

【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】平成17年8月11日(2005.8.11)

【公表番号】特表2002-501480(P2002-501480A)

【公表日】平成14年1月15日(2002.1.15)

【出願番号】特願平10-533049

【国際特許分類第7版】

A 6 1 K 31/327

A 6 1 P 31/04

【F I】

A 6 1 K 31/327

A 6 1 P 31/04 1 7 1

【手続補正書】

【提出日】平成16年12月14日(2004.12.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】補正の内容のとおり

【補正方法】変更

【補正の内容】

## 手 続 補 正 書

平成16年12月14日

特許庁長官 殿



## 1. 事件の表示

平成10年特許願第533049号

## 2. 補正をする者

住所 アメリカ合衆国、55102 ミネソタ州、セント ポール、  
エコラボ センター（番地なし）

名称 エコラボ インク

## 3. 代理人

識別番号 ~~100095555~~

住所 大阪府大阪市北区天満橋1丁目8番30号

9555 OAPタワー26階



氏名 弁理士 池内 寛幸

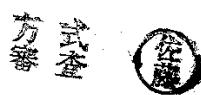
電話番号 06-6135-6051

## 4. 補正対象書類名 明細書

## 5. 補正対象項目名 全文

## 6. 補正の内容

(1) 明細書全文を別紙の通り補正します。



(別紙)

【書類名】 明細書

【発明の名称】 毛状疣贅病 (Hairy Wart Disease) の抑制における過酸素 (peroxygen) 化合物の使用

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ペルオキシカルボン酸および希釀剤を含む予防上有効量の抗菌性濃縮組成物を毎日乳牛に付与する、乳牛における毛状疣贅病抑制方法。

【請求項 2】 ペルオキシカルボン酸が過酢酸を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 前記ペルオキシカルボン酸が、C<sub>2</sub>—C<sub>18</sub>過カルボン酸またはその混合物を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】 前記抗菌性濃縮組成物が、  
約 2～25 重量% のペルオキシカルボン酸、  
約 1～45 重量% の過酸化水素、  
約 1～70 重量% の対応カルボン酸、及び差引残量分の水  
を含有する請求項 1 から 3 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、乳牛における足の疾病予防療法に関するものである。更に詳しくは、本発明は乳牛の毛状疣贅病を引き起こす生物の抑制のためにペルオキシカルボン酸の使用に関するものである。

【0002】

発明の背景

毛状疣贅病は、乳頭腫性肚皮膚炎 (Papillomatus Digital Dermatitis (PDD))、伝染性牛趾間皮膚炎 (Infectious Bovine Interdigital Dermatitis (IDD))、趾皮膚炎 (Digital Dermatitis (DD))、又は家畜趾間腐爛 (Stable Foot Rot (SFR)) とも呼ばれており、動物間で伝播する伝染病である。この疾病の影響は、趾行、体重減少、健康全般における減退に見られ、乳牛の場合には、牛乳生産量の低下、及び、その結果生じる酪農業者の経済的損失に見られる。動物の生命を守るため、

介在手術を必要とする場合も有り得る。

#### 【0003】

この病気は、フソバクテリウム-メクロホルム (*Fusobacterium necrophorum*)、ジケロバクテルノドーサス (*Dichelobacter nodosus*)、及びバクテロイデスマニノゲニカス (*Bacteroides melaninogenicus*) に起因するものと考えられる。全て嫌気性スピロヘータであり、腸管溝 (intestinal track) に生存し、最長 10 ヶ月間肥料／糞尿中に生存することが報告されている。

#### 【0004】

現在の治療としては、硫酸銅、硫酸亜鉛、ホルムアルデヒド、テトラサイクリン、並びに、苛性ソーダ及び次亜塩素酸ソーダを含む混合物を含有する足浴が挙げられる。テトラサイクリンのみ有効であることが報告されており、しかも、一般に、テトラサイクリンで治療した感染部位に包帯を施すことを含め、何らかの外科医療技術と組み合わせた場合である。従って、毛状疣贅病を抑制する上で現在入手可能な製品よりも更に効果的な製品に対する需要が存在し、これは、特に米国における酪農場乳牛群全体にこの病気が広がっているという報告により、この病気が酪農製品製造者の面している最も大きな問題の一つとなっているからである。

#### 【0005】

例えば、消毒剤、抗菌剤、及び殺菌剤として、抗菌性組成物におけるペルオキシカルボン酸の使用が報告されている。特に、過酢酸は、バクテリア及びウイルスの抑制が重要要素である場合、一般的殺菌剤として家禽飼育場での適用において使用されている。伝染病を治療するために動物に直接ペルオキシカルボン酸を使用することは報告されていない。

#### 【0006】

##### 発明の簡単な説明

本発明は、乳牛の毛状疣贅および／又は関連の足の疾病に対する、ペルオキシカルボン酸化合物の新規使用に関するものである。本発明に含まれるペルオキシカルボン酸生成物は、動物の予防プログラム、つまり、予防療法に有効である事が分かっている。

**【0007】**

前記予防プログラム、つまり予防療法においては、全動物群を一日単位で、液体に浸からせる足浴を用いる。または、動物群において、伝染している可能性のある部位に前記生成物をスプレーするか又は泡状物を付与することにより一日単位で治療してもよい。前記生成物には、予防上有効量のペルオキシカルボン酸を使用する。推奨する適用量としては、希釀剤、例えば水1ガロンにつき0.5～1.0オンス(14.8～290.6mL)、好ましくは、濃縮物0.5～3オンス(1リッターにつき14.8～88.7mL)を使用する。更に好ましくは、1.5ガロンにつき1オンス(6.6Lにつき29.6mL)を使用する。

**【0008】**

一選択肢として、感染した動物の直接的療法としては、希釀剤中の治療上有効量のペルオキシカルボン酸をスプレーすることが挙げられる。推奨する適用量は、希釀剤1ガロンにつき濃縮物1～10オンス(1リッターにつき29.6～290.6mL)である。得られた溶液を、3～10日間感染部位に直接スプレーする。病状が深刻な場合には、濃縮物を希釀せず使用することもできる。

**【0009】**

従って、第一の態様における本発明は、ペルオキシカルボン酸と希釀剤を含む予防上有効量の抗菌性濃縮組成物を乳牛に毎日塗る、乳牛における毛状疣贅病の抑制方法である。

**【0010】****詳細な説明**

乳牛における毛状疣贅病の予防処置は、ペルオキシカルボン酸含有溶液を塗付することにより行われる。前記ペルオキシカルボン酸は、抗菌性濃縮組成物に含まれ、前記組成物は、対応する前駆体カルボン酸、過酸化水素、及び差引残分量の水を含んでいてもよい。この濃縮物は、乳牛への付与に先立って、希釀剤、好ましくは、水で希釀し、その後、予防のために乳牛の蹄又は乳牛の他の感染している可能性のある部位にスプレーするか又は泡状物を付与するか、若しくは、別の方法で付与する。他の予防方法では、乳牛群用の足浴に前記溶液を使用する。

**【0011】**

### 抗菌性濃縮組成物

前記濃縮組成物は、ペルオキシカルボン酸、その対応カルボン酸、過酸化水素、及び水の平衡混合物を含む。前記濃縮物は、安定剤、カップラー等下記に述べるような他の成分を含んでいても良い。

#### 【0012】

前記抗菌性濃縮組成物中の上記成分の中で、本発明はカルボン酸を含有する。一般に、カルボン酸は式 $R-COOH$ を有し、Rは脂肪族基、脂環式基、芳香族基、複素環基を含むあらゆる数の様々な基を示し、それら全てが飽和していても不飽和であってもよく、また置換されていてもいなくてもよい。カルボン酸は、一、二、三、又はそれ以上のカルボキシル基を有することもある。

#### 【0013】

カルボン酸は、水性組成物を酸性化する傾向がある。酸系において、カルボン酸は抗菌作用も発揮し得る。

#### 【0014】

前記組成物に含まれるペルオキシカルボン酸成分は、抗菌剤として作用する。更に、本発明におけるペルオキシカルボン酸成分及びその母体カルボン酸(paren t carboxylic acid)は、前記組成物を酸性pHに保つ。

#### 【0015】

過カルボン酸(percarboxylic acid)は一般に、式 $R(CO_3H)_n$ を有し、Rは脂肪族基、脂環式基、芳香族基、複素環基を含むあらゆる数の様々な基を示し、それら全てが飽和していても不飽和であってもよく、また置換されていてもいなくてもよい。このように、Rは、例えば、アルキル、アリールアルキル、シクロアルキル、芳香族基又は複素環基であってもよく、また、nは1、2、又は3であり、その母体となる酸(parent acid)に過(per)又はペルオキシ(peroxy)の接頭辞を付けることにより命名する。

#### 【0016】

ペルオキシカルボン酸は、その対応カルボン酸よりも化学的安定性において劣るが、その安定性は一般に分子量の増加と共に向上する。これら酸は一般に、遊離基及び非ラジカル経路(path)により、光分解又は遊離基誘発(radical-induced)

分解により、加水分解又は解離により、或いは、金属イオン又は錯体の作用により分解できる。ペルオキシカルボン酸は、10～98重量%の過酸化水素とカルボン酸との直接的酸触媒作用による平衡作用により、アルデヒドの自動酸化または加過水分解(perhydrolysis)により、またはカルボン酸ハライド、水素を有するカルボン酸無水物、過酸化ナトリウムまたはその他過酸化水素のその場の源(sources)から作ってもよい。

#### 【0017】

本発明において有用なペルオキシカルボン酸は、例えば、過酢酸、過プロピオン酸、過酪酸、過ヘキサン酸、過ヘプタン酸、過オクタン酸、過ノナン酸、過デカン酸、過安息香酸、過グリコール酸、過グルタル酸、過コハク酸、過乳酸、過クエン酸、過ラウリン酸、過アジピン酸、過リンゴ酸、過フマル酸、過酒石酸、またはそれらの混合物のようなC<sub>2</sub>～C<sub>18</sub>ペルオキシカルボン酸を含む。これらのペルオキシカルボン酸は水性溶液中安定性の良い優れた抗菌作用を提供することが分かっている。

#### 【0018】

過酢酸、過オクタン酸、および過デカン酸に加えて、特に好ましい過カルボン酸には、過プロピオン酸、過酪酸、過グリコール酸、過乳酸、および過クエン酸がある。

#### 【0019】

前記抗菌性濃縮組成物には、ペルオキシカルボン酸の混合物を使用してもよい。好ましいのは、過酢酸と他の過カルボン酸、好ましくは上述したもので、特に過オクタン酸との組み合わせである。このペルオキシカルボン酸の組み合わせは、好ましい抗菌効力および安定性を提供することが分かっている。一般に過オクタノン酸の過酢酸に対する割合は、約1：1～1：9の範囲内である。

#### 【0020】

本発明による前記抗菌性濃縮組成物のもっとも好ましい形態においては、過酢酸を使用する。過酢酸は、下記式



を有するペルオキシカルボン酸である。

### 【0021】

一般に、過酢酸は、より高い濃度で刺激臭を有する液体であり、水、アルコール、エーテルおよび硫酸に自在に溶解する。過酢酸は、酢酸コバルトの存在の下アセトアルデヒド及び酸素からの製造を含め、当技術分野における当業者にとって周知となっているあらゆる数の手段により製造できる。過酢酸の50%溶液は、無水酢酸、過酸化水素および硫酸を組み合わせることにより得ることもできる。過酢酸の他の形成方法としては、米国特許第2,833,813号明細書に開示されているものがあり、参考文献として本明細書に援用する。

### 【0022】

本発明におけるペルオキシカルボン酸の他の形成方法としては、米国特許第4,051,058号明細書、第4,051,059号、第5,200,189号、第5,314,687号、および第5,437,868号明細種に記載されているものがあり、参考文献として本明細書に援用する。

### 【0023】

#### 過酸化水素

本発明の抗菌性濃縮組成物は、過酸化水素成分を含んでいてもよい。前記ペルオキシカルボン酸との組み合わせにおいて、過酸化水素は、微生物に対し驚くべきレベルの抗菌作用を提供する。更に、過酸化水素を付与するあらゆる表面を洗浄する発泡作用を提供するものであってもよい。過酸化水素は、一旦付与すると、機械的洗浄作用と共に作用し、適用部位の表面を更に清浄にする。過酸化水素の更なる利点は、使用および分解に際してのこの組成物の食料との併用可能性(food compatibility)である。例えば、過酢酸と過酸化水素を組み合わせることにより、分解の際、酢酸、水、および酸素になり、それらは全て食料製品と併用可能(food product compatible)である。

### 【0024】

多くの酸化剤を使用してもよいが、多数の理由から過酸化水素が一般には好ましい。 $H_2O_2$ ／過酢酸殺菌剤の適用後、残った残渣は、水と酸性成分のみを含むものである。乳牛の脚や蹄といった適用部位の表面上にこれら生成物が付着しても、有害反応を引き起こすことはない。

**【0025】**

過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の分子量は、34.014であり、弱酸性で、澄んだ無色の液体である。四つの原子が、無極性H-O-O-H構造で共有結合している。一般に、過酸化水素の融点は0.41°C、沸点は150.2°C、25°Cでの密度は1.4425 g/cm<sup>3</sup>、および粘度は20°Cで1.245センチポアズである。

**【0026】**

一般に、本発明の方法において使用する前記組成物に含まれる過酸化水素の濃度は、約1重量%～約50重量%、好ましくは、約3重量%～約40重量%、最も好ましくは、約5重量%～約30重量%の範囲内である。

**【0027】**

過酸化水素のこれらの濃度は、本発明の範囲内であれば低下または増加させてよい。

**【0028】**助剤(Adjuvants)

本発明の抗菌性組成物は、助剤をいくつ含んでいてもよい。特に、本発明の組成物は、前記組成物に添加してもよい多くの成分の中で、安定化剤または潤滑剤を含んでいてもよい。

**【0029】**

安定化剤を本発明の組成物に添加し、過酸および過酸化水素を安定化してもよい。一般に、キレート化剤または金属イオン封鎖剤が本発明において安定化剤として有用であり、数ある中でもEDTA（エチレンジアミン四酢酸及び塩、例えば、テトラナトリウム塩）のようなアルキルジアミンポリ酢酸(polyacetic acid)系キレート化剤、アクリルおよびポリアクリル酸系安定化剤、ホスホン酸およびジホスホン酸、ホスホン酸塩系キレート化剤がある。好ましい金属イオン封鎖剤には、1-ヒドロキシエチリデン-1、1-ジホスホン酸( $CH_3C(PO_3H_2)_2OH$ )、アミノ[トリ(メチレンホスホン酸)]、2-ホスフェンブタン(phosphenebutane)-1,2,4-トリカルボン酸を含むホスホン酸及びホスホン酸塩、並びに、アルキル金属塩、アンモニウム塩、又は、モノ、ジ、又はトリエタノールアミン塩のようなアルキロイル(alkyloyl)アミン塩がある。安定

化剤は、前記組成物の約0重量%～約20重量%、好ましくは前記組成物の約0.1重量%から約10重量%、最も好ましくは前記組成物の約0.2重量%～5重量%の範囲内の濃度で使用される。

#### 【0030】

湿潤剤もまた、本発明の前記組成物において有用である。湿潤剤は、本発明の抗菌性組成物の浸透作用を向上させる働きをし、当技術分野において周知となっているあらゆる成分が挙げられ、本発明の前記組成物の表面エネルギーを低下させる。

#### 【0031】

更に、湿潤剤は、脂肪酸及びペルオキシ脂肪酸の溶解を助け、泡の形成を促進し、且つ、前記濃縮組成物の貯蔵安定性を高める。

#### 【0032】

本発明の組成物は、湿潤剤として、水性液体中で脂肪酸及び短鎖ペルオキシ脂肪酸双方の混合を可能にする界面活性剤ヒドロトロープ性(hydrotrope)カップリング剤又は可溶化剤を含有してもよい。機能面から言うと、使用できる適切なカッplerーは、非毒性であり、水性溶液中の前記脂肪酸及びペルオキシ脂肪酸を、前記溶液が放置されるあらゆる使用状態において保存する。

#### 【0033】

本発明において使用できる好ましい分類の湿潤剤又はヒドロトロピー性(hydro tropic)カップリング剤或いは可溶化剤には、アルキルベンゼンスルホン酸塩の前記アルキル中6～18の炭素原子を有するもの、アルキル硫酸塩及び／又はアルカンスルホン酸塩(それぞれアルキル又はアルカン基に8～22の炭素原子を有する)のようなスルホン酸塩及び硫酸塩タイプのアニオン界面活性剤がある。

使用できるアルキルベンゼンスルホン酸塩としては、6～18の炭素原子、好ましくは8～15の炭素原子のアルキルラジカルを含むものが好ましい。前記アルキルベンゼンスルホン酸塩の代わりに、鎖長が8～18炭素原子のアルキル又はアルカンラジカルを有するアルキル硫酸塩又はアルカンスルホン酸塩が使用できる。必要であれば、上記アニオン界面活性剤の混合物も使用できる。

#### 【0034】

非イオン界面活性剤も本発明において有用であり、例えば、エチレンオキシド成分、プロピレンオキシド成分、及びそれらの混合物、並びにエチレンオキシドー $\alpha$ -プロピレンオキシド成分をヘテロ又はブロック形態のいずれかで含むものがある。また、本発明において有用なのは、アルキルエチレンオキシド化合物、アルキルプロピレンオキシド化合物、及びそれらの混合物、並びにアルキルエチレンオキシドー $\alpha$ -プロピレンオキシド化合物を含む非イオン界面活性剤があり、その際、前記エチレンオキシドプロピレンオキシド成分は、ヘテロ又はブロック形態のいずれかである。更に、本発明において有用なのは、アルキル鎖に結合したエチレンオキシドー $\alpha$ -プロピレンオキシド成分のあらゆる混合物又は結合体を有する非イオン界面活性剤で、その際、前記エチレンオキシド及びプロピレンオキシド成分はいかなるランダムな又は規則的なパターンであってもよく、また、いかなる特有の長さのものでもよい。本発明において有用な非イオン界面活性剤には、ブロック及びヘテロエチレンオキシドプロピレンオキシドのランダムなセクション(randomized section)又はエチレンオキシドー $\alpha$ -プロピレンオキシドもある。

#### 【0035】

一般に、本発明において使用される界面活性剤の濃度は、組成物の約0重量%～約5重量%、好ましくは、前記濃縮組成物の約0重量%～約2重量%、最も好ましくは、前記組成物の約0重量%～約1重量%の範囲内である。

#### 【0036】

本発明は、用途の要求に応じて、当技術分野の当業者にとって周知となっており、本発明の作用を促進する他の成分をいくつ含んでいてもよい。

#### 【0037】

本発明において使用される前記濃縮組成物は、下記成分を含んでいてもよい。

	組成(重量%)		
	使用可	実用的	好ましい
ペルオキシカルボン酸	2～25	2～20	4～20
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	1～45	5～35	7～30
カルボン酸	1～70	3～55	5～45
界面活性剤	0～20	0～10	0～5
キレート剤	0～20	0～10	0～5
水	差引残量分	差引残量分	差引残量分

## 【0038】

過酸の生成

本発明の方法は、過酸濃縮組成物を使用することにより着手してもよい。そのような場合、前記ペルオキシカルボン酸は、自然に生成されてもよいし、ここに参考文献として援用するロケスマ工等(Lokkesmoe et al.)の1992年6月16日発行の米国特許第5,122,538号明細書に記載されている方法のような使用を考慮したカルボン酸濃縮物と過酸化水素濃縮物の組合せによって生成されてもよい。そのような場合、前記組成物は、下記表に示すような、様々なレベルの過酸化水素及び安定剤を含む過酸化水素濃縮物から作成してもよい。

## 【0039】

成分	濃度(重量%)		
	使用可	実用的	好ましい
過酸化水素	5~70	15~70	25~60
安定剤	0~10	0~5	0.1~3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	20~95	25~85	37~75

## 【0040】

カルボン酸と組み合わせた場合、前記二つの濃縮物により、ペルオキシカルボン酸が生じる。一般に、前記カルボン酸濃縮物は、下記表に示すようにカルボン酸又はそれと水とからなる。

## 【0041】

成分	濃度(重量%)		
	使用可	実用的	好ましい
カルボン酸	50~100	65~100	80~100
水	0~50	0~35	0~20

## 【0042】

毛状疣贅病の抑制

乳牛に既にできている疣贅(wart)の直接的治療法は、希釀剤、例えば、水1ガロンにつき濃縮物約1~10オンスの上述したような抗菌性濃縮組成物を、一日に一度又は3~10日間搾乳時ごとに感染部位にスプレーにより塗付することにより実施できる。または、病状が深刻な場合には特に、前記抗菌性濃縮組成物を、希釀剤を使用せず、感染部位にスプレー、泡立て、又は別の方法で付与してもよい。この処置の後、疣贅(wart)が除去されるまで搾乳時ごとに1ガロンの希釀剤

につき濃縮物約0.5~3オンス、好ましくは1.5オンスで更なる治療を続けてよい。

保護／防止又は予防療法は、希釀剤1ガロンにつき濃縮物約0.5~10オンス(1リッターにつき14.8~290.6ml)の抗菌性濃縮組成物を使用して、スプレー又は足浴の使用いずれかにより実施できる。好ましい適用量は、1ガロンにつき0.5~3オンス(1リッターにつき14.8~88.7ml)、更に好ましくは、1ガロンにつき1.5オンス(1リッターにつき44.4ml)である。足浴を用いる場合、かなりの汚れ(有機質及び／又は無機質)の混入によりペルオキシカルボン酸が極端に減少した場合、再度補充する。前記足浴は、当日の全搾乳時において一杯にしておく。スプレーによる付与は、問題の発病度に応じて一日に一度又は搾乳時ごとに行う。

#### 【0043】

実施例1において開示している過酢酸配合濃縮物を用いて、使用した濃縮物中の活性POAA(過酢酸)濃度は以下の通りである。

#### 【0044】

1ギャロンの水に対する生成物(オンス(oz.))	POAA濃度(ppm)
0.5	254
1.0	508
1.5	762
3	1524
10	5080
希釀剤無し	58,000

生成物(濃縮物)の比重=1.12

$$ppmPOAA = \frac{(oz./gal)}{1.28} \times 1.12 \times 0.058 \times 10^6$$

を用いた。

#### 【0045】

##### 疣贅(wart)へのスプレー用

有用なPOAA濃度	250~60,000 ppm
好ましい	500~60,000 ppm
最も好ましい	1,500~5,000 ppm

#### 【0046】

上記方法は、この病気に対する予防プログラムにおいて有効であることが分か

っている。このように、例えば、27.5重量%の過酸化水素、5.8重量%の過酢酸を含有し水で0.5重量%に希釀した抗菌性濃縮組成物を使用することにより、インビトロでテストした場合、ジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス(*Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*)に対し>99.778%バクテリアが減少し、フソバクテリウム-ネクロフォルムに関しては>99.999%減少した。これらのバクテリアは、毛状疣贅病を引き起こす原因であると考えられる。

#### 【0047】

##### 実施例

本発明を、下記例を参照しながら更に詳細に説明する。これらの例における単なる適切な構成は、非制限的な説明用の具体例として本発明の様々な配合物、安定性、及び適用を示しているものである。

#### 【0048】

##### 実施例1

濃縮過酢酸(すなわち、「POAA」)の原液を記載のテストに使用するために調製した。下記成分を平衡濃度で含んでいた。

#### 【0049】

<u>成分</u>	<u>重量%</u>
過酢酸	5.8
過酸化水素	27.5
酢酸	8.0
HEDP <sup>a</sup>	0.9
LAS <sup>b</sup>	1.0
H <sub>2</sub> O	差引残分量

a... HEDPとは、1-ヒドロキシエチリデン-1、1-ジホスホン酸(安定剤)(モンサント-デケスト(Monsanto-Dequest)(登録商標)2010)である。

b... LASとは、直鎖アルキルベンゼンスルホネート(アニオン界面活性剤)である。

#### 【0050】

下記インビトロテストを上記POAA濃縮物を用いて実施した。

#### 【0051】

テスト生物：ジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス(*Dichelobacter (Bacteroides) nodosus*) (ATCC 27521)、培養培地：5%の血液とトリプシン性大豆寒天

### 培地(Tryptic Soy Agar)

テスト生物: フソバクテリウム-ネクロフォルム(ATCC 27852)、培養培地: 5 % の血液とトリプシン性大豆寒天培地(Tryptic Soy Agar)

#### 【0052】

この研究において使用した微生物は、アメリカ型微生物株保存機関(メリーランド州ロックビル)(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland)から得た。

#### 【0053】

継代培養培地: 5 % の血液寒天平板(Blood Agar Plate)とトリプシン性大豆寒天培地(Tryptic Soy Agar)

原液中和剤: 0.5 % チオ硫酸ナトリウム

放置時間: 15秒

放置温度: 25°C

方法: AOAC 分析公定法(Official Methods of Analysis of the AOAC)、第 15 版、1990 年。

#### 【0054】

殺菌剤使用-希釈

前記POAA濃縮物を、その成生物の用途のための指示に従って調製した。0.5 % 溶液を 2.5 ml の POAA 濃縮物と 497.5 ml の無菌脱イオン水を用いて作成した。生成物は溶液の状態で、調製した当日に使用した。

#### 【0055】

細菌培養培地

三(3) 血液寒天平板(Blood Agar Plate)にフソバクテリウム-ネクロフォルムを植込み、5 血液寒天平板にジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス(Dichelobacter (Bacteroides) nodosus)を植込んだ。前記血液寒天平板を、35~37°C で四日間嫌気性雰囲気中において培養した。増殖した細菌を、2 ml のリン酸緩衝液希釈水を用いて各血液寒天平板から洗い流した。各生物体に対して、増殖懸濁液(growth suspension)を吸引させ、無菌容器において一緒にプールした。各生物体のプールした懸濁液を渦流混合(vortex mixed)し、テストに使用した。

**【0056】****手順**

テストされる濃度の生成物 9.9 ml を、二つの 25.0 ml 広口三角フラスコのそれぞれに添加し、25 ± 2 °C のウォーターバスに配置した。

**【0057】**

「初期数」の対照試験(control)用に使用するため、9.9 ml の無菌リン酸緩衝液希釈水を含む同様のフラスコを準備した。各フラスコに 1 ml の培養懸濁液を、以下のようにして添加した。

- a) 前記フラスコを回転させ、前記懸濁液を添加する直前に停止させ、液体残留する動き(residual motion)を十分生じさせテスト水との接触時に懸濁液がプールすることを防いだ。
- b) 懸濁液をテスト溶液にわずかに浸したピペットの先端で、表面の中央と端部の途中に添加した。(添加中、フラスコの首又は側面へのピペットの接触は避けた)。

**【0058】****継代培養培地の植込み****テストサンプル**

懸濁液を添加してから正確に 15 秒後、放置した培養菌 1 ml を 9 ml の中和剤ブランク(neutralizer blanks)に添加した。混合した後、1.0 ml 及び 0.1 ml 各四つのアリコートを、分散培養平板技術を用いて、それぞれ血液寒天平板に移した。フソバクテリウムーネクロフォルム回収平板(recovery plate)は、3 日間の間 35 ~ 37 °C で培養した後生存菌の数を数えた。ジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス(Dichelobacter (Bacteroides) nodosus)回収平板(recovery plate)は、6 日間の間 35 ~ 37 °C で培養した後生存菌の数を数えた。

**【0059】****数のコントロール(Number Control)**

「初期数」 フラスコの培養液 1 ml を 9.9 ml のリン酸緩衝液希釈水に添加した(希釈液 1)。1 ml の希釈液 1 を完全に混合した後、9.9 ml のリン酸緩衝液希釈水に移した(希釈液 2)。三番目の希釈液は、9.9 ml のリン酸緩衝液希釈水中に 1.0 ml の希釈液 2 を用いて作成した(希釈液 3)。希釈液 3 から 1

m 1 及び 0. 1 m 1 各四つのアリコートを個々のペトリ皿に移した。血液寒天培地 1.5 ~ 2.0 m 1 を各平板に添加し、寒天を冷却し凝固させた。前記平板を、テストにおけると同様に回転させ培養した。初期懸濁液における数を数え、cfu / m 1 の数を確認した。

### 【0060】

コントロール	<u>ジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス フソバクテリウム-ネクロフォルム</u>
a. 中和剤コントロール	増殖していない
b. リン酸緩衝液希釈水	増殖していない
c. 中和確認コントロール(NC)	

中和コントロールサンプル 1 m 1 及び 0. 1 m 1 のアリコート（放置した培養液 1 m 1 を用いて植込んだ 9 m 1 の中和剤ブランク管(neutralizer blank tube)）を血液寒天平板に移した。テスト生物体懸濁液 1 m 1 を NC 血液寒天平板及び無菌血液寒天コントロール平板上に添加した。前記血液寒天平板は、テストにおけると同様にして培養した。前記血液寒天平板において、前記寒天表面上のコロニーの存在を調べ、前記血液寒天コントロール平板の表面上のコロニーと比較した。

### 【0061】

#### ジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス：

中和接種物：TNTC CFU/ml を含む 1. 0 m 1 ジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス懸濁液

サンプル識別名	培地	0.1ML	1.0ML
POAA	BAP	TNTC, TNTC	TNTC, TNTC

前記中和コントロールは増殖を示し、テスト系において増殖しない原因である静菌を除去している。

#### フソバクテリウム-ネクロフォルム：

中和接種物：TNTC CFU/ml を含む 1. 0 m 1 フソバクテリウム-ネクロフォルム懸濁液

サンプル識別名	培地	0.1ML	1.0ML
POAA	BAP	TNTC, TNTC	TNTC, TNTC

前記中和コントロールは増殖を示し、テスト系において増殖しない原因である静菌を除去している。

TNTC = 無数

BAP = 血液寒天平板

### 【0062】

テスト結果：15秒間の接触時間後

ジケロバクター(バクテロイデ)ノドーサス

非処理コントロール	4.5 × 10 <sup>3</sup> cfu/ml
0.5%生成物 (290 ppm POAA)	<1 cfu/ml
%削減量	>99.978%

フソバクテリウム-ネクロフォルム

非処理コントロール	28.3 × 10 <sup>6</sup> cfu/ml
0.5%生成物 (290 ppm POAA)	<1 cfu/ml
%削減量	>99.999%

cfu/ml=1ミリリットル当たりのコロニー形成単位

注釈：

- 1) 結果は、二組の四つの平板セットの平均である。全ての場合において、処理サンプルにおいては1 cfu/ml 未満であった。
- 2) 使用した生成物：実施例1 0.5%に希釈した場合、使用溶液中POAAの濃度は290 ppmであった。

【0063】

計算

前記%削減量を計算する。

$$1 - \frac{\text{テストコロニー形成単位数}}{\text{コントロールコロニー形成単位数}} \times 100 = \% \text{ 削減量}$$

【0064】

上記明細事項、実施例及びデータにより、本発明の組成物の製造及び使用方法を完全に記載している。本発明の精神及び範囲を超えることなく多くの実施例が作成可能であるため、本発明はここに添付したクレームに内在するものである。