

(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2013-509593

(P2013-509593A)

(43) 公表日 平成25年3月14日(2013.3.14)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|------------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 D | 2GO45 |
| C 1 2 Q 1/48 (2006.01) | C 1 2 Q 1/48 ZNA | 4BO63 |
| C 1 2 Q 1/26 (2006.01) | C 1 2 Q 1/26 | 4HO45 |
| GO 1 N 33/535 (2006.01) | GO 1 N 33/53 F | |
| GO 1 N 33/48 (2006.01) | GO 1 N 33/535 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 142 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|----------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2012-537132 (P2012-537132) | (71) 出願人 | 599132904 |
| (86) (22) 出願日 | 平成22年10月29日 (2010.10.29) | | ネステク ソシエテ アノニム |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成24年6月27日 (2012.6.27) | | スイス国, ブベイ, アブニュー ネスレ |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2010/054810 | | 55 |
| (87) 国際公開番号 | W02011/053831 | (74) 代理人 | 100088155 |
| (87) 国際公開日 | 平成23年5月5日 (2011.5.5) | | 弁理士 長谷川 芳樹 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/256, 717 | (74) 代理人 | 100114270 |
| (32) 優先日 | 平成21年10月30日 (2009.10.30) | | 弁理士 黒川 朋也 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100128381 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/264, 588 | | 弁理士 清水 義憲 |
| (32) 優先日 | 平成21年11月25日 (2009.11.25) | (74) 代理人 | 100107456 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | 弁理士 池田 成人 |
| (31) 優先権主張番号 | 61/326, 176 | (74) 代理人 | 100140453 |
| (32) 優先日 | 平成22年4月20日 (2010.4.20) | | 弁理士 戸津 洋介 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 過敏性腸症候群の診断方法

(57) 【要約】

本発明は、IBSを診断、予後及びサブタイプする新規のバイオマーカー、キット及び方法を提供する。本明細書中に同定される新規のIBSバイオマーカーの血清レベルを検出することによって、過敏性腸症候群の診断を補助する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

（a）試料中に存在するIBSマーカーが前記IBSマーカーとIBSマーカー結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をIBSマーカー結合部分と接触させること；及び

（b）前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するIBSマーカーのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法であり、

ここで、前記IBSマーカーが、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン-O-サルフェート、5-ヒドロキシインドール酢酸、5-HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB及びヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3Aからなる群から選択されるものとする、前記方法。

【請求項 2】

（c）試料中に存在するIBSマーカーのレベル又は濃度と対照レベル又は濃度とを比較することを更に含み、ここで、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するIBSマーカーのレベル又は濃度の差は、前記対象がIBSである可能性の増加を示すものであるものとする、請求項1に記載の前記方法。

【請求項 3】

対照レベル又は濃度が、健常対象からの血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーのレベル又は濃度である、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するIBSマーカーのレベル又は濃度の増加が、前記対象がIBSである可能性の増加を示す、請求項3に記載の方法。

【請求項 5】

対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するIBSマーカーの同一又は低減したレベル又は濃度が、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す、請求項3に記載の方法。

【請求項 6】

対照レベル又は濃度が、IBSの対象からの血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーのレベル又は濃度である、請求項2に記載の方法。

【請求項 7】

対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するIBSマーカーの同一又は増加したレベル又は濃度が、前記対象がIBSである可能性の増加を示す、請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するIBSマーカーの低減したレベル又は濃度が、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す、請求項6に記載の方法。

【請求項 9】

IBSマーカーが糖鎖欠損トランスフェリンである、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

IBSマーカーがウロコルチンである、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

IBSマーカーが副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

10

20

30

40

50

I B S マーカーがコルチゾールである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

I B S マーカーが副腎皮質刺激ホルモンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

I B S マーカーがサブスタンス P である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

I B S マーカーが神経成長因子である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

I B S マーカーがニューロキニン A である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法 10

【請求項 1 7】

I B S マーカーがニューロキニン B である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法

【請求項 1 8】

I B S マーカーが血管作動性腸管ペプチドである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

I B S マーカーがグルカゴン様ペプチド 2 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 2 0】

I B S マーカーがモチリンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

I B S マーカーが下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

I B S マーカーがセロトニンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

I B S マーカーがトリプトファンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

I B S マーカーがセロトニン - O - サルフェートである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 2 5】

I B S マーカーが 5 - ヒドロキシインドール酢酸である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 6】

I B S マーカーが 5 - H T グルクロニドである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 7】

I B S マーカーがチロシンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 2 8】

I B S マーカーがフェニルアラニンである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法

【請求項 2 9】

I B S マーカーが U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 0】

I B S マーカーがセロトニン再取り込み輸送体である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 1】

I B S マーカーがトリプトファンヒドロキシラーゼ 1 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ A である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 3】

I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ B である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

I B S マーカーがヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター 3 A である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 5】

対象が I B S の疑いがある、請求項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

結合部分が抗体を含む、請求項 1 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 7】

酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

E L I S A がサンドイッチ E L I S A である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

対象からの生物試料中の少なくとも 1 種の追加のバイオマーカーのレベル又は濃度を決定することを更に含み、前記バイオマーカーが、脳由来神経栄養因子（B D N F）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（N G A L）、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子（T W E A K）、成長関連癌遺伝子（G R O - ）、インターロイキン - 1（I L - 1）、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 1（T I M P - 1）、抗 Saccharomyces cerevisiae 抗体（A S C A - I g A）、抗 C B i r - 1 抗体（C B i r 1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（A N C A）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A（t T G）、ヒスタミン、トリプターゼ、プロスタグランジン E₂（P G E₂）及びこれらの組合せからなる群から選択されるものとする、請求項 1 ~ 3 8 のいずれか一項に記載の前記方法。

20

【請求項 4 0】

（d）対象における少なくとも 1 種の症状の存在又は重症度を同定することによって、前記対象についての症状プロファイルを決定すること；及び

（e）I B S バイオマーカーのレベル及び症状プロファイルに基づくアルゴリズムを使用して、対象が I B S であること又は I B S でないことを診断すること；

を更に含む、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 4 1】

前記少なくとも 1 種の症状が、胸痛、胸部不快感、胸焼け、普通量の食事後の不快な膨満感、普通量の食事の完食不能、腹痛、腹部不快感、便秘、下痢、鼓脹、腹部膨満、疼痛又は不快感を有することに伴う消極的な思考又は感情及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 4 0 に記載の方法。

40

【請求項 4 2】

前記少なくとも 1 種の症状の存在又は重症度が、質問票を使用して同定される、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 3】

I B S バイオマーカーのレベルに基づくアルゴリズムを使用することを含み、請求項 1 ~ 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 4】

アルゴリズムがシステムプロファイルに更に基づく、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記統計的アルゴリズムが学習統計的分類子システムを含む、請求項 4 3 又は 4 4 に記

50

載の方法。

【請求項 4 6】

前記統計的アルゴリズムが、少なくとも 2 種の学習統計的分類子システムの組合せを含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

少なくとも 2 種の学習統計的分類子システムの組合せが、ランダムフォレスト分類子及びニューラルネットワーク分類子を含む、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

対象が I B S である確率を提供することを更に含む、請求項 1 ~ 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 4 9】

I B S 便秘型 (I B S - C)、I B S 下痢型 (I B S - D)、I B S 混合型 (I B S - M)、I B S 交替型 (I B S - A) 又は感染後 I B S (I B S - P I) として、I B S の診断を分類することを更に含む、請求項 1 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

I B S でない対象を I B D である、I B D でない、又は健常対象であるとして診断することを更に含む、請求項 4 0 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

対象における過敏性腸症候群 (I B S) の進行又は後退をモニタリングする方法であって：

20

(a) 試料中に存在する I B S マーカーが前記 I B S マーカーと I B S マーカー結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、1 回目に対象から採取された第 1 の血液又は血清試料を、I B S マーカー結合部分と接触させること；

(b) 前記複合体のレベルを決定し、これによって第 1 の試料中に存在する I B S マーカーのレベルを決定すること；

(c) 試料中に存在する I B S マーカーが前記 I B S マーカーと I B S マーカー結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、2 回目に対象から採取された第 2 の血液又は血清試料を、I B S マーカー結合部分と接触させること；

(d) 前記複合体のレベルを決定し、これによって第 2 の試料中に存在する I B S マーカーのレベルを決定すること；及び

30

(e) 第 1 の試料中に存在する I B S マーカーのレベルと第 2 の試料中に存在する I B S マーカーのレベルとを比較すること；

を含む前記方法であり、

ここで、第 2 の試料中の I B S マーカーのレベルが第 1 の試料と比べて高ければ、対象における I B S の進行を示し、第 2 の試料中の I B S マーカーのレベルが第 1 の試料に比べて低ければ、対象における I B S の後退を示すものとし、そして

I B S マーカーが、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A からなる群から選択されるものとする、前記方法。

40

【請求項 5 2】

I B S マーカーが糖鎖欠損トランスフェリンである、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

I B S マーカーがウロコルチンである、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 4】

50

- I B S マーカーが副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 5 5】
I B S マーカーがコルチゾールである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 5 6】
I B S マーカーが副腎皮質刺激ホルモンである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 5 7】
I B S マーカーがサブスタンス P である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 5 8】
I B S マーカーが神経成長因子である、請求項 5 1 に記載の方法。 10
- 【請求項 5 9】
I B S マーカーがニューロキニン A である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 0】
I B S マーカーがニューロキニン B である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 1】
I B S マーカーが血管作動性腸管ペプチドである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 2】
I B S マーカーがグルカゴン様ペプチド 2 である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 3】
I B S マーカーがモチリンである、請求項 5 1 に記載の方法。 20
- 【請求項 6 4】
I B S マーカーが下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 5】
I B S マーカーがセロトニンである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 6】
I B S マーカーがトリプトファンである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 7】
I B S マーカーがセロトニン - O - サルフェートである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 6 8】
I B S マーカーが 5 - ヒドロキシインドール酢酸である、請求項 5 1 に記載の方法。 30
- 【請求項 6 9】
I B S マーカーが 5 - H T グルクロニドである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 0】
I B S マーカーがチロシンである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 1】
I B S マーカーがフェニルアラニンである、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 2】
I B S マーカーが U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6 である、請求項 5 1 に記載の方法。 40
- 【請求項 7 3】
I B S マーカーがセロトニン再取り込み輸送体である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 4】
I B S マーカーがトリプトファンヒドロキシラーゼ 1 である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 5】
I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ A である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 6】
I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ B である、請求項 5 1 に記載の方法。
- 【請求項 7 7】 50

I B S マーカーがヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター 3 A である、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 7 8】

結合部分が抗体を含む、請求項 5 1 ~ 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）である、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

E L I S A がサンドイッチ E L I S A である、請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

対象からの生物試料中の少なくとも 1 種の追加のバイオマーカーのレベルを決定することを更に含み、前記バイオマーカーが、脳由来神経栄養因子（B D N F）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（N G A L）、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子（T W E A K）、成長関連癌遺伝子（G R O - ）、インターロイキン - 1（I L - 1）、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 1（T I M P - 1）、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体（A S C A - I g A）、抗 C B i r - 1 抗体（C B i r 1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（A N C A）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A（t T G）、ヒスタミン、 - トリプターゼ、プロスタグランジン E₂（P G E₂）及びこれらの組合せからなる群から選択されるものとする、請求項 5 1 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の前記方法。

10

【請求項 8 2】

対象における少なくとも 1 種の症状の存在又は重症度を同定することによって、前記対象についての症状プロファイルを決することを更に含む、請求項 5 1 に記載の方法。

20

【請求項 8 3】

前記少なくとも 1 種の症状が、胸痛、胸部不快感、胸焼け、普通量の食事後の不快な膨満感、普通量の食事の完食不能、腹痛、腹部不快感、便秘、下痢、鼓脹、腹部膨満、疼痛又は不快感を有することに伴う消極的な思考又は感情及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

I B S バイオマーカーのレベルに基づくアルゴリズムを使用することを含み、請求項 5 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

アルゴリズムがシステムプロファイルに更に基づく、請求項 8 4 に記載の方法。

30

【請求項 8 6】

前記アルゴリズムが統計的アルゴリズムを含む、請求項 8 4 又は 8 5 に記載の方法。

【請求項 8 7】

前記統計的アルゴリズムが学習統計的分類子システムを含む、請求項 8 6 に記載の方法

。

【請求項 8 8】

前記統計的アルゴリズムが、少なくとも 2 種の学習統計的分類子システムの組合せを含む、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

少なくとも 2 種の学習統計的分類子システムの組合せが、ランダムフォレスト分類子及びニューラルネットワーク分類子を含む、請求項 8 8 に記載の方法。

40

【請求項 9 0】

過敏性腸症候群（I B S）の治療に有用な薬物を服用する対象において薬物の効力をモニタリングすることを含み、請求項 5 1 ~ 8 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 1】

1 種以上のプロセッサを制御して対象からの血液又は血清試料が過敏性腸症候群（I B S）と関連するか否かを分類するコードを含むコンピュータ読取可能媒体であって、診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、前記診断マーカープロファイルに基づき前記試料を I B S 試料又は非 I B S 試料として分類する統計的に導

50

出される判定を生成するための指示を前記コードが含み、

ここで、前記診断マーカープロファイルは、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン-O-サルフェート、5-ヒドロキシインドール酢酸、5-HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB及びヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター3Aからなる群から選択される少なくとも1種の診断IBSマーカーのレベルを示すものとする、前記コンピュータ読取可能媒体。

【請求項92】

IBSマーカーが糖鎖欠損トランスフェリンである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項93】

IBSマーカーがウロコルチンである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項94】

IBSマーカーが副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質である、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項95】

IBSマーカーがコルチゾールである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項96】

IBSマーカーが副腎皮質刺激ホルモンである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項97】

IBSマーカーがサブスタンスPである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項98】

IBSマーカーが神経成長因子である、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項99】

IBSマーカーがニューロキニンAである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項100】

IBSマーカーがニューロキニンBである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項101】

IBSマーカーが血管作動性腸管ペプチドである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項102】

IBSマーカーがグルカゴン様ペプチド2である、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項103】

IBSマーカーがモチリンである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項104】

IBSマーカーが下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドである、請求項91に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項105】

10

20

30

40

50

I B S マーカーがセロトニンである、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 0 6】

I B S マーカーがトリプトファンである、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 0 7】

I B S マーカーがセロトニン - O - サルフェートである、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 0 8】

I B S マーカーが 5 - ヒドロキシインドール酢酸である、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

10

【請求項 1 0 9】

I B S マーカーが 5 - H T グルクロニドである、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 1 0】

I B S マーカーがチロシンである、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 1 1】

I B S マーカーがフェニルアラニンである、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 1 2】

I B S マーカーが U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6 である、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

20

【請求項 1 1 3】

I B S マーカーがセロトニン再取り込み輸送体である、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 1 4】

I B S マーカーがトリプトファンヒドロキシラーゼ 1 である、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 1 5】

I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ A である、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

30

【請求項 1 1 6】

I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ B である、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 1 7】

I B S マーカーがヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A である、請求項 9 1 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 1 8】

診断マーカープロファイルが、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ、プロスタグランジン E₂ (P G E₂) 及びこれらの組合せからなる群から選択される、対象からの生物試料中の少なくとも 1 種の追加の診断マーカーのレベルを示す、請求項 9 1 ~ 1 1 7 のいずれか一項に記載のコンピュータ読取可能媒体。

40

【請求項 1 1 9】

前記対象における少なくとも 1 種の症状の存在又は重症度を示す症状プロファイルと組み合わせて前記診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、前記診断マーカープロファイル及び前記症状プロファイルに基づき前記試料を I B S 試料又

50

は非 I B S 試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示を含む、請求項 9 1 ~ 1 1 8 のいずれか一項に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 2 0】

前記統計処理が、単一の学習統計的分類子システムを含む、請求項 1 1 9 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 2 1】

前記統計処理が、少なくとも 2 種の学習統計的分類子システムの組合せを含む、請求項 1 2 0 に記載のコンピュータ読取可能媒体。

【請求項 1 2 2】

少なくとも 2 種の学習統計的分類子システムの組合せが、ランダムフォレスト分類子及びニューラルネットワーク分類子を含む、請求項 1 2 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 2 3】

対象からの血清又は血液試料が過敏性腸症候群 (I B S) と関連するか否かを分類するシステムであって：

(a) 診断マーカープロファイルを含むデータセットを生成するように構成されたデータ収集モジュールであって、ここで、前記診断マーカープロファイルは、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A からなる群から選択される少なくとも 1 種の診断 I B S マーカーの存在又はレベルを示すものとする、前記データ収集モジュールと；

20

(b) 統計処理をデータセットに適用することによってデータセットを処理して、前記診断マーカープロファイルに基づき前記試料を I B S 試料又は非 I B S 試料として分類する統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュールと；

(c) 統計的に導出される判定を表示するように構成されたディスプレイモジュールと；

30

を含む、前記システム。

【請求項 1 2 4】

I B S マーカーが糖鎖欠損トランスフェリンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 2 5】

I B S マーカーがウロコルチンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 2 6】

I B S マーカーが副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 2 7】

I B S マーカーがコルチゾールである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

40

【請求項 1 2 8】

I B S マーカーが副腎皮質刺激ホルモンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 2 9】

I B S マーカーがサブスタンス P である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 0】

I B S マーカーが神経成長因子である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 1】

I B S マーカーがニューロキニン A である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 2】

50

I B S マーカーがニューロキニン B である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 3】

I B S マーカーが血管作動性腸管ペプチドである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 4】

I B S マーカーがグルカゴン様ペプチド 2 である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 5】

I B S マーカーがモチリンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 6】

I B S マーカーが下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

10

【請求項 1 3 7】

I B S マーカーがセロトニンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 8】

I B S マーカーがトリプトファンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 3 9】

I B S マーカーがセロトニン - O - サルフェートである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 0】

I B S マーカーが 5 - ヒドロキシインドール酢酸である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

20

【請求項 1 4 1】

I B S マーカーが 5 - H T グルクロニドである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 2】

I B S マーカーがチロシンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 3】

I B S マーカーがフェニルアラニンである、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 4】

I B S マーカーが U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6 である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 5】

I B S マーカーがセロトニン再取り込み輸送体である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

30

【請求項 1 4 6】

I B S マーカーがトリプトファンヒドロキシラーゼ 1 である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 7】

I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ A である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 8】

I B S マーカーがモノアミンオキシダーゼ B である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

【請求項 1 4 9】

I B S マーカーがヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A である、請求項 1 2 3 に記載のシステム。

40

【請求項 1 5 0】

診断マーカープロファイルが、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ、プロスタグランジン E 2 (P G E ₂) 及びこれらの組合せからなる群から選択される、対

50

象からの生物試料中の少なくとも1種の追加の診断マーカーのレベルを示す、請求項123～149のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項151】

前記対象における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を示す症状プロファイルと組み合わせて前記診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、前記診断マーカープロファイル及び前記症状プロファイルに基づき前記試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示を前記データ処理モジュールが含む、請求項123～150のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項152】

前記統計処理が、単一の学習統計的分類子システムを含む、請求項151に記載のシステム。 10

【請求項153】

前記統計処理が、少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せを含む、請求項152に記載のシステム。

【請求項154】

少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せが、ランダムフォレスト分類子及びニューラルネットワーク分類子を含む、請求項153に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0001】

本出願は、2009年10月30日に提出された米国仮出願第61/256,717号、2009年11月25日に提出された米国仮出願第61/264,588号及び2010年4月20日に提出された米国仮出願第61/326,176号の優先権を主張し、これらの全開示は、全ての目的のため、参照することによって本明細書中に組み込まれる。以下の文献も参照することにより本明細書中に組み込まれる：2007年8月14日に提出され、そして、2008年4月10日に公開された米国特許出願公開第2008/0085524号明細書；2007年8月20日に提出され、そして、2008年7月10日に公開された米国特許出願公開第2008/0166719号明細書。 20

【背景技術】

【0002】

過敏性腸症候群（IBS）は、全ての胃腸障害の中で最も一般的であり、総人口の10～20%が罹患し、消化不調の全患者の50%超を占める。しかしながら、研究により、IBSを罹患する者の約10～50%のみが実際に医学的治療を求めるにすぎないと示唆されている。IBSの患者は、異なる症状、例えば、主として排便と関連する腹痛、下痢、便秘又は交互に生じる下痢及び便秘、腹部膨張、ガス並びに便中の過剰な粘液などを示す。IBS患者の40%超は非常に激しい症状を示すため、仕事を休み、社会生活を削減し、性交を回避し、約束を取消し、旅行を中止し、薬剤投与を受け、更に、困惑の恐怖のために家に閉じこもらなければならない。米国で試算されたIBSの医療費は、年間当たり80億ドルである（Talley et al., Gastroenterol., 109:1736-1741 (1995)）。 30

【0003】

IBS患者は、それらの顕著な腸の症状に応じて以下の3つの群に分類される：便秘優勢型IBS（IBS-C）、下痢優勢型IBS（IBS-D）並びに下痢及び便秘が交互に生じるIBS（IBS-M）。現在の診療において、IBSの診断は、ローマIII基準に基づいており、そして、患者が示す症状（その他の胃腸障害を除く）による。この障害を同定するのに使用することのできる生物学的な、X線写真の、内視鏡の又は生理学的な特異的バイオマーカーは存在しない。 40

【0004】

過敏性腸症候群は、異種の（heterogeneous）胃腸（GI）機能障害である。その病因と免疫システムとの関与を指し示す証拠が増えている。胃腸感染症は、IBSの発症を引き起こす誘発要因であることがある。一方で、IBSはしばしば「脳-腸障害」と呼ばれ 50

る。5-HTシグナル経路の異常調節により媒介される分泌及びGI運動性における変化が、排便習慣における異常の基礎となることがある。結腸神経に近接する肥胖細胞の活性化は、IBSを罹患する患者により経験される異常痛覚と関連している。肥胖細胞は、活性化の際に、種々の炎症性メディエーターを生成及び放出できることがよく知られている。しかしながら、これらの種々の経路がどのように互いに伝達するのか、そして、これらの相互作用がIBS患者と健康な対象との間で同じように挙動するのかどうか、ということとは不明である。

【0005】

IBSの正確な病態生理は、よく理解されていない。それにもかかわらず、末梢感作として公知の、内臓疼痛知覚に対する感受性の増大が存在する。この感作は、モノアミン（例えば、カテコールアミン及びインドールアミン）、サブスタンスP並びに種々のサイトカイン及びプロスタノイド、例えば、E型プロスタグランジンを含む種々のメディエーターに起因する、一次求心性ニューロンの変換過程の閾値の低減及び増幅の増加を含む（例えば、Mayer et al., *Gastroenterol.*, 107:271-293 (1994)を参照）。管腔内の内容物及び/又はガスの異常な処理をもたらす腸運動機能障害が、IBSの原因病理にも関与している（例えば、Kellow et al., *Gastroenterol.*, 92:1885-1893 (1987); Levitt et al., *Ann. Int. Med.*, 124:422-424 (1996)を参照）。心理学的な要因もIBS症状の一因であることがあり、これによって誘因されていなければ、うつ病及び不安を含む障害とともに現れることがある（例えば、Drossman et al., *Gastroenterol. Int.*, 8:47-90 (1995)を参照）。

10

20

【0006】

IBSの原因は、よく理解されていない。腸壁は、食物を胃から腸管に通して直腸へ移動させる際に収縮及び弛緩する筋肉の層により覆われている。通常、これらの筋肉は協調されたリズムで収縮及び弛緩する。IBS患者においては、これらの収縮が、典型的には、正常のものよりも強く、正常のものよりも長く持続する。結果として、食物がより速やかに腸を通過させられ、一部の場においてはガス、鼓脹及び下痢を引き起こす。他の場においては逆のことが生じ、食物移動が緩慢であり、便が硬くなり、乾燥し、便秘を引き起こす。

【0007】

IBSの正確な病態生理については、依然として解明されていない。腸管運動障害及び内臓知覚の変化は、症状の発症に対する重要な要因であるとみなされている（Quigley, *S. J. Gastroenterol.*, 38(Suppl. 237):1-8 (2003); Mayer et al., *Gastroenterol.*, 122:2032-2048 (2002)）。一方、この病態は、現在、一般に、脳-腸軸の障害と見なされている。近年、腸管感染症及び腸炎の役割についても提案されている。研究により、細菌学的に確認された胃腸炎に引き続いてIBSが発症することが実証された一方、他の研究により、IBSにおける軽度の粘膜炎症（Spiller et al., *Gut*, 47:804-811 (2000); Dunlop et al., *Gastroenterol.*, 125:1651-1659 (2003); Cumberland et al., *Epidemiol. Infect.*, 130:453-460 (2003)を参照）及び免疫活性化（Gwee et al., *Gut*, 52:523-526 (2003); Pimentel et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 95:3503-3506 (2000)を参照）の証拠が提供された。腸管フローラもまた関与し、近年の研究により、免疫活性の調節による障害の治療におけるプロバイオティクス生物ビフィドバクテリウム属の効力が実証された（O'Mahony et al., *Gastroenterol.*, 128:541-551 (2005)）。

30

40

【0008】

視床下部-下垂体-副腎軸（HPA）はヒトにおける中核内分泌ストレス系であり（De Wied et al., *Front. Neuroendocrinol.*, 14:251-302 (1993)）、脳と腸の免疫系との重要な結びつきを提供する。この軸の活性化は身体的及び心理的なストレス因子の両方に応答して起こり（Dinan, *Br. J. Psychiatry*, 164:365-371 (1994)）、これらストレス因子は両方ともIBSの病態生理に関与している（Cumberland et al., *Epidemiol. Infect.*, 130:453-460 (2003)）。IBSの患者は、幼児期における性的及び身体的な虐待の割合が高いとともに、成人期におけるストレスの多い人生の出来事の割合が高いことが報告さ

50

れている (Gaynes et al., Baillieres Clin. Gastroenterol., 13:437-452 (1999))。このような心理社会的なトラウマ又は乏しい認識に基づく対処方法は、症状の重症度、日常の機能及び健康の結果に深い影響を及ぼす。

【0009】

I B S の病因は十分に特性決定されていないが、医学界は、患者病歴に基づく I B S 診断を補助するためにローマ I I 基準として公知の合意に基づく定義及び基準を策定した。ローマ I I 基準は、1年の期間にわたり3カ月の継続的又は反復的な腹痛又は不快感がみられ、これらの腹痛又は不快感が、排便によって軽減され、及び/又は排便頻度若しくは便の硬さの変化及び以下の2種以上を伴うことを要する：排便頻度の変化、便形態の変化、糞便移動の変化、粘液の移動又は鼓脹及び腹部膨張。これらの症状を引き起こし得る任意の構造的又は生化学的な障害も存在しないことも必要な条件である。結果として、ローマ I I 基準は、実質的な患者病歴が存在する場合にのみ使用することができ、他の点でこの症状を説明する、異常な腸構造又は代謝過程が存在しない場合にのみ信頼性がある。同様に、近年、医学界によって策定されたローマ I I I 基準は、症状の特定の組合せ、詳細な患者病歴及び身体検査の提示が存在する場合にのみ使用することができる。

10

【0010】

I B S と他の疾患又は障害との症状の類似性のために、患者を I B S として診断することは困難であり得ることが十分に実証されている。実際、I B S 症状は、非常に多くの他の腸の疾患と類似するか又は同一であるため、正確な診断が下されるまでに数年を要し得る。例えば、炎症性腸疾患 (I B D) の患者は、例えば、鼓脹、下痢、便秘及び腹痛の軽度の徴候及び症状を示すが、I B S の患者と区別することは困難であることがある。結果として、I B S と I B D との症状の類似性によって、迅速且つ正確な診断が困難になる。I B S と I B D とを区別して診断することが困難であるため、これらの疾患の早期且つ有効な治療が妨げられている。残念ながら、類似症状を示す他の腸疾患又は障害から、I B S を明確に区別するための迅速且つ正確な診断方法は、現在利用可能ではない。本発明はこの要求を満たし、更に、関連する利点も提供する。

20

【発明の概要】

【0011】

本発明は、個体からの試料が過敏性腸症候群 (I B S) と関連するか否かを正確に分類する方法、アッセイ、システム及びコードを提供する。非限定的な例として、本発明は、統計的アルゴリズム及び/又は経験的データを使用して、個体からの試料を I B S 試料として分類するのに有用である。同様に、本発明はまた、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法、アッセイ、システム及びコードを提供する。本発明は、統計的アルゴリズム及び/又は経験的データの組合せを使用して、I B S 様の症状を示す1種以上の疾患又は障害を除外し、そして、I B S を確定するのに有用である。従って、本発明は、I B S の正確な診断予測及び治療決定の指針に有用な予後情報を提供する。

30

【0012】

1つの観点において、本発明は、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

(a) 試料中に存在する I B S マーカーが前記 I B S マーカーと I B S マーカー結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を I B S マーカー結合部分と接触させること；及び

40

(b) 前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する I B S マーカーのレベルを決定すること；

を含む前記方法を提供する。

【0013】

1つの観点において、本発明は、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の進行又は後退をモニタリングする方法であって：

(a) 試料中に存在する I B S マーカーが前記 I B S マーカーと I B S マーカー結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、1回目に対象から採取された第

50

1の血液又は血清試料を、IBSマーカー結合部分と接触させること；

(b)前記複合体のレベルを決定し、これによって第1の試料中に存在するIBSマーカーのレベルを決定すること；

(c)試料中に存在するIBSマーカーが前記IBSマーカーとIBSマーカー結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、2回目に対象から採取された第2の血液又は血清試料を、IBSマーカー結合部分と接触させること；

(d)前記複合体のレベルを決定し、これによって第2の試料中に存在するIBSマーカーのレベルを決定すること；及び

(e)第1の試料中に存在するIBSマーカーのレベルと第2の試料中に存在するIBSマーカーのレベルとを比較すること；

を含む前記方法であり、
ここで、

第2の試料中のIBSマーカーのレベルが第1の試料と比べて高ければ、対象におけるIBSの進行を示し、そして、第2の試料中のIBSマーカーのレベルが第1の試料に比べて低ければ、対象におけるIBSの後退を示すものとする、前記方法を提供する。

【0014】

1つの観点において、本発明は、1種以上のプロセッサを制御して対象からの血液又は血清試料が過敏性腸症候群(IBS)と関連するか否かを分類するコードを含むコンピュータ読取可能媒体であって；

診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、前記診断マーカープロファイルに基づき前記試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示を前記コードが含み、

ここで、前記診断マーカープロファイルは、本明細書中に記載の少なくとも1種のIBS診断マーカーのレベルを示すものとする、前記コンピュータ読取可能媒体を提供する。

【0015】

別の観点において、本発明は、対象からの血清又は血液試料が過敏性腸症候群(IBS)と関連するか否かを分類するシステムであって；

(a)診断マーカープロファイルを含むデータセットを生成するように構成されたデータ収集モジュールであって、ここで、前記診断マーカープロファイルは、本明細書中に記載の少なくとも1種のIBS診断マーカーの存在又はレベルを示すものとする、前記データ収集モジュール；

(b)統計処理をデータセットに適用することによってデータセットを処理して、前記診断マーカープロファイルに基づき前記試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュール；及び

(c)統計的に導出される判定を表示するように構成されたディスプレイモジュール；
を含む、前記システムを提供する。

【0016】

1つの観点において、本発明は、個体からの試料がIBSと関連するか否かを分類する方法であって；

(a)試料において少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルを検出することによって、診断マーカープロファイルを決定すること；及び

(b)前記診断マーカープロファイルに基づくアルゴリズムを使用して、前記試料をIBS試料又は非IBS試料として分類すること；

を含む、前記方法を提供する。

【0017】

本明細書中に記載の診断方法の或る実施態様において、IBSマーカーは、サイトカイン、成長因子、抗好中球抗体、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA)、抗菌性抗体、肥胖細胞マーカー、ストレスマーカー、消化管ホルモン、セロトニン代謝産物、セロトニン経路マーカー、糖鎖欠損トランスフェリン(carbohydrate deficient transferrin; CDT)、ラクトフェリン、抗組織トランスグルタミナーゼ(anti-tissue transgluta

10

20

30

40

50

minase ; t T G) 抗体、リポカリン、マトリックスメタロプロテアーゼ (M M P)、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 (tissue inhibitor of metalloproteinase ; T I M P)、

- グロブリン、アクチン切断タンパク質、S 1 0 0 タンパク質、フィブリノペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P)、タキキニン、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、セリンプロテアーゼ、プロスタグランジン、ヒスタミン及びこれらの組合せからなる群から選択される。

【 0 0 1 8 】

本明細書中に記載の診断方法の好ましい実施態様において、I B S マーカーは、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質 (corticotrophin-releasing hormone-binding protein)、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A 並びにこれらの組合せからなる群から選択される。

10

【 0 0 1 9 】

本発明の種々の方法及びアッセイの好ましい実施態様において、表 1 に示すバイオマーカーの 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 種以上の存在又はレベルを検出して、I B S の予測に有用な診断マーカープロファイルを作成する。或る例において、本明細書中に記載のバイオマーカーは、免疫アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) 又は免疫組織化学アッセイを使用して分析される。

20

【表 1】

IBS分類における使用に適切な模範的診断マーカー

| ファミリー | バイオマーカー |
|-----------------|---------------------------------------|
| サイトカイン | CXCL8/IL-8 |
| | IL-1 β |
| | TNF-関連アポトーシス弱誘発因子 (TWEAK) |
| | レプチン |
| | オステオプロテゲリン (OPG) |
| | CCL19/MIP-3 β |
| | CXCL1/GRO1/GRO α |
| | CXCL4/PF-4 |
| | CXCL7/NAP-2 |
| | INF β 2/IL-6 |
| | IL-12 |
| | CSIF/IL-10 |
| | 腫瘍壊死因子 α (TNF- α) |
| 成長因子 | 上皮増殖因子 (EGF) |
| | 血管内皮増殖因子 (VEGF) |
| | 色素上皮由来因子 (PEDF) |
| | 脳由来神経栄養因子 (BDNF) |
| | 神経鞘腫由来増殖因子 (SDGF) /アンフィレグリン |
| 抗好中球抗体 | 抗好中球細胞質抗体 (ANCA) |
| | 核周辺抗好中球細胞質抗体 (pANCA) |
| | 抗I2抗体 |
| ASCA | ASCA-IgA |
| | ASCA-IgG |
| 抗菌性抗体 | 抗外膜タンパク質C (OmpC) 抗体 |
| | 抗Cbir-1フラゲリン抗体 |
| リポカリン | 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL) |
| MMP | MMP-9 |
| TIMP | TIMP-1 |
| α -グロブリン | α 2-マクログロブリン (α 2-MG) |
| | ハプトグロビン前駆体 α 2 (Hp α 2) |
| | オロソムコイド |
| アクチン切断タンパク質 | ゲルソリン |
| S100タンパク質 | カルグラニューリンA/S100A8/MRP-8 |
| フィブリノペプチド | フィブリノペプチドA (FIBA) |

10

20

30

| | |
|--|--|
| その他 | ラクトフェリン |
| | 抗組織トランスグルタミナーゼ (tTG) 抗体 |
| | 糖鎖欠損トランスフェリン (CDT) |
| ストレスマーカー | ウロコルチン (Ucn) |
| | 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質 (CRFBP) |
| | コルチゾール |
| | 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH, コルチコトロピン) |
| 肥胖細胞マーカー | トリプターゼ |
| | ヒスタミン |
| | プロスタグランジンE ₂ (PGE ₂) |
| 消化管ホルモン | カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) |
| | サブスタンスP |
| | 神経成長因子 (NGF) |
| | ニューロキニンA |
| | ニューロキニンB |
| | 血管作動性腸管ペプチド (VIP) |
| | グルカゴン様ペプチド2 (GLP-2) |
| | モチリン |
| | 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド (PACAP) |
| | セロトニン代謝産物 |
| トリプトファン | |
| セロトニン-O-サルフェート (5-ヒドロキシトリプトミン-O-サルフェート; 5-HT-O-サルフェート) | |
| 5-ヒドロキシインドール酢酸 (5-HIAA) | |
| 5-HTグルクロニド (5-HT-GA) | |
| 血清代謝産物 | チロシン |
| | フェニルアラニン |
| セロトニン経路マーカー | UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6 (UGT1A6) |
| | セロトニン再取り込み輸送体 (SERT) |
| | トリプトファンヒドロキシラーゼ1 (TPH1) |
| | モノアミンオキシダーゼA (MAO-A) |
| | モノアミンオキシダーゼB (MAO-B) |
| | ヒドロキシトリプトミン (セロトニン) レセプター3A (5-HT3A; 5-HT3R) |

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】本発明の1つの実施態様における用量応答曲線を示す図である。

【0021】

【図2】本発明の1つの実施態様における用量応答曲線を示す図である。

【0022】

【図3】本発明の1つの実施態様における標準曲線を示す図である。ウサギ抗ヒトトリプターゼを免疫アッセイプレート上にコーティングし、アッセイ緩衝液 (PBS中5%BSA) によってブロッキングした。種々の濃度のヒトトリプターゼ (標準曲線) 又はヒト血清試料 (アッセイ緩衝液中で1:5及び1:10に希釈) をウェルに添加し、室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、抗トリプターゼ (G3) アルカリホスファターゼ (AP) 標識McAbを添加し、室温で2時間インキュベートした。プレートを洗浄し、AP基質 (CSPD) を各ウェルに添加した。発光プレートリーダーを使用して発光を検出した。血清トリプターゼ濃度は、標準曲線を使用して計算した。(トリプターゼ検出範囲0.019-5000ng/mL。EC50=65ng/mL; 正常プール血清中にスパイクされた20ng/mLのトリプターゼについて回収率81.5%)。実施例1

参照。

- 【0023】
 【図4】GI対照、IBS-C及びIBS-Dの血清中のトリプターゼ濃度についての棒グラフを示す図である。
- 【0024】
 【図5】トリプターゼlog値分布についての棒グラフを示す図である。
- 【0025】
 【図6】トリプターゼデータの密度分析を示す図である。
- 【0026】
 【図7】GI対照、IBS-C、IBS-D及びIBS-Aの血清中のトリプターゼ濃度についての棒グラフを示す図である。 10
- 【0027】
 【図8】本発明の1つの実施態様におけるヒトトリプターゼの用量応答曲線を示す図である。
- 【0028】
 【図9】トリプターゼELISAの最適化を示す図である。(A)種々の量の捕捉抗体についてのトリプターゼ標準曲線の比較。(B)検出抗体希釈の最適化。(C)種々の量の正常ヒト血清(NHS)の存在下でのトリプターゼ標準曲線の比較。
- 【0029】
 【図10】健常対照(n=139)及びIBSの対象(n=378)からの血清中のトリプターゼレベルを示す図である。 20
- 【0030】
 【図11】健常対照に対するIBS患者におけるヒスタミン及びPGE₂の血清レベルの増加を示す図である。
- 【0031】
 【図12】本明細書中に同定及び開示されるIBSマーカーから導出される分子経路の1つの実施態様を示す図である。
- 【0032】
 【図13】本発明の1つの実施態様による疾患分類システム(DCS)を示す図である。
- 【0033】
 【図14】、同定された代謝産物が、非IBS個体の血清と比較するとIBS個体の血清において種々の濃度で存在することを実証する、代表的なクロマトグラフを提供する図である。 30
- 【0034】
 【図15】健常対照に対するIBS患者における同定された代謝産物の血清レベルの増加を示す図である。
- 【0035】
 【図16】IBS予測において同定されたトップの変数を示す図である。
- 【0036】
 【図17】トリプトファン及び5-HT代謝産物生成が、全血のTNF α 処理に応じて増加することを示す代表的なクロマトグラフを提供する図である。 40
- 【0037】
 【図18】種々の炎症性サイトカインで処理した全血中の(A)TPH1及び(B)MAO発現を示す図である。
- 【0038】
 【図19】種々の炎症性サイトカインで処理した全血中のウロコルチン(Ucn)レベル(Y軸)を示す図である。
- 【0039】
 【図20】種々の炎症性サイトカインで処理した全血中の、肥胖細胞マーカーである(A)ヒスタミン、(B)PGE₂及び(C)トリプターゼのレベルを示す図である。 50

【0040】

【図21】本明細書中に記載のいくつかのマーカーにより媒介される胃腸系における白血球、腸クロム親和細胞、肥胖細胞及び血小板の間の相互作用を示す図である。

【0041】

【図22】IBS患者及び健常対照(HC)対象からの血清試料のHPLC分析から得られる代表的なクロマトグラフを提供する図である。

【0042】

【図23】IBS患者(IBS-C=12, IBS-D=24, IBS-M=14)及び健常対照対象(HC=38)からの試料のHPLC分析により決定される、7.5分ピーク、13.5分ピーク及び17.2分ピークの血清レベル(AUC)を示す図である。

10

【0043】

【図24】質量分析による7.5分ピークの構造説明を提供する図である。7.5分ピーク中に存在する化合物の分子量は、アミノ酸チロシンの分子量に相当する181.9 m/z (パネルA)であると決定された。分子イオン(181.9 m/z)からOH基(17 m/z)を除去したものに相当するm/z 164.9での顕著な質量ピークを示すパネルBと、前記分子イオンからH₂O(18 m/z)及びNH₃(17 m/z)を除去したものに相当するm/z 146.9での顕著な質量ピークを示すパネルCと、前記分子イオンからHCOOH(m/z 46)及びOH基(17 m/z)を除去したものに相当するm/z 119での顕著な質量ピークを示すパネルDとの結果から、このピークのアイデンティティがチロシンであることが更に実証された。

20

【0044】

【図25】質量分析による13.5分ピークの構造説明を提供する図である。13.5分ピーク中に存在する化合物の分子量は、アミノ酸フェニルアラニンの分子量に相当する165.9 m/z (パネルA)であると決定された。分子イオン(165.9 m/z)からH₂O(18 m/z)及びNH₃(17 m/z)を除去したものに相当するm/z 131.0での顕著な質量ピークを示すパネルBと、前記分子イオンからHCOOH(46 m/z)を除去したものに相当するm/z 120.0での顕著な質量ピークを示すパネルCとの結果から、このピークのアイデンティティがフェニルアラニンであることが更に実証された。

30

【0045】

【図26】HPLC分析により決定される、血清試料に対するD-チロシン中スパイクの用量依存応答を示す図である。

【0046】

【図27】HPLC分析により決定される、血清試料に対するL-フェニルアラニン中スパイクの用量依存応答を示す図である。

【0047】

【図28】IBSの病態生理におけるセロトニン経路及びその関与を示す図である。

【0048】

【図29】全血球のサイトカイン処理により生成される5-HT経路代謝酵素の転写レベルを示す図である。

40

【0049】

【図30】全血球のサイトカイン処理により生成される肥胖細胞活性化マーカーの正規化レベルを示す図である。

【0050】

【図31】全血球のサイトカイン処理により生成されるウロコルチン(Ucn)のレベルを示す図である。

【発明の詳細な説明】

【0051】

I. 序論

患者を過敏性腸症候群(IBS)として診断することは、IBSと他の疾患又は障害と

50

の症状の類似性のために困難であり得る。例えば、炎症性腸疾患（IBD）である患者は、例えば、鼓脹、下痢、便秘及び腹痛の軽度の徴候及び症状を示すが、IBS患者と区別することは困難であり得る。結果として、IBSとIBDとの症状の類似性によって迅速且つ正確な診断が困難になり、疾患の早期且つ有効な治療が妨げられる。

【0052】

過敏性腸症候群（IBS）の病理は完全には理解されていないが、多くの研究により、IBSは脳-腸軸の調節不全により引き起こされる障害であるという仮説がもたらされている（総説については、Ohman and Simren, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Mar; 7(3):163-73参照）。この理論を支持する一つの観察は、IBSと診断された患者の腸粘膜内で肥満細胞の数の増加を見出すことができるという度重なる研究結果である（Guilarte, M. et al, *Gut* 56, 203-209 (2007); Walker, M. M. et al, *Pharmacol. Ther.* 29, 765-773 (2009); Akbar, A. et al, *Gut* 57, 923-929 (2008); Barbara, G. et al, *Gastroenterology* 126, 693-702 (2004); Barbara, G. et al, *Gastroenterology* 132, 26-37 (2007); Cremon, C. et al, *Am. J. Gastroenterol.* 104, 392-400 (2009); and O' Sullivan, M. et al, *Neurogastroenterol. Motil.*, 12, 449-457 (2000)）。同様に、一部の研究により、ヒスタミン及びセリンプロテアーゼ（例えば、トリプターゼ）を含むこれらの細胞から放出されるメディエーターのレベルが、IBS患者の結腸粘膜内で見出されることも分かっている（Buhner et al., *Gastroenterology* 2009 Oct;137(4); Barbara et al., *Gastroenterology*, Volume: 122, Number: 4 Suppl. 1, Page: A-276, April 2002）。しかしながら、この研究結果は、他の研究によりこのような相関が存在しないことが報告されているので、依然として議論的である（Guilarte et al., *Gut* 2007 Feb;56(2):203-9）。

10

20

【0053】

IBS患者の結腸粘膜内での肥満細胞メディエーターのレベルの増加の存在にかかわらず、結腸生検は侵襲的手順であるため、このような相関は制限された診断値を有する。研究者は、IBS患者の血液/血清中の同様のパターンを非侵襲的診断に十分好適な体液に探索するが、今日まで相関は報告されていない（Lessof et al., *Ann Allergy.* 1983 Aug;51(2 Pt 2):249-50; Guilarte, M. et al, *Gut* 56, 203-209 (2007); Ohman and Simren, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Mar;7(3):163-73）。

【0054】

有利には、本発明は、他の観点のうち、過敏性腸症候群（IBS）の診断及び分類のための非侵襲的方法及びアッセイを提供する。或る実施態様において、これらの方法及びアッセイは、IBSの疑いがあるか又は既にIBSと診断された対象の血液及び/又は血清中の種々のIBSバイオマーカーの存在又は濃度レベルの検出に関する。好ましい実施態様において、本発明方法は、対象からの血液及び/又は血清試料中において、表1に同定される1種以上のIBSマーカーを検出することを含む。追加のマーカーを使用することもできる。

30

【0055】

本発明は、部分的には、或る診断マーカー（例えば、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂、ヒスタミン、サイトカイン、成長因子、抗好中球抗体、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体、抗菌性抗体、肥満細胞マーカー、ストレスマーカー、消化管ホルモン、セロトニン代謝産物、セロトニン経路マーカー、糖鎖欠損トランスフェリン（CDT）、ラクトフェリンなど）の存在又はレベルを検出すること単独により、又は1つ以上の質問（例えば、「あなたは現在何らかの症状を経験していますか？」）に対する個体の回答に基づくIBS関連症状の存在又は重症度を同定することの組合せによって、個体からの生物試料をIBS試料として分類する精度を、実質的に改善することができるという驚くべき発見に基づくものである。図12は、本明細書中に同定及び開示されたIBSマーカーによって導出された分子経路の非限定的な例を示す。いくつかの観点において、本発明は統計的アルゴリズムを使用して、IBS試料又は非IBS試料としての試料の分類を補助する。その他の観点において、本発明は、他の腸疾患（例えば、IBD）を除外し、次いで

40

50

非IBD試料を分類する統計的アルゴリズムを使用して、IBSの分類を補助する。

【0056】

II. 定義

本明細書において使用される以下の用語は、特に記載のない限り、これらに帰属する意味を有する。

【0057】

「分類すること」という用語は、疾患状態を有する試料を「関連づけること」又は「カテゴライズすること」を含む。或る例において、「分類すること」は、統計的証拠、経験的証拠又はこの両方に基づく。或る実施態様において、分類する方法及びシステムは、既知の疾患状態を有する試料の、いわゆるトレーニングセットを使用する。トレーニングデータセットは、確立されると、未知試料の特徴を比較する基準、モデル又は雛形として機能して試料の未知の疾患状態を分類する。或る例において、試料を分類することは、試料の疾患状態を診断することに通じる。或る他の例において、試料を分類することは、試料の疾患状態を別の疾患状態から区別することに通じる。

10

【0058】

「過敏性腸症候群」又は「IBS」という用語は、以下に限定されるものではないが、典型的には、いかなる明白な構造的異常も存在せず、腹痛、腹部不快感、排便パターンの変化、便通の消失又はより頻繁な便通、下痢及び便秘を含む1種以上の症状を特徴とする機能的腸障害の群を含む。症状の顕著さに応じて少なくとも3種のIBS型が存在する：(1)下痢優勢型(IBS-D)；(2)便秘優勢型(IBS-C)及び(3)交互に生じる排便パターンを有するIBS(IBS-A)。IBSは、症状の混合型(IBS-M)としても発症し得る。種々なIBSの臨床サブタイプ、例えば、感染後IBSも存在する(IBS-PI)。

20

【0059】

「試料を転換すること」という用語は、マーカーを抽出するための、あるいは、本明細書中に定義されるマーカーを変化又は改変するための試料の物理的及び/又は化学的变化を含む。マーカーのレベル又は濃度を計測するための試料又はマーカーの抽出、操作、化学的沈殿、ELISA、複合体化、免疫抽出、物理的又は化学的改変は、全て転換を構成する。試料又はマーカーが転換工程前後で同一でない限り、変化又は改変が転換である。

30

【0060】

「試料」という用語は、個体から得られる任意の生物試験体を含む。本発明における使用に好適な試料は、以下に限定されるものではないが、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便(すなわち、便)、涙液及び他の任意の体液又は組織試料(例えば、生検物)、例えば、小腸又は結腸試料並びにこれらの細胞抽出物(例えば、赤血球細胞抽出物)を含む。好ましい実施態様において、試料は、血液、血漿又は血清試料である。より好ましい実施態様において、試料は、血清試料である。例えば、血清、唾液及び尿の試料の使用は、当分野において周知である(例えば、Hashida et al., J. Clin. Lab. Anal., 11:267-86 (1997)参照)。当業者は、試料(例えば、血清試料)をマーカーレベルの分析の前に希釈することができることを認識している。

40

【0061】

「バイオマーカー」又は「マーカー」という用語は、個体からの試料をIBS試料として分類するため又は個体からの試料におけるIBS様症状と関連する1種以上の疾患又は障害を除外するために使用することができる任意の診断マーカー、例えば、生化学マーカー、血清学マーカー、遺伝子マーカー又はその他の臨床的若しくは超音波検査上の特徴を含む。「バイオマーカー」又は「マーカー」という用語は、IBSをこの種々の型又は臨床サブタイプの1種に分類するために使用することができる任意の分類マーカー、例えば、生化学マーカー、血清学マーカー、遺伝子マーカー又は他の臨床的若しくは超音波検査上の特徴を包含する。本発明における使用に好適な診断マーカーの非限定的な例は、以下に記載され、サイトカイン、成長因子、抗好中球抗体、抗Saccharomyces cerevisiae抗体、抗菌性抗体、肥胖細胞マーカー、ストレスマーカー、消化管ホルモン、セロトニン代謝

50

産物、セロトニン経路マーカー、糖鎖欠損トランスフェリン (CDT)、抗組織トランスグルタミナーゼ (tTG) 抗体、リポカリン、マトリクスメタロプロテアーゼ (MMPs)、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 (TIMPs)、グロブリン、アクチン切断タンパク質、S100タンパク質、フィブリノペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP)、タキキニン、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、セリンプロテアーゼ (例えば、トリプターゼ、エラスターゼ)、プロスタグランジン (例えば、 PGE_2)、ヒスタミン、C反応性タンパク質 (CRP)、ラクtofelin、抗ラクtofelin抗体、カルプロテクチン、ヘモグロビン、NOD2/CARD15、セロトニン再取り込み輸送体 (SERT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ - 1、5 - ヒドロキシトリプタミン (5-HT)、ラクツロースなどを含む。分類マーカーの例は、限定されるものではないが、レプチン、SERT、トリプトファンヒドロキシラーゼ - 1、5-HT、胃幽門洞粘膜タンパク質 8、ケラチン - 8、クローディン - 8、ゾヌリン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体 1 (CRHR1)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体 2 (CRHR2)、トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジン E_2 (PGE_2) などを含む。いくつかの実施態様において、診断マーカーを使用して、IBSをこの種々の型又は臨床サブタイプのうちの1種に分類することができる。その他の実施態様において、分類マーカーを使用して、試料をIBS試料として分類するか、又はIBS様症状と関連する1種以上の疾患及び障害を除外することができる。当業者は、本発明における使用に好適な追加の診断及び分類マーカーについて理解する。

10

【0062】

20

或る例において、少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイを使用して決定される。本発明の方法における使用に好適なハイブリダイゼーションアッセイ及び増幅ベースアッセイの例は、上記のものである。或る他の例において、少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルは、免疫アッセイ又は免疫組織化学アッセイを使用して決定される。本発明の方法における使用に好適な免疫アッセイ及び免疫組織化学アッセイの非限定的な例は、本明細書に記載のものである。

【0063】

本明細書において使用される「結合部分」という用語は、目的のバイオマーカーを特異的に認識することのできる分子の任意のクラスを意味する。本明細書に記載の方法における使用に適切な結合部分の非限定的な例は、タンパク質、例えば、モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体及びそれらの機能的フラグメント (例えば、ミニボディ、二量体 (diabodies)、三量体 (triabodies)、一本鎖 Fv、F(ab)′ など)、ファージディスプレイ又はリボソームディスプレイからの組合せによる誘導タンパク質、ペプチド、核酸、例えばアプタマー、並びに目的のバイオマーカーを特異的に認識することのできるその他の分子を含む。

30

【0064】

本明細書において使用される「プロファイル」という用語は、疾患又は障害、例えば、IBS又はIBDと関連する明確な特徴又は特性を表す、任意のデータのセットを含む。前記用語は、試料中の1種以上の診断マーカーを分析する「診断マーカープロファイル」、個体が経験している又は経験した1種以上のIBS関連臨床因子 (例えば、症状) を同定する「症状プロファイル」及びこれらの組合せを含む。例えば、「診断マーカープロファイル」は、IBS及び/又はIBDと関連する1種以上の診断マーカーの存在又はレベルを表すデータのセットを含むことができる。同様に、「症状プロファイル」は、IBS及び/又はIBDと関連する1種以上の症状の存在、重症度、頻度及び/又は持続期間を表すデータのセットを含むことができる。

40

【0065】

一部の実施態様において、上記の診断マーカー及び/又は診断プロファイルの1種以上を計測するためのパネルは、試料をIBS試料又は非IBS試料として分類するために構築及び使用することができる。当業者は、例えば、個体試料のアリコート又は希釈物を使

50

用して、複数の診断マーカーの存在又はレベルを同時に又は連続的に決定することができることを認識する。或る例において、個体試料中の特定の診断マーカーのレベルは、これが比較試料（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料）又は試料群中の同一マーカーのレベルを少なくとも約10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%又は1000%上回る（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料の比較群中の同一マーカーの中央レベルを上回る）場合、上昇しているとみなされる。或る他の例において、個体試料中の特定の診断マーカーのレベルは、これが比較試料（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料）又は試料群中の同一マーカーのレベルを少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%下回る（例えば、正常、GI対照、IBD及び/又はセリアック病試料の比較群中の同一マーカーの中央レベルを下回る）場合、低下しているとみなされる。

10

【0066】

「個体」、「対象」又は「患者」という用語は、典型的にはヒトを指すが、例えば、他の霊長類、齧歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ヒツジ、ブタなどを含む他の動物も指す。

【0067】

本明細書において使用される「実質的に同一のアミノ酸配列」という用語は、天然に生じるアミノ酸配列と類似するが、同一ではないアミノ酸配列を含む。例えば、天然に生じるペプチド、ポリペプチド又はタンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有するアミノ酸配列は、天然に生じるペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列と関連する1種以上の改変、例えば、アミノ酸付加、欠失又は置換を有することができるが、但し、この改変された配列が、天然に生じるペプチド、ポリペプチド又はタンパク質の少なくとも1種の生物学的活性、例えば、免疫活性を実質的に保持することを条件とする。アミノ酸配列間の実質的な類似性の比較は、通常、約6~100残基間、好ましくは約10~100残基間、より好ましくは約25~35残基間の配列を用いて実施される。本発明のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質、又はその断片の特に有用な改変は、例えば、安定性の増加をもたらす改変である。1個以上のD型アミノ酸の取り込みは、ポリペプチド又はポリペプチド断片の安定性の増加において有用な改変である。同様にリジン残基の欠失又は置換は、ポリペプチド又はポリペプチド断片を分解から保護することによって安定性を増加させることができる。

20

30

【0068】

「IBSの進行又は後退をモニタリングする」という用語は、個体の疾患状態（例えば、IBSの存在又は重症度）を決定するための本発明の方法、システム及びコードの使用を含む。或る例において、アルゴリズム（例えば、学習統計的分類子システム（learning statistical classifier system））の結果が、より早期において同一個体について得られた結果と比較される。一部の実施態様において、本発明の方法、システム及びコードは、例えば、診断マーカーの分析及び/又はこの同定あるいはIBS関連症状に基づき、個体においてIBSが急速又は緩慢に進行する可能性を決定することによって、IBSの進行を予測するために使用することができる。その他の実施態様において、本発明の方法、システム及びコードは、例えば、診断マーカーの分析及び/又はこの同定あるいはIBS関連症状に基づき、個体においてIBSが急速又は緩慢に後退する可能性を決定することによって、IBSの後退を予測するために使用することができる。

40

【0069】

「IBSの治療に有用な薬物を服用している個体における薬物の効力をモニタリングすること」という用語は、IBSを治療する治療剤が投与された後、この治療剤の有効性を決定するために本発明の方法、システム及びコードを使用することを含む。或る例において、アルゴリズム（例えば、学習統計的分類子システム）の結果は、治療剤の使用開始前又は治療のより早期の段階における同一個体について得られた結果と比較される。本明細

50

書中に記載の I B S の治療に有用な薬物は、個体の健康を改善するために使用される任意の化合物又は薬物であり、以下に限定されるものではないが、I B S 薬、例えば、セロトニン作動薬、抗うつ剤、塩化物チャネル活性化因子、クロライドチャネル遮断薬、グアニル酸シクラーゼアゴニスト、抗生物質、オピオイド、ニューロキニンアンタゴニスト、抗痙攣又は抗コリン作動薬、ベラドンナルカロイド、バルビツレート、グルカゴン様ペプチド 1 (G L P - 1) アナログ、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (C R F) アンタゴニスト、プロバイオティクス、これらの遊離塩基、医薬的に許容可能なこれらの塩、これらの誘導体、これらのアナログ及びこれらの組合せを含む。

【 0 0 7 0 】

「治療有効量又は用量」という用語は、治療効果の達成が必要とされる対象において、治療効果を達成することができる薬物の用量を含む。例えば、I B S の治療に有用な薬物の治療有効量は、I B S と関連する 1 種以上の症状を予防又は軽減することができる量であることができる。正確な量は、当業者が公知技術を使用して確認することができる (例えば、Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms, Vols. 1-3 (1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); and Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2003) 参照) 。

【 0 0 7 1 】

I I I . 実施態様の説明

本発明は、対象における過敏性腸症候群の診断を補助する方法、システム及びコードを提供する。同様に、本発明は、個体からの試料が過敏性腸症候群 (I B S) と関連するか否かを正確に分類する方法、システム及びコードを提供する。一部の実施態様において、本発明は、統計的アルゴリズム (例えば、学習統計的分類システム) 及び / 又は経験的データ (例えば、I B S マーカーの存在又はレベル) の使用に依存する。本発明は、統計的アルゴリズム及び / 又は経験的データの組合せを使用して I B S 様症状を示す 1 種以上の疾患又は障害を除外し、I B S を確定するためにも有用である。従って、本発明は I B S の正確な診断的予測及び治療決定の指針に有用な予後情報を提供する。

【 0 0 7 2 】

A . 過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法

1 つの観点において、本発明は、表 1 に示すバイオマーカーの 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 種以上のレベルを決定することによって、対象における過敏性腸症候群の診断を補助する方法を提供する。好ましい実施態様において、本明細書中に提供される方法は、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A 及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも 1 種のバイオマーカーの検出によるものである。

【 0 0 7 3 】

或る実施態様において、脳由来神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotropic Factor ; B D N F) 好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin ; N G A L)、TNF-関連アポトーシス弱誘発因子 (TNF-related Weak Inducer of Apoptosis ; T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (Growth-Related Oncogene Alpha ; G R O -)、インターロイキン - 1 (Interleukin-1 Beta ; I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 - 1 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 ; T I M P - 1)、

抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体 (ASCA - IgA)、抗CBir - 1抗体 (CBir 1)、抗好中球細胞質抗体 (ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA (tTG)、 - トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE₂ (PGE₂)及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種のIBSバイオマーカーと共に、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター3A及びこれらの組合せから選択される少なくとも1種のバイオマーカーのレベルを、決定することによって、対象における過敏性腸症候群の診断を補助する方法が提供される。

10

【0074】

更にその他の実施態様では、サイトカイン (例えば、IL - 8、IL - 1、TWEAK、レプチン、OPG、MIP - 3、GRO、CXCL4 / PF - 4及び/又はCXCL7 / NAP - 2)、成長因子 (例えば、EGF、VEGF、PEDF、BDNF及び/又はSDGF)、抗好中球抗体 (例えば、ANCA、pANCA、cANCA、NSNA及び/又はSAPPA)、ASCA (例えば、ASCA - IgA、ASCA - IgG及び/又はASCA - IgM)、抗菌性抗体 (例えば、抗OmpC抗体、抗フラジェリン抗体及び/又は抗I2抗体)、ラクトフェリン、抗tTG抗体、リポカリン (例えば、NGAL、NGAL / MMP - 9複合体)、MMP (例えば、MMP - 9)、TIMP (例えば、TIMP - 1)、 - グロブリン (例えば、 - 2 - マクログロブリン、ハプトグロビン及び/又はオロソムコイド)、アクチン切断タンパク質 (例えば、ゲルゾリン)、S100タンパク質 (例えば、カルグラニューリン)、フィブリノペプチド (例えば、FIBA)、CGRP、タキキニン (例えば、サブスタンスP)、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種のバイオマーカーと共に、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB、ヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター3A及びこれらの組合せから選択される少なくとも1種のバイオマーカーのレベルを決定することによって、対象における過敏性腸症候群の診断を補助する方法が提供される。更に他の実施態様において、例えば、抗ラクトフェリン抗体、L - セレクチン / CD62L、エラスターゼ、C反応性タンパク質 (CRP)、カルプロテクチン、抗U1 - 70kDa自己抗体、閉鎖帯1 (ZO - 1)、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、血清アミロイドA、ガストリン、 - トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE₂ (PGE₂)及びこれらの組合せの他の診断マーカーの存在又はレベルを検出することもできる。

20

30

40

【0075】

別の観点において、本発明は、個体からの試料がIBSと関連するか否かを分類する方法であって、

(a) 試料中の少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルを検出することによって、診断マーカープロファイルを決定すること；

(b) 診断マーカープロファイルに基づく第1の統計的アルゴリズムを使用して、試料

50

を I B D 試料又は非 I B D 試料として分類すること；及び

試料が非 I B D 試料として分類された場合には、

(c) 工程 (a) において決定されたものと同一の診断マーカープロファイル又は異なる診断マーカープロファイルに基づく第 2 の統計的アルゴリズムを使用して、非 I B D 試料を I B S 試料又は非 I B S 試料として分類すること；

を含む前記方法を提供する。

【 0 0 7 6 】

I B D を除外するために使用される診断マーカーは、I B S を確定するために使用される診断マーカーと同一であることができる。あるいは、I B D を除外するために使用される診断マーカーは、I B S を確定するために使用される診断マーカーと異なることができる。

10

【 0 0 7 7 】

一部の実施態様において、第 1 に I B D を除外し (すなわち、試料を I B D 試料又は非 I B D 試料として分類し)、次いで I B S を確定する (すなわち、非 I B D 試料を I B S 試料又は非 I B S 試料として分類する) 方法は、

症状プロファイルと場合により組み合わせで診断マーカープロファイルを決定すること (ここで、症状プロファイルは、個体における少なくとも 1 種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定される) ；

診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づく第 1 の統計的アルゴリズムを使用して、試料を I B D 試料又は非 I B D 試料として分類すること；及び

20

試料が非 I B D 試料として分類された場合、工程 (a) において決定されたものと同一のプロファイル又は異なるプロファイルに基づく第 2 の統計的アルゴリズムを使用して、非 I B D 試料を I B S 試料又は非 I B S 試料として分類すること；

を含む。当業者は、診断マーカープロファイル及び症状プロファイルを同時に又は任意の順序で連続的に決定することができることを認識する。

【 0 0 7 8 】

追加の実施態様において、本発明の方法は腸炎 (intestinal inflammation) を除外することを更に含む。腸炎の非限定的な例は、急性炎症、憩室炎、回腸囊肛門吻合、顕微鏡的大腸炎、感染性下痢及びこれらの組合せを含む。一部の例において、腸炎は C 反応性タンパク質 (C R P)、ラクtofelin、カルプロテクチン又はこれらの組合せの存在又は

30

【 0 0 7 9 】

本明細書に記載のとおり、本発明の方法は、臨床医、例えば、胃腸科専門医又は一般開業医に I B S 分類結果を送付することを更に含むことができる。本方法は、個体が I B S を有する確率の形式で診断を提供することもできる。例えば、個体は、約 0 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 % 以上の I B S を有する確率を有することができる。一部の例において、本発明の方法は、個体における I B S の予後を更に提供する。例えば、予後は、外科処置、I B S のカテゴリー又は臨床サブタイプの発現、1 種以上の症状の発現あるいは疾患からの回復であることができる。

40

【 0 0 8 0 】

1 . - トリプターゼ

1 つの観点において、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

(a) 試料中に存在する I B S マーカーが前記 I B S マーカーと I B S マーカー結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を I B S マーカー結合部分と接触させること；

(b) 前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する I B S マーカーのレベルを決定すること；

を含む前記方法であり、

50

ここで、前記 I B S マーカーが、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A からなる群から選択されるものとする前記方法が提供される。1つの実施態様において、本方法は、(c) 試料中に存在する I B S マーカーのレベルと対照レベルとを比較することを更に含み、ここで、対照レベルに対する試料中に存在する I B S マーカーのレベルの差は、前記対象が I B S である可能性の増加を示すものであるものとする。

10

【0081】

特定の実施態様において、本発明は、I B S の診断を補助するアッセイであって：

(a) I B S マーカーが含有される試料を、I B S マーカーが前記 I B S マーカーと捕捉抗 I B S マーカー抗体とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、接触させること；

(b) 複合体を酵素標識指示抗体と接触させて複合体を標識複合体に転換すること；

(c) 標識複合体を酵素用基質と接触させること；及び

(d) 試料中の前記 I B S マーカーの存在又はレベルを検出すること；

20

を含む前記アッセイであり、

ここで、前記 I B S マーカーが、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A からなる群から選択されるものとする、前記アッセイを提供する。

30

【0082】

或る実施態様において、対照レベルは、健常対象からの血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーのレベル、あるいは、健常対象のコホートからの血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの平均レベルである。他の実施態様において、対照レベルは、非 I B S 対象からの血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーのレベル、あるいは、非 I B S 対象のコホートからの血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの平均レベルである。別の実施態様において、対照レベルは、疾患対象からの血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーのレベル、あるいは、疾患対象のコホートからの血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの平均レベルである。対照レベルを決定するために有用な疾患対象の非限定的な例は、I B S の対象、非 I B S 胃腸疾患の対象、炎症性腸疾患 (I B D) の対象、潰瘍性大腸炎 (U C) の対象、クローン病 (C D) の対象、セリアック病の対象、胃食道逆流性症 (G E R D) の対象、癌の対象、胃腸管の癌の対象、胃癌の対象、小腸又は大腸癌の対象などを含む。

40

【0083】

対照レベルが、1人以上の健常対象の血液又は血清試料中の I B S マーカーのレベルである場合、対象からの試料中に存在する I B S マーカーのレベルが対照レベルと比較して増加することが、対象が I B S である可能性の増加を示す。逆に、対照が 1人以上の健常対象である場合、対象からの試料中に存在する I B S マーカーのレベルが対照レベルと比

50

較して同様であるか又は低減することは、対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0084】

対照レベルが1人以上のIBSの対象の血液又は血清試料中のIBSマーカーのレベルである場合、対象からの試料中に存在するIBSマーカーのレベルが対照レベルと比較して同様であるか又は増加することは、対象がIBSである可能性の増加を示す。逆に、対照が1人以上のIBSの対象である場合、対象からの試料中に存在するIBSマーカーのレベルが対照レベルと比較して低減することは、対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0085】

本発明の或る観点において、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって、血液又は血清試料中のIBSマーカー、並びに、 α -トリプターゼ、ヒスタミン及びプロスタグランジン E_2 （ $PG E_2$ ）から選択される少なくとも1種の追加の血液又は血清バイオマーカーを検出することを含む方法が提供される。1つの実施態様において、本方法は、対象からの血液又は血清試料からのIBSマーカー及び α -トリプターゼのレベルを検出又は決定することを含む。別の実施態様において、本方法は、対象からの血液又は血清試料からのIBSマーカー及び $PG E_2$ のレベルを検出又は決定することを含む。第3の実施態様において、本方法は、対象からの血液又は血清試料からのIBSマーカー及びヒスタミンのレベルを検出又は決定することを含む。更に別の実施態様において、本方法は、対象からの血液又は血清試料からのIBSマーカー、 α -トリプターゼ、ヒスタミン及び $PG E_2$ のレベルを検出又は決定することを含む。好ましくは、IBSマーカー、 α -トリプターゼ、ヒスタミン及び/又は $PG E_2$ は、同一の血液又は血清試料から検出されるが、ある例において、バイオマーカーは、例えば、同時に又は異なる時間に同一個体から採取された異なる血液又は血清試料中で検出することができる。或る実施態様において、バイオマーカーは、対象からの血液又は血清試料の種々のアリコートを用いて実施される別個のアッセイにおいて検出することができる。他の実施態様において、バイオマーカーは、単一マルチプレックス検出アッセイ、例えば、Luminex（商標）xMAP（商標）アッセイにおいて検出することができる。

10

20

【0086】

本発明の更に他の観点において、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害因子1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、 α -トリプターゼ、ヒスタミン、 $PG E_2$ 及びこれらの組合せから選択される少なくとも1種の追加のバイオマーカーと、血液又は血清試料中のIBSマーカーとを検出することを含む前記方法が提供される。或る実施態様において、追加のバイオマーカーの少なくとも2種を検出することができる。その他の実施態様において、追加のバイオマーカーの少なくとも3、4、5、6、7、8、9又は10種を検出することができる。

30

40

【0087】

少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルを検出又は決定するために使用される試料は、典型的には、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便（すなわち、便）、涙液及び任意の他の体液又は組織試料（すなわち、生検物）、例えば、小腸又は結腸の試料である。好ましくは、試料は、血清、全血、血漿、糞便、尿又は組織生検物である。或る例において、本発明の方法は、試料中の少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルを検出又は決定する前に、個体からの試料を得ることを更に含む。好ましい実施態様において、追加のバイオマーカーは、血液又は血清試料から検出することができる。その他の実施態様において、追加のバイオマーカーは、対象の腸からの生検物又は糞便試料から検出することができる。

50

【 0 0 8 8 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの脳由来神経栄養因子(BDNF)のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、脳由来神経栄養因子(BDNF)は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、脳由来神経栄養因子(BDNF)は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

【 0 0 8 9 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

10

【 0 0 9 0 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からのTNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

20

【 0 0 9 1 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの成長関連癌遺伝子(GRO-)のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、成長関連癌遺伝子(GRO-)は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、成長関連癌遺伝子(GRO-)は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

30

【 0 0 9 2 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からのインターロイキン-1(IL-1)のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、インターロイキン-1(IL-1)は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、インターロイキン-1(IL-1)は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

【 0 0 9 3 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの組織メタロプロテアーゼ阻害因子-1(TIMP-1)のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、組織メタロプロテアーゼ阻害因子-1(TIMP-1)は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、組織メタロプロテアーゼ阻害因子-1(TIMP-1)は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

40

【 0 0 9 4 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの抗Saccharomyces cerevisiae抗体(ASCA-IgA)のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、抗Saccharomyces cerevisiae抗体(ASCA-IgA)は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様

50

において、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体 (A S C A - I g A) は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

【 0 0 9 5 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの抗C B i r - 1抗体 (C B i r 1) のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、抗C B i r - 1抗体 (C B i r 1) は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、抗C B i r - 1抗体 (C B i r 1) は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

10

【 0 0 9 6 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A) のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A) は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A) は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

【 0 0 9 7 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカー及び生物試料からの抗ヒト組織トランスグルタミナーゼI g A (t T G) のレベルを検出又は決定することを含む。好ましい実施態様において、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼI g A (t T G) は、対象からの血液又は血清試料中で検出される。別の好ましい実施態様において、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼI g A (t T G) は、糞便試料又は対象の腸からの生検物中で検出される。その他の実施態様において、少なくとも1種の追加のバイオマーカーも検出される。

20

【 0 0 9 8 】

1つの実施態様において、本方法は、血液又は血清試料からのIBSマーカーのレベル、並びに、血液又は血清試料、糞便試料又は対象の腸の生検物からの脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 - 1 (T I M P - 1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体 (A S C A - I g A)、抗C B i r - 1抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A) 及び抗ヒト組織トランスグルタミナーゼI g A (t T G) の全てのレベルを検出又は決定することを含む。

30

【 0 0 9 9 】

或る実施態様において、少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイを使用して決定される。本発明の方法における使用に好適なハイブリダイゼーションアッセイの例は、以下に限定されるものではないが、ノザンプロットティング、ドットプロットティング、R N a s e プロテクション及びこれらの組合せを含む。本発明の方法における使用に好適な増幅ベースアッセイの非限定的な例は、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R) を含む。

40

【 0 1 0 0 】

或る他の実施態様において、少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルは、免疫アッセイ又は免疫組織化学アッセイを使用して決定される。本発明の方法における使用に好適な免疫アッセイの非限定的な例は、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) を含む。本発明の方法における使用に好適な免疫組織化学アッセイの例は、以下に限定されるものではないが、免疫蛍光アッセイ、例えば、直接的蛍光抗体アッセイ、間接的蛍光抗体 (I F A) アッセイ、抗補体免疫蛍光アッセイ及びアビジン - ビオチン免疫蛍光アッセイを含む。その他のタイプの免疫組織化学アッセイは、免疫ペルオキシダーゼアッセイを含む。

50

。

【0101】

好ましい実施態様において、IBSマーカーの存在又はレベルは、サンドイッチ酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を使用して決定される。サンドイッチELISAにおける抗体の捕捉及び検出のため、任意の好適な抗体ペアを使用することができる。当業者は、アッセイに適切な抗体ペアを選択する方法を理解及び認識する。一般に、第1の(捕捉)抗体の結合が第2の(検出)抗体を干渉しないように、対象となる標的(例えば、IBSマーカー)へ種々のエピトープで結合する2種の抗体が選択される。或る実施態様において、複合体の検出を補助するため、検出抗体は、酵素、例えば、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされる。その他の実施態様において、検出抗体に結合する酵素(例えば、アルカリホスファターゼ)にコンジュゲートされた二次抗体を、アッセイにおいて使用することができる。一般に、次いで複合体は、発光基質、例えば、Ultra LITE(商品名)(NAG Research Laboratories); Sensolyte(商標)(AnaSpec); SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo Scientific); SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate(Thermo Scientific); CPSD(ジナトリウム3-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-5'-クロロ}トリシクロ[3.3.1.1.3,7]デカン)-4-イル)フェニルホスフェート; Tropix, Inc)の使用によって検出される。好ましい実施態様において、トリプターゼサンドイッチELISAは、アッセイ感度を向上させるため、検出抗体としてのアルカリホスファターゼにコンジュゲートされた抗トリプターゼ抗体及びCPSD含有発光基質の使用を含む。CPSD基質は、化学発光検出系、例えば、ELISA-Light(商品名)System(Applied Biosystems)に見出すことができる

10

20

【0102】

一部の実施態様において、本明細書において提供される方法は、対象についての症状プロファイルを決定する工程を更に含み、症状プロファイルは、対象における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定される。好ましい実施態様において、本方法は：

30

(d) 対象についての症状プロファイルを決定すること(症状プロファイルは、対象における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定される)；及び

(e) IBSバイオマーカーのレベル及びシステムプロファイルに基づくアルゴリズムを使用して対象がIBSであること又はIBSでないことを診断すること；

を含む。好ましい実施態様において、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法は、例えば、

場合により症状プロファイルと組み合わせて、IBSマーカー又は上記のこの組合せについての診断マーカープロファイルを決定すること(症状プロファイルは、個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定される)；及び

40

診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づくアルゴリズムを使用して試料をIBS試料又は非IBS試料として分類すること；を含む。

【0103】

症状プロファイルは、典型的には、胸痛、胸部不快感、胸焼け、普通量の食事後の不快な膨満感、普通量の食事の完食不能、腹痛、腹部不快感、便秘、下痢、鼓脹、腹部膨満、疼痛又は不快感を有することに伴う消極的な思考又は感情及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の症状の存在及び重症度を同定することによって決定される。

【0104】

50

好ましい実施態様において、IBSを予測するのに有用な症状プロファイルを作成するため、本明細書に記載の症状の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の存在又は重症度が同定される。或る例では、質問票又は他の形式の記述、口頭あるいは電話調査を使用して、症状プロファイルを生成する。質問票又は調査は、典型的には、回答者から現在及び/又は最近のIBS関連症状について情報を収集する目的のための標準化された一連の質問及び回答を含む。

【0105】

一部の実施態様において、症状プロファイルは、質問票又は調査において示された質問に対する回答の全て又は一部を編集及び/又は分析することによって生成される。その他の実施態様において、症状プロファイルは、以下の質問：「あなたは現在何らかの症状を経験していますか？」に対する個人の回答に基づき生成される。これらの実施態様のいずれかに従って作成される症状プロファイルを、本明細書に記載のアルゴリズムベースの方法において診断マーカープロファイルと組み合わせて使用して、IBS予測の精度を改善することができる。

10

【0106】

一部の実施態様において、本明細書において提供される方法は、対象がIBSである見込みを提供することを更に含む。或る実施態様において、本方法は、対象が、IBSの可能性が極めて低い、IBSの可能性が低い、IBSの可能性が高い、又はIBSの可能性が極めて高いという見込みを提供することを含むことができる。関連する実施態様において、IBS試料又は非IBS試料と分類された試料がIBSの対象からのものである見込みを提供することを更に含む方法が提供される。或る実施態様において、本方法は、試料が、IBSの可能性が極めて低い、IBSの可能性が低い、IBSの可能性が高い、又はIBSの可能性が極めて高い対象からのものである見込みを提供することを含むことができる。

20

【0107】

その他の実施態様において、本明細書において提供される方法は、IBSの診断をIBS便秘型 (IBS - C)、IBS下痢型 (IBS - D)、IBS混合型 (IBS - M)、IBS交替型 (IBS - A) 又は感染後IBS (IBS - PI) として分類することを更に含む。関連する実施態様において、試料をIBS便秘型 (IBS - C)、IBS下痢型 (IBS - D)、IBS混合型 (IBS - M)、IBS交替型 (IBS - A) 又は感染後IBS (IBS - PI) 試料として更に分類する方法が本明細書において提供される。

30

【0108】

1つの実施態様において、本発明は、IBS - Cからの、IBS - D及びIBS - Aの区別を補助するアッセイであって：

(a) IBSマーカーがIBSマーカーと捕捉抗IBSマーカー抗体とを含む複合体に転換するのに好適な条件下において、IBSマーカーが含有される試料を接触させること；

(b) 複合体を酵素標識指示抗体と接触させて複合体を標識複合体に転換すること；

(c) 標識複合体を酵素用基質と接触させること；及び

(d) 試料中のIBSマーカーの存在又はレベルを検出すること；

40

を含む前記アッセイを提供する。

【0109】

一部の例において、IBS - Cからの、IBS - D及びIBS - Aの区別を補助するアッセイは、試料中の - トリプターゼ、プロスタグランジン (例えば、 $PG E_2$) 及び/又はヒスタミンの存在又はレベルを検出することを更に含む。

【0110】

更に他の実施態様において、本明細書において提供される方法は、IBSでない対象を、IBDである、IBDでない、セリアック病である、セリアック病でない、健常対象である、又は胃腸疾患でないとして診断することを更に含む。関連する実施態様において、非IBS試料を、IBD試料、非IBD試料、健常試料、非胃腸疾患試料、セリアック試

50

料などとして更に分類する方法が本明細書において提供される。

【0111】

1つの実施態様において、本明細書において提供される方法は、IBSバイオマーカーのレベルに基づくアルゴリズムの使用を含む。或る実施態様において、アルゴリズムは、システムプロファイルに更に基づく。好ましい実施態様において、アルゴリズムは、統計的アルゴリズム、例えば、学習統計的分類子システムを含む。より好ましい実施態様において、アルゴリズムは、少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せを含む。最も好ましい実施態様において、少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せは、ランダムフォレスト分類子及びニューラルネットワーク分類子を含む。

【0112】

2. ストレスマーカー

1つの実施態様において、本発明は、対象からの生物試料（例えば、血液又は血清試料）中のストレスマーカーのレベル又は濃度を検出することによって、前記対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法を提供する。ストレスマーカーのレベル又は濃度は、当分野において公知の種々の方法と、その他の周知の方法とにより決定することができ、前記公知の種々の方法としては、以下に制限されるものではないが、免疫アッセイ、例えば、酵素免疫アッセイ（EIA）、例えば、酵素増幅免疫アッセイ技術（EMIT）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、抗原捕捉ELISA、サンドイッチELISA、IgM抗体捕捉ELISA（MAC ELISA）、及び微粒子酵素免疫アッセイ（MEIA）；キャピラリー電気泳動免疫アッセイ（CEIA）；放射免疫アッセイ（RIA）；免疫放射定量アッセイ（IRMA）；蛍光偏光免疫アッセイ（FPIA）；及び、化学発光アッセイ（CL）；例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）単独又は質量分析との組合せ（例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、タンデムMSなど）によるマーカーの精製；を挙げることができ、そして、前記その他の周知の方法としては、以下に限定されるものではないが、ブラッドフォードアッセイ、クマシーブルー染色、銀染色、放射標識タンパク質のためのアッセイ及び質量分析を挙げることができる。

【0113】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するストレスマーカーが前記ストレスマーカーとストレスマーカー結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をストレスマーカー結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するストレスマーカーのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。好ましい実施態様において、ストレスマーカーは、ウロコルチン（Ucn）、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質（CRFHP）、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、及びこれらの組合せから選択される。

【0114】

1つの実施態様において、上記に提供した方法は、試料中に存在するストレスマーカーのレベル又は濃度と対照レベル又は濃度とを比較することを更に含み、ここで、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するストレスマーカーのレベル又は濃度の差は、前記対象がIBSである可能性の増加を示すものであるものとする。

【0115】

1つの実施態様では、対照レベル又は濃度は、健常対象からの血液又は血清試料中に存在するストレスマーカーのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するストレスマーカーのレベル又は濃度の増加は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するストレスマーカーの同一又は低減したレベル又は濃度は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

。

10

20

30

40

50

【0116】

別の実施態様では、対照レベル又は濃度は、IBSの対象からの血液又は血清試料中に存在するストレスマーカのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するストレスマーカの同一又は増加したレベル又は濃度は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するストレスマーカのレベル又は濃度の低減は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0117】

別の関連する実施態様では、ストレスマーカ及び少なくとも1種の追加のIBSマーカのレベル又は濃度を検出することによって、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法が提供され、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂（PGE₂）及びこれらの組合せから選択される。

10

【0118】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

20

試料中に存在するウロコルチンが前記ウロコルチンとウロコルチン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をウロコルチン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するウロコルチンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂（PGE₂）から選択されるものとする。

30

【0119】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質が前記副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質と副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質結合部分と接触させること；及び

40

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA

50

A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 2 0 】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するコルチゾールが前記コルチゾールとコルチゾール結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をコルチゾール結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するコルチゾールのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 2 1 】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する副腎皮質刺激ホルモンが前記副腎皮質刺激ホルモンと副腎皮質刺激ホルモン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を副腎皮質刺激ホルモン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する副腎皮質刺激ホルモンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 2 2 】

3 . 消化管ホルモン

1つの実施態様において、本発明は、対象からの生物試料 (例えば、血液又は血清試料) 中の消化管ホルモンのレベル又は濃度を検出することによって、前記対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法を提供する。消化管ホルモンのレベル又は濃度は、当分野において公知の種々の方法と、その他の周知の方法とにより決定することができ、前記公知の種々の方法としては、以下に制限されるものではないが、免疫アッセイ、例えば、酵素免疫アッセイ (E I A)、例えば、酵素増幅免疫アッセイ技術 (E M I T)、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、抗原捕捉 E L I S A、サンドイッチ E L I S A、I g M 抗体捕捉 E L I S A (M A C E L I S A)、及び微粒子酵素免疫アッセイ (M E I A)；キャピラリー電気泳動免疫アッセイ (C E I A)；放射免疫アッセイ (R I A)；免疫放射定量アッセイ (I R M A)；蛍光偏光免疫アッセイ (F P I A)；及び、化学発光アッセイ (C L)；例えば、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) 単独

10

20

30

40

50

又は質量分析との組合せ（例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、タンデムMSなど）によるマーカーの精製；を挙げることができ、そして、前記その他の周知の方法としては、以下に限定されるものではないが、ブラッドフォードアッセイ、クマシーブルー染色、銀染色、放射標識タンパク質のためのアッセイ及び質量分析を挙げることができる。

【0123】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する消化管ホルモンが前記消化管ホルモンと消化管ホルモン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を消化管ホルモン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する消化管ホルモンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。好ましい実施態様において、消化管ホルモンは、サブスタンスP、神経成長因子（NGF）、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド（VIP）、グルカゴン様ペプチド2（GLP-2）、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド（PACAP）及びこれらの組合せから選択される。

【0124】

1つの実施態様において、上記に提供した方法は、試料中に存在する消化管ホルモンのレベル又は濃度と対照レベル又は濃度とを比較することを更に含み、ここで、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する消化管ホルモンのレベル又は濃度の差は、前記対象がIBSである可能性の増加を示すものであるものとする。

【0125】

1つの実施態様では、対照レベル又は濃度は、健常対象からの血液又は血清試料中に存在する消化管ホルモンのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する消化管ホルモンのレベル又は濃度の増加は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する消化管ホルモンの同一又は低減したレベル又は濃度は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0126】

別の実施態様では、対照レベル又は濃度は、IBSの対象からの血液又は血清試料中に存在する消化管ホルモンのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する消化管ホルモンの同一又は増加したレベル又は濃度は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する消化管ホルモンのレベル又は濃度の低減は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0127】

別の関連する実施態様では、消化管ホルモン及び少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することによって、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法が提供され、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗Saccharomyces cerevisiae抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂（PGE₂）及びこれらの組合せから選択される。

【0128】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するサブスタンスPが前記サブスタンスPとサブスタンスP結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をサブスタンス

10

20

30

40

50

P結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するサブスタンスPのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0129】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する神経成長因子が前記神経成長因子と神経成長因子結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を神経成長因子結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する神経成長因子のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0130】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するニューロキニンAが前記ニューロキニンAとニューロキニンA結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をニューロキニンA結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するニューロキニンAのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0131】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するニューロキニンBが前記ニューロキニンBとニューロキニンB結合部

10

20

30

40

50

分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をニューロキニン B 結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するニューロキニン B のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 3 2 】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する血管作動性腸管ペプチドが前記血管作動性腸管ペプチドと血管作動性腸管ペプチド結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を血管作動性腸管ペプチド結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する血管作動性腸管ペプチドのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 3 3 】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するグルカゴン様ペプチド 2 が前記グルカゴン様ペプチド 2 とグルカゴン様ペプチド 2 結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をグルカゴン様ペプチド 2 結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するグルカゴン様ペプチド 2 のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 3 4 】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

10

20

30

40

50

試料中に存在するモチリンが前記モチリンとモチリン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をモチリン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するモチリンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

10

【0135】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドが前記下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドと下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド結合部分と接触させること；及び

20

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチドのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

30

【0136】

4. セロトニン代謝産物

1つの実施態様において、本発明は、対象からの生物試料(例えば、血液又は血清試料)中のセロトニン代謝産物のレベル又は濃度を検出することによって、前記対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法を提供する。セロトニン代謝産物のレベル又は濃度は、当分野において公知の種々の方法と、その他の周知の方法とにより決定することができ、前記公知の種々の方法としては、以下に制限されるものではないが、免疫アッセイ、例えば、酵素免疫アッセイ(EIA)、例えば、酵素増幅免疫アッセイ技術(EMIT)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、抗原捕捉ELISA、サンドイッチELISA、IgM抗体捕捉ELISA(MACELISA)、及び微粒子酵素免疫アッセイ(MEIA)；キャピラリー電気泳動免疫アッセイ(CEIA)；放射免疫アッセイ(RIA)；免疫放射定量アッセイ(IRMA)；蛍光偏光免疫アッセイ(FPIA)；及び、化学発光アッセイ(CL)；例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)単独又は質量分析との組合せ(例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、タンデムMSなど)によるマーカーの精製；を挙げる事ができ、そして、前記その他の周知の方法としては、以下に限定されるものではないが、ブラッドフォードアッセイ、クマシーブルー染色、銀染色、放射標識タンパク質のためのアッセイ及び質量分析を挙げる事ができる。

40

50

【 0 1 3 7 】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（ I B S ）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するセロトニン代謝産物が前記セロトニン代謝産物とセロトニン代謝産物結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をセロトニン代謝産物結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するセロトニン代謝産物のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。好ましい実施態様において、セロトニン代謝産物は、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド及びこれらの組合せから選択される。

10

【 0 1 3 8 】

1つの実施態様において、上記に提供した方法は、試料中に存在するセロトニン代謝産物のレベル又は濃度と対照レベル又は濃度とを比較することを更に含み、ここで、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン代謝産物のレベル又は濃度の差は、前記対象が I B S である可能性の増加を示すものであるものとする。

【 0 1 3 9 】

1つの実施態様では、対照レベル又は濃度は、健常対象からの血液又は血清試料中に存在するセロトニン代謝産物のレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン代謝産物のレベル又は濃度の増加は、前記対象が I B S である可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン代謝産物の同一又は低減したレベル又は濃度は、前記対象が I B S でない可能性の増加を示す。

20

【 0 1 4 0 】

別の実施態様では、対照レベル又は濃度は、 I B S の対象からの血液又は血清試料中に存在するセロトニン代謝産物のレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン代謝産物の同一又は増加したレベル又は濃度は、前記対象が I B S である可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン代謝産物のレベル又は濃度の低減は、前記対象が I B S でない可能性の増加を示す。

30

【 0 1 4 1 】

別の関連する実施態様では、セロトニン代謝産物及び少なくとも1種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することによって、対象における過敏性腸症候群（ I B S ）の診断を補助する方法が提供され、ここで、前記少なくとも1種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子（ B D N F ）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（ N G A L ）、 T N F 関連アポトーシス弱誘導因子（ T W E A K ）、成長関連癌遺伝子（ G R O - ）、インターロイキン - 1（ I L - 1 ）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1（ T I M P - 1 ）、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体（ A S C A - I g A ）、抗 C B i r - 1 抗体（ C B i r 1 ）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ A N C A ）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A（ t T G ）、ヒスタミン、 - トリプターゼ、プロスタグランジン E₂（ P G E₂ ）及びこれらの組合せから選択される。

40

【 0 1 4 2 】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（ I B S ）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するセロトニンが前記セロトニンとセロトニン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をセロトニン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するセロトニンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の

50

追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも 1 種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 4 3 】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するトリプトファンが前記トリプトファンとトリプトファン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をトリプトファン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するトリプトファンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも 1 種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも 1 種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 4 4 】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するセロトニン - O - サルフェートが前記セロトニン - O - サルフェートとセロトニン - O - サルフェート結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をセロトニン - O - サルフェート結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するセロトニン - O - サルフェートのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも 1 種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも 1 種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 *Saccharomyces cerevisiae* 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 4 5 】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する 5 - ヒドロキシインドール酢酸が前記 5 - ヒドロキシインドール酢酸と 5 - ヒドロキシインドール酢酸結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を 5 - ヒドロキシインドール酢酸結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する5-ヒドロキシインドール酢酸のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0146】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する5-HTグルクロニドが前記5-HTグルクロニドと5-HTグルクロニド結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を5-HTグルクロニド結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する5-HTグルクロニドのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0147】

5. 血清代謝産物

1つの実施態様において、本発明は、対象からの生物試料(例えば、血液又は血清試料)中の血清代謝産物のレベル又は濃度を検出することによって、前記対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法を提供する。血清代謝産物のレベル又は濃度は、当分野において公知の種々の方法と、その他の周知の方法とにより決定することができ、前記公知の種々の方法としては、以下に制限されるものではないが、免疫アッセイ、例えば、酵素免疫アッセイ(EIA)、例えば、酵素増幅免疫アッセイ技術(EMIT)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、抗原捕捉ELISA、サンドイッチELISA、IgM抗体捕捉ELISA(MACELISA)、及び微粒子酵素免疫アッセイ(MEIA)；キャピラリー電気泳動免疫アッセイ(CEIA)；放射免疫アッセイ(RIA)；免疫放射定量アッセイ(IRMA)；蛍光偏光免疫アッセイ(FPIA)；及び、化学発光アッセイ(CL)；例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)単独又は質量分析との組合せ(例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、タンデムMSなど)によるマーカーの精製；を挙げることができ、そして、前記その他の周知の方法としては、以下に限定されるものではないが、ブラッドフォードアッセイ、クマシーブルー染色、銀染色、放射標識タンパク質のためのアッセイ及び質量分析を挙げることができる。

【0148】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する血清代謝産物が前記血清代謝産物と血清代謝産物結合部分とを含む複

10

20

30

40

50

合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を血清代謝産物結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する血清代謝産物のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。好ましい実施態様において、血清代謝産物は、チロシン及び/又はフェニルアラニンから選択される。

【0149】

1つの実施態様において、上記に提供した方法は、試料中に存在する血清代謝産物のレベル又は濃度と対照レベル又は濃度とを比較することを更に含み、ここで、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する血清代謝産物のレベル又は濃度の差は、前記対象がIBSである可能性の増加を示すものであるものとする。

10

【0150】

1つの実施態様では、対照レベル又は濃度は、健常対象からの血液又は血清試料中に存在する血清代謝産物のレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する血清代謝産物のレベル又は濃度の増加は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する血清代謝産物の同一又は低減したレベル又は濃度は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0151】

別の実施態様では、対照レベル又は濃度は、IBSの対象からの血液又は血清試料中に存在する血清代謝産物のレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する血清代謝産物の同一又は増加したレベル又は濃度は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する血清代謝産物のレベル又は濃度の低減は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

20

【0152】

別の関連する実施態様では、血清代謝産物及び少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することによって、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法が提供され、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂（PGE₂）及びこれらの組合せから選択される。

30

【0153】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するチロシンが前記チロシンとチロシン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をチロシン結合部分と接触させること；及び

40

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するチロシンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプター

50

ゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 5 4 】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するフェニルアラニンが前記フェニルアラニンとフェニルアラニン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をフェニルアラニン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するフェニルアラニンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加の I B S マーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加の I B S マーカーは、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (N G A L)、T N F 関連アポトーシス弱誘導因子 (T W E A K)、成長関連癌遺伝子 (G R O -)、インターロイキン - 1 (I L - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (T I M P - 1)、抗 Saccharomyces cerevisiae 抗体 (A S C A - I g A)、抗 C B i r - 1 抗体 (C B i r 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (A N C A)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ I g A (t T G)、ヒスタミン、 - トリプターゼ及びプロスタグランジン E₂ (P G E₂) から選択されるものとする。

【 0 1 5 5 】

6 . セロトニン経路マーカー

1つの実施態様において、本発明は、対象からの生物試料 (例えば、血液又は血清試料) 中のセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度を検出することによって、前記対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法を提供する。セロトニン経路マーカーのレベル又は濃度は、当分野において公知の種々の方法と、その他の周知の方法とにより決定することができ、前記公知の種々の方法としては、以下に制限されるものではないが、免疫アッセイ、例えば、酵素免疫アッセイ (E I A)、例えば、酵素増幅免疫アッセイ技術 (E M I T)、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、抗原捕捉 E L I S A、サンドイッチ E L I S A、I g M 抗体捕捉 E L I S A (M A C E L I S A)、及び微粒子酵素免疫アッセイ (M E I A)；キャピラリー電気泳動免疫アッセイ (C E I A)；放射免疫アッセイ (R I A)；免疫放射定量アッセイ (I R M A)；蛍光偏光免疫アッセイ (F P I A)；及び、化学発光アッセイ (C L)；例えば、高速液体クロマトグラフィー (H P L C) 単独又は質量分析との組合せ (例えば、M A L D I / M S、M A L D I - T O F / M S、S E L D I - T O F / M S、タンデム M S など) によるマーカーの精製；を挙げることができ、そして、前記その他の周知の方法としては、以下に限定されるものではないが、ブラッドフォードアッセイ、クマシーブルー染色、銀染色、放射標識タンパク質のためのアッセイ及び質量分析を挙げることができる。

【 0 1 5 6 】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群 (I B S) の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するセロトニン経路マーカーが前記セロトニン経路マーカーとセロトニン経路マーカー結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をセロトニン経路マーカー結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。好ましい実施態様において、セロトニン経路マーカーは、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B、ヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A 及びこれらの組合せから選択される。

【 0 1 5 7 】

10

20

30

40

50

1つの実施態様において、上記に提供した方法は、試料中に存在するセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度と対照レベル又は濃度とを比較することを更に含み、ここで、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度の差は、前記対象がIBSである可能性の増加を示すものであるものとする。

【0158】

1つの実施態様では、対照レベル又は濃度は、健常対象からの血液又は血清試料中に存在するセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度の増加は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン経路マーカーの同一又は低減したレベル又は濃度は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

10

【0159】

別の実施態様では、対照レベル又は濃度は、IBSの対象からの血液又は血清試料中に存在するセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン経路マーカーの同一又は増加したレベル又は濃度は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するセロトニン経路マーカーのレベル又は濃度の低減は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0160】

別の関連する実施態様では、セロトニン経路マーカー及び少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することによって、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法が提供され、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂（PGE₂）及びこれらの組合せから選択される。

20

【0161】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

30

試料中に存在するUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6が前記UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6とUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6結合部分と接触させること；及び前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するUDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂（PGE₂）から選択されるものとする。

40

【0162】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

50

試料中に存在するセロトニン再取り込み輸送体が前記セロトニン再取り込み輸送体とセロトニン再取り込み輸送体結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をセロトニン再取り込み輸送体結合部分と接触させること；及び前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するセロトニン再取り込み輸送体のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0163】

別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するトリプトファンヒドロキシラーゼ1が前記トリプトファンヒドロキシラーゼ1とトリプトファンヒドロキシラーゼ1結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をトリプトファンヒドロキシラーゼ1結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するトリプトファンヒドロキシラーゼ1のレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0164】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するモノアミンオキシダーゼAが前記モノアミンオキシダーゼAとモノアミンオキシダーゼA結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をモノアミンオキシダーゼA結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するモノアミンオキシダーゼAのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0165】

10

20

30

40

50

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するモノアミンオキシダーゼBが前記モノアミンオキシダーゼBとモノアミンオキシダーゼB結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をモノアミンオキシダーゼB結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するモノアミンオキシダーゼBのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂（PGE₂）から選択されるものとする。

【0166】

更に別の特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在するヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3Aが前記ヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3Aとヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3A結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料をヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3A結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在するヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3Aのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、-トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂（PGE₂）から選択されるものとする。

【0167】

7. 糖鎖欠損トランスフェリン（CDT）

1つの実施態様において、本発明は、対象からの生物試料（例えば、血液又は血清試料）中の糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度を検出することによって、前記対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法を提供する。糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度は、当分野において公知の種々の方法と、その他の周知の方法とにより決定することができ、前記公知の種々の方法としては、以下に制限されるものではないが、免疫アッセイ、例えば、酵素免疫アッセイ（EIA）、例えば、酵素増幅免疫アッセイ技術（EMIT）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、抗原捕捉ELISA、サンドイッチELISA、IgM抗体捕捉ELISA（MAC-ELISA）、及び微粒子酵素免疫アッセイ（MEIA）；キャピラリー電気泳動免疫アッセイ（CEIA）；放射免疫アッセイ（RIA）；免疫放射定量アッセイ（IRMA）；蛍光偏光免疫アッセイ（FPIA）；及び、化学発光アッセイ（CL）；例えば、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）単独又は質量分析との組合せ（例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、タンデムMSなど）によるマーカーの精製

10

20

30

40

50

;を挙げることができ、そして、前記その他の周知の方法としては、以下に限定されるものではないが、ブラッドフォードアッセイ、クマシーブルー染色、銀染色、放射標識タンパク質のためのアッセイ及び質量分析を挙げることができる。

【0168】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンが前記糖鎖欠損トランスフェリンと糖鎖欠損トランスフェリン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を糖鎖欠損トランスフェリン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度を決定すること；

を含む前記方法が提供される。

【0169】

1つの実施態様において、上記に提供した方法は、試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度と対照レベル又は濃度とを比較することを更に含み、ここで、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度の差は、前記対象がIBSである可能性の増加を示すものであるものとする。

【0170】

1つの実施態様では、対照レベル又は濃度は、健常対象からの血液又は血清試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度の増加は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在するストレスマーカの同一又は低減したレベル又は濃度は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0171】

別の実施態様では、対照レベル又は濃度は、IBSの対象からの血液又は血清試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度であり、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンの同一又は増加したレベル又は濃度は、前記対象がIBSである可能性の増加を示し、それに対して、対照レベル又は濃度に対する試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度の低減は、前記対象がIBSでない可能性の増加を示す。

【0172】

別の関連する実施態様では、糖鎖欠損トランスフェリン及び少なくとも1種の追加のIBSマーカのレベル又は濃度を検出することによって、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法が提供され、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカは、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、ヒスタミン、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂（PGE₂）及びこれらの組合せから選択される。

【0173】

特定の実施態様では、対象における過敏性腸症候群（IBS）の診断を補助する方法であって：

試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンが前記糖鎖欠損トランスフェリンと糖鎖欠損トランスフェリン結合部分とを含む複合体に転換するのに好適な条件下で、対象からの血液又は血清試料を糖鎖欠損トランスフェリン結合部分と接触させること；及び

前記複合体のレベルを決定し、これによって試料中に存在する糖鎖欠損トランスフェリンのレベル又は濃度を決定すること；

10

20

30

40

50

を含む前記方法が提供される。1つの実施態様において、前記方法は、少なくとも1種の追加のIBSマーカーのレベル又は濃度を検出することを更に含み、ここで、前記少なくとも1種の追加のIBSマーカーは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、トリプターゼ及びプロスタグランジンE₂(PGE₂)から選択されるものとする。

【0174】

B. 症状プロファイル

一部の実施態様において、IBSの診断を補助する方法は：

症状プロファイルと場合により組み合わせる診断マーカープロファイルを決定すること(ここで、症状プロファイルは、個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定されるものとする)；並びに

診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づくアルゴリズムを使用して、試料をIBS試料又は非IBS試料として分類すること；

を含む。当業者は、診断マーカープロファイル及び症状プロファイルを同時に又は任意の順序で連続的に決定することができることを認識する。

【0175】

症状プロファイルは、典型的には、胸痛、胸部不快感、胸焼け、普通量の食事後の不快な膨満感、普通量の食事の完食不能、腹痛、腹部不快感、便秘、下痢、鼓脹、腹部膨満、疼痛又は不快感を有することに伴う消極的な思考又は感情及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の症状の存在及び重症度を同定することによって決定される。

【0176】

好ましい実施態様において、IBSを予測するのに有用な症状プロファイルを作成するため、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の本明細書に記載の症状の存在又は重症度が同定される。ある例において、質問票又は他の形式の記述、口頭あるいは電話調査を使用して、症状プロファイルを生成する。質問票又は調査は、典型的には、回答者から現在及び/又は最近のIBS関連症状について情報を収集する目的のための標準化された一連の質問及び回答を含む。例えば、実施例3は、個体における1種以上のIBS関連症状の存在又は重症度を同定するために質問票に含めることができる例示的な質問を提供する。

【0177】

或る実施態様において、症状プロファイルは、質問票又は調査において示された質問に対する回答の全て又は一部を編集及び/又は分析することによって生成される。或るその他の実施態様において、症状プロファイルは、以下の質問：「あなたは現在何らかの症状を経験していますか？」に対する個人の回答に基づき生成される。これらの実施態様のいずれかに従って作成される症状プロファイルを、本明細書に記載のアルゴリズムベースの方法において、診断マーカープロファイルと組み合わせることで、IBS予測の精度を改善することができる。

【0178】

C. 統計的アルゴリズムの使用

一部の実施態様において、対象における過敏性腸症候群(IBS)の診断を補助する方法は、統計的アルゴリズムと併用する診断マーカープロファイル単独又は症状プロファイルとの組合せに基づく。ある例において、統計的アルゴリズムは、学習統計的分類子システムである。学習統計的分類子システムは、ランダムフォレスト(RF)、分類及び回帰ツリー(C&RT)、ブーストされたツリー、ニューラルネットワーク(NN)、サポートベクターマシン(SVM)、一般的なカイ二乗自動相互作用検出モデル、インタラクテ

10

20

30

40

50

ィブツリー、多変量適応的回帰スプライン、機械学習分類子及びこれらの組合せからなる群から選択することができる。好ましくは、学習統計的分類子システムは、ツリーベースの統計的アルゴリズム（例えば、RF、C & RTなど）及び/又はNN（例えば、人工的NNなど）である。本発明における使用に好適な学習統計的分類子システムの追加の例は、米国特許出願第11/368,285号に記載されている。或る実施態様において、本方法は、対象からの試料をIBS試料又は非IBS試料として分類することを含む。

【0179】

或る例において、統計的アルゴリズムは、単一の学習統計的分類子システムである。好ましくは、単一の学習統計的分類子システムは、ツリーベースの統計的アルゴリズム、例えば、RF又はC & RTを含む。非限定的な例として、単一の学習統計的分類子システムを使用して、予測値又は確率値、及び少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベル（すなわち、診断マーカープロファイル）単独、あるいは少なくとも1種の症状の存在又は重症度（すなわち、症状プロファイル）との組合せに基づき、試料をIBS試料又は非IBS試料として分類することができる。単一の学習統計的分類子システムの使用は、典型的には、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率及び/又は全体精度を伴い、試料をIBS試料として分類する。そのようなものとして、試料をIBS試料又は非IBS試料として分類することは、対象におけるIBSの診断の補助に有用である。

10

20

【0180】

或るその他の例において、統計的アルゴリズムは、少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せである。好ましくは、学習統計的分類子システムの組合せは、例えば、タンデム又はパラレルで使用されるRF及びNNを含む。非限定的な例として、最初にRFを使用して、診断マーカープロファイル単独、又は症状プロファイルとの組合せに基づく予測値又は確率値を作成することができ、次いでNNを使用して、予測値又は確率値及び同一又は異なる診断マーカープロファイル又はプロファイルの組合せに基づき試料をIBS試料又は非IBS試料として分類することができる。有利には、本発明の複合型RF/NN学習統計的分類子システムは、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率及び/又は全体精度を伴い、試料をIBS試料として分類する。特に好ましい実施態様において、統計的アルゴリズムは、ランダムフォレスト分類子又はランダムフォレスト分類子とニューラルネットワーク分類子との組合せである。

30

【0181】

一部の例において、1種以上の学習統計的分類子システムを使用して得られたデータは、処理アルゴリズムを使用して処理することができる。このような処理アルゴリズムを、例えば、多層パーセプトロン、バックプロパゲーションネットワーク及びレーベンバーグ・マルカートアルゴリズムからなる群から選択することができる。他の例において、このような処理アルゴリズムの組合せを、例えばパラレル又はシリアル方式で 사용할ことができる。

40

【0182】

或る他の実施態様において、本発明の方法は、臨床医、例えば、胃腸科専門医又は一般開業医にIBS分類結果を送付することを更に含む。別の実施態様において、本発明の方法は、個体がIBSである確率の形式で診断を提供する。例えば、個体は、IBSである確率が約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%以上であり得る。更に別の実施態様において、本発明の方法は、個体におけるIBSの予後を更に提供することができる。例えば、予後は、外科処置、IBSのカテゴリー又は

50

臨床サブタイプの発現、1種以上の症状の発現あるいは疾患からの回復であることができる。

【0183】

D. アッセイ及びキット

当分野において公知の種々のアッセイ、技術及びキットのいずれかを使用して、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルを決定し、試料がIBSと関連するか否かを分類することができる。

【0184】

本発明は、部分的には、個体から得られる試料中の少なくとも1種のマーカーの存在又はレベルを決定することに依存する。本明細書において使用される「少なくとも1種のマーカーの存在を決定すること」という用語は、当業者に公知の任意の定量又は定性アッセイを使用することによって、対象となる各マーカーの存在を決定することを含む。ある例において、特定の形質、変化あるいは生化学的又は血清学的な物質（例えば、タンパク質又は抗体）の存在又は非存在を決定する定性アッセイは、対象となる各マーカーを検出するために好適である。或る他の例において、RNA、タンパク質、抗体又は活性の存在又は非存在を決定する定量アッセイは、対象となる各マーカーを検出するために好適である。本明細書において使用される「少なくとも1種のマーカーのレベルを決定する」という用語は、当業者に公知の任意の直接的又は間接的な定量アッセイを使用することによって、対象となる各マーカーのレベルを決定することを含む。或る例において、例えば、RNA、タンパク質、抗体又は活性の相対量又は絶対量を決定する定量アッセイは、対象となる各マーカーのレベルを決定するために好適である。当業者は、マーカーのレベルを決定するために有用な任意のアッセイも、マーカーの存在又は非存在を決定するために有用であることを認識する。

10

20

【0185】

本明細書において使用される「抗体」という用語は、ポリクローナル又はモノクローナル及び任意のアイソタイプであることができる免疫グロブリン分子の集団、又は免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な断片を含む。このような免疫活性断片は、重鎖及び軽鎖の可変領域を含有し、これらは抗原に特異的に結合する抗体分子の一部を構成する。例えば、当分野においてFab、Fab'又はF(ab')₂として公知の免疫グロブリン分子の免疫活性断片は、抗体という用語の意味に含まれる。

30

【0186】

フローサイトメトリーを使用して、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルを決定することができる。このようなフローサイトメトリーアッセイは、ビーズベース免疫アッセイを含み、例えば、カンジダ・アルピカンス及びHIVタンパク質に対する血清抗体の検出について記載されている方法と同一の方法において抗体マーカーレベルを決定するために使用することができる（例えば、Bishop and Davis, J. Immunol. Methods, 210:79-87 (1997); McHugh et al., J. Immunol. Methods, 116:213 (1989); Scillian et al., Blood, 73:2041 (1989)を参照）。

【0187】

マーカーに特異的な組換え抗原を発現させるためのファージディスプレイ技術を使用して、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルを決定することもできる。例えば、抗体マーカーに特異的な抗原を発現するファージ粒子は、所望により、抗体、例えば、抗ファージモノクローナル抗体を使用してマルチウェルプレートに固定することができる（Felicetti et al., "Phage-Displayed Peptides as Tools for Characterization of Human Sera" in Abelson (Ed.), Methods in Enzymol., 267, San Diego: Academic Press, Inc. (1996)を参照）。

40

【0188】

競合的及び非競合的免疫アッセイを含む種々の免疫アッセイ技術を使用して、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルを決定することができる（例えば、Self and Cook, Curr. Opin. Biotechnol., 7:60-65 (1996)を参照）。免疫アッセイという用語は、以下

50

に限定されるものではないが、酵素免疫アッセイ (E I A)、例えば、酵素増幅免疫アッセイ技術 (E M I T)、酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A)、抗原捕捉 E L I S A、サンドイッチ E L I S A、I g M抗体捕捉 E L I S A (M A C E L I S A)及び微粒子酵素免疫アッセイ (M E I A) ; キャピラリー電気泳動免疫アッセイ (C E I A) ; 放射免疫アッセイ (R I A) ; 免疫放射定量アッセイ (I R M A) ; 蛍光偏光免疫アッセイ (F P I A) ; 並びに化学発光アッセイ (C L) を含む技術を包含する。所望により、このような免疫アッセイは、自動化されることができる。免疫アッセイは、レーザーにより誘導される蛍光とともに使用することもできる (例えば、Schmalzing and Nashabeh, Electrophoresis, 18:2184-2193 (1997); Bao, J. Chromatogr. B. Biomed. Sci., 699:463-480 (1997)を参照)。リポソーム免疫アッセイ、例えば、フローインジェクションリポソーム免疫アッセイ及びリポソーム免疫センサーも、本発明における使用に好適である (例えば、Rongen et al., J. Immunol. Methods, 204:105-133 (1997)を参照)。更に、タンパク質 / 抗体複合体の形成が、マーカー濃度に応じてピーク速度信号に変換される光分散の増加をもたらすネフェロメトリーアッセイが、本発明における使用に好適である。ネフェロメトリーアッセイはBeckman Coulter (Brea, CA; Kit #449430)から市販されており、Behring Nephelometer Analyzerを使用して実施することができる (Fink et al., J. Clin. Chem. Clin. Biol. Chem., 27:261-276 (1989))。

【0189】

抗原捕捉 E L I S A は、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルの決定に有用であり得る。例えば、抗原捕捉 E L I S A においては、対象となるマーカーに対する抗体が固相に結合され、マーカーが抗体によって結合されるように試料が添加される。非結合タンパク質が洗浄によって除去された後、結合マーカーの量を、例えば、放射免疫アッセイを使用して定量することができる。(例えば、Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988を参照)。サンドイッチ E L I S A も、本発明における使用に好適であり得る。例えば、2抗体サンドイッチアッセイにおいて、第1の抗体が固体担体に結合され、対象となるマーカーが第1の抗体に結合することが可能となる。マーカーの量は、マーカーに結合する第2の抗体の量を計測することによって定量される。抗体は、種々の固体担体、例えば、磁性又はクロマトグラフマトリックス粒子、アッセイプレートの表面 (例えば、マイクロタイターウェル)、固体基材又は膜の一片 (例えば、プラスチック、ナイロン、紙) などに固定化することができる。アッセイストリップは、抗体又は複数の抗体を固体担体上のアレイにおいてコーティングすることによって調製することができる。次いで、このストリップは、試験試料中に浸漬することができ、洗浄及び検出工程によって迅速に処理して計測可能なシグナル、例えば、有色点を生成することができる。

【0190】

例えば、ヨウ素 - 125 (^{125}I) 標識された二次抗体 (Harlow and Lane, 前掲) を使用する放射免疫アッセイも、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルを決定するために好適である。化学発光マーカーによって標識された二次抗体も、本発明における使用に好適である。化学発光二次抗体を使用する化学発光アッセイは、マーカーレベルの高感度な非放射性検出に好適である。このような二次抗体は、種々の源、例えば、Amersham Lifesciences, Inc. (Arlington Heights, IL) から市販品として得ることができる。

【0191】

上記免疫アッセイは、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルを決定するために特に有用である。非限定的な例として、IL - 8 結合分子、例えば、抗 IL - 8 抗体又は細胞外 IL - 8 結合タンパク質 (例えば、IL - 8 受容体) を使用する E L I S A は、試料が IL - 8 タンパク質について陽性が否かを決定するため、又は試料中の IL - 8 タンパク質レベルを決定するために有用である。固定好中球 E L I S A は、試料が A N C A について陽性が否かを決定するため、又は試料中の A N C A レベルを決定するために有用である。同様に、酵母細胞壁ホスホペプチドマンナンを使用する E L I S A は、試料が A S C A - I g A 及び / 又は A S C A - I g G について陽性が否かを決定するため、あるいは

試料中の ASCA - IgA 及び / 又は ASCA - IgG レベルを決定するために有用である。OmpC タンパク質又はこの断片を使用する ELISA は、試料が抗 OmpC 抗体について陽性が否かを決定するため、又は試料中の抗 OmpC 抗体レベルを決定するために有用である。I2 タンパク質又はこの断片を使用する ELISA は、試料が抗 I2 抗体について陽性が否かを決定するため、又は試料中の抗 I2 抗体レベルを決定するために有用である。フラジェリタンパク質 (例えば、Cbir-1 フラジェリン) 又はこの断片を使用する ELISA は、試料が抗フラジェリン抗体について陽性が否かを決定するため、又は試料中の抗フラジェリン抗体レベルを決定するために有用である。更に、上記免疫アッセイは、試料中のその他の診断マーカーの存在又はレベルを決定するために特に有用である。

10

【0192】

対象となるマーカーに対する抗体の特異的な免疫結合は、直接的又は間接的に検出することができる。直接的標識は、蛍光又は発光タグ、金属、色素、放射性核種などを含み、抗体に結合される。ヨウ素 125 (^{125}I) によって標識された抗体を使用して、試料中の 1 種以上のマーカーのレベルを決定することができる。マーカーに特異的な化学発光抗体を使用する化学発光アッセイは、マーカーレベルの高感度な非放射性検出に好適である。蛍光色素によって標識された抗体も、試料中の 1 種以上のマーカーのレベルを決定するために好適である。蛍光色素の例は、以下に限定されるものではないが、DAPI、フルオレセイン、ヘキスト 33258、R-フィコシアニン、B-フィコエリスリン、R-フィコエリスリン、ローダミン、テキサスレッド及びリサミンを含む。蛍光色素に結合している 2 次抗体は、市販品として得ることができ、例えば、ヤギ F(ab')₂ 抗ヒト IgG-FITC は、Tago Immunologicals (Burlingame, CA) から入手可能である。

20

【0193】

間接的標識は、当分野において周知の種々の酵素、例えば、セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ (AP)、ガラクトシダーゼ、ウレアーゼなどを含む。セイヨウワサビペルオキシダーゼ検出系は、例えば、発色基質テトラメチルベンジジン (TMB) とともに使用することができ、過酸化水素の存在下で 450 nm において検出可能な可溶性生成物を生じさせる。アルカリホスファターゼ検出系は、発色基質 p-ニトロフェニルホスフェートとともに使用することができ、例えば、405 nm において容易に検出可能な可溶性生成物を生じさせる。同様に、ガラクトシダーゼ検出系は、発色基質 o-ニトロフェニル-D-ガラクトピラノシド (ONPG) とともに使用することができ、410 nm において検出可能な可溶性生成物を生じさせる。ウレアーゼ検出系は、例えば、ウレア-プロモクレゾールパーブル (Sigma Immunochemicals; St. Louis, MO) の基質とともに使用することができる。酵素に結合している有用な 2 次抗体は、多数の市販源から得ることができ、例えば、ヤギ F(ab')₂ 抗ヒト IgG-アルカリホスファターゼは、Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA.) から購入することができる。

30

【0194】

直接又は間接的標識からのシグナルは、例えば、発色基質からの色を検出するための分光光度計；放射線を検出するための放射線カウンター、例えば、 ^{125}I の検出のためのガンマカウンター；又はある波長の光の存在下で蛍光を検出するための蛍光光度計；を使用して分析することができる。酵素結合抗体の検出のため、マーカーレベルの量の定量分析は、分光光度計、例えば、EMAX Microplate Reader (Molecular Devices; Menlo Park, CA) を使用して製造業者の説明書に従って行うことができる。所望により、本発明のアッセイは、自動化又はロボットによって実施することができ、複数の試料からのシグナルを同時に検出することができる。

40

【0195】

定量ウエスタンブロッティングを使用して、試料中の 1 種以上のマーカーの存在又はレベルを検出又は決定することもできる。ウエスタンブロットは、周知の方法、例えば、走査デンシトメトリー又はホスホイメージングによって定量することができる。非限定的な例

50

として、タンパク質試料は、10% SDS-PAGE Laemmliゲル上で電気泳動される。1次マウスモノクローナル抗体はプロットと反応され、抗体結合は、予備的なスロットプロット実験を使用して線形であることを確認することができる。ヤギ抗マウスセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合抗体(BioRad)は、2次抗体として使用され、シグナル検出は、化学発光を使用して、例えば、Renaissance化学発光キット(New England Nuclear; Boston, MA)を用いて製造業者の説明書に従って実施される。プロットのオートラジオグラフは、走査デンストメーター(Molecular Dynamics; Sunnyvale, CA)を使用して分析され、陽性対照に対して正規化される。値は、例えば、実値と陽性対照との比として報告される(デンストメトリーインデックス)。このような方法は当分野において周知であり、例えば、Parra et al., J. Vasc. Surg., 28:669-675 (1998)に記載されている。

10

【0196】

あるいは、種々の免疫組織化学アッセイ技術を使用して、試料中の1種以上のマーカーの存在又はレベルを決定することができる。免疫組織化学アッセイという用語は、蛍光顕微鏡又は光学顕微鏡を使用する、対象となるマーカーと反応する抗体に結合させた(すなわち、コンジュゲートさせた)蛍光色素又は酵素の視覚的検出を利用する技術を包含し、そして、以下に限定されるものではないが、直接的蛍光抗体アッセイ、間接的蛍光抗体(IFA)アッセイ、抗補体免疫蛍光、アビジン-ビオチン免疫蛍光及び免疫ペルオキシダーゼアッセイを含む。例えば、IFAアッセイは、試料がANCAについて陽性か否か、試料中のANCAのレベル、試料がpANCAについて陽性か否か、試料中のpANCAのレベル及び/又はANCA染色パターン(例えば、cANCA、pANCA、NSNA及び/又はSAPPA染色パターン)を決定するために有用である。試料中のANCAの濃度は、例えば、終点滴定によって、又は既知の参照標準と比較して視覚的蛍光強度を測定することによって定量することができる。

20

【0197】

あるいは、対象となるマーカーの存在又はレベルは、精製マーカーの量を検出又は定量することによって決定することができる。マーカーの精製は、例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)単独又は質量分析との組合せ(例えば、MALDI/MS、MALDI-TOF/MS、SELDI-TOF/MS、タンデムMSなど)によって達成することができる。対象となるマーカーの定性又は定量検出は、以下に限定されるものではないが、ブラッドフォードアッセイ、クマシーブルー染色、銀染色、放射標識タンパク質のためのアッセイ及び質量分析を含む周知の方法によって決定することもできる。

30

【0198】

複数のマーカーの分析は、1つの試験試料について別個に又は同時に実施することができる。マーカーの別個又は連続的アッセイのため、好適な機器は、臨床実験室用分析装置、例えば、ElecSys(Roche)、AxSym(Abbott)、Access(Beckman)、ADVIA(商標)、CENTAUR(商標)(Bayer)、及びNICHOLS ADVANTAGE(商標)(Nichols Institute)免疫アッセイ系を含む。好ましい機器又はタンパク質チップは、単一表面上で複数のマーカーの同時アッセイを実施する。特に有用な物理フォーマットは、複数の異なるマーカー検出のため、複数の独立したアドレス可能なロケーションを有する表面を含む。このようなフォーマットは、タンパク質マイクロアレイ又は「タンパク質チップ」(例えば、Ng et al., J. Cell Mol. Med., 6:329-340 (2002))及びある種のキャピラリー装置を含む(例えば、米国特許第6,019,944号を参照)。これらの実施態様においては、それぞれの独立した表面上のロケーションは、それぞれの領域における検出のための1種以上のマーカーを固定化するために抗体を含むことができる。あるいは、表面は、表面の独立したロケーションに固定された1種以上の独立した粒子(例えば、マイクロ粒子又はナノ粒子)を含むことができ、マイクロ粒子は、検出のための1種以上のマーカーを固定化するために抗体を含む。

40

【0199】

50

対象となる種々のマーカーの存在又はレベルを決定する上記アッセイに加え、定型的な技術、例えば、ノザン分析、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R)、又はマーカーをコードする配列の一部に相補的な核酸配列に対するハイブリダイゼーションに基づく他の任意の方法 (例えば、スロットプロットハイブリダイゼーション) を使用するマーカーの m R N A レベルの分析も本発明の範囲内である。適用可能な P C R 増幅技術は、例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York(1999), Chapter 7 and Supplement 47; Theophilus et al., "PCR Mutation Detection Protocols," Humana Press, (2002); 及び Innis et al., PCR Protocols, San Diego, Academic Press, Inc. (1990) に記載されている。一般的な核酸ハイブリダイゼーション法は、Anderson, "Nucleic Acid Hybridization," BIOS Scientific Publishers, 1999 に記載されている。複数の転写された核酸配列 (例えば、m R N A 又は c D N A) の増幅又はハイブリダイゼーションも、マイクロアレイ上に配列された m R N A 又は c D N A 配列から実施することができる。マイクロアレイ法は、一般に、Hardiman, "Microarrays Methods and Applications: Nuts & Bolts," DNA Press, 2003; and Baldi et al., "DNA Microarrays and Gene Expression: From Experiments to Data Analysis and Modeling," Cambridge University Press, 2002 に記載されている。

10

【0200】

マーカーの遺伝子型、例えば、遺伝子マーカーの分析は、以下に限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) ベースの分析、配列解析及び電気泳動分析を含む当分野において公知の技術を使用して実施することができる。P C R ベース分析の非限定的な例は、Applied Biosystems から入手可能な Taqman (商標) 対立遺伝子識別アッセイを含む。配列分析の非限定的な例は、マキサム・ギルバートシーケンシング、サンガーシーケンシング、キャピラリーアレイ D N A シーケンシング、サーマルサイクルシーケンシング (Sears et al., Biotechniques, 13:626-633 (1992))、固相シーケンシング (Zimmerman et al., Methods Mol. Cell Biol., 3:39-42 (1992))、質量分析、例えば、マトリックス支援レーザー脱離 / イオン化飛行時間型質量分析 (M A L D I - T O F / M S ; Fu et al., Nature Biotech., 16:381-384 (1998)) を用いるシーケンシング及びハイブリダイゼーションによるシーケンシング (Chee et al., Science, 274:610-614 (1996)); Drmanac et al., Science, 260:1649-1652 (1993); Drmanac et al., Nature Biotech., 16:54-58 (1998)) を含む。電気泳動分析の非限定的な例は、スラブゲル電気泳動、例えば、アガロース又はポリアクリルアミドゲル電気泳動、キャピラリー電気泳動及び変性勾配ゲル電気泳動を含む。マーカー中の多型部位における個体の遺伝子型を決定する他の方法は、例えば、Third Wave Technologies, Inc. からの INVADER (商標) アッセイ、制限酵素断片長多型 (R F L P) 分析、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、ヘテロ二本鎖モビリティアッセイ及び一本鎖 D N A 高次構造多型 (S S C P) 分析を含む。

20

30

【0201】

対象となるいくつかのマーカーは、複数の試料の効果的な処理のために 1 つの試験に合することができる。更に、当業者は、同一対象からの、試験する複数の試料の値 (例えば、連続的な時点などにおけるもの) を認識する。このような一連の試料の試験によって、経時的なマーカーレベルの変化の同定が可能となる。マーカーレベルの増加又は減少並びにマーカーレベルの変化の非存在も、I B S を分類するため又は I B S 様症状と関連する疾患及び障害を除外するための有用な情報を提供することができる。

40

【0202】

上記の 1 種以上のマーカーを計測するためのパネルを構築して、試料を I B S と関連するとして分類するための本発明のアプローチに関連する関連情報を提供することができる。このようなパネルを構築して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40 種以上の個々のマーカーの存在又はレベルを決定することができる。単一のマーカー又はマーカーのサブセットの分析も、種々の臨床背景において当業者が実施することができる。これ

50

らは、以下に限定されるものではないが、巡回、緊急治療、救急救命治療、集中治療、モニタリングユニット、入院患者、通院患者、診療所、医療クリニック及び集団検診を含む。

【0203】

マーカーの分析は、同様に種々の物理フォーマットにおいて実施することができる。例えば、マイクロタイタープレートの使用又は自動化を使用して、多数の試験試料の処理を促進することができる。あるいは、単一の試料フォーマットを開発して、適時の様式において治療及び診断を簡略化することができる。

【0204】

1. 実施態様

1つの観点において、本発明は、血液又は血清試料中のIBSマーカーを検出するアッセイであって：

(a) 固相表面を第1の抗IBSマーカー捕捉抗体によりコーティングする工程；

(b)、試料中に存在するIBSマーカーが前記IBSマーカー及び抗IBSマーカー捕捉抗体を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、固相表面を血液又は血清試料と接触させる工程；

(c) 三重複合体を形成するのに好適な条件下で、IBSマーカー及び抗IBSマーカー複合体を、第2の検出抗体と接触させる工程；及び

(d) 三重複合体を、発光又は化学発光基質と接触させる工程；

を含む方法であり、ここで、IBSマーカーが、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン-O-サルフェート、5-ヒドロキシインドール酢酸、5-HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB及びヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター3Aからなる群から選択されるものとする、前記方法を提供する。

【0205】

1つの実施態様において、検出抗体は、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされている。その他の実施態様において、検出抗体は酵素にコンジュゲートされておらず、本方法は、

(i) 四重複合体を形成するのに好適な条件下で、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされた第3の抗体へ、三重複合体を接触させる工程；及び

(ii) 四重複合体を発光又は化学発光基質と接触させる工程；

を更に含む。

【0206】

サンドイッチELISAにおける抗体の捕捉及び検出のため、任意の好適な抗体ペアを使用することができる。当業者は、アッセイに適切な抗体ペアを選択する方法を理解及び認識する。一般に、第1の(捕捉)抗体の結合が第2の(検出)抗体を干渉しないように、対象となる標的(例えば、IBSマーカー)へ異なるエピトープで結合する2種の抗体が選択される。或る実施態様において、複合体の検出を補助するため、検出抗体は、酵素、例えば、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされる。その他の実施態様において、検出抗体に結合する酵素(例えば、アルカリホスファターゼ)にコンジュゲートされた二次抗体をアッセイにおいて使用することができる。

【0207】

一般に、複合体は、発光基質、例えば、キット、例えば、Ultra LITE(商品名)(NAG Research Laboratories)；SensoLyte(商標)(AnaSpec)；SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo Scientific)；SuperSignal ELISA Pico Chemil

10

20

30

40

50

uminescent Substrate (Thermo Scientific)に見出される発光基質；又はC P S D (ジナトリウム 3 - (4 - メトキシスピロ { 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2 ' - (5 ' - クロロ) トリシクロ [3 . 3 . 1 . 1 3 , 7] デカン } - 4 - イル) フェニルホスフェート ; Tropix, Inc) の使用により検出される。

【 0 2 0 8 】

好ましい実施態様において、I B S マーカーの存在又はレベルを検出するアッセイはサンドイッチ E L I S A を含み、前記サンドイッチ E L I S A は、検出抗体としてのアルカリホスファターゼにコンジュゲートされた抗 I B S マーカー抗体及び C P S D 含有発光基質の使用に依存して、アッセイ感度を向上させる。C P S D 基質は、化学発光検出系、例えば、ELISA-Light (商品名) System (Applied Biosystems) に見出すことができる。

10

【 0 2 0 9 】

本アッセイの好ましい実施態様において、血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの検出限界は、約 5 0 0 p g / m L 未満である。或る実施態様において、血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの検出限界は、約 5 0 0 p g / m L 未満又は約 4 0 0 p g / m L 未満、3 0 0 p g / m L、2 5 0 p g / m L、2 0 0 p g / m L、1 5 0 p g / m L、1 0 0 p g / m L、7 5 p g / m L、5 0 p g / m L、4 0 p g / m L、3 0 p g / m L、2 5 p g / m L、2 0 p g / m L、1 5 p g / m L 又は約 1 0 p g / m L 未満である。好ましい実施態様において、血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの検出限界は、約 2 0 0 p g / m L 未満である。より好ましい実施態様において、血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの検出限界は、約 1 0 0 p g / m L 未満である。より好ましい実施態様において、血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの検出限界は、約 5 0 p g / m L 未満である。最も好ましい実施態様において、血液又は血清試料中に存在する I B S マーカーの検出限界は、約 2 5 p g / m L 未満である。

20

【 0 2 1 0 】

別の観点において、本発明は、I B S の診断を補助するアッセイであって：

(a) I B S マーカーが前記 I B S マーカー及び捕捉抗 I B S マーカー抗体を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、I B S マーカーを有する試料を接触させること；

(b) 複合体を酵素標識指示抗体と接触させて、複合体を標識複合体に転換すること；

(c) 標識複合体を酵素用基質と接触させること；及び

(d) 試料中の I B S マーカーの存在又はレベルを検出すること；

30

を含むアッセイであり、ここで、I B S マーカーが、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニアラニン、U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A からなる群から選択されるものとする、前記アッセイを提供する。

40

【 0 2 1 1 】

I B S の診断を補助するアッセイの 1 つの実施態様において、試料はヒト血清である。

【 0 2 1 2 】

I B S の診断を補助するアッセイの別の実施態様において、試料は I B S の疑いがある対象から得られる。

【 0 2 1 3 】

I B S の診断を補助するアッセイの別の実施態様において、試料中の I B S マーカーのレベルが健常対照と比べて高ければ、対象が I B S である可能性の増加を示す。

【 0 2 1 4 】

50

I B S の診断を補助するアッセイの別の実施態様において、アッセイは酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) である。

【 0 2 1 5 】

I B S の診断を補助するアッセイの別の実施態様において、試料中の I B S マーカーの存在又はレベルの検出は、検出デバイスの使用を含む。

【 0 2 1 6 】

I B S の診断を補助するアッセイの別の実施態様において、検出デバイスは発光プレートリーダーを含む。

【 0 2 1 7 】

I B S の診断を補助するアッセイの別の実施態様において、検出デバイスは分光光度計を含む。

10

【 0 2 1 8 】

I B S の診断を補助するアッセイの別の実施態様において、アッセイは、試料中のトリプターゼ、プロスタグランジン E 2 (P G E ₂) 及び / 又はヒスタミンの存在又はレベルの検出を更に含む。

【 0 2 1 9 】

別の観点において、本発明は、I B S の臨床サブタイプの区別を補助するアッセイであって：

- (a) I B S マーカーが前記 I B S マーカー及び捕捉抗トリプターゼ抗体を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、I B S マーカーを有する試料を接触させること；
- (b) 複合体を酵素標識指示抗体と接触させて、複合体を標識複合体に転換すること；
- (c) 標識複合体を酵素用基質と接触させること；及び
- (d) 試料中の I B S マーカーの存在又はレベルを検出すること；

20

を含むアッセイであり、ここで、I B S マーカーが、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンス P、神経成長因子、ニューロキニン A、ニューロキニン B、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド 2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン - O - サルフェート、5 - ヒドロキシインドール酢酸、5 - H T グルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、U D P - グルクロノシルトランスフェラーゼ 1 - 6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1、モノアミンオキシダーゼ A、モノアミンオキシダーゼ B 及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター 3 A からなる群から選択されるものとする、前記アッセイを提供する。

30

【 0 2 2 0 】

I B S の臨床サブタイプの区別を補助するアッセイの 1 つの実施態様において、アッセイは、I B S - D 及び I B S - A と I B S - C との区別を補助する。

【 0 2 2 1 】

I B S の臨床サブタイプの区別を補助するアッセイの別の実施態様において、試料はヒト血清である。

【 0 2 2 2 】

I B S の臨床サブタイプの区別を補助するアッセイの別の実施態様において、アッセイは酵素結合免疫吸着アッセイ (E L I S A) である。

40

【 0 2 2 3 】

I B S の臨床サブタイプの区別を補助するアッセイの別の実施態様において、試料中の I B S マーカーの存在又はレベルの検出は、検出デバイスの使用を含む。

【 0 2 2 4 】

I B S の臨床サブタイプの区別を補助するアッセイの別の実施態様において、アッセイは、試料中のトリプターゼ、プロスタグランジン E 2 (P G E ₂) 及び / 又はヒスタミンの存在又はレベルの検出を更に含む。

【 0 2 2 5 】

50

或る実施態様において、本明細書において提供されるアッセイは、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子 (TWEAK)、成長関連癌遺伝子 (GRO-)、インターロイキン-1 (IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1 (TIMP-1)、抗Saccharomyces cerevisiae抗体 (ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体 (CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA (tTG)、-トリプターゼ、プロスタグランジンE₂ (PGE₂)、ヒスタミン及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の追加のバイオマーカーの存在又はレベルを検出することを更に含むことができる。

【0226】

更にその他の実施態様において、本明細書において提供されるアッセイは、サイトカイン (例えば、IL-8、IL-1、TWEAK、レプチン、OPG、MIP-3、GRO、CXCL4/PF-4及び/又はCXCL7/NAP-2)、成長因子 (例えば、EGF、VEGF、PEDF、BDNF及び/又はSDGF)、抗好中球抗体 (例えば、ANCA、pANCA、cANCA、NSNA及び/又はSAPPA)、ASCA (例えば、ASCA-IgA、ASCA-IgG及び/又はASCA-IgM)、抗菌性抗体 (例えば、抗OmpC抗体、抗フラジェリン抗体及び/又は抗I2抗体)、ラクトフェリン、抗tTG抗体、リポカリン (例えば、NGAL、NGAL/MMP-9複合体)、MMP (例えば、MMP-9)、TIMP (例えば、TIMP-1)、-グロブリン (例えば、-2-マクログロブリン、ハプトグロビン及び/又はオロソムコイド)、アクチン切断タンパク質 (例えば、ゲルゾリン)、S100タンパク質 (例えば、カルグラニューリン)、フィブリノペプチド (例えば、FIBA)、CGRP、タキキニン (例えば、サブスタンスP)、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン並びにこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の追加のバイオマーカーの存在又はレベルを検出することを更に含むことができる。更にその他の実施態様において、その他の診断マーカー、例えば、抗ラクトフェリン抗体、L-セレクチン/CD62L、エラスターゼ、C反応性タンパク質 (CRP)、カルプロテクチン、抗U1-70kDa自己抗体、閉鎖帯1 (ZO-1)、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、血清アミロイドA、ガストリン及びこれらの組合せの存在又はレベルを検出することもできる。

【0227】

或る実施態様において、提供されるアッセイは、本明細書に記載のバイオマーカーの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30種以上の検出を含むことができる。

【0228】

別の観点において、対象におけるIBSの診断を補助するキット又は試料をIBS試料若しくは非IBS試料として分類するキットが提供される。或る実施態様において、本明細書において提供されるキットは、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン-O-サルフェート、5-ヒドロキシインドール酢酸、5-HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB及びヒドロキシトリプタミン (セロトニン) レセプター3Aから選択されるIBSバイオマーカーの存在又はレベルを検出するための結合部分を含有する。

【0229】

その他の実施態様において、キットは、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン (NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子 (TWEAK

10

20

30

40

50

)、成長関連癌遺伝子 (GRO -)、インターロイキン - 1 (IL - 1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質 1 (TIMP - 1)、抗Saccharomyces cerevisiae抗体 (ASCA - IgA)、抗CBir - 1抗体 (CBir 1)、抗ヒト好中球細胞質抗体 (ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA (tTG)、 - トリプターゼ、プロスタグランジンE₂ (PGE₂)、ヒスタミン及びこれらの組合せからなる群から選択される追加のバイオマーカーのための少なくとも1種の結合部分も含有する。

【0230】

更にその他の実施態様において、キットは、サイトカイン (例えば、IL - 8、IL - 1、TWEAK、レプチン、OPG、MIP - 3、GRO、CXCL4/PF - 4及び/又はCXCL7/NAP - 2)、成長因子 (例えば、EGF、VEGF、PEDF、BDNF及び/又はSDGF)、抗好中球抗体 (例えば、ANCA、pANCA、cANCA、NSNA及び/又はSAPPA)、ASCA (例えば、ASCA - IgA、ASCA - IgG及び/又はASCA - IgM)、抗菌性抗体 (例えば、抗OmpC抗体、抗フラジェリン抗体及び/又は抗I2抗体)ラクトフェリン、抗tTG抗体、リポカリン (例えば、NGAL、NGAL/MMP - 9複合体)、MMP (例えば、MMP - 9)、TIMP (例えば、TIMP - 1)、 - グロブリン (例えば、 - 2 - マクログロブリン、ハプトグロビン及び/又はオロソムコイド)、アクチン切断タンパク質 (例えば、ゲルゾリン)、S100タンパク質 (例えば、カルグラニユリン)、フィブリノペプチド (例えば、FIBA)、CGRP、タキキニン (例えば、サブスタンスP)、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、抗ラクトフェリン抗体、L - セレクチン/CD62L、エラスターゼ、C反応性タンパク質 (CRP)、カルプロテクチン、抗U1 - 70kDa自己抗体、閉鎖帯1 (ZO - 1)、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、血清アミロイドA、ガストリン並びにこれらの組合せからなる群から選択される追加のバイオマーカーのための少なくとも1種の結合部分を含有する。

【0231】

或る実施態様において、提供されるキットは、本明細書中に記載のバイオマーカーの少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30種以上のための結合部分を含有することができる。

【0232】

好ましい実施態様において、血液又は血清試料中のIBSマーカーの存在又はレベルを検出するキットが提供される。1つの実施態様において、キットは、場合により固体表面に結合している第1の捕捉抗体及び前記捕捉抗体とは異なるIBSマーカー上のエピトープに結合する第2の検出抗体を含有する。或る実施態様において、検出抗体はアルカリホスファターゼにコンジュゲートされている。その他の実施態様において、検出抗体は、酵素、すなわち、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされていない。検出抗体が酵素にコンジュゲートされていない或る実施態様において、キットは、検出抗体に特異的な第3の抗体を更に含むことができ、第3の抗体は、酵素、例えば、アルカリホスファターゼにコンジュゲートされている。

【0233】

或る実施態様においてキットは、発光又は化学発光基質、例えば、Ultra LITE (商品名) (NAG Research Laboratories); SensoLyte (商標) (AnaSpec); SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific); SuperSignal ELISA Pic o Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific); に見出される発光基質又はCPSD (ジナトリウム3 - (4 - メトキシスピロ { 1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - (5' - クロロ) トリシクロ [3.3.1.13, 7] デカン } - 4 - イル) フェニルホスフェート; Tropix, Inc) も含有する。好ましい実施態様において、発光基質は、CPSD (ジナトリウム3 - (4 - メトキシスピロ { 1, 2 - ジオキセタン - 3, 2' - (5' - クロロ) トリシクロ [3.3.1.13, 7] デカン } - 4 - イル) フェニルホスフェートである。

10

20

30

40

50

【0234】

或る実施態様において、IBSマーカーの存在又はレベルを検出するキットは、約500 pg/mL未満の濃度において血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーを検出するのに好適である。或る実施態様において、本キットは、約500 pg/mL未満又は約400 pg/mL未満、300 pg/mL、250 pg/mL、200 pg/mL、150 pg/mL、100 pg/mL、75 pg/mL、50 pg/mL、40 pg/mL、30 pg/mL、25 pg/mL、20 pg/mL、15 pg/mL又は約10 pg/mL未満の濃度において血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーを検出するのに好適である。好ましい実施態様において、本キットは、約200 pg/mL未満の濃度において血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーを検出するのに好適である。より好ましい実施態様において、本キットは、約100 pg/mL未満の濃度において血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーを検出するのに好適である。より好ましい実施態様において、本キットは、約50 pg/mL未満の濃度において血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーを検出するのに好適である。最も好ましい実施態様において、本キットは、約25 pg/mL未満の濃度において血液又は血清試料中に存在するIBSマーカーを検出するのに好適である。

10

【0235】

E. 治療をモニタリング及び割り付ける方法

一部の実施態様において、個体をIBSであるとして診断した後、IBSに関連する1種以上の症状の治療に有用な薬物の治療有効量を個体に投与する。好適なIBS薬は、以下に限定されるものではないが、セロトニン作動薬、抗うつ剤、クロライドチャネル活性化因子、クロライドチャネル遮断薬、グアニル酸シクラーゼアゴニスト、抗生物質、オピオイドアゴニスト、ニューロキニンアンタゴニスト、抗痙攣又は抗コリン作動薬、ペラドンナルカロイド、バルピツレート、GLP-1アナログ、CRFアンタゴニスト、プロバイオティクス、これらの遊離塩基、医薬的に許容されるこれらの塩、これらの誘導体、これらのアナログ及びこれらの組合せを含む。その他のIBS薬は、増量剤、ドーパミンアンタゴニスト、駆風剤、トランキライザー、デクストフィソパム(dextofisopam)、フェニトイン、チモロール及びジルチアゼムを含む。更に、神経又はグリア細胞シグナリングに影響を及ぼすことによって腸透過性を調節するグルタミン及びグルタミン酸のアミノ酸を投与して、IBSの患者を治療することができる。

20

30

【0236】

その他の実施態様において、本発明の方法は、IBS試料又はIBSの診断を、IBS便秘型(IBS-C)、IBS下痢型(IBS-D)、IBS混合型(IBS-M)、IBS交替型(IBS-A)又は感染後IBS(IBS-PI)試料又は診断として分類することを更に含む。或る例において、IBS試料又は診断をIBSのカテゴリー、形態又は臨床サブタイプに分類することは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の本明細書に提供される分類マーカーの存在又はレベルに基づく。好ましくは、IBSの少なくとも1種の形態は、本明細書中に提供される1種以上のIBSマーカーの存在又はレベルに基づきIBSの少なくとも1種の他の形態から区別される。或る例において、本発明の方法を使用して、既にIBSであると同定された個体において、IBS-C試料とIBS-A及び/又はIBS-D試料とを区別することができる。或るその他の例において、本発明の方法を使用して、既にIBSでないとして診断された個体からの試料をIBS-A試料、IBS-C試料、IBS-D試料又は非IBS試料として分類することができる。

40

【0237】

或る実施態様において、本方法は、分類から得られた結果を臨床医に送付することを更に含む。或るその他の実施態様において、本方法は、個体がIBS-A、IBS-C、IBS-D、IBS-M又はIBS-PIである確率の形式の診断を更に提供する。本発明の方法は、IBS-A、IBS-C、IBS-D、IBS-M及び/又はIBS-PIの治療に有用な薬物の治療有効量を個体に投与することを更に含むことができる。好適な薬

50

物は、以下に限定されるものではないが、テガセロド (Zelnorm (商品名))、アロセトロン (Lotronex (商標))、ルビプロストン (Amitiza (商品名))、リファミキシン (Xifaxan (商品名))、MD - 1100、プロバイオティクス及びこれらの組合せを含む。

【0238】

試料が IBS - A 又は IBS - C 試料として分類され、及び / 又は個体が IBS - A 又は IBS - C であると診断された例において、テガセロド又は他の 5 - HT₄ アゴニスト (例えば、モサブリド、レンザブリド、AG1 - 001 など) の治療有効用量を個体に投与することができる。一部の例において、試料が IBS - C として分類され、及び / 又は個体が IBS - C である診断された場合、ルビプロストン又はその他のクロライドチャンネル活性化因子、リファミキシン又は腸内細菌の過剰成長を制御できるその他の抗生物質、MD - 1100 又は他のグアニル酸シクラーゼアゴニスト、アシマドリン又はその他のオピオイドアゴニスト又はタルネタントあるいはその他のニューロキニンアンタゴニストの治療有効量を個体に投与することができる。その他の例において、試料が IBS - D として分類され、及び / 又は個体が IBS - D であると診断された場合、アロセトロン又は他の 5 - HT₃ アンタゴニスト (例えば、ラモセトロン、DDP - 225 など)、クロフェレマー又はその他のクロライドチャンネル遮断薬、タルネタント又はその他のニューロキニンアンタゴニスト (例えば、サレデュータントなど) あるいは抗うつ剤、例えば、三環系抗うつ剤の治療有効量を個体に投与することができる。

10

【0239】

更に別の観点において、本発明は、個体における IBS の進行及び後退をモニタリングする方法であって：

20

(a) 試料中の少なくとも 1 種の診断マーカーの存在又はレベルを検出することによって診断マーカープロファイルを決定すること；及び

(b) 診断マーカープロファイルに基づくアルゴリズムを使用して個体における IBS の存在又は重症度を決定すること；
を含む前記方法を提供する。

【0240】

1 つの実施態様において、IBS の進行及び後退をモニタリングする方法は：

症状プロファイルと場合により組み合わせて診断マーカープロファイルを決定すること (ここで、前記症状プロファイルは、個体における少なくとも 1 種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定されるものとする)；及び

30

診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づくアルゴリズムを使用して個体における IBS の存在又は重症度を決定すること；
を含む。

【0241】

関連する観点において、本発明は、IBS の治療に有用な薬物を服用する個体における薬物の効力をモニタリングする方法であって：

(a) 試料中の少なくとも 1 種の診断マーカーの存在又はレベルを検出することによって診断マーカープロファイルを決定すること；及び

(b) 診断マーカープロファイルに基づくアルゴリズムを使用して薬物の有効性を決定すること；
を含む前記方法を提供する。

40

【0242】

1 つの実施態様において、IBS 薬の効力をモニタリングする方法は：

症状プロファイルと場合により組み合わせて診断マーカープロファイルを決定すること (ここで、前記症状プロファイルは、個体における少なくとも 1 種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定されるものとする)；及び

診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づくアルゴリズムを使用して薬物の有効性を決定すること；
を含む。

50

【0243】

1つの実施態様において、本発明は、対象における過敏性腸症候群（IBS）の進行又は後退をモニタリングする方法であって：

（a）試料中に存在するIBSマーカ―が、IBSマーカ―とIBSマーカ―結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、1回目に対象から採取された第1の血液又は血清試料を、IBSマーカ―結合部分と接触させること；

（b）複合体のレベルを決定し、これによって第1の試料中に存在するIBSマーカ―のレベルを決定すること；

（c）試料中に存在するIBSマーカ―がIBSマーカ―とIBSマーカ―結合部分を含む複合体に転換するのに好適な条件下において、2回目に対象から採取された第2の血液又は血清試料を、IBSマーカ―結合部分と接触させること；

（d）複合体のレベルを決定し、これによって第2の試料中に存在するIBSマーカ―のレベルを決定すること；及び

（e）第1の試料中に存在するIBSマーカ―のレベルと第2の試料中に存在するIBSマーカ―のレベルとを比較すること；

を含む方法であり、ここで、第2の試料中のIBSマーカ―のレベルが第1の試料と比べて高ければ、対象におけるIBSの進行を示し、そして、第2の試料中のIBSマーカ―のレベルが第1の試料と比べて低ければ、対象におけるIBSの後退を示すものであるとする、前記方法を提供する。

【0244】

治療をモニタリング及び割り付ける方法の或る実施態様において、本方法は、脳由来神経栄養因子（BDNF）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子（TWEAK）、成長関連癌遺伝子（GRO-）、インターロイキン-1（IL-1）、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1（TIMP-1）、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体（ASCA-IgA）、抗CBir-1抗体（CBir1）、抗ヒト好中球細胞質抗体（ANCA）、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA（tTG）、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂、ヒスタミン及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の追加のバイオマーカ―のレベルの存在を検出することを更に含む。或る実施態様において、本方法は、上記に提供した追加のバイオマーカ―の少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10種全ての存在又はレベルを検出することを含む。

【0245】

更にその他の実施態様において、本方法は、サイトカイン（例えば、IL-8、IL-1、TWEAK、レプチン、OPG、MIP-3、GRO、CXCL4/PF-4及び/又はCXCL7/NAP-2）、成長因子（例えば、EGF、VEGF、PEDF、BDNF及び/又はSDGF）、抗好中球抗体（例えば、ANCA、pANCA、cANCA、NSNA及び/又はSAPPA）、ASCA（例えば、ASCA-IgA、ASCA-IgG及び/又はASCA-IgM）、抗菌性抗体（例えば、抗OmpC抗体、抗フラジェリン抗体及び/又は抗I2抗体）、ラクトフェリン、抗tTG抗体、リポカリン（例えば、NGAL、NGAL/MMP-9複合体）、MMP（例えば、MMP-9）、TIMP（例えば、TIMP-1）、α₂-グロブリン（例えば、α₂-マクログロブリン、ハプトグロビン及び/又はオロソムコイド）、アクチン切断タンパク質（例えば、ゲルゾリン）、S100タンパク質（例えば、カルグラニユリン）、フィブリノペプチド（例えば、FIBA）、CGRP、タキキニン（例えば、サブスタンスP）、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン並びにこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種のバイオマーカ―のレベルの存在を検出することを更に含むことができる。更にその他の実施態様において、その他の診断マーカ―、例えば、抗ラクトフェリン抗体、L-セレクチン/CD62L、エラスターゼ、C反応性タンパク質（CRP）、カルプロテクチン、抗U1-70kDa自己抗体、閉鎖帯1（ZO-1）、血管作動性腸管ペプチド（VIP）、血清アミロイドA、ガストリン及びこれらの組合せなど

10

20

30

40

50

の存在又はレベルを検出することもできる。

【0246】

一部の実施態様において、上記の診断マーカーの1種以上を計測するためのパネルを、IBSの存在若しくは重症度を決定するため又はIBS薬の有効性を決定するために構築及び使用することができる。当業者は、例えば、個体試料のアリコート又は希釈物を使用して複数の診断マーカーの存在又はレベルを同時に又は連続的に決定することができることを認識する。上記のとおり、個体試料中の特定の診断マーカーのレベルは、一般に、これが比較試料又は試料群における同一のマーカーのレベルを少なくとも約10%、15%、20%、25%、50%、75%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、600%、700%、800%、900%又は1000%上回る（例えば、中央値を上回る）場合、上昇しているとみなされる。同様に、個体試料中の特定の診断マーカーのレベルは、典型的には、比較試料又は試料群における同一のマーカーのレベルを少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%又は95%下回る（例えば、中央値を下回る）場合、低下しているとみなされる。

10

【0247】

或る実施態様において、IBSの進行及び後退をモニタリングする方法は：

症状プロファイルと場合により組み合わせる診断マーカープロファイルを決定すること（ここで、前記症状プロファイルは、個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定されるものとする）；及び

20

診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づくアルゴリズムを使用して個体のIBSの存在又は重症度を決定すること；

を含む。或るその他の実施態様において、IBS薬の効力をモニタリングする方法は：

症状プロファイルと場合により組み合わせる診断マーカープロファイルを決定すること（ここで、前記症状プロファイルは、個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を同定することによって決定されるものとする）；及び

診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づくアルゴリズムを使用して薬物の有効性を決定すること；

を含む。当業者は、診断マーカープロファイル及び症状プロファイルを同時に又は任意の順序で連続的に決定することができることを認識する。

30

【0248】

一部の実施態様において、IBSの存在又は重症度あるいはIBS薬の有効性を決定することは、統計的アルゴリズムを併用する診断マーカープロファイル単独又は症状プロファイルとの組合せに基づく。或る例において、統計的アルゴリズムは、学習統計的分類子システムである。学習統計的分類子システムは、本明細書中に記載の学習統計的分類子システムのいずれかを含む。

【0249】

或る実施態様において、本発明の方法は、工程（b）において決定された個体におけるIBSの存在又は重症度を、より早期の個体におけるIBSの存在又は重症度と比較することを更に含むことができる。非限定的な例として、IBS薬を服用している個体について決定されたIBSの存在又は重症度を、IBS薬の使用開始前又は治療のより早期の同一個体について決定されたIBSの存在又は重症度と比較することができる。或る他の実施態様において、本発明の方法は、工程（b）において決定されたIBS薬の有効性と治療のより早期の個体におけるIBS薬の有効性を比較することによって、IBS薬の有効性を決定することを含むことができる。追加の実施態様において、本方法は、IBSのモニタリング結果を臨床医、例えば、胃腸科専門医又は一般開業医に送付することを更に含むことができる。

40

【0250】

F．試料を分類するためのコンピュータ読取可能媒体及びシステム

50

1つの観点において、本発明は、1種以上のプロセッサを制御して対象からの血液又は血清試料が過敏性腸症候群（IBS）と関連するか否かを分類するコードを含むコンピュータ読取可能媒体であって、

診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、前記診断マーカープロファイルに基づき前記試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示を前記コードが含み、

ここで、前記診断マーカープロファイルは、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン-O-サルフェート、5-ヒドロキシインドール酢酸、5-HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB及びヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3A並びにこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の診断マーカーのレベルを示すものとする、前記コンピュータ読取可能媒体を提供する。

【0251】

その他の実施態様において、IBSを確定するためのコンピュータ読取可能媒体は、個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を示す症状プロファイルと場合により組み合わせて診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づき試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示を含む。当業者は、統計処理を診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに同時に又は任意の順序で連続的に適用することができることを認識する。

【0252】

特定の実施態様において、本発明は、1種以上のプロセッサを制御して対象からの血液又は血清試料が過敏性腸症候群（IBS）と関連するか否かを分類するコードを含むコンピュータ読取可能媒体であって、

診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、前記診断マーカープロファイルに基づき前記試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示を前記コードが含み、

ここで、前記診断マーカープロファイルは、試料中の少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルを示すものとする、前記コンピュータ読取可能媒体を提供する。

【0253】

関連する観点において、本発明は、1種以上のプロセッサを制御して個体からの試料がIBSと関連するか否かを分類するコードを含むコンピュータ読取可能媒体であって、前記コードが：

(a) 診断マーカープロファイルを含むデータセットに第1の統計処理を適用して、診断マーカープロファイルに基づき試料をIBD試料又は非IBD試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示（ここで、前記診断マーカープロファイルは、試料中の少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルを示すものとする）；及び

試料が非IBD試料として分類された場合、(b) 同一又は異なるデータセットに第2の統計処理を適用して、非IBD試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する第2の統計的に導出される判定を生成するための指示；を含む、前記コンピュータ読取可能媒体を提供する。

【0254】

1つの実施態様において、IBSを確定するためのコンピュータ読取可能媒体は、個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を示す症状プロファイルと場合により組み合わせて診断マーカープロファイルを含むデータセットに統計処理を適用して、診断マ

10

20

30

40

50

ーカープロファイル及び症状プロファイルに基づき試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示を含む。

【0255】

その他の実施態様において、第1にIBDを除外し、次いでIBSを確定するためのコンピュータ読取可能媒体は、

個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を示す症状プロファイルと場合により組み合わせて診断マーカープロファイルを含むデータセットに第1の統計処理を適用して、診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づき試料をIBD試料又は非IBD試料として分類する統計的に導出される判定を生成するための指示；及び

試料が非IBD試料として分類された場合、同一又は異なるデータセットに第2の統計処理を適用して、非IBD試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する第2の統計的に導出される判定を生成するための指示；

を含む。当業者は、第1及び/又は第2の統計処理を診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに同時に又は任意の順序で連続的に適用することができることを認識する。

【0256】

1つの実施態様において、第1及び第2の統計処理は、種々のプロセッサにおいて実装される。あるいは、第1及び第2の統計処理は、単一のプロセッサにおいて実装される。別の実施態様において、第1の統計処理は、学習統計的分類子システムである。本発明における使用に好適な学習統計的分類子システムの例は、上記のとおりである。或る例において、第1及び/又は第2の統計処理は、単一の学習統計的分類子システム、例えば、RF又はC&RTである。或るその他の例において、第1及び/又は第2の統計処理は、少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せである。非限定的な例として、学習統計的分類子システムの組合せは、例えば、タンデムで使用されるRF及びNN又はSVMを含む。一部の例において、1種以上の学習統計的分類子システムを使用して得られたデータは、処理アルゴリズムを使用して処理することができる。

【0257】

別の観点において、本発明は、対象からの血液又は血清試料が過敏性腸症候群（IBS）と関連するか否かを分類するシステムであって：

(a) 診断マーカープロファイルを含むデータセットを生成するように構成されたデータ収集モジュール（ここで、前記診断マーカープロファイルは、糖鎖欠損トランスフェリン、ウロコルチン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質、コルチゾール、副腎皮質刺激ホルモン、サブスタンスP、神経成長因子、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド、グルカゴン様ペプチド2、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド、セロトニン、トリプトファン、セロトニン-O-サルフェート、5-ヒドロキシインドール酢酸、5-HTグルクロニド、チロシン、フェニルアラニン、UDP-グルクロノシルトランスフェラーゼ1-6、セロトニン再取り込み輸送体、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、モノアミンオキシダーゼA、モノアミンオキシダーゼB及びヒドロキシトリプタミン（セロトニン）レセプター3A及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の診断マーカの存在又はレベルを示すものとする）；

(b) データセットに統計処理を適用することによってデータセットを処理して診断マーカープロファイルに基づき試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュール；及び

(c) 統計的に導出される判定を表示するように構成されたディスプレイモジュール；を含む前記システムを提供する。

【0258】

或る実施態様において、血液又は血清試料がIBSと関連するか否かを分類するか、IBSの診断を補助するか、又はIBSを確定するシステムは、

個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を示す症状プロファイルと場合により組み合わせて診断マーカープロファイルを含むデータセットを生成するように構成さ

10

20

30

40

50

れたデータ収集モジュール；

データセットに統計処理を適用することによってデータセットを処理して診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づき試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュール；及び統計的に導出される判定を表示するように構成されたディスプレイモジュール；を含むシステムを提供する。

【0259】

関連する観点において、本発明は、個体からの試料がIBSと関連するか否かを分類するシステムであって：

(a) 診断マーカープロファイルを含むデータセットを生成するように構成されたデータ収集モジュール（ここで、前記診断マーカープロファイルは、試料中の少なくとも1種の診断マーカーの存在又はレベルを示す）；

(b) データセットに第1の統計処理を適用することによってデータセットを処理して、診断マーカープロファイルに基づき試料をIBD試料又は非IBD試料として分類する第1の統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュール；試料が非IBD試料として分類された場合、同一又は異なるデータセットに第2の統計処理を適用して、非IBD試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する第2の統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュール；及び

(c) 第1及び/又は第2の統計的に導出される判定を表示するように構成されたディスプレイモジュールを含むシステム；

【0260】

1つの実施態様において、第1にIBDを除外し、次いでIBSを確定するシステムは：

個体における少なくとも1種の症状の存在又は重症度を示す症状プロファイルと場合により組み合わせて診断マーカープロファイルを含むデータセットを生成するように構成されたデータ収集モジュール；

データセットに第1の統計処理を適用することによってデータセットを処理して、診断マーカープロファイル及び症状プロファイルに基づき試料をIBD試料又は非IBD試料として分類する第1の統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュール；

試料が非IBD試料として分類された場合、同一又は異なるデータセットに第2の統計処理を適用して、非IBD試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する第2の統計的に導出される判定を生成するように構成されたデータ処理モジュール；及び

第1及び/又は第2の統計的に導出される判定を表示するように構成されたディスプレイモジュール；を含む。

【0261】

或る実施態様において、診断マーカープロファイルは、脳由来神経栄養因子(BDNF)、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、成長関連癌遺伝子(GRO-)、インターロイキン-1(IL-1)、組織メタロプロテアーゼ阻害物質1(TIMP-1)、抗Saccharomyces cerevisiae抗体(ASCA-IgA)、抗CBir-1抗体(CBir1)、抗ヒト好中球細胞質抗体(ANCA)、抗ヒト組織トランスグルタミナーゼIgA(tTG)、ヒスタミン、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂(PGE₂)及びこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の追加の診断マーカーのレベルを示す。或る実施態様において、本方法は、上記に提供した追加のバイオマーカーの少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10種全ての存在又はレベルを検出することを含む。

【0262】

更にその他の実施態様において、診断マーカープロファイルは、サイトカイン（例えば

、IL-8、IL-1、TWEAK、レプチン、OPG、MIP-3、GRO、CXCL4/PF-4及び/又はCXCL7/NAP-2)、成長因子(例えば、EGF、VEGF、PEDF、BDNF及び/又はSDGF)、抗好中球抗体(例えば、ANCA、pANCA、cANCA、NSNA及び/又はSAPPA)、ASCA(例えば、ASCA-IgA、ASCA-IgG及び/又はASCA-IgM)、抗菌性抗体(例えば、抗OmpC抗体、抗フラジエリン抗体及び/又は抗I2抗体)、ラクトフェリン、抗tTG抗体、リポカリン(例えば、NGAL、NGAL/MMP-9複合体)、MMP(例えば、MMP-9)、TIMP(例えば、TIMP-1)、 α -2-マクログロブリン、ハプトグロビン及び/又はオロソムコイド)、アクチン切断タンパク質(例えば、ゲルゾリン)、S100タンパク質(例えば、カルグラニユリン)、フィブリノペプチド(例えば、FIBA)、CGRP、タキキニン(例えば、サブスタンスP)、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン並びにこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも1種の追加の診断マーカーのレベルを示す。更にその他の実施態様において、その他の診断マーカー、例えば、抗ラクトフェリン抗体、L-セレクチン/CD62L、エラスターゼ、C反応性タンパク質(CRP)、カルプロテクチン、抗U1-70kDa自己抗体、閉鎖帯1(ZO-1)、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、血清アミロイドA、ガストリン及びこれらの組合せの存在又はレベルを検出することもできる。

10

【0263】

G. IBS様症状を示す疾患及び障害

20

種々の構造又は代謝疾患及び障害は、IBSと類似する兆候又は症状を引き起こし得る。非限定的な例として、炎症性腸疾患(IBD)、セリアック病(CD)、急性炎症、憩室炎、回腸囊肛門吻合、顕微鏡的大腸炎、慢性感染性下痢、ラクターゼ欠損症、癌(例えば、結腸直腸癌)、小腸又は結腸の機械的閉塞、腸管感染症、虚血、消化不良、吸収不良、子宮内膜症及び未同定の腸管の炎症性疾患などの疾患及び障害の患者は、IBSと同様の、軽度から中等度の疼痛、並びに、便の硬さ及び/又は便通の頻度における変化を伴う腹部不快感を示し得る。追加のIBS様症状は、慢性下痢又は慢性便秘あるいは便秘と下痢を交互に繰り返す症状、体重減少、腹部膨満又は鼓脹及び糞便粘液を含むことができる。

【0264】

30

大部分のIBD患者は、2種の明確な臨床サブタイプであるクローン病及び潰瘍性大腸炎のうちの1種に分類することができる。クローン病は、回腸下部を侵襲し、結腸及び腸管の他の領域を患うことが多い炎症性疾患である。潰瘍性大腸炎は、主として大腸の粘膜及び粘膜下組織中に局在する炎症を特徴とする。IBDのこれらの臨床サブタイプを罹患する患者は、典型的には、IBS様症状、例えば、腹痛、慢性下痢、体重減少及び痙攣などを示す。

【0265】

セリアック病の臨床所見も、IBS様症状、例えば、慢性下痢、体重減少及び腹部膨満を伴う腹部不快感を特徴とする。セリアック病は、典型的には絨毛萎縮、陰窩の過形成及び/又は小腸の粘膜内層の炎症を伴う腸粘膜の免疫介在障害である。セリアック病の個体は、栄養の吸収不良に加えて、ミネラル欠損、ビタミン欠損、骨粗鬆症、自己免疫疾患及び腸悪性腫瘍(例えば、リンパ腫及び癌腫)に対する危険に面している。適当な遺伝的及び環境的状况におけるタンパク質、例えば、グルテン(例えば、小麦、ライ麦、大麦、オート麦、キビ、ライ小麦、スペルト麦及びカムート中に存在するグルテニン及びプロラミンタンパク質)への暴露が、セリアック病を引き起こす原因であると考えられている。

40

【0266】

IBS様症状を示す腸炎を特徴とするその他の疾患及び障害は、例えば、急性炎症、憩室炎、回腸囊肛門吻合、顕微鏡的大腸炎及び慢性感染性下痢並びに未同定の腸管の炎症性障害を含む。急性炎症のエピソードを経験している患者は、典型的には、IBS様症状に加えてC反応性タンパク質(CRP)レベルが上昇している。CRPは、炎症過程の急性

50

期に肝臓によって産生され、通常、炎症過程の開始約24時間後に放出される。憩室炎、回腸囊肛門吻合、顕微鏡的大腸炎及び慢性感染性下痢を罹患する患者は、典型的には、IBS様症状に加えて、糞中のラクトフェリン及び/又はカルプロテクチンのレベルが増加している。ラクトフェリンは、粘膜によって分泌される糖タンパク質であり、白血球の二次顆粒中の主要なタンパク質である。白血球は一般に炎症部位にリクルートされ、活性化され、周辺領域に顆粒の内容物を放出する。この過程が便中のラクトフェリンの濃度を増加させる。

【0267】

過敏性囊症候群のような囊のその他の非炎症病態と比較して、回腸囊肛門吻合（すなわち、クローン病の重症例の場合、結腸の完全切除後に囊が作出される）の患者においては、ラクトフェリンレベルの増加が観察される。ラクトフェリンレベルの上昇は憩室炎患者においても観察され、この憩室炎は、消化管における膨張した囊（すなわち、憩室）が炎症を起こし、及び/又は感染し、重症度の腹痛、発熱、悪心及び排便習慣の顕著な変化を引き起こす病態である。顕微鏡的大腸炎も便中ラクトフェリンレベルの増加を伴う慢性炎症性障害である。顕微鏡的大腸炎は、持続性の水様下痢（非血性）、通常、体重減少を伴う腹痛、大腸内視鏡検査及び放射線検査における正常な粘膜並びに非常に特異的な組織病理学的変化を特徴とする。顕微鏡的大腸炎は、コラーゲン蓄積大腸炎及びリンパ性大腸炎の2種の疾患からなる。コラーゲン蓄積大腸炎は、病因が不明であり、長期の水様下痢及び正常な大腸内視鏡検査結果を示す患者に見出される。コラーゲン蓄積大腸炎及びリンパ性大腸炎は両方とも、結腸内膜におけるリンパ球の増加を特徴とする。コラーゲン蓄積大腸炎は更に、結腸の上皮下コラーゲン層の肥大化を特徴とする。慢性感染性下痢も、便中ラクトフェリンレベルの増加を伴う疾病である。慢性感染性下痢は通常、細菌、ウイルス又は原生動物の感染によって引き起こされ、患者はIBS様症状、例えば、下痢及び腹痛を示す。ラクトフェリンレベルの増加は、IBDの患者においても観察される。

【0268】

腸炎を伴う疾患及び障害は、CRP及び/又はラクトフェリン及び/又はカルプロテクチンレベルを決定することに加えて、糞便中血液の存在、例えば、便中ヘモグロビンを検出することによって排除することもできる。患者の自覚なく起こる腸出血は、潜在出血又は潜出血と呼ばれる。潜在出血の存在（例えば、便中ヘモグロビン）は、典型的には、患者の糞便試料中で観察される。その他の病態、例えば、潰瘍（例えば、胃潰瘍、十二指腸潰瘍）、癌（胃癌、結腸直腸癌）及び痔も、腹痛並びに便の硬さ及び/又は排便頻度の変化を含むIBS様症状を示し得る。

【0269】

更に、便中カルプロテクチンレベルを評価することもできる。カルプロテクチンは、主に好中球及び単球に由来する抗菌活性を有するカルシウム結合タンパク質である。カルプロテクチンは、嚢胞性繊維症、関節リウマチ、IBD、結腸直腸癌、HIV及び他の炎症性疾患と臨床的関連を有することが見出されている。このレベルは、血清、血漿、口腔、脳脊髄液及び滑液、尿及び便中で計測されている。GI障害における便中カルプロテクチンの利点は、以下のとおり認識されている：室温において3~7日間安定であり、このことによって普通郵便による試料の運搬が可能になり；クローン病の患者の便中1-アントトリプシンと相関し；ほとんど大部分の消化管癌及びIBDの患者において上昇する。便中カルプロテクチンは、潰瘍性大腸炎における疾患活性の内視鏡的及び組織学的グレーディングと十分相関し、そして、IBDにおける疾患活性の指標であるインジウム111によって標識された好中性顆粒球の便排泄と十分相関することが見出された。

【0270】

上記事項を考慮すると、広範囲の疾患及び障害がIBS様症状を引き起こし得、これによって試料をIBS試料として明確に分類することに対する実質的な障壁が作られることが明らかである。しかしながら、本発明は、例えば、統計的アルゴリズムを使用して個体からの試料をIBS試料として分類することによって、又は、例えば、統計的アルゴリズムの組合せを使用してIBSと類似する臨床所見を共有するこれらの疾患及び障害を排除

10

20

30

40

50

(すなわち、除外)し、試料中のIBS試料を同定(すなわち、確定)することによってこの制限を克服する。

【0271】

H. 診断マーカー

種々の診断マーカーは、個体からの試料をIBS試料として分類するか又は個体からの試料におけるIBS様症状と関連する1種以上の疾患又は障害を除外する本発明の方法、システム及びコードにおける使用に好適である。診断マーカーの例は、以下に限定されるものではないが、サイトカイン、成長因子、抗好中球抗体、抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体、抗菌性抗体、抗組織トランスグルタミナーゼ(tTG)抗体、リポカリン、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)、リポカリン及びMMPの複合体、組織メタロプロテアーゼ阻害因子(TIMPs)、グロブリン(例えば、 α -グロブリン)、アクチン切断タンパク質、S100タンパク質、フィブリノペプチド、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、タキキニン、グレリン、ニューロテンシン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)、セリンプロテアーゼ(例えば、トリプターゼ、例えば、 α -トリプターゼ、エラスターゼなど)、プロスタグランジン(例えば、 PGE_2)、ヒスタミン、C反応性タンパク質(CRP)、ラクトフェリン、抗ラクトフェリン抗体、カルプロテクチン、ヘモグロビン、NOD2/CARD15、セロトニン再取り込み輸送体(SERT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ1、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)、ラクツロース、肥胖細胞マーカー、ストレスマーカー、消化管ホルモン、セロトニン代謝産物、セロトニン経路マーカー、糖鎖欠損トランスフェリン(CDT)並びにこれらの組合せを含む。本発明によりIBSを予測するための追加の診断マーカーは、全ての目的のために参照することにより全体が本明細書に取り込まれる2007年8月14日に出版された米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例14に記載の技術を使用して選択することができる。当業者は、本発明における使用に好適なその他の診断マーカーについても理解する。

10

20

【0272】

特定の実施態様において、診断マーカープロファイルは、以下のバイオマーカー：セリンプロテアーゼ(例えば、トリプターゼ、例えば、 α -トリプターゼ)；プロスタグランジン(例えば、 PGE_2)；及び/又はヒスタミンの少なくとも1、2又は3種全ての存在又はレベルを検出することにより決定される。

30

【0273】

その他の実施態様において、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9又は10種以上の診断マーカーの存在又はレベルを個体試料中で決定する。ある例において、サイトカインは、下記のサイトカインの1種以上を含む。好ましくは、IL-8、IL-1、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、レプチン、オステオプロテゲリン(OPG)、MIP-3、GRO、CXCL4/PF-4及び/又はCXCL7/NAP-2の存在又はレベルを個体試料中で決定する。或るその他の例において、成長因子は、下記の成長因子の1種以上を含む。好ましくは、上皮成長因子(EGF)、血管内皮成長因子(VEGF)、色素上皮由来因子(PEDF)、脳由来神経栄養因子(BDNF)及び/又はアンフィレギュリン(SDGF)の存在又はレベルを個体試料中で決定する。

40

【0274】

一部の例において、抗好中球抗体は、ANCA、pANCA、cANCA、NSNA、SAPPA及びこれらの組合せを含む。その他の例において、ASCAは、ASCA-IgA、ASCA-IgG、ASCA-IgM及びこれらの組合せを含む。更なる例において、抗菌性抗体は、抗OmpC抗体、抗フラジェリン抗体、抗I2抗体及びこれらの組合せを含む。

【0275】

或る例において、リポカリンは、下記のリポカリンの1種以上を含む。好ましくは、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン(NGAL)及び/又はNGALとマトリックスメタロプロテアーゼとの複合体(例えば、NGAL/MMP-9複合体)の存在又はレベルを、

50

個体試料中で決定する。その他の例において、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は、下記の MMP の 1 種以上を含む。好ましくは、MMP - 9 の存在又はレベルを個体試料中で決定する。更なる例において、組織メタロプロテアーゼ阻害因子 (TIMP) は、下記の TIMP の 1 種以上を含む。好ましくは、TIMP - 1 の存在又はレベルを個体試料中で決定する。更に追加の例において、 α -グロブリンは、下記の α -グロブリンの 1 種以上を含む。好ましくは、 α -2-マクログロブリン、ハプトグロビン及び/又はオロソムコイドの存在又はレベルを、個体試料中で決定する。

【0276】

或るその他の例において、アクチン切断タンパク質は、下記のアクチン切断タンパク質の 1 種以上を含む。好ましくは、ゲルゾリンの存在又はレベルを個体試料中で決定する。追加の例において、S100タンパク質は、例えば、カルグラニューリンを含む下記の S100タンパク質の 1 種以上を含む。更にその他の例において、フィブリノペプチドは、下記のフィブリノペプチドの 1 種以上を含む。好ましくは、フィブリノペプチド A (FIBA) の存在又はレベルを個体試料中で決定する。更なる例において、タキキニン、例えば、サブスタンス P、ニューロキニン A 及び/又はニューロキニン B の存在又はレベルを、個体試料中で決定する。

10

【0277】

一部の例において、セリンプロテアーゼは、下記のセリンプロテアーゼの 1 種以上を含む。好ましくは、セリンプロテアーゼ、例えば、トリプターゼ (例えば、 α -トリプターゼ) の存在又はレベルを、個体試料中で決定する。その他の例において、プロスタグランジン 20 は、下記のプロスタグランジンの 1 種以上を含む。好ましくは、プロスタグランジン、例えば、PGE₂ の存在又はレベルを個体試料中で決定する。

20

【0278】

その他の診断マーカー、例えば、抗ラクトフェリン抗体、L-セレクチン/CD62L、エラスターゼ、C反応性タンパク質 (CRP)、カルプロテクチン、抗U1-70kDa自己抗体、閉鎖帯 1 (ZO-1)、血管作動性腸管ペプチド (VIP)、血清アミロイド A 及び/又はガストリンの存在又はレベルを決定することもできる。

【0279】

1. セリンプロテアーゼ

試料中の少なくとも 1 種のセリンプロテアーゼの存在又はレベルの決定は、本発明において有用である。本明細書において使用される用語「セリンプロテアーゼ」は、活性部位のアミノ酸の 1 個がセリンであるプロテアーゼのファミリーの任意のメンバーを含む。セリンプロテアーゼの非限定的な例は、トリプターゼ (例えば、 α -トリプターゼ、 β -トリプターゼ、 γ -トリプターゼ及び/又は δ -トリプターゼ)、エラスターゼ、キモトリプシン、トリプシン、サブチリシン及びこれらの組合せを含む。トリプターゼは、種々の生体液中で計測することができ、肥胖細胞活性化についての有用なマーカーとして機能することができるヒト肥胖細胞の豊富な特異的中性プロテアーゼである。実際、トリプターゼは、IBSにおける肥胖細胞活性化についてのマーカーとして使用することができる。トリプターゼは、おそらくプロテアーゼ活性化受容体 2 の活性化によって、肥胖細胞のプロ分泌及びプロ炎症効果を説明する良好な候補と考えられているが、他の肥胖細胞メディエーターも関与し得る。好ましい実施態様において、 α -トリプターゼ (TPBAB1) を、対象からの血液又は血清試料中で検出する。 α -トリプターゼは、一般に、トリプターゼ - 1 又はトリプターゼ I とも称され、トリプターゼ / 1 遺伝子 (TPSAB1; NM_003294) によってコードされ、翻訳されて 275 個のアミノ酸のトリプターゼ - 1 前駆体タンパク質 (NP_003285) が形成される。次いで、前駆体タンパク質はシグナルペプチド (アミノ酸 1~18) 及び活性化ペプチドプロペプチド (アミノ酸 19~30) の除去によりプロセッシングされ、成熟トリプターゼ - 1 ポリペプチド (アミノ酸 31~275; UniProt: Q15661) がもたらされる。

30

40

【0280】

或る例において、特定のセリンプロテアーゼ、例えば、トリプターゼの存在又はレベル

50

は、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイにより、mRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のセリンプロテアーゼ、例えば、トリプターゼの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清試料中のトリプターゼの存在又はレベルを決定するために好適なELISA技術は、本明細書に記載されている。特に好ましい実施態様において、トリプターゼのレベルは、検出抗体がアルカリホスファターゼにコンジュゲートされた抗トリプターゼ抗体、例えば、市販の抗体G3であるサンドイッチELISAアッセイを使用して血液又は血清試料中で検出される。発光基質、例えば、CPSD（ジナトリウム3-（4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-（5'-クロロ）トリシクロ[3.3.1.1.3,7]デカン}-4-イル）フェニルホスフェート）を使用してアッセイの感度を向上させることができる。

【0281】

2. プロスタグランジン

試料中の少なくとも1種のプロスタグランジンの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される用語「プロスタグランジン」は、脂肪酸から酵素的に誘導され、動物体内における重要な機能を有する脂質化合物の群の任意のメンバーを含む。全てのプロスタグランジンは、5炭素環を含む20個の炭素原子を含有する。プロスタグランジンは、トロンボキサン及びプロスタサイクリンと一緒に、プロスタノイドクラスの脂肪酸誘導体を形成する。プロスタノイドクラスは、エイコサノイドのサブクラスである。プロスタグランジンの非限定的な例は、プロスタグランジン I_2 （PG I_2 ）、プロスタグランジン E_2 （PG E_2 ）、プロスタグランジン F_2 （PG F_2 ）及びこれらの組合せを含む。好ましい実施態様において、プロスタグランジン E_2 （PG E_2 ）を、対象、例えば、IBSの疑いがある対象からの血液又は血清試料中で検出する。或る実施態様において、PG E_2 は、ELISA又は化学発光アッセイにより検出することができる。血清試料中のPG E_2 の存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) から入手可能である。

【0282】

3. ヒスタミン

試料中のヒスタミンの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される用語「ヒスタミン」は、局所免疫応答に関与し、腸内の生理学的機能を調節し、神経伝達物質として作用する生体アミンを含む。ヒスタミンは、炎症応答を誘引する。外部病原体（foreign pathogens）に対する免疫応答の一部として、ヒスタミンは、好塩基球及び結合組織付近に見出される肥満細胞により産生される。ヒスタミンは、白血球及びその他のタンパク質に対する毛細血管の浸透性を増加させて、患部組織内でこれらを外部侵入物と交戦させる。このことは、実質的に全ての動物体細胞内で見出される。好ましい実施態様において、ヒスタミンは、対象、例えば、IBSの疑いがある対象からの血液又は血清試料中で検出される。或る実施態様において、ヒスタミンは、ELISA又は化学発光アッセイにより検出することができる。血清試料中のヒスタミンの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Immunotech (Czech Republic)及びCayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) から入手可能である。

【0283】

4. サイトカイン

試料中の少なくとも1種のカイトカインの存在又はレベルの決定は、本発明において特に有用である。本明細書において使用される「サイトカイン」という用語は、種々の範囲の免疫システム機能を調節する免疫細胞によって分泌される、種々のポリペプチド又はタンパク質のいずれかを含み、そして、小分子サイトカイン、例えば、ケモカインを包含する。「サイトカイン」という用語は、例えば、体重、造血、血管新生、創傷治癒、インスリン耐性、免疫応答及び炎症応答の調節において機能する脂肪細胞によって分泌されるサイ

10

20

30

40

50

トカインの群を含むアディポサイトカインも含む。

【0284】

或る観点において、以下に限定されるものではないが、TNF- α 、TNF関連アポトーシス弱誘導因子(TWEAK)、オステオプロテゲリン(OPG)、IFN- γ 、IFN- β 、IFN- α 、IL-1 β 、IL-1 α 、IL-1受容体アンタゴニスト(IL-1ra)、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、可溶性IL-6受容体(sIL-6R)、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、IL-23及びIL-27を含む少なくとも1種のサイトカインの存在又はレベルを、試料中で決定する。或る他の観点において、少なくとも1種のケモカイン、例えば、CXCL1/GRO1/GRO、CXCL2/GRO2、CXCL3/GRO3、CXCL4/PF-4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL9/MIG、CXCL10/IP-10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15、CXCL16、CXCL17/DMC、CCL1、CCL2/MCP-1、CCL3/MIP-1、CCL4/MIP-1、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/CCL10、CCL11/エオタキシン、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/MIP-5、CCL16/LEC、CCL17/TARC、CCL18/MIP-4、CCL19/MIP-3、CCL20/MIP-3、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF1、CCL24/エオタキシン-2、CCL25/TECK、CCL26/エオタキシン-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CL1、CL2及びCX₃CL1の存在又はレベルを試料中で決定する。或る更なる観点において、以下に限定されるものではないが、レプチン、アディポネクチン、レジスチン、活性型又は総プラスミノーゲン活性化抑制因子1(PAI-1)、ビスファチン及びレチノール結合タンパク質4(RBP4)を含む少なくとも1種のアディポサイトカインの存在又はレベルを、試料中で決定する。好ましくは、IL-8、IL-1 β 、TWEAK、レプチン、OPG、MIP-3、GRO、CXCL4/PF-4及び/又はCXCL7/NAP-2の存在又はレベルを決定する。

10

20

30

【0285】

更にその他の観点では、サイトカインレベルの割合を試料中で決定する。例えば、IL-10(TNF- α /IL-10)レベルに対するTNF- α レベルの割合、又は、IL-12(IL-10/IL-12)レベルに対するIL-10レベルの割合をIBSの診断に用いることができる。更にその他の実施態様において、任意の1つのサイトカインレベルに対するその他の任意の1つのサイトカインのレベルの割合を使用することができる。本発明の方法において使用することのできる割合の非限定的な例は、TNF- α /TWEAK、TNF- α /OPG、TNF- α /IFN- γ 、TNF- α /IFN- β 、TNF- α /IFN- α 、TNF- α /IL-1 β 、TNF- α /IL-1 α 、TNF- α /IL-1ra、TNF- α /IL-2、TNF- α /IL-4、TNF- α /IL-5、TNF- α /IL-6、TNF- α /sIL-6R、TNF- α /IL-7、TNF- α /IL-8、TNF- α /IL-9、TNF- α /IL-10、TNF- α /IL-12、TNF- α /IL-13、TNF- α /IL-15、TNF- α /IL-17、TNF- α /IL-23、TNF- α /IL-27、TWEAK/OPG、TWEAK/IFN- γ 、TWEAK/IFN- β 、TWEAK/IFN- α 、TWEAK/IL-1 β 、TWEAK/IL-1 α 、TWEAK/IL-1ra、TWEAK/IL-2、TWEAK/IL-4、TWEAK/IL-5、TWEAK/IL-6、TWEAK/sIL-6R、TWEAK/IL-7、TWEAK/IL-8、TWEAK/IL-9、TWEAK/IL-10、TWEAK/IL-12、TWEAK/IL-13、TWEAK/IL-15、TWEAK/IL-17、TWEAK/IL-23、TWEAK/IL-27、IL-6/TWEAK、IL-6/OPG、IL-6/IFN- γ 、IL-6/IFN- β 、

40

50

IL - 6 / IFN - 、 IL - 6 / IL - 1 、 IL - 6 / IL - 1 、 IL - 6 / IL - 1 ra、 IL - 6 / IL - 2、 IL - 6 / IL - 4、 IL - 6 / IL - 5、 IL - 6 / sIL - 6 R、 IL - 6 / IL - 7、 IL - 6 / IL - 8、 IL - 6 / IL - 9、 IL - 6 / IL - 10、 IL - 6 / IL - 12、 IL - 6 / IL - 13、 IL - 6 / IL - 15、 IL - 6 / IL - 17、 IL - 6 / IL - 23、 IL - 6 / IL - 27、 IL - 12 / TWEAK、 IL - 12 / OPG、 IL - 12 / IFN - 、 IL - 12 / IFN - 、 IL - 12 / IFN - 、 IL - 12 / IL - 1 、 IL - 12 / IL - 1 、 IL - 12 / IL - 1 ra、 IL - 12 / IL - 2、 IL - 12 / IL - 4、 IL - 12 / IL - 5、 IL - 12 / IL - 6、 IL - 12 / sIL - 6 R、 IL - 12 / IL - 7、 IL - 12 / IL - 8、 IL - 12 / IL - 9、 IL - 12 / IL - 10、 IL - 12 / IL - 13、 IL - 12 / IL - 15、 IL - 12 / IL - 17、 IL - 12 / IL - 23、 IL - 12 / IL - 27、 IL - 10 / TWEAK、 IL - 10 / OPG、 IL - 10 / IFN - 、 IL - 10 / IFN - 、 IL - 10 / IFN - 、 IL - 10 / IL - 1 、 IL - 10 / IL - 1 、 IL - 10 / IL - 1 ra、 IL - 10 / IL - 2、 IL - 10 / IL - 4、 IL - 10 / IL - 5、 IL - 10 / IL - 6、 IL - 10 / sIL - 6 R、 IL - 10 / IL - 7、 IL - 10 / IL - 8、 IL - 10 / IL - 9、 IL - 10 / IL - 12、 IL - 10 / IL - 13、 IL - 10 / IL - 15、 IL - 10 / IL - 17、 IL - 10 / IL - 23、 IL - 10 / IL - 27、 IL - 8 / TWEAK、 IL - 8 / OPG、 IL - 8 / IFN - 、 IL - 8 / IFN - 、 IL - 8 / IFN - 、 IL - 8 / IL - 1 、 IL - 8 / IL - 1 、 IL - 8 / IL - 1 ra、 IL - 8 / IL - 2、 IL - 8 / IL - 4、 IL - 8 / IL - 5、 IL - 8 / IL - 6、 IL - 8 / sIL - 6 R、 IL - 8 / IL - 7、 IL - 8 / IL - 8、 IL - 8 / IL - 9、 IL - 8 / IL - 10、 IL - 8 / IL - 12、 IL - 8 / IL - 13、 IL - 8 / IL - 15、 IL - 8 / IL - 17、 IL - 8 / IL - 23、 IL - 8 / IL - 27、 又は一方のサイトカインのもう一方のサイトカインに対する任意のその他の割合を含む。

10

20

30

40

50

【 0 2 8 6 】

或る例において、特定のサイトカインの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のサイトカインの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿、唾液又は尿試料中のサイトカイン、例えば、IL - 8、IL - 1 、 MIP - 3 、 GRO 、 CXCL4 / PF - 4 又はCXCL7 / NAP - 2 の存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI)、BD Biosciences Pharmingen (San Diego, CA)、Invitrogen (Camarillo, CA)、Calbiochem (San Diego, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、QIAGEN Inc. (Valencia, CA)、Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA) 及び / 又はBender MedSystems Inc. (Burlingame, CA) から入手可能である。

【 0 2 8 7 】

5 . T W E A K

TWEAKは、構造的に関連するサイトカインのTNFスーパーファミリーのメンバーである。全長膜固定型（membrane-anchored）TWEAKは、多くの細胞型の表面上に見出すことができ、そして、タンパク質分解処理によって生じるより小さな生物学的活性型（smaller, biologically active form）は細胞外環境でも検出されている（例えば、Chicheportiche et al., J. Biol. Chem., 272:32401-32410 (1997)を参照）。TWEAKは、繊維芽細胞成長因子誘導性14（Fn14；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー12A又はTNFRSF12Aとしても公知）と命名されたTNF受容体スーパーファミリーメンバーと結合することによって作用する。TWEAKは、細胞成長及び血管新生の刺激、炎症性サイトカインの誘導並びにアポトーシスの刺激を含む多数の生物学的

活性を有する（例えば、Wiley et al., Cytokine Growth Factor Rev., 14:241-249 (2003)を参照）。特に、TWEAKは、繊維芽細胞及び滑膜細胞において、PGE₂、MMP-1、IL-6、IL-8、RANTES、及びIP-10の発現を誘導すること並びに内皮細胞においてICAM-1、E-セレクトリン、IL-8及びMCP-1の発現を上方調節することが示されている（例えば、Campbell et al., Front. Biosci., 9:2273-2284 (2004)を参照）。FN14受容体へのTWEAKの結合又は構成的なFn14の過剰発現は、免疫又は炎症過程、発癌、癌治療耐性及び腫瘍形成において重要な役割を担うNF-κBシグナリング経路を活性化することも実証されている（例えば、Winkles et al., Cancer Lett., 235:11-17 (2006);及びWinkles et al., Front. Biosci., 12:2761-2771 (2007)を参照）。当業者は、TWEAKが腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー12 (TNFSF12)、APO3リガンド (APO3L)、CD255、DR3リガンド、FN14及びUNQ181/PRO207としても公知であることを認識する。

10

【0288】

生物試料、例えば、血清、血漿、唾液又は尿試料中のTWEAKの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Bender MedSystems Inc. (Burlingame, CA)、Agdia Inc. (Elkhart, IN)、American Research Products Inc. (Belmont, MA)、Biomeda Corp. (Foster City, CA)、BioVision, Inc. (Mountain View, CA)、及びKamiya Biomedical Co. (Seattle, WA)から入手可能である。

20

【0289】

6. オステオプロテゲリン (OPG)

OPGは、構造的に関連するサイトカインのTNFスーパーファミリーの401個のアミノ酸メンバーである。OPGは、NFκBの受容体活性化因子 (RANK) と同源性を示し、RANKリガンド (RANKL; OPGリガンド (OPGL) としても公知) の可溶性 decoy 受容体として作用することによってマクロファージの破骨細胞への分化を阻害し、破骨細胞の吸収を調節する。結果としてOPG-RANK-RANKL系は、破骨細胞の形成、機能及び生存において直接的且つ本質的な役割を担う。OPG-RANK-RANKL系は、癌細胞遊走をモジュレートし、こうして骨への転移の発現を制御することも示されている。当業者は、OPGがオステオプロテゲリン及び破骨細胞形成阻害因子 (OCIF) としても公知であることを認識する。

30

【0290】

血清、血漿、唾液又は尿試料中のOPGの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Immunodiagnostic Systems Ltd. (Baldon, United Kingdom)及びBioVendor, LLC (Candler, NC)から入手可能である。

【0291】

7. レプチン

レプチンは、サイトカインのアディポサイトカインファミリーのメンバーであり、そして、食物の取り込みを阻害すること及びエネルギー消費を刺激することによって体重の調節において決定的な役割を担う16kDのペプチドホルモンである。レプチンは主に脂肪細胞によって合成され、体脂肪含量に比例した量で血漿中を循環する（例えば、Maffei et al., Nat. Med., 1:1155-1161 (1995); Considine et al., Diabetes, 45:992-994 (1996)を参照）。レプチンは、異種間で非常に高い程度の同源性を示し、他のサイトカインとも構造が類似している（例えば、Madej et al., FEBS Lett., 373:13-18 (1995)を参照）。レプチンはレプチン受容体を介して作用し、前記レプチン受容体は、細胞外モチーフである4個のシステイン残基及び多数のフィブロネクチンタイプIIドメインを特徴とする受容体のI型サイトカインスーパーファミリーの単一膜貫通ドメイン受容体 (single-transmembrane domain receptor) である（例えば、Heim, Eur. J. Clin. Invest., 26:1-12 (1996)を参照）。レプチン受容体は、ホモ二量体として存在することが公知であり、そして、受容体にリガンドが結合した後に生じる構造変化によって活性化される（例え

40

50

ば、Devos et al., J. Biol. Chem., 272:18304-18310 (1997)を参照)オルタナティブスライシングによって生じる、6種のレプチン受容体のアイソフォームがこれまでに同定されている(例えば、Wang et al., Nature, 393:684-688 (1998); Lee et al., Nature, 379:632-635 (1996)を参照)。

【0292】

生物試料、例えば、血清、血漿、唾液又は尿試料中のレプチンの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、B-Bridge International (Mountain View, CA)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI)、Invitrogen (Camarillo, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、LINCO Research, Inc. (St. Charles, MO)、Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX)、Immuno-Biological Laboratories, Inc. (Minneapolis, MN)及びCayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI)から入手可能である。

10

【0293】

8. 成長因子

試料中の1種以上の成長因子の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「成長因子」という用語は、細胞増殖及び/又は細胞分化を刺激することができる種々のペプチド、ポリペプチド又はタンパク質のいずれかを含む。

【0294】

或る観点において、以下に限定されるものではないが、上皮成長因子(EGF)、ヘパリン結合性上皮成長因子(HB-EGF)、血管内皮成長因子(VEGF)、色素上皮由来因子(PEDF; SERPINF1としても公知)、アンフィレギュリン(AREG; 神経鞘腫由来成長因子(SDGF)としても公知)、塩基性繊維芽細胞成長因子(bFGF)、肝細胞成長因子(HGF)、トランスフォーミング成長因子(TGF- α)、トランスフォーミング成長因子(TGF- β)、骨形成タンパク質(bone morphogenetic proteins; 例えばBMP1-BMP15)、血小板由来成長因子(PDGF)、神経成長因子(NGF)、神経成長因子(β -NGF)、神経栄養因子(例えば、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン3(NT3)、ニューロトロフィン4(NT4)など)、成長分化因子-9(GDF-9)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、ミオスタチン(GDF-8)、エリスロポエチン(EPO)及びトロポポエチン(TPO)を含む少なくとも1種の成長因子の存在又はレベルが、試料中で決定される。好ましくは、EGF、VEGF、PEDF、アンフィレギュリン(SDGF)及び/又はBDNFの存在又はレベルが決定される。

20

30

【0295】

或る例において、特定の成長因子の存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイにより、mRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定の成長因子の存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿、唾液又は尿試料中の成長因子、例えば、EGF、VEGF、PEDF、SDGF又はBDNFの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Antigenix America Inc. (Huntington Station, NY)、Promega (Madison, WI)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Invitrogen (Camarillo, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)、Neogen Corp. (Lexington, KY)、PeproTech (Rocky Hill, NJ)、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)及び/又はAbazyme (Needham, MA)から入手可能である。

40

【0296】

9. リポカリン

試料中の1種以上のリポカリンの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「リポカリン」という用語は、いくつかの共通する分子認

50

識特性：種々の疎水性小分子と結合する能力；特異的な細胞表面受容体への結合；及び可溶性高分子との複合体の形成；を特徴とする、種々のスモール細胞外タンパク質（small extracellular proteins）のいずれかを含む（例えば、Flowers, Biochem. J., 318:1-14 (1996)を参照）。リポカリンの生物学的機能の変化は、これらの特性の1種以上によって媒介される。リポカリンタンパク質ファミリーは顕著な機能の多様性を示し、レチノール輸送、無脊椎動物の隠蔽色（invertebrate cryptic coloration）、嗅覚及びフェロモン輸送並びにプロスタグランジンの生合成における役割を担う。リポカリンは、細胞の恒常性の調節及び免疫応答の調節に関与し、キャリアタンパク質として、内因性及び外因性化合物の一般的なクリアランスにも作用する。リポカリンは配列レベルにおいて顕著な多様性を有するが、これらの3次元構造は統一した特徴がある。リポカリンの結晶構造は高度に保存されており、内部のリガンド結合部位を囲む、単一の8本鎖の連続的に水素結合した逆平行パレルを含む。

10

【0297】

或る観点において、以下に限定されるものではないが、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL；ヒト好中球リポカリン（HNL）又はリポカリン-2としても公知）、フォンエブネル腺タンパク質（VEGP；リポカリン-1としても公知）、レチノール結合タンパク質（RBP）、プルプリン（PURP）、レチノイン酸結合タンパク質（RABP）、_{2u}-グロブリン（A2U）、主要尿タンパク質（MUP）、ピリン結合タンパク質（BBP）、₁-クルスタシアニン、妊娠性タンパク質14（PP14）、₁-ラクトグロブリン（Blg）、₁-ミクログロブリン（A1M）、C8のガンマ鎖（C8_γ）、アポリポタンパク質D（ApoD）、ラザリロ（LAZ）、プロスタグランジンD2シンターゼ（PGDS）、休眠特異的タンパク質（quiescence-specific protein；QSP）、脈絡叢タンパク質、臭気物質結合タンパク質（OBP）、₁-酸性糖タンパク質（AGP）、プロバシン（PBAS）、アフロジシン、オロソムコイド及びプロゲステーゲン関連子宮内膜タンパク質（progesterone-associated endometrial protein；PAEP）を含む少なくとも1種のリポカリンの存在又はレベルが、試料中で決定される。或るその他の観点において、例えば、NGAL及びマトリックスメタロプロテアーゼの複合体（例えば、NGAL/MMP-9複合体）を含む少なくとも1種のリポカリン複合体の存在又はレベルを決定する。好ましくは、NGAL又はそのMMP-9との複合体の存在又はレベルが決定される。

20

30

【0298】

或る例において、特定のリポカリンの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のリポカリンの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿又は尿試料中のリポカリン、例えば、NGALの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、AntibodyShop A/S（Gentofte, Denmark）、LabClinics SA（Barcelona, Spain）、Lucerna-Chem AG（Luzern, Switzerland）、R&D Systems, Inc.（Minneapolis, MN）及びAssay Designs, Inc.（Ann Arbor, MI）から入手することができる。NGAL/MMP-9複合体の存在又はレベルを決定するための適切なELISAキットは、例えばR&D Systems, Inc.（Minneapolis, MN）から入手可能である。追加のNGAL及びNGAL/MMP-9複合体のELISA技術は、例えば、Kjeldsen et al., Blood, 83:799-807 (1994);及びKjeldsen et al., J. Immunol. Methods, 198:155-164 (1996)に記載されている。

40

【0299】

10. マトリックスメタロプロテアーゼ

試料中の少なくとも1種のマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「マトリックスメタロプロテアーゼ」又は「MMP」という用語は、種々の細胞外マトリックスタンパク質を分解し、細胞表面受容体を開裂させ、アポトーシスリガンドを放出し、及び/又はケモ

50

カインを調節することができる重鉛依存型エンドペプチダーゼを含む。MMPは、細胞挙動、例えば、細胞増殖、遊走（接着／分散）、分化、血管新生および宿主防御において主要な役割を担うとも考えられている。

【0300】

或る観点において、以下に限定されるものではないが、MMP-1（間質性コラゲナーゼ）、MMP-2（ゼラチナーゼA）、MMP-3（ストロメリシン-1）、MMP-7（マトリリシン）、MMP-8（好中球コラゲナーゼ）、MMP-9（ゼラチナーゼB）、MMP-10（ストロメリシン-2）、MMP-11（ストロメリシン-3）、MMP-12（マクロファージメタロエラスターゼ）、MMP-13（コラゲナーゼ-3）、MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-18（コラゲナーゼ-4）、MMP-19、MMP-20（エナメリシン）、MMP-21、MMP-23、MMP-24、MMP-25、MMP-26（マトリリシン-2）、MMP-27及びMMP-28（エピリシン）を含む少なくとも1種の少なくとも1種のMMPの存在又はレベルを試料中で決定する。好ましくは、MMP-9の存在又はレベルが決定される。

10

【0301】

或る例において、特定のMMPの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のMMPの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清又は血漿試料中のMMP、例えば、MMP-9の存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Calbiochem (San Diego, CA), CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA), and R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)から入手可能である。

20

【0302】

11．組織メタロプロテアーゼ阻害因子

試料中の少なくとも1種の組織メタロプロテアーゼ阻害因子（TIMP）の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「組織メタロプロテアーゼ阻害因子」又は「TIMP」という用語は、MMPを阻害することができるタンパク質を含む。

【0303】

或る観点において、以下に限定されるものではないが、TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3及びTIMP-4を含む少なくとも1種の少なくとも1種のTIMPの存在又はレベルを試料中で決定する。好ましくは、TIMP-1の存在又はレベルを決定する。

30

【0304】

或る例において、特定のTIMPの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のTIMPの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清又は血漿試料中のTIMP、例えば、TIMP-1の存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Calbiochem (San Diego, CA)、Invitrogen (Camarillo, CA)、CHEMICON International, Inc. (Temecula, CA)及びR&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)から入手可能である。

40

【0305】

12．グロブリン

試料中の少なくとも1種のグロブリンの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「グロブリン」という用語は、血清電気泳動時にアルブミンよりも移動しない血清タンパク質ファミリーの異種系列の任意のメンバーを含む。タンパク質電気泳動は、典型的には、グロブリンを以下の3つのカテゴリー： - グ

50

ロブリン(すなわち、 α - 1 - グロブリン又は α - 2 - グロブリン) ; β - グロブリン ;
及び γ - グロブリン ; にカテゴライズするために使用される。

【 0 3 0 6 】

α - グロブリンは、アルカリ又は電荷を帯びた溶液中でよく移動する血漿中の球状タンパク質の集団を含む。これらは、一般に、或る血液プロテアーゼ及び阻害活性を阻害するように機能する。 α - グロブリンの例は、以下に限定されるものではないが、 α - 2 - マクログロブリン (α 2 - M G)、ハプトグロビン (H p)、オロソムコイド、 α - 1 - アンチトリプシン、 α - 1 - アンチキモトリプシン、 α - 2 - アンチプラスミン、アンチトロンビン、セルロプラスミン、ヘパリン補因子 I I、レチノール結合タンパク質及びトランスコルチンを含む。好ましくは、 α 2 - M G、ハプトグロビン及び / 又はオロソムコイドの存在又はレベルが決定される。或る例において、1種以上のハプトグロビンアロタイプ、例えば、H p 前駆体、H p、H p 1 及び H p 2 が決定される。

10

【 0 3 0 7 】

或る例において、特定のグロブリンの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイにより m R N A 発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のグロブリンの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ (例えば、E L I S A) 又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿又は尿試料中のグロブリン、例えば、 α 2 - M G、ハプトグロビン又はオロソムコイドの存在又はレベルを決定するために好適な E L I S A キットは、例えば、GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA) 及び / 又は Immundiagnostik AG (Bensheim, Germany) から入手可能である。

20

【 0 3 0 8 】

1 3 . アクチン切断タンパク質

試料中の少なくとも1種のアクチン切断タンパク質の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「アクチン切断タンパク質」という用語は、アクチンのリモデリング及び細胞運動性の調節に関与するタンパク質ファミリーの任意のメンバーを含む。アクチン切断タンパク質の非限定的な例は、ゲルゾリン (プレビン又はアクチン脱重合因子としても公知)、ピリン、フラグミン及びアドセベリンを含む。例えば、ゲルゾリンは白血球、血小板及び他の細胞のタンパク質であり、マイクロモラ - 未満のカルシウム存在下でアクチンフィラメントを切断し、これによって細胞質のアクチンゲルをゾル化する。

30

【 0 3 0 9 】

或る例において、特定のアクチン切断タンパク質の存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイにより m R N A 発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のアクチン切断タンパク質の存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ (例えば、E L I S A) 又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血漿試料中のアクチン切断タンパク質、例えば、ゲルゾリンの存在又はレベルを決定するために好適な E L I S A 技術は、例えば、Smith et al., J. Lab. Clin. Med., 110:189-195 (1987); 及び Hiyoshi et al., Biochem. Mol. Biol. Int., 32:755-762 (1994) に記載されている。

40

【 0 3 1 0 】

1 4 . S 1 0 0 タンパク質

試料中の少なくとも1種の S 1 0 0 タンパク質の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「S 1 0 0 タンパク質」という用語は、2個の E F ハンドカルシウム結合ドメインの存在及び細胞型特異的発現を特徴とする低分子量酸性タンパク質ファミリーの任意のメンバーを含む。ヒトには、少なくとも21種の異なるタイプの S 1 0 0 タンパク質が存在する。この名称は、S 1 0 0 タンパク質が中性 p H の硫酸アンモニウム中で 1 0 0 % 可溶である事実に由来する。ほとんどの S 1 0 0 タンパク質は、ホモ 2 量体型であり、非共有結合によって一緒に保持される2個の同一のポリペプチドからなる。S 1 0 0 タンパク質は構造的にはカルモジュリンと類似するが、環境

50

因子に応じて異なるレベルにおいて特定の細胞内で細胞特異的に発現する点で異なる。S100タンパク質は、通常、神経堤に由来する細胞（例えば、シュワン細胞、メラノサイト、グリア細胞）、軟骨細胞、脂肪細胞、筋上皮細胞、マクロファージ、ランゲルハンス細胞、樹状細胞及びケラチノサイト内に存在する。S100タンパク質は、種々の細胞内及び細胞外の機能、例えば、タンパク質のリン酸化、転写因子、カルシウムイオン（ Ca^{2+} ）の恒常性、細胞骨格構成成分の動態、酵素活性、細胞成長及び分化並びに炎症応答の調節に関与している。

【0311】

カルグラニューリンは、腎上皮細胞及び好中球を含む複数の細胞タイプにおいて発現されるS100タンパク質であり、慢性炎症の病態下における浸潤単球及び顆粒球中に豊富である。カルグラニューリンの例は、以下に限定されるものではないが、カルグラニューリンA（S100A8又はMRP-8としても公知）、カルグラニューリンB（S100A9又はMRP-14としても公知）及びカルグラニューリンC（S100A12としても公知）を含む。

10

【0312】

或る例において、特定のS100タンパク質の存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、特定のS100タンパク質の存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿、又は尿試料中のS100タンパク質、例えば、カルグラニューリンA（S100A8）、カルグラニューリンB（S100A9）の存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Peninsula Laboratories Inc. (San Carlos, CA)及びHycult biotechnology b.v. (Uden, The Netherlands)から入手可能である。

20

【0313】

S100A8及びS100A9の複合体カルプロテクチンは、好中球、単球及びケラチノサイトの細胞質におけるカルシウム及び亜鉛結合性タンパク質である。カルプロテクチンは、好中性顆粒球及びマクロファージにおける主要なタンパク質であり、これらの細胞中の細胞質ゾル分画における総タンパク質の60%ほどを占める。従って、カルプロテクチンは好中球の代謝回転の代理マーカーである。糞便中のカルプロテクチン濃度は、腸粘膜好中球の浸潤の強度及び炎症の重症度と相関する。一部の例において、カルプロテクチンは、少量（50～100mg）の便試料を使用するELISA法により計測することができる（例えば、John et al., Scand J Gastroenterol., 36:291-296 (2001)を参照）。

30

【0314】

試料中の少なくとも1種のタキキニンの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「タキキニン」という用語は、カルボキシ末端の配列Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂を共有するアミド化されたニューロペプチドを含む。タキキニンは、典型的には、1種以上のタキキニン受容体（例えば、TACR1、TACR2及び/又はTACR3）に結合する。

40

【0315】

或る観点において、以下に限定されるものではないが、サブスタンスP、ニューロキニンA及びニューロキニンBを含む少なくとも1種のタキキニンの存在又はレベルを試料中で決定する。好ましくは、サブスタンスPの存在又はレベルを決定する。サブスタンスPは、中枢及び末梢神経系の両方において、神経末端から放出される、長さ11アミノ酸のペプチドである。サブスタンスP放出神経が分布する非常に多くの生物学的な部位には、皮膚、腸、胃、膀胱及び心血管系がある。

【0316】

或る例において、特定のタキキニンの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検

50

出される。或る他の例において、特定のタキキニンの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、E L I S A）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿、唾液又は尿試料中のタキキニン、例えば、サブスタンス P の存在又はレベルを決定するために好適な E L I S A キットは、例えば、MD Bio sciences Inc. (St. Paul, MN)、Assay Designs, Inc. (Ann Arbor, MI)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO) 及び Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) から入手可能である。

【0317】

16. グレリン

試料中のグレリンの存在又はレベルの決定も、本発明においては有用である。本明細書において使用される「グレリン」という用語は、成長ホルモン分泌促進受容体（G H S R）に対する内因性リガンドであり、成長ホルモン放出の調節に關与する28アミノ酸のペプチドを含む。グレリンは、典型的には、3番目のセリン残基においてn-オクタノイル基によってアシル化され、活性型グレリンを形成することができる。あるいは、グレリンは、非アシル化型（すなわち、デスアシルグレリン）として存在することができる。グレリンは、胃底の粘膜内に主に局在する特殊化腸クロム親和細胞内で主に発現され、レプチンとは反対の代謝効果を有する。グレリンは、食物の取り込みを刺激し、炭水化物の使用を向上させ、脂肪の利用を低減させ、胃の運動及び酸分泌を増加させ、自発運動を低減させる。

【0318】

或る例において、グレリンの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、グレリンの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、E L I S A）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿、唾液又は尿試料中の活性型グレリン又はデスアシル-グレリンの存在又はレベルを決定するために好適な E L I S A キットは、例えば、Alpco Diagnostics (Salem, NH)、Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI)、LINCO Research, Inc. (St. Charles, MO) 及び Diagnostic Systems Laboratories, Inc. (Webster, TX) から入手可能である。

【0319】

17. ニューロテンシン

試料中のニューロテンシンの存在又はレベルの決定も、本発明においては有用である。本明細書において使用される「ニューロテンシン」という用語は、中枢神経系及び胃腸管にわたり広く分布するトリデカペプチドを含む。ニューロテンシンは、いくつかの胃腸機能及び疾患状態の発現及び進行において重要なメディエーターとして同定されており、神経、上皮細胞及び/又は免疫及び炎症系の細胞に対して直接的又は間接的に作用する特定の受容体と相互作用することによって、その効果を発揮する（例えば、Zhao et al., *Pep tides*, 27:2434-2444 (2006)を参照）。

【0320】

或る例において、ニューロテンシンの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、ニューロテンシンの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ（例えば、E L I S A）又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。試料中のニューロテンシンの存在又はレベルを決定するために好適な E L I S A 技術は、例えば、Davis et al., *J. Neurosci. Methods*, 14:15-23 (1985); 及び Williams et al., *J. Histochem. Cytochem.*, 37:831-841 (1989)に記載されている。

【0321】

18. 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン

試料中の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（C R H ; 副腎皮質刺激ホルモン放出因子

10

20

30

40

50

又はCRFとしても公知)の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン」、「CRH」、「副腎皮質刺激ホルモン放出因子」又は「CRF」という用語は、哺乳動物、例えば、ヒトにおけるストレスに対する応答の近位部を媒介する視床下部の室傍核によって分泌される41アミノ酸ペプチドを含む。CRHは、典型的には、1種以上の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体(例えば、CRHR1及び/又はCRHR2)に結合する。CRHは、視床下部、脊髄、胃、脾臓、十二指腸、副腎及び胎盤によって発現される。

【0322】

或る例において、CRHの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或るその他の例において、CRHの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。血清、血漿、唾液、又は尿試料中のCRHの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Alpco Diagnostics (Salem, NH)及びCosmo Bio Co., Ltd. (Tokyo, Japan)から入手可能である。

10

【0323】

19. 抗好中球抗体

試料中のANCAレベル及び/又はpANCAの存在又は非存在の決定も、本発明においては有用である。本明細書において使用される「抗好中球細胞質抗体」又は「ANCA」という用語は、好中球の細胞質及び/又は核成分に対する抗体を含む。ANCA活性は、好中球におけるANCAの染色パターン:(1)核周囲の際立った明るさを有しない好中球細胞質の染色(cANCA);(2)核の外縁周りの核周囲の染色(pANCA);(3)核の内縁周りの核周囲の染色(NSNA);及び(4)好中球全体にわたる斑点を有する拡散した染色(SAPPA);に基づき、いくつかの幅のあるカテゴリーに分割することができる。ある例において、pANCA染色は、DNアーゼ処理に感受性を示す。ANCAという用語は、以下に限定されるものではないが、cANCA、pANCA、NSNA及びSAPPAを含む、全ての種々の抗好中球反応性を包含する。同様にANCAという用語は、以下に限定されるものではないが、免疫グロブリンA及びGを含む全ての免疫グロブリンのアイソタイプを包含する。

20

【0324】

個体からの試料中のANCAレベルは、例えば、アルコール固定された好中球を用いて免疫アッセイ、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)を使用して決定することができる。特定のカテゴリーのANCA、例えば、pANCAの存在又は非存在は、例えば、免疫組織化学アッセイ、例えば、間接的蛍光抗体(IFA)アッセイを使用して決定することができる。好ましくは、試料中のpANCAの存在又は非存在は、DNアーゼ処理され、固定された好中球を用いて免疫蛍光アッセイを使用して決定される。固定された好中球に加えて、ANCAレベルを決定するために好適なANCAに特異的な抗原は、以下に限定されるものではないが、非精製の又は部分精製された好中球抽出物;精製タンパク質、タンパク質断片又は合成ペプチド、例えば、ヒストンH1又はこれらのANCA反応性断片(例えば、米国特許第6,074,835号を参照);ヒストンH1様抗原、ポーリン抗原、バクテロイド抗原又はこれらのANCA反応性断片(例えば、米国特許第6,033,864号を参照);分泌小胞抗原又はこのANCA反応性断片(例えば、米国特許出願第08/804,106号を参照);及び抗ANCAのイディオタイプの抗体を含む。当業者は、ANCAに特異的な追加の抗原の使用が本発明の範囲内であることを認識する。

30

40

【0325】

20. 抗*Saccharomyces cerevisiae*抗体

試料中のASCA(例えば、ASCA-IgA及び/又はASCA-IgG)レベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「抗*Saccharomyces cerevisiae*免疫グロブリンA」又は「ASCA-IgA」という用語は、*S. cerevisiae*と特異的に反応する免疫グロブリンAのアイソタイプの抗体を含む。同様に、「抗Saccharo

50

myces cerevisiae免疫グロブリンG」又は「ASC A - Ig G」という用語は、S. cerevisiaeと特異的に反応する免疫グロブリンGのアイソタイプの抗体を含む。

【0326】

試料がASC A - Ig A又はASC A - Ig Gについて陽性であるか否かの決定は、ASC Aに特異的な抗原を使用して行われる。このような抗原は、ASC A - Ig A及び/又はASC A - Ig Gによって特異的に結合される任意の抗原又は抗原の混合物であることができる。ASC A抗体は、最初はS. cerevisiaeへの結合能を特徴としていたが、当業者は、ASC Aによって特異的に結合される抗原が、S. cerevisiaeから又は抗原がASC A抗体に特異的に結合することができる限り種々の他の源から得ることができることを理解する。従って、試料中のASC A - Ig A及び/又はASC A - Ig Gレベルを決定するために使用することができるASC Aに特異的な抗原の例示的な源は、以下に限定されるものではないが、完全死滅酵母細胞、例えば、Saccharomyces又はCandida細胞；酵母細胞壁マンナン、例えば、ホスホペプチドマンナン（PPM）；オリゴ糖、例えば、オリゴマンノシド；ネオ糖脂質；抗ASC Aイデオタイプ抗体などを含む。酵母の異なる種及び株、例えば、S. cerevisiae株Su 1、Su 2、CBS 1315又はBM 156あるいはCandida albicans株VW 32は、ASC A - Ig A及び/又はASC A - Ig Gに特異的な抗原としての使用に好適である。ASC Aに特異的な精製及び合成抗原も、試料中のASC A - Ig A及び/又はASC A - Ig Gレベルの決定における使用に好適である。精製抗原の例は、以下に限定されるものではないが、精製オリゴ糖抗原、例えば、オリゴマンノシドを含む。合成抗原の例は、以下に限定されるものではないが、合成オリゴマンノシド、例えば、米国特許出願公開第20030105060号に記載のもの、例えば、D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man-OR、D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man-OR及びD-Man (1-3) D-Man (1-2) D-Man (1-2) D-Man-ORを含み、ここで、Rは水素原子、C₁ ~ C₂₀アルキル基又は場合により標識された連結基であるものとする。

10

20

【0327】

酵母細胞壁マンナン、例えば、PPMの調製物は、試料中のASC A - Ig A及び/又はASC A - Ig Gレベルの決定において使用することができる。このような水溶性表面抗原は、当分野において公知の適切な任意の抽出技術、例えば、オートクレーブによって調製することができるか、又は市販品として得ることができる（例えば、Lindberg et al., Gut, 33:909-913 (1992)を参照）。PPMの酸安定性画分は、本発明の統計的アルゴリズムにおいても有用である（例えば、Sendid et al., Clin. Diag. Lab. Immunol., 3:219-226 (1996)を参照）。試料中のASC Aレベルの決定において有用である例示的なPPMは、S. uvarum株ATCC # 38926に由来する。

30

【0328】

精製オリゴ糖抗原、例えば、オリゴマンノシドも、試料中のASC A - Ig A及び/又はASC A - Ig Gレベルの決定において有用であり得る。精製オリゴマンノシド抗原は、例えば、Faille et al., Eur. J. Microbiol. Infect. Dis., 11:438-446 (1992)に記載のとおり、好ましくは、ネオ糖脂質に変換される。当業者は、このようなオリゴマンノシド抗原のASC Aとの反応性が、マンノシル鎖長（Frosh et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA, 82:1194-1198 (1985)）；アノマー配置（Fukazawa et al., In "Immunology of Fungal Disease," E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker Inc., New York, pp. 37-62 (1989)；Nishikawa et al., Microbiol. Immunol., 34:825-840 (1990)；Poulain et al., Eur. J. Clin. Microbiol., 23:46-52 (1993)；Shibata et al., Arch. Biochem. Biophys., 243:338-348 (1985)；Trinel et al., Infect. Immun., 60:3845-3851 (1992)を参照）；又は結合の位置（Kikuchi et al., Planta, 190:525-535 (1993)を参照）を変えることによって最適化することができることを理解する。

40

【0329】

本発明の方法における使用に好適なオリゴマンノシドは、以下に限定されるものではないが、マンノテトラオースMan (1-3) Man (1-2) Man (1-2) Manを

50

有するオリゴマンノシドを含む。このようなオリゴマンノシドは、例えば、Faille et al . , (前掲)に記載のとおりPPMから精製することができる。ASCAに特異的な例示的ネオ糖脂質は、このそれぞれのPPMからオリゴマンノシドを放出させ、続いて放出されたオリゴマンノシドを4-ヘキサデシルアニリンなどにカップリングさせることによって構築することができる。

【0330】

21. 抗菌性抗体

試料中の抗OmpC抗体レベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「抗外膜タンパク質C抗体」又は「抗OmpC抗体」という用語は、例えば、国際公開第WO01/89361号に記載のとおり細菌の外膜ポーリンに対する抗体を含む。「外膜タンパク質C」又は「OmpC」という用語は、抗OmpC抗体との免疫反応性を示す細菌のポーリンを指す。

10

【0331】

個体からの試料中に存在する抗OmpC抗体のレベルは、OmpCタンパク質又はこの断片、例えば、この免疫反応性断片を使用して決定することができる。試料中の抗OmpC抗体のレベルの決定において有用である好適なOmpC抗原は、以下に限定されるものではないが、OmpCタンパク質、OmpCタンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有するOmpCポリペプチド又はこの断片、例えば、この免疫反応性断片を含む。本明細書において使用されるOmpCポリペプチドは、一般に、配列アライメントプログラム、例えば、CLUSTALWを使用して決定されるアミノ酸同一性において、OmpCタンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、更により好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列の同一性のあるアミノ酸配列を有するポリペプチドを説明する。このような抗原は、腸内細菌、例えば、E. coliからの精製によって、核酸、例えば、Genbankアクセッション番号K00541の組換えによる発現によって、合成手段、例えば、液相又は固相ペプチド合成によって、あるいはファージディスプレイを使用することによって調製することができる。

20

【0332】

試料中の抗I2抗体レベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「抗I2抗体」という用語は、例えば、米国特許第6,309,643号に記載の細菌の転写制御因子と相同性を共有する微生物抗原に対する抗体を含む。「I2」という用語は、抗I2抗体との免疫反応性を示す微生物抗原を指す。微生物I2タンパク質は、C. pasteurianum由来の予測タンパク質4、Mycobacterium tuberculosis由来のRv3557c及びAquifex aeolicus由来の転写制御因子とある程度の類似性と弱い相同性を共有する100アミノ酸のポリペプチドである。I2タンパク質についての核酸及びタンパク質配列は、例えば、米国特許第6,309,643号に記載されている。

30

【0333】

個体からの試料中に存在する抗I2抗体のレベルは、I2タンパク質又はこの断片、例えば、この免疫反応性断片を使用して決定することができる。試料中の抗I2抗体のレベルの決定において有用である好適なI2抗原は、以下に限定されるものではないが、I2タンパク質、I2タンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有するI2ポリペプチド又はこの断片、例えば、この免疫反応性断片を含む。このようなI2ポリペプチドは、C. pasteurianumのタンパク質4よりもI2タンパク質と高い配列類似性を示し、このアイソタイプ変異型及びホモログを含む。本明細書において使用されるI2ポリペプチドは、一般に、配列アライメントプログラム、例えば、CLUSTALWを使用して決定されるアミノ酸同一性において、天然に生じるI2タンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、更により好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列の同一性のあるアミノ酸配列を有するポリペプチドを説明する。このようなI2抗原は、例えば、微生物からの精製によって、I2抗原をコードする核酸の組換えによる発現によって、

40

50

合成手段、例えば、液相又は固相ペプチド合成によって、あるいはファージディスプレイを使用することによって調製することができる。

【0334】

試料中の抗フラジェリン抗体レベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「抗フラジェリン抗体」という用語は、例えば、国際公開第W003/053220号及び米国特許出願公開第20040043931号に記載の細菌鞭毛のタンパク質構成成分に対する抗体を含む。「フラジェリン」という用語は、抗フラジェリン抗体との免疫反応性を示す細菌の鞭毛タンパク質を指す。微生物のフラジェリンは、フィラメント形成のために中空の筒状に配置された細菌の鞭毛中に見出されるタンパク質である。

【0335】

個体からの試料中の抗フラジェリン抗体のレベルは、フラジェリンタンパク質又はこの断片、例えば、この免疫反応性断片を使用して決定することができる。試料中の抗フラジェリン抗体のレベルの決定において有用である好適なフラジェリン抗原は、以下に限定されるものではないが、フラジェリンタンパク質、例えば、Cbir-1フラジェリン、フラジェリンX、フラジェリンA、フラジェリンB、これらの断片及びこれらの組合せ、フラジェリンタンパク質と実質的に同一のアミノ酸配列を有するフラジェリンポリペプチド又はこの断片、例えば、この免疫反応性断片を含む。本明細書において使用されるフラジェリンポリペプチドは、一般に、配列アライメントプログラム、例えば、CLUSTALWを使用して決定されるアミノ酸同一性において、天然に生じるフラジェリンタンパク質と約50%超の同一性、好ましくは約60%超の同一性、より好ましくは約70%超の同一性、更により好ましくは約80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%超のアミノ酸配列の同一性のあるアミノ酸配列を有するポリペプチドを説明する。このようなフラジェリン抗原は、細菌、例えば、Helicobacter Bilis、Helicobacter mustelae、Helicobacter pylori、Butyrivibrio fibrisolvens及び盲腸中に見出される細菌からの精製によって、フラジェリン抗原をコードする核酸の組換えによる発現によって、合成手段、例えば、液相又は固相ペプチド合成によって、あるいはファージディスプレイを使用することによって調製することができる。

【0336】

22. 肥胖細胞マーカー

試料中の肥胖細胞マーカーの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「肥胖細胞マーカー」という用語は、豊富な肥胖細胞又は肥満細胞が存在することあるいは増加することを示す、任意のタンパク質又は代謝産物を含む。或る実施態様において、これらの肥胖細胞マーカーは、肥胖細胞の細胞表面上に存在することができるか、及び/又は、肥胖細胞内に特異的に発現又は存在することができる。肥胖細胞は、一般的に、結合組織中に見出され、そして、高レベルのヒスタミン及びヘパリンを含有する大顆粒を有する(harbor)。これらの細胞は、CD34+骨髄前駆体細胞から由来すると考えられ、そして、創傷治癒、病原体対する防御、アレルギー並びにアナフィラキシーを含むいくつかの生物学的過程において機能する。肥胖細胞マーカーの非限定的な例は、トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE₂(PGE₂)、プロスタグランジンD₂(PGD₂)、カルボキシペプチダーゼA、カイメース、CD25、CD34、CD117(c-Kit)、LAMP-1(CD107a)、LAMP-2(CD107b)などを含む。

【0337】

神経支配の近位にある炎症性肥胖細胞が、IBSで経験される腹痛に寄与することがあるということが仮定されている(Rijnierse A. et al., Pharmacol Ther. (2007))。このことと一致するように、多数の肥胖細胞及び肥胖細胞の活性化がIBS患者における腸管部位で見出されている。胃腸管に限局した後、肥胖細胞は、アレルギー、微生物生成物及び/又は神経伝達物質により刺激され、分泌促進反射を刺激し且つ腹痛の感知された感覚を増加させる豊富な種類の生物活性メディエーターを放出する。そのようにして、胃腸管における肥胖細胞又は肥胖細胞代謝産物の存在の増加をIBSの診断に使用することが

10

20

30

40

50

できる。従って、1つの実施態様において、肥胖細胞脱顆粒に関連するバイオマーカー、例えば、トリプターゼ、プロスタグランジンE₂、ヒスタミン及びヒスタミン代謝産物(4-イミダゾール酢酸、t-メチルヒスタミン及びt-メチル-4-イミダゾール酢酸を含む)は、本発明の方法に有用である。その他の実施態様において、セロトニン、神経成長因子、血管内皮細胞成長因子、TNF- α 、TNF- β 、IL-6及びIL-8を含む肥胖細胞から特異的に放出されるバイオマーカーは、本発明の方法に有用である。

【0338】

或る例において、肥胖細胞マーカーの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、肥胖細胞マーカーの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ、又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。

10

【0339】

或る実施態様において、肥胖細胞マーカーは、トリプターゼ、ヒスタミン、プロスタグランジンE₂(PGE₂)又はこれらの組合せであることができる。更にその他の実施態様において、豊富な肥胖細胞の存在又は増加を、抗Ki抗体、例えばKi-MC1又はKi-M1Pモノクローナル抗体(Hamann K. et al., Br J Dermatol. (1995))又は蛍光ペルベリン結合アッセイ(Berlin and Enerback, Int Arch Allergy Appl Immunol. (1983))を使用することにより検出することができる。

20

【0340】

23. 消化管ホルモン

試料中の少なくとも1種の消化管ホルモンの存在又はレベルを決定することも、本発明において有用である。本明細書において使用される「消化管ホルモン」という用語は、ある細胞により放出され有機体中に局在する第2の細胞の代謝産物を変化させる、腸管に存在する化学物質又はペプチドを含む。一般的に、ホルモンは、細胞表面上に位置する特異的受容体に結合した後で、標的細胞における応答を促進する。動物では、ホルモンは、一般に、全身にわたって血流中に輸送されるが、これらは拡散により転座(translocate)することができる。このようにして、内分泌性ホルモン分子が血流中へ直接分泌し、その一方で、外分泌性ホルモンは管(duct)へ直接分泌して、そこから血流を横断するかあるいはパラクリンシグナル伝達を介して全身にわたって拡散する。IBSマーカーとしての使用に適当な消化管ホルモンの非限定的な例は、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、サブスタンスP、神経成長因子(NGF)、ニューロキニンA、ニューロキニンB、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、グルカゴン様ペプチド1(GLP-1)、グルカゴン様ペプチド2(GLP-2)、モチリン、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)、セクレチン、コレシストキニン、神経ペプチドY、隣ポリペプチド、ペプチドYY、エンテログルカゴン及びグルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチドを含む。

30

【0341】

或る例において、腸ペプチドホルモンマーカーの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、ペプチドホルモンマーカーの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ、又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。

40

【0342】

24. カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)

CGRPは、ヒトにおいては2つの成熟形態の α -CGRP及び β -CGRPで存在する、ペプチドのカルシトニンファミリーのメンバーである。 α -CGRPは、カルシトニン/CGRP遺伝子の選択的スプライシングから形成される37アミノ酸ペプチド：AC

50

D T A T C V T H R L A G L L S R S G G V V K N N F V P T N V G S K A F - N H ₂ (配列番号1)である。 - C G R Pは、カルシトニン関連ポリペプチド、前駆体遺伝子から形成される37アミノ酸ポリペプチドA C N T A T C V T H R L A G L L S R S G G M V K S N F V P T N V G S K A F - N H ₂ (配列番号2)である。或る例において、C G R Pは、カルシトニンアイソフォームC G R Pプレプロタンパク質(NP__001029125)又はその変異体(例えば、NP__001029124又はNP__001732)、C G R Pプロペプチド(C A A 3 4 0 7 0)、あるいはカルシトニン関連ポリペプチド、前駆体(NP__000719)からなることがある。

【0343】

C G R Pは、末梢ニューロン及び中枢ニューロンの両方で生成される最も豊富なペプチドであり(Rosenfeld MG et al., Nature (1983))、そして、最も効力のあるペプチド血管拡張剤であり、痛みの伝達に機能することができる(Brian SD et al., Nature (1985); McCulloch et al., PNAS (1986))。C G R Pは、カルシトニン受容体様受容体(C L R)と呼ばれるGタンパク質結合受容体と受容体活性修飾タンパク質(RAMP1)とから構成されるヘテロメリック受容体を介してその効果を介在することによって、心臓血管恒常性及び痛覚(nociception)における1つの役割を果たすと考えられている。

10

【0344】

或る例において、C G R P又はその前駆体の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、q P C Rアッセイ、R T - P C Rアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、m R N A発現のレベルで検出する。或るその他の例において、ペプチドホルモンマーカの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、E L I S A)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のC G R Pの存在又はレベルを決定するために好適なE L I S Aキットは、例えば、Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI)、Bachem Holding AG/ Peninsula Laboratories, LLC (San Carlos, CA)及びBioPorto Diagnostics (Denmark)から入手することができる。

20

【0345】

25. サブスタンスP

サブスタンスPは、中枢及び末梢神経系の両方において、神経末端から放出される、長さ11アミノ酸(R P K P Q Q F F G L M - N H ₂; 配列番号3)のペプチドである。サブスタンスP放出神経が分布する非常に多くの生物学的な部位には、皮膚、腸、胃、膀胱及び心血管系がある。サブスタンスPは、プレプロタキキニンA遺伝子(T A C 1; N M __003182)の選択的スプライシング後のポリペプチド前駆体由来する。或る実施態様において、サブスタンスP又はサブスタンスP前駆体タンパク質は、I B Sのマーカ、例えば、T A C 1ポリペプチド(NP__003173; NP__054704; NP__054702; 及びNP__054703)又はその転写産物として有用であることがある。

30

【0346】

或る例において、サブスタンスP又はその前駆体の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、q P C Rアッセイ、R T - P C Rアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、m R N A発現のレベルで検出する。或るその他の例において、ペプチドホルモンマーカの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、E L I S A)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のサブスタンスPの存在又はレベルを決定するために好適なE L I S Aキットは、例えば、Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI)、Bachem Holding AG/ Peninsula Laboratories, LLC (San Carlos, CA)及びMD Biosciences Inc. (St. Paul, MN)から入手することができる。

40

【0347】

26. 神経成長因子(N G F)

50

NGFは、NGF - ファミリーのメンバーであり、そして、ホモ二量体化してより大きな複合体へ導入される分泌タンパク質である。NGFは神経成長刺激活性を有し、そして、複合体は、成長の調節と交感神経ニューロン及び或る感覚ニューロンの分化とに關与する。特定の標的ニューロンの分化及び生存を誘導するスモール分泌タンパク質。NGFは、この成長因子のTrkA及びLNGFRに应答することができる細胞の表面上で、少なくとも2つの受容体に結合する。NGFは、NGF遺伝子(NM__002506)によりコードされる前駆体ポリペプチド(NP__002497)から由来するスモールポリペプチド(NP__002497の残基122-241)である。或る実施態様において、NGF、NGF前駆体ポリペプチド又はNGFポリペプチド(NP__002497の残基19-121)は、IBSマーカーとして有用であることがある。

10

【0348】

或る例において、NGF又はその前駆体の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、NGF、その前駆体又はそのプロタンパク質の存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のNGFの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Millipore (Billerica, MA)、CUSABIO Biotech Co., Ltd. (Newark, DE)、Emelca Biosciences (Belgium)及びSignosis, Inc. (Sunnyvale, CA)から入手することができる。

20

【0349】

27. ニューロキニンA

ニューロキニンAは、プレプロタキニンA遺伝子(TAC1; NM__003182)の選択的スプライシング後のポリペプチド前駆体に由来する、長さ10アミノ酸(HKTD S F V G L M; 配列番号4)のペプチドである。ペプチドは、神経ペプチド神経伝達物質のタキニンファミリーのメンバーである。或る実施態様において、ニューロキニンA又はニューロキニンA前駆体タンパク質は、IBSのマーカー、例えば、TAC1ポリペプチド(NP__003173及びNP__054703)又はその転写産物として有用であることがある。

30

【0350】

或る例において、ニューロキニンA又はその前駆体の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、ニューロキニンAの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のニューロキニンAの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Abcam (Cambridge, MA)、Fitzgerald Industries (North Acton, MA)及びRayBiotech, Inc (Norcross, GA)から入手することができる。

40

【0351】

28. ニューロキニンB

ニューロキニンBは、タキニン3遺伝子(TAC3; NM__003182)によりコードされるタキニン3前駆体(NP__037383)に由来する、長さ10アミノ酸(DMHDF F V G L M - NH₂; 配列番号5)のペプチドである。ペプチドは、神経ペプチド神経伝達物質のタキニンファミリーのメンバーである。或る実施態様において、ニューロキニンB又はニューロキニンB前駆体タンパク質は、IBSのマーカー、例えば、TAC3ポリペプチド(NP__037383)又はその転写産物として有用であることがある。

【0352】

50

或る例において、ニューロキニン B 又はその前駆体の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、ニューロキニン B の存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のニューロキニン B の存在又はレベルを決定するために好適な ELISA キットは、例えば、Abcam (Cambridge, MA)、Bachem Holding AG/ Peninsula Laboratories, LLC (San Carlos, CA) 及び RayBiotech, Inc (Norcross, GA) から入手することができる。

【0353】

29. 血管作動性腸管ペプチド (VIP)

VIP は、ヒトの腸、膵臓及び視床下部において見出される 28 アミノ酸ペプチドホルモン (HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILN; 配列番号 6) である。このペプチドは、平滑筋弛緩を誘導し、胃酸分泌及び腸管腔からの吸収の障害を引き起こし、そして、膵液及び胆汁への水分分泌を刺激する。VIP は、血管作動性腸管ペプチド遺伝子 (Entrez Gene ID: 7432) の選択的スプライシング後のポリペプチド前駆体由来する。或る実施態様において、VIP、VIP 前駆体タンパク質（例えば、NP_919416 又は NP_003372）、VIP プロペプチド又は VIP ペプチドをコードする転写産物（例えば、NM_003381 又は NM_194435）は、IBS のマーカーとして有用であることがある。

【0354】

或る例において、VIP の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA 発現のレベルで検出する。或るその他の例において、VIP、その前駆体又はそのプロペプチドの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中の VIP の存在又はレベルを決定するために好適な ELISA キットは、例えば、Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (Burlingame, CA)、BioPorto Diagnostics (Denmark) 及び RayBiotech, Inc (Norcross, GA) から入手することができる。

【0355】

30. グルカゴン様ペプチド 2 (GLP-2)

GLP-2 は、腸、膵臓及び脳において発現する 33 アミノ酸ペプチドホルモン (HADGSFSDMNTILDNLAAARDFINWLIQTKITD; 配列番号 7) である。GLP-2 は、GLP-1 とともに腸内で共分泌 (co-secrete) して、そこで、胃運動性、分泌、糖輸送並びに細胞分化及び増殖を調節する働きをすることが知られている。GLP-2 は、グルカゴン遺伝子 (CGC; NM_002054) によりコードされるポリペプチド前駆体、プログルカゴンに由来する。或る実施態様において、GLP-2、GLP-2 前駆体タンパク質（例えば、NP_002045）、GLP-2 プロタンパク質又は GLP-2 ペプチドをコードする転写産物（例えば、NM_002054）は、IBS のマーカーとして有用であることがある。

【0356】

或る例において、GLP-2 の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA 発現のレベルで検出する。或るその他の例において、GLP-2、その前駆体又はそのプロペプチドの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中の GLP-2 の存在又はレベルを決定するために好適な ELISA キットは、例えば、RayBiotech, Inc (Norcross, GA)、BioSupply UK (England) 及び BioCat GmbH (Germa

10

20

30

40

50

ny)から入手することができる。

【0357】

31.モチリン

小腸にある内分泌性M細胞から分泌される22アミノ酸ペプチドホルモン(FVPIFTYGE LQRMQEKERNKGQ;配列番号8)である。いったん放出されると、モチリンは、ペプシンの生成を刺激し、そして、不消化物質の消化管を通じた輸送に関する伝播性消化管収縮運動(migrating motor complexes)を調節する。モチリンは、モチリン遺伝子(MLN;Entrez Gene ID:4295)によりコードされる前駆体ポリペプチド、プロモチリンに由来する。MLNの転写は、二つのアイソフォーム(NM_002418及びNM_001040109)のうち的一方への選択的スプライシングを受け、これは、2つの異なる前駆体ポリペプチド(NP_002409及びNP_001035198)の翻訳をもたらす。或る実施態様において、モチリン、モチリン前駆体ポリペプチド、モチリンプロペプチド(例えば、モチリン関連ペプチド)又はモチリンをコードする転写産物は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

10

【0358】

或る例において、モチリンの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、モチリン、その前駆体又はそのプロペプチドの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のモチリンの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Abcam(Cambridge, MA)、CUSABIO Biotech Co., Ltd.(Newark, DE)及びPhoenix Biotech(China)から入手することができる。

20

【0359】

32.下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)

PACAPは、神経系、胃腸管及びリンパ系にわたって見出される血管作用性神経ペプチド(VN)である。VN、例えば、PACAP及びVIPは、神経伝達物質、神経調節物質、向神経性刺激物質、ホルモン調節因子、血管拡張薬並びに免疫及び痛覚調節因子として機能する。PACAPは、アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド1(下垂体)遺伝子(ADCYAP1;Entrez Gene ID:1271617)によりコードされる前駆体タンパク質(NP_001108)である。ADCYAP1遺伝子の転写は、二つのアイソフォーム(NM_001099733及びNM_001117)のうち的一方への選択的スプライシングを受け、これは、2つの異なる前駆体ポリペプチド(NP_001093203及びNP_001108)の翻訳をもたらす。発現PACAPポリペプチドは、2つのプロペプチド、PACAP関連ペプチド(DVAHGILNEAYRKVLDSL SAGKHLQSLVARGVGGSLGGGAGDDAEPLS;配列番号9)、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド38(HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQRVKNK;配列番号10)及び下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド27(HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL;配列番号11)を含む、より小さいペプチドへ更に処理される。或る実施態様において、PACAP、PACAP前駆体ポリペプチド、PACAPプロペプチド(例えば、PACAP関連ペプチド、下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド38及び下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド27)又はPACAPをコードする転写産物は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

30

40

【0360】

或る例において、PACAPの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、PACAP、その前駆体又はそのプロペプチドの存在又はレベルを、例

50

えば、免疫アッセイ（例えば、E L I S A）、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のP A C A Pの存在又はレベルを決定するために好適なE L I S Aキットは、例えば、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)、US Biological (Swampscott, MA)及びNovus Biologicals (Littleton, CO)から入手することができる。

【0361】

33. セロトニン代謝産物

試料中の少なくとも1種のセロトニン（5 - ヒドロキシトリプタミン；5 H T）代謝産物の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「セロトニン代謝産物」という用語は、セロトニン、セロトニン生合成中間体及びセロトニン代謝産物を含む。セロトニンは、胃腸管において主に見出され、そこでは腸運動を調節する働きをし、そして、より少ない程度では中枢神経系において見出され、そこでは気分、食欲、睡眠、筋収縮及び種々の認識機能の調節に関連する。セロトニンレベルは、I B S患者の胃腸管において上方調節される。また、セロトニン濃度は、I B S（C）よりもI B S（D）においてより高い。しかしながら、セロトニン輸送体（S E R T）による血小板への再取り込みの厳しい調節によって、セロトニンレベルの変動は血漿中で容易に測定されない。そのために、本明細書中に提供される1つの実施態様においては、I B Sの診断用に腸内のセロトニン濃度を反映するために、セロトニン代謝産物を、例えば、血液及び尿の生物試料中で検出することができる。I B Sマーカーとしての使用に適当なセロトニン代謝産物の非限定的な例は、トリプトファン、5 - H T - O - サルフェート、セロトニンO - サルフェート（5 - ヒドロキシトリプタミンO - サルフェート；5 - H T - O - サルフェート）、5 - ヒドロキシインドール酢酸（5 - H I A A）、5 - H Tグルクロニド（5 - H T - G A）及び5 - ヒドロキシトリプトホール（5 - H T O L）を含む。

【0362】

或る例において、セロトニン代謝産物の存在又はレベルを、質量分析ベースアッセイ、プロトン磁気共鳴分光ベースアッセイ、クロマトグラフアッセイ（例えば、液体クロマトグラフアッセイ又はH P L C）、免疫アッセイ（例えば、E L I S A）などを使用して検出する。

【0363】

34. 腸神経系血清代謝産物

試料中の少なくとも1種の腸神経系血清代謝産物の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「腸神経系血清代謝産物」という用語は、ドパミン、ノルエピネフリン、エピネフリン、チロシン、フェニルアラニン、ドパミン生合成中間体、ノルエピネフリン生合成中間体、エピネフリン生合成中間体、及びドパミン代謝産物、ノルエピネフリン代謝産物、エピネフリン代謝産物を含む。本明細書中に提供される1つの実施態様において、I B Sを診断、サブタイプ又は予後提供するために、腸神経系血清代謝産物を、例えば、血液及び尿の生物試料中に検出することができる。或る実施態様において、高レベルのチロシンは、I B Sに関連するか又はI B Sを示すか、あるいは、I B Sの可能性の増加に関連する。その他の実施態様において、高レベルのチロシンは、I B S - D又はI B S - Mに関連するか、あるいは、I B S - D又はI B S - Mを示す。別の実施態様において、高レベルのフェニルアラニンは、I B Sに関連するか又はI B Sを示すか、あるいは、I B Sの可能性の増加に関連する。その他の実施態様において、高レベルのフェニルアラニンは、I B S - D又はI B S - Mに関連するか、あるいは、I B S - D又はI B S - Mを示す。

【0364】

或る例において、腸神経系血清代謝産物の存在又はレベルを、質量分析ベースアッセイ、プロトン磁気共鳴分光ベースアッセイ、クロマトグラフアッセイ（例えば、液体クロマトグラフアッセイ又はH P L C）、免疫アッセイ（例えば、E L I S A）などを使用して検出する。

【0365】

10

20

30

40

50

I . セロトニン経路マーカー

試料中の少なくとも1種のセロトニン経路マーカーの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「セロトニン経路マーカー」という用語は、セロトニンの生合成又は代謝あるいは胃腸管におけるセロトニンレベルの調節に関与する遺伝子とタンパク質と酵素とを含む。IBSマーカーとしての使用に適当なセロトニン経路マーカーの非限定的な例は、UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ1 - 6 (UGT1A6)、セロトニン再取り込み輸送体 (SERT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ1 (TPH1)、モノアミンオキシダーゼA (MAO - A)、モノアミンオキシダーゼB (MAO - B) 及びヒドロキシトリプタミンレセプター3A (5 - HT3A ; 5 - HT3R) を含む。

10

【0366】

1 . UDP - グルクロノシルトランスフェラーゼ1 - 6 (UGT1A6)

UGT1A6は、種々の基質のグルクロン酸化を触媒する、ERの膜結合酵素のUDP - グルクロノシル/UDP - グルコシルトランスフェラーゼスーパーファミリーのメンバーである。酵素のUDP - グルクロノシル/UDP - グルコシルトランスフェラーゼスーパーファミリーは、UTP - 糖から疎水性小分子へのグリコシル基の添加を触媒する。哺乳類のUDP - グルクロノシルトランスフェラーゼは、例えば、Burchell et al., DNA Cell Biol., 10(7):487-94 (1991)に記載される。これらの酵素は、それらのC末端領域において約50のアミノ酸残基の保存ドメインを共有し、そして、例えば、薬剤(例えば、トポイソメラーゼI阻害因子)及び発癌物質の生体異物の解毒及びその後の除去において主要な役割を果たす。セロトニンは、UGT1A6の特異的な内因性基質であることが既に分かっている(King C. et al., Arch Biochem Biophys (1999))。UGT1A6、E . C . 2 . 4 . 1 . 17酵素は、転写産物(NM__001072及びNM__205862)の選択的スプライシング後で、UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ1ファミリー、ポリペプチドA6遺伝子(UGT1A6 ; Entrez Gene ID : 54578)及び2つの前駆体ポリペプチド(NP__001063及びNP__995584)のうちの一方の成熟タンパク質(matures)によってコードされる。UGT1A6*1、UGT1A6*2、UGT1A6*3及びUGT1A6*4を含む種々の対立遺伝子が、UGT1A6遺伝子用に存在する(Nagar S. et al., Pharmacogenetics (2004))。これらのハプロタイプは、rs6759892(158T>G)、rs1042708(348C>A)、rs2070959(680A>G)、rs1105879(691A>G)及びrs1042709(1667G>C)を含む、公知のUGT1A6のSNPの種々の組合せを含む。或る実施態様において、UGT1A6、その前駆体タンパク質、UGT1A6のmRNA又はUGT1A6のSNP、ハプロタイプあるいは遺伝子型は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

20

30

【0367】

或る例において、UGT1A6の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT - PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、UGT1A6又はその前駆体の存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のUGT1A6の存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Abnova (Walnut CA)及びSanta Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)から入手することができる。更にその他の例において、UGT1A6遺伝子の、SNP又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT - PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

40

【0368】

2 . セロトニン選択的再取り込み輸送体 (SERT)

50

S E R Tは、モノアミン神経伝達物質の細胞へ及び細胞からの輸送を促進する、膜結合受容体のモノアミン輸送体ファミリーのメンバーである。セロトニン受容体 (S E R T) は、ニューロン及び血小板へのセロトニンの取り込みを介在し、それによって *in vivo* のセロトニンレベルを調節する。S E R T 遺伝子における多型性は、乳児突然死症候群 (S I D S)、アルツハイマー病、心的外傷後ストレス障害、うつ病、肺高血圧症、心筋梗塞及び I B S を含む種々の疾患と以前から関連している (検討のために、Murphy DL et al., Mol Interv. (2004) を参照。)。S E R T は、溶質キャリアファミリー 6 (神経伝達物質輸送体、セロトニン)、メンバー 4 遺伝子 (S L C 6 A 4 ; E n t r e z G e n e I D : 6 5 3 2 ; N M _ 0 0 1 0 4 5) によってコードされる 7 0 k D a 膜貫通受容体 (N P _ 0 0 1 0 3 6) である。種々の S N P は、 r s 6 3 5 5 (4 7 2 G > C)、 r s 2 2 2 8 6 7 3 (9 0 8 G > C)、 r s 2 8 9 1 4 8 3 2 (1 5 7 8 A > C)、 r s 2 8 9 1 4 8 3 3 (1 6 9 8 T > C)、 r s 2 8 9 1 4 8 3 4 (1 9 5 3 C > G)、 r s 6 3 5 2 (2 1 2 0 A > C) 及び I 4 2 5 V を含む S L C 6 A 4 遺伝子において同定されている。更に、 A > G 多型性 (rs25531) 及び短い変異体をもたらす 4 4 塩基対の削除の多型性 (rs4795541) を含む S L C 6 A 4 遺伝子のプロモーター領域における多型性が記載されている (Heils A et al., J Neurochem. (1996))。或る実施態様において、S E R T、S L C 6 A 4 の m R N A 又は S L C 6 A 4 の S N P、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、I B S のマーカーとして有用であることがある。

10

【 0 3 6 9 】

或る例において、S E R T の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、q P C R アッセイ、R T - P C R アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、m R N A 発現のレベルで検出する。或るその他の例において、S E R T の存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ (例えば、E L I S A)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中の S E R T の存在又はレベルを決定するために好適な E L I S A キットは、例えば、Abgent, Inc. (San Diego, CA)、Origene Technologies (Rockville, MD) 及び Abcam (Cambridge, MA) から入手することができる。更にその他の例において、S L C 6 A 4 遺伝子の、S N P、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、q P C R アッセイ、R T - P C R アッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

20

30

【 0 3 7 0 】

3 . トリプトファンヒドロキシラーゼ 1 (T P H 1)

T P H 1 は、L - トリプトファンのヒドロキシル化を触媒して、5 - ヒドロキシトリプトファン、セロトニン生合成の中間体を形成する E . C . 1 . 1 4 . 1 6 . 4 酵素である。トリプトファンヒドロキシラーゼの 2 つのアイソフォーム (T P H 1 及び T P H 2) は、哺乳類の腸及び中枢神経系において見出される。T P H 1 は腸内に見出される主要なアイソフォームであり、そして、T P H 2 は中枢神経系において見出される主要なアイソフォームである。特に、T P H は、縫線ニューロン、松果体細胞、肥胖細胞、単核白血球、ランゲルハンス島の細胞、並びに腸及び膵臓の腸クロム親和細胞を含む、いくつかの細胞系統において発現する。T P H 1 は、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1 遺伝子 (T P H 1 ; E n t r e z G e n e I D : 7 1 6 6 ; N M _ 0 0 4 1 7 9) によりコードされる 5 0 k D a タンパク質 (N P _ 0 0 4 1 7 0) である。種々の S N P は、 r s 1 7 2 4 2 3 (3 0 1 + 1 2 8 1 G > A)、 r s 2 1 1 1 0 2 (9 3 0 + 6 2 9 A > G)、 r s 1 0 4 8 8 6 8 3 (4 0 2 + 1 2 7 6 A > G)、 r s 6 8 4 3 0 2 (1 1 7 + 1 8 4 0 C > T)、 r s 5 0 3 9 6 4 (7 2 3 C > T)、 r s 4 9 0 8 9 5 (7 8 9 C > T)、 r s 4 1 2 7 4 3 5 0 (8 2 0 C > A)、 r s 4 1 2 7 4 3 4 8 (9 2 9 C > T) 及び r s 5 6 1 5 1 7 9 8 (1 0 9 5 T > C) を含む T P H 1 遺伝子において同定されている。いくつかの T P H 1 の S N P は、衝動的攻撃手段 (New AS et al., Am J Med Genet. (1998)) 及び統合失調症 (Allen NC et al., Nat Genet. (2008)) を含む精神障害と関連する。或る実

40

50

施態様において、TPH1、TPH1のmRNA又はTPH1のSNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

【0371】

或る例において、TPH1の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、TPH1の存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のTPH1の存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Novus Biologicals (Littleton, CO) 及びAbcam (Cambridge, MA)から入手することができる。更にその他の例において、TPH1遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

10

【0372】

4. モノアミノオキシダーゼA (MAO-A)

MAO-A、すなわちE.C.1.4.3.4酵素は、フラビン-含有アミノオキシドレダクターゼの酵素ファミリーのメンバーである。ミトコンドリア外膜に限局されるこの酵素は、FAD補因子を用いて、セロトニン、ノルエピネフリン及びエピネフリンを含む神経作用性及び血管作用性アミンの脱アミノ化を触媒する。MAO-Aは、モノアミノオキシダーゼA遺伝子(MAOA; Entrez Gene ID: 4128; NM_000240)によりコードされる59.7kDaタンパク質(NP_000231)である。いくつかのSNPは、rs1800464(566A>C)、rs58524323(696G>A)、rs1137068(818G>T)、rs72554632(1067C>T)、rs6323(1072G>T)、rs61730725(1074T>C)、rs1799835(1121T>G)、rs1800465(1207A>T)、rs1803987(1324G>T)、rs7065428(1342A>G)、rs1803986(1516G>T)、rs1137070(1591T>C)、rs1800466(1740A>G)、rs3788862(NT_079573.3、位置6369131A/C)及びrs1465108(NT_079573.3、位置6389976A/G)を含むMAOA遺伝子において同定されている。いくつかのMAOAのSNPは、自閉症スペクトラム障害(Yoo HJ et al., Neurosci Res. (2009))、双極性情動障害(Lin et al., Behav Brain Funct. (2008))、及び注意欠陥過活動性障害(Rommelse N et al., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. (2008))を含む障害と関連している。或る実施態様において、MAO-A、MAOAのmRNA又はMAOAのSNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

20

30

【0373】

或る例において、MAOAの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、MAO-Aの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ（例えば、ELISA）、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のMAO-Aの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Novus Biologicals (Littleton, CO)、Abcam (Cambridge, MA)及びAbnova (Walnut, CA)から入手することができる。更にその他の例において、MAOA遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定ア

40

50

ッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

【0374】

5. モノアミノオキシダーゼ B (MAO-B)

MAO-B、すなわち E.C.1.4.3.4 酵素は、フラビン - 含有アミノオキシドレダクターゼの酵素ファミリーのメンバーである。MAO-Bは、MAO-Aと約70%の配列同一性を共有し、MAO-Aと同様にミトコンドリア外膜に限局され、そして、神経作用性及び血管作用性アミンの脱アミノ化を触媒する。MAO-Bは、ベンジルアミン、フェニルエチルアミン及びドパミンを優先的に脱アミノ化する。MAO-Aが、セロトニン及びエピネフリンを、MAO-Bよりも高い親和性で脱アミノ化するという事実のために、うつ病の第1選択治療用にはMAO-A抑制因子よりもMAO-B抑制因子が好ましい。MAO-Bは、モノアミノオキシダーゼB遺伝子(MAOB; Entrez Gene ID: 4129; NM_000898)によりコードされる58.8 kDaタンパク質(NP_000889)である。いくつかのSNPは、rs12010260(260G>T)、rs17856663(289G>A)、rs17852046(565C>A)、rs12845783(767A>C)、rs12850496(775C>A)、rs12845773(777A>C)、rs7879356(782A>G)、rs55815323(1087C>T)、rs5952696(1229A>G)、rs6324(1637C>T)、rs1040399(NT_079573.3、位置6477166C/T)及びrs6651806(NT_079573.3、位置6540731A/C)を含むMAO-B遺伝子において同定されている。いくつかのMAOBのSNPは、注意欠陥過活動性障害(Li J et al., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. (2008)及び大うつ病の脆弱性(Dlugos AM et al., J Neural Transm. (2009))を含む障害と関連している。或る実施態様において、MAO-B、MAOBのmRNA又はMAOBのSNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

10

20

【0375】

或る例において、MAOBの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、MAO-Bの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のMAO-Bの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Novus Biologicals (Littleton, CO)、Abcam (Cambridge, MA)及びSanta Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA)から入手することができる。更にその他の例において、MAOB遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

30

【0376】

6. ヒドロキシトリプタミンレセプター3A (5-HT3R)

5-HT3Rは、リガンド依存性イオンチャネル受容体(ligand-gated ion channel receptor)スーパーファミリーのメンバーである。5-HT3Rポリペプチドは、少なくとも1つの5-HT3Rサブユニットを含有するヘテロ5量体型構造又はホモ5量体型5-HT3Rからなることができる、5量体型膜貫通5-HT₃受容体のサブユニットである。5-HT₃受容体はイオン透過孔であり、セロトニンと結合する際には、ニューロンにおける興奮反応をもたらす構造変化を生じさせる。近年、マイクロRNAがHT3R受容体の調節に寄与することが示された(Kapeller J et al., Hum Mol Genet. (2008))。5-HT3Rタンパク質は、転写産物(NM_000869、NM_001161772及びNM_213621)の選択的スプライシング後に、5-ヒドロキシトリプタミン(セロトニン)レセプター3A遺伝子(HT3RA; Entrez Gene ID: 3359)

40

50

によってコードされ、そして、前駆体ポリペプチド (NP__000860、NP__001155244 及び NP__998786) からシグナルペプチドを除去することによって処理される。いくつかの SNP は、rs33940208 (168C>T)、rs72466464 (170C>T)、rs72466465 (205G>A)、rs72466467 (705G>T)、rs34327364 (714G>A)、rs4938063 (896G>A)、rs56232120 (969G>A)、rs35815285 (1169G>A)、rs12285005 (1198C>T)、rs35592083 (1320C>T)、rs34111946 (1471G>A)、rs35944954 (1479C>T)、rs1176713 (1515A>G)、rs1150220 (NT__033899.7、位置17420302C/T) 及び rs1062613 (97C>T) を含む HTR3A 遺伝子において同定されている。いくつかの HTR3A の SNP は、治療抵抗性統合失調症 (Ji X et al., Neurosci Lett. (2008)) 及び自閉症 (Anderson BM et al., Neurogenetics (2009)) を含む障害に関連している。或る実施態様において、5 - HTR3R、HTR3A の mRNA、HTR3A のミクロRNA 又は HTR3A の SNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBS のマーカーとして有用であることがある。

【0377】

或る例において、HTR3A の存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCR アッセイ、RT-PCR アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA 発現のレベルで検出する。或る他の例において、5 - HTR3R の存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ (例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中の 5 - HTR3R の存在又はレベルを決定するために好適な ELISA キットは、例えば、RayBiotech, Inc (Norcross, GA) 及び Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA) から入手することができる。更にその他の例において、HTR3A 遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCR アッセイ、RT-PCR アッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

【0378】

J. ストレスマーカー

試料中の少なくとも 1 種のストレスマーカーの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。本明細書において使用される「ストレスマーカー」という用語は、ストレスに対する中枢神経系の応答を介在する働きをする、任意のペプチド、ホルモン、代謝産物、タンパク質又は遺伝子を含む。これらのマーカーは、ストレスに対する応答において放出されるホルモン、ストレスに対する応答において特異的に生成される代謝産物、ストレスに対する応答において特異的に発現する遺伝子及びタンパク質、及びストレス依存性ホルモンと代謝産物とを結合する細胞受容体を含む。IBS マーカーとしての使用に適切なストレスマーカーの非限定的な例は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH; CRF)、ウロコルチン (Ucn)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質 (CRFBP) 及び副腎皮質刺激ホルモン (ACTH、コルチコトロピン) を含む。

1. 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH; CRF)

CRH は、中枢神経系のストレス応答に関与する神経内分泌ホルモンである。このホルモンは、多くのストレス関連末梢効果及び行動応答を介在する。CRH は、上部及び下部の両方の胃腸管におけるストレス誘導の運動性に関与することが示されている。CRH は、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子 (CRH; Entrez Gene ID: 1392; NM__000756) によりコードされる前駆体ポリペプチド (副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン前駆体; NP__000747) に由来する 41 - アミノ酸ペプチドホルモン (SEEPPISLDLTFHLLREVL E M A R A E Q L A Q Q A H S N R K L M E I I; 配列番号 12) である。いくつかの SNP は、rs12721511 (18

10

20

30

40

50

9 C > G)、rs72556398 (236G > C)、rs3832590 (330 - CCG > CGCCCG)、rs6159 (473A > C)、rs28364016 (692G > C)、rs28364017 (NT__008183.18、位置18943997A / G)及びrs28364014 (NT__008183.18、位置18943683C / G)を含むCRH遺伝子において同定されている。或る実施態様において、CRH、CRH前駆体ポリペプチド、CRHプロペプチド、CRHのmRNA又はCRHのSNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

【0379】

或る例において、CRHの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、CRHの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のCRHの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、IBL America (Minneapolis, MN)及びAbbiotec (San Diego, CA)から入手することができる。更にその他の例において、CRH遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

【0380】

2. ウロコルチン1 (Ucn)

Ucnは、ペプチドホルモンであり、そして、sauvagine/副腎皮質刺激ホルモン放出因子/ウロテンシンIファミリーのメンバーである。ウロコルチンは、CRF-1及びCRF-2受容体の両方に対して高い親和性を有し、そして、CRHよりも効能のある食欲抑制薬である。視床下部において主に生成されるCRHと異なり、UCNは胃腸管で生成され、そのためにCRHよりも容易に血漿中で検出される。UCNは、ウロコルチン遺伝子(UCN; Entrez Gene ID: 7349; NM__003353)によりコードされる前駆体ポリペプチド(ウロコルチンプレプロタンパク質; NP__003344)に由来する40-アミノ酸ペプチドホルモン(DNPSLSIDLTFHLLRTLLELARTQSQRERA EQNRIFDSV; 配列番号13)である。いくつかのSNPは、rs11557508 (NT__022184.14; 位置6347221C / T)、rs28364046 (NT__022184.14; 位置6346948A / G)、rs35403114 (NT__022184.14; 位置6346902C / T)、rs6709781 (NT__022184.14; 位置6346798C / G)、rs28364045 (525C > T)及びrs11557507 (NT__022184.14; 位置6346118G / T)を含むCRH遺伝子において同定されている。或る実施態様において、UCN、UCN前駆体ポリペプチド、UCNプロペプチド、UCNのmRNA又はUCNのSNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

或る例において、UCNの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、UCNの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のUCNの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Novus Biologicals (Littleton, CO)、Abcam (Cambridge, MA)及びUS Biological (Swampscott, MA)から入手することができる。更にその他の例において、UCN遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺

伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

【0381】

3. 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質 (CRHBP)

CRHBPは、CRHとUcnとの両方に対する高い親和性を有し、CRF受容体活性化を防止し、そして、それによってこれらのペプチドホルモンの生物活性及びバイオアベイラビリティを調節する。特に、これらの相互作用はCRHBP上の異なる結合表面によって介在される(Huising et al., J Biol Chem. (2008))。CRHBPは、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン結合タンパク質遺伝子 (CRHBP; Entrez Gene ID : 1393; NM_001882) によりコードされる前駆体ポリペプチド (NP_001873) に由来する分泌糖タンパク質である。いくつかのSNPは、rs1133082 (372C>A)、rs1053967 (529C>T)、rs34347676 (544G>A)、rs26844303 (547C>G)、rs3792738 (NT_006713.14、位置26842142A/C)、rs41272246 (NT_006713.14、位置26843420A/C) 及びrs2135078 (NT_006713.14、位置26859826C/T) を含むCRHBP遺伝子において同定されている。いくつかのCRHBPのSNPは、不安障害及びアルコール乱用障害(Enoch MA et al., PLoS One (2008)) 並びに自然早産(Velez DR et al., PLoS One (2008)) を含む障害と関連している。或る実施態様において、CRHBP、CRHBPのmRNA又はCRHBPのSNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBSのマーカとして有用であることがある。

或る例において、CRHBPの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、CRHBPの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のCRHBPの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、例えば、Abgent, Inc. (San Diego, CA)、Abbot (San Diego, CA) 及びAlpco (Salem, NH) から入手することができる。更にその他の例において、CRHBP遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

【0382】

4. コルチゾール

コルチゾールは、ストレス及び不安に応答して副腎において生成されるコルチコステロイドホルモンである。グルココルチコイドの生成は、CRH及び副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) により調節される。ストレス又は不安に応答して放出された後に、コルチゾールは、恒常性の回復を助ける働きをし、そして、インスリン、血清中のコラーゲンフリーアミノ酸、胃酸分泌、ナトリウム、カリウム、水分及び銅を含む、体内の複数の代謝産物のレベルに影響を及ぼす。或る例において、コルチゾールの存在又はレベルを、質量分析ベースアッセイ、プロトン磁気共鳴分光ベースアッセイ、クロマトグラフアッセイ(例えば、液体クロマトグラフアッセイ又はHPLC)、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)ベースアッセイ(Yu et al., Assay Drug Dev Technol. (2007))、酵素断片相補ベースアッセイ(enzyme fragment complementation based assay; Kumar A et al., Biosens Bioelectron. (2007))、蛍光アッセイ(Appel D et al., Anal Bioanal Chem. (2005))などを用いて検出する。

【0383】

5. 副腎皮質刺激ホルモン (ACTH、コルチコトリピン)

ACTHは、甲状腺による甲状腺ホルモンの生成及び放出を刺激する働きをする、下垂体前葉により生成され且つ分泌される39アミノ酸刺激ホルモン(SYSMEHFRWVKPVGKKRRPVKVYPNGAEDESA EAFPLEF; 配列番号14)である。ACTHは、一般に生物学的ストレスに応答して生成され、そして、副腎皮質からのアンドロゲン及びコルチゾールの生成の増加に影響する。ACTHは、プロオピオメラノコルチン遺伝子(POMC; Entrez Gene ID: 5443; NM_000939; NM_001035256)の選択的スプライシング後に翻訳される、プロオピオメラノコルチンプレタンパク質(NP_000930; NP_001030333)の成熟形態に由来する。プロオピオメラノコルチンプレタンパク質は、NPP(残基27-102)、メラノトロピン(残基77-87)、ポテンシャルペプチド(残基(105-134)、コルチコトロピン(残基138-176)、メラノトロピン(残基138-150)、コルチコトロピン様中間ペプチド(残基156-176)、リポトロピン(残基179-267)、リポトロピン(残基179-234)、メラノトロピン(残基217-234)、 α -エンドルフィン(残基237-267)及びメトエンケファリン(残基237-241)を含む11ポテンシャルポリペプチドへ高度に処理される。いくつかのSNPは、rs8192605(281C>T)、rs28932470(421A>G)、rs28932471(448C>T)、rs28930368(545C>T)、rs35254395(552insAGCAGCGGC)、rs10654394(560insGCCGCTGCT)、rs34650613(609C>T)、rs8192606(657C>G)、rs45463492(697G>T)、rs2071345(848C>T)、rs28932472(969C>G)、rs3754860(NT_022184.14、位置4209187C/T)、rs1009388(NT_022184.14、位置4207034C/G)及びrs1042571(NT_022184.14、位置4199820C/T)を含むPOMC遺伝子において同定されている。いくつかのPOMCのSNPは、パーキンソン病(Shadrina M et al., Neurosci Lett. (2006))、肥満(Ahituv N et al., Am J Hum Genet. (2007)及び物質依存(Zhang H et al., Biol Psychiatry (2009))を含む障害と関連している。或る実施態様において、ACTH、POMCのmRNA又はPOMCのSNP、ハプロタイプ、多型変異体、あるいは遺伝子型は、IBSのマーカーとして有用であることがある。

或る例において、POMCの存在又はレベルを、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて、mRNA発現のレベルで検出する。或るその他の例において、ACTHの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出する。血清、血漿、唾液又は尿試料中のACTHの存在又はレベルを決定するために好適なELISAキットは、Calbiotech (Spring Valley, CA)、GenWay Biotech, Inc. (San Diego, CA)及びMD Bioproducts (St. Paul, MN)から入手することができる。更にその他の例において、POMC遺伝子の、SNP、多型性、又は特定のハプロタイプ又は遺伝子型を、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ、増幅ベースアッセイ、例えば、qPCRアッセイ、RT-PCRアッセイ、単一ヌクレオチド塩基配列決定アッセイ又は質量分析ベースアッセイを用いて検出する。

【0384】

K. 他の診断マーカー

試料中のラクトフェリンの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。或る例において、ラクトフェリンの存在又はレベルは、アッセイ、例えば、ハイブリダイゼーションアッセイ又は増幅ベースアッセイによりmRNA発現のレベルにおいて検出される。或る他の例において、ラクトフェリンの存在又はレベルは、例えば、免疫アッセイ(例えばELISA)又は免疫組織化学アッセイを使用してタンパク質発現のレベルにおいて検出される。Calbiochem (San Diego, CA)から入手可能なラクトフェリンのELISAキットは、血漿、尿、気管支肺胞洗浄物、脳脊髄液試料中のヒトラクトフェリンを検出する

ために使用することができる。同様に、U.S. Biological (Swampscott, MA)から入手可能なELISAキットは、血漿試料中のラクトフェリンのレベルを決定するために使用することができる。米国特許出願公開第20040137536号は、糞便試料中のラクトフェリンレベルの上昇の存在を決定するためのELISAアッセイを記載している。同様に、米国特許出願公開第20040033537号は、糞便、粘液又は胆汁試料中の内因性ラクトフェリン濃度を決定するためのELISAアッセイを記載している。一部の実施態様において、この場合、抗ラクトフェリン抗体の存在又はレベルは、例えば、ラクトフェリントタンパク質又はこの断片を使用して試料中で検出することができる。

【0385】

試料中の糖鎖欠損トランスフェリン(CDT)の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。CDTは、大量のアルコール摂取の存在を検出するために現在使用されている診断試験である。この試験は、通常、血液、血清、毛又は尿試料中の0個、1個又は2個のシアル酸鎖により修飾されるトランスフェリンポリペプチド、すなわち、糖鎖欠損トランスフェリントタンパク質のレベルを測定する。そのようにして、CDT試験を使用して個体をアルコール乱用問題又はアルコール中毒と同定する。或る実施態様において、CDT試験又はCDTレベルは、IBSのマーカーとして有用であることができる。或るその他の例において、CDTの存在又はレベルを、Consumer Genetics, Inc. (Sunnyvale, CA)及びSebia electrophoresis (Norcross, GA)により販売される電気泳動アッセイにより検出する。或るその他の例において、CDTの存在又はレベルを、例えば、免疫アッセイ(例えば、ELISA)、等電点電気泳動アッセイ、免疫組織化学アッセイ又は質量分析ベースアッセイを使用して検出する。

10

20

【0386】

免疫アッセイ、例えば、ELISAも、試料中のC反応性タンパク質(CRP)の存在又はレベルを決定するために特に有用である。例えば、Alpco Diagnostics (Salem, NH)から入手可能なサンドイッチ比色ELISAアッセイを使用して、血清、血漿、尿又は糞便試料中のCRPのレベルを決定することができる。同様に、Biomedica Corporation (Foster City, CA)から入手可能なELISAキットを使用して、試料中のCRPレベルを検出することができる。試料中のCRPレベルを決定するその他の方法は、例えば米国特許第6,838,250号及び同第6,406,862号；並びに米国特許出願公開第20060024682号及び同第20060019410号に記載されている。

30

【0387】

更に、潜血、便潜血は、胃腸疾病の指標となることが多く、胃腸出血をモニタリングするために種々のキットが開発されてきた。例えば、Hemoccult SENS Aは、Beckman Coulterの製品であるが、胃腸出血、鉄欠乏、消化性潰瘍、潰瘍性大腸炎及び一部の例においては結腸直腸癌のスクリーニングにおいて、診断の補助となるものである。この特定のアッセイは、青色を生じる過酸化水素によるグアヤクの酸化に基づく。同様の比色アッセイが、糞便試料中の血液を検出するためにHelena Laboratories (Beaumont, TX)から市販されている。ヘモグロビン又はヘム活性の存在又はレベルを決定することによる糞便試料中の潜血を検出するその他の方法は、例えば米国特許第4,277,250号、同第4,920,045号、同第5,081,040号及び同第5,310,684号に記載されている。

40

【0388】

試料中のフィブリノーゲン又はこのタンパク質分解産物、例えば、フィブリノペプチドの存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。フィブリノーゲンは、肝臓内で合成される血漿糖タンパク質で、3種の構造的に異なるサブユニット：アルファ(FGA)；ベータ(FGB)；及びガンマ(FGG)から構成される。トロンピンは、フィブリノーゲン分子の限定的なタンパク質分解を引き起こし、この間にフィブリノペプチドA及びBがアルファ及びベータ鎖のN末端領域からそれぞれ放出される。フィブリノペプチドA及びBは、多くの種において配列解読がなされており、血管収縮物質としての生理的役割を有することができる。1つの実施態様において、ヒトフィブリノペプチドAは、配列：Ala - Asp - Ser - Gly - Gl

50

u - G l y - A s p - P h e - L e u - A l a - G l u - G l y - G l y - G l y - V a l - A r g (配列番号 1 5) を含む。別の実施態様において、ヒトフィブリノペプチド B は、配列：G l p - G l y - V a l - A s n - A s p - A s n - G l u - G l u - G l y - P h e - P h e - S e r - A l a - A r g (配列番号 1 6) を含む。American Diagnostica Inc. (Stamford, CT) から入手可能な E L I S A キットを使用して、血漿又は他の生体液中のヒトフィブリノペプチド A の存在又はレベルを検出することができる。

【 0 3 8 9 】

或る実施態様において、試料中のカルシトニン遺伝子関連ペプチド (C G R P) の存在又はレベルの決定も、本発明において有用である。カルシトニンは、甲状腺の傍濾胞細胞によって合成される 3 2 アミノ酸のペプチドホルモンである。カルシトニンは、副甲状腺ホルモンのものとは反対の効果である、血清カルシウムの低減を引き起こす。C G R P は、カルシトニンとともに、第 1 1 染色体上に局在する C T / C G R P 遺伝子に由来する。C G R P は 3 7 アミノ酸のペプチドであり、強力な内因性血管拡張物質である。C G R P は主に神経組織内で産生され；しかしながら、この受容体は体中に発現する。Cayman Chemical Co. (Ann Arbor, MI) から入手可能な E L I S A キットは、血漿、血清、神経組織、C S F 及び培養液を含む種々の試料中のヒト C G R P の存在又はレベルを検出するために使用することができる。

10

【 0 3 9 0 】

その他の実施態様において、試料中の抗組織トランスグルタミナーゼ抗体 (t T G) 抗体の存在又はレベルの決定が、本発明において有用である。本明細書において使用される「抗 t T G 抗体」という用語は、組織トランスグルタミナーゼ (t T G) 又はこの断片を認識する任意の抗体を含む。トランスグルタミナーゼは、ユビキタスであり、種間で高度に保存された C a ²⁺ 依存性酵素の多様なファミリーである。全てのトランスグルタミナーゼの中で、t T G は最も広く分布している。或る例において、抗 t T G 抗体は、抗 t T G I g A 抗体、抗 t T G I g G 抗体又はこれらの混合物である。ScheBo Biotech USA Inc. (Marietta, GA) から入手可能な E L I S A キットを使用して、血液試料中のヒト抗 t T G I g A 抗体の存在又はレベルを検出することができる。

20

【 0 3 9 1 】

試料中の N O D 2 / C A R D 1 5 遺伝子における多型の存在の決定も、本発明において有用である。例えば、N O D 2 遺伝子における多型、例えば、R 7 0 3 W タンパク質変異をもたらす C 2 1 0 7 T 核酸変異を個体からの試料中で同定することができる (例えば、米国特許出願公開第 20030190639 号を参照) 。代替的实施態様において、N O D 2 m R N A レベルは、I B S の分類を補助するために本発明の診断マーカーとして使用することができる。

30

【 0 3 9 2 】

試料中のセロトニン再取り込み輸送体 (S E R T) 遺伝子における多型の存在の決定も、本発明において有用である。例えば、S E R T 遺伝子のプロモーター領域における多型は、転写活性に影響し、5 - H T 再取り込み効率の変化をもたらす。S E R T - P 欠失 / 欠失遺伝子型と I B S 表現型との間には強い遺伝子型の関連が観察されることが示されている (例えば、Yeo Gut, 53:1396-1399 (2004) を参照) 。代替的实施態様において、S E R T m R N A レベルは、I B S の分類を補助するために本発明の診断マーカーとして使用することができる (例えば、Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39(5 Suppl.):S184-193 (2005) を参照) 。

40

【 0 3 9 3 】

或る観点において、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1 の m R N A のレベルが診断マーカーである。例えば、トリプトファンヒドロキシラーゼ 1 の m R N A は、I B S においては顕著に減少していることが示されている (例えば、Coats, Gastroenterology, 126:1897-1899 (2004) を参照) 。或るその他の観点において、細菌の過剰成長の指標となるメタンを計測するためのラクツロース呼気検査を、I B S についての診断マーカーとして使用することができる。

50

【0394】

追加の診断マーカーは、以下に限定されるものではないが、L-セレクチン/CD62L、抗U1-70kDa自己抗体、閉鎖帯1(ZO-1)、血管作動性腸管ペプチド(VIP)、血清アミロイドA、ガストリン、NB3遺伝子多型、NCI1遺伝子多型、便中白血球、2A及び2Cアドレナリン受容体遺伝子多型、IL-10遺伝子多型、TNF- α 遺伝子多型、TNF- β 遺伝子多型、アドレナリン受容体、Gタンパク質、5-HT_{2A}遺伝子多型、5-HTTLPR遺伝子多型、5-HT₄受容体遺伝子多型、ゾヌリン並びに33量体ペプチドを含む(Shan et al., Science, 297:2275-2279 (2002); 国際公開第03/068170号を参照)。

【0395】

L. 分類マーカー

種々の分類マーカーが、IBSをカテゴリー、形態、臨床サブタイプ、例えば、IBS便秘型(IBS-C)、IBS下痢型(IBS-D)、IBS混合型(IBS-M)、IBS交替型(IBS-A)又は感染後IBS(IBS-PI)に分類する本発明の方法、システム及びコードにおける使用に好適である。分類マーカーの例は、以下に限定されるものではないが、上記の診断マーカーのいずれか(例えば、レプチン、セロトニン再取り込み輸送体(SERT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ-1、5-ヒドロキシトリプタミン(5-HT)、トリプターゼ、PGE₂、ヒスタミンなど)及び腔粘膜タンパク質8、ケラチン-8、クローディン-8、ゾヌリン、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体1(CRH1)、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン受容体2(CRH2)などを含む。

【0396】

例えば、以下の実施例1及び2は、トリプターゼレベルの計測がIBS-C患者試料とIBS-A及びIBS-D患者試料とを区別するために特に有用であることを示す。同様に、全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる2007年8月14日に出願された米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例1は、レプチンレベルを計測することがIBS-C患者試料とIBS-A及びIBS-D患者試料とを区別するために特に有用であることを説明している。更に、粘膜SERT及びトリプトファンヒドロキシラーゼ1の発現は、IBS-C及びIBS-Dにおいて減少していることが示されている(例えば、Gershon, J. Clin. Gastroenterol., 39(5 Suppl):S184-193 (2005)を参照)。更に、IBS-C患者は、食後の5-HT放出の障害を示す一方、IBS-PI患者は、5-HTのより高いピークレベルを有する(例えば、Dunlop, Clin Gastroenterol Hepatol., 3:349-357 (2005)を参照)。更に、図11において理解することができるように、ヒスタミン及びPGE₂の血清レベルも、IBS-D患者試料とIBS-A、IBS-C及び健常対照の患者試料とを区別するために特に有用である。

【0397】

M. 統計的アルゴリズム

一部の観点において、本発明は、試料をIBS試料又は非IBS試料として分類するための統計的アルゴリズム又は処理を使用して試料がIBSと関連するか否かを分類する方法、アッセイ、システム及びコードを提供する。その他の観点において、本発明は、試料を非IBD試料又はIBD試料として分類するための第1の統計的アルゴリズム又は処理を使用し(すなわち、IBD除外工程)、次いで非IBD試料をIBS試料又は非IBS試料として分類するための第2の統計的アルゴリズム又は処理を使用して(すなわち、IBS確定工程)、試料がIBSと関連するか否かを分類する方法、システム及びコードを提供する。好ましくは、統計的アルゴリズム又は処理は、1種以上の学習統計的分類システムを独立して含む。本明細書に記載のとおり、学習統計的分類システムの組合せは、有利には、試料がIBSと関連するか否かを分類することについての感度、特異度、陰性適中率、陽性適中率及び/又は全体精度の改善を提供する。好ましい実施態様において、本明細書において提供される方法、アッセイ、システム及びコードは、少なくとも2種の統計的アルゴリズムの組合せを使用する。

10

20

30

40

50

【0398】

一部の実施態様において、第1の統計的アルゴリズムは、ランダムフォレスト(RF)、分類及び回帰ツリー(C&RT)、ブーストされたツリー、ニューラルネットワーク(NN)、サポートベクターマシン(SVM)、一般的なカイ二乗による自動相互作用検出モデル、インタラクティブツリー、多変量適応的回帰スプライン、機械学習分類子及びこれらの組合せからなる群から選択される学習統計的分類子システムである。或る例において、第1の統計的アルゴリズムは単一の学習統計的分類子システムである。好ましくは、単一の学習統計的分類子システムは、ツリーベース統計的アルゴリズム、例えば、RF又はC&RTを含む。或るその他の例において、第1の統計的アルゴリズムは、例えばタンデム又はパラレルで使用される少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せである。非限定的な例として、最初にRFを使用して診断マーカープロファイル単独又は症状プロファイルとの組合せに基づき予測値又は確率値を作成することができ、次いでNN(例えば人工的NN)を使用して予測値又は確率値及び同一又は異なる診断マーカープロファイル又はプロファイルの組合せに基づき試料を非IBD試料又はIBD試料として分類することができる。本発明の複合型RF/NN学習統計的分類子システムは、典型的には、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率及び/又は全体精度を伴い、試料を非IBD試料として分類する。

10

【0399】

或る実施態様において、第2の統計的アルゴリズムは、上記の学習統計的分類子システムのいずれかを含む。或る例において、第2の統計的アルゴリズムは、単一の学習統計的分類子システム、例えば、ツリーベース統計的アルゴリズム(例えば、RF又はC&RT)などである。ある他の例において、第2の統計的アルゴリズムは、例えばタンデム又はパラレルで使用される少なくとも2種の学習統計的分類子システムの組合せである。非限定的な例として、最初にRFを使用して診断マーカープロファイル単独又は症状プロファイルとの組合せに基づき予測値又は確率値を作成することができ、次いでNN(例えば人工的NN)又はSVMを使用して予測値又は確率値及び同一又は異なる診断マーカープロファイル又はプロファイルの組合せに基づき非IBD試料を非IBS試料又はIBS試料として分類することができる。本明細書に記載の複合型RF/NN又はRF/SVM学習統計的分類子システムは、典型的には、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の感度、特異度、陽性適中率、陰性適中率及び/又は全体精度を伴い、試料をIBS試料として分類する。

20

30

【0400】

一部の例において、1種以上の学習統計的分類子システムを使用して得られたデータは、処理アルゴリズムを使用して処理することができる。このような処理アルゴリズムは、例えば、多層パーセプトロン、バックプロパゲーションネットワーク及びレーベンバーグ・マルカート・アルゴリズムからなる群から選択することができる。その他の例において、このような処理アルゴリズムの組合せを、例えば、パラレル又はシリアル方式で使用することができる。

40

【0401】

「統計的アルゴリズム」又は「統計処理」という用語は、可変要素間の関係を決定するために使用される種々の統計分析のいずれかを含む。本発明において、可変要素は、対象となる少なくとも1種のマーカーの存在又はレベル及び/又は少なくとも1種のIBS関連症状の存在又は重症度である。任意数のマーカー及び/又は症状を、本明細書に記載の統計的アルゴリズムを使用して分析することができる。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60種以上のバイオマーカー及び/又は症

50

状を統計的アルゴリズムに含めることができる。1つの実施態様において、ロジスティック回帰が使用される。別の実施態様において、直線回帰が使用される。或る例において、本発明の統計的アルゴリズムは、可変要素として所与の母集団内における特定のマーカの分位値の大きさを使用することができる。分位値は、(可能な限り)等数の観察結果を含む群にデータサンプルを分割する一組の「カットポイント」である。例えば、四分位値は、データサンプルを(可能な限り)等数の観察結果を含む4つの群に分割する値である。下位四分位値は、順位づけられたデータセットから上位4分の1のデータ値であり;上位四分位値は、順位づけられたデータセットから下位4分の1のデータ値である。五分位値は、データサンプルを(可能な限り)等数の観察結果を含む5つの集団に分割する値である。本発明は、アルゴリズムにおける可変要素として(ちょうど連続可変要素と同じように)、マーカーレベルの百分率範囲(例えば、三分位値、四分位値、五分位値など)又はこれらの累積指数(例えば、マーカーレベルの四分位値の合計など)の使用も含むことができる。

10

20

30

40

50

【0402】

好ましくは、本発明の統計的アルゴリズムは、1種以上の学習統計的分類子システムを含む。本明細書において使用される「学習統計的分類子システム」という用語は、複雑なデータセット(例えば、対象となるマーカのパネル及び/又はIBS関連症状のリスト)に適合し、このようなデータセットに基づき決定を下すことができる機械学習アルゴリズム技術を含む。一部の実施態様において、単一の学習統計的分類子システム、例えば、分類ツリー(例えば、ランダムフォレスト)が使用される。その他の実施態様において、2、3、4、5、6、7、8、9、10種以上の学習統計的分類子システムの組合せが好ましくはタンドムで使用される。学習統計的分類子システムの例は、以下に限定されるものではないが、帰納学習を使用するもの(例えば、決定/分類ツリー、例えば、ランダムフォレスト、分類及び回帰ツリー(C&RT)、ブーストされたツリーなど)、確率的で近似的に正しい(PAC)学習、コネクショニスト学習(例えば、ニューラルネットワーク(NN)、人工ニューラルネットワーク(ANN)、ニューロファジーネットワーク(NFN)、ネットワーク構造、パーセプトロン、例えば、多層パーセプトロン、多層フィードフォワードネットワーク、ニューラルネットワークの適用、ピリーフネットワークにおけるベイジアン学習など)、強化学習(例えば、既知環境下での受動的学習、例えば、ナイーブ学習、適応的動的学習及び時間差分学習、未知環境下での受動的学習、未知環境下での能動学習、学習行動価値関数、強化学習の適用など)並びに遺伝的アルゴリズム及び進化的プログラミングを含む。その他の学習統計的分類子システムは、サポートベクターマシン(例えば、カーネル法)、多変量適応的回帰スプライン(MARS)、レーベンバーグ・マルカートアルゴリズム、ガウス・ニュートンアルゴリズム、ガウス混合、勾配降下アルゴリズム及び学習ベクトル量子化(LVQ)を含む。

【0403】

ランダムフォレストは、Leo Breiman及びAdele Cutlerによって開発されたアルゴリズムを使用して構築される学習統計的分類子システムである。ランダムフォレストは、多数の個々の決定ツリーを使用し、個々のツリーによって決定されたクラスのモード(すなわち、最も頻繁に生じること)を選択することによってクラスを決定する。ランダムフォレスト分析は、例えば、Salford Systems (San Diego, CA)から入手可能なRandomForestsソフトウェアを使用して実施することができる。ランダムフォレストの説明については、例えば、Breiman, Machine Learning, 45:5-32 (2001);及びhttp://stat-www.berkeley.edu/users/breiman/RandomForests/cc_home.htmを参照。

【0404】

分類及び回帰ツリーは、古典的回帰モデルにフィッティングすることに対するコンピュータを駆使した代替案を提示し、典型的には、1個以上の予測因子に基づく対象となるカテゴリカル又は連続的応答のために考えられる最良のモデルを決定するために使用される。分類及び回帰ツリー分析は、例えば、Salford Systemsから入手可能なCARTソフトウェア又はStatSoft, Inc. (Tulsa, OK)から入手可能なStatisticaデータ分析ソフトウエ

アを使用して実施することができる。分類及び回帰ツリーの説明は、例えば、Breiman et al. “Classification and Regression Trees,” Chapman and Hall, New York (1984); 及びSteinberg et al., “CART: Tree-Structured Non-Parametric Data Analysis,” Salford Systems, San Diego, (1995)に見出される。

【0405】

ニューラルネットワークは、計算に対する接続リストアプローチに基づく情報処理のための数学又は計算モデルを使用する、相互結合している人工ニューロン群である。典型的には、ニューラルネットワークは、このネットワークを流れる外部又は内部情報に基づき、これらの構造を変化させる適応型システムである。ニューラルネットワークの具体的な例は、フィードフォワードニューラルネットワーク、例えば、パーセプトロン、単層パーセプトロン、多層パーセプトロン、バックプロパゲーションネットワーク、ADALINEネットワーク、MADALINEネットワーク、ランマトリクスネットワーク(Learnmatrix networks)、放射基底関数(RBF)ネットワーク及び自己組織化マップ又はコホネン自己組織化ネットワーク;リカレントニューラルネットワーク、例えば、単純リカレントネットワーク及びホップフィールド・ネットワーク;確率的ニューラルネットワーク、例えば、ボルツマンマシン;モジュール型ニューラルネットワーク、例えば、コミッティマシン及び関連ニューラルネットワーク;並びにその他のタイプのネットワーク、例えば、即座に訓練されたニューラルネットワーク、スパイクニューラルネットワーク、動的ニューラルネットワーク及びカスケディングニューラルネットワークを含む。ニューラルネットワーク分析は、例えば、StatSoft, Inc.から入手可能なStatisticaデータ分析ソフトウェアを使用して実施することができる。ニューラルネットワークの説明については、例えば、Freeman et al., In “Neural Networks: Algorithms, Applications and Programming Techniques,” Addison-Wesley Publishing Company (1991); Zadeh, Information and Control, 8:338-353 (1965); Zadeh, “IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics,” 3:28-44 (1973); Gersho et al., In “Vector Quantization and Signal Compression,” Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London (1992);及びHassoun, “Fundamentals of Artificial Neural Networks,” MIT Press, Cambridge, Massachusetts, London(1995)を参照。

【0406】

サポートベクターマシンは、分類及び回帰に使用される一連の関連する教師付き学習技術であり、例えば、Cristianini et al., “An Introduction to Support Vector Machines and Other Kernel-Based Learning Methods,” Cambridge University Press (2000)に記載されている。サポートベクターマシン分析は、例えば、Thorsten Joachims (Cornell University)によって開発されたSVM¹ソフトウェア又はChih-Chung Chang及びChih-Jen Lin (National Taiwan University)によって開発されたLIBSVMソフトウェアを使用して実施することができる。

【0407】

本明細書に記載の学習統計的分類子システムは、健常個体、IBS患者、IBD患者及び/又はセリアック病患者からの試料のコホート(例えば、血清試料)を使用してトレーニング及び試験することができる。例えば、生検、大腸内視鏡検査又は例えば、米国特許第6,218,129号に記載の免疫アッセイを使用して、医師、好ましくは胃腸科専門医によってIBDを保有していると診断された患者からの試料は、本発明の学習統計的分類子システムのトレーニング及び試験における使用に好適である。IBDと診断された患者からの試料も、例えば、米国特許第5,750,355号及び同第5,830,675号に記載の免疫アッセイを使用して、クローン病又は潰瘍性大腸炎に階層化することができる。公表された基準、例えば、マニング、ローマI、ローマII又はローマIII診断基準を使用してIBSと診断された患者からの試料は、本発明の学習統計的分類子システムのトレーニング及び試験における使用に好適である。健常個体からの試料は、IBD及び/又はIBS試料として同定されなかったものを含むことができる。当業者は、本発明の学習統計的分類子システムのトレーニング及び試験において使用することができる患者試料のコホートを得るための

追加の技術及び診断基準について理解する。

【0408】

本明細書において使用される「感度」という用語は、本発明の診断方法、システム又はコードが、試料が陽性である（例えば、IBSを有する）場合に陽性結果を出す確率を指す。感度は、真陽性の結果の数を真陽性及び偽陰性の合計によって割ったものとして計算される。感度は、本質的には、本発明の方法、システム又はコードがいかに正しくIBSを有するものを、疾患を有しないものから区別するかの尺度である。統計的アルゴリズムは、IBSを分類する感度が少なくとも約60%であり、例えば、少なくとも約65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%であり得るように選択することができる。好ましい実施態様において、IBSを分類する感度は、学習統計的分類子システムの組合せが使用される場合（全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例10を参照）には少なくとも約90%であり、又は単一の学習統計的分類子システムが使用される場合（全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例11を参照）には少なくとも約85%である。

10

【0409】

「特異度」という用語は、本発明の診断方法、システム又はコードが、試料が陽性ではない（例えばIBSを有しない）場合に陰性結果を出す確率を指す。特異度は、真陰性の結果の数を真陰性及び偽陽性の合計によって割ったものとして計算される。特異度は、本質的には、本発明の方法、システム又はコードがいかに正しくIBSを有しないものを、疾患を有するものから排除するかの尺度である。統計的アルゴリズムは、IBSを分類する特異度が少なくとも約70%であり、例えば、少なくとも約75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%であるように選択することができる。好ましい実施態様において、IBSを分類する特異度は、学習統計的分類子システムの組合せが使用される場合（全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例10を参照）には少なくとも約86%であり、又は単一の学習統計的分類子システムが使用される場合（全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例11を参照）には少なくとも約84%である。

20

30

【0410】

本明細書において使用される「陰性適中率」又は「NPV」という用語は、IBSを有しないと同定された個体が実際に疾患を有しない確率を指す。陰性適中率は、真陰性の数を真陰性及び偽陰性の合計によって割ったものとして計算することができる。陰性適中率は、診断方法、システム又はコードの特徴及び分析された母集団における疾患の有病率によって決定される。統計的アルゴリズムは、疾患の有病率を有する母集団における陰性適中率が、約70%～約99%の範囲内にあり、例えば、少なくとも約70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%であり得るように選択することができる。好ましい実施態様においては、IBSを分類する陰性適中率は、学習統計的分類子システムの組合せが使用される場合（全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例10を参照）には、少なくとも約87%である。

40

【0411】

「陽性適中率」又は「PPV」という用語は、IBSを有すると同定された個体が実際に疾患を有する確率を指す。陽性適中率は、真陽性の数を真陽性及び偽陽性の合計によって割ったものとして計算することができる。陽性適中率は、診断方法、システム又はコー

50

ドの特徴及び分析された母集団における疾患の有病率によって決定される。統計的アルゴリズムは、疾患の有病率を持つ母集団における陽性適中率が、約80%～約99%の範囲内にあり、例えば、少なくとも約80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%であり得るように選択することができる。好ましい実施態様において、IBSを分類する陽性適中率は、学習統計的分類子システムの組合せが使用される場合（全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例10を参照）には、少なくとも約90%である。

【0412】

予測値は、陰性及び陽性適中率を含み、分析される母集団における疾患の有病率に影響される。本発明の方法、システム又はコードにおいて、統計的アルゴリズムは、特定のIBS保有率を有する臨床母集団のための望ましい臨床パラメータを生成するように選択することができる。例えば、学習統計的分類子システムは、例えば、診療所、例えば、胃腸科専門医の診療所又は一般開業医の診療所において認められ得る、約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%又は70%までのIBS有病率に対して選択することができる。

【0413】

本明細書において使用される「全体一致」又は「全体精度」という用語は、本発明の方法、システム又はコードが疾患状態を分類する精度を指す。全体精度は、真陽性及び真陰性の合計を試料結果の総数によって割ったものとして計算され、分析される母集団における疾患の有病率によって影響を受ける。例えば、統計的アルゴリズムは、疾患有病率を有する患者の母集団における全体精度が少なくとも約60%であり、例えば、少なくとも約65%、70%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%であり得るように選択することができる。好ましい実施態様において、IBSを分類する全体精度は、学習統計的分類子システムの組合せが使用される場合（全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例10を参照）には、少なくとも約80%である。

【0414】

N. 疾患分類システム

図13は、本発明の1つの実施態様に従った疾患分類システム(DCS)(200)を説明する。図に示されるとおり、DCSは、DCS知能モジュール(205)、例えば、プロセッサ(215)及び記憶モジュール(210)を有するコンピュータを含む。知能モジュールは、1種以上の直接接続(例えば、USB、Firewire又は他のインターフェース)及び1種以上のネットワーク接続(例えば、モデム又は他のネットワークインターフェースデバイスを含む)を通して情報を伝達及び受信するためのコミュニケーションモジュール(図示せず)も含む。記憶モジュールは、内部記憶デバイス及び1個以上の外部記憶デバイスを含むことができる。知能モジュールは、ディスプレイモジュール(225)、例えば、モニタ又はプリンタも含む。1つの観点において、知能モジュールは、データ、例えば、データ収集モジュール、例えば、試験システム(250)からの患者試験結果を、直接接続を介するか又はネットワーク(240)上のいずれかで受信する。例えば、試験システムは、1個以上の患者試料(255)に対し多重分析検定を実行し、試験結果を知能モジュールに自動的に提供するように配列されることがある。データは、ユーザによる直接入力を通じて知能モジュールに提供することができるか、あるいは、携帯用媒体、例えば、コンパクトディスク(CD)又はデジタル多用途ディスク(DVD)からダウンロードすることができる。試験システムは、知能モジュールと直接的に連結させて知能モジュールと統合することができるか、又はネットワーク上で知能モジュールと遠隔的に連結することができる。知能モジュールは、周知のネットワーク上で1個以上の

クライアントシステム(230)とデータを通信することもできる。例えば、要求している医師及び健康管理提供者は、クライアントシステム(230)を使用して、研究室又は病院に常駐させることができる知能モジュールから報告を取得及び閲覧することができる。

【0415】

ネットワークは、LAN(ローカルエリアネットワーク)、WAN(ワイドエリアネットワーク)、無線ネットワーク、2地点間ネットワーク、スター型ネットワーク、トークンリングネットワーク、ハブネットワーク又はその他の構成であることができる。現在使用されている最も一般的なタイプのネットワークは、TCP/IP(伝送制御プロトコル/インターネットプロトコル)ネットワーク、例えば、大文字の「I」を用いて「インターネット(Internet)」と称されることが多いネットワークのグローバルインターネットワークであり、本明細書の実施例の多くにおいて使用されるものの、TCP/IPは現在好ましいプロトコルではあるが、本発明が使用することができるネットワークは、これに限定されないと理解すべきである。

10

【0416】

米国特許出願公開第2008/0085524号からの、図2に示したシステムにおけるいくつかの要素は、本明細書において詳細に説明する必要がない慣用で周知の要素を含むことができる。例えば、知能モジュールは、デスクトップ型パーソナルコンピュータ、ワークステーション、大型汎用コンピュータ、ノート型コンピュータなどとして実装することができる。各クライアントシステムは、デスクトップ型パーソナルコンピュータ、ワークステーション、ノート型コンピュータ、PDA、携帯電話又は任意のWAP可能なデバイスあるいはインターネット又は他のネットワーク接続に直接又は間接的に接続可能な任意の他のコンピュータデバイスを含むことができる。クライアントシステムは、典型的には、HTTPクライアント、例えば、閲覧プログラム、例えば、MicrosoftのInternet Explorer(商品名)ブラウザ、Netscape's Navigator(商品名)ブラウザ、Operaブラウザ又は携帯電話、PDA若しくは他のワイヤレスデバイスの場合にはWAP可能なブラウザなどを実行し、クライアントシステムのユーザがネットワーク上で知能モジュールから利用可能な情報及びページにアクセスし、処理し、閲覧することを可能にする。各クライアントシステムは、典型的には、1個以上のユーザインターフェースデバイス、例えば、知能モジュールによって提供されるページ、フォーム及び他の情報とともにディスプレイ(例えば、モニタスクリーン、LCDディスプレイなど)(235)にブラウザによって提供されるグラフィカルユーザインターフェース(GUI)と相互作用するために、キーボード、マウス、タッチスクリーン、ペンなども含む。上記のとおり、本発明は、ネットワークの特定のグローバルインターネットワークを指す、インターネットとともに使用することに好適である。しかしながら、他のネットワーク、例えば、イントラネット、エクストラネット、仮想プライベートネットワーク(VPN)、非TCP/IPベースネットワーク、任意のLAN又はWANなどをインターネットの代わりに使用することができることと理解すべきである。

20

30

【0417】

1つの実施態様によれば、各クライアントシステム及びこの構成要素の全ては、アプリケーション、例えば、中央処理装置、例えば、Intel(商標)Pentium(商標)プロセッサなどを使用するコンピュータコードの実行を含むブラウザを使用してオペレータによる設定が可能である。同様に、知能モジュール及びこの構成要素の全ては、中央処理装置(215)、例えば、Intel Pentiumプロセッサなど又は複数のプロセッサユニットを使用するコンピュータコードの実行を含む(1種以上の)アプリケーションを使用してオペレータにより設定可能であり得る。本明細書に記載の、知能モジュールを操作及び設定してデータ及び試験結果を処理するためのコンピュータコードは、好ましくは、ハードディスク上にダウンロード及び保存されるが、全体のプログラムコード又はこの一部は、任意の他の揮発性若しくは不揮発性記憶媒体又は周知の装置、例えば、ROM若しくはRAMに保存されてもよく、又はプログラムコードを保存することができ

40

50

る任意の他のコンピュータ読取可能媒体(260)、例えば、コンパクトディスク(CD)媒体、デジタル多用途ディスク(DVD)媒体、フロッピーディスク、ROM、RAMなどに提供されてもよい。

【0418】

本発明の種々の観点及び実施態様を実装するためのコンピュータコードは、コンピュータシステム、例えば、C、C++、C#、HTML、Java、JavaScriptなど又は任意の他のスクリプト言語、例えば、VBScript上で実行可能な任意のプログラミング言語において実装することができる。更に、プログラムコード全体又はこの一部は、搬送波信号として具体化することができ、この信号は、周知の任意の通信媒体又はプロトコル(例えば、TCP/IP、HTTP、HTTPS、Ethernetなど)を使用して、インターネット上で、又は周知の任意の他の慣用的なネットワーク接続(例えば、エクストラネット、VPN、LANなど)上でソフトウェア源(例えば、サーバ)から伝達及びダウンロードすることができる。

10

【0419】

1つの実施態様によれば、知能モジュールは、患者の試験結果及び/又は質問票の回答を分析するための疾患分類処理を実装して患者試料がIBSと関連するか否かを決定する。データは、メモリ(210)内の1個以上のデータ表又は他の論理データ構造あるいは知能モジュールと接続された別個の記憶装置又はデータベースシステムに保存することができる。1種以上の統計処理が、典型的には、特定の患者についての試験データを含むデータセットに適用される。例えば、試験データは、患者からの試料中の少なくとも1種のマーカーの存在又はレベルを示すデータを含む診断マーカープロファイルを含むことができる。試験データは、患者が患っている又は最近患っていたIBSと関連する、少なくとも1種の症状の存在又は重症度を示すデータを含む症状プロファイルを含むこともできる。1つの観点において、統計処理は、診断マーカープロファイル及び/又は症状プロファイルに基づき患者試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する統計的に導出される判定を生成する。別の観点において、第1の統計処理は、診断マーカープロファイル及び/又は症状プロファイルに基づき患者試料をIBD試料又は非IBD試料として分類する第1の統計的に導出される判定を生成する。患者試料が非IBD試料として分類された場合、第2の統計処理が同一又は異なるデータセットに適用されて非IBD試料をIBS試料又は非IBS試料として分類する第2の統計的に導出される判定が生成される。第1及び/又は第2の統計的に導出される判定は、知能モジュールに付随又は接続されたディスプレイ装置に表示されてもよく、又は(1個以上の)判定は別個のシステム、例えばクライアントシステム(230)に提供及び表示することができる。表示された結果によって、医師が妥当な診断又は予後を下すことが可能になる。

20

30

【0420】

0. 治療及び治療モニタリング

個体からの試料がIBS試料として分類されると、本発明の方法、システム及びコードは、IBSと関連する1種以上の症状の治療に有用な薬物(すなわち、IBS薬)の治療有効量をこの個体に投与することを更に含むことができる。治療用途のため、IBS薬は、単独で投与することができるか、あるいは、1種以上の追加のIBS薬及び/若しくはIBS薬と関連する副作用を軽減する1種以上の薬物と組み合わせて同時投与することができる。

40

【0421】

IBS薬は、必要に応じて好適な医薬賦形剤とともに投与することができ、許容された投与方式のいずれかによって実施することができる。従って、投与は、例えば、静脈内、局所、皮下、経皮的、経皮、筋肉内、経口、頬、舌下、歯肉、口蓋、関節内、非経口、動脈内、皮内、脳室内、頭蓋内、腹腔内、病巣内、鼻内、直腸、腔内又は吸入であることができる。「同時投与」は、IBS薬が、第2薬物(例えば、別のIBS薬、IBS薬の副作用の軽減に有用な薬物など)の投与と同時に、この投与直前に、又はこの投与直後に投与されることを意味する。

50

【0422】

I B S 薬の治療有効量は、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8回以上繰り返し投与することができるか、又は用量を連続注入によって投与することができる。用量は、固体、半固体、凍結乾燥粉末又は液体投薬形態、例えば、錠剤、丸剤、ペレット剤、カプセル剤、散剤、液剤、懸濁液剤、乳剤、坐剤、持続性浣腸剤、クリーム剤、軟膏剤、ローション剤、ゲル剤、エアロゾル剤、フォーム剤などの形態を取ることができ、好ましくは、正確な投与量の簡単な投与に好適な単位投薬形態のものである。

【0423】

本明細書において使用される「単位投薬形態」は、ヒト対象及び他の哺乳動物に対する単一の投与量として好適な物理的に分離した単位を指し、各単位は、所望の発現、忍容性及び/又は治療効果を生成するように計算された、I B S 薬の所定量を、好適な医薬賦形剤とともに含有する(例えば、アンプル)。更に、より濃縮された投薬形態を調製することができ、次いでこれからより希釈された単位投薬形態を生成することができる。従って、より濃縮された投薬形態は、実質的には、例えば、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10倍以上の量のI B S 薬を含有する。

10

【0424】

このような投薬形態の調製方法は、当業者に公知である(例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18TH ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)を参照)。投薬形態は、典型的には、慣用の医薬担体又は賦形剤を含み、他の医薬剤、担体、助剤、希釈剤、組織透過促進剤、可溶化剤などを更に含むことができる。適切な賦形剤は、当分野において周知の方法によって、特定の投薬形態及び投与経路に応じて個々に調整することができる(例えば、REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES、前掲を参照)。

20

【0425】

好適な賦形剤の例は、以下に限定されるものではないが、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギン酸塩、トラガカント、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、生理食塩水、シロップ、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びポリアクリル酸、例えば、Carbopol、例えば、Carbopol 941、Carbopol 980、Carbopol 981などを含む。投薬形態は、滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸マグネシウム及び鉱油；湿潤剤；乳化剤；懸濁化剤；保存剤、例えば、メチル-、エチル-及びプロピル-ヒドロキシ-ベンゾエート(すなわち、パラベン)；pH調整剤、例えば、無機及び有機酸及び塩基；甘味剤；並びに香味剤を更に含むことができる。投薬形態は、生分解性ポリマービーズ、デキストラン及びシクロデキストリン包接錯体を含むこともできる。

30

【0426】

経口投与のため、治療有効用量は、錠剤、カプセル剤、乳剤、懸濁液剤、液剤、シロップ剤、噴霧剤、トローチ剤、散剤及び徐放性剤形の形態であることができる。経口投与に好適な賦形剤は、医薬グレードのマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、滑石、セルロース、グルコース、ゼラチン、スクロース、炭酸マグネシウムなどを含む。

40

【0427】

一部の実施態様において、治療有効用量は、丸剤、錠剤又はカプセル剤の形態を取り、従って、投薬形態は、I B S 薬とともに、以下のいずれか：希釈剤、例えば、ラクトース、スクロース、第二リン酸カルシウムなど；崩壊剤、例えば、デンプン又はこの誘導体；滑剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムなど；及び結合剤、例えば、デンプン、アカシアゴム、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、セルロース及びこれらの誘導体を含有することができる。I B S 薬は、例えば、ポリエチレングリコール(PEG)担体中に配置される坐剤に配合することもできる。

【0428】

液体投薬形態は、例えば、経口、局所又は静脈内投与のための液剤又は懸濁液剤を形成

50

するため、担体、例えば、生理食塩水（例えば、0.9 w/v % 塩化ナトリウム）、水性デキストロース、グリセロール、エタノールなどの中で、IBS薬及び場合により1種以上の医薬的に許容される助剤を溶解又は分散させることによって調製することができる。IBS薬は、持続性浣腸剤に配合することもできる。

【0429】

局所投与のため、治療有効用量は、乳剤、ローション剤、ゲル剤、フォーム剤、クリーム剤、ゼリー剤、液剤、懸濁液剤、軟膏剤及び経皮貼付剤の形態であることができる。吸入による投与のため、IBS薬は、乾燥粉末として又はネブライザを介して液体形態で送達することができる。非経口投与のため、治療有効用量は、滅菌注射液剤及び滅菌包装粉末の形態であることができる。好ましくは、注射液剤は、約4.5～約7.5のpHにおいて配合される。

10

【0430】

治療有効用量は、凍結乾燥形態で提供することもできる。このような投薬形態は、投与前の再構成のために緩衝液、例えば、重炭酸塩を含むことができる、あるいは、緩衝液は、例えば、水により再構成するために凍結乾燥投薬形態中に含めることができる。凍結乾燥投薬形態は、好適な血管収縮剤、例えば、エピネフリンを更に含むことができる。凍結乾燥投薬形態は、シリンジ中で提供することができ、場合により、再構成された投薬形態を個体に直ちに投与することができるように、再構成のための緩衝液と組み合わせて包装することができる。

【0431】

IBS治療のための治療的使用において、IBS薬は、一日あたり約0.001 mg/kg～約1000 mg/kgの初回投与量において投与することができる。約0.01 mg/kg～約500 mg/kg、約0.1 mg/kg～約200 mg/kg、約1 mg/kg～約100 mg/kg又は約10 mg/kg～約50 mg/kgの1日用量の範囲を使用することができる。しかしながら、投与量は、個体の要求、IBS症状の重症度及び用いられるIBS薬に応じて変えることができる。例えば、投与量は、本明細書に記載の方法に従ってIBSであるとして分類された個体におけるIBS症状の重症度を考慮して経験的に決定することができる。個体に投与される用量は、本発明に関して、経時的に個体における有益な治療応答に影響を及ぼすのに十分であることが好ましい。用量のサイズは、個体における特定のIBS薬の投与に伴う任意の不利益な副作用の存在、性質及び程度によって決定することもできる。特定の状況に対する適切な投与量の決定は、医師の技能の範囲内である。一般に、治療は、IBS薬の最適な用量よりも少ない投与量で開始される。その後、投与量は、状況下における最適な効果に達するまで少しずつ増加される。便宜上、所望により、総1日投与量は、その日の間で分割し、分けて投与することができる。

20

30

【0432】

本明細書において使用される「IBS薬」という用語は、IBSと関連する1種以上の症状の治療に有用な薬物の全ての医薬的に許容される形態を含む。例えば、IBS薬は、ラセミ体又は異性体の混合物、イオン交換樹脂に結合した固体複合体などであることができる。更に、IBS薬は溶媒和形態であることができる。「IBS薬」という用語は、記載されているIBS薬の全ての医薬的に許容される塩、誘導体及びアナログ並びにこれらの組合せも含むものとする。例えば、IBS薬の医薬的に許容される塩は、以下に限定されるものではないが、IBS薬の酒石酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、酒石酸水素塩、二塩酸塩、サリチル酸塩、ヘミコハク酸塩、クエン酸塩、マレイン酸塩、塩酸塩、カルバミン酸塩、硫酸塩、硝酸塩及び安息香酸塩の形態並びにこれらの組合せなどを含む。IBS薬の任意の形態、例えばIBS薬の医薬的に許容される塩、IBS薬の遊離塩基又はこれらの混合物は、本発明の方法における使用に好適である。

40

【0433】

IBSと関連する1種以上の症状の治療に有用な好適な薬物は、以下に限定されるものではないが、セロトニン作動薬、抗うつ剤、クロライドチャンネル活性化因子、クロライド

50

チャンネル遮断薬、グアニル酸シクラーゼアゴニスト、抗生物質、オピオイド、ニューロキニンアンタゴニスト、抗痙攣あるいは抗コリン作動薬、ベラドンナアルカロイド、バルピツレート、グルカゴン様ペプチド1 (GLP-1) アナログ、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) アンタゴニスト、プロバイオティクス、これらの遊離塩基、これらの医薬的に許容される塩、これらの誘導体、これらのアナログ及びこれらの組合せを含む。その他のIBS薬は、増量剤、ドーパミンアンタゴニスト、駆風剤、トランキライザー、デクストフィソパム、フェニトイン、チモロール及びジルチアゼムを含む。

【0434】

セロトニン作動薬は、IBS症状、例えば、便秘、下痢及び/又は交互に発症する下痢及び便秘の治療に有用である。セロトニン作動薬の非限定的な例は、Cash et al., *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 22:1047-1060 (2005)に記載されており、5-HT₃受容体アゴニスト (例えば、MKC-733など)、5-HT₄受容体アゴニスト (例えば、テガセロド (Zelnorm (商品名))、プルカロプリド、AG1-001など)、5-HT₃受容体アンタゴニスト (例えば、アロセトロン (Lotronex (商標))、シランセトロン、オンダンセトロン、グラニセトロン、ドラセトロン、ラモセトロン、パロノセトロン、E-3620、DDP-225、DDP-733など)、5-HT₃受容体アンタゴニスト/5-HT₄受容体アゴニストの混合物 (例えば、シサプリド、モサプリド、レンザプリドなど)、これらの遊離塩基、これらの医薬的に許容される塩、これらの誘導体、これらのアナログ及びこれらの組合せを含む。更に、神経又はグリア細胞シグナリングに影響を及ぼすことによって腸透過性を調節するアミノ酸、例えば、グルタミン及びグルタミン酸を、IBS患者を治療するために投与することができる。

10

20

【0435】

抗うつ剤、例えば、選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) 又は三環系抗うつ剤は、IBS症状、例えば、腹痛、便秘及び/又は下痢の治療に特に有用である。SSRI抗うつ剤の非限定的な例は、シタロプラム、フルボキサミン、パロキセチン、フルオキセチン、セルトラリン、これらの遊離塩基、これらの医薬的に許容される塩、これらの誘導体、これらのアナログ及びこれらの組合せを含む。三環系抗うつ剤の例は、以下に限定されるものではないが、デシプラミン、ノルトリプチリン、プロトリプチリン、アミトリプチリン、クロミプラミン、ドキセピン、イミプラミン、トリミプラミン、マプロチリン、アモキサピン、クロミプラミン、これらの遊離塩基、これらの医薬的に許容される塩、これらの誘導体、これらのアナログ及びこれらの組合せを含む。

30

40

【0436】

クロライドチャンネル活性化因子は、IBS症状、例えば、便秘の治療に有用である。クロライドチャンネル活性化因子の非限定的な例は、ルビプロストン (Amitiza (商品名))、この遊離塩基、この医薬的に許容される塩、この誘導体又はこのアナログである。更に、クロフェレマーなどのクロライドチャンネル遮断薬は、IBS症状、例えば、下痢の治療に有用である。グアニル酸シクラーゼアゴニスト、例えば、MD-1100は、IBSと関連する便秘の治療に有用である (例えば、Bryant et al., *Gastroenterol.*, 128:A-257 (2005)を参照)。抗生物質、例えば、ネオマイシンも、IBSと関連する便秘の治療における使用に好適であり得る (例えば、Park et al., *Gastroenterol.*, 128:A-258 (2005)を参照)。非吸収性抗生物質、例えば、リファキシミン (Xifaxan (商品名)) は、IBSと関連する小腸の細菌過剰成長及び/又は便秘を治療するために好適である (例えば、Sharara et al., *Am. J. Gastroenterol.*, 101:326-333 (2006)を参照)。

【0437】

オピオイド、例えば、カップオピオイド (例えば、アシマドリン) は、IBSと関連する疼痛及び/又は便秘を治療するのに有用であり得る。ニューロキニン (NK) アンタゴニスト、例えば、タルネタント、サレデュータント並びに他のNK₂及び/又はNK₃アンタゴニストは、IBS症状、例えば、結腸中の筋肉の過敏性、便秘及び/又は下痢を治療するのに有用であり得る。抗痙攣又は抗コリン作動薬、例えば、ジサイクロミンは、I

50

B S 症状、例えば、腸及び膀胱の筋肉における痙攣を治療するために有用であり得る。その他の抗痙攣又は抗コリン作動薬、例えば、ベラドンナルカロイド（例えば、アトロピン、スコポラミン、ヒヨスチアミンなど）は、I B S に関連する腸痙攣を軽減するためにバルビツレート、例えば、フェノバルビタールと組み合わせて使用することができる。G L P - 1 アナログ、例えば、G T P - 0 1 0 は、I B S 症状、例えば、便秘を治療するために有用であり得る。C R F アンタゴニスト、例えば、アストレシン及びプロバイオティクス、例えば、V S L # 3（商標）は、1 種以上の I B S 症状を治療するために有用であり得る。当業者は、現在使用されている又は開発中の I B S と関連する 1 種以上の症状を治療するために好適な追加の I B S 薬について理解する。

【0438】

個体からの試料が I B S 試料として分類されたら、個体を定期的な間隔でモニタリングしてある治療レジメンの効力を評価することもできる。例えば、あるマーカーのレベルは、治療、例えば、薬物の治療効果に基づき変化する。患者は、個別的アプローチにおいて応答を評価し、ある薬物又は治療の効果を理解するためにモニタリングされる。更に、患者は薬物に応答しないことがあるが、マーカーは変化し得、このことは、患者が、これらのマーカーレベルによって同定することができる特別な集団（非応答性）に属することを示唆する。これらの患者は、患者の現在の治療及び処方された代替の治療を中止することができる。

【0439】

I V . 実施例

以下の実施例は説明のために提供するものであり、特許請求される発明を限定するものではない。

【0440】

2007年8月14日に出願された米国特許出願公開第2008/0085524号からの実施例は、全ての目的のために参照により全体として本明細書に組み込まれる。

【0441】

実施例 1 . I B S を予測するためのトリプターゼ E L I S A

本実施例は、肥胖細胞 - トリプターゼの存在又はレベルを検出するための高感度 E L I S A を説明する。なお、図 1 ~ 7 を参照のこと。

【0442】

背景：肥胖細胞は、過敏性腸症候群（I B S）の病因において重要な役割を担う。遠位腸セグメント内での肥胖細胞浸潤及び活性化の増加は、I B S の症状の発症及び重症度に関連する。肥胖細胞は、I B S 患者における粘膜刺激に対する内臓求心性神経の応答の上昇に関与している。肥胖細胞マーカーの計測は、I B S の臨床診断において重要な意味を有し得る。しかしながら、この試みは、高感度アッセイの欠如に起因して遅れていた。

【0443】

方法：本明細書において、本発明者らは、ヒト血清試料中のトリプターゼレベルを計測するための高感度両面 E L I S A アッセイ（検出限界 0.019 ng/mL ）の開発及び検証を報告する。このアッセイは正確であり、堅牢であり、再現性を示す。健常対照及び I B S 患者における血清トリプターゼ濃度を、このアッセイを使用して計測した。

【0444】

結果：健常対照における平均血清トリプターゼレベルは、 $9.32 \pm 2.1 \text{ ng/mL}$ （ $n = 156$ ）であった。I B S - D 及び I B S - A 患者は、顕著に高い血清トリプターゼ濃度を示す（I B S - D について 12.71 ng/mL （ $n = 209$ ）、I B S - A について 11.94 ng/mL （ $n = 57$ ）、 $p < 0.01$ ）；一方、I B S - C についての平均トリプターゼレベルは、 9.34 ng/mL （ $n = 118$ ）であり、I B S - C についての健常対照との顕著な差はない。

【0445】

結論：これは、I B S - D 及び I B S - A 患者と I B S - C 患者及び健常対照とを区別するこれまでのところ開発された最初のバイオマーカーである。血清トリプターゼレベル

10

20

30

40

50

を他の Prometheus IBS バイオマーカーと組み合わせることによって、本発明者らは、IBS-D 及び IBS-A 患者の診断の精度を改善することができた。

【0446】

捕捉抗体としてのウサギ抗トリプターゼ及び検出抗体としてのアルカリホスファターゼにコンジュゲートされた G3 を使用して血清肥満細胞 - トリプターゼのレベルを決定するための ELISA アッセイを開発した。発光基質 CPSD (ジナトリウム 3 - (4 - メトキシスピロ { 1 , 2 - ジオキセタン - 3 , 2' - (5' - クロロ) トリシクロ [3 . 3 . 1 . 13 , 7] デカン } - 4 - イル) フェニルホスフェート) を使用して、アッセイ感度を向上させた。5% BSA 及び 10% 正常ヒト血清を有する緩衝液中で - トリプターゼについて 1 ~ 1000 ng / mL の標準範囲にわたり線形用量応答曲線が観察された。このアッセイの下限は、0.019 ng / mL であり、イントラアッセイ及びインターアッセイ変動係数は、1 ng / mL 及び 1000 ng / mL のトリプターゼ濃度において 15% 未満であった。血清に添加された既知量の精製トリプターゼの回収率は、88% であった。健常対照、IBS-C 及び IBS-D 患者からのトリプターゼの血清レベルを試験するため、免疫アッセイを利用した。健常対照における平均血清トリプターゼレベルは、 7.0 ± 2.1 ng / mL ($n = 113$) であった。IBS-C 及び IBS-D における平均トリプターゼレベルは、それぞれ 9.6 ng / mL ($n = 116$) 及び 12.7 ($n = 209$) であった。 11.4 ng / mL (平均 + 2SD) のカットオフ値を使用すると、GI 健常対照についてのアッセイ特異度は 82% ($n = 156$) であり、IBS-C 及び IBS-D についてのアッセイ感度は、それぞれ 21.5% 及び 24.9% であった。患者の症状及び IBS についての他のマーカーと血清トリプターゼレベルとを組み合わせることは、IBS-D と他のタイプの過敏性腸症候群を区別するのに役立つ。

10

20

【0447】

実施例 2 . IBS における血清トリプターゼレベルの診断有用性の評価

背景：肥満細胞は、過敏性腸症候群 (IBS) の発病において重要な役割を担う。遠位腸セグメント内での肥満細胞浸潤及び活性化の増加は、IBS の症状の発症及び重症度に関連する。肥満細胞は、IBS 患者における粘膜刺激に対する内臓求心性神経の応答の上昇に関与している。肥満細胞マーカーの計測は、IBS の臨床診断において重要な意味を有し得る。しかしながら、この試みは、高感度アッセイの欠如に起因して遅れていた。

【0448】

方法：本明細書において、本発明者らは、ヒト血清試料中のトリプターゼレベルを計測するための高感度 2 部位 ELISA アッセイ (検出限界 0.019 ng / mL) の開発及び検証を報告する。このアッセイは正確であり、堅牢であり、再現性を示す。健常対照及び IBS 患者における血清トリプターゼ濃度を、このアッセイを使用して計測した。

30

【0449】

結果：健常対照における平均血清トリプターゼレベルは、 7.1 ± 2.5 ng / mL であった。IBS-D 及び IBS-A 患者は、健常対照対象よりも高い血清トリプターゼ濃度を示す (IBS-D について 10.3 ± 8.7 ng / mL、IBS-A について 12.1 ± 10.7 ng / mL)、一方、IBS-C についての平均トリプターゼレベルは、 9.6 ± 9.4 ng / mL であった。IBS-C 群と IBS-D 群との血清トリプターゼレベルの統計的差異が存在した ($p < 0.01$)。

40

【0450】

結論：血清トリプターゼ濃度は、IBS-D 患者と IBS-C 患者とを区別するこれまでのところ開発された最初のバイオマーカーである。血清トリプターゼレベルを他の IBS バイオマーカーと組み合わせて IBS の診断の精度を改善することができる。

【0451】

図 8 は、本明細書に記載のトリプターゼ ELISA におけるヒトトリプターゼの用量依存性応答を示す。プロトコル：96 ウェルマイクロタイタ - プレートを、炭酸ナトリウム (pH 9.6) 中 100 mL の 2 mg / mL 抗ヒトトリプターゼ抗体によって 4 において一晩コーティングした。PBST によって洗浄した後、プレートを 300 mL / ウェル

50

のブロッキング/アッセイ緩衝液 (PBS 中 5% BSA) と、室温 (RT) において 30 分間穏やかに攪拌しながらインキュベートした。洗浄後、100 mL / ウェルの段階希釈 (アッセイ緩衝液中 1 : 8) したヒトリプターゼをプレートに添加した。RT において更に 2 時間インキュベートした後、プレートを洗浄し、次いでアッセイ緩衝液中で最適に希釈した 100 mL の AP にコンジュゲートされた抗ヒトリプターゼとインキュベートした。プレートを穏やかに攪拌しながら 2 時間インキュベートし、次いで洗浄した。100 mL の Tropix CSPD 基質を各ウェルに添加し、暗所で 30 分間インキュベートしてから、発光プレートリーダーによって発光を読み取った。相対発光単位 (RLU) 及びトリプターゼ濃度を Prism Graphpad Program によってプロットした。トリプターゼ検出範囲 = 0.019 - 5000 ng/mL。EC50 = 65 ng/mL。回収率は、正常プール血清中にスパイクされた 20 ng について 81.5% であった。

【0452】

図 9 は、本明細書に記載のトリプターゼ ELISA の最適化を示す。図 10 は、健常対照 (n = 139) 及び IBS の対象 (n = 378) からの血清中のトリプターゼレベルを示す。トリプターゼレベルを、アッセイ緩衝液によって 10 倍希釈した血清試料中で ELISA によって計測した。IBS 患者も、このサブタイプ: IBS-D (n = 206): 下痢優勢型; IBS-C (n = 116): 便秘優勢型; IBS-A (n = 56): 交互症状; に従って示す。各値は、二重決定の平均である。実線は、各群からの中央値である。12 ng/mL のカットオフ値は、中央プラス 2SD を有する健常対象から計算した (点線)。健常対象に対して * p < 0.0001; IBS-D に対して ** p < 0.0001; マン・ホイットニー U 検定。表 2 は、IBS サブタイプ及び健常対象におけるトリプターゼレベルの概要を提供する (カットオフ = 12.0 ng/mL)。

【表 2】

IBS サブタイプ及び健常対象におけるトリプターゼレベル (ng/mL)
(カットオフ = 12.0 ng/mL)

| | 健常対照 | IBS | IBS-D | IBS-C | IBS-A |
|------------|------|------|-------|-------|-------|
| 対象 (n) | 139 | 381 | 209 | 116 | 56 |
| 平均 (ng/mL) | 7.1 | 10.3 | 10.3 | 9.6 | 12.1 |
| STDEV | 2.4 | 9.2 | 8.7 | 9.4 | 10.7 |
| 陽性 | 9 | 82 | 44 | 22 | 16 |

【0453】

図 11 は、健常対照に対する IBS 患者におけるヒスタミン及び PGE₂ の血清レベルの増加を示す。PGE₂ は、Cayman 製キットを使用する ELISA によって 50 µL の血清中で計測した。ヒスタミンは、Immunotech EIA キットを使用して 10 µL の血清中で計測した。試料は二重に試験した。実線は、各群の中央値である。例えば、或る観点において、健常対照、IBS-A 及び / 又は IBS-C 試料又は標準と比べて高いレベルの PGE₂ を検出することによって、IBS-D を診断するか又は IBS の他の臨床サブタイプから区別することができる。或るその他の観点において、健常対照及び / 又は IBS-C 試料又は標準と比べて高いレベルのヒスタミンを検出することによって、IBS-D 又は IBS-A を診断するか又は IBS-C と区別することができる。

【0454】

結論: (1) 血清トリプターゼレベルを高感度で、高精度で正確に計測することができるサンドイッチ ELISA 法を開発した。このアッセイは、高精度の再現性を有し、多数のヒト血清の定型的試験に好適である。(2) この ELISA を使用して、本発明者らは、健常対照と IBS 患者との血清トリプターゼレベルの有意差を見出した。IBS 患者のうち、IBS-D 及び IBS-A 患者は、IBS-C 患者と比較して統計的に高いトリプターゼレベルを有した。(3) 追加の肥胖細胞マーカー、ヒスタミン及び PGE₂ も、IBS 患者血清試料中で異常であることを見出した。これらのマーカーをトリプターゼと組

み合わせること、IBSの診断精度の改善をもたらした。

【0455】

実施例3. IBSと関連する症状の存在又は重症度を同定するための質問票

本実施例は、個人における1種以上のIBS関連症状の存在又は重症度を同定するために有用な質問票について説明する。本質問票は、クリニック又は開業医の診療所で個人によって全ての項目を記入されてもよいし、あるいは家に持ち帰り、個人がクリニック又は開業医の診療所に戻ってくる(例えば、患者の採血のため)ときに提出することができる。

【0456】

一部の実施態様において、本質問票は、個人に、1種以上のIBSと関連する症状の存在又は重症度に関する回答を提供することを求める一連の質問を含む第1のセクションを含む。本質問票は、一般に、IBS関連症状、例えば、胸痛、胸部不快感、胸焼け、普通量の食事後の不快な膨満感、普通量の食事の完食不能、腹痛、腹部不快感、便秘、下痢、鼓脹及び/又は腹部膨満の存在、重症度、頻度及び/又は持続期間を同定することを対象とした質問を含む。

10

【0457】

或る例において、質問票の第1のセクションは、ローマIII基準に基づく、ローマ委員会によって策定された、<http://www.romecriteria.org/questionnaires/>から入手可能な質問票からの質問の全て又は一部を含む。例えば、質問票は、成人機能性GI障害に対するローマIII診断質問票(別表C)(<http://www.romecriteria.org/pdfs/AdultFuncitGIQ.pdf>から入手可能)の920~936ページに説明される93個の質問の全て又は一部を含むことができる。好ましくは、質問票の第1のセクションは、ローマIII診断質問票に説明される93個の質問の16個を含む(表3を参照)。あるいは、質問票の第1のセクションは、表3に示される16個の質問の一部(例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個)を含有することができる。非限定的な例として、表3に説明される以下の10個の質問:質問番号2、3、5、6、9、10、11、13、15及び16を質問票に含めることができる。当業者は、質問票の第1のセクションが、疼痛、不快感及び/又は便の硬さの変化に関する表3に示す質問に類似する質問を含むことができることを認識する。

20

【表 3】

I B S 関連症状の存在又は重症度を同定するための質問表の模範的な第 1 セクション

| | | |
|---|---|----|
| 1. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で（心臓障害とは無関係に）胸部の中央に疼痛又は不快感がありましたか？ | (0) 全くない (1) 月に1日より少ない (2) 月に1日 (3) 月に2～3日 (4) 週に1日 (5) 週に1日より多い (6) 毎日 | |
| 2. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で胸焼け（胸部における灼熱様の不快感又は灼熱痛）がありましたか？ | (0) 全くない (1) 月に1日より少ない (2) 月に1日 (3) 月に2～3日 (4) 週に1日 (5) 週に1日より多い (6) 毎日 | 10 |
| 3. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で普通量の食事後に不快な膨満感がありましたか？ | (0) 全くない → (1) 月に1日より少ない (2) 月に1日 (3) 月に2～3日 (4) 週に1日 (5) 週に1日より多い (6) 毎日 | |
| 4. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で普通量の食事を完食することができませんでしたか？ | (0) 全くない → (1) 月に1日より少ない (2) 月に1日 (3) 月に2～3日 (4) 週に1日 (5) 週に1日より多い (6) 毎日 | 20 |
| 5. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で胸部ではなく腹部の中央、へそ上部に疼痛又は灼熱感がありましたか？ | (0) 全くない → (1) 月に1日より少ない (2) 月に1日 (3) 月に2～3日 (4) 週に1日 (5) 週に1日より多い (6) 毎日 | |
| 6. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で腹部のいずれかに不快感又は疼痛がありましたか？ | (0) 全くない → (1) 月に1日より少ない (2) 月に1日 (3) 月に2～3日 (4) 週に1日 (5) 週に1日より多い (6) 毎日 | 30 |
| 7. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で排便が週に3回未満（0～2回）でしたか？ | (0) 全くない 又は まれに (1) ときどき (2) しばしば (3) ほとんど (4) いつも | |

| | |
|--|---|
| 8. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で硬い又は塊状の糞便がありましたか？ | (0) 全くない 又は まれに (1) ときどき (当該期間の25%) (2) しばしば (当該期間の50%) (3) ほとんど (当該期間の75%) (4) いつも |
| 9. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で排便時に力みましたか？ | (0) 全くない 又は まれに (1) ときどき (2) しばしば (3) ほとんど (4) いつも |
| 10. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で排便時に残便感がありましたか？ | (0) 全くない 又は まれに (1) ときどき (2) しばしば (3) ほとんど (4) いつも |
| 11. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で排便時に糞便を移動させることができない(すなわち、塞がれている)という感覚がありましたか？ | (0) 全くない 又は まれに (1) ときどき (2) しばしば (3) ほとんど (4) いつも |
| 12. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で臀部又はその周辺を押圧するか、あるいは、糞便を除去して排便を完了させましたか？ | (0) 全くない 又は まれに (1) ときどき (2) しばしば (3) ほとんど (4) いつも |
| 13. 上記27～32の質問に記載の便秘の症状のいずれかが6ヶ月よりも以前に現れましたか？ | (0) いいえ (1) はい |
| 14. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で軟便、泥状便又は水様便がありましたか？ | (0) 全くない 又は まれに → (1) ときどき (当該期間の25%) (2) しばしば (当該期間の50%) (3) ほとんど (当該期間の75%) (4) いつも |
| 15. 過去3ヶ月において、どのくらいの頻度で鼓脹又は膨満がありましたか？ | (0) 全くない → (1) 月に1日より少ない (2) 月に1日 (3) 月に2～3日 (4) 週に1日 (5) 週に1日より多い (6) 毎日 |
| 16. 鼓脹又は膨満の症状は6ヶ月よりも以前に現れましたか？ | (0) いいえ (1) はい |

10

20

30

40

50

【0458】

その他の実施態様において、質問票は、個人に、IBSと関連する疼痛又は不快感を有することに伴う消極的な思考又は感情の存在又は重症度に関する回答を提供することを求める一連の質問を含有する第2のセクションを含む。例えば、本質問票は、個人がIBSの1種以上の症状と関連する疼痛又は不快感を経験している時の不安、恐れ、緊張感、懸念、心配、悩み、ストレス、落ち込み、失望感、絶望、悲観、疑念及び/又は否定的なことの存在、重症度、頻度及び/又は持続期間を同定することを対象とした質問を含むことができる。

【0459】

ある例において、質問票の第2のセクションは、Sullivan et al., The Pain Catastrophizing Scale: Development and Validation, Psychol. Assess., 7:524-532 (1995)に記載の質問票からの質問の全て又は一部を含む。例えば、質問票は、個人が疼痛を経験した場合に或る消極的な思考又は感情を有する程度：0 = 全くない、1 = 軽度、2 = 中程度、3 = 重度、4 = いつも、を示す痛み認知面の評価(PCS)に従って個人によって回答されるべき一連の質問を含むことができる。質問票の第2のセクションは、IBSと関連する疼痛又は不快感を有することに伴う消極的な思考又は感情の存在又は重症度を同定

することに関連する、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15個以上の質問又は記述を含有することができる。非限定的な例として、個人が疼痛を経験した場合以下の思考又は感情の1つ以上：「私はいつも疼痛が止むかどうか心配している」；「私はもうこれ以上疼痛に耐えられないと感じる」；「私は疼痛が悪化するのではないかと恐れている」；「私は疼痛が消えることを切望している」；及び「私は疼痛がどれほど痛いかについて考え続けている」を有する程度を評価するように個人に求めることができる。当業者は、質問票がIBSと関連する疼痛又は不快感を有することに伴う消極的な思考又は感情に関する類似の質問を含むことができると理解する。

【0460】

一部の実施態様において、質問票は、質問票の第1のセクション又はこの一部からの質問（例えば、表3を参照）のみを含む。その他の実施態様においては、質問票は、質問票の第2セクション又はこの一部からの質問のみを含む。

10

【0461】

個人によって本質問票が全て記入されると、各質問に対する回答に対応する数字を合わせることができ、得られる値は、個体からの試料中の1種以上の診断マーカの分析と組み合わせ、本明細書に記載の統計的アルゴリズムを使用して処理してIBS予測の精度を増加させることができる。

【0462】

あるいは、以下質問：「あなたは現在何らかの症状を経験していますか？」に対する個人からの「はい」又は「いいえ」の回答は、本明細書に記載のバイオマーカの1種以上の分析結果と組み合わせ、単一の統計的アルゴリズム又は統計的アルゴリズムの組合せを使用して処理してIBS予測の精度を増加させることができる。

20

【0463】

実施例4．過敏性腸症候群（IBS）の診断のための血液ベース診断アッセイ

本実施例は、過敏性腸症候群（IBS）についての最初の血液ベースバイオマーカークラシフィケーションを説明する。本試験は、IBSの診断において臨床医を補助することができる。下記のIBS診断は、承認されたIBS専門家及びGIクリニックから回収された十分に特性決定されたIBS試料を使用して検証した。試料は、ローマII又はローマIII陽性であり、患者は、1年超にわたりIBSの診断を受けた。試験は、50%の感度、88%の特異度、70%の全体精度を有する。

30

【0464】

本アッセイを開発するために使用された全コホートは、1721個の血清試料からなるものであった。使用された検証コホートは、516個の血清試料からなるものであり、このうち50%はローマII又はローマIII基準に従ってIBSと診断されたものであり；36%は非IBS疾患対照であり；及び14%は正常健常対照であった。アッセイの感度は50%であり、特異度は88%である。医師が患者において疾患の確率が約75%であると決定し、IBSを確定する場合、陽性試験結果の94%は真陽性である一方、陰性試験結果の38%は真陰性である。医師が患者において疾患の確率が約25%であると決定し、IBSを除外する場合、陰性試験結果の86%は真陰性である一方、陽性試験結果の61%は真陽性である。

40

【0465】

アッセイは、ランダムフォレスト分類子及びニューラルネットワーク分類子からなる2種の学習統計的分類子システムと組み合わせたバイオマーカの定量分析を含む。

【0466】

アッセイの試験体要件は、例えば、SSTチューブ中の2.0mLの分離血清を医師が得ることからなる。最良の結果のため、試料を回収から2時間以内に遠心分離及び冷蔵すべきである。アッセイ検出前に試料を運搬する必要がある場合、試料は冷蔵又は冷凍すべきである。最良の結果のため、試料を使用前に4℃において7日以下又は冷凍の場合は30日間貯蔵すべきである。

【0467】

50

手短に述べると、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) は、IBS バイオマーカーの ASCA - IgA、CBir1、ANCA 及び tTG について特異的な抗体を用いて実施する。更に、化学発光アッセイは、IBS バイオマーカーの BDNF、NGAL、TWEAK、GRO- α 、IL-1 β 及び TIMP-1 について実施する。健常対象におけるこれらのマーカーの正常範囲についての参照値を、表 4 に提供する。

【表 4】

| IBSアッセイにおいて検出されるマーカーについての参照値 | |
|---|----------------------|
| マーカー | 参照レベル |
| BDNF (脳由来神経栄養因子) | 7536.5-31324.4 pg/mL |
| NGAL (好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン) | 28.3-272.5 ng/mL |
| TWEAK (TNF関連アポトーシス弱誘導因子) | 351.6-1751.7 pg/mL |
| GRO- α (成長関連癌遺伝子 α) | 26.4-499.3 pg/mL |
| IL-1 β (インターロイキン-1 β) | 279.5-1358.6 fg/mL |
| TIMP-1 (組織メタロプロテアーゼ阻害因子1) | 156.1-410.6 ng/mL |
| ASCA-IgA (抗 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 抗体) | <20.0 EU/mL |
| CBir1 (抗 CBir-1 抗体) | <21.0 EU/mL |
| ANCA (抗ヒト好中球細胞質抗体) | <12.1 EU/mL |
| tTG (抗ヒト組織トランスグルタミナーゼ IgA) | <4.0 U/mL |

10

【0468】

或る例において、上記 IBS バイオマーカーの検出からの情報は、患者によって提供される症状情報と組み合わせることができる。例えば、IBS の診断において臨床医を更に補助するため、患者は、患者の症状のチェックリストを記入することができ、そこからの情報を IBS バイオマーカーからの情報と組み合わせることができる。この方式において使用することができるチェックリストの例を、表 5 に提供する。

20

【表 5】

一般に IBS と関連する症状の患者チェックリスト例

| IBS 症状チェックリスト |
|---|
| 記入して次回の予約時にお持ちください。 |
| お名前 _____ |
| 予約日 _____ |
| あなたが現在有する又は過去に有した症状の隣にチェックマークを入れてください。どのくらいの頻度でこれらの症状が存在するか書いてください。 |
| _____ 再発する腹痛又は腹部の不快感 |
| _____ 異常な排便頻度 (3 回超/日の排便又は 3 回未満/週の排便) |
| _____ 異常な糞便形態 (塊状/硬便又は軟便/水様便) |
| _____ 異常な糞便移動 (いきみ、切迫又は不十分な排便感) |
| _____ 粘液の移動 |
| _____ 鼓脹又は腹部膨満 |
| _____ ガス発生 |
| _____ 切迫感 (化粧室を急いで見つける必要がある) |

30

40

【0469】

実施例 5 . 過敏性腸症候群の患者の血清における新規の代謝産物の同定

5 - ヒドロキシトリプタミンは、トリプトファンデヒドロゲナーゼにより触媒されるトリプトファンから変換される。体内の 5 - HT の 95% 超が、胃腸管の腸クロム親和細胞

50

から放出される。5-HTは、腸神経系の腸管筋ニューロン及び粘膜下ニューロンにある種々の受容体サブタイプを介して作用し、GI管の正常機能において重要な役割を果たすことが知られている。5-HTの異常レベルは、過敏性腸症候群の病因と関連する。

【0470】

5-HT(ヒドロキシトリプタミン)は、GIの運動性、分泌及び感覚において重要な役割を果たす。5-HT受容体に作用するセロトニン作動性治療は、IBS患者が経験する症状を効果的に改善する。5-HT代謝産物の研究は、IBSの正確な診断に使用され得る生物学的に関連のあるバイオマーカーの同定を導くことがある。

【0471】

血清代謝産物は、高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)を使用して、IBS-Cの12患者、IBS-Dの24患者、IBS-Mの14患者及び健常な38対象からの試料を調査した。本発明者らは、IBS試料及び健常対照試料における20ピーク超の分離を可能にするDiphenylカラムを使用する高処理HPLC方法を開発及び最適化した。同じ対象からの血漿、血清及び尿試料を、5-HT及びその代謝産物のレベルについて比較した。

10

【0472】

手短に述べると、承認されたIRB(Prometheus 08IBS04プロトコル)に従って、SST管中に血清試料を収集した。イソプロパノール60uL及びアセトニトリル360uLを用いて、ヒト血清300uLを除タンパクした。混合物を次に15分間2000xgで遠心分離した。代謝産物を含む上澄みを第2の管へ移し、そして、Speed Vac Plus(model SC110A)を用いて濃縮した。乾燥ペレット剤を160uLの水で戻して、その100uLをHPLCシステム(Agilant 1200)へ注入した。

20

【0473】

液体クロマトグラフィは、quaternaryポンプ、オートサンプラー、DAD及びFLDからなるアジレント1200HPLCシステムを使用して実施した。クロマトグラフ分離を、10µmのMetaguard PursuitXR C18ガードカラム及び4.6x20mm、5µmのSunFire C18ガードカラムにより保護される4.6x150mm、5µmのVarian Pursuit Diphenylカラム上で実施した。最初の20分間の分析については、100%緩衝液Aから100%緩衝液Bの勾配を使用した。55分後には、移動相が100%緩衝液Bから100%緩衝液Aへ1分間にわたって変化した。次に、緩衝液Aを、次の注入用に備えて100%で10分間保持した。移動相Aは、氷酢酸を使用するpH4の酢酸ナトリウム緩衝液10mMからなるものであった。移動相Bは、メタノール12%を有する以外は緩衝液Aと同じであった。5-HT及びその他のインドールを、225の励起及び342の放出で設定されるFLDを使用して検出した。トリプトファン及びキヌレニンを、278及び360のそれぞれの波長に設定されるUVで検出した。

30

【0474】

Ex = 0.65Vにおいて25で測定を実施した。校正曲線は、10~200pg/mLの範囲にわたって線形である。方法確認は、国際的に容認された基準に従って実施した。血液は、健常対照対象及びIBS対象から採集された。

【0475】

分析の際に、UV検出器による20分及び蛍光検出器による7.5分、13.5分、52分それぞれの保持時間で、いくつかの公知の検体(例えば、トリプトファン、及び、5-HT及びその代謝産物、5-HT-O-S及びキヌレニン)及びいくつかの新規の代謝産物を同定した。この分析からの代表的なクロマトグラフを図14に示す。各バイオマーカーのレベルを図15に示す。

40

【0476】

表6に見られるように、内部標準により標準化された後で、3つのIBSサブタイプの全てにおける血清5-HT濃度は、健常対照の濃度よりも低かった、すなわち、中央値AUCは、健常対象について94.5であり、IBS-C、IBS-D及びIBS-Mについてそれぞれ66.85、48.3及び46.25であった。5-HTにより標準化され

50

た後で、7.5分及び13.5分のピークについての濃度曲線下面積は、3つのIBSサブタイプの全てにおいてより高かった。IBS-D患者は、IBS-C、IBS-M及び健常提供者よりも高いレベルの20分UVピークを有していた。これらの研究結果は、IBS診断用のバイオマーカーとして血清代謝産物を用いることがあることを示唆している。血清代謝産物の予測力を図16に示す。

【表6】

| ピーク | 平均 | | | | 中央値 | | | | 標準誤差 | | | |
|-------------------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|--------|--------|-------|-------|
| | IBS-C | IBS-D | IBS-M | HC | IBS-C | IBS-D | IBS-M | HC | IBS-C | IBS-D | IBS-M | HC |
| 20分 UV (不明) | 88.5 | 114.1 | 90.8 | 83.0 | 66.3 | 108.9 | 75.9 | 67.8 | 22.2 | 13.9 | 12.9 | 11.1 |
| 30分 UV (不明) | 380.3 | 569.0 | 466.7 | 359.3 | 267.2 | 388.4 | 372.5 | 256.6 | 124.8 | 112.2 | 70.0 | 51.7 |
| 5-HT/IS | 89.0 | 51.3 | 52.1 | 97.5 | 66.9 | 48.3 | 46.3 | 94.1 | 23.9 | 8.7 | 8.3 | 9.6 |
| 7.5分 FLD/5-HT | 7486.0 | 4413.0 | 3233.0 | 1148.0 | 948.0 | 1583.0 | 2219.0 | 806.2 | 4660.0 | 1242.0 | 814.6 | 149.2 |
| 13.5分 FLD/5-HT | 699.2 | 299.2 | 193.3 | 75.6 | 76.4 | 97.8 | 163.8 | 42.1 | 524.5 | 94.5 | 43.5 | 13.9 |

10

【0477】

実施例6. ヒト血球中の肥満細胞活性化及び5-HT代謝産物についての炎症性サイトカイン処理の効果

20

過敏性腸症候群は、多因子機能性GI疾患である。局所腸粘膜における炎症性刺激は、IBS疾患の発病の誘因として関与している。セロトニン異常調節、肥満細胞活性化及びストレス応答の全ては、この疾患の病因に寄与する。本実施例は、健常提供者からの炎症性サイトカイン処理された血液試料におけるこれらの経路の相互作用の研究を提供する。ストレスマーカー及び肥満細胞の血漿レベル並びに5-HT代謝産物における変化を測定した。炎症性刺激が、トリプトファン及び5-HT代謝産物を変化させることが分かった。同様に、血漿キヌレンイン及び5-HT-O-Sレベルを、TNF- α 処理によって上方調節した。IL-1刺激は、肥満細胞活性化のマーカーであるPGE₂のレベルの増加をもたらした。5-HT合成酵素(TPH-1)及び代謝酵素(MAO)の定量化は、サイトカインによりこれらの酵素の転写産物が増加するという結果を導いた。これらの経路の相互作用の理解は、生物学的に関連するバイオマーカーを同定して臨床診断を支援するのに役立つ。

30

【0478】

過敏性腸症候群は、異種の疾患である。その病因と免疫システムとの関与を指し示す証拠が増えている。胃腸感染症は、症状の発現を引き起こす誘発要因であることがある。IBSはしばしば「脳-腸障害」と呼ばれる。セロトニンシグナル系の異常調節により媒介されることのある胃腸の運動性及び分泌における変化が、排便習慣における異常の基礎となることがある。結腸神経に近接する肥満細胞の活性化は、IBSを罹患する患者における異常痛覚と相関していた。肥満細胞は、活性化の際に、種々の炎症性メディエーターを生成及び放出できることがよく知られている。これらの経路がどのように互いに伝達するのか、そして、これらの相互作用がIBS患者と健康な対象との間で同じように挙動するのかどうか、ということは不明のままである。

40

【0479】

血液試料を以下のように収集して処理した。健常提供者からの新鮮なヒト血液試料をヘパリン管中に収集した。試料を7つの15mL colloquial管へ分注し、そして、炎症性サイトカイン、TNF- α 、IL-1、TIMP1、NGAL、2-plex (BDNF及びTWEAK)、5-plex (Gro-a、ASCA、ANCA、tTG、CBir1)を用いて細胞培養インキュベータ中に37°Cで2日間処理した。試料中の代謝産物のレベルを測定するために、処理された血漿試料300 μ Lからイソプロパノール

50

ル及びアセトニトリルによって化学物質を抽出した。代謝産物を、diphenolカラム (Aliquantシステム) を使用してHPLCにより分離した。機械を0~12%メタノールの勾配で20分間操作し、次に、12%メタノールで55分間均一濃度 (isocratic) で操作した。5-HT及びその他のインドールを、225の励起及び342の放出で設定されるFLDを使用して検出した。トリプトファン及びキヌレニンを、278及び360のそれぞれの波長に設定されるUVで検出した。この分析からの代表的なクロマトグラフを図17に示す。図18及び表7に見られるように、血液試料のTNF- α 処理はトリプトファン及び5-HT代謝産物を著しく刺激し、キヌレニン及び5-HT-O-S生成の上昇をもたらした。

【表7】

血液試料中のトリプトファン、キヌレニン及び5-HT-O-Sのレベルについての炎症性サイトカイン処理の効果

| 処理 | トリプトファン | キヌレニン | 5-HT-O-S |
|--------------|----------|--------|----------|
| ブランク | 2,851.90 | 17.10 | 56.50 |
| IL1 β | 3,865.96 | 54.90 | 86.70 |
| TIMP1 | 3,903.20 | 71.10 | 85.00 |
| TNF α | 3,471.10 | 147.56 | 124.67 |
| 2 Plex | 3,950.35 | 22.70 | 91.20 |
| 5 Plex | 3,857.94 | 26.30 | 92.60 |

10

20

【0480】

MAO、TPH1及びSERT発現プロファイリング：2.4mLの処理した各血液試料をパクスジーン管へ加えて、トータルRNAを製造業者のプロトコルに従って調製した。200ngのトータルRNAをcDNAへ逆転写して、続いて200ngのcDNAをqPCR反応 (ABI 7000システム) による定量化のために使用した。

【0481】

免疫マーカーの測定：肥胖細胞マーカー、5-HT及びウロコルチン (Ucn) をELISAにより測定した。トリプターゼ及びUcnをPrometheusにより開発されたアッセイを使用して測定した。業務用のアッセイを使用してPGE₂、ヒスタミン及び5-HTを測定した。表8及び図19に見られるように、Ucnレベルは、TNF- α 、TIMP1及びNGAL処理に応じて著しく上昇した。表9及び図20に見られるように、肥胖細胞マーカーPGE₂は、IL-1 β 処理に応じて著しく上昇した。

30

【表8】

Ucn放出のレベルに対する炎症性サイトカイン処理の効果

| 処理 | Ucn ng/mL |
|--------------|-----------|
| ブランク | NA |
| 5-plex | NA |
| 2-plex | NA |
| IL-1 β | NA |
| NGAL | 14.7+8.5 |
| TIMP1 | 37.8+2.1 |
| TNF α | 42.8+1.1 |

40

【表 9】

肥胖細胞マーカーのレベルに対する炎症性サイトカイン処理の効果

| 処理 | 肥胖細胞マーカー | | |
|-------------|-----------|------------------|------------|
| | トリプターゼ | PGE ₂ | ヒスタミン |
| B I k | 19.8+1.1 | 1621.7+89.1 | 294.9+43.3 |
| 5 p l e x | 20.5+1.3 | 1505.8+105.5 | 269.2+18.2 |
| 2 p l e x | 21.7+0.7 | 1916.8+126.4 | 279.7+29.8 |
| I L - 1 β | 20.7+0.74 | 5588.6+560.8 | 257.3+35.3 |
| N G A L | 20.3+1 | 1700.3+23.6 | 265.5+20.0 |
| T I M P - 1 | 21.2+0.27 | 1818.5+185.1 | 261.6+30.5 |
| T N F - α | 20.4+2.0 | 2394.3+83.4 | 208.8+28.9 |

10

【0482】

TNF- 処理が、健常なヒト血球におけるトリプトファン代謝産物、キヌレニン及び5-HT代謝産物、5-HT-O-Sの放出の増加を導くことを、本実施例は実証する。トリプトファン及び5-HT代謝産物における変化は、サイトカイン処理により誘導される血球中の5-HTMAO及びTPH1発現の変化に起因することがある。更に、肥胖細胞マーカーPGE₂のレベルは、新鮮な全血のIL-1 処理の際に著しく増加したことが分かった。IBS患者血球におけるサイトカイン応答の更なる研究が、IBS病因に寄与する経路における機構的な相互作用についての手掛かりを与えることがある。

20

【0483】

実施例7. IBS及びそのサブタイプの同定のために有用な代謝産物バイオマーカーとしてのチロシン、フェニルアラニン及びセロトニンの発見

セロトニン(5-ヒドロキシトリプタミン、5HT)は、胃腸の(GI)運動性、分泌及び感覚において重要な役割を果たす。5-HT3受容体アンタゴニスト、すなわちアロセトロンは、重度の下痢優勢型の女性の過敏性腸症候群(IBS)患者への適応が認められており、そして、5-HT4受容体アゴニスト、すなわちテガセロッドは、便秘優勢型のIBS患者への適応が認められている。5-HTがIBSにおいて果たす主な役割のために、血清中の5-HTの分析及びその代謝産物の分析は、IBSの正確な診断に用いられることのできる生物学的に関連のあるバイオマーカーの同定を導くことがある。この目的のために、高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)を使用して、新規のバイオマーカーを探すためのIBS患者及び健常対照(HC)対象からの血清代謝産物の分析が行われてきた。実際には、IBS患者対HC対象における種々の濃度を有するいくつかの潜在的なバイオマーカーが見出された。これらの新規のバイオマーカーを同定するために、ヒトのプール血清試料の大規模な抽出及びHPLC精製を実施してこれらのマーカーを分離し、そして、質量分光分析を使用してこれらの化学構造を確立した。マーカーの1つを5-HTそれ自体であると同定し、その一方で、その他の分離されたマーカーのうちの2つをチロシン及びフェニルアラニンであると同定し、そして、次に、ヒト血清試料中へ合成チロシン及びフェニルアラニンをスパイキングすることによって分析HPLCにおけるこれらのマーカーピークの同定を確認した。5-HTの血清レベルは、IBS患者よりもHC対象で高いことがわかった。それに対して、IBS患者サブタイプは、チロシン及びフェニルアラニンの種々のレベルを有する。チロシン及びフェニルアラニンレベルの測定はIBS診断に関連する。なぜなら、これらの2つのアミノ酸は、腸神経系の重要な調節因子であるドパミン、ノルエピネフリン及びエピネフリンの生合成のための前駆体であるからである。

30

40

【0484】

IBSの病因が不明瞭なままであるのに対して、セロトニン(5-HT)生合成及び代謝、肥胖細胞浸潤、内臓過敏、ストレス応答並びに細菌感染(感染後IBS)を含む、IBSにおいて異常調節された重度の病態生理学的経路を示唆する証拠の実体がある。勿論

50

、5-HT系は、GI生理学及び病態生理学において重要な役割を果たし、そして、いくつかの5-HT受容体アゴニスト及びアンタゴニストは、IBSの適応について認められているか、又は、臨床開発下にある。この理由のために、IBS患者血清試料中の潜在的なバイオマーカーとしての5-HT及びその代謝産物の同定は、IBSの正確な診断を容易にし、そして、より良い治療を提供することができる。この目的のために、高性能液体クロマトグラフィ(HPLC)方法を展開して、IBS患者及び健常対照(HC)対象からの血清試料中の潜在的なバイオマーカーが同定されてきた。

【0485】

HPLC分析用の血清試料の調製：IRB認可されたプロトコルに従ってIBS患者血清試料をSST管中に収集し、そして、健常対照血清試料を提供者から入手した。HPLC分析用の血清試料を調製するために、血清300 μ Lをイソプロパノール60 μ L及びアセトニトリル360 μ Lと共にエッペンドルフ管中に攪拌(vortexing)することによって除タンパク化して、混合物を2000Xgで15分間遠心分離した。血清代謝産物を含有する上澄み液を第2のエッペンドルフ管へ移し、そして、Speed Vac Plus濃縮(モデルSC110A)を使用して溶媒を蒸発した。乾燥ペレット剤を160 μ Lの水で戻して、その100 μ Lを分析用HPLCシステムへ注入した。

10

【0486】

分析HPLC手順：分析用に用いられるHPLCは、バイナリポンプ、オートサンプラー、DAD検出器及びFLD検出器からなるアジレントモデル1200HPLCシステムである。連続して接続している10 μ mのC18 Metaguard Pursuit XRガードカラム及び4.6x20mm、5 μ mのC18 Sun Fireガードカラムによって保護される、4.6x150mm、5 μ mのVarian Pursuit Diphenylカラム上で代謝産物の分離を実施した。移動相Aは、氷酢酸を使用してpH4に緩衝した10mMの酢酸ナトリウム溶液からなり、そして、移動相Bは、移動相Aにおけるメタノール12容量%であった。1mL/分の流量で100%移動相Aから100%移動相Bへ20分に変化し、次に、100%移動相Bに35分間留まる勾配を使用して、HPLC分析を室温で実施した。55分後に、移動相は100%Bから100%Aへ1分にわたって変化し、そして、次の10分間は、次の分析用の調製において100%Aで維持された。励起波長225nm及び放出波長342nmに設定されるFLD検出器を使用して、5-HT及びその他のインドール含有分子を検出した。それぞれ278nm及び360nmに設定されるUV波長を有するDAD検出器を使用して、キヌレニン及びその他の代謝産物を検出した。

20

30

【0487】

代謝産物の大規模分離及び同定：HPLC分析において同定されるバイオマーカーピークの化学構造を確立するために、プール血清試料の大規模精製を3DBioOptimaによって実施して、そして、分離された代謝産物マーカーの構造を質量分析によって決定した。

【0488】

図22は、IBS患者(図22、パネルa、b及びc)及び健常対照対象(パネルd、e及びf)からの血清試料のHPLC分析から得られる代表的なクロマトグラフを示す。パネルa及びdにおけるピークが278nmでのUV吸光度により検出されたのに対して、パネルb及びeにおけるピークは360nmでのUV吸光度により検出された。パネルc及びfにおけるピークは、蛍光検出によりモニタリングされた。図22に見られるように、7.5分、13.5分及び17.2分で溶出する3つの顕著なピーク(囲みにより表示)は、IBS血清試料とHC血清試料との間でのピークエリアにおける差を示す。IBS血清試料とHC血清試料との間でのピークエリアにおける差は、その他の溶出ピーク(eluted peaks)でも見られるが、それらは顕著ではなかった。7.5分、13.5分及び17.2分のピークエリアにおけるIBSとHC対象との有意差のために、収集された血清試料のすべてをHPLC法により評価した。図23は、IBS-C、IBS-D、IBS-M及びHC対象から得られる血清試料における3つのピークレベルの統計的分布を示す。図23に見られるように、17.2分ピークの血清レベルはIBS患者よりもHC対

40

50

象でより高いことが分かったのに対して、IBS患者サブタイプは、7.5分及び13.5分ピークで種々のレベルを有する。17.2分で溶出するピークは、HPLC分析において、5-HT標準中にスパイクされるものとの共溶出により容易に5-HTとして同定されたが、7.5分及び13.5分ピークの同定は不明であった。これらの2つピークの化学構造を確立するために、プール血清試料の大規模精製を実施して、これらの2つのピークに存在する化合物を分離し、質量分析によりこれらの構造を決定した。図24は、アミノ酸チロシンとしての同定を確立するための質量分析による7.5分ピークの構造解明を示し、そして、図25は、アミノ酸フェニルアラニンとしての同定を確立するための質量分析による13.5分ピークの構造解明を示す。図26は、線形用量依存応答曲線を発生させる、

血清試料に対する標準D-チロシンのスパイクングに起因するHPLC分析結果を示しており、そして、図27は、線形用量依存応答曲線を発生させる、血清試料に対する標準L-フェニルアラニンのスパイクングに起因するHPLC分析結果を示す。

【0489】

この研究では、HPLC法を展開して、IBSの診断用の潜在的なバイオマーカーを探すために、IBS患者及び健常対照対象から得られる血清試料中に存在する代謝産物を分析した。チロシン、フェニルアラニン及びセロトニンに相当する3つの顕著なマーカーを見出した。セロトニンの血清レベルは、IBS患者よりも健常対照対象においてより高いことが分かったのに対して、IBS患者サブタイプは、チロシン及びフェニルアラニンの種々のレベルを有する。セロトニンレベルに加えて、チロシン及びフェニルアラニンレベルの測定はIBS診断に関連する。なぜなら、これらの2つのアミノ酸は、腸神経系の重要な調節因子であるドパミン、ノルエピネフリン及びエピネフリンの生合成用の前駆体であるからである。

【0490】

実施例8. TNF 処理が、トリプトファン代謝産物、キヌレニン及び5-HT代謝産物、5-HT-O-SO₃Hの放出の増加をもたらす。IL-1 処理が全血球(whole blood cells)中のPGE₂を増加させ、そして、TNF 及びTIMP1治療が全血球中のウロコルチンレベルを上昇させる。

過敏性腸症候群(IBS)は、多因子機能性胃腸(GI)疾患である。局所腸粘膜における炎症性刺激は、IBS疾患の発病の1つの誘因として関与している。セロトニン(5-HT)異常調節、肥胖細胞活性化及びストレス応答と関連する経路の全ては、この疾患の病因に寄与する。IBS診断用のバイオマーカーを見出す試みにおいて、これらの経路の相互作用は、健常提供者からの炎症性サイトカイン処理された全血試料において研究されてきた。ストレス応答マーカー及び肥胖細胞活性化のレベル並びに5-HT代謝産物における変化を決定した。炎症性サイトカイン刺激が、トリプトファン及び5-HT代謝産物を変化させることが分かった。血漿キヌレニン及び5-HT-O-SO₃Hレベルを、TNF- 処理によって上方調節した。IL-1 刺激は、肥胖細胞活性化のマーカーであるPGE₂のレベルの増加をもたらした。5-HT生合成酵素(TPH1)及び代謝酵素(MAO)のmRNAレベルの測定は、これらの酵素の転写産物がサイトカイン処理による影響を受けることを示唆した。従って、これらの経路の相互作用の理解は、生物学的に関連するバイオマーカーを同定してIBSの臨床診断を支援するのに役立つ。

【0491】

血液試料の収集及び処理：健常提供者からの新鮮なヒト血液試料をヘパリン管中に収集した。収集した試料を7つの15mL colloidal管へ分注し、そして、炎症性サイトカイン、TNF-、IL-1、TIMP1(組織メタロプロテアーゼ阻害因子1)、NGAL(好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン)を用いて細胞培養インキュベータ中に37で2日間処理した。

【0492】

代謝産物の測定：各300µLの処理された血漿試料から、イソプロパノール及びアセトニトリルを用いて生成物を抽出し、そして、アジレントHPLCシステム上のdiph

10

20

30

40

50

enylカラムを使用して抽出物を分析した。代謝産物の分離を、pH 4.0の酢酸ナトリウム緩衝液10mM中の0~12%メタノールからの直線勾配を用いて20分間実施し、続いて、同じ緩衝液中の12%メタノールで35分間均一濃度(isocratic)で操作した。インドール代謝産物及び5-HTを、225nmの励起波長及び342nmの放出波長で設定されるFLD検出器を使用して検出した。トリプトファン及びキヌレニンを、それぞれ278nm及び360nmの波長で設定されるUVで検出した。

【0493】

MAO、TPH1及びSERT発現プロファイリング：処理された血液試料の各々からの2.4mLの分割量をパクスジーン管へ加えて、トータルRNAを製造業者のプロトコルに従って調製した。200ngのトータルRNAの分割量をcDNAへ逆転写し、そして、200ngの得られたcDNAをqPCR反応(ABI 7000システム)による定量化のために使用した。

10

【0494】

免疫マーカーの測定：トリプターゼ及びUcn(ウロコルチン)をPrometheusにより開発されたアッセイを使用して測定した。市販のELISAアッセイを使用してPGE₂、ヒスタミン及び5-HTを測定した。

【0495】

図28は、IBSの病態生理における5-HT経路及びその関与を示す。5-HT3受容体アンタゴニスト、すなわちロトロネクスは、重度の下痢優勢型の女性のIBS患者への適応が認められており、これは、腸の分泌、集団ぜん動(propulsion)及び疼痛の刺激をもたらす5-HT3受容体の活性化を阻害するからである。表10は、全血球中の5-HT経路代謝産物のレベルに対するサイトカイン処理の効果を示し、それに対して、図29は、全血球中の5-HT経路代謝酵素の転写レベルに対するサイトカイン処理の効果を示す。表10に見られるように、TNF処理が、代謝産物キヌレニン及び5-HT-O-SO₃Hの相対レベルを大きく増加させた。このことは、このサイトカインがトリプトファン及び5-HT代謝産物を刺激し、それによってキヌレニン及び5-HT-O-SO₃H合成の増加をもたらされたことを示している。IL-1及びTIMP1での処理による5-HT経路代謝産物についての目立った効果は認められなかった。

20

【0496】

それに対して、全血球のTNF処理がTPH1ではなくMAOの転写を阻害し、一方で、IL-1処理は、MAOではなくTPH1の転写レベルを大いに増加させた(図29を参照)。TIMP1処理もTPH1の転写レベルをわずかに増加させるがMAOの転写レベルを阻害し、一方で、NGAL処理はこれら2つの転写産物について著しい効果を有するようには見られなかった。SERTの転写レベルは、処理された細胞のいずれにおいても検出不能であった。表11及び図30は、全血球のサイトカイン処理により生成される肥胖細胞活性化マーカーのレベルを示す。IL-1での処理は、マーカーPGE₂のレベルを大いに増加させ、一方で、NGAL、TIMP1及びTNFでの処理によるその他のマーカーレベルにおける目立った変化は認められなかった。図31は、全血球のサイトカイン処理により生成されるストレス応答マーカーウロコルチン(Ucn)のレベルを示す。ウロコルチンレベルは、IL-1ではなく、TNF、TIMP1及びNGALでの処理により大いに上昇する。図19は、本明細書中に確定される一部のマーカーにより介在される胃腸系における白血球、腸クロム親和細胞、肥胖細胞及び血小板の間の相互作用を示す略図である。

30

40

【表 1 0】

全血球のサイトカイン処理により生成される5-HT経路代謝産物のレベル

| サイトカイン処理 | 相対トリプトファンレベル | 相対キヌレニンレベル | 相対5-HT-O-SO ₃ Hレベル |
|--------------|--------------|------------|-------------------------------|
| 未処理 | 2,851.90 | 17.10 | 56.50 |
| IL-1 β | 3,865.96 | 54.90 | 86.70 |
| TIMP 1 | 3,903.20 | 71.10 | 85.00 |
| TNF α | 3,471.10 | 147.56 | 124.67 |

【表 1 1】

全血球のサイトカイン処理により生成される肥胖細胞活性化マーカーのレベル

| サイトカイン処理 | トリプターゼ (ng/mL) | PGE ₂ (pg/mL) | ヒスタミン (pg/mL) |
|--------------|-------------------|-----------------------------|------------------|
| 未処理 | 19.8 \pm 1.1 | 1621.7 \pm 89.1 | 294.9 \pm 43.3 |
| IL-1 β | 20.7 \pm 0.74 | 5588.6 \pm 560.8 | 257.3 \pm 35.3 |
| NGAL | 20.3 \pm 1 | 1700.3 \pm 23.6 | 265.5 \pm 20.0 |
| TIMP 1 | 21.2 \pm 0.27 | 1818.5 \pm 185.1 | 261.6 \pm 30.5 |
| TNF α | 20.4 \pm 2.0 | 2394.3 \pm 83.4 | 208.8 \pm 28.9 |

10

【0497】

20

TNF 処理が、健常なヒト全血球におけるトリプトファン代謝産物、キヌレニン及び5-HT代謝産物、5-HT-O-SO₃Hの放出の増加をもたらすことを、本実施例は実証する。理論に縛られることなく、トリプトファン及び5-HT代謝産物に見られる変更は、サイトカイン処理により誘導される血球中の酵素MAO及びTPH1の発現での変化に起因することができる。

【0498】

図30に見られるように、肥胖細胞活性化マーカーPGE₂のレベルは、全血球のIL-1処理で大いに増加した。更に、図31に見られるように、TNF及びTIMP1処理も、全血球中のストレス応答マーカーウロコルチンのレベルを大いに上昇させた。IBS患者血球のサイトカイン処理における応答の更なる研究は、IBSの病因に寄与する経路における機構的な相互作用についての手掛かりを与えることがある。

30

【0499】

参考文献：

1. Barbara G and Cremon C. Serine proteases: new players in diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. Gut. 2008 May;57(5):591-9.

【0500】

2. Barbara G, Wang B, Stanghellini V, et al. Mast Cell-Dependent Excitation of Visceral-Nociceptive Sensory Neurons in Irritable Bowel Syndrome. Gastroenterology 2007;132:26-37.

【0501】

3. Foley KF, Pantano C, Ciolino A, Mawe GM. IFN- and TNF- decrease serotonin transporter function and expression in Caco2 cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 292: G779-G784, 2007.

40

【0502】

4. Burczynski ME, Peterson RL, Twine NC, Zuberek KA, Brodeur BJ, Casciotti L, Maganti V, Reddy PS, Strahs A, Immermann F, Spinelli W, Schwertschlag U, Slager AM, Cotreau MM, Dorner AJ. Molecular classification of Crohn's disease and ulcerative colitis patients using transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells. J Mol Diagn, 8:51-61, 2006.

【0503】

50

明確な理解の目的のために、本発明を説明及び実施例によっていくらか詳細に記載したが、当業者は、添付の特許請求の範囲の範囲内で一定の変更及び改変を実施することができることを理解する。更に、本明細書において提供される各参考文献は、各参考文献が参照により個々に組み込まれたのと同程度に全体として参照により組み込まれる。

【 図 1 】

Optimize the Coating Ab

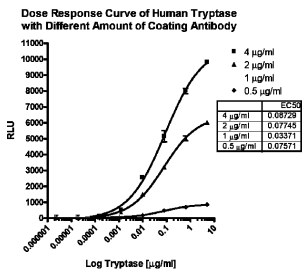


FIG. 1

【 図 2 】

Optimize the Detecting Ab

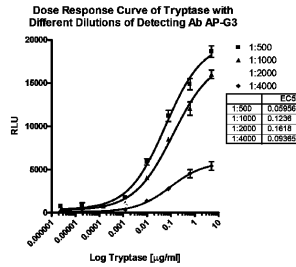


FIG. 2

【 図 3 】

Development of Sensitive Human Trypsin ELISA for the Detection of Trypsin in Human Serum

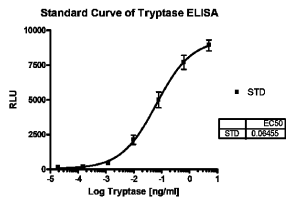


FIG. 3

【 図 4 】

Human Trypsin Concentration in Serum from GI Control (71), IBS-C (61), and IBS-D (203) Patients.

Values are expressed as mean (SEM). *p = 0.0019 for IBS-D; Mann Whitney U test.

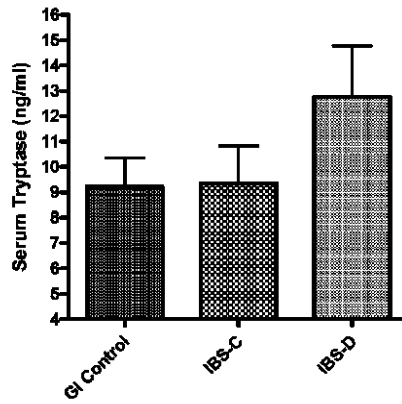


FIG. 4

【 図 5 】

Trypsin Log Value Distribution

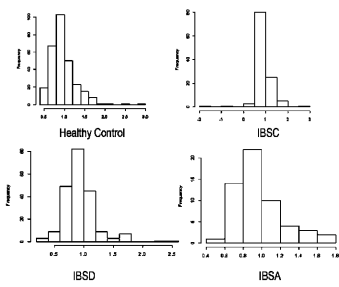


FIG. 5

【 図 6 】

Density Analysis for Trypsin Data

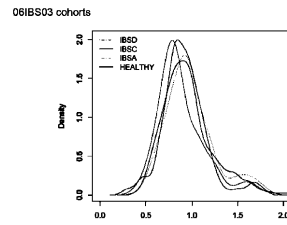


FIG. 6

【 図 7 】

Human trypsin concentration in serum from healthy control (n=156), IBS-D (n=209), IBS-C (n=119), and IBS-A (n=57). Values are expressed as mean (SEM), p<0.05 for IBS-D, Mann Whitney U test.

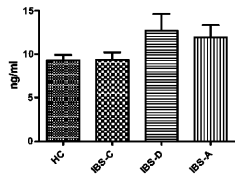


FIG. 7

【 図 8 】

Standard Curve of Human Trypsin

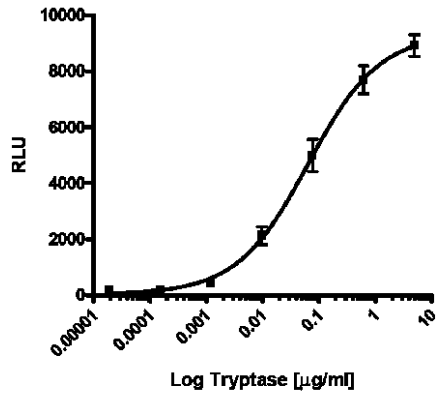
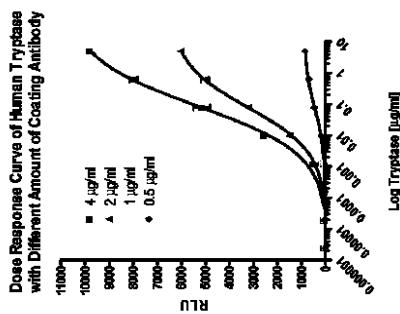
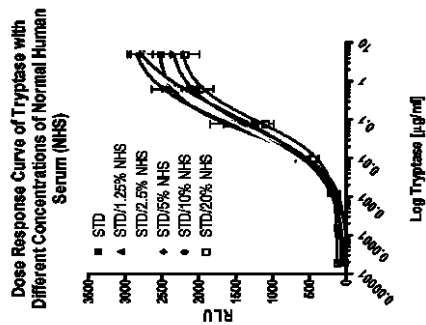


FIG. 8

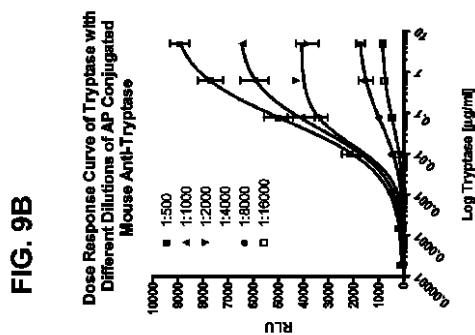
【 図 9 A 】



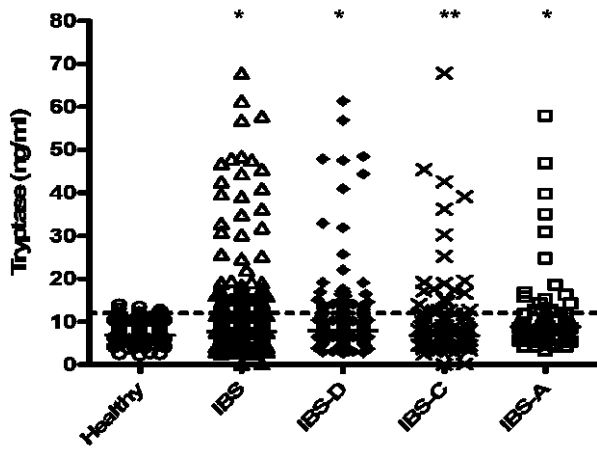
【 図 9 C 】



【 図 9 B 】



【 1 0 】



【 1 1 】

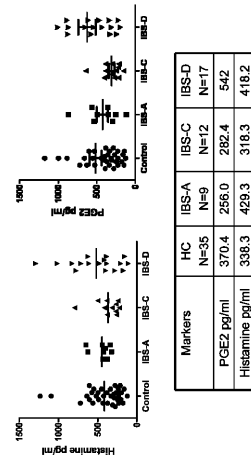


FIG. 11

FIG. 10

【 1 2 】

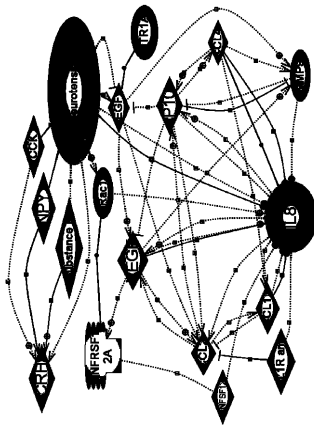


FIG. 12

【 1 3 】

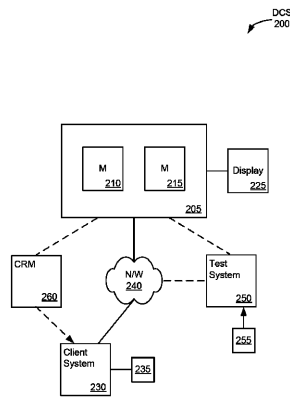


FIG. 13

【 1 4 】

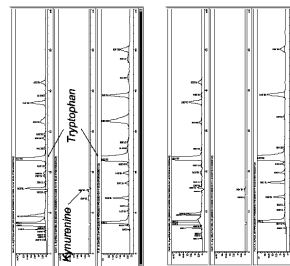


FIG. 14

【 15 】

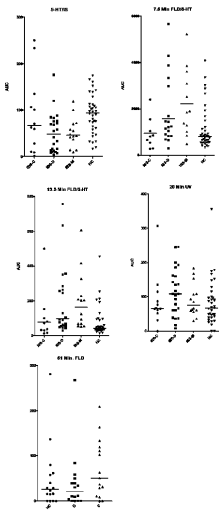


FIG. 15

【 16 】

| Variable | Score |
|---------------------------------|--------|
| FLD225_20_MIN_PEAK_AREA | 100.00 |
| UV278_15_5_MIN_PEAK_AREA | 80.18 |
| FLD225_17_5_MIN_PEAK_AREA_5_HT | 45.13 |
| UV278_19_5_MIN_PEAK_AREA | 38.88 |
| UV360_16_MIN_PEAK_AREA_KYNURENI | 15.18 |
| FLD225_13_5_MIN_PEAK_AREA | 11.06 |

FIG. 16

【 17 】

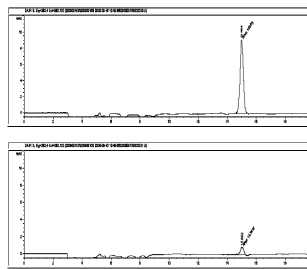
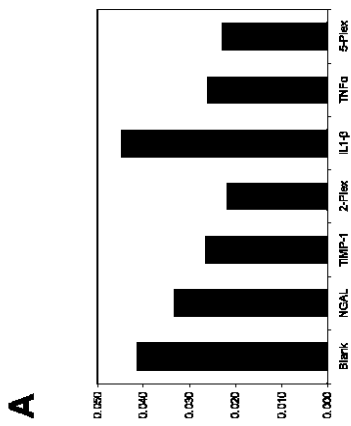
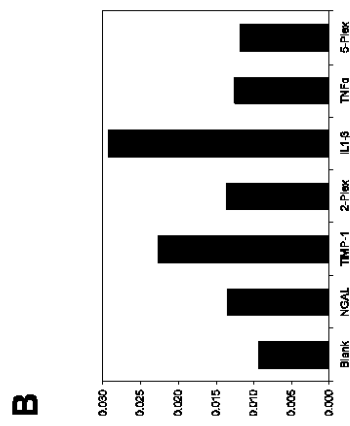


FIG. 17

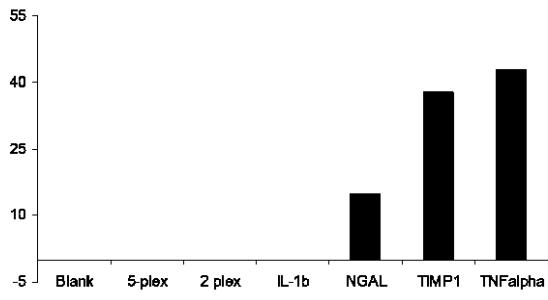
【 18 A 】



【 18 B 】



【 図 19 】



【 図 20 A 】

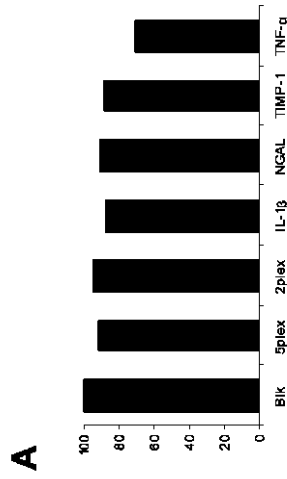
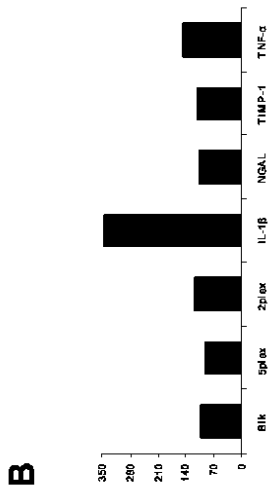
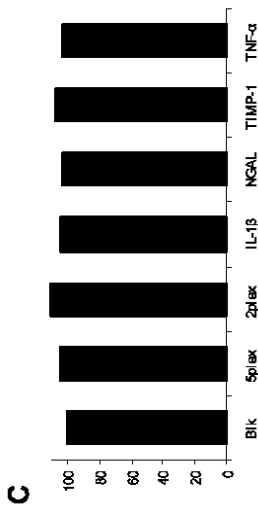


FIG. 19

【 図 20 B 】



【 図 20 C 】



【 2 1 】

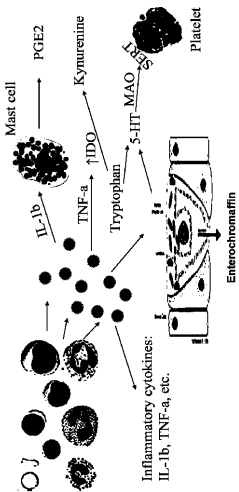


FIG. 21

【 2 2 】

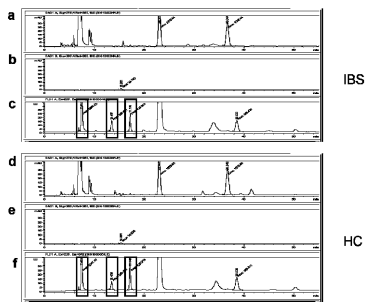


FIG. 22

【 2 3 】

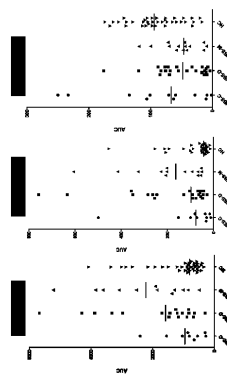


FIG. 23

【 2 4 】

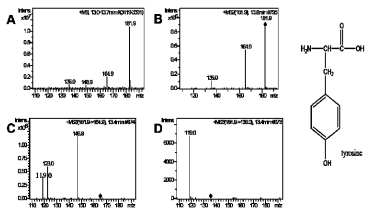


FIG. 24

【 2 5 】

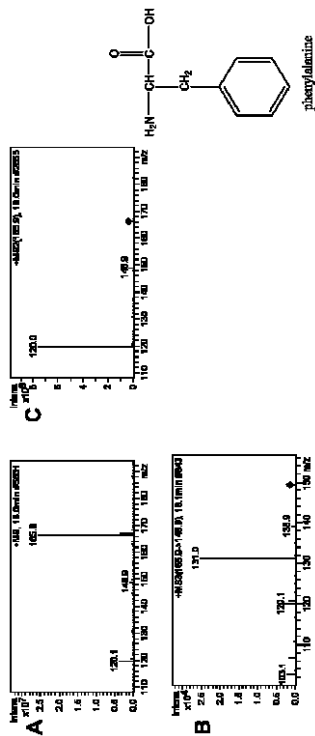


FIG. 25

【 図 3 1 】

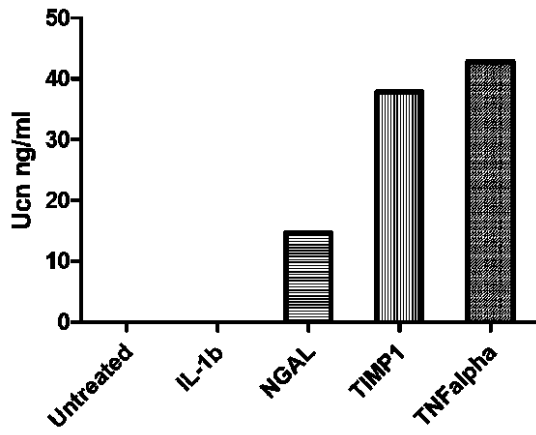


FIG. 31

【 配 列 表 】

2013509593000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/54810

| | | |
|--|--|--|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C12Q 1/68 (2011.01) USPC - 435/6 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(B): C12Q 1/68 (2011.01) USPC: 435/6 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched IPC(B): G01N 33/53, 33/00, 33/48 (2010.01) USPC: 435/7.1, 7.24, 7.92, 7.94; Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST; PGPB, USPT, EPAB, JPAB; Thomson Innovation, GoogleScholar irritable bowel syndrome (IBS), carbohydrate, deficient transferrin, urocortin, c-releasing hormone-binding protein, cortisol, adrenocorticotropic hormone, substance P, nerve growth factor, neurokinin A, neurokinin B, computer, learning statistical classifier | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X ----- Y | US 2008/0085524 A1 (LOIS) 10 April 2008 (10.04.2008) Title, Abstract, para[0010], para[0014], para[0017]-para[0020], para[0029], para[0033], para[0039], para[0050]-para[0053], para[0067], para[0093], para[0096], para[0104], para[0105], para[0106], para[0108], para[0110], para[0198], para[0126], para[0151], para[0192], para[0198], para[0207], para[0236], para[0259], para[0264], para[0290], para[0295], para[0334], para[0352], para[0354], para[0357], para[0399] | 1-8, 14-18, 22, 30, 31, 51, 57-61, 65, 73-74, 78-80, 82-83, 91, 97-101, 105, 113-114, 118, 123, 129-133, 137, 145-146 and 150 ----- 9-13, 19-21, 23-29, 32-34, 52-56, 62-64, 66-72, 75-77, 92-96, 102-104, 106-112, 115-117, 124-128, 134-136, 138-144 and 147-149 |
| Y | US 2006/0105387 A1 (PRIOR et al.) 18 May 2006 (18.05.2006) para[0259], para[0334] | 9, 52, 92, 124 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> | | |
| * 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 January 2011 (19.01.2011) | | Date of mailing of the international search report 22 FEB 2011 |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201 | | Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/54810

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.: 35-50, 81, 84-90, 119-122, and 151-154
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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/54810

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|---|---|--|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| Y | Tache et al. CRF1 receptor signaling pathways are involved in stress-related alterations of colonic function and viscerosensitivity: implications for irritable bowel syndrome. <i>British Journal of Pharmacology</i> (2004) 141, 1321-1330. page 1325, col 2 | 10, 53, 93, 125 |
| Y | Karolyi et al. Altered anxiety and weight gain in corticotropin-releasing hormone-binding protein-deficient mice. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> Vol. 96, pp. 11595-11600, September 1999. page 11595, col 1 | 11, 54, 94, 126 |
| Y | Posserud et al. Altered visceral perceptual and neuroendocrine response in patients with irritable bowel syndrome during mental stress. <i>Gut</i> 2004;53:1102-1108. Abstract | 12, 13, 55, 56, 95, 96, 127, 128 |
| Y | Perdue et al. Stress Impairs Murine Intestinal Barrier Function: Improvement by Glucagon-Like Peptide-2. <i>JPET</i> 314:214-220, 2005. Abstract | 19, 62, 102, 134 |
| Y | Simren et al. An exaggerated sensory component of the gastrocolonic response in patients with irritable bowel syndrome <i>Gut</i> 2001;48:20-27. Abstract | 20, 63, 103, 135 |
| Y | Lauffer et al. Biological relevance of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the gastrointestinal tract. <i>Regulatory Peptides</i> Volume 84, Issues 1-3, 22 October 1999. Abstract | 21, 64, 104, 138 |
| Y | Kilkens et al. Acute tryptophan depletion affects brain-gut responses in irritable bowel syndrome patients and controls. <i>Gut</i> 2004;53:1794?1800. Title, page 1796, col 2, <i>Biochemical parameters</i> | 23, 27, 28, 66, 70, 71, 106, 110, 111, 138, 142, 143 |
| Y | Dunlop et al. Abnormalities of 5-hydroxytryptamine metabolism in irritable bowel syndrome <i>Clinical Gastroenterology and Hepatology</i> Volume 3, Issue 4, Pages 349-357, April 2005. Abstract | 25, 68, 108, 140 |
| Y | WO 2002/020841 A2 (DAVIS et al.) 14 March 2002 (14.03.2002) page 3, in 10-25, page 5, in 25-32, page 6, in 1-5 | 29, 72, 112, 144 |
| Y | US 6,303,617 B1 (GLASKY) 16 October 2001 (16.10.2001) col 5, in 20-50 | 32, 33, 75, 76, 115, 116, 147, 148 |
| Y | Kapeller et al. First evidence for an association of a functional variant in the microRNA-510 target site of the serotonin receptor-type 3E gene with diarrhea predominant irritable bowel syndrome. <i>Human Molecular Genetics</i> , 2008, Vol. 17, No. 19, pg. 2967-2977, page 2970, bottom of col 2 | 34, 77, 117 and 149 |
| Y | Beacroft et al. Postprandial plasma 5-hydroxytryptamine in diarrhoea predominant irritable bowel syndrome: a pilot study <i>Gut</i> 1998;42:42-48. Abstract | 24, 26, 67, 69, 107, 109, 139, 141 |
| Y | Kishimoto et al. Synthesis and Properties of Serotonin O-Sulfate. <i>The Journal of Biochemistry</i> , Vol. 49, No. 5, 1961. Abstract | 24, 67, 107, 139 |
| Y | Gershon et al. RADIOISOTOPIC STUDIES OF THE BINDING, EXCHANGE, AND DISTRIBUTION OF 5-HYDROXYTRYPTAMINE SYNTHESIZED FROM ITS RADIOACTIVE PRECURSOR. <i>J. Physiol.</i> (1966), 186, pp. 451-476. page 29, item 4 | 26, 69, 109, 141 |

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 0 7 K 14/435 (2006.01) G 0 1 N 33/48 Z
 C 0 7 K 14/435

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), 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, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ゴン ホワ
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 3 0 - 2 2 7 4 , サン ディエゴ, カーメル パーク
 ドライブ 1 2 4 5 7

(72) 発明者 ワン シュウイ ロン
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 3 0 , サン ディエゴ, サドル マウンテン コート
 4 5 5 5

(72) 発明者 シン シャラット
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 2 7 , ランチョ サンタ フェ, トップ オブ ザ
 モーニング ウェイ 8 1 7 1

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA20 DA35 DA36 DA54 FB03 JA01 JA03
 4B063 QA01 QA19 QQ22 QQ26 QS33
 4H045 AA30 BA16 BA18 BA19 CA40 DA89 EA50

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | <无法获取翻译> | | |
| 公开(公告)号 | JP2013509593A5 | 公开(公告)日 | 2013-12-05 |
| 申请号 | JP2012537132 | 申请日 | 2010-10-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 雀巢产品技术援助有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | Nesuteku兴业ANONYME | | |
| [标]发明人 | ゴンホフ ワンシュウイロン シンシャラット | | |
| 发明人 | ゴン ホフ ワン シュウイ ロン シン シャラット | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 C12Q1/48 C12Q1/26 G01N33/535 G01N33/48 C07K14/435 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6827 C12Q2600/156 G01N33/6893 G01N2800/065 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.D C12Q1/48.ZNA C12Q1/26 G01N33/53.F G01N33/535 G01N33/48.Z C07K14/435 | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA20 2G045/DA35 2G045/DA36 2G045/DA54 2G045/FB03 2G045/JA01 2G045/JA03 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ22 4B063/QQ26 4B063/QS33 4H045/AA30 4H045/BA16 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/CA40 4H045/DA89 4H045/EA50 | | |
| 代理人(译) | 长谷川良树 黒川智也 清水义 池田 成人 | | |
| 优先权 | 61/256717 2009-10-30 US 61/264588 2009-11-25 US 61/326176 2010-04-20 US | | |
| 其他公开文献 | JP2013509593A | | |

摘要(译)

本发明提供了新的生物标志物，试剂盒以及诊断，预后和亚型IBS的方法。还提供了通过检测本文鉴定的新型IBS生物标志物的血清水平来帮助诊断肠易激综合征的方法。