

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-502179

(P2015-502179A)

(43) 公表日 平成27年1月22日 (2015.1.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 2/16 (2006.01)	A 6 1 L 2/16 Z	2 H 0 0 6
A 6 1 K 31/7016 (2006.01)	A 6 1 K 31/7016	4 B 0 1 4
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 B 0 2 1
A 6 1 K 31/7004 (2006.01)	A 6 1 K 31/7004	4 C 0 5 8
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 86 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-515857 (P2014-515857)	(71) 出願人	513314001
(86) (22) 出願日	平成24年6月1日 (2012.6.1)		イヴァノーヴァ、スヴェトラナ エー.
(85) 翻訳文提出日	平成26年2月7日 (2014.2.7)		アメリカ合衆国、32708 フロリダ州
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/040408		、ウィンター スプリング、133 ヘリ
(87) 国際公開番号	W02012/173796		テイジ パーク ストリート
(87) 国際公開日	平成24年12月20日 (2012.12.20)	(74) 代理人	100104411
(31) 優先権主張番号	13/481,787		弁理士 矢口 太郎
(32) 優先日	平成24年5月26日 (2012.5.26)	(72) 発明者	イヴァノーヴァ、スヴェトラナ エー.
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、32708 フロリダ州
(31) 優先権主張番号	61/520,654		、ウィンター スプリング、133 ヘリ
(32) 優先日	平成23年6月13日 (2011.6.13)		テイジ パーク ストリート
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

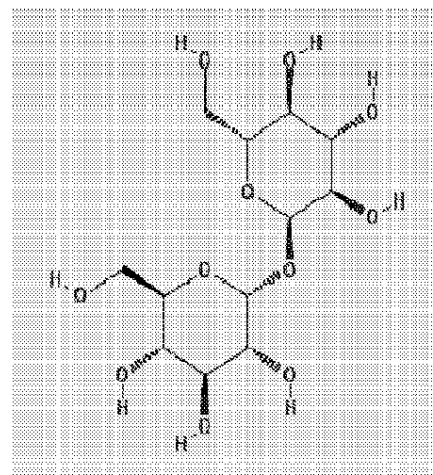
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオフィルムを予防および処理するための組成物および方法

(57) 【要約】

【解決手段】 微生物膜の発達における二糖類トレハロースの役割が発見されたことに基づき、バイオフィルムを処理するための組成物および方法が開示される。身体で伝搬されるバイオフィルムを全身のおよび局所的に治療する様々な実施形態において、前記方法は、バイオフィルム形成部位でバイオフィルムのゲル基質を適切に分解するのに十分な提示時間、トレハロース、トレハロースを分解する酵素を他の単糖類と併用して投与する工程を含む。前記方法は、前記バイオフィルムに存在するタンパク質および脂質を分解するタンパク分解酵素、線維素溶解酵素、および脂肪分解酵素などの他の酵素と併用投与する工程、および前記バイオフィルムの根底にある特殊なタイプの感染性病原体に対して抗菌薬を投与する工程も含む。さらに、医療装置表面のバイオフィルムおよび工業環境に存在するバイオフィルムの分解に対処する方法も開示される。

【選択図】 図1

Fig. 1a Trehalose Chemical Structure (C₁₂H₂₂O₁₁)

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体液および組織に曝露した表面を呈示する医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法であって、前記表面にトレハロースを接触させる工程を有する方法。

【請求項 2】

請求項 1 記載の方法において、前記方法は、さらに、
前記医療装置の縫合用カフ構造にトレハロースを含浸させる工程と、
前記カフを人工弁のアセンブリに取り付ける工程と
を有するものである方法。

【請求項 3】

請求項 2 記載の方法において、この方法は、さらに、
固定化したトレハロースコーティングで前記人工弁をコーティングする工程を有するものである方法。

【請求項 4】

請求項 1 記載の体液および組織に曝露した表面を呈示する医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記方法は中心静脈カテーテルおよび導尿カテーテルにおけるバイオフィルム形成および増殖を予防するものであり、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液、および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 のフラッシュ溶液を作成する工程と、

前記カテーテルを前記第 1 のフラッシュ溶液で流す工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、および b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 2 のフラッシュ溶液を作成する工程と、

前記カテーテルを前記第 2 のフラッシュ溶液で流す工程と
を有するものである方法。

【請求項 5】

請求項 4 記載の体液および組織に曝露した表面を呈示する医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、この方法は、さらに、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および b) 多菌性抗生剤 (polymicrobial antibiotics) の水溶液または食塩水溶液、および c) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 のフラッシュ溶液を作成する工程と、

前記カテーテルを前記第 3 のフラッシュ溶液で流す工程と
を含むものである方法。

【請求項 6】

請求項 1 記載の体液および組織に曝露した表面を呈示する医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記方法は、さらに、

トレハロースを支持構造化合物に固定する工程と、

前記医療装置のバイオフィルムに脆弱な表面に前記支持構造化合物を結合する工程と
を有するものである方法。

【請求項 7】

請求項 6 記載の体液および組織に曝露した表面を呈示する医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記装置は a) 中心静脈カテーテル、b) 導尿カテーテル、c) 内視鏡、および d) 医療用インプラントから成る群から選択されるものである方法。

【請求項 8】

請求項 7 記載の体液および組織に曝露した表面を呈示する医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記方法は、さらに、

10

20

30

40

50

前記装置表面に抗菌薬を含浸させる工程を有するものである方法。

【請求項 9】

請求項 1 記載の体液および組織に曝露した表面を呈示する医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記方法は、さらに、

高分子の付着に抵抗性を示す表面を前記装置に作成する工程と、

前記表面内にトレハロースを固定化する工程と

を有するものである方法。

【請求項 10】

体外に使用される医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法であって、前記方法が a) トレハロースに前記装置を曝露させる工程と、 b) 前記装置にトレハロースを付着させる工程とから成る群から選択される方法。

10

【請求項 11】

請求項 10 記載の医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記方法はコンタクトレンズおよびレンズケースのバイオフィルム形成および増殖を予防し、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液、および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 のレンズ処理溶液を作成する工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、および b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 2 のレンズ処理溶液を作成する工程と、

20

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および c) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 のレンズ処理溶液を作成する工程と、

有効となる提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で、前記処理溶液をレンズおよびレンズケースに適用する工程と

を有するものである方法。

【請求項 12】

請求項 10 記載の医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記方法は、さらに、

30

トレハロースを含む持続放出製剤を作成する工程と、

前記製剤を前記医療装置のバイオフィルムに脆弱な表面に結合する工程と

を有するものである方法。

【請求項 13】

請求項 12 記載の方法において、前記製剤は持続放出製剤中に少なくとも 1 つの抗菌薬を含むものである方法。

【請求項 14】

請求項 10 記載の医療装置のバイオフィルム形成および増殖を予防する方法において、前記方法は、さらに、

40

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液、および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液を作成する工程と、

前記医療装置を前記第 1 の処理溶液に液浸させる工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、および b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液、d) キレート剤、および e) 酵素安定剤から成る群から選択される第 2 の処理溶液を作成する工程と、

前記医療装置を前記第 2 の処理溶液に液浸させる工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および c) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成

50

る群から選択される第3の処理溶液を作成する工程と、

前記医療装置を前記第3の処理溶液に液浸させる工程と

を有し、前記液浸が有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項15】

請求項14記載の方法において、前記第1の処理溶液は、トレハラーゼの酵素活性を最適にする温度で温度管理されるものである方法。

【請求項16】

請求項14記載の方法において、この方法は、前記バイオフィームで汚染された表面に超音波を照射する追加の工程を含むものである方法。

10

【請求項17】

請求項14記載の方法において、前記医療装置が透析装置の構成要素を有するものである方法。

【請求項18】

請求項10記載の医療装置のバイオフィーム形成および増殖を予防する方法において、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液、およびb) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される処理溶液を作成する工程と、

前記医療装置のバイオフィームで汚染された表面を前記処理溶液に液浸させる工程と、

20

前記溶液および前記液浸した表面に、前記バイオフィーム分解に超音波を使用してトレハロース活性を得るために適した周波数および強度の超音波を照射する工程と

を有するものである方法。

【請求項19】

請求項18記載の医療装置のバイオフィーム形成および増殖を予防する方法において、この方法は、この後さらに、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、およびc) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第2の処理溶液を作成する工程と、

前記医療装置のバイオフィームで汚染された表面を前記第2の処理溶液に液浸させる工程と、

30

前記第2の溶液および液浸した表面に、前記バイオフィーム分解に超音波を使用してトレハロース活性を得るために適した周波数および強度の超音波を照射する工程と、

a) キレート剤の水溶液または食塩水溶液、およびb) 酵素安定剤の水溶液から成る群から選択される第3の処理溶液を作成する工程と、

前記医療装置のバイオフィームで汚染された表面を前記第3の処理溶液に液浸させる工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、およびc) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第4の処理溶液を作成する工程と、

40

前記医療装置のバイオフィームで汚染された表面を前記第4の処理溶液に液浸させる工程と

を順次含み、前記液浸が有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項20】

請求項10記載の医療装置のバイオフィーム形成および増殖を予防する方法において、歯科用装置の送水管のバイオフィーム予防をターゲットとするものであり、前記方法は、さらに、多段階の手順として、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液、およびb) トレハロースと他の単糖

50

類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第1の処理溶液を作成する工程と、

有効となるのに十分な時間、バイオフィルムを曝露するため、前記第1の処理溶液を前記歯科用装置の送水管に注入する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、c) 脂肪分解酵素、d) キレート剤、およびe) 酵素安定剤から成る群から選択される試薬を含む、第2の処理溶液を作成する工程と、

有効となるのに十分な時間、バイオフィルムを曝露するため、前記第2の処理溶液を前記歯科用装置の送水管に注入する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、およびc) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第3の処理溶液を作成する工程と、

有効となるのに十分な時間、バイオフィルムを曝露するため、前記第3の処理溶液を前記歯科用装置の送水管に注入する工程と

を有し、前記処理溶液の前記注入が、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項21】

生物においてバイオフィルムによる感染を治療する方法であって、前記方法は第1のトレハロース製剤を前記感染に投与する工程を有する方法。

【請求項22】

請求項21記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、この方法は、多段階の手順を用いた発生部位の感染の局所治療を含むものであり、前記多段階の手順は、

a) トレハロースおよびb) トレハロースと他の単糖類から成る群から選択される製剤を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、およびc) 脂肪分解酵素から成る群から選択される製剤を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される製剤を投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項23】

請求項21記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、前記方法は、さらに、

a) 遅延放出型のトレハロースのみおよびb) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、およびc) 脂肪分解酵素から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と

を有し、前記トレハロースおよび単糖類の前記遅延放出が、前記トレハロースおよび単糖類の前記投与されたタンパク分解酵素への曝露を回避し、上部消化管に天然で存在するタンパク分解酵素への曝露を回避するように調節されるものである方法。

【請求項24】

請求項23記載のバイオフィルムによる感染を全身的に治療する方法において、滲出のないバイオフィルムによる中耳炎および滲出が認められる中耳炎の治療をターゲットしているが、鼓室チューブは利用しないものである方法。

【請求項25】

請求項24記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、滲出のないバイ

10

20

30

40

50

オフィルムによる中耳炎および滲出が認められる中耳炎の治療をターゲットしているが、鼓室チューブは利用しないものであり、前記方法は、さらに、局所治療方法として、

鼻腔粘膜に局所的に、a) トレハロースのみおよびb) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を投与する工程と、

鼻腔粘膜に局所的に、a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、およびc) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を投与する工程と、

鼻腔粘膜に局所的に、a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物を投与する工程と

を有し、前記鼻腔粘膜への前記化合物の前記局所投与は、前記鼻腔および副鼻腔から中耳への感染拡大を治療するために利用され、前記投与それぞれは、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

10

【請求項 26】

請求項 25 記載の方法において、鼓室チューブを留置し、滲出が認められる中耳炎をターゲットするものであり、この方法は、さらに、

前記鼓室チューブの表面をa) トレハロース、b) 他の単糖類、c) 前記感染に存在する前記病原菌に特異的な抗生剤、d) 多菌性抗生剤、およびe) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物で覆う工程と、

耳に前記チューブを留置する工程と

を有するものである方法。

20

【請求項 27】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみおよびb) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、およびc) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

30

【請求項 28】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、消化管感染の治療をターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、

a) トレハロースのみ、b) 遅延放出型のトレハロースのみ、c) トレハロースと他の単糖類との併用、およびd) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、c) 脂肪分解酵素、およびd) 他の消化酵素から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と

を有し、前記トレハロースおよび単糖類の前記遅延放出が、前記トレハロースおよび単糖類の前記投与されたタンパク分解酵素への曝露を回避し、上部消化管に天然で存在するタンパク分解酵素への曝露を回避するように調節されるものである方法。

40

【請求項 29】

請求項 28 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、下部消化管感染を局所的に治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、多段階の局所手順として、

かん腸により、バイオフィルム形成部位に、a) トレハロースのみの水溶液または食塩

50

水溶液、および b) トレハロースと他の単糖類との混合水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される化合物を投与する工程と、

かん腸により、バイオフィーム形成部位に、a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される化合物を投与する工程と、

かん腸により、バイオフィーム形成部位に、a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および c) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される化合物を投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で、有効となるのに十分な量の化合物を用いて行われるものである方法。

10

【請求項 30】

請求項 21 記載のバイオフィームによる感染を治療する方法において、消化管感染を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、

a) トレハロースのみ、b) 遅延放出型のトレハロースのみ、c) トレハロースと他の単糖類との併用、および d) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物と消化酵素を併用し、消化管に投与する工程を有するものである方法。

【請求項 31】

請求項 21 記載のバイオフィームによる感染を治療する方法において、上気道のバイオフィームによる感染を局所的に治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、多段階の手順として、

20

a) 点滴注入、b) 洗浄、c) 噴霧、d) ゲル塗布、および e) 軟膏塗布、またはそのいずれかの組み合わせから成る群から選択される方法により、a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物をバイオフィーム形成部位に投与する工程と、

a) 点滴注入、b) 洗浄、c) 噴霧、d) ゲル塗布、および e) 軟膏塗布、またはそのいずれかの組み合わせから成る群から選択される方法により、a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物をバイオフィーム形成部位に投与する工程と、

30

a) 点滴注入、b) 洗浄、c) 噴霧、d) ゲル塗布、および e) 軟膏塗布、またはそのいずれかの組み合わせから成る群から選択される方法により、a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物をバイオフィーム形成部位に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 32】

請求項 31 記載のバイオフィームによる感染を治療する方法において、上気道のバイオフィームによる感染を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、全身投与法として、

40

a) 遅延放出型のトレハロースのみおよび b) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と

を有し、前記トレハロースおよび単糖類の前記遅延放出が、前記トレハロースおよび単糖類の前記投与されたタンパク分解酵素への曝露を回避し、上部消化管に天然で存在するタンパク分解酵素への曝露を回避するように調節されるものである方法。

50

【請求項 3 3】

請求項 3 1 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、上気道のバイオフィルムによる感染を治療することをターゲットとしたものであり、全身投与方法として、

a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と

を含み、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

10

【請求項 3 4】

請求項 3 1 記載の方法において、緑膿菌感染をターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、

アルギン酸リアーゼ酵素の投与を有し、前記酵素は多糖類アルギン酸を分解するために利用されるものである方法。

【請求項 3 5】

請求項 3 1 記載の方法において、連鎖球菌属感染をターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、

デキストラナーゼ酵素の投与を有し、前記酵素は多糖類デキストランを分解するために利用されるものである方法。

20

【請求項 3 6】

請求項 2 1 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、下気道のバイオフィルムによる感染を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、全身投与方法として、

a) 遅延放出型のトレハロースのみおよび b) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と

を有し、前記トレハロースおよび単糖類の前記遅延放出が、前記トレハロースおよび単糖類の前記投与されたタンパク分解酵素への曝露を回避し、上部消化管に天然で存在するタンパク分解酵素への曝露を回避するように調節されるものである方法。

30

【請求項 3 7】

請求項 3 6 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、下気道のバイオフィルムによる感染を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、下気道を治療する工程として、

a) 点滴注入、b) 洗浄、c) 噴霧、d) ゲル塗布、および e) 軟膏塗布、またはそのいずれかの組み合わせから成る群から選択される方法により、a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を鼻腔および副鼻腔に投与する工程と、

a) 点滴注入、b) 洗浄、c) 噴霧、d) ゲル塗布、および e) 軟膏塗布、またはそのいずれかの組み合わせから成る群から選択される方法により、a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を鼻腔および副鼻腔に投与する工程と、

a) 点滴注入、b) 洗浄、c) 噴霧、d) ゲル塗布、および e) 軟膏塗布、またはそのいずれかの組み合わせから成る群から選択される方法により、a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物

40

50

を鼻腔および副鼻腔に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 38】

請求項 37 記載の方法において、前記他の単糖類が a) アルギン酸リアーゼおよび b) デキストラナーゼから成る群から選択される化合物であり、前記単糖類は多糖類アルギン酸およびデキストランを分解するために利用されるものである方法。

【請求項 39】

請求項 36 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、下気道のバイオフィルムによる感染を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、さらに、

多段階の局所治療で気管支肺胞洗浄を行う工程を有するものであり、この工程は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、および b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 2 の処理溶液を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および c) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 の処理溶液を投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 40】

請求項 39 記載の方法において、前記他の単糖類が a) アルギン酸リアーゼおよび b) デキストラナーゼから成る群から選択される化合物であり、前記単糖類は多糖類アルギン酸およびデキストランを分解するために利用されるものである方法。

【請求項 41】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、下気道のバイオフィルムによる感染を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、全身投与方法として、

a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 42】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、自然弁心内膜炎、感染性心内膜炎、および留置カテーテル敗血症を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、全身投与方法として、

a) 遅延放出型のトレハロースのみおよび b) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から

10

20

30

40

50

選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と

を有し、前記トレハロースおよび単糖類の前記遅延放出が、前記トレハロースおよび単糖類の前記投与されたタンパク分解酵素への曝露を回避し、上部消化管に天然で存在するタンパク分解酵素への曝露を回避するように調節されるものである方法。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 記載の方法において、この方法は、多段階の手順を用いた発生部位の感染の局所治療を含み、前記多段階の手順は、

a) トレハロースおよび b) トレハロースと他の単糖類から成る群から選択される第 1 の製剤を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される第 2 の治療製剤を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される第 3 の治療製剤を投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 4 4】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、自然弁心内膜炎、感染性心内膜炎、および留置カテーテル敗血症を治療することをターゲットとしたものであり、この方法は、全身投与法として、

a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 4 5】

請求項 2 1 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、前立腺炎の局所治療を含み、多段階の手順により、カテーテルから前立腺管内のバイオフィルム形成部位に直接投与するものであり、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液、および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、および b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 2 の処理溶液を投与する工程と、

タンパク分解酵素および線維素溶解酵素を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および c) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 の処理溶液を投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、バイオフィルム

10

20

30

40

50

による慢性細菌性前立腺炎の全身療法を含むものであり、前記方法は、さらに、

a) 遅延放出型のトレハロースのみおよびb) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、およびc) 脂肪分解酵素から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と

を有し、前記トレハロースおよび単糖類の前記遅延放出が、前記トレハロースおよび単糖類の前記投与されたタンパク分解酵素への曝露を回避し、上部消化管に天然で存在するタンパク分解酵素への曝露を回避するように調節されるものである方法。

10

【請求項47】

請求項45記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、バイオフィルムによる慢性細菌性前立腺炎の全身療法を含むものであり、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみおよびb) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、およびc) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

20

【請求項48】

請求項21記載のバイオフィルムによる尿路感染を治療する方法において、以下の多段階の手順による膀胱への点滴注入により上記感染を局所的に治療する工程を有するものであり、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液およびb) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第1の処理溶液を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、およびb) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、およびc) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第2の処理溶液を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、およびc) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第3の処理溶液を投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

30

【請求項49】

請求項48記載のバイオフィルムによる尿路感染を治療する方法において、バイオフィルムによる尿路感染の全身療法を含むものであり、前記方法は、さらに、

a) 遅延放出型のトレハロースのみおよびb) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、およびc) 脂肪分解酵素から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、およびc) 他の抗菌薬から成る群から選択される消化管化合物を投与する工程と

を有し、前記トレハロースおよび単糖類の前記遅延放出が、前記トレハロースおよび単糖類の前記投与されたタンパク分解酵素への曝露を回避し、上部消化管に天然で存在するタンパク分解酵素への曝露を回避するように調節されるものである方法。

40

50

【請求項 50】

請求項 48 記載のバイオフィルムによる尿路感染を治療する方法において、バイオフィルムによる尿路感染の全身療法を含むものであり、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類との併用から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と、

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤、b) 多菌性抗生剤、および c) 他の抗菌薬から成る群から選択される化合物を全身に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

10

【請求項 51】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、眼球のバイオフィルムによる感染をターゲットとしたものであり、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液を眼に投与する工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 2 の処理溶液を眼に投与する工程と、

20

a) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および c) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 の処理溶液を眼に投与する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 52】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、歯牙感染および歯周炎をターゲットとしたものであり、前記方法は、さらに、

30

トレハロースと、a) 口内洗浄液、b) ジェル、および c) 歯磨き粉から成る群から選択される化合物とを併用した治療用製剤を作成する工程と、

前記製剤を歯および口腔組織に投与する工程と

を有するものである方法。

【請求項 53】

請求項 52 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、歯牙感染および歯周炎をターゲットとしたものであり、前記製剤はさらに他の単糖類を有するものである方法。

【請求項 54】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、歯の清掃中のバイオフィルムの予防および治療をターゲットとしたものであり、前記方法は、さらに、

40

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、および b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 2 の処理溶液を投与する工程と、

抗菌性化合物の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 の処理溶液を投与する工程と

を有し、各工程が、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類お

50

よび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために調節され、歯科医院で行う歯の清掃中に経口投与されるものである方法。

【請求項 55】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、口腔手術におけるバイオフィルムの予防および治療をターゲットとしたものであり、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液を投与する工程と、

a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素から成る群から選択される第 2 の処理溶液を投与する工程と、

抗菌性化合物の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 の処理溶液を投与する工程と

を有し、各工程が、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために調節され、歯牙手術中およびその前後に口腔組織に投与されるものである方法。

【請求項 56】

請求項 21 記載のバイオフィルムによる感染を治療する方法において、歯内治療におけるバイオフィルムの予防をターゲットとしたものであり、前記方法は、さらに、

a) トレハロース、b) 他の単糖類、および c) 歯内治療における歯の治療に一般的に使用される物質を有する治療用製剤を作成する工程と、

前記製剤を適切な歯および歯肉表面に投与する工程と

を有するものである方法。

【請求項 57】

パイプライン系においてバイオフィルム形成および増殖を処理する方法であって、パイプラインに含まれるバイオフィルムをトレハロースで処理する工程を有する方法。

【請求項 58】

請求項 57 記載のパイプライン系のバイオフィルム形成および増殖を処理する方法において、前記方法は、さらに、

トレハロースを含む水溶液を作成する工程と、

パイプラインの石油の流れに、前記パイプラインの内面にすぐ隣接し、前記パイプラインの石油の流れの中心を囲むように流れる環状層として、限られた量の前記水溶液を導入する工程と

を有し、前記環状水層がパイプラインのバイオフィルムを前記トレハロースに曝露させるものである方法。

【請求項 59】

請求項 57 記載のパイプライン系のバイオフィルム形成および増殖を処理する方法において、前記方法は、さらに、

トレハロースを、磁性化合物および強磁性化合物から成る群から選択される支持構造物質に固定する工程と、

上記固定化トレハロースを含む水性懸濁液を作成する工程と、

前記パイプラインの石油の流れに、一定量の前記水性懸濁液を導入する工程と、

バイオフィルムが増殖しやすいパイプライン内の位置で前記トレハロースが濃縮されるように、前記パイプラインの外側に磁場をかけることで、前記固定されたトレハロースの動きの方向を決める工程と

を有するものである方法。

【請求項 60】

請求項 57 記載のパイプライン系のバイオフィルム形成および増殖を処理する方法において、前記方法は、さらに、

10

20

30

40

50

パイプラインのバイオフィルムに対して親和性を示す化合物を選択する工程と、
トレハロースを支持構造として前記化合物に固定する工程と、
前記固定化酵素を前記バイオフィルムの形成部位に送達する工程と
を有するものである方法。

【請求項 6 1】

請求項 6 0 記載の方法において、前記固定化酵素は油水エマルジョンに含まれるものである方法。

【請求項 6 2】

加熱、換気、および空調（「H V A C」）装置のバイオフィルム形成および増殖を処理する方法であって、

a) トレハロースのみの水溶液および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液を作成する工程と、

有効となるのに十分な提示時間、H V A C 装置内のバイオフィルムが含まれる表面を前記第 1 の処理溶液で処理する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、c) 脂肪分解酵素、d) キレート剤、および e) 酵素安定剤から成る群から選択される第 2 の処理溶液を作成する工程と、

有効となるのに十分な提示時間、H V A C 装置内のバイオフィルムが含まれる表面を前記第 2 の処理溶液で処理する工程と、

a) 抗菌性化合物の水溶液から成る群から選択される第 3 の処理溶液を作成する工程と

、
有効となるのに十分な提示時間、H V A C 装置内のバイオフィルムが含まれる表面を前記第 3 の処理溶液で処理する工程と

を有し、前記第 2 の処理溶液の考えられる分解酵素への前記トレハロースおよび単糖類の曝露を回避するように、前記溶液を前記 H V A C に塗布するものである方法。

【請求項 6 3】

海洋面にみられるバイオフィルムを処理する方法であって、トレハロース含有物質を前記表面に塗布する工程を有する方法。

【請求項 6 4】

請求項 6 3 記載の海洋面にみられるバイオフィルムを処理する方法において、前記方法は、さらに、

a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類から成る群から選択される化合物を含む第 1 の処理用ゲルを作成する工程と、

前記表面を前記第 1 の処理用ゲルに曝露する工程と、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、c) 脂肪分解酵素、d) キレート剤、および e) 酵素安定剤から成る群から選択される化合物を含む第 2 の処理用ゲルを作成する工程と、

前記表面を前記第 2 の処理用ゲルに曝露する工程と、

抗菌薬から成る群から選択される化合物を含む第 3 の処理用ゲルを作成する工程と、

前記表面を前記第 3 の処理用ゲルに曝露する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 6 5】

請求項 6 3 記載の海洋面にみられるバイオフィルムを処理する方法において、前記方法は、さらに、

前記バイオフィルムに親和性を示す化合物を有する海洋面コーティングを作成する工程と、

トレハロースを支持構造として前記化合物に固定する工程と

を有するものである方法。

【請求項 6 6】

食品加工面、食品保存面、および家庭用品表面のバイオフィルムを処理する方法であって、多段階の手順として、

バイオフィルムに脆弱性の表面に a) 少なくとも 1 つのトレハロースのみおよび b) 少なくとも 1 つのトレハロースと他の単糖類から成る群から選択される第 1 の処理用組成物を塗布する工程と、

バイオフィルムに脆弱性の表面に a) 少なくとも 1 つのタンパク分解酵素、b) 少なくとも 1 つの線維素溶解酵素、および c) 少なくとも 1 つの脂肪分解酵素から成る群から選択される第 2 の処理用組成物を塗布する工程と、

バイオフィルムに脆弱性の表面に抗菌薬から成る群から選択される第 3 の処理用組成物を塗布する工程と

を有し、前記投与それぞれが、有効となるのに十分な提示時間、前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するために示された順序で行われるものである方法。

【請求項 67】

a) トレハロース、b) トレハロースと他の単糖類、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物を有する外部バイオフィルムによる感染を治療するための組成物であって、前記化合物は、a) 水溶液または食塩水溶液、b) ゲル、および c) 軟膏から成る群から選択される形態であり、前記化合物は有効となるのに十分な量および塗布時間使用され、前記製剤は前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与される組成物。

【請求項 68】

請求項 67 記載のバイオフィルムによる感染を治療するための組成物において、眼の感染をターゲットとしたものである組成物。

【請求項 69】

a) 遅延放出型のトレハロース、b) トレハロースと遅延放出型の他の単糖類との併用、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物を有する、内部バイオフィルムによる感染を全身的に治療する組成物であって、前記化合物は有効となるのに十分な量使用され、前記製剤は前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与されるものである組成物。

【請求項 70】

バイオフィルムによる感染を予防および治療するための組成物であって、前記組成物はトレハロースを有するものである組成物。

【請求項 71】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、

a) 水溶液または食塩水溶液、またはゲル型のトレハロースのみ、b) 水溶液または食塩水溶液、またはゲル型のトレハロースおよび他の単糖類、c) 水溶液または食塩水溶液、またはゲル型のタンパク分解酵素、d) 水溶液または食塩水溶液、またはゲル型の線維素溶解酵素、e) 水溶液または食塩水溶液、またはゲル型の脂肪分解酵素、および f) 水溶液または食塩水溶液、またはゲル型の抗菌薬から成る群から選択される化合物を有し、

前記化合物それぞれの量は有効となるのに十分であり、前記組成物は上気道感染を治療し、前記トレハロースおよび前記単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように局所的に投与するために適用されるものである組成物。

【請求項 72】

請求項 71 記載の上気道感染を治療する組成物において、緑膿菌感染に対応するアルギン酸リアーゼを含むものである組成物。

【請求項 73】

請求項 71 記載の上気道感染を治療する組成物において、連鎖球菌属感染に対応するデキストラナーゼを含むものである組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 74】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、
水溶液または食塩水溶液と、

a) トレハロースのみ、b) トレハロースと他の単糖類との併用、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物と

を有し、前記組成物は気管支肺胞洗浄製剤および副鼻腔への点鼻製剤を用いて下気道感染を治療するために適用され、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分であり、前記化合物は前記トレハロースおよび前記単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与されるものである組成物。

10

【請求項 75】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、
水溶液または食塩水溶液と、

a) トレハロースのみ、b) トレハロースと他の単糖類との併用、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物と

を有し、前記組成物は副鼻腔への点鼻製剤を用いて中耳炎感染を治療するために適用され、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分であり、前記化合物は前記トレハロースおよび前記単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与されるものである組成物。

20

【請求項 76】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、
水溶液または食塩水溶液と、

a) トレハロースのみ、b) トレハロースと他の単糖類との併用、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物と

を有し、前記組成物は前記組成物を送達するカテーテルを用いて慢性細菌性前立腺炎を治療するために適用され、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分であり、前記化合物は前記トレハロースおよび前記単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与されるものである組成物。

30

【請求項 77】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、

a) トレハロースのみおよび b) トレハロースと他の単糖類から成る群から選択される化合物と併用した消化酵素

を有し、前記組成物は上部消化管のバイオフィルムによる感染を治療するために適用されるものである組成物。

【請求項 78】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液、c) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、d) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、e) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液、f) 存在する感染菌に特異的な抗生剤の水溶液または食塩水溶液、g) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液、および h) 他の抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択され、かん腸として局所投与される化合物

40

を有し、前記組成物は消化管のバイオフィルムによる感染を治療するために適用され、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分であり、前記化合物は前記トレハロースおよび前記単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与されるものである組成物。

【請求項 79】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、

50

a) トレハロースのみ、b) トレハロースと他の単糖類との併用、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物

を有し、前記組成物は自然弁心内膜炎、感染性心内膜炎、および留置カテーテル敗血症を治療するために適用され、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分であり、前記化合物は前記トレハロースおよび前記単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与されるものである組成物。

【請求項 80】

請求項 70 記載の組成物において、前記組成物は、さらに、

a) トレハロースのみ、b) トレハロースと他の単糖類との併用、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物

を有し、前記組成物は歯周炎を治療するために適用され、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分であり、前記化合物は前記トレハロースおよび前記単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与されるものである組成物。

【請求項 81】

内部バイオフィームによる感染を局所的に治療する組成物であって、a) トレハロース、b) トレハロースと他の単糖類、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬から成る群から選択される化合物を有し、前記化合物の量は有効となるのに十分であり、前記製剤は前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与される組成物。

【請求項 82】

バイオフィームによる感染を予防および治療するための組成物であって、前記組成物は、

a) トレハロースおよび b) トレハロースと他の単糖類の群から選択される化合物

を有し、前記組成物は口内のバイオフィームによる感染を治療するために適用され、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分である組成物。

【請求項 83】

請求項 82 に記載の口内のバイオフィームによる感染を治療するための組成物において、この組成物は、a) メタノール、b) チモール、c) メチル・サリチル酸、d) オイカリプトール、および e) 他の抗菌薬から成る群から選択される他の化合物を含むものである組成物。

【請求項 84】

口内のバイオフィームによる感染を治療するためのチューイングガムの組成物であって、a) トレハロース、b) トレハロースと他の単糖類との併用、および c) 抗菌薬から成る群から選択される化合物を有する組成物。

【請求項 85】

口内のバイオフィームによる感染を治療するためのデンタルフロスの組成物であって、a) 絹、b) ポリアミド、および c) テフロンから成る群から選択される原料のトレハロース含浸繊維を有する組成物。

【請求項 86】

コンタクトレンズおよびレンズケースにおけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物であって、a) トレハロースのみ、b) トレハロースと他の単糖類、c) タンパク分解酵素、d) 線維素溶解酵素、e) 脂肪分解酵素、および f) 抗菌薬の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される組成物を有し、前記組成物中の化合物の量は有効となるのに十分であり、前記組成物は前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように投与される組成物。

【請求項 87】

医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物であって、トレハロースを有する組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 88】

請求項 87 記載の医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物において、前記トレハロースは前記医療装置のバイオフィームに脆弱性の表面に結合する持続放出組成物に取り込まれるものである組成物。

【請求項 89】

請求項 88 記載の医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物において、この組成物は持続放出製剤に少なくとも 1 つの抗菌薬を含むものである組成物。

【請求項 90】

請求項 87 記載の医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物において、この組成物は支持構造化合物を含み、前記トレハロースは前記支持構造化合物によって前記装置表面に固定されるものである組成物。

10

【請求項 91】

請求項 87 記載の医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物において、この組成物は、さらに、

a) トレハロースのみの水溶液または食塩水溶液および b) トレハロースと他の単糖類との水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 1 の処理溶液、および a) タンパク分解酵素の水溶液または食塩水溶液、および b) 線維素溶解酵素の水溶液または食塩水溶液、および c) 脂肪分解酵素の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 2 の処理溶液を有し、前記溶液は前記トレハロースおよび単糖類の前記タンパク分解酵素への曝露を回避するように使用されるものである組成物。

20

【請求項 92】

請求項 91 記載の医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物において、この組成物は、さらに、

a) 抗菌薬および b) 多菌性抗生剤の水溶液または食塩水溶液から成る群から選択される第 3 の処理溶液を有するものである組成物。

【請求項 93】

請求項 91 記載の体外医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物において、この組成物は、a) 他の酵素、b) キレート剤、c) 酵素安定剤、および d) 殺生物剤から成る群から選択される他の試薬を含み、前記医療装置はトレハロースの酵素分解化合物への曝露を予防するように、前記バイオフィームを処理するため、前記製剤に含浸されるものである組成物。

30

【請求項 94】

請求項 91 記載の医療装置におけるバイオフィーム形成および増殖を処理するための組成物において、この組成物は、前記装置表面に高分子の付着に抵抗性を持つ少なくとも 1 つの化合物を含むものである組成物。

【請求項 95】

歯科用装置の送水管、換気空調系 (HVAC)、食品加工および食品保存系、家庭用品表面におけるバイオフィーム形成および増殖を処理する組成物であって、a) 少なくとも 1 つのトレハロースおよび b) 少なくとも 1 つのトレハロースと他の単糖類との併用から選択される第 1 の処理用組成物、a) 少なくとも 1 つのタンパク分解酵素、b) 少なくとも 1 つの線維素溶解酵素、c) 少なくとも 1 つの脂肪分解酵素、d) 少なくとも 1 つの緩衝剤、e) 少なくとも 1 つの界面活性剤、f) 少なくとも 1 つの洗剤、g) 少なくとも 1 つのキレート剤、および h) 少なくとも 1 つの酵素安定剤から成る群から選択される第 2 の処理用組成物、および少なくとも 1 つの殺生物剤から成る群から選択される第 3 の処理用組成物を有し、前記組成物は、前記第 2 または第 3 の処理用組成物中の分解する可能性がある化合物への前記トレハロースおよび単糖類の曝露を回避するように使用される組成物。

40

【請求項 96】

請求項 95 記載の組成物において、前記組成物はエアロゾルとして前記 HVAC 系に送

50

達されるものである組成物。

【請求項 97】

パイプライン系のバイオフィルムを処理するための組成物であって、前記製剤はトレハロースの水溶液を有するものである組成物。

【請求項 98】

請求項 97 記載の組成物において、この組成物は、さらに、

a) タンパク分解酵素、b) 線維素溶解酵素、c) 脂肪分解酵素、d) 緩衝剤、e) 界面活性剤、f) 洗剤、g) キレート剤、h) 酵素安定剤、および i) 殺生物剤から成る群から選択される追加化合物を有し、前記製剤は分解する可能性がある化合物への前記トレハロースおよび単糖類の曝露を回避するように投与されるものである組成物。

10

【請求項 99】

請求項 97 記載の組成物において、この組成物は、さらに、

油水エマルジョンに前記組成物を組み入れる工程を有し、前記エマルジョンは前記パイプライン系に流水層がない状態で、前記組成物をバイオフィルムに送達させることができるものである組成物。

【請求項 100】

請求項 97 記載の組成物において、前記トレハロースは前記バイオフィルムに親和性を示す支持構造物質に固定されるものである組成物。

【請求項 101】

請求項 97 記載の組成物において、前記トレハロースは前記バイオフィルム中の前記トレハロースの沈着が磁場または電磁場の影響を受けるように、磁性を示す支持構造物質に固定されるものである組成物。

20

【請求項 102】

第 1 の経口投与される酵素組成物が第 2 の経口投与される酵素組成物、または他の化合物、または上部消化管で自然発生する酵素により分解されるのを防ぐ方法であって、前記方法は、

第 1 の経口投与される酵素の遅延放出組成物を作成する工程と、

前記第 2 の経口投与される酵素組成物を作成する工程と、

a) 前記第 1 の酵素組成物、b) 前記第 2 の酵素組成物、および c) 前記他の化合物から成る群の組成物を経口投与する工程と

30

を有し、前記遅延放出の期間は、前記第 1 の酵素組成物の小腸における最初の放出が可能となり、それによって前記第 2 の組成物の酵素、または前記他の化合物、または前記上部消化管で自然発生する酵素による前記第 1 の組成物の酵素の分解を回避するのに十分である方法。

【請求項 103】

第 1 の経口投与される酵素組成物が第 2 の同時投与される酵素組成物、または他の化合物、または上部消化管で自然発生する酵素により分解されるのを防ぐ方法であって、前記方法は、

経口投与される酵素の第 1 の遅延放出組成物を作成する工程と、

同時投与される酵素の第 2 の遅延放出組成物を作成する工程と、

a) 前記第 1 の遅延放出組成物、b) 前記第 2 の遅延放出組成物、および c) 前記他の化合物から成る群の組成物を経口投与する工程と

40

を有し、前記第 1 の遅延放出および前記第 2 の遅延放出の期間は、前記経口投与される酵素の身体吸収を最適化し、前記経口投与される酵素の分解を最小限にするために確定されるものである方法。

【請求項 104】

酵素を経口投与するための組成物であって、a) 第 1 の遅延放出される酵素組成物および b) 第 2 の遅延放出される酵素組成物を有し、前記第 1 の遅延放出および前記第 2 の遅延放出の期間は、前記酵素の身体吸収を最適化し、前記酵素の分解を最小限にするために確定されるものである組成物。

50

【請求項 105】

酵素を経口投与するための組成物であって、a) 第1の遅延放出される酵素組成物およびb) 第2の酵素組成物を有し、前記遅延放出の期間は、前記第1の酵素組成物の身体吸収を最適化し、前記第1の酵素組成物の、前記第2の酵素組成物、または前記消化管で自然発生するタンパク分解酵素による分解を最小限とするために確定されるものである組成物。

【請求項 106】

酵素を経口投与するための組成物であって、遅延放出される酵素組成物を有し、前記遅延放出の期間は、前記酵素の身体吸収を最適化し、前記酵素組成物の前記上部消化管で自然発生するタンパク分解酵素による分解を最小限とするために確定されるものである組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願書類の相互参照

この出願書類では、2011年6月13日に提出された米国仮出願第61/520,654号の利益を請求する。前記仮出願の開示は、この参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、バイオフィルムを予防および処理するための組成物および方法に関する。

20

【背景技術】

【0003】

前世紀の間、細菌性バイオフィルムは様々な生態系における微生物生命の遍在的形態として説明されてきたが、これは固体-液体、固体-気体、液体-液体、および液体-気体の界面で発生する可能性がある。バイオフィルム優性の一般的理論は、1978年に定義および発表された(Costerton JW, Geesey GG, and Cheng GK, "How bacteria stick," Sci. Am., 1978; 238: 86-95.)。この理論の基礎データは、当初ほとんどが、様々な表面上でのバイオフィルムにおける細菌増殖の99.9%以上が、工業用水道システム、また様々なパイプラインおよび容器で重大な問題を引き起こしていることを示した自然の水界生態系から出されたものであった。

30

【0004】

後になって、この細菌性バイオフィルムに関する基礎的理論は、医療および歯科分野で受け入れられた。様々なバイオフィルムを直接検査するための新しい先端的方法では、人体で多くの医療装置と関連した慢性感染症などを引き起こす微生物が、これらの装置内または表面、また、様々な器官および系の粘膜内層(口腔、気道、眼、耳、消化管、および尿路)にあるバイオフィルムで実際に増殖することが示された。この理論で述べられているとおり、「細菌はどこにようと利用できる、特定の基本的生存戦略を有している」(Donlan RM and Costerton JW, "Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms," Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2002: 167-193)。

40

【0005】

バイオフィルムの性質および構造

数十年にわたり、(ほとんどが実験室の環境で増殖した)様々なバイオフィルムに関する直接的な物理的および化学的研究は、バイオフィルムが、すべてが多糖類(主要成分)、タンパク質、糖タンパク質、核酸、脂質、リン脂質、および腐植物質など、微生物由来バイオポリマーを有する高度に水和したエキソポリマー基質に埋め込まれた単一微生物の細胞および微小コロニーから成り、全体構造と交差する水路を分岐させ、対流によって前記バイオフィルムにバルク流体を運び、栄養素と老廃物を輸送し、前記バイオフィルム内

50

のpH勾配に寄与することを示している (Costerton JW and Irvin RT, "The Bacteria Glycocalyx in Nature and Disease," *Ann. Rev. Microbiol.*, 1981; 35: 299-324.); (de Beer D, Stoodley P, and Lewandowski Z, "Liquid flow in heterogeneous biofilms," *Biotechnol. Bioeng.*, 1994; 44: 636-641.); (Himmelsbach DS and Akin DE, "Near-Infrared Fourier-Transform Raman Spectroscopy of Flax (*Linum usitatissimum* L.) Stems," *J Agric Food Chem.*, 1998; 46: 991-998.); (Maquelin K, Kirschner C, Choo-Smith LP, van den Braak N, Endtz HP, Naumann D, and Puppels GJ, "Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy," *J Microbiol Methods*, 2002; 51: 255-271.); (Neu TR and Marshall KC, "Bacterial Polymers: Physicochemical Aspects of Their Interactions at Interfaces," *J Biomater Appl*, 1990; 5: 107-133.); (Neugebauer U, Schmid U, Baumann K, Ziebuhr W, Kozitskaya S, Deckert V, Schmitt M, Popp J, "Toward a Detailed Understanding of Bacterial Metabolism - Spectroscopic Characterization of *Staphylococcus Epidermidis*," *ChemPhysChem*, 2007; 8: 124-137.); (Weldon MK, Zhelyaskov VR, Morris MD, "Surface-enhanced Raman spectroscopy of lipids on silver microprobes," *Appl Spectrosc*, 1998; 52: 265-269.)。バイオフィルムのタイプと関与する微生物によって、微生物細胞の微小コロニーは容積で前記バイオフィルムの約10%~15%を構成し、前記バイオフィルム基質は約85%~90%を有する。前記バイオフィルム基質の主要成分である水は前記基質容積の95%~98%を構成することができ、前記基質の粒子分画はそれに応じて残りの2%~5%を有することができる。細胞外の多糖類およびタンパク質は前記バイオフィルム基質の主要成分であると考えられ、過去数十年で最も広範に研究されてきた (Sutherland IW, "The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment," *Trends Microbiol*, 2001; 9: 222-227.); (Stewart PS and Costerton JW, "Antibiotic resistance of bacteria in biofilms," *Lancet*, 2001; 358: 135-138.); (Staudt C, Horn H, Hempel DC, Neu TR, "Volumetric measurements of bacteria and EPS-glycoconjugates in biofilms," *Biotechnol Bioeng*, 2004; 88: 585-592.); (Zhang XQ, Bishop PL, and Kupferle MJ, "Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers," *Water Sci Technol*, 1998; 37: 345-348.)。

【0006】

前記バイオフィーム基質の主要成分であると想定されている多糖類は、様々な環境において腐生性および病原性微生物が形成するグリコカリックスの多様な構造変形形態を提供する (Barbara Vu, et al., "Review. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation," *Molecules*, 2009; 14: 2535-2554; doi: 3390/molecules 14072535.)。微生物膜中の多糖類のタイプは膨大な範囲があり、関与している微生物の遺伝子分析および局所環境の物理化学的性質によって決まる (Sutherland IW, "The biofilm matrix - an immobilized but dynamic microbial environment," *Trends Microbiol.*, 2001; 9: 222-227.)。多くの多糖類は細菌の細胞壁および毒性因子の構造要素として、様々な細菌によって構成的に生産され、細菌細胞壁表面に付着したまま、静電結合および水素結合により前記細胞を囲む複合体ネットワークを形成するか、エキソ多糖類 (EPS) として生息環境に放出される可能性がある (Mayer C, Moritz R., Kirschner C., Borchard W, Maibaum R, Wingender J, and Flemming HC, "The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms," *Int J Biol Macromol*, 1999; 26: 3-16.)。多糖類、また単糖類および二糖類は、細菌が環境から取り込み、炭素源として代謝することができ、その代謝は合成経路および分解経路をいずれも司る酵素のバランスのとれた生産によって遺伝的に制御されている (Sutherland IW, "Polysaccharases for microbial polysaccharides," *Carbohydr Polym*, 1999; 38: 319-328.)。EPSはその構造によって、様々な量の水と結合することができ、(セルロース、ムタン、またはカードランなど) その一部はその三次構造からほとんどの水を排除することさえできる。長年にわたり、前記バイオフィーム基質のゲル様粘度は、主に関与する多糖類の物理的および化学的性質に起因すると考えられた (Christensen BE, "The role of extracellular polysaccharides in biofilms," *J Biotechnol*, 1989; 10: 181-202.); (Stoodley P, et al., "Oscillation characteristics of biofilm streamers in turbulent flowing water as related to drag and pressure drop," *Biotechnol Bioeng*, 1998; 57: 536-544.)。エキソ多糖類は(セルロース、デキストラン、レバンなどの)天然のホモポリマーである可能性があるが、大部分は結合力を増大させる二価カチオン (Ca、Mg) を引きつける (例えば、グラム陰性菌が産生するアルギン酸塩、ジェラン、キサンタンなどの) ポリアニオン系であり、少数が一部のグラム陽性菌が産生するようなポリカチオン系である (Sutherland IW, "Biotechnology of Exopolysaccharides," Cambridge: Cambridge University Press, 1990.); (Mack D, Fischle W, Krokotsch A, Leopold K, Hartmann R, Egge H, and Laufs R, "The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* is a linear β -1, 6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analysis," *J Bacteriol*, 1996; 178: 175-183.)。

【0007】

通常は少量のバイオフィーム由来EPSのみが直接研究に利用できるため、研究者は通常、浮遊細胞培養から導き出したデータを利用し、これをバイオフィームに外挿する。バイオフィーム特異的な多糖類が存在するという考えを支持する決定的な証拠はなく、今まで、様々なバイオフィームに存在し、研究されたすべての多糖類は、浮遊細胞によって合成された対応するポリマーと酷似している。バイオフィーム中の多糖類量（1若しくはそれ以上、いずれかの特定バイオフィームで特定の細菌に特異的なもの）の増加はバイオフィームで増殖する微生物のストレス反応の一部である可能性があり、細菌は副生成物としてエキソ多糖類を生成し、最適ではない増殖条件で蓄積した還元当量を放出すると提案されてきた (Creti R, Koch S, Fabretti F, Baldassarri L, and Huebner J, "Enterococcal
colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides," BMC Microbiology, 2006; 6: 60 doi: 10.1186/1471-2180-6-60.); (Rinker KD, Kelly RM, "Effect of carbon and nitrogen sources on growth dynamics and exopolysaccharide production for the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus litoralis* and bacterium *Thermotoga maritima*," Biotechnol Bioeng, 2000; 69: 537-547.); (Sutherland IW, "Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework," Microbiology, 2001; 147: 3-9.).

【0008】

他の細胞外生成物（細菌代謝の特異的基質または副生成物）、および有機堆積物は、老化および溶解細胞からバイオフィームに放出されるか、前記バイオフィーム基質内にトラップされ、エキソ多糖類の混合物によってそこに「固定」される可能性がある (Christensen BE, "The role of extracellular polysaccharides in biofilms," J. Biotechnol., 1989; 10: 181-201.)。これらの細胞外生成物には、小さな糖類（単糖、二糖類）、ポリオール、タンパク質、糖タンパク質、酵素、脂質、糖脂質、リン脂質、核酸、およびDNAが含まれる (Boyd A and Chakrabarty AM, "Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*," Appl Environ Microbiol, 1994; 60: 2355-2359.); (Harz M, Røsch P, Peschke KD, Ronneberger O, Burkhardt H, and Popp J, "Micro-Raman spectroscopic identification of bacterial cells of the genus *Staphylococcus* and dependence on their cultivation conditions," Analyst, 2005; 130: 1543-1550.); (Nottinghamher I, Verrier S, Haque S, Polak JM, Hench LL, "Spectroscopic study of human lung epithelial cells (A549) in culture: living cells versus dead cells," Biopolymers, 2003; 72: 230-240.); (Sutherland IW, "A natural terrestrial biofilm," J Ind Microbiol, 1996; 17: 281-283.); (Webb JS et al, "Cell death in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development

, " J. Bacteriol., 2003; 185: 4585-4592.
) ; (Weldon MK, Zhelyaskov VR, Morris MD,
 "Surface-enhanced Raman spectroscopy of
 lipids on silver microprobes," Appl Spectrosc, 1998; 52: 265-269.) ; (Yarwood JM,
 et al., "Quorum sensing in Staphylococcus aureus biofilms," J. Bacteriol., 2004; 186: 1838-1850.)。細胞外DNAは溶解細胞から放出され、バイ
 オフィルムの構造を支える上で重要な役割を果たし、バイオフィルムに特異的な表現型が
 発達できるように、微生物が遺伝物質を交換する機会を提供すると指摘された (Cost
 erton JW, Veeh R, Shirtliff M, Pasmore M,
 Post C, and Ehrich GD, "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections,"
 J. Clin. Invest., 2003; 112: 1466-1477.)
 ; (Gilbert P, Maira-Litran T, McBain AJ,
 Rickard AH, and Whyte FW, "The physiology and collective recalcitrance of micro
 bial biofilm communities," Adv. Microb.
 Physiol., 2002; 46: 202-256.) ; (Osterrei
 cher-Ravid D, Ron EZ, &Rosenberg E, "Hori
 zontal transfer of an exopolymer complex
 from one bacterial species to another,"
 Environ Microbiol, 2000; 2: 366-372.) ;
 (Stoodley P, Sauer K, Davies DG, and Cos
 terton JW, "Biofilms as complex differen
 tiated communities," Annu. Rev. Microbio
 l., 2002; 56: 187-209.) ; (Whitchurch CB,
 et al., "Extracellular DNA required for
 bacterial biofilm formation," Science,
 2002; 295: 1487.)。

【0009】

バイオフィルムの動的環境では、微生物が特殊な化学的シグナル伝達分子を利用して連
 絡を取り (菌体密度感知機構 [QS] と呼ばれるプロセス)、化学的シグナル伝達で互
 に協調した近隣細胞の数が十分存在すると、細菌は抗菌剤による傷害などの環境条件、お
 よびバイオフィルム群で生活することによる利益の変化に適切に反応することができる。
 変異株がQSに特異的なN-(3-オキソドデカノイル)-L-ホモセリンラクトンシグ
 ナルを生成することができなかった場合、実験室で増殖させた緑膿菌バイオフィルムの細
 胞外基質の主な変化に基づき、QSによって細胞外多糖類の産生を制御することができ
 ると想定された (Davies D, Parsek M, Pearson J, et
 al., "The involvement of cell-to-cell s
 ignals in the development of a bacterial
 biofilm," Science, 1998; 280: 295-298.)
 ; (Singh P, Schaeffer A, Parsek M, et al
 ., "Quorum sensing signals indicate that
 cystic fibrosis lungs are infected with
 bacterial biofilms," Nature, 2000; 407:
 762-764.)。しかし、今日まで、緑膿菌バイオフィルム基質の産生に関与し、
 菌体密度感知機構により制御された遺伝子は同定されておらず、(他の多糖類PELおよ
 びPSLの産生を制御する) pelおよび/またはpsl遺伝子も菌体密度感知機構によ

り制御された遺伝子としては明らかになっていない (Branda SS, Vik A, Friedman L, and Kolter R, "Biofilms: the matrix revisited," *Trends in Microbiology*, 2005; 13(1): 20-26.); (Whiteley M, et al., "Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999; 96: 13904-13909.)。また、抗菌薬に対するバイオフィルムの耐性における菌体密度感知機構の役割はまだ明らかとなっておらず、例えば、菌体密度感知機構に欠陥のある実験的変異体では、洗剤および抗生剤に対する耐性に影響はない (Brooun A, et al., "A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000; 44: 640-646.)。

10

【0010】

古典的モデルによれば、すべてのバイオフィルムは、動的環境を持つ非相同的な多層構造、前記バイオフィルムの新しい層が絶えず追加され、部分的に剥離する3次元様式の成長、前記バイオフィルム内の空間的および時間的不均一性と細菌成長率のばらつき、前記微生物の代謝および遺伝的活動の違いと (抗生剤を含む) 抗菌薬に対する抵抗および宿主の防御機構の亢進として説明することができる (Charaklis WG, Marshall KC, "Biofilm as a basis for interdisciplinary approach," pp. 3-15, In: *Biofilms*, 1990, John Wiley and Sons, Charaklis WG. and Marshall KC. (ed.), New York, N. Y.); (Fux CA, et al., "Review. Survival strategies of infectious biofilms", *Trends in Microbiology*, January 2005; Vol. 13, No 1: 34-40.)。前記バイオフィルム内の不均一性は、タンパク質合成および呼吸活性について確認されたが、DNA含有量はバイオフィルム中で比較的一定に留まった (Wentland EJ, et al., "Spatial variations in growth rate within *Klebsiella pneumoniae* colonies and biofilm," *Biotechnol. Prog.*, 1996; 12: 316-321.); (Xu KD, et al., "Biofilm resistance to antimicrobial agents," *Microbiology*, 2000; 146: 547-549.)。バイオフィルム内の酸素分圧には勾配があり、表面領域は、細菌が酸素利用率の低下に適応している、より深層の領域よりも代謝的に活性である (De Beer D, Stoodley P, Roe F, et al., "Effects of biofilm structure on oxygen distribution and mass transport," *Biotechnology Bioengineering*, 1994; 43: 1131-1138.)。バイオフィルムの外層は、多糖類および他の構成物質 (タンパク質、脂質など) の増加が遅いため、抗菌薬をより透過し、内 (深) 層はより密度が高く、圧縮されており、透過性が低い。バイオフィルム外層の細菌は大量の媒質と接し、より成長が早く、抗菌薬に対する耐性が低い可能性がある。逆に、内層つまり深層の細菌は付着表面により近接して位置し、成長が遅く、酸素および栄養素利用性が低下した状態に適合しており、やがては抗菌薬に対する耐性が高くなり、結果としてバイオフィルム特異的な抗生剤耐性の表現型が現れる可能性がある (Brown MR, et al., "Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?", *J. An*

20

30

40

50

timicrob. Chemother., 1998; 22: 777-780.)。

【0011】

「バイオフィーム内のいかなる特定の細胞も、同じバイオフィーム内の他の細胞と比較するとわずかに異なる環境となっているため、異なる速度で増殖する」と提案されている (Mah TC, and O' Toole GA, "Review. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents," Trends in Microbiology, Jan. 2001, 9(1): 34-39.)。浸透圧保護物質のトレハロースおよび分解酵素カタラーゼの生産が増加し、病原性細胞コロニーに近接したトレハロース濃度が高いことから確認されるとおり、連続的に細菌が成長すると、細胞密度が上昇し、微生物細胞に一般的ストレス反応が誘発される (Liu X, et al., "Global adaptations resulting from high population densities in Escherichia coli cultures," J. Bacteriol., 2000; 182: 4158-4164.)。溶質(栄養素)のバイオフィームへの流れが低下する、遺伝子型が生き残るために細菌微小コロニーの増殖率が低下するなど、これらの事象によってバイオフィームが生理的に変化する (Brown MR, and Barker J, "Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms," Trends Microbiol., 1999; 7: 46-50.); (Mah TC., and O' Toole GA, "Review: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents", Trends in Microbiology, Jan. 2001; 9(1): 34-39.)。

【0012】

約20年前、細菌にバイオフィーム特異的な表現型が存在するというのは新しい発想であった。そのようなバイオフィーム特異的な表現型は、表面に付着した時点で微生物の重集団に誘導されると考えられ、浮遊細胞と比較し、特異的なバイオフィーム関連遺伝子を発現すると提案された (Kuchma SL, and O' Toole GA, "Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression," Curr. Opin. Biotechnol., 2000; 11: 429-433.)。ほとんどが実験室で構築され、実験室で増殖させた変異株の遺伝的研究に基づく複数の研究データは、バイオフィームで増殖した細胞は、栄養素の利用、増殖率、ストレス反応、抗菌薬および宿主の防御機構に対する耐性亢進などの特異的な性質が浮遊細胞とは異なるという裏付けとなる証拠を提供した。

【0013】

抗菌薬に対するバイオフィームの耐性

バイオフィーム関連微生物の(抗生剤を含む)抗菌薬に対する耐性のメカニズムは、個々の細菌細胞に固有の耐性を与える、プラスミド、トランスポゾン、および突然変異体とは異なる (Stewart PS and Costerton JW, "Review. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms," Lancet, 2001; 358: 135-138.); (Costerton JW, Stewart PS, and Greenberg E, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," Science, 1999; 284: 1318-1322.); (Costerton JW and Stewart PS, "Biofilms and device-related infections," In: Nataro JP, Blaser MJ, C

unningham-Rundles S., (eds.), Persistent bacterial infections. Washington, DC: ASM Press, 2000; 432-439.)。

【0014】

複数の研究において、抗菌薬に対するバイオフィルム耐性の様々なメカニズムの基礎が提供され、以下の考えが含まれた：

・抗菌薬および宿主の防御細胞がバイオフィルムのエキソポリマー基質に浸透する際の物理的および／または化学的拡散バリア

・微生物の一般的ストレス反応の活性化

・微生物の増殖が遅い

10

・バイオフィルム特異的な細菌表現型が出現した可能性

これらのメカニズムはいかなるタイプのバイオフィルムにも適用することができ、存在する細菌と使用される抗菌薬の種類は様々である (Geddes A, "Infection in the twenty-first century: Predictions and postulates," J Antimicrob Chemother, 2000; 46: 873-878.); (Stewart PS, "Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms," Antimicrob. Agents Chemother., 1996; 40: 2517-2522.); (Stewart PS, "Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms," Int J Med Microbiol, 2002; 292: 107-113.)。

20

【0015】

バイオフィルム耐性メカニズムのほとんどは、抗菌薬および宿主防御細胞のバイオフィルムへの浸透を防御、阻害、または遅延させることのできる、最初の物理的および／または化学的バリアとしてバイオフィルムのエキソポリマー基質によって提供される。抗菌薬のバイオフィルムへの拡散は様々な方法によって阻害することができ、例えば、一般的な消毒薬である塩素は肺炎桿菌と緑膿菌の混合バイオフィルムの基質内における化学反応によって消費される (de Beer D, et al., "Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection," Appl. Environ. Microbiol., 1994; 60: 4339-4344.)、抗生剤シプロフロキサシンはバイオフィルムの成分と結合する (Suci PA, et al., "Investigation of ciprofloxacin penetration into Pseudomonas aeruginosa biofilms," Antimicrob Agents Chemother, 1994; 38: 2125-2133.)、緑膿菌の作るバイオフィルムはピペラシリンの拡散を阻害する (Hoyle B, et al., "Pseudomonas aeruginosa biofilm as a diffusion barrier to piperacillin," Antimicrob. Agents Chemother., 1992; 36: 2054-2056.)、正電荷を持つアミノグリコシドは表皮ブドウ球菌の作るバイオフィルムの β 1, 4-グルコサミノグリカンおよび緑膿菌の作るバイオフィルムのアルギン酸塩など、負電荷を持つ基質ポリマーに結合する (Lewis K, "Riddle of biofilm resistance," Antimicrob Agents Chemother., 2001; 45: 999-1007.); (Walters MC, et al., "Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of Pseudomonas aerug

30

40

50

inosa biofilms to ciprofloxacin and tobramycin," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003; 47: 317-323.); (Gordon CA, Hodges NA, Marriott C, "Antibiotic interaction and diffusion through alginate exopolysaccharide of Cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*," *J. Antimicrob. Chemother.*, 1988; 22: 667-674.); (Nichols WW, et al., "Inhibition of tobramycin diffusion by binding to alginate," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1988; 32: 518-523.)、大腸菌のムコイド表現型が生産する付加的な基質成分のコラン酸はバイオフィームの変異を支援し、バイオフィームをより厚くする (Danese PN, et al., "Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture," *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 3593-3596.)、培養液内にあり、エキソポリマー基質の薄い層で覆われたアスペルギルス・フミガーツスの菌糸体への抗真菌薬ナイスタチンの透過性は、細胞外基質の厚い層によって覆われた空中増殖するコロニーよりも高い (Beauvais A, et al., "An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*," *Cellular Microbiology*, 2007; 9 (6): 1588-1600.)、分泌型IgG抗体は基質に結合するため、バイオフィームを透過することができない (de Beer D, et al., "Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by micro-injection and confocal microscopy," *Biotechnol. Bioeng.*, 1997; 53: 151-158.)、緑膿菌のムコイド表現型が生成するアルギン酸塩は、宿主の白血球およびINF- γ により活性化されるマクロファージの食作用から細菌を保護する (Bayer AS, et al., "Functional role of mucoid exopolysaccharide (alginate) in antibiotic-induced and polymorphonuclear leukocyte-mediated killing of *Pseudomonas aeruginosa*," *Infect. Immun.*, 1991; 59: 302-308.); (Leid JG, Willson CJ, Shirtliff ME, Hassett DJ, Parsek MR, and Jeffers AK, "The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing." *J Immunol*, 2005; 175: 7512-7518.) などである。

【0016】

抗菌薬の拡散は、細菌自体が産生する特異的な活性物質によって阻害される、または遅延する可能性があり、例えば、緑膿菌種が産生する酵素カタラーゼは厚いバイオフィームに拡散すると過酸化水素を分解する (Stewart PS, et al., "Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000; 66: 836-838.)、アンピシリンは、アンピシリン分解酵素の β -ラク

タマーゼがあるため、肺炎桿菌のバイオフィームに浸透することができない (Anderi JN, et al., "Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2000; 44: 1818-1824.); (Bagge N, Hentzer M, Andersen JB, Ciofu O, Givskov M, and Høiby N, "Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Antimicrob Agents Chemother.*, 2004; 48: 1168-1174.)、コアグラゼ陰性ブドウ球菌由来の細胞外粘液は糖ペプチド抗生剤の作用を抑制する (Konig C, et al., "Factors compromising antibiotic activity against biofilms of *Staphylococcus epidermidis*," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2001; 20: 20-26.); (Souli M and Giamarellou H., "Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents," *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1998; 42: 939-941.)、緑膿菌が産生するPMN毒素のラムノリピドBは好中球を殺傷することが知られている (Jensen PΦ, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, et al., "Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*," *Microbiology*, 2007; 153: 1329-1338.) などである。

【0017】

抗菌薬のバイオフィームへの浸透が遅くなると、細菌がストレス反応を制御し、抗菌薬に対する耐性に介在する様々な遺伝子の発現を誘導する十分な時間ができる (Jefferson KK, Goldmann DA, and Pier GB, "Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms," *Antimicrob Agents Chemother.*, 2005; 49: 2467-2473.); (Anwar H, Strap JL, and Costerton JW, "Establishment of aging biofilms: a possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy," *Antimicrob Agents Chemother.*, 1992; 36: 1347-1351.)。一般的ストレス反応の中心的調節因子は高い細胞密度によって誘導される代替シグマ因子RpoSであり、活性化遺伝子rpoSのmRNAの有無は慢性緑膿菌バイオフィームに感染した嚢胞性線維症患者の唾液において、RT-PCRにより検出された (Foley I, et al., "General stress response master regulator rpoS is expressed in human infection: a possible role in chronicity," *J. Antimicrob. Chemother.*, 1999; 43: 16

4-165.)。また、さらなるシグマ因子のAlgはRpoSと協調して作用し、バイオフィルムの形成および成熟時の実験室で増殖させた緑膿菌における一般的ストレス反応を制御することが示され、algC (エキソ多糖類のアルギン酸合成に関与するホスホモンノムターゼを制御する)、algD、algU、およびポリホスホキナーゼ合成を制御する遺伝子など、いくつかの他の遺伝子もアップレギュレートされた (Davis DG and Geesey GG, "Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in Pseudomonas aeruginosa during biofilm development in continuous culture," Appl. Environ. Microbiol., 1995; 61: 860-867.)。実験室環境でバイオフィルムを発達させる場合、固着細胞と浮遊細胞では45もの遺伝子の発現が異なることが証明された。

【0018】

バイオフィルムによる医学的状態および疾患

バイオフィルムによるヒト感染症および医療装置のバイオフィルムに関する包括的なレビューは、Rodney M. DonlanおよびJ. William Costertonによって発表された (Donlan RM and Costerton JW, "Review. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms," Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2002; 167-193.)。微生物膜は、自然弁心内膜炎 (NVE)、留置カテーテル敗血症、慢性中耳炎、慢性副鼻腔炎および鼻副鼻腔炎、慢性気管支炎、嚢胞性線維症、緑膿菌肺炎、慢性細菌性前立腺炎、慢性尿路感染症 (UTIs)、歯周病、慢性創傷感染、骨髓炎を含む様々なヒト慢性感染症の発症機序において重要な因子である (Costerton JW, Stewart P, Greenberg E, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," Science, 1999; 284: 1318-1322.); (Hall-Stoodley L and Stoodley P, "Evolving concepts in biofilm infections," Cellular Microbiology, 2009; 11 (7): 1034-1043.)。微生物膜は、様々な医療装置 (人工心臓弁、中心静脈カテーテル、導尿カテーテル、コンタクトレンズ、中耳腔換気用チューブ、子宮内装置) や医療用器具 (内視鏡、透析システム、噴霧器、歯科用装置の送水管)、および病院および他の医療環境における様々な表面で検出されている (Costerton JW and Stewart PS, "Biofilms and device-related infections," In: Nataro J. P., Blaser M. J., Cunningham-Rundles S., eds. Persistent bacterial infections. Washington, DC: ASM Press, 2000; 432-439.); (Bryers JD, "Medical Biofilms," Biotechnology and Bioengineering, 2008; 100 (1) May 1.)。特殊な特徴のため、慢性のバイオフィルムによる感染症では、効果的治療を行うため、異なる介入アプローチが必要である (Stewart PS and Costerton JW, "Review. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms," Lancet, 2001; 358: 135-138.); (Donlan RM and Costerton JW, "Review. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms," Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2002; 167-193.); (Costerton JW, Stewart PS, and Gr

10

20

30

40

50

eenberg EP, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," *Science*, 1999; 284: 1318-1322.); (Costerton JW and Stewart PS, "Biofilms and device-related infections," In: Nataro JP, Blaser MJ, Cunningham-Rundles S, eds. *Persistent bacterial infections*. Washington, DC: ASM Press, 2000; 432-439.); (Wolcott RD, M. D. and Ehrlich GD, Ph. D., "Biofilms and chronic infections," *JAMA*, 2008, Vol. 299, No 22.); (Costerton JW, Irvin RT, "The Bacteria Glycocalyx in Nature and Disease," *Ann. Rev. Microbiol.*, 1981; 35: 299-324.); (Costerton JW, et al., "The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections," *J. Clin. Invest.*, 2003; 112: 1466-1477.)。

10

【0019】

自然弁心内膜炎

20

自然弁心内膜炎(NVE)の発症は、心臓の内皮(一般に、僧帽弁、大動脈弁、三尖弁、および肺動脈弁のもの)と血流を循環する微生物との相互作用によるものである(Livornese LL and Korzeniowski OM, "Pathogenesis of infective endocarditis," pp. 19-35. In: *Infective endocarditis*, Kaye D. (ed.), 2nd ed., 1992; Raven Press, New York, N. Y.)。微生物は、通常は無傷の内皮には付着しない。(血管炎などの)損傷した内皮、(非細菌性血栓性心内膜炎[NBTE]などの)心臓弁の初期血栓性病変の形成、血管損傷に反応して内皮細胞、血小板、および線維芽細胞が分泌し、フィブリン、コラーゲン、ヒト細胞、および細菌にも同時に結合可能なフィブロネクチンの蓄積、一部の細菌の特異的フィブロネクチン受容体(緑膿菌、黄色ブドウ球菌)、様々な連鎖球菌が生産し、NBTEでは血栓表面への接着を促す高分子量デキストランなど、付着を促す要因があるはずである(Lowrance JH, Baddour LM, and Simpson WA, "The role of fibronectin binding on the rate model of experimental endocarditis caused by *Streptococcus sanguis*," *J. Clin. Investig.* 86: 7-13.); (Roberts RB, "Streptococcal endocarditis: the viridins and beta hemolytic streptococci," pp. 191-208. In: *Infective endocarditis*, Kaye D. (ed.), 2nd ed., 1992; Raven Press, New York, N. Y.)。最も代謝的に活性なコロニーは血栓の表面で検出され、ここで最初のバイオフィルムを形成した(Durack DT and Beeson PB, "Experimental bacterial endocarditis II. Survival of bacteria in endocardial vegetations," *Br. J. Pathol.*, 1972, 53: 50-53.)。NVE症例2345例に関する臨床試験では、様々な関連微生物、つまり連鎖球菌(ビリダンス型連鎖球菌、ストレプトコッカス・ボビスを含む)、腸球菌、肺炎球菌が約56%の症例に、ブドウ球菌が約25%の症例に(約19%がコアグラーゼ陽性、約6%がコアグラーゼ陰性)、グラム陰性菌が約11

30

40

50

%の症例に、真菌（カンジダ属およびアスペルギルス属）が約10%の症例に証明され、これらの微生物はすべて主に中咽頭、胃腸管、および泌尿生殖路から血流に入ることができた（Tunkel AR and Mandell GI, "Infecting microorganisms," pp. 85-97. In: Infective endocarditis, Kaye D. (ed.), 2nd ed., 1992; Raven Press, New York, N.Y.).

【0020】

気道のバイオフィームによる慢性感染症

上気道では、細菌性バイオフィームが慢性扁桃炎、慢性咽頭炎、慢性副鼻腔炎、および慢性鼻副鼻腔炎（CRS）、慢性中耳炎（OM）、および胆脂腫で証明された。慢性および再発性扁桃炎患者の臨床標本では、付着および凝集したバイオフィーム関連細菌が、慢性扁桃炎のために切除された扁桃腺の粘膜上皮（73%の症例）および肥大のみのために切除された扁桃腺症例の75%で検出された（Chole RA and Faddis BT, "Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity," Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2003; 129: 634-636.）。炭水化物基質存在下、*in situ*で上皮内層と関連した微生物膜は、慢性咽頭炎のため切除されたヒト咽頭扁桃腺の臨床検体で証明された（Kania RE, Lamers GE, Vonk MJ, Dorpmans E, Struik J, Tran Ba Huy P, et al., "Characterization of mucosal biofilms on human adenoid tissues," Laryngoscope, 2008; 118: 128-134.）; （Nistico L, Gieseke A, Stoodley P, Hall-Stoodley L, Kerschner JE, and Ehrlich GD, "Fluorescence 'in situ' hybridization for the detection of biofilm in the middle ear and upper respiratory tract mucosa," Methods Mol Biol, 2009; 493: 191-213.）。

【0021】

慢性鼻副鼻腔炎

慢性鼻副鼻腔炎（CRS）では、粘膜が変化し、上皮細胞が様々な程度で露出していると、細菌がコロニー形成し、バイオフィームが発達するのに好ましい表面となる（Biedlingmaier J, Trifillis A, "Comparison of CT scan and electron microscopic findings on endoscopically harvested middle turbinates," Otolaryngol Head Neck Surg, 1998; 118: 165-173.）。主に緑膿菌感染によるバイオフィーム形成は、手術を受け、医学的治療を行ったにもかかわらず症状が持続していた患者で確認された（Cryer J, Schipor I, Perloff JR, Palmer JN, "Evidence of bacterial biofilms in human chronic sinusitis," ORL J Otolaryngol Relat Spec, 2004; 66: 155-158.）。手術を受けたCRS患者では、患者5例中5例の粘膜生検で、走査電子顕微鏡法（SEM）により異なるステージのバイオフィームが証明され、5例の患者全員で、繊毛が無秩序な状態から、繊毛および杯細胞がまったくない状態まで、様々な重症度の粘膜表面の異常所見が示された（Ramadan HH, Sanclement JA, Thomas JG, "Chronic rhinosinusitis and biofilms," Otolaryngol Head Neck Surg, 2005; 132

： 414－417.）。CRSおよび緑膿菌の作るバイオフィルムのほとんどの症例では、臨床症状が培養をターゲットとした抗生剤、局所ステロイド、および鼻洗浄に難治性であり、手術（機械的創面切除術）でしか有意な改善はみられなかった（Ferguson BJ, Stolz DB, "Demonstration of biofilm in human bacterial chronic rhinosinusitis," Am J Rhinol, 2005; 19: 452－457.）。

【0022】

慢性中耳炎

慢性中耳炎（OM）には中耳粘膜骨膜内層の炎症が関与し、肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、カタラリス菌、A群β溶血性連鎖球菌、腸内細菌、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、緑膿菌、および他の微生物を含む様々な微生物によって引き起こされ、混合培養を単離することもできる（Feigin RD, Kline MW, Hyatt SR, and Ford III KL, "Otitis media," pp. 174－189. In: Textbook of pediatric infectious diseases, Feigin RD and Cherry JD (ed.), 3rd ed., vol. 1, 1992, W. B. Saunders Co., Philadelphia, Pa.); (Giebink GS, Juhn SK, Weber ML, and Le CT, "The bacteriology and cytology of chronic otitis media with effusion," Pediatric Infect. Dis., 1982; 1: 98－103.）。

バイオフィルム関連感染症としての慢性OMは、臨床検体および動物モデルで証明された。走査型電子顕微鏡は、本微生物の培養液を注射したチンチラの中耳粘膜表面において、インフルエンザ菌が作るバイオフィルムの根拠を提示した（Hayes JD, Veeh R, Wang X, Costerton JW, Post JC, and Ehrlich GD, Abstr. 186, Am. Soc. Microbiol. Biofilm, 2000; Conf. 2000.）; (Hong W, Mason K, Jurcisek J, Novotny L, Bakaletz LO, and Swords WE, "Phosphorylcholine decreases early inflammation and promotes the establishment of stable biofilm communities of nontypeable Haemophilus influenzae strain 86-028NP in a chinchilla model of otitis media," Infect Immun, 2007b; 75: 958－965.）。肺炎連鎖球菌、インフルエンザ菌、およびカタラリス菌のバイオフィルム凝集体は、治療のため、TTの留置を受けた慢性または再発性OM小児の中耳粘膜内層の生検で検出されたが、蝸牛移植術を受けた患者の中耳粘膜生検では検出されなかった（Hall-Stoodley L, Hu FZ, Gieseke A, Nistico L, Nguyen D, Hayes J, et al., "Direct detection of bacterial biofilms on the middle-ear mucosa of children with chronic otitis media," JAMA, 2006; 296: 202－211.）。

【0023】

滲出液がみられる慢性OMでは、中耳に非常に粘性の高い体液があるため、圧力の上昇と聴力損失を軽減するため、多くの症例で中耳腔換気用チューブ（TT）の移植が必要となる。中耳腔換気用チューブは汚染しやすく、内面にバイオフィルムが蓄積する。様々な中耳腔換気用チューブで緑膿菌、黄色ブドウ球菌、および表皮ブドウ球菌によるコロニー形成とバイオフィルムの発達を調査し、3つの微生物すべてがArmstrongシリコンおよび酸化銀コーティングArmstrong型シリコンチューブにバイオフィルムを

形成したたという根拠が示され、緑膿菌はフッ素プラスチック型チューブにもバイオフィルムを発達させ、イオン化シリコンチューブのみが汚染およびバイオフィルムがないままであった (Biedlingmaier JF, Samaranayake R, and Whelan P, "Resistance to biofilm formation on otologic implant materials," *Otolaryngol Head Neck Surg*, 1998; 118: 444-451.)。酸化銀含浸silasticチューブは、おそらくチューブへの特定細菌の付着およびコロニー形成を阻害することで、術後1週間の術後耳漏の発生率を低下させたが、中耳に確立した感染には影響しなかった (Gourin CG and Hubbell RN, "Otorrhea after insertion of silver oxide-impregnated silastic tympanostomy tubes," *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg*, 1999; 125: 446-450.)。細菌性バイオフィルムはヒト蝸牛移植でも検出された (Pawlowski KS, Wawro D, Roland PS, "Bacterial biofilm formation on a human cochlear implant," *Otol Neurotol*, 2005; 26: 972-975.)。

【0024】

下気道では、特に嚢胞性線維症患者において、微生物膜が慢性気管支炎、慢性閉塞性肺疾患、および肺炎と関連していた。臨床サンプル（痰、気管支洗浄液、肺および気管支内膜の生検）の走査電子顕微鏡法では、微生物膜は粘膜内層に付着しているか、または気道上皮を覆う粘液中に細菌凝集体の形で付着していることが証明された (Lam J, Chan R, Lam K, and Costerton JW, "Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis," *Infect Immun*, 1980; 28: 546-556.); (Martinez-Solano L, Macia MD, Fajardo A, Oliver A, and Martinez JL, "Chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in chronic obstructive pulmonary disease," *Clin Infect Dis*, 2008; 47: 1526-1533.); (Starner TD, Zhang N, Kim G, Apicella MA, and McCray PB Jr, "Haemophilus influenzae forms biofilms on airway epithelia: implications in cystic fibrosis," *Am J Respir Crit Care Med*, 2006; 174: 213-220.); (Worlitzsch D, Tarran R, Ulrich M, Schwab U, Cekici A, Meyer KC, et al., 2002, "Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients," *J Clin Invest*, 2002; 109: 317-325.); (Yang L, Haagenensen JA, Jelsbak L, Johansen HK, Sternberg C, Høiby N, and Molin S, "In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections," *J Bacteriol*, 2008; 190: 2767-2776.)。

【0025】

嚢胞性線維症

10

20

30

40

50

下気道系の慢性疾患である嚢胞性線維症（CF）は、最も一般的な遺伝性疾患であり、CF患者の70%は塩化物イオンチャネルのタンパク質として機能する嚢胞性線維性膜貫通調節因子（CFTR）に欠損があり、気道の分泌上皮細胞の分泌が変化している。CFでは、基本的に水分が欠乏しており、粘液層の上に向かう流れが妨害されるため、粘膜毛様体クリアランスが変化している。電解質の分泌が低下し、吸収が増加すると、脱水が起き、呼吸粘膜を覆う分泌物が肥厚化する（Koch C and Hφiby N, "Pathogenesis of cystic fibrosis," *Lancet*, 1993; 341: 1065-1069.）。過剰に粘性の高い粘液は、CF患者の細菌性肺感染症の発症率を上昇させると考えられる。通常、これらの患者では黄色ブドウ球菌が最初に肺で分離され、続いてインフルエンザ菌が分離される。これらの感染はいずれも、抗生剤で効果的に治療することができるが、持続すれば、通常バイオフィルムを形成し、CFに罹患した肺は緑膿菌（コロニー形成率は約80%）およびセパシア菌がコロニーを形成しやすくなり、結果として死に至る（Govan JR, and Detric V, "Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*," *Microbiol. Rev.*, 1996; 60: 539-574.）。臨床研究で証明されたとおり、いずれの微生物も初期のコロニー形成では粘液性はないが、CF患者の肺で持続すると、最終的には数ヵ月から数年の期間で粘液性の表現型に変化する（Koch C and Hφiby N, "Pathogenesis of cystic fibrosis," *Lancet*, 1993; 341: 1065-1069.）。多糖類物質であることが示され、後でアルギン酸塩として同定された粘液物質は、緑膿菌の実験室株によって一時的に生産された後、表面に付着した（Hoyle BD, Williams LJ, and Costerton JW, "Production of mucoid exopolysaccharide during development of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms," *Infect. Immun.*, 1993; 61: 777-780.）。栄養制限、物質追加、および抗生剤濃度が最適ではないなど、いくつかの*in vitro*条件では、アルギン酸塩の生産が増加するため、粘液性になることがあると提案された（May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, Roychoudhury S, Zielinski NA, Berry A, Rothmel RK, Misra TK, and Chakrabarty AM, "Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients," *Clin. Microbiol. Rev.*, 1991; 4: 191-206.）。経口シプロフロキサシンおよび吸入コリスチンを用いた初期の抗菌薬治療は、緑膿菌による慢性感染症を数年間遅らせることが示された（Koch C and Hφiby N, "Pathogenesis of cystic fibrosis," *Lancet*, 1993; 341: 1065-1069.）。

【0026】

歯周病

歯周病には歯の支持組織の感染が含まれ、軽度および可逆的な歯肉の炎症から歯周組織（歯肉、歯周靱帯、および歯槽骨）の慢性的破壊および歯の脱落にまで及ぶ。歯肉縁下の隙間（歯根と歯肉の間の溝）は主な歯周炎発症部位であり、疾患が進行すると歯周ポケットが深くなる（Lamont RJ and Jenkinson HF, "Life below gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998; 62: 1244-1263.）。中

等度の歯周病患者から単離した微生物には、フゾバクテリウムヌクレアーツム、ペプトストレプトコッカス・ミクロス、*Eubacterium timidum*、*Eubacterium brachy*、乳酸桿菌属、*Actinomyces naeslundii*、*Pseudomonas anaerobius*、真正細菌属D8株、*Bacteroides intermedius*、フゾバクテリウム属、セレノモナス・スプチゲナ、真正細菌属D6株、バクテロイデス・ニューモシンテス、およびヘモフィルス・アフロファイルが含まれ、これらの細菌は健常患者には認められない (Moore WEC, Holdeman LV, Cato EP, Smilbert RM, Burmeister JA, and Ranney RR, "Bacteriology of moderate (chronic) periodontitis in mature adult humans," *Infect. Immun.*, 1993; 42: 510-515.)。成人の歯周炎患者では、歯肉縁下の歯垢にスピロヘータおよび球菌が潜み、歯肉縁下部の活動性病変の優占微生物には、フゾバクテリウム・ヌクレアーツム、ポリネラ・レクタ、バクテロイデス・インターメディア、*Bacteroides forsythus*、およびジンジバリス菌 (ポルフィロモナスジンジバリス) が含まれる (Omar AA, Newman HN, and Osborn J, "Darkground microscopy of subgingival plaque from the top to the bottom of the periodontal pocket," *J. Clin. Periodontol.*, 1990; 17: 364-370.); (Dzink JI, Socransky SS, and Haffajee AD, "The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases," *J. Clin. Periodontol.*, 1988; 15: 316-323.)。

【0027】

歯の表面を洗浄後ほぼ直ちにエナメル質の露出面に発達するタンパク性の調製フィルム (獲得被膜と呼ばれる) は、アルブミン、リゾチーム、糖タンパク質、リンタンパク質、脂質、および歯肉溝滲出液を有する。薄膜形成後数時間以内に、正常な口腔細菌叢の主にグラム陽性球菌および桿菌の単細胞はこれらの表面にコロニーを形成し、細胞外グルカン
 を生成することで、前記薄膜に直接結合する (Kolenbrander PE and London J, "Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence," *J. Bacteriol.*, 1993; 175: 3247-3252.)。数日後、放線菌類が優位を占め、この後様々な微生物が共凝集した結果、特有の多糖類基質と唾液由来ポリマーを持つ初期のバイオフィルムが発達し、そのままになっていると、この後 (2~3週間以内に) 歯垢が形成する (Marsh PD, "Dental plaque," pp. 282-300. In: *Microbial biofilms*. 1995; Lappin-Scott HM and Costerton JW (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.)。歯垢はカルシウムおよびリン酸イオンにより石灰化し (歯石と呼ばれる)、歯ブラシの届かない部分 (歯と歯の間、歯と歯肉の間) ではより広範に発達する。これらの歯ブラシの届かない部分で歯垢の量が増えると、唾液の有益な緩衝作用および抗菌性が低下し、虫歯または歯周病につながる。臨床研究データは、歯肉縁上の歯垢を専門家による歯のクリーニングおよび個人的な衛生努力によりコントロールすることで、歯肉炎および成人性歯周炎は予防可能であることを示している (Corbet EF and Davies WIR, "The role of supragingival plaque in the control of progressive periodontal disease," *J. Clin. Periodontol.*, 1993; 20: 307-313.)。

【0028】

慢性細菌性前立腺炎

前立腺は、尿道を上がってきた細菌または感染尿が前立腺管に逆流し、後部尿道に出ることで感染する可能性がある (Domingue GJ and Hellstrom WJG, "Prostatitis," Clin. Microbiol. Rev., 1998; 11: 604-613.)。感染初期に抗生剤治療により細菌を除菌しなければ、細菌が存続し、散発的な微小コロニーおよびバイオフィルムを形成し、前立腺管系の上皮細胞に付着することで、慢性細菌性前立腺炎となる可能性がある。このプロセスに関与する微生物には、大腸菌 (最も一般的な分離菌)、克雷ブシエラ菌、腸内細菌、プロテウス属、セラシア属、緑膿菌、大便連鎖球菌、バクテロイデス属、ガルドネラ属、コリネバクテリウム属、およびコアグラエゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) が含まれる (Nickel JC, Costerton JW, McLean RJC, and Olson M, "Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the urinary tract infections," J. Antimicrob. Chemother., 1994; 33 (Suppl. A): 31-41.)。慢性細菌性前立腺炎患者の生検を走査電子顕微鏡法または透過電子顕微鏡法により検査し、グリコカリックスに入った微小コロニーに細菌が存在し、管状または房状の粘膜層にしっかりと付着していることが証明された (Nickel JC and Costerton JW, "Bacterial localization in antibiotic-refractory chronic bacterial prostatitis," Prostate, 1993; 23: 107-114.)。導管内腔の散発的 CoNS 微小コロニーは、水を含まない粘性基質に包み込まれていることが示された (Nickel JC and Costerton JW, "Coagulase-negative staphylococcus in chronic prostatitis," J. Urol., 1992; 147: 398-401.)。慢性細菌性前立腺炎では、局所環境とバイオフィルム形成のため、治療が失敗することが多く、細菌代謝が変化し、抗菌薬に耐性が生じる可能性がある。抗菌薬治療の有効性を高めるため、前立腺管内のバイオフィルムに、直接、より高濃度の抗生剤を送達させることが提案された (Nickel JC, Costerton JW, Mclean RJC, and Olson M, "Bacterial biofilms: influence on the pathogenesis, diagnosis, and treatment of the urinary tract infections," J. Antimicrob. Chemother., 1994; 33 (Suppl. A): 31-41.)。

【0029】

医療装置のバイオフィルム

過去20年にわたり、人工心臓弁、中心静脈カテーテル、導尿 (フォーリー) カテーテル、コンタクトレンズ、子宮内避妊器具、および歯科用装置の送水管を含む様々な医療装置のバイオフィルムが、一般細菌培養法および走査電子顕微鏡法を用いて研究され、特定の装置 (コンタクトレンズおよび導尿カテーテル) については、細菌の付着およびバイオフィルム形成に対する様々な材料の感受性評価もさらに実施された (Costerton JW, Stewart PS, and Greenberg EP, "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections," Science, 1999; 284: 1318-1322.) ; (Donlan RM and Costerton JW, "Review. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms," Clinical Microbiology Reviews, Apr. 2002; 15: 167-192.)。

167-193.)。

【0030】

人工心臓弁

人工心臓弁(PVE)は、0.5%~4%の範囲を占める心臓の弁および周辺組織の微生物感染であり、現在使用されている機械弁およびバイオプロテーゼのいずれのタイプの弁でも同様である(Douglas JL and Cobbs CG, "Prosthetic valve endocarditis," pp. 375-396. In: Infective endocarditis, Kaye D. (ed.), 2nd ed., 1992; Raven Press LTD., New York, N. Y.)。人工弁の外科的移植による組織損傷では、縫合部位および装置に血小板とフィブリンが蓄積し、細菌のコロニー形成とバイオフィルムの発達に好適な環境が提供される。PVEは主に縫合用カフ構造(sewing cuff fabric)の微生物コロニー形成によって引き起こされる。微生物は一般に弁輪に侵入し、弁と組織を分離させ、漏出につながる可能性がある。PVEに関与する感染微生物には、表皮ブドウ球菌(初期段階)に続き、連鎖球菌、CoNS、腸球菌、黄色ブドウ球菌、グラム陰性球桿菌、真菌、およびピリダンス型連鎖球属(PVE後期に単離されることが最も多い微生物)を含む(Hancock EW, "Artificial valve disease," pp. 1539-1545. In: The heart arteries and veins; Schlant RC, Alexander RW, O'Rourke RA, Roberts R, and Sonnenblick EH (ed.), 8th ed., 1994; vol. 2. McGraw-Hill, Inc., New York, N. Y.); (Illingworth BL, Twenden K, Schroeder RF, and Cameron JD, "In vivo efficacy of silver-coated (silzone) infection-resistant polyester fabric against a biofilm producing bacteria, Staphylococcus epidermidis, J. Heart Valve Dis., 1998; 7: 524-530.); (Karchmer AW and Gibbons GW, "Infections of prosthetic heart valves and vascular grafts," pp. 213-249. In: Infections associated with indwelling medical devices; Bisno AL and Waldvogel FA (ed.), 1994, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.)。

【0031】

中心静脈カテーテル

中心静脈カテーテル(CVC)については、装置に関連した感染率は3%~5%である。感染性バイオフィルムは一般にCVCに存在し、カテーテルの外面または内腔に関連している可能性がある。コロニー形成およびバイオフィルム形成はカテーテル処置後3日以内に発生すると考えられる。短期的カテーテル(10日未満の留置)では通常外面の広範なバイオフィルム形成が認められ、長期的カテーテル(30日まで)では内腔により広範なバイオフィルムが認められる。(Raad II, Costerton JW, Sabharwal, Sacilowski UM, Anaissie W, and Bodey GP, "Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: a quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement," J. Infect. Dis., 1993; 168: 400-407.)。コロニー形成微生物は皮膚挿入部位から装置外面に沿って移動するか、または医療従事者による操作が

原因でハブから内腔に沿って移動することから発生する (Elliott TSJ, Moss HA, Tebbs SE, Wilson IC, Bonser RS, Graham TR, Burke LP, and Faroqui MH, "Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997; 16: 210-213.)。装置は血流と直接接触するため、その表面は血小板、血漿、およびアルブミン、フィブリノゲン、フィブロネクチン、およびラミニンなどの組織タンパク質でコーティングされ、細菌が付着する調節フィルムが形成し、黄色ブドウ球菌はフィブロネクチン、フィブリノゲン、およびラミニンに付着し、表皮ブドウ球菌はフィブロネクチンのみに付着する。CVCにコロニーを形成する微生物には、CONS、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、肺炎桿菌、大便連鎖球菌、およびカンジダ・アルビカンスが含まれる (Elliott TSJ, Moss HA, Tebbs SE, Wilson IC, Bonser RS, Graham TR, Burke LP, and Faroqui MH, "Novel approach to investigate a source of microbial contamination of central venous catheters," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997; 16: 210-213.)。

10

【0032】

20

導尿カテーテル

導尿カテーテルは、カテーテルシステムの種類にかかわらず、細菌汚染を受ける。開放系では、開放された回収容器に排液するカテーテルが早く汚染され、患者は3～4日以内に尿路感染 (UTI) を発症することが多い。閉鎖系では、カテーテルをしっかりと固定されたプラスチック製回収バッグに出す場合、患者の尿は約半数の患者で10～14日間無菌状態のままとすることができる (Kaye D and Hessen T, "Infections associated with foreign bodies in the urinary tract," pp. 291-307. In: *Infections associated with indwelling medical devices*; Bisno AL and Waldvogel FA (ed.), 1994; 2nd ed., American Society for Microbiology, Washington, D. C.)。開放系か閉鎖系にかかわらず、短期的なカテーテル処置 (7日まで) では10%～50%の患者がUTIを発症し、長期的なカテーテル処置 (28日以上) では基本的にすべての患者がUTIを発症する (Stickler DJ, "Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters," *Biofouling*, 1996; 94: 293-305.)。カテーテル関連UTIのリスクは、カテーテルを1日留置するごとに約10%上昇する。最初に、カテーテルには表皮ブドウ球菌、大便連鎖球菌、大腸菌、ミラビリス変形菌などの単一微生物がコロニーを形成する。この後、細菌数とその種類は増え、プロビデンス・スチュアルティ、緑膿菌、ミラビリス変形菌、肺炎桿菌、モルガン菌、アシネトバクター・カルコアセチカス、およびエンテロバクター・エロゲネスを含む混合細菌群となる (McLean RJC, Nickel JC, and Olson ME, "Biofilm associated urinary tract infections," pp. 261-273. In: *Microbial biofilms*; 1995, Lappin-Scott HM and Costerton JW (ed.), Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.)。

30

40

【0033】

走査電子顕微鏡法および透過電子顕微鏡法によるin vivoおよびin vitro

50

o 研究のいずれも、カテーテルにバイオフィームが形成したという根拠を示している。長期的なカテーテル処置を受けた患者のシリコンおよびシリコンコーティングしたフォーリー・カテーテル上のバイオフィームの厚さは $200\ \mu\text{m}$ ~ $500\ \mu\text{m}$ の範囲であり、最も厚いバイオフィームは大腸菌および肺炎桿菌により形成されたものである（最高 $490\ \mu\text{m}$ ）。最も薄いバイオフィームはモルガン菌および類ジフテリア菌によって形成され（平均約 $10\ \mu\text{m}$ ）、これらのバイオフィームは斑状でもあった（Ganderton L, Chawla J, Winters C, Wimpenny J, and Stickler D, "Scanning electron microscopy of bacterial biofilms on indwelling bladder catheters," Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1992; 11: 789-796.）。

10

【0034】

導尿カテーテルのバイオフィームは独特であるが、これは、尿の尿素を加水分解し、遊離アンモニアを形成する特定の微生物が酵素ウレアーゼを産生するため、局所 pH が上昇し、無機物のヒドロキシアパタイト（リン酸カルシウム）およびストルバイト（リン酸アンモニウムマグネシウム）が沈殿するためである。これらの無機物はカテーテルのバイオフィームに沈着し、無機物の付着物を形成し、これは 3 ~ 5 日以内に導尿カテーテルを完全に閉塞する（Tunney MM, Jones DS, and Gorman SP, "Biofilm and biofilm-related encrustations of urinary tract devices," Methods Enzymol., 1999; 310: 558-566.）。導尿カテーテルにおける主なウレアーゼ産生微生物は、ミラビリス変形菌、モルガン菌、緑膿菌、肺炎桿菌、およびプロテウス・ブルガリスである。無機物の付着物はこれらの細菌を含むカテーテルのみで観察された（Stickler D, Morris N, Moreno MC, and Sabbuba N, "Studies on the formation of crystalline bacterial biofilms on urethral catheters," Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 1998; 17: 649-652.）；（Stickler D, Ganderton L, King J, Nettleton J, and Winters C, "Proteus mirabilis biofilms and the encrustation of urethral catheters," Urol. Res., 1993; 21: 407-411.）。

20

30

【0035】

コンタクトレンズ

細菌はソフトコンタクトレンズ（ヒドロゲルまたはシリコン製）およびポリメタクリル酸メチル製のハードコンタクトレンズ、いずれのタイプのコンタクトレンズにも容易に付着する。ヒドロゲルコンタクトレンズへの緑膿菌の最初の付着により、2 時間以内にバイオフィームが形成し、特徴的な細胞外基質ポリマーが透過電子顕微鏡法およびルテニウムレッド染色により観察された（Miller MJ and Ahearn G, "Adherence of Pseudomonas aeruginosa to hydrophilic contact lenses and other substrata," J. Clin. Microbiol., 1987; 25: 1392-1397.）。付着の程度は、基質の性質、pH、電解質濃度、ポリマーのイオン電荷、および検査した菌種を含む様々な要因に依存した。

40

【0036】

コンタクトレンズに付着することが示された微生物には、緑膿菌、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、セラシア属、大腸菌、プロテウス属、およびカンジダ属が含まれる（Dart JKG, "Contact lens and prosthesis infections," pp. 1-30. In: Duane's fundati

50

ons of clinical ophthalmology; Tasman W and Jaeger EA (ed.), 1996; Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.)。確立されたバイオフィームは、緑膿菌角膜炎患者および細菌性角膜炎の臨床診断を受けた患者が外したレンズに検出され、数例は数種の細菌または細菌と真菌を含んでいた (Stapleton F and Dart J, "Pseudomonas keratitis associated with biofilm formation on a disposable soft contact lens," Br. J. Ophthalmol., 1995; 79: 864-865.); (McLaughlin-Borlace L, Stapleton F, Matheson M, and Dart JKG, "Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis," J. Appl. Microbiol., 1998; 84: 827-838.)。 10

【0037】

前記レンズの例は、汚染されたレンズおよびレンズ消毒液の主な微生物発生源と考えられ、無症状のレンズ使用者の80%が保存時の汚染例であった (McLaughlin-Borlace L, Stapleton F, Matheson M, and Dart JKG, "Bacterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis," J. Appl. Microbiol., 1998; 84: 827-838.)。また、同一微生物が前記 20
レンズ症例および感染患者の角膜からも単離された。さらに、原生動物のアカントアメーバがこれらのバイオフィームの構成要素であることが示された (Dart JKG, "Contact lens and prosthesis infections," pp. 1-30. In: Duane's foundations of clinical ophthalmology; Tasman W and Jaeger EA (ed.), 1996; Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.); (McLaughlin-Borlace L, Stapleton F, Matheson M, and Dart JKG, "B 30
acterial biofilm on contact lenses and lens storage cases in wearers with microbial keratitis," J. Appl. Microbiol., 1998; 84: 827-838.)。

【0038】

歯科用装置の送水管

歯科手順では、患者および歯科専門家のいずれも、歯科用装置の様々な構成要素から発生した日和見性および病原性の微生物と接触する可能性がある。小口径の軟質プラスチックは、異なるハンドピース (空気-水シリンジ、超音波歯石除去器、高速ハンドピース) に水 (都市水道水または蒸留、ろ過、または滅菌水を含む別の貯水槽の水) を供給し、これ 40
らの系すべてで細菌数が上昇していることが検出された (Barbeau J, Tanguay R, Faucher E, Avezard C, Trudel L, Cote L, and Prevost AP, "Multiparametric analysis of waterline contamination in dental units," Appl. Environ. Microbiol., 1996; 62: 3954-3959.); (Furuhashi M and Miyamae T, "Prevention of bacterial contamination of water in dental units," J. Hosp. Infect., 1985; 6: 81-88.); (Ma 50
yo JA, Oertling KM, and Andrieu SC, "Bac

terial biofilm: a source of contamination in dental air-water syringes," Clin. Prev. Dent., 1990; 12: 13-20.); (Williams HN, Kelley J, Folineo D, Williams GC, Hawley CL, and Sibiski J, "Assessing microbial contamination in clean water dental units and compliance with disinfection protocol," JADA, 1994; 125: 1205-1211.)

。

【0039】

歯科用送水管から一般に単離される微生物には、シュードモナス属、フラボバクテリウム属、アシネトバクター属、モラクセラ属、アクロモバクター属、メチロバクテリウム属、ロドトルラ属、線菌綱（クラドスポリウム属、アスペルギルス属、およびペニシリウム属）、バシラス属、連鎖球菌属、CoNS、ミクロコッカス属、コリネバクテリウム属、およびレジオネラ・ニューモフィラを含む (Tall BD, Williams HN, George KS, Gray RT, and Walch M, "Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes," Can. J. Microbiol., 1995; 41: 647-654.); (Whitehouse RLS, Peters E, Lizotte J, and Lilge C, "Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water," J. Dent., 1991; 19: 290-295.); (Mills SEP, Lauderdale W, and Mayhew RB, "Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%," JADA, 1986; 113: 280-284.); (Atlas RM, Williams JF, and Huntington MK, "Legionella contamination of dental-unit waters," Appl. Environ. Microbiol., 1995; 61: 1208-1213.); (Callacombe SJ and Fernandes LL, "Detecting Legionella pneumophila in water systems: a comparison of various dental units," JADA, 1995; 126: 603-608.); (Pankhurst CL, Philpott-Howard JN, Hewitt JH, and Casewell MW, "The efficacy of chlorination and filtration in the control and eradication of Legionella from dental chair water systems," J. Hosp. Infect., 1990; 16: 9-18.)。観察された様々な微生物は、明らかな多糖類基質に埋め込まれていた (Whitehouse RLS, Peters E, Lizotte J, and Lilge C, "Influence of biofilms on microbial contamination in dental unit water," J. Dent., 1991; 19: 290-295.)。また、(1つのバイオフィルムサンプルに) アメーバ性栄養体および嚢胞、および線虫も観察された (Santiago JI, Huntington MK, Johnston AM, Quinn RS, and Williams JF, "Microbial contamination of dental unit waterlines: short- and long-term effects of flushing," Gen. Dent., 199

10

20

30

40

50

4 ; 42 : 528-535.)。バイオフィームと水の細菌数には正相関が認められ、接触後180日までに、厚い複数の細胞外ポリマー基質層が歯科用装置の送水管の表面全体を覆っていた (Tall BD, Williams HN, George KS, Gray RT, and Walch M, "Bacterial succession within a biofilm in water supply lines of dental air-water syringes," Can. J. Microbiol., 1995; 41: 647-654.)。広範な細胞外ポリマー基質、および混合皮膚微生物叢と水生細菌をいずれも含むバイオフィームも、唾液排出装置の内部に検出された (Barbeau J, ten Bockum L, Gauthier C, and Prevost AP, "Cross contamination potential of saliva ejectors used in dentistry," J. Hosp. Infect., 1998; 40: 303-311.)。

10

【0040】

バイオフィームおよびバイオフィームによる感染を治療する方法

バイオフィームをコントロールする戦略は多く提案されてきたが、ほとんどは様々な医療装置に形成されるバイオフィームに適用され、これらの装置を使用する患者に対する長期的抗生剤、装置表面を覆う様々な抗菌薬、様々なポリマー材料、超音波、および低強度の電場と消毒薬の併用を含む。

【0041】

20

ヒト体内のバイオフィームによる感染については、細胞外重合物質を完全になくす、または貫通させることを目的としたアプローチが少数提供され、例えば、酵素混合物は、実験室で増殖させたいいくつかの異なる微生物のバイオフィームを完全になくす上で効果的であった (Johansen CP, Falholt P, and Gram L, "Enzymatic removal and disinfection of bacterial biofilm," Appl. Environ. Microbiol., 1997; 63: 3724-3728.)。別のよりの確なアプローチは、バイオフィーム中の特定微生物の多糖類を特定し、その酵素でバイオフィームを処理する方法であり、例えば、特異的酵素のアルギン酸リアーゼは、ムコイド緑膿菌のバイオフィーム多糖類であるアルギン酸塩により、ゲンタマイシンおよびトブラマイシンのより効果的な拡散を可能にした (Hatch RA, and Schiller NL, "Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid Pseudomonas aeruginosa," Antimicrob. Agents Chemother., 1998; 42: 974-977.)。さらに、バイオフィーム感染の管理では、アミノグリコシド、フルオロキノロン、マクロライド、また臨床で利用できる最新のタンパク質合成酵素阻害剤 (リネゾリドおよびキヌプリスチン) を含め、様々な抗生剤が *in vitro* および *in vivo* で広範に検討され、*in vivo* でのバイオフィーム感染の治療に有望であるように見える (In: Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy; Edited by Pace JL, Rupp ME, and Finch RG; Boca Raton, FL: CRC Press, 2006. Chapter 18, page 360.)。

30

40

【0042】

最近の特許文献のレビューでは、引用を1) 抗生剤および新しく確立されたバイオフィームの小分子阻害剤、2) 菌体密度感知機構およびシグナル伝達の分子阻害剤、3) バイオフィームの形成を阻害する表面コーティング物質、4) 感染性バイオフィームを治療するための抗生剤およびワクチン、5) バイオフィームを分解するための酵素、および6) 感染性バイオフィームのバクテリオファージ治療の6分野の最新治療アプローチにまとめ

50

ている (Lynch AS and Abbanat D, "New antibiotic agents and approaches to treat biofilm-associated infections," Expert Opin. Ther. Patents, 2010; 20(10): 1373-1387.)
。

【0043】

さらなるアプローチには、様々な天然物質および複合技術の利用が含まれる。例えば、クワ科ヒゴ (*Ficus glabrata*) の木由来のシステインプロテアーゼである oral-ficin など、天然のバイオフィーム付着防止剤が提案されたが、これはバイオフィーム形成細菌の表面付着を予防する (Potera C, "A Potpourri of Probing and Treating Biofilms of the Oral Cavity," Microbe Magazine, Oct. 2009.)。

蜂蜜は菌体密度感知機構を阻害し、それによってバイオフィームの形成または維持に干渉できることから、感染創管理の候補物質とすることができると示唆される ("The role of biofilm in wounds," a thesis submitted to the University of Wales, Cardiff, UK, in candidature for Ph.D. by Okhiria OA, May 2010, Chapter 5: Antimicrobial effect of honey on biofilm and quorum sensing: 190-234.)。

【0044】

複合技術の使用例は、超音波と抗生剤を併用した、インプラントのバイオフィーム感染の処理である (Carmen JC, Roeder BL, Nelson JL, Robison Ogilvie RL, Robison RA, Schaalje GB, and Pitt WG, "Treatment of Biofilm Infections on Implants with Low-frequency Ultrasound and Antibiotics," Am J Infect Control. 2005, March; 33(2): 78-82.)。

【0045】

医療装置のバイオフィーム汚染の対処法

細菌および真菌バイオフィームは様々なタイプの医療装置に発達する。これには、聴診器、腔鏡、鼻咽頭鏡、血管造影用カテーテル、内視鏡、血管形成術用バルーンカテーテルなどの医療用診断装置、およびコンタクトレンズ、子宮内避妊器具、歯科インプラント、人工尿路、およびカテーテルなどの永久、半永久、一時的留置器具、腹膜透析カテーテル、血液透析および化学療法剤の長期的投与用留置カテーテル (ヒックマンカテーテル)、心臓インプラント (ペースメーカー、人工心臓弁、補助人工心臓 [VAD])、合成血管およびステント、人工装具、内部固定装置、経皮縫合糸、気管および人工呼吸器チューブ、ネブライザなどの投薬分配用具、および滅菌器などの洗浄装置が含まれる。医療装置における微生物膜および関連病原菌の存在を抑制するために利用されている最新の方法について本明細書でまとめている。

【0046】

インプラント

留置医療装置およびインプラントと関連したバイオフィーム感染は、従来の抗生剤を使用して改善することが困難である。抗生剤の投与では、高用量で抗生剤を併用した長期的な投与、または前記装置または関連組織の一時的な外科的摘除が必要である。コロニー形成プロセスに干渉することを目的としたより新しい開発は、例えば、新規生体材料、音響エネルギーまたは低電圧電流と抗生剤との同時適用、特異的抗バイオフィーム剤の開発を有する (Jass J, Surman S, and Walker JT, "Medical biofilms: detection, prevention, and control," Vol. 2., John Wiley, 2003:

261.)。

【0047】

中心静脈カテーテル

いくつかの研究では、静脈カテーテルにおけるバイオフィーム形成をコントロールする際の、様々なタイプの抗菌薬投与の効果を検討した。使用された方法および材料には、微生物のコロニー形成を排除するためのカテーテルの生理的流出に消毒薬を加える方法 (Freeman R, Gould FK. "Infection and intravascular catheters," [letter]. J. Antimicrob. Chemother., 1985; 15: 258.)、カテーテルを複合抗菌薬で充満させる方法 (Darouiche RO et al., "A comparison of two antimicrobial-impregnated central venous catheters," N Engl J Med, 1999; 340: 1-8.)、抗生剤をカテーテル表面に結合させるため、界面活性剤でカテーテルをコーティングする方法 (Kamal G. D., Pfaller M. A., Rempe L. E., Jebson P. J. R., "Reduced intravascular catheter infection by antibiotic bonding. A prospective, randomized, controlled trial", JAMA, 1991; 265: 2364-2368.)、および複合抗生剤の局所的適用後に銀イオンを挿入する段階を含む、取り付け可能な皮下血圧測定バンド (Flowers R. H., Schwenzer K. J., Kopel R. F., Fisch M. J., Tucker S. I., Farr B. M., "Efficacy of an attachable subcutaneous cuff for the prevention of intravascular catheter-related infection", JAMA, 1989; 261: 878-883.)を含む。

【0048】

人工心臓弁

心臓弁移植に伴う感染の発症機序は、弁と周辺組織との接触面が関与する。具体的に述べると、機械的心臓弁の移植では取り付け部位の組織を損傷するため、微生物がそのような場所でコロニーを形成する傾向が高まる (Donlan RM, "Biofilms and Device-Associated Infections," Emerging Infectious Diseases Journal, Mar-Apr 2001; Vol. 7, No. 2: 277-281.)。そのため、そのような感染により生じたバイオフィームは、前記インプラントの周辺組織または前記組織に装置を取りつけるために用いる縫合用カフ構造に好んで発達する傾向がある縫合用カフ構造の銀コーティングはそのような感染を抑制することが分かっている (Illingworth BL, Tweden K, Schroeder RF, Cameron JD, "In vivo efficacy of silver-coated (Silzone) infection-resistant polyester fabric against a biofilm-producing bacteria, Staphylococcus epidermidis", J Heart Valve Dis 1998; 7: 524. Abstract); (Carrel T, Nguyen T, Kipfer B, Althaus U, "Definitive cure of recurrent prosthetic endocarditis using silver-coated St. Jude medical heart valves: a preliminary case report," J Heart Valve Dis., 1998; 7: 531. Abstract.)。

【0049】

導尿カテーテル

導尿カテーテルのバイオフィーム処理に対する従来のアプローチには、抗菌薬軟膏および潤滑剤の使用、抗菌薬の膀胱滴下または洗浄、抗菌薬を含む回収バッグの使用、抗菌薬のカテーテル注入、および全身抗生剤の使用を含む (Kaye D, Hesse M T, "Infections associated with foreign bodies in the urinary tract," In: Bisno A. L., Waldvogel F. A., editors. *Infections associated with indwelling medical devices*. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology; 1994; pp. 291-307.) 10
。銀のカテーテル注入は細菌尿の発症を遅らせることが分かっているが、そのようなアプローチは効果が限られていることが分かっている (Donlan RM, "Biofilms and Device-Associated Infections," *Emerging Infectious Diseases Journal*, Mar-Apr 2001; Vol. 7, No. 2: 277-281.)。カテーテルの作成に使用される様々な材料から、カテーテルに付着しやすい患者では、シリコンカテーテルがラテックス、テフロン、またはシリコンコーティングしたラテックスよりも閉塞しにくい (Sedor J and Mulholland SG, "Hospital-acquired urinary tract infections associated with indwelling catheter," *Urol. Clin. N. Am.*, 1999; 26: 821-828.) 20

【0050】

NanoVibronixが製造する新製品のUroShield™ Systemでは、カテーテルの表面全体を活性化することで、バイオフィーム形成の最初の段階である細菌の付着を阻害する、低コストのディスポーザブル超音波アクチュエータを利用している (Nagy K, Kovacs B, Jackel M, Tenke P, "The effectiveness of acoustic energy induced by UroShield device in the prevention of bacteriuria and the reduction of patient's complaints related to long-term indwelling urinary catheters," Poster presentation at 26th Annual Congress of the European Association of Urology (EAU); Vienna, March 2011: No. 483. Abstract.) 30

【0051】

透析システム

血液透析系でバイオフィームが発達することが実証された。実際、一部の症例は透析施設内での感染の大発生が疑われた。さらに、これらのバイオフィーム中のエンドトキシンおよび他のサイトカインは透析膜を通過し、患者に炎症反応を誘発する可能性がある (Vincent FC, Tibi AR, and Darbord JC. "A bacterial biofilm in a hemodialysis system. Assessment of disinfection and crossing of endotoxins," *ASAIO Trans.*, 1989; 35: 310-313.) 40
。透析チューブからのバイオフィームの除去に限定された研究では、21種類の除染手順の有効性が確認され、最も効果的な治療は酸による前処理後に濃縮した漂白剤溶液を使用する方法であり、高温で処理を行ってもバイオフィームの除去は改善しなかった (Marion-Ferey K, et al., "Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machin 50

e decontamination procedures using an in vitro model," Journal of Hospital Infection, 2003; 53(1): 64-71.)。

【0052】

臨床現場に配置された水道系からバイオフィルムを除去することは困難であることを考えると、多段階の洗浄（有機物質の除去）、スケール除去（無機物質の除去）、および消毒（微生物の除去）プロセスが提案される。最もよく利用される最新のプロトコールには、a) クエン酸後に漂白剤、b) 漂白剤のみ、c) 過酢酸と酢酸および過酸化水素（PAA）、d) クエン酸後に高圧蒸気殺菌、e) 高温でクエン酸、f) 高温でグリコール酸、g) 熱水、およびh) クエン酸後にPAAが含まれる。これらの消毒プロトコールはすべて微生物の殺菌に非常に効果があるように見えるが、感染面のバイオフィルム量を減少する効果はない。

10

【0053】

これまで、シリコン面からバイオフィルム（および結果としてエンドトキシン）を完全に除去することが示された治療はない。スケール除去自体は高温でも不十分である。漂白剤は、バイオフィルムの除去には単独で比較的優れた薬物であるように見える。さらに、UV照射はバイオフィルムに限定的な影響しか示さず、オゾンは除去効率がより高いことが証明されたが、バイオフィルムの殺菌は限定的である。超酸化濃度を達成することができれば、細菌および関連エンドトキシン両方の破壊は可能であると推論されている（"The Role of Biofilms in Device-Related Infections," Ed. By Shirliff M and Leid JG; Springer-Verlag, Berlin, 2009.)。

20

【0054】

内視鏡

内視鏡のバイオフィルムを除去する多数の洗剤の有効性に関する比較研究では、「一般的に使用されている酵素系洗剤の多くは生存可能な生菌量を減少させる、または細菌EPSを除去することはできない」と判断された（Vickery K, Pajkos A, and Cossart Y, "Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency," Am J Infect Control. 2004, May; 32(3): 170-176.)。酵素を含まない洗剤（Whiteley Medical（オーストラリア、シドニー）製）1つのみが、細菌生存率および残留細菌エキソ多糖類基質を有意に低下させた。

30

【0055】

特筆すべきは米国特許第6,855,678号であり、この中で走査電子顕微鏡法の利用について開示しているが、バイオフィルムは多数の層から成り、最も重要なことに、医療器具の表面に隣接し、固く付着した薄い層が存在することが観察された。ここで推奨された治療製剤は、界面活性剤、溶媒、共溶媒、窒素含有殺生物剤、および有機キレート剤の併用などである。この組成物は、内視鏡および他の医療用装置を容易に洗浄および消毒する、単純な非腐食性の天然に近い化学洗剤を提供する。仮説上の作用様式は、a) 溶媒および共溶媒（例えば、溶媒は第一級および第二級アルコール、グリコール、エステル、ケトン、芳香族アルコール、および8若しくはそれ未満の炭素原子を含む環状窒素溶媒などの低分子量極性溶媒、共溶媒は低分子量アミン、アミド、およびアミドのメチルおよびエチル誘導体を含む）はバイオフィルムを膨張するように作用する、b) 有機キレート剤と界面活性剤を併用すると、殺生物剤を含む窒素がバイオフィルムを貫通する能力が高くなる、およびc) 前記有機キレート剤と殺生物剤を含む窒素を併用すると、相乗的に作用し、バイオフィルムを除去する、および／またはその中の微生物を殺菌する、というものである。

40

【0056】

コンタクトレンズ

50

第4級アンモニウム化合物、グルコン酸クロルヘキシジン、および過酸化水素3%を含め、コンタクトレンズ保存ケースの細菌性バイオフィームに対して様々な洗浄液が検査された。過酸化水素3%は、緑膿菌、表皮ブドウ球菌、および化膿連鎖球菌が形成してから24時間後のバイオフィームを不活化する検査で最も効果があった。カンジダ・アルビカンスのバイオフィームはこれらの処理すべてに高度に耐性を示し、セラチア・マルセッセンスはクロルヘキシジン消毒液中で増殖することができた (Wilson LA, Sawant AD, and Ahearn DG, "Comparative efficacies of soft contact lens disinfectant solutions against microbial films in lens cases," Arch. Ophthalmol., 1991; 109: 1155-1157.); (Gandhi PA, Sawant AD, Wilson LA, and Ahearn DG, "Adaptation and growth of *Serratia marcescens* in contact lens disinfectant solutions containing chlorhexidine gluconate," Appl. Environ. Microbiol., 1993; 59: 183-188.)。サリチル酸ナトリウムがレンズおよびレンズケースへの細菌付着を抑制することが分かった (Farber BF, His-Chia H, Donnenfield ED, Perry HD, Epstein A, and Wolff A, "A novel antibiotic film technology for contact lens solutions," Ophthalmology, 1995; 102: 831-836.)。

【0057】

歯科用装置の送水管

歯科用装置の送水管は直径が小さく、表面：容積比が非常に高く、比較的流速が遅いため、水生細菌のコロニー形成およびバイオフィーム形成に理想的である。チューブのバイオフィームに由来する浮遊細菌量を減少させる処理として現在利用されている洗浄は十分な結果を示さず、洗浄のみでは効果がない (Santiago JI, Huntington MK, Johnston AM, Quinn RS, and Williams JF, "Microbial contamination of dental unit waterlines: short- and long-term effects of flushing," Gen. Dent., 1994; 42: 528-535.)。ポビドンヨードを加えることで、最初は汚染の細菌数を1mlあたり4および5 log 少なくすることができたが、この値は22日以内に処理前の値に戻った (Mills SE, Lauderdale PW, and Mayhew RB, "Reduction of microbial contamination in dental units with povidone-iodine 10%," JADA, 1986; 113: 280-284.)。0.5~1 ppmの遊離塩素を10分間毎日処理することで、正常細菌数を処理前の値から2 log 減少させることができたが、塩素消毒を中止すると、細菌数は再び上昇した (Feigin RD and Henriksen K, "Methods of disinfection of the water system of dental units by water chlorination," J. Dent. Res., 1988; 67: 1499-1504.)。漂白剤(1:10溶液)による、すでに細菌性バイオフィーム汚染された水道系の塩素消毒は、バイオフィームの除去効果がなかった (Murdoch-Kinch CA, Andrews NA, Atwan S, Jude R, Gleason MJ, and Molinari JA, "Comparison of dental water quality management procedures," JADA, 1997; 128: 1235-1243.)。

【0058】

工業用途（パイプライン、海洋生物付着、食品衛生、およびHVAC）におけるバイオフィーム

産業システムは、バイオフィームの存在のため、多数の有害作用を受けている。加熱および冷却系、また配油、配水、および配ガスシステムでは、これらの作用にパイプラインの流量制限、流れの汚染、および腐食が含まれる。船舶などの海洋システムでは、船体の生物付着により、船体の抵抗が増すため、船の燃料効率が著しく低下する可能性がある。

【0059】

配油、配水、および配ガスシステム中のバイオフィームを処理するための現在のアプローチ

10

配油、配水、および配ガスのための産業システムにおいて、バイオフィームは、特定のポイントでパイプまたは他の導管の有効径を減少させる、または前記導管の流路の摩擦を上昇させる可能性がある、大量のバイオマスを形成する可能性がある。これにより前記導管の流れに対する抵抗が増し、流量が減少し、ポンプの電力消費量が増し、生産工程の効率が低下する。さらに、このバイオマスは流水または流油の汚染源となる可能性もある。加えて、ほとんどのバイオマスで組成物および構造が不均一であり、基礎にある導管金属に陰極および陽極部位が形成され、それによって腐食過程に寄与する。

【0060】

現在、バイオフィームのパイプライン処理については、低濃度の塩素がバイオフィームに対して有効ではないことが分かったため、冷却システムには二酸化塩素、配水システムにはオゾンなど、強い酸化殺生物剤を使用する傾向がある。また、多数の非酸化殺生物剤が利用でき、有効であるが、環境に対する長期的効果はまだ分かっていない。超音波、電場、EPSの加水分解、およびバイオフィームの付着および凝集を変化させる方法など、バイオフィームをコントロールする新しい技術は、まだ実験室レベルで初期段階にあり、まだ大量の産業システムでの成功は証明されていない（Sriyutha Murthy P and Venkatesan R, "Industrial Biofilm s and Their Control". In: Marine and Industrial Biofouling; Editors: Fleming H, Murthy P, Venkatesan R, and Cooksey K; Springer-Verlag, 2010.）。

20

30

【0061】

石油およびガス会社が直面する重大な経済損失の1つは、パイプラインの腐食によるものである。パイプライン内部の腐食は、基本的に硫酸塩還元菌（SRB）によって引き起こされる。SRBは嫌気性であり、加速腐食損害のほとんどの事例の原因となっている。SRBが作るバイオマスについては、いくつかより新しい戦略に、a) SRBと競合する、より害のない硝酸還元細菌の発達を促す硝酸カルシウムまたはナトリウム、b) 硫酸塩の還元を阻害する代謝阻害剤としてのモリブデン酸塩、c) 硫化物の産生とそのバイオフィームへの取り込みを阻害するアントラキノン、およびd) バイオフィームの付着を阻害する撮影アミン技術などの分散剤の使用が含まれる。また、殺菌剤を使用することで（典型的な流動条件下）石油パイプラインに連続的な水相はできないため、水油エマルジョンを使用することが提案された（"Petroleum Microbiology"; edited by Ollivier B and Magot M, ASM Press, 2005.）。

40

【0062】

より最近のバイオフィームによって変化した付着概念の例には、国際特許出願第PCT/US2006/028353号の開示が含まれ、ステンレス鋼（およびおそらくは幅広い他の金属表面）および非金属表面の緑膿菌コロニー形成を阻害する、非毒性のペプチドを基本としたバイオフィーム阻害剤について報告している。前記組成物および方法では、ステンレス鋼および他の表面に特異的に結合し、シュドモナスによるバイオフィーム形成を防止する、非常に親和性の高いペプチドリガンドについて説明している。バイオフィ

50

ルム付着阻害剤の別の例は、オーストラリアの企業 Bio Signal Ltd. が開発した技術であり、これには、その防御的性質に耐性を示す細菌を誘発せずに、広範な細菌感染を効果的に回避する、紅藻 *Delisea pulchra* のフラノースの使用が含まれる。この海藻が産生するフラノンは、通常は表面コロニー形成を誘導する細菌シグナル伝達分子（N-アシルホモセリンラクトン）を受け取る、同じ特異的タンパク質で覆われた細菌受容体部位に容易に結合する。Bio Signal Ltd. は、パイプライン、HVAC、および送水管処理を含む用途において、細菌のシグナル伝達を遮断することで、細菌のコロニーおよびバイオフィーム形成を阻害する合成フラノンの利用をターゲットとしている。

【0063】

食品産業における食品加工、保存、および輸送システムの除染方法

他の産業用途について上述したより従来型の除線方法に加え、最近、食品産業では、食品のバイオプロセスから持ち込まれた酵素に基づくスキームの利用に乗り出した。具体的に述べると、EPS自体を酵素的に分解することで、バイオフィームの除去に貢献する方法を見付ける努力が行われてきた。概して、これらの努力は、EPSの多糖類骨格の破壊に向けられてきた。最初の例はNovozymeの米国特許出願第20110104141号に見ることができ、ここではバイオフィームの多糖類を分解する主要酵素としての α -アミラーゼの利用について開示しており、アミノペプチダーゼ、アミラーゼ、カルボヒドラーゼ、カルボキシペプチダーゼ、カタラーゼ、セルラーゼ、キチナーゼ、クチナーゼ、シクロデキストリングリコシルトランスフェラーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、エステラーゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、 α -グルコシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、ハロペルオキシダーゼ、インベルターゼ、ラッカーゼ、リパーゼ、マンノシダーゼ、オキシドレダクターゼ、ペクチン分解酵素、ペプチドグルタミナーゼ、ペルオキシダーゼ、フィターゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、タンパク分解酵素、リボヌクレアーゼ、トランスグルタミナーゼ、またはキシラナーゼなど、さらなる酵素が含まれる可能性がある。食品および飲料産業での用途をターゲットとするため、RealcoがNovozymeと共同で製造したBiorémなどの製品は、このような多酵素混合物の使用後、殺生物剤を使用する、2段階の洗浄プロセスを利用している。

【0064】

この産業部門でも超音波が有用なツールであることが分かり、衛生管理ではキレート剤と超音波の併用が、特定のバイオフィーム産生病原菌を金属表面から除去するために有用であることが分かった (Oulahal N, Martial-Gros A, Bonneau M and Blum LJ, "Combined effect of chelating agents and ultrasound on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to *Escherichia coli* milk" and *Staphylococcus aureus* milk" biofilms", Biofilms, 2004; 1: 65-73, Cambridge University Press.)。そのような照射の有効性は、エネルギーの周波数およびデューティサイクルに依存性を示すことが示された (Nishikawa T, et al., "A study of the efficacy of ultrasonic waves in removing biofilms," Gerontology, Sept 2010; Vol 27, Issue 3: 199-206.)。

【0065】

海洋生物付着に対する現在の処理方法

生物付着は世界中で様々な産業に発生しており、最も多くみられる生物付着部位の1つが船体であり、フジツボが発見されることが多い。船におけるバイオフィームと関連した重要な問題は、船体が最終的に腐食し、船が劣化することである。しかし、腐食が発生する前に、有機体の増殖が船体の粗度を上昇させる可能性があり、これが船の操縦性を低下

10

20

30

40

50

させ、流体力学的抗力を上昇させる。最終的には、生物付着が船の燃費を30%も上昇させる可能性がある。船体以外の船の部分にも影響がおよび、熱交換器、水冷却パイプ、プロペラ、バラスト水にも影響する。漁業および養魚業にも影響し、網籠およびトロール網に汚損生物がみられる。オーストラリアでは、生物付着が真珠採取産業コストの約80%を占めている(Stanczak M, "Biofouling: It's Not Just Barnacles Anymore," CSA Discovery Guide, 2004; <http://www.csa.com/discoveryguides/biofoul/overview.php>.)。

【0066】

従来の管理方法は、防汚化合物で露出面をコーティングするものである。これらの化合物のほとんどは、コーティングから徐々に浸出し、周辺環境を汚染する銅およびスズの塩に依存している。今日、最も広く利用されているコーティングの1つはトリブチルスズ(TBT)であり、海洋生物に対する毒性は非常に高い。このコーティングは非標的生物に望まない副作用を有することが分かってきたため、2008年に世界的な使用禁止令が制定された。環境的に健全な代替法が競って探索されている(Scottish Association for Marine Science, <http://www.sams.ac.uk/research/departments/microbial-molecular/mmb-project-themes/algal-biofilms>.)。

【0067】

したがって、海運業などの海上用途では、実行可能で費用対効果の高いバイオフィルムの改善需要は満たされていない。

【0068】

加熱装置、換気空調系(HVAC)、および冷却装置におけるバイオフィルムの現在の処理方法

HVACおよび冷却装置では、冷却コイル、排水パン、および水分凝縮が起こるダクト作業中に形成されるバイオフィルムと関連した問題に直面する。冷却コイルにバイオフィルムが形成すると熱交換効率が低下し、排水パンおよびダクト作業を含め、他の表面に増殖すると、気流の汚染源となる。これらの用途においてバイオフィルムに対処する従来の方法には、コイルの維持洗浄、ダクト作業および排水パン、システム表面への防食および抗菌コーティングの使用、バイオフィルムを分解し、病原菌を殺菌するシステム表面のc波紫外線照射が含まれる。

【0069】

家庭での用途におけるバイオフィルム汚染の改善

家庭用品産業は、家庭用品表面の消毒、水道および配管設備、およびヒトの衛生学的必要性に極めて関心がある。これらの多様な表面に付着した細菌の殺菌に伴う困難は、この産業部門では周知のことであり、現在、かなりの研究がバイオフィルムを殺菌または除去する製品の開発に向けられている。

【0070】

この部門における革新は、プロバイオティクスに基づく洗浄である。これらの製品の一部は良性の細菌層を作り、これがキッチンおよび浴室表面の資源で病原性細菌と競合することに成功している。このような製品は他に、プロバイオティクス細菌と酵素を結合し、バイオフィルムおよび殺菌された病原体を消化する。この製品クラスの主な例は、オランダのChrisal Probioticsが製造するPIPである。

【0071】

医療用および産業用途のいずれにおいても多様に考察されたバイオフィルム処理を行う従来のアプローチは、証明されておらず、有効性が限定的で、時間を消費し、表面積が大きい、または表面に繰り返し処理が必要な場合はコストがかかり、まだより新しい概念で現場応用の有効性と拡張可能性を証明する必要がある。したがって、バイオフィルムを処理するため、より効果的でコストの低い方法がまだ至急必要である。本組成物および方法

は、高い効率および低いコストでバイオフィルムを処理するための、新しい独立型アプローチの可能性、さらに、そのような処理のコストを削減しながら、特定の従来型の処理を拡大する可能性を提供する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0072】

トレハロース（遍在する一般的ストレス反応代謝物および浸透圧保護物質）は、微生物膜の形成および発達に重要な役割を果たしている可能性があり、トレハロースと水の特異的相互作用はバイオフィルム形成の最も重要なメカニズムの1つであると考えられている。本組成物および方法では、バイオフィルム分解の重要段階として、トレハロースの分解をターゲットとすることが着想された。

10

【0073】

前記組成物および方法に関する様々な実施形態において、バイオフィルムの形成を予防、分解、および／または阻害する化合物、これらの化合物を有する組成物、これらの化合物を利用した装置、およびこれを利用する方法が開示されている。

【0074】

トレハロースは、バイオフィルムゲルを形成する過程で水分子と細菌細胞間の水素結合を操作する役割を果たすため、トレハロースの分解は最終的にバイオフィルムゲルの分解につながるはずである。高い特異性でトレハロースを分解することで、バイオフィルム基質ゲルを分解する化合物クラスについて開示されている。具体的に述べると、天然酵素のトレハラーゼはトレハロース分子を2つのグルコース分子に加水分解する。ヒトの体内で産生される少量の酵素トレハラーゼは、はるかに大量の投与で増強され、*in vivo*でバイオフィルムによる感染を治療するに違いない。トレハラーゼ酵素を取り入れ、送達機構に関与する様々な治療製剤が特殊なタイプの感染について詳述されており、全身および局所的な治療プロトコルが含まれる。さらに、トレハラーゼを含む混合物および関連プロセスは、医療機器にあるバイオフィルムを分解し、産業用途においてバイオフィルム付着物およびバイオフィルムによる生物腐食を軽減することが開示されている。医療機器のバイオフィルム分解については、トレハラーゼを含む混合物を超音波および超音波補助による酵素活性などの他のプロセスと協調して使用し、バイオフィルムを分解することができる。バイオフィルム防止のアプローチには、表面コーティングにトレハラーゼ酵素を利用する方法を含む。

20

30

【0075】

以下は、前記組成物および方法をより詳しく定義し、請求項の意味を裏付ける用語および表現集である。

【0076】

遅延放出一本組成物および方法の中では、遅延放出は具体的に、ビル、カプセル、錠剤、または他の形態中のトレハラーゼ（および一部の実施形態では他の化合物）が経口摂取された後、おおよそその所定時間で発生するトレハラーゼ（または他の化合物）の放出を指す。典型的には、本組成物および方法では、遅延は小腸でトレハラーゼ（または他の化合物）の放出が起こり、上部消化管における天然タンパク分解酵素による分解を回避することを意味する。例えば、時間とともに放出速度が直線的に増加または減少する、または放出速度が一定であるなど、小腸での放出についてあらかじめプログラムされた様々な一時的プロファイルは、前記組成物および方法の範囲内である。

40

【0077】

持続放出一本組成物および方法の中では、身体の外部に適用するための、トレハラーゼ（または他の化合物）の放出を指す。これは遅延型ではないトレハラーゼ（または他の化合物）の連続的放出であるが、医療装置および産業用表面に継続的、持続的に酵素処理を行う目的で、初の機会として起こる。

【0078】

有効性が十分一標的の感染性病原菌を治療する抗菌薬によりバイオフィルムのゲル構造

50

を分散させ、さらに貫通するため、その分解を行うために十分な治療用組成物の量および治療期間に関する。

【0079】

トレハラーゼートレハラーゼアイソザイムの分類から選択されるすべての酵素を指す。微生物では2種類のトレハラーゼ酵素が認められ、典型的には細胞質ゾルにみられる天然トレハラーゼ（NT）と細胞質ゾルの液胞にみられる酸性トレハラーゼ（AT）で、いずれかのタイプの酵素を本組成物および方法に適用することができる。さらに、候補酵素の数が多く、Protein Model Portal (<http://www.proteinmodelportal.org/>)では541種類ものトレハラーゼの変形モデル（アイソザイム）を認めることができ、それぞれがトレハロースのグルコースへの加水分解で異なる作用強度を示す。本組成物および方法では、特定のバイオフィルムの用途に最適なこれらのアイソザイムの中から、選択することを見込んでいる。例えば、身体内で使用するため、特定のアイソザイムを十分に精製できると、この目的で、より高い酵素活性を示す別のアイソザイムよりもこれを選択することが有利になる可能性があるが、これは産業用途に委ねられることになる。

10

【0080】

消化酵素－身体が吸収しやすくするため、摂取した食物の高分子をより小さな構成要素に分解する酵素。本組成物および方法では、トレハラーゼ（または他の化合物）を有する治療用製剤について開示され、これは、a) 上部消化管で自然発生する消化酵素による分解を回避し、b) 遅延放出製剤として補充した消化酵素と併用され、そのような補充療法でタンパク分解酵素による分解を回避するはずである。

20

【0081】

医療装置－体内に一時的または永久的に取り付けられる装置、および身体との接触の有無にかかわらず、少なくとも組織または体液と接触する医療機器を含む。一時的に取り付けられる医療装置の例には、カテーテル、内視鏡、および外科装置を含む。永久的な装置の例には、整形外科用インプラント、ステント、および外科用メッシュなどの装置を含む。体外に使用される装置の例には、聴診器、透析装置、および血液および尿分析機器を含む。上述の各装置はバイオフィルムが形成しやすい表面を示すため、今回開示する組成物および方法の特殊な実施形態による処理の利益を受ける可能性がある。

【0082】

抗菌薬－細菌、真菌、または原生動物などの微生物を殺菌またはその増殖を阻害する物質。抗菌薬は微生物を殺菌するか（殺菌）、または微生物の増殖を阻害する（静菌）。消毒剤は非生物または体外に使用される抗菌物質である。

30

【0083】

他のサッカリダーゼ（単糖類を加水分解する酵素）－様々なジマー、オリゴマー、およびポリサッカリダーゼを含む。

【0084】

生物－微生物から動物およびヒトまでの生物範囲に関連する。

【0085】

消化管－消化管、口、食道、胃、および十二指腸を有する上部消化管、および小腸および大腸を有する下部消化管を指す。

40

【0086】

経消化管投与－3種類の主な代替治療送達法に関連し、第一に口から治療用化合物が投与される経口投与であり、経口投与することができない患者では、利用できる第二の方法が経鼻胃チューブによるものであり、第三の方法にはかん腸による送達を含む。

【0087】

全身使用による投与－経皮注射、筋肉注射、静脈内注射、および静脈カテーテル投与による治療用化合物の投与に関する。

【0088】

本開示の他の態様、利益、および特徴は、以下の図面の簡単な説明、発明を実施するた

50

めの形態、および請求項を含む出願書類全体を精査した後に明らかとなるだろう。

【図面の簡単な説明】

【0089】

【図1】図1aは、二糖類トレハロースの化学構造の図である。

【0090】

図1bは、トレハロースの骨格構造の絵図である。

【図2】図2aは、サッカロマイセス・セレビシエ由来の酵素トレハラーゼのリボンモデル絵図である。

【0091】

図2bは、ペニシリウム・マルネッフェイ由来の酵素トレハラーゼのリボンモデル絵図である。

【0092】

図2cは、ホモサピエンス由来の酵素トレハラーゼのリボンモデル絵図である。

【0093】

図2dは、カンジダ・アルビカンス由来の酵素トレハラーゼのリボンモデル絵図である。

【発明を実施するための形態】

【0094】

すべての細菌性バイオフィームは、エキソポリマー基質および細菌性微小コロニー両方の空間的および時間的に不均一な生きた動的構造と定義することができるため、バイオフィームによる慢性感染の治療では、両成分を同時に目標とする必要がある。

【0095】

バイオフィームで増殖する微生物の最も重要な生存機構の1つは、多数の環境要因によって誘発される一般的ストレス反応である。一般的ストレス反応（遍在性）では、（一般的ストレス反応の代謝物および浸透圧保護物質としての）トレハロースの増産が、生存および防御機構として二重の役割を果たしている。

【0096】

トレハロースは生物圏に偏在し、哺乳類を除くほぼすべての生命形態に存在する二糖類である。トレハロースは最も重要な貯蔵炭水化物の1つであり、エネルギー源および細胞成分合成の炭素供給源としての役割を果たすことができる。様々な微生物において、トレハロースは構造上または輸送上の役割を果たし、特定の代謝経路を管理またはコントロールを行うシグナル伝達物質として機能し、浸透圧ストレス、熱、低温、乾燥、脱水、酸化、および酸素欠乏などの有害なストレス作用から細胞膜およびタンパク質を保護する機能を果たしている可能性がある (Elbein AD, "The metabolism of α , α -trehalose," Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1974; 30: 227-256.); (Crowe J, Crowe L, and Chapman D, "Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms. The role of trehalose," Science, 1984; 223: 209-217.); (Takayama K and Armstrong EL, "Isolation, characterization and function of 6-mycolyl-6'-acetyl-trehalose in the H37Rv strain of Mycobacterium tuberculosis," Biochemistry, 1976; 15: 441-446.)。

【0097】

トレハロースは、シュードモナス属、バシラス属、ブドウ球菌属、連鎖球菌属、インフルエンザ菌、肺炎桿菌、プロテウス属、放線菌属、コリネバクテリウム属、エンテロコッカス属、腸管病原性大腸菌、カンジダ属、放線菌、および他の病原性酵母および真菌を含め、ヒト体内でバイオフィームを形成し、慢性感染を引き起こすことが知られている微生物

10

20

30

40

50

物を含む様々な日和見性および病原性の微生物において、部分的に病原性および抗菌薬耐性の原因であると考えられる。カンジダ・アルビカンスの一部の株で証明されたとおり、トレハロース産生に干渉すると、その病原性は著しく低下する。具体的に述べると、トレハロース合成に関与する2つの酵素のうちの1つであるトレハロース-6-リン酸ホスファターゼをコードする遺伝子TSP2が欠失したC. アルビカンス変異株は、in vivo全身感染症マウスモデルにおいて、病原性が低下していることが示され、in vitroバイオフィーム系で増殖させると、特定の非変異株よりもバイオフィーム形成が有意に少ないことが示された (Coeney T, Nailis H, Tournu H, Van Dick P, and Nelis H, "Biofilm Formation and Stress Response in Candida Albicans TSP2 Mutant," ASM Conference on Candida and Candidiasis, Edition 8, Denver, CO; March 12-17, 2006.)。

10

【0098】

微生物生命において偏在し、機能が多彩なトレハロースの重要性は、すべての微生物が細胞内でトレハロースを合成することができる、および／またはトレハロース代謝の複数の合成および分解経路を用いて環境から取り出すという事実によって証明される。程度の差はあるがこれらの経路の利用は、特定の細菌ではトレハロース利用の遺伝的プログラムに依存している。

【0099】

20

トレハロースの細胞内合成を行う、最も知られ、広く利用されている経路では、グルコシル基供与体として様々なヌクレオシド二リン酸グルコース誘導体 (ADP-D-グルコース、CDP-D-グルコース、GDP-D-グルコース、TDP-D-グルコース、およびUDP-D-グルコース)、およびトレハロース-6-リン酸シンターゼ (TPS) およびトレハロース-6-リン酸ホスファターゼ (TPP) の2つの酵素による触媒を受ける2段階反応のα-D-グルコース-6-リン酸を利用している (Styrvold OB and Strom AR, "Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed Escherichia coli K-12 strains: influence of amber suppressors and function of the periplasmic trehalase," J. Bacteriol, 1991; 173 (3): 1187-1192. PMID: 1825082)。

30

通常、トレハロース-6-リン酸シンターゼを処理するマイコバクテリウム・スメグマチスおよび結核菌などの一部の放線菌は、グルコシル基の供与体として5種類のヌクレオシド二リン酸グルコース誘導体すべてを利用することができる点について述べておく必要がある (Lapp D, Patterson BW, Elbein AD, "Properties of a trehalose phosphate synthetase from Mycobacterium smegmatis. Activation of the enzyme by polynucleotides and other polyanions," J. Biol. Chem., 1971; 246 (14): 4567-4579.)。

40

【0100】

また、トレハロースは、リン酸化合物のトレハロース-6-リン酸およびグルコース-6-リン酸の有無とは関係なく、マルトースから直接合成することができる。この経路には、トレハロースの1, 4-結合を1, 1-結合に変換するマルトース (グリコシル-α 1, 4-グルコピラノシド) の分子内転位が含まれ、この反応は酵素トレハロースシンターゼにより触媒され、初期生成物として遊離トレハロースを生じる。コリネバクテリウム・グルタミクムでは、この経路が反対の方向に働き、炭素供給源として再利用するため、過剰のトレハロースをマルトースに戻すことで、トレハロース酵素の欠如を補っていると想定されている (De Smet KA, Weston A, Brown IN,

50

Young DB, Robertson BD, "Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria," *Microbiology*, 2000; 146 (Pt 1): 199-208. PMID: 10658666); (Wolf A, Cramer R, Morbach S, "Three pathways for trehalose metabolism in *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 and their significance in response to osmotic stress," *Mol Microbiol*, 2003; 49 (4): 1119-1134. PMID: 12890033.)。

10

【0101】

さらなる経路では、トレハロースがグリコーゲンまたはデンプンなどの多糖類から形成することができ、これはまず、イソアミラーゼがグリコーゲンの $\alpha-1, 6$ -グリコシド結合またはデンプンなど他の多糖類の $\alpha-1, 4$ -グリコシド結合を加水分解し、マルトデキストリンを生成し、次に、マルトオリゴシルートレハロースシンターゼ (MTS) が分子内トランスグルコシル化により $\alpha, \alpha-1, 1$ -グリコシド結合を形成することで、マルトデキストリンをマルトオリゴシルートレハロースに変換し、第三の酵素マルトオリゴシルートレハローストレハロヒドロラーゼ (MTH) が前記生成物を加水分解し、トレハロースとグリコシル残基が2つ短くなったマルトデキストリンを形成するなど、いくつかの酵素の作用により行われる。3種類の異なるトレハロースの生合成経路を有するコリネバクテリウム・グルタミクムでは、これがトレハロース生合成の主要経路である (Maruta K, Mitsuzumi H, Nakada T, Kubota M, Chaen H, Fukuda S, Sugumoto T, Kurimoto M, "Cloning and sequencing of a cluster of genes encoding novel enzymes of trehalose biosynthesis from thermophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*," *Biochim Biophys Acta*, 1996; 129 (3): 177-181. PMID: 8980629.)。

20

【0102】

未修飾型およびリン酸化型のいずれについても、トレハロースの分解にはいくつか代わりの経路がある。未修飾トレハロースは、加水分解酵素トレハラーゼ (細胞質のトレハラーゼ-TreF、または周辺質のトレハラーゼ-TreA) により分解され、2つの β -D-グルコース分子を生成するか、または、酵素トレハロースホスホリラーゼの作用により分断され、最終生成物として β -D-グルコース-6-リン酸を生成することができる。いくつかの経路で重要な酵素であるトレハロースホスホリラーゼ (TP) は、 β -D-グルコース-1-リン酸と β -D-グルコース、または α -D-グルコース-1-リン酸と α -D-グルコースへのトレハロースの可逆的合成 (および分解) を触媒することができる。リン酸化型のトレハロース-6-リン酸は、トレハロース-6-リン酸ヒドロラーゼにより加水分解され、 β -D-グルコースと β -D-グルコース-6-リン酸を生成するか、またはトレハロース-6-リン酸ホスホリラーゼにより分解され、 β -D-グルコース-1-リン酸と β -D-グルコース-6-リン酸を生成することができる。分解経路のすべての最終生成物は解糖により代謝される可能性がある。トレハロースのリン酸化型であるトレハロース-6-リン酸を利用したトレハロース分解経路は、グラム陽性菌およびグラム陰性菌のいずれにも多く認められる (Helfert C, Gotsche S, Dahl MK, "Cleavage of trehalose-phosphate in *Bacillus subtilis* is catalyzed by a phospho- α -(1-1)-glucosidase encoded by the TreA gene," *Mol Microbiol*, 1995; 16 (1): 111-120. PMID: 7651129.) ;

30

40

50

(Levander F, Andersson U, Radstrom P, "Physiological role of beta-phosphoglucosylase in *Lactococcus lactis*," *Appl Environ Microbiol*, 2001; 67(10): 4546-4553. PMID: 11571154.)。

【0103】

トレハロースの複数の合成および分解経路は、様々な微生物に対し、絶えず変化する環境条件の中であらゆる目的に使える浸透圧保護物質として、トレハロースを利用する無制限の機会を提供している。ヒトの体の生きた環境の中では、細菌が生理学的変化の範囲内でも、体液の浸透圧の時間的、空間的変動に絶えず適応する必要がある。浸透圧適応能力 (osmoadaptation) では、細菌が絶えず浸透活性化合物 (浸透圧調節物質) の取り込みと放出の普遍的メカニズムを構成的に利用している。細菌は環境から荷電イオンを取り込み、相溶性のある溶質を取り込むか、または合成することで外部の浸透圧が上昇した条件に適合している。低浸透圧の培養液に移行すると、正常な膨圧を回復し、細胞が破裂しないようにするため、これらの浸透圧保護物質を排出する必要がある。相溶性のある溶質の取り込みおよび排出経路には、PTS系、ABCトランスポーター、機械受容チャネル、およびポーリンが含まれる (Berrier CM, Besnard M, Ajouz B, Coulombe A, and Ghazi A, "Multiple mechanosensitive ion channels from *Escherichia coli*, activated at different thresholds of applied pressure," *J. Membr. Biol.*, 1996; 151: 175-187.); (Bremner R and Kraemer R, "Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria," pp. 79-97. In G. Storz and R. Hengge-Aronis (ed.), *Bacterial stress responses*. 2000; ASM Press, Washington, D. C.); (Chang G, Spencer R, Lee AT, Barclay MT, and Rees DC, "Structure of the MscL homolog from *Mycobacterium tuberculosis*: a gated mechanosensitive ion channel," *Science*, 1998; 282: 2220-2225.); (Morbach S and Kraemer R, "Body shaping under water stress: osmosensing and osmoregulation of solute transport in bacteria," *ChemBioChem*, 2002; 3: 384-397.)。

【0104】

相溶性のある溶質は小さく、双性イオンで、非常に溶解性の高い有機分子であり、アミノ酸 (プロリン、グルタミン酸)、アミノ酸誘導体 (グリシンベタイン、エクトイン)、および糖 (トレハロースおよびスクロース) など、様々な物質を含み、タンパク質を安定化させ、細胞を水和させると考えられる (Steator RD and Hill C, "Bacterial osmoadaptation: the role of osmolytes in bacterial stress and virulence," *FEMS Microbiol. Rev.*, 2002; 26: 49-71.)。細菌によって、環境から取り込まれた浸透圧調節物質の好み異なる可能性があるが、これらはすべてあらゆる状況に使える浸透圧保護物質としてトレハロースを構成的に利用している。例えば、ヒト消化管の大腸菌およびコレラ菌はグリシンベタインを好むが、その合成はプロリン、ベタイン、またはコリンの外部供給に依存しており、これらの化合物は環境中では容易に利用できないか、または、微生物膜の深層では大幅に減

少している可能性がある。これらの化合物が利用できない場合、細胞はグルタミンおよびトレハロースを蓄積させることで、中等度の浸透圧耐性を達成することができる (Styvold OB, Strom AR, "Synthesis, accumulation, and excretion of trehalose in osmotically stressed *Escherichia coli* K-12 strains: influence of amber suppressors and function of periplasmic trehalase," *J Bacteriol*, 1991; 173 (3): 1187-1192. PMID: 1825082.); (Kapfhammer D, Karatan E, Pflughoeft KJ, and Watnik PI, "Role for Glycine Betaine Transport in *Vibrio cholera* Osmoadaptation and Biofilm Formation within Microbial Communities," *Applied and Environmental Microbiology*, July 2005: 3840-3847.)。 10

【0105】

実験室で増殖させた細菌で証明されたとおり、浸透圧ストレスに対する最初の適応反応は細胞質カリウムの取り込み率および量の上昇であり、続いてグルタミン酸が蓄積し、トレハロースが合成される (Dinnbier U, Limpinsel E, Schmid R, and Bakker EP, "Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaptation of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations," *Arch. Microbiol.*, 1988; 150: 348-357.); (McLaggan D, Naprstek J, Buurman ET, and Epstein W, "Interdependence of K⁺ and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*," *J. Biol. Chem.*, 1994; 269: 1911-1917.); (StromAR and Kaasen I, "Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression," *Mol. Microbiol.*, 1993; 8: 205-210.)。 20 30

(好気状態で増殖させた)大腸菌プロテオームの浸透圧ストレスに応じた時間依存的(10~60分)変化から、トレハロースおよび細胞質トレハラーゼTreF(調節性を有するトレハロース分解酵素)いずれの合成についても、高浸透圧ストレスに対する細菌適合の中期(10~30分)および長期(30~60分)に遺伝子がアップレギュレートされ、トレハラーゼTreF合成遺伝子は適合の初期(0~10分)にすでにアップレギュレートされていることが証明された (Weber A, Kogl SA, and Jung K, "Time-Dependent Proteome Alterations under Osmotic Stress during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*," *Journal of Bacteriology*, Oct. 2006: 7165-7175. doi: 10.1128/JB.00508-06.)。 40

【0106】

相溶性のある溶質の合成および／または輸送は時間依存的で、特に嫌氣的に増殖した細胞ではエネルギーを消費するプロセスであり、細菌ではコストがかかる。したがって、いかなる特定の細菌においても、浸透圧ストレスに直面して相溶性のある溶質の選択は、常に環境中で利用でき、細胞代謝で再使用することができ、絶えず変化する浸透圧に素速く 50

、柔軟に反応し、その輸送および合成のエネルギー消費が少ない物質（またはその前駆体）が優先される。トレハロースは普遍的なストレス反応の代謝物および浸透圧保護物質として、これらの要件をすべて満たしているように思われる。

【0107】

トレハロースは安定な二糖類であり、2つのグルコース分子のアノマー炭素のヒドロキシル基の間に縮合して形成したグリコシド結合〔O- α -D-グルコピラノシル-(1-1)- α -D-グルコピラノシド〕を有し、他の分子と相互作用できないようになっているため、トレハロースは最も化学的に不活性な糖となっている（Birch GG, "Trehaloses," Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1963; 18: 201-225.）;（Elbein AD, "The metabolism of alpha, alpha-trehalose," Adv. Carbohydr. Chem. Biochem., 1974; 30: 227-256.）。柔軟なグリコシド結合は内部に水素結合がないこともあって、柔軟な分子となっているが、このグリコシド結合は容易に開裂せず、1 kcal/molの結合は非常に弾力性があるため、トレハロース分子は広範な温度およびpH条件に耐えることができる（Pava CL and Panek AD, "Biotechnological applications of the disaccharide trehalose," Biotechnol. Annu. Rev., 1996; 2: 293-314.）。異常なアノマー炭素（1-1）間のグリコシド結合のため、さらに重合するために利用できる炭素がなく、トレハロースは二糖類としてしか存在せず、ある程度バイオフィルムのゲル様基質の二糖類分子として分布し、トレハロースと水分子との相互作用によりその密度に影響している。最も強い分子間力である分子間水素結合（H結合）は、トレハロースと水との相互作用の中心である。具体的に述べると、そのような結合はトレハロース分子の周りにある水の構造を変化させ、分子の動的シミュレーションで観察され、実験研究から裏付けられるトレハロース分子の自己凝集現象を説明している。

【0108】

トレハロースの化学構造は図1aに示されており、 α 結合二糖類が α -グルコース単位間の α , α -1, 1-グリコシド結合で形成していることを示している。この酵素の骨格構造は図1bに示されており、グルコース単位によって2つの面が確立されていることを示している。

【0109】

トレハロースは、広範な溶媒和により水を捉えると判断されてきた。水分子はトレハロース分子の周りの溶媒和錯体に配列され、水がH結合の形成によりトレハロースの官能基と結合し、無限希釈すると、溶媒和数は1.5に近づく（全二糖類の中で最も多い）。このように水和数が比較的多いことは、トレハロース水溶液の最小濃度で水を再構築し、ゲル化現象に寄与する能力が高いことを裏付けている。水の再構築挙動については、トレハロースは水分子間の水素結合を約2%強くする。これは、トレハロースクラスターによって再構築されることと一致し、純粋な水トレハロースネットワークの構造を分解するのに十分である。水分子間でより強く、より直線的で、より最適化されたH結合が形成するが、より弱い結合はトレハロース-水の相互作用に帰属される（Sapir L and Harries D, "Linking Trehalose Self-Association with Binary Aqueous Solution Equation of State," J. Phys. Chem. B, 2011; 115: 624-634.）。

【0110】

トレハロースは水溶液中で濃度依存的に自己結合し、（1.75 M以上の濃度で）最終的に浸透し、強く結合したクラスターネットワークが形成するまでサイズが増大したクラスターを形成し、溶液の動的性質に影響する。他の二糖類（スクロース、マルトース、イソマルトース）と比較し、トレハロースに分子内水素結合がないことは、凝集する傾向が

高いことを説明しており、それによって、低いトレハロース濃度での水の動的性質にすでに影響している (Lebret A, Bordat P, Affouard F, Descamps M, Migliardo FJ, Phys. Chem. B, 2005; 109: 11046.); (Lebret A, Affouard F, Bordat P, Hedoux A, Guinet Y, and Descamps M, Chem. Phys., 2008; 345: 267.); (Peric-Hassler L, Hansen HS, Baron R, and Hunenberger PH, "Conformational properties of glucose-based disaccharides investigated using molecular dynamics simulations with local elevation umbrella sampling," Carbohydr. Res., 2010; 345: 1781.)。

【0111】

タンパク質 (リゾチーム)、糖、および水の三成分混合物では、0.5 M の中程度の濃度でトレハロースがタンパク質の周りにクラスターを形成することができ、これによって、溶媒和の性質が変化した水分子の薄い層をトラップし、タンパク質の周りの水和殻において溶媒である水分子の「動的希釈剤」としての役割を果たしている。異方性水和 (トレハロースのグリコシド酸素に隣接した非常にわずかな水和) のためトレハロース分子の立体配座剛性はかなり高く、これが水素結合した水分子と安定な相互作用を提供し、トレハロースは分子動的シミュレーションの1段階につき平均2.8個の長寿命水素結合を作るのに対し、他の糖では平均2.1個である (Lins RD, Pereira CS, and Hunenberger PH, "Protein-Trehalose Interactions in Aqueous Solution," Proteins, 2004; 55: 177.); (Choi Y, Cho KW, Jeong K, and Jung S, "Molecular dynamic simulations of trehalose as a 'dynamic reducer' for solvent water molecules in the hydration shell," Carbohydr Res., June 12, 2006; 341(8): 1020-1028.)。

【0112】

トレハロース水溶液と接するDPPC (ジパルミトイルホスファチジルコリン) から成る脂質膜をシミュレーションした三成分混合物は、膜界面付近にトレハロース分子がクラスターを形成し、トレハロース分子間および脂質頭部と、いずれも水素結合を形成していることを示している (Pereira CS, Hunenberger PH, "The effect of trehalose on a phospholipid membrane under mechanical stress," Biophys. J., 2008; 95: 3525.); (Sum AK, Faller R, and de Pablo JJ, "Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides," Biophys. J., 2003; 85: 2830.)。トレハロースは水と競合して細胞膜のカルボニルおよびリン酸のいずれとも結合し、これらの基と水のH結合よりも強いOH架橋を形成し、水の置換は糖の挿入によって相殺される。少なくとも10個の水素結合を形成することのできるグルコース二量体のトレハロースは、脂質二層面にほぼ垂直に脂質界面に挿入し、0.1 mM という低さのトレハロース濃度で細胞膜の水活性を70%まで低下させることができる。トレハロースの挿入はカルボニルとリン酸で同時に水を置換するが、水和した脂質については細胞膜の表面に異常を引き起こさない (Pereira CS and Hunenberger PH, "The effect of trehalose on a phospholipi

d membrane under mechanical stress," Biophys. J., 2008; 95:3525.); (Sum AK, Fallner R, and de Pablo JJ, "Molecular simulation study of phospholipid bilayers and insights of the interactions with disaccharides," Biophys. J., 2003; 85: 2830.); (Villareal M, Diaz SB, Disalvo EA, Montich G, Langmuir, 2004; 20: 7844.).

【0113】

水が置換した結果、トレハロースは細胞表面の電位、したがって、細胞の凝集および表面への付着に影響する可能性がある。これらの現象では、少なくとも2つのメカニズムがある可能性がある。まず、細胞表面電位の大きさは、細胞膜のリン脂質およびカルボニル化合物との結合において、水とトレハロースを置換することで調節できる。第二に、(不均一な)この同じ水との置換により表面電位が不均一になり、接着性も与えられる(Poortinga AT, Bos R, Norde W, and Busscher HJ, "Electric double layer interactions in bacterial adhesion to surfaces," Surface Science Reports, 2002; 47: 1-31.); (Disalvo EA, Lairion F, Martini F, Almaleck H, Diaz S, and Gordillo G, "Water in Biological Membranes at Interfaces: Does it Play a Functional Role?," An. Asoc. Quim. Argent., 2004; V. 92 n. 4-6 Buenos Aires ago. / dic.).

【0114】

トレハロースとバイオフィルムの形成

遍在する一般的ストレス反応の代謝物および浸透圧保護物質としてのトレハロースの独特の性質、およびその(バイオフィルム基質の95%までを有する)水との相互作用に関する特異的な特徴を基に考えると、トレハロースは微生物膜の最も重要な成分の1つであり、その水との特異的な相互作用はバイオフィルム形成の最も重要なメカニズムの1つであると考えることができる。

【0115】

ヒトの体における病原菌としての細菌の成功は、新しい環境に適応し、表面に付着し、バイオフィルムで覆って保護した状態でそこに留まり、バイオフィルムによる慢性感染として自身を確立する能力にかかっている。微生物膜の形成は微生物がその環境に適応する連続的なプロセスと見ることができるため、トレハロースおよびその水との相互作用は、バイオフィルム発達のすべての段階で重要な役割を果たしている可能性がある。

【0116】

まず、微生物が浮遊微生物の形でヒトの体内に入ると、様々なストレス(まずは浸透圧ストレス)を受けやすく、一般的ストレス反応を受け、水との最初の相互作用で微生物膜の形成プロセスを開始するトレハロースを産生する。この初期段階では、トレハロースが様々な方法で表面への浮遊細菌の付着を促進し、細胞膜界面での水と脂質頭部との相互作用の結果、微生物細胞表面の電位を低下させ、細菌細胞の凝集、初期の吸収、および表面への付着を生物学的および非生物学的に促進する。また、トレハロースは、細菌細胞周囲の溶媒和の性質が変化した水和層を形成し、この層内(および、第3および第4までの水和層)の水の動的性質を抑制するため、細菌細胞の動きが遅くなり、細菌細胞の凝集および様々な表面への付着を助ける。さらに、トレハロースは水溶液中で濃度依存的に自己会合し、クラスターネットワークを形成し、これが水溶液の動的性質に影響する。トレハロースは広範な溶媒和により、溶液中で水を再構成し、水分子間の水素結合を高める強力な活性があるため、ゲル化現象とバイオフィルム形成に寄与する。

【0117】

バイオフィルム発達の次の段階（細菌コロニーの形成およびバイオフィルムの成熟）では、細菌がバイオフィルム中の細胞密度の上昇、栄養素の制限、および老廃物の蓄積など、絶えず変化する環境条件に反応し、一般化ストレス反応の代謝物および浸透圧保護物質としてトレハロースを連続的に産生する。次に、連続的なトレハロースー水の相互作用が新しい水分子を引きつけ、さらに水を再構成し、バイオフィルムの新しい層を形成し、徐々にバイオフィルムの量を増加する。この段階で、細菌はバイオフィルム基質に、特定のタンパク質（付着因子、基質と相互作用する因子）、相溶性のある溶質、多糖類、脂質、リン脂質、および老化および溶解細胞の残骸などの代謝の最終生成物または副生成物を含む様々な細胞外物質を放出し、バイオフィルム三次構造の形成、バイオフィルム構造の安定化、バイオフィルム基質の肥大、およびバイオフィルム密度の上昇に寄与する。

10

【0118】

バイオフィルムが劣化するにつれ、細菌細胞に隣接した深層のトレハロース蓄積量が多くなるため、バイオフィルム上層のトレハロース量が減少する可能性があり、トレハロースの水再構成作用、水分子間の水素結合の強化効果、および細菌細胞間の凝集力が徐々に低下し、バイオフィルムの上層がはがれ落ち、病原性細菌が新しい場所に伝搬しやすくなる。

【0119】

バイオフィルム発達のすべての段階で、細菌は、様々な消毒剤および抗菌薬の使用を含むバイオフィルムに対するあらゆる環境からの攻撃に対し、一般的ストレス反応の代謝物および浸透圧保護物質としてさらにトレハロースを産生することで反応し、これによってさらにバイオフィルムゲル基質の量と密度が上昇し、有害物質のバイオフィルムへの浸透を予防する。

20

トレハロースは、ほとんどが様々な栄養素のバイオフィルム形成に対する作用を評価する、またはバイオフィルムのエキソポリマー基質の内容を分析することを目的とした試験研究において、実験室で増殖された微生物膜の他の糖、二糖類および多糖類と一緒に検出された。しかし、現在まで、バイオフィルムの特定成分としてのトレハロースの重要性、またはトレハロースおよびその水との相互作用が微生物膜の発達メカニズムに果たすと考えられる役割について、これらの研究で具体的な結論は得られていない。

【0120】

30

例えば、トレハロースは、アスペルギルス・フミガーツスバイオフィルムの空中増殖する菌糸の単糖類ーポリオール分画において、グリセロール（5%）、マンニトール（18%）、およびグルコース（74%）とともに少量（3%）検出され、すべてのヘキソースおよびポリオールが細胞外と同じ割合で細胞内に認められた（Beauvais A, Schmidt C, Guadagnini S, Roux P, Perret E, Henry C, Paris S, Mallet A, Prevost M, and Latge JP, "An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*," *Cellular Microbiology*, 2007; 9(6): 1588-1600.）。別の例では、リステリア・モノサイトゲネス（食品産業で最も多く見られるバイオフィルム生成病原菌）によるステンレス鋼でのバイオフィルム発達は、増殖培養液に栄養素としてマンノースまたはトレハロースがあると強化され、21℃で12日間インキューベートした場合、一定のバイオフィルム生産にはトレハロースがマンノースよりも優れていた（Kim KY and Frank JF, "Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel," *Journal of food protection*, 1995; 58(1): 24-28.）。別の研究では、構造的および代謝的に特徴的なミュータンス連鎖球菌（歯科バイオフィルムでは最もよくみられる病原菌）が作るバイオフィルムの形成は、表面吸収される唾液α-アミラーゼ

40

50

および細菌グルコシルトランスフェラーゼの存在下、スクロースのみと比較し、スクロースおよびデンプンを併用することで亢進され、マルトースの取り込み／輸送および発酵／解糖に関連した遺伝子がアップレギュレートされた (Klein MI, DeBaz L, Agidi S, Lee H, Xie G, Lin AH, Hamaker BR, Lemos JA, and Koo H, "Dynamics of *Streptococcus mutans* Transcriptome in Response to Starch and Sucrose during Biofilm Development," PLoS ONE, 2010; 5(10): 1-13.)。

次の研究では、炭化水素汚染された高山生息環境の酵母 (*Cryptococcus terreus*-PB4株、および*Rhodotorula creatinivora*-PB7およびPB12株) が、唯一の炭素およびエネルギー源としてグルコースまたはフェノールを含む培養液での増殖中にグリコーゲン (酸およびアルカリ溶解性) およびトレハロースを合成および蓄積し、*Rhodotorula creatinivora*のいずれの株でもバイオフィームが多く形成された (Krallish I, Gonta S, Savenkova L, Bergauer P, and Margesin R, "Phenol degradation by immobilized cold-adapted yeast strains of *Cryptococcus terreus* and *Rhodotorula creatinivora*," Extremophiles, 2006; 10(5): 441-449.)。

【0121】

これまでの結果と対比し、実験室で増殖された野生型大便連鎖球菌は、増殖培養液にマルトースまたはグルコースが存在すると強いバイオフィームを形成し、トレハロースを含む培養液では非常に少量のバイオフィームを形成した (Creti R, Koch S, Fabretti F, Baldassarri L, and Johannes H, "Enterococcal colonization of the gastro-intestinal tract: role of biofilm and environmental oligosaccharides," BMC Microbiology, 2006; 6: 660-668.)。

【0122】

トレハロースは酵母および真菌では最も多量に存在する二糖類であるため、バイオフィームを形成する酵母または真菌感染のバイオフィーム基質、および／または酵母および／または真菌を含む多種バイオフィームは、抗菌薬の浸透にさらに耐性を示す可能性がある。臨床所見では、アミラーゼ、様々な単糖類 (ただし、トレハロース分解の特異的酵素は含まれていなかった)、ペプチダーゼ、プロテイナーゼ、リパーゼ、および線維素溶解酵素を含む酵素製剤を適用しても、細菌およびカンジダ感染の混合バイオフィームまたはバイオフィームを形成するカンジダ属による慢性感染は治療が困難であることが証明された。

【0123】

酵素トレハラーゼ

トレハロースは、高度に特異的な酵素トレハラーゼ (アルファ、アルファートレハラーゼ-グルコヒドロラーゼ) によって分解され、加水分解でグルコース2分子を生成し得、このプロセスは、酵母、細菌、および昆虫を含む種々の生物の生命機能において重要で、おそらく必須であると思われる (Nwaka S and Holzer H, (Nwaka S and Holzer H, "Molecular biology of trehalose and trehalases in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*," Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 1998; 58: 197-237.)。酵素トレハラーゼ (α 、 α -トレハラーゼ-1-C-グルコヒドロラーゼ、EC 3.2.1.28) は、動物及び植物を含む多くのミクロおよびマクロ生物に存在することが報告されている

が、大抵の場合、この重要な酵素の機能も特性のいずれも研究されていない (Elbein AD, "The metabolism of α , α -trehalose, "Adv. Carbohydr. Chem. Biochem, 1974; 30: 227-256.); (Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, and Carroll D, "New insights on trehalose: a multifunctional molecule, "Glycobiology, 2003; Vol. 13, No 4: 17R-27R.)。

【0124】

この酵素の541種ものモデル変異体は、Protein Model Portal (<http://www.proteinmodelportal.org/>) に記載されている。異なる酵素変異体 (アイソザイムス) に対応するこれらのモデルのいくつかは、図2a~2dに示されている。

【0125】

下位の生命体 (酵母、真菌、細菌) の形態に於いては、主に2種のタトレハラーゼ酵素: 中性トレハラーゼ (NT) および酸性トレハラーゼ (AT) があり、それぞれ2つの異なる遺伝子、NTH1及びATH1によりコードされている。これらの微生物でトレハラーゼ活性の大部分は、細胞質ゾルに位置する中性トレハラーゼに由来し、最適pH約7で、基質としてトレハロースに非常に特異的であり、セロビオース、マルトース、ラクトース、蔗糖、ラフィノース、及びメリビオースに対し非活性であるが、この酵素は、特定の調節機能がある (App H and Holzer H, "Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant, "J. Biol. Chem., 1989; 264: 17583-17588.)。酸性または液胞トレハラーゼは、最適pH4.5を有し、基質としてトレハロースに非常に特異的であり、セロビオース、マルトース、ラクトース、スクロース、およびメリビオースでは活性を示さず、この酵素は、細胞膜周辺腔で作用し、外因性トレハロースと結合し、それを内在化し、液胞で切断して遊離グルコースを生成する (Mittenbuhler K and Holzer H, "Purification and characterization of acid trehalases from the yeast SUC2 mutant, "J. Biol. Chem., 1988; 263: 8537-8543.) ; (Stambuk BU, de Arujo PS, Panek AD, and Serrano R, "Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*, "Eur. J. Biochem., 1996; 237: 876-881.)。

【0126】

両トレハラーゼの活性は、指数関数的に成長中の酵母細胞内では、低い、グルコース消失後の、安定相成長時では、高い (Winkler K, Kienle I, Burger M, Wagner JC, and Holzer H, "Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast, "FEBS Lett., 1991; 291: 262-272.)。酵母 *S. cerevisiae* のATH1欠失変異体は、炭素源としてトレハロースを含む培地で生育し得ないが、*Candida utilis* の変異株は、AT活性の欠如にもかかわらず、炭素源としての細胞外トレハロースを利用し得る。大腸菌のような種々の細菌は、取り込みシステムの一部として作用し、PTS (phosphotransferase system, ホスホトランスフェラーゼ系) にグルコースを供給し、亦浸透調節材としてトレハロースの代謝に関連し得るトレハラーゼを有する (Horlacher R, Uhland K, Klein W, Erhmann M, and Boos W, "Characterization of a cytoplasmic trehalase of *Escherichia coli*, "J. Bacteriol., 1996; 178: 625-627.)。

【0127】

植物界では、その基質トレハロースが維管束植物ではまれであるが、酵素トレハラーゼは、普遍的である。植物に於けるトレハラーゼ活性に対する明確な役割は、実証されていないが、植物トレハラーゼが寄生虫やその他の病原生物に対する防御の役割を果たす可能性か、或いは、植物に関連する細菌に由来するトレハロースの分解に参加する可能性が示唆されている (Muller J, Wiemken A, and Aeschbacher R, "Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development, "Plant Sci., 1999; 147: 37-47.) ; (Muller J, Aeschbacher RA, Winkler A, Boller T, and Wiemken A, "Trehalose and trehalase in Arabidopsis, "Plant Physiol., 2001; 125: 1086-1093.) 。

【0128】

二糖類トレハロースが哺乳類に存在することは知られていないが、酵素トレハラーゼは腎臓刷子縁膜及び腸絨毛膜の両方で、ヒトを含む哺乳動物で見出されている。腎臓でのトレハラーゼの役割は未だ明らかではないが、腸内でその機能は、摂取したトレハロースを加水分解することである (Dahlqvist A, "Assay of intestinal disaccharidases, "Anal. Biochem., 1968; 22: 99-107.) ; (Ruf J, Wacker H, James P, Maffia M, Seiler P, Galand G, Kieckbusch A, Semenza G, and Mantei N, "Rabbit small intestine trehalase. Purification, cDNA cloning, expression and verification of GPI-anchoring, "J. Biol. Chem., 1990; 265: 15034-15040.) ; (Yonemaya Y and Lever JE, "Apical trehalase expression associated with cell patterning after inducer treatment of LLC-PK monolayers, "J. Cell. Physiol., 1987; 131: 330-341.) 。

トレハロース代謝の他の酵素とは対照的に、ヒトでは α 、 α -トレハラーゼのみ存在し、小腸におけるリーベルキューン(Lieberkuhn)腺によって生成され、マルターゼ、スクラーゼ-イソマルターゼ複合体、 β -グリコシダーゼ-ラクターゼのような他の特定の二糖類分解酵素と共に腸液の構成成分である。(Mayes PA, "Carbohydrates of physiologic significance, "In: Harper's Biochemistry, 25th ed, 2000, pp. 149-159, Appleton & Lange, Stamford, CT.) ; (Rodwell VW and Kennelly PJ, "Enzymes: General Properties; Enzymes: Kinetics, "In: Harper's Biochemistry, 25th ed, 2000, p. 74-102, Appleton & Lange, Stamford, CT.) 。

他のすべての二糖類分解酵素と同様に、トレハラーゼは、前記触媒ドメインが自由に基質と反応する間、腸管腔で腸細胞の刷子縁に取り付いたままである。腸管腔には遊離トレハラーゼの活性あまり無く、ほとんどの活性は、腸上皮細胞の刷子縁上にある小さな「小頭部(knob)」と関連する。他の二糖類で示したように、トレハラーゼ欠損症患者では、受動拡散によってわずかな部分(約0.5%)が吸収され得る(van Elburg RM, Uil JJ, Kokke FTM, Mulder AM, van der Broek WGM, Mulder CJJ, and Heymans HSA, "Repeatability of the sugar-absorption test, using lactulose and mannitol, for measuring intestinal permeability for sugars, "J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr., 1995; 20: 184-188.) 。

トレハラーゼ活性の痕跡が、腎皮質、血漿、尿、肝臓、及び胆汁中にも見出

されていて、これらの場所での前記酵素の機能は未だ明らかではないが、尿及び胆汁中のトレハラーゼは、それが腎臓と肝臓に存在することに付随して起こり得る (E z e L C , "P l a s m a t r e h a l a s e a c t i v i t y a n d d i a b e t e s m e l l i t u s , " B i o c h e m G e n . , 1 9 8 9 ; 7 : 4 8 7 - 4 9 5 .)

。

【0129】

ヒトの酵素、 α 、 α -トレハラーゼの生化学的特性は以下を含む。

- ・基質（二糖類トレハロース）に対する高い特異性
- ・活性化する方法は、基質（トレハロース）との直接接触
- ・活性の最適条件は、pH 5. 0～と7. 0間の範囲（他の二糖類分解酵素に類似）
- ・作用後の生成物は、グルコース2分子
- ・熱感受性は、グリコシル化タンパク質として、おそらく他の二糖類分解酵素に類似
- ・触媒効率は、基質トレハロースに対する高い特異性のために高い
- ・活性に対して補酵素或いは金属イオンを必要としない
- ・酵素の共変異体 (v a r i a n t) は不明。

10

【0130】

ヒトの α 、 α -トレハラーゼ酵素の機能は、摂取された二糖類トレハロースをグルコースに加水分解することである。トレハラーゼ欠損症は、既知の代謝疾患であり、この場合、体が二糖類トレハロースをグルコースに変換できない。この欠損を有する人は、キノコを食べた後に嘔吐、腹部不快感、及び下痢を催すが、大抵の場合、常染色体劣性型で遺伝するように思われる (K l e i n m a n R E , G o u l e t O , M i e l i i - V e r g a n i G , S h e r m a n P M , I n : W a l k e r ' s P e d i a t r i c G a s t r o i n t e s t i n a l D i s e a s e : P h y s i o l o g y , D i a g n o s i s , M a n a g e m e n t , 5 - t h e d i t i o n , 2 0 0 8) ; (S e m e n z a , G . , A u r i c c h i o , S . , a n d M a n t e i , N . I n : T h e M e t a b o l i c & M o l e c u l a r B a s e s o f I n h e r i t e d D i s e a s e ; 8 - t h e d . , 2 0 0 1 ; C h a p t e r 7 5 : S m a l l I n t e s t i n a l D i s a c c h a r i d o s e s . M c G r a w - H i l l , N e w Y o r k .) 。腸トレハラーゼ単独欠損症は、グリーンランド住民の約8%に見出されており、フィンランド人の間では稀ではないが、その他の場所では、稀であると考えられる。トレハラーゼ酵素単独欠損症の低い(2%)発生率が、米国、英国、および欧州本土住民について報告されている (B e r g o z R , V a l l o t o n M C , a n d L o i z e a u E , " T r e h a l a s e d e f i c i e n c y , " A n n . N u t r . M e t a b . , 1 9 8 2 ; 2 6 : 1 9 1 - 1 9 5 .) 。英国では、吸収不全の疑いで調査した400人の患者から、369人(92%)は、生検で正常な腸組織像を有しており、トレハラーゼは、4, 79~37, 及び12 U/gタンパク質で正常範囲であった。31人(8%)の絨毛萎縮患者は、セリアック病の診断を受け、トレハラーゼを含む二糖類分解酵素が大幅に低下していたが、無グルテン食で治療後には、(ラクターゼを除く)すべての酵素の回復機能を得た。該著者等は、英国住民にトレハラーゼ活性の日常的な測定をする根拠はないと結論した (M u r r a y I A , C o u p l a n d K , S m i t h J A , A n s e l l I D , L o n g R G , " I n t e s t i n a l t r e h a l a s e i n a U K p o p u l a t i o n : E s t a b l i s h i n g a n o r m a l r a n g e a n d t h e e f f e c t o f d i s e a s e , " B r . J . N u t r . , 2 0 0 0 ; 8 3 (3) : 2 4 1 - 2 4 5 .) 。ベルギーでは、腹部症状と下痢の患者200人からの腸の生検標本では、全 α 、 α -トレハラーゼ欠損症(0~12 U/g粘膜)は、18(9%)例、部分的な欠損症(3~12 U/g粘膜)は、39(19.5%)例で検出され、患者(2%)4人だけが、選択的 α 、 α -トレハラーゼ欠損症で、その他の二糖類分解酵素は正常であったと発表され、これらのデータは、 α 、 α -トレハラーゼ欠損症が従来考えられてきたよりは一般的であり得ることを示唆した (B u t s J P , S t i l m a n t C , B e r n a s c o n i P , N e i r i n c

20

30

40

50

k C, De Keyser N, "Characterization of alpha, alpha-trehalase released in the intestinal lumen by the probiotic *Saccharomyces boulardii*", *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 2008; 43 (12) : 1489-1496.)。

【0131】

トレハラーゼの重要性は、先天性欠損や遺伝的異常を含む特定の病態で実証された：腸トレハラーゼのアイソザイムが低度或いは存在せずに、鎖肛の胎児由来の羊水試料に検出されたが、一方正常なレベルよりも高い腎臓のトレハラーゼ活性が、多発性嚢胞腎疾患胎児の羊水中に見出された (Elslinger MA, Dallaire L, Potier M, "Fetal intestinal and renal origins of trehalase activity in human amniotic fluid", *Clin Chim Acta*, July, 16, 1993; 216 (1-2) : 91-102.)。また、妊娠18週目の検診で 嚢胞性線維症の子供に対するリスクが4人に1人である妊婦14人の羊水穿刺による羊水中に、腸トレハラーゼ酵素の低レベルが検出された。更に19週目に中絶した2人の症例では、両胎児の膵臓及び腸粘膜を含む外分泌腺に嚢胞性線維症の特徴的な組織学的病変が見られており、またこれらの胎児の胎便中の総タンパク質含有量も対照に於けるより大幅に高かった (Szabo M, Teichmann F, Szeifert GT, Toth M, Toth Z, Torok O, Papp Z, "Prenatal diagnosis of cystic fibrosis by trehalase enzyme assay in amniotic fluid", *Article first published online*: 23 APR 2008; DOI: 10.1111/j.1300-0004.1985.tb01211.x.)。羊水中のトレハラーゼ酵素試験法は、嚢胞性線維症の出生前診断のための遺伝子検査として推奨された。

【0132】

トレハロース含有食品の大量摂取は、全世界で一般的ではないので、世界中の多様な住民のトレハラーゼ欠損症の発生頻度は、ほとんど知られていない。しかし、留意すべき事は、過去20年間に亘って、食品（主に、きのこ類、藻類、パン酵母）中のトレハロースの天然源に加えて、乾燥、凍結、及び加工食品の製造での添加剤として、亦、種々の製品（アイスクリーム、ベーク製品を含む）の水分保留剤として、米国を含むいくつかの国で承認されていることであり、調理済み食品または他の製品中のこの成分の標識の規定が無いことである (Abbott PJ and Chen J, WHO Food Additives Series 46: Trehalose. International Programme on Chemical Safety. Accessed Feb 4, 2010, available at : <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v46je05.htm>.)。

【0133】

外来性トレハロースの消化および利用に通常産生される酵素トレハラーゼの量は、健常者には、適切であるが、バイオフィームに基づく慢性感染症の人々、特にトレハラーゼ酵素欠損症の人に必要とされるものよりも遙かに少ない。従って、他の酵素製剤および（抗生物質を含む）抗菌剤と共に、酵素トレハラーゼを使用することは、バイオフィームに基づく慢性感染症のための種々の治療プロトコルの有効性を大幅に高め得る。

【0134】

従って、ここで開示した組成物および方法のために少なくとも1つの根拠は、既存の治療法の有効性を増進するために、微生物バイオフィームのトレハロース成分の加水分解に対して特異性の高い酵素トレハラーゼを、バイオフィームに基づく慢性感染症のための治療プロトコルに加えることである。

【0135】

酵素トレハラーゼは、天然の供給源（植物、酵母、真菌）から得ることができ、種々の

形態（粉末、液体、ゲル、錠剤、およびカプセル剤）で製造でき、バイオフィルムが問題である、（主に粘膜ライニング、口腔、気道、尿路、及び胃腸管）体内の如何なる特定の位置にも送達でき、単独または他の酵素と協調して使用でき、医療機器、工業用流体導管上のバイオフィルムを制御するのに使用し得る。しかしながら、利用可能な医療／保健の科学的情報は、未だに単独で、または酵素製剤のいずれかで、任意の処方薬、一般用医薬品、または栄養補助食品の成分として、亦医療機器上のバイオフィルム処理のための成分として、この酵素の証拠を示していない。また、工業的環境におけるバイオフィルムの問題のための酵素トレハラーゼ使用についての情報は、得られていない。

【0136】

バイオフィルムに基づく感染症の治療に関する実施態様

10

人体のバイオフィルムに基づく慢性感染症のための既存のプロトコルの有効性を高めるために、トレハラーゼ酵素は、単独で、または他の酵素と組み合わせて、感染バイオフィルムのサイトへの直接適用（気道の直接アクセス可能な粘膜ライニング、胃腸管、泌尿生殖路、目、皮膚、開放創など）および／または全身系酵素としてかのいずれかで、直接アクセスできない（またはアクセス困難な）感染サイト及び血流中のバイオフィルムに基づく感染症に対処するため、単独で或いは多酵素製剤に含ませるかで使用し得る。

【0137】

細菌性バイオフィルムの部位への直接適用においては、トレハラーゼ酵素は十分にバイオフィルム・マトリックスを分解するのに十分な曝露時間でトレハラーゼ（単独で又は他の多糖類分解酵素と組み合わせて）の適用から始め、次いで対応する適切な曝露時間に亘ってタンパク質および脂質を分解する他の酵素（タンパク質分解、線維素溶解、脂肪分解酵素）の組み合わせを適用する第2工程の多工程手順で使用されるべきであり、この手順の第3工程は、関連する感染症（または複数の）に特異の抗菌剤、または多菌抗生物質を適用すべきである。

20

【0138】

全身性酵素としては、上部胃腸管（胃や十二指腸）および／または投与製剤中のタンパク質分解酵素によるトレハラーゼの早期分解を回避するために、単独で、または他の多糖類分解酵素と組み合わせて、時間遅延放出性物質（または複数の）として使用、或いは時間遅延放出成分（または複数の）として多酵素製剤中に含ませるべきで、最終的にさらに吸収のため小腸内に放出させるべきである。このようにして、バイオフィルムに基づく感染症のアクセス困難な、例えば、血管の内層上、骨、関節内、移植された医療デバイス上などの「くぼみ（niche）」に、血流を介してトレハラーゼの直接吸収および流通のために供給することができる。

30

【0139】

また、本組成物および方法の範囲内で、健康維持や医療上の理由のために投与したトレハラーゼ及び他の多糖類分解酵素以外の酵素が、共投与タンパク質分解酵素、他の共投与された化合物、及び上部胃腸管で自然発生するタンパク質分解酵素から保護されているのを保証する方法がある。係る保護方法は、単独かまたは他の酵素と組み合わせて経口的に投与されるにかかわらず、保護すべき酵素の時間遅延放出製剤を作成することを含む。遅延時間を確立し得るので、保護された酵素の放出は、小腸内で起こる。また、保護された酵素および任意の同時投与したタンパク質分解酵素に差分時間遅延を確立して、これらの化合物の有害な相互作用を避け得る。現在市場に出ている従来消化酵素または全身性製剤では、含有酵素は、通常、タンパク質分解から保護されていない。

40

【0140】

上気道

上気道に影響を与えるバイオフィルムを形成する主要な病原体の菌種は、ヘモフィルス・インフルエンザ菌、クレブシエラ肺炎桿菌、肺炎球菌、連鎖球菌属、ブドウ球菌属、緑膿菌、カンジダ属、及びアスペルギルス属を含む。上気道における、これらのタイプのバイオフィルムに基づく感染症（慢性副鼻腔炎、副鼻腔炎、扁桃炎、咽頭炎、および中耳炎）には、トレハラーゼ酵素が、単独で、または他の多糖類分解酵素と共に、粘膜ライニン

50

グ上の感染バイオフィルム部位への直接適用に、注入、灌注、およびスプレー用生理食塩水系溶液として液体形態で、並びにゲル剤、軟膏剤、および粉末形態で使用し得る。

【0141】

局所治療は、多工程の手順を含むべきであって、該第1工程は、適切な曝露時間トレハラーゼ（単独または他の多糖類分解酵素と共に）の適用であり、第2工程は、同様の適切な曝露時間の間、タンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素の適用であり、次いで最終工程は、特定の感染性病原体に対処するため、より長い曝露時間、前記本感染に特異的な抗菌剤或いは複数菌の抗生物質の適用である。局所治療は、全身性酵素配合物（時間遅延放出形態のトレハラーゼを包含）と、好ましくは、複数菌活性を有する、全身性抗生物質とを用いて強化し得る。

10

【0142】

緑膿菌感染には、バイオフィルムに基づく感染部位への局所適用において、追加の酵素である、アルギン酸リアーゼ（緑膿菌バイオフィルムの重要な構成要素である、多糖類アルギン酸に対して高度に特異的）を、トレハラーゼまたは、他の多糖類分解酵素と組み合わせて、トレハラーゼに添加し得る。連鎖球菌属感染症には、バイオフィルムに基づく感染部位への局所適用において、追加の酵素である、デキストラナーゼ（球菌属によって産生するオリゴ糖であり、粘膜表面への微生物の付着およびバイオフィルム形成を促進するデキストランに対して高度に特異的）を、トレハラーゼまたは、他の多糖類分解酵素と組み合わせて、トレハラーゼに添加し得る。局所治療は、全身性酵素配合物（時間遅延放出形態のトレハラーゼまたは他の多糖類分解酵素と共にトレハラーゼを包含）と、好ましくは、複数菌活性を有する全身性の抗生物質とを用いて強化し得る。

20

【0143】

中耳炎

滲出を伴うかまたは伴わない中耳炎には、治療は全身性抗生物質と共に、全身性酵素製剤（時間遅延放出形態でトレハラーゼまたは他の多糖類分解酵素と共にトレハラーゼ）を含むべきである。この治療は、鼻および副鼻腔の空洞から中耳への感染拡大に対処するために、多工程の手順の局所治療で強化し得る、即ち：最初にトレハラーゼ単独、または他の多糖類分解酵素と共に適用、（例えば、緑膿菌のバイオフィルム中の多糖類のアルギン酸に対して高度に特異的なアルギン酸リアーゼ酵素、または連鎖球菌バイオフィルム中のオリゴ糖デキストランに高度に特異的なデキストラナーゼ酵素）、次いでタンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素の適用、そして最終的に鼻腔の粘膜へ抗生物質の適用。内耳への送達は、耳管を通して中耳への経路で鼻点滴により行い得る。

30

【0144】

滲出を伴い、鼓膜チューブを設置した中耳炎には、上記の全身性および局所治療は、追加の工程によって強化されるべきである：前記設置鼓膜チューブは、内側をトレハラーゼ、他の多糖類分解酵素（例えば、特異性の高いアルギン酸リアーゼとデキストラナーゼ）及び本病原体に特異的な抗菌剤或いは複数菌の抗生物質でカバーし得る。

【0145】

下気道

下気道内のバイオフィルムに基づく感染症の治療は、（a）全身性抗生物質と共に全身性酵素（時間遅延放出形態でのトレハラーゼ単独、或いはトレハラーゼ及び他の多糖類分解酵素）；工程で、生理食塩水系溶液中でトレハラーゼ単独、またはトレハラーゼと他の多糖類分解酵素（例えば、アルギン酸リアーゼ、デキストラナーゼ）の使用；次いで第2工程でのタンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素、及び第3工程での抗生物質の使用を含む多工程の手順に於ける気管支肺胞または全肺洗浄；（c）トレハラーゼ単独またはトレハラーゼと他の多糖類分解酵素（好ましくは既存の病原体に対して特異的）の鼻および副鼻腔点滴（多工程の手順で）、次いでタンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素、最後に抗生物質の使用を包含すべきである。

40

【0146】

慢性バイオフィルムに基づく感染状態に至る更なる要因は以下の通りである：遺伝性ト

50

レハラーゼ酵素欠損症（NIH Genetic and Rare Diseases Information Center 記載の稀な遺伝病）、嚢胞性線維症の人の遺伝的トレハラーゼ酵素欠損症、および乾燥食品の製造における承認された添加剤として、及びアイスクリームや焼き菓子など多くの食品中の保湿剤として、食品業界でのトレハロースの広範な使用による、人為的トレハラーゼ欠損症。

【0147】

嚢胞性線維症患者の遺伝性トレハラーゼ欠損症を考慮に入れると、食品中のトレハロースの無制限な消費は、係る人の上下気道の粘膜内層上に厚いバイオフィルムの形成に有利な要因になる。緑膿菌は、他の細菌や真菌との共生で、多糖類アルギン酸の産生とトレハロースの増産でこの環境を利用し、長期の抗生物質治療単独では、根絶することはほとんど不可能である厚手の複数菌のバイオフィルムの結果になる（係る治療は当該患者を維持し得るが）。この複数菌のバイオフィルムをその発生の任意の段階で対処するのに、治療は、以下を含む必要がある：a) 全身性酵素製剤の構成成分として時間遅延放出形態でトレハラーゼまたは他の多糖類分解酵素と共にトレハラーゼを使用、b) 第1工程での生理食塩水系溶液中でトレハラーゼ単独、またはトレハラーゼと他の多糖類分解酵素（例えば、アルギン酸リアーゼ、デキストラナーゼ）の使用；次いで第2工程での生理食塩水系溶液中タンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素、及び第3工程での抗生物質の使用を含む多工程の手順に於ける気管支肺胞または全肺洗浄、及びc) 全身性抗生物質の連続使用。

【0148】

この治療は、（多段階の手順で）トレハラーゼ単独あるいは他の多糖類分解酵素（好ましくは本病原体に特異的な）と共にトレハラーゼを鼻および副鼻腔点滴し、次いでタンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素、最後に抗生物質によって強化し得る。

【0149】

固有弁心内膜炎（NVE）、感染性心内膜炎、およびライン敗血症

NVE、感染性心内膜炎、及び血流感染のようなライン敗血症の好ましい治療プロトコルは、トレハラーゼ単独または他の多糖類分解酵素（好ましくは本病原体に特異的な）との組み合わせの、時間遅延放出形態による全身性投与；タンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素；及び特定の感染原体を対象とする抗生物質または複数菌抗生物質を含むべきである。これらのバイオフィルム媒介感染疾患に関連する代表的な生物は、連鎖球菌属、腸球菌属、肺炎球菌、ブドウ球菌属（コアグララーゼ陽性および陰性の両者）、腸内細菌、および真菌類（最も頻繁に、カンジダ・アルビカンス（*Candida albicans*）およびアスペルギルス属）を含む。すべてのこれらの病原体は、主に中咽頭、胃腸管、および泌尿生殖路を経由して血流へのアクセスを得るので、NVE、感染性心内膜炎、及びライン敗血症の全身性治療は、前記起源サイトがバイオフィルムに基づく感染症を表す場合、前記多工程手順（トレハラーゼ、他の酵素、および抗菌剤を適用して）を含む、前記起源サイトでのこれらの感染症の局所治療で強化されるべきである。

【0150】

慢性細菌性前立腺炎（CBP）と尿路感染症（UTI）

トレハラーゼ単独或いは他の多糖類分解酵素と共にトレハラーゼが時間遅延放出形態で、抗菌薬と一緒に包含されている、全身性の酵素の使用は、CBPとUTIの両方のバイオフィルムに基づく慢性感染症の存在に対処するであろう。膀胱内注入経路の、UTIの局所治療には、粘膜ライニングを治療するための上記開示の多工程手順に倣った方法を採用すべきである：第1工程は、適切な曝露時間トレハラーゼ（単独で、または他の多糖類分解酵素と共に）の適用であり；第2工程は、対応する適切な曝露時間にわたるタンパク質分解、線維素溶解、脂肪分解酵素の適用である、そして最終工程は、特定の感染性病原体に対処するため、より長い曝露時間で抗菌薬（抗生物質）の適用を含む。CBPの局所治療のためには、先と同じく同一の多工程の手順を使用すべきであるが、より高濃度の抗生物質の注入（カテーテル等の医療機器を介して）によって前立腺管内のバイオフィルムに直接送達される。

【0151】

胃腸管感染

胃腸管の感染症は、蠕虫感染症（線虫は、トレハロースを生成することが知られている）と共に複数菌のバイオフィルムの群落を特徴とする。上部胃腸管内微生物バイオフィルムを治療するのに、消化酵素の製剤は、トレハラーゼ単独または他多糖類分解酵素とトレハラーゼを含むべきである。下部胃腸管内のバイオフィルムに基づく感染症の治療では、消化酵素の製剤は、上部胃腸管におけるタンパク質分解酵素によるか、または同製剤中タンパク質分解酵素による早期分解を避けるために、トレハラーゼ単独、或いは他の多糖類分解酵素とトレハラーゼを、時間遅延放出形態で含むべきである。選択的に、粘膜ライニング上の感染性バイオフィルムの治療用に上記開示の多工程局所治療（トレハラーゼ単独または他の多糖類分解酵素と共に）は、特に、腸管下部に位置する感染性バイオフィルムを治療（局所結腸治療として）するのに使用し得る。酵素群（トレハラーゼを含む）の使用に加えて、可能性のある共生感染、寄生生物、または原虫類を含む特定の微生物に対抗する、局所および全身性抗菌剤が投与されるべきである。

【0152】

歯科疾患及び歯周病

ストレプトコッカス・ミュータンスとラクトバシラス（トレハロースの生合成用に複数の経路を持つことが知られている）を含む、齲蝕を開始する原因である2つのグループの細菌は、高濃度の経口摂取した単糖類および他の糖類、並びに摂取した炭水化物に唾液アミラーゼの作用により生成された、トレハロースの合成を増進し、バイオフィルムの形成を促進する生成物に直接アクセスし得る。酵素トレハラーゼは、単独、または他の多糖類分解酵素と組み合わせて、歯及び周囲の組織表面上の細菌バイオフィルム形成を阻害することで齲蝕の予防に使用し得る。

【0153】

歯周病は、抗菌薬による治療だけでは難治性の、古典的なバイオフィルムを介した疾患である。トレハラーゼ単独または他の多糖類分解酵素との組み合わせを含む治療の適用は、予防用および治療用の両方であり得る。トレハラーゼは（単独または他の多糖類分解酵素と共に）歯周疾患の治療用および／または専門の歯の清掃処置手順中の経口適用で抗菌剤と組み合わせ得る。また、トレハラーゼ単独、または他の多糖類分解酵素と共の適用、次いでタンパク質分解、線維素溶解、および脂肪分解酵素の適用、最終的に抗菌剤の適用を包含する、多工程局所治療は、粘膜ライニング上の感染性バイオフィルムの処理を上記に開示したように、歯周バイオフィルムに基づく感染症の治療方法として使用し得る。細菌バイオフィルムは、歯垢の本質であることから、マウスウォッシュまたはゲル型中にトレハラーゼを単独または他の多糖類分解酵素と共に使用することは、歯垢の形成を減少させ得、抗菌剤との組み合わせで長期間の使用で既存細菌バイオフィルムを徐々に分解、排除し得る。

【0154】

歯科手術で、トレハラーゼ製剤は、バイオフィルムに基づく感染症に対する予防として役に立ち得る。トレハラーゼは、歯科手術の前後に抗菌物質との組み合わせで使用し得る。さらに、歯内療法で歯を治療するために普通使用されている歯科用セメントのような他の材料と組み合わせ得る。

【0155】

歯科衛生におけるトレハラーゼの予防的適用は、マウスウォッシュ、練り歯磨き、デンタルフロス、及びチューインガムでのその使用を含む。トレハラーゼは、従来のアルコール不含マウスウォッシュ（前記酵素のアルコール誘発性変性を回避するため）と組み合わせることができ、係る組成物は、また通常メントール、チモール、サリチル酸メチル、およびユーカリプトールを含む。練り歯磨きにトレハラーゼを含めることは、従来の練り歯磨きの成分と化学的相互作用がなくて容易である。通常の練り歯磨きは、研磨材10～40%、保湿剤20～70%、水5～30%、バインダー1～2%、洗剤1～3%、香料1～2%、防腐剤0.05～0.5%、及び治療薬0.1～0.5%である。デンタルフロ

ス繊維のトレハラーゼによる含浸は、例えば、絹、ポリアミド、テフロンのようなデンタルフロス材料に使用される香味剤を含ませることに類似である。最後に、トレハラーゼは（単独で、または他の多糖類分解酵素と共に）細菌のバイオフィーム及び歯垢形成を防止し、亦、抗菌剤での治療プロトコルにおける経口バイオフィームに基づく感染症を治療するために、チューインガム組成物に含め得る。

【0156】

敏感な人の過剰なトレハロース摂取を軽減すること

トレハロースは、その独特の化学構造のために、高温でも、低いpH条件下で安定なままである。トレハロースの高い安定性のために、本来の製品の特性が熱処理、冷凍、および長期保存後も保持され得るので、過去20年間、農業食品産業は、食品安定剤、甘味料、および保湿材として、多くの食品中のトレハロースの使用を導入してきた。通常、製品のラベルは、この食品添加物の存在または量を示していない。バイオフィームに基づく感染症を示す患者、特に遺伝性トレハラーゼ酵素欠損症の患者は、この糖類の過剰分が腸内細菌によって、局所の胃腸管のバイオフィーム形成用に使用され得るか、或いは腸内で吸収され、循環を介して、直接、さまざまな場所の感染性生物に与えられて、人体の種々の部位でのバイオフィームに基づく慢性感染症の発症と持続性の一因になり得るか、のいずれかであるので、食事由来のトレハロースの摂取によって危険性が増大し得る。食事由来のトレハロースの摂取時に危険性の増した人にとって、これらの悪い発症を軽減するために、トレハラーゼは、単独の酵素（時間遅延放出形態で）として使用し得、又は（同じ時間遅延放出形態で）消化性および全身性酵素の既存の製剤に添加し得る。

【0157】

医療機器のバイオフィームに基づく汚染の処理の実施態様

バイオフィーム汚染医療機器の処理法は、予防および治療の2つの分類を含む。本組成物および方法の予防法は、トレハラーゼ酵素を組み入れることにより、デバイス表面の組成を変えることに依存し、一方治療法は、これらの表面を一時的に、トレハラーゼ単独または他の化合物とプロトコルとに協調しトレハラーゼに基づく処理製剤に露出することを利用する。

【0158】

予防法

表面上のコーティング（遅延放出と非遅延放出の両方）およびは酵素固定化の使用は、医療機器上のバイオフィームの成長を防ぎ得る、2つの方法である。単純な（非遅延放出）コーティングは、金属、ポリマー、及び布地表面に適用し、処理酵素に短時間の初期露出を提供し得る。遅延放出コーティングは、時間をかけて周囲の環境に酵素を放出して、バイオフィームを分解し得、最終的にはコーティング含有の酵素の初期量を使い切る。これらのコーティングとは対照的に、表面上に固定化した酵素は、永久的な再使用可能触媒として作用し、バイオフィームの継続的分解の可能性を提供し得る。

【0159】

処理コーティングは、布製人工心臓弁のカフス及びヘルニア修復に使用の外科手術用メッシュなどの多孔質表面並びに金属およびポリマー製医療デバイス表面のような非多孔性表面に適用し得る。トレハラーゼ酵素または他の薬剤（抗菌剤のような）と組み合わせたトレハラーゼ酵素を時間をかけて放出する、遅延放出コーティングは、バイオフィームの形成に対抗する予防作用を見込める。これらのコーティングは、医療機器のバイオフィームを受けやすい表面上、並びに一時及び永久体内インプラントでの使用に特に有用である。遅延放出コーティングの従来例は、既存の又は特別に表面上に作成した表面空隙に埋め込まれた酵素、表面結合マイクロカプセル化酵素、及び表面上に酵素を重ねた、溶解可能コーティングを包含する。これらの従来コーティングの構造及び組成物、デバイスまたはインプラント表面へのこれらの接着、及び目的の薬剤の時間的放出のメカニズムは、従来技術において周知であり、また、本組成物および方法でトレハラーゼの使用を利用するように修正し得る。

【0160】

トレハラーゼは、医療機器のバイオフィルムを受けやすい表面上に、（以下、治療方法に関してより詳細に説明するように）固定化し得る。かなりの一連の研究がポリマーおよび金属表面上の酵素固定化の細部に充てられている（ex. : Drevon GF, "Enzyme Immobilization into Polymers and Coatings," PhD Dissertation, University of Pittsburgh, 2002）。医療機器の表面上へのトレハラーゼの固定化は、銀、銅又はバイオフィルム付着防止材、Bacti-cent (商標) KBのような抗菌性質の他の物質とさえ組み合わせ得る。トレハラーゼは、支持構造として機能する化合物上に固定化し得るし、この支持構造化合物は、デバイス表面に結合させ得る。これは、デバイス表面とトレハラーゼとの直接的な相互作用を避けることによって、トレハラーゼ酵素活性が維持されることを保証する。多数の支持構造の化合物候補の中から、選択は、デバイス表面に高い結合親和性を達成する一方、トレハラーゼの酵素活性を維持することで最適化し得る。

10

【0161】

トレハラーゼに基づく処理コーティングは、遅延放出及び非遅延放出の両方とも、並びに固定化トレハラーゼは、中心静脈カテーテルおよび尿道カテーテルの内外表面並びに内視鏡及び整形外科用インプラントを含む、種々のタイプのインプラントのバイオフィルムを受けやすい表面上に使用し得る。また、トレハラーゼは、有効性を改善するために、デバイス上のコーティングまたは固定化状態中に、抗菌化合物と組み合わせ得る。外科用メッシュまたは布地のトレハラーゼを用いた含浸は、さらに別の適用である。最も重要な例は、心臓弁アセンブリにカフを装着する前に、トレハラーゼで布地縫合カフを含浸させて人工心臓弁上のバイオフィルム形成及び成長を防止する方法である。さらに、心臓弁アセンブリは、固定化トレハラーゼコーティングでカバーし得る。

20

【0162】

植込み式 (implantable) と身体挿入装置との表面は、免疫応答および細菌のコロニー形成両者の、いわゆる「表面を目指す競争」の標的である (Gristina A, "Biomedical-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration," Clinical Orthopedics and Related Research, 2004, No. 427, pp. 4-12.)。免疫応答が先着する例では、高分子の接着および一般的な炎症作用はさらに、非血管線維性皮膜により、デバイス表面の囲い込みに結局達し得、それは更に細菌のコロニー形成およびバイオフィルム生成を支持し得る。細菌のコロニー形成が顕性免疫応答の前に起こると、バイオフィルムは、デバイス表面にすぐ隣接して形成し得る。デバイスの表面における宿主細胞の蓄積と表面の細菌のコロニー形成との両方が共通して初期高分子接着性を有するので、インビボでそのような接着を打破することは、バイオフィルム形成を妨げるトレハラーゼの使用と相乗的なのである。

30

【0163】

この目的のために、トレハラーゼは、合成物表面への高分子の付着を阻止する目的を果たす新しいコーティングと組み合わせ得る。諸例の中に、デバイス表面で水分子を活用して高分子の接着を妨害するための高分子的取り組みである、Semprus Sustain (商標) 技術、保護されたデバイスの表面との高分子の接触を排除する微細孔性防汚コーティングである、OptiChem (登録商標)、及び表面コーティング内の極性の周期的反転の利用でタンパク質の付着を打破する見込みを示唆する双性イオン性コーティングがある (Brault ND, Gao C, Xue H, Piliarik M, Homola J, Jiang S, Yu Q, "Ultra-low fouling and functionalizable zwitterionic coatings grafted onto SiO₂ via a biomimetic adhesive group for sensing and detection in complex media," Biosens Bioelectron., 201

40

50

0 Jun 15, 25 (10): 2276-2282.)。トレハラーゼを包含する遅延放出コーティングは、種々の様式で高分子忌避コーティングと共に使用し得る。例えば、高分子忌避コーティングの範囲内で、トレハラーゼ時間放出サイトを適切な密度で設け得る。あるいは、異なるコーティングを、デバイス表面に対して平行および垂直の両方の種々の配列で交互配置し得る。

【0164】

治癒法

本組成物の方法および表面からのバイオフィーム及び関連病原体の分解及び除去に取り組む方法は、種々の浸漬（液浸）とリンスのプロトコルを含む。他の酵素、キレート剤、および安定剤のような他の化合物を伴うトレハラーゼ酵素溶液が予想される。浸漬溶液の好ましい実施態様では、バイオフィームゲル・マトリックスを分解するトレハラーゼ酵素の本発明での使用は、上記 Bio Rem などの製品に見られる酵素混合物への重要な追加事項として見られ得る。トレハラーゼ系浸漬液に浸漬露出後は、次いで病原体の排除のために、従来技術で周知のように殺菌剤処理露出を行う。トレハラーゼを含有するリンスと浸漬溶液は、最高酵素活性温度に維持されるべきである。また、浸漬と液浸時間は有効性上十分であるべきである。

【0165】

溶液系処理の好ましい方法は、以下の多工程の手順を含む：

1. a) トレハラーゼ単独の水性または生理食塩液及び b) 他の多糖類分解酵素を伴うトレハラーゼの水性または生理食塩溶液を含む群から取得した第1処理溶液を作成し、
2. a) タンパク質分解酵素の水性または生理食塩液及び b) 線維素溶解酵素の水性または生理食塩溶液を含む群から取得した第2処理溶液を作成し、
3. a) 殺菌剤の水性または生理食塩液、b) 感染性病原体に特異的な抗生物質の水性または生理食塩溶液、または c) 多菌抗生物質の水性または生理食塩水溶液を含む群から取得した第3処理溶液を作成し、
4. 指定された順序でこれらの溶液で処理中の前記表面を洗い流し（又はリンス）するか、または液浸する。

【0166】

処理した表面の露出時間は有効性上十分であるべきで、係る溶液処理は、トレハラーゼのタンパク質分解酵素に対する露出を回避する様式で行われるべきである。

【0167】

この多工程の手順は、中心静脈及び尿のカテーテル、内視鏡、コンタクトレンズ、レンズケース、透析システムの構成要素、歯科用ユニットの水ライン、及び液浸、リンス、または流体注入し得る他の医療機器の処理に適用し得る。透析システムの場合には、生体液に接触する種々の表面を消毒しなければならない。しかし、いくつかの面は超音波アシスト洗浄のオプションで処理液に液浸し得るが、他の表面は、液浸可能でなく、単に処理溶液で浸漬してフラッシュしなければならない。透析システムの構成要素と歯科用ユニットの水ライン処理には、上記第3溶液は、追加としてキレート剤および酵素安定剤を含有し得る。

【0168】

トレハラーゼ送達の代替手段は、ある種の支持構造物へ取り付け、酵素を固定化することを伴う。上述のようなデバイス表面上の固定化とは対照的に、トレハラーゼは、処理液として使用する液体懸濁液中の支持構造物化合物上に固定化し得る。酵素の固定化は、触媒作用の長期存在および繰り返し使用を可能にし得る。これは、更にその支持構造物への取り付けの特質に基づいて、酵素の触媒効率および熱安定性を高め得る。係る固定化には5つの一般的な分類がある：a) 吸着、b) 共有結合、c) 閉じ込め（エントラップメント）、d) カプセル化、および e) 架橋 (Walker JM, Rapley R, and Bickerstaff GF, "Immobilization of Biocatalysts" in Molecular Biology and Biotechnology, 4th edition, edited by J. M. Walke

r and R. Rapley, RSC Publishing, 2007.)。すべての係る機構は、本組成物および方法の範囲内である。トレハラーゼ酵素のバイオフィルムへの送達で、固定化のいくつかの実装が即時ここで想定される。後述するように、例えば、酵素は、微小球に共有結合で結合し得るし、または米国特許第7824557号の方法（工業用水送達系を処理する、抗菌剤含有のリボソームの使用を開示する）に従ってリボソームに閉じ込め得る。これらの送達機構は、バイオフィルム・マトリックス中に取り込まれて、トレハラーゼ酵素に持続的な露出を提供し得る。

【0169】

トレハラーゼの固定化の実現可能性は、最近の研究文献に見ることができる種々の非治療目的のためのトレハラーゼ固定化の例で力説される。分析目的のために、Bachinskiらは、アミノプロピルガラス粒子上にトレハラーゼの共有結合による固定化を実証した。この研究では、前記酵素はその触媒活性を保持していることが示された（N. Bachinski, A. S. Martins, V. M. Paschoalin, A. D. Panek, and C. L. Paiva, "Trehalase immobilization on aminopropyl glass for analytical use, "Biotechnol Bioeng., 1997 Apr 5, 54(1): 33-39.）。なお、反応槽の再利用のために、トレハラーゼはキチン粒子上にも固定化されていた。（A. S. Martinsa, D. N. Peixotoa, L. M. C. Paivaa, A. D. Paneka and C. L. A. Paivab, "A simple method for obtaining reusable reactors containing immobilized trehalase: Characterization of a crude trehalase preparation immobilized on chitin particles, "Enzyme and Microbial Technology, February 2006, Volume 38, Issues 3-4, Pages 486-492.）。本組成物および方法は、バイオフィルムに特定の親和性を有する支持構造上の酵素トレハラーゼの固定化を包含する。米国特許出願第20060121019号は、バイオフィルム分解酵素を、バイオフィルム親和性の「係留(anchor)」分子に共有結合および非共有結合によって取り付けることを開示している。バイオフィルムに対する既知の親和性を有するとして引用された部分は、コンカナバリリン(A Concanavalin A)、小麦胚芽凝集素(Wheat Germ Agglutinin)、他のレクチン、ヘパリン結合ドメインズ(Heparin Binding Domains)、エラスターゼ(Elastase)、アミロース結合タンパク質(Amylose Binding Protein)、リシヌスコムニス凝集素I(Ricinus communis agglutinin)、ディリコスビフロルス凝集素(Dilichos biflorus agglutinin)及びハリエニシダ凝集素(Ulex europaeus agglutinin)を含む。

【0170】

処理液中で固定化トレハラーゼを使用する好ましい方法は、上記概説したものと同一の溶液系多工程手順を含むが、水性または生理食塩懸濁液中で固定化トレハラーゼを用いる。同様に、前記方法は、先に開示した同一分類の医療機器の処理に同様に適用し得る。

【0171】

上述のように、処理すべき表面を超音波照射して、浸漬とリンス溶液と同時にバイオフィルムの除去を増強し得る。伝統的なバイオフィルム除去用超音波の使用とは別に、本発明の組成物および方法の範囲内の更なる手段は、超音波補助による酵素活性の使用である。種々の酵素処理溶液中に低エネルギーの均一超音波場の導入することは、反応速度を増進させることによりその有効性を大幅に向上させ得る。前記プロセスは、キャビテーションが酵素活性の低下ではなく、著しく増進させるように、調整される。これは、超音波照射の適切な均一性とより低い電力レベルの使用とによって達成される。

【0172】

以下の酵素／超音波を組み合わせた作用の特異的機能が非常に重要であることが確立されている："a) キャビテーションの効果が均一系に比して不均一系（固体－液体）で数100倍大きい、b) 水中、キャビテーションの最大の効果は、多くの工業用酵素の最適な温度である、約50℃で起こる、c) 超音波で引き起こされたキャビテーション効果は、基質表面に向かう酵素高分子の輸送を大きく促進し、d) キャビテーション気泡の崩壊によって出来る機械的衝撃は、酵素作用に、基材の表面を「開放する」重要な利点を提供する。" (Yachmenev V, Condon B, Lambert A, "Technical Aspects of Use of Ultrasound for Intensification of Enzymatic Bio-Processing: New Path to "Green Chemistry", "Proceedings of the International Congress on Acoustics, 2007)。酵素反応速度は1桁以上増加させ得る。特定の酵素適用の例では、 α アミラーゼ反応速度は超音波の使用で増進した (Zhang Y, Lin Q, Wei JN, and Zhu HJ, "Study on enzyme-assisted extraction of polysaccharides from *Dioscorea opposita*", "Zhongguo Zhong Yao Zha Zhi. 2008 Feb, 33 (4): 374-377.)。超音波補助酵素に基づく処理では、前に開示された溶液系多工程処理は、処理中の酵素含有処理溶液と表面の超音波照射を包含するように修飾し得る。

10

【0173】

20

工業バイオフィルムに対処する実施態様

トレハラーゼ酵素の使用で可能となり得る多数の工業的バイオフィルム処理方策がある。これらの方策は、他の化合物とトレハラーゼ酵素との適切な混合物の作成およびバイオフィルムの存在部位へこれらの混合物を送達する方法の両方を含む。

【0174】

処理混合物に関して、トレハラーゼ酵素は溶液で単独で使用され得るか、または最適pH範囲（緩衝液組成）と、トレハロースの加水分解速度を最大にし得る金属イオン濃度とを、維持する化合物を添加し得る。更に、相乗効果を達成するために、1種またはそれ以上のトレハラーゼ酵素は、バイオフィルムに送達される、分散剤、界面活性剤、洗浄剤、他の酵素、抗菌剤、および殺生剤に添加し得る。トレハラーゼは、トレハラーゼを分解またはその酵素（触媒）活性を低下させる可能性のある他のバイオフィルム処理化合物または方法を含むプロトコルの前処理として使用し得る。

30

【0175】

また、上述したように、基質化合物が処理の標的に親和性を有し得る工業的処理で使用するために、トレハラーゼは、液体懸濁液中の基質化合物上に固定化され得る。

【0176】

石油パイプライン向けには、トレハラーゼ酵素混合物を含有する油－水エマルションは、該パイプライン内のバイオフィルムに対する投与の機会をもたらす。これらのエマルション由来混合物は、遊離トレハラーゼ酵素または固定化酵素、並びに更なる従来の処理化合物、例えば従来技術で周知のような殺生剤、界面活性剤、洗剤、および、分散剤を包含し得る。

40

【0177】

パイプライン用特定処理の実施態様は、環状液流の幾何学的形状の利用を伴う。当該油は、潤滑流体（通常は水）の薄い環で囲まれて、管の中心を占有する傾向があるため、水平管において非常に異なる粘度を有する二つの非混和性液体の環状の流れパターン（また、「コア環状流 ("core-annular flow")」としても知られる）は、重油のパイプライン輸送用の魅力的な手段として提案されている (Bannwar AC, "Modeling aspects of oil-water core-annular flows, "Journal of Petroleum Science and Engineering Volume 32, Issues 2-4, 29

50

December 2001, Pages 127-143.)。薄い水膜を前記油と管壁との間に導入し、潤滑剤として作用させ圧力勾配を減少させ得る。8インチ直径のパイプでは、特定の条件下で、非常に薄い水膜を使用し得ることが明らかにされている。粘度が2000 mPasを超える原油では、わずか2%の水で安定した動作が実現可能なことを証明されている(Oliemans RVA, Ooms G, Wu HL, Duijvestijn A, "Core-Annular Oil/Water Flow: The Turbulent-Lubricating-Film Model and Measurements in a 2-in. Pipe Loop, "Middle East Oil Technical Conference and Exhibition, 11-14 March 1985, Bahrain.)。石油パイプラインの内部へのトレハラーゼ含有溶液の送達に対処する、本発明の組成物及び方法のある実施態様においては、前記薄水膜は、トレハラーゼ含有水溶液によって置き換えられる。このトレハラーゼ溶液は、パイプラインの内面にすぐ隣接する流動環状層となる。

【0178】

パイプラインに対処する本組成物および方法の別の実施態様は、パイプライン内の標的処理部位へトレハラーゼを送達するのに磁力を利用することを含む。具体的には、トレハラーゼは、磁気または好ましくは強磁性特性のいずれかを示す、支持構造物上に固定し得る。この固定化トレハラーゼがパイプラインの流れ中に放出される時に、パイプラインの外部の磁場を用いて、パイプライン内部の標的付近に固定化トレハラーゼを導き、保持し得る。前記磁界は、従来技術において周知の磁気または電磁的手段で発生し得る。この実施態様の最適化は、流体の流れの存在下、処理部位でトレハラーゼの適切な濃度を達成するための、発生した磁界の空間および時間的な変動を包含し得る。パイプラインの壁に誘起された残留磁気は、従来技術で周知の方法で軽減し得る。

【0179】

バイオフィームを包含する船体生物付着物の乾ドックでの除去では、リンスおよび／または浸漬プロトコルにトレハラーゼ酵素を含む水溶液を使用し得る。船体にヒドロゲル含有トレハロースを適用するのは、バイオフィーム・マトリックスのトレハロース成分を加水分解するために、バイオフィームの持続的な露出を確保するもう一つの手段である。これは、殺生剤適用前または適用時に成し得る。さらに、固定化トレハラーゼ酵素を組み入れたバイオフィーム予防コーティングの船体表面への適用は、候補となる方策である。医療機器の処理用に述べた溶液系の多工程処理は、この船舶適用に使用するか、または、水性または生理食塩溶液の代わりに処理化合物のゲル送達を使用するように修正し得る。

【0180】

HVAC (heating, ventilation, and air conditioning、暖房、換気、空調) システムの場合、溶液系の多工程処理方法は、記述の通り冷却コイルおよび排出受け皿などの特定の構成部品に使用し得るか、または処理化合物がエアロゾルの形態でHVACダクト配管内に供給され得るように修正され得る。

【0181】

トレハラーゼ酵素系処理で使用する候補の工業用殺生剤は、一般的な市販の工業用殺生物剤の製品、例えば米国メリーランド州Hunt ValleyのSterilex社製で、有効成分：

N-アルキル (C14 60%、C16 30%、C12 5%、C18 5%) ジメチルベンジルアンモニウムクロリド、及び

N-アルキル (C12 68%、C14 32%) ジメチルエチルベンジルアンモニウムクロリドを含むUltra Kleen (商標) を包含する。

【0182】

もう一つの例は、米国ルイジアナ州バトンルージュのAlbermarle Corp. 製で有効成分は、ナトリウムブロモスルファメート (bromosulfamate) とナトリウムクロロスルファメート (chlorosulfamate) を含む、SWG Biocideである。候補は、またグルタルアルデヒド、第四級アンモニウム化合物 (

QACs)、GutおよびQACsのブレンド、アミン塩、ポリマー系ビグアニド、ベンズイソチアゾロン、メチルイソチアゾロンのブレンド、およびアクロレインを含む広く工業用殺生剤一般的な分類中に見出し得る。(Handbook of Biocide and Preservative Use, Edited by H. W. Rossmore, Chapman and Hall, 1995)。

【0183】

食品加工、保管、輸送システムに関連するバイオフィルムの処理には、従来の酵素処理は、トレハラーゼの使用によって強化し得る(従来の候補酵素の長いリストは上に開示された。)。これは、溶液系の多工程手順に関連して行い得る。本発明の組成物および方法は、タンパク質分解的でない、任意の係る酵素とトレハラーゼとの使用を含む。また、超音波支援酵素系洗浄はトレハラーゼの使用に適用可能である。

10

【0184】

バイオフィルムは、配管及び排水管の内面、流し台、浴槽、タイル、シャワーカーテン、シャワーヘッド、クリーニングスポンジ、ガラス製品、歯ブラシ、及びトイレの表面上を含む多くの表面に、家庭環境で見出されている。トレハラーゼを含有する溶液は、単独で、または適用可能な表面に合わせた他のバイオフィルム処理製品との適切な組み合わせで使用し得る。例えば、配管の処理に使用されるある種の化合物は、歯ブラシを処理するには許されないであろう。前記の溶液系の多工程手順は、配管の内部表面を除けば、多くの日用品の表面に簡単に適用し得る。再度であるが、トレハラーゼの酵素活性を低下させるタンパク質分解酵素および他の化合物はトレハラーゼと同時に存在してはならないという警告がある。

20

【0185】

開示された実施態様の前記説明は、当業者が誰でも開示された実施態様を作るまたは使用できるように提供されている。これらの実施態様に対する種々の修正は当業者には容易に明らかであり、本明細書で定義した原理は、本開示の範囲から逸脱することなく他の実施態様に適用できる。したがって、本開示は、本明細書に示された実施態様に限定される意図はなく、以下の特許請求の範囲によって定義される原理および新規の特徴と一致する、可能な最も広い範囲が許容されるべきである。

【図 1】

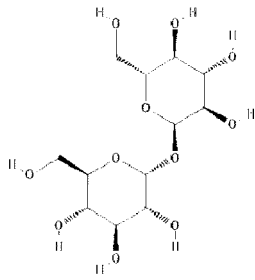
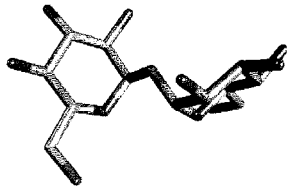
図1a トレハロースの化学構造 ($C_{12}H_{22}O_{11}$)

図1b トレハロース骨格

【図 2】

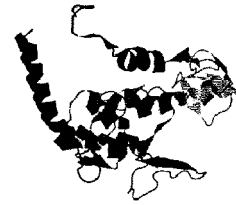
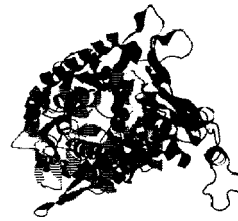
a) 天然型トレハラーゼ、
サッカロマイセス・セレビシエ
(RM11-1a株、Baker酵母)b) α, α -トレハラーゼTreB/Nth1、
ペニシリウム・マルネッフェイ
(ATCC 18224/ CBS 334.59/ QM 7333株)c) α, α -トレハラーゼ、
ホモサピエンスd) 天然型トレハラーゼ、
カンジダ・アルビカンズ (酵母)

図2 トレハラーゼ酵素のリボンモデルの例

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/040408
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61L 2/16(2006.01)i, A61F 2/24(2006.01)i, A61F 2/29(2006.01)i, A61L 27/00(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) A61L 2/16; A61K 38/46; A61K 38/54; A61K 38/47; A61K 9/16; A61K 31/703; A61K 38/48; C12N 15/56; C12N 1/20		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: biofilm, trehalase, medical device, pipeline, HVAC, marine surface, food storage surface, infection, chewing gum, time-delayed release, composition, ocular infection, contact lens.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 2011-0129454 A1 (OLMSTEAD, STEPHEN FRANCIS) 02 June 2011 See abstract; claims 19-20, 24, 26-28, 31.	67-69, 81, 84 86 1-20, 57-66, 70-80 , 82-83, 85, 87-101 , 104-106
Y A	US 6759040 B1 (MANYAK, DAVID M. et al.) 06 July 2004 See abstract; paragraph [0011]; claims 6, 13, 20-21, 32.	86 1-20, 57-85, 87-101 , 104-106
X A	WO 2006-032011 A2 (ELIXIR PHARMACEUTICALS, INC.) 23 March 2006 See claims 37, 40; page 7, lines 21-31; and page 13, lines 1-11.	104-106 1-20, 57-101
A	US 2006-0121019 A1 (BUDNY, JOHN et al.) 08 June 2006 See abstract; and claims 1-2, 5, 18.	1-20, 57-101 , 104-106
A	US 2009-0202516 A1 (OLMSTEAD, STEPHEN F.) 13 August 2009 See abstract; and claims 1-3, -7, 11, 17.	1-20, 57-101 , 104-106
☒ 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 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 27 FEBRUARY 2013 (27.02.2013)		Date of mailing of the international search report 28 FEBRUARY 2013 (28.02.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer KIM, Dong Seok Telephone No. 82-42-481-8647 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/040408

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 21-56, 102-103
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 21-56 and 102-103 pertain to a method for treatment of the human body by therapy, which is a subject matter this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulation, to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/040408

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0820516 B1 (BETZDEARBORN, INC.) 06 March 2002 See claims 1-3 & 7-8.	1-20, 57-101 , 104-106

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

 International application No.
PCT/US2012/040408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011-0129454 A1	02.06.2011	CA 2780756 A1	26.05.2011
		EP 2504025 A2	03.10.2012
		US 2011-0171189 A1	14.07.2011
		US 2011-177048 A1	21.07.2011
		US 2011-177049 A1	21.07.2011
		US 2011-177050 A1	21.07.2011
		US 2011-182873 A1	28.07.2011
		US 2011-182874 A1	28.07.2011
		WO 2011-063394 A2	26.05.2011
		WO 2011-063394 A3	20.10.2011
US 6759040 B1	06.07.2004	AU 1998-93742 A1	05.04.1999
		US 2005-0003503 A1	06.01.2005
		US 2010-0159563 A1	24.06.2010
		US 8298804 B2	30.10.2012
		WO 99-14312 A1	25.03.1999
WO 2006-032011 A2	23.03.2006	CN 101432004 A	13.05.2009
		EP 1796687 A2	20.06.2007
		JP 2008-514549 A	08.05.2008
		WO 2006-032011 A3	16.04.2009
US 2006-0121019 A1	08.06.2006	AU 1998-98028 A1	03.05.1999
		AU 1998-98028 B2	10.01.2002
		AU 2000-35949 A1	29.08.2000
		AU 2001-65425 A1	17.12.2001
		CA 2306459 A1	22.04.1999
		CN 1276732 A0	13.12.2000
		EP 1023084 A1	02.08.2000
		JP 2001-519404 A	23.10.2001
		KR 10-2001-0015757 A	26.02.2001
		US 2002-0022005 A1	21.02.2002
		US 2002-0037259 A1	28.03.2002
		US 2002-0037260 A1	28.03.2002
		US 2005-0158253 A1	21.07.2005
		US 5871714 A	16.02.1999
		US 6159447 A	12.12.2000
		US 6830745 B1	14.12.2004
		WO 00-47174 A1	17.08.2000
		WO 01-93875 A1	13.12.2001
		WO 99-18999 A1	22.04.1999
US 2009-0202516 A1	13.08.2009	CA 2715286 A1	13.08.2009
		EP 2254591 A2	01.12.2010
		JP 2011-511809 A	14.04.2011
		JP 2011-511809 T	14.04.2011
		WO 2009-100456 A2	13.08.2009
		WO 2009-100456 A3	03.12.2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational application No.
PCT/US2012/040408

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0820516 B1	06.03.2002	AU 1996-55002 B2 EP 0820516 A2 JP 11-503317 A KR 10-1998-0703611 A WO 96-31610 A2 WO 96-31610 A3	03.06.1999 28.01.1998 26.03.1999 05.12.1998 10.10.1996 07.11.1996

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/46 (2006.01)	A 6 1 K 37/54	4 C 0 8 6
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 37/48	4 C 2 0 6
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 K 38/51 (2006.01)	A 6 1 K 37/56	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 13/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/08	
A 6 1 P 13/02 (2006.01)	A 6 1 P 13/02	1 0 5
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 K 31/045 (2006.01)	A 6 1 K 31/045	
A 6 1 K 31/05 (2006.01)	A 6 1 K 31/05	
A 6 1 K 31/618 (2006.01)	A 6 1 K 31/618	
A 6 1 K 31/35 (2006.01)	A 6 1 K 31/35	
A 6 1 L 2/18 (2006.01)	A 6 1 L 2/18	
A 2 3 L 3/3562 (2006.01)	A 2 3 L 3/3562	
A 2 3 G 4/00 (2006.01)	A 2 3 G 3/30	
G 0 2 C 13/00 (2006.01)	G 0 2 C 13/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, I D, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO , NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72)発明者 デービス、デニス ダブリュー.

アメリカ合衆国、 3 2 7 5 7 フロリダ州、マウント ドラ、 3 5 0 0 レイク センター ドラ
イブ、アパートメント 2 1 1 0 1

(72)発明者 アレンズ、ブラッド ダブリュー.

アメリカ合衆国、 3 2 8 1 2 フロリダ州、オーランドー、 7 6 1 2 ダエットワイラー ドライ
ブ

(72)発明者 コネラン、トーマス ケー.

アメリカ合衆国、 3 2 8 1 9 フロリダ州、オーランドー、 8 7 0 2 バイ ヒル ブールバード

F ターム(参考) 2H006 DA08

4B014 GB13 GG07 GG15 GK02 GK12 GL10 GP01
4B021 LA41 MC01 MK01 MK02 MK07 MK28 MP02
4C058 AA02 AA06 AA09 AA12 AA13 AA14 AA15 AA16 AA19 AA23
AA24 AA28 BB02 BB07 BB09 CC04 CC06 DD04 DD05 DD11
EE26 JJ03 JJ04 JJ08 JJ21 JJ23 JJ24
4C084 AA02 AA22 DC01 DC02 DC22 DC26 MA13 MA28 MA52 MA59
MA60 MA66 NA05 NA11 NA12 NA14 ZA331 ZA341 ZA361 ZA591
ZA661 ZA671 ZA811 ZA821 ZB311 ZB351 ZB352
4C086 AA01 BA07 DA17 EA01 MA13 MA28 MA57 MA59 MA60 MA66
NA05 NA11 NA12 NA14 ZA33 ZA34 ZA36 ZA59 ZA66 ZA67

	ZA81	ZA82	ZB31	ZB35						
4C206	AA01	CA03	CA17	KA01	MA02	MA03	MA04	NA05	ZA67	ZB31
	ZB35									