

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(10) 国際公開番号
WO 2010/119638 A1

(43) 国際公開日
2010年10月21日(21.10.2010)

PCT

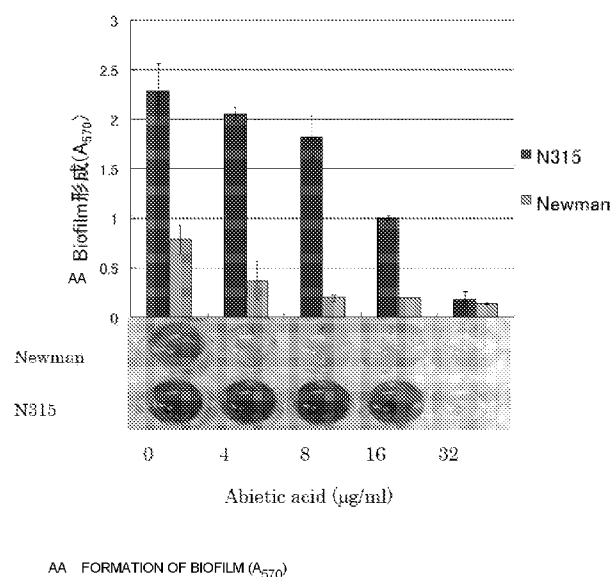
- (51) 国際特許分類:
A61K 31/19 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61K 31/192 (2006.01) C02F 1/50 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/002477
- (22) 国際出願日: 2010年4月5日(05.04.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-097207 2009年4月13日(13.04.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 岡山大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号 Okayama (JP). 学校法人 就実学園(SCHOOL CORPORATION SHUJITSUGAKUEN) [JP/JP]; 〒7038516 岡山県岡山市中区西川原一丁目6番1号 Okayama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 土屋友房(TSUCHIYA, Tomofusa) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP).
- (74) 代理人: 庄司隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3-4-1 6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, ID, 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, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL,

[続葉有]

(54) Title: BIOFILM FORMATION INHIBITOR

(54) 発明の名称: バイオフィーム形成阻害剤

[図4]



(57) Abstract: A biofilm formation inhibitor which effectively acts on the formation of a biofilm without disrupting the resident bacterial flora or developing drug resistant bacteria is provided. More specifically, a biofilm formation inhibitor which effectively acts on the formation of a biofilm derived from a Gram-positive coccus belonging to the genus Staphylococcus is provided. Further, a method for inhibiting the formation of a biofilm in which a treatment is performed using the biofilm formation inhibitor is provided. A diterpenoid compound contained in a plant belonging to the family Pinaceae effectively has a strong inhibitory effect on the formation of a biofilm without disrupting the resident bacterial flora or developing drug resistant bacteria, and therefore can be used as an effective biofilm formation inhibitor.

(57) 要約: 常在細菌叢を乱したり薬剤耐性菌を誘導することなく、バイオフィーム形成に対して有効に作用するバイオフィーム形成阻害剤を提供する。より具体的には、ブドウ球菌属に属するグラム陽性球菌由来のバイオフィーム形成に対して有効に作用するバイオフィーム形成阻害剤を提供する。さらには、該バイオフィーム形成阻害剤を用いて処理するバイオフィーム形成阻害方法を提供する。マツ科の植物に含まれるジテルペノイド化合物が、常在細菌叢を乱し

たり薬剤耐性菌を誘導することなく、有効にバイオフィーム形成に対して強い抑制効果を有し、有効なバイオフィーム形成阻害剤となりうる。

WO 2010/119638 A1

WO 2010/119638 A1



NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, 添付公開書類:

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
TD, TG).

明 細 書

発明の名称： バイオフィルム形成阻害剤

技術分野

- [0001] 本発明は、ジテルペノイド化合物を有効成分として含有するバイオフィルム形成阻害剤に関する。さらには、該バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理するバイオフィルム形成阻害方法に関する。
- [0002] 本出願は、参照によりここに援用されるところの日本出願特願 2009-97207 号優先権を請求する。

背景技術

- [0003] バイオフィルム(biofilm)は、細胞外マトリクスで覆われ、細胞同士あるいは細胞と表面・界面が接着することにより形成される生物集団である。バイオフィルムの形成は、医療分野、排水処理施設、一般家庭などで問題となっており、特に医療分野では大きな問題となっている。
- [0004] 医療分野では、口内細菌によるバイオフィルムが歯周病に関連することから、歯科の分野でバイオフィルムに対する阻害剤が多く報告されている。例えば、カテキンの一種であるエピガロカテキン-3-ガレート(EGCG)が、歯周病関連細菌のエイケネラ・コロデンス(*Eikenella corrodens*)によるバイオフィルムの抑制剤として特許出願され、開示されている(特許文献1)。また、クランベリー抽出物が、歯周病の原因菌の一種であるポルフィロモナス・ジンジバリス(*Porphyromonas gingivalis*)やトレポネーマ・デデンティコラ(*Treponema denticola*)によるバイオフィルムの抑制剤として特許出願され、開示されている(特許文献2)。
- [0005] 細菌のうち、グラム陽性菌の多くは、しばしばヒトや環境に常在し、健康人にとってはほとんど問題にならない弱毒菌であるが、それら弱毒菌も免疫不全患者や易感染患者においては重篤な感染症を引き起こす場合がある。ブドウ球菌はグラム陽性の球菌で、ヒトの皮膚、鼻腔、消化管などの常在菌であるが、医療現場では主に易感染患者において手術部位感染、血流感染、呼

吸器感染、尿路感染を惹起し、さらに心内膜炎、髄膜炎、敗血症などを引き起こす場合もあり、最も重要な病院感染起因菌の一つである。

[0006] 医療現場では、バイオフィームが関与するカテーテル関連血流感染(CR-BSI)や尿道留置カテーテル関連尿路感染(UA-UTI)が問題となっている。感染は、ブドウ球菌などの細菌が血管カテーテルや尿路カテーテルなどの医療用デバイスに定着し、バイオフィームを形成することによって引き起こされる。いったんバイオフィームが形成されると、細菌が宿主の免疫系による攻撃から逃れたり、バイオフィームが抗菌薬の浸透を妨げたりすることで治療が困難となる。黄色ブドウ球菌(Staphylococcus aureus)は、医療機関では主に易感染患者において手術部位感染、血流感染、呼吸器感染、尿路感染などの起因菌となり、感染部位によっては難治性となって時に死因となる場合もある。特に、院内感染の原因菌とされるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(methicillin-resistant Staphylococcus aureus: MRSA)の進入経路は、47.8%が血液留置カテーテル、13.9%が尿路カテーテル留置によるといわれており、難治化すると同時に、重症化することが問題となる。

[0007] ブドウ球菌によるバイオフィームを抑制する物質としては、直鎖セスキテルペンの一種であるファルネソール(farnesol)(非特許文献1)や、ベンジルイソキノリンアルカロイドの一種であるベルベリン(berberine)(非特許文献2)が報告されている。

[0008] しかしながら、既に報告されているファルネソールやベルベリンは、黄色ブドウ球菌に抗菌活性を有することが知られており、報告されている濃度では、バイオフィーム形成を抑制する一方で、黄色ブドウ球菌の育成を抑制している可能性がある。また、ベルベリンは、NorAの基質となっている。NorAは黄色ブドウ球菌に主要な多剤排出ポンプであり、黄色ブドウ球菌の多剤耐性に寄与するといわれている。ベルベリンを常用することで、このNorAの発現が亢進し、多剤耐性変異株を誘導する可能性がある。ファルネソールやベルベリンのように、抗菌活性を有するものは、常在細菌叢を乱したり、やがては耐性獲得を誘導したりする点で問題が残されており、医薬品や医療器具

などの医療用デバイスに実用化されているものはない。

- [0009] また、一般家庭やその他の施設などでも、例えば水周りや排水処理に関し、バイオフィルムの形成が問題となっている。このような場合にも、ヒトなどの生体に対して安全でありながら、バイオフィルムの形成を有効に阻害するバイオフィルム形成阻害剤の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：特開2008-13458号公報
特許文献2：特開2007-91703号公報

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50: 1463-9 (2006)
非特許文献2：Int J Antimicrobial Agents 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明は、常在細菌叢を乱したり薬剤耐性菌を誘導することなく、バイオフィルム形成に対して有効に作用するバイオフィルム形成阻害剤を提供することを課題とする。より具体的には、ブドウ球菌属に属するグラム陽性球菌由来のバイオフィルム形成に対して有効に作用するバイオフィルム形成阻害剤を提供することを課題とする。さらには、該バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理するバイオフィルム形成阻害方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- [0013] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、マツ科の植物に含まれるジテルペノイド化合物が、常在細菌叢を乱したり薬剤耐性菌を誘導することなく、バイオフィルム形成に対して強い阻害作用を有することを見出し、本発明を完成した。

- [0014] 即ち本発明は、以下よりなる。

1. ジテルペノイド化合物を有効成分として含有するバイオフィルム形成阻

害剤。

２． ジテルペノイド化合物が、環状ジテルペノイド化合物である、前項１に記載のバイオフィルム形成阻害剤。

３． 環状ジテルペノイド化合物が、アビエタン系ジテルペノイド化合物である前項２に記載のバイオフィルム形成阻害剤。

４． アビエタン系ジテルペノイド化合物が、アビエチン酸、デヒドロアビエチン酸、ネオアビエチン酸、ピマル酸、パラストリン酸、レボピマル酸及びこれらの薬理学上許容可能な誘導体のいずれか１種又は２種以上である前項３に記載のバイオフィルム形成阻害剤。

５． バイオフィルム形成阻害剤が、ロジンを含む、前項１～４のいずれかに記載のバイオフィルム形成阻害剤。

６． バイオフィルムが、ブドウ球菌属に属するグラム陽性球菌由来である前項１～５のいずれか１に記載のバイオフィルム形成阻害剤。

７． ブドウ球菌属に属するグラム陽性球菌が、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌及び腐性ブドウ球菌から選択されるいずれかである前項６に記載のバイオフィルム形成阻害剤。

８． 黄色ブドウ球菌が、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）又はバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）である前項７に記載のバイオフィルム形成阻害剤。

９． 前項１～８のいずれか１に記載のバイオフィルム形成阻害剤で処理されてなる医療用用具。

１０． バイオフィルム形成阻害剤で処理されてなる医療用用具が、当該医療用用具の表面をバイオフィルム形成阻害剤でコーティングされているか、又は当該医療用用具にバイオフィルム形成阻害剤が浸透しているものである前項９に記載の医療用用具。

１１． 前項１～８のいずれか１に記載のバイオフィルム形成阻害剤を用いて処理する工程を含むバイオフィルム形成阻害方法。

１２． バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理する対象物が医療用用具であ

る、前項 11 に記載のバイオフィルム形成阻害方法。

13. バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理する対象物が排水処理設備である、前項 11 に記載のバイオフィルム形成阻害方法。

発明の効果

[0015] 本発明のバイオフィルム形成阻害剤により、臨床上問題となるブドウ球菌属に属するグラム陽性球菌、例えば黄色ブドウ球菌（MRSAを含む）、表皮ブドウ球菌及び腐性ブドウ球菌から選択される 1 種又は複数種のブドウ球菌由来のバイオフィルム形成を阻害することができる。該バイオフィルム形成阻害剤は抗菌剤と異なり、菌を殺すことなくバイオフィルムの形成のみを阻害する。この性質は 1. 皮膚をはじめ、各部位での常在細菌叢を乱さない、2. 薬剤耐性菌を誘導しないという 2 つの利点を持っている。抗菌物質（抗菌薬や銀）を浸み込ませたカテーテルはすでに臨床応用されているが、いずれも抗菌性を目的としたもので、バイオフィルムの形成阻害を目的としたものはできていない。本発明のジテルペノイド化合物を有効成分として含有するバイオフィルム形成阻害剤を、医療用用具、例えばカテーテルなどの医療用デバイス、医療用ドレッシング材や医療用テープにコーティングしたり浸み込ませて用いる方法は、医療用用具に関連する感染症の新たな予防法になり得る。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]各種黄色ブドウ球菌株について、各濃度のグルコースを含む培地で培養したときのバイオフィルム形成能を示す図である。（参考例 1）

[図2]アビエチン酸及びその他の天然由来物質の、黄色ブドウ球菌（N315株）によるバイオフィルム形成阻害能を示す図である。（参考例 2）

[図3]アビエチン酸及び 6 種の天然由来物質の、黄色ブドウ球菌（N315株）によるバイオフィルム形成阻害能を示す図である。（参考例 3）

[図4]アビエチン酸の、黄色ブドウ球菌（N315株、Newman株）によるバイオフィルム形成阻害能を示す図である。（実施例 1）

[図5]アビエチン酸の、黄色ブドウ球菌（N315株）によるバイオフィルム

形成阻害能及び遊離菌の生菌数に及ぼす影響を示す図である。（実施例 2）

[図6]アビエチン酸及びその類似化合物の、黄色ブドウ球菌（N 3 1 5 株）によるバイオフィルム形成阻害能及び遊離菌の生菌数に及ぼす影響を示す図である。（実施例 3）

[図7]アビエチン酸、デヒドロアビエチン酸及びロジンの、黄色ブドウ球菌（N 3 1 5 株）によるバイオフィルム形成阻害能を示す図である。（実施例 4）

[図8]アビエチン酸、デヒドロアビエチン酸及びロジンの、表皮ブドウ球菌（臨床分離株）によるバイオフィルム形成阻害能を示す図である。（実施例 5）

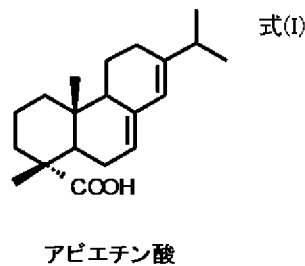
発明を実施するための形態

[0017] 本発明は、ジテルペノイド化合物を有効成分として含有するバイオフィルム形成阻害剤に関する。本発明においてバイオフィルム形成阻害剤に含有されるジテルペノイド化合物は、好ましくは環状ジテルペノイド化合物である。ジテルペノイド化合物には、ラブダン型、ピラマン型やアビエタン型などが知られているが、本発明のバイオフィルム形成阻害剤としては、アビエタン系ジテルペノイド化合物が特に好適である。アビエタン系ジテルペノイド化合物は、例えば松や杉などのマツ科(Pinaceae)の植物から抽出される化合物であり、しそ科の植物からも抽出可能な化合物である。そのような化合物として、具体的にはアビエチン酸、デヒドロアビエチン酸(dehydroabietic acid)、ネオアビエチン酸(neoabietic acid)、ピマル酸(pimaric acid)、パラストリン酸、レボピマル酸等が挙げられる。本発明において、アビエタン系ジテルペノイド化合物とは、上記化合物のほか、これらの薬理学上許容可能な誘導体のいずれかであってもよい。本発明において、薬理学上許容可能な誘導体とは、ジテルペノイド化合物、好ましくはアビエタン系ジテルペノイド化合物、より好ましくは上述の化合物と共通の基本骨格を有する誘導体であって、バイオフィルム形成阻害能を有する化合物をいう。本発明のジテルペノイド化合物は、上記植物から抽出した天然物由来であっても良いし、合

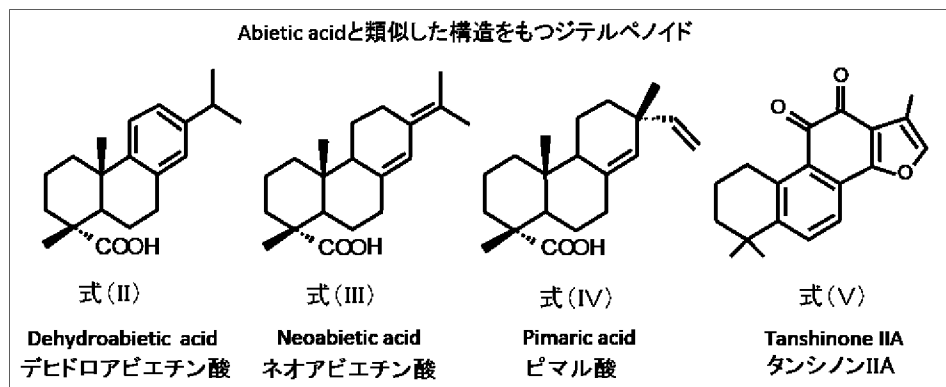
成した化合物であっても良い。また、その全ての立体異性体（ジアステレオマー、エピマー、エナンチオマーなど）又はラセミ体を含む。

[0018] 以下に、代表的なアビエタン系ジテルペノイド化合物であるアビエチン酸と、その類似化合物の例を示す。

[化1]



[0019] [化2]



[0020] 本発明のバイオフィルム形成阻害剤における有効成分として用いる上記化合物は、商業的に入手してもよいが、天然物から抽出しても良い。天然物から抽出する場合は、該抽出物は公知の方法、又は今後開発されるあらゆる方法で製造することができる。例えば、抽出物は、水、有機溶剤又はこれらの混合物を用いて適当な方法で抽出することにより得ることができる。有機溶剤は特に制限されるものではなく、メタノール、エタノール、イソプロパノール、ブタノール等のアルコール類やアセトン、酢酸エチル、エチルエーテル等を挙げることができ、これらは1種を単独で用いてもよいし、2種以上を併用することもできる。これらの化合物は、例えば70%アセトン水溶液及び100%メタノールを溶剤として浸漬抽出することが好ましい。また、

抽出した化合物は、さらに精製していても良い。例えば、カラムクロマトグラフィー等で精製したものであってもよい。また、ロジン（松の幹に傷をつけて得られる樹液を水蒸気蒸留して揮発性の物質を除いたもの）は単独又は酸を添加し、加熱することにより得ることができる。

[0021] 本発明においてバイオフィルム形成阻害剤には、バイオフィルム形成阻害能を有するジテルペノイド化合物、好ましくはアビエタン系ジテルペノイド化合物、より好ましくは上述の化合物のうち、1種を単独で又は2種以上の混合物として配合することができる。また、本発明のバイオフィルム形成阻害剤には、バイオフィルム形成阻害能を有する上述の化合物が含有されるのであれば、化合物自体は精製されているものであってもよいし、天然物からの抽出物がそのまま含まれているものであっても良い。そのような抽出物の例として、ロジンを挙げることができる。本発明のバイオフィルム形成阻害剤は、ロジンを含んでいても良いし、ロジンそのものであってもよい。ロジンは、ジテルペン樹脂酸を約90%程度含有し、その主成分はアビエチン酸である。即ちマツ科の植物に多量に含まれる松脂の不揮発性の成分であり、専門的には樹脂酸とよばれる各種異性体を主成分としたものである。ロジンは、マツ科の植物の分泌物から精油や揮発性物質を除いて作製することができる。ロジンは、天然ロジンでも良いし、各種の合成ロジンであってもよい。

[0022] 本発明においてバイオフィルム形成阻害剤に含有されるジテルペノイド化合物は、バイオフィルムの形成を阻害しうる濃度であれば、どのような濃度で用いても良いが、本発明では、特に最小生育阻止濃度（minimum inhibitory concentration: MIC、以下単に「MIC」ともいう。）よりも低い濃度において使用することができるのが特徴である。例えばMICの1/2以下、好ましくは1/4以下、より好ましくは1/8以下の濃度で使用することができる。このような低い濃度で、バイオフィルムの形成を阻害することができることで、常在細菌叢を乱したり薬剤耐性菌を誘導することを防ぐことができる。具体的には、アビエチン酸の濃度として、8～64 ppm、好ましく

は16～32ppmで使用することができる。他のジテルペノイド化合物では、デヒドロアビエチン酸、ネオアビエチン酸、ピマル酸の濃度として、2～8ppm、好ましくは2～4ppmで使用することができる。

[0023] 本発明のバイオフィルム形成阻害剤には、上記有効成分としてのジテルペノイド化合物が上記濃度で含有されていれば良く、特に限定されない。また、該ジテルペノイド化合物の溶媒としては、例えばジメチルスルフォキシド(DMSO)、アルコール類、アセトン等が挙げられる。

[0024] 本発明のバイオフィルム形成阻害剤が作用するバイオフィルムの由来は特に限定されないが、本発明のバイオフィルム形成阻害剤は、ブドウ球菌属(*Staphylococcus*)に属するグラム陽性球菌により形成されるものに対して特に阻害活性を有する。本発明のバイオフィルム形成阻害剤は、ブドウ球菌属のうち好ましくは、黄色ブドウ球菌(*S. aureus*)、表皮ブドウ球菌(*S. epidermidis*)や腐性ブドウ球菌(*S. saprophyticus*)由来のバイオフィルム形成を有効に阻害する。黄色ブドウ球菌の中には莢膜多糖を有する株があり、このような株はバイオフィルムを形成し、抗菌薬の到達が悪くなるため、その効果が低下することがある。本発明のバイオフィルム形成阻害剤は、黄色ブドウ球菌のうち、さらにはMRSAやバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌(vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: VRSA)由来のバイオフィルム形成阻害について有効に作用する。

[0025] 本発明は、上記バイオフィルム形成阻害剤で処理されてなる医療用用具、例えば医療用デバイス、医療用ドレッシングや医療用テープにも及ぶ。バイオフィルム形成阻害剤で処理されてなる医療用用具とは、当該医療用用具の表面の一部若しくは全体をバイオフィルム形成阻害剤でコーティングされているか、又は医療用用具の一部若しくは全体にバイオフィルム形成阻害剤が浸透しているものをいう。

[0026] 本発明において、医療用用具は、医療用に使用される装置、機器、デバイスなどが挙げられ、特に限定されない。例えば生体内に留置されうる医療用デバイス、すなわちインプラント(implant)が、バイオフィルムの形成によ

り重篤な感染に結びつくことが危惧される。インプラントの例として、特に限定されないが、例えばカテーテル、人工歯（デンタルインプラント）、骨折・リウマチ等の治療で骨を固定するためのボルト、ペースメーカー、人工心臓弁、人工関節、ボイスプロテーゼ、コンタクトレンズ等が挙げられる。前記カテーテルとしては、尿道カテーテル、腹腔カテーテル及び中心静脈カテーテル等が挙げられる。このように、生体内に留置されうる医療用デバイスを、本発明のバイオフィルム形成阻害剤で処理することにより、留置される生体の常在細菌叢を乱したり、薬剤耐性菌を誘導することなく、効果的に医療用デバイスにおけるバイオフィルム形成が阻害される。また、特に生体内で留置させるためのものでなくとも、バイオフィルムの形成により、何らかの好ましくない影響を及ぼすことが危惧される医療用用具、例えば医療用デバイス、医療用ドレッシング材や医療用テープも、本発明の範囲に含まれる。

[0027] 本発明は、バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理する工程を含むバイオフィルム形成阻害方法にも及ぶ。ここで、バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理する処理対象物は、上述の医療用デバイスのほか、バイオフィルムの形成が問題となりうるあらゆる物を処理対象物とすることができる。例えば、一般家庭やその他の事業所での排水処理設備には、ぬめり等のバイオフィルムに起因する汚染が問題となる。具体的には、炊事場、洗面所や風呂場などの水周りに係る設備、その他給水設備、排水管や排水溝などの排水設備が挙げられる。また、絆創膏の粘着付与剤や軟膏の基材、滑り止め、セッケンに混ぜるなどの用途に適用することができる。

[0028] 上記において、処理するとは、処理対象物を本発明のバイオフィルム形成阻害剤と接触させる工程を含む。バイオフィルム形成阻害剤と接触させるとは、コーティングする、スプレーする、浸漬する、洗浄する等の操作をいう。処理対象物が医療用デバイスのように小規模のものであれば、該医療用デバイスの表面の一部にバイオフィルム形成阻害剤を塗布したりスプレーすることでコーティング処理を行ったり、浸漬させて浸み込ませたり、又は洗浄

したりすることができる。処理対象物が給水設備や排水処理設備のように大規模の場合には、所望の部位に本発明のバイオフィルム形成阻害剤を流し込んだり、塗布したり、洗浄したりすることができる。このような場合に、バイオフィルム形成阻害剤に含まれる化合物自体は天然物からの抽出物がそのまま含まれているものであっても良い。

[0029] 上記の場合に、必要に応じて、バイオフィルムを形成しうる菌に有効な消毒薬、例えばグルコン酸クロルヘキシジン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、両性界面活性剤、アルコール、次亜塩素酸ナトリウム、ポビドンヨード、グルタラルなどを用いて併用して用いて処理しても良いし、上記処理の前後に処理しても良い。なお、ブドウ球菌に対する持続効果の面ではクロルヘキシジンが優れているといわれている。

実施例

[0030] 以下に、本発明の理解をより確実にするために、本発明を完成するに至った経緯を参考例に示し、本発明の内容を具体的に実施例に示して詳細かつ具体的に説明するが、本発明は下記の実施例の範囲に限定されるものではないことは明らかである。

[0031] (参考例 1) バイオフィルムの作製

本参考例では、バイオフィルム形成阻害剤の有効成分をスクリーニングするために用いるバイオフィルムの産生条件を検討した。黄色ブドウ球菌の様々な菌株の細胞をそれぞれ BHI (ブレインハートインヒュージョン) 培地で希釈後、96 穴プレートに 200 μ l ずつ分注し、各々 0.1 ~ 2.0 % となるようにグルコース (glucose) を加えた。これを 37°C で 48 時間静置培養したのち、形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレット (crystal violet) を用いて染色した。蒸留水を用いて各ウェルを洗浄した後、DMSO 200 μ l で溶出したクリスタルバイオレットについて 570 nm の吸光度を計測し、バイオフィルムの形成能を測定した。

[0032] 上記の検討結果を図 1 に示した。その結果、さまざまな黄色ブドウ球菌の菌株のうち、黄色ブドウ球菌 N315 株がバイオフィルム形成に適している

ものと考え、以降の実施例において使用した。N 3 1 5 株はM R S Aの標準株であり、すでに全ゲノム配列も決定されており、遺伝的解析も行いやすい株である。この株のバイオフィルム形成能をさらに高めるために1%グルコースを含む培地を用いて培養した。

[0033] (参考例2) バイオフィルム形成阻害物質のスクリーニング

本参考例では、バイオフィルム形成阻害剤の有効成分であるバイオフィルム形成阻害物質を選別するためにスクリーニングを行なった。スクリーニングには35種類の天然由来物質を用いた。まず最初に、これらの天然由来物質の黄色ブドウ球菌N 3 1 5 株に対する最小生育阻止濃度(M I C)を求め、生育に影響を与えないM I Cの1/8以下の濃度を培地に添加したときのバイオフィルムの形成能を確認した。各候補化合物は、1%DMSOを含む培地で希釈した。黄色ブドウ球菌N 3 1 5 株に対するM I Cは、表1に示した。

[0034]

[表1]

候補天然由来物	MIC (μ g/ml) <i>S. aureus</i> N315
アビエチン酸(Abietic acid)	256
塩酸ベルベリン(Berberine hydrochloride)	64
ボルネオール(Borneol)	>1024
カンフェン(Camphene)	>512
樟腦(Camphor)	>1024
カプサイシン(Capsaicin)	>128
シネオール(Cineol)	>1024
シトラール(Citral)	1024
シトロネロール(Citronellol)	1024
酢酸シトロネリル(Citronellyl acetate)	1024
シメン(Cymene)	>1024
ジヒドロカプサイシン(Dihydrocapsaicin)	>128
オイゲノール(Eugenol)	>1024
ファルネソール(Farnesol)	32
ゲラニオール(Geraniol)	1024
酢酸ゲラニオール(Geranyl acetate)	>1024
ラバンデュロール(Lavandulol)	>1024
リナロール(Linalool)	>1024
酢酸リナリル(Linalyl acetate)	>1024
ミルセン(Myrcene)	>1024
ナリンゲニン(Naringenin)	256
ネロール(Nerol)	1024
ネロリドール(Nerolidol)	>256
ノニルワニリルアミド(Nonylic vanillylamide)	>128
フィトール(Phytol)	>1024
α -ピネン(α -pinene)	>1024
β -ピネン(β -pinene)	>1024
ケルセチン(Quercetin dihydrate)	>1024
テルピネオール(Terpineol)	1024
テトラヒドロリナロール(Tetrahydrolinalool)	>1024
チモール(Thymol)	256

[0035] 黄色ブドウ球菌 N 3 1 5 株細胞を B H I (1%グルコース添加) 培地で 100 倍に希釈した後、96 穴プレートに 200 μ l ずつ分注し、さらに各試料溶液 2 μ l を加えた。ここで、候補化合物のうちオイゲノール及びケルセチン(queracetin)は最終濃度が 1/16 MIC、その他については 1/8 MIC となるよう調整した。コントロールは試料も溶媒も含まない B H I 培地と

した。これらを 37℃で 48 時間静置培養した。

形成されたバイオフィルムを、クリスタルバイオレットを用いて染色し、バイオフィルムの形成能を参考例 1 と同手法により測定した。物質名の後の数字は濃度を表し、単位は $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

[0036] その結果、アビエチン酸(abietic acid, $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_2$)、オイゲノール(eugenol, $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_2$)、カプサイシン(capsaicin, $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_3$)、ネロール(nerol, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$)、ナリンゲニン(naringenin, $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$)、シトロネロール(citronellol, $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}$)、ジヒドロカプサイシン(dihydrocapzaicin, $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_3$)、ゲラニオール(geraniol, $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}$)の 8 種類の物質にバイオフィルム形成阻害が認められた。特に、アビエチン酸は黄色ブドウ球菌 N 3 1 5 株によるバイオフィルム形成を強く阻害することが確認された。また精油成分であるシトロネロールもある程度バイオフィルム形成を阻害することが確認された。ここで、ゲラニオールは直鎖モノテルペノイドの一種であり、ネロールはモノテルペン的一种である。カプサイシンはアルカロイドのうちカプサイシノイドと呼ばれる化合物の一種である。また、オイゲノールはグアイアコールにアリル基が置換した構造を持つ、フェニルプロパノイドの一種である。ナリンゲニンはフラバノンであり、フラボノイドに属する。

[0037] (参考例 3) バイオフィルム形成阻害物質のスクリーニング (2)

本参考例では参考例 2 におけるスクリーニングの結果、黄色ブドウ球菌の N 3 1 5 株において、バイオフィルムの産生を比較的強く抑制し、菌の生育には大きな影響を与えなかったアビエチン酸、オイゲノール、カプサイシン、ネロール、シトロネロール、ゲラニオールの 6 種類の天然由来物について、MIC の 1/8 よりさらに低濃度の試料を用いてバイオフィルム形成阻害活性の濃度依存性を調べた。

[0038] その結果、濃度依存的にバイオフィルム形成を抑制しているものはアビエチン酸とシトロネロールであることがわかった。低濃度で抑制作用を持つアビエチン酸を効果的なバイオフィルム形成阻害物質とした。

[0039] (実施例 1) アビエチン酸のバイオフィルム形成阻害作用の確認

本実施例は、参考例 2 及び 3 の結果に基づき、特にバイオフィルムの形成阻害作用の優れていたアビエチン酸について確認した。アビエチン酸のバイオフィルム形成阻害作用が黄色ブドウ球菌 N 3 1 5 株に特有のものであるかどうかを確認するためにメチシリン感受性黄色ブドウ球菌の病原性に関わる実験に用いられる Newman 株のバイオフィルム形成に及ぼす効果も調べた。黄色ブドウ球菌 N 3 1 5 株細胞又は Newman 株細胞を B H I （1 % グルコース添加）培地で 1 0 0 倍に希釈した後、9 6 穴プレートに 2 0 0 μ l ずつ分注し、さらに最終濃度が 0、4、8、1 6、3 2 μ g / m l となるようアビエチン酸溶液 2 μ l （溶媒である D M S O の最終濃度は 1 %）を加えた。これらを 3 7 °C で 4 8 時間静置培養した。形成されたバイオフィルムを、クリスタルバイオレットを用いて染色し、バイオフィルムの形成能を参考例 1 と同手法により測定した。

[0040] その結果、図 4 に示すように N 3 1 5 株及び Newman 株のいずれについても、バイオフィルム形成はアビエチン酸により阻害されることが確認された。

[0041] （実施例 2）アビエチン酸のバイオフィルム形成阻害作用の確認

本実施例ではアビエチン酸のバイオフィルム形成阻害作用と菌の生育抑制作用との関係を調べた。実施例 1 と同手法により黄色ブドウ球菌 N 3 1 5 株細胞を B H I （1 % グルコース添加）培地で 1 0 0 倍に希釈した後、9 6 穴プレートに 2 0 0 μ l ずつ分注し、さらに 0、4、8、1 6、3 2 μ g / m l のアビエチン酸溶液 2 μ l （溶媒である D M S O の最終濃度は 1 %）を加えた。コントロールは試料も溶媒も含まない B H I 培地とした。これらを 3 7 °C で 4 8 時間静置培養した。形成されたバイオフィルムを、クリスタルバイオレットを用いて染色し、バイオフィルムの形成能を参考例 1 と同手法により測定した。また、ウェル内の培地中の菌数（浮遊菌）についても測定した。9 6 穴プレート各ウェルの培養上清を 1 0 ⁴ 分の 1 に滅菌生理食塩液で希釈した菌浮遊液を普通寒天培地に塗布し、3 7 °C で静置培養後のコロニー数をカウントし、菌数を測定した。生菌数は 1 0 ³ C F U / m l で表した。

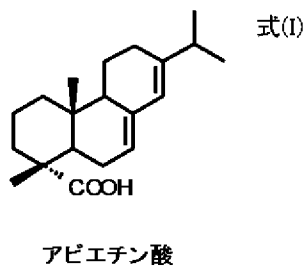
[0042] その結果、図 5 に示すように、アビエチン酸の濃度が上昇するにつれて、

バイオフィーム形成能は減少する一方、各ウェル中の浮遊菌数が上昇していることが確認された。これはアビエチン酸が黄色ブドウ球菌を殺すことなくバイオフィーム形成能だけを阻害したことを示している。

[0043] (実施例 3) アビエチン酸及びその類似物質のバイオフィーム形成阻害作用の確認

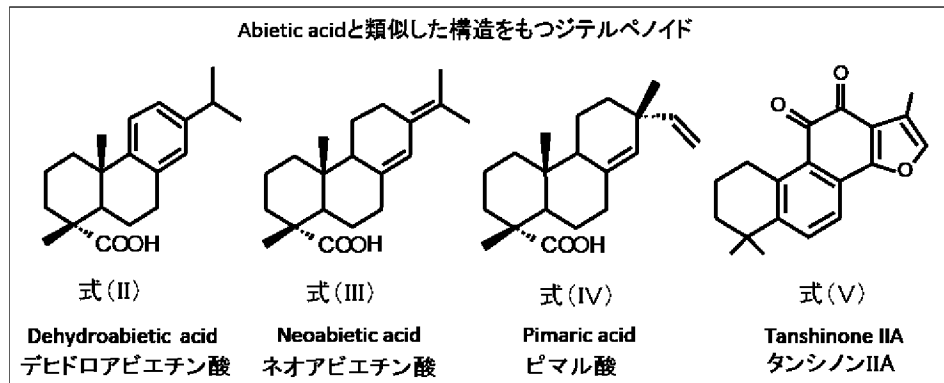
アビエチン酸にバイオフィーム形成阻害作用が認められたことから、本実施例ではアビエチン酸の類似化合物についても同様に確認した。実施例 1 と同手法により黄色ブドウ球菌 N 3 1 5 株細胞を B H I (1% グルコース添加) 培地で 100 倍に希釈した後、96 穴プレートに 200 μ l ずつ分注し、さらに各濃度のアビエチン酸、デヒドロアビエチン酸(dehydroabietic acid)、ネオアビエチン酸(neoabietic acid)、ピマル酸(pimaric acid)又はタンシノン(tanshinones)を各々 2 μ l (溶媒である DMSO の最終濃度は 1%) 加えた。コントロールは試料も溶媒も含まない B H I 培地とした。また、1% DMSO を含む B H I 培地も比較対照とした。これらを 37°C で 48 時間静置培養した。形成されたバイオフィームを、クリスタルバイオレットを用いて染色し、バイオフィームの形成能を参考例 1 と同手法により測定した。アビエチン酸及びその類似物質の構造式は、以下のとおりである。

[0044] [化1]



[0045]

[化2]



[0046] その結果、図6に示すようにアビエチン酸と同様にマツ科の植物に含まれるジテルペノイドである、デヒドロアビエチン酸、ネオアビエチン酸、ピマル酸については強いバイオフィーム形成阻害作用が認められた。また培地に添加した各アビエチン酸の類似化合物の添加濃度は、アビエチン酸の添加濃度が $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ に対して、 $2 \sim 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ と低く、アビエチン酸よりも低濃度で効果を示した。

[0047] (実施例4) ロジンのバイオフィーム形成阻害作用の確認(1)

アビエチン酸及びデヒドロアビエチン酸にバイオフィーム形成阻害効果があったことに基づいて、アビエチン酸を主成分として含むロジン (rosin) についても黄色ブドウ球菌に対してバイオフィーム抑制効果があるかどうか調べた。本実施例では、黄色ブドウ球菌はN315株細胞を用い、ロジンは和光純薬工業株式会社のものを用いた。用いたロジンの組成は、樹脂酸(80-97%)、不ケンカ物及びその他少量である。樹脂酸には主としてアビエチン酸、ネオアビエチン酸、パラストリン酸を含み、他にレボピマル酸、デヒドロアビエチン酸、ピマル酸などが含まれる。また、アビエチン酸及びデヒドロアビエチン酸についてもバイオフィーム抑制効果を確認した。アビエチン酸及びデヒドロアビエチン酸の最終濃度はMICの $1/16$ 及び $1/8$ 、ロジンの最終濃度はMICの $1/32$ 、 $1/16$ 及び $1/8$ を用いた。

[0048] 黄色ブドウ球菌N315株細胞をBHI(1%グルコース添加)培地で100倍に希釈した後、96穴プレートに $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し、さらに最終

濃度が16又は32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるようアビエチン酸溶液2 μl （溶媒であるDMSOの最終濃度は1%）を加えた。デヒドロアビエチン酸については4又は8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう、さらにロジンも最終濃度が8、16又は32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように溶液を2 μl 培地に加えた。次いで、これらを37°Cで48時間静置培養した。形成されたバイオフィルムを、クリスタルバイオレットを用いて染色したのち、蒸留水を用いて各ウェルを洗浄した後、DMSO 200 μl で溶出したクリスタルバイオレットについて570 nmの吸光度を計測し、バイオフィルムの形成能を測定した。

[0049] 上記の結果、黄色ブドウ球菌において、アビエチン酸を主成分として含むロジンについてもアビエチン酸と同様のバイオフィルム抑制効果が認められた。ロジンはマツ科の植物の分泌物から精油や揮発性物質を除いた樹脂である。ジテルペン樹脂酸を90%含有し、その主成分はアビエチン酸である。絆創膏の粘着付与剤や軟膏の基材、滑り止め、セッケンに混ぜるなど、用途は広い。

[0050] （実施例5）ロジンのバイオフィルム形成阻害作用の確認（2）

黄色ブドウ球菌の代わりに、表皮ブドウ球菌（臨床分離株）を用いた他は、実施例4と同手法にて、表皮ブドウ球菌に対するアビエチン酸、デヒドロアビエチン酸及びロジンのバイオフィルム形成阻害作用を確認した。

[0051] 上記の結果、ロジンは表皮ブドウ球菌においても黄色ブドウ球菌と同様に、バイオフィルム形成阻害効果が認められた。

[0052] 表皮ブドウ球菌は殆どのヒトの表皮や鼻腔に常在し、病原性の殆どない菌である。しかしながら、皮膚に常在する表皮ブドウ球菌が体内異物装着時に易感染患者に感染した場合には重症感染症を起こすことがある。表皮ブドウ球菌は、黄色ブドウ球菌と同様に体内に留置されるカテーテル等への付着性が高くバイオフィルムを形成しやすい。カテーテル関連血流感染症の起因菌としては黄色ブドウ球菌より表皮ブドウ球菌の方が、割合が高い。

産業上の利用可能性

[0053] 以上詳述したように、本発明のバイオフィルム形成阻害剤により、臨床上

問題となる黄色ブドウ球菌（MRSAを含む）由来のバイオフィルム形成を阻害することができる。該バイオフィルム形成阻害剤は抗菌剤と異なり、菌を殺すことなくバイオフィルムの形成のみを阻害しうる。この性質は1. 皮膚を始め各部位での常在細菌叢を乱さない、2. 薬剤耐性菌を誘導しないという2つの利点を持っている。抗菌物質（抗菌薬や銀）を浸み込ませたカテーテルはすでに臨床応用されているが、いずれも抗菌性を目的としたもので、バイオフィルム形成阻害を目的としたものではない。

[0054] 本発明のジテルペノイド化合物を有効成分として含有するバイオフィルム形成阻害剤を、カテーテルをはじめとする各種医療用デバイスにコーティングしたり浸透させて用いる方法は、カテーテルなどの医療用デバイスに関連する感染症の新たな予防法になり得る。さらに、一般家庭を含む各施設の水周りにおいても、本発明のバイオフィルム形成阻害剤で処理することにより、効果的にバイオフィルムの形成を阻害しうる。

[0055] また、アビエチン酸を主成分として含むロジン、黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌に対してアビエチン酸と同様のバイオフィルム抑制効果が認められたことから、ロジンを含む本発明のバイオフィルム形成阻害剤は、絆創膏の粘着付与剤や軟膏の基材、滑り止め、セッケンに混ぜるなど、用途は広い。表皮ブドウ球菌は、黄色ブドウ球菌と同様に体内に留置されるカテーテル等への付着性が高くバイオフィルムを形成しやすい。カテーテル関連血流感染症の起因菌としては黄色ブドウ球菌より表皮ブドウ球菌の方が、割合が高い。これらのことから、本発明のバイオフィルム形成阻害剤を各種医療用デバイスにコーティングしたり浸透させて用いることで、バイオフィルムの形成が抑制された、安全性の高い医療用デバイスを提供することができる。

請求の範囲

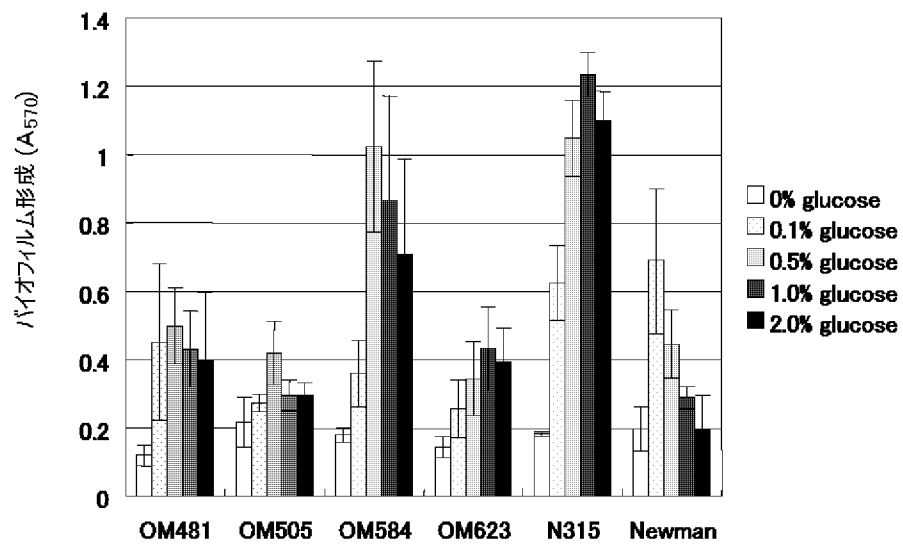
- [請求項1] ジテルペノイド化合物を有効成分として含有するバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項2] ジテルペノイド化合物が、環状ジテルペノイド化合物である、請求項1に記載のバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項3] 環状ジテルペノイド化合物が、アビエタン系ジテルペノイド化合物である請求項2に記載のバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項4] アビエタン系ジテルペノイド化合物が、アビエチン酸、デヒドロアビエチン酸、ネオアビエチン酸、ピマル酸、パラストリン酸、レボピマル酸及びこれらの薬理学上許容可能な誘導体のいずれか1種又は2種以上である請求項3に記載のバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項5] バイオフィルム形成阻害剤が、ロジンを含む、請求項1～4のいずれかに記載のバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項6] バイオフィルムが、ブドウ球菌属に属するグラム陽性球菌由来である請求項1～7のいずれか1に記載のバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項7] ブドウ球菌属に属するグラム陽性球菌が、黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌及び腐性ブドウ球菌から選択されるいずれかである請求項6に記載のバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項8] 黄色ブドウ球菌が、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）又はバンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌（VRSA）である請求項7に記載のバイオフィルム形成阻害剤。
- [請求項9] 請求項1～8のいずれか1に記載のバイオフィルム形成阻害剤で処理されてなる医療用用具。
- [請求項10] バイオフィルム形成阻害剤で処理されてなる医療用用具が、当該医療用用具の表面をバイオフィルム形成阻害剤でコーティングされているか、又は当該医療用用具にバイオフィルム形成阻害剤が浸透しているものである請求項9に記載の医療用用具。
- [請求項11] 請求項1～8のいずれか1に記載のバイオフィルム形成阻害剤を用い

て処理する工程を含むバイオフィルム形成阻害方法。

[請求項12] バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理する対象物が医療用用具である、請求項11に記載のバイオフィルム形成阻害方法。

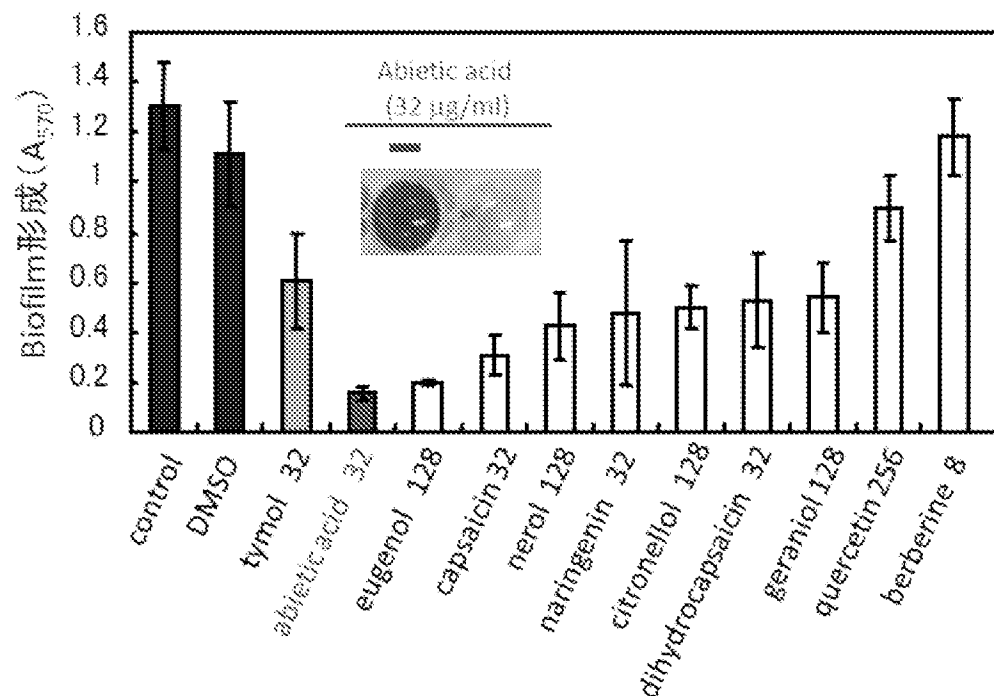
[請求項13] バイオフィルム形成阻害剤を用いて処理する対象物が排水処理設備である、請求項11に記載のバイオフィルム形成阻害方法。

[図1]

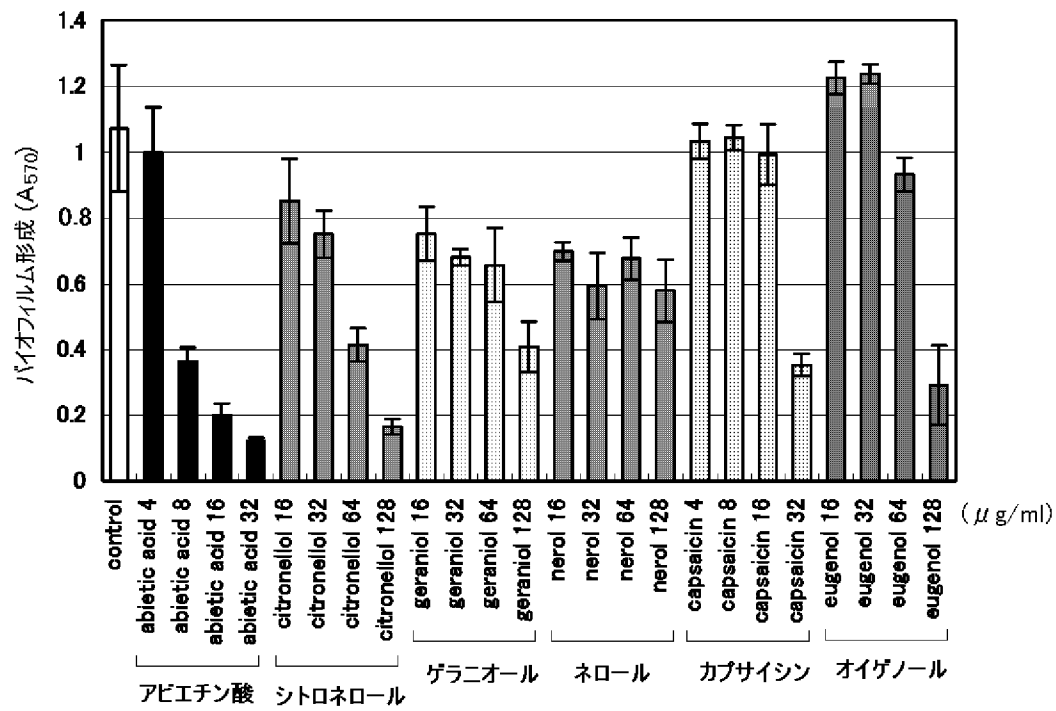


グルコース濃度または黄色ブドウ球菌株による
バイオフィーム形成能

[図2]

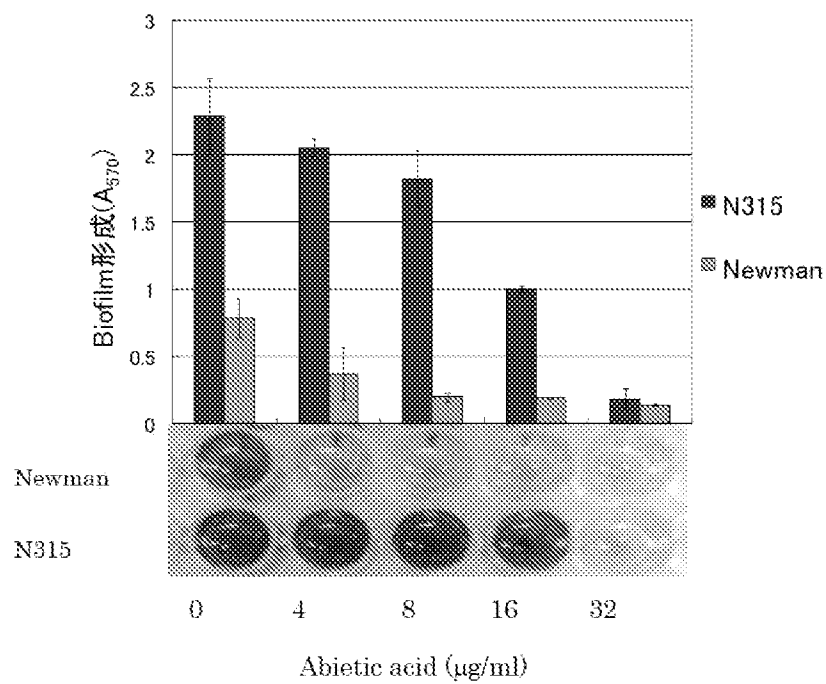


[図3]

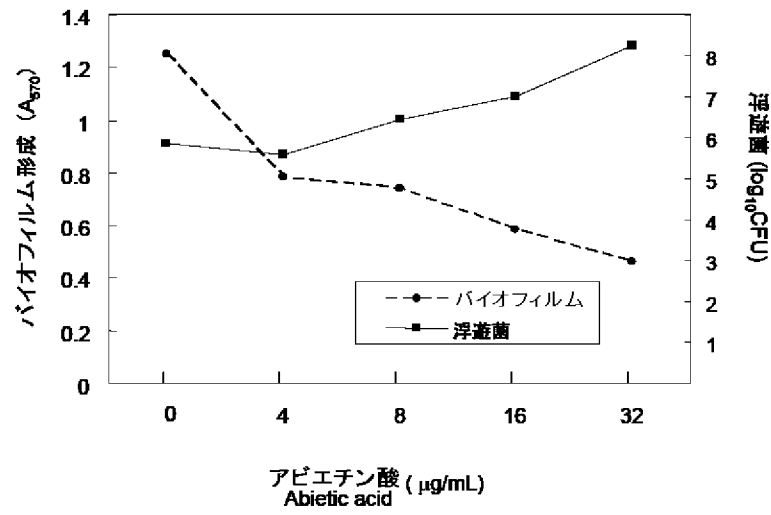


黄色ブドウ球菌N315株のバイオフィルム形成に対する
天然由来物の影響

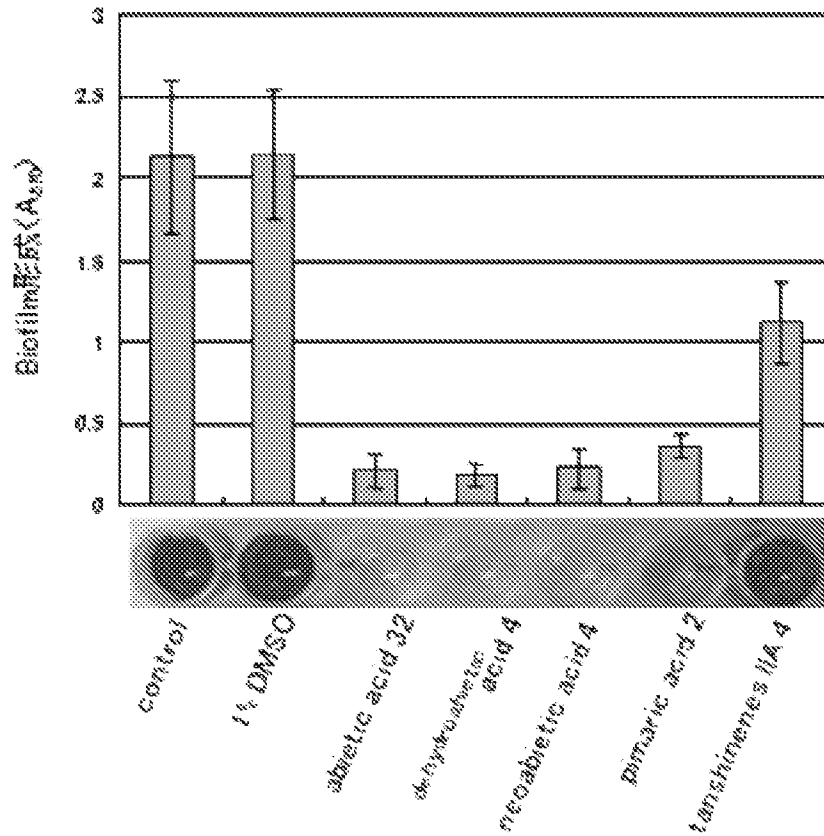
[図4]



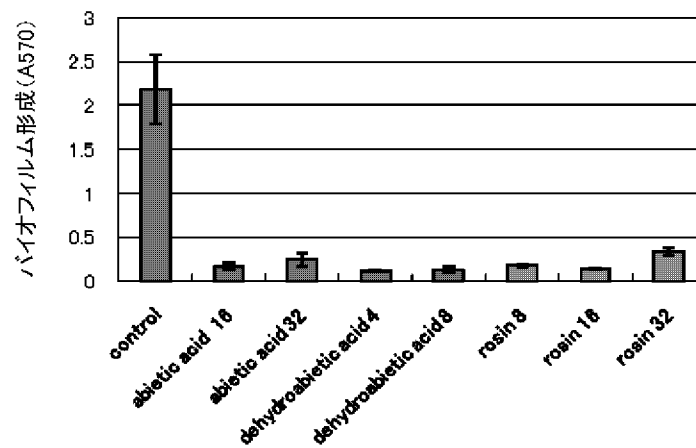
[図5]



[図6]

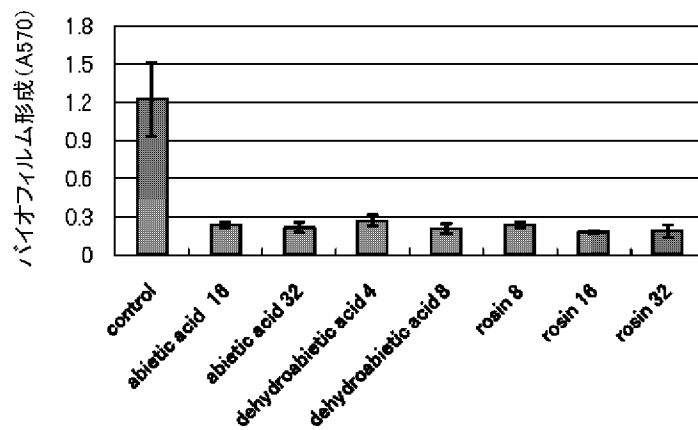


[図7]



黄色ブドウ球菌N315株のバイオフィルム形成に対する
アビエタン型ジテルペノイド及びロジンの影響

[図8]



表皮ブドウ球菌のバイオフィルム形成に対する
アビエタン型ジテルペノイド及びロジンの影響

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002477

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K31/19(2006.01)i, A61K31/192(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, C02F1/50(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)

A61K31/19, A61K31/192, A61P31/04, C02F1/50

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Scillacì, D. et al, In vitro anti-biofilm activity of Boswellia spp. oleogum resin essential oils, Letters in Applied Microbiology, 2008, Volume 47 Issue 5, Pages 433-438	1, 2, 6-10, 12, 13
A	JP 2003-267910 A (Japan Science and Technology Corp.), 25 September 2003 (25.09.2003), entire text (Family: none)	1-10, 12, 13
A	JP 2002-080419 A (Japan Science and Technology Corp.), 19 March 2002 (19.03.2002), entire text (Family: none)	1-10, 12, 13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 April, 2010 (27.04.10)Date of mailing of the international search report
11 May, 2010 (11.05.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002477

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5929124 A (Kurt Hostettmann), 27 July 1999 (27.07.1999), entire text (Family: none)	1-10,12,13
A	JP 1-311018 A (Shiseido Co., Ltd.), 15 December 1989 (15.12.1989), entire text (Family: none)	1-10,12,13
A	JP 62-056422 A (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.), 12 March 1987 (12.03.1987), entire text (Family: none)	1-10,12,13
A	JP 61-091155 A (Mitsubishi Chemical Industries Ltd.), 09 May 1986 (09.05.1986), entire text (Family: none)	1-10,12,13
A	Balan, K.V et al, Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of Salvia sclarea L.: Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci, Phytomedicine, 2007, Volume 14, Issue 1, Page 31-35	1-10,12,13
A	TADA, M. et al, Efficient ortho-Oxidation of Phenol and Synthesis of Anti-MRSA and Anti-VRE Compound Abietaquinone Methide from Dehydroabietic Acid, Chem. Pharm. Bull., 2006, Vol.54, No.10, pp.1412-1417	1-10,12,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/002477

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.: 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 11 includes a method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy.
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 additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
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.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/19(2006.01)i, A61K31/192(2006.01)i, A61P31/04(2006.01)i, C02F1/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K31/19, A61K31/192, A61P31/04, C02F1/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	Scillaci, D. et al, In vitro anti-biofilm activity of Boswellia spp. oleogum resin essential oils, Letters in Applied Microbiology, 2008, Volume 47 Issue 5, Pages 433-438	1, 2, 6-10, 12, 13
A	JP 2003-267910 A (科学技術振興事業団) 2003. 09. 25, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 12, 13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 7 . 0 4 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 1 . 0 5 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

清野 千秋

4 C

3 1 2 7

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2002-080419 A (科学技術振興事業団) 2002. 03. 19, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 12, 13
A	US 5929124 A (Kurt Hostettmann) 1999. 07. 27, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 12, 13
A	JP 1-311018 A (株式会社資生堂) 1989. 12. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 12, 13
A	JP 62-056422 A (三菱化成工業株式会社) 1987. 03. 12, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 12, 13
A	JP 61-091155 A (三菱化成工業株式会社) 1986. 05. 09, 全文 (ファミリーなし)	1-10, 12, 13
A	Balan, K.V et al, Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of Salvia sclarea L. : Salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant Staphylococci, Phytomedicine, 2007, , Volume 14, Issue 1, Page 31-35	1-10, 12, 13
A	TADA, M. et al, Efficient ortho-Oxidation of Phenol and Synthesis of Anti-MRSA and Anti-VRE Compound Abietaquinone Methide from Dehydroabietic Acid, Chem. Pharm. Bull., 2006, Vol.54, No.10, pp.1412-1417	1-10, 12, 13

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 11 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求項 11 は「手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法」を包含するものである。

2. ☐ 請求項 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求項 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。