

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6679309号  
(P6679309)

(45) 発行日 令和2年4月15日(2020.4.15)

(24) 登録日 令和2年3月23日(2020.3.23)

|                                |               |   |  |
|--------------------------------|---------------|---|--|
| (51) Int. Cl.                  | F I           |   |  |
| <b>A 6 1 K 35/74</b> (2015.01) | A 6 1 K 35/74 | A |  |
| <b>A 2 3 L 33/10</b> (2016.01) | A 2 3 L 33/10 |   |  |
| <b>A 6 1 P 1/10</b> (2006.01)  | A 6 1 P 1/10  |   |  |
| <b>A 6 1 P 1/12</b> (2006.01)  | A 6 1 P 1/12  |   |  |
| <b>A 6 1 P 25/28</b> (2006.01) | A 6 1 P 25/28 |   |  |

請求項の数 14 (全 56 頁)

|                    |                               |           |   |
|--------------------|-------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号          | 特願2015-530008 (P2015-530008)  | (73) 特許権者 | 508032284   |
| (86) (22) 出願日      | 平成25年8月28日 (2013.8.28)        |           | カリフォルニア インスティテュート オブ テクノロジー   |
| (65) 公表番号          | 特表2015-529668 (P2015-529668A) |           | アメリカ合衆国, カリフォルニア州 91125, パサデナ, イースト・カリフォルニア・ブールヴァード 1200, エムシー 6-32 |
| (43) 公表日           | 平成27年10月8日 (2015.10.8)        | (74) 代理人  | 100147485   |
| (86) 国際出願番号        | PCT/US2013/057148             |           | 弁理士 杉村 憲司   |
| (87) 国際公開番号        | W02014/036182                 | (72) 発明者  | イレイン シャオ  |
| (87) 国際公開日         | 平成26年3月6日 (2014.3.6)          |           | アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91748 ローランド ハイウェイ イーストヘリテージ プレイス 19387             |
| 審査請求日              | 平成28年8月26日 (2016.8.26)        |           |   |
| 審判番号               | 不服2018-12131 (P2018-12131/J1) |           |   |
| 審判請求日              | 平成30年9月10日 (2018.9.10)        |           |   |
| (31) 優先権主張番号       | 61/694, 679                   |           |   |
| (32) 優先日           | 平成24年8月29日 (2012.8.29)        |           |   |
| (33) 優先権主張国・地域又は機関 | 米国 (US)                       |           |   |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自閉症スペクトラム障害の診断および処置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象の行動性能を向上させる 処置に使用する ための、バクテロイデス属の細菌を含む組成物であって、ここで、

前記バクテロイデス属の細菌が、B . フラジリス、B . テタイオタオミクロン、B . ブルガツス、またはそれらの混合物であり、

該対象が、自閉症スペクトラム障害 ( ASD ) を患っており、

処置を必要とする該対象の 4 - エチルフェニルスルフェート ( 4 E P S ) の血中レベルが、ASD を患っていない対象の血液で観察される 4 E P S の血中レベル

に対して 増加 しており；

該使用が、該処置を必要とする対象において、ASD のうちの少なくとも 1 つ以上の症状における欠陥の改善が観察されるまで、該組成物を投与することによって、該対象の 4 E P S の血中レベルを 減少 させることを含む、組成物。

【請求項 2】

前記バクテロイデス属の細菌が、B . テタイオタオミクロンである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

前記バクテロイデス属の細菌が、B . フラジリスである、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 4】

前記バクテロイデス属の細菌が、B . ブルガツスである、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 5】

前記組成物が、プロバイオティック組成物、栄養補助食品、医薬組成物、またはそれらの混合物である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 6】

前記 4 E P S の血中レベルを減少させることが、前記処置を必要とする対象の胃腸 ( G I ) 窮迫を改善するか、または前記処置を必要とする対象の腸管透過性を低減する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 7】

前記 G I 窮迫が、腹部の痙攣、慢性下痢、便秘、腸管透過性またはそれらの組合せを含む、請求項 6 に記載の組成物。

10

## 【請求項 8】

A S D でない対象群の 4 E P S の参照血中レベルをインビトロで判定すること、処置を必要とする対象の 4 E P S の血中レベルを減少させる前および後に処置を必要とする対象の行動性能を判定すること、またはそれらの両方をさらに含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

## 【請求項 9】

処置を必要とする対象の行動性能を判定することが、自閉症行動チェックリスト ( A B C )、自閉症診断インタビュー - 改訂版 ( A D I - R )、児童自閉症評価スケール ( C A R S ) および / または前言語自閉症診断観察スケジュール ( P L - A D O S ) を使用することを含む、請求項 8 に記載の組成物。

20

## 【請求項 10】

対象の行動性能を向上させる処置に使用するための、バクテロイデス属の細菌を含む組成物であって、ここで、

前記バクテロイデス属の細菌が、B . フラジリス、B . テタイオタオミクロン、B . プルガツス、またはそれらの混合物であり、

該対象が、A S D を患っており、

処置を必要とする該対象の 4 - エチルフェニルスルフェート ( 4 E P S ) の尿中レベルが、A S D を患っていない対象で観察される 4 E P S の尿中レベルに対して増加しており；

該使用が、前記対象において、A S D のうちの少なくとも 1 つ以上の症状における欠陥の改善が観察されるまで、該組成物を投与することによって、前記対象の該 4 E P S の尿中レベルを減少させることを含む、組成物。

30

## 【請求項 11】

自閉症スペクトラム障害 ( A S D ) を患っておりプロバイオティック処置に対して感受性がある対象の腸微生物叢を調節する使用のための、バクテロイデス属の細菌を含むプロバイオティック組成物であって、ここで、

前記バクテロイデス属の細菌が、B . フラジリス、B . テタイオタオミクロン、B . プルガツス、またはそれらの混合物から成る群から選択され、

該使用が、

該対象の 4 - エチルフェニルスルフェート ( 4 E P S ) の血中レベルを判定すること；  
と、

40

該対象の 4 E P S の血中レベルを、A S D および 1 つまたは複数の胃腸障害を患っている対象群の 4 E P S の参照血中レベルと比較すること、ここで、該対象の 4 E P S の血中レベルと該参照血中レベルとの間の実質的な同一性は、該対象が該プロバイオティック処置に対して感受性であることを示す；と、

該対象の腸微生物叢の組成を調整するために該プロバイオティック組成物を投与すること；とを含む、プロバイオティック組成物。

## 【請求項 12】

前記バクテロイデス属の細菌が B . テタイオタオミクロンである、請求項 1 1 に記載のプロバイオティック組成物。

50

## 【請求項 1 3】

前記バクテロイデス属の細菌が B . フラジリスである、請求項 1 1 に記載のプロバイオティック組成物。

## 【請求項 1 4】

前記バクテロイデス属の細菌が B . ブルガツスである、請求項 1 1 に記載のプロバイオティック組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願

米国特許法第 1 1 9 条 ( e ) の下、本出願は、その全体が参照により明示的に本明細書に組み込まれる、2 0 1 2 年 8 月 2 9 日に本出願の米国特許仮出願第 6 1 / 6 9 4 , 6 7 9 号の優先権を主張する。

## 【0002】

## 連邦後援研究開発に関する表明

本発明は、軍によって与えられた補助金番号 W 8 1 X W H - 1 1 - 0 5 1 5、米国国立衛生研究所によって与えられた卒業生訓練補助金番号 5 T 3 2 G M 0 7 7 3 7、全米科学財団によって与えられた卒業生研究奨励金番号 D G E - 0 7 0 3 2 6 7、および国立精神衛生研究所補助金番号 M H 1 0 0 5 5 6 の下で、政府の支援によりもたらされた。政府は、本発明に一定の権利を有する。

## 【0003】

## 配列表の参照

本出願は、電子フォーマットの配列表とともに本出願されている。配列表は、2 0 1 3 年 8 月 2 8 日に作成された、S E Q L I S T I N G . T X T という名称のサイズが 4 K b のファイルで提供される。配列表の電子フォーマットの情報は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0004】

本出願は一般に、自閉症スペクトラム障害 ( A S D ) の診断および処置の分野に関する。

## 【背景技術】

## 【0005】

自閉症スペクトラム障害 ( A S D ) は、常動行動ならびに言葉および社会的交流の欠陥を特徴とする重大な神経発達障害である。自閉症の報告発病率は 2 0 0 8 年現在の米国で 8 8 例の出産中 1 例へと速やかに増加し ( C D C、2 0 1 2 年)、来たるべき数十年におけるかなりの医学的および社会的負担を表している。A S D の再現可能な分子診断は開発されておらず、A S D の核心的症状を処置するための療法は限定され、再現可能な分子診断は開発されていない。自閉症スペクトラム障害 ( A S D ) の多くの研究は疾患の遺伝子、行動および神経学の面に重点を置いているが、A S D の病原性における環境危険因子 ( H a l l m a y e r ら、2 0 1 1 年)、免疫調節不全および追加の末梢破壊の主要な役割が、近年かなりの注目を集めている。同じ診断を共有する個体間の著しい異質性は、A S D のために様々な病因があるという支配的な概念と一貫している。さらに、A S D 症状のスペクトラムならびに特定の原因、処置および分子バイオマーカーを同定することの困難性は、A S D の臨床サブタイプをより明確に定義し、サブクラスの A S D 個体に合わせた処置を提供する必要性を鮮明に示す。

## 【先行技術文献】

## 【非特許文献】

## 【0006】

【非特許文献 1】H a l l m a y e r ら、2 0 1 1 年

## 【発明の概要】

10

20

30

40

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

本明細書で開示される一部の実施形態は、対象の行動性能を向上させるための方法であって、処置を必要とする対象の自閉症スペクトラム障害（ASD）関連代謝産物の血中レベルを判定することと、対象の行動性能の向上が観察されるまで対象のASD関連代謝産物の血中レベルを調整することを含む方法に関する。

## 【0008】

一部の実施形態では、対象は、不安、自閉症スペクトラム障害（ASD）、またはASDの症状の1つもしくは複数を伴う病的状態を患っている。一部の実施形態では、対象はASDを患っている。

10

## 【0009】

一部の実施形態では、ASD関連代謝産物の血中レベルを調整することは、対象の腸微生物叢の組成を調整することを含む。一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、糞便の移植を含む。一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、バクテロイデス属の細菌を含む組成物を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、バクテロイデス属の細菌は、B.フラジリス、B.テタイオタオミクロン、B.ブルガツス、またはそれらの混合物である。

## 【0010】

一部の実施形態では、組成物は、プロバイオティック組成物、栄養補助食品、医薬組成物またはそれらの混合物である。

20

## 【0011】

一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、対象のクロストリジア綱の細菌のレベルを低減することを含む。一部の実施形態では、クロストリジア綱の細菌は、ラクノスピラ科である。一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、対象のルミノコッカス科、エリシペロトリクス科および/またはアルカリゲネス科の細菌のレベルを増加させることを含む。

## 【0012】

一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、表1に掲載される代謝産物の1つである。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、トリプトファン代謝に関与する代謝産物、脂肪酸代謝に関与する代謝産物、プリン代謝に関与する代謝産物、グリコレート、イミダゾールプロピオネートまたはN-アセチルセリンである。一部の実施形態では、トリプトファン代謝に関与する代謝産物は、4-エチルフェニルスルフェート、インドールピルベート、インドリル-3-アクリロイルグリシンまたはセロトニンである。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、4-エチルフェニルスルフェート、インドールピルベート、グリコレートまたはイミダゾールプロピオネートである。

30

## 【0013】

一部の実施形態では、対象のASD関連代謝産物の血中レベルを調整することは、ASD関連代謝産物に対する抗体、ASD関連代謝産物のin vivo合成の中間体に対する抗体、またはASD関連代謝産物のin vivo合成の基質に対する抗体を対象に投与することを含む。

40

## 【0014】

一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、4-エチルフェニルスルフェートまたはインドールピルベートである。

## 【0015】

一部の実施形態では、対象のASD関連代謝産物の血中レベルを調整することは、ASD関連代謝産物のin vivo合成に関与する酵素を阻害することを含む。

## 【0016】

一部の実施形態では、ASD関連代謝産物の血中レベルを調整することは、対象の胃腸（GI）窮迫を改善する。一部の実施形態では、GI窮迫は、腹部の痙攣、慢性下痢、便秘、腸管透過性またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物

50

の血中レベルを調整することは、対象の腸管透過性を低減する。

【0017】

一部の実施形態では、本方法は、自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルを判定することを含む。一部の実施形態では、本方法は、対象のASD関連代謝産物の血中レベルを調整する前および後に、対象の行動性能を判定することを含む。

【0018】

一部の実施形態では、対象の行動性能を判定することは、自閉症行動チェックリスト(ABC)、自閉症診断インタビュー-改訂版(ADI-R)、児童自閉症評価スケール(CARS)および/または前言語自閉症診断観察スケジュール(PLADOS)を使用することを含む。

10

【0019】

一部の実施形態では、対象の行動性能を向上させるための方法であって、処置を必要とする対象の自閉症スペクトラム障害(ASD)関連代謝産物の尿中レベルを判定することと、対象の行動性能の向上が観察されるまで対象のASD関連代謝産物の尿中レベルを調整することを含む方法も本明細書で開示される。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、4-メチルフェニル、4-メチルフェニルスルフェートまたはインドリル-3-アクリロイルグリシンである。

【0020】

一部の実施形態では、ASD関連代謝産物の尿中レベルを調整することは、対象の腸微生物叢の組成を調整することを含む。一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、バクテロイデス属の細菌を含む組成物を対象に投与することを含む。

20

【0021】

ここで提供される一部の実施形態は、プロバイオティック処置に対する自閉症スペクトラム障害(ASD)を患っている対象の感受性を評価するための方法であって、対象のB.フラジリス応答性代謝産物の血中レベルを判定することと、対象のB.フラジリス応答性代謝産物の血中レベルを、ASDおよび1つまたは複数の胃腸障害を患っている対象の代謝産物の参照レベルと比較することとを含み、対象の代謝産物の血中レベルと参照レベルの間の実質的な同一性は、対象がプロバイオティック処置に感受性であることを示す方法に関する。

【0022】

一部の実施形態では、本方法は、対象の腸微生物叢の組成を調整することを含む。

30

【0023】

一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、バクテロイデス属の細菌を含む組成物を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、バクテロイデス属の細菌は、B.フラジリス、B.テタイオタオミクロン、B.プルガツス、またはそれらの混合物である。

【0024】

一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、糞便の移植を含む。

【0025】

一部の実施形態では、B.フラジリス応答性代謝産物は、表2に掲載される代謝産物の1つである。

40

【0026】

本明細書で開示される一部の実施形態は、対象の腸管透過性を低減することを含む、自閉症スペクトラム障害(ASD)を患っている対象の胃腸(GI)窮迫を軽減するための方法に関する。一部の実施形態では、GI窮迫は、腹部の痙攣、慢性下痢、便秘、腸管透過性またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、腸管透過性を低減することは、対象の腸微生物叢の組成を調整することを含む。

【0027】

一部の実施形態では、対象の自閉症スペクトラム障害(ASD)を診断するための方法であって、対象の腸のサイトカインのレベルおよび1つまたは複数のASD関連代謝産物

50

の血中レベルを判定することと、自閉症でない対象群のサイトカインおよび代謝産物の参照レベルと比較して、対象の腸のサイトカインのレベルおよびASD関連代謝産物の少なくとも1つまたは複数の血中レベルに変化があるかどうかを検出することを含み、腸のサイトカインの量および1つまたは複数の代謝産物の少なくとも1つの血中レベルの変化は、対象がASDを患っていることを示す方法も本明細書で開示される。

#### 【0028】

一部の実施形態では、対象の自閉症スペクトラム障害(ASD)を診断するための方法であって、対象の2つ以上のASD関連代謝産物の血中レベルを判定することと、自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルと比較して、対象の2つ以上のASD関連代謝産物の血中レベルに変化があるかどうかを検出することを含み、2つ以上のASD関連代謝産物の少なくとも2つの血中レベルの変化は、対象がASDを患っていることを示す方法が本明細書にさらに開示される。

10

#### 【0029】

一部の実施形態では、ASD関連代謝産物の1つまたは複数は、表1に掲載される代謝産物から選択される。一部の実施形態では、1つまたは複数のASD関連代謝産物は、トリプトファン代謝に関与する代謝産物、脂肪酸代謝に関与する代謝産物、プリン代謝に関与する代謝産物、グリコレート、イミダゾールプロピオネート、N-アセチルセリン、またはそれらの任意の組合せを含む。一部の実施形態では、トリプトファン代謝に関与する代謝産物は、4-エチルフェニルスルフェート、インドールピルベート、インドリル-3-アクリロイルグリシンまたはセロトニンである。一部の実施形態では、サイトカインは、インターロイキン-6(IL-6)である。一部の実施形態では、本方法は、対象がASDを患っていることが示された場合に、対象の行動性能を向上させるために対象の1つまたは複数のASD関連代謝産物のレベルを変化させることを含む。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0030】

【図1】MIA子孫が、欠陥のあるGI障壁の完全性ならびに密着帯構成成分およびサイトカインの異常な発現を示すことを示す図である。図1A。腸管透過性アッセイ、FITC-デキストランの経口強制栄養の後に血清で検出されるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)の蛍光強度を測定する。DSS: n = 6、S: 成体 n = 16; 若い個体 n = 4、P: 成体 n = 17; 若い個体 n = 4。データは、成体生理食塩水子孫で観察された蛍光強度に標準化される。図1B。成体生理食塩水およびポリ(I:C)子孫の結腸でのベータアクチンと比較した密着帯構成成分の発現。各遺伝子のデータは、生理食塩水子孫での発現レベルに標準化される。n = 8。図1C。成体生理食塩水およびポリ(I:C)子孫の結腸でのベータアクチンと比較したサイトカインおよび炎症性マーカーの発現。各遺伝子のデータは、生理食塩水子孫での発現レベルに標準化される。n = 6 ~ 21。図1D。成体生理食塩水およびポリ(I:C)子孫の結腸での全タンパク質含有量と比較したサイトカインおよびケモカインのタンパク質レベル。n = 10。データは、平均 ± SEMで提示される。\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001。DSS = デキストラン硫酸ナトリウム、S = 生理食塩水 + ビヒクル、P = ポリ(I:C) + ビヒクル。各実験について、成体生理食塩水およびポリ(I:C)子孫を3週齢時にビヒクルで処置し、ポリ(I:C) + B.フラジリス処置群と同時にデータを収集した。

30

40

【図2】B.フラジリス処置は、小腸での密着帯発現およびサイトカインプロファイルにほとんど影響を及ぼさないことを示す図である。図2A。成体生理食塩水およびポリ(I:C)子孫の小腸でのベータアクチンと比較した密着帯構成成分の発現。各遺伝子のデータは、生理食塩水子孫での発現レベルに標準化される。n = 8。図2B。MIA子孫の小腸でのベータアクチンと比較した注目すべき密着帯構成成分の発現に及ぼすB.フラジリス処置の影響の数量化。生理食塩水およびポリ(I:C)のデータは、パネル(A)の通りである。n = 8。図2C。成体の生理食塩水、ポリ(I:C)およびポリ(I:C) + B.フラジリス子孫の小腸での全タンパク質含有量と比較したサイトカインおよびケモカインのタンパク質レベル。データは、生理食塩水子孫での発現レベルに標準化される。棒

50



全OTUに基づく非加重UniFracベースの3D PCoAプロットであり、成体MIAと対照子孫の間の腸微生物叢の全体的差を例示する。各主座標(PC)によって説明される変異パーセントは、軸の上に示す。図5Bは、クロストリジア綱およびバクテロイデス綱OTUの二次サンプリングに基づく非加重UniFracベースの3D PCoAプロットである(試料につき2003個の読取り)。図5Cは、クロストリジア綱およびバクテロイデス綱OTUを引いた後に残されたOTUの二次サンプリングに基づく非加重UniFracベースの3D PCoAプロットである(試料につき47個の読取り)。図5Dは、成体生理食塩水およびポリ(I:C)子孫からの個々の複製生物(右、y軸)の腸微生物叢の特異なOTUの相対的存在度(下、x軸)を示すヒートマップであり、強度が増加する赤色は、特定の試料の特異なOTUの相対的存在度の増加を表す。処置群を有意に識別する全てのOTUをプロットする。リボソームデータベースプロジェクトによって命名された家族レベルの分類学的帰属を、各OTUについて示す。図5Eは、最も豊富な分類群(左)および最も豊富でない分類群(右)の、クラスレベルでの分類学的帰属によって分類されたOTUの平均の相対的存在度を示す。n = 10。ポリ(I:C) + B・フラジリス処置群について、データを同時に収集し、分析した。

【図6】B・フラジリス処置は、MIA子孫において、GI障壁の完全性ならびに密着帯構成成分およびサイトカインの結腸発現の欠陥を修正することを示す図である。図6A。腸管透過性アッセイ、FITC-デキストランの経口強制栄養の後に血清で検出されるフルオレセインイソチオシアネート(FITC)の蛍光強度を測定する。データは、成体生理食塩水子孫で観察された蛍光強度に標準化される。DSS、生理食塩水およびポリ(I:C)のデータは、図1の通りである。ポリ(I:C) + B・フラジリス: n = 9。図6B。成体の生理食塩水、ポリ(I:C)およびポリ(I:C) + B・フラジリス子孫の結腸でのベータアクチンと比較した密着帯構成成分の発現。各遺伝子のデータは、生理食塩水子孫での発現レベルに標準化される。生理食塩水およびポリ(I:C)のデータは、図1の通りである。棒の直上のアスタリスクは、生理食塩水対照(黒線で表すように、1に標準化される)と比較した有意性を示し、グラフの最上部のアスタリスクは、ポリ(I:C)とポリ(I:C) + B・フラジリス群の間の統計的有意性を表す。n = 8。図6C。クローディン8の免疫蛍光染色。n = 5の代表的画像。図6D。ウエスタンプロットで測定された、生理食塩水、ポリ(I:C)およびポリ(I:C) + B・フラジリス子孫からの結腸におけるクローディン8(左)およびクローディン15(右)のタンパク質レベル。同じプロットからの代表的なシグナルを、下に表す。データは、生理食塩水子孫で検出されたシグナル強度に標準化される。n = 3。図6E。成体の生理食塩水、ポリ(I:C)およびポリ(I:C) + B・フラジリス子孫の結腸でのベータアクチンと比較したIL-6の発現。データは、生理食塩水子孫での発現レベルに標準化される。生理食塩水およびポリ(I:C)のデータは、図1の通りである。ポリ(I:C) + B・フラジリス: n = 3。図6F。成体の生理食塩水、ポリ(I:C)およびポリ(I:C) + B・フラジリス子孫の結腸での全タンパク質含有量と比較したサイトカインおよびケモカインのタンパク質レベル。データは、生理食塩水子孫での発現レベルに標準化される。生理食塩水およびポリ(I:C)のデータは、図1の通りである。棒の直上のアスタリスクは、生理食塩水対照(黒線で表すように、1に標準化される)と比較した有意性を示し、グラフの最上部のアスタリスクは、ポリ(I:C)とポリ(I:C) + B・フラジリス群の間の統計的有意性を表す。n = 10。データは、平均 ± SEMで提示される。\* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001、n.s. = 有意でない。DSS = デキストラン硫酸ナトリウム、S = 生理食塩水 + ビヒクル、P = ポリ(I:C) + ビヒクル、P + BF = ポリ(I:C) + B・フラジリス。

【図7】IL-6は、クローディン8および15の結腸発現をモジュレートすることを示す図である。図7A。組換えマウスIL-6の漸増濃度とex vivoで4時間培養した成体野生型マウスの結腸でのベータアクチンと比較した、クローディン8(左)およびクローディン15(右)の用量依存的発現。データは、0 ng/mlのIL-6対照で検出された発現レベルに標準化される。n = 3。図7B。80 ng/mlの組換えマウスI

10

20

30

40

50



L - 6 と培養した成体野生型マウスの結腸でのベータアクチンと比較した、クローディング 8 (左) およびクローディング 15 (右) の時間依存的発現。n = 3。図 7 C。組換えマウス IL - 6 による処置から 12 時間後の成体野生型マウスの結腸でのベータアクチンと比較した、クローディング 8 (上) およびクローディング 15 (下) の発現。n = 3。データは、平均 ± SEM で提示される。

【図 8】B . フラジリス処置は、M I A 子孫で腸管微生物叢の組成を変化させ、種レベルの異常を修正することを示す図である。図 8 A は、全ての O T U に基づく非加重 U n i F r a c ベースの 3 D P C o A プロットである。各主座標 ( P C ) によって説明される変異パーセントは、軸の上に示す。生理食塩水およびポリ ( I : C ) のデータは、図 2 の通りである。図 8 B . M I A によって有意に変化し、B . フラジリス処置によって完全に回復する、ラクノスピラ科 (上) およびバクテロイデス目 (下) の鍵となる O T U の相対的存在度。データは、平均 ± SEM で提示される。図 8 C は、パネル B に提示された鍵となる O T U の 16 S r R N A 遺伝子配列の最近接分析に基づく系統樹である。実線で示す分岐はラクノスピラ科の O T U を示し、破線で示す分岐はバクテロイデス目の O T U を示す。6 つの数で標識した分類群は、ポリ ( I : C ) 子孫で有意に上昇し、B . フラジリス処置によって修正された O T U を示す。n = 10。

【図 9】M I A 子孫の処置の後に、B . フラジリスの持続的な定着の証拠がないことを示す図である。図 9 A . ビヒクルまたは B . フラジリスによる成体子孫の処置から 1、2 および 3 週間後に収集した糞便試料における、B . フラジリス 16 S 配列 (上) および細菌 16 S 配列 (下) のレベル。B . フラジリスが定着した無菌マウスを、陽性対照として使用した。データは定量的 R T - P C R サイクリング閾値 [ C ( t ) ] で提示され、そこにおいて、C ( t ) > 34 (ハッチ線) は無視できると考えられ、C ( t ) < 34 については、より小さい C ( t ) はより高い存在度に等しい。n = 1、各々は 3 ~ 5 個の独立ケージからプールされた試料を表す。図 9 B . ビヒクルまたは B . フラジリスによる成体子孫の処置から 1、2 および 3 週間後に収集した糞便試料における、B . フラジリス 16 S 配列 (上) および細菌 16 S 配列 (下) のレベル。B . フラジリスが定着した無菌マウスを、陽性対照として使用した。データは定量的 R T - P C R サイクリング閾値 [ C ( t ) ] で提示され、そこにおいて、C ( t ) > 34 (ハッチ線) は無視できると考えられ、C ( t ) < 34 については、より小さい C ( t ) はより高い存在度に等しい。n = 1、各々は 3 ~ 5 個の独立ケージからプールされた試料を表す。データは、平均 ± SEM で提示される。S = 生理食塩水 + ビヒクル、P = ポリ ( I : C ) + ビヒクル、P + B F = ポリ ( I : C ) + B . フラジリス、G F + B F = 無菌 + B . フラジリス。

【図 10】B . フラジリス処置は、M I A 子孫で自閉症関連の行動異常を改善することを示す図である。図 10 A . 10 分の試験中の、50 × 50 c m オープンフィールド内で移動した総距離 (右)、17 × 17 c m 中心四角で費やした持続時間 (中央)、およびフィールドの中心への立入り回数 (左) で測定した、オープンフィールド探査アッセイでの不安様および運動行動。n = 35 ~ 75。図 10 B . パルスだけへの驚愕反応と 5 d b または 15 d b の前パルスが先行したパルスへの驚愕反応の間の差をパーセントで測定した、前パルス障害アッセイでの知覚運動ゲーティング。処置の影響は、ボンフェローニの事後検定による反復測定二元配置 A N O V A によって評価した。n = 35 ~ 75。図 10 C . 10 分の試験中の 3 × 6 アレイへのマーブルの反復埋め込み。n = 16 ~ 45。図 10 D . 10 分の社会的遭遇の間に成体雄マウスによって発生された超音波発声の総数 (左)、平均持続時間 (中央) および総持続時間 (右) で測定された伝達行動。n = 10。図 10 E は、B . フラジリスで処置した M I A 子孫での社交性の欠陥を示す。図 10 F は、B . フラジリスで処置した M I A 子孫での社会的好みの欠陥を示す。グラフは、マウスの 3 ~ 6 個の独立したコホートで得られた累積結果を表す。データは、平均 ± SEM で提示される。\* p < 0 . 05、\*\* p < 0 . 01、\*\*\* p < 0 . 001。S = 生理食塩水 + ビヒクル、P = ポリ ( I : C ) + ビヒクル、P + B F = ポリ ( I : C ) + B . フラジリス。ポリ ( I : C ) + B . フラジリス P S A およびポリ ( I : C ) + B . テタイオタオミクロン処置群について、データを同時に収集した。

10

20

30

40

50

【図11】MIA子孫での自閉症関連の行動の改善は、B・フラジリス処置に特異的でないことを示す図である。図11A。10分の試験中の、50×50cmオープンフィールド内で移動した総距離（右）、17×17cm中心四角で費やした期間（中央）、およびフィールドの中心への立入り回数（左）で測定した、オープンフィールド探査アッセイでの不安様および運動行動。ポリ（I：C）+B・テタイオタオミクロン：n=32。図11B。10分の試験中の3×6アレイへのマープルの反復埋め込み。ポリ（I：C）+B・テタイオタオミクロン：n=32。図11C。10分の社会的遭遇の間に成体雄マウスによって発生された超音波発声の総数（左）、平均持続時間（中央）および総持続時間（右）で測定された伝達行動。ポリ（I：C）+B・テタイオタオミクロン：n=10。図11D。パルスだけへの驚愕反応と5dbまたは15dbの前パルスが先行したパルスへの驚愕反応の間の差をパーセントで測定した、前パルス阻害アッセイでの知覚運動ゲーティング。処置の影響は、ボンフェローニの事後検定による反復測定二元配置ANOVAによって評価した。ポリ（I：C）+B・テタイオタオミクロン：n=32。全てのパネルについて、生理食塩水、ポリ（I：C）およびポリ（I：C）+B・フラジリスのデータは、図10の通りである。グラフは、マウスの3～6個の独立したコホートで得られた累積結果を表す。データは、平均±SEMで提示される。\* p<0.05、\*\* p<0.01、\*\*\* p<0.001。S=生理食塩水+ビヒクル、P=ポリ（I：C）+ビヒクル、P+BF=ポリ（I：C）+B・フラジリス、P+BT=ポリ（I：C）+B・テタイオタオミクロン。

10

【図12】B・フラジリス処置は、統計的に有意な血清中代謝産物変化を引き起こし、脂肪酸代謝およびプリンサルベージ経路に関連する生化学物質の広範囲にわたる変化を伴うことを示す図である。GC/LC-MSによる測定で、生理食塩水対照と比較して、B・フラジリス処置MIA子孫の血清で有意に変化する103個の代謝産物のレベル。色は、生理食塩水子孫で検出された代謝産物濃度に対する変化倍率（fold change）を示し、赤い色相は対照と比較して増加したレベルを表し、緑の色相は対照と比較して減少したレベルを表す（左上の説明文を参照）。示される全ての変化は、対比による二元配置ANOVAによりp<0.05である。P=ポリ（I：C）、P+BF=ポリ（I：C）+B・フラジリス。n=8。

20

【図13】B・フラジリス処置は、不安様行動を十分に誘導する微生物依存性代謝産物である4-エチルフェニルスルフェート（4EPS）の、MIAによって誘導された変化を修正することを示す図である。図13Aは、MIAによって有意に変化し、B・フラジリス処置によって回復した、GC/LC-MSによって検出された代謝産物の相対的数量化を示す。n=8。図13Bは、従来通り定着させた（特定病原体除去、SPF）マウスに対する成体無菌（GF）マウスの血清でLC-MSによって検出された4EPSの濃度を示す。U.D.=検出不能。n=1、各々は3～5匹のマウスからプールされた血清を表す。図13C。4EPSまたは生理食塩水ビヒクルで処置した従来の野生型マウスの、オープンフィールド探査アッセイにおける不安様および運動行動。データは、10分の試験中の、50×50cmオープンフィールド内で移動した総距離（右）、および17×17cm中心四角で費やした持続時間（左）を示す。4EPSおよびビヒクルで処置したマウスの間に、フィールドの中心への立入り回数の差はない（データ示さず）。n=10。図13D。対照と比較した4EPS処置マウスにおける、前パルス阻害アッセイでの強化された驚愕反射。データは、120dbのパルスに応じて起こった驚愕の平均強度（左）、および5dbまたは15dbの前パルスが先行したときのパルスの阻害パーセント（右）を示す。n=10。データは、平均±SEMで提示される。\* p<0.05、\*\* p<0.01、S=生理食塩水+ビヒクル、P=ポリ（I：C）+ビヒクル、P+BF=ポリ（I：C）+B・フラジリス、SPF=特定病原体除去（従来通りに定着した）、GF=無菌、Veh.=ビヒクル（生理食塩水）、4EPS=4-エチルフェニルスルフェート。

30

40

【図14】宿主-微生物相互作用による自閉症関連代謝産物の合成を示す図である。図14A。微生物チロシン代謝および宿主硫酸化による、4EPS（MIA血清で上昇し、B・フラジリス処置によって回復することが見出されている）およびp-クレゾール（AS

50

D 個体の尿で上昇することが報告されている)の合成を例示する図。図 1 4 B。微生物トリプトファン代謝および宿主グリシン抱合からの、インドールピルベート (M I A 血清で上昇し、B . フラジリス処置によって回復することが見出されている) およびインドリル - 3 - アクリロイルグリシン (A S D 個体の尿で上昇することが報告されている) の合成を例示する図。実線矢印は、公知の生物学的変換を表す。点線矢印は、予測された生物学的変換を表す。

【図 1 5】4 - エチルフェニルスルフェート (4 E P S) の合成、検出および *i n v i v o* 実験を示す図である。図 1 5 A。還流ベンゼン中で 4 - エチルフェノールを三酸化硫黄 - ピリジンで処理してピリジニウム塩を生成し、続いて K + 樹脂の上でイオン交換を行ってカリウム塩を生成することによる 4 E P S 合成の図。図 1 5 B。L C / M S によって分析した、カリウム 4 E P S の既知濃度の用量反応曲線および線状回帰分析。図 1 5 C。成体野生型マウスへの 3 0 m g / k g のカリウム 4 E P S の単回 *i . p .* 注射の後の、血清中 4 E P S の時間依存的増加。図 1 5 D。1 0 分の社会的遭遇の間に成体雄マウスによって発生された超音波発声の総数 (左)、平均持続時間 (中央) および総持続時間 (右) で測定された伝達行動。n = 5。図 1 5 E。1 0 分の試験中の 3 × 6 アレイへのマーブルの反復埋め込み。n = 1 0。データは、平均 ± S E M で提示される。V e h . = ビヒクル (生理食塩水)、4 E P S = 4 - エチルフェニルスルフェート。

【発明を実施するための形態】

【0031】

以下の詳細な説明では、本明細書の一部を形成する添付図を参照する。図では、文脈が特に指図しない限り、類似した記号は類似した構成成分を一般的に特定する。詳細な説明、図および請求項に記載される例示的实施形態は、限定するものでない。本明細書に提示される主題の精神または範囲を逸脱しない範囲で、他の実施形態を利用することができ、他の変更を加えることができる。本明細書に一般的に記載され、図で例示される本開示の態様を多種多様な異なる立体配置で配置し、置換し、組み合わせ、分離し、設計することができることは容易に理解され、その全ては本明細書で明示的に企図される。

【0032】

自閉症スペクトラム障害 (A S D) は、常動行動ならびに言葉および社会的交流の欠陥を特徴とする重大な神経発達障害である。本明細書に記載されるように、様々な代謝産物が A S D に関連する。対象におけるこれらの代謝産物のレベルは、A S D を診断するために判定し、使用することができ、または、例えば対象の行動性能を向上させることによって、A S D の処置のために調整することができる。さらに、本明細書に記載されるように、様々な代謝産物が B . フラジリス処置に応答性であり、それらの代謝産物は、プロバイオティック処置に対する A S D を患っている対象の感受性を評価するために使用することができる。

【0033】

一部の実施形態では、対象の行動性能を向上させるために、処置を必要とする対象の循環中の代謝産物のレベルを判定し、調整する。処置を必要とする対象は、不安、A S D、または A S D の症状の 1 つもしくは複数を伴う病的状態を患っている対象であってもよい。対象の循環中の代謝産物のレベルは、代謝産物の血中レベル、例えば血清中レベルまたは血漿中レベルであってもよい。一部の実施形態では、対象の行動性能を向上させるために、対象の代謝産物の尿中または糞便中レベルを判定し、調整する。

【0034】

一部の実施形態では、対象が A S D を有するかどうか診断するために、対象の循環中の代謝産物のレベルを検出し、自閉症でない集団での代謝産物の参照レベルと比較する。対象の循環中の代謝産物のレベルは、代謝産物の血中レベル、例えば血清中レベルまたは血漿中レベルであってもよい。

【0035】

定義

特に定義されない限り、本明細書で使用される専門用語および科学用語は、本開示が属

10

20

30

40

50

する分野の当業者が通常理解するのと同じ意味を有する。例えば、Singletonら、Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 第2版、J. Wiley & Sons (New York, NY 1994年) ; Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989年)を参照。本開示のために、以下の用語が下で定義される。

【0036】

本明細書で用いるように、用語「対象」は、哺乳動物などの脊椎動物である。用語「哺乳動物」は哺乳綱に属する個体と定義され、限定されずにヒト、家畜ならびに飼育動物、および動物園、スポーツまたは愛玩動物、例えばヒツジ、イヌ、ウマ、ネコまたはウシが含まれる。一部の実施形態では、対象はヒトである。

10

【0037】

本明細書で用いるように、用語「状態/障害/症状」または「行動異常」は、対象が表す症状、例えば、それらに限定されないが、不安、脆弱X、Ret t症候群、結節硬化、強迫性障害、注意欠陥障害、統合失調症、自閉症(古典的自閉症)、アスペルガー障害(アスペルガー症候群)、他に規定されない広汎性発達障害(PDD-NOS)、児童統合障害(CDD)、またはASDの症状の1つもしくは複数を伴う病的状態を指す。

【0038】

本明細書で用いるように、用語「処置を必要とする対象」は、上で指摘した行動障害/症状の1つまたは複数を表しているか患っている対象を指す。標準の行動試験プロトコル/ガイドラインを使用して、適格者は処置を必要とするそのような個体を同定することができる。個体の障害および/または症状に向上があるかどうか判定するために、同じ行動試験プロトコル/ガイドラインを使用することもできる。

20

【0039】

本明細書で用いるように、用語「行動性能の向上」は、いかなる程度であれ、不安、ASDまたはASDの症状の1つもしくは複数を伴う病的状態を患っている個体が表す行動障害、症状および/または異常の1つまたは複数の予防またはその重症度もしくは頻度の低減を指す。行動症状の非限定的な例には、反復性の行動、前パルス阻害(PPH)の減少および不安の増加が含まれる。向上は、処置を受けている個体自身、または別の者(医師その他)によって観察される。

30

【0040】

本明細書で用いるように、用語「処置」は、患者、特にASDを患っている患者が表す疾患、障害または生理的状态に応じて加えられる臨床介入を指す。処置の目的には、症状の軽減または予防、疾患、障害または状態の進行または悪化を減速するか、停止すること、および疾患、障害または状態の寛解の1つまたは複数が含まれるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、「処置」は、治療的処置および予防的または防止的措置を指す。処置を必要とする者には、疾患または障害または望ましくない生理的状态に既に侵されている者、ならびに疾患または障害または望ましくない生理的状态を予防すべき者が含まれる。例えば、一部の実施形態では、処置は、ASD関連の行動を含む、対象の行動性能を向上させることができる。本明細書で用いるように、用語「予防」は、それらの行動症状を後に発現する個体の負担を低減する任意の活性を指す。これは、一次、二次および三次の予防レベルで起こり：a)一次予防は、症状/障害/状態の発達を避け；b)二次予防活性は状態/障害/症状の処置の初期段階に向けられ、それによって、状態/障害/症状の進行および症状の出現を予防する介入の機会を増加させる；c)三次予防は、例えば機能回復、および/または任意の状態/障害/症状もしくは関連する合併症を低減することによって、既に確立された状態/障害/症状の悪影響を低減する。

40

【0041】

「薬学的に許容される」担体は、用いられる投薬量および濃度で、それに曝露される細胞または哺乳動物に無毒な担体である。「薬学的に許容される」担体は、限定されずに、

50

選択される適用様式、例えば経口適用または注射に適し、従来の医薬用製剤の形、例えば錠剤、顆粒剤、粉末、カプセル剤などの固体、および溶液、乳濁液、懸濁液等の液体で投与される、有機または無機の、固体か液体の賦形剤であってもよい。しばしば、生理的に許容される担体は、リン酸緩衝液またはクエン酸緩衝液などのpH緩衝水溶液である。生理的に許容される担体は、以下の1つまたは複数を含むこともできる：抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、低分子量（約10残基未満の）ポリペプチド、タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン、アミノ酸、炭水化物、例えばグルコース、マンノースまたはデキストリン、EDTAなどのキレート化剤、マンニトールまたはソルビトールなどの糖アルコール、ナトリウムなどの塩形成対イオン、ならびに非イオン性界面活性剤、例えばTween（商標）、ポリエチレングリコール（PEG）およびPluronic（商標）。補助剤、安定剤、乳化剤、滑沢剤、結合剤、pH調整剤コントローラ、等張剤および他の従来の添加剤を、担体に加えることもできる。

10

#### 【0042】

薬学的に許容されるか適当な担体には、GI管の障害状況に有益であることが知られている他の化合物（例えば、抗酸化剤、例えばビタミンC、ビタミンE、セレンまたは亜鉛）；または食物組成物が含まれてもよい。食物組成物は、限定されずに、ミルク、ヨーグルト、凝乳、チーズ、発酵乳、ミルクベースの発酵生成物、アイスクリーム、発酵した穀類ベースの生成物、ミルクベースの粉末、小児処方、錠剤、液体細菌懸濁液、乾燥経口補助食品または湿式経口補助食品であってもよい。

20

#### 【0043】

本明細書で用いるように、用語「栄養補助食品」は、健康に有益な食物（強化食品または食事補助食品として）を指す。栄養補助食品は、医薬品と同じ試験および規制の対象でない。

#### 【0044】

本明細書で用いるように、用語「プロバイオティック」は生きている微生物を指し、適当量で投与されると、それは宿主に健康有益性を与える。プロバイオティクスは、食物および食事補助食品（例えば、限定されずにカプセル剤、錠剤および粉末）で入手することができる。プロバイオティックを含有する食物の非限定的な例には、酪農製品、例えばヨーグルト、発酵および未発酵ミルク、スムージー、バター、クリーム、フォームス、コンブチャ、サラダドレッシング、味噌、テンペー、栄養バーおよび一部のジュースおよびダイズ飲料が含まれる。

30

#### 【0045】

本明細書で用いるように、用語「代謝産物」は、代謝に関与する任意の分子を指す。代謝産物は、代謝過程での生成物、基質または中間体であってもよい。例えば、代謝産物は、一次代謝産物、二次代謝産物、有機代謝産物または無機の代謝産物であってもよい。代謝産物には、アミノ酸、ペプチド、アシルカルニチン、単糖、脂質およびリン脂質、プロスタグランジン、ヒドロキシエイコサテトラエン酸、ヒドロキシオクタデカジエン酸、ステロイド、胆汁酸、および糖脂質およびリン脂質が含まれるが、これらに限定されない。

#### 【0046】

本明細書で用いるように、用語「サイトカイン」は、免疫系の細胞の活性をモジュレートする、分泌されたタンパク質またはその活性断片もしくは突然変異体を指す。サイトカインの例には、限定されずに、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、腫瘍壊死因子、免疫細胞前駆体のためのコロニー刺激因子等が含まれる。

40

#### 【0047】

本明細書で用いるように、用語「抗体」には、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する完全長抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異的抗体（例えば、二重特異的抗体、ダイアボディ、ならびに単鎖分子、および抗体断片（例えば、FabまたはF(ab')<sub>2</sub>およびFv））が含まれる。異なるクラスの抗体の構造および特性については、例えば、Basic and Cli

50

nical Immunology、第8版、Daniel P. Sties、Abba I. TerrおよびTristram G. Parslow(編)、Appleton & Lange、Norwalk、Conn.、1994年、71頁および第6章を参照。

#### 【0048】

自閉症スペクトラム障害(ASD)

自閉症スペクトラム障害(ASD)は、常動行動ならびにコミュニケーションおよび社会的交流の欠陥を特徴とする複雑な神経発達障害である。用語「スペクトラム」は、ASD患者が有する可能性がある、多様な症状、技術、および機能障害または身体障害のレベルを指す。ASDは、Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders、第四版-テキスト改訂(DSM-IV-TR)に掲載されるガイドラインに従って一般に診断される。マニュアルは現在、自閉症障害(古典的自閉症)、アスペルガー障害(アスペルガー症候群)、他に規定されない広汎性発達障害(PDD-NOS)、Ret tの障害(Ret t症候群)および児童統合障害(CDD)を含む、時には広汎性発達障害(PDD)と呼ばれる5つの障害をASDとして定義する。一部の患者は症状が軽度の障害であるが、他は重度の障害である。ASDは、病因が明確に定義されておらず、標的とする治療法がない複雑な障害のセットを包含する。

10

#### 【0049】

近年の研究は、自閉症個体における著しい神経および末梢免疫性の調節不全を鮮明にする。その発生率および核心的自閉症行動の重症度との相関を考慮すると、ASDでのいくつかの併存症の中で、胃腸(GI)窮迫が特に興味深い(Adamsら、2011年; Buieら、2010年; Couryら、2012年; Gorrindoら、2013年; Ibrahimら、2009年; Wangら、2011年)。ASD児童のかなりのサブセットは、腸管透過性の増加(または「漏出性の腸」)および腸管微生物叢の変化した組成を含む、胃腸(GI)合併症を示す(Buieら、2010年; Couryら、2012年; D'Eu femiaら、1996年; de Magistrisら、2010年; de Magistrisら、2013年; Ibrahimら、2009年)。さらに、14,000人以上のASD個体の近年の多施設研究は、対照と比較して炎症性腸疾患(IBD)および他のGI障害のより高い発生率をASD患者で報告する(Kohaneら、2012年)。変化した栄養素摂取量、食事アレルギーおよび代謝破壊もASDと関連し、抗生物質処置および制限食は、一部の自閉症児に行動の向上を提供することが報告されている(Buieら、2010年)。

20

30

#### 【0050】

母体の免疫活性化(MIA)は、ASDの重要な環境危険因子である。いくつかの大きな疫学研究は、母体のウイルスおよび細菌感染症と子孫での自閉症危険率の増加とを関連づけた((Atl adottirら、2010年; Gorrindoら、2012年)。妊娠雌にウイルスの模擬ポリ(I:C)を注射することによってマウスでこの危険因子をモデル化することは、自閉症の核心的行動症状、例えば反復性/衝動的な行動の特質症状、ならびに一般的な自閉症神経病理(プルキンエ細胞での空間的に制限された欠陥)を示す子孫を生み出すことが示されている((Boksa、2010年; Malkov aら、2012年; Schwartz erら、2013年; Shiら、2009年)。近年、MIA子孫は、免疫系および胃腸管の異常を示すことも見出されている。

40

#### 【0051】

ヒトには大きな存在度および多様な微生物が定着し、それは健康および疾患の調節で重大な役割をする。片利共生微生物叢の生命異常は、IBD、肥満および心血管疾患を含むヒトのいくつかの病気の病原性と結びつけられている(BlumbergおよびPowrie、2012年; Clementeら、2012年)。片利共生細菌は、社会的、感情的、侵害受容および不安様行動を含む様々な複雑な行動にも影響を及ぼし(Amaralら、2008年; Bravoら、2011年; Desbonnetら、2013年; He

50

ijt zら、2011年)、マウス(Al - Asmak hら、2012年; Collinsら、2012年; CryanおよびDinan、2012年)およびヒト(Tillischら、2013年)で脳の発達および機能に寄与する。腸微生物叢と脳の間の遠距離相互作用は、マウスで多発性硬化症およびうつ病の症状を処置する微生物ベースの療法の能力(Bravoら、2011年; Hooperら、2012年; Ochoa - Reparazら、2010年)、ならびにヒトの慢性疲労症候群および精神的窮迫の感情的な症状の処置で報告されたプロバイオティクスの効力の根底にある(Messaoudiら、2011年; Raoら、2009年)。

#### 【0052】

破壊された群集組成(Adamsら、2011年; Finegold、2011年; Finegoldら、2010年; Finegoldら、2012年; Gondaliaら、2012年; Parrachoら、2005b; Williamsら、2011年; Williamsら、2012年)、および微生物によって誘導された代謝産物の变化した末梢レベル(Altieriら、2011年; Fryeら、2013年; MacFabe、2012年; Mingら、2012b; Yapら、2010a)を含む、微生物叢に関係がある多数の異常が自閉症個体で同定された。

10

#### 【0053】

行動性能を向上させるための方法

処置を必要とする対象の行動性能を向上させるための方法が、本明細書で提供される。処置を必要とする対象は、不安、ASD、またはASDの症状の1つもしくは複数を伴う病的状態を患っている対象であってもよい。

20

#### 【0054】

一部の実施形態では、本方法は、処置を必要とする対象のASD関連代謝産物の血中レベルを判定することと、対象の行動性能の向上が観察されるまで対象のASD関連代謝産物の血中レベルを調整することとを含む。

#### 【0055】

一部の実施形態では、本方法は、処置を必要とする対象の自閉症スペクトラム障害(ASD)関連代謝産物のレベルを判定することと、対象の代謝産物のレベルが自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルと実質的に同じであるように対象のASD関連代謝産物のレベルを調整し、それによって対象の行動性能を向上させることとを含む。一部の実施形態では、本方法は、自閉症でない対象の集団でASD関連代謝産物の参照レベルを判定することをさらに含むことができる。

30

#### 【0056】

一部の実施形態では、本方法は、処置を必要とする対象の自閉症スペクトラム障害(ASD)関連代謝産物のレベルを判定することと、対象の代謝産物のレベルが、ASD、不安またはASDの症状の1つもしくは複数を伴ういかなる病的状態も患っていない対象の集団での代謝産物の参照レベルと実質的に同じであるように対象のASD関連代謝産物のレベルを調整し、それによって対象の行動性能を向上させることとを含む。一部の実施形態では、本方法は、ASD、不安またはASDの症状の1つもしくは複数を伴ういかなる病的状態も患っていない対象中でASD関連代謝産物の参照レベルを判定することをさらに含むことができる。

40

#### 【0057】

一部の実施形態では、本明細書で開示される方法は、処置を必要とする対象のASD関連代謝産物のレベルを調整する前に行動性能のベースラインを測定すること、および/または処置を必要とする対象のASD関連代謝産物のレベルを調整した後に行動性能を測定することを含むこともできる。一部の実施形態では、本方法は、処置を必要とする対象のASD関連代謝産物のレベルを調整する前および後の行動性能を比較することを含むことができ、その比較は、対象の行動性能が向上するかどうか、およびどの程度向上するかについて判定するために使用することができる。

#### 【0058】

50

本明細書で開示される方法では、様々なパラメータおよび方法を使用して行動性能を測定および評価することができる。例えば、試験下の対象の制限された反復性の行動および/または常同行動パターンの存在および/または程度を判定するために、行動試験を実行することができる。一部の実施形態では、行動試験のために、自閉症行動チェックリスト(ABC)、自閉症診断インタビュー-改訂版(ADI-R)、児童自閉症評価スケール(CARS)および/または前言語自閉症診断観察スケジュール(PL-ADOS)が使用される。行動試験には、限定されずに、1)強度または集中のいずれかが異常である、対象の1つまたは複数の常同的および制限されたパターンへの没頭、2)特定の非機能的ルーチンまたは儀式への頑なな執着、c)常同的および反復性の運動マンネリズム(例えば、手フラッピング、指フラッピングなど)、ならびに/またはd)物体の部分への持続的な没頭の存在および/または程度を検出することを含めることができる。行動試験に含めることができ、試験下の対象の行動性能を向上させることの必要性を示唆する行動の非限定的な例には、以下のものが含まれる：a)感覚に関する行動、例えば学習時の視覚的識別能の低利用、聞こえないようであり、したがって難聴が疑われる、時には、大きい雑音への「驚愕反応」を示さない、時には、あざ、切り傷および注射などの痛みを伴う刺激が反応を呼び起こさない、しばしば、明るい光を目に向けたときに瞬かない、多くの音に耳を塞ぐ、天然光の存在下で、目を細めるか、眉をひそめるか、目を覆う、しばしば、「見知らぬ」人への視覚的反応を示さず、長期間空間を見つめる；b)対人行動：しばしば、社会的/環境的刺激に参加しない、社会的微笑を示さない、手を差し出されたときに手を伸ばさない、他人の表情/感情に非反応性で、能動的に目を合わさない、触られるか抱かれることに抵抗する、腕に抱かれるときにだらける、硬直して、抱くことが困難、遊びで他の子供を模倣しない、友好関係を築いたことがない、しばしばおびえているか非常に不安である、人を「覗き込む」；c)身体および物体の使用に関する行動：長期間自身を回転させる、玩具を適切に使用しない、彼/彼女と特定の物体を譲り合わない、長期間自身を揺らす、突進および疾走をよくする、手をバタバタする、つま先で歩く、頭をぶつける、手を噛むなどによって自己を傷つける、頻繁に物体をクルクル回し、回転させ、たたく、環境中の物体を触り、においを嗅ぎ、および/または味見する、物を揃えるなどの複雑な「儀式」に関係する、非常に破壊的である；ならびにd)言葉に関する行動：一度与えられる簡単な命令に従わない、代名詞逆転を有する、会話が無調である、他の二人の間で、大声で呼ばれる自身の名前に応答しない、滅多に「はい」または「私」と言わない、前置詞を含む簡単な命令に従わない、身振りをするによって所望の物体を得る、語句を何度も反復する、名前を挙げた物体を5つを超えて指摘することができない、欲しい物および必要な物を伝えるために、1日に0~5個の自発的単語を使用する、音または単語を何度も反復する、他による質問または表明を繰り返す、伝えるために1日に少なくとも15個から30個未満の自発的語句を使用する、簡単な作業を学習するが、速やかに「忘れる」、ルーチン/環境の変化への強い反応、発達の1つの領域で「特殊技能」を有し、それは精神発達遅滞を無視するようである、重度のかんしゃくおよび/または頻繁な軽微な立腹、噛む、打つ、けることなどによって他人を傷つける、要求が満たされるのを待たない、トイレをすることに困難である、頻繁な援助がないと着用しない、しばしば周囲に無意識であり、危険な状況に気がつかないことがある、生命のない物を操作し、専念することを好む、ならびに発達の遅延は、30カ月の年齢またはそれ以前に同定された。主治医ならば本明細書で開示される処置を必要とする対象を特定する方法を知るのであることを、当業者は理解する。

#### 【0059】

調整の後、対象のASD関連代謝産物のレベルは、自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルの約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約98%、約99%、約100%、約101%、約102%、約105%、約110%、約120%、約130%、約140%、約150%、またはこれらの値の任意の2つの間の範囲であってもよい。一部の実施形態では、対象のASD関連代謝産物のレベルは、自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルの約80%、約90%、約95%、約98%、約99%、

10

20

30

40

50



約100%、約101%、約102%、約105%、約110%、約120%、またはこれらの値の任意の2つの間の範囲である。一部の実施形態では、対象のASD関連代謝産物のレベルは、自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルの約95%、約98%、約99%、約100%、約101%、約102%、約105%、またはこれらの値の任意の2つの間の範囲である。代謝産物のレベルは、対象の循環中の代謝産物のレベルであってもよい。例えば、代謝産物のレベルは、対象の血液または他の体液（例えば、脳脊髄液、胸膜液、羊水、精液または唾液）の中の代謝産物のレベルであってもよい。一部の実施形態では、代謝産物のレベルは、対象の代謝産物の血中レベルである。代謝産物の血中レベルは、例えば、代謝産物の血清中レベルまたは血漿中レベルであってもよい。一部の実施形態では、代謝産物のレベルは、対象の代謝産物の尿中レベルである。

10

**【0060】**

一部の実施形態では、対象は、不安、ASD、またはASDの症状の1つもしくは複数に伴う病的状態を患っている。ASDの非限定的な例には、自閉症障害（古典的自閉症）、アスペルガー障害（アスペルガー症候群）、他に規定されない広汎性発達障害（PDD-NOS）、Ret t tの障害（Ret t t症候群）および児童統合障害（CDD）が含まれる。一部の実施形態では、対象はASDを患っている。一部の実施形態では、対象は自閉症を患っている。

**【0061】**

対象のASD関連代謝産物のレベル、例えば血中レベルを調整するために、様々な方法を使用することができる。一部の実施形態では、代謝産物のレベル、例えば血中レベルは、対象の腸微生物叢の組成を調整することによって調整される。対象の腸微生物叢の組成の調整は、例えば、糞便の移植（糞便微生物叢の移植（FMT）、糞便細菌療法または大便秘植としても知られる）によって達成することができる。糞便の移植は、健全なドナー、例えば自閉症でない対象からレシピエント（例えば、自閉症を患っている対象）への糞便中の細菌の移植の工程を含むことができる。糞便の移植の手順は、ドナーからレシピエントへの細菌糞便フローラの単回または複数回の注入（例えば、浣腸による）を含むことができる。

20

**【0062】**

一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、細菌を含む組成物、例えばバクテロイデス属の細菌を含む組成物を対象に投与することを含む。本明細書で開示される方法で使用することができるバクテロイデス属の細菌は、特に限定されない。一部の実施形態では、バクテロイデス属の細菌は、B . フラジリス、B . テタイオタオミクロン、B . ブルガツス、またはそれらの混合物を含む。一部の実施形態では、バクテロイデス属の細菌は、B . フラジリスであってもよい。細菌を含む組成物、例えばバクテロイデス属の細菌を含む組成物は、様々な経路を通して対象に投与することができる。例えば、組成物は、経口投与、直腸投与、経皮投与、鼻腔内投与または吸入を通して対象に投与することができる。一部の実施形態では、組成物は経口的に対象に投与される。細菌、例えばバクテロイデス属の細菌を含む組成物は、様々な形であってもよい。例えば、組成物は、プロバイオティック組成物、栄養補助食品、医薬組成物またはそれらの混合物であってもよい。一部の実施形態では、組成物はプロバイオティック組成物である。ヒトおよび動物対象のための各投薬量は、所望の効果を発生させるのに十分な量で計算される細菌の所定量を好ましくは含有する。実際の剤形は、用いられる特定の細菌および達成すべき効果に依存する。細菌を含む組成物、例えばバクテロイデス属の細菌を含む組成物は、単独で、または1つまたは複数の追加のプロバイオティック、栄養補助食品または治療薬と組み合わせて投与することができる。1つまたは複数のさらなる追加のプロバイオティック、栄養補助食品または治療薬「と組み合わせた」投与は、同時（同じ時間の）投与と任意の順序での連続的な投与の両方を含む。投与は、特に疾患状態の何らかの変化または望ましくない副作用を考慮して、監督実務者が適当と考える通り、慢性または間欠的であってもよい。「慢性」投与は継続的な方法での組成物の投与を指すが、「間欠的」投与は中断して行われる処置を指す。

30

40

50

## 【 0 0 6 3 】

一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、対象の1種または複数種の細菌のレベルを低減することを含む。例えば、対象のクロストリジアカクシス属（ラクノスピラ科など）のレベルを低減して、対象の腸微生物叢の組成を調整することができる。一部の実施形態では、ラクノスピラ科はロゼブリア属である。バクテロイデス綱細菌（バクテロイデス目S24-7など）のレベルを低減して、対象の腸微生物叢の組成を調整することもできる。一部の実施形態では、クロストリジアカクシス属は、ラクノスピラ科である。対象の1種または複数種の細菌のレベルを低減するために、様々な方法を使用することができる。例えば、1種または複数種の腸内細菌を低減するために、対象に減炭水化物食を提供することができる。いかなる特定の理論にも縛られないが、減炭水化物食は、細菌発酵のために必要な入手できる材料を制限して、腸内細菌種を低減することができると考えられている。

10

## 【 0 0 6 4 】

一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を調整することは、対象の1種または複数種の細菌のレベルを増加させることを含む。例えば、対象のルミノコッカス科、エリシペロトリクス科、および/またはアルカリゲネス科細菌のレベルを増加させて、対象の腸微生物叢の組成を調整することができる。

## 【 0 0 6 5 】

## A S D 関連代謝産物

本明細書で用いるように、用語「自閉症スペクトラム障害（A S D）関連代謝産物」は、自閉症でない対象および/またはA S D、不安もしくはA S Dの症状の1つもしくは複数を伴ういかなる病的状態も患っていない対象と比較して、A S D、不安および/またはA S Dの症状の1つもしくは複数を伴う任意の病的状態を患っている対象中でそのレベルが変化する代謝産物を指す。例えば、自閉症でない対象と比較して、A S Dを患っている対象の循環中で代謝産物のレベルを変化させることができる。一部の実施形態では、自閉症でない対象と比較して、A S Dを患っている対象の血液、血清、血漿、体液（例えば、脳脊髄液、胸膜液、羊水、精液または唾液）、尿および/または糞便で、代謝産物のレベルは変化する。ある場合には、A S D関連代謝産物は、A S Dを患っている対象でA S D関連の行動の発達において原因となる役割を演ずる。ある場合には、A S D関連代謝産物のレベルの変化は、A S Dによって引き起こされる。A S D関連代謝産物は、自閉症でない対象またはA S D、不安もしくはA S Dの症状の1つもしくは複数を伴ういかなる病的状態も患っていない対象と比較して、A S Dを患っている対象において増加または低下したレベルを有することができる。

20

30

## 【 0 0 6 6 】

代謝産物のレベルの変動性が個体間に存在することができること、および比較のための、自閉症以外の集団、またはA S D、不安もしくはA S Dの症状の1つもしくは複数を伴ういかなる病的状態も患っていない対象の集団での代謝産物のレベルを代表する値として、参照レベルを確立することができることを当業者は理解する。参照集団における特定の対象の組入れおよび/または除外を判定するために、様々な基準、例えば対象の年齢（例えば、参照対象は、処置を必要とする対象と同じ年齢群に入ることができる）および対象の性別（例えば、参照対象は、処置を必要とする対象と同じ性別であってもよい）を使用することができる。一部の実施形態では、参照レベルと比較して、A S Dを患っている対象においてA S D関連代謝産物のレベルは増加する。一部の実施形態では、参照レベルと比較して、A S Dを患っている対象においてA S D関連代謝産物のレベルは低下する。一部の実施形態では、A S Dを患っている対象の腸微生物叢の組成を調整することによって、A S D関連代謝産物のレベルの変化を部分的または完全に回復させることができる。

40

## 【 0 0 6 7 】

A S D 関連代謝産物の非限定的な例は、表 1 に提供される。

## 【 0 0 6 8 】

【表1】

表1.例示的なASD関連代謝産物

|                |                    |                             |
|----------------|--------------------|-----------------------------|
| N-アセチルセリン      | ベータアラニン            | 4-メチル-2-オキソペンタオエート          |
| イミダゾールプロピオネート  | フェノールスルフェート        | 5-メチルチオアデノシン                |
| セロトニン          | 3-メチル-2-オキソバレレート   | ドコサペンタエノエート(n3 DPA; 22:5n3) |
| アルギニン          | オルニチン              | ドコサペンタエノエート(n6 DPA; 22:5n6) |
| グリシルバリン        | エイコセノエート           | ジホモ-リノレート(20:2n6)           |
| キシロース          | オクタデカンジオエート        | ドコサヘキサエノエート(DHA; 22:6n3)    |
| ステアレート         | パントテネート            | 1-ペンタデカノイルグリセロホスホコリン        |
| 13-HODE+9-HODE | エルゴチオネイン           | 1-オレオイルグリセロホスホエタノールアミン      |
| ビリルビン(E,E)     | グリコレート(ヒドロキシアセテート) | 4-エチルフェニルスルフェート             |
| イコールスルフェート     | トランスウロカネート         | 1-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミン     |
| グルタミン          | インドールピルベート         | 1-ステアロイルグリセロホスホイノシトール       |
| アドレネート         | 3-ホスホグリセレート        | 1-パルミトレオイルグリセロホスホコリン        |
| ミオイノシトール       | フェニルアセチルグリシン       | 1-パルミトイルプラスメニルエタノールアミン      |
| システイン          | ホスホエノールピルベート       | ペプチドTDTEDKGEFLSEGGVR        |
| リボース           | 12-HETE            | 4-メチルフェニルスルフェート             |
| 4-メチルフェニル      | インドリル-3-アクリロイルグリシン | 4-エチルフェニル                   |

10

20

30

## 【0069】

ASD関連代謝産物は、様々な代謝経路に關与する。ASD関連代謝産物が關与することができる代謝経路の例には、アミノ酸代謝、タンパク質代謝、炭水化物代謝、脂質代謝、ならびに補因子およびビタミンの代謝が含まれるが、これらに限定されない。例えば、ASD関連代謝産物は、グリシン、セリンおよびトレオニン代謝；アラニンおよびアスパラギン酸代謝；グルタミン酸代謝；ヒスチジン代謝；フェニルアラニンおよびチロシン代謝；トリプトファン代謝；バリン、ロイシンおよびイソロイシン代謝；システイン、メチオニン、SAMおよびタウリン代謝；尿素サイクル；アルギニン、プロリン代謝；および/またはポリアミン代謝に關与する代謝産物であってもよい。ASD関連代謝産物は、ジペプチドまたはフィブリノゲン切断ペプチドであってもよい。さらに、ASD関連代謝産物は、解糖、糖新生、ピルビン酸代謝；および/またはヌクレオチド糖、ペントース代謝に關与する代謝産物であってもよい。ASD関連代謝産物は、必須脂肪酸、長鎖脂肪酸、モノヒドロキシおよび/またはジカルボキシレート脂肪酸、エイコサノイド、イノシトールおよび/またはリゾ脂質の代謝に關与する代謝産物であってもよい。ASD関連代謝産物は、ヘモグロビンおよびポルフィリン代謝、パントテネートおよびCoA代謝、および/またはベンゾエート代謝に關与する代謝産物であってもよい。

40

## 【0070】

一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、トリプトファン代謝に關与する代謝産物

50

、脂肪酸代謝に関与する代謝産物、またはプリン代謝に関与する代謝産物である。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、グリコレート、イミダゾールプロピオネートまたはN-アセチルセリンである。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、4-エチルフェニルスルフェート(4EPS)、4-エチルフェニル、インドールピルベート、インドリル-3-アクリロイルグリシンまたはセロトニンである。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、4-メチルフェニルスルフェートまたは4-メチルフェニルである。

【0071】

一部の実施形態では、対象の行動性能を向上させるために、1つのASD関連代謝産物のレベルが調整される。例えば、対象の4EPSまたはインドールピルベートのレベル、例えば4EPSおよびインドールピルベートの血中レベル(例えば、血清中レベル)は、対象の行動性能を向上させるために調整することができる。一部の実施形態では、2つ以上のASD関連代謝産物のレベルが、対象の行動性能を向上させるために調整される。例えば、対象の4EPSおよびインドールピルベートのレベル、例えば4EPSおよびインドールピルベートの血中レベル(例えば、血清中レベル)は、対象の行動性能を向上させるために調整することができる。

10

【0072】

対象の行動性能を向上させるために、対象のASD関連代謝産物のレベル、例えば血中レベル(例えば、血清中レベル)または尿中レベルを調整するために、様々な方法を使用することができる。例えば、ASD関連代謝産物、ASD関連代謝産物の*in vivo*合成の中間体、またはASD関連代謝産物の*in vivo*合成の基質に特異的に結合する抗体は、対象のASD関連代謝産物のレベルを調整するために対象に投与することができる。例えば、4EPSおよび/または*in vivo*での4EPS合成における基質および中間体の1つまたは複数に特異的に結合する抗体は、対象の4EPSのレベルを低減するために使用することができる。一部の実施形態では、チロシン、ヒドロキシフェニルピルビン酸、p-クマル酸、p-ビニルフェニール、ヒドロキシフェニルプロピオネート、および/または4-エチルフェニールに特異的に結合する抗体は、対象の4EPSのレベルを低減するために対象に投与される。一部の実施形態では、4EPSに特異的に結合する抗体は、対象の4EPSのレベルを低減するために対象に投与される。別の例として、4-メチルフェニルスルフェートおよび/または*in vivo*での4-メチルフェニルスルフェートの合成における基質および中間体の1つまたは複数に特異的に結合する抗体は、対象の4-メチルフェニルスルフェートのレベルを低減するために使用することができる。一部の実施形態では、チロシン、ヒドロキシフェニルピルビン酸、ヒドロキシフェニルプロピオネート、ヒドロキシフェニルアセテートおよび/またはp-クレゾールに特異的に結合する抗体は、対象の4-メチルフェニルスルフェートのレベル、例えば4-メチルフェニルスルフェートの尿中レベルを低減するために対象に投与される。一部の実施形態では、4-メチルフェニルスルフェートに特異的に結合する抗体は、対象の4-メチルフェニルスルフェートのレベルを低減するために対象に投与される。さらに別の例として、インドリル-3-アクリロイルグリシンおよび/または*in vivo*でのインドリル-3-アクリロイルグリシンの合成における基質および中間体の1つまたは複数に特異的に結合する抗体は、対象のインドリル-3-アクリロイルグリシンのレベルを低減するために使用することができる。一部の実施形態では、トリプトファン、インドールピルベートおよび/またはインドールアクリル酸に特異的に結合する抗体は、対象のインドリル-3-アクリロイルグリシンのレベルを低減するために対象に投与される。一部の実施形態では、インドリル-3-アクリロイルグリシンに特異的に結合する抗体は、対象のインドリル-3-アクリロイルグリシンのレベルを低減するために対象に投与される。さらに別の例として、トリプトファンおよびインドールピルベートに特異的に結合する抗体は、対象のインドールピルベートのレベルを低減するために使用することができる。

20

30

40

【0073】

小分子に特異的に結合する抗体を生成するための方法が、当技術分野で開発されている。例えば、小分子に対するモノクローナル抗体の生成が、Rufora、J. Ag. Foo

50

d Chem. 52巻：182～187頁（2004年）に記載され、それは参照により本明細書に組み込まれる。例えば、動物、例えばモルモットまたはラット、好ましくはマウスを、ハプテン（例えば、KLH）にコンジュゲートさせた小分子、抗体産生細胞、好ましくは脾臓リンパ球で免疫化し、収集して安定した不死化細胞系統、好ましくは骨髄腫細胞系統と融合させてハイブリドーマ細胞を産生することができ、次にそれを単離し、クローニングする。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,156,882号を参照。さらに、小分子特異的抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を細胞からクローニングすることができ、例えば、モノクローナル抗体をコードする遺伝子をハイブリドーマからクローニングして、組換えモノクローナル抗体を産生するために使用することができる。

10

**【0074】**

対象の行動性能を向上させるために、ASD関連代謝産物の*in vivo*合成に関する酵素を阻害することによって、対象のASD関連代謝産物のレベル、例えば血中レベル（例えば、血清中レベル）または尿中レベルを調整することもできる。

**【0075】**

本明細書に記載のように、対象のASD関連代謝産物のレベル、例えば血中レベル（例えば、血清中レベル）を調整することは、ASDを患っている対象の胃腸（GI）窮迫を改善することができる。GI窮迫は、腹部の痙攣、慢性下痢、便秘、腸管透過性またはそれらの組合せであってもよい。本明細書で開示されるように、改善は広義で使用され、処置する病的状態に関連するパラメータ、例えば症状の重大さの低減を少なくとも指す。一部の実施形態では、本方法は、病的状態または病的状態を特徴付ける症状の少なくとも一つまたは複数を宿主がもはや患わないように、起こることを完全に阻害、例えば予防すること、または停止、例えば終了することができる。一部の実施形態では、本方法は、検出可能であるか検出不能であるかを問わず、疾患進行の遅延または減速、疾患状態の改善または緩和、および寛解（部分的であるか全体の）が可能である。

20

**【0076】**

上で議論したように、その発生率および核心的自閉症行動の重症度との相関を考慮すると、胃腸（GI）窮迫がASDで重要な併存症である。ASDを患っている対象の胃腸（GI）窮迫を軽減するための方法も、本明細書で開示される。この方法は、対象の腸管透過性を低減することを含むことができる。一部の実施形態では、GI窮迫は、腹部の痙攣、慢性下痢、便秘、腸管透過性またはそれらの組合せを含む。腸管透過性を低減することは、対象の腸微生物叢の組成を変化させることによって達成することができる。一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を変化させることは、バクテロイデス属の細菌などの細菌を含む組成物を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を変化させることは、糞便の移植を含む。一部の実施形態では、対象の腸微生物叢の組成を変化させることは、プロバイオティック処置を含む。

30

**【0077】**

様々な対象を処置することができる。一般に、そのような対象は哺乳動物であり、その用語は、肉食動物（例えば、イヌおよびネコ）、齧歯目（例えば、マウス、モルモットおよびラット）および霊長類（例えば、ヒト、チンパンジーおよびサル）の目を含む哺乳類綱の中にある生物を記載するために広義に使用される。好ましい実施形態では、対象はヒトである。

40

**【0078】**

本明細書で開示される方法では、処置を必要とする対象に投与される細菌、例えばバクテロイデス属細菌（例えば、B.フラジリス）の量は、様々なパラメータ、例えば対象の年齢、体重、応答、処置する対象の状態；不安、ASD、またはASDの1つまたは複数の症状による病的状態のタイプおよび重症度；細菌が含まれる組成物の形；投与経路；ならびに必要なレジメンによって判定することができる。状態の重症度は、例えば、標準的な予後評価方法によって一部評価することができる。上で議論したものと同等のプログラムは、獣医学で使用することができる。例えば、処置を必要とする対象に投与するの

50

効な量を判定するために、細菌の量を測定することができる。主治医ならば、毒性または器官機能不全のために、細菌の投与を終了、中断または調整する方法および時期を知るのであることを、当業者は理解しよう。反対に、主治医ならば、臨床応答が十分でない（毒性を除外する）場合に、処置をより高いレベルに調整することも知るであろう。

【 0 0 7 9 】

プロバイオティック処置に対する A S D 対象の感受性を評価するための方法

プロバイオティック処置に対する A S D を患っている対象の感受性を評価するための方法が、本明細書で提供される。この方法は、対象の B . フラジリス応答性代謝産物のレベルを判定することと、対象の B . フラジリス応答性代謝産物のレベルを、 A S D および 1 つまたは複数の胃腸障害を患っている対象の代謝産物の参照レベルと比較することを含むことができ、対象の代謝産物の血中レベルと参照レベル間の実質的な同一性は、対象がプロバイオティック処置、例えば B . フラジリスのプロバイオティック処置に感受性であることを示す。一部の実施形態では、本方法は、対象の 2 つ以上の B . フラジリス応答性代謝産物のレベルを判定することと、対象の 2 つ以上の B . フラジリス応答性代謝産物の各々のレベルを、 2 つ以上の B . フラジリス応答性代謝産物の各々の参照レベルと比較することを含み、対象の代謝産物の血中レベルと参照レベル間の実質的な同一性は、プロバイオティック処置に対する対象の感受性の増加を示す。

10

【 0 0 8 0 】

代謝産物のレベルは、対象の循環中の代謝産物のレベルであってもよい。例えば、代謝産物のレベルは、対象の血液または他の体液（例えば、脳脊髄液、胸膜液、羊水、精液または唾液）の中の代謝産物のレベルである。一部の実施形態では、代謝産物のレベルは、対象の代謝産物の血中レベルである。代謝産物の血中レベルは、例えば、代謝産物の血清中レベルまたは血漿中レベルであってもよい。一部の実施形態では、代謝産物のレベルは、対象の代謝産物の尿中レベルである。

20

B . フラジリス応答性代謝産物

【 0 0 8 1 】

本明細書で用いるように、用語「 B . フラジリス応答性代謝産物」は、そのレベルが B . フラジリス処置によって変化すると判定された代謝産物を指す。例えば、 B . フラジリス処置の後の対象の循環中で代謝産物のレベルを変化させることができる。一部の実施形態では、 B . フラジリス処置の後の対象の血液、血清、血漿、体液（例えば、脳脊髄液、胸膜液、羊水、精液または唾液）、尿および / または糞便中で、代謝産物のレベルは変化する。 B . フラジリス応答性代謝産物は、 B . フラジリス処置の後にレベルを増加または低下させることができる。ある場合には、 A S D 関連代謝産物は、 B . フラジリスで処置した A S D 対象の行動性能の向上において原因となる役割を演ずる。ある場合には、 B . フラジリス応答性代謝産物は、 A S D 関連代謝産物でもある。ある場合には、 A S D 関連代謝産物は、 B . フラジリス応答性代謝産物でもある。

30

【 0 0 8 2 】

本明細書で開示されるように、 B . フラジリス応答性代謝産物は、対象、例えば A S D を患っている対象の代謝産物の前処置レベルを B . フラジリス処置の後の対象の代謝産物のレベルと比較することによって、判定することができる。代謝産物のレベルの変動性が個体間に存在することができること、および比較のための、 1 つまたは複数の G I 障害を患っている A S D 対象の集団での代謝産物のレベルを代表する値として、 B . フラジリス応答性代謝産物の参照レベルを確立することができることを当業者は理解する。一部の実施形態では、参照レベルと比較して、 A S D を患っている対象において B . フラジリス応答性代謝産物のレベルは増加する。一部の実施形態では、参照レベルと比較して、 A S D を患っている対象において B . フラジリス応答性代謝産物のレベルは低下する。

40

【 0 0 8 3 】

B . フラジリス応答性代謝産物の非限定的な例は、表 2 に提供される。

【 0 0 8 4 】

【表 2 - 1】

表2.例示的なB.フラジリス応答性代謝産物

|                          |                          |    |
|--------------------------|--------------------------|----|
| サルコシン(N-メチルグリシン)         | イノシン                     |    |
| アスパルテート                  | アデノシン                    |    |
| 3-ウレイドプロピオネート            | アデノシン5'-ーリン酸(AMP)        |    |
| グルタレート(ペンタンジオエート)        | グアノシン5'-ーリン酸(5'-GMP)     |    |
| チロシン                     | 尿酸塩                      |    |
| 3-(4-ヒドロキシフェニル)ラクテート     | 2'-デオキシシチジン              | 10 |
| 3-フェニルプロピオネート(ヒドロシンナメート) | ウラシル                     |    |
| セロトニン(5HT)               | プソイドウリジン                 |    |
| 3-メチル-2-オキソブチレート         | ニコチンアミド                  |    |
| 3-メチル-2-オキソバレレート         | カテコールスルフェート              |    |
| 4-メチル-2-オキソペンタノエート       | サリチレート                   |    |
| イソブチリルカルニチン              | イコールスルフェート               |    |
| 2-メチルブチロイルカルニチン          | エリスリトール                  |    |
| イソバレリルカルニチン              | ドデカンジオエート                | 20 |
| 2-ヒドロキシブチレート(AHB)        | テトラデカンジオエート              |    |
| アルギニン                    | ヘキサデカンジオエート              |    |
| オルニチン                    | オクタデカンジオエート              |    |
| 2-アミノブチレート               | ウンデカンジオエート               |    |
| 4-グアニジノブタノエート            | 12-HETE                  |    |
| 5-オキソプロリン                | プロピオニルカルニチン              |    |
| グリシルバリン                  | ブチリルカルニチン                |    |
| ガンマグルタミルトリプトファン          | バレリルカルニチン                |    |
| TDTEKGEFLSEGGGV          | 3-デヒドロカルニチン              | 30 |
| TDTEKGEFLSEGGGVR         | ヘキサノイルカルニチン              |    |
| ソルビトール                   | オクタノイルカルニチン              |    |
| ピルベート                    | コリン                      |    |
| リビトール                    | キロイノシトール                 |    |
| リボース                     | ピニトール                    |    |
| リブロース                    | 3-ヒドロキシブチレート(BHBA)       |    |
| キシリトール                   | 1,2-プロパンジオール             |    |
| シトレート                    | 1-リノレオイルグリセロホスホエタノールアミン  | 40 |
| フマレート                    | 1-アラキドノイルグリセロホスホエタノールアミン |    |

【表 2 - 2】

|                                 |                             |    |
|---------------------------------|-----------------------------|----|
| マレート                            | 2-アラキドノイルグリセロホスホエタノールアミン    |    |
| リノレート(18:2n6)                   | 1-ステアロイルグリセロホスホイノシトール       |    |
| リノレネート[アルファまたはガンマ;(18:3n3または6)] | 1-リノレオイルグリセロホスホイノシトール       |    |
| ジホモ-リノレネート(20:3n3またはn6)         | 1-アラキドノイルグリセロホスホイノシトール      | 10 |
| ドコサペンタエノエート(n3 DPA; 22:5n3)     | 1-パルミトイルプラスメニルエタノールアミン      |    |
| ドコサペンタエノエート(n6 DPA; 22:5n6)     | ヒポキサンチン                     |    |
| ドコサヘキサエノエート(DHA; 22:6n3)        | エイコセノエート(20:1n9または11)       |    |
| ヘプタノエート(7:0)                    | ジホモ-リノレート(20:2n6)           |    |
| ペラルゴネート(9:0)                    | ミード酸(20:3n9)                |    |
| ラウレート(12:0)                     | アドレネート(22:4n6)              |    |
| ミリステート(14:0)                    | 8-ヒドロキシオクタノエート              |    |
| パルミテート(16:0)                    | 3-ヒドロキシデカノエート               | 20 |
| パルミトレエート(16:1n7)                | 16-ヒドロキシパルミテート              |    |
| マルガレート(17:0)                    | 13-HODE + 9-HODE            |    |
| ステアレート(18:0)                    | 12,13-ヒドロキシオクタデカ-9(Z)-エノエート |    |
| オレエート(18:1n9)                   | 9,10-ヒドロキシオクタデカ-12(Z)-エン酸   |    |
| ステアリドネート(18:4n3)                | アジペート                       |    |
| スベレート(オクタンジオエート)                | 2-ヒドロキシグルタレート               |    |
| セバケート(デカンジオエート)                 | ピメレート(ヘプタンジオエート)            |    |
| アゼレート(ノナンジオエート)                 |                             |    |

## 【 0 0 8 5】

## A S D の診断

対象の A S D を診断するための方法も、本明細書で開示される。一部の実施形態では、この方法は、対象の腸のサイトカインのレベルおよび 1 つまたは複数の A S D 関連代謝産物のレベルを判定することと、自閉症でない対象群のサイトカインおよび代謝産物の参照レベルと比較して、対象の腸のサイトカインレベルおよび A S D 関連代謝産物の少なくとも 1 つまたは複数のレベルに変化があるかどうかを検出することとを含み、腸のサイトカインの量および 1 つまたは複数の代謝産物の少なくとも 1 つのレベルの変化は、対象が A S D を患っていることを示す。

## 【 0 0 8 6】

一部の実施形態では、本方法は、対象の A S D 関連代謝産物のレベルを判定することと、自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルと比較して、対象の A S D 関連代謝産物のレベルに変化があるかどうかを検出することとを含み、A S D 関連代謝産物のレベルの変化は、対象が A S D を患っていることを示す。一部の実施形態では、本方法は、対象の 2 つ以上の A S D 関連代謝産物のレベルを判定することと、自閉症でない対象群の代謝産物の参照レベルと比較して、対象の 2 つ以上の A S D 関連代謝産物のレベルに変化があるかどうかを検出することとを含み、2 つ以上の A S D 関連代謝産物の少なくとも 2 つのレベルの変化は、対象が A S D を患っていることを示す。

## 【 0 0 8 7】

本明細書で開示されるように、A S D 代謝産物のレベルは、対象の循環中の代謝産物の

10

20

30

40

50



レベルであってもよい。例えば、代謝産物のレベルは、対象の血液または他の体液（例えば、脳脊髄液、胸膜液、羊水、精液または唾液）の中の代謝産物のレベルであってもよい。一部の実施形態では、代謝産物のレベルは、対象の代謝産物の血中レベルである。代謝産物の血中レベルは、例えば、代謝産物の血清中レベルまたは血漿中レベルであってもよい。一部の実施形態では、代謝産物のレベルは、対象の代謝産物の尿中レベルである。

【0088】

代謝産物のレベルおよび/またはサイトカインのレベルの変動性が、自閉症でない集団の個体間に存在することができることを当業者は理解する。したがって、代謝産物の参照レベルは、比較のための自閉症でない集団での代謝産物のレベルを代表する値として確立することができ、サイトカインの参照レベルは、比較のための自閉症でない集団でのサイトカインのレベルを代表する値として確立することができる。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物の参照レベルと比較して、ASDを患っている対象においてASD関連代謝産物のレベルは増加する。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物の参照レベルと比較して、ASDを患っている対象においてASD関連代謝産物のレベルは低下する。一部の実施形態では、サイトカインの参照レベルと比較して、ASDを患っている対象においてサイトカインのレベルは増加する。一部の実施形態では、サイトカインの参照レベルと比較して、ASDを患っている対象においてサイトカインのレベルは低下する。ASD関連代謝産物は本明細書に記載され、本方法で使用することができるASD関連代謝産物の非限定的な例は表1で提供される。

【0089】

一部の実施形態では、サイトカインはインターロイキン-6 (IL-6) である。一部の実施形態では、1つまたは複数のASD関連代謝産物は、トリプトファン代謝に関与する代謝産物、脂肪酸代謝に関与する代謝産物、プリン代謝に関与する代謝産物、グリコレート、イミダゾールプロピオネート、N-アセチルセリン、またはそれらの任意の組合せを含む。トリプトファン代謝に関与する代謝産物の非限定的な例には、4-エチルフェニルスルフェート、インドールピルベート、インドリル-3-アクリロイルグリシンまたはセロトニンが含まれる。一部の実施形態では、ASD関連代謝産物は、4-エチルフェニルスルフェート、インドールピルベート、インドリル-3-アクリロイルグリシンまたはセロトニンである。

【0090】

本開示で開示される方法では、対象の代謝産物のレベルは、当技術分野で公知である任意の従来の方法、例えば、限定されずに、クロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、ガスクロマトグラフィー、質量分析、タンデム型質量分析、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 質量分析、表面増強レーザー脱離/イオン化-飛行時間型 (SELDI-TOF) 質量分析、四極子-飛行時間型 (Q-TOF) 質量分析、大気圧光イオン化質量分析 (APPI-MS)、フーリエ変換質量分析 (FTMS)、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化-フーリエ変換-イオンサイクロトロン共鳴 (MALDI-FT-ICR) 質量分析、二次イオン質量分析 (SIMS)、放射免疫測定法、微流動チップベースアッセイ、蛍光検出、化学発光検出、またはそれらの組合せによって判定することができる。

【実施例】

【0091】

上述の実施形態の一部の態様は以下の実施例でさらに詳細に開示されるが、それらは本開示の範囲を限定するものではない。

【0092】

実験材料および方法

下記の実施例1~8のために、以下の実験方法を使用した。

【0093】

動物およびMIA

妊娠雌のより大きなコホートから妊娠 C57BL/6N (Charles River; Wilmington, MA) を無作為に選択し、Smithら、2007年、に記載される方法に従って、E12.5に生理食塩水または20mg/kgポリ(I:C)をi.p.注射した。全ての動物実験は、Caltech IACUCに承認された。

【0094】

#### B. フラジリス処置

3週齢時に、無作為化された実験計画を作成するために、個々の同腹子にわたる生理食塩水およびポリ(I:C)の子孫を離乳させ、同じ処置群の4匹の非同腹子子孫のケージに入れた(Lazic, 2013年)。1日おきに6日間のB.フラジリスまたはビヒクルによる処置のために、ポリ(I:C)対生理食塩水処置群のケージを無作為に選択した。神経発達および行動に及ぼす初期生命のストレスのいかなる交絡影響も除外するために、懸濁液は経口強制栄養によって投与しなかった。B.フラジリス処置のために、 $10^{10}$  cfuの新たに生長させたB.フラジリスを1mLの1.5%重炭酸ナトリウムに懸濁させ、4mlの無糖アップルソースと混合し、4つの標準の食物ペレットの上に散布した。ビヒクル処置のために、生理食塩水およびポリ(I:C)動物に、食物ペレットの上のアップルソース中の1.5%重炭酸ナトリウムを与えた。投与後48時間までに、アップルソースおよびペレットは各処置群のマウスによって完全に消費された。PSA欠損突然変異体B.フラジリスおよびB.テタイオタオミクロンによる処置のために、同じ手順を使用した。

【0095】

#### 腸管透過性アッセイ

成体マウスを4時間絶食させた後、0.6g/kgの4kDa FITC-デキストラン(Sigma Aldrich)を経口強制栄養で与えた。4時間後に、血液試料を心臓穿刺によって収集し、SSTバキューター(Becton Dickinson)を通して遠心した。xFluor4スペクトロメータ(Tecan)を使用して、FITC蛍光強度についてFITC-デキストラン標準および3x希釈血清を521nmで直ちに読み取った。大腸炎を化学的に誘導するために、7日の間、飲料水中の3%硫酸デキストランナトリウム塩(DSS; MP Biomedicals)をマウスに与えた。

【0096】

#### in vitro免疫アッセイ

TregおよびGr-1フローサイトメトリーおよびCD4+T細胞in vitro刺激のための方法は、Hsiaoら、2012年、に記載されている。簡潔には、脾臓および腸間膜リンパ節から細胞を完全RPMIに採取した。脾細胞の細分類のために、細胞をGr-1 APC、CD11b-PE、CD4-FITCおよびTer119-PerCP-Cy5.5(Biolegend)で染色した。Tregsの検出のために、GolgiPLUG(BD Biosciences)の存在下で脾細胞をPMA/イオノマイシンで4時間刺激し、Fc受容体のためにブロックし、CD4-FITC、CD25-PE、Foxp3-APCおよびTer119-PerCP-Cy5.5で標識した。FACSCaliburサイトメーター(BD Biosciences)を使用して試料を処理し、FlowJoソフトウェア(TreeStar)を使用して分析した。CD4+T細胞刺激アッセイのために、5%(vol/vol)CO<sub>2</sub>の37°Cで3日の間、 $10^6$ 個のCD4+T細胞をPMA(50ng/ml)およびイオノマイシン(750ng/ml)を含む完全RPMIで培養した。毎日、製造業者の指示(eBioscience)に従って、IL-6およびIL-17を検出するためにELISAアッセイのために上清を収集した。

【0097】

#### IL-6経口強制栄養およびin vitro結腸培養

in vivoアッセイのために、成体マウスに、1.5%重炭酸ナトリウム中の5μg無担体組換えマウスIL-6(eBioscience)を強制栄養で与えた。上記の通り、強制栄養の4時間後に、遠位、中間および近位結腸の1cm領域を切除し、HBS

10

20

30

40

50

Sで洗浄し、qRT-PCRのために処理した。in vitroアッセイのために、成体マウスを屠殺し、遠位、中間および近位結腸の1cm領域を切除し、洗浄し、完全RPMI培地中の0~80ng/mlのIL-6による結腸培養のために二分した。培養4時間後、上記の通り結腸断片を採取し、qRT-PCRのために処理した。

#### 【0098】

腸管qRT-PCR、ウエスタンブロットおよびサイトカインプロファイル

遠位、中間および近位の結腸および小腸の1cm領域をHBSSで洗浄し、a) HsiaoおよびPatterson、2011年、に従ってRNA単離および逆転写のために氷冷Trizol中でホモジナイズしたか、またはb) タンパク質アッセイのために無EDTAプロテアーゼ阻害剤(Roche)を含有する組織抽出試薬I(Invitrogen)中でホモジナイズした。SYBR緑色qRT-PCRのために、検証されたプライマーセットをPrimerbank(Harvard)から得た。サイトカインプロファイルリングのために、City of Hope(Duarte, CA)のClinical Immunobiology Correlative Studies Laboratoryによって、Luminex FLEXMAP 3Dプラットフォームでマウス20プレックスサイトカインアレイ(Invitrogen)が実行された。標準方法によってウエスタンブロットを実行し、1:100希釈のウサギ抗クロードイン8またはウサギ抗クロードイン15(Invitrogen)で探索した。

10

#### 【0099】

微生物DNA抽出、16S rRNA遺伝子増幅およびピロシーケンシング

NIH Human Microbiome Projectの一環でベンチマーク試験されたプロトコルに従って、MoBio PowerSoilキットを使用してマウス糞ペレットから細菌ゲノムDNAを抽出した。16S rRNA遺伝子のV3~V5領域は、454-ピロシーケンシングのためのリンカー配列を有する、個々にバーコード化された汎用性プライマーを使用して増幅されたPCRであった。シーケンシングは、多重化された454-チタンピロシーケンサーを使用して、Baylor College of MedicineのHuman Genome Sequencing Centerで実施された。

20

#### 【0100】

16S rRNA遺伝子配列分析

FASTAおよび品質ファイルはBaylor College of MedicineのAlkek Center for Metagenomics and Microbiome Researchから得、品質をフィルターにかけた。<200bpおよび>1000bpの配列、およびいかなるプライマーミスマッチ、バーコードミスマッチ、あいまいな塩基、6塩基を超えるホモポリマーラン、または30以下の平均品質スコアを有する配列は廃棄された。品質をフィルターにかけた配列は、次にQIIME 1.6ソフトウェアパッケージを使用して分析した(Caporasoら、2010b)。配列を次にキメラについてチェックし、97%の配列類似性指数でUSearchパイプライン(Edgar、2010年; Edgarら、2011年)を使用して操作的分類単位(OTU)に集約した。0.001の最大e値の小サブユニット非冗長参照データベースリリース111(Questら、2013年)に基づいて、その後、基本的ローカルアライメント検索ツール(BLAST)分類子(Altschulら、1990年)を使用してOTUに分類学上の分類を割り当てた。異なる分類レベルで全てのOTUの分類概要を生成するために、これらの分類を次に使用した。樹ベースのアルファおよびベータ多様性分析のために、PyNAST(Caporasoら、2010a)を使用して各OTUの代表的配列を整列させ、FastTree(Priceら、2009年)を使用してこのアライメントに基づいて系統樹を構築した。アルファ多様性推定値(観察された種およびFaithの系統発生多様性[PD]による; (Faith、1992年))、および均一性(Simpsonの均一性およびジニ係数による; (Wittebolleら、2009年))を計算し、各試料からの2082個の配列の希薄化を使用した100反復

30

40

50

に基づくノンパラメトリック試験を使用して群間で比較した。ベータ多様性のために、1試料につき2160個の配列の均一な試料採取を使用し、加重および非加重UniFrac (LozuponeおよびKnight, 2005年)を使用して計算した。統計的有意性を判定するために999個の順列による類似性の分析(ANOSIM; Fiererら2010年)を使用して、ベータ多様性をペアワイズ法(生理食塩水(S)対ポリ(I:C)(P)、ポリ(I:C)(P)対ポリ(I:C)+B・フラジリス処置(P+BF))で比較した。

#### 【0101】

##### 特異的OTUの差の同定

生理食塩水とポリ(I:C)処置群、およびポリ(I:C)とポリ(I:C)+B・フラジリス処置群を識別する鍵となるOTUは、以下の3つの補完的分析を使用してQIIMEによって生成されたOTU表からの不偏の方法を使用して同定された:(1)Metastats比較(Whiteら, 2009年)、(2)最初はQIIME(Knightsら, 2011年)の下の、その後はBorutaの特色選択と一緒の、Genboree microbiome toolset(Riehlら, 2012年)の中のRandom Forestsアルゴリズム、および(3)GalaxyプラットフォームベースのLDA Effect Size分析(Lefse; Segataら, 2011年)。処置群の間で有意に異なるOTUだけが、さらなる分析の候補であった((1)および(3)についての $p < 0.05$ 、ならびに $> 0.0001$ は、Random Forestsおよび以後のBorutaアルゴリズムによる同定の精度の低下を意味する)。Metastats分析は、オンラインインターフェイス(<http://metastats.cbcb.umd.edu>)を使用して任意の2つの処置群のQIIMEによって生成されたOTU表で行った。QIIMEソフトウェアパッケージ(Breiman, 2001年; Knightsら, 2011年)において差別的なOTUを同定するために、1000個の樹および10倍の交差検証に基づいて2つの処置群を一度に比較する、Random Forestsアルゴリズムを使用し、Genboree Microbiome toolset(KursaおよびRudnicki, 2010年; Riehlら, 2012年)で実施したように、さらに検証して、Boruta特色選択アルゴリズムと一緒にした。Borutaアルゴリズムによって確認されたOTUだけが、差別的であると定義された。観察された誤差率と計算された誤差率の間の比は、Random Forests分析の信頼度の尺度として使用した:この比は、生理食塩水対ポリ(I:C)では $5.0(0.1 \pm 0.21$ の推定誤差)であり、ポリ(I:C)対ポリ(I:C)+B・フラジリスでは $2.86(0.23 \pm 0.22$ の推定誤差)。3つの方法のいずれか1つによるいかなる誤表示も克服するために、上の3つの方法のうち少なくとも2つによって同定されたOTUだけを、差別的であると定義した。図1の分析については、MIAによって有意に変化したOTUは、生理食塩水対ポリ(I:C)群を比較することによって同定された。図6の分析については、ポリ(I:C)対ポリ(I:C)+B・フラジリス群を比較し、図1の分析によっても同定されたOTUだけを報告するだけである。

#### 【0102】

SINAアライナー(<http://www.arb-silva.de/aligner/>; Pruesseら, 2012年)を使用して鍵となるOTUを次に整列させ、Arb(Ludwigら, 2004年)を使用してSILVA参照データベースリリース111(Quastら, 2013年)と比較し、FigTree(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)を使用して可視化した。それらの相対的存在度をOTU表から抽出することによって、鍵となるOTUのヒートマップを生成した。これらのデータは、最初はOTUにより、その後は試料によって次に標準化し(行または列の全ての値の平方和が1に等しいように)、Cluster3.0を使用して相関によって集約した(de Hoonら, 2004年)。最後に、Java TreeViewを使用して存在度データを可視化した(Saldanha, 20

10

20

30

40

50

04年)。

【0103】

B. フラジリス定着アッセイ

B. フラジリスまたはビヒクルによる処置の開始から1、2および3週間後に、MIAおよび対照子孫から糞便試料を無菌的に収集した。陽性対照の役割をさせるために、上記の通り無菌マウスをB. フラジリスで処置した。QIAamp DNA Stool Miniキット(Qiagen)を使用して、DNAを糞便試料から単離した。Odamuraら、2008年、に従って、B. フラジリス特異的5' TGATTC CGCATGGTTTCAAT3' (配列番号1) および5' CGACCCATAGAGCCTTCAATC3' (配列番号2)、ならびに汎用性16Sプライマー5' ACTCCTACGGGAGGGCAGCAGT3' (配列番号3) および5' ATTACC GCGGCTGCTGGC3' (配列番号4) によるqPCRのために、50ngのDNAを使用した。

10

【0104】

行動試験

Hsiaoら、2012年、およびMalikovaら、2012年、に記載されているように、成体のMIAおよび対照子孫を行動について試験した。前パルス阻害、オープンフィールド探査、マーブル埋め込み、社会的交流および成体超音波発声のために、6週齢からその順序で始めてマウスを試験し、行動試験の間は少なくとも5日間であった。B. フラジリス処置および対照の群の行動データ(図10)は、PPIおよびオープンフィールド試験についてはマウスの3~5個の独立コホート、マーブル埋め込みについては2~4個のコホート、成体雄超音波発声については2つのコホート、社会的交流については1つのコホートの複数の同腹子から収集された累積結果を表す。行動試験全体の試料サイズの不一致は、我々の実験研究の間に特定の試験がいつ実施されたかについての差を反映する。

20

【0105】

前パルス阻害。PPI試験は知覚運動ゲーティングの手段として使用し、GeyerおよびSwerdlow、2001年、およびSmithら、2007年、に記載される手順に従って実行、分析した。簡潔には、マウスを5分の間SR-LAB驚愕反応系(SanDiego Instruments)の試験チャンバーに順応させ、ホワイトノイズ(驚愕刺激)の6回の120dBのパルスを与え、その後、驚愕なし、驚愕刺激だけ、驚愕と5dBの前パルスまたは驚愕と15dBの前パルスの14の無作為化されたブロックに供した。驚愕反応は圧電センサーによって記録し、PPIパーセントは以下の通りに定義される： $[(驚愕刺激だけ - 驚愕と5または15dBの前パルス) / 驚愕刺激だけ] * 100$ 。

30

【0106】

オープンフィールド探査。オープンフィールド試験は、齧歯動物で不安様および運動行動を測定するために広く使われている。50x50cmの白色プレキシングラスボックスに、マウスを10分の間置いた。オーバーヘッドビデオカメラでセッションを記録し、移動した距離ならびに中心アリーナ(中心の17cm四角)における立入り回数および消費時間を分析するために、Ethovisionソフトウェア(Noldus)を使用した。

40

【0107】

マーブル埋め込み。マーブル埋め込みは、自閉症の個体で観察されるものに類似した、齧歯動物で導き出された反復性の行動である(Silvermanら、2010b)。Thomasら、2009年、およびMalikovaら、2012年、に記載される方法に従って、この試験を実行、分析した。4cm層のスギチップ材敷料を含有する新規試験ケージにマウスを10分の間慣れさせ、その後、新しいハウジングケージに移した。試験ケージに、18個のガラスマーブル(15mm直径)を等距離で6x3に整列させた。マウスを試験ケージに戻し、10分で埋め込まれたマーブルの数を記録した。

【0108】

社交性および社会的好み。Sankoorikalら、2006年、およびYangら

50

、2011年、から採用した方法によって、社会的交流試験を実行、分析した。簡潔には、側チャンバーの各々に透明な交流円筒を含有する40×60cmのプレキシグラス3チャンバー装置に、試験マウスを10分の間慣れさせた。社交性は次の10分のセッションで試験し、そこでは、試験マウスは、反対側のチャンバーの他の交流円筒内の新規玩具（緑色の粘着性のボール）に対して1つの交流円筒内の新規同性の年齢をマッチさせたマウス（社会的物体）を探る機会を与えられた。社会的好みは最後の10分のセッションで試験し、そこでは、試験マウスは、新規のなじみの薄い同性の年齢をマッチさせたマウスに対して今ではなじみのマウス（以前の社交性セッションからの刺激マウス）を探る機会を与えられた。各セッションでは、試験マウスの軌跡は、Ethovisionソフトウェア（Noldus）で追跡した。社交性データは、玩具に対してよりもマウスへの好み：社会的チャンバー内での時間のパーセント - 非社会的チャンバー内での時間パーセントとして提示され、社会的好みのデータは、なじみのマウスに対してよりもなじみの薄いマウスへの好み：なじみの薄いマウスのチャンバー内での時間のパーセント - なじみのマウスのチャンバー内での時間のパーセントとして提示される。チャンバー立入り、ならびに接触ゾーン（交流円筒を囲む7×7cm四角）への立入りおよび接触ゾーンで費やした持続時間の測定のために、同様の指数を測定した。

10

## 【0109】

成体超音波発声。雄のマウスは、伝達の重要な形として雌マウスに応じてUSVを発生する（Portfors, 2007年）。新規雌への曝露に応じる成体雄のUSV発生は、Grimsleyら、2011年、Scattoniら、2011年、およびSilvermanら、2010a、に記載される方法に従って測定した。標準化された異性経験の歴史を提供し、社会的優位性の差を調整するために、成体雄を試験の1週前に単独で収容し、試験の4日前から開始して毎日なじみの薄い成体雌マウスに20分の間曝露させた。試験日に、マウスを10分の間新規ケージに慣れさせた後に、新規の年齢をマッチさせた雌に曝露させた。UltraSoundGateマイクおよびオーディオシステム（Avisoft Bioacoustics）を使用して、USVを3分の間記録した。記録は、512FFTの長さでの高速フーリエ変換および5msホールド時間での閾値ベースアルゴリズムによる検出の後に、AvisoftのSASLab Proソフトウェアを使用して分析した。提示されたデータは、3分のセッション中の呼びかけの持続時間および回数を反映する。

20

30

## 【0110】

## メタボロミクススクリーニング

行動的に検証された成体マウスから、血清を心臓穿刺によって収集した。試料を抽出し、Metabolon, IncによるGC/MS、LC/MSおよびLC/MS/MSプラットフォームで分析した。有機水性溶媒による連続抽出によってタンパク分画を取り出し、TurboVapシステム（Zymark）を使用して濃縮し、真空乾燥させた。LC/MSおよびLC/MS/MSについては、>11の注射標準を含有する酸性または塩基性のLC適合溶媒で試料を再構成し、線形イオントラップフロントエンドおよびフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析計バックエンドの、Waters ACQUITY UPLCおよびThermo-Finnigan LTQ質量分析計にかけた。GC/MSのために、ピストリメチル-シリル-トリフルオロアセトアミドを使用して乾燥窒素の下で試料を誘導体化し、電子衝撃イオン化を使用するThermo-Finnigan Trace DSQ高速スキャン単一四重極質量分析計で分析した。精製された標準の代謝ライブラリーエントリーとの比較によって、化学実体を同定した。各化合物の対数変換および最小観測値による転嫁の後、対比による二元配置ANOVAを使用してデータを分析した。

40

## 【0111】

## 4EPS合成および検出

アリール硫酸の合成についてBurlinghamら、2003年、およびGrimes、1959年、に報告されている手順の修正版を使用して、カリウム4-エチルフェニ

50

ルスルフェートを調製した(図15A)。還流ベンゼン(20ml、活性化アルミナカラムを通過させることによって乾燥させた)中で、4-エチルフェノール(Sigma-Aldrich、5.00g、40.9mmol)を三酸化硫黄-ピリジン錯体(Sigma-Aldrich、5.92g、37.2mmol)で処理した。3.5時間後に、生じた溶液を室温まで冷却させ、その時点で生成物は結晶化した。濾過による単離により、白い結晶質固体として7.93gの粗ピリジニウム4-エチルフェニルスルフェートを得た。この材料の1.00gを、3%トリエチルアミンを含むアセトニトリル10mLに溶解し、シリカゲル(Silicycle、粒径32~63 $\mu$ m)のプラグで濾過し、アセトニトリル中の3%トリエチルアミンで溶出した。濾液を次に濃縮し、生じた残渣を20mLの脱イオン水に溶解し、ダウエックス50WX8イオン交換樹脂(K<sup>+</sup>形)のカラムを通して溶出させ、20mLの脱イオン水で洗い落とした。イオン交換処理をもう一度繰り返して、生じた溶液を真空下で濃縮して、618mg(55%の全体収率)のカリウム4-エチルフェニルスルフェートを白い粉末として得た(図15A)。

10

## 【0112】

真正のカリウム4-エチルフェニルスルフェートの<sup>1</sup>Hおよび<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、Varian Inova500分光計で記録し、内部DMSO-d<sub>5</sub>に対して報告される(<sup>1</sup>H、 $\delta$  = 2.50; <sup>13</sup>C、 $\delta$  = 39.52)。高分解能質量スペクトル(HRMS)は、混合イオン化モードでAgilent G1978AマルチモードソースとAgilent 6200シリーズTOFを使用して取得した(エレクトロスプレーイオン化(ESI)および大気圧化学電離(APCI))。カリウム4-エチルフェニルスルフェートの分光学的データは、以下の通りである:<sup>1</sup>H NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz) 7.11~7.04(m, 4H)、2.54(q, J = 7.6 Hz, 2H)、1.15(t, J = 7.6 Hz, 3H); <sup>13</sup>C NMR(DMSO-d<sub>6</sub>, 126 MHz) 151.4、138.3、127.9、120.6、27.5、16.0; HRMS(マルチモード-ESI/APCI) C<sub>8</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>S[M-K]<sup>-</sup> 201.0227の計算値、実測値201.0225。

20

## 【0113】

真正の4EPSおよび血清試料は、フォトダイオードアレイ検出器を備え、モデルG1946C単一四極子エクスペクトスプレー(expectospray)質量分析計に連結されているAgilent 110シリーズHPLC系を使用して、LC/MSによって分析した。HPLC分離は、Agilent Zorbax XDB-C18カラム(4.6mm x 50mm x 5 $\mu$ m粒径)を使用して、25 $\mu$ mで得られた。4EPSイオンは、エレクトロスプレー毛細管を3kVに設定して、m/z 200.9および580ms/イオンの滞留時間のイオンのための選択イオンモニタリングを使用して検出した。0~50%アセトニトリルからの10分の直線勾配を使用して0.05%トリフルオロ酢酸およびアセトニトリルで溶出したとき、真正のカリウム4EPSは、6.2分の保持時間を有することが見出された。マウス血清中の4EPSの数量化のために、分析物濃度に対して既知濃度の真正カリウム4EPSの総イオン数ピーク面積をプロットすることによって、用量反応曲線を構築した(R<sup>2</sup> = 0.9998; 図15B)。マウス血清試料をアセトニトリルで4倍に希釈し、4 $\mu$ mで3分の間、10,000gで遠心分離した。10 $\mu$ Lの上清を、HPLC系に直接に注入した。

30

40

## 【0114】

## 4EPS十分性実験

野生型マウスに、3から6週齢まで毎日、生理食塩水または30mg/kgの4EPSカリウム塩をi.p.注射した。30mg/kgの4EPSのi.p.注射後の様々な時間に血清中4EPSレベルを測定することによって、用量反応曲線を作成した(図15C)。上記の通り、6から9週齢までマウスの行動を試験した。

## 【0115】

## 統計解析

統計解析は、Prismソフトウェア(Graphpad)を使用して実施した。デー

50

タを正規分布について評価し、平均 ± S E Mとして図面にプロットした。2つの処置群（すなわち対照対4EPS）の間の差は、Welchの修正による対応のない学生tの両側t検定を使用して評価した。複数の群（生理食塩水対ポリ（I：C）対ポリ（I：C）+B・フラジリス/B・テタイオタオミクロン）の間の差を、ボンフェローニの事後検定による一元配置ANOVAを使用して評価した。PPIおよびCD4+T細胞刺激データの分析のために、ボンフェローニ事後検定による二元配置反復測定ANOVAを使用した。代謝産物データの分析のために、対比による二元配置ANOVAを使用した。研究の個々の無作為化計画を考慮し、サンプルサイズは、処置群あたりの個々のマウスの数を表す（Lazic、2013年）。上の検定から現れる有意な差は、図で \* p < 0.05、\*\* p < 0.01、\*\*\* p < 0.001によって示される。注目すべき有意に近い差（0.5 < p < 0.1）を図に示す。注目すべき有意でない（有意に近くない）差は、図で「n.s.」によって示される。

10

#### 【実施例1】

##### 【0116】

免疫活性化母体の子孫はヒトASDのGI症状を示す

ASDの基本的な行動および神経病理学的症状（Malikovaら、2012年）を示す成体MIA子孫は、腸上皮層を越えて循環に入る、経口投与されたFITC-デキストランの転流の増加によって反映されるような、腸障壁の完全性のかなりの欠陥を示すことも見出された（図1A、左パネル）。腸管透過性のこのMIA関連の増加は、実験的大腸炎を誘導するために使用される化学物質であるデキストラン硫酸ナトリウム（DSS）で処置されたマウスで見られるものに類似する（図1A、左パネル）（Wirtzら、2007年）。腸管完全性の欠陥は、3週齢のMIA子孫で検出可能であり（図1A、右パネル）、異常が生命初期に確立されたことを示した。MIA子孫で増加した腸管透過性の分子基礎を評価するために、MIA子孫の結腸を密着帯構成成分ZO-1（TJP1）、ZO-2（TJP2）、ZO-3（TJP3）、オクルディンおよびクローディン（CLDN）1、2、3、4、7、8、12、13および15について検査した（Holmesら、2006年）。GI異常を示すASD児童のサブセットで見出された漏出性腸表現型と一貫して、成体MIA子孫からの結腸は、ZO-1、ZO-2、オクルディンおよびクローディン8の転写産物の発現減少ならびにクローディン15 mRNAの発現増加を示した（図1B）。ZO-1の発現欠損は成体MIA子孫の小腸でも観察され（図2A）、腸障壁の完全性の欠陥の広がりを実証する。

20

30

##### 【0117】

透過性の増加はいくつかの腸管疾患ならびにASDのサブセットで観察され、一般的に炎症の徴候と関連している（Heringら、2012年；Turner、2009年；White、2003年）。密着帯構成成分の発現の変化に加えて、成体MIA子孫からの結腸は、インターロイキン-6（IL-6）mRNAおよびタンパク質のレベルの増加（図1Cおよび1D）ならびにサイトカイン/ケモカインIL-12p40/p70、IP-10、MIGおよびMIP-1aのレベルの低下（図1D）を示すことが見出された。MIA子孫からの小腸は、変化したサイトカイン/ケモカインプロファイルも示す（図2C）。腸管サイトカインの変化には、ヘマトキシリンおよびエオシン染色切片からの肉眼的上皮形態の組織学的検査によって評価される、明白なGI病理が付随しなかった。しかし、免疫関連のシグナル伝達因子の変化と一貫して、成体MIA子孫からの腸間膜リンパ節および脾臓は、低下したレベルの調節T細胞ならびにCD4+ヘルパーT細胞によるIL-6およびIL-17の過応答性産生を有することが見出され、炎症誘発性表現型を示唆している（図3A~D）（Hsiaoら、2012年）。腸免疫活性化を支持する同様の知見が、ASD個体のサブセットで見られる（Onoreら、2012年）。

40

##### 【0118】

前述のものを考慮すると、この実施例は、免疫活性化母体の成体子孫は腸透過性の増加および異常な腸内サイトカインプロファイルを示し、マウスモデルのASD関連のGI症状を再現することを示す。

50



## 【実施例 2】

## 【0119】

M I A 子孫は、腸微生物叢の生命異常を示す

この実施例では、A S D マウスモデルにおける正常な腸微生物叢の破壊と G I 機能不全の間の潜在的な関連性を検討した。

## 【0120】

M I A が微生物叢の変化を誘導するかどうか評価するために、ポリ ( I : C ) または生理食塩水で処置した母体の成体子孫から単離された試料の 16 S r R N A 遺伝子シーケンシングによって、糞便の細菌集団を調査した。アルファ多様性、すなわち種の豊富さおよび均一性は、F a i t h の系統発生多様性 ( P D ) 指数、および観察された種の数 ( それぞれ  $p = 1.0000$  および  $0.2790$  )、ならびにジニ係数および S i m p s o n 均一性指数 ( それぞれ  $p = 0.5430$  および  $p = 0.2610$  ; 図 4 A および 4 B ) で測定されたように、対照と M I A 子孫の間で有意に異ならなかった。対照的に、微生物群落の間の系統発生類似性の程度を測定する非加重 U n i F r a c 分析は、成体子孫の腸微生物叢に及ぼす M I A の強大な影響を明らかにする ( 図 5 A ~ E )。主座標分析により M I A 試料は対照とは異なって集約し ( P C o A ; A N O S I M R = 0.2829、 $p = 0.0030$  )、対照と比較して M I A 子孫からの腸細菌の構成員の頑強な変化を示す ( 図 5 A )。腸微生物叢の組成の変化に及ぼす M I A の影響は、我々の調査の総読取り数のおよそ 90.1% ( S および P 群で 51, 586 中 46, 484 の読取り数 ) を占める、クロストリジア綱およびバクテロイデス綱からの配列を P C o A によって排他的に検査したときにさらに明白である ( R = 0.2331、 $p = 0.0070$  ; 図 5 B ) が、クロストリジア綱およびバクテロイデス綱の配列を他の全ての細菌綱の P C o A から特異的に排除したときには明白でない ( R = 0.1051、 $p = 0.0700$  ; 図 5 C )。このことは、クロストリジア綱およびバクテロイデス綱の操作的分類単位 ( O T U ) の多様性の変化が、M I A 子孫と対照間の腸微生物叢の差の主要な推進体であることを示す。

## 【0121】

試料のいずれかにわたって検出された 1474 O T U 中 67 O T U は、細菌のラクノスピラ科、ルミノコッカス科、エリシペロトリクス科、アルカリゲネス科、ポルフィロモナス科、プレボテラ科およびリケネラ科、および未分類バクテロイデス目に割り当てられるものを含む処置群を識別する ( 図 5 D )。これらの 67 個の差別的な O T U のうち、19 個は対照試料でより豊富であり、48 個は M I A 試料でより豊富である。P C o A 結果 ( 図 5 A ~ C ) と一貫して、M I A 子孫と対照を識別する大多数の O T U は、バクテロイデス綱 ( 67 O T U のうちの 45 個 ; 67.2% ) およびクロストリジア綱 ( 67 O T U のうちの 17 個 ; 25.4% ) に割り当てられ、残りの少数の差別的 O T U は、プロテオバクテリア綱 ( 3 O T U ; 4.5% ) および他の綱 ( テネリキューテスおよび未分類、各 1 O T U ; 3.0% ) に属する。興味深いことには、ポルフィロモナス科、プレボテラ科および多くの未分類バクテロイデス目 ( 45 個の差別的バクテロイデス O T U のうちの 36 個 ; 80% )、およびラクノスピラ科 ( 14 個の差別的クロストリジウム O T U のうちの 8 個 ; 57% ) は、M I A 子孫でより豊富であった。反対に、ルミノコッカス科 ( 2 O T U )、エリシペロトリクス科 ( 2 O T U ) およびベータプロテオバクテリアの科のアルカリゲネス科 ( 2 O T U ) は、対照子孫でより豊富であった ( 図 5 D )。これらのデータは、特異的ラクノスピラ科が、他のバクテロイデス種とともに M I A 病原性で重要な役割を演じるが、他の分類群は保護的役割を演じる可能性を示す。重要なことに、M I A 子孫と対照の間に、クロストリジア綱 (  $13.63 \pm 2.54\%$  対  $14.44 \pm 2.84\%$ 、平均  $\pm$  S E M ; スチューデントの t 検定  $p = 0.8340$  ) およびバクテロイデス綱 (  $76.25 \pm 3.22\%$  対  $76.22 \pm 3.46\%$ 、平均  $\pm$  S E M ; スチューデントの t 検定  $p = 0.9943$  ) の全体の相対的存在度に有意差はなく ( 図 5 E、左パネル )、稀な O T U の構成員の変化が、実験群の間での腸微生物叢の主要な変化を推進することを示す。

## 【0122】

分類上の多様性の差はより顕著でない細菌綱でも見られ、M I A 子孫は、対照と比較し

てエリシペロトリックスの有意に低下した相対的存在度を示した(0.15の±0.03%対0.74±0.25%、平均±SEM; スチューデントのt検定、p値=0.0334)(図5E、右パネル)。全体として、MIAは、細菌綱クロストリジア綱およびバクテロイデス綱の特異的OTUの変化によって主に推進された、腸微生物叢の生命異常につながるが見出された。クロストリジア目のラクノスピラ科およびルミノコッカス科として分類されたOTUの変化は、ASD対象の糞便でのクロストリジウム属の種の増加に関する報告に対応する(Finegoldら、2012年)。全体として、マウスにおける一次自閉症危険因子としてのMIAのモデリングは、ASDの行動および神経病理学的特色(Boksa、2010年)だけでなく、ASD個体のサブセットで記載されるそれらに類似したGI症状も誘導する。本明細書で提示されるデータは、共存するGI問題を有するヒトASDのためのモデルとしてMIAを使用することができることを示す。

10

## 【実施例3】

## 【0123】

B.フラジリス処置は、MIA子孫で腸障壁の完全性を向上させる

腸内微生物は、腸管上皮の発達、メンテナンスおよび修復で重要な役割を演ずる(Sharmaら、2010年; Turner、2009年)。腸微生物叢を標的にすることがMIA関連のGI異常の発達または持続性に影響を与えることができるかどうか判定するために、離乳時に子孫をヒト片利共生細菌B.フラジリスで処置し、その後、8週齢時にGI異常について検査した。注目すべきことに、B.フラジリス処置は、MIA子孫で腸管透過性を修正した(図6A)。さらに、B.フラジリス処置はCLDN8および15の遺伝子発現のMIA関連の変化を改善したが、TJP1、TJP2またはOCLN mRNAの発現レベルに対して有意な影響を及ぼさなかった(図6B)。結腸においてクロードイン8および15のタンパク質レベルで同様の変化が観察され、B.フラジリス処置によって回復する(図6C~D)。密着帯発現に及ぼすB.フラジリスのそのような影響は、MIA子孫からの小腸では観察されず(図2B)、バクテロイデス属の種が主に結腸で見出されるという事実と一貫している。さらに、プロバイオティック投与より前のGI欠陥の存在(図1A、右パネル)は、B.フラジリスがMIA子孫でASD関連の病理を処置することができることを示唆する。

20

## 【0124】

B.フラジリス処置は、結腸IL-6のmRNAおよびタンパク質のレベルのMIA関連の増加を、対照マウスで見出されるレベルに回復させもした(図6E~F)。MIA子孫の結腸および小腸の両方で他のサイトカインのレベルが変化したが(図1Dおよび2C)、これらはB.フラジリス処置の影響を受けず、IL-6への特異性を明らかにした。この知見は、MIAモデルでのIL-6の重大な役割と一貫している(Smithら、2007年)。IL-6を含むいくつかのサイトカインは密着帯をモジュレートして、腸障壁の完全性を調節することが報告されているので、変化した腸内サイトカインプロファイルは、MIA子孫で観察される腸管透過性の増加の基礎を形成することができる(Suzukiら、2011年; Turner、2009年)。組換えIL-6処置が*in vivo*および*in vitro*結腸器官培養でクロードイン8およびクロードイン15の結腸レベルをモジュレートすることができることがさらに見出され(図7A~C)、結腸IL-6レベルのB.フラジリスによって媒介される回復が腸透過性に対するその影響の根底にある可能性が示唆された。総合すると、これらの知見は、MIA子孫のB.フラジリス処置がGI障壁の完全性の欠陥を元に戻し、密着帯およびサイトカイン発現の変化を修正することを実証する。

30

40

## 【実施例4】

## 【0125】

B.フラジリス処置はMIA子孫で微生物叢の変化を回復する

MIA子孫でGI生理を改善することに加えて、B.フラジリス処置は、腸内微生物叢の組成に及ぼす長期影響を誘導する。PCoAにより全体レベルで(ANOSIM R=0.0060、p=0.4470)、または微生物叢の豊富さ(PD: p=0.2980

50

、観察された種：  $p = 0.5440$  ) および均一性 ( G i n i :  $p = 0.6110$ 、 S i m p s o n 均一性：  $p = 0.5600$  ; 図 8 A、4 A ~ B ) で、有意な差は観察されなかった。しかし、成体 M I A 子孫を対照から識別する特定の鍵となる O T U を評価した結果、B・フラジリス処置の修正効果は明らかであった ( 図 8 B )。特に、B・フラジリスで処置した M I A 子孫は、M I A を対照子孫から識別する 67 O T U 中 6 つの相対的存在度の完全な回復を示した ( M I A と対照子孫の間で差別的であると同定されなかった他の 28 O T U は、M I A 子孫と B・フラジリスで処置したそれらを識別することができた)。これらの 6 O T U は、ラクノスピラ科の未分類のバクテロイデス綱およびクロストリジア綱に分類学上割り当てられる ( 図 8 B )。注目すべきことに、定量的リアルタイム P C R によって評価された通り、処置した M I A 子孫から単離された糞便および盲腸の試料で検出不能のままである B・フラジリスの持続的な定着の不在下で、これらの変化は起こった ( 図 9 A ~ B )。興味深いことに、M I A 子孫で上昇した 10 個のラクノスピラ科のうちの 4 個は、B・フラジリス処置によって修正された ( 図 5 D および 8 A ~ C )。さらに、B・フラジリス処置は、2 つのバクテロイデス綱 O T U の相対的存在度を対照で観察されたレベルに回復させた ( 図 8 B )。M I A によって変化し、B・フラジリス処置によって回復した 6 O T U の系統発生再構築は、2 つのバクテロイデス綱 O T U が単系統群に集まることを明らかにする ( 図 8 D )。さらに、M I A によって有意に変化し、B・フラジリスによって修正されたラクノスピラ科 O T U は、2 つの別個の単系統群に集まる ( 図 8 D )。これらの結果は、B・フラジリスによる M I A 子孫の処置は B・フラジリス自体の持続的な定着につながるができないが、それが、ラクノスピラ科ならびに未分類のバクテロイデス目の関連微生物の特定の群の相対的存在度を修正することができることを示す。

#### 【 0 1 2 6 】

全体として、この実施例は、B・フラジリスによる M I A 子孫の処置が、片利共生微生物叢の M I A 関連の生命異常に關与する特定の変化を改善し、自閉症個体のサブセットで観察されるものに類似する G I 異常を修正することができることを実証する。

#### 【 実施例 5 】

#### 【 0 1 2 7 】

B・フラジリス処置は、A S D 関連の行動異常を修正する

中核的 A S D 行動異常への G I 機能不全の潜在的影響を探るために、B・フラジリス処置が M I A 子孫で A S D 関連の行動に影響を与えるかどうかという問題を調べた。

#### 【 0 1 2 8 】

様々な行動アッセイで、成体 M I A 子孫は、A S D の主要な行動特色を示すことが見出された。オープンフィールド探査は、オープンアリーナでの動物の運動を移動および不安の尺度にマッピングすることを含む ( B a i l e y および C r a w l e y、2009年)。M I A 子孫はアリーナの中央での立入りおよび消費時間の減少を示したが、不安様行動の指標となる総移動距離の差は示さなかった ( 図 10 A ; 生理食塩水 ( S ) とポリ ( I : C ) ( P ) を比較)。前パルス阻害 ( P P I ) 作業は、より低い強度の刺激 ( 「前パルス」 ) が先行する聴覚音 ( 「パルス」 ) に対するその驚愕を阻害する動物の能力を測定する。P P I の欠損は障害のある知覚運動のゲーティングの尺度であり、自閉症を含むいくつかの神経発達障害で観察される ( P e r r y ら、2007年)。M I A 子孫は、5 または 15 d b の前パルスに応じて低下した P P I を示した ( 図 10 B )。マーブル埋め込み試験は、不安が交絡していない自然の穴掘行動に繰り返し従事するマウスの性質を測定する ( T h o m a s ら、2009年)。M I A 子孫は、対照と比較して増加した常同的マーブル埋め込みを示し ( 図 10 C )、それは、中核的 A S D 症状としての反復性の行動をモデル化する。異なる社会的パラダイムを越えて異なる構造化モチーフで数種類の呼びかけが発生し、使用されることを想定し、超音波発声はマウスによる伝達を測定するために使用される ( G r i m s l e y ら、2011年 ; S c a t t o n i ら、2011年 ; S i l v e r m a n ら、2010b)。社会的遭遇に応じて発生した超音波発声の回数および持続時間の低減によって示される通り、M I A 子孫は伝達において A S D 関連の欠陥を示した

(図10D)。最後に、社会的交流でのASD関連の機能障害を測定するために、3チャンパー社会的試験を使用する(Silvermanら、2010a)。社交性は、新規物体よりも新規マウスと交流するマウスの好みによって例示され、社会的目新しさ(社会的好み)は、なじみのマウスに対してなじみのないマウスと交流する好みで特徴付けられる。MIA子孫は、社交性および社会的好みの両方の欠陥を示した(図10E~F)。全体として、それらの行動アッセイは、ASD関連の不安および欠陥知覚運動ゲーティングに加えて、ASDの主要な診断症状を評価し、ASDマウスモデルの表現型分析のために広く使用されている(Hanら、2012年; Novarinoら、2012年; Schmeisserら、2012年; Silvermanら、2010a; Tabuchiら、2007年; Tsaiら、2012年; Wonら、2012年)。

10

#### 【0129】

注目すべきことに、B・フラジリスによる経口処置は、これらのASD関連の行動異常の多くを改善した。中央立入り回数およびオープンフィールドの中央での消費時間の回復によって示される通り、B・フラジリスで処置したMIA子孫は、オープンフィールドで不安様行動を示さなかった(図10A; ポリ(I:C)(P)とポリ(I:C)+B・フラジリス(P+BF)を比較)。5および15dbの前パルスに応じた、組み合わせたPPIの増加によって示される通り、B・フラジリスはMIA子孫で知覚運動ゲーティングを向上させ(図10B)、音声刺激に対する驚愕の強度に有意な影響はなかった(データ示さず)。超音波発声の回数および持続時間の増加で例示される通り、B・フラジリスで処置したMIA子孫は、常同的マーブル埋め込みのレベルの低下も示し、伝達行動も回復した(図10C~D)。興味深いことに、B・フラジリス処置は、MIA子孫によって発生された呼びかけあたりの持続時間を、生理食塩水対照で観察されたそれを超えるレベルに上昇させ(図10D)、伝達する性質の正常化にもかかわらず(発生された呼びかけ数に対照と比較して差はなかった)、より長い音節を強化して生成された呼びかけのタイプに質的な差があることを示唆する。

20

#### 【0130】

B・フラジリスで処置したMIA子孫は、伝達、反復性、不安様および知覚運動の行動の向上を示したが、それらは社交性および社会的好みの欠陥を保持する(図10E)。興味深いことに、これは、ASD個体(CanitanoおよびScandurra、2008年)およびCNTNAP2ノックアウトマウス、ASDの遺伝子マウスモデル(Penagarikanoら、2011年)、へのリスペリドンの投与によって社会的行動を向上させる能力の欠如に対応する。これらのデータは、他の行動と比較して社会的行動を支配する回路または論理和回路の柔軟性に基本的な差があること、およびMIA子孫でのASD関連の行動欠陥の改善の過程でB・フラジリス処置が特定の脳回路をモジュレートすることを示す。

30

#### 【0131】

さらに、B・フラジリス処置に対応する行動の向上は、MIA子孫での全身免疫の変化と関連せず(図3A~C)、B・フラジリスによる免疫調節効果を与えると以前に同定された分子である多糖A(PSA)に依存しなかった(図3E)(Mazmanianら、2008年; Ochoa-Reparazら、2010年; RoundおよびMazmanian、2010年)。さらに、バクテロイデス・テタイオタオミクロンによる同様の処置もMIA子孫で、不安様、反復性および伝達の行動を有意に向上させるので、行動の改善はB・フラジリスに特異的でない(図11A~D)。これは、B・フラジリス処置がGI管でのB・フラジリスの持続的な定着につながるのと我々の知見(図9A~B)と一貫し、レジデント微生物叢における長期シフトを引き起こすことによって作用しているのかもしれない(図4を参照)。

40

#### 【実施例6】

#### 【0132】

血清メタボローム(metabolome)は、MIAおよびB・フラジリス処置によってモジュレートされる

50

代謝研究は、腸微生物生成物が多い腸管外組織で見出され、微生物叢に由来する分子は、マウスおよびヒトで代謝、免疫、行動の表現型に影響することができることを示した（Bercikら、2011年；BlumbergおよびPowrie、2012年；Hooperら、2012年；MacFabe、2012年；Matsumotoら、2012年；Nicholsonら、2012年）。この実施例では、潜在性を検討した。

【0133】

血清中代謝産物のMIA関連の変化を同定するために、質量分析（GC/LC-MS）をベースとした代謝プロファイリングによるガスクロマトグラフィー/液体クロマトグラフィーを使用した。2,400個の代謝産物を分析し、このうち、アミノ酸（94）、ペプチド（15）、炭水化物（22）、エネルギー（10）、脂質（128）、ヌクレオチド（23）、生体外物質（19）ならびに補因子およびビタミン（11）スーパー経路にわたる322個の代謝産物が成体マウスからの血清で検出された（表4）。興味深いことに、MIAは、検出された全ての血清中代謝産物の8%で統計的に有意な変化をもたらす（表3）。さらに、出産後のB.フラジリス処置は、血清中メタボロームに対して有意な影響を及ぼし、検出される全ての代謝産物の34%を変化させる（表4および図12）。

【0134】

【表3-1】

| スーパー経路 | 下位経路               | 代謝産物          | 変化倍率 | p値     |
|--------|--------------------|---------------|------|--------|
| アミノ酸   | グリシン、セリンおよびトレオニン代謝 | N-アセチルセリン     | 0.73 | 0.0354 |
| アミノ酸   | アラニンおよびアスパラギン酸代謝   | ベータアラニン       | 0.46 | 0.0500 |
| アミノ酸   | グルタミン酸代謝           | グルタミン         | 1.2  | 0.0173 |
| アミノ酸   | ヒスチジン代謝            | トランスウロカネート    | 1.71 | 0.0240 |
| アミノ酸   | ヒスチジン代謝            | イミダゾールプロピオネート | 1.35 | 0.0161 |
| アミノ酸   | フェニルアラニンおよびチロシン代謝  | フェニルアセチルグリシン  | 0.71 | 0.0821 |
| アミノ酸   | フェニルアラニンおよびチロシン代謝  | フェノールスルフェート   | 0.68 | 0.0092 |
| アミノ酸   | トリプトファン代謝          | インドールピルベート    | 1.57 | 0.0240 |
| アミノ酸   | トリプトファン代謝          | セロトニン         | 1.15 | 0.0804 |

10

20

30

40

【表 3 - 2】

|      |                        |                             |      |        |
|------|------------------------|-----------------------------|------|--------|
| アミノ酸 | バリン、ロイシンおよびイソロイシン代謝    | 3-メチル-2-オキソバレレート            | 0.75 | 0.0152 |
| アミノ酸 | バリン、ロイシンおよびイソロイシン代謝    | 4-メチル-2-オキソペンタオエート          | 0.7  | 0.0072 |
| アミノ酸 | システイン、メチオニン、SAM、タウリン代謝 | システイン                       | 0.73 | 0.0582 |
| アミノ酸 | 尿素サイクル; アルギニン、プロリン代謝   | アルギニン                       | 0.87 | 0.0761 |
| アミノ酸 | 尿素サイクル; アルギニン、プロリン代謝   | オルニチン                       | 0.68 | 0.0956 |
| アミノ酸 | ポリアミン代謝                | 5-メチルチオアデノシン                | 1.34 | 0.0425 |
| ペプチド | ジペプチド                  | グリシルバリン                     | 0.48 | 0.0077 |
| ペプチド | フィブリノゲン切断ペプチド          | TDTEDKGEFLSEGGGVR           | 1.8  | 0.0567 |
| 炭水化物 | 解糖、糖新生、ピルビン酸代謝         | 3-ホスホグリセリン酸                 | 0.51 | 0.0265 |
| 炭水化物 | 解糖、糖新生、ピルビン酸代謝         | ホスホエノールピルビン酸                | 0.56 | 0.0344 |
| 炭水化物 | ヌクレオチド糖、ペントース代謝        | リボース                        | 1.44 | 0.0499 |
| 炭水化物 | ヌクレオチド糖、ペントース代謝        | キシロース                       | 1.34 | 0.0827 |
| 脂質   | 必須脂肪酸                  | ドコサペンタエノエート(n3 DPA; 22:5n3) | 0.75 | 0.0988 |
| 脂質   | 必須脂肪酸                  | ドコサペンタエノエート(n6 DPA; 22:5n6) | 0.83 | 0.0970 |
| 脂質   | 必須脂肪酸                  | ドコサヘキサエノエート(DHA; 22:6n3)    | 0.8  | 0.0965 |
| 脂質   | 長鎖脂肪酸                  | ステアレート                      | 0.88 | 0.0491 |
| 脂質   | 長鎖脂肪酸                  | エイコセノエート                    | 0.61 | 0.0151 |
| 脂質   | 長鎖脂肪酸                  | ジホモ-リノレート(20:2n6)           | 0.79 | 0.0614 |
| 脂質   | 長鎖脂肪酸                  | アドレネート                      | 0.82 | 0.0923 |

10

20

30

40

【表 3 - 3】

|  |                       |                         |       |        |    |
|--|-----------------------|-------------------------|-------|--------|----|
| 脂質   | 脂肪酸、モノ<br>ヒドロキシ       | 13-HODE+9-HODE          | 0.72  | 0.0489 |    |
| 脂質   | 脂肪酸、ジカ<br>ルボキシレー<br>ト | オクタデカンジオエート             | 0.83  | 0.0413 |    |
| 脂質   | エイコサノイ<br>ド           | 12-HETE                 | 0.69  | 0.0152 |    |
| 脂質   | イノシトール<br>代謝          | ミオイノシトール                | 0.86  | 0.0817 | 10 |
| 脂質   | リゾ脂質                  | 1-パルミトイルグリセロホスホエタノールアミン | 0.81  | 0.0868 |    |
| 脂質   | リゾ脂質                  | 1-オレオイルグリセロホスホエタノールアミン  | 0.7   | 0.0169 |    |
| 脂質   | リゾ脂質                  | 1-ペンタデカノイルグリセロホスホコリン    | 1.43  | 0.0505 |    |
| 脂質   | リゾ脂質                  | 1-パルミトレオイルグリセロホスホコリン    | 1.49  | 0.0388 |    |
| 脂質   | リゾ脂質                  | 1-ステアロイルグリセロホスホイノシトール   | 0.64  | 0.0059 |    |
| 脂質   | リゾ脂質                  | 1-パルミトイルプラスメニルエタノールアミン  | 0.73  | 0.0399 | 20 |
| 補因子およびビタミン   | ヘモグロビン<br>およびポルフィリン代謝 | ビリルビン(E,E)              | 2.68  | 0.0496 |    |
| 補因子およびビタミン   | パントテネートおよび CoA<br>代謝  | パントテネート                 | 1.33  | 0.0643 |    |
| 補因子およびビタミン   | ベンゾエート<br>代謝          | 4-エチルフェニルスルフェート         | 46.39 | 0.0359 |    |
| 補因子およびビタミン   | 化学物質                  | グリコレート(ヒドロキシアセテート)      | 1.17  | 0.0498 | 30 |
| 補因子およびビタミン   | 食物構成成分/<br>植物         | エルゴチオネイン                | 0.72  | 0.0688 |    |
| 補因子およびビタミン   | 食物構成成分/<br>植物         | イコールスルフェート              | 0.78  | 0.0315 |    |
| 対照に対するポリ(I:C)注射母体の 10 週齢子孫における血清中代謝産物のレベルの注目すべき変化(p<0.10)の要約。血清試料を抽出し、Metabolon,Inc.による GC/LC-MS によって分析した。データは、対比による二元配置 ANOVA を使用して分析した。追加の詳細は、実験手順において提供される。 |                       |                         |       |        |    |

【 0 1 3 5 】

40

【表 4 - 1】

| 表 4.B. フラジリス処置の後に生理食塩水およびポリ(I:C)子孫で変化した血清中代謝産物 |                     |                         |               |                  |      |
|--|---------------------|-------------------------|---------------|------------------|------|
| スーパー経路   | 下位経路                | 生化学的名称                  | プラットフォーム      | I:C-Bfrag<br>CON |      |
|  |                     | サルコシン(N-メチルグリシン)        | GC/MS         | 0.64             |      |
|  | アラニンおよびアスパラギン酸代謝    | アスパラギン酸                 | GC/MS         | 0.76             |      |
|  |                     | 3-ウレイドプロピオネート           | LC/MS pos     | 0.64             |      |
|  | リシン代謝               | グルタレート(ペンタンジオエート)       | GC/MS         | 0.78             |      |
|  |                     | チロシン                    | LC/MS pos     | 0.85             |      |
|  |                     | 3-(4-ヒドロキシフェニル)ラクテート    | LC/MS neg     | 0.81             |      |
|  |                     | 3-フェニルプロピオネート(ヒドロシナメート) | LC/MS neg     | 0.60             |      |
|  |                     | セロトニン(5HT)              | LC/MS pos     | 1.26             |      |
|  | バリン、ロイシンおよびイソロイシン代謝 | 3-メチル-2-オキソブチレート        | LC/MS neg     | 0.68             |      |
|  |                     | 3-メチル-2-オキソバレレート        | LC/MS neg     | 0.67             |      |
|  |                     | 4-メチル-2-オキソペンタノエート      | LC/MS neg     | 0.63             |      |
|  |                     | イソブチリルカルニチン             | LC/MS pos     | 0.68             |      |
|  |                     | 2-メチルブチロイルカルニチン         | LC/MS pos     | 0.66             |      |
|  |                     | イソバレリルカルニチン             | LC/MS pos     | 0.76             |      |
|  |                     | 2-ヒドロキシブチレート(AHB)       | GC/MS         | 0.64             |      |
|  | 尿素サイクル;アルギニン、プロリン代謝 | アルギニン                   | LC/MS pos     | 0.86             |      |
|  |                     | オルニチン                   | GC/MS         | 0.66             |      |
|  | ブタノエート代謝            |                         | 2-アミノブチレート    | LC/MS pos        | 0.76 |
|  | グアニジノおよびアセトアミド代謝    |                         | 4-グアニジノブタノエート | LC/MS pos        | 0.65 |
|  |                     |                         | 5-オキソプロリン     | LC/MS neg        | 0.80 |
| ペプチド   |                     | ジペプチド                   | グリシルバリン       | LC/MS pos        | 0.22 |
|  | ガンマグルタミルトリプトファン     |                         | LC/MS pos     | 0.77             |      |
|  | フィブリノゲン切断ペプチド       | TDTEDKGEFLSEGGGV*       | LC/MS pos     | 1.43             |      |
|  |                     | TDTEDKGEFLSEGGGVR*      | LC/MS pos     | 3.46             |      |

10

20

30



【表4 - 2】

|             |               |                                   |           |      |  |
|-------------|---------------|-----------------------------------|-----------|------|--|
|             |               | ソルビトール                            | GC/MS     | 0.63 |  |
|             |               | ピルビン酸                             | GC/MS     | 0.58 |  |
|             |               | リビトール                             | GC/MS     | 0.74 |  |
|             |               | リボース                              | GC/MS     | 1.97 |  |
|             |               | リブロース                             | GC/MS     | 0.68 |  |
|             |               | キシリトール                            | GC/MS     | 1.62 |  |
| エネルギー       | クレブス回路        | クエン酸                              | GC/MS     | 0.80 |  |
|             |               | フマル酸                              | GC/MS     | 0.64 |  |
|             |               | リンゴ酸                              | GC/MS     | 0.69 |  |
| 脂質          | 必須脂肪酸         | リノレート(18:2n6)                     | LC/MS neg | 0.64 |  |
|             |               | リノレネート[アルファまたはガンマ;(18:3n3 または 6)] | LC/MS neg | 0.62 |  |
|             |               | ジホモ-リノレネート(20:3n3 または n6)         | LC/MS neg | 0.69 |  |
|             |               | ドコサペンタエノエート(n3 DPA; 22:5n3)       | LC/MS neg | 0.72 |  |
|             |               | ドコサペンタエノエート(n6 DPA; 22:5n6)       | LC/MS neg | 0.70 |  |
|             |               | ドコサヘキサエノエート(DHA; 22:6n3)          | LC/MS neg | 0.77 |  |
|             |               | ヘプタノエート(7:0)                      | LC/MS neg | 0.81 |  |
|             |               | ペラルゴネート(9:0)                      | LC/MS neg | 0.81 |  |
|             |               | ラウレート(12:0)                       | LC/MS neg | 0.85 |  |
|             | 長鎖脂肪酸         | ミリステート(14:0)                      | GC/MS     | 0.70 |  |
|             |               | パルミテート(16:0)                      | LC/MS neg | 0.72 |  |
|             |               | パルミトレエート(16:1n7)                  | GC/MS     | 0.70 |  |
|             |               | マルガレート(17:0)                      | GC/MS     | 0.60 |  |
|             |               | ステアレート(18:0)                      | LC/MS neg | 0.75 |  |
|             |               | オレエート(18:1n9)                     | GC/MS     | 0.56 |  |
|             |               | ステアリドネート(18:4n3)                  | LC/MS neg | 0.66 |  |
|             |               | エイコセノエート(20:1n9 または 11)           | LC/MS neg | 0.59 |  |
|             |               | ジホモ-リノレート(20:2n6)                 | LC/MS neg | 0.63 |  |
|             |               | ミード酸(20:3n9)                      | LC/MS neg | 0.74 |  |
|             |               | アドレネート(22:4n6)                    | LC/MS neg | 0.75 |  |
|             |               | 8-ヒドロキシオクタノエート                    | LC/MS neg | 0.72 |  |
|             |               | 3-ヒドロキシデカノエート                     | LC/MS neg | 0.51 |  |
|             |               | 16-ヒドロキシパルミテート                    | LC/MS neg | 0.70 |  |
|             | 脂肪酸、ジヒドロキシ    | 12,13-ヒドロキシオクタデカ-9(Z)-エノエート       | LC/MS neg | 0.54 |  |
|             |               | 9,10-ヒドロキシオクタデカ-12(Z)-エン酸         | LC/MS neg | 0.48 |  |
|             | 脂肪酸、ジカルボキシレート | アジペート                             | GC/MS     | 0.62 |  |
|             |               | 2-ヒドロキシグルタレート                     | GC/MS     | 0.83 |  |
|             |               | ピメレート(ヘプタンジオエート)                  | GC/MS     | 0.61 |  |
|             |               | スベレート(オクタンジオエート)                  | LC/MS pos | 0.69 |  |
|             |               | セバケート(デカンジオエート)                   | LC/MS neg | 0.64 |  |
|             |               | アゼレート(ノナンジオエート)                   | LC/MS neg | 0.72 |  |
|             |               | ドデカンジオエート                         | LC/MS neg | 0.65 |  |
|             |               | テトラデカンジオエート                       | LC/MS neg | 0.57 |  |
| ヘキサデカンジオエート |               | LC/MS neg                         | 0.54      |      |  |
| オクタデカンジオエート |               | LC/MS neg                         | 0.53      |      |  |

10

20

30

40

【表4 - 3】

|  |                           |                           |           |       |      |
|--|---------------------------|---------------------------|-----------|-------|------|
|  |                           | ウンデカンジオエート                | LC/MS neg | 0.66  |      |
|  | エイコサノイド                   | 12-HETE                   | LC/MS neg | 0.57  |      |
|  | 脂肪酸代謝<br>(さらに<br>BCAA 代謝) | プロピオニルカルニチン               | LC/MS pos | 0.79  |      |
|  |                           | ブチリルカルニチン                 | LC/MS pos | 0.64  |      |
|  | 脂肪酸代謝                     | バレリルカルニチン                 | LC/MS pos | 0.56  | 10   |
|  |                           | 3-デヒドロカルニチン*              | LC/MS pos | 0.71  |      |
|  |                           | ヘキサノイルカルニチン               | LC/MS pos | 0.58  |      |
|  |                           | オクタノイルカルニチン               | LC/MS pos | 0.69  |      |
|  |                           | コリン                       | LC/MS pos | 0.79  |      |
|  |                           | キロ-イノシトール                 | GC/MS     | 0.66  |      |
|  |                           | ピニトール                     | GC/MS     | 0.61  |      |
|  | ケトン体                      | 3-ヒドロキシブチレート(BHBA)        | GC/MS     | 0.66  |      |
|  |                           | 1,2-プロパンジオール              | GC/MS     | 0.83  |      |
|  |                           | 1-リノレオイルグリセロホスホエタノールアミン*  | LC/MS neg | 0.71  |      |
|  |                           | 1-アラキドノイルグリセロホスホエタノールアミン* | LC/MS neg | 0.76  | 20   |
|  |                           | 2-アラキドノイルグリセロホスホエタノールアミン* | LC/MS neg | 0.78  |      |
|  |                           | 1-ステアロイルグリセロホスホイノシトール     | LC/MS neg | 0.66  |      |
|  |                           | 1-リノレオイルグリセロホスホイノシトール*    | LC/MS neg | 0.59  |      |
|  |                           | 1-アラキドノイルグリセロホスホイノシトール*   | LC/MS neg | 0.61  |      |
|  |                           | 1-パルミトイルプラスメニルエタノールアミン*   | LC/MS neg | 0.72  |      |
|  |                           |                           |           |       |      |
|  |                           | ヒボキサンチン                   | GC/MS     | 8.55  | 30   |
|  |                           | イノシン                      | LC/MS neg | 8.36  |      |
|  |                           | アデノシン                     | LC/MS pos | 5.63  |      |
|  |                           | アデノシン 5'-リン酸(AMP)         | LC/MS pos | 20.92 |      |
|  | プリン代謝、<br>グアニン含有          | グアノシン 5'-リン酸(5'-GMP)      | LC/MS pos | 5.74  |      |
|  | プリン代謝、<br>尿酸代謝            | 尿酸                        | LC/MS neg | 0.84  |      |
|  | ピリミジン<br>代謝、ウラシル<br>含有    | 2'-デオキシシチジン               | LC/MS pos | 1.32  |      |
|  |                           | ウラシル                      | GC/MS     | 0.64  |      |
|  |                           | プソイドウリジン                  | LC/MS neg | 0.89  | 40   |
|  | ニコチン酸<br>およびニコチンアミド<br>代謝 | ニコチンアミド                   | LC/MS pos | 0.79  |      |
|  | 薬物                        | カテコールスルフェート               | LC/MS neg | 0.77  |      |
|  |                           | サリチレート                    | LC/MS neg | 0.68  |      |
|  |                           | イコールスルフェート                | LC/MS neg | 0.70  |      |
|  |                           | 糖、糖代用品、<br>デンプン           | エリスリトール   | GC/MS | 0.79 |

【実施例7】

## 【0136】

B・フラジリス処置は、MIAによって誘導される血清中代謝産物のレベルを修正するこの実施例は、B・フラジリスによって媒介される腸障壁の完全性の向上が、血清中代謝産物レベルの変化を予防することを示す。

## 【0137】

4-エチルフェニルスルフェート(4EPS)、インドールピルベートおよびいくつかの他の血清中代謝産物は、MIA処置によってかなり変更され、B・フラジリス処置によって対照レベルに回復される(図13A)。MIA子孫は、B・フラジリス処置によって激減した4-エチルフェニルスルフェート(4EPS)の血清中レベルの著しい46倍の増加を示した(図13A)。さらに、従来通り定着したマウスと比較して、無菌マウスが血清中4EPSのほとんど検出不能であるレベルを示すことが見出され、血清中4EPSが片利共生微生物叢に由来するか、きわどくモジュレートされることを示した(図13B)。4EPSは、ヒト自閉症の可能な尿バイオマーカーとして同定された関連代謝産物であるp-クレゾール(4-メチルフェノール)と同様に、尿毒症毒素であることが示唆されている(Altieriら、2011年;PersicoおよびNapolioni、2013年)。MIA子孫は、血清中p-クレゾールの高いレベルも示したが、その増加は統計的有意性に到達しなかった(表4)。4EPSが、p-クレゾールの有毒な硫酸化された形(4-メチルフェニルスルフェート;4MPS)と緊密な構造類似性を共有するという事実は興味深い、その理由は、2つの代謝産物が機能的重複を示すことができ(図14A)、MIAモデルにおいて見られる代謝産物異常とヒトASDで観察されるそれらに関連づけるからである。

## 【0138】

4EPSに加えて、MIA子孫はトリプトファン代謝経路の重要な分子である血清中インドールピルベートの有意に高いレベルを示し、それはB・フラジリス処置によって対照レベルに回復した(図13A)。インドールピルベートはトリプトファン異化作用によって生成され、4EPSと同様に、インドールピルベートは腸内微生物によって産生されると思われる(SmithおよびMacfarlane、1997年)(図14B)。さらに、MIA子孫で観察される血清中インドールピルベートの上昇は、ヒト自閉症で観察される別の主要なトリプトファン代謝産物であり、ASDの尿バイオマーカーであると示唆されたインドリル-3-アクリロイルグリシン(IAG)の増加に類似する(Bullら、2003年)。興味深いことに、IAGはGIホメオスターシスに関与し、細菌性トリプトファン代謝によって生成される(Keszthelyiら、2009年)。MIA子孫が血清中セロトニンのレベルの増加(0.05 < P < 0.10)を示したことは注目すべきであり、それは、トリプトファン代謝の別の経路の変化を反映し、自閉症の高セロトニン血症の内部表現型を思い出させる(Mulderら、2004年)。重要なことに、片利共生微生物叢は、インドール含有トリプトファン代謝産物およびセロトニンの血清中レベルに影響を与えることが知られている(Wikoffら、2009年)。MIAは、血清中グリコレート、イミダゾールプロピオネートおよびN-アセチルセリンレベルの変化にもつながり(図13A)、それはB・フラジリス処置によって修正された。

## 【0139】

この実施例は、特定の代謝産物がMIA子孫で変化し、B・フラジリス処置によって正常化されることを実証する。

## 【実施例8】

## 【0140】

血清中代謝産物は、ASD関連の行動を誘導する

特定の代謝産物の全身の生物学的利用能のMIA依存的増加、およびB・フラジリスによる回復は、これらの分子が、MIA子孫でASD関連の行動において原因となる役割を演ずることを示唆する。この実施例は、腸内細菌の影響を受ける全ての代謝産物の中で最も劇的なものである血清中4EPSを実験的に増加させることが、ナイーブマウスで任意のASD関連の行動異常を引き起こすのに十分であるかどうかを検査した。

## 【0141】

4EPSは三酸化硫黄-ピリジン錯体による4-エチルフェノールの処理によって化学的に合成され、それは、イオン交換の後に4EPSカリウム塩を生み出す(図15A~C)(Burlinghamら、2003年;Grimes、1959)。3週齢(MIA子孫で腸透過性の増加が検出されたとき、図1Aを参照)から6週齢(行動試験が始まったとき)まで、マウスを4EPSまたは生理食塩水ビヒクルで腹腔内に毎日処置した。

## 【0142】

注目すべきことに、ナイーブ野生型マウスへの4EPSの全身投与は、MIA子孫で観察されたものと同様の不安様行動を誘導するのに十分であった(図13C)。ビヒクルで処置した対照に対して、4EPSに曝露させたマウスはオープンフィールドで同等の距離を移動したが、中央アリーナで費やす時間は短かった(図13C)。注目すべきことに、未処置の生理食塩水子孫と比較して、ビヒクルで処置した対照は不安様行動の症状を示した(中央立入り:  $14.5 \pm 1.1$  対  $23.7 \pm 1.4$ ; 中央での時間(s):  $29.4 \pm 5.4$  対  $46.4 \pm 4.2$ ; 距離(m):  $35.6 \pm 1.8$  対  $37.6 \pm 1.0$ 、図13Cのビヒクル処置マウス(Veh.)を図10Aの生理食塩水子孫(S)と比較する)。これは、マウスおよびヒトでの不安レベルの上昇に対する慢性ストレス(連日注射)の周知の影響を反映する(BaileyおよびCrawley、2009年; Bourinら、2007年)。また、PPI試験では、4EPS処置マウスは、無条件一次刺激に対する驚愕の強度の増加を示したが、PPIで有意な変化は示さず(図13D)、驚愕反射の不安関連の増強を表している(Bourinら、2007年)。また、4EPS処置マウスと対照処置マウスの間に重量の差はなく、したがって、測定された驚愕強度に対する体質量の交絡効果はなかった。反対に、マーブル埋め込みまたはUSV行動において、4EPS処置と生理食塩水処置マウスの間に有意差はなく(図15Dおよび15E)、血清中4EPSレベルを特異的に上昇させることが不安様行動を促進することを示唆した。

## 【実施例9】

## 【0143】

自閉症スペクトラム障害(ASD)の処置

この実施例は、ASDを患っている患者の処置を例示する。

## 【0144】

患者は、ASDを患っていると確認される。対象の4EPSの血中レベルを判定する。B.フラジリスの組成物を、経口投与により患者に投与する。B.フラジリスの投与は、患者で4EPSの血中レベルおよび腸微生物叢の組成を変化させると予想される。細菌投与が、患者でASDの1つまたは複数の症状を軽減すること、例えば行動性能を向上させることも予想される。

## 【実施例10】

## 【0145】

自閉症スペクトラム障害(ASD)の処置

この実施例は、ASDを患っている患者の処置を例示する。

## 【0146】

患者は、ASDを患っていると確認される。対象の4-メチルフェニルスルフェートの尿中レベルを判定する。B.フラジリスの組成物を、経口投与により患者に投与する。B.フラジリスの投与は、患者で4-メチルフェニルスルフェートの尿中レベルおよび腸微生物叢の組成を変化させると予想される。細菌投与が、患者でASDの1つまたは複数の症状を軽減すること、例えば行動性能を向上させることも予想される。

## 【0147】

前述の記載および実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態を詳述し、発明者によって企図される最良の様式を記載する。しかし、本文で前述のものがどんなに詳述されているように見えても、本発明を多くの方法で実践することができ、本発明は添付の請求項およびそれらの任意の同等物に従って解釈されるべきであることが理解される。本出願を上に詳述したが、当業者ならば、本発明の精神を逸脱しない範囲で様々な変更を加えること

10

20

30

40

50

ができることを理解する。

【0148】

本出願では、特に明記されていなければ、または本開示を考慮して当業者が理解するように単数形が唯一の機能的実施形態でない限り、単数形の使用は複数形を含むことができる。したがって、例えば、「a」は2個以上を意味することができ、「一実施形態」はその記載が複数の実施形態に適用されることを意味することができる。さらに、本出願では、「および/または」は、「および」の包括的な意味と、代わりに「または」の排他的意味の両方がリストに適用されることを表す。したがって、リストは、リストの項目の全ての可能な組合せを含み、さらに他の項目からの各項目も排他的に含むと解釈するべきである。この用語の追加は、用語「および」または「または」の単独使用へのいかなる特定の

10

【0149】

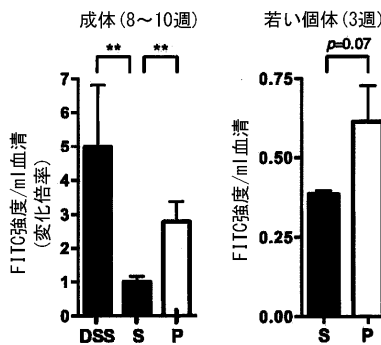
それらに限定されないが公開および未公開の特許出願、特許、テキストブック、参考文献等を含む、本明細書の全ての引用文献は、既にそうでない限り、参照により本明細書に組み込まれる。組み込まれる文献および同様の資料の1つまたは複数が、それらに限定されないが定義された用語、用語使用、記載された技術など含む明細書に含まれる開示と異なるか矛盾する範囲で、本明細書はいかなるそのような矛盾した材料に取って代わり、および/または優先するものとする。

【0150】

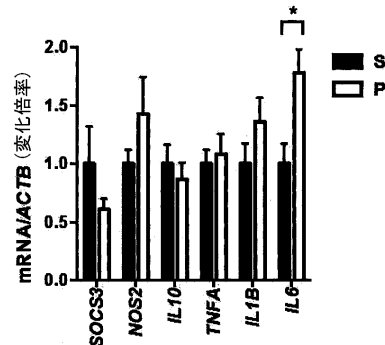
本明細書で用いられる用語「含む (comprising)」は、「含む (including)」、「含有する」または「によって特徴付けられる」と同義であり、包括的または非限定的であり、追加の列挙されていない要素または方法ステップを排除しない。

20

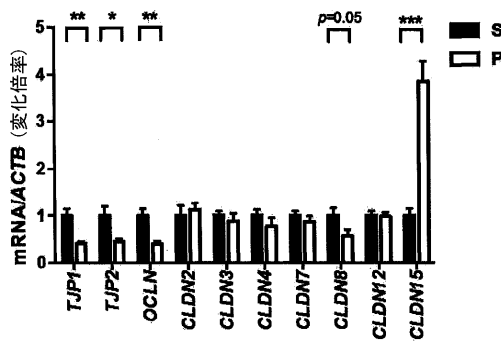
【図1A】



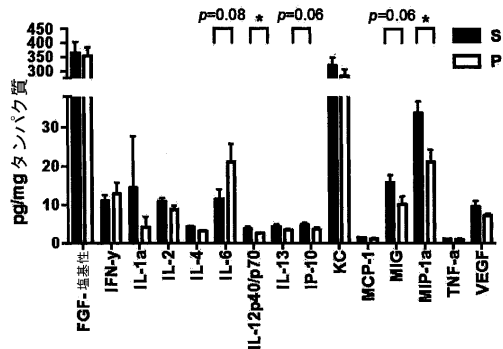
【図1C】



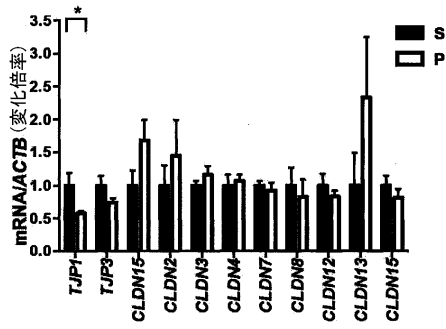
【図1B】



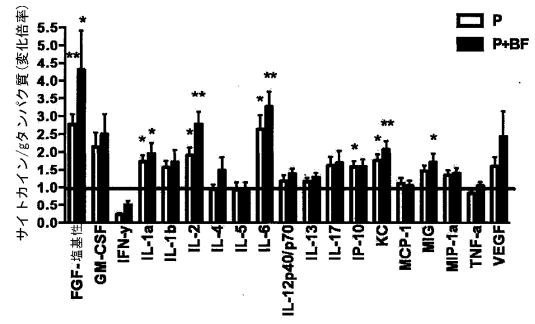
【図1D】



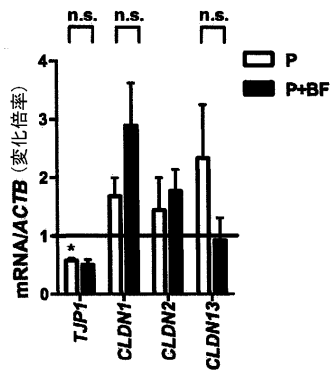
【 図 2 A 】



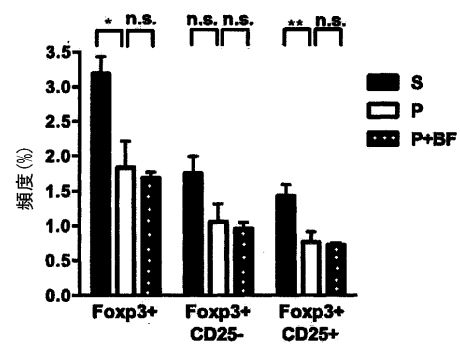
【 図 2 C 】



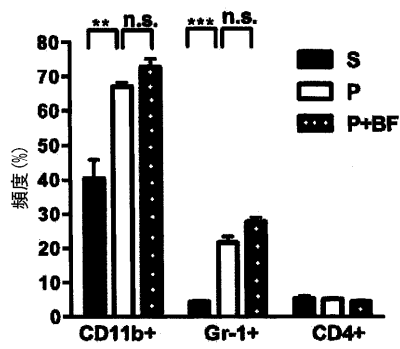
【 図 2 B 】



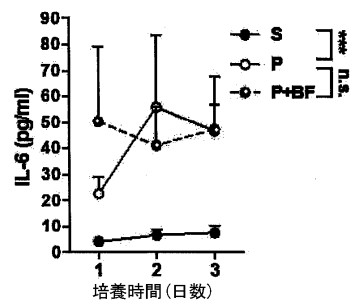
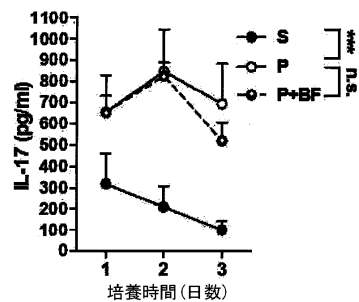
【 図 3 A 】



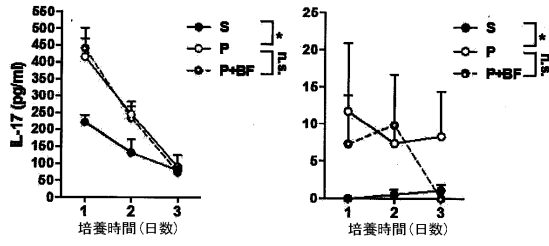
【 図 3 B 】



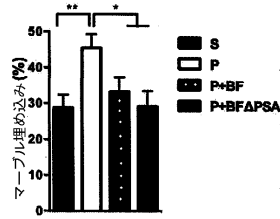
【 図 3 C 】



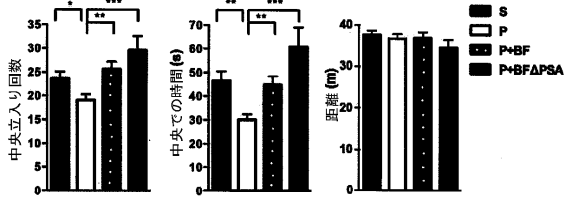
【 図 3 D 】



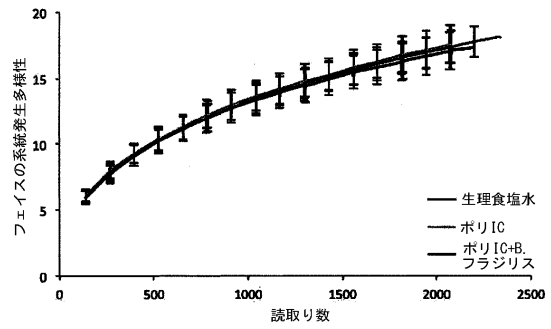
【 図 3 F 】



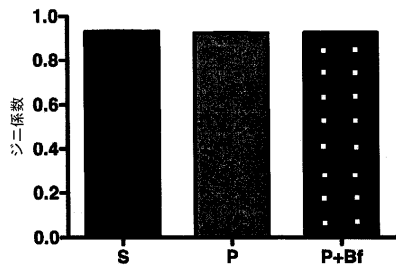
【 図 3 E 】



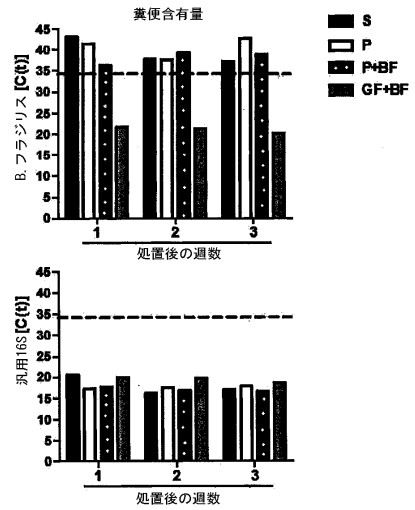
【 図 4 A 】



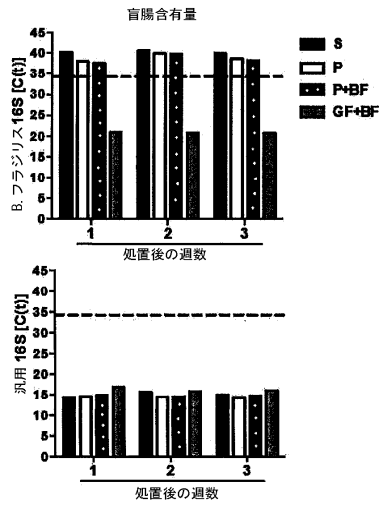
【 図 4 B 】



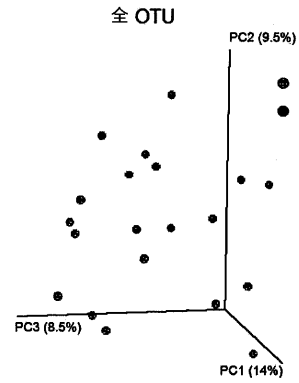
【 図 4 C 】



【 図 4 D 】

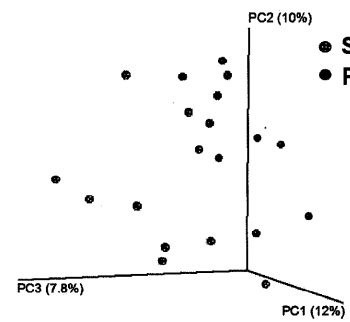


【 図 5 A 】



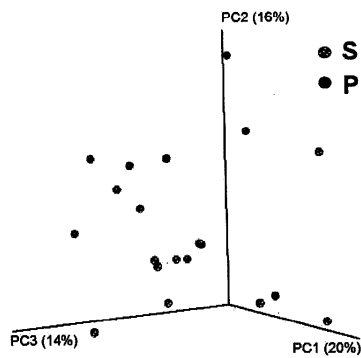
【 図 5 B 】

クロストリジウム網およびバクテロイデス網の OTU

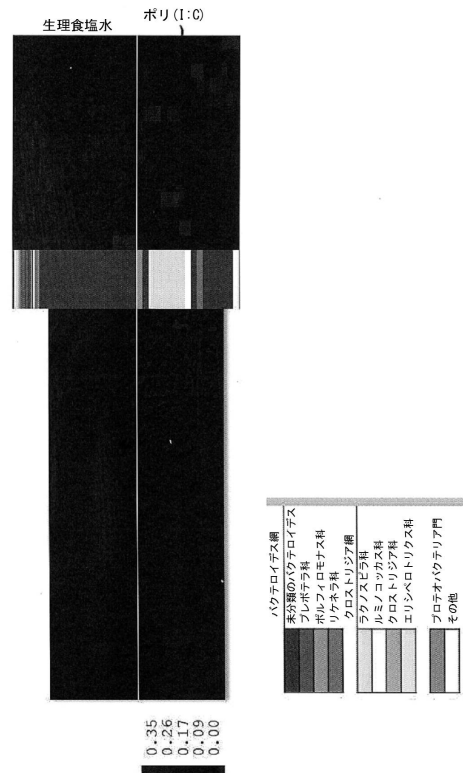


【 図 5 C 】

クロストリジウム網およびバクテロイデス網を除く全 OTU

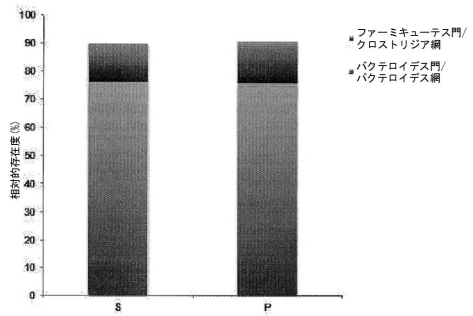


【 図 5 D 】

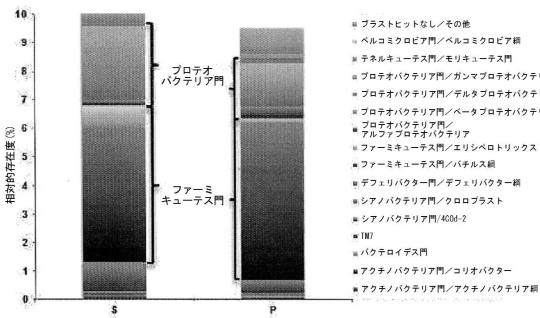
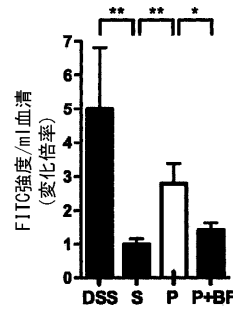




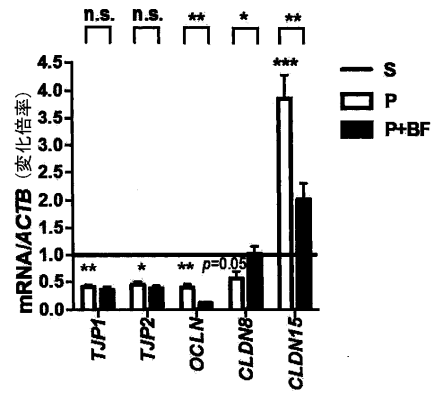
【 図 5 E 】



【 図 6 A 】

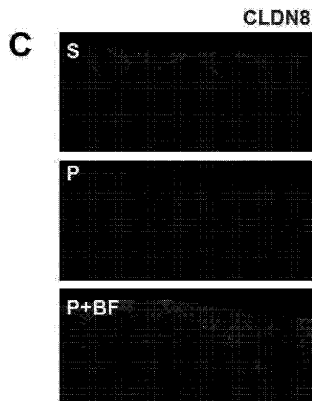


【 図 6 B 】

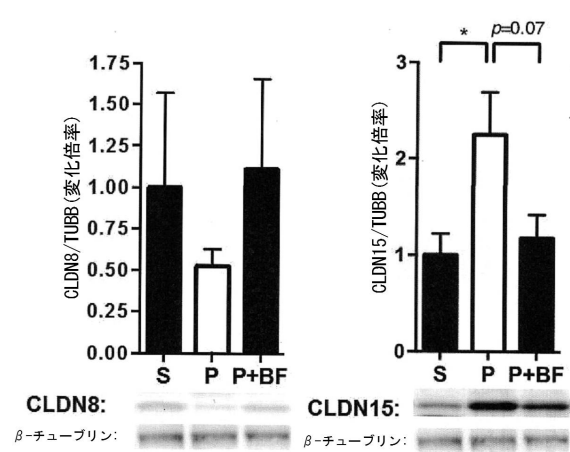


【 図 6 C 】

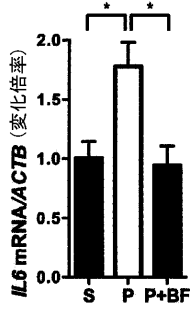
Figure 6 (continued)



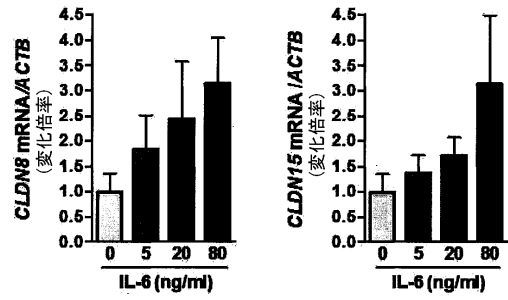
【 図 6 D 】



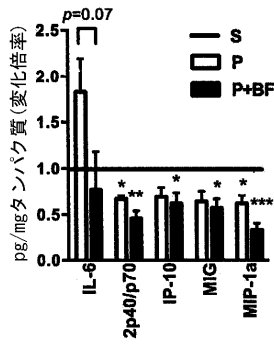
【 図 6 E 】



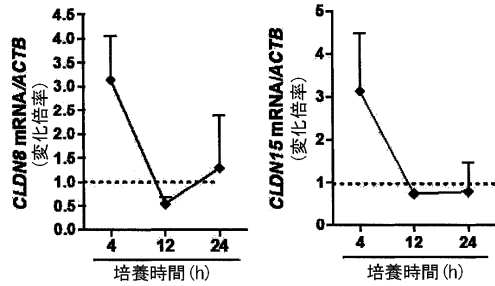
【 図 7 A 】



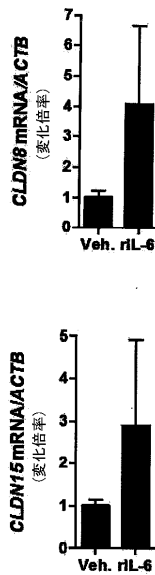
【 図 6 F 】



【 図 7 B 】



【 図 7 C 】



【 図 8 A 】

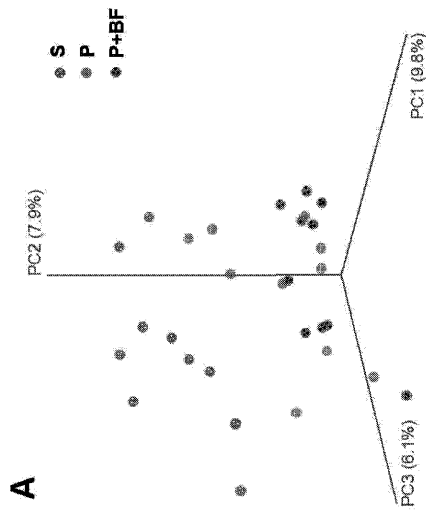
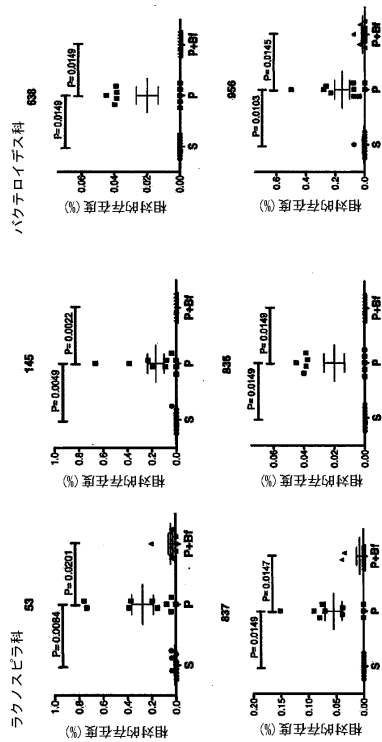


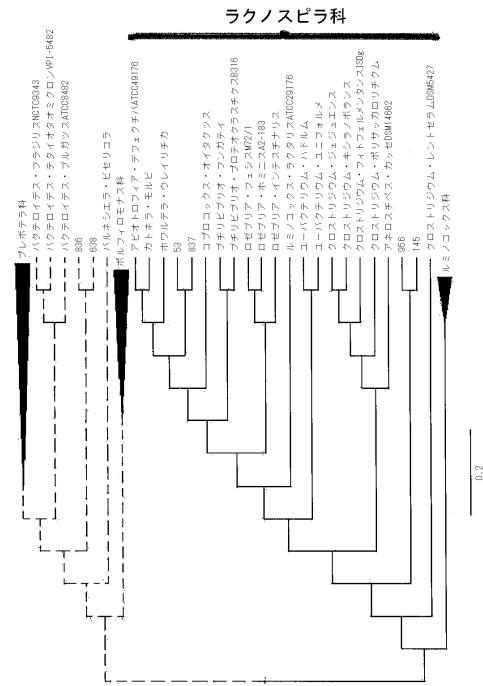
Figure 8

A

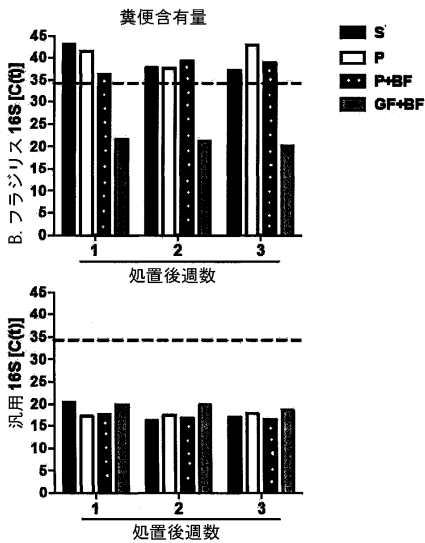
【 図 8 B 】



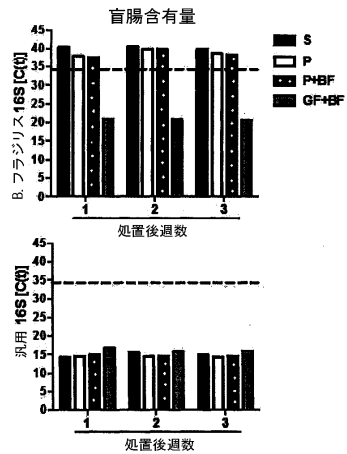
【 図 8 C 】



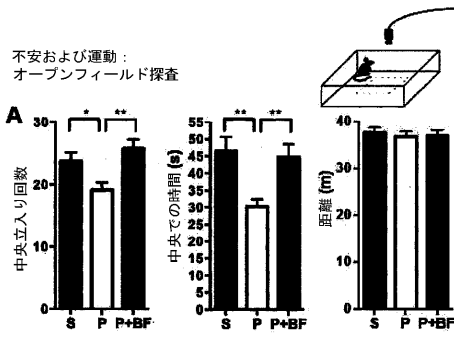
【 図 9 A 】



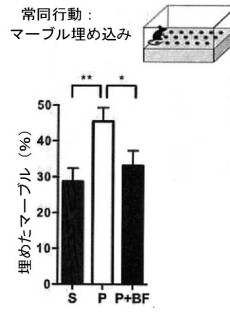
【 図 9 B 】



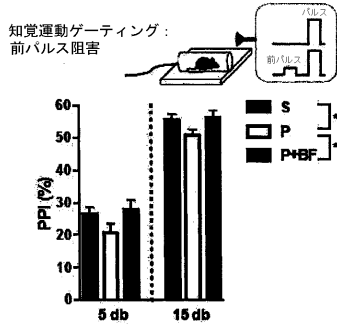
【 図 1 0 A 】



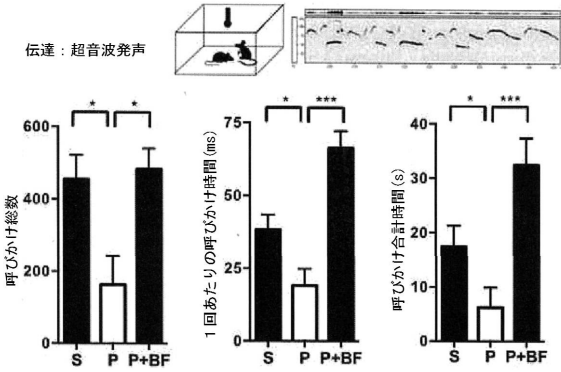
【 図 1 0 C 】



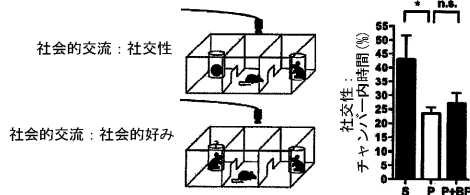
【 図 1 0 B 】



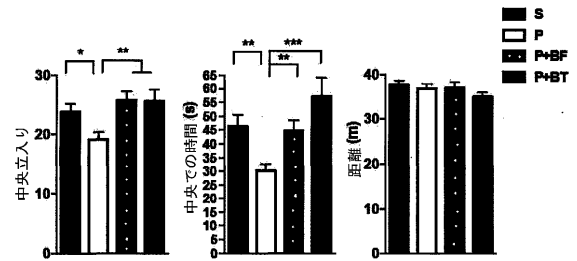
【 図 1 0 D 】



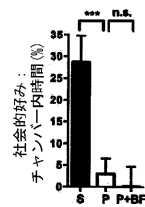
【 図 1 0 E 】



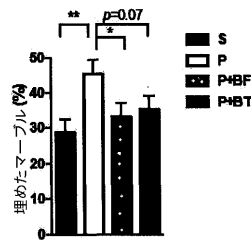
【 図 1 1 A 】



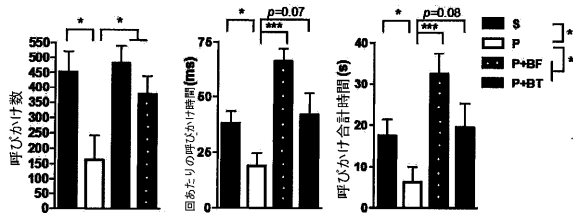
【 図 1 0 F 】



【 図 1 1 B 】



【 1 1 C 】

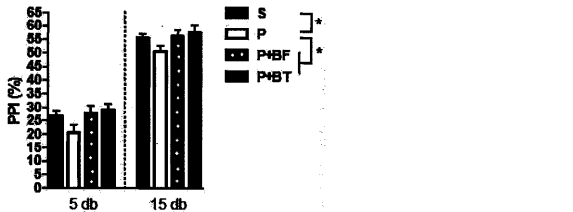


【 1 2 A 】



| スーパー経路             | 代謝産物                      | P | P+BF |
|--------------------|---------------------------|---|------|
| アミノ酸               | サルコシン (N-メチルグリシン)         |   |      |
|                    | アスパラギン酸                   |   |      |
|                    | 3-ウレイドプロピオネート             |   |      |
|                    | グルタレート (ペンタンジオエート)        |   |      |
|                    | チロシン                      |   |      |
|                    | 3- (4-ヒドロキシフェニル) ラクテート    |   |      |
|                    | 3-フェニルプロピオネート (ヒドロキシナメート) |   |      |
|                    | セロトニン (5HT)               |   |      |
|                    | 3-メチル-2-オキソバレレート          |   |      |
|                    | 3-メチル-2-オキソブチレート          |   |      |
|                    | 4-メチル-2-オキソペンタノエート        |   |      |
|                    | イソバチルカルニチン                |   |      |
|                    | 2-メチルプロピルカルニチン            |   |      |
| イソバチルカルニチン         |                           |   |      |
| 2-ヒドロキシブチレート (AHB) |                           |   |      |
| アルギニン              |                           |   |      |
| オルニチン              |                           |   |      |
| 2-アミノブチレート         |                           |   |      |
| 4-グアニジノブチレート       |                           |   |      |
| 5-オキソプロリン          |                           |   |      |
| グリシルバリン            |                           |   |      |
| ペプチド               | ガンマーグルタミルトリプトファン          |   |      |
|                    | TDTEDKGEFLSEGQGV          |   |      |
| 炭水化物               | ソルビトール                    |   |      |
|                    | ビルビリン酸                    |   |      |
| エネルギー              | リボース                      |   |      |
|                    | リブリン酸                     |   |      |
| プリン代謝              | ヒポキサンチン                   |   |      |
|                    | イノシン                      |   |      |
| スクレオチド             | アデノシン                     |   |      |
|                    | アデノシン5'-ヌーリン酸 (AMP)       |   |      |
| 核酸                 | グアノシン5'-ヌーリン酸 (5'-GMP)    |   |      |
|                    | 腺酸                        |   |      |
| 補因子                | 2-デオキシシチジン                |   |      |
|                    | ウラシル                      |   |      |
| 生体異物               | アミノ酸                      |   |      |
|                    | ニコチンアミド                   |   |      |
| 脂質                 | カテコールスルフェート               |   |      |
|                    | サリチレート                    |   |      |
|                    | イコールスルフェート                |   |      |
|                    | エリスリトール                   |   |      |
|                    | コリン                       |   |      |
|                    | キロイノシトール                  |   |      |
|                    | ピニトール                     |   |      |

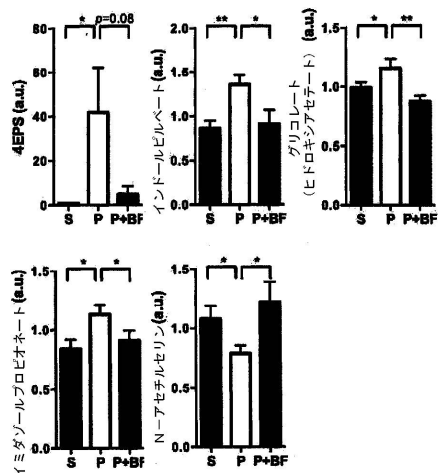
【 1 1 D 】



【 1 2 B 】

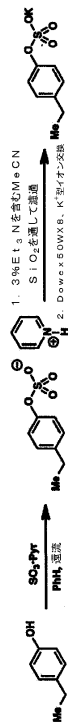
| 生理指標値に対する変化率       | 代謝産物                             | 必須アミノ酸 | 必須脂肪酸 | 必須ビタミン | 必須ミネラル |
|--------------------|----------------------------------|--------|-------|--------|--------|
| <math>< 0.5</math> | リノレート (7ルウツマナリジメ: 11: 3: 3または13) |        |       |        |        |
| 0.5-0.6            | トコサヘキサノエート (DHA: 22: 6 n3)       |        |       |        |        |
| 0.6-0.7            | リノレート (18: 2 n6)                 |        |       |        |        |
| 1.0-2.0            | ジホモノレノレート (20: 3 n3またはn6)        |        |       |        |        |
| >5.0               | ドコサペンタノエート (n3 DPA: 22: 5 n3)    |        |       |        |        |
|                    | ドコサペンタノエート (n6 DPA: 22: 5 n6)    |        |       |        |        |
|                    | ヘパノエート (7: 0)                    |        |       |        |        |
|                    | ペラルゴネート (9: 0)                   |        |       |        |        |
|                    | ラクテート (12: 0)                    |        |       |        |        |
|                    | メチルプロピレート (13: 4 n3)             |        |       |        |        |
|                    | エイコセノエート (20: 1 n9または11)         |        |       |        |        |
|                    | ステアレート (18: 0)                   |        |       |        |        |
|                    | ジホモノレノレート (20: 2 n6)             |        |       |        |        |
|                    | マルガレート (17: 0)                   |        |       |        |        |
|                    | オレエート (18: 1 n9)                 |        |       |        |        |
|                    | ミリスエート (14: 0)                   |        |       |        |        |
|                    | パルステート (16: 0)                   |        |       |        |        |
|                    | パルミトステート (16: 1 n7)              |        |       |        |        |
|                    | ミド酸 (20: 3 n9)                   |        |       |        |        |
|                    | アドレネート (22: 4 n6)                |        |       |        |        |
|                    | 13-HODE + 9-HODE                 |        |       |        |        |
|                    | 16-ヒドロキシパルミテート                   |        |       |        |        |
|                    | 8-ヒドロキシオクタノエート                   |        |       |        |        |
|                    | 3-ヒドロキシシカノエート                    |        |       |        |        |
|                    | 12, 13-ヒドロキシシカノエート (2)-エノエート     |        |       |        |        |
|                    | 9, 10-ヒドロキシシカノエート (2)-エノエート      |        |       |        |        |
|                    | ヒメレート (ヘパタンジオエート)                |        |       |        |        |
|                    | スベレート (オクタタンジオエート)               |        |       |        |        |
|                    | 14-チカンジオエート                      |        |       |        |        |
|                    | オクタチカンジオエート                      |        |       |        |        |
|                    | ウンチカンジオエート                       |        |       |        |        |
|                    | アジベート                            |        |       |        |        |
|                    | セバケート (デカンジオエート)                 |        |       |        |        |
|                    | テトラデカンジオエート                      |        |       |        |        |
|                    | 2-ヒドロキシグルタレート                    |        |       |        |        |
|                    | アセート (ノナンジオエート)                  |        |       |        |        |
|                    | ヘキサチカンジオエート                      |        |       |        |        |
|                    | 12-HETE                          |        |       |        |        |
|                    | プロピオニルカルニチン                      |        |       |        |        |
|                    | ブチリルカルニチン                        |        |       |        |        |
|                    | パレリルカルニチン                        |        |       |        |        |
|                    | 3-アセチルカルニチン                      |        |       |        |        |
|                    | ヘキサリルカルニチン                       |        |       |        |        |
|                    | オクタニルカルニチン                       |        |       |        |        |
|                    | 3-ヒドロキシブチレート (BHBA)              |        |       |        |        |
|                    | 1, 2-エポキシブチレート                   |        |       |        |        |
|                    | 1-パルミトイルブラスメルエタノールアミン            |        |       |        |        |
|                    | 1-ステアロイルグリセロホスホイノシトール            |        |       |        |        |
|                    | 2-アラキドニルグリセロホスホエタノールアミン          |        |       |        |        |
|                    | 1-アラキドニルグリセロホスホイノシトール            |        |       |        |        |
|                    | 1-アラキドニルグリセロホスホエタノールアミン          |        |       |        |        |
|                    | 1-アラキドニルグリセロホスホイノシトール            |        |       |        |        |

【 1 3 A 】

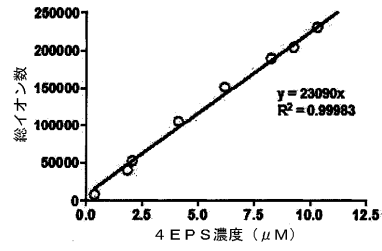




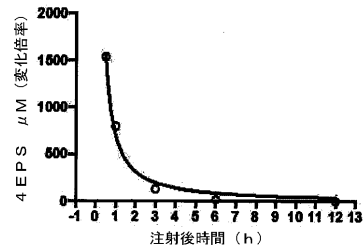
【 図 1 5 A 】



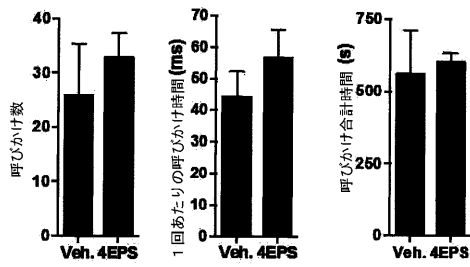
【 図 1 5 B 】



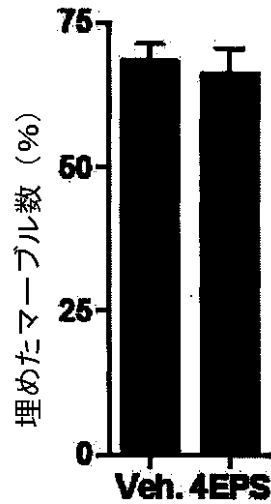
【 図 1 5 C 】



【 図 1 5 D 】



【 図 1 5 E 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 サークス ケイ マズマニアン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91326 ポーター ランチ リヴォルノ ウェイ 20  
029
- (72)発明者 ポール エイチ パターソン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91001 アルタデナ ラ ソラーナ 1410
- (72)発明者 サラ マックブライド  
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91101 パサデナ サウス ハドソン アベニュー 1  
60 ナンバー101

## 合議体

- 審判長 村上 騎見高  
審判官 前田 佳与子  
審判官 穴吹 智子

- (56)参考文献 国際公開第2012/048152(WO, A2)  
国際公開第2011/139914(WO, A1)  
特表2008-532033(JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K35, A61P25, A61P1, A61P43, A23L33, G01N33