

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6171018号
(P6171018)

(45) 発行日 平成29年7月26日(2017.7.26)

(24) 登録日 平成29年7月7日(2017.7.7)

(51) Int.Cl.	F 1
AO1N 25/30 (2006.01)	AO1N 25/30
AO1N 25/02 (2006.01)	AO1N 25/02
AO1N 43/80 (2006.01)	AO1N 43/80 102
AO1P 3/00 (2006.01)	AO1P 3/00
AO1P 1/00 (2006.01)	AO1P 1/00

請求項の数 12 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-532116 (P2015-532116)
(86) (22) 出願日	平成25年9月16日 (2013.9.16)
(65) 公表番号	特表2015-534552 (P2015-534552A)
(43) 公表日	平成27年12月3日 (2015.12.3)
(86) 國際出願番号	PCT/US2013/059885
(87) 國際公開番号	W02014/046990
(87) 國際公開日	平成26年3月27日 (2014.3.27)
審査請求日	平成28年9月1日 (2016.9.1)
(31) 優先権主張番号	61/702,446
(32) 優先日	平成24年9月18日 (2012.9.18)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	61/803,155
(32) 優先日	平成25年3月19日 (2013.3.19)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	502141050 ダウ グローバル テクノロジーズ エル エルシー アメリカ合衆国 ミシガン州 48674 , ミッドランド, ダウ センター 204 O
(73) 特許権者	590002035 ローム アンド ハース カンパニー ROHM AND HAAS COMPAN NY アメリカ合衆国 19106-2399 ペンシルバニア州 フィラデルフィア, イ ンディペンデンス モール ウエスト 1 OO

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 殺菌組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 0.5 - 5 wt % の、 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン および 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの混合物；ならびに (b) 1 - 10 wt % の、 構造 :



(式中、 R は分枝型 $C_6 - C_{1-2}$ アルキル基であり、 x は 3 から 7 であり、 y は 5 から 12 である)

を有する非イオン性界面活性剤を含む水性殺菌組成物。

【請求項 2】

(a) 0.5 - 5 wt % の、 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン および 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの混合物；ならびに (b) 1 - 10 wt % の、 構造 :



(式中、 R は $C_6 - C_{1-2}$ アルキル基であり、 x は 3 から 6 であり、 y は 5 から 12 である)

を有する非イオン性界面活性剤を含む水性殺菌組成物。

【請求項 3】

3 から 8 wt % の前記非イオン性界面活性剤を有する、請求項 1 または 2 に記載の組成物。

10

20

【請求項 4】

R が $C_7 - C_9$ アルキル基であり、x が 4 から 6 であり、y が 5 から 7 または 8 から 10 である、請求項 3 に記載の組成物。

【請求項 5】

1 - 3 wt % の前記混合物を有する、請求項 4 に記載の組成物。

【請求項 6】

R が 2 - エチルヘキシルであり、y が 6 または 9 であり、5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン対 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの重量比が 2 . 5 : 1 から 3 . 5 : 1 であり、前記非イオン性界面活性剤対前記混合物の重量比が 5 : 1 から 2 : 1 である、請求項 5 に記載の組成物。

10

【請求項 7】

(a) 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよび 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの混合物；ならびに (b) 構造：



(式中、R は C_8 アルキル基であり、x は 5 であり、y は 6 または 9 である) を有する非イオン性界面活性剤を含む、相乗的殺菌組成物。

【請求項 8】

5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン対 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの重量比が 2 . 5 : 1 から 3 . 5 : 1 である、請求項 7 に記載の相乗的殺菌組成物。

20

【請求項 9】

R が 2 - エチルヘキシルであり、y が 9 であり、前記混合物対前記非イオン性界面活性剤の重量比が 1 : 2 から 1 : 5 である、請求項 8 に記載の相乗的殺菌組成物。

【請求項 10】

R が 2 - エチルヘキシルであり、y が 6 であり、前記混合物対前記非イオン性界面活性剤の重量比が 1 : 0 . 5 から 1 : 1 0 である、請求項 8 に記載の相乗的殺菌組成物。

【請求項 11】

(a) 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよび 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの混合物；ならびに (b) 構造：

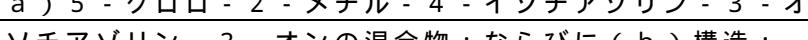


30

(式中、R は分枝型 $C_6 - C_{12}$ アルキル基であり、x は 3 から 7 であり、y は 5 から 1 2 である。) を有する非イオン性界面活性剤を含み、前記非イオン性界面活性剤対前記混合物の重量比が 1 0 : 1 から 0 . 8 : 1 である水性殺菌組成物。

【請求項 12】

(a) 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよび 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの混合物；ならびに (b) 構造：



(式中、R は $C_6 - C_{12}$ アルキル基であり、x は 3 から 6 であり、y は 5 から 1 2 である) を有する非イオン性界面活性剤を含み、前記非イオン性界面活性剤対前記混合物の重量比が 1 0 : 1 から 0 . 8 : 1 である水性殺菌組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、5 - クロロ - 2 - メチルイソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチルイソチアゾリン - 3 - オンおよび界面活性剤を含有する殺菌組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

5 - クロロ - 2 - メチルイソチアゾリン - 3 - オン、2 - メチルイソチアゾリン - 3 -

50

オンおよび非イオン性分散剤を含有する組成物が、米国特許第4,295,932号明細書に開示されている。該組成物は、5-クロロ-2-メチルイソチアゾリン-3-オンおよび2-メチルイソチアゾリン-3-オンの3:1混合物およびPLURONIC L61またはTERGITOL L61分散剤と同じ組成を有すると思われるエチレンオキサイドとプロピレンオキサイドとのコポリマーを含有する。しかし、5-クロロ-2-メチルイソチアゾリン-3-オンおよび2-メチルイソチアゾリン-3-オンを含有する代替の組成物の必要性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

10

【特許文献1】米国特許第4,295,932号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明が対処する問題は、5-クロロ-2-メチルイソチアゾリン-3-オンおよび2-メチルイソチアゾリン-3-オンを含有する代替の組成物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、(a) 0.5-5wt%の5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンおよび2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの混合物；ならびに(b) 1-10wt%の、C₆-C₁₂アルキル基、平均3-7モル重合単位のプロピレンオキサイドおよび平均5-12モル重合単位のエチレンオキサイドを含む非イオン性界面活性剤を含む水性殺菌組成物を対象とする。

20

【0006】

本発明は、(a) 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンおよび2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの混合物；ならびに(b)構造：



(式中、RはC₈アルキル基であり、xは5であり、yは6または9である)

を有する非イオン性界面活性剤を含む、相乗的殺菌組成物をさらに対象とする。

【0007】

30

本発明は、(a) 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンおよび2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンの混合物；ならびに(b) C₆-C₁₂アルキル基、平均3-7モル重合単位のプロピレンオキサイドおよび平均5-12モル重合単位のエチレンオキサイドを含む非イオン性界面活性剤を含み、前記非イオン性界面活性剤対前記混合物の重量比が10:1から0.8:1である水性殺菌組成物をさらに対象とする。

【発明を実施するための形態】

【0008】

「MIT」は、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンであり、2-メチル-3-イソチアゾロンとも称される。「CMT」は、5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オンであり、5-クロロ-2-メチル-3-イソチアゾロンとも称される。好ましくは、CMT対MITの重量比は、少なくとも2:1、好ましくは少なくとも2.5:1である。好ましくは、CMT対MITの重量比は、4:1以下、好ましくは3.5:1以下である。本発明の好ましい一実施形態において、CMT:MITの比は約3:1である。

40

【0009】

本明細書において使用する場合、下記の用語は、文脈が特に他のことを明確に述べない限り、指定された定義を有する。「殺菌剤」という用語は、ある場所において微生物の成長を阻害、または成長を制御可能な化合物を指し、殺菌剤は、殺細菌剤、殺真菌剤および殺藻剤を含む。「微生物」という用語は、例えば、真菌(酵母およびカビなど)、細菌および藻を含む。本明細書において使用される用語の「固体」組成物は、25において固

50

体の組成物である。下記の略称は本明細書を通して使用される：ppm = 重量百万分率（重量 / 重量）、mL = ミリリットル。他のことが明記されない限り、温度は摂氏度（℃）であり、百分率に対する言及は重量百分率（wt%）であり量および比率は、有効成分ベース、すなわちイソチアゾロンおよび非イオン性界面活性剤である。固体組成物中の水の百分率は、任意の水和塩中に存在するすべての水および存在し得る任意の遊離水を含む。

【0010】

好ましくは、水性組成物は、少なくとも0.8wt%のCMITおよびMIT混合物（有効成分ベース）、好ましくは少なくとも1wt%、好ましくは少なくとも1.1wt%の前記組成物、好ましくは少なくとも1.2wt%、好ましくは少なくとも1.3wt%を含有し、；好ましくは、該組成物は4.5wt%以下の前記混合物を含有し、好ましくは4wt%以下、好ましくは3.5wt%以下、好ましくは3wt%以下、好ましくは2.5wt%以下、好ましくは2wt%以下、好ましくは1.8wt%以下の前記混合物を含有する。好ましくは、非イオン性界面活性剤対CMIT/MIT混合物の重量比は、CMIT/MITおよび界面活性剤の有効成分重量に基づき、10:1以下、好ましくは8:1以下、好ましくは6:1以下、好ましくは5:1以下、好ましくは4:1以下、好ましくは3.5:1以下、好ましくは3:1以下であり、好ましくは少なくとも0.8:1、好ましくは少なくとも1:1、好ましくは少なくとも1.5:1、好ましくは少なくとも2:1、好ましくは少なくとも2.5:1、好ましくは少なくとも3:1である。

【0011】

「金属硝酸塩」は、好ましくはアルカリ金属、アルカリ土類金属またはアンモニウムの硝酸塩である。好ましくは、金属はリチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、アンモニウムまたはこれらの組み合わせであり、より好ましくは、ナトリウム、カリウム、マグネシウムまたはこれらの組み合わせである。マグネシウムが特に好ましい。

【0012】

水性組成物は、好ましくは少なくとも70wt%の水を含有し、好ましくは少なくとも80wt%、好ましくは少なくとも85wt%、好ましくは少なくとも87wt%、好ましくは少なくとも89wt%の水を含有する。好ましくは、水性組成物は、少なくとも0.5wt%の金属硝酸塩を含有し、好ましくは少なくとも1wt%、好ましくは少なくとも1.2wt%、好ましくは少なくとも1.4wt%、好ましくは少なくとも2wt%の金属硝酸塩を含有し、好ましくは8wt%以下、好ましくは6wt%以下、好ましくは5wt%以下、好ましくは4wt%以下、好ましくは3wt%以下の金属硝酸塩を含有する。好ましくは、水性組成物は、少なくとも0.005wt%の、ヨウ素酸、臭素酸、過ヨウ素酸またはそれらの塩の少なくとも1つを含有し、好ましくは少なくとも0.01wt%、好ましくは少なくとも0.015wt%、好ましくは少なくとも0.02wt%の、ヨウ素酸、臭素酸、過ヨウ素酸またはそれらの塩の少なくとも1つを含有し、好ましくは0.2wt%以下、好ましくは0.1wt%以下、好ましくは0.05wt%以下の、ヨウ素酸、臭素酸、過ヨウ素酸またはそれらの塩の少なくとも1つを含有する。好ましくは、硝酸銅、硫酸銅または他の塩を含む銅系安定剤を使用することができ、好ましくは少なくとも0.05wt%、好ましくは少なくとも0.10%、好ましくは少なくとも0.15%、好ましくは少なくとも0.20%；好ましくは2.0%以下、好ましくは1.0%以下、好ましくは5.0%以下を含有する。さらに、過酸化物またはプロノポール系安定剤もまた使用できる。通常、水性組成物は、工業的使用のために1.0から15ppmのCMIT/MIT（有効成分ベース）に希釈されるものである。

【0013】

好ましくは、非イオン性界面活性剤は下記の構造：



（式中、RはC₆-C₁₂アルキル基であり、xは3から7であり、yは5から12である。）

を有する。xおよびyの数は、化合物の混合物に由来する平均値である。好ましくは、

10

20

30

40

50

R は C₆ - C₁₀ アルキル基、好ましくは C₇ - C₉ アルキル基、好ましくは C₈ アルキル基、好ましくは 2 - エチルヘキシル基である。好ましくは、R は分枝型アルキル基である。好ましくは、x は 4 - 6 であり、好ましくは約 5 である。好ましくは、y は 5 - 10 であり、好ましくは 6 - 10、好ましくは 6 - 9、好ましくは 5 - 7 または 8 - 10、好ましくは 7 - 10、好ましくは 8 - 10、好ましくは約 9 である。好ましくは、水性組成物は、少なくとも 2 wt % の前記非イオン性界面活性剤（有効成分ベース）を含有し、好ましくは少なくとも 3 wt %、好ましくは少なくとも 3.5 wt %、好ましくは少なくとも 4 wt % の前記非イオン性界面活性剤を含有し、好ましくは 9 wt % 以下、好ましくは 8 wt % 以下、好ましくは 7 wt % 以下、好ましくは 6.5 wt % 以下、好ましくは 6 wt % 以下の前記非イオン性界面活性剤を含有する。

10

【0014】

水性組成物は、イソチアゾロン殺生物剤の生成から持ち越される微量の有機溶媒を含有してもよい。好ましくは、水性組成物中の有機溶媒の合計レベルは、1 % 以下、好ましくは 0.5 % 以下、好ましくは 0.3 % 以下、好ましくは 0.2 % 以下、好ましくは 0.1 % 以下である。通常、存在し得る有機溶媒としては、例えば、エタノール、酢酸エチル、酢酸、酢酸ブチル、ブタノールおよび塩化メチレンが挙げられる。

【0015】

好ましくは、水性組成物は、他の界面活性剤を実質的に含まず、すなわち、水性組成物は、1 wt % 未満の前記非イオン性界面活性剤以外の界面活性剤を含有し、好ましくは 0.5 wt % 未満、好ましくは 0.3 wt % 未満、好ましくは 0.2 wt % 未満、好ましくは 0.1 wt % 未満、好ましくは 0.05 wt % 未満の前記非イオン性界面活性剤以外の界面活性剤を含有する。

20

【0016】

好ましくは、相乗的殺菌組成物は、(a) 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよび 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの混合物；ならびに (b) C₈ アルキル基、平均 5 重合単位のプロピレンオキサイドおよび平均 9 重合単位のエチレンオキサイドを含む非イオン性界面活性剤を含有する。好ましくは、前記混合物対前記非イオン性界面活性剤の重量比は、1 : 2 から 1 : 50 である。好ましくは、相乗的殺菌組成物は、(a) 5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよび 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンの混合物；ならびに (b) C₈ アルキル基、平均 5 重合単位のプロピレンオキサイドおよび平均 6 重合単位のエチレンオキサイドを含む非イオン性界面活性剤を含有する。好ましくは、前記混合物対前記非イオン性界面活性剤の重量比は、1 : 0.5 から 1 : 10 である。好ましくは、非イオン性界面活性剤は下記の構造：



(式中、R は C₈ アルキル基であり、x は 5 であり、y は 6 または 9、好ましくは 9 である) を有する。好ましくは、C₈ アルキル基は 2 - エチルヘキシルである。C M I T / M I T 混合物 (3 : 1 重量比) は、P. エルギノーサ (P. aeruginosa)、E. クロアカ (E. cloacae) および K. ニューモニエ (K. pneumoniae) に対して前述の式 (式中、R が 2 - エチルヘキシルであり、x が 5 であり、y が 9 である) の非イオン性界面活性剤と相乗的であり、この組み合わせはエンテロバクター・クロアカ (E. cloacae) の成長の阻害において特に有効である。C M I T / M I T 混合物混合物 (3 : 1 重量比) は、前述の式 (式中、R は 2 - エチルヘキシルであり、x は 5 であり、y は 6 である) の非イオン性界面活性剤と、エンテロバクター・クロアカ (E. cloacae) およびクレブシエラ・ニューモニエ (K. pneumoniae) に対して相乗的であった。好ましくは、相乗的殺菌組成物は実質的に他のイソチアゾロンを含まない、すなわち、相乗的殺菌組成物は、有効成分の合計重量に基づき 1 wt % 未満、好ましくは 0.5 wt % 未満、好ましくは 0.2 wt % 未満、好ましくは 0.1 wt % 未満の、C M I T / M I T 以外のイソチアゾロンを有する。好ましくは、相乗的殺菌組成物は実質的に他の殺菌剤を含まず、すなわち、相乗的殺菌組成物は、有効成分の合計重量に基づ

40

50

き 1 w t % 未満、好ましくは 0 . 5 w t % 未満、好ましくは 0 . 2 w t % 未満、好ましくは 0 . 1 w t % 未満の、C M I T / M I T 以外の殺菌剤を有する。

【 0 0 1 7 】

本発明の組成物は、他の原料、例えば消泡剤および乳化剤を含んでもよい。本発明の殺菌組成物を使用して、微生物または水生高等生物（例えば、原生動物、無脊椎動物、コケムシ、渦鞭毛藻、甲殻類、軟体動物など）の成長を、微生物の攻撃を受ける場所の上、中またはその場所に殺菌有効量の組成物を導入することによって阻害することができる。適切な場所としては、例えば、工業用プロセス水；電着塗装（electrocoat deposition）系；冷却塔；空気清浄装置；ガススクラバー；鉱物スラリー；廃水処理；観賞用噴水；逆浸透ろ過；限外ろ過；バラスト水；蒸発凝縮器；熱交換機；紙パルプ処理用流体および添加物；デンプン；プラスチック；エマルジョン；分散液；塗料；ラテックス；ニスなどの被膜剤；建設用製品、例えばマスチック、コーティング材およびシーラントなど；建設用接着剤、例えばセラミック接着剤、カーペット裏地接着剤および貼り合わせ用接着剤など；工業的もしくは消費者用接着剤；写真用化学薬品；印刷流体；家庭用品、例えば浴室および台所用洗浄剤；化粧品；トイレタリー製品；シャンプー；石鹼；洗剤；工業用洗浄剤；床磨き剤；洗濯すすぎ剤；金属加工油剤；コンベア潤滑剤；油圧油；革および革加工製品；織物；織物製品；木材および木材加工製品、例えば合板、チップボード、フレークボード、積層梁、配向性ストランドボード、ハードボードおよびパーティクルボード；液油加工流体；燃料；油田流体、例えば注入水、破碎流体および掘削泥水；農業用アジュバント保存；界面活性剤保存；医療機器；診断試薬保存；食品保存、例えばプラスチックまたは紙の食品ラップ；食品；飲料、および工業プロセス用低温殺菌器；便器；レクリエーション水域；プール；ならびにスパが挙げられる。10

【 0 0 1 8 】

ある用途において微生物の成長を阻害または制御するために必要とされる本発明の殺菌組成物の特定量は変動する。通常、本発明の組成物の量は、組成物の有効成分が 0 . 1 から 1 , 0 0 0 p p m (百万分率) で提供された場合、微生物の成長を制御するために十分である。組成物の有効成分（すなわち非イオン性界面活性剤およびイソチアゾロン混合物）は、その場所において少なくとも 1 p p m、好ましくは少なくとも 5 p p m、好ましくは少なくとも 10 p p m、好ましくは少なくとも 20 p p m の量で存在することが好ましい。組成物の有効成分は、その場所において 7 0 0 p p m 以下、好ましくは 4 0 0 p p m 以下、好ましくは 2 0 0 p p m 以下、好ましくは 1 0 0 p p m 以下、好ましくは 5 0 p p m 以下、好ましくは 3 0 p p m 以下、好ましくは 2 0 p p m 以下で存在することが好ましい。20

【 0 0 1 9 】

工業的および商業的冷却水系において、好ましくは有効成分の合計濃度は、少なくとも 1 p p m、好ましくは少なくとも 2 p p m、好ましくは少なくとも 3 p p m；好ましくは 2 5 p p m 以下、好ましくは 2 0 p p m 以下、好ましくは 1 5 p p m 以下、好ましくは 1 2 p p m 以下、好ましくは 1 0 p p m 以下、好ましくは 8 p p m 以下、好ましくは 6 p p m 以下である。本発明の方法において、工業的および商業的冷却水系は、非イオン性界面活性剤およびイソチアゾロン混合物を、一緒または別々に、上記の濃度を生み出す量で加えることによって処理される。30

【 実施例 1 】

【 0 0 2 0 】

P L U R O N I C 界面活性剤と C M I T / M I T 殺生物剤との適合性スクリーニング

いくつかの P L U R O N I C 界面活性剤を含むさまざまな界面活性剤が、表面上の細菌生物汚染を制御するための、低レベルの C M I T / M I T (3 : 1 重量比) 殺生物剤の有効性を改善することが既に示されている。本出願のすべての試験において、C M I T / M I T は、銅またはヨウ素酸塩系の安定剤を含まなかった。殺生物剤と界面活性剤との 1 . 5 : 5 重量パーセント比の併用は、さまざまな時点および異なる母材においてさまざまな生物による生物汚染の制御に有効であった。P L U R O N I C および T E R G I T O L 40

50

L界面活性剤は、プロピレンオキサイド(PO)とエチレンオキサイド EOとのコポリマーであり、ポリプロピレングリコールをエチレンオキサイドでキャップすることにより作製される。ナンバリング系の1桁目の300倍は重合POコアの分子量を示し、2桁目の10倍は界面活性剤中の重合エチレンオキサイドの百分率を示す。例えば、PLURONIC L61は、MW1800のPOコアを有し、全体で10%EOである。

【0021】

しかし、2部分(2つのドラム)の処理は、追加のポンプ、タイマー、配管系、電気、在庫、空所および維持管理を必要とするので、微生物制御のために2部分(2つのドラム)の処理を使用することは望ましくない。最も望ましい投与系は、単一製品(1ドラム)戦略である。しかし、併用製剤は、実行可能な選択であるために、優れた適合性および安定性を実証しなければならない。

【0022】

殺生物剤および界面活性剤の併用を含有する安定な製剤は、特に昇温における保存下での良好な物理的および化学的適合性の最小基準を実証しなければならない。製品からの発泡も、最小から全くないことは併用製品の重要な特長である。

【0023】

このスクリーニング研究において、いくつかのPLURONIC界面活性剤(BASF Co.)を、1%および5%でCMIT/MIT殺生物剤と併用して評価した。殺生物剤と界面活性剤との物理的安定性を、40°において1週間の間評価した。この実施例において、殺生物剤を、最終濃度1.5%に製剤化し、0.15%の硝酸銅により安定化させた。

【0024】

この研究結果により、PLURONIC L62(1%または5%において)とCMIT/MITとの製剤が相分離を起こし、したがって使用に不適切であることが示された。CMIT/MIT製剤とPLURONIC L43との相分離は、1:1比においても見られたが、1:5重量比においては見られなかった。しかし、PLURONIC L44は、CMIT/MITとの併用において相分離を示さなかった。これらのスクリーニング結果に基づき、CMIT/MITとPLURONIC L44界面活性剤との製剤は、さらなる適合性試験に適切であった。

[表]

殺生物剤	界面活性剤	物理的安定性 40°Cにおいて1週間 後の観察	併用製剤に 関する適、 不適
1.5% CMIT/MIT	なし	相分離なし	該当せず
1.5% CMIT/MIT	1% PLURONIC L62 LF	相分離	不適
1.5% CMIT/MIT	5% PLURONIC L62 LF	相分離	不適
1.5% CMIT/MIT	1% PLURONIC L43	相分離	不適
1.5% CMIT/MIT	5% PLURONIC L43	相分離なし	適
1.5% CMIT/MIT	1% PLURONIC L44	相分離なし	適
1.5% CMIT/MIT	5% PLURONIC L44	相分離なし	適

【実施例2】

【0025】

CMIT/MIT殺生物剤とPLURONIC界面活性剤との長期熱老化後の適合性。この安定性/適合性研究において、PLURONIC L44およびL44 INH界面活性剤(BASF Co.)を5%レベルで、0.01%ヨウ素酸カリウムにより事前安定化または事後安定化のいずれかを行った1.5%レベルのCMIT/MIT殺生物剤と併用して評価した。殺生物剤と界面活性剤との物理的/化学的安定性を、25°において4週間保存後および55°において4~8週間保存後に評価した。適切な製剤は、>90%の各殺生物剤成分の残留を示し、55°において4週間保存後に濁りも沈殿物も示さ

10

20

30

40

50

ない。わずかな色変化のみが望ましくないが、これは固体（沈殿物）を生み出すものでも、または投与される殺生物剤の濃度に影響を与えるものでもないので、許容可能である。許容できない試料は太字および下線で強調してある。

【0026】

この研究結果により、C M I T / M I T 殺生物剤は、P L U R O N I C L 4 4 または P L U R O N I C L 4 4 I N H 界面活性剤のいずれとも昇温（55℃）において適合性ではないことが示された。C M I T 殺生物剤のより激しい分解が試料1および試料2（事前安定化）対試料2および試料3（事後安定化）において見られた。すべての熱老化試料は、殺生物剤の喪失（< 95%の残留）、沈殿の形成および混濁の出現のため許容できないと見なされた。したがって、C M I T / M I T とP L U R O N I C L 4 4 またはL 4 4 I N H 界面活性剤との併用は、さまざまな熱老化条件および調製方法において強固でも適合性でもない。

[表]

試料	Wt %	週	℃	MIT%	CMIT%	合計%	MIT残留 %	CMIT残留 %	外観
CMIT/MIT 事前安定化	10.71%	0	25	0.38	1.12	1.50	100%	100%	無色透明
PLURONIC L4 4 INH	5.00%	4	25	0.39	1.14	1.53	103%	102%	無色透明
		4	55	0.33	0.01	0.34	<u>87%</u>	<u>1%</u>	混濁、黄色 、沈殿物
		8	55	0.24	0.01	0.25	<u>63%</u>	<u>1%</u>	混濁、黄色 、沈殿物
CMIT/MIT 事前安定化	10.71%	0	25	0.38	1.12	1.50	100%	100%	無色透明
PLURONIC L4 4	5.00%	4	25	0.39	1.13	1.52	103%	101%	無色透明
		4	55	0.30	0.06	0.36	<u>79%</u>	<u>5%</u>	混濁、黄色 、沈殿物
		8	55	0.24	0.05	0.29	<u>63%</u>	<u>4%</u>	混濁、黄色 、沈殿物
CMIT/MIT 事後安定化	10.71%	0	25	0.36	1.06	1.4	100%	100%	無色透明
PLURONIC L4 4 INH	5.00%	4	25	0.36	1.07	1.43	100%	101%	無色透明
		4	55	0.32	0.66	0.98	<u>89%</u>	<u>62%</u>	混濁、黄色 、沈殿物
		8	55	0.28	0.26	0.54	<u>78%</u>	<u>25%</u>	混濁、黄色 、沈殿物
CMIT/MIT 事後安定化	10.71%	0	25	0.38	1.11	1.49	100%	100%	無色透明
PLURONIC L4 4	5.00%	4	25	0.38	1.11	1.49	100%	100%	無色透明
		4	55	0.35	0.88	1.23	<u>92%</u>	<u>79%</u>	混濁、黄色 、沈殿物
		8	55	0.33	0.73	1.03	<u>87%</u>	<u>66%</u>	混濁、黄色 、沈殿物

【実施例3】

【0027】

C M I T / M I T 製剤と界面活性剤との化学的安定性。

さらなる研究を実施し、C M I T およびM I T 有効成分と、さまざまな界面活性剤との（1.5:5重量比）併用における化学的安定性を、長期熱老化条件下で比較した。

【0028】

この研究において、いくつかの追加の界面活性剤を5%で、0.01%ヨウ素酸カリウムにより事前安定化または事後安定化のいずれかを行った1.5%のC M I T / M I T 殺

10

20

30

40

50

生物剤と併用して評価した。殺生物剤製剤と界面活性剤との化学的安定性を、当初 25°において評価し、4週後および8週後の老化を55°において評価した。適切な製剤は、>95%の各殺生物剤成分の残留を示し、55°において4週間保存後に濁りも沈殿も示さない。わずかな色変化のみが望ましくないが、これは固体（沈殿物）を生み出すものでも、または投入される殺生物剤の濃度に影響を与えるものでもないので、許容可能である。許容できない試料は太字および下線で強調してある。

【0029】

CMIT/MITとTERGITOL L-64およびSurf. A（平均9単位のEOによりキャップされた平均5単位のPOを含む2-エチルヘキシル）との併用により、良好な物理的安定性および化学的安定性が示され、両方のイソチアゾロン殺生物剤は55°

10

において4~8週間後も活性であった。1つの試料だけが8週後にCMITの有意な喪失を示した。わずかな色変化がCMIT/MIT+Surf. Aに見られたが、濁りも沈殿も観察されなかった。したがって、これらの界面活性剤は両方ともCMIT/MIT殺生物剤を含有する強固な製剤の候補である。

【表】

試料	wt%	Wk	°C	MIT %	CMIT %	有効成分合計	MIT残留%	CMIT残留%	外観
CMIT/MIT 事前安定化	10.7 1	0	25	0.3 9	1.16	1.55	100%	100%	無色透明
TERGITOL L-64	5.00	4	55	0.3 8	1.15	1.54	98%	99%	無色透明
		8	55	0.3 9	1.07	1.46	99%	<u>92%</u>	無色透明
CMIT/MIT 事後安定化	10.7 1	0	25	0.3 8	1.14	1.52	100%	100%	無色透明
TERGITOL L-64	5.00	4	55	0.3 7	1.09	1.47	98%	96%	無色透明
		8	55	0.3 8	1.10	1.49	101%	97%	無色透明
CMIT/MIT 事前安定化	10.7 1	0	25	0.3 8	1.15	1.53	100%	100%	無色透明
Surf. A	5.00	4	55	0.4 0	1.18	1.58	105%	103%	透明、淡 黄色
		8	55	0.4 1	1.19	1.59	107%	103%	透明、淡 黄色
CMIT/MIT 事後安定化	10.7 1	0	25	0.3 8	1.12	1.50	100%	100%	無色透明
Surf. A	5.00	4	55	0.3 7	1.11	1.48	97%	99%	透明、淡 黄色
		8	55	0.3 9	1.11	1.50	102%	99%	透明、淡 黄色

【実施例4】

20

【0030】

30

CMIT/MIT製剤と、Surf. A、BおよびCならびにTERGITOL界面活性剤との適合性スクリーニング。

適合性スクリーニング研究を実施して、CMIT/MIT製剤と、さまざまな界面活性剤との適合性を評価し、これらの界面活性剤は、CMIT/MIT殺生物剤の微生物バイオフィルム制御に対する有効性を強化していた。物理的観察を、1.5%CMIT/MIT殺生物剤と5%界面活性剤とを含有する併用製剤に対して実施した。CMIT/MIT殺生物剤を、14%CMIT/MIT製品を希釈して、（非添加が明記されない限り）0.01%ヨウ素酸カリウムにより事後安定化することにより調製した。

【0031】

50

結果により、C M I T / M I T が物理的には無色透明であり、ヨウ素酸カリウムにより安定化させた場合沈殿物を含まないことが示された。1.5% C M I T / M I T 製剤中の安定剤の除去により、40°および55°において変色および沈殿物が生じた。

【0032】

Surf. C (平均3単位のEOによりキャップされた平均5単位のPOを含む2-エチルヘキシル)およびTERGITOL L-81界面活性剤(CMIT/MIT含有または非含有)は、ゼロ時において物理的に不適切(混濁またはゲル化)であり、さらなる試験を行わなかった。

【0033】

Surf. B (平均6単位のEOによりキャップされた平均5単位のPOを含む2-エチルヘキシル)およびTERGITOL L-62は、CMIT/MITとの併用において変わりやすい結果を示し、濁り、色または高発泡のため適切とはみなされなかった。

【0034】

Surf. AおよびTERGITOL L-64界面活性剤は、5%で1.5%のCMIT/MIT殺生物剤と一緒に製剤化した場合、優れた物理的特性および適合性を示した。これらの製剤は、通常、透明であり、濁りまたは色が無く、55°までの短期熱老化後に最小の発泡から発泡が無かった。

[表]

界面活性剤	CMIT/MIT	0時	25°Cにおいて4日	40°Cにおいて4日	55°Cにおいて4日
なし	1.5%	透明	透明	透明	透明
	1.5% 安定剤なし	透明	透明	黄色、 沈殿物	黄色、 沈殿物
5% Surf. C	なし	混濁	—	—	—
	1.5%	混濁	—	—	—
5% Surf. B	なし	透明	透明、 高発泡	混濁、 白色	混濁、 白色
	1.5%	透明	透明、 高発泡	透明、 わずかに発泡	混濁、 白色、わずかに発泡
5% Surf. A	なし	透明	透明、 中発泡	透明、 わずかに発泡	透明、 わずかに発泡
	1.5%	透明	透明、 中発泡	透明	透明
5% TERGITOL L-62	なし	透明	透明、 低発泡	透明	混濁
	1.5%	透明	透明、 低発泡	透明	混濁、 わずかに黄変
5% TERGITOL L-64	なし	透明	透明	透明	透明
	1.5%	透明	透明	透明	透明
5% TERGITOL L-81	なし	混濁、 ゲル化、 相分離	—	—	—
	1.5%	混濁、 ゲル化、 相分離	—	—	—

10

20

30

40

【実施例5】

【0035】

CMIT/MIT製剤と、Surf. AおよびTERGITOL L-64界面活性剤との長期熱老化後の適合性および安定性。

さらなる安定性試験を、Surf. B、Surf. AおよびTERGITOL L-64界面活性剤を含有するCMIT/MIT製剤に対して実施し、それらの長期物理的適合性および化学的適合性を評価した。試験は25°、40°および55°において実施した

50

。結果により、2ヶ月後55において保存されたTERGITOL L-64+CMIT/MITを除くすべての製剤が優れた化学的安定性（初期濃度の>95%が残留）および物理的外観（透明、沈殿および濁りなし）を示した。わずかな発泡および色が、Surf. BとCMIT/MITとを含有する製剤において観察された。

【0036】

老化3ヶ月後、CMIT有効成分のわずかな喪失（94%残留）が55においてSurf. Aに見られた。CMITの中程度の喪失（89%残留）および黄変が、55においてSurf. Bに見られた。すべての他の被験併用は、優れた物理的適合性および化学的適合性を示した。

【0037】

6ヶ月後、室温において老化させたすべての試料は非常に安定であり、物理的に適合性であった。想定通りに、昇温における殺生物剤のさらなる喪失がいくつかの製剤に関して指摘されたが、40および55において6ヶ月の保存に関してこれは許容可能である。

[表]

2ヶ月保存における殺生物剤の安定性および適合性

試料	CMIT %	MIT %	有効成分合計%	CMIT残留%	MIT残留%	外観
Surf. A + CMIT/MIT 25°C	1.134	0.375	1.51	101%	101%	透明
Surf. A + CMIT/MIT 40°C	1.140	0.374	1.51	101%	101%	透明
Surf. A + CMIT/MIT 55°C	1.075	0.373	1.45	95%	101%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 25°C	1.132	0.374	1.51	101%	102%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 40°C	1.123	0.372	1.49	101%	102%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 55°C	0.174	0.251	0.43	<u>16%</u>	<u>69%</u>	黄色、沈殿物
CMIT/MIT 25°C	1.217	0.403	1.62	105%	105%	透明
CMIT/MIT 40°C	1.186	0.392	1.58	102%	102%	透明
CMIT/MIT 55°C	1.185	0.392	1.58	102%	102%	透明
Surf. B + CMIT/MIT 25°C	1.131	0.374	1.51	100%	100%	透明、発泡
Surf. B + CMIT/MIT 40°C	1.140	0.376	1.52	101%	100%	黄白色、発泡
Surf. B + CMIT/MIT 55°C	1.081	0.376	1.46	95%	100%	透明、発泡

Surf. A + CMIT/MIT 初期濃度 = 1.133% CMIT + 0.375% MIT

Surf. A + CMIT/MIT 初期濃度 = 1.127% CMIT + 0.371% MIT

TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 初期濃度 = 1.116% CMIT + 0.365% MIT

CMIT/MIT 初期濃度 = 1.163% CMIT + 0.384% MIT

[表]

3ヶ月保存における殺生物剤の安定性および適合性

試料	CMIT%	MIT%	有効成分合計%	CMIT残留%	MIT残留%	外観
Surf. A + CMIT/MIT 25°C	1.137	0.378	1.51	101%	102%	透明
Surf. A + CMIT/MIT 40°C	1.113	0.367	1.48	99%	99%	透明
Surf. A + CMIT/MIT 55°C	1.057	0.361	1.42	94%	97%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 25°C	1.121	0.370	1.49	100%	101%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 40°C	1.091	0.364	1.46	98%	100%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 55°C	n t (検査せず)	n t (検査せず)	n t (検査せず)	N t (検査せず)	n t (検査せず)	N t (検査せず)
CMIT/MIT 25°C	1.212	0.401	1.61	104%	104%	透明
CMIT/MIT 40°C	1.184	0.391	1.58	102%	102%	透明
CMIT/MIT 55°C	1.212	0.414	1.63	104%	108%	透明、 黄白色、
Surf. B + CMIT/MIT 25°C	1.126	0.372	1.50	99%	99%	透明、
Surf. B + CMIT/MIT 40°C	1.131	0.374	1.50	100%	100%	黄白色、発泡
Surf. B + CMIT/MIT 55°C	1.008	0.399	1.41	89%	106%	黄色、

[表]

6ヶ月保存における殺生物剤の安定性および適合性

試料	CMIT%	MIT%	有効成分合計%	残留 CMIT%	残留 MIT%	外観
Surf. A + CMIT/MIT 25°C	1.152	0.382	1.53	102%	103%	透明
Surf. A + CMIT/MIT 40°C	1.085	0.360	1.44	96%	97%	透明
Surf. A + CMIT/MIT 55°C	0.922	0.357	1.28	82%	96%	黄白色、
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 25°C	1.134	0.375	1.51	102%	103%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 40°C	0.974	0.365	1.34	87%	100%	透明
TERGITOL L-64 + CMIT/MIT 55°C	n t (検査せず)	n t (検査せず)	n t (検査せず)	n t (検査せず)	N t (検査せず)	N t (検査せず)
CMIT/MIT 25°C	1.239	0.414	1.65	107%	108%	透明
CMIT/MIT 40°C	1.226	0.394	1.62	105%	103%	透明
CMIT/MIT 55°C	1.235	0.442	1.68	106%	115%	透明
Surf. B + CMIT/MIT 25°C	1.147	0.378	1.53	101%	101%	透明、 発泡
Surf. B + CMIT/MIT 40°C	1.105	0.369	1.47	98%	99%	黄白色、 発泡
Surf. B + CMIT/MIT 55°C	n t (検査せず)	N t (検査せず)				

【0038】

プランクトン細菌による相乗作用試験

高分解能最小発育阻止濃度 (H R M I C) 研究を実施して、CMIT/MIT 殺生物剤および界面活性剤の両方単独または併用の阻害レベルを決定した。試験は標準的実験質培地において実施した。結果は、30において24時間のインキュベーション後に決定し

10

20

30

40

50

た。

【0039】

材料および方法

本発明の併用の相乗性は、該化合物の広範囲の濃度および比率を試験することによって実証された。相乗性の1つの尺度は、Kull, F. C.; Eisman, P. C.; Syłwestrowicz, H. D. and Mayer, R. L., in Applied Microbiology 9: 538-541 (1961)により記載された工業的に認められた方法であり、下記の式により決定される比を使用する：

$Q_a / Q_A + Q_b / Q_B = \text{相乗指数 (Synergy Index) (S.I.)}$ 、
式中：

Q_A = 単独で作用する、エンドポイントを生み出す化合物A（第1の成分）のppm濃度（化合物AのMICまたはMBC）。

Q_a = 混合物中の、エンドポイントを生み出す化合物Aのppm濃度。

Q_B = 単独で作用する、エンドポイントを生み出す化合物B（第2の成分）のppm濃度（化合物BのMICまたはMBC）。

Q_b = 混合物中の、エンドポイントを生み出す化合物Bのppm濃度。

【0040】

Q_a / Q_A および Q_b / Q_B の合計が1より大きい場合、拮抗作用が示される。合計が1に等しい場合、相加性が示され、1未満である場合、相乗性が実証される。S.I.が低いほど、その特定の混合物により示される相乗作用は大きい。殺菌剤の最小発育阻止濃度（MIC）は、特定の設定条件下で加えられた微生物の成長を防ぐ最も低い被験濃度である。

【0041】

試験は、96ウェルマイクロタイタープレートにより、高分解能MIC併用試験方法を用いるBIOMEK 2000 Workstationを使用して設定され、これは、2種の殺生物剤の複数の併用を1つの試験プレートに提供する。無機塩+グルコース-酵母エキス（MGY）培地において成長が観察されなかった（阻害）殺生物剤の最も低い濃度を、併用の最小発育阻止濃度（MIC）として定義した。

【0042】

シュードモナス・エルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）（ATCC 15442）、エンテロバクター・クロアカ（*Enterobacter cloacae*）（ATCC 13047）またはクレブシラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）（ATCC 10031）の24時間齢培養液の1:20希釈液を試験に使用した。マイクロタイタープレートの各ウェルに、各生物の20μlの純粹培養懸濁液を10⁶コロニー形成単位（CFU）/mlの最終密度で入れた。

【0043】

MICプレートを30において24時間インキュベートし、微生物の成長（濁度）の有無を視覚的に検査した。試験は、殺生物剤の異なる出発濃度で二連に設定して、抗菌活性を示す併用候補の数を増やした。成長を阻害した殺生物剤の最も低い濃度を、MICとして記録した。すべての殺生物剤の結果を、有効成分ベースについてppm（百万分率）で報告する。

【0044】

結果により、CMIT/MITがSurf.AおよびSurf.Bと相乗的であったことが示された。相乗指数値を下記の表に要約する。界面活性剤単独は、10,000ppmにおいて抗菌活性を示さなかった。

【0045】

CMIT/MITおよびSurf.Aによる相乗作用が、3種すべての被験細菌株に対して観察された。Surf.Bのみが、エンテロバクター（*Enterobacter*）および（クレブシラ（*Klebsiella*）株に対してCMIT/MITとの相乗作用を示し、シュードモナス・エルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*

10

20

30

40

50

a) に対しては相乗作用を示さなかった。

[表]

CMIT/MIT殺生物剤と、Surf. AまたはSurf. Bによる相乗作用結果の要約

界面活性剤	相乗指数值範囲	相乗的比率(殺生物剤:界面活性剤)	相乗作用が観察された細菌株
Surf. A	0.50から0.83	1/50から1/2	<i>P. エルギノーサ (P. aeruginosa)</i> <i>E. クロアカ (E. cloacae)</i> <i>K. ニューモニエ (K. pneumoniae)</i>
Surf. B	0.50 から 0.67	1/10 から 1/0.5	<i>E. クロアカ (E. cloacae)</i> <i>K. ニューモニエ (K. pneumoniae)</i>

10

[表]

Surf. AおよびCMIT/MIT殺生物剤による相乗作用

微生物	Q _a ppm CMIT/MIT	Q _b ppm Surf. A	相乗指数值	相乗作用値比 (CMIT/MIT: Surf. A)
<i>P. エルギノーサ (P. aeruginosa)</i>	2	0	1.0	-
実験1	1	10	0.50	1/10
	1	15	0.50	1/15
	0	>10,000	1.0	-
<i>E・クロアカ (E. cloacae)</i>	1	0	1.0	-
実験1	0.8	5	0.80	1/6.3
	0.8	10	0.80	1/12.5
	0.5	15	0.50	1/30
	0.5	20	0.50	1/40
	0.5	25	0.50	1/50
	0	>10,000	1.0	-
<i>K. ニューモニエ (K. pneumoniae)</i>	1	0	1.0	-
実験1	0.8	5	0.80	1/6
	0.8	10	0.80	1/13
	0.8	15	0.80	1/19
	0.8	20	0.80	1/25
	0.8	25	0.80	1/31
	0	>10,000	1.0	-
<i>P. エルギノーサ (P. aeruginosa)</i>	2	0	1.0	-
実験2	1	4	0.50	1/4
	1	10	0.50	1/10
	0	>10,000	1.0	-
<i>E・クロアカ (E. cloacae)</i>	0.6	0	1.0	-
実験2	0.5	1	0.83	1/2
	0.5	2	0.83	1/4
	0.5	6	0.83	1/6
	0	>10,000	1.0	-
<i>K. ニューモニエ (K. pneumoniae)</i>	1	0	1.0	-
実験2	0.8	2	0.8	1/2.5
	0.8	4	0.8	1/5
	0	>10,000	1.0	-

20

30

40

[表]

Surf. B および CMIT/MIT 殺生物剤による相乗作用

微生物	Q _a ppm CMIT/MIT	Q _b ppm Surf. B	相乗指数 値	相乗作用値 比 (CMIT/MIT:Surf. B)
<i>P. エルギノーサ</i> (<i>P. aeruginosa</i>) 実験1	2	0	1.0	-
	2	>10,000	1.0	相乗作用なし
	0	>10,000	1.0	-
<i>E. クロアカ</i> (<i>E. cloacae</i>) 実験1	3	0	1.0	-
	2	4	0.67	1/2
	2	2	0.67	1/1
	2	1	0.67	1/0.5
<i>K. ニューモニエ</i> (<i>K. pneumoniae</i>) 実験1	2	0	1.0	-
	1	6	0.5	1/6
	1	8	0.5	1/8
	1	10	0.5	1/10
	0	>10,000	1.0	-

【0046】

CMIT/MIT 殺生物剤 + 界面活性剤によるバイオフィルム制御研究

【0047】

材料および方法

モデルバイオフィルム系を使用して、CMIT/MIT 殺生物剤および界面活性剤処理（単独または併用）の、定着したバイオフィルムの根絶に関する有効性を評価した。この系は、1%のトリプチケースソイプロスを含むリン酸緩衝生理食塩水（100ml）中でスライドガラス上においてバイオフィルムを成長させることを伴った。3種の細菌（シードモナス・エルギノーサ（*Pseudomonas aeruginosa*）ATTC C15442、エンテロバクター・クロアカ（*Enterobacter cloacae*）ATCC 13047およびクレブシラ・ニューモニエ（*Klebsiella pneumoniae*）ATCC 10031）の混合物を、バイオフィルム試料のための接種材料として使用した。攪拌しながら（150-200 rpm）30において24-48時間インキュベーション後、事前成長バイオフィルムのスライドをリン酸緩衝生理食塩水ですすぎ、合成冷却水（584mg/l CaCl₂ - 2H₂O）、203mg/l MgCl₂ - 6H₂O）、84mg/l NaHCO₃、5mg/l アクリレートポリマーおよび0.1% トリプチケースソイプロス）を含有する殺生物剤処理接触溶液に移した。所定の接触時間（4-24時間）後、バイオフィルムをすすぎ、搔き取り、生存細菌の生菌数を、平板生菌数測定法またはMPNによりトリプチケースソイプロス（TSB）培地を使用して決定した。

【0048】

データを下記に提供して、細菌汚染を制御するための界面活性剤の存在下におけるCMIT/MIT 殺生物剤による相加的有効性を実証した。界面活性剤単独の添加により、高濃度であってもバイオフィルム制御は示されなかった。したがって、界面活性剤は、表面における細菌汚染の制御において、CMIT/MITとの相乗効果を実証した。概して、制御または別の処理に対する少なくとも0.5log単位のlog減少の増加が、測定可能な改善の証拠である。

【0049】

CDC Biofilm Reactor 研究に関して、CDC Biofilm Reactorを、下記を例外としてASTM E2562-07の手順に従って使用した：

1. *P. エルギノーサ* (*P. aeruginosa*) から変更した細菌種は、レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) ATCC BAA

10

20

30

40

50

74、レジオネラ (Legionella) 宿主生物のアカントアーベ・ポリファーガ (Acanthamoeba polyphaga) ATCC30461 および未定義の環境細菌生物を含む。環境生物およびレジオネラ (Legionella) は、細胞懸濁液に由来する

2. バッチ相 (流動のないインキュベーション) を、過去の 24 時間から 5 日間に延長して、レジオネラ (Legionella) の遅い成長速度を支持した。

3. 冷却塔環境に関連する条件を反映するために、培地を合成冷却水に変更し、培地の流速を遅くして、レジオネラ (Legionella) の遅い成長速度を反映させた。

4. 処理プロトコルは、標的殺生物剤が、初期投薬後に加えられた現実的な維持投薬により、クーポンに付着した生存バイオフィルムにどのように影響を与えるかを検出するために、BCDMH - ハロゲン化水 (0.6 ppm の利用可能な塩素) によりフラッシュする、24 時間の事後処理を加えることさらに含んだ。

5. サンプリングを変更して、プレサンプリングのすすぎステップを取り除き、ステップ 10.3.4 - 10.4.2 を取り除き、激しいボルテックス混合ステップに置き換えて、被験クーポンからバイオフィルムを取り外した。レジオネラ (Legionella) 生菌数は二連にブレーティングしなかった。

【実施例 6】

【0050】

CMIT/MIT 殺生物剤 (1.5 ppm 有効成分; a.i.) 単独により、未処理対照と比較して細菌生物汚染の制御に関して、2.310g 減少が 4 時間ににおいて示され、0.710g 減少が 24 時間ににおいて示された。15 ppm 有効成分で単独で試験された Surf. A、B および C により、未処理の対照と比較して、表面の細菌汚染の減少は示されなかった。CMIT/MIT と、Surf. A、B または C (1:10 wt% 比) との併用はすべて、CMIT/MIT 処理単独と比較して細菌バイオフィルム制御の改善を示した。したがって、これらの界面活性剤は、単独で試験した場合には制御を示さなかつたが、CMIT/MIT 殺生物剤による細菌バイオフィルム成長の制御を改善した。

[表]

10

20

処理	試料接触時間	バイオフィルムのLog成長細胞/cm ²	Log減少 vs 未処理対照
未処理対照	4時間	6.2	0.0
	24時間	6.8	0.0
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT	4時間	4.0	2.3
	24時間	5.1	1.7
15 ppm a.i. Surf. C	4時間	6.4	-0.2
	24時間	6.6	0.2
15 ppm a.i. Surf. B	4時間	7.5	-1.3
	24時間	6.5	0.3
15 ppm a.i. Surf. A	4時間	6.3	-0.1
	24時間	6.8	0.0
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT および 15 ppm a.i. Surf. C	4時間	2.8	3.4
	24時間	4.5	2.2
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT および 15 ppm a.i. Surf. B	4時間	3.0	3.3
	24時間	4.4	2.4
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT および 15 ppm a.i. Surf. A	4時間	3.6	2.6
	24時間	4.4	2.4

【実施例 7】

30

【0051】

CMIT/MIT殺生物剤 (1.5 ppm 有効成分; a.i.) 単独により、未処理対照と比較して細菌生物汚染の制御に関して、210g 減少が4時間において示され、2210g 減少が24時間において示された。

【0052】

1.5 ppm の CMIT/MIT と、5 ppm の Surf. B または Surf. A (1:3.3 wt% 比) との併用はすべて、CMIT/MIT 处理単独と比較して細菌バイオフィルム制御の改善を示した。

【0053】

この試験において、Surf. C は、CMIT/MIT と一緒に細菌制御の改善を示さなかったが、Surf. A は、24時間処理されたバイオフィルム試料において生存細菌を示さなかった。したがって、Surf. A および Surf. B は、CMIT/MIT 殺生物剤による細菌バイオフィルム成長の制御を改善した。

[表]

40

処理	試料接觸時間	バイオフィルムのLog成長細胞/cm ²	Log 減少 vs 未処理対照
未処理対照	4時間	6.4	0.0
	24時間	6.9	0.0
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT	4時間	5.2	1.2
	24時間	4.7	2.2
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT + 5 ppm ai. Surf. C	4時間	4.9	1.4
	24時間	4.5	2.4
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT + 5 ppm ai. Surf. B	4時間	3.6	2.8
	24時間	4.0	2.9
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT + 5 ppm ai. Surf. A	4時間	3.7	2.7
	24時間	1.8*	≥5.1

*検出限界=生存細胞は回収されなかった

【実施例8】

【0054】

CMIT/MIT殺生物剤(1.5 ppm有効成分; a.i.)単独により、未処理対照と比較して細菌生物汚染の制御に関して、2.3log減少が4時間において示され、2.5log減少が24時間において示された。

【0055】

Surf. A(5 ppm有効成分)とCMIT/MIT(1.5 ppm)(殺生物剤:界面活性剤1:3.3wt%比)とは、CMIT/MIT処理単独と比較して細菌バイオフィルム制御の改善を示した。

[表]

処理	試料接觸時間	バイオフィルムのLog成長細胞/cm ²	Log 減少 vs 未処理対照
未処理対照	4時間	4.5	0.0
	24時間	5.3	0.0
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT	4時間	2.2	2.3
	24時間	2.8	2.5
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT + 5 ppm ai. Surf. A	4時間	1.5	3.0
	24時間	2.1	3.2

*検出限界=生存細胞は回収されなかった

【実施例9】

【0056】

1.5 ppmおよび3 ppmの有効成分のCMIT/MIT殺生物剤単独により、未処理対照と比較して、4~24時間後の細菌バイオフィルム成長の1.4から2.3の1log減少が示された。CMIT/MITとSurf. A(1:3.3wt%比)との併用により、24時間の接觸後のCMIT/MIT処理単独と比較して、細菌バイオフィルム制御の改善が示された。50 ppmの有効成分Surf. Aだけでは細菌制御は見られなかった。したがって、この界面活性剤は、単独で試験した場合には制御を示さなかつた。したがって、この界面活性剤は、単独で試験した場合には制御を示さなかつたが、CMIT/MIT殺生物剤(この殺生物剤に関する正常な用量範囲内で)による細菌バイ

10

20

30

40

50

オフィルム成長の制御を改善した。

[表]

処理	試料接触時間	バイオフィルムのLog成長 細胞/cm ²	Log 減少 vs 未処理対照
未処理対照	4 時間	6.6	0.0
	24 時間	6.9	0.0
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT	4 時間	4.5	2.0
	24 時間	5.5	1.4
3 ppm ai CMIT/MIT	4 時間	5.1	1.5
	24 時間	4.7	2.3
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT + 5 ppm ai. Surf. A	4 時間	5.2	1.4
	24 時間	4.5	2.4
3 ppm a.i. CMIT/MIT + 10 ppm ai. Surf. A	4 時間	5.4	1.1
	24 時間	2.9	4.0
50 ppm Surf. A	4 時間	7.4	-0.9
	24 時間	6.8	0.2

10

20

【実施例10】

【0057】

処理を、CDC Biofilm Reactorにおいて、上記の材料および方法に記載のように、レジオネラ (Legionella) 細菌を含む混合環境試料に対して評価した。

[表]

処理	試料接触時間	レジオネラ (Legionella) バイオフィルムのLog成長 細胞/cm ²	レジオネラ (Legionella) Log 減少 vs 未処理対照
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT	0時間	2.72	0
	24時間	2.66	0.06
	72時間	2.57	0.15
	96時間	0	2.27
1.5 ppm a.i. CMIT/MIT + 5 ppm ai. Surf. A	7日	0	2.72
	0時間	2.81	0
	24時間	1.6	1.21
	72時間	1.6	1.21
	96時間	0	2.81
	7日	2.2	0.61

30

40

【実施例11】

【0058】

界面活性剤：低CMIT/MIT比の評価

一連の試料を、4種の異なる界面活性剤 (TERGITOL L-61、TERGITOL L-64、Surfactant BおよびSurfactant A)により、それぞれ製剤の3%または1.5%で調製した。各製剤は、およそ11%のKATHON (商標) CF1400殺生物剤を、最終有効成分濃度1.5%のCMIT/MITに対し

50

て含有した。製剤の残りは脱イオン水であった。対照試料を、界面活性剤の代わりに水を加えることによって作製した。不安定化対照を、KATHON(商標)WTから作製し、不安定化対照は他の製剤を安定化したヨウ素酸塩のいずれも含有しなかった。

【0059】

各試料を、KATHON(商標)CF1400(CMITおよびMIT)中の有効成分のレベルに関して、ゼロ時およびその後4週間の間毎週分析した。合計有効成分レベルは、CMITおよびMITの濃度の合計である。試料を、高圧液体クロマトグラフィー(HPLC)により分析した。

【0060】

試料を調製し、ゼロ時におけるCMITおよびMITレベルに関して分析し、すべての試料が正確に投与されたことを確保した。分析後、試料を3つのバイアル、1つは25における加熱老化用、1つは40における加熱老化用および1つは55における加熱老化用に分けた。

【表1】

表1. ゼロ時のCMIT/MITおよび界面活性剤試料に関する有効成分分析

試料	CMIT	MIT	合計AI	AI 比	Mg(NO ₃) ₂
CMIT/MIT(安定剤なし)	1.137	0.376	1.51	75.2	2.3
CMIT/MIT(安定剤含有)	1.195	0.394	1.59	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.150	0.379	1.53	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.120	0.369	1.49	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.151	0.379	1.53	75.2	2.3
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.146	0.377	1.52	75.3	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	1.201	0.395	1.60	75.3	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	1.190	0.392	1.58	75.2	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.144	0.376	1.52	75.3	2.3
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.146	0.378	1.52	75.2	2.3

その後、試料を4週間の間毎週分析し、熱老化後の安定性を決定した。

【表2】

表2. 1週間の熱老化後のCMIT/MITおよび界面活性剤試料に関する有効成分分析

温度(℃)	試料	CMIT	MIT	合計AI	AI比	Mg(NO ₃) ₂
25	CMIT/MIT (安定剤なし)	1.145	0.378	1.52	75.2	2.3
25	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.204	0.399	1.60	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.167	0.387	1.55	75.1	2.3
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.135	0.375	1.51	75.2	2.3
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.175	0.388	1.56	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.184	0.392	1.58	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.159	0.384	1.54	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.152	0.381	1.53	75.1	2.3
40	CMIT/MIT (安定剤なし)	1.092	0.376	1.47	74.4	2.3
40	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.174	0.389	1.56	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.174	0.388	1.56	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.126	0.373	1.50	75.1	2.3
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.202	0.399	1.60	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.151	0.380	1.53	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.159	0.384	1.54	75.1	2.3
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.194	0.395	1.59	75.1	2.5
55	CMIT/MIT (安定剤なし)	0.928	0.373	1.30	71.3	2.3
55	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.191	0.396	1.59	75.1	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.156	0.383	1.54	75.1	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.238	0.411	1.65	75.1	2.5
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-61-1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-61-3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-64-1.5%	1.181	0.392	1.57	75.1	2.4
55	CMIT/MIT+TERGITOL L-64-3.0%	1.160	0.385	1.55	75.1	2.4

10

20

30

TERGITOL L-61を含有する試料は、1週間の熱老化後に混濁した。55において1週間熱老化されたSurf. Bを含有する試料もまた、混濁した。

【表3】

表3. 2週間の熱老化後のCMIT/MITおよび界面活性剤試料に関する有効成分分析

温度(°C)	試料	CMIT	MIT	合計AI	AI比	Mg(NO ₃) ₂
25	CMIT/MIT (安定剤なし)	1.155	0.382	1.54	75.2	N/A
25	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.225	0.405	1.63	75.2	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.198	0.396	1.59	75.1	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.186	0.392	1.58	75.2	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.183	0.391	1.57	75.1	N/A
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.233	0.408	1.64	75.1	N/A
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.208	0.399	1.61	75.2	N/A
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.176	0.389	1.57	75.2	N/A
40	CMIT/MIT (安定剤なし)	1.000	0.381	1.38	72.4	N/A
40	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.222	0.404	1.63	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.205	0.400	1.60	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.191	0.393	1.58	75.2	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.215	0.402	1.62	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.182	0.390	1.57	75.2	N/A
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.173	0.388	1.56	75.1	N/A
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.242	0.410	1.65	75.2	N/A
55	CMIT/MIT (安定剤なし)	0.708	0.382	1.09	64.9	N/A
55	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.237	0.409	1.65	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.243	0.413	1.66	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.278	0.424	1.70	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.244	0.413	1.66	75.1	N/A
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.208	0.400	1.61	75.1	N/A

10

20

30

2週間の時点のプロードなピークのため、Mg(NO₃)₂ のレベルは分析できなかった。

【表4】

表4. 3週間の熱老化後のCMIT/MITおよび界面活性剤試料に関する有効成分分析

温度(℃)	試料	CMIT	MIT	合計AI	AI比	Mg(NO ₃) ₂
25	CMIT/MIT (安定剤なし)	1.155	0.383	1.54	75.1	2.4
25	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.231	0.409	1.64	75.1	2.5
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.188	0.394	1.58	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.153	0.382	1.54	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.200	0.397	1.60	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.199	0.399	1.60	75.1	2.5
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.182	0.392	1.57	75.1	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.177	0.392	1.57	75.0	2.4
40	CMIT/MIT (安定剤なし)	0.804	0.374	1.18	68.2	2.3
40	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.203	0.397	1.60	75.2	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.207	0.402	1.61	75.0	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.166	0.386	1.55	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.235	0.411	1.65	75.0	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.159	0.384	1.54	75.1	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.206	0.401	1.61	75.0	2.5
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.247	0.413	1.66	75.1	2.6
55	CMIT/MIT (安定剤なし)	0.413	0.333	0.75	55.4	2.2
55	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.228	0.405	1.63	75.2	2.5
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.174	0.392	1.57	75.0	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.268	0.424	1.69	75.0	2.7
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.199	0.398	1.60	75.1	2.5
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.169	0.386	1.56	75.2	2.5

10

20

30

【表5】

表5. 4週間の熱老化後のC M I T / M I T および界面活性剤試料に関する有効成分分析

温度(℃)	試料	CMIT	MIT	合計A/I	AI比	Mg(NO ₃) ₂
25	CMIT/MIT (安定剤なし)	1.167	0.385	1.55	75.2	2.3
25	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.263	0.415	1.68	75.3	2.5
25	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.180	0.390	1.57	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.155	0.382	1.54	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.199	0.396	1.59	75.2	2.4
25	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.207	0.400	1.61	75.1	2.5
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.202	0.395	1.60	75.3	2.4
25	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.173	0.389	1.56	75.1	2.4
40	CMIT/MIT (安定剤なし)	0.710	0.374	1.08	65.5	2.3
40	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.198	0.394	1.59	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	1.202	0.397	1.60	75.2	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	1.170	0.386	1.56	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.236	0.409	1.65	75.1	2.5
40	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.159	0.381	1.54	75.3	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.191	0.392	1.58	75.2	2.4
40	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.221	0.402	1.62	75.2	2.5
55	CMIT/MIT (安定剤なし)	0.291	0.313	0.60	48.2	2.2
55	CMIT/MIT (安定剤含有)	1.204	0.398	1.60	75.2	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	1.185	0.392	1.58	75.2	2.4
55	CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	1.251	0.414	1.66	75.2	2.7
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	混濁				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	混濁				
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	1.201	0.398	1.60	75.1	2.5
55	CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	1.157	0.382	1.54	75.2	2.5

4週間の熱老化後、混濁しなかったすべての試料は、不安定化C M I T / M I T 試料を除き極めて安定なままであった。

10

20

30

【表 6】

表 6. C M I T / M I T および界面活性剤ブレンドのそれぞれの中に、熱老化後残留する合計有効成分のパーセント

試料	温度(℃)	残留パーセント					
		t = 0	t = 1週	t = 2週	t = 3週	t = 4週	
CMIT/MIT (安定剤なし)	25	100	101	102	102	103	
CMIT/MIT (安定剤含有)	25	100	101	108	103	106	
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	25	100	102	105	104	103	
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	25	100	101	104	103	103	
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	25	100	102	104	104	104	
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	25	100	104	108	105	106	
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	25	混濁					
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	25	混濁					
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	25	100	102	106	104	105	
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	25	100	101	103	103	103	
CMIT/MIT (安定剤なし)	40	100	97	91	78	72	
CMIT/MIT (安定剤含有)	40	100	98	107	101	100	
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	40	100	102	106	105	105	
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	40	100	101	105	104	104	
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	40	100	105	107	108	108	
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	40	100	101	104	101	101	
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	40	混濁					
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	40	混濁					
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	40	100	102	103	106	104	
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	40	100	104	109	109	107	
CMIT/MIT (安定剤なし)	55	100	86	72	49	40	
CMIT/MIT (安定剤含有)	55	100	100	109	103	101	
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	55	100	混濁				
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	55	100	混濁				
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	55	100	101	109	102	103	
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	55	100	108	113	111	109	
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	55	混濁					
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	55	混濁					
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	55	100	103	110	105	105	
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	55	100	101	106	102	101	

残留パーセントの値のいくつかは、試料に関して記録された初期の値より高い。これは、熱老化中にいくらかの水が蒸発したためと思われる。試料の安定性のより正確な図を提供するために、合計有効成分の値を、C M I T および M I T の出発濃度に対して正規化する前に、M g (N O₃)₂ 濃度に対して正規化した。表 7 はこれらの結果を記載している。

【表7】

表7. 热老化工程の間の蒸発を考慮に入れるためにMg (NO₃)₂に対して正規化した後の、各試料中に残留する有効成分のパーセント

試料	温度 (°C)	残留パーセント			
		t = 0	t = 1 週	t = 3 週	t = 4 週
CMIT/MIT (安定剤なし)	25	100	101	99	100
CMIT/MIT (安定剤含有)	25	100	96	94	95
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	25	100	99	98	99
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	25	100	102	100	100
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	25	100	97	98	99
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	25	100	99	98	98
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	25	混濁			
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	25	混濁			
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	25	100	99	98	99
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	25	100	99	97	99
CMIT/MIT (安定剤なし)	40	100	97	77	71
CMIT/MIT (安定剤含有)	40	100	95	92	95
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	40	100	99	97	98
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	40	100	100	98	100
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	40	100	98	98	99
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	40	100	96	98	98
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	40	混濁			
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	40	混濁			
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	40	100	99	93	94
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	40	100	97	93	93
CMIT/MIT (安定剤なし)	55	100	85	51	42
CMIT/MIT (安定剤含有)	55	100	94	94	95
CMIT/MIT + Surf. B- 1.5%	55	100	混濁		
CMIT/MIT + Surf. B- 3.0%	55	100	混濁		
CMIT/MIT + Surf. A- 1.5%	55	100	97	97	97
CMIT/MIT + Surf. A- 3.0%	55	100	98	93	94
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 1.5%	55	混濁			
CMIT/MIT + TERGITOL L-61- 3.0%	55	混濁			
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 1.5%	55	100	98	96	94
CMIT/MIT + TERGITOL L-64- 3.0%	55	100	98	95	94

10

20

30

透明なままであった試料のすべてが、不安定化CMIT/MIT試料を除いて、55において1ヵ月間安定であった。Mg (NO₃)₂レベルがt = 2週で正確に計算されなかったので、残留パーセントをその時点に関しては計算しなかった。

【実施例12】

【0061】

1:1 CMIT/MIT：界面活性剤の併用の有効性

【0062】

培地

トリプチケースソイプロス寒天 (T S B A)

30gのトリプチケースソイプロス (Difco) および15gの寒天 (Difco) を2リットルのフラスコに量る。

1000mlの脱イオン水を加える。

121において20分間オートクレーブ処理する。

25mlのT S B Aを滅菌プレート (VWR) に注ぐ。

【0063】

ポテトデキストロースプロス (P D B)

24gのポテトデキストロースプロス (Difco) を2リットルのフラスコに量る

。

40

50

1000mlの脱イオン水を加える。

完全に混合して、1分間沸騰させる。

121において20分間オートクレーブ処理する。

【0064】

サブローデキストロース寒天（S D A）

195gのサブローデキストロース寒天（D i f c o）を2リットルのフラスコに量る。

1000mlの脱イオン水を加える。

完全に混合して、1分間沸騰させる。

121において20分間オートクレーブ処理する。

10

ウォーターバスにおいて冷却し、100μlのゲンタマイシン（gentomycin）（Sigma）および100μlのストレプトマイシン（Sigma）を培地に加える。

25mlのS D Aを滅菌プレート（V W R）に注ぐ。

【0065】

トリプチケースソイプロス（T S B）

30gのトリプチケースソイプロス（D i f c o）を2リットルのフラスコに量る。

1000mlの脱イオン水を加える。

121において20分間オートクレーブ処理する。

【0066】

A l g a - G r o C o n c e n t r a t e d M e d i u m

0.3gの寒天（D i f c o）を100mlのフラスコに量る。

60mlの脱イオン水を加える。

121において20分間オートクレーブ処理する。

20

放冷する。

A l g a - G r o C o n c e n t r a t e d M e d i u m (C a r o l i n a B i o l o g i c a l S u p p l y) を加える。

【0067】

方法

高分解能最小発育阻止濃度評価

30

【0068】

微生物

下記の被験微生物は、米国培養細胞系統保存機関（A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o n ）（A T C C ; M a n a s s a s , V A , U S A ）から入手した。

[表]

<u>菌株</u>	<u>起源</u>	
シュードモナス・エルギノーサ（ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ）	ATCC 15442	40
黄色ブドウ球菌（ <i>Staphylococcus aureus</i> ）	ATCC 6538	
カンジダ・アルビカンス（ <i>Candida albicans</i> ）	ATCC 2091	
サッカロマイセス・セレビシエ（ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ）	ATCC 18824	
クロレラ属（ <i>Chlorella sp.</i> ）	ATCC 30582/ UTEX 26	

【0069】

培養管理

50

細菌を、T S B Aで30において48時間成長させた。真菌は、S D Aで25において48時間成長させた。各プレートを、およそ5mLのリン酸緩衝液、pH7.2で洗浄した。培養懸濁液を、等体積の滅菌50%グリセロールと混合した。得られた懸濁液を1mLずつ2mLのクライオバイアルに分注し、-70において保存した。微生物を、凍結したクライオバイアルから試験前に回収した。細菌を、T S B Aで30において48時間成長させた。真菌は、S D Aで30において48時間成長させた。

【0070】

藻類を成長させ、液体培養培地 (B o l d 3 N 培地) において管理した。藻類を回収し、600gにおいて6分間遠心分離し、培養培地に再懸濁した。藻類種を混合し、100µLを殺生物剤含有寒天プレートの上に置いた。プレートを、恒温下で30において10インキュベートした。

【0071】

藻類用培地の調製のために、20gのB a c t o a g a r を980mLのd H₂Oに加え、121において30分間オートクレーブ滅菌し、50のウォーターバスに配置し、その後20mLのB o l d 3 N (50×ストック)を各リットルに加えた。寒天の一部を無菌的に (a s p e c t i c a l l y) に滅菌フラスコに移し、そこに所望の量の殺生物剤を加え、その後寒天をペトリ皿に注いだ。ペトリ皿を殺生物剤を含有する約20mLの最終藻類用培地で満たした。

[表]

使用した機器および設備

20

機器/設備	銘柄/モデル
化学天秤	Sartorius
インキュベーター	Lab-Line Instruments, Inc.
オートクレーブ	Amsco
UV/VIS分光計	Spectronic 20 GENESYS

細菌および真菌を阻害するために必要な殺菌剤の最も低い濃度を、高分解能最小発育阻止濃度 (H R M I C) 試験により決定した。さまざまな量の各殺菌剤を96ウェルプレート中の培地に加えた。H R M I C 試験に使用した培地は、細菌にはトリプチケースソイブロス (T S B) および真菌にはポテトデキストロースプロス (P D B) であった。定常期の細菌を、一晩30において、回転振とうインキュベーター (125往復/分) においてT S B 中で成長させた。真菌のリン酸緩衝懸濁液を調製し、P D Bで希釈した。一晩培養液を、OD値0.40に対して較正し、約1.0×10⁸ c f u /mLの出発細菌懸濁液を確保した。適切な希釈を、適切な試験培地で実施し、試験に植え付け、細菌に関してはおよそ10⁶ C F U /mLを各ウェルに、または真菌に関しては10⁵ C F U /mLを各ウェルに提供した。三連の細胞懸濁液を、すべての生物に関して調製した。マイクロタイタプレートを、細菌に関しては30において24時間、および真菌に関しては25

30

において7日間インキュベートし、その後、各ウェルの濁度を観察することによって微生物の成長の有無をチェックした。藻類は、液体培養培地 (B o l d 3 N 培地) において成長させ、管理した。藻類を回収し、600gにおいて6分間遠心分離し、培養培地に再懸濁した。藻類種を混合し、100µLを殺生物剤含有寒天プレートに置いた。プレートを、恒温下で30においてインキュベートした。インキュベート後、殺生物剤含有寒天プレート上の成長の存在を視覚的にチェックし、対照プレートに対して比較した。成長を示さなかった第1のマイクロタイタウェル中の化合物濃度が、殺菌剤に関する最小発育阻止濃度 (M I C) であった。高分解能M I C 試験は、エンドポイントの間隔が狭く、被験化合物の間のより大きな差別化が可能なので、通常の2倍M I C 試験より正確である。各殺菌剤に関するM I C 値を、細菌、真菌および藻類それぞれに関する3種の異なる接

40

50

種材料試験の、各接種材料を3連に試験した平均から決定した。

[表]

HRMIC試験におけるCMIT/MITの濃度 (ppm有効成分)

1.5% CMIT/MIT				1.5% CMIT/MIT + Surf. A			
1	2	3	4	5	6	7	8
15.0	1.50	0.150	0.015	15+15	1.50+1.5 0	0.15+0.15	0.015+0.015
12.0	1.20	0.120	0.012	12+12	1.20+1.2 0	0.12+0.12	0.012+0.012
9.0	0.90	0.090	0.009	9+9	0.90+0.9 0	0.09+0.09	0.009+0.009
7.5	0.75	0.075	0.0075	7.5+7.5	0.75+0.7 5	0.075+0.07 5	0.0075+0.007 5
6.0	0.60	0.060	0.0060	6+6	0.60+0.6 0	0.06+0.06	0.006+0.006
4.5	0.45	0.045	0.0045	5	4.5+4.5 5	0.045+0.04 5	0.0045+0.004 5
3.0	0.30	0.030	0.0030	3+3	0.30+0.3 0	0.03+0.03	0.003+0.003
0.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.000

【0072】

緑藻類系統のMIC試験を、Bold 3N培地を含有する寒天ペトリ皿を使用して実施した。この培地は、藻類の成長を最もよく支援するので選択した。CMIT/MIT 1.5%殺菌剤およびCMIT/MITのブレンド、1.5%+Surf. A (「1:1混合物」)を、寒天培地に加え、0.75、1.5、3.0、6.0および12.0ppmの有効成分を提供した。

【0073】

藻類接種材料を、藻類を回収し、600gにおいて6分間遠心分離し、培養培地に再懸濁することによって調製した。100μL量の各週齢の藻類培養液を、さまざまな濃度の殺生物剤を含有する寒天プレートの表面に画線し、照明付きインキュベーターで30においてインキュベートした。30において7日間のインキュベーション後、寒天表面で藻類の成長（目で見て緑色の外観）を阻害した殺生物剤の最も低い濃度を、MICと見なした。試料は、二連で試験した。

【0074】

1.5%CMIT/MIT+1.5%Surf. A (「1:1混合物」)の抗菌活性

1:1混合物および1.5%CMIT/MITのMIC値を、細菌混合物（実験1、2および3）または真菌（4、5および6）に対して、前記のように高分解能MIC法を使用してTSBまたはPDB中で決定した。1:1混合物および1.5%CMIT/MITのMIC値を、藻類に対して、前記のように寒天プレートMIC法を使用してBacto agarにおいて決定した。結果は、1:1混合物および1.5%CMIT/MITが、低レベルで微生物の成長を阻害する、高度に有効な殺菌剤であることを示している。さらに、1:1混合物のMICは、1.5%CMIT/MITのMICと同様である。MIC研究において、ppm a.iは、試験条件で存在するCMIT/MITの量を指す。

[表]

10

20

30

40

実験 1 : 1 : 1 混合物および 1. 5% CMIT/MIT の、細菌に対する MIC

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)
シュードモナス・エルギノーサ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (ATCC 15442) および 黄色ブドウ球菌 (スタフィロコッカス・アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>)) (ATCC 6538)	0.3	0	3	0

10

[表]

実験 2 : 1 : 1 混合物および 1. 5% CMIT/MIT の、細菌に対する MIC

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)
シュードモナス・エルギノーサ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (ATCC 15442) および 黄色ブドウ球菌 (スタフィロコッカス・アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>)) (ATCC 6538)	0.3	0	4	0.87

20

[表]

実験 3 : 1 : 1 混合物および 1. 5% CMIT/MIT の、細菌に対する MIC

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)
シュードモナス・エルギノーサ (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) (ATCC 15442) および 黄色ブドウ球菌 (スタフィロコッカス・アウレウス (<i>Staphylococcus aureus</i>)) (ATCC 6538)	0.3	0	3.5	0.87

30

[表]

実験 1 : 1 : 1 混合物および 1. 5% CMIT/MIT の、真菌に対する MIC

微生物	1:1 混合物		1.5% CMIT/MIT	
	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)	MIC (ppm a.i.)	SD (+/-)
カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>) (ATCC 2091) および サッカロマイセス・セレビシエ (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) (ATCC 18824)	0.06	0	0.45	0

40

[表]

実験 2 : 1 : 1 混合物および 1. 5 % CMIT/MIT の、真菌に対する MIC

微生物	1:1 混合物			1.5% CMIT/MIT		
	MIC (ppm a.i)	SD (+/-))	MIC (ppm a.i)	SD (+/-))
カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>) (ATCC 2091) およびサ ッカロマイセス・セレビ シエ (<i>Saccharomyces ce revisiae</i>) (ATCC 1882 4)	0.045	0		3	0	

10

[表]

実験 3 : 1 : 1 混合物および 1. 5 % CMIT/MIT の、真菌に対する MIC

微生物	1:1 混合物			1.5% CMIT/MIT		
	MIC (ppm a.i)	SD (+/-))	MIC (ppm a.i)	SD (+/-))
カンジダ・アルビカンス (<i>Candida albicans</i>) (ATCC 2091) およびサ ッカロマイセス・セレビ シエ (<i>Saccharomyces ce revisiae</i>) (ATCC 1882 4)	0.06	0		0.65	0.087	

20

[表]

1 : 1 混合物および 1. 5 % CMIT/MIT の、藻類 (クロレラ・ブルガリス (*Ch
lorrella vuggariss*) (ATCC 30582)) に対する MIC

殺菌剤濃度 (ppm 有効成 分)	成長観察の再現					
	再現 1		再現 2		再現 3	
	CMIT/M IT	1:1 混合 物	CMIT/MIT	1:1 混合物	CMIT/M IT	1:1 混合 物
0 (対照)	+	+	+	+	+	+
0.75	-	-	-	-	-	-
1.5	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-

すべての再現において成長が無いものに対して決定された MIC 値

30

フロントページの続き

(51)Int.CI.		F I		
A 0 1 P	13/00	(2006.01)	A 0 1 P	13/00
C 0 2 F	1/50	(2006.01)	C 0 2 F	1/50
A 6 1 L	9/01	(2006.01)	C 0 2 F	1/50
A 6 1 K	8/49	(2006.01)	C 0 2 F	1/50
A 6 1 K	8/86	(2006.01)	C 0 2 F	1/50
A 6 1 K	8/39	(2006.01)	C 0 2 F	1/50
A 6 1 Q	19/10	(2006.01)	C 0 2 F	1/50
A 6 1 Q	5/02	(2006.01)	A 6 1 L	9/01
			A 6 1 L	9/01
			A 6 1 K	8/49
			A 6 1 K	8/86
			A 6 1 K	8/39
			A 6 1 Q	19/10
			A 6 1 Q	5/02

(74)代理人 110000589

特許業務法人センダ国際特許事務所

(72)発明者 ウシャ・ガンジー

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19040 ハットボロ セリル・ドライブ 509

(72)発明者 クリストイン・マキニス

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19422 ブルー・ベル メドウ・ドライブ 1109

(72)発明者 ポール・オー・スクーク

アメリカ合衆国 イリノイ州 60047 レイク・チューリッヒ エディ・レーン 1409

(72)発明者 クリストイン・エム・シュルツ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19044 ホーシャム グリーン・メドウ・レーン 30
4

(72)発明者 テリー・ミカエル・ウィリアムズ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19002 ローワー・グワイニッド ミーティングハウス
・ロード 1340

審査官 水島 英一郎

(56)参考文献 特開2008-037828(JP,A)

特開平01-175905(JP,A)

特開平02-304005(JP,A)

特開2000-191409(JP,A)

特開2012-072110(JP,A)

(58)調査した分野(Int.CI., DB名)

A 0 1 N

A 0 1 P