

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006 年 10 月 19 日 (19.10.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/109619 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
- (74) 代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052
東京都港区赤坂二丁目 8 番 5 号 若林ビル 3 階 Tokyo
(JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/307102
- (22) 国際出願日: 2006 年 4 月 4 日 (04.04.2006)
- (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 2005-112557 2005 年 4 月 8 日 (08.04.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社
アネロファーマ・サイエンス (ANAEROPHARMA
SCIENCE INC.) [JP/JP]; 〒1020073 東京都千代田区九
段北 3-2-2 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 浜地 芳典
(HAMAJI, Yoshinori) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本
市旭 3-1-1 Nagano (JP). 藤森 実 (FUJIMORI,
Minoru) [JP/JP]; 〒3908621 長野県松本市旭 3-1-1
Nagano (JP). 天野 純 (AMANO, Jun) [JP/JP]; 〒
3908621 長野県松本市旭 3-1-1 Nagano (JP).
谷口 俊一郎 (TANIGUCHI, Shunichirou) [JP/JP]; 〒
3908621 長野県松本市旭 3-1-1 Nagano (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可
能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD,
SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY,
KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: 5-FLUOROURACIL-RESISTANT BACTERIA AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: 5-フルオロウラシル耐性菌およびその作製方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing a cytosine deaminase (CD)-expressing, 5-fluorouracil (5-FU)-resistant bacterium which can grow in tumor tissues placed under anaerobic conditions, is capable of expressing CD, and has a resistance against 5-FU present in the concentration effective to exhibit antitumor activity or higher. More specifically, the method is a method (A) comprising performing subculture or acclimation culture of a CD-expressing bacterium which can grow in tumor tissues placed under anaerobic conditions, in the presence of 5-fluorocytosine (5-FC), or a method (B) comprising (1) performing subculture or acclimation culture of a bacterium which can grow in tumor tissues placed under anaerobic conditions but cannot express CD, in the presence of 5-FC to thereby produce a 5-FU-resistant bacterium and (2) introducing a CD gene into the 5-FU-resistant bacterium to transform the bacterium. Also disclosed are the CD-expressing, 5-FU-resistant bacterium and a pharmaceutical composition comprising the bacterium.

(57) 要約: 本発明は、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼ (CD) を発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の 5-フルオロウラシル (5-FU) 耐性を有する CD 発現・5-FU 耐性菌の作製方法を提供するものである。具体的には、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できる CD 発現菌を、5-フルオロシトシン (5-FC) の存在下で継代・馴化培養する方法 A や、(1) 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、CD を発現しない菌を 5-FU の存在下で継代・馴化培養して、5-FU 耐性菌を作製する工程と、(2) 該 5-FU 耐性菌に、CD 遺伝子を導入して形質転換する工程とを有する方法 B である。さらに本発明は、該 CD 発現・5-FU 耐性菌およびこれを含有する医薬組成物を提供するものである。

WO 2006/109619 A1

明 細 書

5-フルオロウラシル耐性菌およびその作製方法

技術分野

- [0001] 本発明は、固形腫瘍治療剤として有用な、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼ(EC3.5.4.1;以下CD)を発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-フルオロウラシル(以下5-FU)耐性能を有すCD発現・5-FU耐性菌の作製方法に関する。また、本発明は、5-FU耐性菌、該耐性菌を含有する医薬組成物、及び該耐性菌を含有する固形腫瘍治療剤に関する。

背景技術

- [0002] CDは、シトシンをウラシルに脱アミノ化する酵素である(例えば、非特許文献1参照)。CDは微生物の代謝に於いて重要な役割を果たす酵素であり、複数の異なる微生物より分離されているが、哺乳動物細胞はこのCDを通常は産生しない(例えば、非特許文献2参照)。CDを産生する多くの細菌及び真菌は、5-フルオロシトシン(以下5-FC)を細胞に対して致死的な極めて毒性の強い代謝物、5-FUに変換する。5-FUは異常RNAの生成とDNA合成を阻害するが、5-FCの抗真菌作用はこの5-FUの異常RNA生成とDNA合成阻害作用による。
- [0003] すなわち、5-FCはシトシンパーミターゼによって真菌細胞内へ取り込まれ、細胞内で5-FCはCDによって直ちに5-FUに変換される。細胞内の5-FUは5-FUMPを経て、UMP-ピロホスホリラーゼによって5-FUDPへ変換される。さらにその先のリン酸化経路は2つに分岐し、一方では5-FUTPが、他方では5-FdUMPが生成される。ここで5-FUTPは、UTPの代りにRNAに取り込まれて異常なRNAを生成することによって、正常なタンパク合成を阻害し、結果的に真菌の発育を阻止することになる。また、5-FdUMPは、チミジン酸合成酵素に対する強力な阻害剤として働き、DNA合成・核分裂を阻害して殺菌的效果を現わす。
- [0004] しかし、正常な哺乳動物細胞は有意な量のCDを発現しないため、5-FCを有毒な代謝物5-FUに脱アミノすることができず、従って5-FCは強い抗菌活性を示す濃度においても哺乳動物細胞に対しては無毒である。一方、5-FUは哺乳動物細胞

に対しても強い細胞毒性作用を有しており、抗ガン剤として広く使用されている。

[0005] CD遺伝子は、大腸菌(*Escherichia coli*)及び酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)より分離され、クローン化されている。(例えば、非特許文献3, 4参照)そして、多くの研究者がこのCD遺伝子の哺乳動物細胞への導入により、イン・ビトロにおけるこれら細胞の5-FUに対する選択的感受性が低下することを示している(例えば、非特許文献3, 5参照)。また、レトロウイルスベクターを使った、CD遺伝子を導入された腫瘍細胞は、イン・ビボにおいて5-FUによる動物の全身治療により排除できることも示されている(例えば、非特許文献6~8参照)。さらに、複製欠損アデノウイルスベクター(例えば、非特許文献9参照)及びカチオン性リポソーム(例えば、非特許文献10参照)もまた、それぞれ、ヒト大腸癌細胞及びマウスの巨大細胞肺癌へのCD遺伝子の導入に利用されている。これら腫瘍細胞内での遺伝子発現は、5-FUに対する感受性を付与する。

[0006] カンジダ(*Candida*)等の真菌の感染症に用いられる5-FUは耐性を得やすいことが知られている(例えば、非特許文献11参照)。5-FUに対する耐性は、5-FUへの変換、RNAへの取り込み等に関与するいずれかの酵素の喪失又は変異によって起こりうるために、理論的には多様な耐性化機序が考えられるが、臨床的に最も頻度が高いのは、カンジダ・アルビカンズにおけるUMP-ピロホスホリラーゼの喪失、又は活性低下に伴う耐性獲得であり、5-FU感受性とUMP-ピロホスホリラーゼ酵素活性が明らかに相関することも知られている。核相が一倍体であるカンジダ・グラブラータでは、シトシンパーミターゼやCDの欠損による耐性株も報告されている。

[0007] 他方、ビフィドバクテリウム・ロンガム(*Bifidobacterium longum*)は、グラム陽性の嫌気性細菌で、そのゲノムはGC含量が高い(例えば、非特許文献12参照)。このビフィドバクテリウム・ロンガムは非病原性であり、ヒトや他の動物の大腸における、正常なマイクロフローラの大部分を構成している(例えば、非特許文献13参照)。免疫反応を高め(例えば、非特許文献14参照)、癌の発生に対して抑制効果を有し(例えば、非特許文献15参照)、ウイルス感染から宿主を保護し(例えば、非特許文献16, 17参照)、抗菌物質を生産する可能性がある(例えば、非特許文献18参照)等、宿主の健康を促進する特性を有するとされている。ビフィドバクテリウム種には、世界中で広く発酵

乳製品の調製に使用されているものもある。

[0008] さらに、ビフィドバクテリウム・ロンガムのプラスミドは、プロバイオティクスのベクターや、感染性疾患の経口ワクチンのベクターへの応用を期待されている。例えば、ビフィドバクテリウム由来のプラスミドと大腸菌由来のプラスミドを利用してビフィドバクテリウムと大腸菌で相互複製されるシャトルベクターを製造する段階と、前記シャトルベクターに目的蛋白質をコーディングする目的遺伝子を結合させて組換えベクターを製造する段階とを有し、前記製造された組換えベクターに形質転換させるための宿主細胞として前記シャトルベクターの製造に利用されたビフィドバクテリウムを利用することを特徴とする形質転換方法が知られている(例えば、特許文献1参照)。また、最近の報告によって、全身投与後、低酸素の固形腫瘍にビフィドバクテリウム・ロンガムが蓄積し(例えば、非特許文献19, 20参照)、ビフィドバクテリウム・ロンガムhupプロモーターと融合した大腸菌codAを保有する組換えプラスミドpBLES100-S-eCDが、微生物においてCDを発現することが明らかとなった(例えば、特許文献2及び非特許文献21, 22参照)。これによって、組換えビフィドバクテリウム・ロンガムが、酵素-プロドラッグ療法に有効であることが裏付けられた。前記組換えプラスミドpBLES100-S-eCDの構築に用いられたpBLES100は、ビフィドバクテリウム・ロンガムBK51のpTB6と大腸菌のpBR322とから構築されたシャトルベクターである。かかるシャトルベクターpBLES100は、 2.2×10^4 形質転換体/ μ gDNAの有効率でビフィドバクテリウム・ロンガムを形質転換し、その細胞中で構造的及び形質分離の点で安定していた(例えば、非特許文献23参照)。ところが、トランスフェクションの際に、未修飾DNAを有するプラスミドが制限酵素によって微生物中で切断される可能性があることから、外来遺伝子のクローニングには、更に高い形質転換率が必要とされ、本発明者らは、pBLES100と比較して100倍を超える高効率で、ビフィドバクテリウム・ロンガムを形質転換するプラスミドpAV001及びpBRASTA101を提案している(例えば、非特許文献24参照)。

[0009] 上述したように、5-FUは哺乳動物細胞に対しても強い細胞毒性作用を有しており、抗ガン剤として広く使用されている。しかし、5-FUをそのまま患者に投与する際には、患者への副作用を避けるために、例えば血中濃度で $1 \mu\text{g/ml}$ 程度以下とな

るように投与するか、又は血中濃度が $1\mu\text{g/ml}$ を超えるように投与する場合であっても、血中濃度が $1\mu\text{g/ml}$ を超えている時間はせいぜい1時間程度とする必要があった。このような事情から、従来の方法では、5-FUの抗ガン作用が十分に発揮されているとは言い難かった。このような状況下において、高濃度の5-FUで腫瘍を処理しつつ、5-FUの副作用の問題を克服する手段が強く求められていた。

[0010] 特許文献1:特表2004-519236号公報

特許文献2:特開2002-97144号公報

非特許文献1:O'Donovan et al., Bact.Rev.34:278 (1970)

非特許文献2:Nishiyama et al., Cancer Res.45:1753 (1985)

非特許文献3:Austin et al., Pharmacol. 43: 380 (1992)

非特許文献4:Anderson et al., Arch. Microbiol. 152:115 (1989)

非特許文献5:Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA89:33 (1992)

非特許文献6:Huber et al., Cancer Res. 53:4619 (1993)

非特許文献7:Mullen et al., Cancer Res. 54: 1503 (1994)

非特許文献8:Huber et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:8302 (1994)

非特許文献9:Hirschowitz et al., Human Gene Ther. 6:1055 (1995)

非特許文献10:Davis et al., Proc. AACR Abstract No.2355, p345 (1996)

非特許文献11:Clin. Microbiol. Rev. 11:382-402. 1998

非特許文献12:Scardovi, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol 2, eds. Sn eath et al., pp. 1418-1434 (1986)

非特許文献13:Mitsuoka, Elsevier Applied Science, pp 69-114 (1992)

非特許文献14:Yasui et al. J. Dairy Sci., 74, 1187-1195 (1991)

非特許文献15:Reddy et al., Cancer Res., 53, 3914-3918 (1993)

非特許文献16:Duffy et al., Pediatr. Res., 35, 690-695 (1994)

非特許文献17:Saaverdra et al., Lancet., 344, 1046-1049 (1994)

非特許文献18:Ibrahim et al., J. Food Prot., 56, 713-715 (1993)

非特許文献19:Yazawa et al. Cancer Gene Ther., 7, 269-274 (2000)

非特許文献20:Yazawa et al. Breast Cancer Res. Treat., 66, 165-170 (2001)

非特許文献21:Nakamura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 66, 2362-2366 (2002)
)

非特許文献22:Fujimori et al., Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 5, 200-203 (2002)

非特許文献23:Matsumura et al., Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 1211-1212 (1997)

非特許文献24:Tanaka et al., Biosci Biotechnol Biochem.;69(2):422-425 (2005, Feb)
)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0011] CD/5-FUを用いたEnzyme/pro-drug療法は動物実験、臨床試験等に広く用いられている治療法である。かかるEnzyme/pro-drug療法におけるCD遺伝子導入細胞(菌)の5-FU耐性が向上すると、5-FUにより死滅することがないため、CD遺伝子導入細胞(菌)の生存が向上し、CD/5-FUを用いたEnzyme/pro-drug療法の治療効果が有意に向上することが期待できる。本発明の課題は、このような、Enzyme/pro-drug療法の治療剤として有用な、CDを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-FU耐性能を有するCD発現・5-FU耐性菌を作製する方法を提供することにある。また、本発明の課題は、高濃度の5-FUで腫瘍を処理しつつ、5-FUの副作用の問題を克服することを可能とする5-FU耐性菌、該耐性菌を含有する医薬組成物、及び該耐性菌を含有する固形腫瘍治療剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討し、CDを発現していない菌にCD遺伝子を導入して形質転換したCD発現菌を、5-FUの存在下で継代・馴化培養することにより、CD活性を保持したまま5-FU耐性菌を作製しうることを見い出した。すなわち、CD発現菌を、培養培地中に所定量の5-FUを加えて培養すると、CD発現菌の増殖と共に発現したCDの酵素活性により徐々に5-FUが5-FUへと変換され、所定量の5-FUを加えたにもかかわらず、初めは低濃度5-FUで作用することで、CD発現菌の死滅を防ぎ、徐々に濃度が上がることで、耐性能を獲得したCD発

現・5-FU耐性菌のみを選択的に培養することができることを見い出した。また、本発明者らは、CDを発現していない細菌を5-FUの存在下で継代・馴化培養することにより5-FU耐性菌を作製した後、この5-FU耐性菌に、CD遺伝子を導入して形質転換することによっても、CD発現・5-FU耐性菌を作製できることを見出した。さらに、本発明者らは、このような方法で得られる5-FU耐性菌を用いることによって、高濃度の5-FUで腫瘍を処理しつつ、5-FUの副作用の問題を克服することを可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

- [0013] すなわち本発明は、[1]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-フルオロウラシル耐性能を有するシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌の作製方法であって、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるシトシン・デアミナーゼ発現菌を、5-フルオロシトシンの存在下で継代・馴化培養することを特徴とする耐性菌の作製方法や、[2]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるシトシン・デアミナーゼ発現菌が、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現しない菌に、シトシン・デアミナーゼ遺伝子を導入して形質転換したシトシン・デアミナーゼ発現菌であることを特徴とする[1]に記載の耐性菌の作製方法や、[3]2～5000 $\mu\text{g/ml}$ の5-フルオロシトシンを添加した培地で継代・馴化培養することを特徴とする[1]又は[2]に記載の耐性菌の作製方法や、[4]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるシトシン・デアミナーゼ発現菌が、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現するバクテリアであることを特徴とする[1]～[3]のいずれかに記載の耐性菌の作製方法や、[5]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現するバクテリアが、シトシン・デアミナーゼを発現する腸内細菌であることを特徴とする[4]に記載の耐性菌の作製方法や、[6]シトシン・デアミナーゼを発現する腸内細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム属細菌であることを特徴とする、[5]に記載の耐性菌の作製方法や、[7]シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、又はビフィドバクテリウム・インファンティスであることを

特徴とする[6]に記載の耐性菌の作製方法や、[8]シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム・ロンガムであることを特徴とする[7]に記載の耐性菌の作製方法や、[9]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-フルオロウラシル耐性能を有することを特徴とするシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌の作製方法であって、(1)嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現しない菌を5-フルオロウラシルの存在下で継代・馴化培養して、5-フルオロウラシル耐性菌を作製する工程と、(2)該5-フルオロウラシル耐性菌に、シトシン・デアミナーゼ遺伝子を導入して形質転換する工程を有することを特徴とする耐性菌の作製方法や、[10]1~100 $\mu\text{g/ml}$ の5-フルオロウラシルを添加した培地で継代・馴化培養することを特徴とする[9]に記載の耐性菌の作製方法や、[11]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現していない菌が、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現していないバクテリアであることを特徴とする[9]又は[10]に記載の耐性菌の作製方法や、[12]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現していないバクテリアが、シトシン・デアミナーゼを発現していない腸内細菌であることを特徴とする[11]に記載の耐性菌の作製方法や、[13]シトシン・デアミナーゼを発現していない腸内細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム属細菌であることを特徴とする[12]に記載の耐性菌の作製方法や、[14]シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、又はビフィドバクテリウム・インファンティスであることを特徴とする[13]に記載の耐性菌の作製方法や、[15]シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム・ロンガムであることを特徴とする[14]に記載の耐性菌の作製方法や、[16]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-フルオロウラシル耐性能を有するシトシ

ン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌であって、[1]～[15]のいずれかに記載の作製方法で作製されることを特徴とするシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[17]嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも $2\mu\text{g/ml}$ の5-フルオロシトシン又は $1\mu\text{g/ml}$ の5-フルオロウラシルを添加した培地で生育できることを特徴とするシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[18]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性バクテリアであることを特徴とする[16]又は[17]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[19]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性バクテリアが、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性腸内細菌であることを特徴とする[18]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[20]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性腸内細菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム属細菌であることを特徴とする[19]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[21]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、又はビフィドバクテリウム・インファンティスであることを特徴とする[20]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[22]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムである[20]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[23]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムが、プラスミドpBLES100-S-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株であることを特徴とする[22]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[24]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミ

ナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株であることを特徴とする[23]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[25]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株であることを特徴とする[21]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[26]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベaS-1株であることを特徴とする[21]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[27]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベI-53-8W株であることを特徴とする[21]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[28]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・インファンティスが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株であることを特徴とする[21]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[29]シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・インファンティスI-10-5株であることを特徴とする[21]に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌や、[30][16]～[29]のいずれかに記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌を含有することを特徴とする医薬組成物や、[31]5-フルオロシトシンと組み合わせてなることを特徴とする[30]に記載の医薬組成物や、[32]さらに、ラクツロースと組み合わせてなることを特徴とする[30]又は[31]に記載の医薬組成物や、[33]5-フ

ルオロシチンから有効治療量の5-フルオロウラシルに変換できる量のシトシン・デアミナーゼを発現するのに十分な量のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌と、有効治療量の5-フルオロウラシルに変換できる量の5-フルオロシチンとを組み合わせる固形腫瘍治療剤であって、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌が[16]～[29]のいずれかに記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌であることを特徴とする固形腫瘍治療剤や、[34]さらに、ラクツロースを組み合わせることを特徴とする[33]に記載の固形腫瘍治療剤に関する。

図面の簡単な説明

- [0014] [図1]ビフィドバクテリウム属と大腸菌のシャトルベクターpAV001の作製過程と、CDを発現するシャトルベクターpAV001-HU-eCDとの作製過程を示す図である。
- [図2]野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムとビフィドバクテリウム/pAV001-HU-eCDにおける、CDタンパクの発現量の比較結果を示す図である。
- [図3]野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムとビフィドバクテリウム/pAV001-HU-eCDにおける、CDタンパク酵素活性の比較(5-FC→5-FUの変換活性比較)の結果により得られた、経時菌数変化を示す図である。
- [図4]野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムとビフィドバクテリウム/pAV001-HU-eCDにおける、CDタンパク酵素活性の比較(5-FC→5-FUの変換活性比較)の結果により得られた、5-FU濃度を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

- [0015] 本発明における5-FU耐性菌の作製方法としては、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるCD発現菌を、5-FCの存在下で継代・馴化培養する方法A、又は、(1)嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、CDを発現しない菌を5-FUの存在下で継代・馴化培養して、5-FU耐性菌を作製する工程と、(2)該5-FU耐性菌に、CD遺伝子を導入して形質転換する工程とを有する方法Bであれば特に制限されない。
- [0016] 上記方法Aにおける嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるCD発現菌としては、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、CDを発現している菌であ

る限り特に制限はされず、自然界から単離した菌であってもよいし、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、CDを発現していない菌にCD遺伝子を導入して形質転換した組み換え菌であってもよい。

- [0017] また、上記方法Bで用いられる、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、CDを発現していない菌としては、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、CDを発現していない菌であれば特に制限されない。
- [0018] 本発明の作製方法で用いられる、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できる菌としては、バクテリア(細菌)や真菌を例示することができ、該バクテリアとして、ビフィドバクテリウム属細菌、クロストリディウム属細菌、ラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス属細菌、ペプトコッカス属細菌、エンテロコッカス属細菌、バクテロイデス属細菌、ユーバクテリウム属細菌等の腸内細菌を具体的に例示することができるが、中でも、ビフィドバクテリウム属細菌が好ましい。
- [0019] 上記ビフィドバクテリウム属細菌として、具体的にはビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ(*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス(*B. adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス(*B. lactentis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム(*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム(*B. pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム(*B. thermophilum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス(*B. infantis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス(*B. animalis*)などを挙げることができる。中でも、年齢に関係なくヒトの腸内に常在していることが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティスを宿主菌として用いることが好ましく、ビフィドバクテリウム・ロンガムを用いることがより好ましい。これらの菌は、いずれも市販されているか、または寄託機関から容易に入手することができ、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガムATCC-15707、ビフィドバクテリウム・ビフィダムATCC-11863、ビフィドバクテリウム・インファンティスATCC-15697を用いることができる。
- [0020] ビフィドバクテリウム・ロンガムの株については特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株、ビフィドバクテリウム・ロンガムaE-194b株、ビフィ

ドバクテリウム・ロンガムbs-601株、ビフィドバクテリウム・ロンガムM101-2株を例示することができ、中でもビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株を好ましく例示することができる。

[0021] また、ビフィドバクテリウム・ブレーベの株についても特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株(JCM1192)、ビフィドバクテリウム・ブレーベaS-1株、ビフィドバクテリウム・ブレーベI-53-8W株を例示することができる。

[0022] また、ビフィドバクテリウム・インファンティスの株についても特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・インファンティス標準株(JCM1222)、ビフィドバクテリウム・インファンティスI-10-5株を例示することができる。

[0023] また、ビフィドバクテリウム・ラクテンティスの株についても特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・ラクテンティス標準株(JCM1220)を例示することができる。

[0024] 方法Aにおける5-FCの存在下での継代・馴化培養は、細菌、真菌のそれぞれ生育や増殖に適した培養培地(培養液あるいは寒天プレート)上に、例えば、2~5000 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは2~2000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内の5-FCを加え、37°Cで嫌気培養することにより行うことができる。

[0025] 5-FCを加えた培養培地で培養することにより、菌の増殖と共に発現したCDの酵素で5-FCが徐々に5-FUへと変換され、始めは低濃度で作用することで、培養菌の死滅を防ぎ、徐々に濃度が上がることで、耐性能を獲得した培養菌のみを選択的に培養することができる。このようにして、本発明の5-FU耐性菌を再現性よく採取することができる。

[0026] 上記方法Bにおける5-FUの存在下での継代・馴化培養としては、細菌、真菌のそれぞれ生育や増殖に適した培養培地(培養液あるいは寒天プレート)上に、例えば、1~100 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは2~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内の5-FUを加えた37°Cで嫌気培養することができる。このようにして、5-FU耐性菌を再現性よく採取することができる。

[0027] CD遺伝子を導入して形質転換したCD発現菌や、嫌気的環境下での生育能を付与する遺伝子を導入して形質転換した菌を調製するために用いられるCD発現ベクターや形質転換菌の作製は、市販の実験書、例えば、遺伝子マニュアル(講談社)、

高木康敬編遺伝子操作実験法(講談社)、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1982)、モレキュラー・クローニング第2版(Molecular Cloning, 2nd ed.)コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)(1989)、メソッズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymol.), 194(1991)、実験医学別冊・酵母による遺伝子実験法(羊土社、1994)等に記載された方法に従って行うことができる。また、発現ベクターは、宿主菌に適したものをを用いることが好ましい。

- [0028] CDをコードするDNAは、例えば、大腸菌由来のCDをコードするDNAを含有するプラスミドpAdexlCSCD(理化学研究所 ジーンバンク RDB No. 1591)、または同じく大腸菌由来のCDをコードするDNAを含有するプラスミドpMK116から単離されるものを用いることができる(D. A. Mead et al., Protein Engineering 1:67-74(1986))。
- [0029] 特に、ビフィドバクテリウム属細菌用のCD発現ベクターとしては、ビフィドバクテリウム・ロンガムhupプロモーターの下流に挿入した大腸菌codAを保有する組換えプラスミドpBLES100-S-eCD(特許文献1及び非特許文献21参照)や、このpBLES100-S-eCDを改良した、ビフィドバクテリウム・ロンガムやビフィドバクテリウム・ブレーベを形質転換しうるpAV001-HU-eCD、又はこれらのプラスミドの変異体を特に好適に例示することができる。
- [0030] プラスミドpBLES100-S-eCDの変異体とは、pBLES100-S-eCDに由来するプラスミド核酸配列の変異体であって、本発明においてpBLES100-S-eCDと同様に用いることのできるプラスミドを意味する。また、プラスミドpAV001-HU-eCDの変異体とは、同様に、pAV001-HU-eCDに由来するプラスミド核酸配列の変異体であって、本発明においてpAV001-HU-eCDと同様に用いることのできるプラスミドを意味する。
- [0031] 本発明におけるCD発現・5-FU耐性菌は、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、CDを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-FU耐性能を有している限り特に制限はされない。5-FUの抗腫瘍活性の有効濃度は、対象となる腫瘍や患者等によって左右されるため一概にはいえないが、例えば少なくとも0.05~0.1 $\mu\text{g/ml}$ という濃度を例示することができる。

- [0032] なお、市販されている5-FU製剤(注射投与)の説明書には、5-FU製剤を進行胃がん患者に5-FUの血中濃度が約0.6 $\mu\text{g/ml}$ となるように持続静注したことが記載されている。
- [0033] 本発明におけるCD発現・5-FU耐性菌のより具体的な5-FU耐性能としては、少なくとも1~2000 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは2~2000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内の5-FUを含む培養培地(培養液あるいは寒天プレート)で、37°Cで嫌気培養した場合に生育できることをいう。
- [0034] また、本発明におけるCD発現・5-FU耐性菌の5-FU耐性能を、5-FCの濃度で具体的に表すと、2~5000 $\mu\text{g/ml}$ 、好ましくは3~5000 $\mu\text{g/ml}$ の範囲内の5-FCを含む培養培地(培養液あるいは寒天プレート)で、37°Cで嫌気培養した場合に生育できることをいう。
- [0035] 本発明におけるCD発現・5-FU耐性菌の5-FU耐性能は、前述の5-FUの数値範囲の範囲内のいずれかの数値の5-FUを含む培養培地(培養液あるいは寒天プレート)で、37°Cで嫌気培養した場合に生育できるか、又は、前述の5-FCの数値範囲の範囲内のいずれかの数値の5-FCを含む培養培地(培養液あるいは寒天プレート)で、37°Cで嫌気培養した場合に生育できればよいが、本発明のCD発現・5-FU耐性菌の耐性能としては、少なくとも1 $\mu\text{g/ml}$ 以上の5-フルオロウラシルを添加した培地で生育できる耐性能、あるいは、少なくとも2 $\mu\text{g/ml}$ 以上の5-フルオロシトシンを添加した培地で生育できる耐性能であることが望ましい。
- [0036] 本発明におけるCD発現・5-FU耐性菌の製造方法は特に制限されず、自然界から単離してもよいし、前述の本発明の耐性菌の作製方法等を用いてもよい。すなわち、本発明におけるCD発現・5-FU耐性菌は、自然界から単離した菌であってもよいし、前述の本発明の耐性菌の作製方法等を用いた組み換え菌であってもよい。
- [0037] 本発明におけるCD発現・5-FU耐性菌としては、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、CDを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-FU耐性能を有しているというこれらの性質を有しているバクテリア又は真菌である限り特に制限はされないが、該性質を有しているバクテリアであることが好ましく、該性質を有している腸内細菌であることがより好ましい。腸内細菌としては、ビフィドバク

テリウム属細菌、クロストリディウム属細菌、ラクトバチルス属細菌、ストレプトコッカス属細菌、ペプトコッカス属細菌、エンテロコッカス属細菌、バクテロイデス属細菌、ユーバクテリウム属細菌等を好ましく例示することができ、中でもビフィドバクテリウム属細菌をより好ましく例示することができる。

[0038] 上記ビフィドバクテリウム属細菌として、具体的にはビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス (*B. adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・ラクテンティス (*B. lactentis*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*B. bifidum*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*B. pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*B. thermophilum*)、ビフィドバクテリウム・インファンティス (*B. infantis*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*B. animalis*)などを挙げることができる。中でも、年齢に関係なくヒトの腸内に常在していることが知られているビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・アドレッセンティス、ビフィドバクテリウム・ビフィダム、ビフィドバクテリウム・インファンティスを宿主菌として用いることが好ましく、ビフィドバクテリウム・ロンガムを用いることがより好ましい。これらの菌は、いずれも市販されているか、または寄託機関から容易に入手することができ、例えば、ビフィドバクテリウム・ロンガム ATCC-15707、ビフィドバクテリウム・ビフィダム ATCC-11863、ビフィドバクテリウム・インファンティス ATCC-15697を用いることができる。

[0039] ビフィドバクテリウム・ロンガムの株については特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株、ビフィドバクテリウム・ロンガム aE-194b 株、ビフィドバクテリウム・ロンガム bs-601 株、ビフィドバクテリウム・ロンガム M101-2 株を例示することができ、中でもビフィドバクテリウム・ロンガム 105-A 株を好ましく例示することができる。

[0040] また、ビフィドバクテリウム・ブレーベの株についても特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株 (JCM1192)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ aS-1 株、ビフィドバクテリウム・ブレーベ I-53-8W 株を例示することができる。

[0041] また、ビフィドバクテリウム・インファンティスの株についても特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・インファンティス標準株 (JCM1222)、ビフィドバクテリウム・イ

ンファンティスI-10-5株を例示することができる。

- [0042] また、ビフィドバクテリウム・ラクテンティスの株についても特に制限されないが、例えばビフィドバクテリウム・ラクテンティス標準株(JCM1220)を例示することができる。
- [0043] 該性質を有しているビフィドバクテリウム属細菌としてより具体的には、プラスミドpBLES100-S-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、CD発現・5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株(プラスミドpBLES100-S-eCD又はそのプラスミド変異体で形質転換されたビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株)、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、CD発現・5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、CD発現・5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、CD発現・5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベaS-1株、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、CD発現・5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベI-53-8W株、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、CD発現・5-FU耐性ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、CD発現・5-FU耐性ビフィドバクテリウム・インファンティスI-10-5株等を好ましく例示することができる。
- [0044] 本発明の医薬組成物は、本発明のCD発現・5-FU耐性菌を含有している限り特に制限はされない。また、本発明の医薬組成物は、本発明のCD発現・5-FU耐性菌の1種又は2種以上を含有していてもよい。
- [0045] また、本発明の医薬組成物のCD発現・5-FU耐性菌の投与量は、5-FCから有効治療量の5-FUに変換できる量のCDを発現するのに十分な量である限り特に制限はされないが、できる限り少ない方が好ましい。
- [0046] 本発明の医薬組成物は、本発明の効果を妨げない限り、本発明のCD発現・5-FU耐性菌のほかに任意の成分を含有していてもよい。そのような任意成分として、例えば、薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等が挙げられる。また、本発明の医薬組成物は、本発明のCD発現・5-FU耐性菌によって有効量の5-FUに変換

できる量の5-FUと組み合わせて使用され、該5-FUは本発明の医薬組成物に含有させてもよいが、5-FUを含有する医薬組成物と組み合わせて用いることが好ましい。さらに本発明の医薬組成物は、本発明のCD発現・5-FU耐性菌の増殖を促進することができる糖類と組み合わせてもよく、このような糖類として例えばラクツロースを例示することができる。

[0047] 本発明における「XとYと組み合わせてなる」には、XとYを別の形態としたもの、XとYを同一の形態(例えばXとYを含有する形態)としたもののいずれの場合も含む。また、XとYを別の形態としたものの場合、X、Yのいずれも他の成分をさらに含有している場合も含まれる。

[0048] 本発明の医薬組成物を患者に投与すると、本発明のCD発現・5-FU耐性菌は腫瘍内で増殖する。該耐性菌が腫瘍内に存在している間に、患者に5-FUを投与すると、腫瘍内におけるCDの働きで5-FUが5-FUに変換されて、腫瘍細胞を死滅させることができる。本発明のCD発現・5-FU耐性菌は、腫瘍細胞を死滅させることができる5-FU濃度においても生存し、CDによる酵素作用を持続することができるので、本発明のCD発現・5-FU耐性菌を有効成分とする優れた抗腫瘍剤を得ることができる。また、本発明のCD発現・5-FU耐性菌が増殖できる、嫌気的環境下にある腫瘍以外の部分では、該CD発現・5-FU耐性菌が生育できないため、5-FUは5-FUに変換されず、5-FUをそのまま投与した場合に比べて、5-FUによる全身性の副作用を格段に低く抑制することができる。さらに、本発明の固形腫瘍治療剤の抗腫瘍効果が腫瘍への高い特異性を有していることから、5-FUをそのまま投与する場合に比べて、格段に高い5-FU濃度を腫瘍内において実現することが可能となり、その結果、極めて優れた抗腫瘍効果が得られる。

[0049] 本発明の医薬組成物の剤型としては、例えば、本発明のCD発現・5-FU耐性菌を含有する液剤あるいは固形製剤を挙げることができる。液剤は、本発明のCD発現・5-FU耐性菌の培養液を精製し、これに必要に応じて適当な生理食塩液若しくは補液または医薬添加物を加えてアンプルまたはバイアル瓶などに充填することにより製造することができる。また、固形製剤は、液剤に適当な保護剤を添加してアンプルまたはバイアル瓶などに充填した後凍結乾燥またはL乾燥するか、液剤に適当な保

護剤を添加して凍結乾燥またはL乾燥した後これをアンプルまたはバイアル瓶などに充填することにより製造することができる。本発明の医薬組成物の投与方法としては、非経口投与が好ましく、例えば皮下注射、静脈注射、局所注入、脳室内投与等を行うことができるが、静脈注射が最も好ましい。

[0050] なお、本発明の医薬組成物は、5-FU組み合わせて用いられる。本発明の医薬組成物の投与方法と、5-FUの投与方法は同じであっても異なってもよく、また、投与も同時であってもよく隔時であってもよいが、5-FUの投与は、本発明の医薬組成物の投与後、本発明のCD発現・5-FU耐性菌が腫瘍細胞で十分生育できる時間をおいた後に投与する方が好ましい。

[0051] 本発明の医薬組成物と組み合わせて用いられる5-FUの投与量は、本発明のCD発現・5-FU耐性菌によって、5-FUから有効治療量の5-FUに変換できるのに十分な量である限り特に制限はされないが、できる限り少ない方が好ましく、例えば、5～200mg/kgの範囲内から適宜選択することができる。

[0052] また、本発明の医薬組成物は、本発明のCD発現・5-FU耐性菌の増殖を促進する糖類を組み合わせて用いることができ、このような糖類として、例えばラクツロースを挙げることができる。このような糖類は、本発明の医薬組成物に、含有させて投与してもよく、別の医薬組成物として、同時にあるいは隔時に投与してもよい。

[0053] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

参考例1

[0054] [CD発現ビフィドバクテリウム・ロンガムの作製]

特願2004-339677に記載されている方法により、CD発現ビフィドバクテリウム・ロンガムを作製した。

1. シヤトルベクターpAV001の構築

(プラスミドの構築)

ビフィドバクテリウム・ロンガムと大腸菌のシヤトルベクターpBLES100(特許文献2及び非特許文献23参照)よりエンテロコッカス・フェカリス(*Enterococcus faecalis*)由来のスペクチノマイシンアデニルトランスフェラーゼ(AADカセット)を含む配列をPC

Rにより増幅し、pCR-BluntII-TOPOベクター (Invitrogen) にサブクローニングし、pCRTOPO-ScaI-AAD-Eam1105Iを作製した。なお、フォワードプライマーにScaI、リバープライマーにEam1105I制限酵素サイトをそれぞれ付加した。

- [0055] 図1に示すように、Invitrogen社より購入したクローニングベクターpGFPuv (DEFINITION: Cloning vector pGFPuv. ACCESSION: U62636 VERSION: U62636.1 GI: 1490528) はGFPuv遺伝子とその両端のマルチクローニングサイト (Multi-Cloning Site、MCS)、アンピシリン耐性遺伝子、大腸菌プラスミド複製起点より構成されている。
- [0056] このpGFPuvのアンピシリン耐性遺伝子部位を制限酵素Eam1105IとScaIを用いて切断し、取り除いた長断片を作製した。同様に制限酵素Eam1105IとScaIを用いて、pCRTOPO-ScaI-AAD-Eam1105Iを切断したAADカセット含む断片 (約1100bp) を作製した。上記2つの断片をT4DNA リガーゼを用いて結合したpGFPuv-SpRを作製した。なお、作製したプラスミドpGFPuv-SpRのスペクチノマイシン耐性形質付与を、また同時にアンピシリン耐性形質の欠失をそれぞれ大腸菌にて確認した。
- [0057] pGFPuv-SpRを制限酵素SalI (GFPuv遺伝子上流のマルチクローニングサイト内に存在) とSpeI (GFPuv遺伝子下流のマルチクローニングサイト内に存在) で消化し、GFPuv遺伝子を削除したプラスミドpAVNを作製した。
- [0058] ビフィドバクテリウム・ロンガム由来プラスミドpTB6の全塩基配列情報より、RepB, SDO, DDO, AT-rich repeats, DnaA-binding motifsを含む約1900bpの配列をビフィドバクテリウム・ロンガムのプラスミド複製ユニットとして同定した。pTB6よりビフィドバクテリウム・ロンガムのプラスミド複製ユニットを含む約1900bpをPCRにより増幅し、pCR-BluntII-TOPOベクターへサブクローニングしたpCRTOPO-ApaI-1900-ScaIを作製した。なお、フォワードプライマーにApaI、リバープライマーにScaI制限酵素サイトをそれぞれ付加した。
- [0059] pAVNを制限酵素ApaIとScaIで消化した長断片 (約2400bp) と同様にpCRTOPO-ApaI-1900-ScaIを制限酵素ApaIとScaIで消化した短断片 (約1900bp) を、T4DNAリガーゼを用いて結合した、ビフィドバクテリウム・ロンガム-大腸菌シャトルベクターpAV001 (約4300bp) を作製した。

[0060] 2. CD遺伝子発現ベクターpAV001-HU-eCD

(発現ベクターの構築)

次に、pBLES100-S-eCDを制限酵素HindIIIとSpeIで切断し、HU遺伝子プロモーター、大腸菌由来のCD遺伝子とHU遺伝子ターミネーター含む約2900bpを抜き出した。同様にシャトルベクターpAV001をマルチクローニングサイト内にある制限酵素切断部位でHindIIIとSpeIで切断した長断片に、上記の約2900bp断片をT4DNAリガーゼを用いて結合したpAV001-HU-eCD(約7100bp)を作製した。

[0061] 3. CD遺伝子発現ベクターpAV001-HU-eCDのビフィドバクテリウム属への導入

野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムをMRS培地37℃嫌気条件下で培養した培養液から遠心分離により菌体を分離し、適当な緩衝液に懸濁した菌懸濁液を調製した。次に、非特許文献23に記されているエレクトロポレーション法を用いて、シトシン・デアミナーゼ遺伝子発現ベクターpAV001-HU-eCDを上記の菌懸濁液に導入した。導入された組換えビフィドバクテリウム・ロンガム(ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCD)は抗生剤スペクチノマイシン含有寒天培地上でのコロニー形成を元に選別した。

[0062] (組換えビフィドバクテリウム・ロンガムにおけるシトシン・デアミナーゼの発現)

ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDまたは野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムをそれぞれ抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地37℃嫌気条件下で2日以上継代培養した培養液から遠心分離により菌体(1×10^9 CFU)を分離し、超音波破碎後、それぞれ菌体内タンパクを抽出した。上記抽出したタンパクをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ウェスタン分析法にてシトシン・デアミナーゼタンパクの発現を確認した。なお、一次抗体としてウサギ抗シトシン・デアミナーゼモノクローナル抗体(Sawaday Technology)、二次抗体として西洋ワサビペルオキシダーゼ-抗ウサギイムノグロブリンG複合体(Santa Cruz Biotechnology, Inc)をそれぞれ用いた。シグナルの感光法としてECL法により発光させたシグナルを、冷却CCDカメラFluo-S-MAX(BIO-RAD)を用いて検出した。その結果、野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムにおいてはシグナルが検出されずシトシン・デアミナーゼが発現し

ていなかったが、ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDにおいてはシグナルが検出され、シトシン・デアミナーゼタンパクが発現していることを確認した(図2参照)。

- [0063] (ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDにおけるシトシン・デアミナーゼ酵素活性; 5-FU $\rightarrow$ 5-FUの変換活性の測定)

ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDまたは野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムをそれぞれ抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地37℃嫌気条件下で2日以上継代培養した培養液から遠心分離により菌体(2×10^9 CFU)を分離し、4.5 mLのMRS培地に再度懸濁した。次に最終濃度2 mg/mLとなるよう0.5 mLの5-FU (20 mg/mL)を添加し37℃嫌気条件下で培養した。0、4、8、18、24時間ごとの培養液から、遠心分離により菌体を取り除いた上清をそれぞれ回収し、ガスクロ分析(5-FU GC-MS methods, BML)により変換された5-FU濃度を測定した。経時菌数変化を図3に、5-FU濃度を図4にそれぞれ示す。分析の結果、野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムにおいては極少量の5-FUしか検出されなかったが、ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDにおいては4時間後において39.2 μ g/mL、24時間後においては102.1 μ g/mLの5-FUが検出された。

実施例 1

- [0064] [ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDの5-FU耐性菌]

参考例1で得られたビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDを、5-FUを50 μ g/mL含む5 mLの抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地に植菌し、37℃嫌気培養で72時間培養した。次に、培養後の培地を1 mL取り出し、同じく5-FUを50 μ g/mL含む9 mLの抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地に植菌し、同様の培養条件で24時間培養した。この植菌作業を3回繰り返すことにより、5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDを作製した。次に、5-FUを20 μ g/mL含む抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地に植菌し、同様の培養条件で24時間培養し、作製した5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDの5-FU耐性生育を確認した。その後、菌はグリセロールと

懸濁してグリセロールストックとして -80°C で保存した。この保存した菌体サンプルと野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムとを、5-FUを $250\text{ }\mu\text{g/mL}$ 含む抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地に植菌し生育を比較したところ、野生型は生育しなかったが、保存したサンプルは翌日に菌が増殖し、5-FUに対する耐性を保持していた。培養後の菌液を平板測定法により生育菌数を測定したところ、野生型は検出限界以下(10^3CFU/mL 以下)であったが、保存したサンプルの菌液は $2\sim 3\times 10^9\text{CFU/mL}$ 菌が生育していた。

[0065] [5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムの5-FU耐性濃度測定]

実施例1で得られた5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDまたは野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムをそれぞれMRS培地 37°C 嫌気条件下で2日以上継代培養した。これらの培養液を嫌気性希釈液で希釈した後、それぞれ5-FUが0, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 $\mu\text{g/mL}$ 含まれるBL寒天培地上に塗布し、 37°C で2~3日間嫌気培養した後の生育菌数を測定した。5-FUが含まれていないBL寒天培地を用いたものは5連で、それ以外の5-FU含有BL寒天培地を用いたものは3連で試験を行った。その結果を表1(5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCD)及び表2(野生型ビフィドバクテリウム・ロンガム)に示す。表1の結果から分かるように、5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDの5-FU耐性濃度は2000 $\mu\text{g/mL}$ 以上であった。一方で野生型ビフィドバクテリウム・ロンガムは少なくとも5-FU含量25 $\mu\text{g/mL}$ 以上では生育しなかった(表2)。

[0066] [表1]

5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCD

5-FU含量 ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	3	4	5	average	sd	CV (%)	生育率 (%)
0	144	126	175	138	165	149.6	20.0	13.4	
25	116	148	124			129.3	16.7	12.9	86%
50	129	129	128			128.7	0.6	0.4	86%
100	118	139	107			121.3	16.3	13.4	81%
250	100	107	114			107.0	7.0	6.5	72%
500	175	116	153			148.0	29.8	20.1	99%
1000	168	123	147			146.0	22.5	15.4	98%
2000	127	128	124			126.3	2.1	1.6	84%

sd : 標準偏差

CV : 変動係数

[0067] [表2]

野生型ビフィドバクテリウム・ロンガム

5-FU含量 ($\mu\text{g/mL}$)	1	2	3	4	5	average	sd	CV (%)	生育率 (%)
0	108	117	104	126	137	118.4	13.43	11.34	
25	0	0	0			0.0	0.0	-	0%
50	0	0	0			0.0	0.0	-	0%
100	0	0	0			0.0	0.0	-	0%
250	0	0	0			0.0	0.0	-	0%
500	0	0	0			0.0	0.0	-	0%
1000	0	0	0			0.0	0.0	-	0%
2000	0	0	0			0.0	0.0	-	0%

sd : 標準偏差

CV : 変動係数

[0068] [5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムの5-FU耐性形質の維持]

実施例1で得られた5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCDを、抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地を用いて37℃嫌気条件下で2日以上継代培養した。該培養液5 μL を抗生剤スペクチノマイシン含まない5mLのMRS培地に植菌して37℃嫌気条件下で24時間培養を行い、培養後の菌液を同様にして継代培養し、連続的に30日間継代培養を行った。連続継代培養30日後の菌液を嫌気性希釈液で希釈した後、5-FUが250 $\mu\text{g/mL}$ 含まれるBL寒天培地と5-FUを含まないBL寒天培地上にそれぞれ塗布し、37℃で2～3嫌気日間培養後の生

育菌数を測定した。実験は5連で行った。その結果を表3に示す。表3の結果から分かるように、5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムの5-FU耐性形質は、少なくとも連続継代培養30日間行った後も維持されていた。

[0069] [表3]

5-FU含 量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	1	2	3	4	5	average	sd	CV (%)	生育率 (%)
0	146	197	134	153	149	155.8	24.10	15.47	
250	166	152	124	137	194	154.6	27.09	17.52	99%

d : 標準偏差

CV : 変動係数

[0070] [5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムと5-FU非耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムの5-FC添加液体培地での培養]

参考例1のビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCD(5-FU非耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム)と実施例1で得られたビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCD(5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム)をそれぞれ抗生剤スペクチノマイシン含有MRS培地37℃嫌気条件下で2日以上継代培養した。その後、それぞれの培養液50 μL を5, 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の5-FCを含むMRS培地に植菌し37℃嫌気条件下で24時間培養し、培養後の菌液の濁度(OD=600nm)を測定し、各菌の増殖の有無を調べた(表4)。5-FU非耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムは5-FC濃度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度の培地では著しく生育が阻害されたが、5-FU耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムは全ての濃度で生育した。

[0071] [表4]

濁度測定 (OD = 600 nm)		5-FU 含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
		5	25	50	100	250	500
参考例 1	5-FU 非耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム	6.43	4.29	1.92	0.68	0.19	0.09
実施例 1	5-FU 耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム	5.73	5.38	4.11	5.41	5.15	4.29

実施例 2

[0072] [5-FU 添加培地を用いて作製したビフィドバクテリウム・ロンガム/pAV001-HU-eCD の 5-FU 耐性菌]

ビフィドバクテリウム・ロンガムを、5-FU を 1, 5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む 5mL の MRS 培地に植菌し、37°C 嫌気培養で 1~5 日間培養し、それぞれの濁度 (OD=600nm) を測定し、生育の有無を調べた (表 5)。その結果、5-FU を 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む培地では 5 日後も全く生育せず、耐性株が作製できなかった。次に、増殖が確認された培養後の培地を 1mL 取り出し、同じ濃度の 5-FU を含む 9mL の MRS 培地にそれぞれ植菌し、同様の培養条件で 24 時間培養した。この植菌作業を 3 回繰り返し行うことにより、5-FU 耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムをそれぞれの 5-FU 濃度で作製した。次に、MRS 培地にそれぞれの 5-FU 耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムを植菌し、培養後の菌液をそれぞれ 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 5-FU を含む MRS 培地に植菌し、24 時間後の増殖の有無を濁度 (OD=600nm) を用いて測定した (表 6)。その結果、5-FU を 1~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む培地で作製した 5-FU 耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムは、実施例 1 で得られた 5-FU 耐性株と同様に 5-FU に耐性であった。

[0073] [表 5]

OD=600nm	耐性付与に使用した 5-FU 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
	1	5	10	50	100	500	1000
培養日数	1	4.94	0.22	0.09	0.00	-0.05	-0.06
	2	4.94	4.39	5.51	0.44	0.01	-0.08
	3	4.94	4.39	5.51	4.99	0.12	-0.08
	4	4.94	4.39	5.51	4.99	5.88	0.07
	5	4.94	4.39	5.51	4.99	5.88	0.08

[0074] [表6]

	耐性付与に使用した 5-FU 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
	1	5	10	50	100	500	1000
5-FU耐性生育率	20%	55%	62%	90%	95%	0%	0%

実施例 3

[0075] 実施例2で得られた5-FU耐性株を、参考例1と同様の方法で形質転換し、シトシン・デアミナーゼの発現を確認した。作製されたシトシン・デアミナーゼ発現する5-FU耐性株は、実施例1で得られた5-FU耐性株と同様に5-FUに耐性があり、また、その5-FU耐性能は少なくとも7日間以上維持された。

実施例 4

[0076] 実施例1と同様にして、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、ビフィドバクテリウム・インファンティス、ビフィドバクテリウム・ラクテンティスの5-FU耐性株を作製した。以下の表7に5-FU耐性ビフィドバクテリウムの菌株一覧を記載する。

[0077] [表7]

実施例 1 と同様の方法で耐性を獲得させた菌株一覧

種	株名	導入 Plasmid
<i>B. longum</i>	105-A	p B L E S 1 0 0 - S - e C D
<i>B. longum</i>	105-A	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. longum</i>	aE-194b	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. longum</i>	bs-601	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. longum</i>	M101-2	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. lactentis</i>	Type strain JCM1220	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. infantis</i>	Type strain JCM1222	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. infantis</i>	I-10-5	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. breve</i>	Type strain JCM1192	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. breve</i>	aS-1	p A V 0 0 1 - H U - e C D
<i>B. breve</i>	I-53-8W	p A V 0 0 1 - H U - e C D

産業上の利用可能性

[0078] 本発明によると、CD／5-FUを用いたEnzyme／pro-drug療法に極めて有用な、CD活性を保持しかつ5-FUに耐性を示すビフィドバクテリウム属細菌等の5-FU耐性菌を容易に作製することができる。例えば、癌患者に、CD活性を保持しかつ5-FUに耐性を示すビフィドバクテリウム属細菌を投与すると、該ビフィドバクテリウム属細菌は腫瘍内で増殖し、腫瘍内に存在している間に、5-FUを経口投与すると腸管から吸収され、腫瘍内におけるCDの働きで5-FUが5-FUに変換されて、腫瘍細胞を死滅させることができるが、腫瘍細胞を死滅させることができる5-FU濃度においても、5-FU耐性ビフィドバクテリウム属細菌は生存し、CDによる酵素作用を持続することができるので、該ビフィドバクテリウム属微生物を有効成分とする優れた抗腫瘍剤を得ることができる。

[0079] また、本発明のCD発現・5-フルオロウラシル耐性菌が増殖している腫瘍以外の部分では、5-FUは5-FUに変換されないため、5-FUをそのまま投与した場合に比べて、5-FUによる副作用を格段に低く抑制することができる。さらに、本発明の固形腫瘍治療剤の抗腫瘍効果が腫瘍への高い特異性を有していることから、5-FUをそのまま投与する場合に比べて、格段に高い5-FU濃度を腫瘍内において実現することが可能となり、その結果、極めて優れた抗腫瘍効果が得られる。

請求の範囲

- [1] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-フルオロウラシル耐性能を有するシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌の作製方法であって、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるシトシン・デアミナーゼ発現菌を、5-フルオロシトシンの存在下で継代・馴化培養することを特徴とする耐性菌の作製方法。
- [2] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるシトシン・デアミナーゼ発現菌が、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現しない菌に、シトシン・デアミナーゼ遺伝子を導入して形質転換したシトシン・デアミナーゼ発現菌であることを特徴とする請求項1に記載の耐性菌の作製方法。
- [3] 2～5000 μ g/mlの5-フルオロシトシンを添加した培地で継代・馴化培養することを特徴とする請求項1又は2に記載の耐性菌の作製方法。
- [4] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育できるシトシン・デアミナーゼ発現菌が、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現するバクテリアであることを特徴とする請求項1～3のいずれかに記載の耐性菌の作製方法。
- [5] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現するバクテリアが、シトシン・デアミナーゼを発現する腸内細菌であることを特徴とする請求項4に記載の耐性菌の作製方法。
- [6] シトシン・デアミナーゼを発現する腸内細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム属細菌であることを特徴とする、請求項5に記載の耐性菌の作製方法。
- [7] シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、又はビフィドバクテリウム・インファンティスであることを特徴とする請求項6に記載の耐性菌の作製方法。
- [8] シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現するビフィドバクテリウム・ロンガムであることを特徴とする請求項7に記載の

耐性菌の作製方法。

- [9] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-フルオロウラシル耐性能を有することを特徴とするシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌の作製方法であって、
- (1)嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現しない菌を5-フルオロウラシルの存在下で継代・馴化培養して、5-フルオロウラシル耐性菌を作製する工程と、
- (2)該5-フルオロウラシル耐性菌に、シトシン・デアミナーゼ遺伝子を導入して形質転換する工程を有することを特徴とする耐性菌の作製方法。
- [10] 1～100 μ g/mlの5-フルオロウラシルを添加した培地で継代・馴化培養することを特徴とする請求項9に記載の耐性菌の作製方法。
- [11] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現していない菌が、嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現していないバクテリアであることを特徴とする請求項9又は10に記載の耐性菌の作製方法。
- [12] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、かつ、シトシン・デアミナーゼを発現していないバクテリアが、シトシン・デアミナーゼを発現していない腸内細菌であることを特徴とする請求項11に記載の耐性菌の作製方法。
- [13] シトシン・デアミナーゼを発現していない腸内細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム属細菌であることを特徴とする請求項12に記載の耐性菌の作製方法。
- [14] シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、又はビフィドバクテリウム・インファンティスであることを特徴とする請求項13に記載の耐性菌の作製方法。
- [15] シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼを発現していないビフィドバクテリウム・ロンガムであることを特徴とする請求

項14に記載の耐性菌の作製方法。

- [16] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも抗腫瘍活性有効濃度の5-フルオロウラシル耐性能を有するシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌であって、請求項1～15のいずれかに記載の作製方法で作製されることを特徴とするシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [17] 嫌気的環境下にある腫瘍組織内で生育でき、シトシン・デアミナーゼを発現することができ、かつ、少なくとも $2\mu\text{g/ml}$ の5-フルオロシトシン又は $1\mu\text{g/ml}$ の5-フルオロウラシルを添加した培地で生育できることを特徴とするシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [18] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性バクテリアであることを特徴とする請求項16又は17に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [19] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性バクテリアが、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性腸内細菌であることを特徴とする請求項18に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [20] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性腸内細菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム属細菌であることを特徴とする請求項19に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [21] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム、ビフィドバクテリウム・ブレーベ、又はビフィドバクテリウム・インファンティスであることを特徴とする請求項20に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [22] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム属細菌が、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムである請求項20に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [23] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム

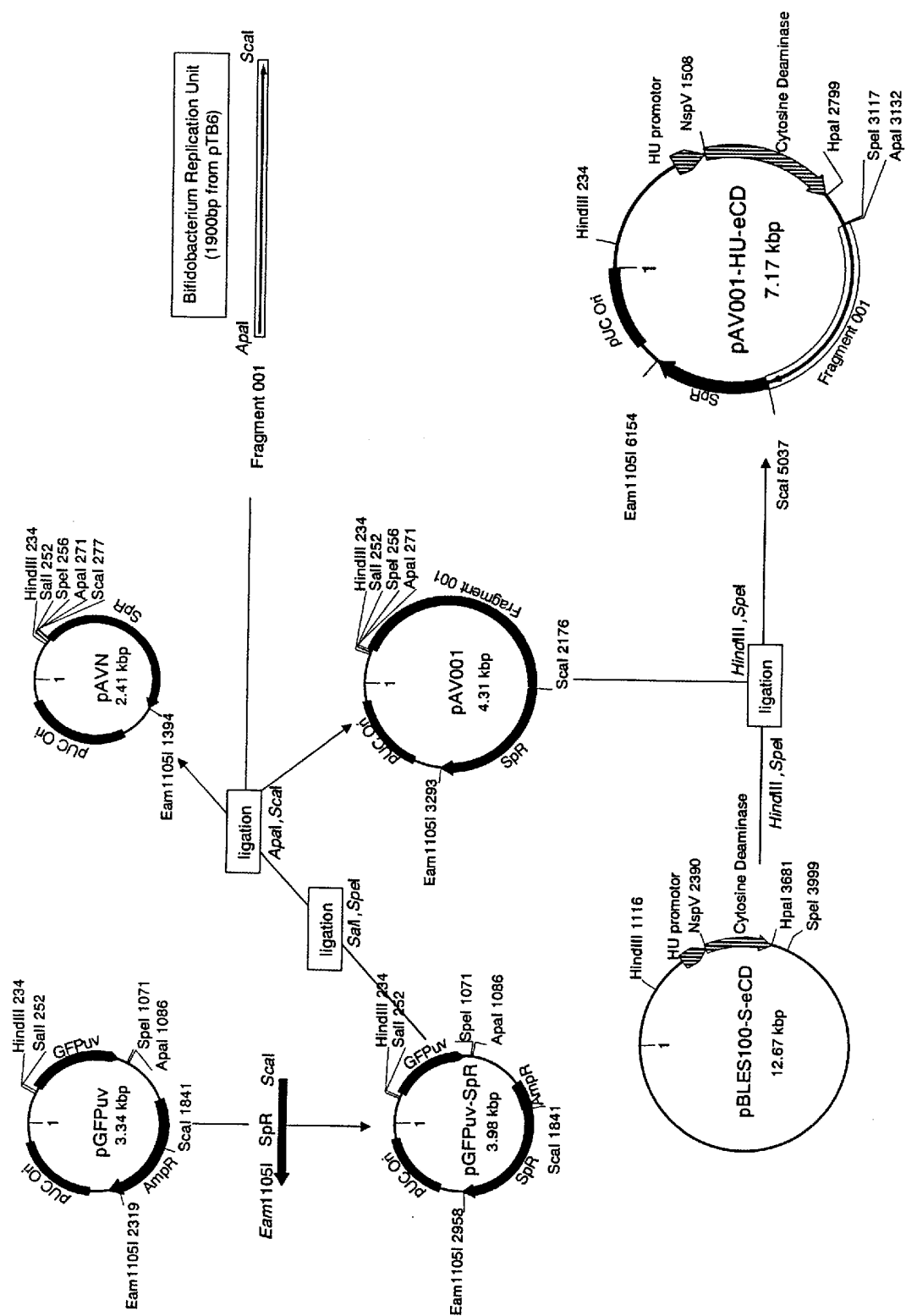
が、プラスミドpBLES100-S-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株であることを特徴とする請求項22に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。

- [24] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガムが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ロンガム105-A株であることを特徴とする請求項23に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [25] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベ標準株であることを特徴とする請求項21に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [26] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベaS-1株であることを特徴とする請求項21に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [27] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・ブレーベI-53-8W株であることを特徴とする請求項21に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性菌。
- [28] シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・インファンティスが、プラスミドpAV001-HU-eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5-フルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・インファンティス標準株であることを特徴とする請求項21に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5-

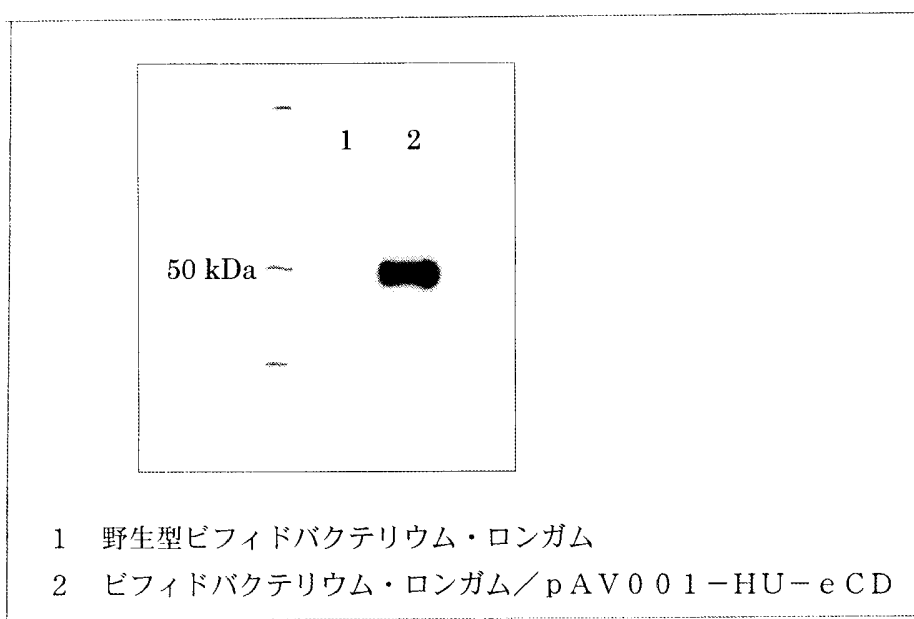
ーフルオロウラシル耐性菌。

- [29] シトシン・デアミナーゼ発現・5ーフルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・インファンティスが、プラスミドpAV001－HU－eCD又はそのプラスミド変異体を保持する、シトシン・デアミナーゼ発現・5ーフルオロウラシル耐性ビフィドバクテリウム・インファンティスI－10－5株であることを特徴とする請求項21に記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5ーフルオロウラシル耐性菌。
- [30] 請求項16～29のいずれかに記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5ーフルオロウラシル耐性菌を含有することを特徴とする医薬組成物。
- [31] 5ーフルオロシトシンと組み合わせてなることを特徴とする請求項30に記載の医薬組成物。
- [32] さらに、ラクツロースと組み合わせてなることを特徴とする請求項30又は31に記載の医薬組成物。
- [33] 5ーフルオロシトシンから有効治療量の5ーフルオロウラシルに変換できる量のシトシン・デアミナーゼを発現するのに十分な量のシトシン・デアミナーゼ発現・5ーフルオロウラシル耐性菌と、有効治療量の5ーフルオロウラシルに変換できる量の5ーフルオロシトシンとを組み合わせてなる固形腫瘍治療剤であって、シトシン・デアミナーゼ発現・5ーフルオロウラシル耐性菌が請求項16～29のいずれかに記載のシトシン・デアミナーゼ発現・5ーフルオロウラシル耐性菌であることを特徴とする固形腫瘍治療剤。
- [34] さらに、ラクツロースを組み合わせてなることを特徴とする請求項33に記載の固形腫瘍治療剤。

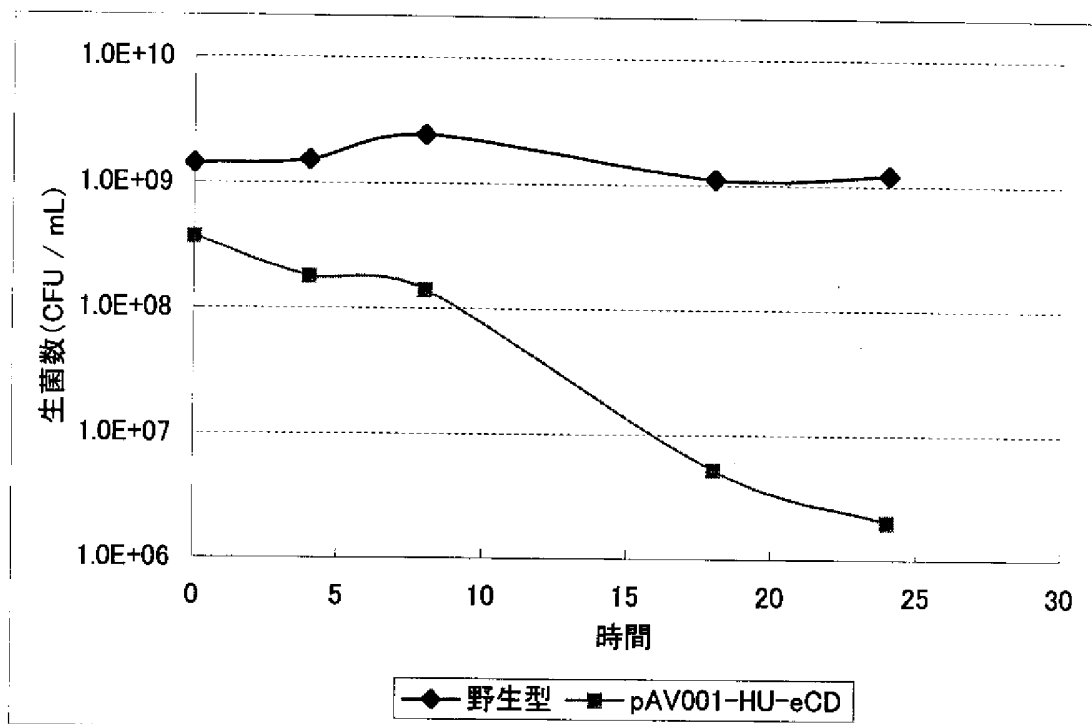
[図1]



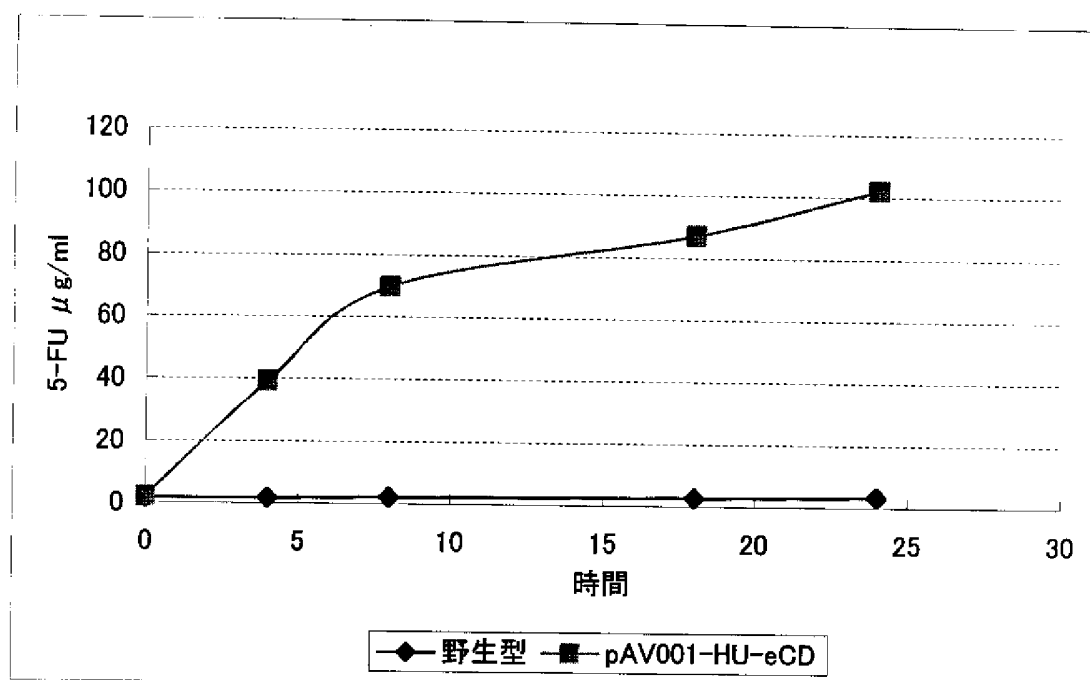
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/307102

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N1/21 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)		
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) C12N1/21 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), JSTplus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2002-97144 A (Jun AMANO et al.), 02 April, 2002 (02.04.02), Full text & US 2002/0054865 A1 & CA 234040 A1	1-34
A	NAGLE DP.Jr. et al., 5-Fluorouracil-resistant strain of <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> . J.Bacteriol., 1987, Vol.169, No.9, pages 4119 to 4123, Full text	1-34
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 April, 2006 (19.04.06)		Date of mailing of the international search report 25 April, 2006 (25.04.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N1/21 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N1/21 (2006.01), C12N5/10 (2006.01), C12N15/09 (2006.01)			
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			
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） BIOSIS/WPI (DIALOG), MEDLINE (DIALOG), JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示		関連する 請求の範囲の番号
A	JP 2002-97144 A (天野純、外 1 名) 2002.4.2, 全文 & US 2002/0054865 A1 CA 234040 A1		1-34
A	NAGLE DP, Jr. et al, 5-Fluorouracil-resistant strain of <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> , J. Bacteriol., 1987, Vol.169, No.9, p.4119-4123, 全文		1-34
☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 19.04.2006		国際調査報告の発送日 25.04.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官（権限のある職員） 内藤 伸一 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B 3534