

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】令和5年3月14日(2023.3.14)

【国際公開番号】WO2021/246086

【出願番号】特願2022-528487(P2022-528487)

【国際特許分類】

A 0 1 N 37/08(2006.01)

A 0 1 P 3/00(2006.01)

A 0 1 N 61/00(2006.01)

A 0 1 N 25/34(2006.01)

B 3 2 B 9/00(2006.01)

B 0 1 J 20/10(2006.01)

B 0 1 J 20/18(2006.01)

B 0 1 J 20/28(2006.01)

10

【F I】

A 0 1 N 37/08

A 0 1 P 3/00

A 0 1 N 61/00 B

A 0 1 N 25/34 Z

B 3 2 B 9/00 A

B 0 1 J 20/10 A

B 0 1 J 20/18 A

B 0 1 J 20/28 A

A 0 1 N 25/34 A

20

【手続補正書】

【提出日】令和4年11月4日(2022.11.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

30

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

アロフェンと、

前記アロフェンに吸着されたアビエタン系ジテルペノイド化合物と、

を含む抗菌性多孔質膜。

【請求項2】

前記アビエタン系ジテルペノイド化合物は、アビエチン酸、デヒドロアビエチン酸及び
ネオアビエチン酸を含む、請求項1に記載の抗菌性多孔質膜。

40

【請求項3】

(削除)

【請求項4】

前記アロフェンに吸着された無機塩及び/又は金属イオンをさらに含む、請求項1又は
2に記載の抗菌性多孔質膜。

【請求項5】

前記無機塩及び/又は金属イオンは、抗菌性を有する、請求項4に記載の抗菌性多孔質
膜。

【請求項6】

50

前記金属イオンは、プラチナイオン、銀イオン及び銅イオンのうち少なくとも一つを含む、請求項 4 又は 5 に記載の抗菌性多孔質膜。

【請求項 7】

前記アピエタン系ジテルペノイド化合物は、保持物質を介することなく前記アロフェンに直接吸着される、請求項 1 乃至 2 及び 4 乃至 6 の何れか一項に記載の抗菌性多孔質膜。

【請求項 8】

基材と、

前記基材上にコーティングされた請求項 1 乃至 2 及び 4 乃至 7 の何れか一項に記載の抗菌性多孔質膜と、

を含む抗菌コーティング材。

10

【請求項 9】

前記基材が不織布であることを特徴とする請求項 8 に記載の抗菌コーティング材。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

8 回、12 回のデヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を基材ごと漬け、ステンレス製の丸座金で基材を押さえつけ、37 で 24 時間静置した。

20

[0051]

この後、それぞれにおけるアロフェン膜のバイオフィルムの形成量を測定した。具体的には、洗浄回数がそれぞれ異なるアロフェン膜の表面に形成されたバイオフィルムの量を CV 法及び WST 法で測定し、各アロフェン膜のバイオフィルムの形成量を算出した。CV 法及び WST 法については後述する。

[0052]

[比較例 1]

比較例として、不織布 (1 cm x 1 cm) にデヒドロアピエチン酸溶液 (溶媒: アセトン) を満遍なく滴下し、一晚、乾燥させた (終濃度 $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$)。デヒドロアピエチン酸を担持させた不織布を複数準備し、アロフェン膜と同様にそれぞれ 0 回、4 回、8 回、12 回洗浄した。この後、1% グルコースを添加した BHI 培地に *S. aureus* N315 株を加え、デヒドロアピエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ漬け、ステンレス製の丸座金で押さえつけ、37 で 24 時間静置した。この後、実施例 1 のアロフェン膜と同様に不織布のバイオフィルムの形成量を CV 法及び WST 法によって測定した。

30

[0053]

図 5 及び図 6 にデヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜 (実施例 1) のバイオフィルムの形成阻害量とアロフェン膜を形成せずにデヒドロアピエチン酸を担持させた不織布 (比較例 1) のバイオフィルムの形成阻害量を示した。図 5 は、CV 法により測定されたアロフェン膜と不織布のバイオフィルムの形成阻害量とそれらの指数関数の近似曲線を示し、図 6 は、WST 法により測定されたアロフェン膜と不織布のバイオフィルムの形成阻害量とそれらの指数関数の近似曲線を示している。尚、図 5 及び図 6 において、「AD」とは AD 法により形成し、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を指している。以下、CV 法及び WST 法の手順について詳細に説明する。

40

[0054]

CV 法について説明する。まず、実施例 1 のデヒドロアピエチン酸を担持

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

50

【 0 0 1 3 】

させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ多量の精製水が入った容器に漬けて洗浄する工程を 2 回繰り返した。次に、実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ 0 . 1 質量 % のクリスタルバイオレット (C V) 水溶液 0 . 5 m l に 1 5 分間浸漬させた。その後、実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ多量の精製水が入った容器に漬けて洗浄する工程を 5 回繰り返した。この後、実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ数時間乾燥させた。乾燥した実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ 3 0 体積 % の酢酸溶液に漬け、実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布に形成されたバイオフィルムを染色した C V を溶出させた。この酢酸溶液の 5 7 0 n m の吸光度を測定することにより該酢酸溶液中に溶出した C V 量を定量した。

10

【 0 0 5 5 】

W S T 法について説明する。まず、実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ多量の精製水が入った容器に漬けて洗浄する工程を 7 回繰り返した。次に、実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ W S T 混合液 (D O J I N D O 社製、M 4 3 9) 2 5 μ L と B H I 培地 4 7 5 μ L との混合液に漬け、3 7 °C で 1 時間静置した。その後、W S T 混合液及び B H I 培地 5 0 0 μ L の混合液を 5 0 μ L 採取して、採取した混合液の 4 5 0 n m の吸光度を測定することにより、実施例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜及び比較例 1 のデヒドロアビエチン酸を担持させた不織布におけるバイオフィルムの形成量を定量した。

20

【 0 0 5 6 】

図 5 を参照すると、近似曲線の傾きは、アロフェン膜 (A D) で - 0 . 0

【 手 続 補 正 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

30

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 1 5

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 1 5 】

回、8 回、1 2 回とした。洗浄は、デヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜を基材ごと 0 . 7 5 m L の精製水に浸漬させて 3 0 分間静置した。1 回洗浄するごとに、デヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜を引き上げ、新たな精製水に同様に浸漬させることにより行った。

【 0 0 6 1 】

次に、1 % グルコースを添加したブレインハートインフュージョン (B H I) 培地を準備し、この B H I 培地に *S . aureus* N 3 1 5 株を加え、洗浄回数 0 回、4 回、8 回、1 2 回のデヒドロアビエチン酸を担持させたアロフェン膜を基材ごと漬け、ステンレス製の丸座金で基材を押さえつけ、3 7 °C で 2 4 時間静置した。

40

【 0 0 6 2 】

それぞれのアロフェン膜におけるバイオフィルムの形成量を測定した。具体的には、洗浄回数がそれぞれ異なるアロフェン膜の表面に形成されたバイオフィルムの量を C V 法によって測定し、各アロフェン膜におけるバイオフィルムの形成阻害活性を算出した。この結果を図 7 に示す。

【 0 0 6 3 】

【 比 較 例 2 】

50

不織布 (1 c m × 1 c m) にデヒドロアピエチン酸溶液 (溶媒 : アセトン) を満遍なく滴下し、一晚、乾燥させた (終濃度 $25 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) 。このようなデヒドロアピエチン酸を担持させた不織布を複数準備し、実施例 2 と同様に、精製水によって 0 回、4 回、8 回、12 回洗浄した。この後、1% グルコースを添加した B H I 培地に *S . a u r e u s* N 3 1 5 株を加え、デヒドロアピエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ漬け、ステンレス製の丸座金で押さえつけ、37 で 24 時間静置した。この後、実施例 2 のアロフェン膜と同様に不織布のバイオフィルムの形成阻害活性を測定した。この結果を図 7 に示す。

[0 0 6 4]

[実施例 3]

上述の A D 方法により作製された、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を 70% エタノール (v / v) を用いて洗浄した。洗浄した回数は、それぞれ 0 回、2 回、4 回、6 回、8 回とした。洗浄は、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を基材ごと 0 . 7 5 m L のエタノールに浸漬させて 30

10

【 手続補正 5 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 0 1 6

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

[0 0 1 6]

分間静置した。1 回洗浄するごとに、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を引き上げ、新たなエタノールに同様に浸漬させることにより行った。

20

[0 0 6 5]

次に、1% グルコースを添加した B H I 培地に *S . a u r e u s* N 3 1 5 株を加え、洗浄回数 0 回、2 回、4 回、6 回、8 回のデヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を基材ごと漬け、ステンレス製の丸座金で基材を押さえつけ、37 で 24 時間静置した。

[0 0 6 6]

それぞれのアロフェン膜のバイオフィルムの形成量を測定した。具体的には、洗浄回数がそれぞれ異なるアロフェン膜の表面に形成されたバイオフィルムの量を C V 法によって測定し、各アロフェン膜におけるバイオフィルムの形成阻害活性を算出した。この結果を図 8 に示す。

30

[0 0 6 7]

[比較例 3]

不織布 (1 c m × 1 c m) にデヒドロアピエチン酸溶液 (溶媒 : アセトン) を満遍なく滴下し、一晚、乾燥させた (終濃度 $25 \mu\text{g} / \text{cm}^2$) 。このようなデヒドロアピエチン酸を担持させた不織布を複数準備し、実施例 3 と同様に、70% エタノール (v / v) によって 0 回、2 回、4 回、6 回、8 回洗浄した。この後、1% グルコースを添加した B H I 培地に *S . a u r e u s* N 3 1 5 株を加え、デヒドロアピエチン酸を担持させた不織布をそれぞれ漬け、ステンレス製の丸座金で押さえつけ、37 で 24 時間静置した。この後、実施例 3 のアロフェン膜と同様に不織布のバイオフィルムの形成阻害活性を測定した。この結果を図 8 に示す。

40

[0 0 6 8]

[実施例 4]

上述の A D 方法により作製された、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜をアセトンを用いて洗浄した。洗浄した回数は、それぞれ 0 回、2 回、4 回、6 回とした。洗浄は、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を基材ごと 0 . 7 5 m L のアセトンに浸漬させて 30 分間静置した。1 回洗浄するごとに、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜を引き上げ、新たなアセトンに同様に浸漬させることにより行った。

【 手続補正 6 】

【 補正対象書類名 】 明細書

50

【補正対象項目名】 0 0 1 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 1 8 】

0 6 であり、不織布で - 0 . 0 1 1 であった。アロフェン膜および不織布ともに、精製水による洗浄を経るごとにバイオフィーム形成阻害活性が減少したが、不織布のバイオフィーム形成阻害活性よりもアロフェン膜のバイオフィーム形成阻害活性のほうが高く保たれており、バイオフィーム形成阻害効果が長く維持された。これにより、アロフェン膜に担持されたデヒドロアピエチン酸の水への溶出量は、不織布に担持されたデヒドロアピエチン酸の水への溶出量よりも少ないことが分かる。

10

[0 0 7 3]

図 8 は、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜（実施例 3）のバイオフィームの形成阻害活性とアロフェン膜を形成せずにデヒドロアピエチン酸を担持させた不織布（比較例 3）のバイオフィームの形成阻害活性を示した散布図とそれらの指数関数の近似曲線である。図 8 においては、横軸に洗浄回数を示し、縦軸にバイオフィーム形成阻害活性を示している。図 8 において、バイオフィーム形成阻害活性は、洗浄回数が 0 回の試料（実施例 3 の場合、洗浄回数 0 回のデヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜、比較例 3 の場合、洗浄回数 0 回のデヒドロアピエチン酸を担持させた不織布）のバイオフィーム形成阻害活性を 1 0 0 としたときの百分率（%）で示している。図 8 を参照すると、近似曲線の傾きは、アロフェン膜で - 0 . 0 4 であり、不織布で - 0 . 0 4 8 であった。

20

[0 0 7 4]

図 9 は、デヒドロアピエチン酸を担持させたアロフェン膜（実施例 4）のバイオフィームの形成阻害活性とアロフェン膜を形成せずにデヒドロアピエチン酸を担持させた不織布（比較例 4）のバイオフィームの形成阻害活性を示した散布図とそれらの指数関数の近似

30

【手続補正 7】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 0 2 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 2 0 】

阻害物質を担持することができる多孔質素材はアロフェンに限定されるわけではない。以下では、ゼオライトを担持物質として使用した場合のバイオフィーム形成阻害物質の抗菌活性持続試験について述べる。

40

[0 0 7 7]

[実施例 5]

デヒドロアピエチン酸を担持させたゼオライト膜を準備した。ゼオライト膜は、ゼオライト 4 A、溶剤、およびワニスを含むペースト（品川ゼネラル株式会社製）を、スクリーン印刷にて基板上に塗布し（厚さ 1 0 μm ）、焼成（焼成温度 3 5 0 ~ 6 0 0 ）することにより成膜した。

[0 0 7 8]

成膜されたゼオライト膜（1 c m × 1 c m）にデヒドロアピエチン酸溶液（溶媒：アセトン）を満遍なく滴下して一晚乾燥させ（終濃度 2 5 0 $\mu\text{g} / \text{c m}^2$ ）、デヒドロアピエチン酸を担持させたゼオライト膜を 3 つ作製した。作製したデヒドロアピエチン酸を担持

50

させたゼオライト膜を1%グルコースを添加したBHI培地に*S. aureus* N315株を加え、基材ごと漬け、ステンレス製の丸座金で基材を押さえつけ、37℃で24時間静置した。

[0079]

この後、ゼオライト膜のバイオフィルムの形成量を測定した。具体的には、ゼオライト膜の表面に形成されたバイオフィルムの量をCV法によって測定し、ゼオライト膜におけるバイオフィルムの形成量を算出した。

[0080]

[実施例6]

実施例5と同様に成膜されたゼオライト膜にデヒドロアビエチン酸溶液(溶媒:アセトン)を満遍なく滴下して一晩乾燥させ(終濃度 $25\mu\text{g}/\text{cm}^2$)、デヒドロアビエチン酸を担持させたゼオライト膜を3つ作製した。作製したデヒドロアビエチン酸を担持させたゼオライト膜を1%グルコースを添加したBHI培地に*S. aureus* N315株を加え、基材ごと漬け、ステンレス製の丸座金で基材を押さえつけ、37℃で24時間静置した。この後、実施例5と同様にゼオライト膜のバイオフィルムの形成量を測定した。

10

[0081]

[実施例7]

実施例5と同様に成膜されたゼオライト膜にデヒドロアビエチン酸溶液(溶媒:アセトン)を満遍なく滴下して一晩乾燥させ(終濃度 $2.5\mu\text{g}/\text{c}$

20

30

40

50