、300以下もしくは100以下、もしくは10以下のmRNAまたはmiRNAが検出される。一部の実施形態では、2～約5または2～約10のmiRNAが個々に検出され、対照と比較して相対的に含量の多いことが判別される。例えば、miRNAシグニチャは、表2、表4、表5中のmiRNA用miRNAプロファイル、または図2もしくは図8のヒトmiRNAに基づいて、トレーニングできる。

【0055】

一部の実施形態では、miR-574-3p、miR-29a-3p、miR-497-5p、miR-29c-3p及びmiR-99b-5pのmiRNAのうちの2つ以上が、患者試料（例えば、椎間板組織）中に検出される。一部の実施形態では、（例えば、椎間板組織中に）miR-29a-3p及びmiR-574-3pが検出される。RNU38B及び/またはRNU48などの1つ以上の対照遺伝子の発現に対して相対的に、発現を定量できる。出発材料、試料採取、RNAの調製及び品質、ならびに逆転写（RT）効率の量のばらつきを制御するため、対照RNAを選択する場合もある。内在性コントロール遺伝子に対する正規化は、潜在的RNA入力またはRT効率バイアスを補正するための確かな方法である。他の潜在的対照としては、ACTB（ベータアクチン）及びGAPDH4などのハウスキーピング遺伝子が挙げられる。一部の実施形態において内在性対照は、有益な組織タイプ及び細胞タイプ全体にわたって比較的一定で且つきわめて高含量の、遺伝子発現を実証している。一部の実施形態では、コホート内の陽性及び陰性試料中のmiRNAフィーチャに対する相対的な発現量に基づいてmiRNAスコアを確定し、そのスコアによって個々の陽性及び陰性試料が判別される。P.acnes陽性の椎間板組織試料とP.acnes陰性の椎間板組織試料とを判別するための例示的な診断miRNAスコア（DMS）は、 $DMS = 18.71 - 11.24 * \log_{10}(miR-29a-3p) + 10.4 * \log_{10}(miR-574-3p)$ であり、カットオフは0.0～-0.4もしくは0.0～-0.3、または0.0～-0.2の範囲内に設定される（P.acnes陽性はカットオフと等しいかまたはそれ未満）。例えば、一部の実施形態では、カットオフが-0.01に設定される。一部の実施形態では、このスコアを、微生物培養、及び/またはPCR（もしくは他の分子アッセイ）の代わりに使用する場合もある。一部の実施形態では、例えば、PCRまたは他の分子アッセイで同定された偽陽性を同定する目的に、スコアが使用される。

【0056】

本明細書において記述されている診断試験で、低毒性感染症が確認された場合、患者に治療を受けるように奨める。低毒性感染症が確認されない場合（分子分析の際、培養で偽陽性が検出された場合を含む）、患者に慢性感染の治療を奨めない。

【0057】

特に、手術に先立って生検を用いたときに試料が低毒性感染症に対して陽性であった場合、手術時に局所抗生物質または消毒リンスを施される場合がある。代わりに、手術に先立って、経口、静脈または局所抗生物質レジメンが投与される場合もある。

【0058】

手術中に試料が単離され、低毒性感染症に対して試験結果が陽性であった場合、経口、

10

20

30

40

50

静脈または椎間抗生物質レジメンが、術後の数日間、数週間もしくは数か月間にわたって投与される場合がある。

【 0 0 5 9 】

一部の実施形態では、生検試料に基づいて、患者を低毒性感染症に罹患していると診断することがある。その場合、患者は抗生物質レジメンを投与され、背下部の疼痛が減じられるかまたは疼痛が消失すれば、椎間板切除もしくは他の侵襲的手技などの手術が回避され、例えば、低侵襲性の手技の方が優先されることがある。

【 0 0 6 0 】

一部の実施形態では、定常の椎間板手術（椎間板切除術）中に得られた組織試料で、陽性の検査結果が得られた場合、任意選択的に、利用可能であれば感受性試験、及び綿密な臨床検査、ならびに撮像フォローアップ（MRI）に従って、抗生物質治療を行う。患者が、微小椎間板切除術後に、腰痛の持続または増悪で苦しんでいて、進行性の椎間板腔炎症の徴候さえ呈している可能性がある場合、治療専門医は、感染症及び背部痛の両方を治療するため、完全な椎間板切除術及び椎間関節固定術を適応とすることがある。患者が抗生物質治療を受けて改善が見られた場合、一定期間の経過後にその抗生物質を中断して、以後の臨床的及び撮像フォローアップを行う。

10

【 0 0 6 1 】

一部の実施形態では、予定された手術に先立って、経皮的生検で採取された組織試料で陽性の検査結果を得て、予定された手技に先立って標的化抗生物質の前処理を実行できる。そのような治療下、臨床的改善の可能性に応じて、予定していた手術を低侵襲性手技または保存療法に変更することも可能である。手術中には、罹患している感染症が低悪性度であることを認識したうえで、感染症が寛解する確率及び良好な臨床転帰が得られる確率を高めようという試みから、局所消毒剤または抗生物質が使用される場合もある。

20

【 0 0 6 2 】

以下、本発明の実施形態について、下記の実施例を通して説明する。

【実施例】

【 0 0 6 3 】

米国では、毎年、およそ800,000例もの患者が、難治性神経根（神経障害性）の疼痛を軽減するため、椎間板手術を受けている。この手技は、神経の炎症を引き起こす椎間板の一部の除去を伴う。これら個人の大多数が潜在的に変形性椎間板疾患（すなわち、患者に慢性腰痛、椎間板ヘルニア、坐骨神経痛及び他の病気に罹り易くなる素因を与える病態）を有することから、我々の社会において障害及び羅病が有意な率に達し、一方、これらの手術のうち約25%は、患者を健康な状態に復帰させることが不可能となっている。

30

【 0 0 6 4 】

変形性椎間板疾患の原因はしばしば特発性であり、椎間板手術を受けた患者の亜集団が、*Propionibacterium acnes*のほか、*Corynebacterium*、及び*Staphylococcus*に起因する可能性のある低毒性感染に罹患しているという証拠が強まっている。低毒性感染は、数例の変性椎間板の原因または悪化因子、且つ/あるいは椎間板手術の25%が、患者をウェルネス状態に復帰させるのに失敗する要因であると考えられている。低毒性感染症は、免疫系を免れる感染症であり、慢性変性病態の一因となる可能性がある。

40

【 0 0 6 5 】

実施例1．マイクロRNA（miRNA）のインビトロ・プロファイリング

（1）天然椎間板組織の3つの試料から誘導されたNP細胞は、*P. acnes*（PA）（顔面座瘡から誘導されたATCC 6919）を介して、または感染した椎間板組織から直接に誘導されたPAを介して、他の細菌種（例えば、*E. coli*、*Staphylococcus*、*Corynebacterium*）に感染する。

（2）さまざまな時点で、細菌細胞内の発生をサイトカイン応答、及びDAPI蛍光色素で評価する。

50

(3) 細胞内空間内の細菌によって誘発されたマイクロRNAプロファイルを同定する。第1のプロファイル(プロファイル1a)は、全ての細菌種に共通のプロファイルであり、第2のプロファイル(プロファイル1b)は、組織試料内の汚染検出用のP. acnesまたはE. coliなどに特異的なプロファイルである。

(4) NP細胞培養物の感染後のさまざまな時点において、マイクロRNAプロファイル(プロファイル1a、及びプロファイル1b)を同定する。急性感染症のモデルとして、試料固定に先立って起こる汚染(例えば、インビトロ汚染信号)を示すプロファイルを同定する際には、30~60分用いる場合がある。慢性感染症をモデリングして、慢性感染症を示すプロファイルを同定する場合には、長期(例えば、1日間、7日間、及び21日間)にわたるインキュベーションが用いられる。

【0066】

Exiqon製マイクロRNA HumanパネルV3.0を使用して、グローバルマイクロRNAの発現プロファイリング(マイクロRNA×754例)を実行する。

【0067】

実施例2. miRNAの新鮮な椎間板組織のプロファイリング

(1) チェコ共和国において約500例の登録患者が椎間板手術を受け、手術時点、ならびに6週間、6か月間及び12か月間のフォローアップで、臨床データが収集される。

(2) 各組織試料は、以下の3つの部分に分けられる。

1. 細菌DNA事象のDNA精製、及びqPCR評価用。メタゲノム手法用に、DNAを抽出直後に-80℃で貯蔵する。

2. マイクロRNAプロファイルのRNA精製及びqPCR評価用。安定化溶液(RNA lysis buffer)を用い、RNAを採取する。

3. 微生物評価用に、室温にて組織をできるだけ早急に微生物学部門に移送する。今後の研究に備えて、血漿及び尿もまた採取し、-80℃で貯蔵する。

(3) 試料1をDNA精製に使用し、全ての試料においてP. acnesのDNAをqPCRにより定量する。加えて、Staphylococciなどの他の細菌種を定量できる。

(4) 培養及びqPCRの両方で陽性である試料については、多重PCR及び/またはシーケンシングで、コロニー及び椎間板組織中のPA菌株を同定する。汚染を排除するために、同じ菌株を同定する必要がある。培養及びqPCRで、同じ菌株に対して陽性の試料はマイクロRNAプロファイリングに対して基準陽性であると見なされる。

(5) 培養で陰性、及びqPCR(例えば、PA、Staphylococci)で陰性(あるいは、陰性試料が存在しない場合、低レベルの陽性)の試料は、マイクロRNAプロファイリングに対して基準陰性であると見なされる。

(6) PA陽性×20例、Staphylococci陽性×10例、及び陰性×30例を、マイクロRNAプロファイリング用に使用する。

(7) 椎間板組織における細菌の発生に関連する共通のマイクロRNAプロファイルを、PA×20例及びStaph×10例とその対照である陰性試料×30例に由来するマイクロRNAプロファイルと比較することによって同定する。PA+の20例及びStaph+の10例と、その対照である陰性試料とを、別個に比較することによって、細菌に特異的なプロファイルを特定する。

(8) インビトロマイクロRNAシグニチャとインビボマイクロRNAシグニチャとの比較を行う。

【0068】

実施例3. コホート全体における陽性の相互検証

試料500例中、培養ではN例の陽性患者、qPCRではN1例の陽性患者が存在し、同定されたマイクロRNAシグニチャに基づいて診断アルゴリズムが開発され、miRNAシグニチャにより患者N3例が陽性とされるであろう。

【0069】

共通のmiRNAシグニチャに対して陽性の症例において、PAに特異的でStaph

10

20

30

40

50

にも特異的なmiRNAシグニチャを評価する。N3は共通のシグニチャに対して陽性になる。N4はPAに特異的なmiRNAシグニチャに対して陽性になり、N5はStaphに特異的なmiRNAシグニチャに対して陽性となり、両方のmiRNAシグニチャに対してN6が陰性となる。このN6をメタゲノム分析にかける。

【0070】

予期される観察としては、CLBPの既往歴があるために手術を受けた患者において真陽性の頻度が高くなること、ならびに腰椎術後疼痛を有する患者において及び（6か月目及び12か月目に臨床転帰が評価された後）特にCLBPに患うであろう患者において真陽性の頻度が高くなることが挙げられる。

【0071】

10

実施例4．診断マイクロRNAスコア(DMS)の確定

患者コホート、及び基準P.acnes試料の定義

平均年齢 44 ± 13 歳の患者326例（男性186例、及び女性140例）が、前向き研究に登録した。臨床的に明らかな術後椎間板炎を発症した患者はいなかった。ゴールドスタンダードの定量的な細菌培養を行ってP.acnes数を算出し、リアルタイムPCRを行って、椎間板組織検体内のゲノム数を検出した。細菌培養及びリアルタイムPCRに用いられた手技については、「方法」の節で詳述する。培養では130例（40%）がP.acnes陽性であった。P.acnes計数は $100 \sim 9000$ CFU/mlの範囲に及び、その中央値は 400 CFU/mlであった。リアルタイムPCRで、P.acnesゲノムは、98例（30%）において検出不可能であった。P.acnes陽性228例の椎間板組織内のP.acnesゲノムの数は $2 \sim 4531$ の範囲に及び、その中央値は 256 ゲノム/総DNA 500 ngであった。培養（ 10^3 CFU/ml、75パーセントイル）及びリアルタイムPCR（DNA 500 ng中、ゲノム500例以上、75パーセントイル）の両方で、P.acnes含量の多いことによって特徴づけられる椎間板組織試料が、基準P.acnes陽性例（N=45、14%）と見なされた。他方、細菌培養及びリアルタイムPCRの両方で陰性の試料は、基準P.acnes陰性例（N=72、22%）として使用された。これらのP.acnes基準症例は、3相バイオマーカー研究において、グローバルマイクロRNAの発現プロファイリング、診断マイクロRNAの同定、ならびに診断マイクロRNAスコア(DMS)の検証及び開発に使用された。

20

30

【0072】

基準試料（陽性45例、陰性72例）を更に、それらのP.acnesの状態に比例するように、ディスカバリーセット、トレーニングセット及び検証セットに更に分けた。P.acnes含量の少ない陽性例において、汚染ベースの偽陽性のリスクが大きいという理由から、検証コホートにおいてリアルタイムPCRではP.acnes含量の少ない試料（ $< 10^3$ CFU/ml）及び/またはさまざまなゲノム計数の試料（N=44）を、新規に開発されたDMSの実装によって評価されるよう対象に含めた（標準の方法では結果が得られないため）。研究の対象となったコホートにおける患者背景を、表3に要約してある。これらの患者161症例のほか、別の10症例（コアグラゼ陰性Staphylococci (CoNS) に対して陽性の椎間板培養例）も、特異性対照群として、本研究の検証部分に含めた。

40

【表 2】

表 3. 患者の特徴 (N = 161)

パラメータ	ディスカバリー セット N=24	トレーニング セット N=35	検証セット N=102
性別			
男性	16 (66%)	21 (60%)	64 (63%)
女性	8 (34%)	14 (40%)	38 (37%)
年齢			
平均値 ± 標準偏差	43 ± 14 y	45 ± 13 y	46 ± 12 y
脊髄手術の既往			
有り	2 (8%)	5 (13%)	9 (9%)
無し	22 (92%)	30 (87%)	93 (91%)
硬膜外注射の既往			
有り	0 (0%)	4 (11%)	2 (2%)
無し	100 (100%)	31 (89%)	100 (98%)
ヘルニアのタイプ			
隆起部	2 (8%)	3 (9%)	3 (3%)
押出	10 (42%)	14 (40%)	38 (37%)
隔離	12 (50%)	18 (51%)	61 (60%)
椎間レベル			
L2/L3	0 (0%)	0 (0%)	1 (1%)
L3/L4	1 (4%)	1 (3%)	2 (2%)
L4/L5	8 (34%)	16 (46%)	40 (39%)
L5/S1	15 (62%)	18 (51%)	59 (58%)
P. acnes の培養結 果*			
> 10 ³ CFU/ml	12 (50%)	15 (43%)	18 (18%)
< 10 ³ CFU/ml	0	0	39 (38%)
陰性	12 (50%)	20 (57%)	45 (44%)
P. acnes のゲノム 数			
DNA 500ng 中、500 超	12 (50%)	15 (43%)	27 (26%)
DNA 500ng 中、500 未満	0	0	13 (13%)
陰性	12 (50%)	15 (57%)	62 (61%)

*いずれの場合も、培養では共感染が観察されなかった。

【0073】

発見フェーズ - P. acnes 陽性及び陰性試料中で脱調節された miRNA

Exiqon 製リアルタイム PCR ベースの技術を使用して、基準 P. acnes 陽性の椎間板組織の 12 例及び P. acnes 陰性試料 × 12 例において、マイクロ RNA の 754 例の発現プロファイリングを遂行した。1 群中の平均 Ct (閾値サイクル) が 35 未満である miRNA のみを、統計的評価の対象とした。マイクロ RNA の発現量を RN

10

20

30

40

50

U38Bに対して正規化した。「方法」の節に記載されているように、P. acnes陽性及び陰性の椎間板組織試料中、マイクロRNA×20例がそれぞれ異なった様式で発現した(表4に要約されている)。

【表3】

表4. 培養及びリアルタイムPCRで、P. acnes含量の多い椎間板組織においてそれぞれ異なる様式にて発現するマイクロRNAを同定する(p値<0.1、及び調整後のp値<0.15)。

miRNA	倍率変化	P 値	調整後の p 値*
hsa-miR-125b-2-3			
p	1.66	0.002	0.056
hsa-miR-99a-5p	1.5	0.003	0.056
hsa-miR-29a-3p	1.45	0.009	0.076
hsa-miR-99b-5p	1.49	0.009	0.076
hsa-miR-125b-5p	0.78	0.017	0.105
hsa-miR-28-3p	1.41	0.020	0.105
hsa-miR-92b-3p**	1.46	0.023	0.107
hsa-miR-29c-3p	1.58	0.039	0.112
hsa-miR-497-5p	1.82	0.039	0.112
hsa-miR-28-5p	1.35	0.039	0.112
hsa-miR-125a-5p	0.48	0.043	0.120
hsa-miR-140-3p	1.52	0.045	0.121
hsa-miR-574-3p	0.54	0.053	0.130
hsa-miR-16-2-3p*			
*	1.38	0.061	0.131
hsa-miR-30a-3p	1.44	0.061	0.131
hsa-miR-146b-5p	0.62	0.071	0.139
hsa-miR-195-5p	1.86	0.082	0.140
hsa-let-7f-2-3p*			
*	1.44	0.098	0.141
hsa-miR-34a-3p**	1.8	0.099	0.145
hsa-miR-423-5p	2.05	0.100	0.149

* 多重仮説検定用の Benjamini-Hochberg 補正

** 発現量が極端に低いため(両方の群において Ct > 33)、検証対象として選択されないマイクロRNA

【0074】

トレーニングフェーズ - 診断マイクロRNAスコア(DMS)の検証、及び確定

本方法に記載されているように、我々は、個別マイクロRNAの発現アッセイ(Life Technologies)、及び2つの基準遺伝子用アッセイを使用して、発見フェーズからの16候補miRNA、ならびに35椎間板組織試料中のRNU38B及びRNU48(基準P. acnes陽性15例、及び基準陰性20例)の発現量を特定した。マイクロRNAの発現量を、2つの基準遺伝子(RNU38B、及びRNU48)の平均値に対して相対的に定量した。全ての試料が、Ct(RNU38B) < 34且つ/またはCt(RNU48) < 31で、品質管理に合格した。P. acnes陽性及び陰性の椎間板組織試料において、発現量が有意に異なることが確認されたマイクロRNAは5つ存在し、それらのうち2つは、多重仮説検定に対しP値を調整した後でさえも依然として有意

であった（表 5、図 4）。

【表 4】

表 5. 発見フェーズにおいて同定された候補マイクロRNAの独立検証

miRNA	倍率変化	P 値	調整後の p 値*
miR-574-3p	0.51	0.002	0.024
miR-29a-3p	1.87	0.002	0.031
miR-497-5p	2.79	0.005	0.063
miR-29c-3p	1.57	0.029	0.322
miR-99b-5p	1.37	0.047	0.437
miR-195-5p	1.85	0.100	0.687
miR-28-5p	1.48	0.105	0.687
miR-30a-3p	1.36	0.112	0.687
miR-146b-5p	1.50	0.184	0.803
miR-34a-3p	1.36	0.303	0.920
miR-140-3p	1.29	0.331	0.920
miR-125a-5p	0.74	0.387	0.920
miR-423-5p	1.46	0.389	0.920
miR-125b-5p	1.25	0.397	0.920
miR-28-3p	1.30	0.461	0.920
miR-125b-2-3p	0.90	0.625	0.920

* 多重仮説検定用の Benjamini-Hochberg 補正

【0075】

診断マイクロRNAスコア（DMS）（式1）を確定するため、2つのマイクロRNA（miR-29a-3p及びmiR-547-3p）を使用した。カットオフ値-0.01は、ROC分析に適用した場合に、基準P.acnes陽性例と陰性例とを最も正確に判別できる値として同定された（図5、AUC=0.9833）。

【0076】

miR-29a-3p及びmiR-547-3p発現量は、以下の2つの基準遺伝子（RNU38B、及びRNU48）の平均値に対して相対的に表される。

$$miR-29a-3p = 2^{-\left(Ct(miR-29a-3p) - \text{平均}(Ct(RNU48), \text{及び} Ct(RNU38B))\right)}$$

$$miR-574-3p = 2^{-\left(Ct(miR-574-3p) - \text{平均}(Ct(RNU48), \text{及び} Ct(RNU38B))\right)}$$

式1：

$$DMS = 18.71 - 11.24 * \log_{10}(miR-29a-3p) + 10.4 * \log_{10}(miR-574-3p)$$

【0077】

図5に示すように、DMS値のROC分析は、P.acnes含量の多い症例（培養及びリアルタイムPCR）と陰性例とを強力に判別できることを示す。

【0078】

検証フェーズ-P.acnes含量の少ない陽性症例におけるDMSの独立検証、及びDMSの使用（標準の方法では結果が得られない場合）

個々のマイクロRNAの発現アッセイ（Life Technologies）、及び基準遺伝子に対するアッセイを使用してmiR-29a-3p及びmiR-574-3pの発現量を定量し、トレーニングフェーズと同様にDMS、RNU38B及びRNU48を構成した。独立した58例（基準P.acnes陽性18例、基準陰性40例）におけるDMSの適用によって、その分析性能が高度であることが確認され、試料の分類精度が

95%に達し、従ってP. acnesの状態に比例していることが明らかにされた(表6及び表7、図6)。しかも、コアグラゼ陰性Staphylococci(CoNS)陽性培養による椎間板組織試料の10例はDMS陰性であり、P. acnesに対するDMSの特異性を示しているか、あるいは少なくとも、DMSが椎間板組織内で二番目に最も頻繁に観察された微生物(CoNS)の存在による影響を受けないことを示している(図7)。

【0079】

標準の診断方法(培養、及びリアルタイムPCR)にDMSを追加したことにより、培養で、P. acnes含量の少ない陽性として評価された椎間板試料のほぼ60%、及びリアルタイムPCRによるさまざまなゲノム計数は、偽陽性であることが明らかになっている(表6)。

【表5】

表7. 2-miRNAベースのDMSの診断性能。

	トレーニングセット	検証セット
AUC	0.98	0.97
感受性	0.93	0.89
特異性	1.00	0.98
精度	0.97	0.95
PPV [#]	1.00	0.94
NPV ^{##}	0.95	0.95

[#] PPV: 陽性予測値、^{##} NPV: 陰性予測値

DMSの計算を、以下に例示する。

【0080】

[試料ID4 - 陽性]

$Ct(miR-29a-3p) = 25.02$; $Ct(miR-574-3p) = 31.35$; $Ct(RNU38B) = 31.58$; $Ct(RNU48) = 28.76$

品質管理: $Ct(RNU38B) < 34$ 且つ $Ct(RNU48) < 31$ の場合、RNA試料は有効である。

$miR-29a-3p = 2 - (25.02 - (28.76 + 31.58) / 2) = 35.5062$

$miR-574-3p = 2 - (31.35 - (28.76 + 31.58) / 2) = 0.4414$

$DMS(id4) = 18.71 \sim 11.24 * \log_{10}(35.5062) + 10.4 * \log_{10}(0.4414) = -2.41$

$DMS(id4) = -2.41 < DMS(\text{陽性カットオフ}) = -0.01$ の場合、試料はP. acnes陽性である。

[試料ID30 - 陰性]

$Ct(miR-29a-3p) = 26.49$; $Ct(miR-574-3p) = 31.73$; $Ct(RNU38B) = 32.43$; $Ct(RNU48) = 30.07$

品質管理: $Ct(RNU38B) < 34$ 且つ $Ct(RNU48) < 31$ の場合、RNA試料は有効である。

$miR-29a-3p = 2 - (26.49 - (30.07 + 32.43) / 2) = 27.0959$

$miR-574-3p = 2 - (31.73 - (30.07 + 32.43) / 2) = 0.7170$

$DMS(id30) = 18.71 \sim 11.24 * \log_{10}(27.0959) + 10.4 * \log_{10}(0.7170) = 1.1$

$DMS(id30) = 1.1 > DMS((陽性カットオフ) = -0.01$ の場合、試料は *P. acnes* 陰性である。

【0081】

表6に示すように、39例中の23例(59%)が、培養では *P. acnes* 含量の少ない陽性であったのに対し、DMSの実装では *P. acnes* 陰性として評価された。

【0082】

5例中の4例(80%)は、リアルタイムPCRで強陽性であったのに対し、培養では陰性であり、DMSでは陰性として評価された。一方、DMSでは5例中の1例(20%)が陽性であった。

【0083】

潜在的な臨床的意義

臨床上的の決定を行う目的で、*P. acnes* に感染した椎間板を使用し、その診断(細菌の培養及び/またはリアルタイムPCR)に標準の方法を適用すれば、1/3を超える患者が、潜在的に有害な抗生物質治療を感染することなしに受けることとなる。多大な時間を必要とし、且つかなり汚染され易い標準の診断技法は、これを、分析性能を有するDMSで完全に置き換えることができ得る。それによって、脊髄疾患患者におけるこれらの不必要な有害処置を防ぐための解決策が得られる。

【0084】

方法

患者:

組み入れ基準としては、感覚欠損有りもしくは無しの腰椎または腰仙部神経根障害で、相関する腰椎または仙骨神経根の分布において対応する臨床的に意義ある運動障害を伴うもの(撮像基準を参照)、あるいは保守的な手段では治り難い神経根痛(坐骨神経痛または大腿骨痛)を伴うもの、下肢伸展挙上陽性試験、皮膚分節感覚欠損、筋緊張運動障害及び/または深部腱反射低下などの身体検査所見に合致すること、最新式磁気共鳴映像方法によるもしくはコンピュータ断層装置による腰仙脊髄の撮像に、臨床的に罹患した神経根及び身体的検査と相関する分布にて遊離髄核隔離または椎間板ヘルニア/突起が示されることが含まれていた。除外基準としては、共存感染もしくは免疫無防備状態、手術以前の月におけるコルチコステロイドまたは抗生物質の使用、トラウマ、未知の放射線量、炎症性関節炎、または他のリウマチ性疾患の診断が含まれていた。収集された疫学データ及び臨床データは、性別、年齢、椎間板疾患部、ヘルニアの種類、既往の脊髄手術の有病率、硬膜外ステロイド注射、術後椎間板炎の発症に関するものであった。書面によるインフォームド・コンセントが、各患者から得られた。本研究は、施設内審査委員会(IRB)により承認された。

【0085】

術中試料の採取

ポピドンヨードの3組調製物を手術部位にこすり付けて、標準の滅菌技術を使用してドレープした。全ての症例において皮膚切開前に標準の周術期抗生物質を投与した。セファゾリンが、ほとんどの症例において投与される標準の抗生物質であった。ペニシリンアレルギーのある患者では、バンコマイシンまたはクリンダマイシンのいずれかが投与された。皮膚切開の対象となる厳密な位置を術中X線透視で案内し、後部正中アプローチを用いて鋭的剥離及び電気焼灼を行った。自家保定牽引子(カスパル型)が配置された後、手術用顕微鏡の下で、Penfield解剖器具及びKerrison骨鉗子を用い、必要に応じて黄色靱帯を切除した。横断神経根を穏やかに収縮させて、椎間板ヘルニアを露出させ、環状欠損部の近くの椎間板腔において髄核の残存疎性断片と共に摘出した。全ての組織試料を、汚染を最小限に抑える方法で取り扱い、密閉した滅菌済の試料カップ内で保持した後、標識化の対象として現場に渡し、実験室に移送した。実験室で、椎間板組織試料が更に分析された。我々は、摘出標本からできるだけ多くの材料を得ようと試みたので、試料サイズを精密には測定せず、 $3 \times 3 \times 5 \sim 10 \times 5 \times 5$ mmと概測した。処理前に試料を凍結せず、手術後2~4時間以内に培養が確立された。

【0086】

微生物の培養

個別包装された滅菌済のガンマ線照射メス、及び滅菌済のガンマ線照射ペトリ皿を使用して、新鮮な椎間板組織試料をより小さな断片に切断した。これらの断片のうちの1つを2 mlのDNA非含有の微量遠心分離管に入れて、*P. acnes*のDNA分析処理を行うまで-80℃で貯蔵した。クラス2の生物学的安全キャビネット内で、滅菌乳棒、及び無菌石英砂（粒径：0.1～0.5 mm；Penta, Czech Republic）を入れた乳鉢、ならびに無菌状態の生理食塩水を用いて、組織の処理及び均質化を行った。均質化された組織試料を、7%ヒツジ血液及びビタミンKを補給したWilkins Chalgren Anaerobic Agar（Hi Media Laboratories, India）に接種した。接種されたプレートを、Anaerobic Work Station（Ruskin Technology, UK）内で、37℃にて好氣的に（窒素80%、CO₂10%、及びH₂10%）14日間インキュベートし、細菌の増殖を評価した。試料中の細菌の量は、ホモジネート1 ml中のコロニー形成単位（CFU）として表された。Rapid ANA II System（Remel, USA）を使用して、MALDI-TOF（microflex（商標）LT MALDI-TOF System+ソフトウェア+バクテリアスペクトルライブラリ、Bruker Corp.）で、生化学的に細菌を同定した。

10

【0087】

DNAの単離

凍結した組織試料（湿潤重量の中央値：130 mg、範囲：20～180 mg）を解凍し、新たに開封した滅菌済の針、メス及びピンセット組を使って小型断片に切断して、滅菌済の2 ml微量遠心分離管に移した。500 µlのATL緩衝液（Qiagen, Germany）に50 µlのプロテイナーゼK（20 mg/ml）（Qiagen）を溶解した溶液中に、組織試料の小断片を更に懸濁させて、サーモミキサーの中で56℃、650 rpmで一晩消化させた。一連の並列処理済の試料のそれぞれに対し滅菌水入りの管をラボ汚染対照として使用し、組織の消化からDNA単離、リアルタイムPCR分析までを、全ラボプロセスに従って行った。QIAamp UCP Pathogen Mini Kit（Qiagen）を使用して、メーカーの指示書に記載されているとおりに、DNAを抽出した。Nanodrop 2000（ThermoFischer, USA）を使用し、あるいはDNA濃度が5 ng/µl未満の試料用に蛍光色素及びQubit 3.0蛍光光度計（Life Technologies, USA）を使用して、DNAの濃度を分光測定で測定した。

20

30

【0088】

リアルタイムPCRによる*P. acnes*の定量

前述のリアルタイムPCRアッセイを、*P. acnes*の16S rRNA遺伝子の131-bp領域を増幅するために以下のプライマーを使用して実施した：フォワードプライマー5'-GCGTGAGTGACGGTAATGGGTA-3'（配列番号1）、リバースプライマー5'-TTCCGACGCGATCAACCA-3'（配列番号2）及びTaqManプローブ5'-AGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCG-3'（配列番号20）。PCR反応混合物15-µl中には、DNA試料6,75 µl、各プライマー5 pmol、及びTaqManプローブ2 pmol、ならびに1X TaqMan遺伝子発現Master Mix（Life Technologies, USA）が含有されていた。QuantStudio 12K Flexシステム（Life Technologies, USA）を、熱サイクリングプロファイル（50℃で2分間、95℃で10分間、ならびに95℃で15秒間及び60℃で1分間の50サイクル）にて使用した。合成された*P. acnes*アンプリコン（131 bp）（Integrated DNA Technologies, USA）の6とおりの濃縮物（10¹～10⁶コピー）の複製5つを用いて作成された内部標準曲線で、試料中の*P. acnes*ゲノム当量を推定した。上述のラボ汚染対照、及びPCR陰性対照を、全てのそれぞれのPCR反

40

50

応に含めた。試料ごとにアッセイを2回ずつ行い、16S rRNA遺伝子コピーの平均数を計算した。ラボ汚染を排除するため、ラボ汚染対照において検出された16S rRNA数を、組織試料中のコピー数から減算した。P. acnes中の16S rRNAオペロン(3コピー/細胞)のコピーの既知数を使用して、各試料中の細菌ゲノムの数を最終的に計算し、椎間板組織試料から抽出された総DNA500ng中の細菌ゲノム数として表した。標本品質及び核酸抽出、ならびに阻害増幅プロセスの評価を可能にするため、ヒトのβグロビン遺伝子を内部対照として含めた。

【0089】

RNAの単離

凍結した組織試料を解凍し(湿潤重量の中央値:100mg、範囲:20~145mg)、滅菌済の針、メス及びピンセット組を使って小型断片に切断し、滅菌済の2ml微量遠心分離管に移した。500μlのATL緩衝液(Qiagen, Germany)に50μlのプロテイナーゼK(20mg/ml)(Qiagen)を溶解した溶液中に、組織試料の小断片を更に懸濁させて、56℃にて650rpmで一晩消化させた。miRNeasy Mini Kit(Qiagen)を使用して、メーカーの指示書に記載されているとおりに、マイクロRNA及び他の小型RNAを含めた総RNAを抽出した。Nanodrop 2000(ThermoFischer, USA)を使用し、あるいはRNA濃度を5ng/μl未満の試料用に蛍光色素、及びQubit 3.0蛍光光度計(Life Technologies, USA)を使用して、RNAの濃度を分光測定で測定した。

【0090】

マイクロRNAの発現プロファイリング

MicroRNA Ready-to-Use PCR Panels(Exiqon, Vedbaek, Denmark)を使用して、miRNAの発現プロファイリングを実行した。データ正規化用に、2枚1組のカード(Human Panel I+II, V4-M)を使用して、ヒトmiRNA×752例及び内在性コントロール×6例を定量できるようにした。Universal cDNA Synthesis Kit(Exiqon, Vedbaek, Denmark)及び総RNA100ngを使用し、標準のプロトコールに従って、第一鎖cDNAの合成を実行した。その後、ExiLent SYBR Greenマスターミックス、及びマイクロRNAに特異的なPCR増幅プライマーを使用して、リアルタイムPCR増幅を行い、且つLNA(商標)(Exiqon, Vedbaek, Denmark)を用いて最適化した。QuantStudio 12K Flexシステム(Life Technologies, USA)を使用して、最終的な測定を実行した。

【0091】

個々のマイクロRNAの発現分析

TaqMan MicroRNA Assayプロトコール(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)に従い、遺伝子に特異的なプライマーを使用して、総RNAから相補性DNAを合成した。逆転写酵素反応を行うため、RNA試料10ng、50nMのステムループRTプライマー、RT緩衝液×1、各dNTP0.25mM、MultiScribe逆転写酵素3.33Uμl⁻¹、及びRNase阻害剤0.25Uμl⁻¹(いずれも、TaqMan マイクロRNA Reverse Transcription Kitより、Applied Biosystems製、Foster City, CA, USA)を使用した。反応混合物(10μl)を、16℃で30分間、42℃で30分間、85℃で5分間インキュベートし、続いて4℃にて保持した(T100(商標)Thermal Cycler; Bio-Rad, Hercules, CA, USA)。QuantStudio 12K Flex リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)を使用して、リアルタイムPCRを実行した。PCR反応混合物20μl中には、RT製品1.33μl、1×TaqMan(NoUmpErase UN

G) Universal PCR Master Mix 及びプライマー 1 μ l、ならびに TaqMan MicroRNA Assay キットのプローブミックス (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) が含まれていた。反応物を 96 ウェルの光学プレートで 95 にて 10 分間インキュベートし、続いて、95 にて 15 秒間、及び 60 にて 1 分間のインキュベートを 40 サイクル行った。使用したマイクロRNA アッセイは miR-574-3p (ID: 002349)、miR-29a-3p (ID: 002112)、miR-497-5p (ID: 001043)、miR-29c-3p (ID: 000587)、miR-99b-5p (ID: 000436)、miR-195-5p (ID: 000494)、miR-28-5p (ID: 000411)、miR-30a-3p (ID: 000416)、miR-146b-5p (ID: 001097)、miR-34a-3p (ID: 002316)、miR-140-3p (ID: 002234)、miR-125a-5p (ID: 002198)、miR-423-5p (ID: 002340)、miR-125b-5p (ID: 000449)、miR-28-3p (ID: 002446)、miR-125b-2-3p (ID: 002158) である。基準遺伝子の定量には、RNU38B (ID: 001004) 及び RNU48 (ID: 001006) の、2 とおりのアッセイを使用した。

10

【0092】

データ分析

閾値サイクルデータを、SDS 2.0.1 ソフトウェア (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で計算した。個々のマイクロRNA リアルタイム PCR 反応をいずれも 3 回ずつ実行した。測定された全ての miRNA の平均発現量を、グローバルマイクロRNA の発現プロファイリングでは RNU38B を使用し、個々のマイクロRNA の測定においては RNU38B と RNU48 との平均を用いて正規化した。続いて、発現量を $2^{-\Delta C_t}$ 方法により分析した。Exiqon 製 miRNA Ready-to-Use PCR Panel に付属している 6 種の可能な遺伝子による標準 gene Norm アルゴリズム及び Norm Finder アルゴリズムを併用して、RNU38B (SNORD38B) を内在性対照として選択した。1 群中の平均 Ct (閾値サイクル) が 35 未満である miRNA のみを、統計的評価の対象とした。P. acnes 陽性例及び P. acnes 陰性例中、分析された miRNA のレベル間の統計的差異をノンパラメトリックのマン・ホイットニー検定で評価し、多重仮説検定用に Benjamini-Hochberg 補正を施した。個々のマイクロRNA の発現量を、2 つの基準遺伝子 (RNU38B、及び RNU48) の平均値に対して相対的に定量した。Ct (RNU38B) > 34 且つ / あるいは Ct (RNU48) > 31 に該当する試料を、本研究から除外した。診断マイクロRNA スコア (DMS) 式を、miR-29a-3p 及び miR-574-3p 発現量の線型組み合わせに基づいて作成した。ROC 分析を通して、P. acnes 陽性例と P. acnes 陰性例とを判別するための最適なカットオフ値を得た。GraphPad Prism バージョン 7.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用して計算を行った。0.05 未満の P 値は、統計的に有意であると見なされた。

20

30

【0093】

40

【表 6】

表 2 : m i R N A

hsa-miR-7-5p	hsa-miR-369-5p	hsa-miR-302c-3p	
hsa-miR-217	hsa-miR-425-5p	hsa-miR-625-3p	
hsa-miR-337-5p	hsa-miR-590-5p	hsa-miR-339-5p	
hsa-miR-328-3p	hsa-miR-760	hsa-miR-873-5p	
hsa-miR-374b-3p	hsa-miR-574-3p	hsa-miR-323a-3p	
hsa-miR-143-3p	hsa-miR-130b-3p	hsa-miR-181d-5p	
hsa-miR-623	hsa-miR-30c-5p	hsa-miR-125a-5p	
hsa-miR-520c-3p	hsa-miR-133b	hsa-miR-129-5p	10
hsa-miR-557	hsa-miR-524-5p	hsa-miR-492	
hsa-miR-218-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-20a-5p	
hsa-miR-136-5p	hsa-miR-193b-3p	hsa-miR-374b-5p	
hsa-miR-127-5p	hsa-miR-501-5p	hsa-miR-302d-3p	
hsa-miR-140-5p	hsa-miR-518c-5p	hsa-miR-346	
hsa-miR-31-3p	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-151a-3p	
hsa-miR-20b-3p	hsa-miR-933	hsa-miR-493-3p	
hsa-miR-325	hsa-miR-379-5p	hsa-miR-122-5p	
hsa-miR-509-3-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-99a-3p	
hsa-miR-210-3p	hsa-miR-589-5p	hsa-miR-361-5p	
hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-141-3p	hsa-miR-202-3p	20
hsa-miR-194-5p	hsa-miR-342-3p	hsa-miR-125b-5p	
hsa-let-7g-5p	hsa-miR-668-3p	hsa-miR-503-5p	
hsa-miR-203a	hsa-miR-934	hsa-miR-204-5p	
hsa-miR-181a-3p	hsa-miR-101-3p	hsa-miR-30d-5p	
hsa-miR-137	hsa-miR-539-5p	hsa-miR-301a-3p	
hsa-miR-551b-3p	hsa-miR-331-3p	hsa-miR-362-5p	
hsa-miR-524-3p	hsa-miR-499a-5p	hsa-miR-30b-3p	
hsa-miR-486-5p	hsa-miR-196a-5p	hsa-miR-654-5p	
hsa-miR-329-3p	hsa-miR-888-5p	hsa-miR-545-3p	
hsa-miR-487b-3p	hsa-miR-330-3p	hsa-miR-29b-2-5p	
cel-miR-39-3p	hsa-miR-570-3p	hsa-miR-491-5p	
hsa-miR-138-5p	hsa-miR-518c-3p	hsa-miR-92b-3p	30
hsa-miR-191-5p	hsa-miR-200a-3p	hsa-miR-665	
mmu-miR-378a-3p	hsa-miR-188-5p	hsa-miR-506-3p	
hsa-miR-103a-3p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-363-3p	
hsa-miR-890	hsa-miR-99b-5p	hsa-miR-132-3p	
hsa-miR-423-5p	hsa-miR-431-5p	hsa-miR-651-5p	
hsa-miR-221-3p	hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-628-3p	
hsa-miR-301b	hsa-miR-367-3p	hsa-miR-432-5p	
hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-505-3p	hsa-miR-154-3p	
hsa-miR-532-5p	hsa-miR-18a-5p	hsa-miR-27a-3p	
hsa-miR-99a-5p	hsa-miR-92a-3p	hsa-miR-376c-3p	
hsa-miR-16-5p	hsa-miR-500a-5p	hsa-miR-940	40
hsa-miR-98-5p	hsa-miR-887-3p	hsa-miR-22-5p	
hsa-miR-185-5p	hsa-miR-491-3p	hsa-miR-224-5p	
hsa-miR-25-3p	hsa-miR-423-3p	hsa-miR-885-5p	
hsa-miR-765	hsa-miR-126-3p	hsa-miR-320a	
hsa-miR-24-3p	hsa-miR-421	hsa-miR-18b-5p	
	hsa-miR-376b-3p	hsa-miR-187-3p	

hsa-miR-516b-5p	hsa-miR-129-2-3p	hsa-miR-512-5p	
hsa-miR-302c-5p	hsa-miR-26b-5p	hsa-miR-449a	
hsa-miR-548b-3p	hsa-miR-214-3p	hsa-miR-498	
hsa-miR-186-5p	hsa-miR-32-5p	hsa-miR-148b-3p	
hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-324-3p	hsa-miR-127-3p	
hsa-miR-155-5p	hsa-miR-488-3p	hsa-miR-598-3p	
hsa-miR-107	hsa-miR-371a-5p	hsa-miR-96-5p	
hsa-miR-302b-3p	hsa-miR-455-5p	hsa-let-7d-5p	
hsa-miR-662	hsa-miR-891a-5p	hsa-miR-135b-5p	
hsa-miR-519d-3p	hsa-miR-549a	hsa-miR-495-3p	
hsa-miR-485-3p	hsa-miR-205-5p	hsa-miR-299-5p	10
hsa-miR-200b-3p	hsa-miR-518b	hsa-miR-34c-3p	
hsa-miR-337-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-596	
hsa-miR-494-3p	hsa-miR-150-5p	hsa-miR-744-5p	
hsa-miR-371a-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-145-5p	
hsa-miR-637	hsa-let-7d-3p	hsa-miR-622	
hsa-miR-144-3p	hsa-miR-608	hsa-miR-516a-5p	
hsa-miR-16-1-3p	hsa-miR-671-5p	hsa-let-7a-5p	
hsa-miR-631	hsa-miR-497-5p	hsa-miR-96-3p	
hsa-miR-34c-5p	hsa-miR-877-5p	hsa-miR-185-3p	
hsa-miR-211-5p	hsa-miR-187-5p	hsa-miR-615-3p	
hsa-miR-454-3p	hsa-miR-10b-5p	hsa-miR-128-3p	20
hsa-let-7f-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-766-3p	
hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-202-5p	hsa-miR-206	
hsa-miR-34a-5p	hsa-miR-652-3p	hsa-miR-298	
hsa-miR-663a	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-193a-5p	
hsa-miR-518e-3p	hsa-miR-30e-3p	hsa-miR-449b-5p	
hsa-miR-29b-3p	hsa-miR-181c-5p	hsa-miR-520d-5p	
hsa-miR-658	hsa-miR-9-3p	hsa-miR-192-5p	
hsa-miR-572	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-29a-3p	
hsa-miR-802	hsa-miR-152-3p	hsa-miR-18a-3p	
hsa-miR-521	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-383-5p	
hsa-miR-433-3p	hsa-miR-365a-3p	hsa-miR-9-5p	30
hsa-miR-660-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-142-5p	
hsa-let-7c-5p	hsa-miR-372-3p	hsa-miR-363-5p	
hsa-miR-28-5p	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-147b	
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-124-3p	hsa-miR-197-3p	
hsa-miR-219a-5p	hsa-miR-190a-5p	hsa-miR-597-5p	
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-302a-3p	hsa-miR-326	
hsa-miR-526b-5p	hsa-miR-595	hsa-miR-15b-5p	
hsa-miR-215-5p	hsa-miR-602	hsa-miR-105-5p	
hsa-miR-30b-5p	hsa-miR-223-3p	hsa-miR-196b-5p	
hsa-miR-184	hsa-miR-627-5p	hsa-miR-296-5p	
hsa-miR-422a	hsa-miR-34b-3p	hsa-miR-20b-5p	
hsa-miR-199a-3p	hsa-miR-410-3p	hsa-miR-147a	40
hsa-miR-335-5p	hsa-miR-17-5p	hsa-miR-198	
hsa-miR-519a-3p	hsa-miR-376a-3p	hsa-miR-375	
hsa-miR-21-5p	hsa-miR-514a-3p	hsa-miR-517a-3p	

hsa-miR-361-3p	hsa-miR-216b-5p	hsa-miR-25-5p	
hsa-miR-21-3p	hsa-miR-106b-5p	hsa-miR-922	
hsa-miR-373-3p	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-124-5p	
hsa-miR-518f-3p	hsa-miR-510-5p	hsa-miR-1264	
hsa-miR-222-3p	hsa-miR-212-3p	hsa-miR-504-5p	
hsa-miR-617	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-138-1-3p	
hsa-miR-154-5p	hsa-miR-542-5p	hsa-miR-502-3p	
hsa-miR-708-5p	hsa-miR-576-3p	hsa-miR-490-5p	
hsa-let-7b-5p	hsa-miR-583	hsa-miR-567	
hsa-miR-95-3p	hsa-miR-483-3p	hsa-miR-18b-3p	
hsa-miR-517c-3p	hsa-miR-582-5p	hsa-miR-125a-3p	10
hsa-miR-151a-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-653-5p	
hsa-miR-502-5p	hsa-miR-33b-5p	hsa-miR-891b	
hsa-miR-345-5p	hsa-miR-193a-3p	hsa-miR-144-5p	
hsa-miR-509-3p	hsa-miR-153-3p	hsa-miR-1538	
hsa-miR-134-5p	hsa-let-7e-5p	hsa-miR-384	
hsa-miR-382-5p	hsa-miR-409-3p	hsa-miR-196b-3p	
hsa-miR-490-3p	hsa-miR-100-5p	hsa-miR-649	
hsa-miR-200c-3p	hsa-miR-629-5p	hsa-miR-143-5p	
hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-484	hsa-miR-1207-5p	
hsa-miR-181b-5p	hsa-miR-429	hsa-miR-943	
hsa-miR-33a-5p	hsa-miR-30c-2-3p	hsa-miR-675-3p	20
hsa-miR-195-5p	hsa-miR-518a-3p	hsa-miR-200b-5p	
hsa-miR-874-3p	hsa-miR-340-5p	hsa-miR-519e-5p	
hsa-miR-135a-5p	hsa-miR-508-3p	hsa-miR-942-5p	
hsa-miR-26a-2-3p	hsa-miR-381-3p	hsa-miR-450b-3p	
hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-553	
hsa-miR-412-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-605-5p	
hsa-miR-1	hsa-miR-139-5p	hsa-miR-24-2-5p	
hsa-miR-299-3p	hsa-miR-373-5p	hsa-miR-23a-5p	
hsa-miR-142-3p	hsa-miR-149-5p	hsa-miR-27b-5p	
hsa-miR-338-3p	hsa-miR-642a-5p	hsa-miR-759	
hsa-miR-584-5p	hsa-miR-31-5p	hsa-miR-770-5p	30
hsa-miR-377-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-585-3p	
hsa-miR-216a-5p	hsa-miR-620	hsa-miR-376a-5p	
hsa-miR-424-5p	hsa-miR-27b-3p	hsa-miR-507	
hsa-miR-921	hsa-miR-523-3p	hsa-miR-520b	
hsa-miR-513a-5p	hsa-miR-374a-5p	hsa-miR-302f	
hsa-miR-140-3p	hsa-miR-92a-1-5p	hsa-miR-28-3p	
hsa-miR-181a-5p	hsa-miR-219a-1-3p	hsa-miR-875-5p	
hsa-miR-10a-5p	hsa-miR-1913	hsa-miR-219a-2-3p	
hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-1245a	hsa-miR-1183	
hsa-miR-182-5p	hsa-miR-522-3p	hsa-miR-758-3p	
hsa-miR-370-3p	hsa-miR-571	hsa-miR-1244	40
hsa-miR-576-5p	hsa-miR-323a-5p	hsa-miR-566	
hsa-miR-425-3p	hsa-miR-592	hsa-miR-1256	
hsa-miR-450a-5p	hsa-miR-487a-3p	hsa-miR-516a-3p	
hsa-miR-411-5p	hsa-miR-1249	hsa-miR-548c-5p	

hsa-miR-496	hsa-miR-621	hsa-miR-1260a	
hsa-miR-876-3p	hsa-miR-556-5p	hsa-miR-182-3p	
hsa-miR-532-3p	hsa-miR-1267	hsa-miR-365b-5p	
hsa-miR-654-3p	hsa-miR-141-5p	hsa-miR-508-5p	
hsa-miR-659-3p	hsa-miR-1269a	hsa-miR-671-3p	
hsa-miR-135b-3p	hsa-miR-501-3p	hsa-miR-941	
hsa-miR-641	hsa-miR-15b-3p	hsa-miR-23b-5p	
hsa-miR-2113	hsa-miR-146b-3p	hsa-miR-591	
hsa-miR-1254	hsa-miR-222-5p	hsa-miR-26b-3p	
hsa-miR-661	hsa-miR-601	hsa-miR-519b-3p	
hsa-miR-892a	hsa-miR-924	hsa-miR-30d-3p	10
hsa-miR-10b-3p	hsa-miR-29a-5p	hsa-miR-518d-5p	
hsa-miR-122-3p	hsa-let-7a-2-3p	hsa-miR-212-5p	
hsa-miR-100-3p	hsa-miR-520f-3p	hsa-miR-520e	
hsa-miR-769-3p	hsa-miR-101-5p	hsa-miR-646	
hsa-miR-300	hsa-miR-520a-3p	hsa-miR-519e-3p	
hsa-miR-518e-5p	hsa-miR-548m	hsa-miR-626	
hsa-miR-489-3p	hsa-miR-517-5p	hsa-miR-26a-1-3p	
hsa-miR-937-3p	hsa-miR-448	hsa-miR-190b	
hsa-miR-381-5p	hsa-miR-1296-5p	hsa-miR-1471	
hsa-miR-640	hsa-miR-1537-3p	hsa-miR-548l	
hsa-miR-148b-5p	hsa-miR-920	hsa-miR-586	20
hsa-miR-29c-5p	hsa-miR-1247-5p	hsa-miR-103b	
hsa-miR-499a-3p	hsa-miR-19b-2-5p	hsa-miR-488-5p	
hsa-let-7f-1-3p	hsa-miR-558	hsa-miR-129-1-3p	
hsa-miR-382-3p	hsa-miR-106b-3p	hsa-miR-192-3p	
hsa-miR-609	hsa-miR-1258	hsa-miR-632	
hsa-miR-10a-3p	hsa-miR-619-3p	hsa-miR-181a-2-3p	
hsa-miR-106a-3p	hsa-miR-208a-3p	hsa-miR-1909-3p	
hsa-let-7e-3p	hsa-miR-17-3p	hsa-miR-573	
hsa-miR-580-3p	hsa-miR-136-3p	hsa-miR-302d-5p	
hsa-miR-761	hsa-miR-877-3p	hsa-miR-194-3p	
hsa-miR-643	hsa-miR-935	hsa-miR-302b-5p	30
hsa-miR-618	hsa-miR-224-3p	hsa-miR-551b-5p	
hsa-miR-221-5p	hsa-miR-624-3p	hsa-miR-635	
hsa-miR-513b-5p	hsa-miR-767-5p	hsa-miR-518d-3p	
hsa-miR-411-3p	hsa-miR-559	hsa-miR-569	
hsa-miR-19a-5p	hsa-miR-449b-3p	hsa-miR-125b-1-3p	
hsa-miR-338-5p	hsa-miR-205-3p	hsa-miR-218-2-3p	
hsa-miR-1914-3p	hsa-miR-604	hsa-miR-519c-3p	
hsa-miR-323b-5p	hsa-miR-130b-5p	hsa-miR-554	
hsa-miR-548i	hsa-miR-149-3p	hsa-miR-938	
hsa-miR-541-3p	hsa-miR-1271-5p	hsa-miR-1243	
hsa-miR-1272	hsa-miR-520h	hsa-miR-708-3p	40
hsa-miR-1205	hsa-miR-769-5p	hsa-miR-1185-5p	
hsa-miR-544a	hsa-miR-612	hsa-miR-512-3p	
hsa-miR-431-3p	hsa-miR-1237-3p	hsa-miR-587	
	hsa-miR-1908-5p	hsa-miR-603	

hsa-miR-1184	hsa-miR-1255b-5p	hsa-miR-1200	
hsa-miR-20a-3p	hsa-miR-330-5p	hsa-miR-1911-5p	
hsa-miR-588	hsa-miR-1238-3p	hsa-miR-33b-3p	
hsa-miR-455-3p	hsa-miR-188-3p	hsa-miR-223-5p	
hsa-miR-582-3p	hsa-miR-589-3p	hsa-miR-34b-5p	
hsa-miR-409-5p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-888-3p	
hsa-miR-452-3p	hsa-miR-16-2-3p	hsa-miR-424-3p	
hsa-miR-19b-1-5p	hsa-miR-515-5p	hsa-miR-339-3p	
hsa-miR-610	hsa-miR-340-3p	hsa-miR-380-5p	
hsa-miR-511-5p	hsa-miR-513a-3p	hsa-miR-647	
hsa-miR-200c-5p	hsa-miR-34a-3p	hsa-miR-518f-5p	10
hsa-let-7a-3p	hsa-miR-342-5p	hsa-miR-92b-5p	
hsa-miR-135a-3p	hsa-miR-639	hsa-miR-551a	
hsa-miR-520a-5p	hsa-let-7i-3p	hsa-miR-146a-3p	
hsa-miR-1468-5p	hsa-miR-543	hsa-miR-218-1-3p	
hsa-miR-628-5p	hsa-miR-645	hsa-miR-593-5p	
hsa-miR-552-3p	hsa-miR-548d-5p	hsa-miR-561-3p	
hsa-miR-145-3p	hsa-miR-33a-3p	hsa-miR-767-3p	
hsa-miR-378a-5p	hsa-miR-664a-3p	hsa-miR-526b-3p	
hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-379-3p	hsa-miR-24-1-5p	
hsa-miR-181c-3p	hsa-miR-556-3p	hsa-let-7b-3p	
hsa-miR-195-3p	hsa-miR-614	hsa-miR-193b-5p	20
hsa-miR-578	hsa-miR-616-5p	hsa-miR-335-3p	
hsa-miR-505-5p	hsa-miR-93-3p	hsa-miR-541-5p	
hsa-miR-875-3p	hsa-miR-1972	hsa-miR-30c-1-3p	
hsa-miR-450b-5p	hsa-miR-616-3p	hsa-miR-629-3p	
hsa-miR-876-5p	hsa-miR-369-3p	hsa-miR-377-5p	
hsa-miR-362-3p	hsa-miR-2110	hsa-miR-630	
hsa-miR-624-5p	hsa-miR-548a-3p	hsa-miR-548d-3p	
hsa-miR-27a-5p	hsa-miR-634	hsa-miR-885-3p	
hsa-miR-744-3p	hsa-miR-320c	hsa-miR-320d	
hsa-miR-139-3p	hsa-miR-636	hsa-miR-2053	
hsa-miR-138-2-3p	hsa-miR-606	hsa-miR-675-5p	30
hsa-miR-655-3p	hsa-miR-208b-3p	hsa-miR-1252-5p	
hsa-miR-99b-3p	hsa-miR-367-5p	hsa-miR-548e-3p	
hsa-miR-581	hsa-miR-520d-3p	hsa-miR-1914-5p	
hsa-miR-191-3p	hsa-miR-1265	hsa-miR-513c-5p	
hsa-miR-32-3p	hsa-miR-1203	hsa-miR-331-5p	
hsa-miR-1204	hsa-miR-548k	hsa-miR-1182	
hsa-miR-548j-5p	hsa-miR-548a-5p	hsa-miR-611	
hsa-miR-555	hsa-miR-1253	hsa-miR-1181	
hsa-miR-1224-3p	hsa-miR-615-5p	hsa-miR-638	
hsa-miR-1539	hsa-miR-607	hsa-miR-515-3p	
hsa-miR-663b	hsa-miR-1208	hsa-miR-650	40
hsa-miR-1248	hsa-miR-302e	hsa-miR-1178-3p	
hsa-miR-889-3p	hsa-miR-1206	hsa-miR-600	
hsa-miR-1227-3p	hsa-miR-1270	hsa-miR-599	
hsa-miR-548h-5p	hsa-miR-525-3p	hsa-miR-520g-3p	

hsa-miR-564
 hsa-miR-132-5p
 hsa-miR-577
 hsa-miR-1911-3p
 hsa-let-7f-2-3p
 hsa-miR-155-3p
 hsa-miR-105-3p
 hsa-miR-486-3p
 hsa-miR-320b
 hsa-miR-296-3p

hsa-miR-7-2-3p
 hsa-miR-550a-3p
 hsa-miR-380-3p
 hsa-miR-593-3p
 hsa-miR-1912
 hsa-miR-493-5p
 hsa-miR-432-3p
 hsa-miR-454-5p
 hsa-miR-936
 hsa-miR-30a-3p
 hsa-let-7g-3p
 hsa-miR-214-5p

hsa-miR-183-3p
 hsa-miR-1179
 hsa-miR-562
 hsa-miR-579-3p
 hsa-miR-590-3p
 hsa-miR-130a-5p
 hsa-miR-563
 hsa-miR-200a-5p
 hsa-miR-483-5p
 hsa-miR-15a-3p
 hsa-miR-944
 hsa-miR-92a-2-5p
 hsa-miR-548 n

10

【 0 0 9 4 】

【 表 7 】

表6：培養による低含量P. acnes症例、及びPCRによる多様なレベルのP. acnesゲノム症例における、DMSの適用（標準の方法では結果が得られない場合）

ID	P. acnes 培養物 [CFU/ml]	培養の 結果	PCR [P. acnes ゲノ ム/500ng DNA]	PCR の結 果*	DMS 値	DMS の結 果	全ての 結果	DMS 補正後の P. acnes 診断
1	800	+	194	+	-0.31	+	+/-/+	陽性
2	800	+	0	-	1.20	-	+/-/-	偽陽性
3	800	+	1301	++	2.88	-	+/-+/-	偽陽性
4	700	+	618	++	-2.41	+	+/-+/-	陽性
5	600	+	392	+	-0.43	+	+/-/+	陽性
6	600	+	0	-	-3.62	+	+/-/+	陽性
7	600	+	193	+	-0.49	+	+/-/+	陽性
8	500	+	1155	++	-39.68	+	+/-+/-	陽性
9	500	+	348	+	-4.83	+	+/-/+	陽性
10	500	+	2361	++	0.36	-	+/-+/-	偽陽性
11	500	+	0	-	3.42	-	+/-/-	偽陽性
12	500	+	17	+	0.37	-	+/-/-	偽陽性
13	300	+	294	+	-1.84	+	+/-/+	陽性
14	300	+	0	-	6.26	-	+/-/-	偽陽性
15	300	+	0	-	-0.93	+	+/-/+	陽性
16	300	+	0	-	6.05	-	+/-/-	偽陽性
17	300	+	0	-	-0.44	+	+/-/+	陽性
18	200	+	271	+	0.07	+	+/-/+	陽性
19	200	+	191	+	-2.2	+	+/-/+	陽性
20	200	+	64	+	-2.86	+	+/-/+	陽性
21	200	+	0	-	6.57	-	+/-/-	偽陽性
22	200	+	0	-	2.52	-	+/-/-	偽陽性
23	200	+	0	-	4.18	-	+/-/-	偽陽性

20

30

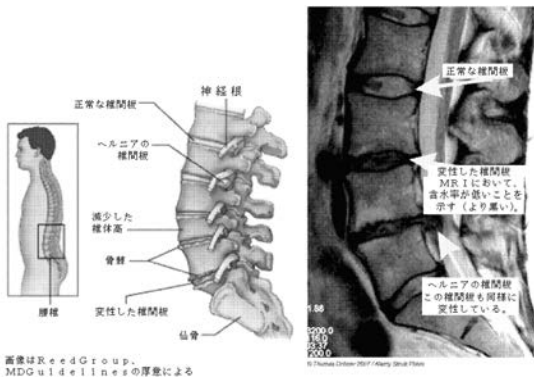
ID	P. acnes 培養物 [CFU/ml]	培養の 結果	PCR [P. acnes ゲノ ム/500ng DNA]	PCR の結果*	DMS 値	DMS の結果	全ての 結果	DMS 補正後の P. acnes 診断
24	200	+	0	-	-1.63	+	+/-/+	陽性
25	200	+	0	-	2.41	-	+/-/-	偽陽性
26	200	+	0	-	5.24	-	+/-/-	偽陽性
27	200	+	48	+	11.97	-	+/-/-	偽陽性
28	100	+	0	-	2.04	-	+/-/-	偽陽性
29	100	+	0	-	-1.08	+	+/-/+	陽性
30	100	+	213	+	1.1	-	+/-/-	偽陽性
31	100	+	0	-	-0.24	-	+/-/-	偽陽性
32	100	+	0	-	5.73	-	+/-/-	偽陽性
33	100	+	0	-	5.92	-	+/-/-	偽陽性
34	100	+	249	+	2.42	-	+/-/-	偽陽性
35	100	+	0	-	1.64	-	+/-/-	偽陽性
36	100	+	80	+	4.97	-	+/-/-	偽陽性
37	100	+	0	-	2.55	-	+/-/-	偽陽性
38	100	+	0	-	0.12	-	+/-/-	偽陽性
39	100	+	0	-	-0.35	+	+/-/+	陽性
40	0	-	1500	++	12.34	-	-/+/-	PCR で偽陽性
41	0	-	995	++	3.84	-	-/+/-	PCR で偽陽性
42	0	-	555	++	8.39	-	-/+/-	PCR で偽陽性
43	0	-	572	++	4.78	-	-/+/-	PCR で偽陽性
44	0	-	2046	++	-2.26	+	-/+/+	培養で偽陰性

*++は、CFU/ml が103を超えることを意味する。***は、P. acnes ゲノムの数が500を超えることを意味する。

10

20

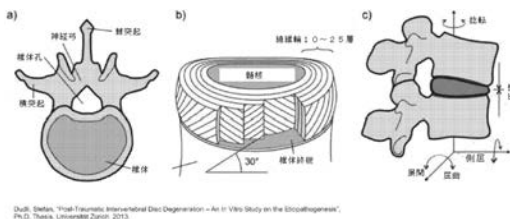
【図1】



【図2】

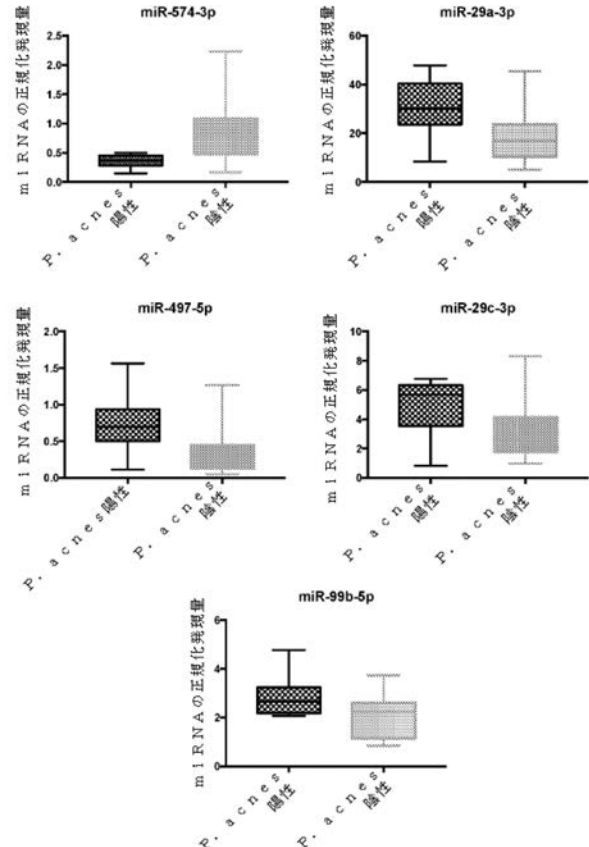


【図3】

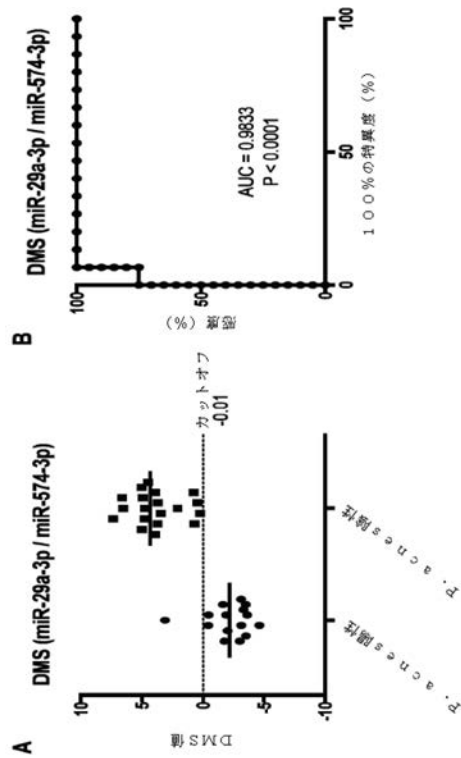


DuBo, Stefan, "Post-Traumatic Intervertebral Disc Degeneration - An In Vitro Study on the Etiopathogenesis", Ph.D. Thesis, Universität Zürich, 2013.

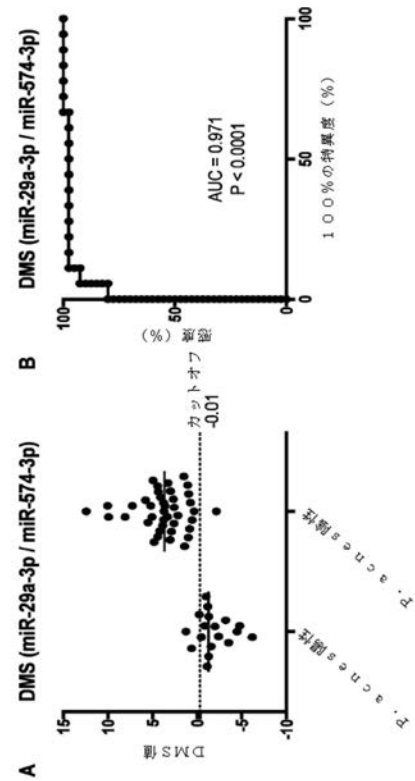
【図4】



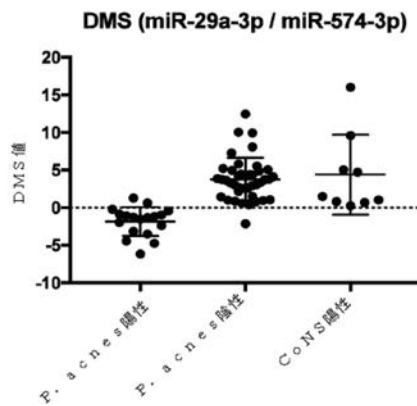
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 - 1 】

hsa-miR-125b-2-3p
 miRBase 受け入れ番号: MIMAT0004603
 UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC (配列番号: 21)

hsa-miR-99a-5p
 miRBase 受け入れ番号: MIMAT0000097
 AACCCGUAGAUCGACUUGUG (配列番号: 22)

hsa-miR-29a-3p
 miRBase 受け入れ番号: MIMAT0000086
 UAGCACCAUCUGAAUUGGUUA (配列番号: 23)

hsa-miR-99b-5p
 miRBase 受け入れ番号: MIMAT0000689
 CACCCGUAGAACCACUUGCG (配列番号: 24)

hsa-miR-125b-5p
 miRBase 受け入れ番号: MIMAT0000423
 UCCCUGAGACCUAACUUGUGA (配列番号: 25)

hsa-miR-28-3p
 miRBase 受け入れ番号: MIMAT0004502
 CACUAGAUUGAGCUCUUGGA (配列番号: 26)

【図 8 - 2】

hsa-miR-92b-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0003218
UAUUGCACUCGUCGCGGCCUCC (配列番号: 27)

hsa-miR-29c-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0000681
UAGCACCAUUUGAAUCGGUUA (配列番号: 28)

hsa-miR-497-5p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0002820
CAGCAGCACACUGUGGUUUGU (配列番号: 29)

hsa-miR-28-5p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0000085
AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG (配列番号: 30)

hsa-miR-125a-5p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0000443
UCCCUGAGACCCUUUAACCUUGUA (配列番号: 31)

hsa-miR-140-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0004597
UACCACAGGGUAGAACCACGG (配列番号: 32)

【図 8 - 4】

hsa-miR-34a-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0004457
CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU (配列番号: 39)

hsa-miR-423-5p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0004748
UGAGGGGCAGAGCGAGACUUU (配列番号: 40)

【図 8 - 3】

hsa-miR-574-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0003239
CAGGCUAUGCACACCCACA (配列番号: 33)

hsa-miR-16-2-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0004518
CCAAUAUUACUGUGCUGUUUA (配列番号: 34)

hsa-miR-30a-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0000088
CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC (配列番号: 35)

hsa-miR-146b-5p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0002809
UGAGAACUGAAUCCAUGGCU (配列番号: 36)

hsa-miR-195-5p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0000461
UAGCAGCACAGAAUAUUGGC (配列番号: 37)

hsa-let-7f-2-3p

m i R B a s e 受け入れ番号: MIMAT0004487
CUAUACAGUCUACUGUCUUUCC (配列番号: 38)

【配列表】

2018523492000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年12月8日(2016.12.8)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者における低毒性感染症の検出方法であって、

低毒性感染症の原因となる片利共生微生物が患者試料中に存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験することと、

前記試料由来の宿主細胞RNAプロファイルを特定することと、

前記RNAプロファイルを低毒性感染症を示すRNAシグニチャについて評価して、偽陽性及び/または偽陰性と真正の低毒性感染症とを判別することと

を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記患者が炎症状態の症状を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記炎症状態の症状が、変性椎間板疾患（DDD）、慢性腰痛（CLBP）、関節もしくは軟骨の炎症、インプラントもしくは補綴に付随する炎症、心内膜炎、感染の疑いのある静脈ポートシステム、または胃潰瘍、前立腺炎、前立腺癌から選択される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記試料が軟骨、または好気性環境からの組織もしくは細胞を含む、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記試料が椎間板組織である、請求項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記患者は椎間板手術がスケジュールされている、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記椎間板手術が、椎間板ヘルニアの修復、主腰椎固定手術、または主椎間板の関節形成術である、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記患者が慢性腰痛（CLBP）及び/または脊椎手術後疼痛症の既往歴を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記患者が偽関節症の既往歴を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

手術時に前記試料が採取される、請求項 5 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

手術に先立って前記試料が生検で採取される、請求項 5 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記試料の一部に *Propionibacterium acne* が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項 1 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記試料中に *Staphylococcus* 種、*Corynebacterium* 種、

Lactobacillus種、Pseudomonas種、Enterococcus種、Streptococcus種、Bacillus種、Citrobacter種、E.coli、Moraxella種、Haemophilus種、Neisseria種、Clostridium種、Enterobacter種、及びKlebsiella種のうちの1種以上が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項1～11のいずれか1項に記載の方法。

【請求項14】

前記試料の少なくとも一部が消化され、且つDNAが単離される、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

前記片利共生微生物のDNAが増幅される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

前記試料中の前記片利共生微生物（複数可）が、PCR、培養、免疫化学法、分光法、インサイチュ・ハイブリダイゼーションもしくはメタゲノム分析で検出または定量される、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記RNAシグニチャが、感染性臨床試料由来のRNAプロファイル及び非感染性臨床試料由来のRNAプロファイルでトレーニングされる、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

前記片利共生微生物の存在に対して試験結果が陽性（すなわち高含量）である臨床試料、及び前記片利共生微生物の存在に対して試験結果が陰性（すなわち低含量）である臨床試料由来のRNAプロファイル用いて、RNAシグニチャをトレーニングする、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記片利共生微生物が存在するかどうか、定量的PCRまたはシーケンシング（培養、免疫化学法、分光法もしくはインサイチュ・ハイブリダイゼーションの少なくとも1つを用いたもの）から任意選択的に選択される少なくとも2つの検出方法により判別される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記RNAシグニチャが、片利共生微生物及び非感染性細胞に感染した細胞培養からのRNAプロファイルでトレーニングされたクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項1～16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項21】

前記細胞培養がNP細胞である、請求項20に記載の方法。

【請求項22】

前記RNAシグニチャがマイクロRNAシグニチャである、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記RNAシグニチャが、長いノンコーディングRNAシグニチャであり、任意選択的にlncRNA、lincRNAまたはT-UCRの1つ以上を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記RNAシグニチャが、小型ノンコーディングRNAを含み、任意選択的にpiRNA、snRNA、snoRNA、及びcircRNAの1つ以上を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項25】

前記RNAシグニチャがmRNAシグニチャである、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記細胞が片利共生病原体にインビトロ感染する、請求項 20 または 21 に記載の方法。

【請求項 27】

慢性感染症をモデリングするため、前記細胞を少なくとも 1 週間インビトロ感染させる、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記 RNA シグニチャが、教師付き、教師無し、または半教師付きクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項 1 ~ 27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】

前記 RNA シグニチャが、100 以下の RNA、または 75 以下の RNA、または 50 以下の RNA、または 25 以下の RNA、または 10 以下の RNA、または 5 以下の RNA、または 4 以下の RNA の相対的発現を含む、請求項 1 ~ 28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】

前記 RNA シグニチャが、2 つまたは 3 つの RNA の相対的発現を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記 RNA が、表 2 から選択される miRNA である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 RNA が、表 4、表 5、または図 8 から選択される miRNA である、請求項 29 または 30 に記載の方法。

【請求項 33】

前記 RNA シグニチャが、miR-29a-3p 及び miR-574-3p の一方または両方の相対的発現量を含む、請求項 29 ~ 32 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 34】

手術時に陽性試料に対して局所抗生物質または消毒剤リンスが施される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 35】

手術に先立って陽性試料に対して経口または局所抗生物質レジメンが投与される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 36】

手術後に陽性試料に対して経口、IV または椎間抗生物質レジメンが投与される、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 37】

臨床組織試料中の片利共生微生物の低毒性感染症を検出する方法であって、前記方法が、

前記宿主組織中の miRNA プロファイルを検出することと、

低毒性感染症を示す miRNA シグニチャに対して前記 miRNA プロファイルを評価することと

を含み、

前記 miRNA シグニチャは、少なくとも 2 つの検出方法で前記片利共生微生物の存在に対して陽性（すなわち高含量）である組織試料由来の miRNA プロファイル、及び前記少なくとも 2 つの方法で前記片利共生微生物の存在に対して陰性（すなわち低含量）である組織試料由来の miRNA プロファイルを用いてトレーニングされる、前記方法。

【請求項 38】

前記検出方法が、核酸増幅、DNA シークエンシング、微生物培養、免疫化学法、分光法及びインサイチュ・ハイブリダイゼーションから選択される、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記検出方法が定量的PCR及び微生物培養である、請求項38に記載の方法。

【請求項40】

前記RNAシグニチャが、教師付き、教師無し、または半教師付きクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項37～39のいずれか1項に記載の方法。

【請求項41】

前記RNAシグニチャが、10以下のRNA、または5以下のRNA、または4以下のRNAの相対的発現を含む、請求項37～40のいずれか1項に記載の方法。

【請求項42】

前記RNAシグニチャが、2つまたは3つのRNAの相対的発現を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

前記RNAが、表2から選択されるmiRNAである、請求項41または42に記載の方法。

【請求項44】

前記RNAが、表4または表5から選択されるmiRNAである、請求項41または42に記載の方法。

【請求項45】

前記RNAシグニチャが、miR-29a-3p及びmiR-574-3pの一方または両方の相対的発現量を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項46】

前記患者が、慢性腰痛(CLP)、関節もしくは軟骨の炎症、インプラントもしくは補綴に付随する炎症、心内膜炎、感染の疑いのある静脈ポートシステム、または胃潰瘍から選択される炎症状態を有する、請求項37～45のいずれか1項に記載の方法。

【請求項47】

前記試料が軟骨、または好気性環境からの組織もしくは細胞を含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記試料が椎間板組織である、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記患者は椎間板手術がスケジュールされている、請求項48に記載の方法。

【請求項50】

前記椎間板手術が、椎間板ヘルニアの修復、主腰椎固定手術、または主椎間板の関節形成術である、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記患者が慢性腰痛(CLP)及び/または脊椎手術後疼痛症の既往歴を有する、請求項46～50のいずれか1項に記載の方法。

【請求項52】

前記患者が偽関節症の既往歴を有する、請求項46～50のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

手術時に前記試料が採取される、請求項37～52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項54】

手術に先立って前記試料が生検で採取される、請求項37～52のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

前記試料中にPropionibacterium acneが存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を更に試験する、請求項37～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項56】

前記試料中にStaphylococcus種、Corynebacterium種、Lactobacillus種、Pseudomonas種、Enterococcus

種、*Streptococcus*種、*Bacillus*種、*Citrobacter*種、*E. coli*、*Moraxella*種、*Haemophilus*種、*Neisseria*種、*Clostridium*種、*Enterobacter*種、及び*Klebsiella*種のうちの1種以上が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項37～54のいずれか1項に記載の方法。

【請求項57】

前記試料の一部が消化され、且つDNAが単離される、請求項47または48に記載の方法。

【請求項58】

DNAが増幅される、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

前記試料中の前記片利共生微生物（複数可）が、PCR、培養、免疫化学法、分光法、インサイチュ・ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、及びメタゲノム分析の1つ以上で検出または定量される、請求項55～58のいずれか1項に記載の方法。

【請求項60】

前記試料中に前記片利共生病原体が存在するかどうか他の技法では試験されない、請求項37に記載の方法。

【請求項61】

前記試料中に前記片利共生病原体が存在するかどうかPCR及び/または培養では試験されない、請求項37に記載の方法。

【請求項62】

手術時に陽性試料に対して局所抗生物質または消毒剤リンスが施される、請求項37に記載の方法。

【請求項63】

手術に先立って陽性試料に対して経口または局所抗生物質レジメンが投与される、請求項37に記載の方法。

【請求項64】

手術後に陽性試料に対して経口、IVまたは椎間抗生物質レジメンが投与される、請求項37に記載の方法。

【請求項65】

低毒性感染症の治療方法であって、低毒性感染症を有すると判定された患者に抗生物質を投与することを含み、前記低毒性感染症が、低毒性感染症の徴候を呈する部位からの細胞中の宿主細胞RNAシグニチャの存在によって検出され、前記RNAシグニチャが低毒性感染症を示す、前記方法。

【請求項66】

前記患者において前記片利共生微生物が存在することが、任意選択的にPCR、培養、または顕微鏡検査のうちの1つ以上で、低毒性感染症の症状を呈する部位から採取された試料中に検出される、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記抗生物質が局所的に前記部位に投与される、請求項65に記載の方法。

【請求項68】

前記抗生物質が全身的に投与される、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

前記RNAシグニチャは、少なくとも2つの検出方法で前記片利共生微生物に対して陽性である組織試料由来のRNAプロファイル、及び前記少なくとも2つの方法で前記片利共生微生物に対して陰性である組織試料由来のRNAプロファイルを用いて、トレーニングする、請求項65～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

前記検出方法が、核酸増幅、DNAシーケンシング、微生物培養、免疫化学法、分光法及びインサイチュ・ハイブリダイゼーションから選択される、請求項69に記載の方法

。

【請求項 7 1】

前記検出方法が定量的 P C R 及び微生物培養である、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記 R N A シグニチャが、教師付き、教師無し、または半教師付きクラシファイア・アルゴリズムを使用する、請求項 6 5 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記 R N A シグニチャが、1 0 以下の R N A、または 5 以下の R N A、または 4 以下の R N A の相対的発現を含む、請求項 6 5 ~ 7 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記 R N A シグニチャが、2 つまたは 3 つの R N A の相対的発現を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記 R N A が、表 2 から選択される m i R N A である、請求項 7 3 または 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記 R N A が、表 4 または表 5 から選択される m i R N A である、請求項 7 3 または 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記核酸シグニチャが、m i R - 2 9 a - 3 p 及び m i R - 5 7 4 - 3 p の一方または両方の相対的発現量を含む、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記患者が、慢性腰痛 (C L B P)、関節もしくは軟骨の炎症、インプラントもしくは補綴に付随する炎症、心内膜炎、感染の疑いのある静脈ポートシステム、または胃潰瘍から選択される炎症状態の症状を有する、請求項 6 5 ~ 7 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記試料が軟骨、または好気性環境からの組織もしくは細胞を含む、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記試料が椎間板組織である、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記患者は椎間板手術がスケジュールされている、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記椎間板手術が、椎間板ヘルニアの修復、主腰椎固定手術、または主椎間板の関節形成術である、請求項 8 1 に記載の方法。

【請求項 8 3】

前記患者が慢性腰痛 (C L B P) 及び / または脊椎手術後疼痛症の既往歴を有する、請求項 7 8 ~ 8 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記患者が偽関節症の既往歴を有する、請求項 7 8 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法

。

【請求項 8 5】

手術時に前記試料が採取される、請求項 7 8 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 6】

手術に先立って前記試料が生検で採取される、請求項 7 8 ~ 8 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記試料中に *Propionibacterium acne* が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を更に試験する、請求項 6 5 ~ 8 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記試料中に *Staphylococcus* 種、*Corynebacterium* 種、*Lactobacillus* 種、*Pseudomonas* 種、*Enterococcus* 種、*Streptococcus* 種、*Bacillus* 種、*Citrobacter* 種、*E. coli*、*Moraxella* 種、*Haemophilus* 種、*Neisseria* 種、*Clostridium* 種、*Enterobacter* 種、及び *Klebsiella* 種のうちの 1 種以上が存在するかどうかまたは前記試料中の濃度を試験する、請求項 65 ~ 87 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 89】

前記試料の一部が消化され、DNA が単離される、請求項 87 または 88 に記載の方法。

【請求項 90】

前記片利共生微生物の DNA が増幅される、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記試料中の前記片利共生微生物（類）が、PCR、培養、免疫化学法、分光法、インサイチュ・ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、及びメタゲノム分析の 1 つ以上で検出または定量される、請求項 87 ~ 90 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 92】

手術時に陽性試料に対して局所抗生物質が塗布される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 93】

手術に先立って陽性試料に対して経口または局所抗生物質レジメンが投与される、請求項 65 に記載の方法。

【請求項 94】

手術後に陽性試料に対して経口、IV または椎間抗生物質レジメンが投与される、請求項 65 に記載の方法

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2016/043295

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 15/11; C12N 15/113; C40B 40/06; C40B 40/08 (2016.01)

CPC - C12N 15/1072; C12N 15/11; C12N 15/111; C12N 15/113; C12Q 1/689; C40B 40/06 (2016.08)

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)

IPC - C12N 15/11; C12N 15/113; C40B 40/06; C40B 40/08

CPC - C12N 15/1072; C12N 15/11; C12N 15/111; C12N 15/113; C12Q 1/689; C40B 40/06; C40B 40/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC - 514044R; 435/6.12; 506/16 (keyword delimited)

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

Orbit, Google Patents, Google Scholar.

Search terms used: method, process, system, detection, microbiome, microbiota, commensal, low virulence, disc, spine, spinal, surgery, antibiotic, antimicrobial, infection, inflammation, treatment, signature, profile, amplification, culture, PCR, miRNA, miR 29a, 574, supervised, algorithm

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2014/0377278 A1 (ELINAV et al) 25 December 2014 (25.12.2014) entire document	1-3, 85-71, 92-94
Y		4, 37-40, 45, 60-64, 77, 80-82
Y	ALBERT et al. "Does nuclear tissue infected with bacteria following disc herniations lead to Modic changes in the adjacent vertebrae?" Eur Spine J. 10 February 2013 (10.02.2013), Vol. 22, No. 4, Pgs. 690-696. entire document	4, 80-82
Y	US 2013/0225440 A1 (THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA) 29 August 2013 (29.08.2013) entire document	37-40, 45, 60-64
Y	HEIKKINEN et al. "Prediction of microRNA targets in <i>Caenorhabditis elegans</i> using a self-organizing map," Bioinformatics, 21 March 2011 (21.03.2011), Vol. 27, No. 9, Pgs. 1247-1254. entire document	40
Y	US 2007/0065844 A1 (GOLUB et al) 22 March 2007 (22.03.2007) entire document	45, 77
A	ALBERT et al. "Antibiotic treatment in patients with chronic low back pain and vertebral bone edema (Modic type 1 changes): a double-blind randomized clinical controlled trial of efficacy," Eur Spine J. 13 February 2013 (13.02.2013), Vol. 22, No. 4, Pgs. 697-707. entire document	1-4, 37-40, 45, 60-71, 77, 80-82, 92-94
A	US 2009/0150084 A1 (COLWELL et al) 11 June 2009 (11.06.2009) entire document	1-4, 37-40, 45, 60-71, 77, 80-82, 92-94



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

05 October 2016

Date of mailing of the international search report

24 OCT 2016

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/043295

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-36, 41-44, 46-50, 72-76, 78, 79, 83-91
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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:

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.:

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.

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 M	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z N A Z	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 スレイビー オンドレイ

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア ラホヤ プロスペクト ストリート 8 8 8 ス
イート 2 0 0 シーノオー ディシティスディーエックス インコーポレイテッド

F ターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ02 QQ42 QQ52 QR08 QR42 QR62 QS25
QS32 QS34 QX01 QX02

专利名称(译)	检测和治疗低毒性传染病的方法		
公开(公告)号	JP2018523492A	公开(公告)日	2018-08-23
申请号	JP2018523366	申请日	2016-07-21
[标]发明人	カプール マヌ スレイビー オンドレイ		
发明人	カプール マヌ スレイビー オンドレイ		
IPC分类号	C12Q1/686 C12Q1/6837 C12Q1/6841 C12Q1/6874 G01N33/569 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/689 A61K31/546 A61K31/7056 A61K38/14 C12N15/113 C12N2310/141 C12N2320/10 C12Q2600/178 Y02A50/473		
FI分类号	C12Q1/686.Z C12Q1/6837.Z C12Q1/6841 C12Q1/6874.Z G01N33/569 G01N33/53.M C12N15/09.ZNA. Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063 /QR42 4B063/QR62 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX02		
优先权	62/196508 2015-07-24 US		
其他公开文献	JP2018523492A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种通过区分真实和假阳性来检测患者中的低毒性传染病的方法。该方法涉及测试患者样品中共生微生物的存在或量，特别是共生微生物可以是低毒性感染的原因。当测试一个共生微生物，由于样品污染检测到数由于频繁误报，还进行了测试，以确定这些假阳性和真实性的慢性感染。根据本发明，通过评估来自样品的核酸谱确定假阳性。点域6

FIGURE 6

