

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2023年11月2日(02.11.2023)



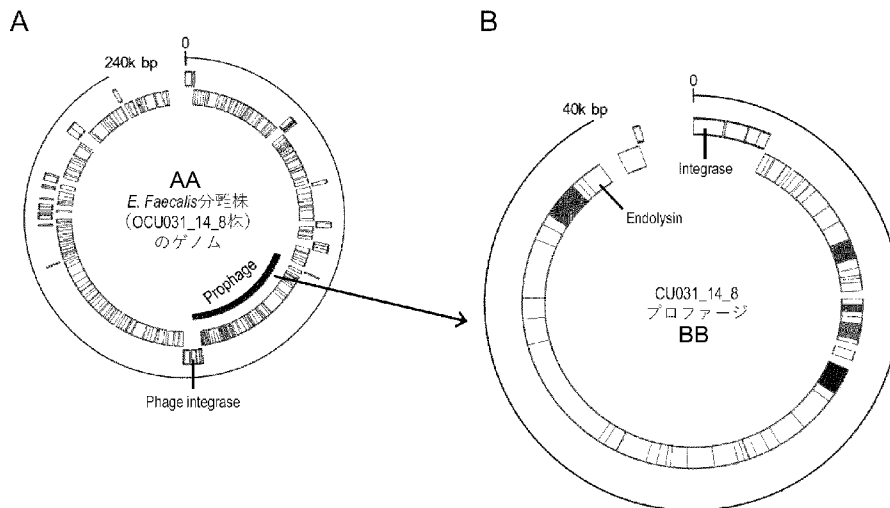
(10) 国際公開番号
WO 2023/210800 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/48 (2006.01) C12N 9/36 (2006.01)
A61P 31/04 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2023/016830
- (22) 国際出願日: 2023年4月28日(28.04.2023)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2022-074458 2022年4月28日(28.04.2022) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 公立大学法人
- 大阪 (UNIVERSITY PUBLIC CORPORATION OSAKA) [JP/JP]; 〒5450051 大阪府大阪市阿倍野区旭町一丁目2番7-6 01号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 植松 智(UEMATSU Satoshi); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 藤本 康介(FUJIMOTO Kosuke); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 林 哲哉(HAYASHI Tetsuya); 〒5588585 大阪府大阪市住吉区杉本3丁目3番138号 公立大学法人大阪 大阪公立大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都

(54) Title: BACTERIOLYTIC AGENT AGAINST ENTEROCOCCUS FAECALIS

(54) 発明の名称: エンテロкокカス・フェカーリスの溶菌剤

[図1]



AA... GENOME OF ISOLATED E. Faecalis STRAIN (OCU031_14_8 STRAIN)
BB... CU031_14_8 PROPHAGE

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a novel bacteriolytic agent capable of lysing a bacterium belonging to the genus Enterococcus. Provided is a bacteriolytic agent against a bacterium belonging to the genus Enterococcus that comprises a lytic enzyme containing any of: (a) the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1; (b) an amino acid sequence resulting from addition, deletion and/or substitution of one or more amino acids in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1; or (c) an amino acid sequence having a sequence identity of 90% or



WO 2023/210800 A1

港区愛宕二丁目5-1 愛宕グリーンヒルズ
MOR Iタワー3 2階 Tokyo (JP).

- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4.17に規定する申立て:

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

添付公開書類:

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

more with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO. 1, or an active fragment thereof.

(57) 要約: エンテロコッカス属細菌を溶菌することができる新たな溶菌剤を提供することを課題とする。(a) 配列番号1で示すアミノ酸配列、(b) 配列番号1で示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が付加、欠失、及び/又は置換されたアミノ酸配列、又は(c) 配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列のいずれかを含む溶菌酵素又はその活性断片からなる、エンテロコッカス属細菌の溶菌剤を提供する。

明 細 書

発明の名称： エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤

技術分野

[0001] 本発明は、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤、及び腸球菌感染症の治療又は予防用医薬組成物等に関する。

背景技術

[0002] 同種造血幹細胞移植（同種移植）は、レシピエントに抗がん剤や放射線照射等の前処置を施した後、ドナー由来の造血幹細胞を輸注等により移植する方法である。造血幹細胞が移植されたレシピエントでは、50%～70%の患者が難治疾患である急性移植片対宿主病（acute graft-versus-host disease；aGVHD）を発症する。

[0003] 急性移植片対宿主病は、同種造血幹細胞移植によりレシピエント体内に導入されたドナー由来の免疫機構が皮膚、消化管、又は肝臓等の組織を攻撃し、破壊してしまう疾患である。急性移植片対宿主病に関連する死亡率は10～30%と報告されているが、有効な治療又は予防法は未だ確立されていない。

[0004] 近年、急性移植片対宿主病の発症や増悪には、腸内細菌叢の変化が密接に関連することが明らかになった（非特許文献1、2）。急性移植片対宿主病患者の腸内では、エンテロコッカス・フェカーリスやエンテロコッカス・フェシウム等のエンテロコッカス属細菌が優勢となる例が多く認められること、及び腸内細菌叢においてエンテロコッカス属細菌の割合が高いほど同種移植後の死亡率が高いことが報告された。非特許文献3には、腸内細菌叢の悪化により、レシピエントの腸管バリア機能が破綻し、異常な免疫応答が誘導されることが記載されている。したがって、急性移植片対宿主病に対する有効な治療方法として、腸内細菌叢を標的とする新たな治療方法の開発が期待されている。

[0005] 過去には、腸内細菌叢を標的とする急性移植片対宿主病の治療又は予防法として、抗生剤投与が試みられた。この方法は、患者の腸内で増殖し優勢と

なったエンテロコッカス属細菌の死滅を目的とする方法であるが、その治療有効性は認められていない（非特許文献4）。これは、抗生剤投与はエンテロコッカス属細菌のみならず有益菌（善玉菌）をも死滅させ得るため、腸内細菌叢の構成を疾患発症前の状態に回復させることができないためと考えられる。

[0006] 腸内細菌叢を標的とする別の方法として、糞便移植（fecal microbiota transplantation; FMT）も試みられている。この方法は、健常者から提供された糞便を患者の腸内に直接移植することによって、腸内細菌叢を改善することを目的としている。しかしながら、この方法の有効性に関する報告は少数例に留まっている。また、ドナー由来の薬剤耐性菌感染症も複数報告されており、安全な標準治療としては確立されていないのが現状である（非特許文献5、6）。

[0007] したがって、急性移植片対宿主病の治療や予防のために腸内細菌叢を標的とする新たな方法が必要とされている。

先行技術文献

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Shono, Y., et al., Sci Transl Med., 2016, 8(339):339ra71

非特許文献2：Gavriilaki, M., et al., Biol Blood Marrow Transplant, 2020, 26(9):1738-46.

非特許文献3：Ciernikova, S., et al., Blood Reviews, 2021, 48:100790.

非特許文献4：Gavriilaki, M., et al., Biol Blood Marrow Transplant, 2020, 26(9):1738-46.

非特許文献5：DeFilipp, Z. et al. N Engl J Med, 2019, 381:2043-2050.

非特許文献6：Bilinski, J. et al. Transpl Infect Dis, 2021, 23(1):e133-86.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の目的は、エンテロコッカス・フェカーリスを溶菌することができる新たな溶菌剤を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決するために、同種造血幹細胞移植を受けた患者に由来し、エンテロコッカス属細菌が優勢となった糞便試料から、エンテロコッカス・フェカーリス株を分離した。計11株の分離株を対象として全ゲノム解析を行った結果、分離株のゲノム中においてプロファージ配列及びプロファージ配列中のエンドライシン遺伝子を見出した。このファージ由来エンドライシンは、*in vitro*溶菌試験において、エンテロコッカス・フェカーリス分離株に対して顕著な溶菌活性を示し、さらに移植片対宿主病モデルマウスへの投与では生存率を飛躍的に向上させる驚くべき効果を有することが実証された。本発明の溶菌酵素は、エンテロコッカス・フェカーリスを選択的に溶菌することができる点が抗生剤と比較して極めて有利であり、糞便移植と比較しても安全性が高い。本発明は、上記知見に基づくものであって以下を提供する。

[0011] (1) 以下の (a) ~ (c) で示すいずれかのアミノ酸配列を含む溶菌酵素又はその活性断片からなる、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤。

(a) 配列番号1で示すアミノ酸配列

(b) 配列番号1で示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が付加、欠失、及び／又は置換されたアミノ酸配列

(c) 配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列

(2) (1) に記載の溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤。

(3) 前記ポリヌクレオチドが以下の (a) ~ (d) で示すいずれかの塩基配列を含む、(2) に記載の溶菌剤。

(a) 配列番号2で示す塩基配列

(b) 配列番号2で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び／若しくは付加された塩基配列

(c) 配列番号2で示す塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列

(d) 配列番号2で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジェントな条件でハイブリダイズする塩基配列

(4) (2)又は(3)に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤。

(5) (1)～(4)のいずれかに記載の溶菌剤及び薬学的に許容可能な担体を含む、腸球菌感染症の治療又は予防用医薬組成物。

(6) 前記腸球菌感染症が、腸内ディスバイオシス、バンコマイシン耐性腸球菌菌血症、又は感染性心内膜炎である、(5)に記載の医薬組成物。

(7) 前記腸内ディスバイオシスが、移植片対宿主病又はアルコール性肝障害である、(6)に記載の医薬組成物。

(8) 腸溶製剤として製剤化されている、(5)～(7)のいずれかに記載の医薬組成物。

(9) 前記担体が、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤、及び滑沢剤からなる群から選択されるいずれか1以上である、(5)～(8)のいずれかに記載の医薬組成物。

(10) 経口投与、直腸投与、腹腔内投与、又は静脈投与される、(5)～(9)のいずれかに記載の医薬組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2022-074458号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、エンテロコッカス属細菌を溶菌することができる新たな溶菌剤が提供される。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]同種造血幹細胞移植後の患者から提供された糞便試料に由来するエンテ

ロコッカス・フェカーリス分離株のゲノム及びそれに含まれているプロファージ配列を示す図である。図1Aは、エンテロコッカス・フェカーリス分離株（0CU031_14_8株）のゲノム構造を示す。図1Bは、プロファージ（0CU031_14_8プロファージ）配列の構造を示す。

[図2]合成したファージ由来エンドライシンをSDS-PAGEにより検出した結果を示す図である。

[図3]エンテロコッカス・フェカーリス分離株（0CU031_14_8株）に対する溶菌活性を検討した結果を示す図である。図3Aは、ファージ由来エンドライシンを細胞再懸濁液に添加した時点を0分としてOD₆₀₀の継時的変化を示す。図3Bは、ファージ由来エンドライシン添加から1時間後の細胞再懸濁液を示す。

[図4]クリスタルバイオレット染色を用いてバイオフィルムアッセイを行った結果を示す図である。計11株のエンテロコッカス・フェカーリス分離株に対してビヒクル（V）又はファージ由来エンドライシン（E）を添加した。

[図5]実施例5における実験方法を模式的に示す図である。

[図6]エンテロコッカス・フェカーリス分離株を投与した移植片対宿主病（GVHD）モデルマウスにファージ由来エンドライシンを投与した結果を示す図である。図6Aは、糞便中のエンテロコッカス・フェカーリスの量を測定した結果を示す。図6Bは、造血幹細胞を移植した日（Day 0）を起点としてマウスの生存率を示す。

[図7]実施例6における実験方法を模式的に示す図である。

[図8]糞便試料を移植した移植片対宿主病（GVHD）モデルマウスにファージ由来エンドライシンを投与した結果を示す図である。図8Aは、糞便中のエンテロコッカス属細菌の比率を示す。図8Bは、造血幹細胞を移植した日（Day 0）を起点としてマウスの生存率を示す。

発明を実施するための形態

[0014] 1. エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤

1-1. 概要

本発明の第1の態様は、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤である

。本発明の溶菌剤は、エンテロコッカス・フェカーリスを溶菌することができる溶菌酵素又はその活性断片からなるか、又はそのいずれかをコードするポリヌクレオチド若しくはそれを含む発現ベクターを含む。

[0015] 1-2. 用語の定義

本明細書において頻用する用語について以下で定義する。

本明細書において「溶菌剤」とは、標的細菌に対して溶菌活性を有する溶菌酵素からなる薬剤、又は当該溶菌酵素をコードするポリヌクレオチドを含む薬剤をいう。

[0016] 本明細書において「溶菌」とは、細菌の細胞膜を破壊する現象をいう。溶菌によって、細菌は死滅し得る。

[0017] 本明細書において「溶菌酵素」とは、特に断りのない限り、エンテロコッカス・フェカーリスに対する溶菌活性を有する酵素をいう。具体的には、エンテロコッカス・フェカーリスのプロファージ配列から見出されたいずれかのエンドライシン（野生型エンドライシン）、及び当該エンドライシンに由来し、エンテロコッカス・フェカーリスに対する溶菌活性を有する変異型エンドライシンをいう。

[0018] 本明細書において「エンドライシン」とは、バクテリオファージに由来し、宿主細菌の細胞壁を分解する活性を有する酵素をいう。エンドライシンは通常、ペプチドグリカンを加水分解する活性を有する。バクテリオファージは、細菌細胞を破壊することなく細菌ゲノムの一部又は染色体外のプラスミドとして存在することが可能であり、この状態をプロファージという。バクテリオファージがプロファージを経て、又はプロファージを経ずに細菌細胞の外に放出される際に、エンドライシンは細菌細胞壁を切断することで放出過程に寄与することが知られている。

[0019] 本明細書において「腸球菌」とは、動物の腸管内に見いだされる球形の形態を有する常在菌の総称である。腸球菌はグラム陽性通性嫌気性細菌であり、腸球菌として17種以上の菌種が知られている。腸球菌の例として、エンテロコッカス・フェカーリスやエンテロコッカス・フェシウム等の細菌種が挙

げられる。

[0020] 本明細書において「エンテロコッカス・フェカーリス (Enterococcus faecalis ; E. faecalis)」は、ヒトや動物の腸内に存在する常在菌の一種であり、グラム陽性D群レンサ球菌である。エンテロコッカス・フェカーリスは、健常者においては通常は感染症を引き起こさないが、免疫力が低下している場合等においては後述する腸球菌感染症等、種々の感染症を引き起こすことが知られている。

[0021] 本明細書において「腸球菌感染症」は、腸球菌の感染によって引き起こされる感染症である。腸球菌では、主にエンテロコッカス・フェカーリス及びエンテロコッカス・フェシウムがヒトで感染症を引き起こす。本明細書では、特に断りのない限り、腸球菌感染症は、エンテロコッカス・フェカーリス感染を伴うものを意味し、特にエンテロコッカス・フェカーリス感染に起因する腸球菌感染症を指す。エンテロコッカス・フェカーリス感染に起因する腸球菌感染症の例として、以下に限定されるものではないが、(急性)移植片対宿主病、及びアルコール性肝障害等の腸内ディスバイオシス、バンコマイシン耐性腸球菌菌血症、並びに感染性心内膜炎等が挙げられる。

[0022] 本明細書において「移植片対宿主病 (graft-versus-host disease ; GVHD)」とは、ドナーから提供された移植片 (例：骨髄細胞、末梢血、又は臍帯血等) に由来する免疫機構が、レシピエントの臓器や組織を攻撃することによって発症する疾患である。移植片対宿主病は通常、後述する同種造血幹細胞移植の後に発症する。移植片対宿主病は、移植してから急性に発症する急性移植片対宿主病、及び移植してから一定期間が経過した後に発症する慢性移植片対宿主病に分けられる。なお、現在の分類では発症時期に基づく分類はなされておらず、特徴的所見により両者が区別されるのが一般的である。

[0023] 本明細書において「急性移植片対宿主病 (acute graft-versus-host disease ; aGVHD)」とは、移植片対宿主病のうち、移植してから急性に発症する疾患をいう。例えば、一定期間内 (例えば100日以内、典型的には6日~30日以内) に発症する移植片対宿主病が該当する。急性移植片対宿主病の症状とし

て、皮膚の発疹や水疱、肝臓機能障害（例えば黄疸）、消化管の異常に伴う嘔吐や食欲不振、持続性の下痢等が挙げられる。

[0024] 本明細書において「慢性移植片対宿主病（chronic graft-versus-host disease ; cGVHD）」とは、移植片対宿主病のうち、移植してから一定期間が経過した後に発症する疾患をいう。例えば、移植から30日～100日以上後に発症する移植片対宿主病が該当する。慢性移植片対宿主病では、上述の急性移植片対宿主病と比較して自己免疫疾患様の症状を呈し、例えば組織の線維化が認められる。

[0025] 本明細書において「同種造血幹細胞移植」（しばしば「同種移植」又は「allo-HCT」と略記される）とは、自己以外の個体をドナーとする造血幹細胞移植を意味する。通常、HLA型が一致又は類似している血縁者又は非血縁者がドナーとなる。同種造血幹細胞移植は、白血病等の悪性血液疾患の根治療法として行われ、移植に用いる細胞の種類によって骨髓移植、末梢血移植、又は臍帯血移植に分類される。

[0026] 同種造血幹細胞移植では、通常、移植前処置が行われる。「移植前処置」とは、がん細胞を死滅させること、及び／又はドナー由来の造血幹細胞の生着を促進することを目的として、同種造血幹細胞移植の前にレシピエントの免疫を低下させるために行う処置をいう。具体的な処置として、抗がん剤投与、放射線照射、又はそれらを組み合わせた処置、さらに必要に応じて免疫抑制剤の投与を移植前に行う処置が挙げられる。一般に、移植前処置は造血幹細胞移植の約7～10日前から行う場合が多い。

[0027] 本明細書において「アルコール性肝障害」とは、過剰なアルコール摂取により引き起こされる肝障害をいう。具体的な肝障害として、アルコール性の脂肪肝、肝炎、及び肝硬変等が挙げられる。アルコール性肝障害では、エンテロコッカス・フェカーリス感染が関与し得ることが知られている（Duan, Y., et al., Nature, 2019, 575(7783): 505-511）。

[0028] 本明細書において「バンコマイシン耐性腸球菌菌血症」とは、バンコマイシンに耐性を獲得した腸球菌（バンコマイシン耐性腸球菌；VRE）が血流中に

存在する病態をいう。菌血症では通常特に症状はみられない。しかし、VREが特定の組織や臓器において増殖することによって重篤な感染症が引き起こされる場合がある。バンコマイシン耐性腸球菌菌血症では、エンテロコッカス・フェカーリス感染が関与し得ることが知られている (Ford, C.D., et al., Biol Blood Marrow Transplant, 2017, 23(2):340-346)。

[0029] 本明細書において「感染性心内膜炎」とは、心臓内に生じる感染症をいう。感染性心内膜炎において心臓弁に感染が及ぶと、弁破壊や弁膜症が引き起こされる場合がある。感染性心内膜炎は、血流に入った細菌が損傷を有する心臓弁に到達することによって成立し得る。感染性心内膜炎では、エンテロコッカス・フェカーリス感染が関与し得ることが知られている (Ch'ng JH, et al., Nat Rev Microbiol, 2019, 17(2):82-94.)。

[0030] 本明細書において「ディスバイオシス (dysbiosis)」とは、生体内における細菌叢の構成異常をいう。具体的には、細菌叢を構成する細菌種の構成割合が健常者とは異なる状態を意味する。ディスバイオシスは、細菌叢を構成する細菌種数の減少等、細菌種の構成割合が変化することによって、様々な疾患の発症や増悪に関与することが知られている。ディスバイオシスでは、有益菌 (善玉菌) の死滅や、正常な細菌種比率の逆転 (「菌交代現象」と呼ばれる) を伴う場合がある。ディスバイオシスの結果として、細菌叢は全体として機能的に劣った菌構成となる。腸内細菌叢のディスバイオシスを本明細書において特に「腸内ディスバイオシス」という。腸内ディスバイオシスを伴う疾患の例として、以下に限定されるものではないが、移植片対宿主病及びアルコール性肝障害等が挙げられる。

[0031] 本明細書において「複数個」とは、例えば、2~40個、2~30個、2~20個、2~15個、2~10個、2~7個、2~5個、2~4個又は2~3個をいう。また、「アミノ酸同一性」 (アミノ酸配列に関する配列同一性) とは、比較する2つのポリペプチドのアミノ酸配列において、アミノ酸残基の一致数が最大となるように、必要に応じて一方又は双方に適宜ギャップを挿入して整列化 (アライメント) したときに、全アミノ酸残基数における一致アミノ酸残基数の割

合 (%) をいう。アミノ酸同一性を算出するための2つのアミノ酸配列の整列化は、Blast、FASTA、ClustalW等の既知プログラムを用いて行うことができる。「塩基同一性」(塩基配列に関する配列同一性)も同様に計算される。

[0032] 本明細書において「(アミノ酸の)置換」とは、天然のタンパク質を構成する20種類のアミノ酸間において、電荷、側鎖、極性、芳香族性等の性質の類似する保存的アミノ酸群内での置換をいう。例えば、低極性側鎖を有する無電荷極性アミノ酸群 (Gly, Asn, Gln, Ser, Thr, Cys, Tyr)、分枝鎖アミノ酸群 (Leu, Val, Ile)、中性アミノ酸群 (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met, Pro)、親水性側鎖を有する中性アミノ酸群 (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, Cys)、酸性アミノ酸群 (Asp, Glu)、塩基性アミノ酸群 (Arg, Lys, His)、芳香族アミノ酸群 (Phe, Tyr, Trp) 内での置換が挙げられる。これらの群内でのアミノ酸置換であれば、ポリペプチドの性質に変化を生じにくいことが知られているため好ましい。

[0033] 本明細書において「ストリンジентな条件」とは、非特異的なハイブリッドが形成されにくい条件を意味する。「高ストリンジентな条件」とは、非特異的なハイブリッドがより形成されにくい、又は形成されない条件をいう。一般に、反応条件が低塩濃度で、かつ高温になるほど高ストリンジентな条件となる。ハイブリダイゼーション後の洗浄において、例えば50℃～70℃、55℃～68℃、又は65℃～68℃で、0.1×SSC及び0.1%SDSで洗浄する条件である。この他、プローブ濃度、プローブ塩基長、ハイブリダイゼーション時間等のその他の条件を適宜組み合わせることでハイブリダイゼーションのストリンジエンシーを高くすることもできる。

[0034] 1-3. 構成

以下、本発明の溶菌剤の構成について具体的に説明をする。

本発明のエンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤は、有効成分として、(1) 溶菌酵素若しくはその活性断片からなるか、(2) 溶菌酵素若しくはその活性断片をコードするポリヌクレオチドを含むか、又は(3) 溶菌酵素

若しくはその活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む。

[0035] (1) 溶菌酵素若しくはその活性断片

一実施形態において、本発明の溶菌剤は、溶菌酵素若しくはその活性断片からなるか、又はそれを含む。

[0036] 溶菌酵素は、エンテロコッカス・フェカーリスのプロファージ配列にコードされる野生型アミノ酸配列からなるエンドライシン（以下、「野生型エンドライシン」という）、又は当該エンドライシンに由来する変異型アミノ酸配列からなるエンドライシン（以下、「変異型エンドライシン」という）のいずれであってもよい。

[0037] 野生型エンドライシンとして、配列番号1で示すアミノ酸配列からなるエンドライシンが挙げられる。

[0038] 配列番号1で示すアミノ酸配列からなるエンドライシン（以下、「ファージ由来エンドライシン」と呼ぶ）は、本実施例において単離された11株のエンテロコッカス・フェカーリス分離株のゲノムにおいて共通して見出されたエンドライシンであり、11株の分離株のいずれにおいてもPodoviridaeに分類されるプロファージ中から見出された。このファージ由来エンドライシンは、酵素活性ドメイン、及び細胞壁結合ドメインを含む。酵素活性ドメインは、N-アセチルムラミン酸とN-アセチル-D-グルコサミン残基との間の1、4 β -結合の加水分解を触媒する活性（エンド-N-アセチルムラミダーゼ活性又はムラミダーゼ活性）を有する触媒ドメインである。この酵素活性によって、細菌細胞壁が変性され得る。配列番号1で示すアミノ酸配列において、酵素活性ドメインは3位～202位を含む。細胞壁結合ドメインは、ZoocinA_TRDドメインに分類することができ、配列番号1で示すアミノ酸配列において223位～329位を含む。

[0039] 変異型エンドライシンとしては、上記の野生型エンドライシンのアミノ酸配列（配列番号1で示すアミノ酸配列）において1若しくは複数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列、又は上記の野生型エンド

ライシンのアミノ酸配列（配列番号1で示すアミノ酸配列）と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドが挙げられる。変異型エンドライシンは、野生型エンドライシンの50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有するものが好ましい。そのような活性を有する変異型エンドライシンとして、酵素活性ドメイン及び細胞壁結合ドメインを含むものが挙げられる。例えば、配列番号1で示すアミノ酸配列において3位～202位からなる酵素活性ドメイン、及び配列番号1で示すアミノ酸配列において223位～329位からなる細胞壁結合ドメインを含む変異型エンドライシンが例示される。

[0040] 一実施形態において、溶菌酵素は、（a）配列番号1で示すアミノ酸配列、（b）配列番号1で示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が付加、欠失、及び／又は置換されたアミノ酸配列、又は（c）配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列からなるポリペプチド若しくはその活性断片、又はそれを含むポリペプチド若しくはその活性断片である。

[0041] 本明細書において溶菌酵素の「活性断片」とは、上記のいずれかの溶菌酵素において、エンテロコッカス・フェカーリスに対する溶菌活性を有する断片、例えば上記の野生型エンドライシンの活性の50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、若しくは90%以上の活性、又はそれと同等以上の活性を有する断片をいう。例えば、酵素活性ドメイン及び／又は細胞壁結合ドメインを含む断片が挙げられる。より具体的には、配列番号1で示すアミノ酸配列において3位～202位からなる酵素活性ドメイン、及び／又は配列番号1で示すアミノ酸配列において223位～329位からなる細胞壁結合ドメインを含む断片が例示される。本断片を構成するポリペプチドのアミノ酸長は、特に限定しないが、例えば、野生型エンドライシンにおいて、少なくとも50、100、15

0、200、250、又は300アミノ酸の連続する領域であればよい。

[0042] (2) 溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチド

一実施形態において、本発明の溶菌剤は、溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む、又はそれからなる。

[0043] 本発明のポリヌクレオチドは、上記の溶菌酵素又はその活性断片をコードする。本発明のポリヌクレオチドは、上記のいずれかの溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチドであれば、その塩基配列は特に限定しない。例えば、配列番号1で示すアミノ酸配列からなる野生型エンドライシンをコードするポリヌクレオチド（例えば、配列番号2で示す塩基配列からなるポリヌクレオチド）を挙げることができる。

[0044] 一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドは、(a) 配列番号2で示す塩基配列、(b) 配列番号2で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列、(c) 配列番号2で示す塩基配列と60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、82%以上、85%以上、87%以上、90%以上、91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、又は99%以上の配列同一性を有する塩基配列、又は(d) 配列番号2で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジентな条件でハイブリダイズする塩基配列のいずれかを含む。

[0045] 一実施形態において、本発明のポリヌクレオチドの塩基配列は、当該ポリヌクレオチドが導入される細胞におけるコドン使用頻度に合わせてコドン最適化した塩基配列であってもよい。

[0046] 本発明のポリヌクレオチドは、DNA、又はmRNA等のRNAであってもよい。

本発明のポリヌクレオチドがmRNAである場合、その塩基配列は、上で例示したいずれかの塩基配列においてチミン (T) をウラシル (U) に置換した塩基配列をコーディング領域として含むmRNAとすることができる。本発明のポリヌクレオチドに該当するmRNAは、前記コーディング領域に加えて、5'末端のキャップ構造、3'末端のポリA鎖、開始コドン上流の5'非翻訳領域 (5' UT

R)、及び／又は終止コドン下流の3' 非翻訳領域 (3' UTR) 等を含んでもよい。5' UTR及び／又は3' UTR等には、mRNAからの翻訳量を調節するための配列が含まれていてもよい。

[0047] (3) 溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター

一実施形態において、本発明の溶菌剤は、エンテロコッカス・フェカリスを溶菌することができる溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、又はそれからなる。

[0048] 本発明の発現ベクターは、本発明の溶菌酵素又はその断片をコードするポリヌクレオチドを発現可能な状態で含む。本明細書において「発現可能な状態」とは、プロモーターの制御下にあるプロモーター下流域に、発現すべき遺伝子を配置していることをいう。

[0049] 本発明の発現ベクターは、必須構成要素として、プロモーター、及び「(2) 溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチド」に記載のポリヌクレオチドを含む。

[0050] 本発明の発現ベクターとして使用可能なベクターは、例えば、プラスミド又はウイルスを利用した発現ベクターである。本明細書において、「発現ベクター」は、プラスミドベクター、ウイルスベクター、及び組換えベクターを包含するものとする。

[0051] プロモーターは、各種プロモーター、例えば、過剰発現型プロモーター、構成的プロモーター、部位特異的プロモーター、時期特異的プロモーター、及び／又は誘導性プロモーターを用いることができる。例えば、CMVプロモーター (CMV-IEプロモーター)、SV40初期プロモーター、RSVプロモーター、HSV-TKプロモーター、EF1 α プロモーター、Ubプロモーター、メタロチオネインプロモーター、SR α プロモーター、又はCAGプロモーター等が挙げられる。

[0052] 発現ベクターは、ターミネーター、エンハンサー、ポリA付加シグナル、5'-UTR (非翻訳領域) 配列、イントロン配列、リボソーム結合配列、標識若しくは選択マーカー遺伝子、マルチクローニング部位、ヌクレアーゼ認識配列

、及び／又は複製開始点等を含むこともできる。それぞれの種類は、宿主細胞内でその機能を発揮し得るものであれば、特に限定されない。

[0053] 1-4. 効果

本発明の溶菌剤によれば、エンテロコッカス・フェカーリスを選択的に溶菌することができる。本発明溶菌剤は、腸内細菌叢においてエンテロコッカス属細菌以外の細菌と比較してエンテロコッカス・フェカーリスを選択的に溶菌することができ、例えば有益菌（善玉菌）を実質的に溶菌することがない。そのため、抗生剤のようにディスバイオシスを悪化させることなく、腸内細菌叢の状態を改善することができる。

[0054] 本発明の溶菌剤によれば、エンテロコッカス・フェカーリスに起因する腸球菌感染症（例えばディスバイオシスを伴う腸球菌感染症）を治療又は予防することができる。

[0055] 本発明のポリヌクレオチドや発現ベクターを導入した宿主細胞もまた提供される。

本発明の溶菌剤を対象に投与する工程を含む、腸球菌感染症の治療又は予防方法、又はエンテロコッカス・フェカーリスを溶菌する方法もまた提供される。腸球菌感染症は例えば急性移植片対宿主病であり、対象は同種造血幹細胞移植のレシピエントであってもよい。

[0056] 急性移植片対宿主病等の腸球菌感染症を治療又は予防するための医薬の製造における、本発明の溶菌剤の使用もまた提供される。

[0057] 2. 腸球菌感染症の治療又は予防用医薬組成物

2-1. 概要

本発明の第2の態様は、腸球菌感染症の治療又は予防用医薬組成物である。本発明の腸球菌感染症の治療又は予防用医薬組成物は、第1態様のエンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤を含み、腸球菌感染症を治療又は予防することができる。

[0058] 2-2. 構成

本発明の医薬組成物は、必須の構成成分として有効成分を、また選択成分

として薬学的に許容可能な担体、又は他の薬剤を包含する。本発明の医薬組成物は、有効成分のみで構成することもできる。しかし、剤形形成を容易にし、有効成分の薬理効果及び／又は剤形を維持するためには後述する薬学的に許容可能な担体を包含した医薬組成物として構成されていることが好ましい。

[0059] 2-2-1. 構成成分

本発明の医薬組成物を構成する各成分について具体的に説明をする。

[0060] (1) 有効成分

本発明の医薬組成物における有効成分は、本発明の溶菌剤である。その構成については、第1態様で既に詳述していることから、ここではその具体的な説明を省略する。

[0061] 本発明の医薬組成物に含まれる溶菌剤の数は限定せず、1つ又は複数であってもよい。本発明の医薬組成物が複数の溶菌剤を含む場合、第1態様に記載の野生型エンドライシン及び／又は変異型エンドライシンの任意の組み合わせを含むことができる。

[0062] (2) 薬学的に許容可能な担体

「薬学的に許容可能な担体」とは、製剤技術分野において通常使用し得る溶媒及び／又は添加剤であって、生体に対して有害性がほとんどないか又は全くないものをいう。

[0063] 薬学的に許容可能な溶媒には、例えば、水、エタノール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等が挙げられる。これらは、殺菌されていることが望ましく、必要に応じて血液と等張に調整されていることが好ましい。

[0064] また、薬学的に許容可能な添加剤には、例えば、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤、滑沢剤等が挙げられる。

[0065] 賦形剤としては、例えば、単糖、二糖類、シクロデキストリン及び多糖類のような糖（より具体的には、限定はしないが、グルコース、スクロース、

ラクトース、ラフィノース、マンニトール、ソルビトール、イノシトール、デキストリン、マルトデキストリン、デンプン及びセルロースを含む)、金属塩(例えば、塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム若しくはリン酸カルシウム、硫酸カルシウム、硫酸マグネシウム、炭酸カルシウム)、クエン酸、酒石酸、グリシン、低、中又は高分子量のポリエチレングリコール(PEG)、プルロニック、カオリン、ケイ酸、あるいはそれらの組み合わせが挙げられる。

[0066] 結合剤としては、例えば、トウモロコシ、コムギ、コメ、若しくはジャガイモのデンプンを用いたデンプン糊、単シロップ、グルコース液、ゼラチン、トラガカント、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、セラック及び／又はポリビニルピロリドン等が挙げられる。

[0067] 崩壊剤としては、例えば、前記デンプンや、乳糖、カルボキシメチルデンプン、架橋ポリビニルピロリドン、アガー、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、アルギン酸若しくはアルギン酸ナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド又はそれらの塩が挙げられる。

[0068] 充填剤としては、例えば、前記糖及び／又はリン酸カルシウム(例えば、リン酸三カルシウム、若しくはリン酸水素カルシウム)が挙げられる。

[0069] 乳化剤としては、例えば、ソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステルが挙げられる。

[0070] 流動添加調節剤及び滑沢剤としては、例えば、ケイ酸塩、タルク、ステアリン酸塩又はポリエチレングリコールが挙げられる。

[0071] 上記の添加剤の他、必要に応じて矯味矯臭剤、溶解補助剤(可溶化剤)、懸濁剤、希釈剤、界面活性剤、安定剤、吸収促進剤(例えば、第4級アンモニウム塩類、ラウリル硫酸ナトリウム)、増量剤、保湿剤(例えば、グリセリン、澱粉)、吸着剤(例えば、澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸)、崩壊抑制剤(例えば、白糖、ステアリン、カカオバター

、水素添加油)、コーティング剤、着色剤、保存剤、抗酸化剤、香料、風味剤、甘味剤、緩衝剤等を含むこともできる。

[0072] (3) 他の薬剤

本発明の医薬組成物は、上記有効成分が有する薬理効果を失わない範囲において、他の薬剤を含有することもできる。ここで「他の薬剤」とは、本発明の溶菌剤と同様にエンテロコッカス・フェカーリスに対して溶菌活性を有する薬剤や、他の腸球菌感染症治療剤等が挙げられる。例えば、腸球菌感染症に対する公知の治療剤、抗菌薬、又は整腸剤(例:プロバイオティクス製剤)等が挙げられる。具体的な薬剤としては、移植片対宿主病であれば、副腎皮質ステロイド製剤、免疫抑制剤、カルシニューリン阻害剤、シクロホスファミド製剤、抗胸腺細胞グロブリン製剤、及び間葉系幹細胞製剤等が挙げられる。また、腸球菌感染症に対する直接的な治療作用やエンテロコッカス・フェカーリスに対する溶菌活性とは無関係の薬理作用を有する薬剤であってもよい。例えば、胃粘膜保護剤等が挙げられる。

[0073] 本発明の医薬組成物が他の薬剤を含む複合製剤である場合、腸球菌感染症を多面的に抑制できる等の相乗的な効果を期待することができるので便利である。

[0074] 2-2-2. 剤形

本発明の医薬組成物の剤形は、有効成分である本発明の溶菌剤を不活化させないか、させにくく、かつ投与後に生体内でその薬理効果を十分に発揮し得る剤形であれば特に限定しない。

[0075] 剤形は、その形態により液体剤形又は固体剤形(ゲルのような半固体剤形を含む)に分類できるが、本発明の医薬組成物は、そのいずれであってもよい。また剤形は投与方法により経口剤形と非経口剤形とに大別できるが、これに関してもいずれであってもよい。

[0076] 具体的な剤形としては、経口剤形であれば、例えば、懸濁剤、乳剤、及びシロップ剤のような液体剤形、散剤(粉剤、粉末剤、飴粉剤を含む)、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、舌下剤、及びトローチ剤等の固体剤形が挙げられる

。また、非経口剤形であれば、例えば、注射剤、懸濁剤、乳剤等の液体剤形、クリーム剤、軟膏剤、硬膏剤、シップ剤及び座剤等の固体剤形が挙げられる。好ましい剤形は、経口剤形のいずれか、又は非経口剤形であれば液体剤形の注射剤である。

[0077] 一実施形態において、本発明の医薬組成物は、腸溶製剤として製剤化されている。腸溶製剤は、カプセル剤、錠剤、カプレット剤、丸剤、トローチ剤、ロゼンジ剤、散剤、又は顆粒剤として製剤化することができる。腸溶製剤のコーティングは特に限定せず、当該技術分野で公知の腸溶性ポリマーを使用することができる。例えばポリ(メタクリル酸-コ-メチルメタクリレート)やオイドラギット(例えば、EUDRAGIT L30 D-55)等の腸溶性ポリマーを使用することができる。

[0078] 2-2-3. 投与方法

本発明の医薬組成物は、腸球菌感染症の治療又は予防のために、有効成分である本発明の溶菌剤を生体に有効量投与することができる方法であれば、当該分野で公知のあらゆる方法を適用することができる。

[0079] 本明細書において「有効量」とは、有効成分がその機能を発揮する上で必要な量、すなわち、本発明では治療又は予防剤が腸球菌感染症を治療又は予防する上で必要な量であって、かつそれを適用する生体に対して有害な副作用をほとんど又は全く付与しない量をいう。この有効量は、被験体の情報、投与経路、及び投与回数等の条件によって変化し得る。「被験体」又は「対象」とは、本発明の医薬組成物の適用対象となる動物個体をいう。好ましい被験体はヒトである。「被験体の情報」とは、被験体の様々な個体情報であって、例えば、被験体の年齢、体重、性別、全身の健康状態、薬剤感受性、服用中の医薬品の有無等を含む。有効量、及びそれに基づいて算出される投与量は、個々の被験体の情報等に応じて医師又は獣医師の判断によって決定される。腸球菌感染症の治療又は予防の十分な効果を得る上で、本発明の医薬組成物を大量投与する必要がある場合、被験者に対する負担軽減のために、数回に分割して投与することもできる。

[0080] 本発明の医薬組成物の投与方法は、全身投与又は局所的投与のいずれであってもよい。全身投与の例としては、静脈注射等の血管内注射や経口投与等が挙げられる。また局所投与の例としては、直腸投与、腹腔内投与等が挙げられる。好ましい投与方法は、経口投与、直腸投与、腹腔内投与、又は静脈投与である。本発明の医薬組成物の有効成分は、本発明の溶菌剤で構成されている。したがって、経口投与の場合には、有効成分を消化酵素による分解から保護するために適当なDDS（薬剤送達システム）を用いる等、適切な処置を施すことが好ましい。

[0081] 本発明の医薬組成物を投与又は摂取する場合、その投与量又は摂取量は、対象の年齢、体重、症状、健康状態、組成物の種類（医薬品、飲食品等）等に応じて、適宜選択される。例えば、0.001 mg/kg/日～1000 mg/kg/日、0.01 mg/kg/日～500 mg/kg/日、0.1 mg/kg/日～200 mg/kg/日、1 mg/kg/日～100 mg/kg/日、5 mg/kg/日～50 mg/kg/日、又は10 mg/kg/日であってもよい。

[0082] 2-2-4. 対象疾患

本発明の医薬組成物が対象とする腸球菌感染症は、エンテロコッカス・フェカーリス感染に起因する疾患であれば特に限定しない。腸球菌感染症の具体例としては、腸内ディスバイオシス（例えば、急性移植片対宿主病、アルコール性肝障害）、バンコマイシン耐性腸球菌菌血症、及び感染性心内膜炎が挙げられる。なお、エンテロコッカス・フェカーリスがアルコール性肝障害に関与し得ることは、文献（Duan, Y., et al., Nature, 2019, 575(7783) : 505-511）に開示されている。エンテロコッカス・フェカーリスがバンコマイシン耐性腸球菌菌血症（感染症）に関与し得ることは、文献（Ford, C.D., et al., Biol Blood Marrow Transplant, 2017, 23(2):340-346）に開示されている。

[0083] 一実施形態において、腸球菌感染症は移植片対宿主病、好ましくは急性移植片対宿主病である。本発明の医薬組成物が（急性）移植片対宿主病を対象とする場合、本発明の医薬組成物は同種造血幹細胞移植のレシピエントに投与することができる。この場合、本発明の医薬組成物は同種造血幹細胞移植の

移植前及び／又は移植後に投与することができる。例えば同種造血幹細胞移植の100日前、90日前、80日前、70日前、60日前、50日前、40日前、30日前、20日前、10日前、5日前、又は3日前から投与を開始することができ、及び／又は移植から3日後、5日後、10日後、20日後、30日後、40日後、50日後、60日後、70日後、80日後、90日後、又は100日後まで投与することができる。

[0084] 2-3. 効果

本発明の医薬組成物によれば、腸球菌感染症を治療又は予防することができる。

本発明の医薬組成物を急性移植片対宿主病の発症前に投与する場合、腸内細菌叢におけるエンテロコッカス・フェカーリスを選択的に減少させることにより、急性移植片対宿主病を予防することができる。本発明の医薬組成物を急性移植片対宿主病の発症後に投与する場合、腸内細菌叢において優勢となったエンテロコッカス・フェカーリスを選択的に減少させることにより、腸内細菌叢の状態を改善することができる。また、糞便移植療法と併用して本発明の医薬組成物を投与することもできる。例えば、糞便移植と同時に、又は糞便移植前若しくは糞便移植後に本発明の医薬組成物を投与してもよい。

[0085] 3. 腸球菌感染症の治療又は予防用食品組成物

3-1. 概要

本発明の第3の態様は、腸球菌感染症の治療又は予防用食品組成物である。本発明の腸球菌感染症の治療又は予防用食品組成物は、第1態様のエンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤を含み、腸球菌感染症を治療又は予防することができる。本発明の食品組成物は、例えば、機能性食品、機能性表示食品、特定保健用食品及び栄養機能性食品等として摂取又は飲食される。

[0086] 3-2. 構成

(食品組成物の有効成分)

本発明の食品組成物における有効成分は、上述のエンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤である。

[0087] (食品組成物)

本発明の「食品組成物」は、特に限定しないが、食品、飲料、機能性食品等を包含する。本発明に係る食品組成物の種類は、特に限定しないが、食品としては、例えば、菓子、麺、パン、米飯及びビスケット等の穀類加工品、練り製品、乳製品、インスタント食品、並びに調味料等が挙げられる。また、飲料としては、例えば、茶系飲料（緑茶、紅茶、烏龍茶等）、果物又は野菜系飲料、経口補水液、炭酸飲料、清涼飲料、栄養ドリンク、水等が挙げられる。

[0088] 本発明の食品組成物は、機能性食品であってもよい。本発明の「機能性食品」は、生体に対する機能性を有する食品を意味する。例えば、特定保健用食品及び栄養機能食品を含む保健機能食品、機能性表示食品、特別用途食品、栄養補助食品、健康補助食品、サプリメント（例えば、液体、粉末、タブレット又はカプセル等）等の、いわゆる健康食品全般が包含される。本発明の機能性食品は、好ましくはサプリメントである。

[0089] 本発明の機能性食品は、固形製剤（例えば、錠剤、顆粒剤、散剤、丸剤、カプセル剤等）、液体製剤（例えば、液剤、懸濁剤、シロップ剤等）、又はジェル剤やペースト剤等であってもよいし、通常の飲食品の形状（例えば、飲料、菓子等）であってもよい。

[0090] 本発明の食品組成物への溶菌剤の配合量は、特に限定しない。通常は、溶菌剤の配合量は、食品の総重量に対して0.001～99重量%、0.01～10重量%、又は0.1～10重量%、例えば90重量%、50重量%、10重量%、5重量%、3重量%、2重量%、1重量%、0.1重量%、又は0.01重量%である。

[0091] 本発明の食品組成物は、任意の食品成分をさらに含んでもよい。本発明の食品組成物は、水、タンパク質、糖質、脂質、ビタミン類、ミネラル類、アミノ酸、有機酸、有機塩基、果汁、フレーバー類、プレバイオティクス等を含んでもよい。また、本発明の食品組成物は、甘味料、香料、及び着色料等の添加物を含んでもよい。

[0092] 3-3. 摂取方法

本発明の食品組成物の対象者、摂取回数、摂取量、摂取時期、及び対象疾患等は、上述の「腸球菌感染症の治療又は予防用医薬組成物」に記載の対象者、投与回数、投与量、投与時期、及び対象疾患等に準じる。

[0093] 3-4. 効果

本発明の食品組成物を摂取した対象において、安全に腸球菌感染症を治療又は予防することができる。

実施例

[0094] <実施例1：同種造血幹細胞移植後の患者における腸内細菌叢の解析>

(目的)

同種造血幹細胞移植を受けた患者から提供された糞便試料を対象として、腸内微生物組成を解析する。

[0095] (方法)

(1) 糞便試料の採取

大阪公立大学医学部附属病院血液内科・造血細胞移植科で2019年1月から2020年6月までの期間に同種造血幹細胞移植 (allogenic hematopoietic cell transplantation; allo-HCT) を受けた血液疾患患者46人から計317個の糞便試料の提供を受けた。なお、本研究は施設内審査委員会から倫理的承認を受けており、全ての患者からインフォームドコンセントを得て実施した。

[0096] 各患者からの糞便試料の採取は、移植前 (前処置開始の14日以内前) に開始し、幹細胞輸注日 (day 0) から98±3日又は退院時まで継続した。なお、全身状態の悪化により患者が糞便試料を提供できなかった場合は検体採取を省略した。

[0097] (2) 糞便試料からの細菌DNA抽出

糞便試料からの細菌DNA抽出は、文献 (Fujimoto K, et al., Cell Host Microbe, 2020, 28(3):380-9, e9) 記載の方法に従って行った。具体的には、RNA later (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中に保存した糞便試料を1 mLのSM-plus緩衝液 (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH7.4), 8 mM MgSO₄ · 7H₂O, 5 mM CaCl · 2H₂O, 及び0.01% (w/v)ゼラチン) 中でホモジナイズした後、100 μm

セルストレイナーに通した。試料を20 mM EDTA、100 μ g/mL組換えヒトリゾチーム (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)、及び0.5 U/mLアクロモペプチダーゼ (富士フィルム和光純薬、東京、日本) を含むSM-plus緩衝液1 mLと37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした。インキュベーション後、上清を1/400倍量の20 mg/mLプロテイナーゼK (Nacalai Tesque、京都、日本) 及び1/20倍量の10%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) と55 $^{\circ}$ Cにて1時間インキュベートした。その後、試料に等容量のフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールを加えて混合した。16,000 \times gで5分間遠心後、クロロホルム抽出を行った。1/10倍量の3M酢酸ナトリウム及び等容量のイソプロパノールと混合した後、16,000 \times gにて15分間遠心分離を行った。上清を除いた後、70%エタノールでペレットを洗浄して空気乾燥後、DNAを10 mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) に再懸濁した。

[0098] (3) 16S rRNA遺伝子解析

16S rRNAのV3-V4領域をPCR増幅した。1段階目のPCR増幅はフォワードプライマー (ACACGACGCTCTTCCGATCTCCTACGGGNGGCWGCAG、配列番号3) 及びリバースプライマー (GACGTGTGCTCTTCCGATCTGACTACHVGGGTATCTAATCC、配列番号4) を用いて20サイクル行った。次いで、2段階目のPCR増幅をオーバーハング配列 (ACACGACGCTCTTCCGATCT、配列番号5 ; GACGTGTGCTCTTCCGATCT、配列番号6) 及びインデックス配列からなるプライマー対並びにNEBNext multiplex 0 ligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1、New England Biolabs) により8サイクル行った。続いて、Agencourt AMPureビーズを用いて増幅産物を精製した。MiSeq v3 Reagent kit及び15%PhiX spike (Illumina) を用いてMiSeq instrument (Illumina、San Diego、CA) により配列決定を実施した。16S rRNA遺伝子解析はQIIME2を用いて行った。

[0099] (結果)

糞便試料を対象とする16SリボソームRNA (rRNA) 遺伝子シーケンシングに基づく腸内微生物組成解析の結果、30例 (65.2%) に由来する89個の糞便試料でエンテロコッカス優勢が認められた。なお、エンテロコッカス優勢 (E

nterococcus domination) とは、糞便試料中に含まれる細菌全体においてエンテロコッカス属細菌の構成割合が25%以上を占める状態を意味する。

[0100] <実施例2：糞便試料から単離されたエンテロコッカス属細菌株の解析>

(目的)

実施例1でエンテロコッカス優勢が認められた糞便試料からエンテロコッカス属細菌株を単離し、抗菌剤耐性及び遺伝子発現解析を行う。

[0101] (方法及び結果)

(1) 細菌種の特定

実施例1でエンテロコッカス優勢が認められた糞便試料30個の各々をエンテロコッカス選択用アガー培地 (アズトレオナム20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ポリミキシンB 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アムホテリシンB 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、塩化トリフェニルテトラゾリウム50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加したブレインハートインフュージョン (BHI) 培地) で培養した。37°Cにて24~48時間好気培養した後、コロニーをピックして、BHI培地中でさらに培養した。次いで、PowerSoil DNA Isolation Kit (QIAGEN、German town、MD、USA) を用いて細菌DNAを抽出した。E. faecalis用のプライマー対 (ATCAAGTAGTCT、配列番号7；及びACGATTCAAAGCTAACTG、配列番号8)並びに E. faecium用のプライマー対 (TTGAGGCAGACCAGATTGACG、配列番号9；及びTAGACAGCGACTCCGATTCC、配列番号10)を用いて細菌DNAからPCR増幅を行い、増幅産物をMCE-202 MultiNA with DNA-12000を用いて分析することで、細菌種を特定した。

30株のうち、11株はE. faecalisであり、19株はE. faeciumであることが同定された。

[0102] (2) 抗菌剤耐性の検証

上記のエンテロコッカス属細菌30株の各々について抗菌剤感受性を検証した。具体的には、生理食塩水で1 McFarland標準に調製した細菌株をBHI培地で500倍に希釈した後、「Eiken」DP42乾燥プレート (栄研化学株式会社、東京、日本) の固相ウェル中で24時間好気培養した。

[0103] ダプトマイシン (DAP)、バンコマイシン (VCM)、テイコプラニン (TEIC

）、及びリネゾリド（LZD）のいずれかの抗菌剤の最小阻害濃度を製品仕様書に従って決定した。E. faecalis株（11株）及びE. faecium（19株）はいずれもダプトマイシン、バンコマイシン、テイコプラニン、及びリネゾリドに感受性を示した。E. faecalis株（11株）を対象として抗菌剤耐性を試験した結果を以下の表1に示す。

[0104] [表1]

表1: E. faecalis 分離株の抗菌剤耐性

E. faecalis 株名	最小阻害濃度 (µg/mL)			
	DAP	VCM	TEIC	LZD
OCU009_35_4	>4	2	1	2
OCU009_35_10	>4	4	2	2
OCU015_56_6	>4	2	0.5	2
OCU015_56_7	>4	2	0.5	2
OCU031_pre_6	>4	2	1	2
OCU031_pre_7	>4	2	1	2
OCU031_pre_10	>4	2	1	2
OCU031_7_1	>4	4	2	2
OCU031_7_9	>4	2	2	2
OCU031_14_5	>4	4	1	2
OCU031_14_8	>4	2	1	2

* DAP, daptomycin; VCM, vancomycin; TEIC, teicoplanin; LZD, linezolid.

[0105] バンコマイシン耐性エンテロコッカス属細菌（VRE）等の多剤耐性細菌は、allo-HCT後の死亡率と関連することが報告されている（Ford, C.D., et al., Biol Blood Marrow Transplant, 2017, 23(2): 340-6.）。しかしながら、上記結果は、日本で分離されたE. faecalis及びE. faecium株の標準的な疫学的特徴と一致していた（Fujiya, K., et al., Sci Rep., 2021; 11(1):14780.）。

[0106] (3) サイトライシン関連遺伝子の同定及び遺伝子発現解析

サイトライシンはヒトや多くの動物モデルにおいてエンテロコッカス属細

菌関連疾患の重症化に寄与する外分泌タンパク質の1つとして知られている。PCRによりサイトライシン関連遺伝子 (cylL_L、cylA、cylB、及びcylM) は、*E. faecalis*の分離株の全てで検出された一方、*E. faecium*の分離株では検出されなかった。

[0107] 次に、*E. faecalis*及び*E. faecium*の分離株において、遺伝子発現解析を行った。具体的には、単離した*E. faecalis*、及び*E. faecium*菌株より細菌DNAを抽出し、シーケンスライブラリを作成した。作成したライブラリを用いて、次世代シーケンサーで全ゲノムシーケンスを実施した。得られたシーケンスリードを繋ぎ合わせたコンティグを作成し、コンティグ内の遺伝子領域を同定し、データベースと照合することで、機能遺伝子の検索を行った。その結果、バイオフィーム形成に関連するKyoto Encyclopedia genes and genomes (KEGG) Ontology (KO) termとしてK01791、K07173、K05946、及びK08605等が*E. faecalis*において高頻度で検出された。この結果から、*E. faecalis*の腸内での生存及び増殖は、バイオフィーム形成に基づくことが示唆された。

[0108] <実施例3 : *E. faecalis*分離株の全ゲノム解析、及びファージ由来エンドライシンの同定>

(目的)

*E. faecalis*分離株を対象として全ゲノム解析を行う。さらに*E. faecalis*ゲノム中のプロファージ配列において溶菌酵素遺伝子を同定する。

[0109] (方法及び結果)

*E. faecalis*及び*E. faecium*のショットガン配列データを解析し、プロファージ配列を抽出した。具体的には、DNAライブラリは、アダプターライゲーション及びバーコード化のステップでNEBNext Multiplex Oligos (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) を使用した点を除いて、KAPA HyperPlus Kit (KAPA Biosystems, Indianapolis, IN, USA) を用いて添付説明書に従って調製した。ライブラリをプールし、HiSeq2500シーケンサー (2×250 paired endリード、HiSeq Rapid SBS Kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA)) で配

列決定を行った。各試料の配列決定の結果として同定したオープンリーディングフレーム (ORF) は、KEGG原核生物遺伝子及び対応KOに従ってアノテーションを行った (図1A)。また、細菌コンティグ中のプロファージ配列をVirSorter (v1.0.3) により予測した (図1B)。各分離株の配列データから、Siphoviridae又はPodoviridaeに分類される最大4種類のプロファージ配列が同定された。

[0110] 11株の*E. faecalis*分離株において、エンドライシンの推定コード配列をプロファージ配列から抽出した。同定されたエンドライシンは、いずれも配列番号1で示すアミノ酸配列からなり、配列番号2で示す塩基配列によってコードされる。以下では、分離株から共通して見出されたエンドライシンを「ファージ由来エンドライシン」と表記し、当該エンドライシンをコードする遺伝子を「ファージ由来エンドライシン遺伝子」と表記する。

[0111] <実施例4 : *E. faecalis*分離株に対する溶菌活性の検証>

(目的)

実施例3で同定されたファージ由来エンドライシンを合成し、*E. faecalis*分離株に対する*in vitro*溶菌活性を検証する。

[0112] (方法及び結果)

(1) タンパク質合成

*E. faecalis*分離株OCU_009_35_4のゲノムDNAを鋳型として、フォワードプライマー (AAGGATCCATGACATTAACCGGAATTGA、配列番号11) 及びリバースプライマー (AAGTCGACTTACCCATAGATTAATTTCT、配列番号12) を用いてファージ由来エンドライシン遺伝子をPCR増幅し、pCold-SUMO発現ベクター (Creative Biogene, Shirley, NY) のBamHI/SalI部位に連結することによって、His-SUMO標識エンドライシン発現ベクターを作製した。この発現ベクターをBL21 (DE3) 細胞に形質転換し、目的のタンパク質をCapturem (商標) Hisタグ精製マキシプレップカラム (タカラ) を用いて精製した。得られたタンパク質は、HiTrap緩衝液 (50 mM Na₃PO₄, 0.15 M NaCl, pH 7.0) でHiTrap (商標) 脱塩カラム (Amersham Biosciences) により脱塩した。タンパク質溶液は、

アミコン（登録商標）ウルトラ-15 10K（ミリポア）にロードして、5,000×gで室温にて20分間遠心分離した。標的タンパク質の濃度は、Protein Assay CBB Solution（ナカライテスク）を用いて測定した。得られたファージ由来エンドライシンをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）により確認した（図2）。

[0113] (2) *E. faecalis*分離株0CU031_14_8に対する溶菌活性

*E. faecalis*分離株0CU031_14_8をBHI培地にて好気培養し、3,000×gにて15分間遠心分離することにより回収した。細胞ペレットを洗浄し、HiTrap緩衝液に再懸濁した。ファージ由来エンドライシンを細胞再懸濁液に終濃度50 μg/mLにて添加した。TVS062CA BioPhoto recorder（ADVANTEC、東京、日本）で1分毎に濁度（OD₆₀₀）を測定することによって、溶菌活性を測定した。

[0114] 結果を図3に示す。*E. faecalis*分離株0CU031_14_8は、ファージ由来エンドライシンの添加によって溶菌されることが実証された。

[0115] (3) 11種類の*E. faecalis*分離株に対する溶菌活性

過去の文献（Yang, Y., et al., J Appl Oral Sci., 2018, 26:e20170566 ; Shao, C., et al., J Proteome res., 2012, 11(9):4465-75 ; He Z., et al., Int J Antimicrob Agents., 2012, 40(1):30-5）に記載の方法に従って、クリスタルバイオレット染色を用いてバイオフィームアッセイを行った。このアッセイは、クリスタルバイオレット色素を細菌由来バイオフィーム（細胞外マトリクス等を含む）に吸着させた後、エタノールを添加することによってクリスタルバイオレット色素を溶出し、その吸光度を測定することによって色素量を定量する方法である。クリスタルバイオレット色素の吸着量は、バイオフィームの乾燥重量と一次相関するため、この方法により細菌由来のバイオフィーム量を定量的に評価することができる。

[0116] 具体的には、11種類の*E. faecalis*分離株の各々をアズトレオナム（20 μg/mL）、ポリミキシンB（20 μg/mL）、及びアムホテリシンB（4 μg/mL）を添加したBHI培地において37℃にて一晩培養した。次いで、新たなBHI培地で100倍に希釈し、96ウェル平底ポリスチレンマイクロタイタープレート（コー

ニング社、Arizona、USA、353072) に接種し、さらに37°Cにて24時間好気培養した。その後、96ウェルプレートにHiTrap緩衝液200 μ Lで1回洗浄し、ファージ由来エンドライシン又はビヒクル (Hisタグを付加したSUMOタンパク質) 200 μ L (終濃度50 μ g/mL) を加えた。プレートを一晩インキュベートした後、200 μ Lのリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄して、反転させて乾燥させた。その後、0.5%クリスタルバイオレット溶液200 μ Lを加えて染色した。室温で15分間染色した後、プレートを200 μ LのPBSで3回洗浄した。プレートを50°Cにて30分間乾燥し、結合した色素を95%エタノール (v/v) 200 μ Lを加えて溶解した。試料の吸光度を570 nmで測定した。11種類の細菌株の全てについて、8ウェルで実験を反復した。

[0117] 結果を図4に示す。この結果から、11種類全ての*E. faecalis*株のバイオフィームがファージ由来エンドライシンによって溶解されたことが示された。

[0118] <実施例5 : *E. faecalis*を投与したGVHDモデルマウスへのファージ由来エンドライシン投与>

(目的)

*E. faecalis*を投与したGVHDモデルマウスにおいてファージ由来エンドライシンを投与し、糞便中の*E. faecalis*細菌数及びの生存率への影響を検討する。

[0119] (方法)

全ての動物実験は、大阪公立大学動物実験委員会の承認を得て実施した。無菌C57BL/6雌マウス (H2k^b) 及びSPFの129SvJ/JmsSlc雌マウス (6~8週齢) をそれぞれSLCジャパン (浜松、日本) 及びCLEAジャパン (東京、日本) から購入した。マウスは、午後8時~午前8時までの暗期条件下、温度制御下 (23 \pm 2°C) で飼育し、無菌水及び標準的な実験用マウス固形飼料を自由に摂取させた。無菌C57BL/6マウスは1ケージで1個体を飼育した。本実施例における実験方法の概要を図5に示す。

[0120] 幹細胞移植前に、無菌C57BL/6雌マウスに対して*E. faecalis* OCU031_14_8株の懸濁液を経口投与した。懸濁液は、 2.0×10^8 コロニー形成ユニット (cfu

)を200 μ Lの滅菌PBSに懸濁したものを使用した。3週間後、糞便懸濁液をエンテロコッカス選択用アガー培地（アズトレオナム20 μ g/mL、ポリミキシンB 20 μ g/mL、アムホテリシンB 4 μ g/mL、塩化トリフェニルテトラゾリウム 50 μ g/mLを添加したブレインハートインフュージョン（BHI）培地）で培養することにより、*E. faecalis*の定着を確認した。

[0121] 前処置として、無菌C57BL/6雌マウスにブスルファン（Sigma-Aldrich）を20 mg/kg/dayにて5日間腹腔内投与した後、シクロホスファミド（Sigma-Aldrich）を10 mg/kg/dayにて3日間投与した。Day -2とDay -1は安静日とした。Day 0にて、レシピエントC57BL/6マウスに、129SvJ/JmsSlcドナー雌マウス由来の 1.5×10^7 骨髄細胞及び 2.0×10^6 脾臓T細胞を静脈内注射した。骨髄細胞は、大腿骨から取得し、Hanks' Balanced Salt Solution（Nacalai Tesque）に懸濁した。赤血球溶解緩衝液Hybti-Max（Sigma-Aldrich、RNBG8098）を用いて赤血球溶解後、PBS中でシングルセル懸濁液を調製した。脾臓T細胞懸濁液の調製には、マウス用Pan T細胞単離キットII（Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany、#130-095-130）を使用した。

[0122] 幹細胞移植日（Day 0）から、HiTrap緩衝液200 μ Lに溶解したファージ由来エンドライシン200 μ g又はビヒクル（Hisタグを付加したSUMOタンパク質）を週3回（10 mg/kg/day、30 mg/kg/week）、3週目まで経口投与した。

[0123] Day 0以降の生存率を毎日モニタリングした。各群における全生存期間を統計解析し、一般化Wilcoxon検定を用いて比較した。また、糞便をBHI培地で希釈した懸濁液をエンテロコッカス選択用アガー培地で培養し、形成されたコロニーの数を測定することにより、糞便中の*E. faecalis*細菌量を定量した。すべての実験は、2回の反復実験により実施した。

[0124] （結果）

結果を図6に示す。ビヒクル（Hisタグを付加したSUMOタンパク質）を投与したGVHDモデルマウスでは、糞便中の*E. faecalis*細菌量が増加する傾向を示した。一方、ファージ由来エンドライシンを投与したGVHDモデルマウスでは、糞便中の*E. faecalis*細菌量が著しく減少した（図6A）。

[0125] また、幹細胞移植から25日後、ビヒクルを投与したGVHDモデルマウスは半数が死亡した。これに対して、ファージ由来エンドライシンを投与したGVHDモデルマウスは、100%が生存した（図6B）。したがって、ファージ由来エンドライシンの投与により生存率が著しく向上することが実証された。

[0126] <実施例6：糞便試料を移植したGVHDモデルマウスへのファージ由来エンドライシン投与>

（目的）

実施例1で採取した患者の糞便を移植したGVHDモデルマウスにおいてファージ由来エンドライシンを投与し、糞便中の*E. faecalis*細菌数及びの生存率への影響を検討する。

[0127] （方法及び結果）

全ての動物実験は、大阪公立大学動物実験委員会の承認を得て実施した。本実施例における実験方法の概要を図7に示す。本実施例では、エンテロコッカス優勢を示した患者由来の糞便（OCU031_14）を嫌気性培地で16倍希釈して得られた200 μ L懸濁液を経口投与した点を除き、実施例5と同様の方法により実験を行った。Day 0以降の生存率を毎日モニタリングし、Day 0及びDay 8における腸内微生物組成を16S rRNA遺伝子配列決定により分析した。

[0128] 結果を図8に示す。ビヒクル（Hisタグを付加したSUMOタンパク質）を投与したGVHDモデルマウスでは、幹細胞移植から8日後において腸内微生物に占めるエンテロコッカス属細菌の割合は有意に変化しなかった。一方、ファージ由来エンドライシンを投与したGVHDモデルマウスでは、幹細胞移植から8日後において腸内微生物に占めるエンテロコッカス属細菌の割合が有意に減少した（図8A）。また、幹細胞移植から30日後、ビヒクルを投与したGVHDモデルマウスは半数近くが死亡したのに対して、ファージ由来エンドライシンを投与したGVHDモデルマウスは、100%が生存した（図8B）。したがって、ファージ由来エンドライシンの投与により生存率が著しく向上することが実証された。

[0129] <実施例7：さらなる*E. faecalis*分離株及び*E. faecium*分離株に対する溶菌

活性の評価>

(目的)

ファージ由来エンドライシンのさらなる*E. faecalis*分離株及び*E. faecium*分離株に対する溶菌活性を評価する。特にサイトライシン関連遺伝子陽性／陰性、及び／又はバンコマイシン耐性／非耐性との関連で溶菌活性を検討する。

[0130] (方法及び結果)

以下の表2に示す各種菌株は、理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室から入手した。

各菌株について、ニッスイプレート馬血液寒天培地を使用する溶血アッセイにより溶血活性を測定し、サイトライシン関連遺伝子をPCRにより検出し、バンコマイシン耐性を実施例2の(2)に記載の方法により評価し、バンコマイシン耐性遺伝子である*vanA*遺伝子及び*vanB*遺伝子をPCRにより検出した。さらに、各菌株をBHI培地にて好気培養し、300×gにて5分間遠心分離することにより回収した。細胞ペレットを洗浄し、HiTrap緩衝液に再懸濁し、ファージ由来エンドライシンを細胞再懸濁液に終濃度50 µg/mLにて添加した。37度でインキュベートし、菌塊の有無を指標に溶菌活性を測定した。

[0131] 結果を以下の表2に示す。ファージ由来エンドライシンは、バンコマイシン耐性かつサイトライシン陽性の*E. faecalis*分離株であるJCM8902株に対しても溶菌活性を示した。一方、*E. faecium*分離株であるJCM5804株に対しては、ファージ由来エンドライシンは溶菌活性を示さなかった。

[0132] [表2]

表2:様々な*E. faecalis*及び*E. faecium*分離株の結果

菌株名	菌種	溶血アッセイ 活性有:+ 活性無:-	サイトライシン 陽性:+ 陰性:-	バンコマイシン耐性 耐性:+ 非耐性:-	<i>vanA</i> 遺伝子 陽性:+ 陰性:-	<i>vanB</i> 遺伝子 陽性:+ 陰性:-	エンドライシン による溶菌 溶菌される:+ 溶菌されない:-
JCM5803	<i>E. faecalis</i>	-	-	-	-	-	+
JCM8902	<i>E. faecalis</i>	+	+	+	+	-	+
JCM5804	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-	-

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の（a）～（c）で示すいずれかのアミノ酸配列を含む溶菌酵素又はその活性断片からなる、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤。
- （a）配列番号1で示すアミノ酸配列
 - （b）配列番号1で示すアミノ酸配列において1又は複数個のアミノ酸が付加、欠失、及び／又は置換されたアミノ酸配列
 - （c）配列番号1で示すアミノ酸配列と90%以上の配列同一性を有するアミノ酸配列
- [請求項2] 請求項1に記載の溶菌酵素又はその活性断片をコードするポリヌクレオチドを含む、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤。
- [請求項3] 前記ポリヌクレオチドが以下の（a）～（d）で示すいずれかの塩基配列を含む、請求項2に記載の溶菌剤。
- （a）配列番号2で示す塩基配列
 - （b）配列番号2で示す塩基配列において1若しくは複数個の塩基が欠失、置換及び／若しくは付加された塩基配列
 - （c）配列番号2で示す塩基配列と90%以上の配列同一性を有する塩基配列
 - （d）配列番号2で示す塩基配列に相補的な塩基配列と高ストリンジентな条件でハイブリダイズする塩基配列
- [請求項4] 請求項2又は3に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクターを含む、エンテロコッカス・フェカーリスの溶菌剤。
- [請求項5] 請求項1～3のいずれか一項に記載の溶菌剤及び薬学的に許容可能な担体を含む、腸球菌感染症の治療又は予防用医薬組成物。
- [請求項6] 前記腸球菌感染症が、腸内ディスバイオシス、バンコマイシン耐性腸球菌菌血症、又は感染性心内膜炎である、請求項5に記載の医薬組成物。
- [請求項7] 前記腸内ディスバイオシスが、移植片対宿主病又はアルコール性肝

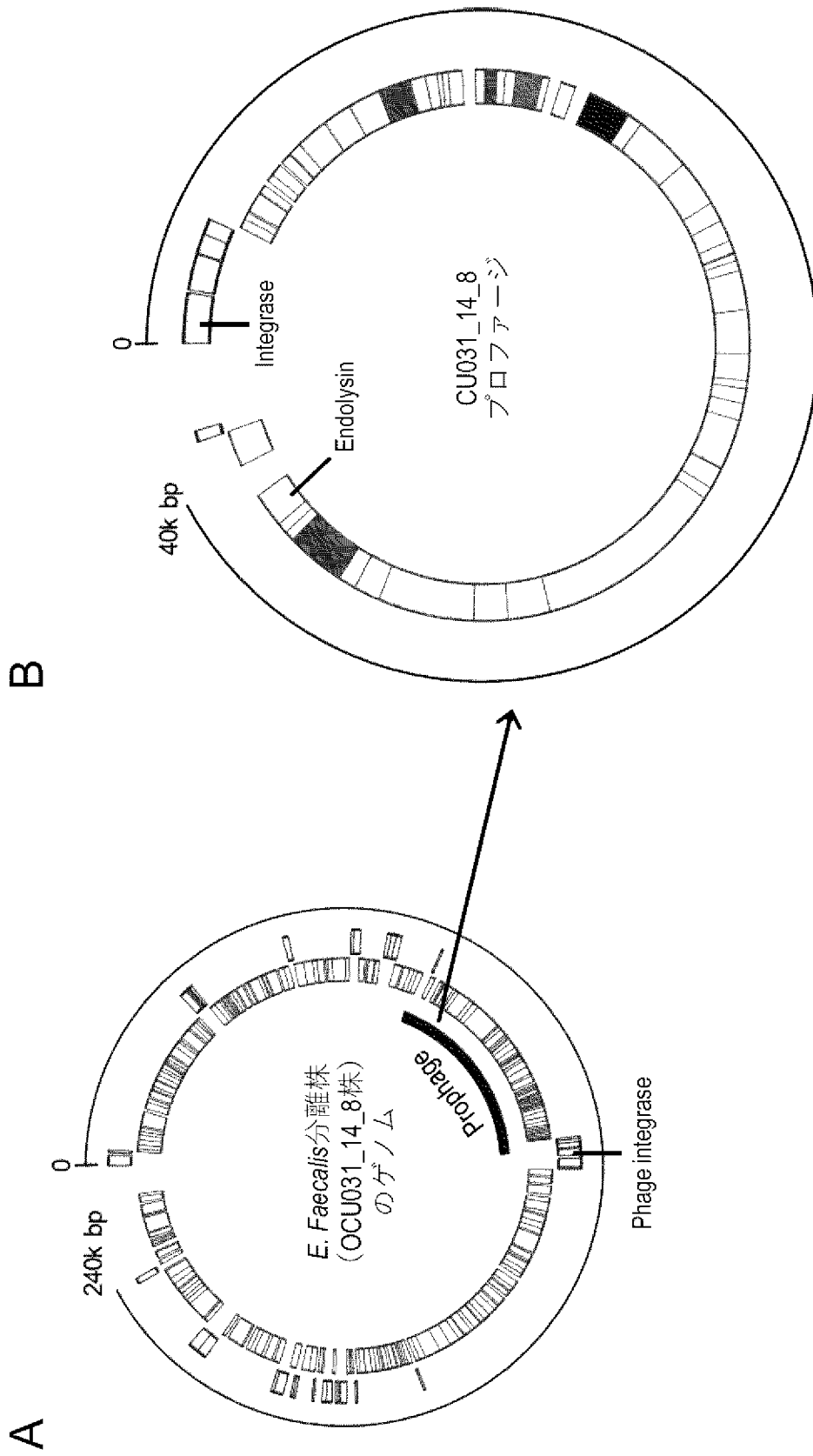
障害である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

[請求項 8] 腸溶製剤として製剤化されている、請求項 7 に記載の医薬組成物。

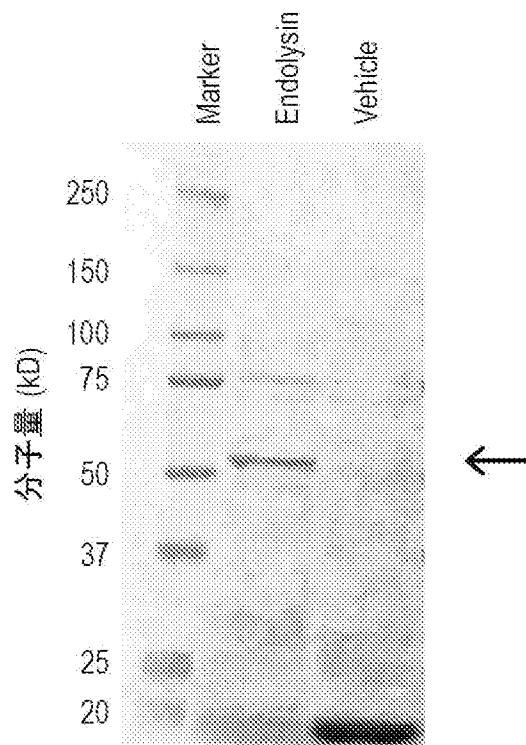
[請求項 9] 前記担体が、賦形剤、結合剤、崩壊剤、充填剤、乳化剤、流動添加調節剤、及び滑沢剤からなる群から選択されるいずれか 1 以上である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

[請求項 10] 経口投与、直腸投与、腹腔内投与、又は静脈投与される、請求項 5 に記載の医薬組成物。

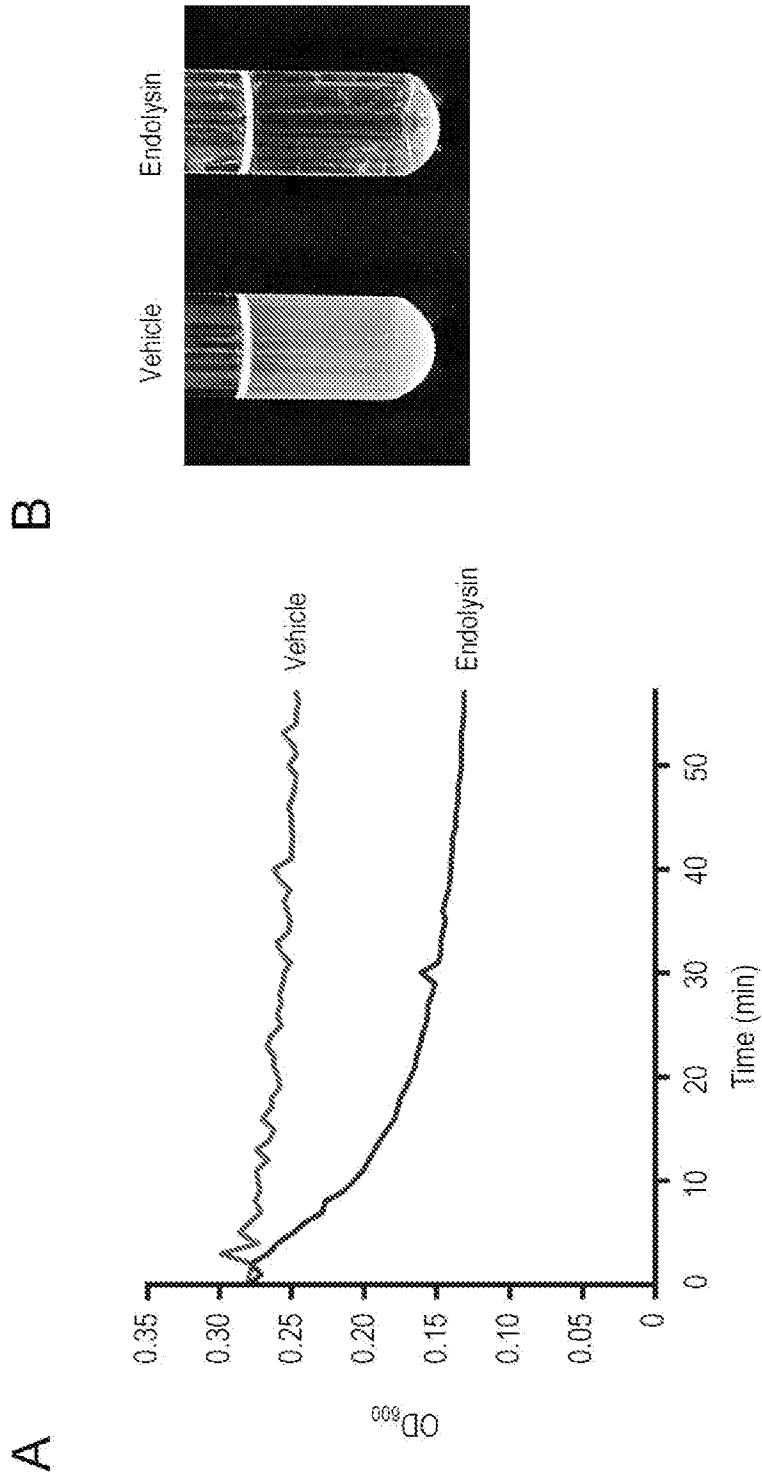
[図1]



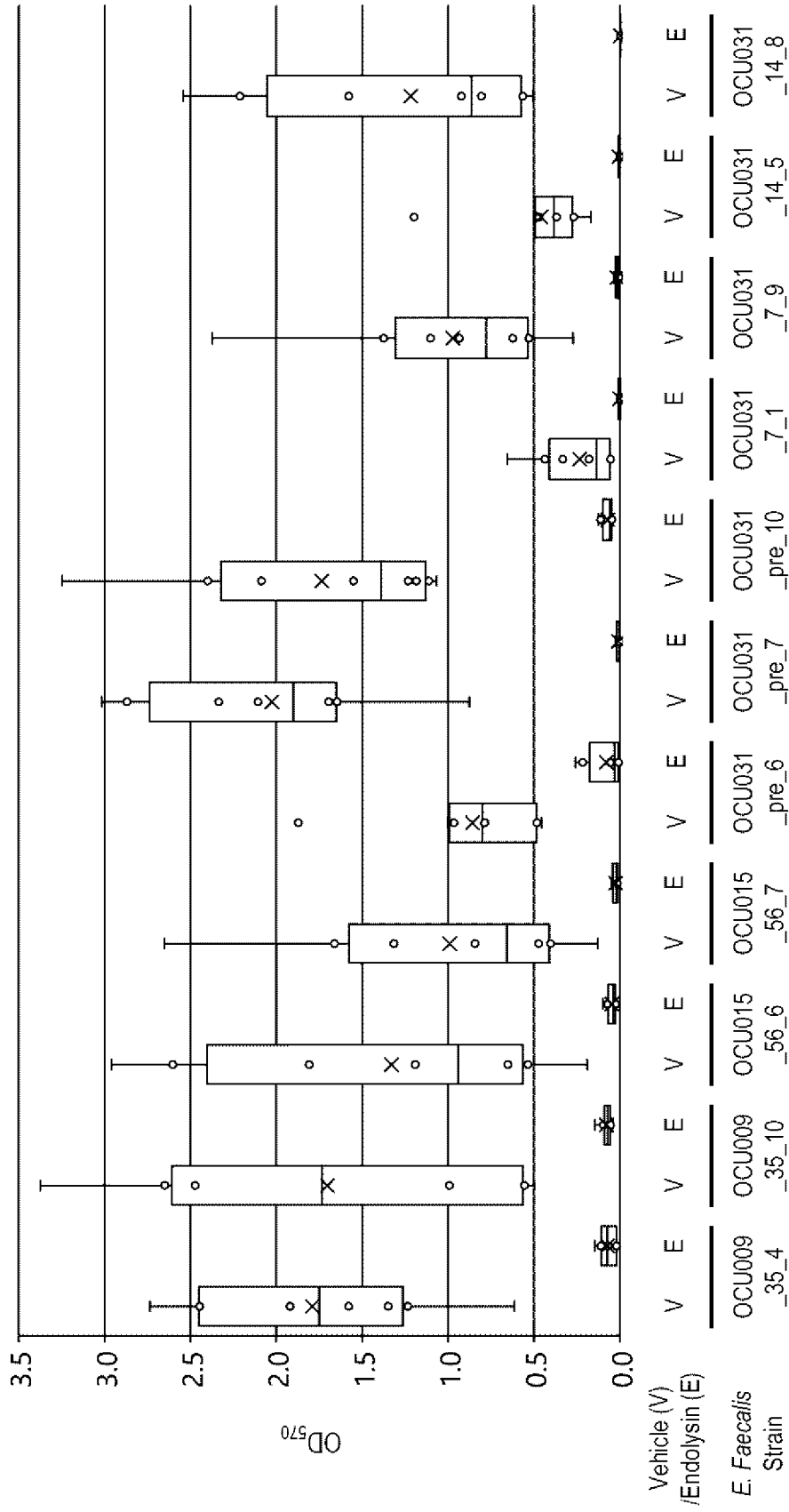
[図2]



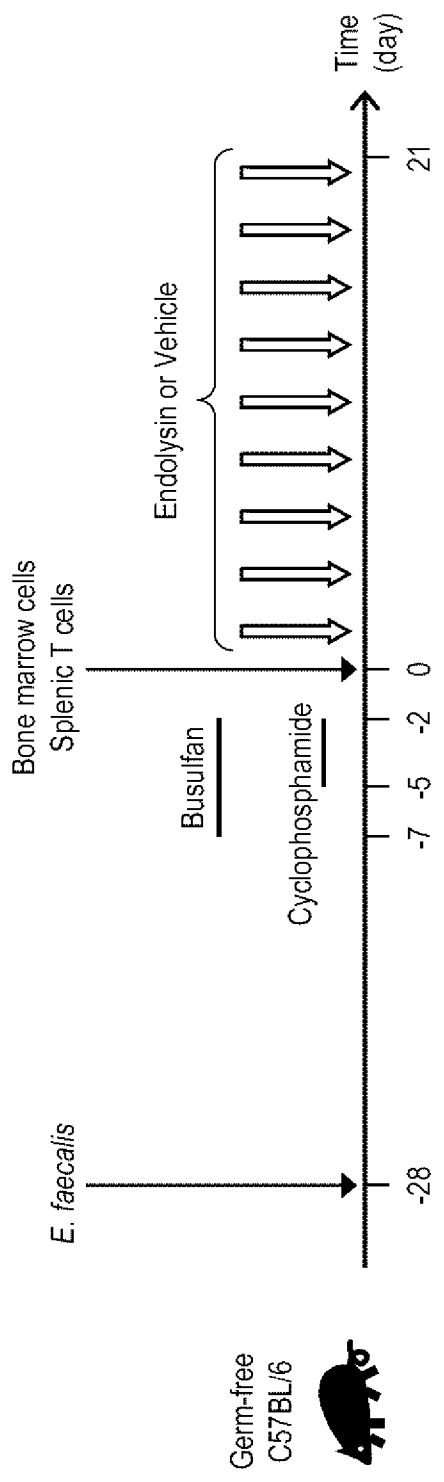
[3]



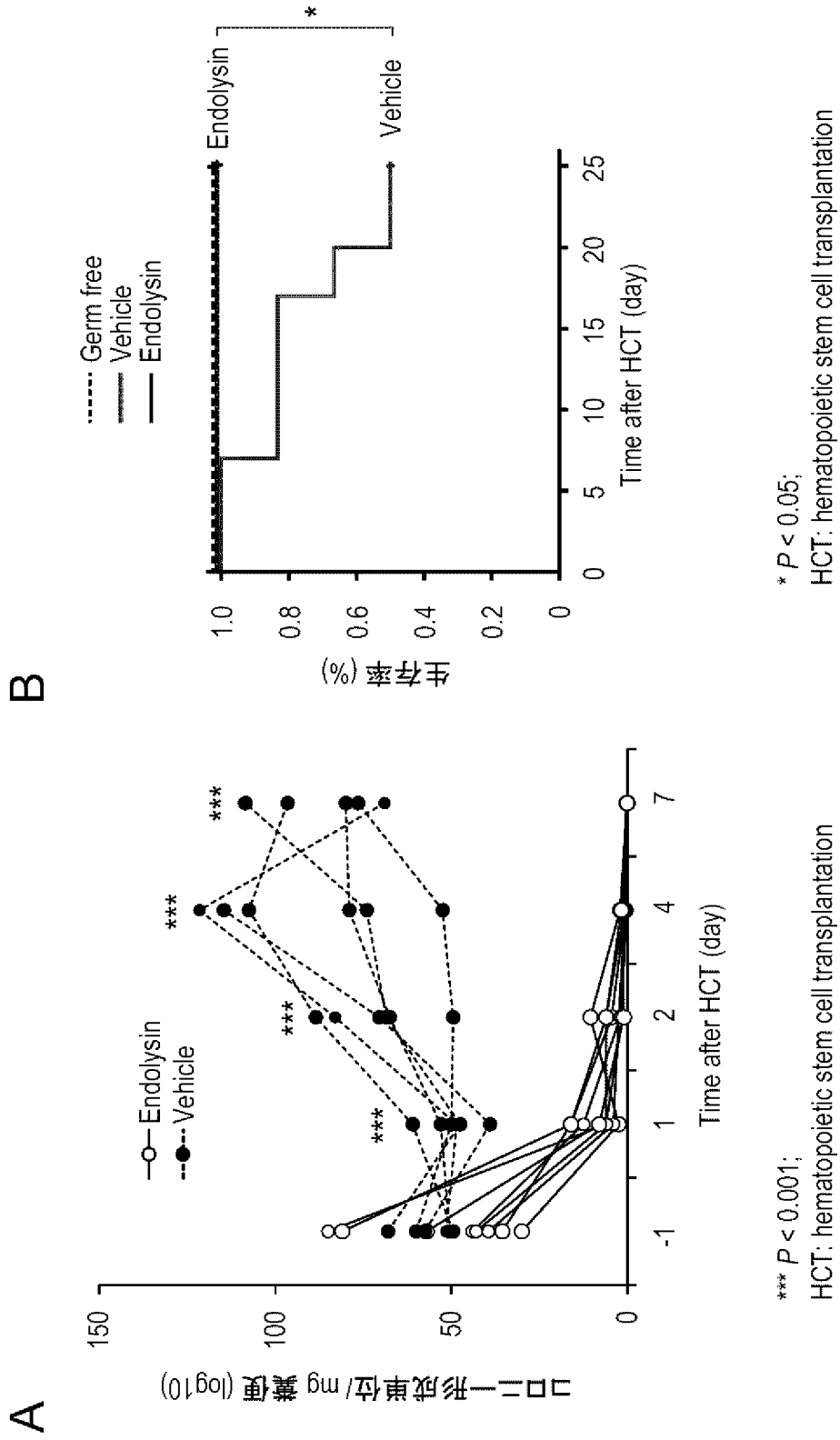
[図4]



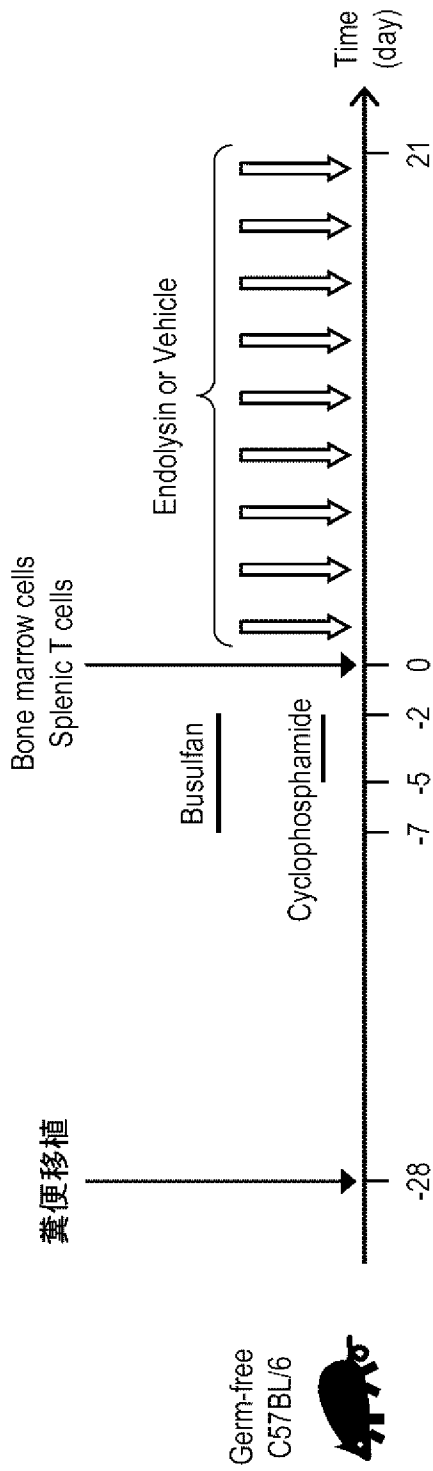
[5]



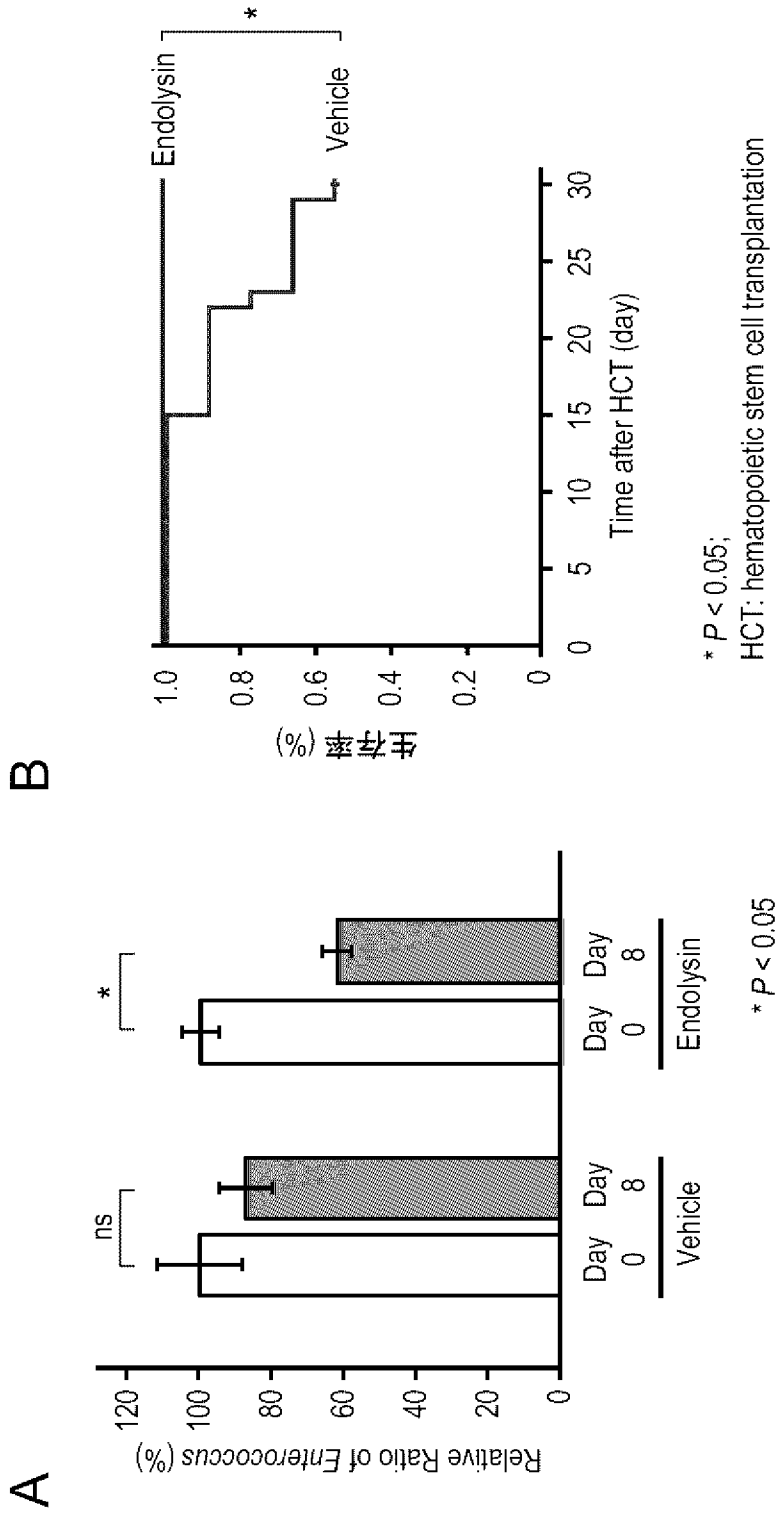
[図6]



[7]



[図8]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2023/016830

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 38/48(2006.01); A61P 31/04(2006.01); C12N 9/36(2006.01)n; C12N 15/63(2006.01)n FI: A61K38/48 ZNA; A61P31/04; C12N9/36; C12N15/63 Z		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K38/48; A61P31/04; C12N9/36; C12N15/63		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2023 Registered utility model specifications of Japan 1996-2023 Published registered utility model applications of Japan 1994-2023		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	endolysin [<i>Enterococcus faecalis</i>] [online], GenBank : RYU34564.1, 11 February 2019, [retrieved on 29 May 2023], Internet: <URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/RYU34564.1 > in particular, title, amino acid sequence section	1-10
A	US 2007/0021600 A1 (GENOME THERAPEUTICS CORP.) 25 January 2007 (2007-01-25) claims, examples, SEQ ID NO: 6015	1-10
A	JP 2004-516805 A (ELITRA PHARMACEUTICALS INC.) 10 June 2004 (2004-06-10) SEQ ID NO: 57208	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 May 2023		Date of mailing of the international search report 13 June 2023
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

“In the form of an Annex C/ST.25 text file” above should be understood as “in ST.26 format”.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2023/016830

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2007/0021600 A1	25 January 2007	(Family: none)	
JP 2004-516805 A	10 June 2004	US 2002/0061569 A1 SEQ ID: 57208 WO 2001/070955 A2 EP 1268774 A1	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K 38/48(2006.01)i; A61P 31/04(2006.01)i; C12N 9/36(2006.01)n; C12N 15/63(2006.01)n FI: A61K38/48 ZNA; A61P31/04; C12N9/36; C12N15/63 Z</p>														
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））</p> <p>A61K38/48; A61P31/04; C12N9/36; C12N15/63</p> <p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2023年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2023年</td> </tr> </table> <p>国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）</p> <p>CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年				
日本国実用新案公報	1922 - 1996年													
日本国公開実用新案公報	1971 - 2023年													
日本国実用新案登録公報	1996 - 2023年													
日本国登録実用新案公報	1994 - 2023年													
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>endolysin [Enterococcus faecalis][オンライン], GenBank : RYU34564.1, 2019.02.11, [検索日 2023.05.29], インターネット:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/RYU34564.1> 特に、タイトル及びアミノ酸配列の項</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2007/0021600 A1 (GENOME THERAPEUTICS CORP.) 25.01.2007 (2007 - 01 - 25) Claims, Examples, SeqID:6015</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2004-516805 A (エリトラ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 10.06.2004 (2004 - 06 - 10) 配列番号57208</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	endolysin [Enterococcus faecalis][オンライン], GenBank : RYU34564.1, 2019.02.11, [検索日 2023.05.29], インターネット:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/RYU34564.1> 特に、タイトル及びアミノ酸配列の項	1-10	A	US 2007/0021600 A1 (GENOME THERAPEUTICS CORP.) 25.01.2007 (2007 - 01 - 25) Claims, Examples, SeqID:6015	1-10	A	JP 2004-516805 A (エリトラ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 10.06.2004 (2004 - 06 - 10) 配列番号57208	1-10
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号												
X	endolysin [Enterococcus faecalis][オンライン], GenBank : RYU34564.1, 2019.02.11, [検索日 2023.05.29], インターネット:<URL:https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/RYU34564.1> 特に、タイトル及びアミノ酸配列の項	1-10												
A	US 2007/0021600 A1 (GENOME THERAPEUTICS CORP.) 25.01.2007 (2007 - 01 - 25) Claims, Examples, SeqID:6015	1-10												
A	JP 2004-516805 A (エリトラ ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 10.06.2004 (2004 - 06 - 10) 配列番号57208	1-10												
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>														
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</p> <p>“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）</p> <p>“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献</p> <p>“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</p> <p>“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</p> <p>“&” 同一パテントファミリー文献</p>														
<p>国際調査を完了した日</p> <p>29.05.2023</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>13.06.2023</p>													
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>菊池 美香 4U 3954</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3439</p>													

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2023/016830

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2007/0021600 A1	25.01.2007	(ファミリーなし)	
JP 2004-516805 A	10.06.2004	US 2002/0061569 A1 Seq ID : 57208 WO 2001/070955 A2 EP 1268774 A1	

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:
- 上記「附属書 C/ST.25 テキストファイル形式」は「ST.26 形式」と読み替える。