

(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
2017年8月17日(17.08.2017)



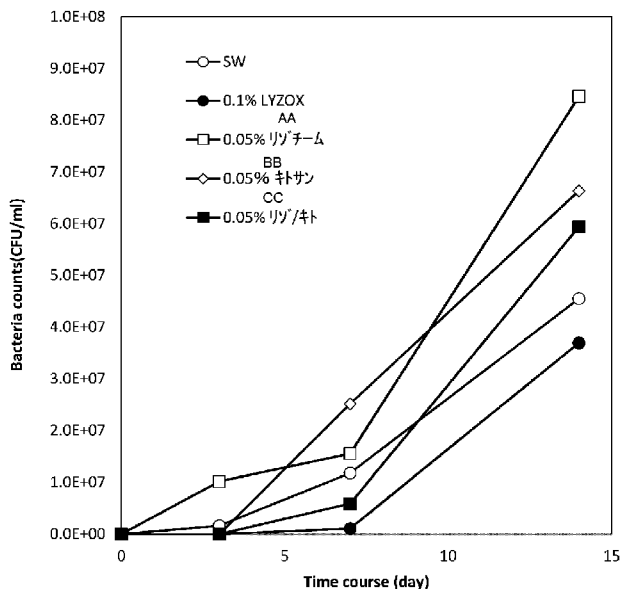
(10) 国際公開番号
WO 2017/138476 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/46 (2006.01) A01P 3/00 (2006.01)
A01N 43/16 (2006.01) A61K 31/722 (2006.01)
A01N 63/00 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/004157
- (22) 国際出願日: 2017年2月6日(06.02.2017)
- (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 2016-022099 2016年2月8日(08.02.2016) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 Tokyo (JP). 和興フィルタテクノロジー株式会社(WAKO FILTER TECHNOLOGY CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1010044 東京都千代田区鍛冶町一丁目8番3号 神田91ビル3階 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 宮崎 泰成(MIYAZAKI, Yasunari); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目5番45号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 影島 宏紀(KAGESHIMA, Hiroki); 〒1010044 東京都千代田区鍛冶町一丁目8番3号 和興フィルタテクノロジー株式会社内 Tokyo (JP). 齊藤 章(SAITO, Akira); 〒1010044 東京都千代田区鍛冶町一丁目8番3号 和興フィルタテクノロジー株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 西村 竜平(NISHIMURA, Ryuhei); 〒6040857 京都府京都市中京区蒔絵屋町280番地 ヤサカ烏丸御所南ビル3F Kyoto (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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,

[続葉有]

(54) Title: ANTIMICROBIAL COMPOSITION

(54) 発明の名称: 抗菌性組成物



AA 0.05% of lysozyme
BB 0.05% of chitosan
CC 0.05% of lysozyme/chitosan

(57) Abstract: Provided is a novel antimicrobial composition, which is against an infectious microorganism causing a respiratory infection, using natural food additives with high safety. The antimicrobial composition comprises a complex, in which lysozyme is bound to chitosan, and has an antimicrobial effect against an infectious microorganism inducing a respiratory infection.

(57) 要約: 本発明は、安全性の高い天然の食品添加物を用いて、呼吸器感染症の原因となる感染菌に対して新規な抗菌性組成物を提供するものであり、リゾチームとキトサンとを結合させた複合体を含有し、呼吸器感染症を引き起こす感染菌に対して抗菌性を有する抗菌性組成物。

WO 2017/138476 A1



SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称： 抗菌性組成物

技術分野

[0001] この発明は、呼吸器感染症の原因となる感染菌に対して抗菌性を有する抗菌性組成物に関するものである。

背景技術

[0002] M R S A、緑膿菌又は肺M A C (Mycobacterium avium complex) 等の非結核性抗酸菌は、呼吸器感染症を引き起こす感染菌である。この感染症は、難治性化することから問題視されている。

[0003] ここで、呼吸器感染症の予防・治療剤として、特許文献1に示すように、ラクトバチルス・アシドフィラス (L a c t o b a c i l l u s a c i d o p h i l u s) に属する乳酸菌を抗呼吸器感染症作用の有効成分として含有するものが考えられている。

[0004] しかしながら、特許文献1は、インフルエンザウイルス（具体的には、マウス・インフルエンザウイルスPR8 [A／PR／8／34 (H1N1)]) に対する増殖抑制作用を示しているに過ぎず、M R S A、緑膿菌又は非結核性抗酸菌に対する増殖抑制作用については一切示していない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2012-241009号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 一方で、本願発明者は、安全性の高い天然の食品添加物であるリゾチーム及びキトサンの複合体を用いて、各種菌に対する抗菌性の検討を行っている。その中で、本願発明者は、リゾチームとキトサンとが結合した複合体が、呼吸器感染症の原因となる感染菌に対して抗菌性を示すことを見出した。

課題を解決するための手段

[0007] すなわち本発明に係る抗菌性組成物は、リゾチームとキトサンとを結合させた複合体を含有し、呼吸器感染症を引き起こす感染菌に対して抗菌性を有することを特徴とする。

[0008] 前記抗菌性には、MRSAの増殖抑制作用、緑膿菌の増殖抑制作用、又は、非結核性抗酸菌の増殖抑制作用が含まれる。つまり、前記抗菌性組成物は、MRSA増殖抑制組成物、緑膿菌増殖抑制組成物又は非結核性抗酸菌増殖抑制組成物を含む。この抗菌性組成物の効果については、後述する。

[0009] 前記抗菌性がMRSAの増殖抑制作用の場合、前記複合体の濃度が0.001質量%以上であることが望ましい。また、前記抗菌性が緑膿菌の増殖抑制作用の場合、前記複合体の濃度が0.001質量%以上であることが望ましい。

[0010] 前記抗菌性組成物は、注射用水、生理食塩液、リンゲル液、精製水又は蒸留水等の液体と混ぜて洗浄水とすることが好ましい。このように洗浄水とすることで、ネブライザーに用いることができる。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、呼吸器感染症を引き起こす感染菌の増殖を抑える効果を奏する。したがって、本発明に依れば、呼吸器感染症の症状の改善、呼吸器感染症の治癒、感染の予防をすることができる。また、リゾチームは、安全性の高い天然の食品添加物として広く利用されており、このリゾチームとキトサンとの複合体を用いた抗菌性組成物は、利用する患者を安心させるとともに、その負担を軽減することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による希釈した培地におけるMRSAの増殖抑制効果を示す図である。

[図2]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による希釈した培地における緑膿菌の増殖抑制効果を示す図である。

[図3]リゾチームーキトサン複合体による濃度別の肺M A Cの増殖抑制効果を示す図である。

[図4]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による希釈した培地における肺M A Cの増殖抑制効果を示す図である。

[図5]10mMリン酸バッファー（pH7.0）をさらに添加した試験培地サンプルにおける、リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による肺M A Cの増殖抑制効果を示す図である。

[図6]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物の耐熱性評価試験の結果を示す図である。

[図7]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による標準培地におけるMR S Aの増殖抑制効果を示す図である。

[図8]リゾチームーキトサン複合体による濃度別の標準培地におけるMR S Aの発生コロニー数の対コントロール比率を示す図である。

[図9]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による標準培地における緑膿菌（NBRC13275）の増殖抑制効果を示す図である。

[図10]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による標準培地における緑膿菌（PAO1）の増殖抑制効果を示す図である。

[図11]リゾチームーキトサン複合体による濃度別の標準培地における緑膿菌（NBRC13275）の発生コロニー数の対コントロール比率を示す図である。

[図12]リゾチームーキトサン複合体に対するMR S Aの耐性菌獲得プロトコールの結果を示す図である。

[図13]走査電子顕微鏡により得られたMR S Aの形態変化を示す画像である

。

[図14]透過電子顕微鏡により得られたMRSAの形態変化を示す画像である

。

[図15]透過電子顕微鏡により得られた緑膿菌の形態変化を示す画像である。

[図16]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物をそれぞれ添加した場合の走査電子顕微鏡により得られたMRSAの形態変化を示す画像である。

[図17]リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物をそれぞれ添加した場合の走査電子顕微鏡により得られた緑膿菌の形態変化を示す画像である。

[図18]リゾチームーキトサン複合体を添加したMRSAに対してDNase I 処理を行った場合の走査電子顕微鏡により得られたMRSAの形態変化を示す画像である。

[図19]リゾチームーキトサン複合体を添加したMRSAに対してDNase I 処理を行った場合の走査電子顕微鏡により得られた緑膿菌の形態変化を示す画像である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下に本発明の一実施形態を詳述する。

[0014] 本実施形態に係る抗菌性組成物は、リゾチームとキトサン（水溶性のものであり、分子量は25000Da以下である。）と結合させた複合体を含有するものである。なお、本実施形態では、分子量14000Daのキトサンを用いている。

[0015] 本実施形態のリゾチームーキトサン複合体は、リゾチームとキトサンをメイラード反応により結合させることにより製造することができる。リゾチームとキトサンとをメイラード反応により結合させることで、リゾチーム中の抗原構造のほとんど又はすべてがマスクされるため、リゾチームーキトサン複合体を摂取してもアレルギーを起こしにくい。

[0016] 具体的な製造方法は次のとおりである。

リゾチーム／キトサンの質量比が、より好ましくは60／40～40／60となる量のリゾチーム及びキトサンを、水に混合溶解し、水溶液中のリゾチーム及びキトサンの合計含量が5～30質量%となるように調製する。得られた水溶液を凍結乾燥することにより粉末化する。得られた粉末を温度50～80℃、より好ましくは55～65℃、相対湿度50～80%、より好ましくは60～70%の条件下で、2～20日、より好ましくは7～14日、メイラード反応させることにより本発明のリゾチームーキトサン複合体を製造することができる。

[0017] 本実施形態のリゾチームーキトサン複合体の生成は、SDS (S o d i u m d o d e c y l s u l f a t e - p o l y a c r y l a m i d e) 電気泳動により得られるプレートを、染色処理したものにより、蛋白質ーキトサン複合体である高分子物質の生成を確認することができる。

[0018] 次に、本実施形態の抗菌性組成物について説明する。

本実施形態の抗菌性組成物は、リゾチームーキトサン複合体を、注射用水、生理食塩液、リンゲル液、精製水又は蒸留水等の液体と混ぜて構成されるものであり、その抗菌力をより保持させるために、リゾチームーキトサン複合体を、好ましくは0.001質量%以上含有するものである。なお、呼吸器感染症の治療にあたって、リゾチームーキトサン複合体の濃度が濃すぎるとアレルギーの原因となる可能性がある。ここで、リゾチームーキトサン複合体の濃度の上限値は、1.0質量%である。

[0019] 例えば、抗菌性組成物をMRSA増殖抑制組成物として用いる場合には、リゾチームーキトサン複合体の濃度は0.001質量%以上とすることが好ましい。また、抗菌性組成物を緑膿菌増殖抑制組成物として用いる場合には、リゾチームーキトサン複合体の濃度は0.01質量%以上とすることが好ましい。さらに、抗菌性組成物を非結核性抗酸菌増殖抑制組成物（肺MAC増殖抑制組成物）として用いる場合には、リゾチームーキトサン複合体の濃度は0.1質量%以上とすることが好ましい。

[0020] この抗菌性組成物は、ネブライザーに用いられる洗浄水とすることができ

る。これにより抗菌性組成物を感染部位に直接噴霧することで、感染菌の増殖を抑制することができる。

[0021] また、本実施形態の抗菌性組成物は、例えば、MRSA、緑膿菌又は肺MAC (Mycobacterium avium complex) 等の非結核性抗酸菌等の呼吸器感染症を引き起こす各種感染菌に対して増殖抑制作用を有する。

実施例

[0022] 以下に実施例を掲げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。なお、以下の実施例において、リゾチーム-キトサン複合体をLYZOX（和興フィルタテクノロジー株式会社の登録商標）ともいう。

[0023] [実施例1]

リゾチーム-キトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による希釈した培地におけるMRSAの増殖抑制効果

[0024] 本試験には、MRSA IID1677を用い、この菌株を普通ブイヨン培地で37℃、20時間培養した。培養した菌液を遠心分離（3000rpm、10分）により回収し、滅菌水により懸濁した。そして、吸光度OD₆₀₀ = 1.0となるように滅菌水で希釈した。これを2000倍に希釈（10⁶CFU/ml相当）し、反応菌液とした。

[0025] それぞれのLB試験培地サンプルへ、100μlの反応菌液を添加し、37℃の条件下で48時間振とう培養した。ここで、それぞれのLB試験培地サンプルは、10mlの1/2.5LB培地に、

- (1) 10mlの滅菌水、
- (2) 10mlの濃度0.002%のリゾチーム-キトサン複合体（添加後の濃度0.001%）、
- (3) 10mlの濃度0.001%のリゾチーム単体（添加後の濃度0.0005%）、
- (4) 10mlの濃度0.001%のキトサン単体（添加後の濃度0.00

0.5%)、又は、

(5) 10 ml の濃度 0.001% のリゾチーム及びキトサンの混合物（添加後のそれぞれの濃度 0.0005%）、
を添加して作製したものである。

[0026] そして、経時的（0、1、2 days）に 3 ml ずつ抜き取り、吸収波長 600 nm にて吸光度を測定した。また必要に応じて、100 μ l 抜き取り、LB 寒天培地へ播種し、発生コロニー数を観察した。

[0027] 実験の結果、図 1 に示すように、リゾチーム単体、リゾチーム及びキトサンの混合物では、48 時間の MRSA の増殖抑制効果が若干見られた。

一方で、リゾチームーキトサン複合体の 48 時間の MRSA の増殖抑制効果は、リゾチーム単体、リゾチーム及びキトサンの混合物に比べて、著しい改善効果が認められた。

[0028] [実施例 2]

リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による希釈した培地における緑膿菌の増殖抑制効果

[0029] 本試験には、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275 を用い、この菌株を普通ブイヨン培地で 37℃、20 時間培養した。培養した菌液を遠心分離（3000 rpm、10 分）により回収し、滅菌水により懸濁した。そして、吸光度 OD600 = 1.0 となるように滅菌水で希釈した。これを 2000 倍に希釈（ 10^6 CFU/ml 相当）し、反応菌液とした。

[0030] それぞれの TSB 試験培地サンプルへ、100 μ l の反応菌液を添加し、37℃の条件下で 48 時間振とう培養した。ここで、それぞれの TSB 試験培地サンプルは、10 ml の 1/2.5 TSB 培地に、200 μ l の 1M リン酸バッファー（pH 7.0）を添加し、さらに、

(1) 10 ml の滅菌水、

(2) 10 ml の濃度 0.02%（添加後の濃度 0.01%）のリゾチーム

ーキトサン複合体、

(3) 10 ml の濃度 0.01% (添加後の濃度 0.005%) のリゾチーム単体、

(4) 10 ml の濃度 0.01% (添加後の濃度 0.005%) のキトサン単体、又は、

(5) 10 ml の濃度 0.01% (添加後のそれぞれの濃度 0.005%) のリゾチーム及びキトサンの混合物、

を添加して作製したものである。

[0031] そして、経時的 (0、1、2 days) に 3 ml ずつ抜き取り、吸収波長 600 nm にて吸光度を測定した。また必要に応じて、100 μ l 抜き取り、MH 寒天培地へ播種し、発生コロニー数を観察した。

[0032] 実験の結果、図 2 に示すように、24 時間までは、リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム及びキトサンの混合物に緑膿菌の増殖抑制効果が見られた。

一方、24 時間を過ぎてから、リゾチームーキトサン複合体による強い増殖抑制効果が見られた。

[0033] [実施例 3]

リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による希釈した培地における肺 MAC の増殖抑制効果

[0034] 本試験には、*Mycobacterium avium* Chester JCM15429 を用い、この菌株を Middlebrook 7H9 培地で 37°C、2 週間培養した。培養した菌液を遠心分離 (3000 rpm、10 分) により回収し、滅菌水により懸濁した。そして、吸光度 OD600 = 1.0 となるように滅菌水で希釈した。これを 2000 倍に希釈 (10^6 CFU/ml 相当) し、反応菌液とした。

[0035] それぞれの Middlebrook 7H9 試験培地サンプルへ、100 μ l の反応菌液を添加し、37°C の条件下で静置培養した。ここで、それぞ

れのMiddlebrook 7H9試験培地サンプルは、10mlの1／2.5Middlebrook 7H9培地に、

- (1) 10mlの滅菌水、
 - (2) 10mlの濃度0.002%のリゾチームーキトサン複合体（添加後の濃度0.001%）、
 - (3) 10mlの濃度0.02%のリゾチームーキトサン複合体（添加後の濃度0.01%）、
 - (4) 10mlの濃度0.2%のリゾチームーキトサン複合体（添加後の濃度0.1%）、
 - (5) 10mlの濃度0.1%のリゾチーム単体（添加後の濃度0.05%）、
 - (6) 10mlの濃度0.1%のキトサン単体（添加後の濃度0.05%）、又は、
 - (7) 10mlの濃度0.1%のリゾチーム及びキトサンの混合物（添加後のそれぞれの濃度0.05%）、
- を添加して作製したものである。

[0036] そして、経時的（0、5、7、12days）に3mlずつ抜き取り、吸収波長600nmにて吸光度を測定した。また必要に応じて、100μl抜き取り、Middlebrook 7H10寒天培地へ播種し、発生コロニー数を観察した。

[0037] 実験の結果、図3に示すように、リゾチームーキトサン複合体の濃度が大きくなるに連れて肺MACの増殖抑制効果が増大することが認められた。

また、図4に示すように、リゾチームーキトサン複合体は、キトサン単体、リゾチーム単体、リゾチーム及びキトサンの混合物に比べて、7日間に亘って、肺MACの増殖抑制効果が著しいことが認められた。

[0038] なお、図5は、10mMリン酸バッファー（pH7.0）をさらに添加したMiddlebrook 7H9試験培地サンプルを用いた結果を示している。

この図5においても、リゾチームーキトサン複合体は、キトサン単体、リゾチーム単体、リゾチーム及びキトサンの混合物に比べて、7日間に亘って、肺MACの増殖抑制効果が著しいことが認められた。

[0039] [実施例4]

リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による耐熱性評価

[0040] 本試験は、リゾチーム感受性の細菌であるマイクロコッカスルテウス菌を用いた溶菌試験である。なお、溶菌活性はリゾチーム特有の活性である。リゾチームは熱に対して比較的安定なタンパク質であるが、一般的には80℃で30分加熱したリゾチームはこの活性がかなり低下することが知られている。本試験は、リゾチームーキトサン複合体（リゾチームにキトサンオリゴ糖を結合させたもの）が、原料のリゾチームに耐熱性を付加するということを示すべく行った。

[0041] 本試験には、濃度5%のリゾチームーキトサン複合体水溶液、濃度2.5%のリゾチーム水溶液、及び、濃度2.5%のリゾチーム及びキトサンの混合物水溶液を用いた。また、使用菌には、和光純薬製のマイクロコッカスルテウス菌を用いた。

[0042] まず試験前日にマイクロコッカスルテウス菌を1g秤とり、100mlの生理食塩水に加えて、4℃で一晩攪拌した。そして、試験当日に、マイクロコッカスルテウス菌について、波長640nmで、OD=1.00±0.05となるように調整し、これを試験菌液とした。なお希釈には同じ生理食塩水を用いた。

[0043] 各溶液を調整し、2mlずつ5mlのチューブに入れて、乾燥炉にて80℃、2時間の熱処理を実施した。なお、加熱処理しないものも同量作製した。この熱処理後、室温に戻した後に、37℃の恒温槽にて30分インキュベートした。

[0044] 前記試験菌液2800μlを吸光度計にセットし、検体添加直前のOD（0-1）を記録した。その後、検体200μlを添加し、攪拌した。このと

きODが上昇するため、一番高くなった値OD（0-2）を記録した。

[0045] 検体添加後からタイマーにて計測し、2、4、6、8、10分経過時点のODを記録した。試験はそれぞれ2回実施し、平均を算出した。

[0046] （0-2）のODを開始時のODとして、それぞれの点におけるΔ吸光度（ΔOD）を算出した。

[0047] 図6の（A）～（C）は、各溶液において、縦軸にΔ吸光度、横軸に時間をプロットしたものである。また、図6の（D）は、加熱の有無でのΔ吸光度を比較し、加熱処理後の溶液が、加熱処理無しの溶液に対してどの程度活性が残っているかを活性残存率（下記の式）として算出したものである。

活性残存率（％）＝「加熱処理有りのΔOD（10分）」／「加熱処理無しのΔOD（10分）」×100

[0048] 図6の（D）から分かるように、リゾチーム溶液における加熱処理後の活性残存率が73.3％であるのに対して、LYZOX溶液における加熱処理後の活性残存率が91.9％と加熱処理を施しても高い溶菌活性を有していることが分かる。したがって、リゾチームをキトサンと結合させることによって、リゾチーム単体に比べて、耐熱性を向上させることができる。

[0049] [実施例5]

リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による標準培地におけるMRSAの増殖抑制効果

[0050] 本試験には、MRSA I I D 1 6 7 7を用い、この菌株を普通ブイヨン培地（栄研化学株式会社製、‘栄研’）20mlに植菌して37℃で一夜振とう培養した。培養した菌液を遠心分離（3000rpm、10分）により回収し、滅菌水により懸濁した。そして、吸光度OD600＝1.0となるように滅菌水で希釈した。これを2000倍に希釈（10⁶CFU/ml相当）し、反応菌液とした。

[0051] それぞれのTSB試験培地サンプルへ、100μlの反応菌液を添加し、37℃の条件下で48時間振とう培養した。ここで、それぞれのTSB試験

培地サンプルは、10 ml の TSB 培地 (BD BBL™) に、200 μ l の 1 M リン酸バッファー (pH 7.0) を添加し、さらに、

- (1) 10 ml の滅菌水、
 - (2) 10 ml の濃度 0.4 % のリゾチーム-キトサン複合体 (添加後の濃度 0.2 %)、
 - (3) 10 ml の濃度 0.2 % のリゾチーム単体 (添加後の濃度 0.1 %)
- 、
- (4) 10 ml の濃度 0.2 % のキトサン単体 (添加後の濃度 0.1 %)、
- 又は、
- (5) 10 ml の濃度 0.2 % のリゾチーム及びキトサンの混合物 (添加後のそれぞれの濃度 0.1 %)、
- を添加して作製したものである。

[0052] そして、100 μ l 抜き取り、MH 寒天培地へ播種し、発生コロニー数を観察した (コロニーカウント法)。その結果を図 7 に示す。図 7 は、10 ml の滅菌水を添加して作成した TSB 試験培地サンプル (コントロール) の 6 時間後の発生コロニー数に対する各サンプルの 6 時間後の発生コロニー数の比率を示している。なお、図 7 の結果は、コロニーカウント法を 3 回行って得られた値の平均値である。

[0053] 実験の結果、図 7 から分かるように、リゾチーム単体では MRSA の増殖抑制効果はほとんど見られないが、リゾチーム-キトサン複合体、キトサン単体、リゾチーム及びキトサンの混合物に MRSA の増殖抑制効果が見られた。特に、リゾチーム-キトサン複合体の MRSA の増殖抑制効果は、キトサン単体、リゾチーム及びキトサンの混合物に比べて、著しい改善効果が認められた。

[0054] 次に、TSB 試験培地サンプルにおけるリゾチーム-キトサン複体の添加後の濃度を、0.01 %、0.05 %、0.1 %、0.2 % とした場合それぞれの発生コロニー数を観察した。その結果を図 8 に示す。図 8 は、前記コントロールの発生コロニー数に対する各濃度の発生コロニー数の比率の変

化を示している。なお、図8の結果は、複製した2つのサンプルによって得られた平均値である。

[0055] 実験の結果、図8から分かるように、何れの濃度であっても、9時間後には、十分な増殖抑制効果が見られる。また、濃度0.2%のリゾチームーキトサン複合体では、6時間経過後にほぼ0%となっており、増殖抑制効果の即効性が示された。

[0056] [実施例6]

リゾチームーキトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物による標準培地における緑膿菌の増殖抑制効果

[0057] 本試験には、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275又はPAO1を用い、その他の処理は、前記[実施例5]と同様とした。

[0058] NBRC 13275における結果を図9に示し、PAO1における結果を図10に示す。なお、図9の結果は、コロニーカウント法を3回行って得られた値の平均値であり、図10の結果は、コロニーカウント法を5回行って得られた値の平均値である。

[0059] 図9から分かるように、リゾチームーキトサン複合体のNBRC 13275の増殖抑制効果は、リゾチーム単体、キトサン単体、リゾチーム及びキトサンの混合物に比べて、著しい改善効果が認められた。

[0060] 図10から分かるように、リゾチームーキトサン複合体のPAO1の増殖抑制効果は、リゾチーム単体、キトサン単体、リゾチーム及びキトサンの混合物に比べて、著しい改善効果が認められた。

[0061] 次に、TSB試験培地サンプルにおけるリゾチームーキトサン複合体の添加後の濃度を、0.05%、0.1%、0.2%、0.5%とした場合それぞれの発生コロニー数を観察した。その結果を図11に示す。図11は、前記コントロールの発生コロニー数に対する各濃度の発生コロニー数の比率の変化を示している。なお、図11の結果は、複製した3つのサンプルによって

得られた平均値である。

[0062] 実験の結果、図 1 1 から分かるように、濃度 0. 2 %、0. 5 % のリゾチームーキトサン複合体は、6 時間後にほぼ 0 % となっており、十分な増殖抑制効果が見られる。

[0063] [実施例 7]

リゾチームーキトサン複合体に対する M R S A の耐性菌の不発生効果

[0064] 本試験には、M R S A I I D 1 6 7 7 を用い、日本化学療法学会の提唱する微量液体希釈法を用いた耐性菌獲得プロトコールを実施した。その結果を図 1 2 に示す。

[0065] 図 1 2 から分かるように、リゾチームーキトサン複合体により継代培養（2 5 代）しても、M I C（最小発育阻止濃度）には、ほとんど変化が無かった。

[0066] 一方、「青木、柏木 “メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（M R S A）院内感染における医療従事者鼻腔保有株の意義に関する検討” 感染症学雑誌 第 6 4 巻」の F i g. 3 に記載されている通り、M R S A の抗菌薬として知られているゲンタマイシンでは、3 代目で耐性菌の発生が確認され、ミノマイシンでは、6 代目で耐性菌の発生が確認されていることが報告されている。

[0067] [実施例 8]

リゾチームーキトサン複合体による M R S A の形態変化の観察

[0068] まず、M R S A の形態変化を走査電子顕微鏡を用いて観察した。この走査電子顕微鏡による観察は、導電処理としてオスミウムコーティング（4 n m）を行い、低加速超高分解能走査電子顕微鏡（株式会社日立ハイテクノロジーズ製 S U 9 0 0 0（加速電圧 1 k V））を用いて行った。また、試料は、M R S A に生理食塩水を添加したもの、M R S A に濃度 0. 2 質量 % のリゾチームーキトサン複合体を添加したものである。

[0069] 走査電子顕微鏡により得られた画像を図 1 3 に示す。図 1 3 に示される通り、生理食塩水を添加したものでは M R S A に形態変化が生じていないが、リゾチームーキトサン複合体を添加したものでは、M R S A の外表面に繊維

状の付着物が出現していることがわかる。

[0070] 次に、MRSAの形態変化を透過電子顕微鏡を用いて観察した。この透過電子顕微鏡による観察は、前処理としてダイヤモンドナイフにて50nmに薄切りし、酢酸ウラン、クエン酸鉛により染色し、透過電子顕微鏡（日本電子株式会社製JEM-1400）を用いて行った。また、試料は、MRSAに生理食塩水を添加したもの、MRSAに濃度0.2質量%のリゾチーム-キトサン複合体を添加したものである。

[0071] 透過電子顕微鏡により得られた画像を図14に示す。図14に示される通り、生理食塩水を添加したものではMRSAに形態変化が生じていないが、リゾチーム-キトサン複合体を添加したものでは、MRSAの内部の繊維状構造（DNA）が消失していることがわかる。

[0072] これらの画像から、リゾチーム-キトサン複合体は、MRSAの細胞壁に複合的に作用してMRSAを破壊すると考えられる。1つは、リゾチーム活性によるペプチドグリカン層の加水分解やキトサンの細胞壁への沈着による抗菌作用であり、もう1つは、リゾチーム-キトサンのハイブリッドによる界面活性作用である。リゾチーム-キトサン複合体により穴をあけられた細菌体内より染色体DNAが引き出されて、細菌体外で沈着を引き起こすと考えられる。これによって、MRSAは増殖ができなくなると同時に、遺伝子損失による耐性菌獲得の機会も奪われると考えられる。

[0073] なお、緑膿菌にリゾチーム-キトサン複合体を添加した場合の形態変化についても、上記と同様に、透過電子顕微鏡を用いた観察した。その結果を図15に示す。図15から分かるように、緑膿菌にリゾチーム-キトサン複合体を添加することで、緑膿菌の細胞壁が破壊されていることが分かる。つまり、リゾチーム-キトサン複合体は、緑膿菌に対しても耐性菌の不活性効果を有することが分かる。

[0074] [実施例9]

リゾチーム-キトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物によるMRSA及び緑膿菌の形態変化の観察

[0075] リゾチーム-キトサン複合体、リゾチーム単体、キトサン単体、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物それぞれで処理（処理時間：2時間）したMRSA及び緑膿菌の形態変化を、走査電子顕微鏡を用いて観察した。この走査電子顕微鏡による観察は、上記の実施例8と同様に、導電処理としてオスミウムコーティング（4 nm）を行い、低加速超高分解能走査電子顕微鏡（株式会社日立ハイテクノロジーズ製SU9000（加速電圧1 kV））を用いて行った。また、各試料は、MRSA又は緑膿菌に、生理食塩水、濃度0.1質量%のリゾチーム-キトサン複合体、0.05質量%のリゾチーム、0.05質量%のキトサン、それぞれ0.05質量%のリゾチーム及びキトサンの混合物を添加したものである。

[0076] 走査電子顕微鏡により得られたMRSAの画像を図16に、緑膿菌の画像を図17に示す。図16に示す通り、生理食塩水を添加したものだけでなく、リゾチーム単体を添加したもの、キトサン単体を添加したもの、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物を添加したものでは、MRSAがその形態を維持しており、目立った形態変化は見られなかった。一方で、リゾチーム-キトサン複合体を添加したものでは、MRSAの形態が変化して、それらの外部に繊維状の付着物が塊となって出現していることがわかる。

[0077] 同様に、図17に示す通り、生理食塩水を添加したものだけでなく、リゾチーム単体を添加したものでは、緑膿菌がその形態を維持しており、目立った形態変化は見られなかった。また、キトサン単体を添加したもの、及び、リゾチーム及びキトサンの混合物を添加したものでは、緑膿菌に若干の形態変化が見られたものの、大部分の緑膿菌がその形態を維持している。一方、リゾチーム-キトサン複合体を添加したものでは、緑膿菌の形態が大きく変化して、それらの外部に繊維状の付着物が塊となって出現していることがわかる。

[0078] また、MRSAにリゾチーム-キトサン複合体を添加したもの、及び、緑膿菌にリゾチーム-キトサン複合体を添加したものに対して、DNase I処理を行った。

[0079] 図18は、MRSAにリゾチーム-キトサン複合体を添加したものに対して、DNase I処理を行った場合と、行わなかった場合とにおいて、走査電子顕微鏡により得られたMRSAの画像である。また、図19は、緑膿菌にリゾチーム-キトサン複合体を添加したものに対して、DNase I処理を行った場合と、行わなかった場合とにおいて、走査電子顕微鏡により得られた緑膿菌の画像である。

[0080] 図18及び図19の何れにおいても、DNase I処理を行った場合には、MRSA及び緑膿菌の外部に出現していた繊維状の付着物が消失している。つまり、MRSA及び緑膿菌の外部に出現した繊維状の付着物は、遺伝子(DNA)であることが分かった。このように、MRSA及び緑膿菌にリゾチーム-キトサン複合体を添加することによって、それらの遺伝子が外部に放出されることによって、MRSA及び緑膿菌は増殖ができなくなると同時に、遺伝子損失による耐性菌獲得の機会も奪われると考えられる。

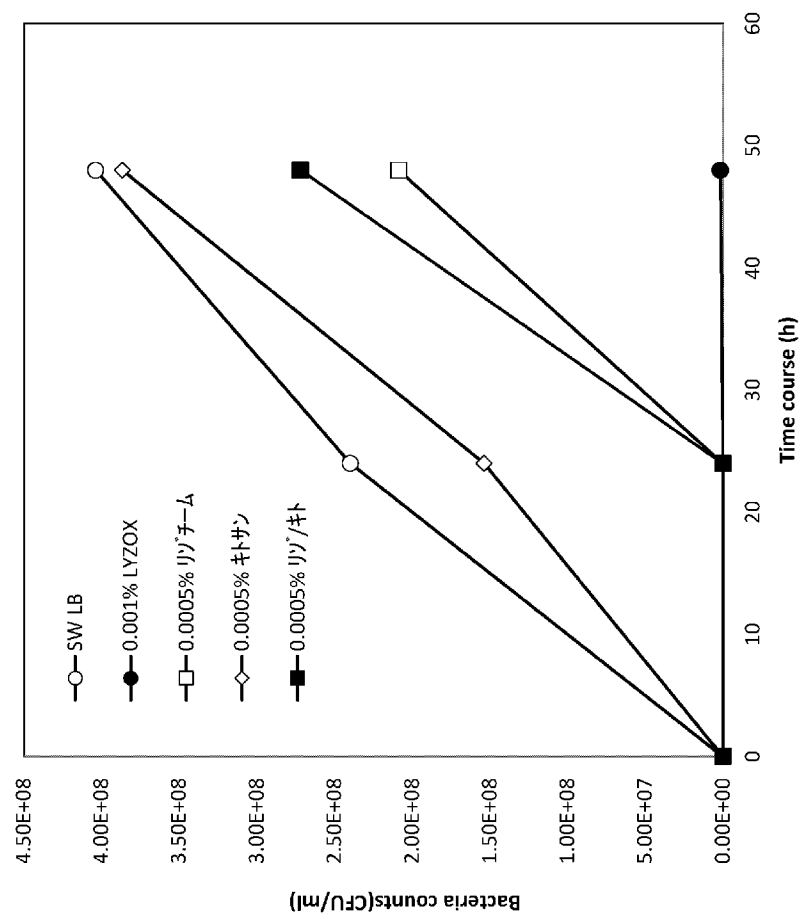
産業上の利用可能性

[0081] 本発明によれば、安全性の高い天然の食品添加物を用いて、呼吸器感染症の原因となる感染菌に対して新規な抗菌性組成物を提供することができる。

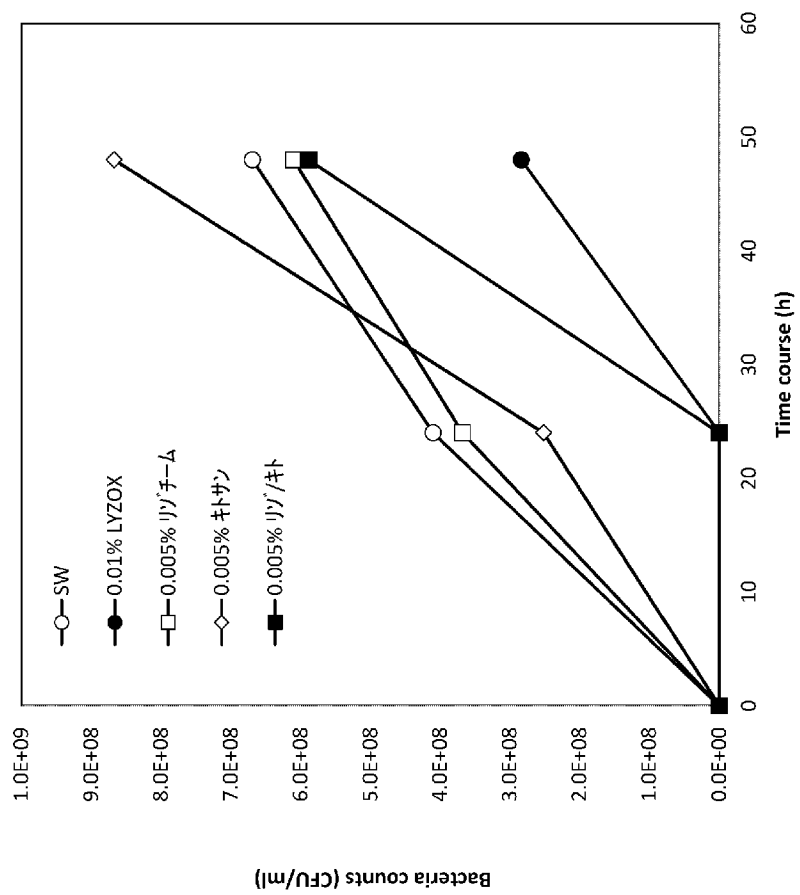
請求の範囲

- [請求項1] リゾチームとキトサンとを結合させた複合体を含有し、呼吸器感染症を引き起こす感染菌に対して抗菌性を有する抗菌性組成物。
- [請求項2] 前記抗菌性が、MRSAの増殖抑制作用、緑膿菌の増殖抑制作用、又は、非結核性抗酸菌の増殖抑制作用を含む請求項1記載の抗菌性組成物。
- [請求項3] 前記抗菌性がMRSAの増殖抑制作用の場合、前記複合体の濃度が0.001質量%以上である請求項2記載の抗菌性組成物。
- [請求項4] 前記抗菌性が緑膿菌の増殖抑制作用の場合、前記複合体の濃度が0.01質量%以上である請求項2記載の抗菌性組成物。
- [請求項5] 耐熱性を有する、請求項1に記載の抗菌性組成物。
- [請求項6] 耐性菌の発生抑制作用を有する、請求項1に記載の抗菌性組成物。
- [請求項7] 請求項1に記載の抗菌性組成物を含有する洗浄水。

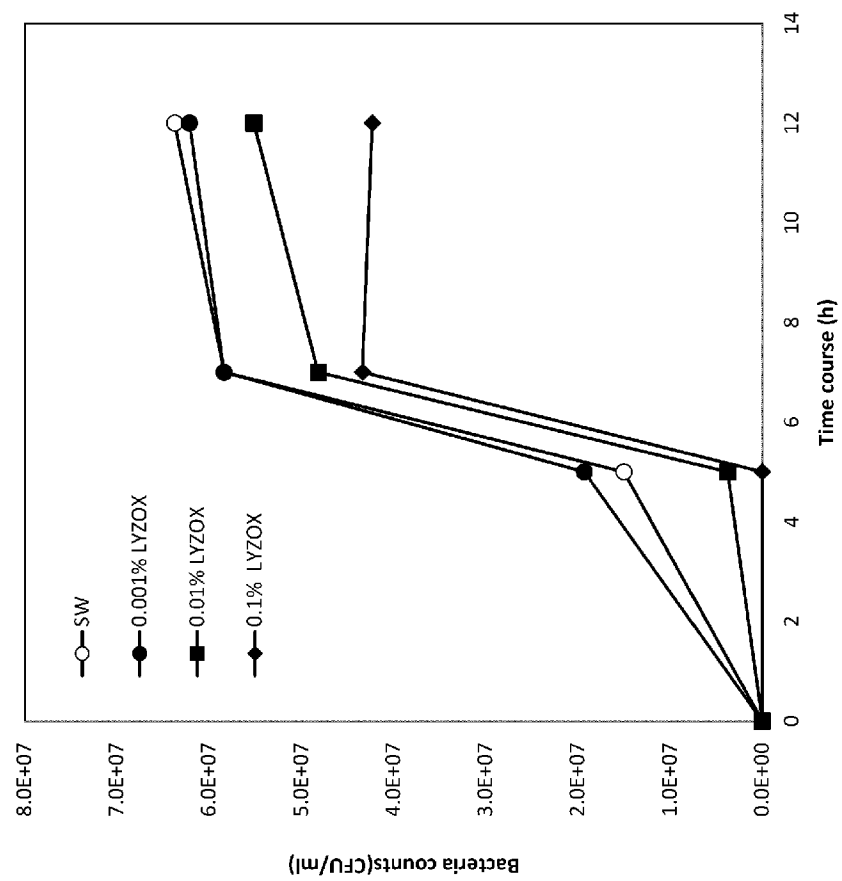
[図1]



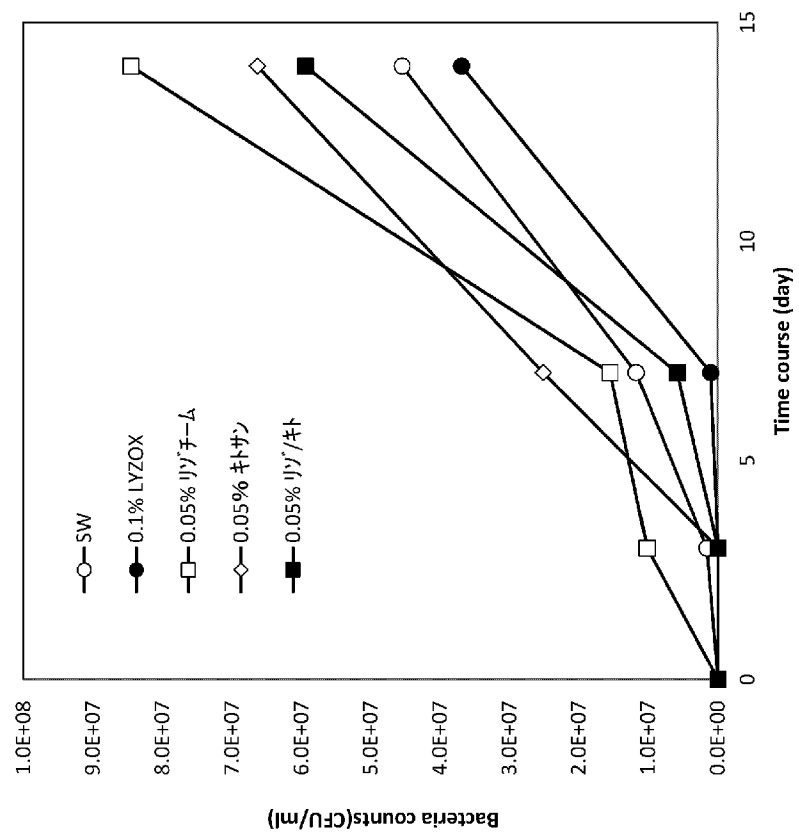
[図2]



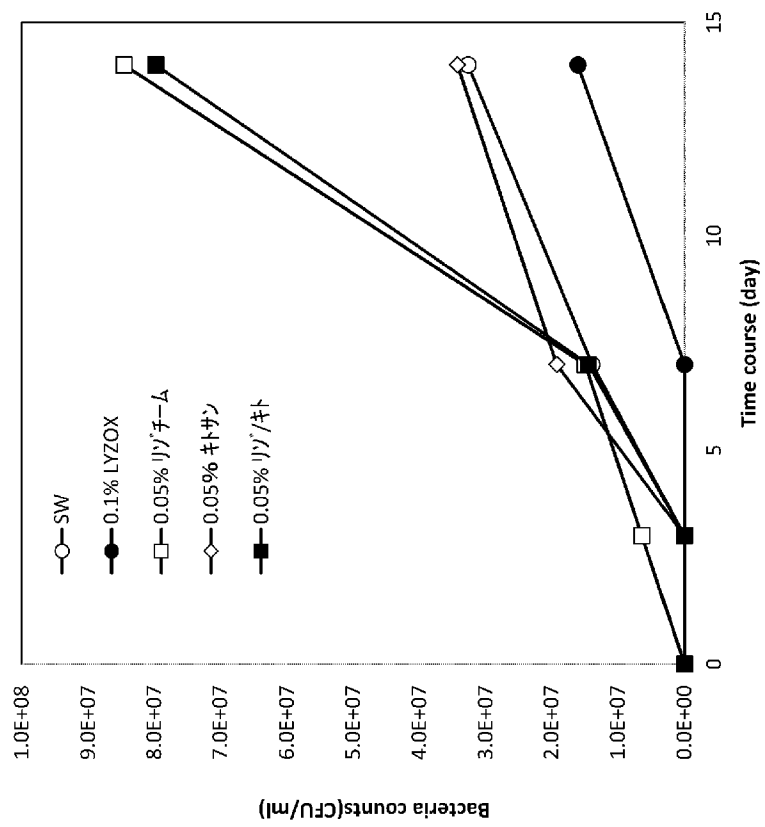
[図3]



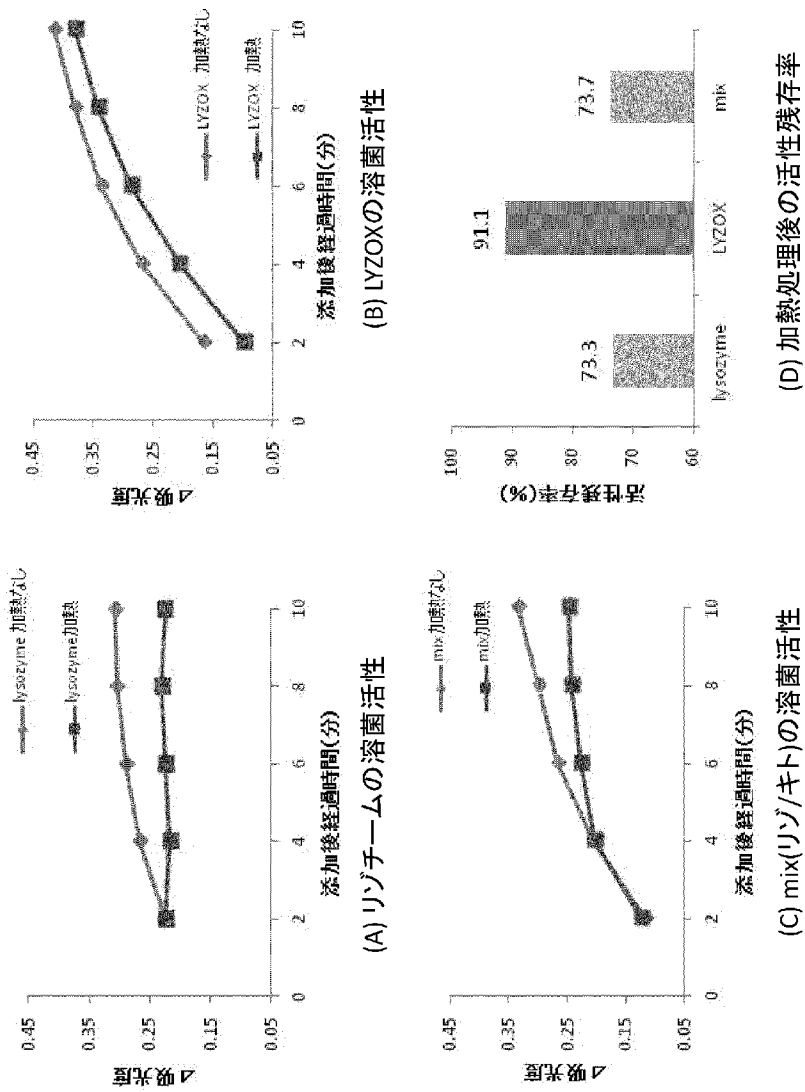
[図4]



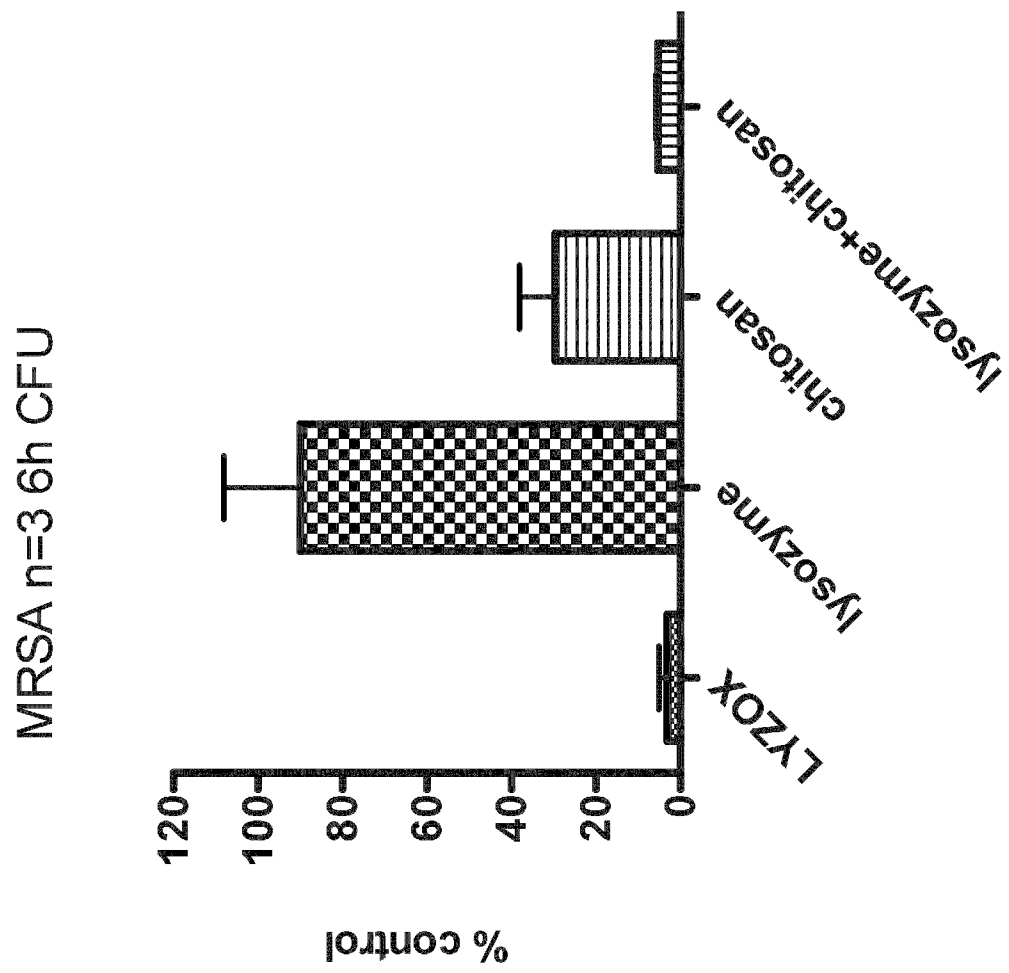
[図5]



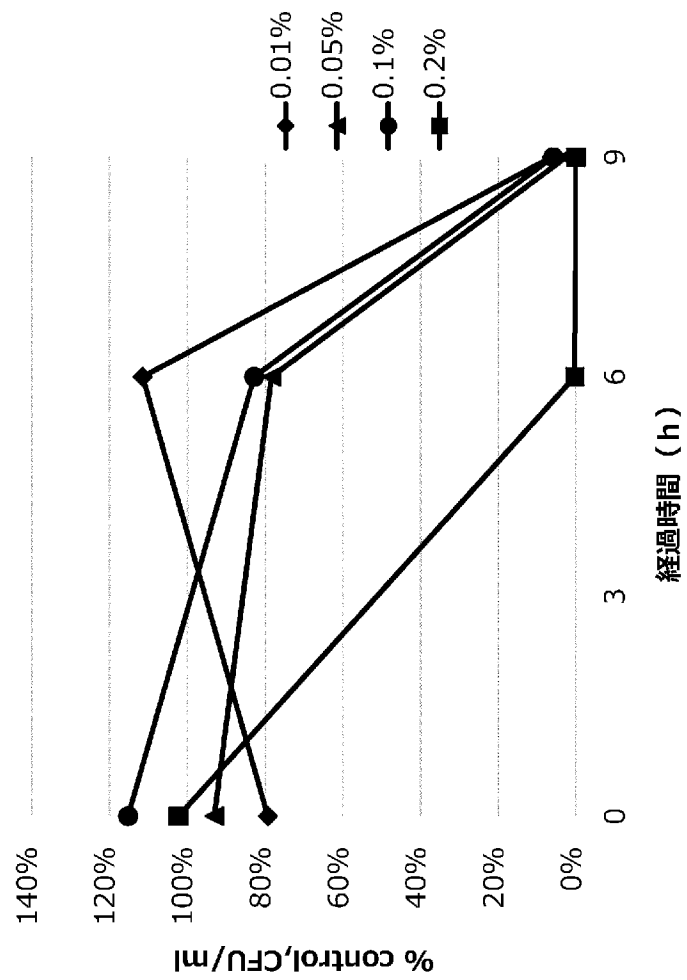
[図6]



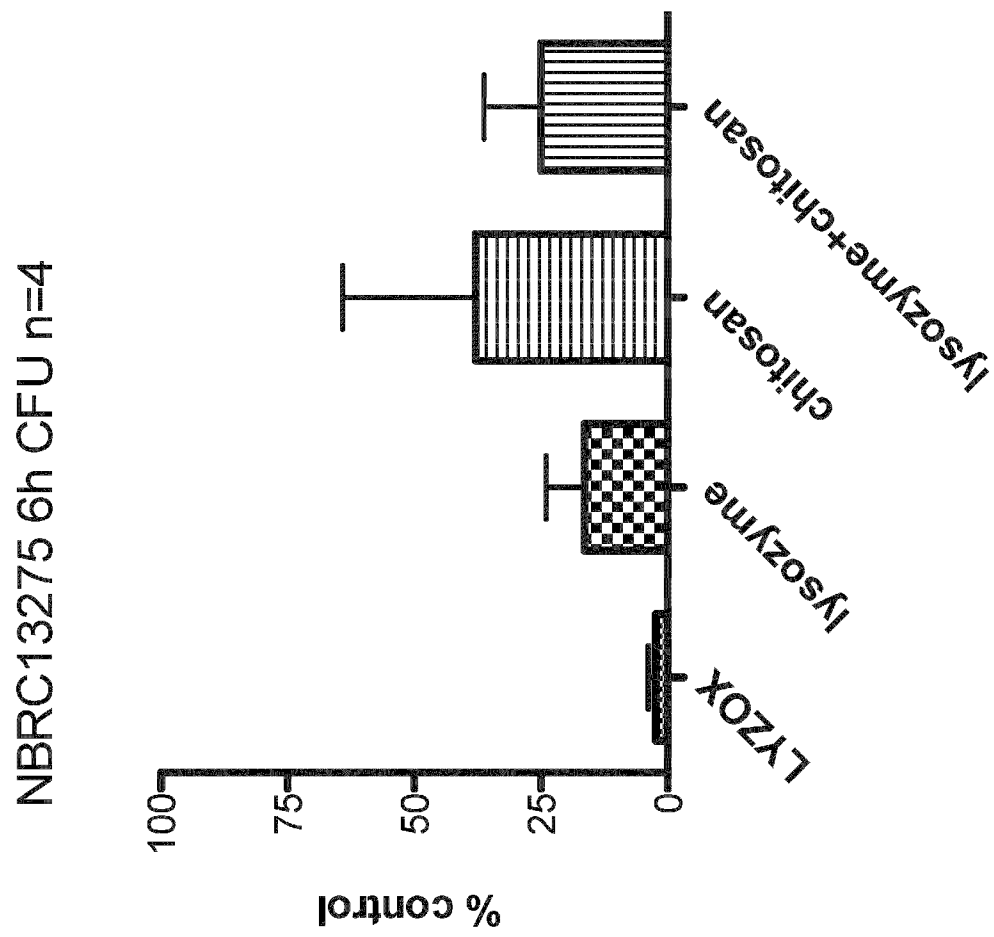
[図7]



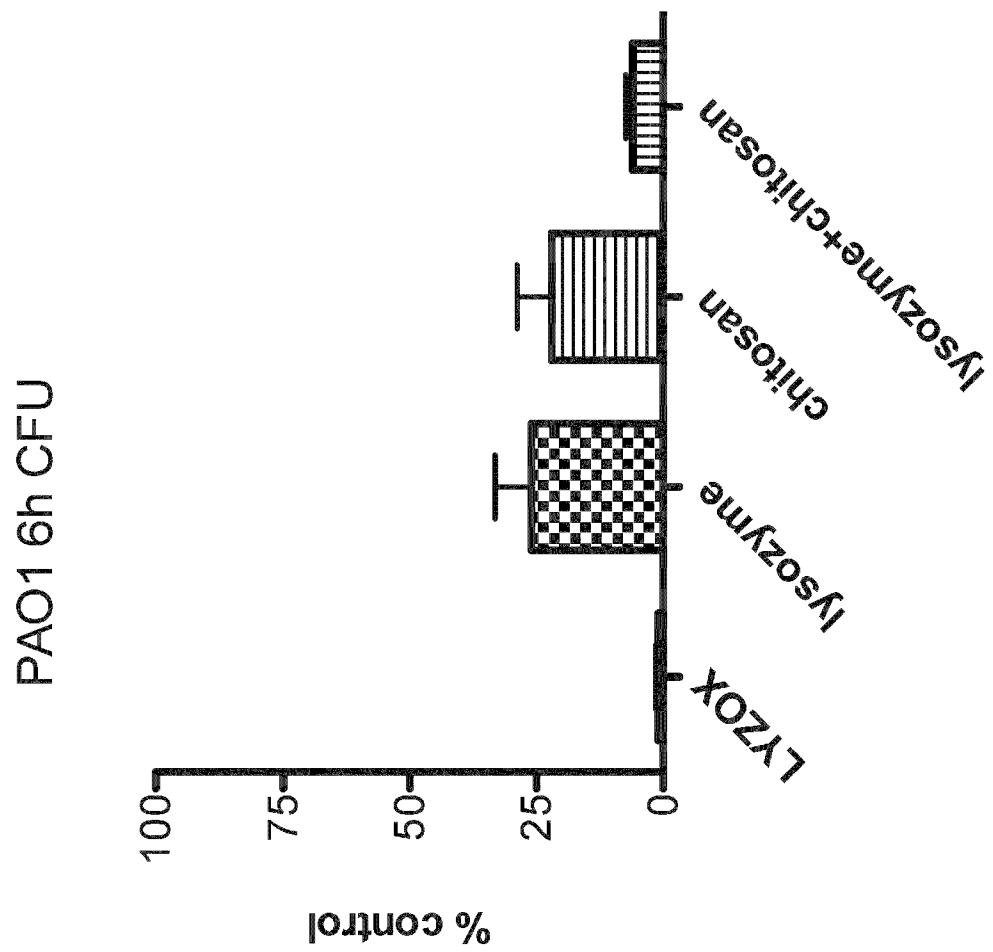
[図8]



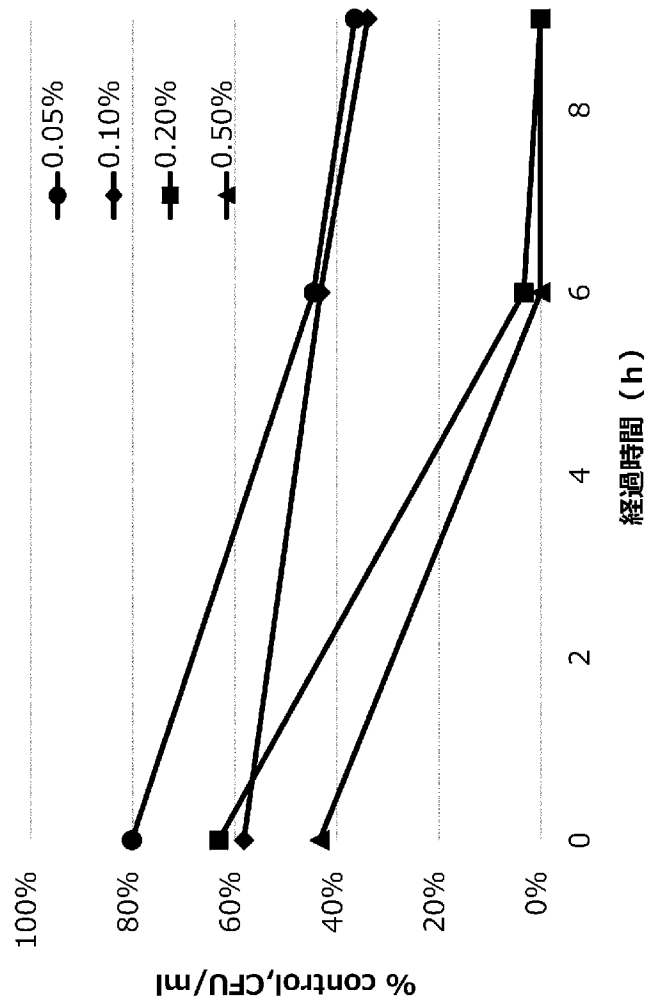
[図9]



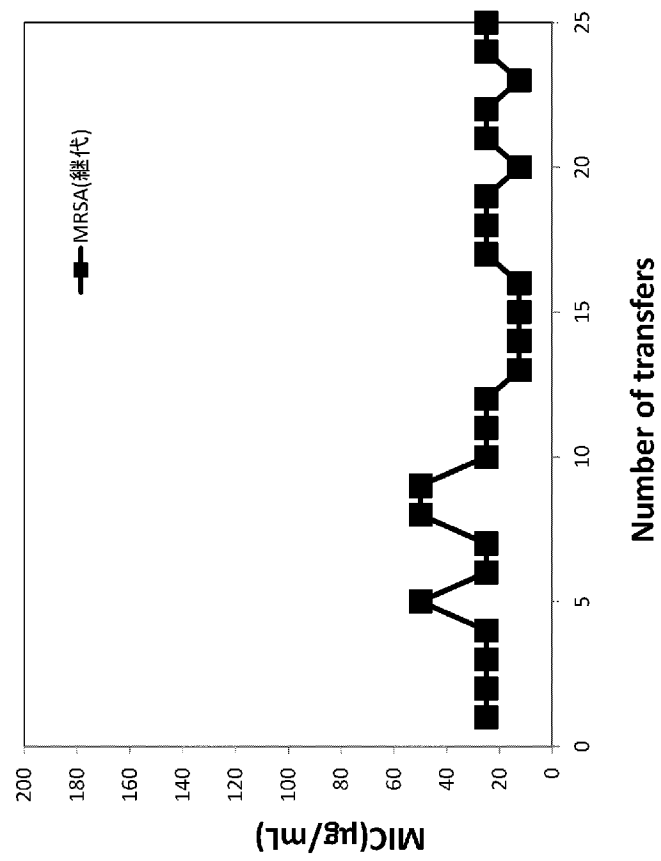
[図10]



[図11]

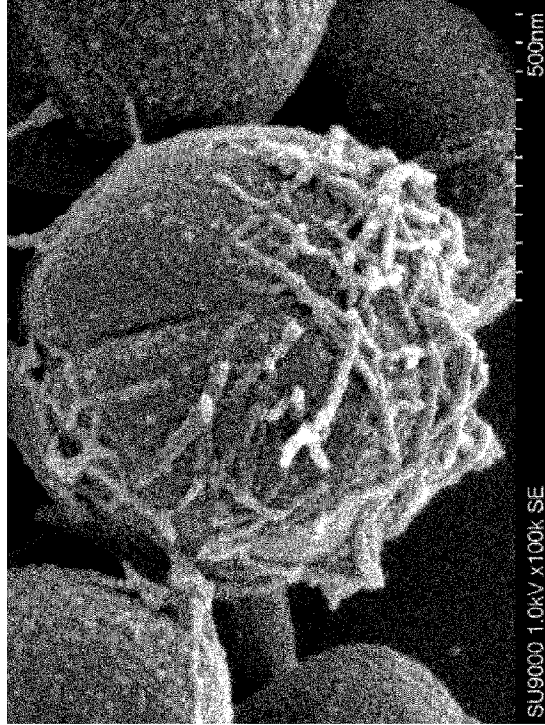


[図12]



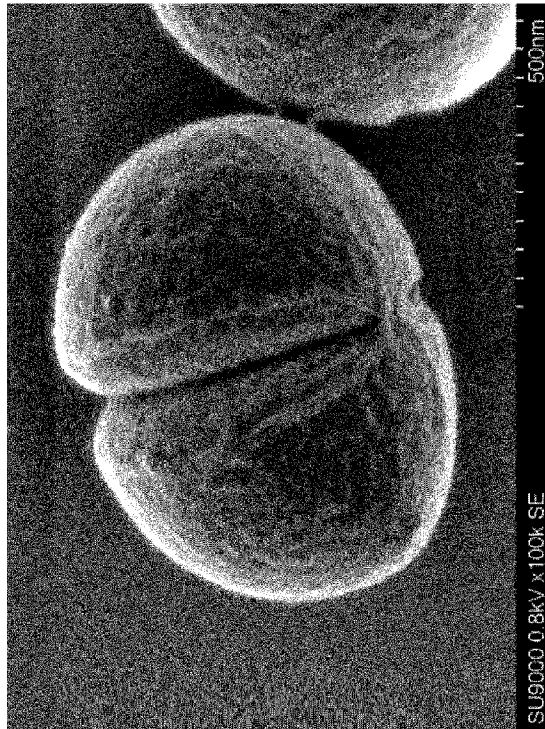
[図13]

【0.2% LYZOX処理】



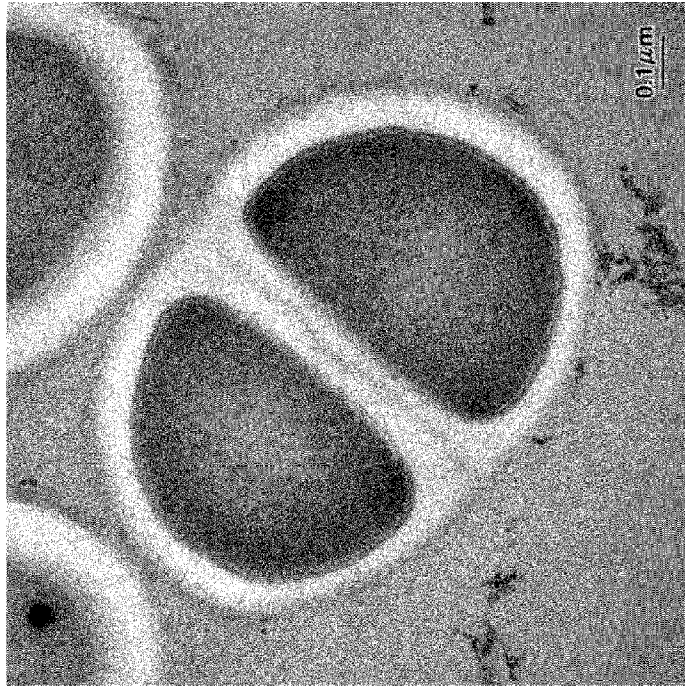
倍率 x100,000

【生理食塩水処理】



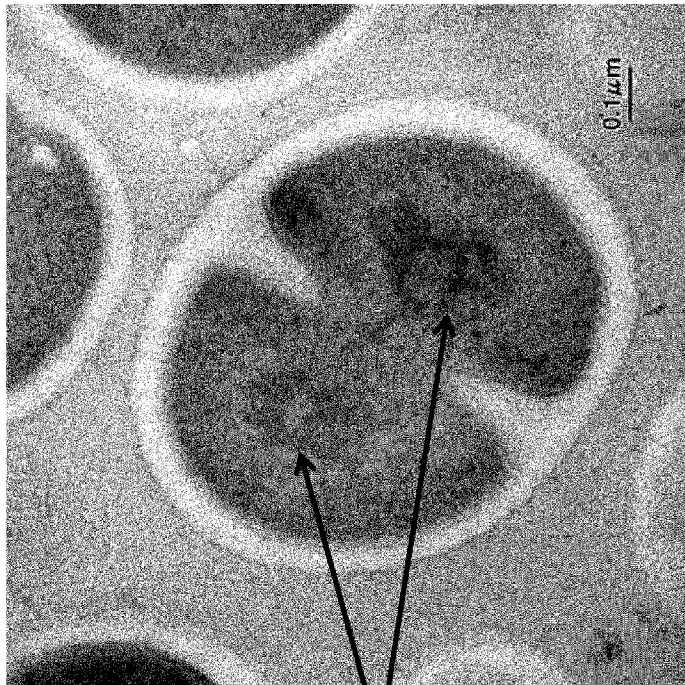
[図14]

【0.2% LYZOX処理】



倍率 x80,000

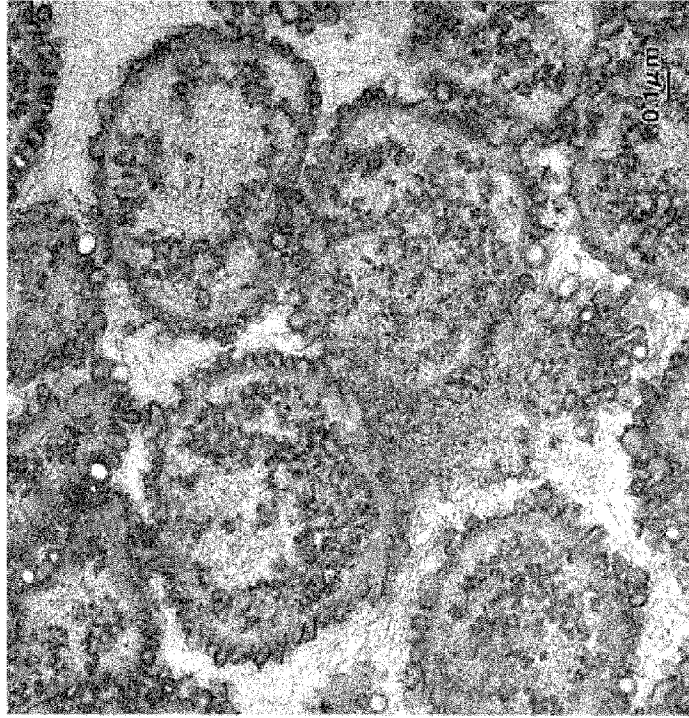
【生理食塩水処理】



線維状構造 (DNA)

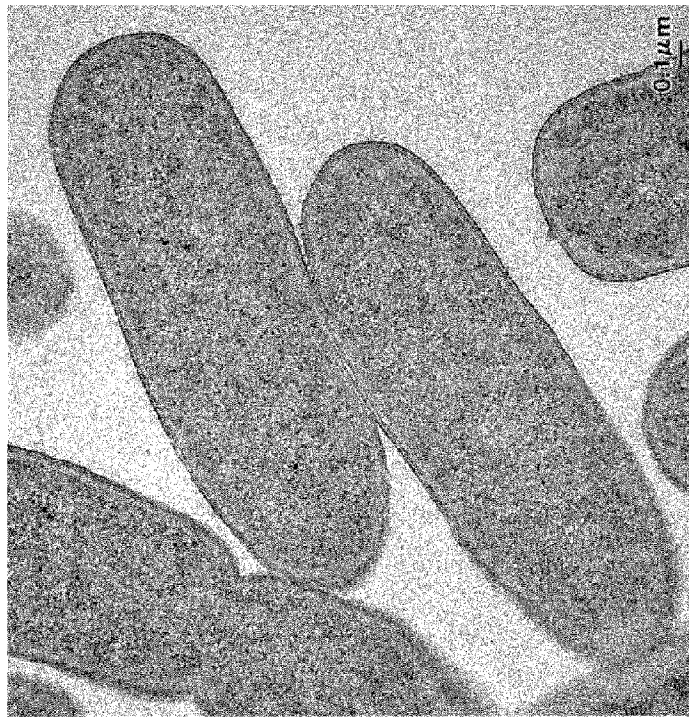
[図15]

【0.2% LYZOX処理】



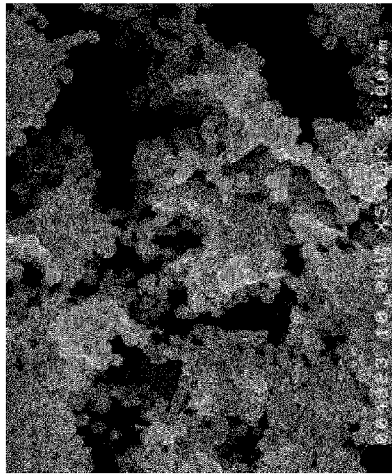
倍率 × 40,000

【生理食塩水処理】

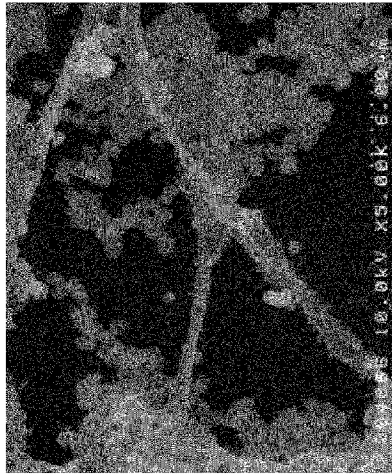


[図16]

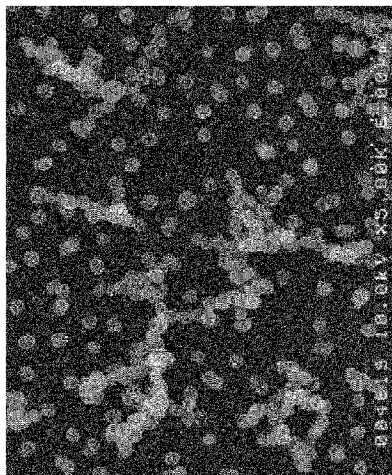
【0.05% リゾチーム】



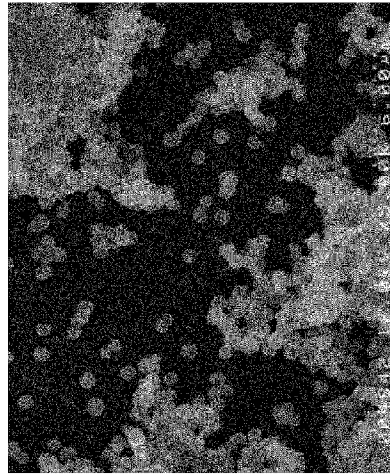
【0.1%リゾックス】



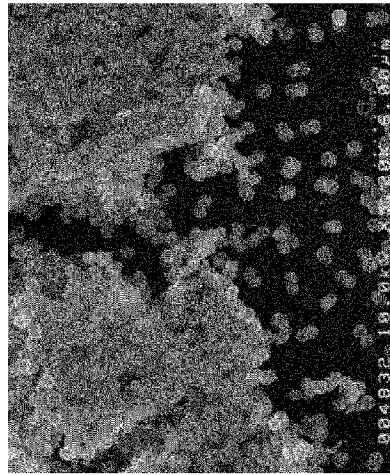
【生理食塩水】



【0.05% リゾ/キト mix】



【0.05% キトサン】



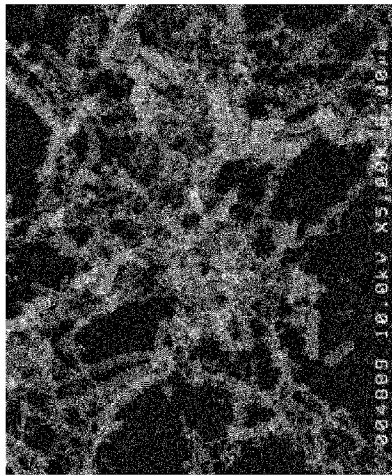
倍率 x 5,000

[図17]

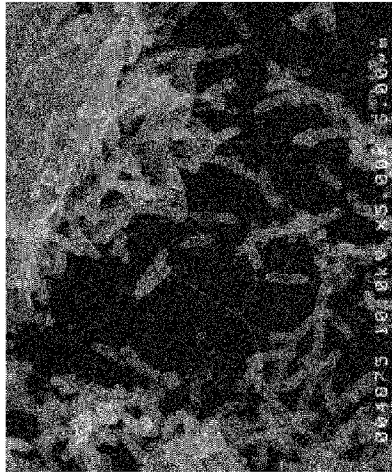
【生理食塩水】



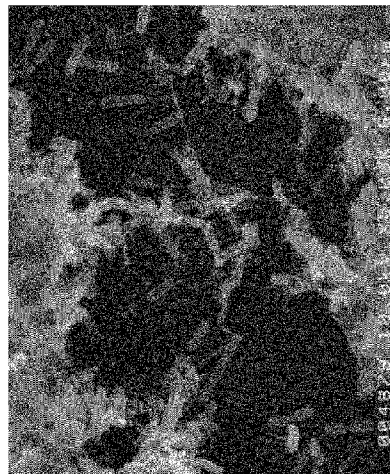
【0.1%リゾックス】



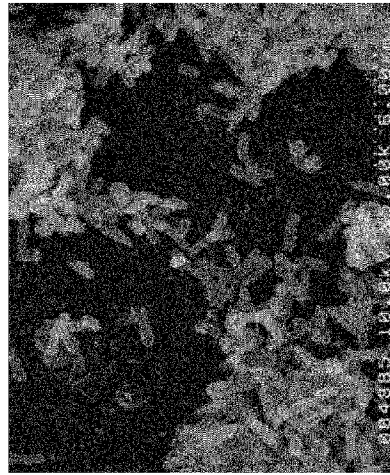
【0.05% リゾチーム】



【0.05% キトサン】

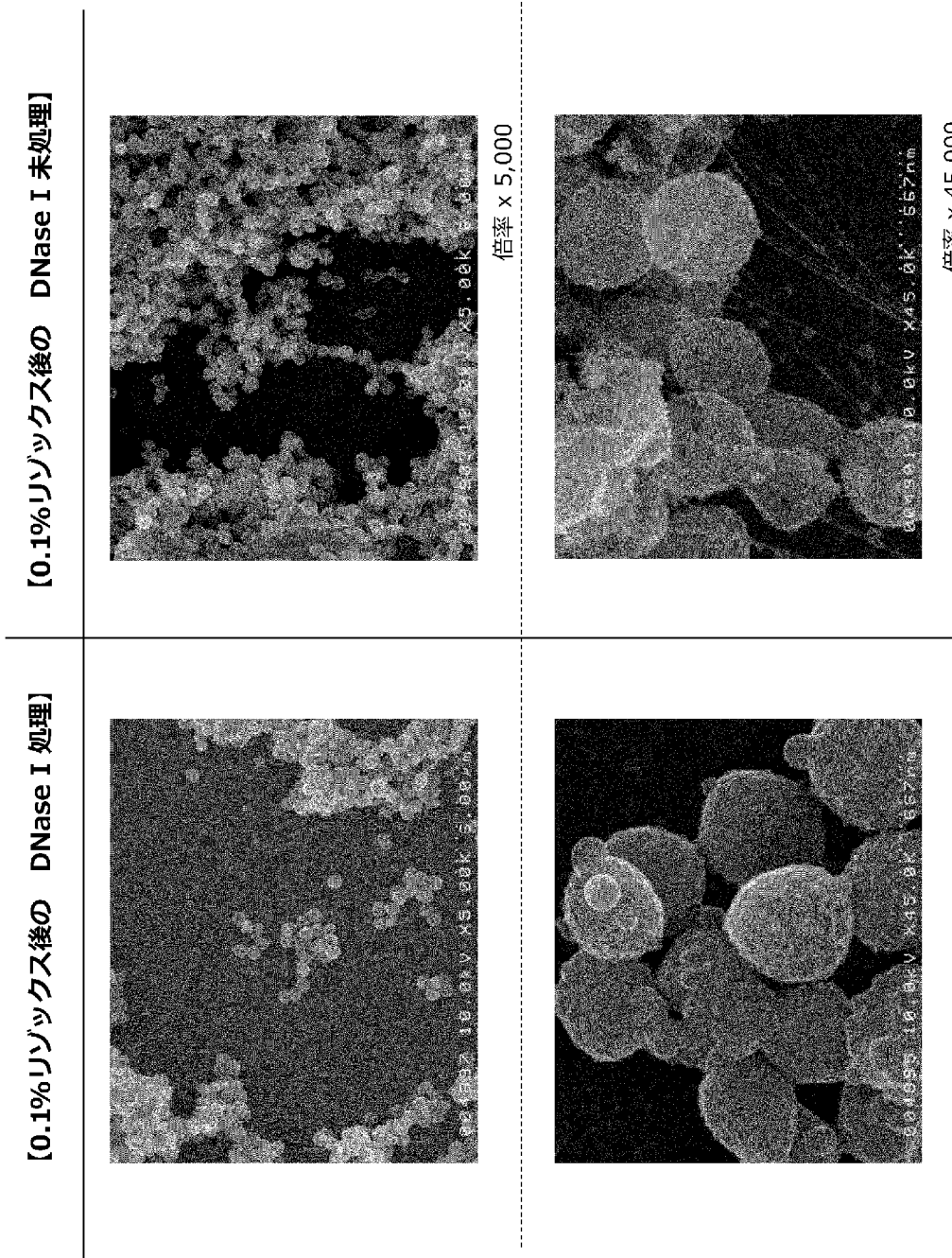


【0.05% リゾ/キト mix】

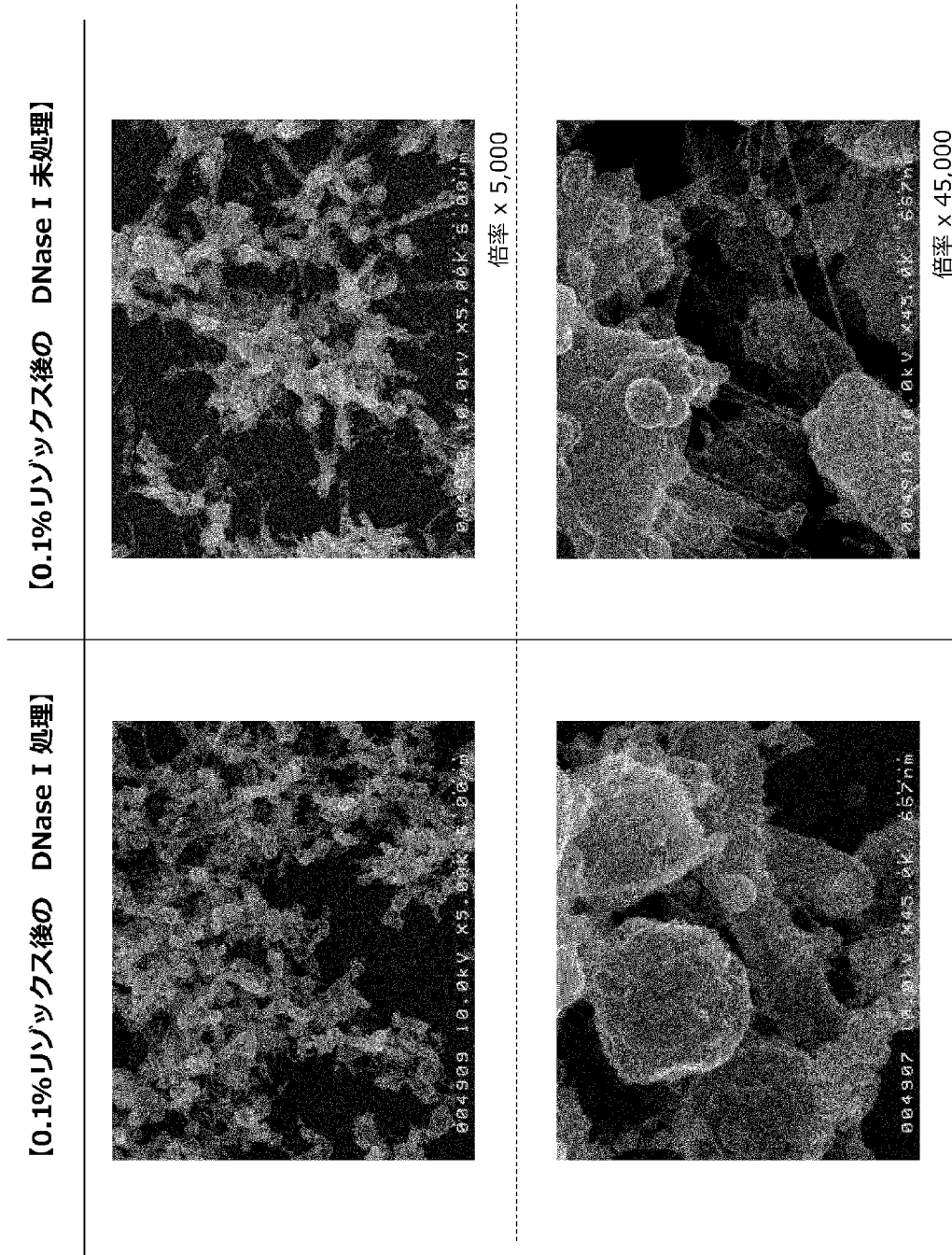


倍率 x 5,000

[図18]



[図19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/004157

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/46(2006.01)i, A01N43/16(2006.01)i, A01N63/00(2006.01)i, A01P3/00(2006.01)i, A61K31/722(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i

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)

A61K38/46, A01N43/16, A01N63/00, A01P3/00, A61K31/722, A61P31/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CApus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SONG Y., et al., Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates, Food Research International, 2002, Vol.35, p.459-466, Abstract, Materials and Methods, page 459, left column, lines 1 to 6	7 1-7
Y	WANG LD., et al., Bactericidal Properties of Chitosan and Lysozyme Composite System, Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2013, Vol.39, No.3, p.284-288, Abstract, Table 6, Table 7	1-7
A	KATO A., Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates, Food Sci.Technol.Res., 2002, Vol.8, No.3, p.193-199	1-7

☒ 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
16 February 2017 (16.02.17)

Date of mailing of the international search report
28 February 2017 (28.02.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/004157

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Rie KURASHIGE et al., "Lysozyme·Chitosan Fukugotai o Mochiita Ryokunokin·MRSA·M.avium complex ni Taisuru Zoshoku Yokusei Koka no Kento", Higashinohon Branch of Japanese Association for Infectious Diseases Kai Sokai·Higashinohon Branch of Japan Society of Chemotherapy Sokai Godo Gakkai Program·Shorokushu, 2016.09, page 146, 100	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61K38/46(2006.01)i, A01N43/16(2006.01)i, A01N63/00(2006.01)i, A01P3/00(2006.01)i,
A61K31/722(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i

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. A61K38/46, A01N43/16, A01N63/00, A01P3/00, A61K31/722, A61P31/04

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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 請求項の番号
X Y	SONG Y., et al., Emulsifying properties and bactericidal action of chitosan-lysozyme conjugates, Food Research International, 2002, Vol. 35, p. 459-466, Abstract, Materials and Methods, 459ページ左欄1-6行	7 1-7

☑ 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

の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

16.02.2017

国際調査報告の発送日

28.02.2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

山村 祥子

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

4U

9217

C (続き) . 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 請求項の番号
Y	WANG LD., et al., Bactericidal Properties of Chitosan and Lysozyme Composite System, Journal of East China University of Science and Technology (Natural Science Edition), 2013, Vol. 39, No. 3, p. 284-288, Abstract、Table 6、Table 7	1-7
A	KATO A., Industrial Applications of Maillard-Type Protein-Polysaccharide Conjugates, Food Sci. Technol. Res., 2002, Vol. 8, No. 3, p. 193-199	1-7
PX	倉重理絵 他, リゾチーム・キトサン複合体を用いた緑膿菌・MRSA・ M. avium complex に対する増殖抑制効果の検討, 日本感染症学会東日本地方会総会・日本化学療法学会東日本支部総 会合同学会プログラム・抄録集, 2016. 09, 1 4 6 ページ 1 0 0	1-7