

(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2018-507033

(P2018-507033A)

(43) 公表日 平成30年3月15日(2018.3.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 L 15/24 (2006.01)	A 6 1 L 15/24 1 0 0	4 C 0 7 6
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	4 C 0 8 1
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 L 0 3 5
A 6 1 P 31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	4 L 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 112 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-540823 (P2017-540823)	(71) 出願人	516018371
(86) (22) 出願日	平成28年2月3日 (2016.2.3)		マトケ・ホールディングス・リミテッド
(85) 翻訳文提出日	平成29年9月29日 (2017.9.29)		イギリス国 オーエックス13 5エイチ
(86) 国際出願番号	PCT/GB2016/050253		アール、アビンドン、サウスムア、ハヌニ
(87) 国際公開番号	W02016/124926		・ロード、マイケルズ・コート 2
(87) 国際公開日	平成28年8月11日 (2016.8.11)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	1501805.4		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成27年2月3日 (2015.2.3)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁理士 森下 夏樹
(31) 優先権主張番号	1508311.6	(74) 代理人	100181674
(32) 優先日	平成27年5月14日 (2015.5.14)		弁理士 飯田 貴敏
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(74) 代理人	100181641
(31) 優先権主張番号	1509652.2		弁理士 石川 大輔
(32) 優先日	平成27年6月3日 (2015.6.3)	(74) 代理人	230113332
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		弁護士 山本 健策
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗微生物繊維及び組成物

(57) 【要約】

抗微生物活性を生じさせる繊維について記載する。本繊維は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質とを含み、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得るいずれかの酵素活性に付加される。この酵素は十分な自由水の存在下で基質を変換して、広範囲の微生物に対して有効である過酸化水素を放出する。この繊維を含む創傷ドレッシング材及び組成物についても記載し、同様に特に創傷治癒のための繊維、創傷ドレッシング材、及び組成物の使用についても記載する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

繊維であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、前記酵素に対する基質を含む未精製の天然物質とを含み、前記酵素は、過酸化水素を放出するように前記基質を変換可能な、前記未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、前記繊維。

【請求項 2】

エレクトロスピニング繊維である、請求項 1 に記載の繊維。

【請求項 3】

ナノファイバーである、請求項 1 または請求項 2 に記載の繊維。

10

【請求項 4】

少なくとも 24 時間、過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含む、先行請求項のいずれかに記載の繊維。

【請求項 5】

少なくとも 24 時間、2 mmol / リットル未満の濃度で過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含む、先行請求項のいずれかに記載の繊維。

【請求項 6】

前記酵素が前記基質を変換するのに十分な自由水を含まない、先行請求項のいずれかに記載の繊維。

【請求項 7】

前記酵素が前記基質を変換するのに十分な水との接触後に、少なくとも 24 時間、過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含む、請求項 6 に記載の繊維。

20

【請求項 8】

前記酵素が前記基質を変換するのに十分な水との接触後に、少なくとも 24 時間、2 mmol / リットル未満の濃度で過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含む、請求項 6 または請求項 7 に記載の繊維。

【請求項 9】

殺菌された状態である、先行請求項のいずれかに記載の繊維。

【請求項 10】

ガンマ照射曝露により殺菌されている、請求項 9 に記載の繊維。

30

【請求項 11】

エレクトロスピニング可能な組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、前記酵素に対する基質を含む未精製の天然物質とを含み、前記酵素は、過酸化水素を放出するように前記基質を変換可能な、前記未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、前記組成物。

【請求項 12】

溶液である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

エレクトロスピニング可能な成分を更に含む、先行請求項のいずれかに記載の繊維または組成物。

40

【請求項 14】

前記エレクトロスピニング可能な成分がエレクトロスピニング可能なポリマーである、請求項 13 に記載の繊維または組成物。

【請求項 15】

前記エレクトロスピニング可能な成分が水溶性である、請求項 13 または請求項 14 に記載の繊維または組成物。

【請求項 16】

前記エレクトロスピニング可能な成分が、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール、及びポリビニルピロリドンからなる群から選択される、請求項 13 ~ 15 のいずれかに記載の繊維または組成物。

50

【請求項 17】

前記酵素が精製酵素である、先行請求項のいずれかに記載の繊維または組成物。

【請求項 18】

前記未精製の天然物質にカタラーゼ活性がない、先行請求項のいずれかに記載の繊維または組成物。

【請求項 19】

前記未精製の天然物質が未精製の天然糖物質である、先行請求項のいずれかに記載の繊維または組成物。

【請求項 20】

前記未精製の天然物質が蜂蜜である、先行請求項のいずれかに記載の繊維または組成物。

10

【請求項 21】

前記蜂蜜が未低温殺菌蜂蜜、好ましくはクリーム状の未低温殺菌蜂蜜である、請求項 20 に記載の繊維または組成物。

【請求項 22】

前記酵素がオキシドレダクターゼ酵素、好ましくはグルコースオキシダーゼである、先行請求項のいずれかに記載の繊維または組成物。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 10 または請求項 13 ~ 22 のいずれかに記載の 1 種または 1 種より多くの繊維を含む創傷ドレッシング材。

20

【請求項 24】

請求項 11 ~ 22 のいずれかに記載の組成物をエレクトロスピニングすることを含む、繊維の製造方法。

【請求項 25】

繊維の製造における抗微生物活性を生じさせるための組成物の使用であって、前記組成物が、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、前記酵素に対する基質を含む未精製の天然物質とを含み、前記酵素は、過酸化水素を放出するように前記基質を変換可能な、前記未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、前記使用。

【請求項 26】

請求項 6 ~ 10 または 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、または請求項 6 ~ 10 または 13 ~ 22 のいずれかに依存する請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材を、前記酵素が前記未精製の天然物質中の前記基質を変換して過酸化水素を放出するのに十分な水と接触させることを含む、抗微生物組成物の製造方法。

30

【請求項 27】

請求項 26 の方法により得られる、抗微生物組成物。

【請求項 28】

医薬品としての使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 12 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材、または請求項 27 に記載の組成物を創傷に施すことを含む、創傷の治療方法。

40

【請求項 30】

創傷の治療における使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 31】

創傷の治療のための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物の使用。

【請求項 32】

50

微生物感染の予防、治療または改善方法であって、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材、または請求項 27 に記載の組成物を、そのような予防、治療または改善を必要とする対象に施すことを含む、前記方法。

【請求項 33】

微生物感染の予防、治療または改善における使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 34】

微生物感染の予防、治療または改善のための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物の使用。

10

【請求項 35】

請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材、または請求項 27 に記載の組成物を炎症部位に施すことを含む、炎症の治療方法。

【請求項 36】

炎症の治療における使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 37】

炎症の治療のための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物の使用。

20

【請求項 38】

組織増殖の刺激方法であって、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材、または請求項 27 に記載の組成物を、そのような刺激を必要とする部位に施すことを含む、前記方法。

【請求項 39】

組織増殖の刺激における使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 40】

組織増殖の刺激のための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物の使用。

30

【請求項 41】

請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材、または請求項 27 に記載の組成物を、デブリードマンを必要とする創傷に施すことを含む、創傷のデブリードマン方法。

【請求項 42】

創傷のデブリードマンにおける使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 43】

創傷のデブリードマンのための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物の使用。

40

【請求項 44】

請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材、または請求項 27 に記載の組成物を、消臭を必要とする創傷に施すことを含む、創傷の消臭方法。

【請求項 45】

創傷の消臭における使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 46】

創傷の消臭のための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物の使用。

50

【請求項 47】

請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物、または請求項 24 に記載の組成物を、薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤と共に含む、医薬組成物。

【請求項 48】

バイオフィームまたはバイオフィームの形成が可能な微生物を含む微生物感染の予防または治療における使用のための、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物であって、好ましくは、前記繊維または組成物が、前記微生物による前記バイオフィームの増殖または播種を防止または阻止する、前記繊維または組成物。

10

【請求項 49】

バイオフィームまたはバイオフィームの形成が可能な微生物を含む微生物感染の予防または治療のための医薬品の製造における、請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 に記載の繊維、または請求項 27 に記載の組成物の使用であって、好ましくは、前記繊維または組成物が、前記微生物による前記バイオフィームの増殖または播種を防止または阻止する、前記使用。

【請求項 50】

前記微生物感染が、バイオフィームの形成が可能なバクテリア、好ましくはグラム陰性菌を含み、場合により前記バクテリアが *Pseudomonas aeruginosa* または *Acinetobacter baumannii* である、請求項 48 または請求項 49 に記載の使用。

20

【請求項 51】

請求項 1 ~ 10 もしくは 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維、請求項 23 に記載の創傷ドレッシング材、または請求項 27 に記載の組成物を炎症部位に施すことを含む、バイオフィームまたはバイオフィームの形成が可能な微生物を含む微生物感染の予防または治療方法。

【請求項 52】

図 34 ~ 36 で参照される、実質的に上記に記載される繊維またはドレッシング材。

【請求項 53】

組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、前記酵素に対する基質を含む未精製の天然物質であって、前記酵素が、過酸化水素を放出するように前記基質を変換可能な、前記未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、前記未精製の天然物質と、ポリマーと、を含む、前記組成物。

30

【請求項 54】

エレクトロスピン可能な組成物及び / または噴霧可能なもしくは霧状化可能な組成物である、請求項 53 に記載の組成物。

【請求項 55】

前記ポリマーが、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンから選択される、請求項 53 または請求項 54 に記載の組成物。

【請求項 56】

組成物を患者に送達するための機器であって、請求項 53 ~ 55 のいずれかに記載の組成物を含む前記機器。

40

【請求項 57】

噴霧機器または霧状化機器である、請求項 56 に記載の機器。

【請求項 58】

i) 請求項 53 ~ 55 のいずれかに記載の組成物と、ii) 組成物を患者に送達するための機器を含む、キット。

【請求項 59】

請求項 53 ~ 55 のいずれかに記載の組成物を患者に塗布または投与する方法であって、患者の気道に、前記組成物を噴霧すること、前記組成物を注入すること、前記組成物を

50

吸入すること、または前記組成物を塗布することを含む、前記方法。

【請求項 6 0】

医薬品としての使用のための、請求項 5 3 ~ 5 5 のいずれかに記載の前記組成物。

【請求項 6 1】

請求項 6 0 に記載の使用のための組成物であって、前記組成物の噴霧により、注入により、吸入により、または塗布により、前記組成物が、患者の気道に投与または塗布される、前記組成物。

【請求項 6 2】

抗微生物活性を生じさせるための組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、前記酵素に対する基質を含む物質とを含み、前記酵素は、過酸化水素を放出するように前記基質を変換可能である、前記物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、前記組成物。

10

【請求項 6 3】

前記物質が、前記酵素に対する精製基質を含む、請求項 6 2 に記載の組成物。

【請求項 6 4】

前記精製基質が精製された糖物質であるか、または精製された糖物質を含む、請求項 6 2 または請求項 6 3 に記載の組成物。

【請求項 6 5】

前記物質が未精製の天然物質である、請求項 6 2 に記載の組成物。

【請求項 6 6】

20

ポリマーを含む、請求項 6 2 ~ 6 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6 7】

前記組成物が、前記酵素が前記基質を変換するのに十分な自由水を含まない、請求項 6 2 ~ 6 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6 8】

水溶性の分包内に収容された、請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 6 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6 9】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 6 7 のいずれかに記載の組成物と、前記組成物を封入する水溶性層とを含む、創傷ドレッシング材。

30

【請求項 7 0】

検出可能な過酸化水素をまったく含まない、請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5、6 2 ~ 6 7 または 6 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7 1】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が 1 2 重量%または 1 2 重量%未満の水を含む、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 7 2】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が 1 0 重量%または 1 0 重量%未満の水を含む、前記組成物または創傷ドレッシング材。

40

【請求項 7 3】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が 5 重量%または 5 重量%未満の水を含む、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 7 4】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が 3 重量%または 3 重量%未満の水を含む、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 7 5】

50

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 4 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が加工助剤、乾燥助剤、充填剤及び / または固化防止剤を含む、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 7 6】

請求項 7 1 ~ 7 5 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が乾燥により得た、または得られる、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 7 7】

前記乾燥が凍結乾燥、真空乾燥または噴霧乾燥を含む、請求項 7 6 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 7 8】

請求項 7 1 ~ 7 7 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が固体形態である、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 7 9】

前記固体形態が粉末、フレーク、顆粒、トローチ剤または錠剤である、請求項 7 8 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 0】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 9 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が、少なくとも 1 時間、1 2 時間、2 4 時間、2 日間または 4 日間、1 0 ~ 5 0 0 p p m の濃度で過酸化水素を持続放出する、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 1】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 9 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が、少なくとも 1 時間、1 2 時間、2 4 時間、2 日間または 4 日間、5 0 ~ 1 0 0 p p m の濃度で過酸化水素を持続放出する、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 2】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 9 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が、少なくとも 1 時間、1 2 時間、2 4 時間、2 日間または 4 日間、2 ~ 5 0 p p m の濃度で過酸化水素を持続放出する、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 3】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 9 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が、少なくとも 1 時間、1 2 時間、2 4 時間、2 日間または 4 日間、5 ~ 1 0 p p m の濃度で過酸化水素を持続放出する、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 4】

少なくとも 2 4 時間、2 m m o l / リットル未満の濃度で過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含む、請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 9 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 5】

少なくとも 2 4 時間、より好ましくは 4 8 時間、少なくとも 0 . 1、0 . 5、1 または 1 . 5 m m o l / リットルの過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含む、請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5 または 6 2 ~ 7 9 または 8 4 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 6】

少なくとも 1 時間、1 2 時間、2 4 時間、2 日間または 4 日間、1 0 ~ 5 0 0 p p m の濃度で過酸化水素を持続放出する、請求項 1 ~ 1 0 または 1 3 ~ 2 2 のいずれかに記載の繊維または創傷ドレッシング材。

【請求項 8 7】

少なくとも 1 時間、1 2 時間、2 4 時間、2 日間または 4 日間、5 0 ~ 1 0 0 p p m の

10

20

30

40

50

濃度で過酸化水素を持続放出する、請求項 1 ~ 10 または 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維または創傷ドレッシング材。

【請求項 88】

少なくとも 1 時間、12 時間、24 時間、2 日間または 4 日間、2 ~ 50 ppm の濃度で過酸化水素を持続放出する、請求項 1 ~ 10 または 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維または創傷ドレッシング材。

【請求項 89】

少なくとも 1 時間、12 時間、24 時間、2 日間または 4 日間、5 ~ 10 ppm の濃度で過酸化水素を持続放出する、請求項 1 ~ 10 または 13 ~ 22 のいずれかに記載の繊維または創傷ドレッシング材。

10

【請求項 90】

請求項 11 ~ 22、53 ~ 55 または 62 ~ 89 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が非水性溶媒を含む、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 91】

i) 前記非水性溶媒が 1 種より多くの非水性溶媒の混合物を含むか、または ii) 前記非水性溶媒が 1 種の非水溶性溶媒のみを含む、請求項 90 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 92】

前記非水性溶媒が、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコール及びプロピレングリコールからなる群から選択されるか、または前記非水性溶媒が、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコール及びプロピレングリコールからなる群から選択される 1 種より多くの非水性溶媒を含む、請求項 90 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

20

【請求項 93】

前記非水性溶媒がグリセロールである、請求項 90 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 94】

前記非水性溶媒が、前記組成物の少なくとも 5 重量%である、請求項 90 ~ 93 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

30

【請求項 95】

前記非水性溶媒が、前記組成物の少なくとも 10 重量%である、請求項 90 ~ 93 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 96】

前記非水性溶媒が、前記組成物の少なくとも 20 重量%である、請求項 90 ~ 93 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 97】

前記非水性溶媒が、前記組成物の少なくとも 50 重量%である、請求項 90 ~ 93 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

40

【請求項 98】

前記非水性溶媒が、前記組成物の少なくとも 75 重量%である、請求項 90 ~ 93 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 99】

前記非水性溶媒が、前記組成物の 50 重量%または 50 重量%未満である、請求項 90 ~ 96 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 100】

前記非水性溶媒が、前記組成物の 1 ~ 50 重量%である、請求項 90 ~ 96 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 101】

前記非水性溶媒が、前記組成物の 50 ~ 90 重量%である、請求項 90 ~ 97 のいずれ

50

かに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 2】

前記組成物または混合物の前記物質が蜂蜜であるか、または蜂蜜を含む、請求項 9 0 ~ 1 0 1 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 3】

前記組成物または混合物の前記物質が蜂蜜であり、前記蜂蜜が少なくとも 2 5 重量 % の量で存在する、請求項 9 0 ~ 1 0 1 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 4】

前記組成物または混合物の前記物質が蜂蜜であり、前記蜂蜜が少なくとも 5 0 重量 % の量で存在する、請求項 9 0 ~ 9 7、または 9 9 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 5】

前記組成物または混合物の前記物質が蜂蜜であり、前記蜂蜜が少なくとも 7 5 重量 % の量で存在する、請求項 9 0 ~ 9 7、または 9 9 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 6】

前記組成物または混合物の前記物質が蜂蜜であり、前記蜂蜜が 1 ~ 5 0 重量 % の量で存在する、請求項 9 0 ~ 9 7、または 9 9 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 7】

前記組成物または混合物の前記物質が蜂蜜であり、前記蜂蜜が 5 0 ~ 9 0 重量 % の量で存在する、請求項 9 0 ~ 9 7、または 9 9 ~ 1 0 0 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 8】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5、6 2 ~ 7 0、または 8 0 ~ 8 9 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が非水性溶媒と水とを含み、前記水が前記物質中に存在し得る任意の水に添加される、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 0 9】

i) 前記非水性溶媒が 1 種より多くの非水性溶媒の混合物を含むか、または i i) 前記非水性溶媒が 1 種の非水性溶媒のみを含む、請求項 1 0 8 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 0】

請求項 1 1 ~ 2 2、5 3 ~ 5 5、6 2 ~ 7 9、または 8 0 ~ 8 9 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物が湿潤剤と水とを含み、前記水が前記物質中に存在し得る任意の水に添加され、前記湿潤剤が前記物質中に存在し得るいずれかの湿潤剤に添加される、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 1】

i) 前記湿潤剤が 1 種より多くの湿潤剤の混合物を含むか、または i i) 前記湿潤剤が 1 種の湿潤剤のみを含む、請求項 1 1 0 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 2】

前記非水性溶媒もしくは湿潤剤が、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコール及びプロピレングリコールからなる群から選択されるか、または前記非水性溶媒もしくは湿潤剤が、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコール及びプロピレングリコールからなる群から選択される 1 種より多くの種類の非水性溶媒もしくは湿潤剤を含む、請求項 1 0 8 または 1 1 0 に記載の組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 3】

前記非水性溶媒または湿潤剤がグリセロールである、請求項 1 1 2 に記載の組成物また

10

20

30

40

50

は創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 4】

請求項 1 0 8 ~ 1 1 3 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物に添加される水の量が、少なくとも 5 重量%、少なくとも 1 0 重量%、少なくとも 1 5 重量%または少なくとも 2 0 重量%である、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 5】

請求項 1 0 8 ~ 1 1 4 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物に添加される水の量が、5 0 重量%もしくは 5 0 重量%未満、または 4 0 重量%もしくは 4 0 重量%未満である、前記組成物または創傷ドレッシング材。

10

【請求項 1 1 6】

請求項 1 0 8 ~ 1 1 3 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物に添加される水の量が、5 ~ 5 0 重量%、5 ~ 3 0 重量%、1 5 ~ 5 0 重量%、または 2 0 ~ 4 0 重量%である、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 7】

請求項 1 0 8 ~ 1 1 3 のいずれかに記載の組成物または創傷ドレッシング材であって、前記組成物中の水の総量が、少なくとも 1 5 重量%、または少なくとも 2 0 重量%である、前記組成物または創傷ドレッシング材。

【請求項 1 1 8】

請求項 1 0 8 ~ 1 1 3、または 1 1 7 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物中の水の総量が、5 0 重量%もしくは 5 0 重量%未満、または 4 0 重量%もしくは 4 0 重量%未満である、前記組成物。

20

【請求項 1 1 9】

請求項 1 0 8 ~ 1 1 3 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物中の水の総量が、1 5 ~ 5 0 重量%、または 2 0 ~ 4 0 重量%である、前記組成物。

【請求項 1 2 0】

請求項 1 0 8 ~ 1 1 3 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物の水分活性が 0 . 6 未満、好ましくは 0 . 5 未満である、前記組成物。

【請求項 1 2 1】

請求項 1 0 8 ~ 1 2 0 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物中の前記湿潤剤または非水性溶媒の量が少なくとも 3 0 重量%である、前記組成物。

30

【請求項 1 2 2】

請求項 1 0 8 ~ 1 2 1 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物中の前記湿潤剤または非水性溶媒の量が少なくとも 4 0 重量%である、前記組成物。

【請求項 1 2 3】

請求項 1 0 8 ~ 1 2 2 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物中の前記湿潤剤または非水性溶媒の量が 7 5 重量%または 7 5 重量%未満である、前記組成物。

【請求項 1 2 4】

請求項 1 0 8 ~ 1 2 3 のいずれかに記載の組成物であって、前記組成物中の前記湿潤剤または非水性溶媒の量が 6 0 重量%または 6 0 重量%未満である、前記組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、抗微生物活性を生じさせる繊維、創傷ドレッシング材及び組成物、ならびにその使用、特に創傷治癒のための使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

蜂蜜は古代より微生物感染の治療に使用されてきた。近年、特に創傷治癒領域において蜂蜜の治療有効性への関心が再燃している。蜂蜜は、創傷感染する一般的な微生物、例えば *Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus a*

50

ureus、Candida albicans及びEscherichia coliなどに対して有効であり、また細菌の抗生物質耐性菌株に対して有効である効果的な広域抗微生物剤であることが臨床試験により明らかになっている。天然物である蜂蜜はまた、薬物による治療に代わる魅力的な選択肢を与える。

【0003】

様々な種類の蜂蜜が抗微生物活性を有している。この活性は主にオスモル濃度、pH、過酸化水素生成、及び植物化学成分の存在に起因する。マヌカツリー(Leptospermum scoparium)由来のマヌカ蜂蜜は、この種の蜂蜜に高レベルの抗微生物性植物化学活性が存在することから、他の大部分の蜂蜜と比較して優れた抗微生物活性を有することが認められている。しかしながら、マヌカ蜂蜜は供給量が比較的限られており、世界規模の市場の需要を満たすことができない。

10

【0004】

その抗微生物作用に加えて、蜂蜜の他のいくつかの活性は創傷治癒、特に慢性創傷の治癒を助けると考えられている。特に蜂蜜は創傷を自己融解的にデブリードマンし、消臭する能力を有する。デブリードマンとは、残存する健常組織の治癒可能性を向上させるために、死滅、損傷または感染した組織を除去することである。蜂蜜はまた、抗炎症特性を有し、組織成長を刺激することが可能であり、また痛みを緩和し、瘢痕を最小限に抑えることが報告されている。

【0005】

蜂蜜を主成分とする創傷ケアドレッシング材がいくつか市販されている。これらの多くは、マヌカ蜂蜜、または高レベルの非過酸化物抗微生物活性を有する他の蜂蜜を使用しているが、これは、酸性度、カタラーゼ活性、及び創傷滲出液中に存在するタンパク質消化酵素が、過酸化水素の抗微生物効果を低減させることができるためである。

20

【0006】

現在市販されている蜂蜜を主成分とするドレッシング材としては、Comvita/Derma Sciencesによって製造されている、マヌカ蜂蜜を含有するMedihoneyの製品群、及びAdvancisによって製造されている、無添加の純粹マヌカ蜂蜜であるActivonが挙げられる。他の蜂蜜を主成分とするドレッシング材は、蜂蜜及び1種以上の添加成分を含有する。こうした製品としては、SanoMed製の抗微生物創傷ゲルであるMelladerm Plusが挙げられる。このゲルは、天然高濃度のグルコースオキシダーゼ及びフェノール分(蜂蜜中の主な植物化学成分はフェノール化合物である)を有する、ブルガリアの多種花の山岳地方産の蜂蜜を含有している。加工中、この蜂蜜は加熱または放射線照射を行わないが、これは加熱または放射線照射が蜂蜜の治癒特性、特にグルコースオキシダーゼによる過酸化水素の生成を破壊すると考えられるためである。それに代わり、この蜂蜜は、WO2008/049578に記載されている、耐オゾン容器中の液体蜂蜜にバブリングさせたオゾンガスを通すオゾン処理方法を使用して殺菌する。しかしながら、オゾンは、米国食品医薬品局(FDA)により、再使用可能な医療機器用の殺菌剤としてのみ承認されているため、現在のところ創傷治癒に使用される蜂蜜を主成分とする製品の殺菌は米国FDAにより認可されていない。

30

【0007】

Mesitran系列は、更なる濃縮蜂蜜による創傷ケア用品系列である。Triticumによって製造されているL-Mesitran軟膏は、48%の医療等級蜂蜜、ならびにラノリン、ヒマワリ油、タラ肝油、マリーゴールド、アロエベラ、ビタミンC、ビタミンE、及び酸化亜鉛を含む、いくつかの他の成分を含有する。

40

【0008】

蜂蜜間の抗微生物力には、蜂蜜の地理的、季節的、及び植物学的な起源、ならびに収穫、加工及び貯蔵条件に応じて、100倍超の差が生じ得る。したがって、蜂蜜を主成分とするドレッシング材は、使用する蜂蜜の種類に応じて様々な抗微生物有効性を有する。Jenkins、Burton及びCooperが著した論文(「The determination of antimicrobial activity of thre

50

e honey impregnated wound dressings by challenge test with EMRSA-15」, Advanci s)によると、Activon、Medihoney、またはMesitran製品を含む蜂蜜を主成分とするドレッシング材はすべて、EMRSA-15に対して異なった有効性を有することがわかった。Activonを含浸させたドレッシング材は最も有効性が高く、次いでMedihoneyドレッシング材の有効性が高く、Mesitran製品はかなり効果の低かった。

【0009】

したがって、蜂蜜の抗微生物力の変動を低減し、抗微生物力の低い蜂蜜の抗微生物活性を改善する必要がある。また、高濃度の植物化学成分を有する蜂蜜の使用に依存しない効果的な蜂蜜を主成分とする創傷ケア用品を提供することが望まれている。また、オゾン処理による殺菌がなされていない効果的な蜂蜜を主成分とする創傷ケア用品を提供することも望まれている。

10

【0010】

蜂蜜を含まない、いくつかの他の抗菌創傷ケアドレッシング材が入手可能である。これには、ConvatecのAquacel(登録商標)Agドレッシング材などの銀含有ドレッシング材が挙げられ、このドレッシング材は創傷滲出液がドレッシング材に吸収されたときに銀イオンを制御された方法で放出する。しかしながら、Staphylococcus aureus、Pseudomonas aeruginosa、及びPseudomonas enterococciなどの銀耐性微生物が報告されており、創傷治癒を遅らせる原因となる場合がある。

20

【0011】

ポビドンヨード(PVP-I)は、ポリビニルピロリドン(ポビドン、PVP)とヨウ素元素との安定的な化学錯体である。これは、創傷感染の治療及び予防における局所塗布用の広域消毒剤である。細菌はPVP-Iに対する耐性を発現しないことが実証されている。PVP-Iは1994年に小さい急性創傷の応急処置について米国FDAによる承認を取得している。しかしながら、その安全性と有効性をめぐる議論が一部にあり、褥瘡性潰瘍での使用は米国保健社会福祉省により推奨されなかった。

【0012】

クロルヘキシジンは広範囲の無孢子細菌に対して急速な殺菌活性を有する。Staphylococcus aureus、Pseudomonas aeruginosa及び一連の臨床分離株に対する抗微生物活性が報告されている。しかしながら、メチシリン耐性Staphylococcus aureus(MRSA)は、クロルヘキシジンへの耐性が認められている。また英国では、医薬品・医療製品規制庁(MHRA)が、クロルヘキシジンを含む医療機器及び医薬品の使用により生じるアナフィラキシー反応の危険性について患者への安全警告を発している。

30

したがって、無毒性で慢性創傷の治療に使用できる、広域活性を有する抗微生物創傷ケア用品を提供することも必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

40

【0013】

【非特許文献1】「The determination of antimicrobial activity of three honey impregnated wound dressings by challenge test with EMRSA-15」, Advanci s

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

出願人は、蜂蜜の抗微生物活性が天然の阻害因子と活性化因子との間の繊細な相互関係に依存すると認識し、種類及び収穫が異なる蜂蜜間の変動を低減して、蜂蜜の天然の抗微

50

生物活性を開放することができ、抗微生物力の劣る蜂蜜の抗微生物特性を改善できる組成物を開発した。出願人はまた、そのような組成物がガンマ照射曝露による殺菌後であっても、著しい創傷治癒特性を有することも見出した。そのような知見が他の天然物質への応用性も有すると出願人は理解している。

【0015】

出願人は、この組成物の抗微生物力を広範囲にわたり緻密に増強させ、制御できることを見出した。このことは、使用目的に最も適した抗微生物力をもつ組成物の提供を可能にする。

【0016】

創傷治癒の領域において、慢性創傷の治療は特に難題となる。慢性創傷とは、適時の一般的な治癒過程を経過しても期待通りに進行しない創傷のことである。慢性創傷は、3週を超えて存在する創傷、または秩序立った適時の過程を経て進行せず、解剖学的かつ機能的な完全性を生じることがないか、または持続的かつ機能的な結果を確立しないまま修復過程を経て進行しない創傷と定義されている (Lazarus et al, Arch Dermatol, 1994; 130(4): 489 - 493)。

10

【0017】

慢性創傷は、重大な健康問題である (Cowan et al, Ulcers 2013, Article ID 487024)。米国の慢性創傷の管理及び治療に関連する健康管理費は、毎年200億ドルを超えると報告されている。非治癒創傷の治療及び管理は難題である。従来、基本的な創傷ケアは、外科的デブリードマン、用手洗浄、保湿性ドレッシング材、ならびに局所及び/または全身性抗微生物療法から構成される。創傷治癒科学は飛躍的な進展を遂げたものの、慢性創傷及びそれに伴う合併症の有病率及び発生率は上昇し続けている。

20

【0018】

慢性創傷の細菌バイオフィルムの存在及び複雑性は、近年、非治癒創傷の重要な局面として認識されている。細菌バイオフィルムは、その多くが共存する多微生物性生物 (細菌、真菌、及び場合によりウイルス) の付着性コロニーである。このようなバイオフィルムコロニーは保護皮膜を形成し、コロニーを宿主防御から保護する。バイオフィルム特有のこの保護物質の性質は動的であり、その成分の生成は創傷床の敵対的環境 (例えば局所抗生物質の存在) によって誘発されると思われる。バイオフィルムは炎症細胞の治癒局面を阻害し、抗生物質 (局所用及び全身用) 及び他の療法に対抗し、細胞間の連通路 (クオラムセンシング) を始動させる生存及び防御機構を有しており、その機構が新たなバイオフィルムの成長を促進し、非治癒創傷を困難にしていることがわかっている。

30

【0019】

細菌バイオフィルムは、表面に付着するかまたは表層境界に形成される凝集細菌と特徴付けられ、自己分泌型の細胞外高分子物質 (EPS) 内に埋め込まれた複雑な共同体として構成される。この動的な細菌共同体は主に単一細菌種または真菌種からなる場合もあれば、より一般的には、連続的に変化する複数の多様な種を含む多微生物性でもあり得る。

【0020】

バイオフィルムは全て、その位置に関係なく、いくつかの共通した特徴を有する。このような特徴としては、共に細菌細胞を保持する細胞外高分子マトリックスの合成、ならびに自由生活性すなわち「浮遊性」の細胞が示す耐性と比較した、宿主防御及び抗微生物剤による殺傷に対する耐性の増加が挙げられる。バイオフィルムコロニー固有の防御性質により、バイオフィルムに関連した感染症の大部分は根絶が困難であるか、または不可能である。

40

【0021】

バイオフィルムの発達は、3つの異なった段階 (Kaplan, J Dent Res 89(3) 2010: 205 - 218)、すなわち、表面への細胞の付着、付着性バイオフィルムコロニーへと至る細胞成長、及びコロニーから周辺媒体への細胞の脱離に区分することができる。細菌細胞と表面間の初期の可逆的な相互作用は、非特異的リフシッ

50

- ファンデルワールス力、ルイス酸塩基、及び静電力を介在する。この一過性の付着は、細菌細胞表面、またはピリ線毛及びフィムブリエなどの細胞付属器に位置する宿主特異的な付着因子及び組織特異的付着因子によって補強される。その結果、細菌細胞が不可逆的に表面に付着する。

【 0 0 2 2 】

バイオフィルム発達の第2段階は、表面での細菌の繁殖、及び付随する細胞外高分子マトリックスの合成を伴う。マトリックスは細菌細胞を一塊にまとめて保持し、その細菌塊を支持構造の表面に確実に付着させる。高分子性のバイオフィルムマトリックス成分のいくつかの例として、グルカン多糖、タンパク質性のフィムブリエ及び細胞外二本鎖DNAが挙げられる。マトリックスはまた、バイオフィルムコロニーに構造的「足場」を提供することに加えて、拡散障壁として機能することにより、または抗微生物剤に直接結合してバイオフィルム細胞への抗微生物剤の接触を妨げることにより、バイオフィルムを介した抗微生物耐性にも寄与する。

10

【 0 0 2 3 】

表面での細菌細胞の持続的成長により、数百ミクロンにわたる周辺環境に向かって突出する、柱状及びキノコ状の塊に密集した数百万の細胞を含む成熟したバイオフィルムコロニーが発達する。この構造には、最初期の循環系として作用する流体で満たされた通路が点在しており、これにより栄養分及び老廃物のバルク液相との交換が可能となる。加えて、バイオフィルム細胞の塊は多くの場合、細胞がない区画された内部空間を含んでいる。このように、成熟したバイオフィルムコロニーは、複雑な高分化した構造である。pH、酸素濃度、栄養の供給性、及び細胞密度の点で異なる多数の微小環境が、バイオフィルムコロニー内に存在する。その結果、コロニーの異なる部分に位置する細胞間の代謝活性及び再生活性には、かなりの不均質性が生じている。コロニー内部に位置する代謝不活化細胞は、活発に増殖する細胞を標的とする抗微生物剤の作用に対する耐性があり得る。

20

【 0 0 2 4 】

バイオフィルムの発達の最終段階は、バイオフィルムコロニーからの細胞の脱落、及び環境へのその分散（「播種」）である。これは、生物分散、細菌の生存、及び疾患伝播に寄与する、バイオフィルムのライフサイクルに不可欠な段階である。バイオフィルムの発達の他の段階同様、分散は、多数の環境シグナル、シグナル伝達経路、及びエフェクターが関与する複雑な過程であり得る。細菌全てが単一のバイオフィルム分散機構を利用するわけではない。

30

【 0 0 2 5 】

バイオフィルムは、歯（プラーク）、心内膜、胃腸及び泌尿生殖器の粘膜、ならびに鼻上皮を含む様々な体表面のほか、整形外科補装具及び侵襲性カテーテルなどの異物に確認されている。

【 0 0 2 6 】

バイオフィルムが、慢性皮膚創傷の創傷治癒の阻害と深く関連していることが証拠から示唆されている。創傷のバイオフィルムは慢性炎症反応を誘発し、このためバイオフィルム周囲の好中球及びマクロファージが蓄積する。好中球及びマクロファージは、バイオフィルム及び周辺組織に影響を及ぼす高レベルの活性酸素種（ROS）を分泌する。炎症細胞はまた、バイオフィルムと影響を受けた組織との間の付着を分解して、バイオフィルムを組織から除去することに役立ち得る高レベルのプロテアーゼ（マトリックスメタロプロテアーゼ及びエラスターゼ）も分泌する。しかし、ROS及びプロテアーゼはまた、正常な周辺組織、タンパク質、免疫細胞、及び組織細胞に損傷を与えて回復を遅延させる能力を有する。

40

【 0 0 2 7 】

脆弱な組織の場合、患者の免疫系、抗生物質、またはデブリードマンによって殺傷される前に、浮遊性細菌を付着させて防御共同体を形成することによりバイオフィルムが形成される。免疫系を損なう、または抗生薬の効果を低減するいくつかの条件は、創傷内のバイオフィルムの発達及び拡散を助長する。このような条件としては、組織の局所貧血また

50

は壊死、栄養失調または低下、及びHIV、糖尿病、重度の物理的外傷、放射線治療、または免疫抑制薬による治療などの、身体の免疫機能を損なう共存症が挙げられる。

【0028】

バイオフィルムが用いる過程には、細菌が宿主細胞に付着して、タンパク質を注入し、宿主細胞経路を再編成することを可能にする分子機構が含まれることが示唆されている。いくつかの細菌種では、注入された細菌タンパク質が宿主細胞の細胞骨格を再編成し、遊走及び有糸分裂を防止して、アポトーシスを阻害する。細菌がバイオフィルムの形成を開始すると、その細菌の分子機構が他の細菌を誘引し、持続的な多微生物系を形成することができる。バイオフィルムコロニーは、多数の細菌種を表す拡大した多様な遺伝子プールを所有すると考えられている。バイオフィルムの長期的な生存は、バイオフィルムの遺伝的多様性と直接関連する場合が多く、このため治療不応性となる慢性感染症が生じる。細菌バイオフィルムの生存には、宿主に確実に付着するための遺伝子発現、排菌を防止して局所炎症を引き起こすための宿主の細胞老化、及びバイオフィルムコロニーの栄養となる創傷床中の血漿を生成する刺激が必要とされる。

10

【0029】

バイオフィルムを形成する能力を有する微生物は、バイオフィルムの集中及び組織化を誘導するクオラムセンシング分子も所有している。分子の分泌誘導及びバイオフィルム中のコロニーの組織化は、栄養素及び他の必須分子の有効性を最大化する一方で、老廃物の拮抗作用、競合物の毒素、及びバイオフィルム上の他の環境危険を最小化する。多微生物バイオフィルムは、経路を調節することができ、また双方向シグナル伝達も実行することができるクオラムセンシング分子を組み込む可能性が高い。バイオフィルム微生物は、多くのクオラムセンシング経路を感知し、それと連通する能力を有する。

20

【0030】

バイオフィルムは多数の防御を有しており、治療に対して耐性があり、抗生物質の効果を制限する。抗生物質及び消毒剤は単一細菌を極めて容易に死滅させるが、バイオフィルム壁は大部分の抗生物質及び消毒剤が、細菌、特に創傷マトリックスの中心部へ到達するのを阻止する。創傷バイオフィルムは、抗体、抗生物質、消毒剤、及び食作用性炎症細胞に対して耐性がある。

【0031】

したがって、特に慢性の皮膚創傷及び熱創傷などの慢性創傷において、バイオフィルムまたはバイオフィルムを形成可能な微生物を含む微生物感染を予防及び治療するための効果的な療法を提供する必要がある。

30

【0032】

創傷治療において、創傷ドレッシング材は、創傷の保護に使用でき、かつ創傷を治療するための抗微生物物質などの活性物質の供給源を提供することができる。エレクトロスピニング法によって製造されたナノファイバーなどの繊維を含有する創傷ドレッシング材は、その高表面積、極小孔径を有する高多孔性、薬剤または他の活性分子を繊維にロードする能力によって、特に有利であり得る。ナノファイバーと活性物質とを含む創傷ドレッシング材の例、ならびにその製造方法は、WO2008/049251及びWO2011/059497に記載されている。

40

【0033】

出願人は、創傷治癒及び感染予防などの用途における過酸化水素などの活性酸素種の有益な効果を認識している。特に出願人は、長期間にわたり活性酸素種を生成する利点を認識している。出願人はエレクトロスピニング繊維などの繊維を含有するドレッシング材を製造した。これは活性酸素種を生成することができ、それによって創傷の簡便かつ効果的な治療を提供することができる。

【0034】

広義には、本発明は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、その酵素に対する基質を含む物質とを含む繊維に関する。この酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、物質に存在し得る任意の酵素活性（本明細書で「基質変換活性

50

【図18-3】種々の試験微生物：(a) *Staphylococcus aureus* ; (b) メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) ; (c) *E. coli* ; (d) バンコマイシン耐性 *enterococcus* (VRE) ; (e) *Pseudomonas aeruginosa* ; (f) *Klebsiella* ; (g) *E. coli* ESBL ; (h) *Enterococcus faecalis* に対する Surgihoney 1 (S1)、Surgihoney 3 (S3)、及び Me

d i h o n e y (M H) の時間殺菌曲線を示す。

【図 19】S 1 及び S 2 S u r g i h o n e y の抗ウイルス活性を試験したブランクアッセイの結果を示す。

【図 20】褥瘡の治療に S 1 S u r g i h o n e y を使用した結果の写真を示す。(a) は治療 1 日目を示し、(b) は治療 30 日目を示す。

【図 21】S u r g i h o n e y ならびに 2 種の変性プロトタイプ P T 1 及び P T 2 における、異なる過酸化水素生成速度を示す。

【図 22】変性ハチミツ S u r g i h o n e y 、 P T 1 及び P T 2 におけるフェノール活性と最大過酸化水素活性の関係を示す。

【図 23 - 1】P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 によるバイオフィルムの形成に対する、(A) 原液の S 1 S u r g i h o n e y 、または (B) 段階希釈した S 1 S u r g i h o n e y の効果、ならびに A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) によるバイオフィルムの形成に対する、(C) 原液の S 1 S u r g i h o n e y または (D) 段階希釈した S 1 S u r g i h o n e y の効果を示す。

10

【図 23 - 2】P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 によるバイオフィルムの形成に対する、(A) 原液の S 1 S u r g i h o n e y 、または (B) 段階希釈した S 1 S u r g i h o n e y の効果、ならびに A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) によるバイオフィルムの形成に対する、(C) 原液の S 1 S u r g i h o n e y または (D) 段階希釈した S 1 S u r g i h o n e y の効果を示す。

20

【図 24 - 1】(A) P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 、または (B) A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) によるバイオフィルムの形成に対する、原液のマヌカ蜂蜜の効果、ならびに (C) P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 (図 2 (C) の上段) 、または A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) (図 2 (C) の下段) によるバイオフィルムの形成に対する段階希釈したマヌカ蜂蜜の効果を示す。

30

【図 24 - 2】(A) P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 、または (B) A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) によるバイオフィルムの形成に対する、原液のマヌカ蜂蜜の効果、ならびに (C) P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 (図 2 (C) の上段) 、または A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) (図 2 (C) の下段) によるバイオフィルムの形成に対する段階希釈したマヌカ蜂蜜の効果を示す。

【図 25 - 1】(A) P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 、ならびに (B) A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) によるバイオフィルムの形成に対する、原液及び段階希釈した S 1 、 S 2 、及び S 3 S u r g i h o n e y の効果を示す。

40

【図 25 - 2】(A) P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 株 P A 0 1 及び臨床熱創傷分離株 1 0 5 4 、ならびに (B) A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i 対照株 A Y E 及び A C I クローン N C T C _ 1 3 4 2 0 (C 5 9) によるバイオフィルムの形成に対する、原液及び段階希釈した S 1 、 S 2 、及び S 3 S u r g i h o n e y の効果を示す。

【図 26】P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a (P S _ 1 5 8 6) のバイオ

50

フィルム産生分離株によるバイオフィルムの形成に対する *Surghoney* 調製物 S1、S2、及び S3、ならびにマヌカ蜂蜜 (MH) の効果を示す。

【図27】 *Pseudomonas aeruginosa* (PA_6749) のバイオフィルム産生分離株によるバイオフィルムの形成に対する *Surghoney* 調製物 S1、S2、及び S3、ならびにマヌカ蜂蜜 (MH) の効果を示す。

【図28】 *Acinetobacter baumannii* (ACI_19606) のバイオフィルム産生分離株によるバイオフィルムの形成に対する *Surghoney* 調製物 S1、S2、及び S3、ならびにマヌカ蜂蜜 (MH) の効果を示す。

【図29】 *Acinetobacter baumannii* (ACI_C60) のバイオフィルム産生分離株によるバイオフィルムの形成に対する *Surghoney* 調製物 S1、S2、及び S3、ならびにマヌカ蜂蜜 (MH) の効果を示す。

【図30】 *Acinetobacter baumannii* (ACI_C59) により産生された事前形成したバイオフィルムの播種の防止または低減に対する *Surghoney* 調製物 S1、S2、及び S3、ならびにマヌカ蜂蜜 (MH) の効果を示す。

【図31】 *Acinetobacter baumannii* (ACI_AYE) により産生された事前形成したバイオフィルムの播種の防止または低減に対する *Surghoney* 調製物 S1、S2、及び S3、ならびにマヌカ蜂蜜 (MH) の効果を示す。

【図32】不活性 *Surghoney* (DE)、マヌカ蜂蜜 (MH:「Comvita Manukacare 18+」)、酢酸 (AA)、ならびに複数の市販の創傷ドレッシング材及び創傷クリームと比較した、*Pseudomonas aeruginosa* (対照株 PA01) によるバイオフィルム形成の防止に対する *Surghoney* S1、S2、及び S3 調製物の効果を示す。

【図33】不活性 *Surghoney* (DE)、マヌカ蜂蜜 (MH:「Comvita Manukacare 18+」)、酢酸 (AA)、ならびに複数の市販の創傷ドレッシング材及び創傷クリームと比較した、*Acinetobacter baumannii* (対照株 AYE) によるバイオフィルム形成の防止に対する *Surghoney* S1、S2、及び S3 調製物の効果を示す。

【図34】対照エレクトロスピニングドレッシング材 (各栄養寒天プレート of the left) と比較した、*Escherichia coli* に対する *Surghoney* 含有エレクトロスピニングドレッシング材 (各栄養寒天プレート of the right) の活性を示す。

【図35】対照エレクトロスピニングドレッシング材 (各栄養寒天プレート of the left) と比較した、*Staphylococcus aureus* に対する *Surghoney* 含有エレクトロスピニングドレッシング材 (各栄養寒天プレート of the right) の活性を示す。

【図36】エレクトロスピニングした *Surghoney* ドレッシング材 (左側) 及びエレクトロスピニングした対照ドレッシング材 (右側) を示す。過酸化水素試験キットにより、エレクトロスピニングした *Surghoney* ドレッシング材の過酸化水素の生成能力を確認した。

【図37】 *Surghoney* の細胞毒性活性に関するアッセイの結果を示す。

【図38】 *Surghoney* の乾燥顆粒、及び水に溶解させて溶液を形成した乾燥 *Surghoney* による過酸化水素の生成を示す。

【図39】図38の *Surghoney* 溶液による、様々な期間 (最大4日) 経過後の過酸化水素の生成を示す。

【図40】濃度の異なる *Surghoney* の S1、S2 及び S3 調製物とともに3、6 及び 24 時間培養した HMC-1 マスト細胞の生存性に対する効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質とを含み、当該酵素は過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得るいずれかの酵素活性に付加される繊維を提供する。

10

20

30

40

50

【0037】

いくつかの実施形態では、繊維は酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含まない。本繊維は特に、使用前に繊維を長期間保存することが望ましい場合に有用であり得る。繊維は貯蔵安定性のある繊維であり得る。他の実施形態では、繊維は酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含む。

【0038】

場合により物質はカタラーゼ活性を含まない。いくつかの実施形態では、物質は未精製の天然物質、例えば蜂蜜である。

【0039】

本発明によれば、本発明の1種以上の繊維を含む創傷ドレッシング材も提供する。

10

【0040】

好ましくは、創傷ドレッシング材は繊維質もしくはナノファイバー質のマットであるか、またはそれを含む。創傷ドレッシング材は、織布繊維を含むことができる。いくつかの実施形態では、このドレッシング材は繊維を適用する基材を含み得る。好適な基材としては、ガーゼ、包帯、ティッシュペーパー、フィルム、ゲル、フォーム、親水コロイド、アルギネート（AMSアルギネートフォームまたはスパンボンドアルギネートドレッシング材など）、ヒドロゲル、または多糖類のペースト剤、顆粒、ビーズを含み得る。基材はホイル、ポリプロピレンまたはCyrax（登録商標）であってもよい。創傷ドレッシング材は、コラーゲンまたはコラーゲン-グリコサミノグリカンのマトリックスを含んでもよい。

20

【0041】

いくつかの実施形態では、ドレッシング材は本発明の1種以上の繊維のみを含むことができる。したがって、いくつかの実施形態では、ドレッシング材は繊維を適用する基材を含まなくてもよい。

【0042】

本発明によれば、本発明の1種以上の繊維を含む繊維質マットも提供する。好ましくは、該繊維または各繊維は織布である。

【0043】

好ましくは、繊維はナノファイバーである。本明細書で使用する用語「ナノファイバー」は、1000ナノメートル（nm）以下の直径を有する繊維を指す。ただし、繊維はマイクロファイバーであり得る。繊維は、1ミリメートル以下、500マイクロメートル（ μm ）以下、50 μm 以下または10 μm 以下の直径を有してもよい。いくつかの実施形態では、繊維は100nm以下の直径を有してもよい。

30

【0044】

好ましい実施形態では、繊維はエレクトロスピンニング繊維である。これは、繊維がエレクトロスピンニング法によって得られる、または形成されることを意味する。

【0045】

通常、エレクトロスピンニングは、高圧電源、紡糸口（例えば金属針）、及びコレクター（例えば接地した導体）の主に3つの構成要素を有する装置を使用して実施される。紡糸口は、エレクトロスピンニング可能な組成物を含んでいるシリンジと接続されている。シリンジポンプを用いて、一定の制御可能な速度で紡糸口から組成物を供給することができる。組成物に高電圧が印加されると、紡糸口のノズルに位置する組成物の液滴に高電流が流れ、誘導電荷が表面全体に均一に分布する。その結果、液滴は、表面電荷間の静電反発力及び外部の電界が及ぼすクーロン力という、主に2種類の静電力を受ける。これらの静電相互作用の作用下で、液滴はテイラーコーンへと変形する。電界強度が閾値を超えると、静電力が組成物の表面張力に勝り、その結果、ノズルから強制的にジェットを噴射することができる。この帯電ジェットに延伸及びホイッピング工程を施し、長く薄い糸を形成する。引き続き組成物を延伸して乾燥させると、その直径を数百マイクロメートルから、数十ナノメートル程度の小ささへと大幅に減少させることができる。一般的な構成では、印加電圧は30kV、紡糸口とコレクターとの間の距離は20cm、溶液の流速は1mL/

40

50

時である。しかしながら、結果を最適化する、または生成される繊維の特性を変化させるために、これらのパラメータを変更できることは言うまでもない。また、当然ながら上記の一般的な装置の変形型または改変型を使用して、エレクトロスピンニングを行うこともできる。例えば、様々な種類のエレクトロスピンニング装置、例えば、*Spray base* (登録商標) 及び *El Marco Nano Spider* (商標) が利用可能である。

【0046】

本発明の好ましい実施形態によれば、繊維または創傷ドレッシング材は殺菌されている。殺菌は、任意の好適な手段によって行うことができる。出願人は、本発明の繊維またはドレッシング材の形成に適した組成物が、ガンマ照射曝露による殺菌後に、グルコースオキシダーゼ活性 (及びそれによって過酸化水素を放出する能力) を保持していることを見出した。したがって繊維または創傷ドレッシング材は、ガンマ照射曝露によって殺菌されていることが好ましい。ガンマ照射の好適なレベルは、 $10 \sim 70 \text{ kGy}$ 、好ましくは $25 \sim 70 \text{ kGy}$ 、より好ましくは $35 \sim 70 \text{ kGy}$ である。

【0047】

本発明によれば、本発明の繊維または創傷ドレッシング材を殺菌する方法も提供される。これにはガンマ照射曝露が含まれる。

【0048】

有利には、過酸化水素を繊維またはドレッシング材から長期間にわたり放出することができる。これは、存在する基質の量、または酵素の量もしくは活性に依存し得る。当然ながら、水との接触後、短期間に比較的高レベルの過酸化水素を放出させるか、または長期間にわたり低濃度の過酸化水素を放出させるように、基質の量及び/または酵素の量もしくは活性を選択することができる。繊維またはドレッシング材は、少なくとも24時間、より好ましくは少なくとも48時間、過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含み得る。好ましくは少なくとも24時間、 2 mmol/l リットル未満の濃度で過酸化水素を持続放出する。

【0049】

酵素が基質を変換するのに十分な自由水を繊維またはドレッシング材が含有しない場合、繊維またはドレッシング材が水と接触した (または混合された) ときに過酸化水素の放出を発生させることができる。したがって、この繊維またはドレッシング材は、酵素が基質を変換するのに十分な水との接触後から、少なくとも24時間、より好ましくは少なくとも48時間、過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含み得る。好ましくは、酵素が基質を変換するのに十分な水との接触後から、少なくとも24時間、 2 mmol/l リットル未満の濃度で過酸化水素を持続放出する。

【0050】

他の実施形態では、繊維またはドレッシング材は、少なくとも24時間、より好ましくは48時間、少なくとも 0.1 、 0.5 、 1 または 1.5 mmol/l リットルの過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含み得る。

【0051】

本発明はまた、エレクトロスピンニング可能な組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質とを含み、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される組成物を提供する。

【0052】

本発明によれば、本発明のエレクトロスピンニング可能な組成物のエレクトロスピンニングを含む、繊維の製造方法も提供する。

【0053】

好ましくは、エレクトロスピンニング可能な組成物は溶液である。溶液の溶媒は水であっても、水を含んでいてもよい。溶媒には、水性溶媒及び/または非水性溶媒 (例えば有機溶媒) を含み得る。

【0054】

10

20

30

40

50

繊維またはエレクトロスピンニング可能な組成物は、1種以上のエレクトロスピンニング可能な成分を含み得る。本発明によれば、繊維またはドレッシング材の形成を容易にする、任意のエレクトロスピンニング可能な成分も好適であり得る。好ましくは、1種以上のエレクトロスピンニング可能な成分はエレクトロスピンニング可能なポリマーである。いくつかの実施形態では、ポリマーは合成ポリマーであってよい。いくつかの実施形態では、ポリマーは天然ポリマーである。いくつかの実施形態では、エレクトロスピンニング可能なポリマーは、ポリエチレンオキシド、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンから選択される。他のポリマーには、ポリカプロラクトンまたはホスフィノ-カルボン酸（PCA）を含み得る。

【0055】

10

エレクトロスピンニング可能な成分は生体適合性であることが好ましい。場合により、エレクトロスピンニング可能な成分は水溶性である。エレクトロスピンニング可能な成分は、有機溶媒、すなわち非水性溶媒に可溶性であってもよい。エレクトロスピンニング可能な成分は、水性溶媒と非水性溶媒の混合物に可溶性であってもよい。好適な非水性溶媒は、グリセロール、ジメチルスルホキシド、エチレングリコールまたはプロピレングリコールであり得るか、またはそれらを含み得る。

【0056】

エレクトロスピンニング可能な組成物は、最大50重量%、25重量%、10重量%または5重量%のエレクトロスピンニング可能な成分を含み得る。場合により、エレクトロスピンニング可能な成分は、組成物の1～50重量%であり得る。エレクトロスピンニング可能な組成物は、最大30重量%、20重量%または10重量%の未精製の天然物質を含み得る。

20

【0057】

エレクトロスピンニング可能な組成物は、ポリマー溶液と未精製の天然物質を混合することにより形成することができる。例えば、ポリマー溶液は、最大50重量%、25重量%、10重量%または5重量%のエレクトロスピンニング可能なポリマーを含み得る。エレクトロスピンニング可能な組成物は、ポリマー溶液と未精製の天然物質を、90%：10%～60%：40%（ポリマー溶液：未精製の天然物質）の重量比で混合することにより形成することができる。例えば、エレクトロスピンニング可能な組成物は、80重量%のポリマー溶液と20重量%の未精製の天然物質との混合物から形成することができる。

30

【0058】

当然ながら、繊維の特性を変化させるため、エレクトロスピンニング可能な成分、未精製の天然物質及び溶媒の相対量を変更することができる。

【0059】

エレクトロスピンニング可能な組成物から形成された繊維は、最大80重量%の未精製の天然物質を含み得る。繊維は、20重量%以上のエレクトロスピンニング可能な成分を含み得る。

【0060】

本発明によれば、本発明による繊維またはドレッシング材の製造において、抗微生物活性を生じさせる組成物の使用を提供し、当該組成物は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、その酵素に対する基質を含む物質とを含み、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される。好ましくは、組成物は貯蔵安定性のある組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含まない。場合により、物質はカタラーゼ活性を含まない。酵素は精製酵素であってもよい。好ましくは、物質は未精製の天然物質である。

40

【0061】

本発明は、酵素が未精製の天然物質中の基質を変換して、過酸化水素を放出するのに十分な水と、本発明の繊維を接触させることを含む、抗微生物組成物の製造方法を提供することができる。本発明はまた、この方法によって得た、または得られる抗微生物組成物も

50

提供する。

【 0 0 6 2 】

好ましくは、抗微生物組成物は溶液である。例えば、繊維またはドレッシング材は、溶媒との接触時に溶解することができる。抗微生物組成物は懸濁液であってよい。抗微生物組成物は、繊維または創傷ドレッシング材を創傷に適用することにより形成することができる。いくつかの実施形態では、酵素が未精製の天然物質中の基質を変換して過酸化水素を放出するのに十分な水を、創傷滲出液が提供してもよい。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、本発明の繊維は、最初に繊維を（例えばポリマーを含有する溶液のエレクトロスピニングにより）形成し、次いで繊維を組成物でコーティングすることで形成してもよく、当該組成物は過酸化水素を放出できるように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質とを含む。コーティングは、エレクトロスプレーなどの方法によって、または組成物中に浸漬することによって達成することができる。コーティングにより、酵素及び基質を含む組成物のエレクトロスピニングの必要性をなくすることができる。

10

【 0 0 6 4 】

本発明は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質とを含む、抗微生物活性を生じさせる組成物を包含する。

【 0 0 6 5 】

組成物はポリマーを含み得る。

20

【 0 0 6 6 】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、ポリマーとを含む組成物を提供する。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、物質は酵素に対する精製基質を含む。

【 0 0 6 8 】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する精製基質を含む物質とを含む組成物を提供する。

【 0 0 6 9 】

本発明によれば、抗微生物活性を生じさせる組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する精製基質を含む物質と、ポリマーとを含む組成物を提供する。

30

【 0 0 7 0 】

組成物の酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、物質に存在し得るいずれかの酵素活性（本明細書で「基質変換活性」と呼ぶ）に付加される（すなわち人間の介入の結果として追加される）。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、組成物は未精製の天然物質を含まない。しかしながら、いくつかの実施形態では、酵素に対する基質を含む物質には未精製の天然物質を含み得る。

【 0 0 7 2 】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質であって、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得るいずれかの酵素活性に付加される、天然物質と、ポリマーと、を含む組成物を提供する。

40

【 0 0 7 3 】

本組成物は、エレクトロスピニング可能な組成物であり得る。代わりにまたは加えて、組成物は噴霧可能なまたは霧状化可能な組成物であってもよい。例えば、組成物は噴霧または霧状化できる流動特性を有し得る。いくつかの実施形態では、組成物はエレクトロスピニング可能な組成物ではない。

【 0 0 7 4 】

50

組成物は注入可能な組成物であってもよい。例えば、組成物はシリンジによる塗布ができる流動特性を有し得る。

【0075】

組成物にポリマーを添加しない場合、蜂蜜などの未精製の天然物質は、効果的な噴霧または注入を可能にするのに必要な流動特性を有しない場合がある。例えば、未精製の天然物質は粘性が強すぎる場合がある。

【0076】

組成物中のポリマーは、任意の医学的に許容されるポリマー、例えば食品医薬品局認可（FDA認可）のポリマーであり得る。

【0077】

いくつかの実施形態では、ポリマーは合成ポリマーであり得る。いくつかの実施形態では、ポリマーは天然ポリマーである。

【0078】

場合により、ポリマーは水溶性である。ポリマーは、有機溶媒、すなわち非水性溶媒に可溶性であってもよい。ポリマーは、水性溶媒と非水性溶媒の混合物に可溶性であってもよい。ポリマーは生分解性（biodegradable）、または生崩壊性（bioerodable）であってもよい。ポリマーはコポリマーであってもよい。

【0079】

いくつかの実施形態では、ポリマーは、ポリエチレンオキシド（またはポリエチレングリコール）、ポリビニルアルコール及びポリビニルピロリドンから選択される。

【0080】

他のポリマーとして、乳酸-グリコール酸共重合体、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、ポリカプロラクトンまたは高分子界面活性剤を含み得る。別の好適なポリマーはホスフィノ-カルボン酸（PCA）であり得る。

【0081】

更なるポリマーとして、セルロース（ヒドロキシプロピルメチルセルロース及びヒドロキシプロピルセルロースといった誘導体を含む）などの多糖、アルギネート、ゼラチンまたはシクロデキストリンを含み得る。好適なポリマーにはまた、キトサンまたはヒアルロン酸を含み得る。

【0082】

組成物は、最大50重量%、25重量%、10重量%または5重量%のポリマーを含み得る。例えば、組成物は0.5~3重量%のポリマーを含み得る。場合により、ポリマーは組成物の0.5~50重量%であり得る。組成物は、最大30重量%、20重量%または10重量%の未精製の天然物質を含み得る。

【0083】

組成物は、ポリマー溶液と物質（未精製の天然物質または精製基質を含む物質であり得る）とを混合することにより形成することができる。例えば、ポリマー溶液は、最大50重量%、25重量%、10重量%または5重量%のポリマーを含み得る。組成物は、ポリマー溶液と物質（未精製の天然物質または精製基質を含む物質であり得る）を、90%：10%~60%：40%（ポリマー溶液：物質）の重量比で混合することにより形成することができる。例えば、組成物は、80重量%のポリマー溶液と20重量%の物質との混合物から形成することができる。

【0084】

好ましくは、組成物は貯蔵安定性のある組成物である。いくつかの実施形態では、組成物は酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含まない。いくつかの実施形態では、組成物は酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含み得る。

【0085】

組成物に存在する基質の量、及び酵素の活性に応じて、持続した期間、過酸化水素を放出することができる。過酸化水素の放出は、組成物の希釈によって発生するかまたは開始されてもよい。当然ながら、短期間に比較的高レベルの過酸化水素を放出させるか、また

10

20

30

40

50

は長期間にわたり低濃度の過酸化水素を放出させるように、組成物中の基質の量及び／または酵素の活性を選択することができる。好適には、組成物は、好ましくは組成物の希釈後、少なくとも24時間、より好ましくは少なくとも48時間、過酸化水素を持続放出する。好適には、本発明の組成物は、好ましくは組成物の希釈後、少なくとも24時間（または少なくとも48時間）、2 mmol / リットル未満の濃度で過酸化水素を持続放出する。本発明の組成物は、場合により組成物の希釈後、少なくとも24時間、より好ましくは48時間、少なくとも0.1、0.5、1または1.5 mm / リットルの過酸化水素を持続放出させることができる。

【0086】

組成物是非水性溶媒を含んでもよい。

10

【0087】

組成物の粘度は、組成物の目的とする用途に応じて調整することができる。例えば、組成物中のポリマーの種類及び／または量を変更することによって、または組成物の溶媒含量を調整することによって、粘度を調整することができる。

【0088】

組成物はゲルであってもよい。好ましくは、組成物は液体である。

【0089】

本発明によれば、組成物を患者に送達するための機器であって、本発明の組成物を含む機器を提供する。

【0090】

20

機器は、噴霧または霧状化装置、例えばポンプ作動型スプレーまたはエアゾールスプレーであってよい。

【0091】

機器は、患者の皮膚への組成物の塗布など、外用を目的としてよい。

【0092】

機器は、患者への内用を目的としてもよい。例えば、機器は患者の気道に組成物を投与するための吸入器またはネブライザーでもよい。機器は洗浄器でもよい。機器は患者に組成物を注入するための機器、例えばシリンジでもよい。

【0093】

本発明によれば、キットを提供し、当該キットは、i) 本発明の組成物と、ii) 組成物を患者に送達するための機器とを含む。組成物は機器と分かれていてもよい。

30

【0094】

組成物は、予防用途を目的としても、微生物感染に伴う病態の治療を目的としてもよい。

【0095】

例えば、手術前の皮膚消毒のための予防スプレーを提供することができる。そのようなスプレーには低粘度の組成物を含むことができる。塗布する際に、組成物是非粘着性であり得る。スプレーは、活性酸素層流を皮膚に送達することができる。層流により、長時間にわたり活性酸素の送達を継続でき、外科切開前の皮膚消毒、外科的処置中と処置後の予防保護の提供が可能になる。

40

【0096】

吸入用に霧状スプレーを提供することができる。吸入用の霧状スプレーは、患者の気道の感染症を治療するために使用することができる。霧状スプレーは、低粘度の組成物を必要とする場合がある。

【0097】

ドレッシング材を貼付する前に、スプレーを使用して熱傷または創傷組織に塗布することができる。スプレーには、粘度の高い組成物を必要とする場合がある。

【0098】

臓器感染及び敗血症予防のため、術後にスプレーを患者体内に塗布することができる。スプレーには、粘度の高い組成物を必要とする場合がある。

50

【 0 0 9 9 】

洗浄器などの機器と共に使用する前に、組成物を水で希釈してもよい。

【 0 1 0 0 】

好ましくは、組成物は実質的に均質である。

【 0 1 0 1 】

本発明によれば、本発明による組成物を患者に塗布または投与する方法を提供し、当該方法は、患者の鼻腔または副鼻腔に、組成物を噴霧すること、組成物を注入すること、組成物を吸入すること、または組成物を塗布することを含む。

【 0 1 0 2 】

本発明によれば、医薬品として使用される本発明による組成物を提供する。組成物は、組成物の噴霧により、注入により、吸入により、または塗布により、患者の鼻腔または副鼻腔に投与または塗布することができる。組成物は患者の体外または体内に投与または塗布することができる。

10

【 0 1 0 3 】

いくつかの実施形態では、組成物は以下ではないか、または以下を含まない：過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質であって、当該酵素が、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得るいずれかの酵素活性に付加される、天然物質と、ポリマーと、を含む組成物ではないか、またはこれらを含まない。

【 0 1 0 4 】

いくつかの実施形態では、組成物は繊維または創傷ドレッシング材ではないか、またはそれを含まない。

20

【 0 1 0 5 】

いくつかの実施形態では、組成物はエレクトロスピン可能な成分を含まない。いくつかの実施形態では、組成物はエレクトロスピン可能なポリマーを含まない。

【 0 1 0 6 】

いくつかの実施形態では、組成物は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質であって、当該酵素が、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、天然物質と、を含むエレクトロスピン可能な組成物ではないか、またはそれを含まない。

30

【 0 1 0 7 】

いくつかの実施形態では、組成物は、酵素が未精製の天然物質中の基質を変換して過酸化水素を放出するのに十分な水と、本発明の繊維を接触させることにより得たまたは得られる組成物ではないか、またはそれを含まない。

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態では、組成物は、20%のS u r g i h o n e y に対して80%のP E O 溶液の重量比でS u r g i h o n e y と混合した、4重量%のポリエチレンオキシドを含有する水溶液ではないか、またはそれを含まない。

【 0 1 0 9 】

いくつかの実施形態では、組成物は、1重量%のポリエチレンオキシド、79重量%の脱イオン水及び20重量%のS u r g i h o n e y を含有する組成物ではないか、またはそれを含まない。

40

【 0 1 1 0 】

好ましい実施形態では、組成物は以下ではないか、または以下を含まない：

水性スプレー

以下を収容する25mlのプラスチックボトル：

活性蜂蜜 10 g

T r i t o n C F 0.1 g

マルトデキストリンまたはコーンスターチ 1 g

50

(ここで「活性蜂蜜」はグルコースオキシダーゼを添加した蜂蜜である)。

【0111】

好ましい実施形態では、組成物は以下ではないか、または以下を含まない。

非水性スプレー

活性蜂蜜 70%

プロピレングリコール 30%

【0112】

好ましい実施形態では、組成物は以下ではないか、または以下を含まない：

粉末

活性蜂蜜

マルトデキストリン

イブプロフェン

微結晶セルロース (CMC)

ポリビニルピロリドン (PVP)。

【0113】

好ましい実施形態では、組成物は以下ではないか、または以下を含まない：

アルコールゲル

Carbopol 940 0.3%

トリエタノールアミン 0.4% (pH及び安定性調節のために必要とされる)

活性蜂蜜 (5+) 65%

エタノール 25.0%

水、適量。

【0114】

好ましい実施形態では、組成物は以下ではないか、または以下を含まない：

真菌爪の治療薬

フォームウェル中の活性蜂蜜 (5+) を有する膏薬

ヒドロキシプロピルセルロース

グリセロール

イソプロピルアルコール

クエン酸

一水和物。

【0115】

いくつかの実施形態では、組成物は以下ではないか、または以下を含まない：

クリーム

蜂蜜 15%

カルボマー 2.63%

ジメチコン 0.13%

スルホコハク酸ラウリル二ナトリウム 0.05%

エデト酸二ナトリウム 0.13%

グリセロール 5.26%

シリカコロイド水和物 0.33%

Poloxamer 0.26%

水酸化ナトリウム 0.41%

精製水 85.03%。

【0116】

いくつかの実施形態では、組成物は、マルトデキストリン、微結晶セルロース、ポリビニルピロリドン、カルボマー、ポロキサマー、ヒドロキシプロピルセルロース、Carbopol 940のうち、1種以上を含まない。

【0117】

好ましくは、酵素は精製酵素である。用語「精製酵素」が本明細書で使用される場合、

10

20

30

40

50

酵素が生成されたときに元々存在する不純物の少なくとも一部から、酵素を分離した酵素製剤を含む。好ましくは、除去または還元される不純物は、そのままでは過酸化水素を放出するように酵素が基質を変換する能力を妨げるものを含む。

【0118】

過酸化水素を放出するように酵素が基質を変換可能であれば、必ずしも精製酵素が高純度であることは必要ないか、または望まれない。状況によっては、比較的粗製の酵素製剤を使用することが望ましい場合がある。好適な純度の例としては、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、または90%の純度が挙げられる。

【0119】

しかしながら、酵素が生成されたときに元々存在し得るカタラーゼの量が低減されていることが好ましい。酵素は、組換え手段または非組換え手段によって生成されたものであってよく、組換え酵素であっても、非組換え酵素であってもよい。酵素は、微生物源、好ましくは非遺伝子組換え微生物から精製してもよい。

【0120】

酵素の純度は、繊維または組成物の使用目的に応じて適宜選択することができる。医療用途の場合、医療等級または医療機器等級の純度を使用しなければならない。

【0121】

カタラーゼは、過酸化水素の水と酸素への分解を触媒する酵素である。カタラーゼ活性のない物質を使用することは、異なる起源から、または同じ起源の異なる回収からの類似した物質間で、この活性の量に変動が生じないことを意味する。このことは、そのような物質から生成できる抗微生物活性の変動を低減する。あるいは、物質がカタラーゼ活性を含んでおり、かつ物質を酵素と接触させる前に物質中のカタラーゼ活性を不活化することが不可能であるまたは望ましくない場合には、物質から生成できる過酸化水素に対するカタラーゼ活性の影響が低減されるように、十分な酵素を使用してもよい。これによっても、物質から生成できる抗微生物活性の変動が低減する。いくつかの実施形態では、物質にカタラーゼ活性がないことが好ましい。

【0122】

カタラーゼは多くの動植物に存在する。カタラーゼ活性は、物質の加工中または抽出中に除去しても、本発明の物質を使用する前に不活化してもよい。カタラーゼ活性は、例えば低温殺菌によって熱失活させてもよい。カタラーゼ活性の熱失活に適した温度は、少なくとも60、70または80であり、好ましくは少なくとも2分間、これを維持する。

【0123】

好ましくは、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は貯蔵安定性である。本発明の繊維またはドレッシング材の形成に適した（または使用される）組成物は、貯蔵安定性であり得る。用語「貯蔵安定性」が本明細書で使用される場合、繊維、ドレッシング材または組成物を水と接触させた後に、抗微生物活性を生成する能力を保持させつつ、繊維、ドレッシング材または組成物を少なくとも数日、好ましくは少なくとも1週間、より好ましくは少なくとも1または2か月間、外界温度で保存できることを意味する。好適な貯蔵温度は37未満、好ましくは20~25である。遮光状態で保存することが好ましい。

【0124】

過酸化水素は一般に外界温度で不安定である。十分な自由水がなければ、酵素が基質を変換して過酸化水素を放出することが阻止され、長期間にわたり外界温度で安定性を維持しやすくなることができる。酵素が基質を変換するのに十分な自由水がない場合には、本発明の貯蔵安定性のある繊維、ドレッシング材もしくは組成物、または本発明の繊維またはドレッシング材の形成に適した組成物は、多少の水を含んでもよい。水の好適な量は、繊維、ドレッシング材または組成物の正確な成分に応じて変化する。しかしながら、通常、貯蔵安定性のある繊維、ドレッシング材または組成物は、20%未満の総水分量、例え

10

20

30

40

50

ば 10% ~ 19% の水を含み得る。

【0125】

本発明の繊維、ドレッシング材または組成物、例えば貯蔵安定性のある繊維、ドレッシング材または組成物は、好ましくは検出可能な過酸化水素をまったく含まない。それらは実質的に過酸化水素を含まないと言ってもよい。例えばそれらは、酵素が基質を変換するのに十分な自由水の非存在下で酵素を基質と接触させることにより形成することができる。

【0126】

繊維、ドレッシング材または組成物に存在する酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、物質に存在し得るいずれかの酵素活性（本明細書で「基質変換活性」と呼ぶ）に付加される（すなわち人間の介入の結果として追加される）。すなわち、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は物質と追加の酵素とを含む。

【0127】

当然ながら、酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含まない実施形態では、水と接触させた後、基質を変換して必要に応じた過酸化水素を形成するのに十分な酵素が存在している必要がある。

【0128】

十分な水の存在下で過酸化水素を生成することの重要性を考慮すると、繊維、ドレッシング材または組成物は、当然ながら追加のペルオキシダーゼを一切含んではならない。

【0129】

いくつかの実施形態では、本発明の組成物、繊維またはドレッシング材は、酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含み得る。いくつかの実施形態では、そのような組成物、繊維またはドレッシング材は、長期間にわたり過酸化水素を生成することができる。それらは例えば、本明細書に記載する濃度の過酸化水素（例えば少なくとも 0.1、0.5、1 または 1.5 mmol / リットルの過酸化水素）を、少なくとも 1 年間、好ましくは少なくとも 3 年間、生成可能であり得る。酵素が基質を変換するのに十分な自由水を有する一部の組成物においては、生成される過酸化水素の濃度が経時的に低減し得る。これは真菌による基質の発酵に起因し得る。発酵によって過酸化水素の生成に利用できる基質の量が低減し得る。いくつかの実施形態では、何らかの真菌による汚染を防止する容器または分包に組成物、繊維またはドレッシング材を密封し、次いで組成物を処理して組成物、繊維またはドレッシング材中の真菌を死滅させることにより発酵を低減することができる。例えば、これはガンマ照射によって達成することができる。

【0130】

好ましくは、酵素はオキシドリダクターゼ酵素である。基質を変換して過酸化水素を放出できるオキシドリダクターゼ酵素の例としては、グルコースオキシダーゼ、ヘキソースオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、ビルビン酸オキシダーゼ、グリコール酸オキシダーゼ及びアミノ酸オキシダーゼが挙げられる。これらのオキシドリダクターゼ酵素に対応する基質は、それぞれ D - グルコース、ヘキソース、コレステロール、D - ガラクトース、ピラノース、コリン、ビルビン酸、グリコール酸及びアミノ酸である。

【0131】

1 種以上のオキシドリダクターゼ酵素と、そのオキシドリダクターゼ酵素に対する 1 種以上の基質との混合物が存在していてもよい。

【0132】

本発明の好ましい実施形態によれば、オキシドリダクターゼ酵素はグルコースオキシダーゼであり、基質は D - グルコースである。

【0133】

物質は、酵素に対する基質を含む任意の物質であってもよい。好ましくは、物質にはカタラーゼ活性がない。好ましくは、物質は未精製の物質である。用語「未精製」が本明細書で使用される場合、純粋形態へと処理されていない物質を指す。未精製の物質は、例え

ば乾燥または煮沸によって濃縮されていてもよい物質を含む。

【0134】

好ましくは、物質は天然源に由来する1種以上の基質を含む（本明細書で「天然物質」と称する）。天然物質の例としては、樹液、根、花蜜、花、種子、果実、葉または新芽由来を含めた、植物源由来の物質が挙げられる。より好ましくは、物質は未精製の天然物質である。

【0135】

好ましくは、物質は、D - グルコース、ヘキソース、コレステロール、D - ガラクトース、ピラノース、コリン、ピルビン酸、グリコール酸またはアミノ酸のうち1種以上の基質を含む。

10

【0136】

好ましくは、物質は糖物質である。用語「糖物質」が本明細書で使用される場合、1種以上の糖を含む任意の物質も意味する。用語「糖」が本明細書で使用される場合、一般式 $C_m(H_2O)_n$ で表される炭水化物を指す。好適な糖としては、単糖類、例えばD - グルコース、ヘキソースまたはD - ガラクトースが挙げられる。好ましくは、糖物質は、天然源由来の1種以上の糖を含む（本明細書で「天然の糖物質」と称する）。より好ましくは、天然の糖物質は、未精製の天然の糖物質である。未精製の天然の糖物質は、天然の糖産物であっても（またはそれに由来しても）よい。好ましい実施形態では、未精製の天然の糖産物は蜂蜜である。いくつかの好ましい実施形態では、蜂蜜は、カタラーゼ活性を除去または不活化するように処理された蜂蜜である。あるいは、未精製の天然の糖物質は、加工された天然糖、例えばシロップまたは転化シロップでもよい。

20

【0137】

上記のように、過酸化水素を放出するように基質を変換できる酵素活性（「基質変換活性」と呼ぶ）が物質自体にないことが好ましい場合がある。物質に基質変換活性がないことには、それによって、異なる起源からの類似した物質間または同じ起源の異なる回収からの類似した物質間で、この活性の量に変動が生じないという利点がある。このことは更に、そのような物質から生成できる抗微生物活性の変動を低減することができる。したがって、基質変換活性が、物質と接触するかまたは物質に添加する酵素によってのみもたらされるため、存在する基質変換活性の量を制御することができる。

【0138】

30

基質変換活性は、物質の加工中または抽出中に除去しても、本発明の物質を使用する前に不活化してもよい。基質変換活性は、例えば低温殺菌による熱失活によって不活化させてもよい。基質変換活性の熱失活に適した温度は、少なくとも80 であり、好ましくは少なくとも2分間、これを維持する。熱失活の利点は、カタラーゼ活性及び基質変換活性の両方を単一の熱失活工程で不活化できることである。

【0139】

本発明のいくつかの実施形態では、物質は、処理、抽出、または精製された物質（すなわち、処理によって不純物または不要な成分が除去された物質）である。好ましくは、除去または還元された不純物は、そのままでは過酸化水素を放出するように酵素が基質を変換する能力を妨げるものを含む。

40

【0140】

本発明のいくつかの実施形態では、物質は酵素に対する精製基質を含む。用語「精製基質」が本明細書で使用される場合、基質が得られたとき、または生成されたときに元々存在する不純物の少なくとも一部から基質を分離した基質製剤を含む。精製基質は、天然源から得ることも、合成して製造することもできる。精製基質は、処理、抽出、または精製された基質（すなわち、処理によって不純物または不要な成分が除去された基質）であってよい。

【0141】

過酸化水素を放出するように酵素が基質を変換可能であれば、必ずしも精製基質が高純度であることは必要ないか、または望まれない。状況によっては、比較的粗製の基質製剤

50

を使用することが望ましい場合がある。好適な純度の例としては、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % の純度が挙げられる。しかしながら、いくつかの実施形態では、精製基質が医療等級、医療機器等級または製薬等級の基質であることが望ましい場合がある。

【0142】

特定の実施形態では、精製基質は精製された糖物質であるか、またはそれを含む。精製された糖物質は、天然源（例えば処理、抽出または精製された天然の糖物質）から得ることも、合成して製造することもできる。精製した糖物質は、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、95 % または 99 % の純度であり得る。精製した糖物質は、医療等級、医療機器等級または製薬等級の糖物質でもよい。精製した糖物質には、1 種以上の精製した糖物質、例えば精製した D - グルコース、ヘキソースまたは D - ガラクトースを含み得る。例えば、精製した糖物質は、医療等級、医療機器等級、または製薬等級の D - グルコース、ヘキソース、または D - ガラクトースでもよい。

10

【0143】

特定の実施形態では、酵素及び基質は精製されており、例えば精製グルコースオキシダーゼ及び精製 D - グルコース、好適には医療等級、医療機器等級、または製薬等級のグルコースオキシダーゼ及び D - グルコースである。本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、追加の抗微生物剤、例えば抗生物質、抗ウイルス薬、または抗真菌薬を含むことができる。

20

【0144】

好ましい実施形態では、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、医療等級または医療機器等級または製薬等級である。

【0145】

好ましくは、物質は蜂蜜である。蜂蜜は、医療等級または医療機器等級の蜂蜜であることが好ましい場合がある。いくつかの実施形態では、蜂蜜は、蜂蜜に元々存在するカタラーゼ活性を除去または不活化するように処理された蜂蜜であることが好ましい。本発明の好ましい実施形態によれば、物質は低温殺菌した蜂蜜であり、酵素はグルコースオキシダーゼである。好ましい実施形態によれば、物質は医療等級または医療機器等級の蜂蜜であり、酵素は医療等級または医療機器等級の酵素、好ましくはグルコースオキシダーゼである。

30

【0146】

上記のように、繊維または創傷ドレッシング材は殺菌されていてもよく、好ましくはガンマ照射曝露によって殺菌される。本発明の組成物もまた、殺菌されていてもよく、好ましくはガンマ照射曝露によって殺菌される。ガンマ照射の好適なレベルは、10 ~ 70 kGy、好ましくは 25 ~ 70 kGy、より好ましくは 35 ~ 70 kGy であり得る。オゾン米国 FDA によって創傷治療に使用される蜂蜜を主成分とする製品の殺菌用として認可されていないため、殺菌はオゾン処理によって行わないことが好ましく、また本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、オゾン、またはオゾン処理によって殺菌された任意の成分を含まないことが好ましい。特に、本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、オゾン処理された蜂蜜またはオゾン処理された油を含んではならない。

40

【0147】

蜂蜜は、ミツバチが花の花蜜を使用して作り出す天然産物である。蜂蜜は糖の飽和または過飽和溶液である。蜂蜜は Codex Alimentarius 国際食品規格において、「植物の花蜜、または植物の生組織の分泌物、または植物の生組織上で植物の汁液を吸う昆虫が排出する物質からミツバチが作り出す天然の甘味物質であって、ミツバチが集め、ミツバチが持つ特殊な物質との化合により変化させ、堆積、脱水、貯蔵し、熟成及び成熟のためハチの巣に残されたものである」と定義されている (Revised Codex Standard for Honey, 2001)。

【0148】

50

花蜜は通常、約 14 % (w/w) の単糖、1 % のフェノール化合物及び 85 % の水を含む。フェノール化合物は、蜂蜜がもつ風味、芳香及び色を与える。ハチの巣の温暖な条件下 (通常 36 °C) で花蜜は非常に急速に発酵する。それを防止するために、花蜜は、働きバチの唾液及び下咽頭腺から出る酵素を含む分泌物と混合される。ハチの巣内で、花蜜はミツバチからミツバチへと渡されて、更に多くの分泌物が添加された後、巣室に保存される。存在する酵素の量は、ミツバチの年齢、食餌及び生理的段階 (ミツバチが働きバチである場合、分泌腺から出る消化酵素が多くなる)、コロニーの強度、ハチの巣の温度、ならびに花蜜の流入量及びその糖含有量によって変化する。

【0149】

ミツバチによって花蜜に加えられる酵素には、デキストリンと糖へのデンプンの変換を触媒するジアスターゼ、フラクトースとグルコースへのスクロースの変換を触媒するインベルターゼ、及び過酸化水素とグルコン酸へのグルコースの変換を触媒するグルコースオキシダーゼが含まれる。過酸化水素の用量が低いと、花蜜を急速に発酵させる酵母の増殖が防止される。ミツバチが花蜜を徐々に乾燥させて蜂蜜を形成するとき、グルコン酸によって蜂蜜は酸性になる (pH 3.5 ~ 4.5)。水は蜂蜜の糖分子に効果的に閉じ込められ、それ以上の化学反応には利用されない。蜂蜜中の「自由」水の量は、水分活性 (a_w) として測定される。蜂蜜中にみられる a_w の量は 0.47 ~ 0.70 であり、平均値で 0.562 及び 0.589 であることが報告されている (RCIEGG, M; BLANC, B, 1981, The water activity of honey and related sugar solutions. Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie 14:1-6)。水分量が 17.1 % 未満の場合、熟成蜂蜜の a_w が低すぎて、いずれの種の増殖も維持されず、発酵が起こらない (Molan, P.C. (1992). The antibacterial activity of honey: 1. The nature of the antibacterial activity. Bee World, 73(1), 5-28)。蜂蜜の酸性化及び自由水の欠如は、発酵が進む危険性を防ぎ、グルコースオキシダーゼの作用を停止する。蜂蜜はまた、花蜜から作り出される様々な量のカタラーゼを含む。

【0150】

花蜂蜜の一般的な化学組成は、以下の通りである：

【表 1】

成分	花蜂蜜	
	平均 (% w/w)	最小-最大 (% w/w)
水分量	17.2	15 - 20
フルクトース	38.2	30 - 45
グルコース	31.3	24 - 40
スクロース	0.7	0.1 - 4.8
他の二糖類	5	
糖の合計	79.7	
無機物	0.2	0.1 - 0.5
アミノ酸、タンパク質	0.3	0.2 - 0.8
酸	0.5	0.2 - 0.8
pH	3.9	3.5 - 4.5

表 1

【0151】

これに加えて、蜂蜜の植物原産地の同定に使用することができる微量の花粉、ならびに

酵素のインベルターゼ、ジアスターゼ、カタラーゼ及びグルコースオキシダーゼが存在する。。また植物化学成分も存在する。この成分は蜂蜜の起源に応じて変化するが、一般には最大約 1 % である。

【 0 1 5 2 】

希釈されると、天然蜂蜜に存在するグルコースオキシダーゼは、希釈された蜂蜜中のグルコース基質を変換し、過酸化水素を放出することができる。しかしながら、蜂蜜の含有成分（特にグルコースオキシダーゼ活性、グルコース、及びカタラーゼ活性の含有量）が変動するということは、起源の異なる蜂蜜、または同じ起源の収穫が異なる蜂蜜で、その抗微生物効果が著しく変動し得ることを意味している。

【 0 1 5 3 】

本発明の実施形態によれば、蜂蜜は低温殺菌することができる。蜂蜜の低温殺菌により、蜂蜜に存在するカタラーゼ及びグルコースオキシダーゼ活性が不活化される。場合により、低温殺菌した蜂蜜を濾過して、収穫後の蜂蜜に存在し得る任意の粒子状物質（例えば蜜蝋粒子及びミツバチの羽）を除去することができる。本発明の繊維またはドレッシング材の製造に適した貯蔵安定性のある組成物を形成するためには、追加されるグルコースオキシダーゼが不活化されない温度で、かつ蜂蜜がグルコースオキシダーゼと容易に混合されるような十分な液体状態のままである温度（好適には 35 ~ 40 ）まで低温殺菌蜂蜜を冷却させてから、グルコースオキシダーゼと低温殺菌蜂蜜を接触させてもよい。

【 0 1 5 4 】

蜂蜜は、カタラーゼ活性の熱失活に十分である温度で低温殺菌することができる。好適な最低温度は 60 ~ 80 である。この温度は、好ましくは少なくとも 2 分間維持される必要がある。

【 0 1 5 5 】

蜂蜜の熱変化及び貯蔵変化の指標として使用される HMF（ヒドロキシメチルフルフラルデヒド）が加熱蜂蜜の副生成物として形成されるため、熱処理の制御は重要であり得る。HMF は酸の存在下でフラクトースの分解によって形成される。熱はこの反応の速度を上昇させる。速度上昇は、熱が強まるにつれて急上昇する。蜂蜜の温度が、通常のハチの巣の外界温度と近似する 40 を超える過程で、HMF が急増する。HMF は有害産物ではない。ジャム、糖蜜、ゴールデンシロップなどは、蜂蜜の 10 ~ 100 倍のレベルの HMF を有し得る。しかしながら、HMF レベルは蜂蜜の劣化指標として使用されており、Codex Alimentarius 規格では 40 mg / l が EU における食卓用蜂蜜の最大許容水準である。

【 0 1 5 6 】

HMF の増加を防止するためには、カタラーゼを不活化するレベルまで蜂蜜の温度を急速に上昇させ、次いで熱変換機構を使用して最大 40 ~ 45 の温度に急速冷却することが好ましい。

【 0 1 5 7 】

この実施形態の工程中、水を一切添加しないため、得られた組成物は、存在するグルコースをグルコースオキシダーゼが変換して過酸化水素を放出するのに十分な自由水を含まない。したがって、本発明の繊維またはドレッシング材の形成に使用できる貯蔵安定性のある組成物は、低温殺菌蜂蜜と、追加のグルコースオキシダーゼと、を含み得る。検出可能な過酸化水素がまったく存在しない場合がある。この組成物は、少なくとも数日間、外界温度で保存することができる。

【 0 1 5 8 】

本発明の他の実施形態では、蜂蜜は未低温殺菌であってもよい。

【 0 1 5 9 】

いくつかの好ましい実施形態によれば、蜂蜜（低温殺菌または未低温殺菌）はクリーム状の蜂蜜である。クリーム状の蜂蜜は、結晶化を制御するように加工された蜂蜜である。クリーム状の蜂蜜は多数の小さい結晶を含有しており、これにより、未加工の蜂蜜で生じ得るより大きな結晶が形成されることが阻止される。クリーム状の蜂蜜の製造方法は米国

10

20

30

40

50

特許 1, 9 8 7, 8 9 3 号に記載された。この方法では、生蜂蜜を最初に低温殺菌し、次いで事前に加工したクリーム状の蜂蜜を低温殺菌蜂蜜に添加して、10%のクリーム状の蜂蜜と90%の低温殺菌蜂蜜の混合物を製造する。その後、混合物を14の制御温度で静置する。この方法により、約1週間で1バッチ分のクリーム状の蜂蜜を製造する。通常の蜂蜜を結晶化して、その結晶を目的のサイズに粉碎することによって、種となるバッチを作製することができる。大規模製造業者はこの方法を一部変更し、混合物を14に維持しながら、パドルを用いて蜂蜜混合物を攪拌する。代替のクリーム化方法では、代わりに蜂蜜を37までゆっくりと温めることで、低温殺菌工程を省略することができる。

【0160】

本発明の他の実施形態では、蜂蜜（低温殺菌または未低温殺菌）はクリーム状でない蜂蜜である。例えば、蜂蜜は低温殺菌されたクリーム状でない蜂蜜であり得る。

【0161】

グルコースオキシダーゼは、好ましくは、人が消費する場合では食品規格のもの、または医療用途の場合では医療等級もしくは医療機器等級のものである精製された天然グルコースオキシダーゼ製剤である。グルコースオキシダーゼの活性は、目的とする過酸化水素の生成率に応じて選択することができる。いくつかのグルコースオキシダーゼ製剤が市販されている（グルコースオキシダーゼは参照番号CAS: 9001-37-0によって識別される）。非遺伝子組換え生物由来のグルコースオキシダーゼのための一般的な微生物起源として、*Aspergillus niger*、*Penicillium amagasakiense*、*Penicillium variable*、*Penicillium notatum*の選別株が挙げられる。GMO *Aspergillus niger* に由来する医療機器等級のグルコースオキシダーゼは、Biozyme UKから入手可能である（活性240IU/mg）。*Aspergillus niger* に由来する食品規格のグルコースオキシダーゼは、BIO-CAT INCから入手可能である（活性15,000ユニット/g）。非遺伝子組換えグルコースオキシダーゼは、BIO-CAT INCから入手可能である（活性12,000/g）。*Aspergillus niger* 由来のグルコースオキシダーゼ（GO3B2）は、BBI Enzyme Limitedから入手可能である（活性360ユニット/mg）。夾雑物：アルファアミラーゼ0.05%以下、サッカラーゼ0.05%以下、マルターゼ0.05%以下及びGO/Cat2000以上。

【0162】

酵素活性（例えば、グルコースオキシダーゼ活性）は、例えば、1~400IU/mgまたは1~300IU/mg、例えば250~280IU/mgの範囲であり得る。使用する酵素の量は、使用目的、物質に存在する任意のカタラーゼ活性の量、物質に存在する基質の量、過酸化水素の望ましい放出濃度、及び過酸化水素の望ましい放出時間を含むいくつかの要因に依存するものと思われる。酵素の好適な量は、当業者が容易に決定することができる。必要に応じて、以下の実施例2に記載するウェル拡散アッセイを使用して、様々な酵素量に対する過酸化水素の放出程度を特定する。酵素（例えばグルコースオキシダーゼ）の好適な量は、繊維、ドレッシング材または組成物の0.0001%~0.5% w/wであり得る。使用する酵素量は、選択したフェノール標準物質（例えば10%、20%、または30%のフェノール標準物質）に相当する抗微生物活性を生成する繊維、ドレッシング材または組成物を製造するように選択することができる。

【0163】

本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、そこに含まれる物質が蜂蜜（例えば、未低温殺菌蜂蜜）であり、酵素が、蜂蜜のD-グルコースを変換して過酸化水素を放出できるグルコースオキシダーゼである場合、グラム当たり少なくとも1ユニット、好ましくは最大1500ユニットのグルコースオキシダーゼを含み得る。このグルコースオキシダーゼは、物質に自然に存在し得る任意のグルコースオキシダーゼ活性に付加される（すなわち人間の介入の結果として追加される）。

【0164】

本明細書で「ユニット」は、 $\text{pH} 7.0$ 、摂氏 25°C で毎分 1 マイクロモルのグルコースを酸化させる酵素量と定義する。

【0165】

出願人は、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物の抗微生物力を、存在するグルコースオキシダーゼ活性の量を増加するだけで増強できることを見出した。

【0166】

本発明のいくつかの実施形態では、繊維、ドレッシング材または組成物のグラム当たりのグルコースオキシダーゼは、 15 ユニット超、例えば少なくとも 30 ユニット、少なくとも 50 ユニット、または少なくとも 100 ユニット、及び好適には 685 ユニット未満、例えば $100 \sim 500$ ユニットで存在し得る。これは、グラム当たりのグルコースオキシダーゼが最大 15 ユニットである繊維、ドレッシング材または組成物と比較して優れた抗微生物特性をもたらすことができる。特に、*MSSA*、*MRSA*、*A* 群及び *B* 群 *Streptococci*、*Enterococcus*、*E. coli*、*E. coli* *ESBL*、*Serratia liquefaciens* *Amp C*、*Klebs. pneumoniae*、*Pseud. aeruginosa*、ならびに *Candida albicans* を含む、広範囲にわたる微生物に対する効力を増加させることができる。

10

【0167】

本発明の他の実施形態では、繊維、ドレッシング材または組成物のグラム当たりのグルコースオキシダーゼは、少なくとも 500 ユニット、例えば $500 \sim 1000$ ユニット、または $685 \sim 1000$ ユニットであり得る。これらはより優れた抗微生物特性をもたらし、例えば *MSSA*、*MRSA*、*E. coli* *ESBL* 及び *Staphylococcus aureus* を含む広範囲にわたる微生物に対する効力を増加させる。

20

【0168】

低温殺菌過程は、蜂蜜に存在する任意の酵素活性をも不活化するため、異なる起源の低温殺菌蜂蜜間、または同じ起源の収穫の異なる蜂蜜間で、カタラーゼ及び基質変換活性に変動が生じない。基質変換活性の量は、規定の量及び活性の酵素を有する精製グルコースオキシダーゼ製剤の添加により制御することができる。それによって、種類及び収穫の異なる蜂蜜間に固有の抗微生物特性の変動を大幅に低減し、抗微生物力の低い蜂蜜の抗微生物特性が改善する。

【0169】

30

本発明の更に好ましい実施形態によれば、物質は転化物質、好ましくは転化シロップ、例えば転化メープルシロップでもよい。用語「転化」が本明細書で使用される場合、物質に元々存在するスクロースが、例えばインベルターゼまたはスクラーゼ酵素の活性によってグルコース及びフラクトースに変換されることを意味する。更にこのような転化物質をグルコースオキシダーゼ酵素と共に使用することができる。

【0170】

メープルシロップは、サトウカエデまたは黒カエデの木の樹液から製造される。寒冷気候地域では、これらの樹木は冬前にその幹及び根にデンプンを貯蔵し、これが糖に変換されると、春に樹液を増加させる。カエデの木に穴を開け、滲出した樹液を採取し、濃縮してメープルシロップを生成することができる。メープルシロップは通常、約 66% のスクロース、 33% の水、ならびに 1% のグルコース及びフラクトースを含む。存在するグルコースが少量であるため、メープルシロップはグルコースオキシダーゼとの化合時に、強力な抗微生物性を生じさせる特性をもたない。しかしながら、例えばインベルターゼまたはスクラーゼを用いて処理することによって、スクロースを最初にグルコースとフラクトースに変換する場合、得られた転化シロップは極めて高レベルのグルコースオキシダーゼに対する基質を含む。

40

【0171】

本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、過酸化水素によって治療できる任意の微生物感染症治療に使用することができる。例としては、グラム陽性菌、グラム陰性菌、抗酸菌、ウイルス、酵母、寄生もしくは病原微生物、または真菌によって引き起こされる

50

感染症が挙げられる。特に、次の微生物によって引き起こされる感染症を治療することができる：*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Candida albicans*、*Propionibacterium acnes*、*Staphylococcus aureus*、*Staphylococcus epidermidis*、*Staphylococcus saprophyticus*、ベータ溶血性 *Streptococci* A群またはB群、*Campylobacter coli*、*Campylobacter jejuni*、メチシリン耐性 *Staphylococcus Aureus* (MRSA)、メチシリン感受性 *Staphylococcus Aureus* (MSSA)、*Botrytis cinerea*、*Mycobacterium tuberculosis*、*Cryptosporidium*、*Plasmodium* 及び *Toxoplasma*。

10

【0172】

本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、下部生殖管感染症の治療に使用することができる。例えば、本発明の組成物を局所塗布して、このような感染症を治療することができる。このような感染症の例としては、細菌性膣症及び一般的な細菌性の膣帯下が挙げられる。本発明の組成物は、タンポンなどの挿入機器に塗布することができる。

【0173】

本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、カルバペネム耐性腸内細菌科 (CRE) またはカルバペネマーゼ産生腸内細菌科 (CPE) 細菌を含む感染症の治療に使用することができる。

20

【0174】

本発明によれば、微生物の成長を防止または阻害するための本発明の繊維または組成物の使用も提供する。

【0175】

本発明によれば、医薬品として使用される本発明の繊維または組成物も提供する。本発明によれば、微生物感染症の予防、治療、または改善のための本発明の繊維または組成物を更に提供する。本発明はまた、微生物感染症の予防、治療、または改善のための医薬品の製造における、本発明の繊維または組成物の使用を提供する。

【0176】

本発明によれば、微生物感染を予防、治療、または改善する方法を更に提供し、この方法には、このような予防、治療または改善を必要とする対象に本発明の繊維、組成物または創傷ドレッシング材を投与することを含む。対象はヒトでも、動物対象でもよい。本発明の繊維、組成物または創傷ドレッシング材は局所投与することができる。

30

【0177】

本発明の繊維または創傷ドレッシング材の形成に使用できる組成物、特に未精製の天然物質が蜂蜜である組成物が、著しい創傷治癒特性を有することを出願人は見出した。具体的には、1か月から1年超にわたって持続する慢性創傷が、治療から数日以内に明らかに治癒し始めた。具体的には、この創傷治癒活性は、低濃度の過酸化水素の持続放出によるものと考えられる。この放出により創傷部位へ酸素が送達される。

40

【0178】

酸素は、創傷治癒を助ける上で様々な重要な役割を有する。創傷治癒の複雑な過程には、大量のエネルギーを必要とする。創傷が感染している場合、更に大きいエネルギーが必要となり、その結果として更に大量の酸素が必要となることを意味する。酸素は、自然治癒過程の機構の多くに関与している。酸素は、代謝サポート、マトリックス修復、消毒/感染制御、ならびに細胞応答のシグナル伝達及び制御において重要な役割を有する。十分な酸素を受けている創傷は、十分な酸素負荷を受けていないものと比較して、一般に治癒速度が増加する。局所貧血/低酸素症は、血管形成、コラーゲン合成及び上皮形成などの創傷治癒過程を直接阻害することができ、また、細菌を死滅させる白血球の能力も妨げる。細菌が増殖するにつれて、創傷部位に更に多くの白血球が動員され、酸素消費は更に増

50

加する。

【0179】

創傷を治癒させるには、治癒過程を促進するためのエネルギー及び栄養分が十分でなければならない。酸素はこうした代謝過程に不可欠である。組織再生及び治癒には、肉芽組織の形成、上皮形成、収縮、及び再構築を伴う。治癒過程には、マトリックスの構築、新たな血管の形成、及び上皮の交換の際に、様々な種類の細胞増殖を必要とする。このような細胞活性は、呼吸を妨害させないような酸素供給に依存する。あらゆる生体高分子（例えばプロテオグリカン、構造タンパク質）の構築に必要な生合成経路は、基本的なエネルギー要求を満たすため酸素に依存している。マトリックスメタロプロテアーゼを含む、様々な酵素が必要とされ、こうした酵素もまたエネルギー要求つまりは酸素要求に関して損失が大きい。

10

【0180】

コラーゲン合成は、この過程の重要な部分である。コラーゲンの沈着は、結合組織の再構築、及び血管形成過程の一部として重要である。酸素は、プロコラーゲンの形成時にプロリン及びリジンのヒドロキシル化に必要とされる補因子である。成熟したコラーゲンの合成には、プロリルヒドロキシラーゼ及びリジルヒドロキシラーゼ酵素を必要とし、そのいずれもがその機能を酸素に依存している。

【0181】

血管新生／血管形成は、完全な治癒に不可欠である。これは適切なシグナルによって誘発される必要がある。高酸素環境では、マクロファージ白血球がこのシグナルを誘発することができ、それによって組織分解、その後のコラーゲンの形成及び組織化、内皮細胞遊走／コロニー形成ならびに血管形成を伴う統合された複雑な一連の事象を引き起こす。

20

【0182】

創傷が生じると、身体 of 自然防御力が活性化される。好中球は、外傷直後に創傷部位に集合し、殺菌性の活性酸素種（ ROS ）及び過酸化水素（ H_2O_2 ）を放出し、細菌を死滅させ感染を防止する。マクロファージは、環境刺激に応答して創傷に到達し、異物粒子を貪食して、創傷治癒にとって重要な血管形成因子である血管内皮増殖因子（ $VEGF$ ）を放出する。酸素は、こうした事象で重要な役割を果たす。マクロファージ及び好中性白血球の主要な微生物殺菌機構の一つが「呼吸バースト」であり、これは、こうした細胞が微生物を死滅させる自然活性である。呼吸バースト過程に欠陥をもつ個体は細菌感染の犠牲になる。白血球は呼吸バースト効果を達成するために酸素を必要とし、酸素レベルが高いとその効力は増大し得る。この白血球はまた、微生物を取り込む（貪食作用）ときに誘発される他の殺菌機構を有する。これは相当なエネルギー消費を伴うことから、酸素依存的な過程であるため、酸素不足の環境では適切に作用しない。この機構は酸素豊富な状況で最適に作用する。酸素はまた嫌気性細菌にとって致命的であり、一部の抗生物質を効果的に機能させる上で重要である。

30

【0183】

酸素分子は、成長因子及び他のシグナル（例えばレドックスシグナル）と相互作用してシグナル伝達経路を調節する重要な細胞シグナルである。血管形成を誘発するマクロファージが放出する分子シグナルが「血管内皮増殖因子」（ $VEGF$ ）である。酸素濃度が高いと、白血球のマクロファージが $VEGF$ を放出することができる。この他にもいくつかの重要な因子及び酵素の遺伝子が、高酸素濃度によって誘導される。

40

【0184】

一酸化窒素（ NO ）の産生もまた、創傷治癒における中心的なシグナル伝達及び制御事象であると認められている。 NO は一酸化窒素合成酵素（ NOS ）という酵素によって生成され、創傷治癒の初期には、その誘導型酵素（ $iNOS$ ）が上方調節される。しかしながら、この酵素はアルギニン及び酸素の供給が豊富である場合にのみ作用して、適切な速度での NO の産生が可能にすることができる。

【0185】

酸素はまた、新たな上皮細胞が増殖し、自己組織化して、上皮構造へと分化する重要な

50

後期治癒事象である上皮形成過程のシグナル伝達（刺激）において直接的な役割を有する。

【0186】

したがって、本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物による創傷部位への持続的な酸素供給は、創傷治癒を促進する際に特に重要であると考えられる。

【0187】

創傷治癒は、別個であるが重複した4段階に特徴付けられる。血液が損傷部位に流出すると、血小板がコラーゲン及び他の細胞外マトリックス（ECM）成分と接触する。血液凝固因子が放出され、数分以内で創傷はフィブリン塊に覆われる。止血に続いて炎症期に入る。好中球が創傷部位に侵入し、損傷を受けた組織及び細菌を除去する。その後、マクロファージが出現し、貪食作用過程が継続する。血小板とマクロファージはいずれも、成長因子及び線維化促進サイトカイン、例えば血小板由来増殖因子（PDGF）及びトランスフォーミング増殖因子ベータ（TGF- β ）などを放出する。マスト細胞は、周辺血管を漏出性にし、細胞を創傷へと通過させるヒスタミン及び他のメディエーターを含む顆粒を放出する。増殖期には血管内皮細胞が新たな毛細管を形成する。線維芽細胞は、隣接組織から清浄化された創傷へと移動して増殖し、フィブロネクチン、コラーゲン、及び新たなECMの他の成分を沈着させる。ケラチノサイトが増殖して移動し、表皮を完全に修復する。最後に、再構築期の間、線維芽細胞の豊富な肉芽組織が、比較的無細胞性の瘢痕と段階的に置き換えられる。架橋コラーゲン分子は、完全な皮膚のものと近似する引張強度を瘢痕に与える。

10

20

【0188】

臨床創傷はどれも微生物負荷の可能性が高く、過度の感染を処置することが必要となる。この負荷は重大な顕性感染を引き起こすと、酸素供給の必要性が大きくなるが、これは、 O_2 依存的な呼吸バーストが内因的に創傷感染を制限する主たる機構に相当するためである。加えて、損傷した組織は、酸化代謝によって修復過程を促進する必要があるため、追加の酸素が必要となる。このため、特徴的に脈管構造の破壊を受ける損傷組織では酸素需要が増加し、それにより酸素が欠乏し、創傷の低酸素化が引き起こされる。末梢血流の減少、ならびに血管形成及び脈管形成の障害は、糖尿病患者、特に下肢における遅延創傷の特徴である。この酸素分圧の低下は、活性酸素種（ROS）を生じさせる内因的酵素の活性を低減する。創傷の低酸素化は治癒を遅延させ、また組織の酸素化状態はROS形成と治癒の奏功を制限する重要な決定要因である。現在では、酸素依存的なレドックス感受性過程が、創傷の殺菌及び治癒の促進のみならず、治癒カスケードの不可欠な要素である創傷反応過程におけるシグナル伝達及び連係の役割にも必要とされることが明らかになっている。

30

【0189】

生体フリーラジカルが細胞破壊の自動的なメディエーターであるという以前に発表された予想は、今や疑問視されている。in vivoでは過酸化水素（ H_2O_2 ）が創傷部位で活発に生成され、創傷治癒を促進し、酸化性物質は生体系において酸化損傷を誘発するのみならず、 H_2O_2 などの酸化性物質はシグナル伝達メッセンジャーとして機能し、細胞活性の複数の局面を誘発する。この結果は、ROS分子が単一細胞環境を超えたシグナル伝達作用を及ぼすことができ、また創傷修復過程時の重要なパラクラインシグナル伝達の役割を担い得る可能性を示している。現在この概念は実証されている。 H_2O_2 などの酸化性物質が細胞ストレス/炎症反応及びその後の組織/ニューロン修復過程に不可欠な役割を果たすことを裏付ける証拠が決定的である。

40

【0190】

主たるROSである H_2O_2 は、容易に合成されて、容易に分解され、あらゆる種類の細胞内に出現するため、低濃度で二次メッセンジャーとして機能し、顕著な役割を果たす。これはラジカルのROSよりも半減期が長く、その小さい非荷電分子は組織を介して容易に拡散する。多くのラジカルのように、無差別に隣接分子と反応することもない。低濃度の H_2O_2 （ $10\mu M$ ）は化学誘引物質として作用し、この活性は血清の存在に依存し

50

ない。 H_2O_2 は、濃度範囲が類似するヒト線維芽細胞及び血管内皮細胞の増殖を刺激する。

【0191】

創傷が生じると、身体 of 自然防御力が活性化され、免疫細胞は外傷直後に創傷部位に集合し、高濃度の殺菌性 H_2O_2 を放出して細菌汚染を防止する。大半のROSは治癒の炎症期に好中球及びマクロファージによって放出される。主たる微生物殺菌機構はこの「呼吸バースト」である。結果として生じる創傷滲出液は H_2O_2 を含むマイクロモル濃度のROSを含有し、これが宿主を細菌及び真菌感染から保護する。 H_2O_2 の静菌性効果は、25～50 μM の濃度で観察された。同時に500 μM を超える濃度では、生存E. coliの細菌細胞の死滅が観察された。呼吸バースト過程に欠陥をもつ個体は細菌感染の犠牲になる。特定の細菌分子に対して内因的な H_2O_2 の特異性がないことに加え、単にファゴソーム内に保持されるのではなく、細胞外環境へと分泌することができることは、こうした細胞が創傷環境全体にその抗微生物特性を及ぼし得ることを意味する。最大のROS生成時に、創傷周辺に形成される H_2O_2 の勾配は約100～200 μM の距離に達することが確認されている。

10

【0192】

創傷治癒には、細胞とそれに関連するROSの構成的役割と破壊的役割を最適に組み合わせ、感染微生物及び非自己物質の根絶と平行して、組織を再構築することが必要となる。創傷治癒に障害に罹患する糖尿病患者の場合、ROSの濃度低下の結果、特に下肢において、末梢血流の減少ならびに血管形成及び脈管形成の障害により、創傷収縮を担う筋線維芽細胞(MFB)の分化が損なわれる。筋線維芽細胞の細胞骨格の主成分である - 平滑筋アクチンの発現は、酸素化血流の供給減少によって減少する。高濃度の H_2O_2 (500 μM)は、単核食細胞、好中球、好酸球、好塩基球及びリンパ球に対して走化性であるマクロファージ炎症タンパク質-1の産生を刺激する。100 μM の H_2O_2 は、血管形成を刺激するケラチノサイトに走化性である血管内皮増殖因子(VEGF)を産生し、この因子では低濃度の H_2O_2 が活性化による細胞遊走及び増殖を促進することがわかっており、また低濃度の H_2O_2 (10 μM)は、好中球に走化性であり、慢性創傷における血管形成/走化性過程を妨害することが示されている。

20

【0193】

患者の H_2O_2 治療の良好な転帰とは対照的に、創傷のROS形成を抑制する必要性を示唆する報告がある。白血球及び間質細胞はいずれも、細胞内、細胞外、及び膜結合型の抗酸化系をいくつか保有しており、創傷内の過剰なROS濃度に応答して、健康な組織が損なわれる恐れが生じる前にROSを除去する。これらは、呼吸の不可避な副生成物である活性酸素の代謝産物を安全に解毒するのに適した適切な系を有する。ROSを中性化できる生化学系は、微生物の生存に不可欠である。ただし、処分されないままの H_2O_2 は、すべてのラジカルのうち最も反応性であるOHを形成する可能性がある。皮膚創傷治癒の間、特に創傷周辺において、おそらく損なわれた間質液内に含まれた高レベルの酸化性物質から増殖細胞を保護することを目的として、ROSスカベンジャーの上方調節が生じることが実証されている。

30

【0194】

このROSの解毒は、多経路であり、多様な一連の転写因子によってゲノム的に制御され、それによって得られる酵素系は、3種類の処理酵素、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)(サイトゾル、ミトコンドリア、及び細胞外)、グルタチオンペルオキシダーゼ及びカタラーゼを含み、これがROSの効力を低減するかまたは完全に無害化する。解毒作用に加えて、SODは他の細胞酸化性物質と比べて比較的その半減期が長く、最適なシグナル伝達候補として膜を横断する能力があることから、 H_2O_2 の特性を促進する重要な酵素である。ROSのタンパク質性の制御に加え、ROSは、小さい抗酸化分子、例えばビタミンC、ビタミンE、 - カロチン、グルタチオン、コエンザイムQ、ビリルビン、 - トコフェロール、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッド酸(NADPH)及び尿酸塩、特に酸化/還元反応が可能な金属イオンをもつ部分、(例えばすべてがRO

40

50

S 捕捉能力を保有するトランスフェリン及びフェリチン)を含む非酵素代謝産物と相互作用することができる。

【0195】

しかしながら、ROSを除去する「指揮を取る(lead the charge)」のはカタラーゼであり、除去される H_2O_2 の50%超を占める。カタラーゼは、ペルオキシソームなどの細胞内小器官内に見られる、肝臓、腎臓及び赤血球でより高濃度である多数の身体組織全体にわたって出現するヘム含有酵素であり、その区画への H_2O_2 の拡散及び中和を利用する。男性のカタラーゼの血清レベルは 50 kU/l と報告されており、創傷治癒におけるカタラーゼ活性は、創傷後の初週で低下し、創傷後2週でカタラーゼの活性レベルが元のレベルに回復することが示されている。創傷のカタラーゼの過剰発現は遺伝子転写によって達成されており、この酵素による H_2O_2 分解の上方調節は、創傷血管形成及び創傷閉鎖の障害をもたらす。加えて、カタラーゼ及び抗酸化剤N-アセチルシステインが、 H_2O_2 が介在することが確認されている走化及びDNA合成を誘発する血小板由来増殖因子(PDGF)に対する、培養平滑筋細胞の反応を妨げることが示されている。

10

【0196】

現在、急性創傷は上記の特徴を有する非常に秩序立った効率的な方法で通常は治癒するため、治療計画には創傷環境及び患者の全身病態を評価しない従来的手順が用いられている。慢性損傷などの病態、例えば糖尿病に起因する治癒しない褥瘡性潰瘍は、欧州の人口の約1%が罹患し、罹患した患者の生活の質に重大な影響を及ぼしている。潜在的に欧州の保健予算の2%が慢性創傷の根絶に費やされているため、慢性創傷は経済と大きく関連している。急性及び慢性創傷治癒における酸素の肯定的な役割が実証されており、また非応答性の潰瘍を自然治癒するための O_2 を生成する局所ドレッシング材を含む高圧治療の導入は、ROSのin-situ生成を可能にすることから有益であることが実証されている。これらに加えて、低レベルの H_2O_2 の産生に依存した従来療法は十分に特徴が明らかであり、また現在は、連続的な低治療用量の H_2O_2 を直接導入する新たな生体工学療法が、慢性創傷の防止に効果を示し始めている。この技術は、酸化損傷を原因として創傷を炎症させ、治癒を阻害/遅延させる、高レベルのROSによる創傷部位の根絶に依存しないことに加え、例えば1.5%の H_2O_2 含有クリームでROS濃度が段階的な減衰曲線となることが実証されている。この高度療法は、 H_2O_2 の合成及び分解方法の複雑な制御に加え、炎症マトリックス内の膜透過性に依存して、治療用量のROSを創傷部位に長期間にわたって正確に送達することを可能にしている。

20

30

【0197】

この創傷治癒に関する研究開発から、創傷環境で生じる内因的なROSが治癒とその多数のレドックス制御を受ける過程を刺激するかという包括的な概念は極めて重要である。過剰なレベルのROS、特に H_2O_2 は、酸化損傷、炎症の長期化、及びおそらくは好中球に関連するタンパク分解性創傷をもたらす、創傷閉鎖を遅延させるが、そのようなレベルの上昇は、治癒が妨げられた結果として、動けない衰弱した患者の間で頻発し得る。しかしながら、治癒を亢進し、感染創傷を清浄化するために生成される H_2O_2 の量は、酸化創傷を引き起こすには不十分であり、レドックスによる対策は慢性創傷の治癒を活性化するための効果的な手段として機能することができる。上記に示した超低濃度の H_2O_2 は、特に糖尿病潰瘍などの慢性創傷の創傷治癒において有益である。このような知見から、創傷の微小環境内でのこの内因的なROS生成を模倣することができ、慢性創傷治癒に役立つ可能性がある新たなレドックスによる技術を得た。

40

【0198】

また創傷治癒活性には、繊維、ドレッシング材または組成物の過酸化水素の放出活性以外に、それらのいくつかの活性が寄与し得ると考えられる。特に、好ましい実施形態は、創傷のデブリードマン能力及び消臭能力を有し、抗炎症特性を有し、組織増殖を刺激することが可能であり、また痛みを抑制して瘢痕を最小限にすると考えられる。

【0199】

50

悪臭は慢性創傷によくある特徴であり、腐敗した血清及び組織タンパク質から悪臭のある化合物を産生する嫌気性細菌種の存在が原因とされる。グルコース（好ましくは24～40重量%）を含む本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、抗微生物作用に加えて、細菌がアミノ酸に優先してグルコースを代謝することを可能にし、その結果、無臭の代謝産物である乳酸を産生する。

【0200】

高いオスモル濃度を有する（好適には蜂蜜と類似した範囲の a_w 、すなわち0.47～0.7を有する）繊維、ドレッシング材または組成物は、組織プロテアーゼの自己融解作用によって創傷のデブリードマンを容易にすると考えられる。これらは、強い浸透圧作用によって創傷組織からリンパ液を流出させることによって、湿性創傷環境を作り出すことができる。それにより、創傷床とその上を覆う壊死組織の境界にプロテアーゼを恒常的に供給することができる。この作用はまた、創傷床の表面を下層から洗浄する。本発明の繊維、ドレッシング材または組成物が放出する過酸化水素によるプロテアーゼの活性化もまた有用であり得る。デブリードマン作用はまた、死組織の除去により、創傷の細菌負荷の低下に寄与することもできる。死組織は、創傷に残存する場合、細菌増殖にとって好適な培地となり、感染症の危険性を高めることがよく知られている。

10

【0201】

身体の炎症反応は治癒過程初期の特徴であるが、反応が持続すると治癒を阻害する可能性があり、組織にさらに損傷を与え、創傷の処理を更に困難にする。持続的な炎症反応は高濃度の滲出液を伴う場合が多い。炎症の抑制、及び患者の痛み緩和により、血管の開放が低減され、それにより浮腫及び滲出液が減少する。感染を除去し、創傷をデブリードマンする本発明の態様の能力は、抗炎症作用に寄与し得ると考えられる。抗酸化剤（好ましくは蜂蜜に存在する1種以上の抗酸化剤）を含む本発明の実施形態は、フリーラジカルを一掃することにより過剰な炎症を低減することもできる。

20

【0202】

持続的な炎症は、創傷に肥厚性瘢痕として現れる線維症の原因となる。本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、炎症を低減し、血管形成を促進して、肉芽組織の形成を刺激することによって瘢痕を低減させることができる。好ましい実施形態はまた、上皮の増殖を刺激することもできる。

30

【0203】

本発明の繊維、ドレッシング材及び組成物はまた、インターロイキン-1（IL-1）を介する免疫賦活効果を有すると考えられる。これらは皮膚細胞からのIL-1の放出を促進すると考えられる。IL-1は、マクロファージ、単球及び樹状細胞によっても分泌されるサイトカインである。これは感染に対抗する身体の炎症反応の重要な部分である。IL-1は内皮細胞上の付着因子の発現を増加させ、感染部位への白血球の遊出を可能にし、また、脳の体温調節中枢に作用して体温を上昇させる。これは内因性発熱物質と呼ばれる。体温の上昇は、身体免疫系が感染症と闘うのを助ける。これは炎症性免疫応答の初期段階であり、系の抗微生物活性を増強する。炎症反応は、起こり得る感染症に対する防御により、また細胞及び組織の修復及び再増殖に関与することにより、創傷治癒の中心的役割を果たす。本発明の繊維、ドレッシング材または組成物の抗微生物効果は、損傷を受けた組織及び/または細胞の再増殖及び修復を助ける免疫賦活効果により促進され補完されると考えられる。

40

【0204】

本発明の繊維、ドレッシング材または組成物、特に蜂蜜を主成分とするものは、周辺皮膚の浸軟の危険性を伴わずに湿潤性の治癒環境を創傷組織に与えることができ、また創傷床へのドレッシング材の付着を防止して、ドレッシング材を取り替える際の痛み及び組織損傷をなくすることができる。これらはまた、健康な細胞の発現を刺激し、創傷における顆粒化と上皮形成の過程を加速することもできる。また、これは、創傷及び損傷を受けた組織を保護するための閉鎖作用も有し得る。蜂蜜を主成分とする組成物はまた、治癒過程に有利である創傷pHの大幅な減少も引き起こすと考えられる。

50

【0205】

本発明の好ましい態様によれば、本発明の繊維、組成物または創傷ドレッシング材は、創傷の治療、または創傷敗血症の治療もしくは管理を含む、創傷ケア方法に使用することができる。

【0206】

創傷は、急性創傷、慢性創傷、外科的創傷（例えば、帝王切開創傷）、慢性熱傷または急性熱傷であり得る。繊維、組成物または創傷ドレッシング材は、創傷敗血症を防止する予防薬に使用することができる。繊維またはドレッシング材は、創傷部位に存在する液体と接触し、それによって希釈される可能性があり、いくつかの実施形態では、これが過酸化水素の放出をもたらす得ると理解される。

10

【0207】

任意の組織の完全性が損なわれたときに創傷が発生する（例えば皮膚破壊、筋肉裂傷、熱傷または骨折）。創傷は、行為（外傷）もしくは外科的処置によって、感染症によって、または基礎病態によって生じる場合がある。

【0208】

急性創傷には、外科的切開及び外傷、例えば裂傷、擦傷、捻除、穿通または咬創、及び熱傷を含む。急性創傷は通常、秩序立った適時の修復過程を経て進行し、解剖学的かつ機能的な完全性の持続的な修復に至る。

【0209】

慢性損傷は、3週を超えて存在する創傷、または秩序立った適時の過程を経て進行せず、解剖学的かつ機能的な完全性を生じることがないか、または持続的かつ機能的な結果を確立しないまま修復過程が進行しない創傷である（Lazarus et al, Arch Dermatol, 1994; 130(4): 489-493）。

20

【0210】

慢性創傷は、静脈性潰瘍、動脈性潰瘍、糖尿病性潰瘍、及び褥瘡性潰瘍という4つのカテゴリに分類することができる。このカテゴリに分類されない少数の創傷は、放射能汚染または局所貧血などを原因とするものであり得る。

【0211】

通常は下腿に生じる静脈性潰瘍は、慢性創傷の約70%~90%を占め、大半は高齢者が罹患する。これは、血液の逆流を防止するために静脈中に存在している弁の機能不全によって生じる静脈高血圧に起因すると考えられている。局所貧血は機能不全から生じ、再灌流傷害と合併することにより、創傷に至る組織損傷を引き起こす。静脈疾患において、潰瘍は通常、足首と腓腹の間、多くは下腿の内側面のゲートル領域（gaiter area）に位置する。

30

【0212】

動脈性下肢潰瘍は、動脈の血流減少とそれに続く組織灌流の低下の結果として発症する。アテローム性動脈硬化症または末梢血管疾患は、動脈性下肢潰瘍の最も一般的な原因である。血液供給の減少を未治療のまま放置すると、罹患した動脈が血液を供給する領域にある組織が死滅し得る。潰瘍の発現は多くの場合、急速であり、組織を深刻に破壊する。動脈性下肢潰瘍は、下肢のどの場所にも発生する可能性があり、深部にあって円形である場合が多く、境界が明瞭に定まっている。

40

【0213】

糖尿病性潰瘍：糖尿病は小血管に免疫低下及び損傷を引き起こし、組織の十分な酸素化を妨げ、それによって慢性創傷を引き起こされ得る。糖尿病は神経障害を引き起こし、これが痛覚と疼痛知覚を阻害する。したがって、患者は下腿及び足部の小さい創傷に当初は気づくことができず、その結果、感染症または創傷の繰り返しを予防できない場合がある。糖尿病性潰瘍の形成には圧力も関与している。糖尿病患者は、慢性潰瘍による切断の危険性が一般集団よりも15%高い。

【0214】

褥瘡性潰瘍は通常、踵、肩甲骨及び仙骨などの圧力を受けやすい身体部位の動きを妨げ

50

る、麻痺などの病態のある人に発症する。褥瘡性潰瘍は、組織への圧力が毛細管内の圧力よりも大きく、それによってその領域への血流が制限される場合に発症する局所貧血を原因とする。皮膚よりも酸素及び栄養分を必要とする筋肉組織は、長期にわたる圧力から最も悪い影響を受ける。他の慢性潰瘍と同様に、再灌流傷害は組織に損傷を与える。

【0215】

潰瘍の治療時には、治療中に創傷を保護するバリアを形成すること、湿潤性の創傷環境を与えること、創傷から壊死組織を除去する (de slough) こと、細菌負荷を低減すること、免疫調節及び栄養改善により治癒を理想的に促進することが望ましい。こうした効果をすべて達成できる従来の創傷治療用品はない。一部の従来治療は、こうした効果の一部を有するが、かなり毒性があるため理想的な治療ではない。しかしながら、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物、特に物質が蜂蜜であるものは、こうした特性のすべてを有し得る。加えて、抗微生物力は、他の蜂蜜を主成分とする創傷ケア用品よりもはるかに強力になるように制御することができ、MRSAなどの抗生物質耐性微生物を含めた、慢性創傷に関与する広範な病原体に対して有効である。

10

【0216】

本発明の繊維、組成物またはドレッシング材は、特に糖尿病患者などの創傷が悪化しやすい患者における創傷の早期治療に特に有利であり得る。早期治療により、慢性創傷で起こる合併症を防止し、患者の活動を維持し、合併症に対処する費用を回避することができる。

【0217】

20

本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、外科的創傷の感染症を緩和または防止する上でも有効であり得る。外科的創傷の感染症は、約10%というかなり高い感染率を有する帝王切開において特に問題である。下記の実施例24は、組成物(本発明の繊維の形成に使用できる)を術後帝王切開創傷に1回塗布すると、手術部位感染の比率が従来データと比較して60%低下することを示している。

【0218】

末梢挿入中心静脈カテーテル(PICCライン)は、化学療法剤及び/または他の薬剤を投与するために使用する。PICCラインは、細長い可撓性のチューブであり、肘屈曲部近傍の腕の大静脈の1つに挿入される。次に、これを心臓の真上の大静脈に先端が位置するまで静脈内に通す。しかしながら、ライン内部またはラインが静脈を通る領域内で感染が発現する可能性がある。感染が発現した場合、通常、患者は抗生物質を投与される。抗生物質によって感染が排除されない場合、または感染が重度である場合には、ラインが取り外される場合がある。感染の発現機会を減らすために、クロルヘキシジンまたは銀などの抗微生物剤を含有するドレッシング材が、ライン挿入部位に適用される場合がある。

30

【0219】

繊維もしくはドレッシング材の形成に使用できる組成物または本発明の組成物は、本発明の組成物をライン挿入部位に局所塗布することにより、PICCラインのコロニー形成を防止及び除去する上で効果的であることがわかった(下記の実施例23を参照)。

【0220】

本発明の繊維またはドレッシング材は、いかなる専門訓練も、複雑な装置なしでも容易に貼付することができる。これらは、患者が感染にかかりやすい場合が多く、また先進諸国よりも手術及び創傷ケアに使用される材料及び器具の感染が多い第三世界諸国での使用に極めて好適であり得る。

40

【0221】

本発明の繊維またはドレッシング材は無毒性にできるため、銀含有ドレッシング材、PVP-I、またはクロルヘキシジンに付随する問題のいずれをも有する可能性がない。

【0222】

本発明の繊維またはドレッシング材はまた、ドナーまたはレシピエントの移植部位の処理にも使用することができる。

【0223】

50

本発明によれば、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物を創傷に投与することを含む、創傷の治療方法を提供する。

【0224】

本発明によれば、創傷治療のための本発明の繊維または組成物もまた提供する。

【0225】

本発明によれば、創傷治療のための医薬品の製造における本発明の繊維または組成物の使用を更に提供する。

【0226】

本発明によれば、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物を炎症部位に投与することを含む、炎症の治療方法もまた提供する。

【0227】

本発明によれば、炎症治療のための本発明の繊維または組成物もまた提供する。

【0228】

本発明によれば、炎症治療のための医薬品の製造における本発明の繊維または組成物の使用を更に提供する。

【0229】

本発明によれば、組織増殖の刺激を必要とする部位に本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物を投与することを含む、組織増殖の刺激方法もまた提供する。

【0230】

本発明によれば、組織増殖を刺激するための本発明の繊維または組成物もまた提供する。

【0231】

本発明によれば、組織増殖を刺激するための医薬品の製造における本発明の繊維または組成物の使用を更に提供する。

【0232】

本発明によれば、デブリードマンを必要とする創傷に本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物を投与することを含む、創傷のデブリードマン方法もまた提供する。

【0233】

本発明によれば、創傷をデブリードマンするための本発明の繊維または組成物もまた提供する。

【0234】

本発明によれば、創傷をデブリードマンするための医薬品の製造における本発明の繊維または組成物の使用を更に提供する。

【0235】

本発明によれば、消臭を必要とする損傷に本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物を投与することを含む、創傷の消臭方法もまた提供する。

【0236】

本発明によれば、創傷を消臭するための本発明の繊維または組成物もまた提供する。

【0237】

本発明によれば、創傷を消臭するための医薬品の製造における本発明の繊維または組成物の使用を更に提供する。

【0238】

創傷治療用途のために、本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物を、医療提供者が決定した適切な頻度で投与することができる。それらは、少なくとも数日毎、例えば毎週、ただし好ましくは毎日または隔日で投与することができる。

【0239】

本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物の投与量は、抗微生物性の強度及びその他の創傷治療特性などの多数の要因、創傷の大きさ、ならびに治療対象の年齢及び病態に応じて決定する。

【0240】

10

20

30

40

50

医療用として好ましい本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、滅菌されており、単回使用される。

【0241】

遮光保存された本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、少なくとも6か月間、安定性を維持することができる。例えば、これらは、高密度ポリエチレン/低密度ポリエチレン(HDPE/LDPE)チューブ、またはポリエステル-アルミニウム-ポリエチレン(PET/AI/PE)の分包に梱包することができる。

【0242】

また、本発明によれば、本発明の繊維または組成物と共に、薬学的に許容される担体、賦形剤または希釈剤を含む医薬組成物を提供する。

10

【0243】

本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、少なくとも1種の好適な抗微生物成分もしくは免疫賦活成分、賦形剤もしくはアジュバント、または抗微生物活性を生成する能力を与えることが望まれる他の任意の好適な成分をも含み得る。ただし、好ましくは、本発明の繊維、ドレッシング材または組成物は、いかなる抗生物質も含まない。

【0244】

本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、座瘡、湿疹、または乾癬などの皮膚疾患の治療に使用することができる。座瘡及び湿疹は、この繊維、創傷ドレッシング材または組成物によって治療することができる微生物感染部分を有するものであってよく、擦傷を原因とする乾癬病変の二次微生物感染もまた治療することができる。

20

【0245】

本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、獣医学に使用することができる。重要な獣医学的用途としては、微生物感染症の治療、ならびに創傷ケアの治療もしくは管理、または熱傷治療が挙げられる。具体的な病態としては、イヌの慢性皮膚感染(皮下ブドウ球菌感染症)、外耳炎(耳の感染)、動物の口腔ケア、ニワトリのカンピロバクター感染症、塵肺症(colliosis)、ブタ、家禽及びウシの腸内微生物感染症、クリプトスポリジウム感染症、人畜共通性感染症のクリアランス、創傷ドレッシング、例えば蹄の除去、ならびに膿瘍治療が挙げられる。本発明は、抗生物質を食物連鎖に持ち込まずに微生物感染症の治療が可能であるという点で、獣医学用途において特に有利である。

【0246】

本発明は、バイオフィルムまたはバイオフィルムの形成が可能な微生物を含む微生物感染の予防または治療方法であって、本発明による繊維、創傷ドレッシング材または組成物を投与することを含む、方法を提供する。

30

【0247】

本発明によれば、バイオフィルムまたはバイオフィルムの形成が可能な微生物を含む微生物感染の予防または治療に使用される本発明による繊維または組成物を提供し、好ましくは当該繊維または組成物は、微生物によるバイオフィルムの増殖または播種を防止または阻止する。

【0248】

本発明によれば、バイオフィルムまたはバイオフィルムの形成が可能な微生物を含む微生物感染の予防または治療に使用される医薬品の製造における本発明による繊維または組成物の使用を提供し、好ましくは当該繊維または組成物は、微生物によるバイオフィルムの増殖または播種を防止または阻止する。

40

【0249】

微生物感染には、バイオフィルムの形成が可能なバクテリア、好ましくはグラム陰性菌を含む場合があり、当該バクテリアは、場合により *Pseudomonas aeruginosa* または *Acinetobacter baumannii* である。

【0250】

本発明による組成物、繊維または創傷ドレッシング材は、危機的コロニー形成状態にある創傷の治療に使用することができる。用語「危機的コロニー形成状態」は多くの場合、

50

細菌が創傷に悪影響を及ぼし始める臨界点、及びその存在の徴候が顕在化し始める臨界点に到達した創傷を指す際に使用される。危機的コロニー形成状態の創傷は、バイオフィルムの存在を示す場合がある。組織の 10^5 微生物/グラム超の細菌負荷は多くの場合、創傷治癒を妨げることが認められている(Siddiqui AR, Bernstein JM (2010) Chronic wound infection: Facts and controversies. Clinics in Dermatology 28: 519 - 26; Edmonds, M., & Foster, A. (2004). The use of antibiotics in the diabetic foot. Am J Surg, 187 (5A), 25S - 28S)。したがって、本発明の繊維、創傷ドレッシング材または組成物は、組織の 10^5 微生物/グラム超の細菌負荷を有する創傷の治療に使用することができる。

10

【0251】

本発明の組成物は、水溶性容器、例えば分包またはパウチに収容することができる。そのため、本発明の組成物を封入または収容する水溶性容器を提供することができる。これにより、有利なことに、水または生理食塩水などの計量済みの量の溶媒を添加することにより、特定の治療用途に応じて正確な量の組成物を分配することができる。例えば、水溶性の分包に収容された本発明の組成物を使用して、鼻洗浄溶液、または噴霧もしくは霧状化される溶液を形成することができる。その結果、組成物を収容した可溶性の分包を水性溶媒に接触させて水性混合液を形成することができる。この水性混合液は、酵素が基質を変換して過酸化水素を生成するのに十分な自由水を含み得る。

20

【0252】

好ましくは、水溶性の分包は医療等級材料から製造される。分包は38℃で水に溶解させることができる。好ましくは、水溶性の分包は、無毒性、耐静電性、紫外線による劣化耐性、またガス、油及びグリースによる劣化耐性である。一例では、可溶性の分包は、ポリマーまたはプラスチック材料、例えばポリビニルアルコールから製造することができる。

【0253】

水溶性の分包に収容された本発明の組成物は、以下の1つ以上の病態の治療に有用であり得る：副鼻腔炎(sinusitis)及び鼻副鼻腔炎(rhinosinusitis)などの鼻の病態；上気道感染症(例えば扁桃炎、喉頭炎及び副鼻腔炎)または下気道感染症(例えば気管支炎、肺炎、細気管支炎及び結核)などの気道感染症；慢性閉塞性肺疾患；及び嚢胞性肺線維症。

30

【0254】

本発明の組成物と、バリアまたは層として機能することができる水溶性材料と、を含む創傷ドレッシング材を提供することができる。水溶性材料は組成物と接触させても、または隣接していてもよい。本発明の組成物は、水溶性材料に封入されていても、またはその内部に収容されていてもよい。水溶性材料は、分包、パウチまたは封入物を形成することができる。組成物は水溶性材料の層間に配置することができる。水溶性材料は医療等級材料から製造することができる。水溶性材料は38℃で水に溶解することができる。好ましくは、水溶性材料は、無毒性、耐静電性、紫外線による劣化耐性、及びガス、油及びグリースによる劣化耐性である。一例では、水溶性材料は、ポリマーまたはプラスチック材料、例えばポリビニルアルコールから製造することができる。使用時にドレッシング材を創傷に貼付すると、水溶性材料が創傷滲出液に溶解するため、本発明の組成物が創傷と接触し、創傷に活性酸素を送達することができる。有利なことに、それによって測定可能かつ正確な用量の活性酸素を創傷に送達することができる。水溶性材料は、創傷ドレッシング材からの組成物の放出を制御することができる。

40

【0255】

水溶性材料及び組成物は、従来の無菌性の創傷ドレッシング材の表面に付着させることができる。

【0256】

50

いくつかの実施形態では、本発明の組成物にとって特に低水分量を有することが有利である。例えば、これが該当するのは、組成物が水溶性容器または分包内に収容されている場合である。水分量が多すぎる場合、水溶性容器内に短時間しか組成物を収容することができない場合がある。したがって、水分量を低減すると、保存期間を長くすることが可能になる。例えば、3年の保存期間が特に望ましい。

【0257】

いくつかの実施形態では、組成物中の水が12重量%以下である。他の実施形態では、組成物中の水が10重量%以下である。いくつかの実施形態では、組成物中の水が5重量%以下、更には3重量%以下である。いくつかの実施形態では、水分量を低減した組成物は液体形態である。いくつかの実施形態では、組成物は固体形態である。好適な固体形態としては、粉末、フレークまたは顆粒が挙げられる。他の形態としてはトローチ剤または錠剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、組成物はパスタ剤である。例えば、パスタ剤は外界温度または室温（例えば20～26）では容易に流出しない場合があるが、軟性及び/または展性の粘度を有し得る。

10

【0258】

いくつかの実施形態では、組成物は乾燥(dry)蜂蜜または乾燥させた(dried)蜂蜜を含み得る。乾燥蜂蜜または乾燥させた蜂蜜製品は市販されており、通常は噴霧乾燥、凍結乾燥または真空乾燥などの方法によって得られる。したがって、水分量を低減させた本発明の組成物は、このような方法を使用して製造することができる。本発明の組成物は、過酸化水素を放出させるように基質を変換できる酵素を、その酵素に対する基質を含む物質（例えば、蜂蜜などの未精製の天然物質）に添加することにより得たものであるか、得られるものであってよく、当該物質は乾燥されており、12重量%以下、10重量%以下、5重量%以下、または3重量%以下の水を含む。あるいは、酵素を物質に添加して得られた組成物を乾燥させてもよい。物質に添加するときの酵素は乾燥形態であっても、乾燥させた形態であってもよい。例えば、酵素は凍結乾燥されたものであってよい。酵素は12重量%以下、10重量%以下、5重量%以下、または3重量%以下の水を含み得る。好ましくは、酵素は、乾燥形態または乾燥させた形態である場合、5重量%未満の水を含む。

20

【0259】

乾燥過程を容易にする、または乾燥させた組成物の特性を改善するために添加剤を添加してもよい。例えば乾燥させた蜂蜜製品は、加工用添加剤を含まない場合、固形化または凝集化する傾向がある。好適な添加剤としては、加工助剤、乾燥助剤、充填剤または凝固防止剤が挙げられる。添加剤には、デンプン、粉乳、ステアリン酸カルシウム、ふすまデキストリン、レシチン及び大豆粉を含み得る。乾燥させた蜂蜜製剤は通常、50重量%以上、65重量%以上、70重量%以上の蜂蜜を含む。よって、製剤の残部は好適な添加剤を含み得る。好ましい実施形態では、乾燥過程を容易にする、または組成物の特性を改善するために添加される添加剤はない。

30

【0260】

したがって、本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、を含む組成物であって、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加され、当該組成物は、12重量%以下、10重量%以下、5重量%以下、または3重量%以下の水を含む、組成物を提供することができる。組成物は、本明細書に記載するように更に定義され得る。例えば、酵素はグルコースオキシダーゼであってよく、物質は未精製の天然物質（例えば蜂蜜）であっても、精製基質（例えばグルコース）であってもよい。組成物は、凍結乾燥によって得たものであっても、または得られるものであってもよい。更に組成物を本明細書に記載するように医療病態の治療に使用することができる。例えば、創傷の治療に組成物を使用することができる。医療病態を治療するために、最初に組成物を水に添加して水溶液を形成してもよい。水の添加によって、過酸化水素の生成を開始することができる。

40

50

【0261】

本発明によれば、組成物を乾燥させることを含む方法を提供することができ、当該組成物は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、を含み、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される。組成物は、噴霧乾燥、凍結乾燥または真空乾燥によって乾燥することができる。乾燥により、組成物中の含水量を12重量%以下、10重量%以下、5重量%以下、または3重量%以下の水に低減することができる。

【0262】

あるいは、酵素を、その酵素に対する基質を含む乾燥させた物質に添加することを含む方法を提供することができる。あるいは、この方法は、i) 酵素に対する基質を含む物質を、乾燥により、12重量%以下、10重量%以下、5重量%以下、または3重量%以下の水を有する物質になるように乾燥させることと、ii) 過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される酵素を、この乾燥させた物質に添加することと、を含み得る。物質は、噴霧乾燥、凍結乾燥または真空乾燥によって乾燥することができる。物質に添加される酵素は乾燥形態であっても、乾燥させた形態であってもよい。

【0263】

本発明の組成物、繊維またはドレッシング材は、特定のレベルまたは濃度で過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含み得る。例えば、本発明の組成物、混合物、繊維またはドレッシング材は、少なくとも2 ppm、少なくとも5 ppm、少なくとも10 ppm、少なくとも20 ppm、または少なくとも50 ppmの濃度で過酸化水素を持続放出させることができる。好ましい実施形態では、このレベルは少なくとも2 ppmであってよい。いくつかの実施形態では、濃度は、最大で500 ppm、200 ppm、100 ppm、50 ppm、20 ppmまたは10 ppmであり得る。好ましい実施形態では、レベルは20 ppm以下であってよい。更に好ましい実施形態では、レベルは10 ppm以下であってよい。例えば、濃度は10 ~ 500 ppm、20 ~ 200 ppm、または50 ~ 100 ppm、2 ~ 50 ppm、2 ~ 20 ppmまたは5 ~ 10 ppmであってよい。酵素は、基質を変換するのに十分な自由水を組成物が含まない場合（例えば、組成物が乾燥組成物または乾燥させた組成物である場合）、水で希釈されて、酵素が基質を変換するのに十分な自由水が存在するときのみ過酸化水素を発生させることができる。したがって、水の添加によって、過酸化水素の生成を開始することができる。組成物、混合物、繊維またはドレッシング材は、少なくとも1時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも2日間、または少なくとも4日間、過酸化水素を持続放出させることができる。好ましくは、過酸化水素の濃度は少なくとも4日間維持される。好ましい実施形態では、過酸化水素の濃度は、少なくとも1時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも2日間、または少なくとも4日間10 ~ 500 ppmに維持される。他の実施形態では、過酸化水素の濃度は、少なくとも1時間、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも2日間、または少なくとも4日間50 ~ 100 ppmに維持される。他の実施形態では、過酸化水素の濃度は、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも2日間、または少なくとも4日間2 ~ 50 ppmに維持される。他の実施形態では、過酸化水素の濃度は、少なくとも12時間、少なくとも24時間、少なくとも2日間、または少なくとも4日間5 ~ 10 ppmに維持される。

【0264】

本発明の組成物または本発明に使用される組成物は、非水性溶媒を含み得る。これは、組成物が未精製の天然物質、例えば蜂蜜を含む場合、特に有利であり得る。蜂蜜は、例えば高粘度を有し、粘着性であるため、その取り扱いや特定の製品による分配が困難になる場合がある。貯蔵安定性のある組成物が望まれる場合、水性溶媒を添加することによって粘度を減少させることができない場合がある。蜂蜜の粘度は、非水性溶媒を使用して減少させることができる。

【0265】

非水性溶媒を含む本発明の組成物において、非水性溶媒は複数の非水性溶媒の混合物を含み得る（または、それから成り得る）。したがって、本明細書で「非水性溶媒」を参照する場合、１種以上または少なくとも１種の非水性溶媒が含まれる。しかしながら、いくつかの実施形態では、非水性溶媒は１種の非水性溶媒のみを含み得る（または、それからなり得る）。

【０２６６】

非水性溶媒の溶液を形成することによって、組成物中の物質をより容易に加工可能にすることができ、粘着性を低下させることができる。したがって、このような溶液を、布地基材などの基材上にコーティングすることができ、それによって創傷ドレッシング材の部材を提供することができる。更に、粘度の低い組成物は噴霧可能であってよい。

10

【０２６７】

このように、本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、非水性溶媒と、を含む抗微生物活性を生じさせる組成物を提供する。

【０２６８】

非水性溶媒を含む組成物において、物質は、本明細書に記載するように、未精製の天然物質、例えば蜂蜜、または酵素に対する精製基質を含む物質であってもよい。

【０２６９】

非水性溶媒を含む本発明の組成物は、本明細書に記載するようにエレクトロスピン可能であってよい。

20

【０２７０】

非水性溶媒を含む本発明の組成物において、物質は、本明細書に記載するように未精製の天然物質であるか、またはそれを含み得る。

【０２７１】

本発明によれば、エレクトロスピン可能な組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質と、非水性溶媒とを含み、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、組成物を提供する。

【０２７２】

非水性溶媒を含む本発明の組成物は、本明細書に記載するポリマーを含み得る。

30

【０２７３】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、非水性溶媒と、ポリマーと、を含む組成物を提供する。

【０２７４】

非水性溶媒を含む本発明の組成物において、物質は、本明細書に記載するように酵素に対する精製基質を含み得る。

【０２７５】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する精製基質を含む物質と、非水性溶媒と、を含む組成物を提供する。

【０２７６】

40

本発明によれば、抗微生物活性を生じさせる組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する精製基質を含む物質と、非水性溶媒と、ポリマーと、を含む組成物を提供する。

【０２７７】

本発明によれば、抗微生物活性を生じさせる組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質と、非水性溶媒と、を含む組成物を提供する。

【０２７８】

本発明によれば、抗微生物活性を生じさせる組成物であって、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質と、非水性

50

溶媒と、ポリマーと、を含み、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、未精製の天然物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される、組成物を提供する。

【0279】

非水性溶媒を含む組成物は、本明細書に記載するように、酵素が基質を変換するのに十分な自由水を含まない貯蔵安定性のある組成物であり得る。

【0280】

非水性溶媒を含む組成物において、物質は、本明細書に記載するようにカタラーゼ活性がなくてもよい。

【0281】

非水性溶媒を含む組成物は、本明細書に記載するように、一定期間過酸化水素を持続放出させることができる。例えば、組成物は、場合により組成物の希釈後に、少なくとも24時間、より好ましくは少なくとも48時間過酸化水素を持続放出させることができる。好適には組成物は、組成物の希釈後、少なくとも24時間、2 mmol / リットル未満の濃度で過酸化水素を持続放出する。

10

【0282】

非水性溶媒を含む組成物は、少なくとも24時間、より好ましくは48時間、少なくとも0.1、0.5、1または1.5 mmol / リットルの過酸化水素を持続放出させるのに十分な酵素及び基質を含むことができる。

【0283】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、非水性溶媒と、を含む組成物であって、当該酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加され、当該組成物は、12重量%以下、10重量%以下、5重量%以下、または3重量%以下の水を含む、組成物を提供する。

20

【0284】

非水性溶媒を含む組成物において、酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な、物質に存在し得る任意の酵素活性（本明細書で「基質変換活性」と呼ぶ）に付加される（すなわち人間の介入の結果として追加される）。非水性溶媒を含む組成物は、本明細書に記載するように精製酵素を含み得る。

【0285】

本発明によれば、医薬品として使用される非水性溶媒を含む組成物もまた提供する。例えば、本発明のこのような組成物を、本明細書に記載する任意の疾患または病態、例えば微生物感染の治療、またはその治療方法に使用することができる。

30

【0286】

非水性溶媒を含む本発明の組成物において、非水性溶媒は、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールを含み得る。好ましくは、非水性溶媒はグリセロールであるか、またはそれを含む。グリセロールは湿潤剤として作用することができるため、グリセロールを含む組成物は乾燥皮膚の軟化または保湿に役立ち得る。非水性溶媒は、1種以上のエタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールを含み得る。いくつかの実施形態では、非水性溶媒は、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールのうち2種を含み得る。いくつかの実施形態では、非水性溶媒は、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールのうち3種を含み得る。いくつかの実施形態では、非水性溶媒は、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールのうち4種を含み得る。

40

【0287】

様々な非水性溶媒の溶解度パラメータ及び粘度パラメータを以下の表に示す。

【表 1 A】

物質	ハンセン溶解度パラメータ				溶媒100mlに可溶性であるグルコース g
	$\delta_t/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_d/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_p/\text{MPa}^{1/2}$	$\delta_h/\text{MPa}^{1/2}$	
エタノール	26.5	15.8	8.8	19.4	1.94 g
ジメチルスルホキシド	26.7	18.1	16.4	10.2	54 g
プロピレングリコール	30.2	16.8	9.4	23.3	
エチレングリコール	32.9	17.0	11.0	26	
グリセロール	36.1	17.4	12.1	29.3	
水	47.8	15.6	16.0	42.3	90g

10

20

物質	粘度
エタノール	1.04mPa. s
ジメチルスルホキシド	1.99mPa. s
グリセロール	1412mPa. s
エチレングリコール	16.1mPa. s
プロピレングリコール	42mPa. s
水	1.3mPa. s

30

【0288】

好ましい実施形態では、上記の表に例示された非水性溶媒の範囲内の溶解度パラメータを有するような非水性溶媒を選択することができる。例えば、 $\delta_t / \text{MPa}^{1/2}$ は 26 ~ 50、例えば 26.5 ~ 47.8 であり得る。 $\delta_d / \text{MPa}^{1/2}$ は 15 ~ 19、例えば 15.6 ~ 18.1 であり得る。 $\delta_p / \text{MPa}^{1/2}$ は 8 ~ 16、例えば 8.8 ~ 16 であり得る。 $\delta_h / \text{MPa}^{1/2}$ は 10 ~ 45、例えば 10.2 ~ 42.3 であり得る。

40

【0289】

望ましい粘度に応じた非水性溶媒を選択することができる。例えば、より高い粘度が望ましい場合、グリセロールが好適であり得る。本発明の組成物に適した粘度は、20 で 100 mPa. s. 以下であり得る。いくつかの実施形態では、好適な粘度は 20 で 75 mPa. s. 以下であり得る。いくつかの実施形態では、好適な粘度は 20 で 75 mPa. s. 以下であり得る。

【0290】

非水性溶媒を含む組成物のいくつかの実施形態では、組成物は少なくとも 2 重量%の非

50

水性溶媒を含み得る。非水性溶媒を含む組成物のいくつかの実施形態では、組成物は少なくとも5重量%の非水性溶媒を含み得る。非水性溶媒を含む組成物のいくつかの実施形態では、組成物は少なくとも10重量%の非水性溶媒を含み得る。他の実施形態において、組成物は少なくとも20重量%の非水性溶媒を含み得る。他の実施形態において、組成物は少なくとも25重量%の非水性溶媒を含み得る。他の実施形態において、組成物は少なくとも50重量%の非水性溶媒を含み得る。いくつかの実施形態において、組成物は少なくとも75重量%の非水性溶媒を含み得る。水性溶媒の量は、組成物の目的とする用途に応じて変更することができる。例えば、噴霧可能な組成物、または抗細菌性ワイプに使用される組成物は、組成物の粘度が低くなるように非水性溶媒をより高レベルで含んでもよい。いくつかの実施形態では、組成物中の非水性溶媒の量は50～90重量%であり得る。

10

【0291】

用途によっては、低量の非水性溶媒を含む組成物、例えば創傷ドレッシング材の形成に使用される組成物を有することが望ましい場合がある。

【0292】

したがって、いくつかの組成物は最大量の非水性溶媒を含み得る。組成物中の非水性溶媒の最大量は、50重量%以下であり得る。いくつかの実施形態では、組成物中の非水性溶媒の量は、1～50、5～50または10～50重量%であり得る。

【0293】

非水性溶媒を含む本発明の組成物において、組成物は蜂蜜を含み得る。組成物が蜂蜜を含む場合、蜂蜜の量は少なくとも20重量%であり得る。いくつかの実施形態では、蜂蜜は少なくとも25重量%の量で存在し得る。いくつかの実施形態では、蜂蜜は少なくとも50重量%の量で存在し得る。いくつかの実施形態では、蜂蜜は少なくとも75重量%の量で存在し得る。いくつかの実施形態では、組成物中の蜂蜜の量は50重量%以下であり得る。いくつかの実施形態では、組成物中の蜂蜜の量は25重量%以下であり得る。いくつかの実施形態では、蜂蜜は組成物中に50～90%の量で存在し得る。いくつかの実施形態では、組成物中の蜂蜜は、1～50、5～50または10～50重量%の量で存在し得る。

20

【0294】

布地などの基材のコーティングに組成物を使用しようとする場合、組成物の重量は、好ましくは1平方メートルの基材当たり少なくとも100gである。他の実施形態において、組成物の重量は、1平方メートルの基材当たり少なくとも200gであり得る。他の実施形態において、組成物の重量は、1平方メートルの基材当たり少なくとも300gであり得る。

30

【0295】

非水性溶媒を含む組成物は、添加された、すなわち追加の水を含んでもよい。したがって、酵素に対する基質を含む物質中に存在し得る任意の水に、水を添加することができる。例えば、本発明の組成物中の物質が未精製の天然物質、例えば蜂蜜である場合、組成物は、未精製の天然物質に既に存在するものに添加される水を含み得る。水が添加されていても、組成物は本明細書に記載するように貯蔵安定性であり得る。非水性溶媒は水中で結合または固定し得るため、添加される水を利用しない、または含まない場合でも酵素が基質を変換することができる。したがって非水性溶媒は湿潤剤として作用することができる。非水性溶媒または湿潤剤は、組成物の水分活性(a_w)を低減することができる。

40

【0296】

したがって、本発明の組成物は追加の水及び湿潤剤を含むと言ってよく、当該湿潤剤は物質中に既に存在し得る任意の湿潤剤に添加される。未精製の天然物質、例えば蜂蜜は、湿潤剤であるか、または湿潤剤を含むと考えられ得る。組成物が未精製の天然物質を含む場合、湿潤剤は、未精製の天然物質、または未精製の天然物質に存在し得る任意の湿潤剤に添加される。

【0297】

50

いくつかの実施形態では、湿潤剤は非水性溶媒ではない。しかしながら、好ましい実施形態では、湿潤剤は非水性溶媒である。

【0298】

組成物中に未精製の天然物質（例えば蜂蜜）を包含すると、組成物が粘性になり、その用途範囲が制限される場合がある。組成物中に非水性溶媒または湿潤剤と、添加された水の両方を包含すると、組成物の粘度が減少し、また粘度の低い組成物は、例えば組成物を容易に噴霧可能にしようとする場合に有益であり得る。蜂蜜、非水性溶媒及び添加された水を含む噴霧可能な組成物の例を実施例40に示す。本発明の組成物に適した粘度は、20で100 mPa・s以下であり得る。いくつかの実施形態では、好適な粘度は20で75 mPa・s以下であり得る。いくつかの実施形態では、好適な粘度は20で50 mPa・s以下であり得る。

10

【0299】

このように、本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、非水性溶媒と、水と、を含む、抗微生物活性を生じさせる貯蔵安定性のある組成物を提供する。この水は、物質に存在し得る任意の水に添加される。酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される。

【0300】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む物質と、湿潤剤と、水と、を含む、抗微生物活性を生じさせる貯蔵安定性のある組成物を提供する。この水は、物質に存在し得る任意の水に添加される。酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される。湿潤剤は、物質、または物質中に存在し得る任意の湿潤剤に添加される。

20

【0301】

湿潤剤を含む本発明の組成物において、湿潤剤は複数の湿潤剤の混合物を含み得る（または、それからなり得る）。したがって、本明細書で「湿潤剤」を参照する場合、1種以上または少なくとも1種の湿潤剤が含まれる。しかしながら、いくつかの実施形態では、湿潤剤は1種の湿潤剤のみを含み得る（または、それからなり得る）。

【0302】

いくつかの実施形態では、物質は酵素に対する精製基質であるか、またはそれを含む。いくつかの実施形態では、物質は未精製の天然物質、好ましくは蜂蜜であるか、またはそれを含む。

30

【0303】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質と、非水性溶媒と、水と、を含む、抗微生物活性を生じさせる貯蔵安定性のある組成物を提供する。この水は、物質に存在し得る任意の水に添加される。酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される。

【0304】

本発明によれば、過酸化水素を放出するように基質を変換可能な酵素と、その酵素に対する基質を含む未精製の天然物質と、湿潤剤と、水と、を含む、抗微生物活性を生じさせる貯蔵安定性のある組成物を提供する。この水は、物質に存在し得る任意の水に添加される。酵素は、過酸化水素を放出するように基質を変換可能である、物質に存在し得る任意の酵素活性に付加される。湿潤剤は、未精製の天然物質に存在し得る任意の湿潤剤に添加される。

40

【0305】

本発明の組成物中の湿潤剤または非水性溶媒、及び添加される水の相対量は、酵素が基質を変換するのに十分な自由水を組成物が含まないように選択することができる。このような組成物が更に多くの水と接触するとき、例えば、組成物が希釈される場合、または組成物が創傷からの滲出液と接触する場合に、酵素が基質を変換して過酸化水素を放出する

50

のに十分な自由水が存在してもよい。

【0306】

湿潤剤または非水性溶媒、及び添加される水を含む本発明の組成物において、組成物中の添加される水の量は少なくとも5重量%であってよい。他の実施形態では、組成物中の添加される水の量が少なくとも10重量%であり得る。他の実施形態では、添加される水の量が少なくとも15重量%であり得る。他の実施形態では、添加される水の量が少なくとも20重量%であり得る。組成物中の添加される水の量は、50重量%以下であり得る。他の実施形態では、添加される水の量は40重量%以下であり得る。いくつかの実施形態では、添加される水の量は、5～50重量%、5～20重量%、15～50重量%、または20～40重量%であり得る。

10

【0307】

湿潤剤または非水性溶媒、及び添加される水を含む本発明の組成物において、組成物中の水の総量（すなわち、物質中に既に存在し得る水の量と、添加される水の量との合計）は少なくとも15重量%であってよい。他の実施形態では、水の総量は少なくとも20重量%であり得る。組成物中の水の総量は、50重量%以下であり得る。他の実施形態では、水の総量は40重量%以下であり得る。いくつかの実施形態では、水の総量は15～50重量%または20～40重量%であり得る。

【0308】

湿潤剤または非水性溶媒、及び添加される水を含む本発明の組成物において、組成物中の水のモル分率は50～75重量%であり得る。例えば、組成物の水のモル分率は60～70重量%であってよい。

20

【0309】

添加される水、及び湿潤剤または非水性溶媒を含む本発明の組成物において、水分活性（ a_w ）は0.6未満、好ましくは0.5未満であり得る。

【0310】

添加される水、及び湿潤剤または非水性溶媒を含む本発明の組成物において、湿潤剤または非水性溶媒の量は少なくとも30重量%であり得る。他の実施形態では、湿潤剤または非水性溶媒の量は少なくとも40重量%であり得る。いくつかの実施形態では、湿潤剤または非水性溶媒の量は少なくとも50重量%であり得る。湿潤剤または非水性溶媒の量は75重量%以下であり得る。湿潤剤または非水性溶媒の量は60重量%以下であり得る。いくつかの実施形態では、湿潤剤または非水性溶媒の量は、30～75重量%または40～60重量%であり得る。

30

【0311】

湿潤剤または非水性溶媒、及び添加された水を含む本発明の組成物において、湿潤剤または非水性溶媒は、エチレングリコール、プロピレングリコール、グリセロールまたはジメチルスルホキシドから選択することができる。いくつかの実施形態では、湿潤剤または非水性溶媒はグリセロールである。湿潤剤または非水性溶媒は、1種以上のエタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールを含み得る。いくつかの実施形態では、湿潤剤または非水性溶媒は、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールのうち2種を含み得る。いくつかの実施形態では、湿潤剤または非水性溶媒は、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールのうち3種を含み得る。いくつかの実施形態では、湿潤剤または非水性溶媒は、エタノール、ジメチルスルホキシド、グリセロール、エチレングリコールまたはプロピレングリコールのうち4種を含み得る。

40

【0312】

いくつかの実施形態では、非水性溶媒を含む組成物は、ポリマーを実質的に含まない（例えば1重量%、0.5重量%、0.1重量%または0.01重量%未満のポリマー）。

【0313】

好ましい実施形態では、非水性溶媒を含む本発明の組成物は、以下ではないか、または

50

以下を含まない：

i) アルコールゲル

Carbopol 940 0.3%

トリエタノールアミン 0.4% (pH調節及び安定性調節のために必要である)

活性蜂蜜 65%

エタノール 25.0%

水、適量

ここで、「活性蜂蜜」はグルコースオキシダーゼを添加した蜂蜜である。

【0314】

好ましい実施形態では、非水性溶媒を含む本発明の組成物は、以下ではないか、または 10

以下を含まない：

ii) 非水性スプレー

活性蜂蜜 70%

プロピレングリコール 30%

【0315】

好ましい実施形態では、非水性溶媒を含む本発明の組成物は、以下ではないか、または

以下を含まない：

iii) 真菌爪の治療薬

フォームウェル中の活性蜂蜜を有する膏薬

ヒドロキシプロピルセルロース

グリセロール

イソプロピルアルコール

クエン酸

一水和物

【0316】

好ましい実施形態では、非水性溶媒を含む本発明の組成物は、以下ではないか、または

以下を含まない：

iv) 喉スプレー

蜂蜜及びグリセロール (好ましくは5~20%の蜂蜜を含む)

【0317】

好ましい実施形態では、非水性溶媒を含む本発明の組成物は、以下ではないか、または

以下を含まない：

v) クリーム

蜂蜜 15%

カルボマー 2.63%

ジメチコン 0.13%

スルホコハク酸ラウリル二ナトリウム 0.05%

エドト酸二ナトリウム 0.13%

グリセロール 5.26%

シリカコロイド水和物 0.33%

Poloxamer 0.26%

水酸化ナトリウム 0.41%

精製水 85.03%

vi) 粉末

活性蜂蜜

マルトデキストリン

イブプロフェン

微結晶セルロース (CMC)

ポリビニルピロリドン (PVP)

【0318】

10

20

30

40

50

ある特定の実施形態では、上記の (i) ~ (v i) の組成物のいずれか 1 つ、または任意の組み合わせを除外することができる。具体的には、本発明の組成物は、上記の (i)、または (i i)、または (i i i)、または (i v)、(v) または (v i) の組成物を除外することができ、あるいは上記の組成物の以下の組み合わせのうちいずれかを除外することができる：

(i) 及び (i i) ; (i) 及び (i i i) ; (i) 及び (i v) ; (i) 及び (v) ; (i) 及び (v i) ; (i i) 及び (i i i) ; (i i) 及び (i v) ; (i i) 及び (v) ; (i i) 及び (v i) ; (i i i) 及び (i v) ; (i i i) 及び (v) ; (i i i) 及び (v i) ; (i v) 及び (v) ; (i v) 及び (v i) ; もしくは (v) 及び (v i) ; または

(i)、(i i) 及び (i i i) ; (i)、(i i) 及び (i v) ; (i)、(i i) 及び (v) ; (i)、(i i) 及び (v i) ; (i)、(i i i) 及び (i v) ; (i)、(i i i) 及び (v) ; (i)、(i i i) 及び (v i) ; (i)、(i v) 及び (v) ; (i)、(i v) 及び (v i) ; (i)、(v) 及び (v i) ; (i i)、(i i i) 及び (i v) ; (i i)、(i i i) 及び (v) ; (i i)、(i i i) 及び (v i) ; (i i)、(i v) 及び (v) ; (i i)、(i v) 及び (v i) ; (i i)、(v) 及び (v i) ; (i i i)、(i v) 及び (v) ; (i i i)、(i v) 及び (v i) ; もしくは (i i i)、(v) 及び (v i) ; または

(i)、(i i)、(i i i) 及び (i v) ; (i)、(i i)、(i i i) 及び (v) ; (i)、(i i)、(i i i) 及び (v i) ; (i)、(i i i)、(i v) 及び (v) ; (i)、(i i i)、(i v) 及び (v i) ; (i)、(i i i)、(v) 及び (v i) ; (i)、(i v)、(v) 及び (v i) ; (i i)、(i i i)、(i v) 及び (v) ; (i i)、(i i i)、(i v) 及び (v i) ; (i i)、(i i i)、(v) 及び (v i) ; (i i)、(i v)、(v) 及び (v i) ; もしくは (i i i)、(i v)、(v) 及び (v i) ; または

(i)、(i i)、(i i i)、(i v) 及び (v) ; (i)、(i i)、(i i i)、(i v) 及び (v i) ; (i)、(i i)、(i v)、(v) 及び (v i) ; もしくは (i)、(i i i)、(i v)、(v) 及び (v i) ; または

(i)、(i i)、(i i i)、(i v)、(v) 及び (v i)。

【 0 3 1 9 】

非水性溶媒を含む本発明の組成物の具体例を実施例 3 9 に記載する。

【 0 3 2 0 】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明の繊維または組成物を、(必要な場合に、繊維または組成物を、過酸化水素を放出するのに十分な自由水と接触させたとき) 抗微生物性であるが、実質的に細胞毒性でも細胞増殖抑制性でもない濃度で、またはある期間にわたり使用することが重要であり得る。

【 0 3 2 1 】

S u r g i h o n e y は、以下の実施例 2 0 に詳細に記載する本発明の組成物のいくつかの実施形態に与えられた名前である。以下の実施例 4 1 は、マスト細胞での濃度の異なる様々な S u r g i h o n e y 製剤の効果を記載している。マスト細胞は、外部環境、例えば鼻粘膜組織と密に接触する組織の上皮直下に位置する監視細胞である。この細胞は病原体の認識及び免疫応答の調節において重要な役割を果たす。実施例 4 1 は、ヒトマスト細胞株 H M C - 1 細胞に対する、濃度の異なる S u r g i h o n e y の効果を記載している。

【 0 3 2 2 】

実施例 4 1 の結果は、ヒトまたは動物の対象を組成物で治療する際、S u r g i h o n e y (特に S 1、S 2、または S 3 製剤、好ましくは S 2 または S 3 製剤)、または本発明の他の組成物を、1 0 0 g / L 未満、好ましくは 4 0 g / L 以下、1 0 g / L 以下、または 1 g / L 以下の濃度で使用すると有益であり得ることを示している。これは、外部環境、例えば鼻粘膜組織と密に接触する組織の上皮など、マスト細胞が存在する場合に特に

10

20

30

40

50

有益であり得る。このような濃度は、副鼻腔炎及び鼻副鼻腔炎などの鼻の病態；上気道感染症（例えば扁桃炎、喉頭炎及び副鼻腔炎）または下気道感染症（例えば気管支炎、肺炎、細気管支炎及び結核）などの気道感染症；慢性閉塞性肺疾患；及び嚢胞性肺線維症の治療に特に効果的であり得る。

【0323】

ヒトまたは動物の対象を組成物で治療する際に、Surghoneyまたは本発明の他の組成物と、ヒトまたは動物細胞との接触を、24時間未満、好ましくは6時間未満または3時間未満に制限することも有益であり得る。これは、外部環境、例えば鼻粘膜組織と密に接触する組織の上皮など、マスト細胞が存在する場合に特に有益であり得る。このような限定的な接触は、副鼻腔炎及び鼻副鼻腔炎などの鼻の病態；上気道感染症（例えば扁桃炎、喉頭炎及び副鼻腔炎）または下気道感染症（例えば気管支炎、肺炎、細気管支炎及び結核）などの気道感染症；慢性閉塞性肺疾患；及び嚢胞性肺線維症の治療に特に効果的であり得る。

10

【0324】

本発明の好ましい実施形態、ならびに本発明の繊維、ドレッシング材及び組成物の作製に使用できる好ましい組成物を、添付図面を参照して、単なる例示として以降に記載する。

【実施例】

【0325】

実施例 1

本実施例では、本発明に使用する貯蔵安定性のある組成物の好ましい製造工程、及びこの貯蔵安定性のある組成物を希釈して過酸化水素を放出させる好ましい工程について記載する。

20

【0326】

「活性」蜂蜜の製造工程

熱交換器を使用して、蜂蜜を80℃で2分間加熱する（所望により、これより低い温度を使用することができる。カタラーゼの不活化に十分であれば、少なくとも60℃が好適である）。この加熱工程の目的は、蜂蜜を低温殺菌すること、収穫後の蜂蜜に存在し得る何らかの蜜蝋粒子及びミツバチの羽を濾過して除去できるように蜂蜜の粘度を低減すること、ならびに過酸化水素の効果的な発生に影響を及ぼす蜂蜜中の任意のカタラーゼをも不活化することである。

30

【0327】

次に低温殺菌蜂蜜を濾過して放置し、通常ハチの巣の温度（35～40℃）まで自然冷却する。次いで、この蜂蜜中に天然で存在していたが、低温殺菌工程によって不活化されたグルコースオキシダーゼの代わりに、低濃度（蜂蜜で通常見られる濃度に相当する）のグルコースオキシダーゼを添加する。濾過した低温殺菌蜂蜜は35～40℃でほぼ液体であるため、このグルコースオキシダーゼと容易に混合することができる。ただし、この混合を室温で行うことができないというわけではない。その後、得られた「活性」蜂蜜を室温で保存する。

40

【0328】

不活化したグルコースオキシダーゼの入れ換え以外は、この天然蜂蜜組成物には何の変更も加えない。「活性」蜂蜜中には検出可能な過酸化水素はない。

【0329】

「活性」蜂蜜の希釈

「活性」蜂蜜の希釈後、自由水が供給され、グルコースオキシダーゼによって蜂蜜中に存在するグルコースの変換が開始されると、時間の経過後に過酸化水素が放出される。過酸化水素濃度は2 mmol / リットル未満であるが、長時間放出される。

【0330】

実施例 2

本実施例では、活性ウルモ蜂蜜の抗微生物効果を実証する試験の結果について記載する

50

。添加されたグルコースオキシダーゼを含む場合、この蜂蜜を「活性」と記載する。

【0331】

ウェル拡散アッセイ

Staphylococcus aureus (NCIMB 9518) を栄養寒天上または栄養ブロス中で増殖させた。

【0332】

一晚培養液を綿棒で採取して寒天プレート表面に置くことにより、抗生物質拡散寒天プレートに培養物を播種した。プレートを15分間室温で静置した。寒天表面に直径7mmのウェルを開けた。200マイクロリットルのサンプル(フェノール標準物質または蜂蜜)を各ウェルに入れた。

【0333】

プレートを16時間インキュベートし、ダイヤル式ノギス(+/-0.1mm)を使用して阻止円を測定した。ウェルの直径を含んだ阻止円の直径を記録した。

【0334】

フェノール標準物質は、フェノールを精製水で必要な濃度に希釈することによって調製した。例えば10%フェノール標準物質は、フェノール1gを精製水9gで希釈することによって調製した。この標準物質を30℃で保存し、使用前に振盪した。

【0335】

蜂蜜

蜂蜜：低温殺菌ウルモ蜂蜜

【0336】

非活性蜂蜜(すなわち、グルコースオキシダーゼを添加していない蜂蜜)を対照として使用した。

【0337】

酵素調製

グルコースオキシダーゼ：医療機器等級材料、非食品等級、GMO *Aspergillus niger* 由来、Biozyme UKにより供給、活性240iu/mg。最初は0.5% w/wの酵素を使用した。これを0.005% w/wの酵素に減らすと20%フェノール標準物質同等物を得ることができる。

【0338】

過酸化水素の検出

Merckoquantの過酸化物試験：カタログ番号1.10011.0002、測定範囲/カラスケールメモリmg/l H_2O_2 0.5 - 2 - 5 - 10 - 25。

【0339】

水溶液中での測定手順：50/50w/wで蜂蜜を水に溶解する。試験片の反応ゾーンを1秒間測定サンプル(15~30℃)に浸す。過剰液体を試験片の長端から吸収性ペーパータオルへと移し、15秒後(カタログ番号110011)または5秒後(カタログ番号110081)、反応ゾーンの色が最も正確に一致するラベル上の色領域を判定する。対応する結果をmg/l H_2O_2 単位で読み取るか、または必要に応じて中間値を推定する。

【0340】

蜂蜜に内在性の過酸化水素が存在しないことを確認するため、50/50w/wでメタノールに溶解する。有機溶媒(易揮発性エーテル)中での測定：試験片の反応ゾーンを1秒間測定サンプル(15~30℃)に浸す。溶媒を蒸発させた後(3~30秒間、試験片を前後にゆっくりあおぐ)、反応ゾーンを1秒間蒸留水に浸し、過剰液体を試験片の長端から吸収性ペーパータオルへと移すか、または反応ゾーンを3~5秒間ずつ4回、静かに吹く。15秒後(カタログ番号110011)または5秒後(カタログ番号110081)、反応ゾーンの色が最も正確に一致するラベル上の色領域を判定する。対応する結果をmg/l H_2O_2 単位で読み取るか、または必要に応じて中間値を推定する。

【0341】

10

20

30

40

50

結果

図 1 a はウェル拡散アッセイの結果を示す。このアッセイでは、低温殺菌ウルモ蜂蜜、異なる量のグルコースオキシダーゼ酵素製剤（0.1%、0.01%、0.01%、0.0015 または 0.0001% w/w）を添加した低温殺菌ウルモ蜂蜜、またはマヌカ UMF 25 + 蜂蜜を含有するサンプルを、*Staphylococcus aureus* を播種した寒天プレートのウェルに加えた。この結果は、サンプルごとに記録した阻止円の直径を示している。

【0342】

少なくとも 0.001% w/w のグルコースオキシダーゼ（240 iu/mg）を含有する活性蜂蜜の *Staphylococcus aureus* に対する抗微生物効果は、マヌカ 25 + 蜂蜜の抗微生物効果と同等であった。

10

【0343】

活性蜂蜜の効果は殺菌性である。

【0344】

図 1 b はウェル拡散アッセイの結果を示す。このアッセイでは、0.5% w/w のグルコースオキシダーゼ酵素製剤を添加した低温殺菌ウルモ蜂蜜を含有するサンプルを、MGO マヌカ蜂蜜、マヌカ 25 + 蜂蜜、及び一連の異なるフェノール標準物質（10% ~ 40%）のサンプルと比較した。この結果は、サンプルごとの阻止円の面積を示している。

【0345】

この結果は、活性ウルモ蜂蜜の効果が 30% フェノール標準物質と同等であり、MGO マヌカ蜂蜜の 2 倍を超える有効性があり、マヌカ UMF 25 + 蜂蜜のほぼ 2 倍の有効性があったことを示している。

20

【0346】

図 2 は、好適な量の酵素を付加することにより、活性蜂蜜の効力を要求に適合するように調整できることを示している。

【0347】

実施例 3

本実施例では、活性ティネオ蜂蜜の抗微生物効果を実証する試験の結果について記載する。添加されたグルコースオキシダーゼを含む場合、この蜂蜜を「活性」と記載する。

【0348】

ティネオ蜂蜜のサンプル及び種々のフェノール標準物質を使用して、実施例 2 に記載のようにウェル拡散アッセイを行った。図 3 a は、種々のサンプルによって生じた *Staphylococcus aureus* の阻止円を示す、2 連の寒天プレートの写真である。この図には、寒天プレートのウェル内のサンプルの配置を示す表示を含んでいる。

30

1. 10% フェノール標準物質
2. 20% フェノール標準物質
3. 30% フェノール標準物質
4. ティネオ蜂蜜（添加されたグルコースオキシダーゼを含有しない低温殺菌ティネオ蜂蜜）
5. ティネオ不活性（更に熱失活を行った低温殺菌ティネオ蜂蜜）
6. マヌカ UMF 25 +
7. ティネオ 20 + （グルコースオキシダーゼ（0.005% Biozyme 酵素）を添加した低温殺菌ティネオ蜂蜜）

40

【0349】

図 3 a は、ティネオ蜂蜜単独またはティネオ不活性蜂蜜のいずれによっても、*Staphylococcus aureus* の増殖が阻止されなかったことを示している。グルコースオキシダーゼを添加したティネオ蜂蜜（ティネオ 20 +）の効果は、マヌカ UMF 25 + の効果よりも大きく、30% フェノール標準物質と同等であった。

【0350】

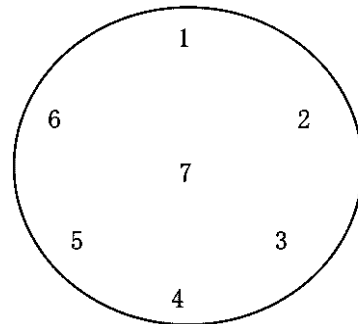
図 3 b は、種々のサンプルによって生じた *Staphylococcus aureu*

50

s の阻止円を示す寒天プレートの写真である。この種々のサンプルは、以下に示すように配列した。

【化 1】

1. 10%フェノール標準物質
2. 20%フェノール標準物質
3. 30%フェノール標準物質
4. ティネオ蜂蜜活性25+ (0.005%酵素w/w)
5. ティネオ蜂蜜活性25+ (0.005%酵素w/w)
6. ティネオ蜂蜜活性40+ (0.05%酵素w/w)
7. マヌカ蜂蜜UMF25+



10

【0351】

図3bは、ティネオ蜂蜜活性25+及び40+のサンプルは、マヌカ蜂蜜25+のサンプルよりも *Staphylococcus aureus* の増殖の阻止に有効であったことを示している。

【0352】

実施例4

本実施例では、活性ウルモ蜂蜜及びティネオ蜂蜜の抗微生物効果を実証する試験の結果について記載する。

20

【0353】

図4aは、ウェル拡散アッセイを3回繰り返した結果を示している。このアッセイは、実施例2に記載するように、24時間のインキュベーション後、*Staphylococcus aureus* 増殖の阻止円を測定して実施した。脱イオン水中の濃度範囲40~10%のフェノールのサンプル、2種類のマヌカ(マヌカUMF25+、マヌカ550MGO)のサンプル、及び0.01% w/wのBiozymeグルコースオキシダーゼを有する活性ウルモ蜂蜜のサンプル(実施例2と同様)。

【0354】

図4bは、更に別のウェル拡散アッセイの結果を示す。グルコースオキシダーゼ(実施例2に記載のBiozyme製剤)を低温殺菌ウルモ蜂蜜に添加し(0.005%酵素w/w)、40で24時間または72時間保存した。次に、保存した活性蜂蜜のサンプルを、実施例2に記載するようなウェル拡散アッセイにおいて *Staphylococcus aureus* に対する活性について試験し、一連の4~25%フェノール標準物質と比較した。図4bは、40で72時間保存したとき活性蜂蜜が安定であったことと、活性蜂蜜は *Staphylococcus aureus* に対する有効性が20%フェノール標準物質と同等であったことを示している。

30

【0355】

図4cは更に別のウェル拡散アッセイの結果を示す。このアッセイでは、低温殺菌ウルモ蜂蜜(実施例2に記載のBiozyme製剤、0.5% w/w)の新しいバッチと古いバッチ(古いバッチは新しいバッチの約4か月前に入手した)の活性、及び添加するグルコースオキシダーゼの量を逡増したティネオ蜂蜜(実施例2に記載のBiozyme製剤、0.0005~0.5% w/w)の活性を、マヌカ18+及び25+UMF蜂蜜、ならびに一連の10~40%フェノール標準物質と比較した。図4cにおいて、「通常」は入手時のままの低温殺菌蜂蜜を指し、「不活性」は更に熱失活させた低温殺菌蜂蜜を指し、「再活性」は更に熱失活させた後にグルコースオキシダーゼを付加している低温殺菌蜂蜜を指す。したがって、ウルモ蜂蜜はグルコースオキシダーゼの添加なし(「ウルモ古4通常」、「ウルモ新X」及び「ウルモ新Y」)、グルコースオキシダーゼありで試験した。図4cは、*Staphylococcus aureus* の阻止円の面積を示す。低温殺菌ウルモ蜂蜜の古いバッチ(「ウルモ古4再活性」)は、新しい低温殺菌バッチ(「ウルモ新X再活性」及び「ウルモ新Y再活性」)と同等の活性を保持しているこ

40

50

とがわかる。これらのバッチはすべて、マヌカ蜂蜜 18 + よりも約 2 倍高い活性を示し、マヌカ蜂蜜 25 + よりも高い活性を示した。低温殺菌ティネオ蜂蜜に添加するグルコースオキシダーゼの量を増加させたところと、蜂蜜の活性が増加した。

【0356】

この試験では、0.005% w/w の酵素は、10% フェノール標準物質とほぼ同等であり、0.05% w/w の酵素は、15% フェノール標準物質とほぼ同等であり、0.5% w/w の酵素は、25% フェノール標準物質とほぼ同等であった。マヌカ 18 + 蜂蜜は 10% フェノール標準物質と同等であり、マヌカ 25 + 蜂蜜は、10% フェノール標準物質と 15% フェノール標準物質の中間の活性を示した。

【0357】

実施例 5

本実施例では、種々のグルコースオキシダーゼ酵素製剤の効果を、低温殺菌ティネオ蜂蜜を用いて試験した。使用した酵素製剤は、実施例 2 に記載の Biozyme 製剤、及び ANHUI MINMETALS DEVELOPMENT I/E CO., LTD 製の食品等級の非 GMO 起源グルコースオキシダーゼ（以下、「Anhui」酵素製剤と呼ぶ）であった。

【0358】

図 5 a は、実施例 2 に記載するように実施したウェル拡散アッセイの結果を示す。このアッセイでは、酵素を含有しない低温殺菌ティネオ蜂蜜、または 0.005 ~ 0.05% w/w の Anhui 酵素を含有する低温殺菌ティネオ蜂蜜のサンプルを、種々のフェノール標準物質（10%、20%、30%）及びマヌカ蜂蜜 UMF 25 + のサンプルと比較した。この結果は、酵素の量を増やすと、Staphylococcus aureus に対する活性蜂蜜の有効性が増加することを示している。0.0125% w/w の酵素は、20% フェノール標準物質及びマヌカ蜂蜜サンプルとほぼ同等であり、0.05% w/w の酵素は、30% フェノール標準物質とほぼ同等であった。

【0359】

図 5 b は、実施例 2 に記載するように実施したウェル拡散アッセイの結果を示しており、このアッセイでは、市販のバッチの低温殺菌ティネオ蜂蜜のサンプルに異なる量の酵素を添加した。「ティネオ」サンプルはグルコースオキシダーゼを添加していない低温殺菌蜂蜜である。「ティネオ不活性」サンプルは、更に熱処理された低温殺菌蜂蜜であり、添加したグルコースオキシダーゼを含有しない。「ティネオ 20 +」サンプルは、0.005% w/w の Biozyme グルコースオキシダーゼを含有する。この結果は、ティネオサンプルが Staphylococcus aureus に対して活性を有しないことを示している。ティネオ 20 + サンプルは Staphylococcus aureus に対して、マヌカ 25 + よりも有効であり、20% フェノール標準物質と 30% フェノール標準物質の中間であった。

【0360】

実施例 6

本実施例では、60 日間または 90 日間保存した活性蜂蜜の安定性試験の結果について記載する。

【0361】

低温殺菌ウルモまたはティネオ蜂蜜に、実施例 2 に記載の Biozyme 製のグルコースオキシダーゼ酵素を 0.005% w/w で添加し、得られた混合物を 37℃ で 2 か月間（ウルモ蜂蜜サンプル）または室温で 90 日間（ティネオ蜂蜜サンプル）保存した。使用した酵素量は、市販の食品に使用される量に相当する。

【0362】

保存後のサンプルを、実施例 2 に記載するように実施した Staphylococcus aureus に対するウェル拡散アッセイで試験した。保存したサンプルを、10%、20%、及び 30% フェノール標準物質と比較した。図 6 a はウルモ蜂蜜サンプルの結果を示し、図 6 b はティネオ蜂蜜サンプルの結果を示す。いずれの種類の蜂蜜にも、保存

10

20

30

40

50

期間中に明らかな活性の損失はなかった。

【0363】

実施例 7

本実施例では、粉末形態のグルコースオキシダーゼ酵素を粉末蜂蜜に添加した、粉末活性蜂蜜の抗微生物活性の試験結果について記載する。

【0364】

粉末蜂蜜は、ADM Specialty Ingredients 製の Honi Bake より得た。この粉末蜂蜜に 0.1% w/w Biozyme グルコースオキシダーゼ（実施例 2 に記載）を添加した。この混合物の抗微生物活性を、実施例 2 に記載するように実施した *Staphylococcus aureus* に対するウェル拡散アッセイで試験した。混合物を寒天プレートの 2 つの異なるウェルに添加した。蜂蜜粉末のみを対照に使用した。結果を図 7 a に示す。対照のウェルはまったく活性を示さなかったが、活性蜂蜜は明らかな阻止円を示した。

【0365】

図 7 b は別のウェル拡散アッセイの結果を示しており、このアッセイでは、種々の粉末蜂蜜を、ANHUI MINMETALS DEVELOPMENT I/E CO., LTD 製の粉末酵素（実施例 5）と混合した。サンプルウェル 24 a は蜂蜜粉末のみであり、サンプルウェル 24 b は 1% w/w の酵素と混合した蜂蜜粉末である。ここでも明らかな阻止円を認めることができる。

【0366】

実施例 8

本実施例では、未低温殺菌蜂蜜と添加された精製グルコースオキシダーゼとを含む組成物の殺菌について記載する。

【0367】

この組成物を 50 g ずつ含有する 10 個の密封分包に、標的線量 11.6 ~ 14.2 kGy（線量計で測定した線量が 13.1 ~ 13.6 kGy であった）でガンマ線照射した後、個別に無菌性を試験した。

【0368】

無菌性試験では、すべての作業をクリーンルーム内の層流下で実施した。上記の組成物 10 g を 100 ml の無菌トリプトン大豆ブロス（TSB：カゼインの腭液消化物 17 g / L、大豆ミールのパイン消化物 3 g / L、塩化ナトリウム 5 g / L、二塩基性リン酸カリウム 2.5 g / L、グルコース 2.5 g / L、pH 7.3 ± 0.2）に添加し、振盪して混合した後、無菌容器へ移した。TSB 100 ml を更に添加してサンプル残渣を除去し、同じ容器へ加えた。TSB をサンプルに添加し、30 ± 2 で最低 14 日間インキュベートし、微生物増殖の兆候を観察した。試験開始前にすべての培地で陽性対照を実施した。

【0369】

インキュベーション期間完了後、1 つの陽性結果が認められた。35 kGy の実証を殺菌線量と認定した。

【0370】

実施例 2 に記載したアッセイと同様のウェル拡散アッセイを使用した、ガンマ線照射による殺菌前後の分包の試験で、組成物の抗微生物活性に及ぼす照射の影響は無視できることが確認された。殺菌後の活性レベルに観測可能な減少はなかった。

【0371】

実施例 9

本実施例では、未低温殺菌蜂蜜と添加された精製グルコースオキシダーゼとを含み（「Surghihoney」と呼ぶ）、ガンマ線照射を使用して殺菌された組成物の抗微生物効果を、マヌカ UMF 25 + 蜂蜜及び熱失活させた蜂蜜（不活性蜂蜜）と比較して実証する試験の結果について記載する。

【0372】

マヌカ蜂蜜UMF25+、不活性蜂蜜及びSurghoneyのサンプルを使用して、実施例2に記載するようなウェル拡散アッセイを実施した。図8(a)は、種々のサンプルによって生じたStaphylococcus aureus(ATCC9518)の阻止円を示す寒天プレートの写真である。図中、マヌカ蜂蜜UMF25+はプレートの最上段にあり、不活性蜂蜜は中段にあり、Surghoneyは下段にある。図8(b)は、マヌカUMF25+蜂蜜で処理したプレート(最上段)、及びSurghoneyで処理したプレート(下段)を示している。

【0373】

この結果は、Surghoneyが殺菌後にStaphylococcus aureusに対する有意な抗微生物活性を保持しており、またSurghoneyがマヌカ蜂蜜UMF25+よりもStaphylococcus aureusに対して有効であったことを明瞭に示している。

【0374】

実施例10

未低温殺菌蜂蜜と、添加された精製グルコースオキシダーゼとを含み、ガンマ線照射(最小線量35kGy)を使用して殺菌された組成物の安定性試験。

【0375】

加速劣化技術は、材料の劣化に伴う化学反応がアレニウスの反応速度関数に従うという仮定に基づくものである。この関数は、均一な工程で温度が10増加または減少すると、化学反応速度が約2倍または約1/2に変化することを示している。例えば、55での5.3週間は、棚上での保存1年間に相当し、55での10.6週間は2年に相当し、26.5週間は5年間に相当する。

【0376】

この試験では2種類の製造バッチからの製品を使用した。製品は、上記の組成物10gを含有する分包であった。この分包は、最小線量35kGyのガンマ線照射で殺菌されている。サンプルを加速劣化条件の55(±2)で保存した。

【0377】

実時間と加速劣化との間の関係は以下のとおりである。

【表2】

実時間相当(月数)	55℃での加速劣化	
	日数	週数
3	9	1.3
6	19	2.6
12	37	5.3
24	74	10.6
36	111	15.9
48	148	21.2
60	185	26.5

表2

【0378】

試験、試験間隔及び必要なサンプル

各バッチからのサンプルを同じ時間間隔で試験した。以下の表に、実施した試験、及びバッチごとの各時点で必要なサンプル総数をまとめている。

【表 3】

試験	時間間隔（実際＝ R；加速＝A）す べて週数	
	26週	
	26R	2.6A
分包充填重 量	10	10
圧力試験	10*	10*
蜂蜜のpH	5**	5**
水分レベル	5**	5**
色	1	1
無菌性		
バッチ当た りのサンプ ル	11	11
総サンプル	33	33

10

20

*分包の充填重量試験の場合と同様のサンプルを使用

**圧力試験から5つのサンプルを使用

表 3

【0379】

試験方法

分包の充填重量：空の分包の平均風袋重量は1.7gである。10個の分包を、較正済みの実験室用秤で個々に秤量し、この風袋重量を減算して結果を記録した。

【0380】

圧力試験：標準的な操作手順に従って、各分包を圧力試験装置で試験した。合格及び不合格数を記録した。

30

【0381】

蜂蜜のpH：5分包の含有物をガラスビーカーに入れた。3種の標準液を使用してHanna pH計を較正した後、電極を脱イオン水中ですすいだ。pH電極及び温度プローブを蜂蜜サンプルに浸し、pH値と温度をデジタル表示から読み取って記録した。

【0382】

水分レベル：各時点で5分包の蜂蜜を採取した。各分包からサンプル約1mlを採取し、屈折計のサンプルプレート上に置いた（1回につき1サンプル）。サンプルカバーを閉め、装置を窓などの光源に向けながら、使用者がレンズを通して観察した。影の線によって指示される目盛りの値を読み取り、結果を記録した。

40

【0383】

色：1分包の蜂蜜を開封し、少量の蜂蜜組成物を白色タイル上に置いた。蜂蜜組成物の色をHoney Colour Chart Pfund Scaleと比較し、スコアを記録した（30～800）。

【0384】

結果

分包の充填重量 - 加速劣化

バッチA：

【表 4】

試験間 隔(週数)	蜂蜜のグラム重量－総重量から風袋重量を減算									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.6	10.3	10.3	10.1	10.2	10.3	10.3	10.2	10.3	10.3	10.2

表 4

【0385】

10

バッチ B :

【表 5】

試験間 隔(週数)	蜂蜜のグラム重量－総重量から風袋重量を減算									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
2.6	10.3	12.1	10.3	10.6	10.6	9.8	10.1	10.1	10.1	9.8

表 5

【0386】

20

圧力試験結果 - 加速劣化

【表 6】

試験間隔(週 数)	バッチA	バッチB
2.6	10/10	10/10

表 6

【0387】

30

pH 試験結果 - 加速劣化

【表 7】

試験間隔(週 数)	バッチA		バッチB	
	pH	温度(℃)	pH	温度(℃)
2.6	3.8	23.1	3.71	23.0

表 7

【0388】

水分量試験結果 - 加速劣化

バッチ A :

【表 8】

40

試験間隔(週 数)	サンプル 1 (%)	サンプル 2 (%)	サンプル 3 (%)	サンプル 4 (%)	サンプル 5 (%)
2.6	15.8	15.8	15.8	15.8	15.6

表 8

【0389】

バッチ B :

【表 9】

試験間隔(週数)	サンプル 1 (%)	サンプル 2 (%)	サンプル 3 (%)	サンプル 4 (%)	サンプル 5 (%)
2.6	15.6	15.8	15.6	16.2	16.2

表 9

【0390】

色試験結果 - 加速劣化

【表 10】

10

試験間隔 (週数)	Pfundスケールスコア	
	バッチA	バッチB
2.6	90-120	90-120

表 10

【0391】

以下の実施例 11 ~ 19 は、未低温殺菌蜂蜜と、添加されたグルコースオキシダーゼを含む組成物（各実施例で、この組成物を「Surgihoney」と呼ぶ）を使用した、創傷の治療結果について記載する。Surgihoney は、10g ずつ組成物を含有する密封分包に入れた。この分包を、ガンマ線照射を使用して殺菌した。治療 0 日目から分包を使用した。ドレッシング材を交換するごとに、新しく Surgihoney を塗布した。ドレッシング材は、実施例に記録した日ごとに、または場合によってそれよりも頻繁に交換した。Surgihoney はドレッシング材に塗布するか、または創傷に直接塗布した後にドレッシング材で覆った。いずれの場合にも、Surgihoney を創傷と直接接触させ、ドレッシング材で覆った。

20

【0392】

実施例 11

本実施例では、Surgihoney を使用した、感染性足趾の治療結果について記載する。結果を図 9 に示す。

30

【0393】

患者は糖尿病の 78 歳男性であった。左足の創傷は治療開始前の 1 か月にわたって発生し、軽度の痛みが生じていた。

- a) 0 日目 - 創傷プロファイル：創傷：3 x 2 x 1 cm；99% 健全な肉芽であるが、1% の緑色コロニー形成；周囲の皮膚のはがれ；臭いを発する少量の黄色膿滲出液；
- b) 5 日目 - 創傷プロファイル：創傷改善；各回 1 分包の蜂蜜を塗布したドレッシング材の交換 2 回目；メトロニダゾール及びアモキシシリン；ティーツリー油も塗布；
- c) 10 日目 - 創傷プロファイル：創傷改善；緑色コロニー形成消失；創傷を洗浄し、乾燥皮膚を取り除き、更に蜂蜜の分包を塗布した。

40

【0394】

実施例 12

本実施例では、Surgihoney を使用した、足趾潰瘍の治療結果について記載する。結果を図 10 に示す。

【0395】

患者は糖尿病の 61 歳女性であり、治療前の 1 か月間にわたって発生し、軽度の痛みが生じている感染性の足趾潰瘍を右足に有していた。

- a) 0 日目 - 創傷プロファイル：創傷：2 x 2 x 0.2 cm；1% の黄褐色瘡蓋、残りは肉芽組織；低量の黄色滲出液；
- b) 7 日目 - 創傷プロファイル：創傷改善；ドレッシング材の交換時に 0.5 分包の S u

50

r g i h o n e y を毎日塗布；F l u c o x ；

c) 10 日目 - 創傷プロファイル：創傷が更に改善；F l u c o x 中止。

【0396】

実施例 13

本実施例では、S u r g i h o n e y を使用した、足部潰瘍の治療結果について記載する。結果を図 11 に示す。

【0397】

患者は糖尿病の 50 歳女性であり、治療前月に発生した足部潰瘍を有していた。皮膚は脆弱であったが、痛みは報告されなかった。

a) 0 日目 - 創傷プロファイル：創傷：1 x 0 . 5 x 0 . 5 c m ；1 % の黄褐色瘡蓋、残りは肉芽組織；極低量の黄色滲出液；

b) 7 日目 - 創傷プロファイル：創傷改善；乾燥；瘡蓋が健常な肉芽に置き換わる；大きさと深さが減少；創傷を生理食塩水で洗浄後、蜂蜜ドレッシング材（0 . 5 分包）を貼付；抗生物質なし；

c) 9 日目 - 創傷プロファイル：創傷が大きく改善；ほぼ閉鎖し、滲出液は存在せず；それぞれ 0 . 5 分包のドレッシング材の貼付を継続。

【0398】

実施例 14

本実施例では、S u r g i h o n e y を使用した、糖尿病性足部潰瘍の治療結果について記載する。結果を図 12 に示す。

【0399】

患者は男性で、低品質の靴の刺激作用によって生じた糖尿病性足部潰瘍を有していた。この患者は、治療前の 1 か月未満、潰瘍を有していた。

a) 0 日目 - 創傷プロファイル：周辺皮膚の赤みと軽度の痛み；1 % の瘡蓋、99 % の肉芽；感染症及び糖尿病；低量の黄色漿液滲出；創傷の大きさ：2 c m x 2 c m x 0 . 2 c m ；

b) 7 日目 - 創傷プロファイル：病院での診断は終了したが、1 日目から現在まで毎日ドレッシング材を交換。ドレッシング材は正看護師である義理の娘が手順書に従って交換した。創傷改善；100 % 健常肉芽；健常な周辺皮膚、軽度の痛み；抗生物質を使用、F l u c o x a c i l l i n 、500 m g 、6 時間ごとに 7 日間；創傷の大きさ：1 . 5 c m x 1 . 3 c m x 0 . 1 。

【0400】

実施例 15

本実施例では、S u r g i h o n e y を使用した、外傷性下腿創傷の治療結果について記載する。結果を図 13 に示す。

【0401】

患者は 95 歳女性で、中程度の痛みが生じている外傷性創傷を下肢に有していた。

a) 0 日目 - 創傷プロファイル：創傷：15 x 12 x 1 c m ；大部分は肉芽組織であるが、創傷床の 1 % は壊死して黒色；中量の血性滲出液；

b) 3 日目 - 創傷プロファイル：創傷変化なし；更なる壊死はないが創傷はほぼ同じ；蜂蜜 1 分包を塗布；拭き取り検体：E n t r e c o c c u s s p . ；抗生物質なし；

c) 8 日目 - 創傷プロファイル：創傷改善；滲出液の量が減り、壊死組織が減少。

【0402】

実施例 16

本実施例では、S u r g i h o n e y を使用した、感染性下腿創傷の治療結果について記載する。結果を図 14 に示す。

【0403】

患者は 91 歳女性で、感染性創傷を下肢に有していた。周辺皮膚は脆弱であり、軽度の痛みが存在した。

a) 0 日目 - 創傷プロファイル：創傷の大きさ：4 . 5 x 2 . 5 c m ；大部分の肉芽組織

10

20

30

40

50

に赤み、1%の黄色/茶色瘡蓋；中量の黄色漿液滲出。

b) 15日目 - 創傷プロファイル：創傷改善；大きさ：4 x 2 cm；瘡蓋は減少し、漿液滲出が存在；

c) 19日目 - 創傷プロファイル：創傷改善；各ドレッシング材にSurgihoneyを塗布。

【0404】

実施例17

本実施例では、Surgihoneyを使用した、下腿潰瘍の治療結果について記載する。結果を図15に示す。

【0405】

患者は女性で、治療開始前の1年にわたり発生している下腿潰瘍を有しており、軽度の痛みが生じていた。

a) 0日目 - 創傷プロファイル：健常な周辺皮膚；1%の瘡蓋、99%の肉芽；中量の黄色漿液滲出；創傷の大きさ：7 cm x 3 cm；

b) 7日目 - 創傷プロファイル：創傷改善、患者は地域ケアを利用；1分包のSurgihoneyを塗布；大きさが減少し、存在する滲出液が減少；耐えられる程度に痛みが緩和。

【0406】

実施例18

本実施例では、Surgihoneyを使用した、褥瘡性潰瘍の治療結果について記載する。結果を図16に示す。

【0407】

患者は糖尿病の88歳女性で、栄養不良状態であった。この患者は、治療前6か月間にわたり発生していた褥瘡性潰瘍（等級3）を有した。中程度の痛みが生じており、周辺皮膚は脆弱であった。

a) 0日目 - 創傷プロファイル：創傷の大きさ：0.7 x 0.7 x 0.2 cm；黄色/茶色瘡蓋1%、蜂窩織炎組織1%、残りは肉芽；低量の黄色膿が存在；

b) 3日目 - 創傷プロファイル：創傷治癒（創傷は閉鎖）；1分包のSurgihoneyを塗布。

【0408】

実施例19

本実施例では、Surgihoneyを使用した、カテーテル挿入口周辺の感染症の治療結果について記載する。結果を図17に示す。

【0409】

患者は、41歳女性の癌患者であった。この患者はカテーテル挿入口周辺の乳房領域に感染症を有していた。創傷は、治療前に発生して1週間未満しか経過しておらず、軽度の痛みが生じていた。

a) 0日目 - 創傷プロファイル：創傷：2 cm x 2 cm；蜂窩織炎1%、残りは肉芽組織；低量の赤色漿液滲出；

b) 6日目 - 創傷プロファイル：創傷は大きく改善；滲出液なし；1分包のSurgihoneyを塗布；拭き取り検体を行ったが増殖なし；抗生物質なし；

c) 14日目 - 創傷プロファイル：創傷はもはや問題ではない程度まで改善。

【0410】

実施例20

Surgihoney

Surgihoneyは、精製グルコースオキシダーゼを添加した未低温殺菌蜂蜜である。抗微生物力が異なる3種類のSurgihoney調製物を作製した。

【0411】

S1 Surgihoney（別称：SH1）：0.1%（w/w）のグルコースオキシダーゼを添加した未低温殺菌蜂蜜。使用した酵素は、BIO-CAT INC製Asp

10

20

30

40

50

ergillius niger 起源の食品等級グルコースオキシダーゼであり、活性は 15,000 ユニット/g であった。50g の S1 Surgihoney を含有する密封分包を標的線量 11/6 ~ 14.2 kGy でガンマ線照射した。

【0412】

S2 Surgihoney (別称: SH2): 0.1% (w/w) のグルコースオキシダーゼを添加した未低温殺菌蜂蜜。使用した酵素は、BBI Enzymes Limited 製 *Aspergillus niger* 起源のグルコースオキシダーゼ (GO3B2) であり、活性は 274 ユニット/mg であった。ユニットの定義: pH 7.0、摂氏 25 で毎分 1 マイクロモルのグルコースを酸化させる酵素量。夾雑物: アルファアミラーゼ 0.05% 以下、サッカラーゼ 0.05% 以下、マルターゼ 0.05% 以下及び G

10

【0413】

S3 Surgihoney (別称: SH3): 0.25% (w/w) のグルコースオキシダーゼを添加した未低温殺菌蜂蜜。使用した酵素は、BBI Enzymes Limited 製グルコースオキシダーゼ (GO3B2) であり、活性は 274 ユニット/mg であった。

【0414】

したがって、S1 Surgihoney は、組成物 1 グラム当たり 15 ユニットのグルコースオキシダーゼを含有し、S2 Surgihoney は、組成物 1 グラム当たり 274 ユニットのグルコースオキシダーゼを含有し、S3 Surgihoney は、組成物 1 グラム当たり 685 ユニットのグルコースオキシダーゼを含有する。

20

【0415】

実施例 21

Surgihoney の *in vitro* 抗微生物活性

本実施例では、ディスク拡散法、最小発育阻止濃度 (MIC) 及び最小殺菌濃度 (MBC) の測定、ならびに時間殺菌測定による、一連の創傷及び潰瘍細菌分離株の Surgihoney に対する感受性試験について記載する。

【0416】

概要

結果: Surgihoney は、広範なグラム陽性菌及びグラム陰性菌ならびに真菌に対し、極めて強力な阻止性と殺菌活性を示す。MIC/MBC は、局所的な臨床使用で達成する可能性が高い濃度よりも有意に低い。創傷における Surgihoney の局所濃度は、約 500 グラム/L と推定される。Staph. Aureus に対する Surgihoney 1 の MIC/MBC は 31 グラム/L 及び 125 グラム/L であり、Surgihoney 3 の MIC/MBC は 0.12 グラム/L 及び 0.24 グラム/L である。殺菌速度は効力に依存する。最も効力が弱い Surgihoney 1 では、試験した全微生物に対して 48 時間以内に完全な殺菌活性が生じた。最も効力が高い Surgihoney 3 では、殺菌活性は 30 分以内に生じた。Surgihoney 接種調製物を最大 1 週間保持すると、完全な殺菌活性が示され、細菌の残留が示されなかった。

30

【0417】

結論: Surgihoney は、皮膚病変、創傷、潰瘍及び空洞に対する、蜂蜜の治癒特性の効果と生体工学製品の強力な抗微生物活性とを組み合わせた、高活性の局所治療法として幅広い可能性を有している。これは多剤耐性細菌に対して高活性である。抗微生物活性に関して、試験したその他の蜂蜜よりも活性であり、化学消毒剤に匹敵する。

40

【0418】

表層創傷及び皮膚潰瘍は、多数の国での高齢者人口の増加、また肥満及び 2 型糖尿病の世界的な蔓延と共にますます一般化している。英国では、地域看護師が下腿潰瘍の手当に多くの時間を費やしており、また下腿潰瘍に関わる地域サービスの水準を維持しようとするれば、下腿潰瘍看護師による監督が必須である。皮膚の慢性損傷には多くの場合、細菌によるコロニーが形成されている。これらがいつ病原性になるか、また病原性であるかどうか

50

かを知することは困難であるが、明らかな感染が存在していなくとも、細菌コロニー形成は、組織の治癒を遅延させ、バイオフィルムを定着させ、その結果、創傷瘡蓋及び悪臭を生じさせる働きをする可能性が高い。

【0419】

組織の生存は、特に共存症と合併した場合に困難となる。慢性創傷には常に細菌によるコロニーが形成されており、これが治癒過程を不安定化する可能性がある。微生物サンプルを送付し、そのサンプルが増殖中の細菌であると報告された場合、全身性抗生物質を提供する試みがある。このサービスは単に、更に耐性のある微生物の選別することであるが、これが、慢性下肢潰瘍にメチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* 及び *Pseudomonas aeruginosa* などの多剤耐性微生物によるコロニーが頻繁に形成される理由である。

10

【0420】

Surghoney は、創傷に対する予防的ドレッシング材として開発された。本試験では、*Surghoney* の *in vitro* 特性を調べる。*Surghoney* は、天然蜂蜜の確立された治癒特性をすべて保持するが、その抗微生物活性は、必要とされるどの効力にも設定することができる。本試験では、*Surghoney* 1、2 及び 3 の最小発育阻止濃度 (MIC) 及び最小殺菌濃度 (MBC)、ならびに時間殺菌曲線を測定した。

【0421】

方法

効力等級が 1、2 及び 3 である *Surghoney* を用意した。*Surghoney* は、半固体形態で分包内の無菌医薬品等級製品として提供した。

20

【0422】

臨床分離株を軟組織微生物学サンプルから採取した。*Staphylococcus aureus* の分離株 18 株、メチシリン感受性 (MSSA) 12 株及びメチシリン耐性 (MRSA) 6 株、溶血性 *Streptococci* の分離株 6 株、ランスフィールド群 A (2)、B (2)、C (1)、G (1)、バンコマイシン耐性 *E. faecium* を含む *Enterococcus spp.* の分離株 5 株、広域スペクトルラクタマーゼ産生株を含む *Esch. coli* 6 株、*Klebsiella spp.* 2 株、*Serratia Marcescens* Amp C 産生株 1 株、*Pseudomonas aeruginosa* 4 株、*Acinetobacter lwoffii* 1 株、*Propionibacterium acnes* 1 株、*Bacteroides fragilis* 1 株、及び *Candida albicans* 2 株、*Candida glabrata* 1 株、*Aspergillus fumigatus* 1 株を *Surghoney* に対して試験した。

30

【0423】

寒天拡散

セミコンフルエントの増殖をもたらす濃度で試験微生物を既に播種した *isosensitest* 寒天内で、6 mm のウェルを切り取った。予備研究において、そのウェルに試験用 *Surghoney* とその他の蜂蜜を加えた。

40

【0424】

最初に予備研究を実施して、効力 S1、S2、S3 の *Surghoney* を、欧州、南アメリカ、ニュージーランド、イエメン、スーダンといった世界各地の種々の蜂蜜、医療用蜂蜜 *Medihoney*、ならびに銀 (*Silver Aquacell*) 及びヨウ素 (*Iodoflex*) を含有する抗微生物ドレッシング材と比較した。*Staphylococcus aureus* を播種したプレート内にウェルを切り取り、試験蜂蜜を充填するか、またはドレッシング材の場合は 2 x 2 cm に切り取って、播種したプレートの表面に置いた。

【0425】

予備研究後、効力 S1、S2、S3 の *Surghoney* を単独で、皮膚病変からの

50

一連の細菌分離株に対して試験した。約2グラムの3種の効力の未希釈 *Surghoney* を等容積の滅菌水で希釈して乳化させた調製物でウェルの表面まで充填した。好気性インキュベーションを18~24時間行った後、ゾーンの大きさを測定した(インキュベーションは *Candida* 及び *Aspergillus spp.* では長めであり、 *Propionibacterium sp.* 及び *Bacteroides sp.* では嫌気性であった)。

【0426】

最小発育阻止濃度及び最小殺菌濃度

Surghoney 生成物を37℃に温めて液化し、5グラムを10mLの無菌脱イオン水と混合した。この希釈液を「未希釈」物質として、段階希釈した。最小発育阻止濃度(MIC)及び最小殺菌濃度(MBC)を実施するにあたっては、英国抗微生物薬化学療法学会(BSAC)の方法を使用した(Andrews JM. *Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother* 2001; 48 (Suppl 1): 5-16)。 *Surghoney* 生成物を、マイクロタイタレイのウェル中で未希釈から1024倍まで段階希釈した。各蜂蜜希釈液75µLをマイクロタイタレイのストリップ内の各ウェルに加えた。未希釈濃度は濃度250グラム/Lであり、2048倍希釈は約0.12グラム/Lであった。

10

【0427】

微生物ごとに4つの形態学的に同一であるコロニーを純粋培養物から採取して試験微生物を調製し、マクファーランド濃度を0.5にした。更にこれを1:10に希釈した。

20

【0428】

対照を含むすべてのウェルに、試験用の分離株調製物75µLを播種した。ウェルトレイを37℃で18時間インキュベートした。MICは、検出可能な濁度を示さなかった最も希釈されたウェルと見なした。

【0429】

MICウェル、及びMICウェル付近のウェルを血液寒天培地で継代培養し、37℃で18時間インキュベートしてMBCを測定した。MBCは、インキュベーション後に増殖を示さなかった最も希釈された濃度であった。

30

【0430】

時間殺菌曲線

0.5マクファーランド濃度の試験用微生物0.1mLを取り、栄養ブロス3mL中でこれを播種することによって、試験用の微生物接種物を調製した。試験接種物を3本のビジュ容器(bi-jou)に分け、対照と3つの試験調製物に、0.5gの *Surghoney* 1(S1)、 *Surghoney* 3(S3)または *Medihoney* (MH)を添加した。1:10に段階希釈して、0.1mLを血液寒天プレートにプレーティングすることにより、接種物のコロニー数を測定した。これを3回繰り返した。

【0431】

試験接種物及び対照接種物を30℃に維持して、表層皮膚病変の温度を模擬した。0.5、2、4、24、48、72及び168時間の時点で、上記のようにコロニー計数を3連で実施した。

40

【0432】

元の接種物0.1mLを栄養ブロスへ播種して *Surghoney* のあらゆる残留効果を中和し、37℃で72時間インキュベートして最終培養を実施した後、血液寒天上にプレーティングして試験微生物の生存率を判定した。

【0433】

結果

阻止円の大きさ

予備比較研究では、すべての *Surghoney* 効力が、医療等級蜂蜜の *Medihoney* を含めた、いかなる他の試験した蜂蜜よりも高い抗微生物活性を有したことが実

50

証された。S 1の阻止円は、他の任意の蜂蜜によって形成された阻止円よりも大きかった。銀ドレッシング材は、ドレッシング材の直下で多少の阻止効果を生じさせたが、Surgihoneyに見られたような阻止円は存在しなかった。ヨウ素ドレッシング材は、Staphylococcus aureusに対して大きな阻止円（約70mm）を形成した。これはS 1（36mm）よりも大きく、S 3（67mm）と同等であった。

【0434】

阻止円の大きさの定量試験では、全効力のSurgihoneyが、試験した全細菌、多剤抗生物質耐性細菌を含めたグラム陽性菌及びグラム陰性菌の両方、ならびに真菌種に対して、寒天拡散で阻止円を形成した。各菌種の阻止円の大きさは、Surgihoney調製物の効力が増すにつれ増大した。表11。Surgihoneyの阻止効果は、銀ドレッシング材と同様、活性剤との直接的な接触のみに依存することなく、ウェルをはるかに超えて拡散し、表11に列挙したように広範な阻止円を形成した。

10

【0435】

MIC及びMBC

Surgihoneyは、試験した全分離株に対して有意な抗微生物活性を示した。MICとMBCとは、分離株が多剤耐性であるか、または高感受性であるかどうかに関わらず、同一種の分離株間で高い一致性を示した。表12には、試験した分離株種に対する希釈比によるMIC値及びMBC値を列挙しており、表13は1リットルあたりのグラム数単位でのMIC及びMBCを示している。効力の程度はSurgihoneyの等級に応じて上昇した。各分離株に対するMBCは、ほとんどの場合、希釈1回範囲内のMICと近似していた。

20

【0436】

創傷におけるSurgihoneyの局所濃度は、約500グラム/Lと推定される。Staph. Aureusに対するSurgihoney 1のMIC/MBCは、それぞれ31グラム/L及び125グラム/Lであり、Surgihoney 3のMIC/MBCはそれぞれ0.12グラム/L及び0.24グラム/Lである。

【0437】

時間殺菌曲線

Surgihoneyは速やかに細菌を死滅させる。1ミリリットルあたりのコロニー形成ユニット(cfu/mL)は最初、約105であり、対照中ではcfu/mL数が徐々に増加したが、Surgihoney接種物中においては、いずれの効力のSurgihoneyと接触した後もcfu/mLは速やかに下降した。30分までに、S 1及びS 3の両方において、ほとんどの場合、cfu数は1000分の1に減少した(図18)。S 1では、ほとんどの場合2時間までに、S 3では30分までに細菌増殖が検出不能となった。Enterococciは高い抵抗性を示し、48時間存続した。栄養ブロス中での最終培養とそれに続く血液寒天でのプレーティングにより、S 1またはS 3接種物中にいずれの微生物も検出できなかったため、殺菌活性はすべての微生物に対して完全であった。

30

【0438】

考察

Surgihoneyは天然蜂蜜であり、人が消費する多くの市販蜂蜜とは異なり、農業用添加剤または抗微生物性残留物を有しないという点で、現在の語の意味では有機物でもある。Surgihoneyは、その活性を亢進するには特定の植物の花蜜源に依存するマヌカなどの蜂蜜とは異なり、特定の花蜜源に依存しない。Surgihoneyの場合、調製工程によって抗微生物活性を調節することができるため、均一な実効力を有する種々の等級の製造が可能となる。

40

【0439】

本試験では、Surgihoneyの効力が、極めて強力な抗微生物性であり、試験した全種の細菌及び真菌に対して活性であることを明確に実証した。Surgihoneyを、世界各地を起源とする種々の蜂蜜、及び医療等級蜂蜜のMedihoneyと比較し

50

た予備研究では、Surgihoneyが有意に高い抗微生物効力を示した。よく使用される局所消毒剤である銀及びヨウ素との比較により、Surgihoney 3はヨウ素ドレッシング材と同等の、また銀ドレッシング材 (Aquacel Ag) よりも高い抗微生物効果を生じさせた。銀ドレッシング材は、ドレッシング材と直接接触している細菌の阻止のみに有効であった。

【0440】

MIC及びMBC試験は、Surgihoneyが微生物を阻止するだけでなく、局所治療で達成される可能性が高い濃度 (推定500グラム/L) よりも10~1000分の1の濃度で微生物を死滅させることを示している。Surgihoneyの殺菌活性は、その阻止活性に近似した濃度で生じる。したがって、Surgihoneyは、任意のコロニー形成創傷もしくは表層感染創傷または軟組織空洞に局所塗布した場合に、多微生物の阻止及び根絶に極めて有効である可能性がある。多くの慢性創傷は耐性菌でコロニー形成されており、バイオフィーム形成時における細菌の残留により創傷治癒が遅延するため、Surgihoneyを使用すると、創傷治癒の促進に加え、抗生物質の適切な使用の削減に役立てることができる。臨床利用時には、創傷部位でのSurgihoneyの局所濃度は、血清または深部組織での全身性抗生物質の濃度よりも大幅に高くなると予測される。このことは、SurgihoneyのMIC及びMBC値が同様に、全身性抗生物質で一般的に示される値よりも高いという結果に表れている。

10

【0441】

Surgihoneyの殺菌活性速度は極めて速いことが時間殺菌曲線によって示されており、Surgihoney 3では30分以内、またSurgihoney 1では2時間以内である。これはグラム陽性微生物及びグラム陰性微生物のいずれにも当てはまるが、Enterococciは両者よりもわずかに高い抵抗性を示している。真菌類、Candida spp.、Aspergillus sp. もまた、増殖を阻止して微生物を死滅させるには、高濃度及び長時間の曝露を必要とする。

20

【0442】

Surgihoneyは、湿性創傷治癒環境をもたらすと同時に、微生物コロニー形成を減少させ、瘡蓋の除去ならびに肉芽形成及び上皮形成の促進を補助することを目的として、皮膚病変及び空洞に局所創傷ドレッシング材として塗布される無菌製品として製剤化される。

30

【0443】

創傷感染症の治療または予防を意図した局所製剤として、他の抗微生物製剤が入手可能である。銀含浸ドレッシング材は良好な抗微生物活性を有することが示されているが、蜂蜜製剤と比較して細胞毒性も呈する。ヨウ素類似物も良好な抗微生物活性を有するが、特定の状況においては毒性であることも報告されている。創傷ドレッシング材でのクロルヘキシジン製剤の使用に関しても、抗微生物耐性及び毒性の発現を理由に懸念が高まっている。

【0444】

Surgihoneyは、皮膚上や創傷中及び空洞中への局所塗布において臨床的有用性が見込まれる。創傷は、バイオフィームを形成して治癒を遅延させ得る細菌によってコロニー形成される場合がある。抗微生物薬耐性、及び新しい抗微生物剤の不足に関する懸念が増加しているため、広範な抗微生物活性を有する局所薬剤は、軟組織病変における全身性抗生物質の使用を削減する役割を果たす可能性がある。このin vitro試験では、効力を調節することができ、また創傷治癒におけるその他の重要な機能 (湿性バリア、瘡蓋除去、局所的な栄養供給、局所的な免疫調節) を達成すると共に、細胞毒性を有しない、高い抗微生物活性を有する創傷ドレッシング材としてのSurgihoneyの能力を実証した。

40

【0445】

結論

上記のin vitroの結果は、創傷ドレッシング材としてのSurgihoney

50

の臨床利用を裏付けており、S u r g i h o n e y が強力かつ無毒性の抗微生物剤であるだけでなく、創傷治癒の過程で必要とされるあらゆる役割を達成できる最初の製品であり得ることを立証している。

【 0 4 4 6 】

【表 1 1】

表 1 1 効力の異なる S u r g i h o n e y (S 1、S 2、S 3) による阻止円の大きさ

バクテリア	株数	S 1 平均ゾーン (範囲) / m	S 2 平均ゾーン (範囲) / m	S 3 平均ゾーン (範囲) / m
メチシリン感受性 Staphylococcus aureus (MSSA)	12	36.2 (32-38)	53.4 (44-58)	66.5 (60-72)
メチシリン耐性 Staphylococcus aureus (MRSA)	6	35.6 (31-38)	52.6 (48-59)	67.3 (59-73)
Streptococci ベー タ溶血性	6	40.0 (35-42)	44.5 (38-51)	59.2 (53-69)
Enterococcus spp	5	38.0 (34-39)	49.5 (44-55)	61.8 (59-64)
Escherichia coli	6	33.4 (30-37)	49.5 (36-55)	62.7 (59-69)
Klebsiella sp.	2	34.2 (30-38)	40.0 (38-42)	57.0 (52-62)
Pseudomonas aeruginosa	4	25.8 (20-28)	34.8 (30-38)	50.2 (46-51)
Acinetobacter Iwoffii	1	32.1	43.7	55.2
Bacteroides fragilis	1	22.3	28.7	34.2
Propionibacterium acnes	1	19.7	23.4	31.9
Candida sp.	2	9 (8-10)	15 (15)	26 (24-28)
Aspergillus fumigatus	1	8	12	18

10

20

30

【 0 4 4 7 】

【表 1 2】

表 1 2. 最小発育阻止濃度 (MIC) 及び最小殺菌濃度 (MBC) の希釈度を示す、未希釈 Surgihoney (S1、S2、S3) からの段階希釈倍数。

	S1		S2		S3	
微生物名	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
MSSA	1:8	1:2	1:32	1:16	1:2048	1:1024
MRSA	1:16	1:4	1:32	1:16	1:2048	1:1024
B 群 Streptococci	1:64	1:16	1:64	1:64	1:1024	1:256
A 群 Streptococci	1:32	1:16	1:128	1:64	1:1024	1:512
Enterococcus	1:8	1:2	1:32	1:4	1:256	1:64
E. coli	1:8	1:4	1:64	1:64	1:256	1:128
E. coli ESBL	1:8	1:2	1:64	1:64	1:256	1:128
Serr. liquefaciens Amp C	1:8	1:4	1:16	1:4	1:256	1:128
Kleb. pneumoniae	1:4	1:2	1:32	1:32	1:256	1:128
Pseud. aeruginosa	1:16	1:16	1:64	1:16	1:256	1:64
Candida albicans	未希 釈で 濁り	未希釈で 増殖	1:16	1:16	1:64	1:64

10

20

【0 4 4 8】

【表 1 3】

表 1 3. グラム/リットル単位で示した Surgihoney の MIC 及び MBC 値

	S1		S2		S3	
微生物名	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
MSSA	31	125	7.8	15.6	0.12	0.24
MRSA	15.6	62.5	7.8	15.6	0.12	0.24
B 群 Streptococci	3.9	15.6	3.9	3.9	0.24	0.9
A 群 Streptococci	7.8	15.6	1.9	3.9	0.24	0.48
Enterococcus	31	125	7.8	62.5	0.9	3.9
E. coli	31	62.5	3.9	3.9	0.9	1.9
E. coli ESBL	31	125	3.9	3.9	0.9	1.9
Serr. liquefaciens Amp C	31	62.5	15.6	62.5	0.9	1.9
Kleb. pneumoniae	1:4	125	7.8	7.8	0.9	1.9
Pseud. aeruginosa	15.6	15.6	3.9	15.6	0.9	3.9
Candida albicans	未希 釈で 濁り	未希釈で 増殖	15.6	15.6	3.9	3.9

30

40

【0 4 4 9】

実施例 2 2

Surgihoney の抗ウイルス活性

細胞培地中に S1 または S2 Surgihoney を単純ヘルペスウイルスと混合した後 (細胞培地中の蜂蜜とウイルスの 50% 混合物)、37 で 1 時間インキュベートした。次に、この混合物を細胞に置き、混合物ごとに形成されたウイルスプラーク数を記録

50

した。蜂蜜を含まない対照、または対照蜂蜜を含む対照も実施した。

【 0 4 5 0 】

1 時間のインキュベーション後に記録したウイルス（単純ヘルペスウイルス）プラーク数を図 1 9 に示す。S 1 または S 2 Surgihoney 混合物ではプラークは形成されず、それと比較して、蜂蜜を含まない混合物では 1 6 0 プラーク、また対照蜂蜜を含む混合物では 1 5 0 プラークが形成された。

【 0 4 5 1 】

この結果は、S 1 及び S 2 Surgihoney 調製物はいずれも、強力な抗ウイルス活性を有することを示している。

【 0 4 5 2 】

10

実施例 2 3

ライン部位ドレッシング材での Surgihoney の使用

末梢挿入中心静脈カテーテル（PICCライン）の感染予防における Surgihoney の有効性を評価するため、30 人の患者の腕にあるライン挿入部位に S 1 Surgihoney を局所貼付した。約 3 g ~ 8 g の S 1 Surgihoney をドレッシング材に塗布した後、このドレッシング材を創傷と接触させ、第 2 のドレッシング材で所定の位置に保持した。ライン部位のコロニー形成と、ライン関連菌血症とを評価し、Surgihoney ドレッシング材を施さなかった 30 人の患者と比較した。結果を以下の表 1 4 に示す。

【 0 4 5 3 】

20

【表 1 4】

表 1 4 . ライン部位コロニー形成の予防及び除去における S 1 Surgihoney の効果

	Surgihoney(30)	Surgihoney なし (30)
開始時のコロニー形成	2	4
評価期間のコロニー形成	0	6
評価期間に除去されたコロニー形成	2	0

30

【 0 4 5 4 】

ライン部位ドレッシング材での使用において、Surgihoney は有効な抗微生物剤であるという結論を得た。

【 0 4 5 5 】

実施例 2 4

帝王切開創傷の感染予防での Surgihoney の使用

手術創感染は帝王切開の場合に特に問題であり、その感染率は約 1 0 % とかなり高い。英国では毎年、帝王切開創傷感染が全国的に増加しており（8 ~ 2 4 . 6 %）、また 1 4 7 , 7 2 6 症例の帝王切開に関与した NHS 病院間で大きなばらつき（1 3 . 6 ~ 3 1 . 9 %）が生じている（Bragg et al . , 2 0 1 0 . Variation in rates of caesarean section among English NHS trusts after accounting for maternal and clinical risk : cross sectional study . BMJ 2 0 1 0 ; 3 4 1）。帝王切開創傷感染は、長期入院、財源消費に加え、他の罹患率及び死亡率の主因である。術後創傷感染を発症した女性の場合、帝王切開からの回復が困難になる。

40

【 0 4 5 6 】

帝王切開創傷の感染予防における Surgihoney の有効性を評価するため、手術後の創傷に S 1 Surgihoney を一回局所塗布した。約 2 5 g ~ 3 5 g の S 1

50

Surgihoneyをドレッシング材に塗布した後、このドレッシング材を創傷と接触させ、第2のドレッシング材で所定の位置に保持した。3か月間にわたり、200人近くの患者を評価した。

【0457】

臨床評価

2012年10月から2013年1月までの期間に帝王切開（CS）を受ける女性に、外科手技の最後に創傷を手当する際、単回適用の創傷ドレッシング材としてSurgihoneyを提供した。患者1人に使用するSurgihoneyは、それぞれ10gの分包であった。無菌技術を使用して、「非無菌」の手術助手がSurgihoney分包を開け、無菌の内容物を無菌のドレッシング材上に注意深く塗布した。次に産科医または手術室の助産師が、ドレッシング材を手術創に貼付した。外科手技後、担当の助産師が評価記録を記入した。収集したデータは、MRSA状態、糖尿病歴、投薬、及び体容積指数であった。外科手技後14日間、担当の助産師はまた、あらゆる創傷治癒問題、特に滲出、痛み、炎症の有無を記録した。炎症がある場合には、創傷培養拭き取り検体を要請し、微生物学的結果を記録した。Surgihoneyドレッシング材を使用した3か月間の評価期間中の手術部位感染（SSI）率を、感染対策チームによって収集されたデータに基づいた9か月前の評価の感染率と比較した。創傷感染とは、抗生物質治療を必要とする炎症性創傷（紅斑、腫脹、分泌）であると臨床的に定義した。SSI率は、実施されたすべてのCS外科手技に対する百分率で算出した。

【0458】

結果

結果を以下の表15に示す。2012年10月から2013年1月までの3か月間で186件のCSがあり、うち102件（55%）は緊急であった。どの女性もMRSAによるコロニー形成はなかった。4人（2.23%）が真性糖尿病を患っていた。42人（27.3%）が25超の体容積指数を有した。評価期間中、186件のうち4件のCS SSIが確認された。これは感染率2.15%に相当する。1人の患者で、Surgihoneyによる治療と関連する有害事象が創傷刺激の形で報告されたが、これ以上の治療介入をせずに3日で解消した。9か月前には、590件のCS外科手技（234件は随意、356件は緊急）があり、感染対策監視機構によって、感染率5.42%に相当する32件のCS SSIが記録されていた。感染率の減少は有意である： $p = 0.042$ （ χ^2 試験）。

【0459】

【表15】

表15. 帝王切開創傷の感染予防におけるS1 Surgihoneyの効果

期間	手技総件数	選択 (%)	緊急 (%)	感染創傷数	感染率%
2012年1月～ 2012年9月－S1 Surgihoney な し	590	234 (39.7%)	356 (60.3%)	32	5.42%*
2012年10月22 日～2013年1月 － S1 Surgihoney あ り	186	84 (45.2%)	102 (54.8%)	4	2.15% (60%低減)

*おそらくトラストの過去の感染率報告に基づく可能性のある微生物学的サンプルデータより得たもの。英国内平均は10%近い。

【0460】

この結果は、過去のデータと比較して、S1 Surgihoneyを用いて治療した

群において手術部位感染率が減少（60%減少）したことを示している。Surghoney ドレッシング材は相容性が良好であり、有害事象はほとんど報告されなかった。

【0461】

Surghoney を使用した場合、創傷感染率は60.33%減少した。この試験の2つの群からのSSI データを使用すると、Surghoney 前ではCS SSI 率（予想）が5.42%であり、Surghoney 後では2.15%（実測）であった。各レベル（過去に報告された9.6%の感染率よりも低い）での、推定される英国でのCS SSI 感染率は、1年あたり8007症例（予想）、及び1年あたり3176症例（実測）となる。その差4831症例を、Surghoney の使用により減少できる可能性がある。

10

【0462】

S1 Surghoney は、手術後の帝王切開創傷の感染率を効果的に減少させるという結論を得た。治癒組織に対する毒性がなく、また治癒過程も促進する薬剤である Surghoney による創傷のコロニー形成予防は、新たな、また潜在的に重要な知見であり、手術創の管理方法を変化させ得る。Surghoney は、臨床的に有効で費用対効果の高い治療介入を提供して、帝王切開を受ける女性のSSI を有意に減少させる。

【0463】

考察

この評価は、効果の高い抗微生物創傷ドレッシング材である Surghoney を初期CS創傷の創傷ドレッシング材として使用し、感染を予防できることを実証した。Surghoney は、確立された創傷治癒特性を有する「天然」製品として、創傷のコロニー形成及び感染を予防する強力な抗微生物活性をもたらすほか、創傷治癒を促進することが見込まれる。いくつかのハロゲン系化学消毒剤は、同程度の抗微生物活性をもたらすことができるが、創傷治癒を遅延させる場合がある（Jan WA. Comparison of conventional pyodine dressing with honey dressing for the treatment of diabetic foot ulcers. JPMI - Journal of Postgraduate Medical Institute 2012; 26(4): 402-7）。ヨウ素創傷ドレッシング材は、CSにおいて禁忌であり（Joint Formulary Committee. The British National Formulary. London: The Pharmaceutical Press; 2013）、その使用では様々な毒性が伴う（Pietsch & Meakins: Complications of povidone-iodine absorption in topically treated burn patients. The Lancet 1976; 307(7954): 280-2; Scoggins et al.: Hypernatraemia and acidosis in association with topical treatment of burns. The Lancet 1977; 309(8018): 959; Donovan et al.: Seizures in a Patient Treated with Continuous Povidone-Iodine Mediastinal Irrigation. New England Journal of Medicine 1992; 326(26): 1784; Colpaert: Iodine toxicity as a cause of total atrioventricular block in burn patients. Burns 2009; 35: S45-S6; Ramaswamykanive: Cardiovascular collapse following povidone-iodine wash. Anaesthesia and Intensive Care 2011; 39(1): 127-30; Lakhal: Povidone iodine: Features of critical systemic absorption. Annales F

20

30

40

50

rancaises d'Anesthesie et de Reanimation 2011; 30 (7-8): e1-8): e1-e3.)。

【0464】

同様に、Cochrane Systematic Reviewsでは、銀含有ドレッシング材または局所薬剤が創傷治癒を促進し、創傷感染を予防するかどうか (Storm-Versloot et al.: Topical silver for preventing wound infection. Cochrane Database of Systematic Reviews 2010)、または感染性の慢性創傷もしくは汚染による慢性創傷の有効な治療法であるかどうか (Vermeulen et al.: Topical silver for treating infected wounds (Review). Cochrane review 2010; (10): 42) を証明する十分な証拠はないことが示された。

10

【0465】

先のSystematic Reviewsでは、創傷ドレッシング材としての蜂蜜の臨床有効性について、有益性が不確かである証拠が示されているが、この新しい製剤はCS患者に有意な臨床的有益性をもたらすことが明らかである (Jull et al.: Honey as a topical treatment for wounds: The Cochrane Collaboration, 2009; Jull et al.: Honey as a topical treatment for wounds. Cochrane database of systematic reviews (Online) 2013; 2)。創傷感染率の時間的な比較では、Surgihoneyの使用により、治療介入前の5.42%から2.15%へと感染率が60.33%減少したことを上記の評価は示している。

20

【0466】

医療関連感染は、入院患者の約8%が患う重大かつ犠牲の大きい医療合併症であり、このような感染の14%をSSIが占め、外科手技を受けた患者の5%近くがSSIを発症したことが判明した。SSIは相当な罹患率を伴い、3分の1を超える術後死が、少なくとも部分的にSSIと関連している。抗微生物予防は、多くの外科手技で日常的に使用され、手術創感染を減少させている。皮膚消毒もまた、外科医によって皮膚切開前に日常的に使用され、皮膚細菌負荷を減少させているが、抗微生物ドレッシング材の使用は日常的に実施されていない。その理由は、大半の局所消毒剤が組織治癒に有害作用を及ぼし得るためである。

30

【0467】

Surgihoneyは強力な抗微生物活性を有する製品であり、無毒性で、組織治癒を促進する。この製品を「清潔な」手術創に局所使用することにより、特定の種類の手術において全身性抗生物質による予防法を実際に代替することができる。このような進歩は、使用する抗生物質量の削減、コロニーを形成する細菌の淘汰圧の低下を促進するものである。

【0468】

この評価にあたり帝王切開創傷を選択した理由は、帝王切開の患者は概して健康であり、共存症はまったくないか、またはほとんどないにもかかわらず、CS感染率の増加が報告されているからである。この増加について想定される理由は、高齢の母親の増加、共存症、特に糖尿病を有する母親の増加、及び体容積指数の高い母親の全体的な増加である。これまで初期の創傷手当に抗微生物剤を使用することは日常的ではなかったが、この評価は、CS創傷感染の予防にSurgihoneyが果たす、興味深く効果的な役割を示している。

40

【0469】

実施例 25

褥瘡治療でのS1 Surgihoneyの使用

患者は脊椎披裂を患う50歳女性患者であり、身体障害があり運動不能であった。この

50

患者は、1年を超えて持続していた腰から仙骨までの褥瘡を有していた。空洞は *Streptococcus pyogenes* に感染していた。

【0470】

S1 Surgihoney を局所ドレッシング材として使用した。2日目より創傷の改善が報告された。30日目までに、軟組織空洞はほぼ完治した。この時点で *Streptococcus* は検出されなかった。

【0471】

結果の写真を図20に示す。写真(a)は治療1日目を示し、写真(b)は治療30日目を示す。

【0472】

10

実施例26

Surgihoney の抗微生物活性

Surgihoney (SH) と、*Apis mellifera* (ミツバチ) によって作られた2種のプロトタイプ変性蜂蜜の、*Staphylococcus aureus* (NCIMB 9518) に対する抗微生物活性を試験した。また、サンプルからの過酸化水素の生成レベルを変化させる能力について、いくつかの変性型の Surgihoney を調べた。

【0473】

方法：*Staphylococcus aureus* 標準株に対するバイオアッセイ法を使用して、Surgihoney (SH) を2種の変性蜂蜜、プロトタイプ1 (PT1) 及びプロトタイプ2 (PT2) と比較した。更なる研究により、各調製物からの過酸化水素の生成速度を試験した。

20

【0474】

結果：Surgihoney の抗微生物活性は、主に過酸化水素の生成に起因することが示された。Surgihoney の変性により、更に強力な2種の蜂蜜プロトタイプが、2倍～3倍高い抗菌活性、及び最大10倍高い過酸化物活性を生じさせることが示された。

【0475】

結論：Surgihoney は、良好な抗微生物活性を示す、臨床的に利用可能な創傷消毒ドレッシング材である。2種の更なる蜂蜜プロトタイプは、実証された過酸化物活性の増加によって増強させることが可能な抗微生物活性を有することが示された。

30

【0476】

方法

1. バイオアッセイ法による蜂蜜の活性の測定

Surgihoney (S)、ならびに2種の変性蜂蜜、プロトタイプ1 (PT1) 及びプロトタイプ2 (PT2) の抗菌活性を、*Staphylococcus aureus* (NCIMB 9518) を使用して測定し、相当するフェノール%で示した。3日繰り返した3つのサンプルの反復試験からの平均値の値を算出した。

【0477】

アッセイ法。使用した寒天ウェル拡散法は、*Microbiology Standard Methods Manual for the New Zealand Dairy Industry* (1982) [Bee Products Standards Council: Proposed standard for measuring the non peroxide activity of honey. In. New Zealand: Bee Products Standards Council; 1982.] に記載されている阻止物質に対するパンチプレートアッセイから適応させた。

40

【0478】

接種物調製。無菌栄養ブロスをブランク及び希釈液として使用し、1cmの光路を有するキュベットを使用して、540nmで測定した吸光度が0.5になるように一晚培養液

50

を調節した。

【0479】

アッセイプレート調製。吸光度0.5に調節した培養物100μl容積を使用して、150mlの栄養寒天に播種し、アッセイプレートを作製した。寒天を回転させて完全に混合し、水平面上に置かれた大きなペトリ皿へ注いだ。寒天が固化したらすぐにプレートを反転させて一晩置いた後、翌日に使用した。アッセイのためにこれらの播種したプレートを4から取り出し、室温で15分間静置した後、寒天表面に直径7.0mmのウェルを切り取った。試験材料(サンプルまたは標準物質)250μlを各ウェルに置いた。

【0480】

カタラーゼ溶液。蒸留水中で、ウシ肝臓(Sigma C9322、2900ユニット/mg)由来の200mg/mlのカタラーゼ溶液を毎日新しく調製した。

【0481】

サンプル調製。4gのサンプルを汎用容器中の4ml蒸留水に添加して最初のサンプル溶液を調製し、37で30分間静置して混合を促進させた。2番目の溶液を調製するため、最初のサンプル溶液2mlを汎用容器中の2mlの蒸留水に添加して混合し、総活性試験用とし、最初のサンプル溶液2mlを2mlのカタラーゼ溶液に添加して混合し、非過酸化物活性用とした。

【0482】

フェノール標準物質の調製。フェノールを水に溶解することにより、10%、30%、50%(w/v)のフェノール標準物質を調製した。フェノール標準物質は使用前に暗所で室温にし、完全に混合してから試験ウェルに添加した。各標準物質を3つのウェルに入れて3連で試験した。標準物質を4で保管し、使用期限を1か月とした。

【0483】

サンプル及び標準物質の適用。250μlを3ウェルそれぞれに加えることにより、全サンプル及び標準物質を3連で試験した。

【0484】

プレートインキュベーション。サンプルの適用後、プレートを37で約18時間インキュベートした。ウェルの直径(7.0mm)を含んだ阻止円の直径を記録した。

【0485】

サンプルの抗菌活性の計算。各フェノール標準物質周辺の明瞭なゾーンの平均直径を計算し、2乗した。明瞭なゾーンの平均直径の2乗に対するフェノール%の標準グラフをプロットした。線形回帰を使用して最適化直線を得た。この直線の式を使用して、明瞭なゾーンの直径の平均測定値の2乗から、各希釈の蜂蜜サンプルの活性を算出した。希釈を考慮に入れて(Surgihoney濃度は1.35g/mlであると仮定)、この数字を4.69倍にし、相当するフェノール濃度(% w/v)でサンプルの活性を表した。

【0486】

総活性：過酸化水素(H_2O_2)に起因する活性を含んだ全活性。
非過酸化物活性：サンプルをカタラーゼ酵素で処理することにより H_2O_2 を除去する。

【0487】

2. H_2O_2 法による蜂蜜活性の測定
Merckoquant(登録商標)1.10011、及び1.10081を使用して活性を測定した。

【0488】

過酸化物試験キット。濃度は相当するmg/Lの H_2O_2 で表した。

【0489】

精製水でサンプルを1:10に希釈した。5分間のインキュベーション後、全サンプルの1時間ごとの H_2O_2 生成を12時間にわたって測定し、その後24時間及び48時間の時点で測定した。

【0490】

測定方法。ペルオキシダーゼによって、過酸化物から有機物酸化還元指示薬へと酸素が

10

20

30

40

50

運ばれると、その指示薬は青色酸化生成物に変換される。試験片の反応ゾーンを色スケールの領域と目視比較することにより、過酸化水素濃度を半定量的に測定する。試験片の反応ゾーンをSurgihoneyサンプル中に1秒間浸し、過剰液体を試験片から吸収性ペーパータオルへと移し、15秒後（カタログ番号110011）または5秒後（カタログ番号110081）、色スケールの領域とより正確に一致する、反応ゾーンに形成された色を判定する。

【0491】

結果

1. 活性評価

蜂蜜サンプルの変性によって生じる抗微生物活性により、PT1及びPT2でのフェノール活性が、Surgihoney単独と比較してそれぞれ2倍及びほぼ3倍に増加した。Surgihoney(SH)の3種のサンプル、ならびに2種の変性プロトタイプ、PT1及びPT2の結果を表16に示す。

【0492】

2. H₂O₂法による蜂蜜活性の測定

プロトタイプの変性により、Surgihoneyの過酸化水素活性の7倍及び10倍の過酸化水素活性を生じることが観測される。3種のサンプルの結果を図21に示す。3種の蜂蜜プロトタイプそれぞれに対する過酸化水素発生の最大レベルを利用し、これを総フェノール活性に対してプロットすることにより、線形の関係性が観測される（図22）。

【0493】

考察

この研究から得た結果は、Surgihoney、ならびに2種の変性プロトタイプ、PT1及びPT2の主な抗微生物活性が過酸化水素に起因することを示している。これは、様々な花を起源とする他の特定の蜂蜜と類似した知見である。しかしながら、以前の研究とは異なり、サンプルからの過酸化水素の供給量は増大することが可能であり、12時間の時点でSurgihoney単独の値のそれぞれ7倍及び10倍である。抗微生物活性と、3種の蜂蜜プロトタイプからの過酸化水素の最大放出量との間には、顕著な線形関係がある。

【0494】

この過酸化水素活性により、急性または慢性創傷に貼付して創傷感染症を治療または予防する創傷ドレッシング材に理想的に適した強力な抗微生物活性が得られる。創傷には少量のカタラーゼが存在し、男性でのカタラーゼの血清中濃度は50kU/lであると報告されているが、治療中の創傷におけるカタラーゼ活性は、実際には創傷を負ってから最初の1週間は減少し、創傷を負った2週目にカタラーゼの活性レベルが元のレベルに回復することが示されている。したがって、このようなカタラーゼ濃度が、外部に使用されるSurgihoneyまたは2種の変性プロトタイプ、PT1及びPT2で認められる抗微生物活性に影響する可能性は極めて低い。

【0495】

抗微生物創傷ドレッシング材に最適な特性は、有効性、無毒性、使い易さ、患者及び臨床医の認容性、ならびに金額相当の価値である。過酸化水素は有効な抗微生物剤であり、栄養細菌、酵母及び孢子に対する活性が強力であるため、殺生物剤として既に使用されている。過酸化水素は、細胞成分の化学的酸化によって抗微生物効果を生じさせる。

【0496】

過酸化水素のヒトへの毒性は濃度に依存するが、ある試験では、抗微生物性に対する特異濃度と、ヒトへの毒性に対する特異濃度は重なり合う場合があると主張している。対照的に、特定の蜂蜜製剤は、過酸化水素を手当時に大量に供給するのではなく、低濃度の過酸化水素を経時的に連続して創傷に供給することによって有効な抗微生物剤となり、このような毒性を有しないことが示されている。実際に、生理学的濃度の過酸化水素を哺乳動物の細胞に与えると、生体反応が刺激され、哺乳動物の細胞において特定の生化学的経路

10

20

30

40

50

が活性化するという説得力のある証拠がある。

【0497】

Surgihoneyならびに2種の変性プロトタイプ、PT1及びPT2が、少なくとも24時間にわたり有効な過酸化水素放出を提供する抗微生物ドレッシング材であることは明らかである。

【0498】

結論

Surgihoneyならびに2種の変性プロトタイプ、PT1及びPT2は、*Staphylococcus aureus* 標準株に対して、強力な抗微生物活性を有することが示された。こうした抗微生物活性は、過酸化水素に起因することが示された。この活性は測定可能であり、過酸化水素活性の観点から説明することができる。これらの変性蜂蜜は、有効性のある、無毒性の投与しやすいドレッシング材を提供する。

10

【0499】

表16は*Staphylococcus aureus* (NCIMB 9518) に対する、Surgihoney (SH) ならびに2種の変性プロトタイプPT1及びPT2の過酸化物抗菌活性及び非過酸化物抗菌活性を示す。

【表16】

サンプル名	バッチ番号	総活性(%フェノール)	非過酸化物活性(%フェノール)
Surgihoney	2015-06-018B	32	0
Surgihoney PT1	HHI4110311	65	7
Surgihoney PT2	HHI14110312	83	10

20

【0500】

以下の実施例27～30は、重要なバイオフィーム形成性の熱創傷病原体に対する、組成物(Surgihoney)の*in vitro*抗菌活性の測定について記載する。

【0501】

Surgihoneyは、臨床試験及び診療のいずれにおいても、広範な浮遊性グラム陽性菌及びグラム陰性菌に対して、極めて強力な阻止性及び殺菌活性を示すことが既に実証されている。帝王切開創傷での予防使用により、耐性微生物が根絶し、ならびにコロニー形成率及び感染が低下することが実証されている。

30

【0502】

抗微生物剤耐性を取り巻く世界的な懸念及びバイオフィームがもたらす問題を考慮して、*Pseudomonas aeruginosa* 及び *Acinetobacter baumannii* のバイオフィーム形成性分離株に対する3種のSurgihoney調製物(上記のS1、S2及びS3)の*in vitro*抗菌活性を調べ、Surgihoneyが、i)バイオフィームの形成を防止するかどうか、ii)既に形成されたバイオフィームの播種を根絶または防止できるかどうかを評価した。

40

【0503】

2つのバイオフィームアッセイを使用して、Surgihoney調製物S1、S2及びS3の抗バイオフィーム特性を調べ、標準マヌカ蜂蜜と比較した。これにより、SHの「最小バイオフィーム阻害濃度」(MBIC)及び「最小バイオフィーム根絶濃度」(MBEC)の*in vitro*測定が可能であった。SHの抗バイオフィーム活性を、20%の蜂蜜を含有するもの(L-Mesitran net)を含めた広範な市販のドレッシング材と比較するために、更なる実験を行った。

【0504】

実施例27

マヌカ蜂蜜と比較したSurgihoneyによるバイオフィーム形成の予防

本実施例では、*Pseudomonas aeruginosa* (対照株PA01及び

50

臨床熱創傷分離株 1054) 及び *Acinetobacter baumannii* (対照株 AYE 及び英国 ACIC クローン NCTC__13420 (C59)) のバイオフィルム形成性分離株によるバイオフィルム形成に対する、Surgihoney (S1) とマヌカ蜂蜜 (MH) の効果を比較する第 1 の実験 (実験 1) と、3 種類の強度の Surgihoney (S1、S2、S3) 調製物の効果を比較する第 2 の実験 (実験 2) について記載する。

【0505】

方法

各未希釈蜂蜜サンプル用に、96 ウェルマイクロタイタープレートのウェル中の 100 μ l の水に 1 白金耳量の蜂蜜を入れた。希釈した蜂蜜サンプル用に、約 2.5 ml の蜂蜜を汎用容器中の 6 ml の水に入れた。次いで、この混合物 3 ml を 1:2048 まで段階希釈した。100 μ l の各段階希釈液を 96 ウェルプレートの別々のウェルに添加した。

【0506】

分離株の一晩培養液をミューラーヒントンブロス中で OD600 が 0.1 になるまで希釈した。100 μ l の希釈した一晩培養液を、未希釈のまたは希釈した各蜂蜜サンプルのウェルに添加した。各陽性対照ウェルには、100 μ l の希釈した一晩培養液及び 100 μ l の水を入れた。各陰性対照ウェルには、200 μ l のブロスまたは 200 μ l の未希釈蜂蜜サンプルを入れた。

【0507】

バイオフィルム形成を促進するためにプレートを 33 (創傷温度) で 72 時間インキュベートした。次いで、クリスタルバイオレット染色試薬 (死滅したバイオフィルム及び生存するバイオフィルムに結合する) を使用してプレートを顕色し、70% エタノールを使用して染色試薬を溶出した後に可視化した。

【0508】

次いで、溶出した色素の光学濃度 (OD) を、分光光度計を使用して評価した。OD 測定値は、取り込まれたクリスタルバイオレットの量に対応する。OD 測定値が高いほど、ウェルが濃く、バイオフィルムの集積が大きいことを表す。次に、OD 測定値をプロットしてグラフを作成した。

【0509】

結果

結果を図 23 ~ 25 に示し、以下の表に要約する。これは、各株 / 分離株に関する最小バイオフィルム阻止濃度 (MBIC) を記録したものである (0.3 の OD をカットオフ値として使用した)。

【表 17】

株 / 分離株	MBIC				
	実験1		実験2		
	S1	MH	S1	S2	S3
PA01	1:2	未希釈 ¹	1:4*	1:16*	1:32*
1054	1:2	未希釈 ¹	1:8*	1:32*	1:16*
AYE	1:4	1:2	1:8*	1:64*	1:64*
C59	1:4	1:2	1:8*	1:64*	1:32*

¹ *Pseudomonas* に対するマヌカ蜂蜜の活性は散発的であった

* = 蜂蜜と陽性対照の成長を比較するためにスチューデント t 検定を行ったとき、統計学的に有意であった ($P < 0.005$)。

【0510】

この結果は、Surgihoney SH1 が、未希釈または 1:2 希釈で使用した場合に *Pseudomonas* のバイオフィルム形成を防止し、未希釈または 1:2 もしくは 1:4 希釈で使用した場合に *Acinetobacter* のバイオフィルム形成を防止

したことを示す。

【0511】

マヌカ蜂蜜は未希釈で使用した場合、*Pseudomonas*のバイオフィルム形成に散発的な影響を与えたが、未希釈または1：2希釈で使用した場合、*Acinetobacter*のバイオフィルム形成を防止した。

【0512】

Surgihoney S2及びS3もまた、*Pseudomonas*及び*Acinetobacter*のバイオフィルム形成を防止したが、S1 *Surgihoney*よりも低濃度でこれを達成することができた。

【0513】

*Pseudomonas*及び*Acinetobacter*のバイオフィルム形成を阻止する*Surgihoney* S2及びS3の能力には、ほとんど有意差がないことがわかった。

【0514】

*Acinetobacter*によるバイオフィルム形成は、*Pseudomonas*のバイオフィルム形成よりも、*Surgihoney*及びマヌカ蜂蜜による治療に対して感受性が高いことがわかった。

【0515】

結論

上記の結果から、*Surgihoney*はバイオフィルムのバイオフィルム形成を防止することができ、*Surgihoney* S2及びS3は*Surgihoney* S1よりも低濃度でバイオフィルム形成を防止できるという結論を得た。各*Surgihoney*調製物は、マヌカ蜂蜜よりも低濃度でバイオフィルム形成を防止することができた。

【0516】

実施例28

マヌカ蜂蜜と比較した、強度の異なる*Surgihoney*調製物によるバイオフィルム形成の防止

本実施例では、*Pseudomonas aeruginosa* (PS__1586]及びPS__6749)及び*Acinetobacter baumannii* (ACI__C60及びACI__19606)のバイオフィルム形成性分離株によるバイオフィルム形成に対する、*Surgihoney* 1 (S1)、*Surgihoney* 2 (S2)、*Surgihoney* 3 (S3)及びマヌカ蜂蜜 (MH)の効果について記載する。

【0517】

方法

各蜂蜜を37のインキュベーターに30分間入れた。次に、それぞれ約3mlの蜂蜜を汎用容器に入れ、3mlの滅菌水を添加した。次いで、この混合物を激しくボルテックスし、1：4096まで段階希釈した。

【0518】

各分離株の希釈した一晚培養液100μlを96ウェルマイクロタイタープレート中の100μlの希釈した蜂蜜に添加し、バイオフィルム形成を促進するために33(創傷温度)で72時間インキュベートした。

【0519】

次いで、クリスタルバイオレット染色試薬を使用してプレートを顕色し、70%エタノールを使用して染色試薬を溶出した後に可視化した。

【0520】

次いで、溶出した色素の光学濃度(OD)を、分光光度計を使用して評価した。OD測定値は、取り込まれたクリスタルバイオレットの量に対応する。OD測定値が高いほど、ウェルが濃く、バイオフィルムの集積が大きいことを表す。次に、OD測定値をプロットしてグラフを作成した。

【0521】

10

20

30

40

50

結果

結果を図 2 6 ~ 2 9 に示し、以下の表に要約する。これは、各分離株に関する最小バイオフィルム阻止濃度 (M B I C) を記録したものである (0 . 3 の O D をカットオフ値として使用した)。

【表 1 8】

分離株	MBIC			
	SH1	SH2	SH3	MH
PS_1586	1:8	1:64	1:32 ¹	1:2 ²
PS_6749	1:8	1:512	1:512	1:16 ³
ACI_C60	1:16 ⁴	1:128 ⁴	1:16 ¹	1:4
ACI_19606	1:16	1:64	1:128	1:2

¹ 1 : 6 4 希釈は試験せず

² 1 : 4 希釈ではそれよりも低い希釈と比較してバイオフィルム形成の増強が観察された (下記参照)

³ 1 : 3 2 希釈ではそれよりも低い希釈と比較してバイオフィルム形成の増強が観察された (下記参照)

⁴ 1 : 8 ~ 1 : 3 2 希釈ではそれよりも低い希釈と比較してバイオフィルム形成の増強が観察された (下記参照)

【 0 5 2 2 】

陽性対照 (P O S) は分離株すべてがバイオフィルムを形成することができることを示し、陰性対照 (N E G) は汚染がなかったことを示す。

【 0 5 2 3 】

いくつかの分離株では、S u r g i h o n e y またはマヌカ蜂蜜の特定の濃度で、それよりも高濃度及び低濃度のバイオフィルム形成と比較して、バイオフィルム形成の増強が認められる。この効果は時折、他の殺生物剤で観察されている。これは殺生物剤の「ストレス」がバイオフィルムの増強を引き起こすためであると考えられている。

【 0 5 2 4 】

結論

上記の結果から、各 S u r g i h o n e y 調製物 (S 1、S 2、及び S 3) は、試験した分離株それぞれのバイオフィルム形成を防止できたという結論を得た。S 2 及び S 3 S u r g i h o n e y 調製物は、S 1 S u r g i h o n e y よりも低濃度でこれを達成することができた。

【 0 5 2 5 】

試験した分離株のバイオフィルム形成を防止するための最適な S u r g i h o n e y 調製物は S 2 であった。1 : 6 4 希釈の S 2 は、試験した各分離株のバイオフィルム形成を防止することができた。

【 0 5 2 6 】

試験した S u r g i h o n e y の各強度の調製物 (S 1、S 2 及び S 3) は総じて、マヌカ蜂蜜よりも低濃度でバイオフィルム形成を防止することができた。

【 0 5 2 7 】

実施例 2 9

S u r g i h o n e y による、既に形成されたバイオフィルムの播種の防止

本実施例では、A c i n e t o b a c t e r b a u m a n n i i の 2 つの分離株 (A C I _ A Y E 及び A C I _ C 5 9) により産生された、既に形成されたバイオフィルムの播種の防止または低減に対する S u r g i h o n e y 調製物 S 1、S 2 及び S 3、ならびにマヌカ蜂蜜 (M H) の効果について記載する。

【 0 5 2 8 】

方法

10

20

30

40

50

Acinetobacter baumannii (ACI__AYEまたはACI__C59)の段階希釈した一晚培養液200 μ lを96ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに添加した。ペグ付きPCRプレートをマイクロタイタープレート上に置くことで、各ウェルには、バイオフィルムを形成させることができる「ペグ」が入るようにする。次いで、96ウェルプレートを、バイオフィルム成長を促進するために33℃で72時間インキュベートした。

【0529】

72時間後、ペグを洗浄した後、試験薬剤(Surgihoneyまたはマヌカ蜂蜜)またはブロスのみ(対照用)をウェルに入れた別の96ウェルプレートに入れた。24時間後、ペグを洗浄した後、滅菌ブロスを入れた別の96ウェルプレートに入れ、一晚インキュベートした。翌日、(上記の実施例27及び28に記載するように)分光光度計を使用してブロスのODを評価した。濁ったブロスはODが高く、バイオフィルムの播種が成功したことを表す。

10

【0530】

最後に、バイオフィルムが最初にペグ上に存在することを実証するために、(上記の実施例27及び28に記載するように)クリスタルバイオレットアッセイをペグに施した。

【0531】

結果

結果を図30及び31に示す。

20

【0532】

図において、y軸はブロスのOD、つまりは播種の量を表す。予想通り、各陽性対照で大量のバイオフィルム播種が観察され、各陰性対照で最小限のバックグラウンド濁度が観察された。バイオフィルムはペグのすべてに存在した。この結果から、Surgihoneyの最小バイオフィルム根絶濃度(MBEC)の決定が可能である。

【0533】

S1:両方の分離株においてS1の1:16の低希釈で播種の減少が観察された。1:2希釈で多少の濁度が観察された。これは、この試験ウェルのいくつかはプレートの角にあり、それによって洗浄が困難であったことからアーチファクトであったと考えられる。1:8希釈でも多少の濁度が観察された。これもまた、おそらくこの試験ウェルがプレート上で陽性対照に隣接していたことからアーチファクトであったと考えられる。

30

【0534】

S2:両方の分離株において1:2~1:32/1:64希釈に播種の減少が観察された。SH1に関しては、1:2希釈で多少の濁度が観察された。これは、この試験ウェルのいくつかはプレートの角にあり、それによって洗浄が困難であったことに起因している。

【0535】

S3:両方の分離株において1:2~1:32/1:64希釈に播種の減少が観察された。S1及びS2に関しては、1:2希釈で多少の濁度が観察された。これは、この試験ウェルのいくつかはプレートの角にあり、それによって洗浄が困難であったことに起因している。

40

【0536】

MH:1:2~1:16/1:32希釈に播種の減少が観察された。

【0537】

結論

この結果は、Surgihoneyが既に形成されたバイオフィルムの播種を防止または減少させることを裏付けている。SurgihoneyのS2及びS3調製物は、S1調製物よりも低濃度でバイオフィルム播種を防止または低減することができたが、S2調製物とS3調製物との間の効力の差はほとんどないことがわかった。S2調製物及びS3調製物は、バイオフィルム播種の減少においてマヌカ蜂蜜よりもわずかに強力であることがわかった。

50

【0538】

実施例30

市販の創傷ドレッシング材と比較した、Surgihoneyによるバイオフィルム形成の防止

本実施例では、不活性Surgihoney (DE)、マヌカ蜂蜜 (MH:「Comvita Manukacare 18+」)、酢酸 (AA)、ならびに複数の市販の創傷ドレッシング材及び創傷クリームと比較した、Pseudomonas aeruginosa (対照株 PA01) 及び Acinetobacter baumannii (対照株 AYE) によるバイオフィルム形成の防止に対するSurgihoney S1、S2及びS3調製物の効果について記載する。

10

【0539】

方法

分離株の一晩培養液をミューラーヒントンブロス中でOD600が0.1になるまで希釈した。

【0540】

Surgihoney S1、S2及びS3、不活性Surgihoney (DE)、ならびにマヌカ蜂蜜 (MH:「Comvita Manukacare 18+」) を1:2~1:256 (希釈剤として水を使用) に段階希釈して試験した。1mlの蜂蜜を、1mlの希釈分離株培養液と共に各ウェルに入れた。

【0541】

以下の市販ドレッシング材をそれぞれ1cm²ずつ、1mlの水及び1mlの希釈分離株培養液に添加した: Mepilex Ag; Urgotul Ag; Acticoat (Ag); Urgotul (AM剤ではない); Mesitran Net (蜂蜜を主成分とするドレッシング材); Polymem (AM剤ではない)。

20

【0542】

市販のクリーム Trimovate 及び Flamazine (皮膚感染症の治療に使用される) も試験した。5%~0.04%の酢酸もまた試験した。

【0543】

バイオフィルム形成を促進するためにプレートを33 (創傷温度) で72時間インキュベートした。次いで、クリスタルバイオレット染色試薬を使用してプレートを顕色し、70%エタノールを使用して染色試薬を溶出した後に可視化した。

30

【0544】

次いで、溶出した色素の光学濃度 (OD) は分光光度計を使用して評価した。OD測定値は、取り込まれたクリスタルバイオレットの量に対応する。OD測定値が高いほどウェルが濃く、バイオフィルムの集積が大きいことを表す。次に、OD測定値をプロットしてグラフを作成した。

【0545】

結果

結果を図32及び33に示す。

【0546】

この結果は、ActicoatとMepilex Agのドレッシング材 (及び程度は少ないがUrgotul silver) が、Flamazineクリームと同様に、両方の株のバイオフィルム形成を防止するのに有効であったことを示す。Urgotul及びPolymemドレッシング材、ならびにMesitran net (市販の蜂蜜を主成分とするドレッシング材)、ならびにTrimovateクリームは、バイオフィルム形成の防止には有効でないことがわかった。

40

【0547】

酢酸は、0.31% (AYE) 及び0.1% (PA01) までバイオフィルム形成の防止に有効であった。

【0548】

50

試験したすべての *Surgihoney* は、少なくとも 1 : 2 及び 1 : 4 希釈で両方の株のバイオフィルム形成の防止に有効であり、また一部はそれよりも低濃度で有効であった（例えば、S 2 は 1 : 64 希釈で AYE に対して有効であった）。

【0549】

S 2 及び S 3 *Surgihoney* は、S 1 *Surgihoney* よりも低濃度でバイオフィルム形成の防止に更に有効であり、各 *Surgihoney* 調製物は、マヌカ蜂蜜よりも低濃度で更に有効であった（例えば、それぞれの 1 : 8 希釈での効果を参照）。マヌカ蜂蜜は 1 : 2 ~ 1 : 4 希釈でバイオフィルム形成の防止に有効であった。

【0550】

この結果はまた、不活性 *Surgihoney* (DE) がバイオフィルム形成の防止に有効であったことを示している。しかしながら、DE 蜂蜜は、過酸化水素活性について試験された、多少の過酸化水素活性を保持することが見出され、完全に不活性化されていないと思われた。

10

【0551】

結論

これらの結果から、*Surgihoney* は、バイオフィルム形成の防止において、いくつかの市販の創傷ドレッシング材に匹敵し、*Mesitran net*（市販の蜂蜜を主成分とするドレッシング材）よりも有効であるという結論を得た。

【0552】

上記の実施例では、*A. baumannii* の 4 つの分離株及び *P. aeruginosa* の 3 つの分離株を試験し、*Surgihoney* はすべての分離株のバイオフィルム形成を用量依存的に防止することができた。既に形成された *A. baumannii* のバイオフィルムを、すべての *Surgihoney* 製剤に 24 時間曝露した。試験した両方の株でバイオフィルムの播種の減少が観察され、これもまた用量依存的であった。

20

【0553】

ドレッシング材実験（実施例 30）では、*Surgihoney* が、試験した 8 種類の市販のクリーム及びドレッシング材のうちの 3 種類と同等またはそれ以上にバイオフィルムの防止に有効であることが明らかとなった。

【0554】

更に、この *in vitro* 試験において、*Surgihoney* は、*A. baumannii* 及び *P. aeruginosa* の単一の分離株のバイオフィルム形成を防止する上で、*L-Mesitran net* よりも有効であった。

30

【0555】

これらの結果は、*Surgihoney* が、熱創傷の主要なグラム陰性病原菌に対して強力な抗バイオフィルム活性を有し、試験されたほとんどの市販ドレッシング材を凌ぐ優れた活性を有することを示している。この組成物は抗生物質の代わりに使用することができるため、抗生物質耐性が増加する時代にあって不適切な抗生物質の使用を削減するのに役立つ。

【0556】

実施例 31

Surgihoney を含有するエレクトロスピンニング創傷ドレッシング材の抗微生物活性

40

4 重量 % のポリエチレンオキシド (PEO) を含有する水溶液を、*Surgihoney* 20 % に対して PEO 溶液 80 % の重量比で *Surgihoney* と混合した。この組成物を、*Elmarco NanoSpider*（商標）エレクトロスピンニング装置を使用して、電圧 60 kV、離間距離 17 cm 及び電極回転 10 rpm でアルギネート基材にエレクトロスピンニングして、*Surgihoney* ドレッシング材を形成した。

【0557】

5 重量 % の PEO 水溶液 (*Surgihoney* を含有しない) もまた、同じエレクトロスピンニング装置及びパラメータを用いてアルギネート基材にエレクトロスピンニングし、

50

対照ドレッシング材を形成した。

【0558】

第1の試験では、栄養寒天を入れた3つのペトリ皿の表面に *Escherichia coli* の一晚培養液を広げた。対照ドレッシング材及び *Surghoney* ドレッシング材のサンプル（約 $2 \times 2 \text{ cm}$ ）を培養物の表面に置いた。対照ドレッシング材を各プレートの左側に置き、*Surghoney* のドレッシング材を各プレートの右側に加えた。このプレートを 37°C で一晚18時間にわたりインキュベートした。

【0559】

第2の試験では、栄養寒天を入れた3つのペトリ皿の表面に *Staphylococcus aureus* の一晚培養液を広げた。対照ドレッシング材及び *Surghoney* ドレッシング材のサンプル（約 $2 \times 2 \text{ cm}$ ）を培養物の表面に置いた。対照ドレッシング材を各プレートの左側に置き、*Surghoney* のドレッシング材を各プレートの右側に加えた。このプレートを 37°C で一晚18時間にわたりインキュベートした。

10

【0560】

第3の試験では、過酸化水素の有無について *Surghoney* ドレッシング材及び対照ドレッシング材を試験した。過酸化水素の有無を、*Merckoquant*（登録商標）の過酸化水素試験キット（コード番号1.10011）を用いて判定した。過酸化水素試験キットの利用前にドレッシング材を濡らした。

【0561】

結果

20

第1の試験結果を図34に示す。各プレートの左側にある対照周辺に阻止円（ZOI）はなく、右側の活性サンプル周辺にはグラム陰性菌に対する活性を示す約 $1 \sim 2 \text{ mm}$ のZOIがあった。

【0562】

第2の試験結果を図35に示す。各プレートの左側にある対照周辺にZOIはなく、右側の活性サンプル周辺にはグラム陽性菌に対する活性を示す約 $5 \sim 10 \text{ mm}$ の明瞭なZOIがあった。

【0563】

第3の試験結果を図36に示す。左側が活性 *Surghoney* ドレッシング材である。青色の有無によって、エレクトロスピンングされた *Surghoney* ドレッシング材（Dと表示）は過酸化水素を生成しており、右側の対照ドレッシング材（Eと表示）は過酸化水素生成能力を有していないことがわかる。

30

【0564】

実施例32

噴霧可能な組成物

1重量%のポリエチレンオキシド（PEO）、79重量%の脱イオン水及び20重量%の *Surghoney* を含む組成物をポンプ作動式噴霧装置に添加した。

【0565】

スプレー装置を使用して組成物を過酸化水素試験片に噴霧した。試験片は、組成物中の過酸化水素の存在を示した。

40

【0566】

5か月後に、スプレーを過酸化水素試験片に噴霧することにより、過酸化水素の生成能力について再試験した。試験片は、組成物中の過酸化水素の存在を示した。

【0567】

実施例33

Surghoney の抗ウイルス活性

SH1またはSH2 *Surghoney* を単純ヘルペスウイルス（HSV）と混合し（ $50 \mu\text{g}$ の蜂蜜と $50 \mu\text{l}$ のウイルス）、 37°C で1時間インキュベートした。次いで、この混合物から希釈系列（ 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ）を調製し、この希釈液をブラック減少アッセイに使用した。蜂蜜を含まない対照、または対照蜂蜜を用

50

いた対照も実施した。各希釈液に形成されたウイルスプラークの数を記録した。結果を以下の表に示す。

【表 19】

蜂蜜	希釈	実験 1			実験 2		
		ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3	ウェル 1	ウェル 2	ウェル 3
SH1	-2	*	*	*	*	*	*
	-3	1	1	5	0	0	0
	-4	0	1	1	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0
SH2	-2	*	*	*	*	*	*
	-3	0	0	0	0	0	0
	-4	0	0	0	0	0	0
	-5	0	0	0	0	0	0
対照蜂 蜜	-2	100	95	88	108	128	106
	-3	13	15	11	14	12	15
	-4	2	1	2	3	2	2
	-5	0	0	0	0	0	1
蜂蜜な し	-2				160	158	164
	-3				28	22	18
	-4				6	4	1
	-5				1	0	1

10

20

【0568】

この結果は、いずれの実験でもSH1及びSH2 SurgihoneyがHSVに対して強度に殺ウイルス性であったことを示す。

【0569】

30

実施例 34

Surgihoneyの細胞毒性活性

SH1またはSH2 Surgihoney (10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} に希釈した50 μ gの蜂蜜)を細胞上で2日間インキュベートした。生存細胞の数及び細胞の総数を計数した(生存率 = 生存数 / 総数 \times 100)。結果を以下の表及び図37に示す。

【0570】

この結果は、SH1 Surgihoneyが 10^{-2} 希釈で細胞毒性であり、 10^{-3} 及び 10^{-4} 希釈で細胞増殖抑制性であり、SH2 Surgihoneyが 10^{-2} 、 10^{-3} 及び 10^{-4} 希釈で細胞増殖抑制性であったことを示す。SH1及びSH2 Surgihoneyは、 10^{-5} 希釈では細胞毒性でも細胞増殖抑制性でもなかった。

40

【0571】

実施例 33及び34の結果から、Surgihoneyは、殺ウイルス性であるが細胞毒性または細胞増殖抑制性ではない用量で投与することができるという結論が得られる。

【 表 2 0 】

条件	希釈	生存細胞数				総細胞数				生存率			
		反復 1	反復 2	平均	標準偏差	反復 1	反復 2	平均	標準偏差	反復 1	反復 2	平均	標準偏差
DMEM	-	1300000	2100000	1700000	565685.4	1400000	2600000	2000000	848528.1	92.9	80.8	86.8	8.5
対照蜂 蜜	-2	1200000	880000	1040000	226274.2	1300000	1000000	1150000	212132	92.3	88.0	90.2	3.0
	-3	2700000	2400000	2550000	212132	2800000	2600000	2700000	141421.4	96.4	92.3	94.4	2.9
	-4	3400000	2800000	3100000	424264.1	3600000	3000000	3300000	424264.1	94.4	93.3	93.9	0.8
	-5	2100000	1300000	1700000	565685.4	2200000	1500000	1850000	494974.7	95.5	86.7	91.1	6.2
SH1	-2	120000	70000	95000	35355.34	370000	350000	360000	14142.14	32.4	20.0	26.2	8.8
	-3	380000	380000	380000	0	400000	600000	500000	141421.4	95.0	63.3	79.2	22.4
	-4	430000	780000	605000	247487.4	470000	850000	660000	268700.6	91.5	91.8	91.6	0.2
	-5	1800000	2200000	2000000	282842.7	2000000	2400000	2200000	282842.7	90.0	91.7	90.8	1.2
SH2	-2	320000	360000	340000	28284.27	390000	400000	395000	7071.068	82.1	90.0	86.0	5.6
	-3	450000	570000	510000	84852.81	760000	730000	745000	21213.2	59.2	78.1	68.6	13.3
	-4	460000	690000	575000	162634.6	660000	790000	725000	91923.88	69.7	87.3	78.5	12.5
	-5	1600000	1700000	1650000	70710.68	1800000	2000000	1900000	141421.4	88.9	85.0	86.9	2.7

【 0 5 7 2 】

実施例 3 5

乾燥 S u r g i h o n e y

10

20

30

40

50

乾燥蜂蜜顆粒 (K 2 4 2 8 9) を Kan e g r a d e L i m i t e d (S t e v e n a g e , U K) から入手した。乾燥蜂蜜顆粒は真空乾燥によって製造され、脱脂粉乳を含む蜂蜜固体を含有していた。水分量は 3 % 未満であった。

【 0 5 7 3 】

乾燥蜂蜜顆粒を、S 1 (S H 1) 及び S 2 (S H 2) レベルのグルコースオキシダーゼを添加することにより活性化した (実施例 2 0 を参照) 。

【 0 5 7 4 】

図 3 8 (左) は、活性化された乾燥蜂蜜顆粒に水を添加すると、過酸化水素の指示片によって検出されるように、5 0 ~ 1 0 0 p p m の過酸化水素が直ちに生成されたことを示している。

10

【 0 5 7 5 】

図 3 8 (右) は、2 g の活性乾燥蜂蜜顆粒を 3 0 g の滅菌温水 (約 3 5) に添加した結果を示す。活性蜂蜜顆粒は、スカムの形成なく容易に溶解した。4 日後でさえ、顆粒が完全に溶解したままであったため沈降はなかった。

【 0 5 7 6 】

図 3 9 は、溶解した活性蜂蜜の活性が長期間にわたって保持されたことを示している。上列 (左から右) : 0 時間 ; 3 0 分 ; 6 0 分 ; 9 0 分。下列 (左から右) : 6 時間 ; 1 6 . 5 時間 ; 4 日。4 日後、過酸化水素のレベルは 5 0 ~ 1 0 0 p p m で一定のままであった。これは、グルコースオキシダーゼが活性のままであり、長期間にわたり過酸化水素を生成するのに十分なグルコースが存在したことを示す。

20

【 0 5 7 7 】

実施例 3 6

水性 S u r g i h o n e y 組成物の安定性

サンプルは 2 0 1 4 年 1 1 月 9 日に次の組成物で調製した :

S H 2 S u r g i h o n e y : 2 0 重量 %

P V A : 5 重量 %

水 : 7 5 重量 %

【 0 5 7 8 】

2 0 1 5 年 1 0 月 1 6 日に過酸化水素試験片を使用してサンプルを試験したところ、依然 3 0 ~ 5 0 p p m のレベルで過酸化水素を生成していることが判明した。

30

【 0 5 7 9 】

2 0 1 5 年 9 月 1 4 日に S H 2 S u r g i h o n e y を水と 1 : 1 5 の比 (S u r g i h o n e y : 水、重量比) で混合することによりサンプルを調製した。2 0 1 5 年 1 0 月 1 6 日に過酸化水素試験片を使用してサンプルを試験したところ、依然として 3 0 ~ 5 0 p p m のレベルで過酸化水素を生成していることが判明した。

【 0 5 8 0 】

実施例 3 7

下部生殖管感染症の局所治療のための S u r g i h o n e y の使用

S u r g i h o n e y は、標準療法に応答性がなかった持続性の膣帯下の治療に使用されている。適応症は、様々な病因による膣帯下、例えば細菌性膣炎及び一般的な細菌性膣帯下であった。

40

【 0 5 8 1 】

S u r g i h o n e y でコーティングしたタンポンを膣に挿入し、2 4 時間ごとに交換した。治療結果は良好であり、副作用は報告されなかった。

【 0 5 8 2 】

実施例 3 8

C P E を治療するための S u r g i h o n e y の使用

インド滞在中に足部の軟組織感染症を発症した患者が、壊死性筋膜炎と診断された。これには、死組織の広範なデブリードマンのほか、抗生物質が必要であった。術後、患者の清拭された創傷に C P E (カルバペネマーゼ産生腸内細菌科) によるコロニーが形成され

50

ていることが判明した。患者は隔離を必要とし、S u r g i h o n e y による治療で微生物は除去された。

【 0 5 8 3 】

実施例 3 9

非水性溶媒を含む組成物

サンプル 1

軽量水流交絡布地 (4 0 g / m ²)

2 5 % ^w / ^w の蜂蜜 / グリセロール溶液によるコーティング

布地のコーティング重量 1 0 0 g / m ²

推奨用途：創傷ドレッシング材の吸収性布地。

10

【 0 5 8 4 】

サンプル 2

軽量水流交絡布地 (4 0 g / m ²)

7 5 % ^w / ^w の蜂蜜 / グリセロール溶液によるコーティング

布地のコーティング重量 1 0 0 g / m ²

推奨用途：創傷ドレッシング材の吸収性布地。

【 0 5 8 5 】

サンプル 3

軽量水流交絡布地 (4 0 g / m ²)

2 5 % ^w / ^w の蜂蜜 / グリセロール溶液によるコーティング

布地のコーティング重量 3 0 0 g / m ²

推奨用途：抗菌ワイブ

20

【 0 5 8 6 】

サンプル 4

軽量水流交絡布地 (4 0 g / m ²)

7 5 % ^w / ^w の蜂蜜 / グリセロール溶液によるコーティング

布地のコーティング重量 3 0 0 g / m ²

推奨用途：抗菌ワイブ

【 0 5 8 7 】

サンプル 5

紙状の布地 (4 2 g / m ²)

2 5 % ^w / ^w の蜂蜜 / グリセロール溶液によるコーティング

布地のコーティング重量 1 0 0 g / m ²

推奨用途：抗菌ワイブ

30

【 0 5 8 8 】

サンプル 6

2 5 % ^w / ^w の蜂蜜 / グリセロール溶液によりコーティングした B o o t s (登録商標)
創傷ドレッシング材

布地のコーティング重量 4 0 0 g / m ²

40

【 0 5 8 9 】

サンプル 7

2 5 % ^w / ^w の蜂蜜 / グリセロール溶液によりコーティングした、吸収性パッド付き B o o t s (登録商標) 粘着創傷ドレッシング材

布地のコーティング重量 1 5 0 g / m ²

【 0 5 9 0 】

サンプル 8

軽量水流交絡布地 (4 0 g / m ²)

2 5 % ^w / ^w の S u r g i h o n e y / グリセロール溶液によるコーティング

布地のコーティング重量 1 0 0 g / m ²

推奨用途：創傷ドレッシング材の吸収性布地。

50

【0591】

サンプル9

軽量水流交絡布地 (40 g / m²)

25 %^{w / w} の *Surghoney* / グリセロール溶液によるコーティング

布地のコーティング重量 300 g / m²

【0592】

実施例40

蜂蜜、非水性溶媒、及び追加の水を含む組成物

Boots (登録商標) *Travel Spray* ボトルから容易に噴霧される以下の組成物 (すべて重量%) で調製した。

蜂蜜 (*Surghoney*) : 25 %

グリセロール : 52.5 %

水 : 22.5 %

【0593】

蜂蜜中に水分が含まれる場合、この組成物は 68.9 % の水モル分率を有する。

スプレーボトルは手動ポンプで操作する。

ポンプ入口管の長さ : 100 mm

管の内径 : 1.5 mm

出口の内径 : 2.5 mm

ポンプ吐出量 : 1 回転当たり水 0.14 g。

【0594】

実施例41

マスト細胞に対する *Surghoney* の細胞毒性

マスト細胞は、外部環境、例えば鼻粘膜組織と密に接触する組織の上皮直下に位置する監視細胞である。この細胞は病原体の認識及び免疫応答の調節において重要な役割を果たす。本実施例では、ヒトマスト細胞株 HMC - 1 細胞に対する、濃度の異なる *Surghoney* の効果について記載する。

【0595】

方法

A) 細胞培養

濃度の異なる (100 g / L、40 g / L、10 g / L、1 g / L) *Surghoney* の S1、S2 及び S3 調製物ならびに対照蜂蜜 (アカシア) を使用した。これらは、細胞増殖培地 (IMDM、10 % FBS、2 % ペニシリンストレプトマイシン) を用いて作製した。200 万個の HMC - 1 細胞を 12 ウェルプレートに添加し、濃度ごとに 2 ml 使用した。

B) 細胞生存性アッセイ

20 µl のサンプルをトリパンブルーで染色することにより、3 時間、6 時間及び 24 時間時点の細胞生存を評価した。

C) 細胞生存アッセイ及び細胞死アッセイ

血球計数器を使用して、生細胞及び死細胞を計数した。死細胞の比率を計算し、データを *Graph Pad Prism* を使用して分析した。

【0596】

結果

濃度の異なる S1、S2、及び S3 *Surghoney* による 3 時間、6 時間及び 24 時間時点での HMC - 1 細胞培養液の結果を図 40 に示す。高濃度の *Surghoney* (S1) 及び対照アカシア蜂蜜はいずれも HMC - 1 の生存にとって有害であった。100 g / L の S1 *Surghoney* を使用した場合、HMC - 1 細胞形態が変化することが観察された。しかし、S2 及び S3 *Surghoney* は、10 g / L 及び 40 g / L で、3 時間及び 6 時間の時点で HMC - 1 細胞の細胞死を低率で示した。

【0597】

10

20

30

40

50

結論

これらの結果は、マスト細胞が存在する領域、例えば鼻粘膜組織のような外部環境と密に接触する組織の上皮での微生物感染の治療では、100 g/L未満、好ましくは40 g/L以下、10 g/L以下、または1 g/L以下の濃度でSurghoney（特にS1、S2またはS3調製物、好ましくはS2またはS3調製物）または本発明の他の組成物を使用することが有益であり得ることを示している。

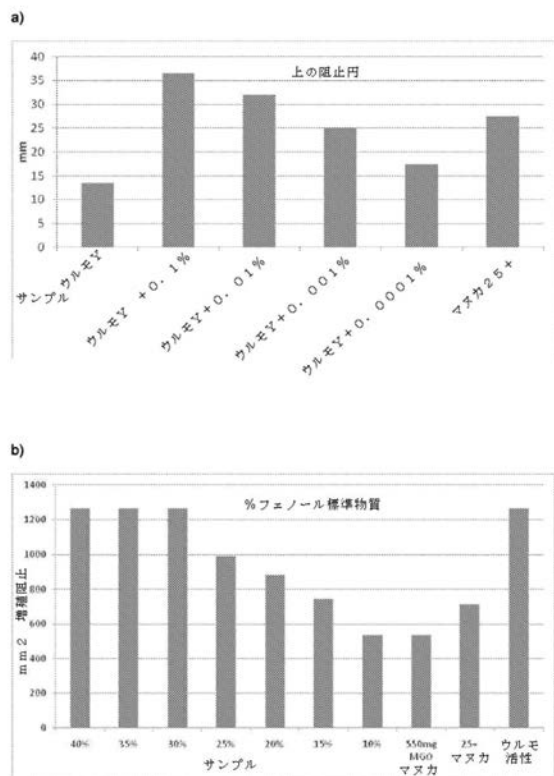
【0598】

また、特にマスト細胞が存在する領域、例えば鼻粘膜組織などの外部環境に密に接触する組織の上皮と接触するとき、Surghoneyまたは本発明の他の組成物と細胞の接触を、24時間未満、好ましくは6時間未満、または3時間未満に制限することもある有益であり得る。

10

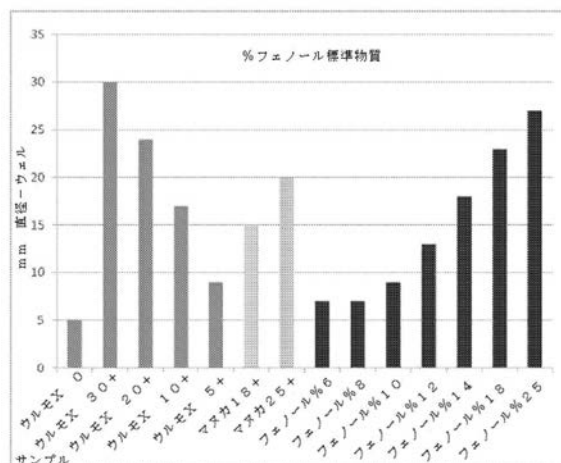
【図1】

【図1】

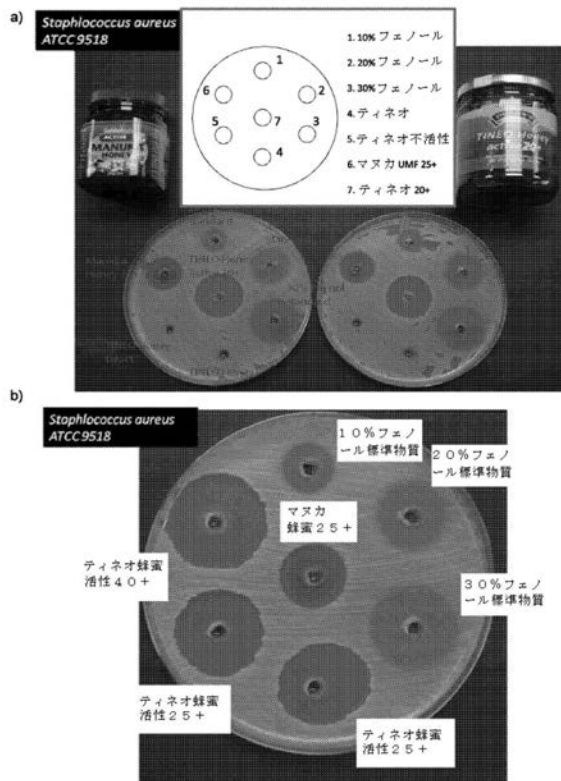


【図2】

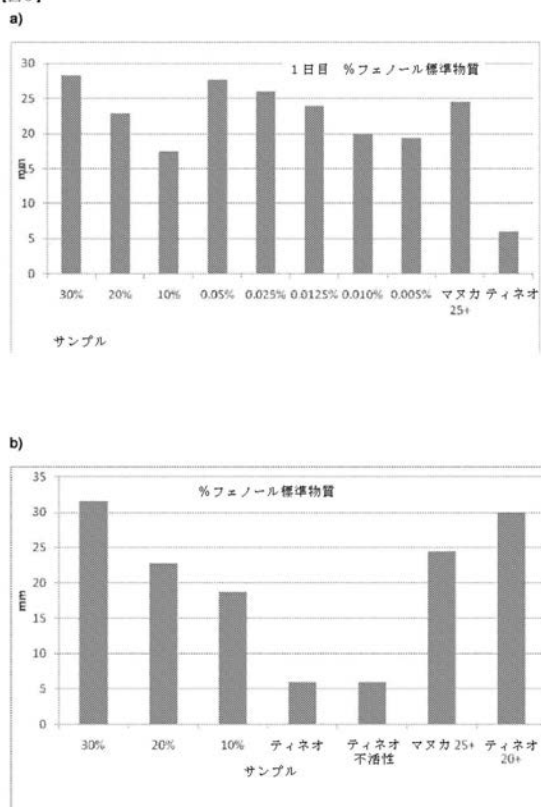
【図2】



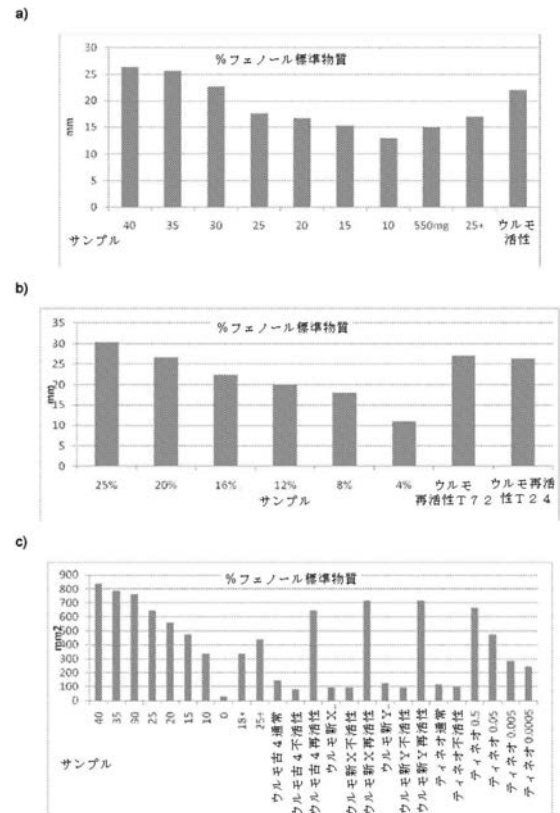
【圖3】



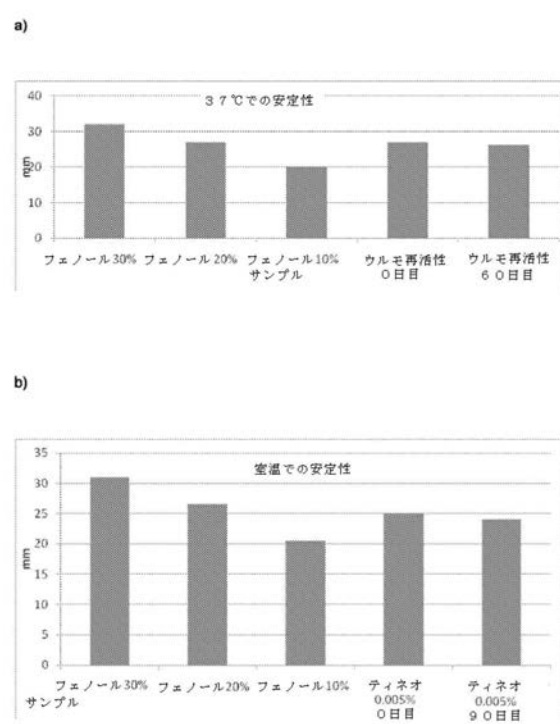
【图5】



【图 4】

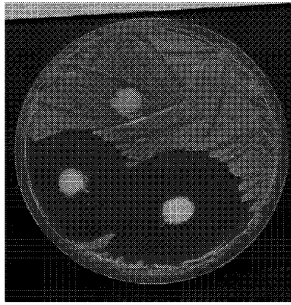


【圖6】



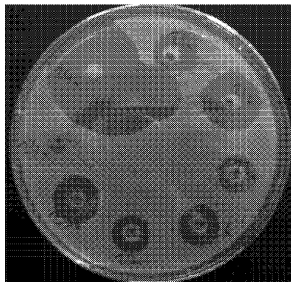
【図 7 a)】

a)



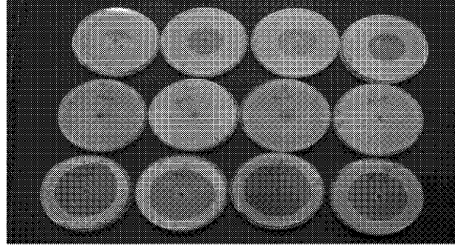
【図 7 b)】

b)



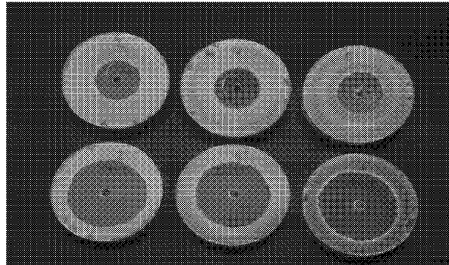
【図 8 a)】

a)



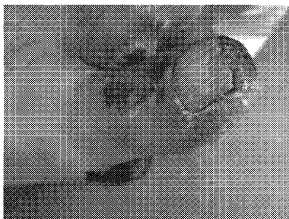
【図 8 b)】

b)



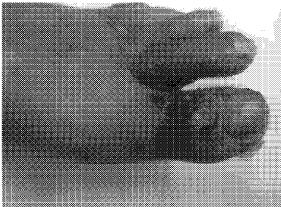
【図 9 a)】

a)



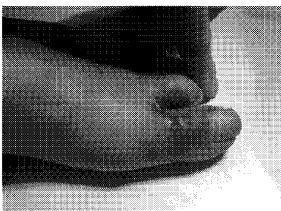
【図 9 b)】

b)



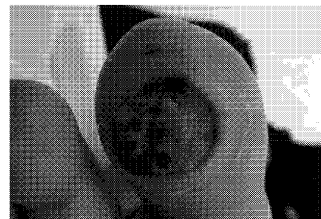
【図 9 c)】

c)



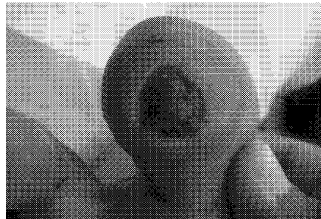
【図 10 a)】

a)



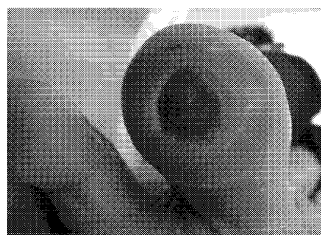
【図 10 b)】

b)

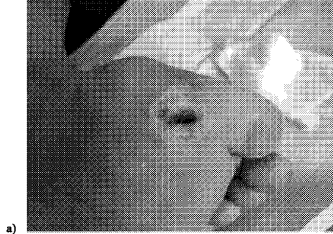


【図 10 c)】

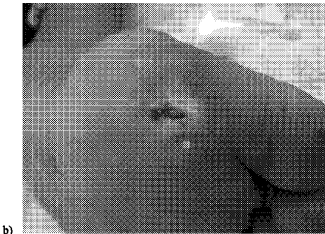
c)



【図 1 1 a)】



【図 1 1 b)】



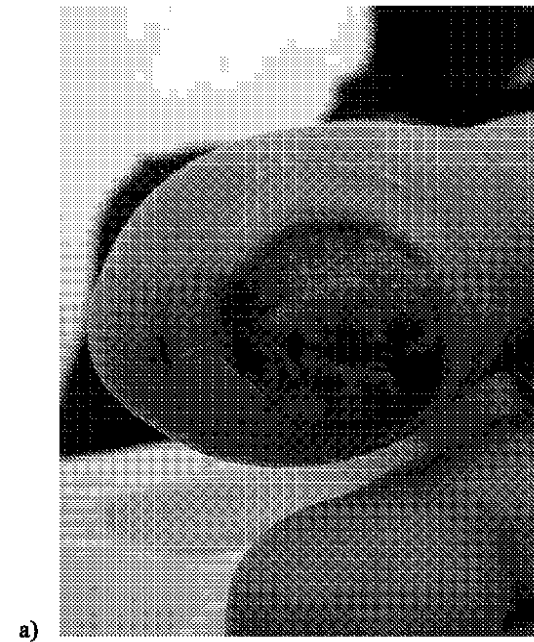
【図 1 1 c)】



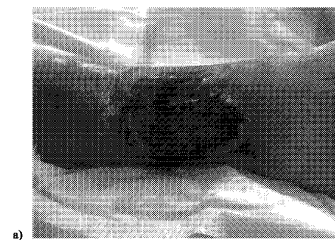
【図 1 2 b)】



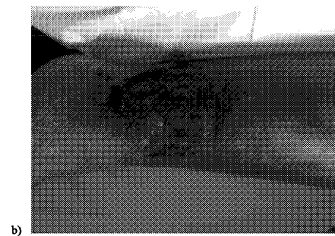
【図 1 2 a)】



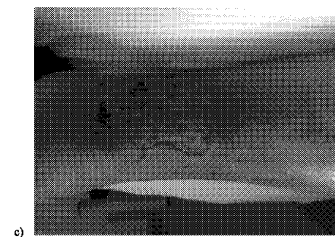
【図 1 3 a)】



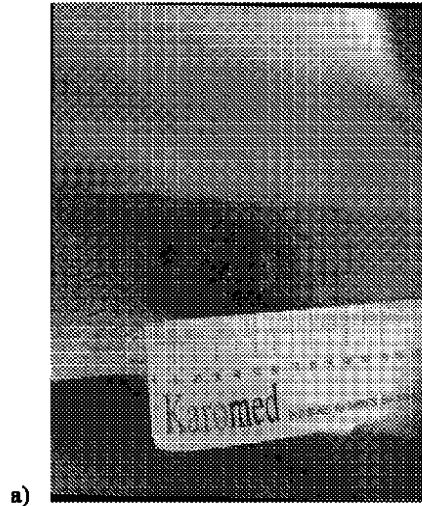
【図 1 3 b)】



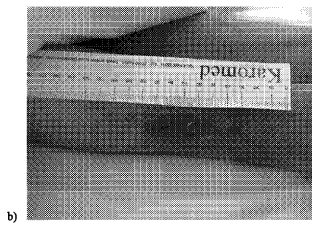
【図 1 3 c)】



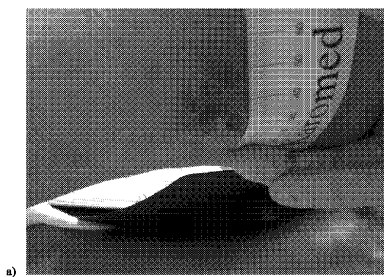
【図 14 a)】



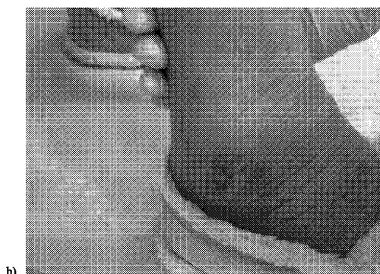
【図 14 b)】



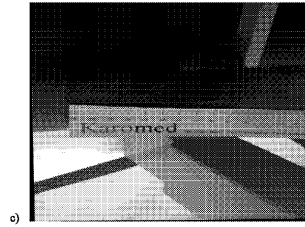
【図 16 a)】



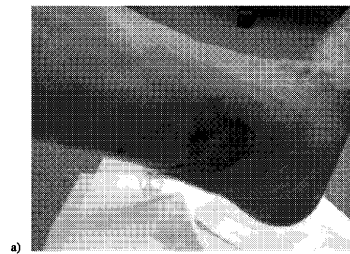
【図 16 b)】



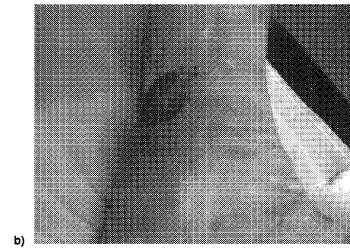
【図 14 c)】



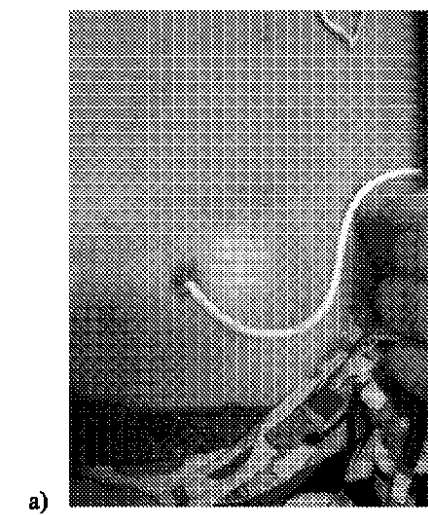
【図 15 a)】



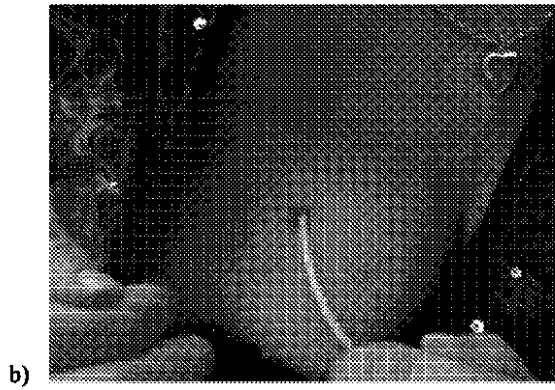
【図 15 b)】



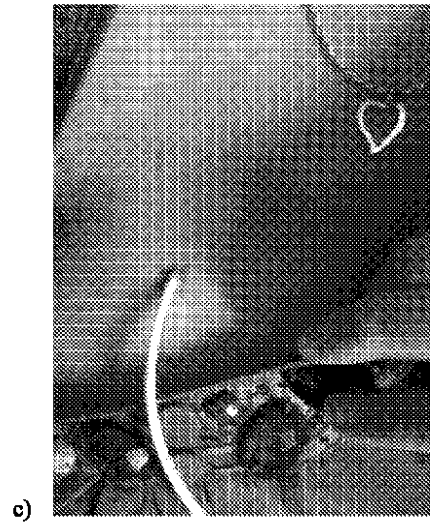
【図 17 a)】



【図 17 b)】

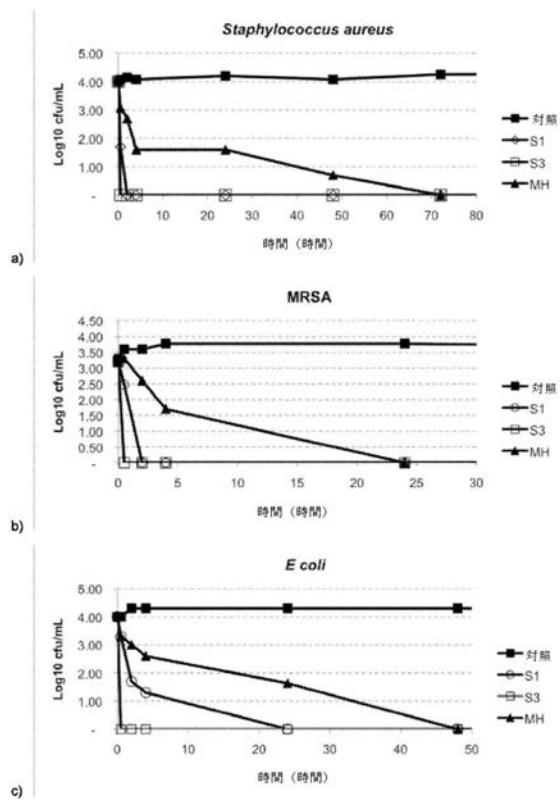


【図 17 c)】

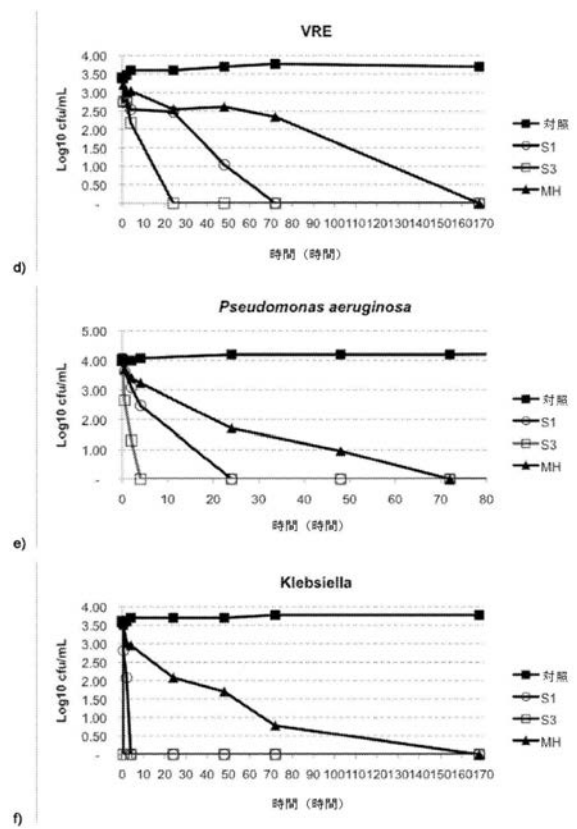


【図 18 - 1】

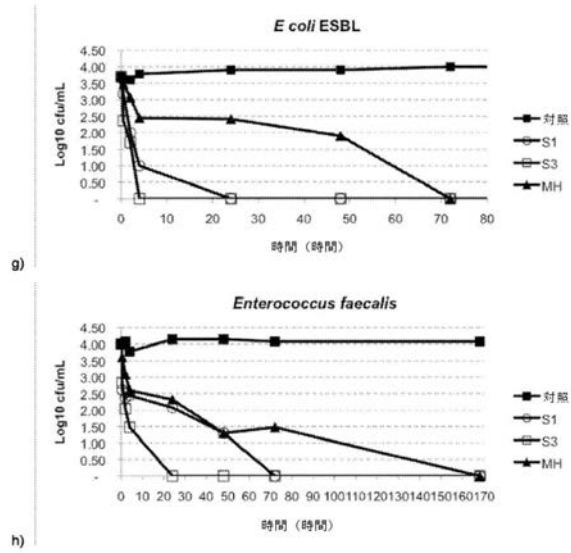
【図 18】



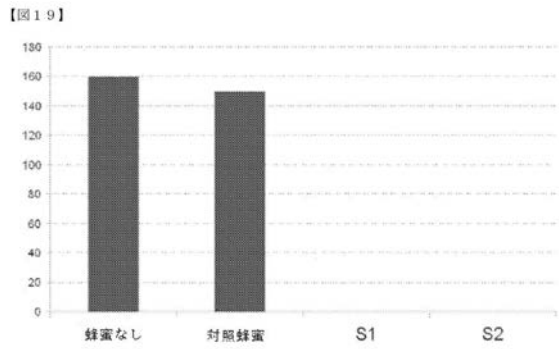
【図 18 - 2】



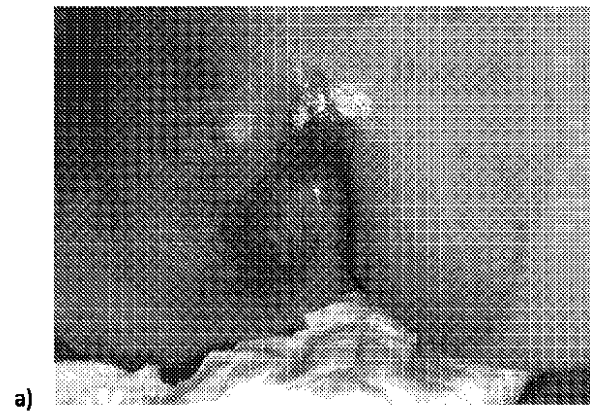
【図 18 - 3】



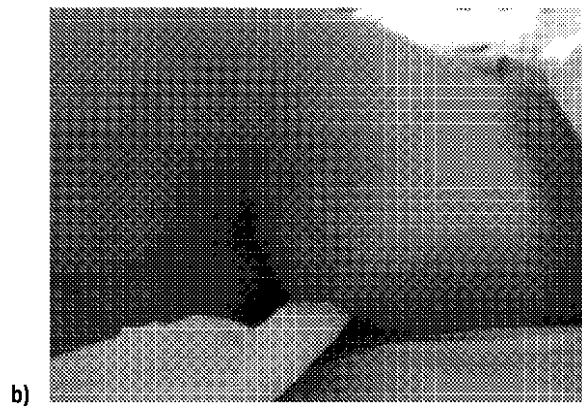
【図 19】



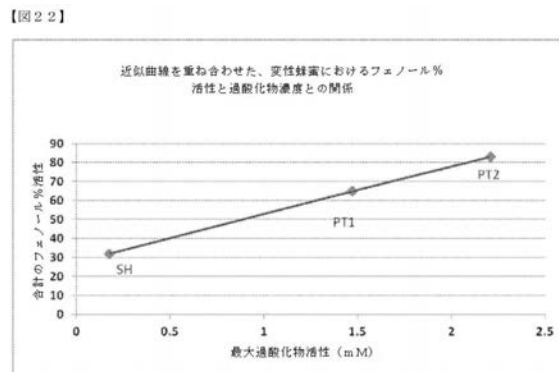
【図 20 a)】



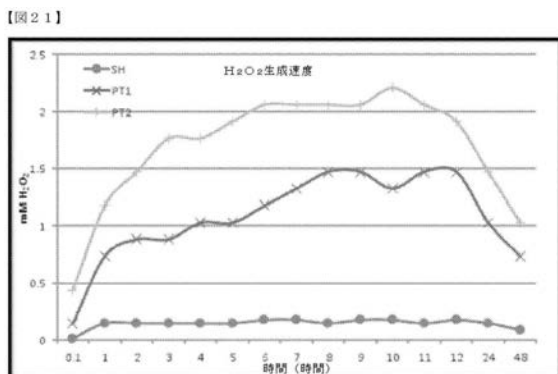
【図 20 b)】



【図 22】

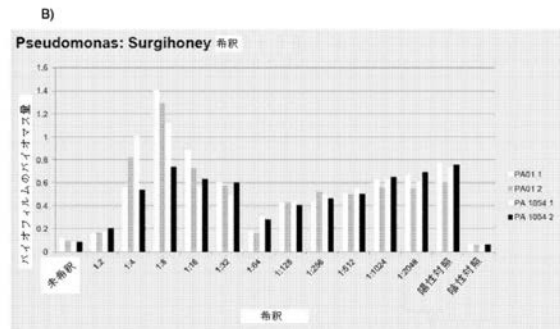
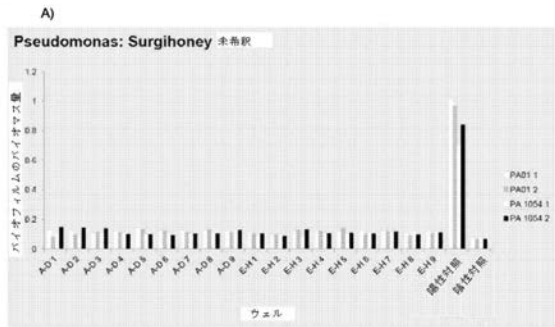


【図 21】



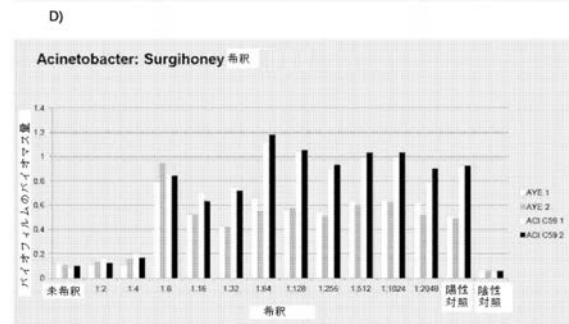
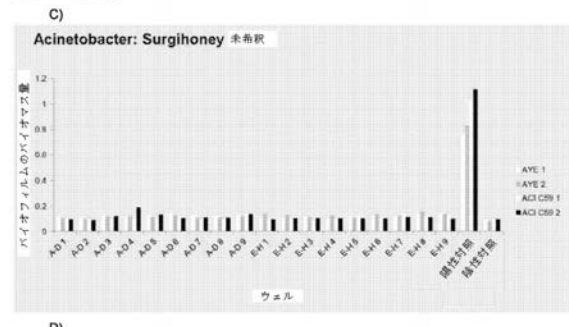
【図 2 3 - 1】

【図 2 3】



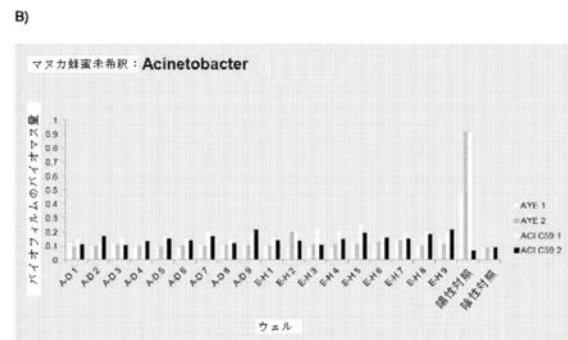
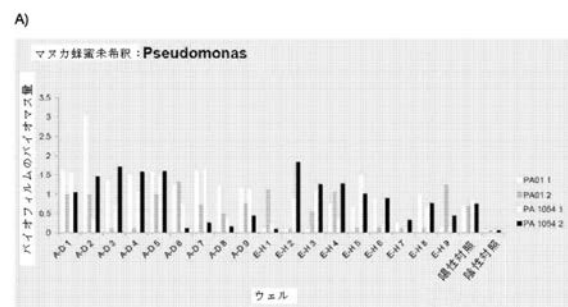
【図 2 3 - 2】

【図 2 3 (続き)】



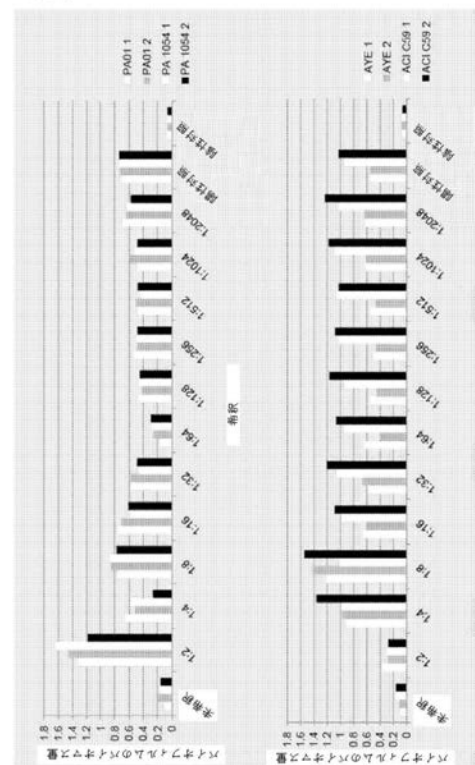
【図 2 4 - 1】

【図 2 4】



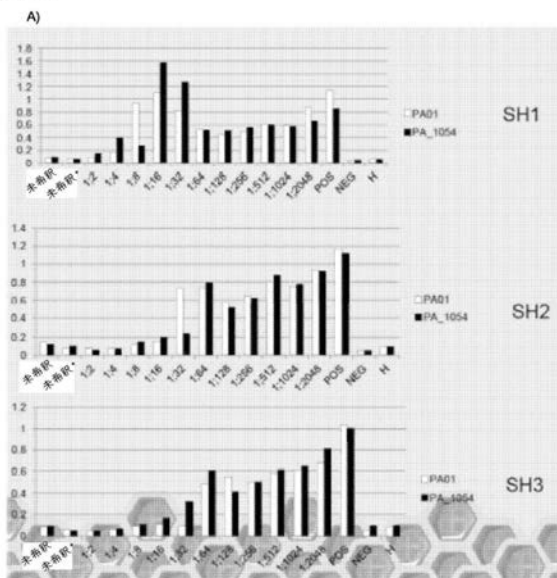
【図 2 4 - 2】

【図 2 4 (続き)】



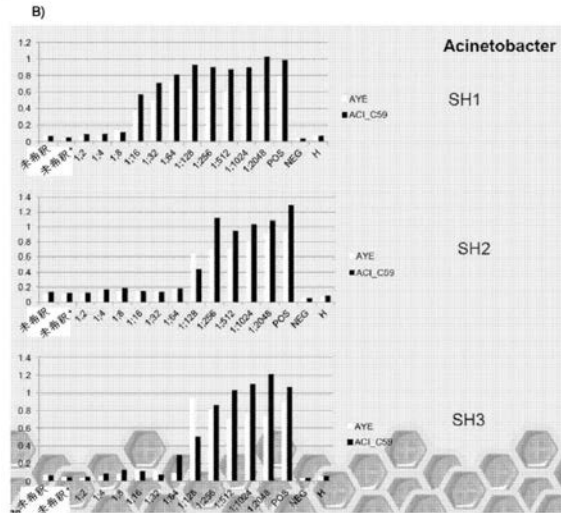
【図 25 - 1】

【図 25】



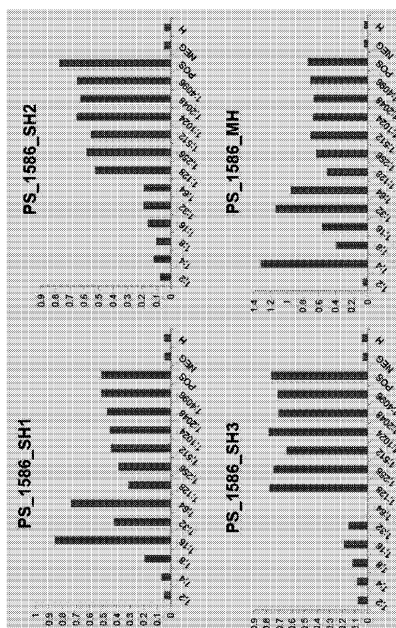
【図 25 - 2】

【図 25 (続き)】



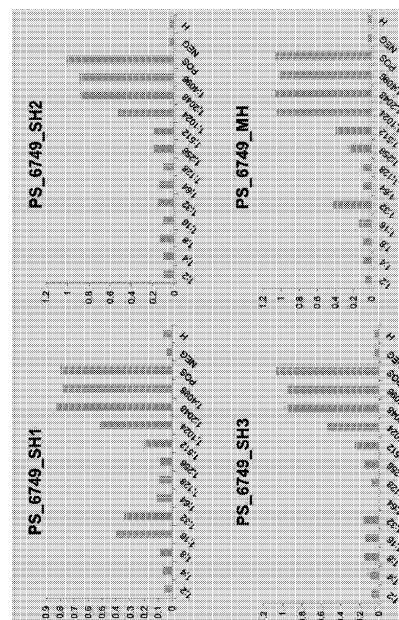
【図 26】

Figure 26



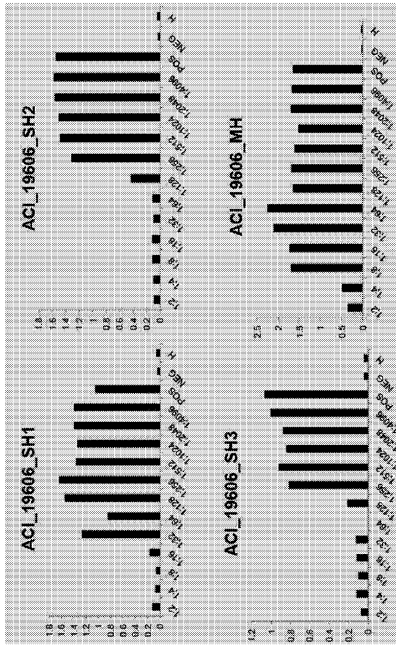
【図 27】

Figure 27



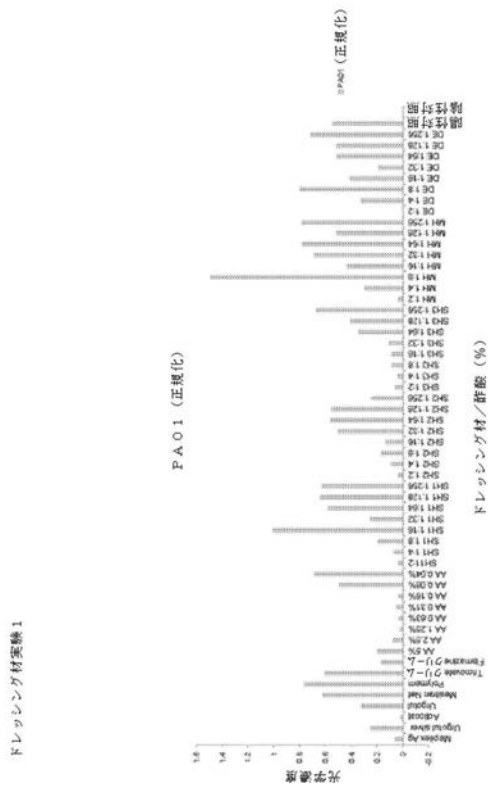
【図 28】

Figure 28



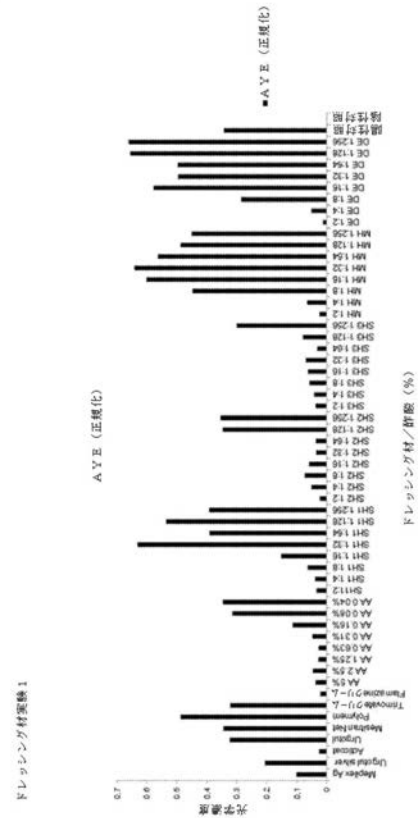
【 図 3 2 】

【圖 3 2】



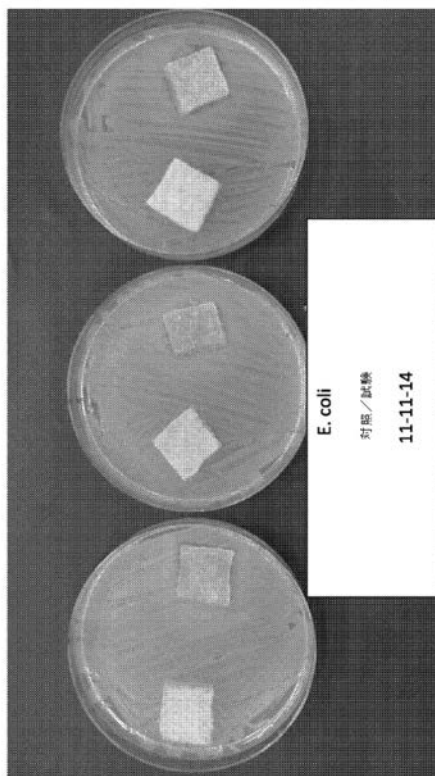
【 図 3 3 】

【圖 3 3】



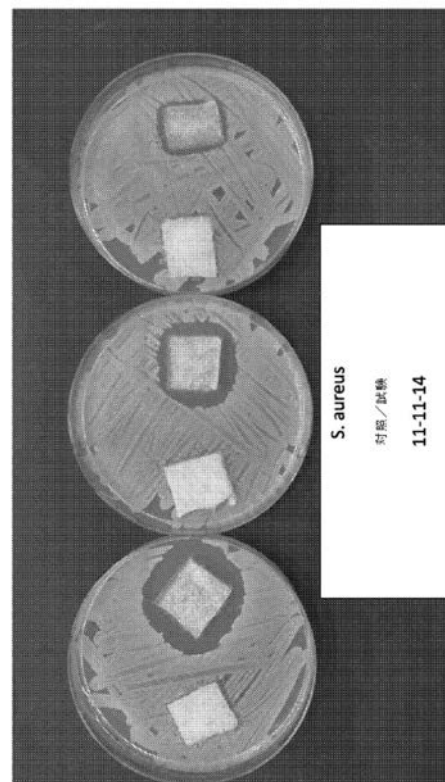
【 図 3 4 】

【图 3-4】

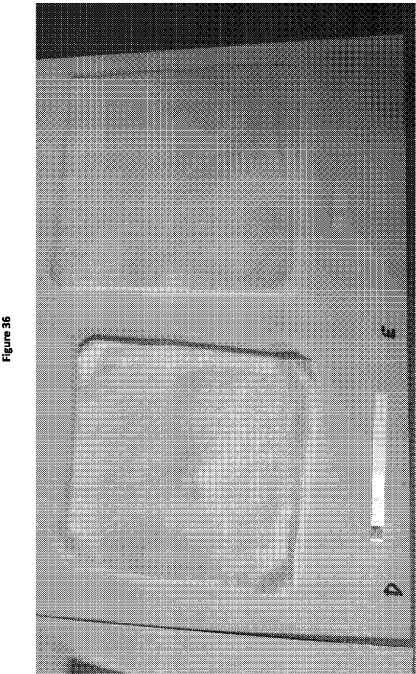


【 ㄨ 3 5 】

【圖 3.5】

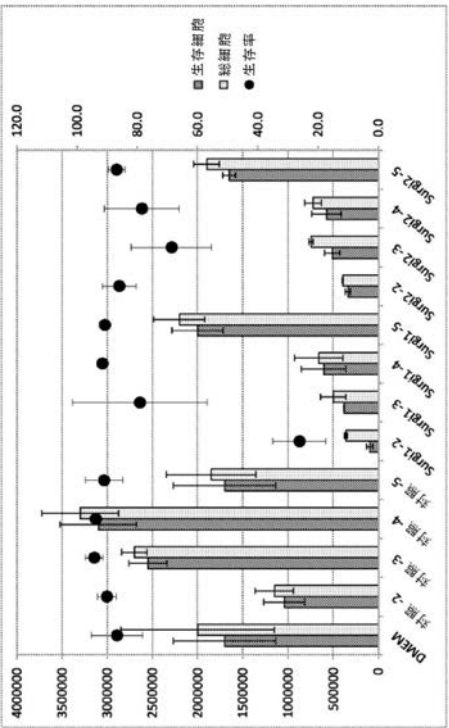


【図 3 6】



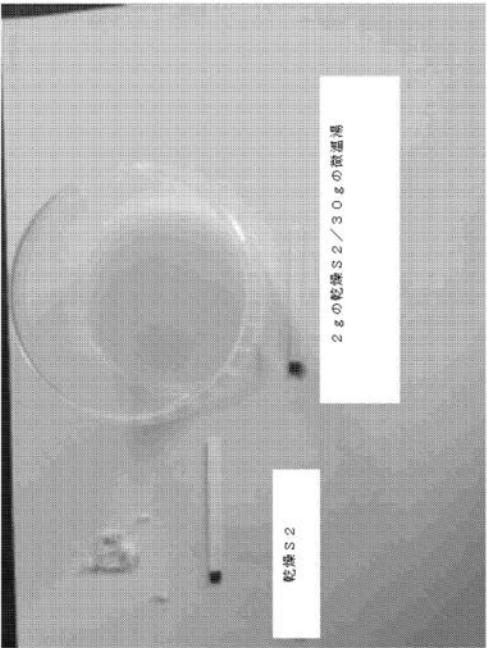
【図 3 7】

【図 3 7】



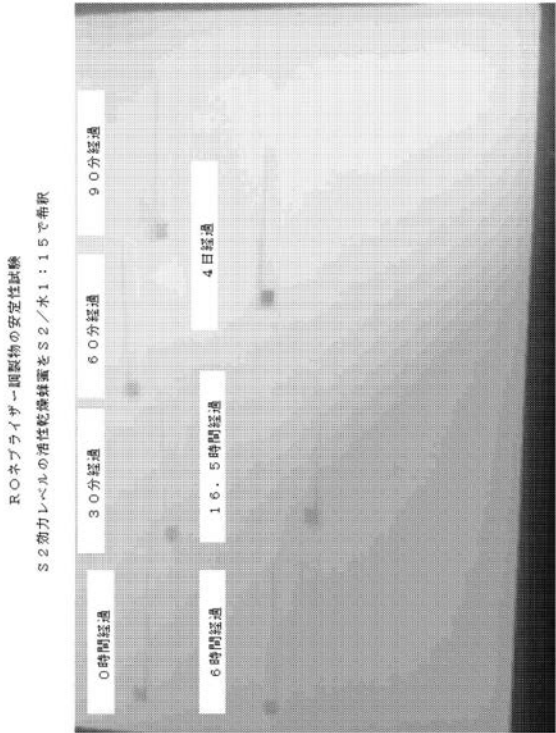
【図 3 8】

【図 3 8】



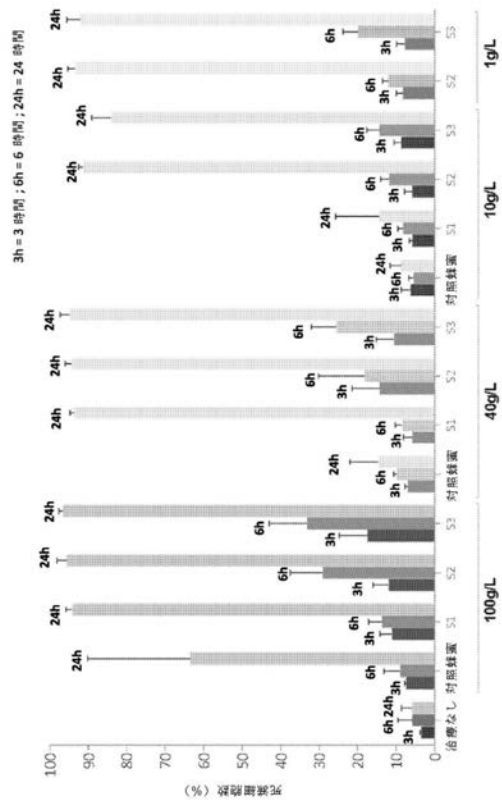
【図 3 9】

【図 3 9】



【図 40】

【図 40】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2016/050253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61L15/24 A61L15/26 A61L15/40 A61L15/42 A61L15/46
ADD.

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

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/291122 A1 (VANDEPUTTE JAN [BE]) 26 November 2009 (2009-11-26)	11-22, 25-61, 65-67, 70-74, 80-96, 100, 102-104, 106-116, 118,120, 123,124
	examples 4-12 -----	
X	WO 2008/049251 A1 (SCHOELLER TEXTIL AG [CH]; GREINER ANDREAS [DE]; HEHL JUDITH [DE]) 2 May 2008 (2008-05-02) cited in the application example 1 -----	1-124
	----- -/-	

☒ 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

Z document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 May 2016

Date of mailing of the international search report

02/06/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Siebum, Bastiaan

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2016/050253

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 4 576 817 A (MONTGOMERY ROBERT E [US] ET AL) 18 March 1986 (1986-03-18) column 1, lines 5-10 examples 1-3 -----	1-124

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2016/050253

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009291122 A1	26-11-2009	AT 440590 T BE 1017155 A3 EP 2040669 A1 US 2009291122 A1 WO 2007137881 A1	15-09-2009 04-03-2008 01-04-2009 26-11-2009 06-12-2007
-----	-----	-----	-----
WO 2008049251 A1	02-05-2008	NONE	
-----	-----	-----	-----
US 4576817 A	18-03-1986	NONE	
-----	-----	-----	-----

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 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7	4 L 0 4 7	
A 6 1 L	15/34	(2006.01)	A 6 1 L	15/34	1 0 0		
A 6 1 L	15/26	(2006.01)	A 6 1 L	15/26	1 0 0		
A 6 1 L	15/38	(2006.01)	A 6 1 L	15/38	1 0 0		
A 6 1 L	15/44	(2006.01)	A 6 1 L	15/44	1 0 0		
A 6 1 L	15/28	(2006.01)	A 6 1 L	15/28	1 0 0		
A 6 1 K	33/40	(2006.01)	A 6 1 K	33/40			
A 6 1 K	9/14	(2006.01)	A 6 1 K	9/14			
A 6 1 K	9/20	(2006.01)	A 6 1 K	9/20			
A 6 1 K	9/70	(2006.01)	A 6 1 K	9/70			
A 6 1 K	47/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/10			
A 6 1 K	47/20	(2006.01)	A 6 1 K	47/20			
A 6 1 K	47/26	(2006.01)	A 6 1 K	47/26			
A 6 1 K	47/32	(2006.01)	A 6 1 K	47/32			
A 6 1 K	47/34	(2017.01)	A 6 1 K	47/34			
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36			
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42			
A 6 1 K	47/44	(2017.01)	A 6 1 K	47/44			
A 6 1 L	15/20	(2006.01)	A 6 1 L	15/20	1 0 0		
D 0 1 F	1/10	(2006.01)	D 0 1 F	1/10			
D 0 1 D	5/04	(2006.01)	D 0 1 D	5/04			
D 0 4 H	1/728	(2012.01)	D 0 4 H	1/728			

- (31)優先権主張番号 1513046.1
 (32)優先日 平成27年7月23日(2015.7.23)
 (33)優先権主張国 英国(GB)
 (31)優先権主張番号 1518258.7
 (32)優先日 平成27年10月15日(2015.10.15)
 (33)優先権主張国 英国(GB)
 (31)優先権主張番号 1519484.8
 (32)優先日 平成27年11月4日(2015.11.4)
 (33)優先権主張国 英国(GB)
 (31)優先権主張番号 1520771.5
 (32)優先日 平成27年11月24日(2015.11.24)
 (33)優先権主張国 英国(GB)
 (31)優先権主張番号 1522450.4
 (32)優先日 平成27年12月18日(2015.12.18)
 (33)優先権主張国 英国(GB)

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

- (72)発明者 パットン, トーマス
アイルランド国 カウンティー スライゴ, コルーニー, ラスリップン, グレンアロー ハ
ウス
- (72)発明者 ブレナン, ジェイムズ
アイルランド国 カウンティー スライゴ, ヘーゼルウッド, キルティカヒル
- (72)発明者 ステープルズ, イアン
イギリス国 オーエックス13 5エイチアール オックスフォードシャー, アピンドン, サ
ウスムア, ハヌニー ロード, マイケルズ コート 2, マトケ ホールディングス リミ
テッド
- (72)発明者 エルダー, イアイン
イギリス国 オーエックス13 5エイチアール オックスフォードシャー, アピンドン, サ
ウスムア, ハヌニー ロード, マイケルズ コート 2, マトケ ホールディングス リミ
テッド
- (72)発明者 キャラハン, アネット
イギリス国 オーエックス13 5エイチアール オックスフォードシャー, アピンドン, サ
ウスムア, ハヌニー ロード, マイケルズ コート 2, マトケ ホールディングス リミ
テッド
- (72)発明者 ドライデン, マシュー
イギリス国 オーエックス13 5エイチアール オックスフォードシャー, アピンドン, サ
ウスムア, ハヌニー ロード, マイケルズ コート 2, マトケ ホールディングス リミ
テッド
- (72)発明者 バレット, ジョン レジナルド
アイルランド国 カウンティー ティペラリー, テンプルモア, マナ サウス 5
- (72)発明者 カーショウ, デイビッド
イギリス国 オーエックス13 5エイチアール オックスフォードシャー, アピンドン, サ
ウスムア, ハヌニー ロード, マイケルズ コート 2, マトケ ホールディングス リミ
テッド
- (72)発明者 サリブ, ラミ
イギリス国 エスオー50 7エフディー イーストリー, ホールトン ヒース, バーリー
フィールズ, ケンレグ コーナー

F ターム(参考) 4C076 AA09 AA24 AA29 AA31 AA36 AA71 BB21 BB22 BB25 BB31
CC04 CC19 CC26 CC31 CC32 DD37 DD38 DD55 DD67 EE06
EE16 EE23 EE30 EE41 EE57 FF02 FF04 FF07 FF12 FF57
GG05 GG09 GG11 GG44
4C081 AA02 AA07 AA08 AA12 AA13 BA12 BA14 BB06 CA05 CA06
CA18 CD25 CD31 DA04 DA05 DA15 DB01 DC12 EA03 EA13
EA14
4C086 AA01 AA02 HA08 HA22 MA02 MA03 MA04 MA05 MA13 MA16
MA32 MA34 MA35 MA41 MA43 MA56 MA59 MA63 MA66 NA10
NA12 ZA89 ZB11 ZB22 ZB32 ZB35
4L035 BB02 DD13 EE20
4L045 AA01 AA08 BA34 BA60 CB40
4L047 AA16 AB08 BA10 CC03 EA22