

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5912678号
(P5912678)

(45) 発行日 平成28年4月27日 (2016. 4. 27)

(24) 登録日 平成28年4月8日 (2016. 4. 8)

(51) Int. Cl.		F I
C 1 1 D	1/04	(2006. 01)
C 1 1 D	3/33	(2006. 01)
C 1 1 D	3/36	(2006. 01)
A 6 1 K	47/46	(2006. 01)
A 6 1 K	47/04	(2006. 01)

請求項の数 10 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-50237 (P2012-50237)
 (22) 出願日 平成24年3月7日 (2012. 3. 7)
 (65) 公開番号 特開2013-185036 (P2013-185036A)
 (43) 公開日 平成25年9月19日 (2013. 9. 19)
 審査請求日 平成26年12月8日 (2014. 12. 8)

(73) 特許権者 000000918
 花王株式会社
 東京都中央区日本橋茅場町1丁目14番1
 〇号
 (74) 代理人 100087642
 弁理士 古谷 聡
 (74) 代理人 100076680
 弁理士 溝部 孝彦
 (74) 代理人 100098408
 弁理士 義経 和昌
 (72) 発明者 浅岡 健太郎
 和歌山県和歌山市湊1334 花王株式
 社研究所内

審査官 古妻 泰一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオフィルム除去剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

界面活性剤〔以下、(a)成分という〕を0.1~30質量%、水を60質量%以上、及び多価金属イオン捕捉剤〔以下、(b)成分という〕を含有し、

(a)成分中の炭素数16~18の不飽和脂肪酸アルカリ金属塩〔以下、(a1)成分という〕の割合が60~100質量%であり、

(a)成分として炭素数16~18の不飽和脂肪酸カリウム塩〔以下、(a1-1)成分という〕を含有し、

(b)成分が、ニトリロ三酢酸、エチレンジアミン四酢酸、ジエチレントリアミン五酢酸、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸、ヒドロキシエチリデンジホスホン酸、アミノトリメチレンホスホン酸、又はそれらの塩から選ばれる一種又は二種以上であり、

除去剤中の陽イオン(ただし水素イオンを除く)の総量中のカリウムイオンの割合が50~100質量%であり、

pH(25)が8~11である、

バイオフィルム除去剤。

【請求項2】

(a)成分を0.1~15質量%、水を80質量%以上、を含有する、請求項1記載のバイオフィルム除去剤。

【請求項3】

(a1)成分と水の合計含有量が95~99.9質量%である、請求項1記載のバイオ

フィルム除去剤。

【請求項 4】

バイオフィルム除去剤中の (a 1) 成分の含有量が 0 . 1 ~ 5 0 質量%である、請求項 1 ~ 3 何れか 1 項記載のバイオフィルム除去剤。

【請求項 5】

バイオフィルムが黄色ブドウ球菌に由来するバイオフィルムである、請求項 1 ~ 4 何れか 1 項記載のバイオフィルム除去剤。

【請求項 6】

皮膚に形成されたバイオフィルムの除去に用いる、請求項 1 ~ 5 何れか 1 項記載のバイオフィルム除去剤。

【請求項 7】

硬質表面に形成されたバイオフィルムの除去に用いる、請求項 1 ~ 6 何れか 1 項記載のバイオフィルム除去剤。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項記載のバイオフィルム除去剤を、1 0 秒 ~ 1 0 分、1 0 ~ 8 0 で接触させる、バイオフィルムの除去方法。

【請求項 9】

タンパク質構成比率が B S A (ウシ血清アルブミン) 換算で 4 5 質量%以上のバイオフィルムに適用する、請求項 8 記載のバイオフィルム除去方法。

【請求項 1 0】

炭素数 1 6 ~ 1 8 の不飽和脂肪酸カリウム塩を 0 . 1 ~ 3 0 質量% (混合する成分の合計量を基準として)、及び、水を 6 0 質量%以上 (混合する成分の合計量を基準として) 混合する、請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項記載のバイオフィルム除去剤の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、バイオフィルム除去剤に関する。より詳細には、微生物及び微生物産生物質からなるバイオフィルムを固体表面から除去し、微生物が関与する様々な分野においてバイオフィルムに起因する危害を防止するためのバイオフィルム除去剤に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

バイオフィルムは生物膜やスライムとも言われ、一般に水系で微生物が物質の表面に付着・増殖することによって微生物細胞内から多糖やタンパク質、核酸などの高分子物質を産生して構造体を形成したものを指す。バイオフィルムが形成されると、微生物を原因とする危害が発生して様々な産業分野で問題を引き起こす。例えば、食品プラントの配管内にバイオフィルムが形成されると、このバイオフィルムが剥がれ落ち、製品内への異物混入につながるだけでなく、微生物由来の毒素で食中毒の原因となる。更に、金属表面へのバイオフィルム形成は金属腐食の原因となり、設備の老朽化を促進する。

【0 0 0 3】

更に、バイオフィルムを形成した微生物集合体に対しては、水系に分散浮遊状態にある微生物に対する場合と比較して、殺菌剤・静菌剤のような微生物制御薬剤の効果が十分に出ないことも多い。例えば医療の面では近年、医療器具の狭い隙間や空孔内に微生物が残存してバイオフィルムを形成し、これを原因とする院内感染例が数多く報告されている。ヒト口腔内においては歯に形成するバイオフィルム、いわゆるデンタルプラーク (歯垢) がう蝕や歯周病の原因となることは良く知られており、これらの問題について長い間検討がなされている。

【0 0 0 4】

タンパク質は、環境の変化により分子間同士でネットワーク構造を形成し、例えばアミロイド、インクルージョンボディと呼ばれる強固な構造体、凝集体を形成することが知られている (非特許文献 1、2)。バイオフィルムは一旦形成され成熟が進むと除去が非常

10

20

30

40

50

に困難となることが知られているが、その一因はこのようなタンパク質の強固な構造体が存在することによると考えられる。

【 0 0 0 5 】

バイオフィルムを除去する技術としては、これまでに、微生物（特許文献 1）、酵素（特許文献 2、3）、カチオン性界面活性剤を含む殺菌剤（特許文献 4）、次亜ハロゲン酸や過酸化水素（特許文献 5）、アルキル置換カルボン酸及びブロック共重合体（特許文献 6）などの薬剤を利用して、固体表面に付着したバイオフィルムの分解や除去を行う方法が提案されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 1 - 1 1 5 2 0 0 号公報

【特許文献 2】特表 2 0 0 6 - 5 0 7 8 5 0 号公報

【特許文献 3】特表 2 0 1 0 - 5 1 1 6 2 3 号公報

【特許文献 4】特開 2 0 0 7 - 2 9 7 3 1 8 号公報

【特許文献 5】特開 2 0 0 8 - 1 8 4 5 1 6 号公報

【特許文献 6】特表 2 0 0 3 - 5 2 3 2 7 8 号公報

【非特許文献】

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 1】長谷川ら、細胞工学、vol. 20、p. 1495-1501（2001）

20

【非特許文献 2】M. M. Carrio et al., J. Biotech., Vol. 96, p. 3-12（2002）

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

既に成熟したバイオフィルムは、微生物によって産出される高分子物質でフィルム状に覆われていることから、酵素や殺菌剤などの薬剤をバイオフィルムの深部まで作用させることは難しい。とりわけ、前述のようなタンパク質の強固な構造体が形成されたバイオフィルムに関しては、上記特許文献 1 - 6 に開示される技術によっても効率的に除去することは困難であった。

【 0 0 0 9 】

30

特許文献 1 には微生物を徐放し、トイレ、ごみ箱や排水口などの汚れ、汚物やぬめりを分解除去することができる、据え置き型の洗浄剤を提供する事を目的として、オレイン酸ナトリウム塩を主成分とし得る石鹼素地を徐放化剤と中性の粉末からなる担体に担持した悪臭原因分解性を有する微生物を混練し、成型してなる洗浄剤が開示されている。しかし微生物の反応効率が悪く、劇的な効果が見られないこと、また製剤化するまでに微生物の混練、成型という過程を経るため生産性が悪いという欠点がある。オレイン酸ナトリウム塩を多量に含むとクラフト点が高くなり剤が水に溶解せず、効率的にバイオフィルムに接触することが困難であるため劇的な効果が見られない欠点がある。

【 0 0 1 0 】

また、特許文献 2、3 に開示されている酵素を利用する従来技術に関しては、酵素活性が温度に大きく依存することから、十分な効果を発揮するには厳密な温度調整を要するという制限があった。特許文献 4 に開示される殺菌剤、特許文献 5 に開示される次亜ハロゲン酸や過酸化水素は、バイオフィルムの効率的な除去は困難であった。また特許文献 6 に開示されているアルキル置換カルボン酸（即ち 3, 5, 5 - トリメチルヘキサン酸）も、バイオフィルムについては効率的な除去はできなかった。

40

【 0 0 1 1 】

本発明の課題は、固体表面等に形成されたバイオフィルム、中でも、従来技術において特に除去が困難であった、タンパク質構成比率が B S A（ウシ血清アルブミン）換算で 45 質量%以上のバイオフィルムを効率的に除去し得るバイオフィルム除去剤を提供することにある。

50

【課題を解決するための手段】

【0012】

本出願人は、上記課題につき鋭意検討した結果、特定の不飽和脂肪酸塩が、固体表面等に形成された、タンパク質構成比率がBSA（ウシ血清アルブミン）換算で45質量%以上のバイオフィルムに対し、優れた除去効果を発現することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0013】

即ち、本発明は、

界面活性剤〔以下、(a)成分という〕を0.1～50質量%、及び、水を50～99.9質量%含有し、

(a)成分中の炭素数16～18の不飽和脂肪酸アルカリ金属塩〔以下、(a1)成分という〕の割合が60～100質量%であり、

(a)成分として炭素数16～18の不飽和脂肪酸カリウム塩〔以下、(a1-1)成分という〕を含有し、

除去剤中の陽イオン（ただし水素イオンを除く）の総量中のカリウムイオンの割合が50～100質量%である、

バイオフィルム除去剤を提供する。

【0014】

また、本発明は、上記本発明のバイオフィルム除去剤を、タンパク質構成比率がBSA（ウシ血清アルブミン）換算で45質量%以上のバイオフィルムに適用する、バイオフィルム除去方法を提供する。

【0015】

また、本発明は、炭素数16～18の不飽和脂肪酸カリウム塩を0.1～50質量%（混合する成分の合計量を基準として）、及び、水を50～99.9質量%（混合する成分の合計量を基準として）混合する、上記本発明のバイオフィルム除去剤の製造方法を提供する。

【発明の効果】

【0016】

本発明のバイオフィルム除去剤は、固体表面等に形成されたバイオフィルム、なかでもタンパク質構成比率がBSA（ウシ血清アルブミン）換算で45質量%以上のバイオフィルムを効率的に除去することができる。

【発明を実施するための形態】

【0017】

〔バイオフィルム除去剤〕

本発明のバイオフィルム除去剤は、界面活性剤〔(a)成分〕を含有する。(a)成分は、炭素数8～24の炭化水素基を有するものが好ましい。

【0018】

(a)成分としては、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、非イオン界面活性剤、及び、両性界面活性剤が挙げられる。

【0019】

陰イオン界面活性剤としては、脂肪酸塩、アルキル硫酸塩、アルキルエーテル硫酸塩、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル硫酸塩、アルキルスルホン酸塩、アルキルアミドスルホン酸塩、アルキルアリールスルホン酸塩、アルキルベンゼンスルホン酸塩、オレフィンスルホン酸塩、パラフィンスルホン酸塩、アルキルスルホコハク酸塩、アルキルエーテルスルホコハク酸塩、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルカルボン酸塩、アルキルアミドスルホコハク酸塩、アルキルサクシンアミド塩、アルキルスルホ酢酸塩、アシルサルコシン塩、アシルイセチオン酸塩、アルケニルコハク酸塩、アルキルエーテル酢酸塩、ポリオキシアルキレンアルキルエーテル酢酸塩；アルキルリン酸塩、アルキルエーテルリン酸塩、ポリオキシアルキレンアルキルエーテルリン酸塩等のリン酸塩；N-アシルタウリン塩、N-アシルアラニン塩、N-アシルグルタミン酸塩、N-アシルアスパラギン酸

10

20

30

40

50

塩等のアシル化アミノ酸塩等が挙げられる。

【0020】

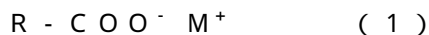
脂肪酸塩は、炭素数8～22の脂肪酸塩が挙げられる。具体的には、カプリル酸、ペラルゴン酸、カプリン酸、ラウリン酸、ミリスチン酸、ペンタデシル酸、パルミチン酸、マルガリン酸、ステアリン酸、ツベルクロステアリン酸、アラキジン酸、ベヘン酸等の飽和脂肪酸の塩、また、リノレン酸、ステアリドン酸、エイコサペンタエン酸、ドコサヘキサエン酸、リノール酸、ジホモ- -リノレン酸、アラキドン酸、オレイン酸、エライジン酸、エルカ酸、ネルボン酸等の不飽和脂肪酸の塩が挙げられる。また、イソステアリン酸や3,5,5-トリメチルヘキサン酸等の分岐構造の脂肪酸の塩が挙げられる。塩は、アルカリ金属塩、アンモニウム塩、アルカノールアンモニウム塩、塩基性アミノ酸塩等が挙げられ、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩が好ましい。

10

【0021】

本発明のバイオフィルム除去剤は、(a)成分として(a1)炭素数16～18の不飽和脂肪酸アルカリ金属塩〔(a1)成分〕を含有し、更に、(a1-1)成分として炭素数16～18の不飽和脂肪酸カリウム塩を含有する。(a1)成分としては、不飽和結合を1つ以上含む炭素数15～17の炭化水素基を1つ有する不飽和脂肪酸塩、及び、不飽和結合を1つ以上含み1つ以上のヒドロキシ基で置換された炭素数15～17の炭化水素基を1つ有する不飽和脂肪酸塩から選ばれる不飽和脂肪酸塩が挙げられる。(a1)成分としては式(1)で表される構造を有する不飽和脂肪酸塩が好ましい。

【0022】



〔式中、Rは不飽和結合を1つ以上含む炭素数15～17の炭化水素基又は不飽和結合を1つ以上含み1つ以上のヒドロキシ基で置換された炭素数15～17の炭化水素基を示す。M⁺はアルカリ金属イオンを示す。〕

20

【0023】

式(1)において、Rの炭化水素基としては、不飽和結合を1つ以上含む炭素数15～17の炭化水素基又は不飽和結合を1つ以上含み1つ以上のヒドロキシ基で置換された炭素数15～17の炭化水素基である。Rの炭化水素基としては、バイオフィルム除去効果の点から、炭素数15～17であり、炭素数17が好ましい。Rの炭化水素基はその水素原子がヒドロキシ基で置換されていてもよい。ヒドロキシ基が置換される場合は、ヒドロキシ基の数は1であることが好ましい。Rの炭化水素基は、直鎖でも分岐鎖でもよい。M⁺のアルカリ金属イオンとしては、ナトリウムイオン、カリウムイオンが好ましく、カリウムイオンがより好ましい。

30

【0024】

(a1)成分は、バイオフィルム除去効果の観点から、不飽和結合を1～3(例えばリノレン酸)有するものが好ましく、1～2有するものがより好ましい。(a1)成分の酸化劣化に対する安定性の観点から、(a1)成分は、不飽和結合を1つ有するものが更に好ましい。式(1)中のRも同様である。

【0025】

(a1)成分の好適な例としては、バイオフィルム除去効果の観点から、オレイン酸、パルミトレイン酸、リノール酸、リノレン酸、及び、リシノール酸から選ばれる不飽和脂肪酸のアルカリ金属塩が挙げられる。中でも、オレイン酸、パルミトレイン酸、及び、リノール酸から選ばれる不飽和脂肪酸のアルカリ金属塩、更にナトリウム塩、カリウム塩が高いバイオフィルム除去性能を示すため好ましい。工業的利用性の観点からオレイン酸アルカリ金属塩、更にオレイン酸カリウム塩が好ましい。(a1)成分のうち、カリウム塩は(a1-1)成分である。(a1-1)成分としては、オレイン酸カリウム塩、リシノール酸カリウム塩、パルミトレイン酸カリウム塩、リノール酸カリウム塩が挙げられる。

40

【0026】

(a)成分の界面活性剤中、更には炭素数8～22の脂肪酸塩中の(a1)成分の割合は、バイオフィルム除去効果の観点から、60～100質量%であり、好ましくは75～

50

100質量%、より好ましくは85～100質量%、更に好ましくは95～100質量%であり、100質量%であることも好ましい。よって、本発明のバイオフィルム除去剤では、バイオフィルム除去効果の観点から、(a1)成分以外の界面活性剤、中でも炭素数8～22の脂肪酸塩であって(a1)成分に該当しないものの含有量が、(a1)成分100質量部に対して67質量部を超えない、更に34質量部を超えない、更に18質量部を超えない、更に6質量部を超えないことが好ましい。

【0027】

本発明のバイオフィルム除去剤において、バイオフィルム除去効果を高める観点から、除去剤中の陽イオン(ただし水素イオンを除く)の総量(以下、全陽イオンという場合もある)中のカリウムイオンの割合は50～100質量%である。好ましくは70～100質量%であり、より好ましくは80～100質量%であり、さらに好ましくは90～100質量%である。ここで、除去剤中の陽イオンの量及びカリウムイオンの量は、除去剤中に遊離状態で存在するイオン及び結合状態で存在するイオンの総量に基づくものであり、配合原料から計算できる場合はその値を採用してもよい。また、配合後の除去剤について、一般法であるフレイム測光法、原子吸光分析、イオンクロマトグラフィー、イオン選択電極を用いた方法などにより測定することもできる。

10

【0028】

本発明のバイオフィルム除去剤は、全陽イオン中のカリウムイオンの割合が上記範囲を満たす範囲で、種々の無機塩を含有することができる。無機塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化アルミニウム、硫酸ナトリウム、硫酸カリウム、硫酸バリウムなどが挙げられる。その中でも(a1)成分を水溶液中から析出させない、すなわちクラフト点を上昇させにくいカリウム塩、ナトリウム塩など一価の金属塩が好ましい。

20

【0029】

本発明における無機塩の含有量は、バイオフィルム除去性の観点から、除去剤中、0～10質量%であることが好ましく、0～5質量%であることがより好ましく、実質無機塩を含まないことがさらに好ましい。

【0030】

本発明のバイオフィルム除去剤は、水を含有する。本発明のバイオフィルム除去剤における水の含有量はバイオフィルム除去効果の観点から、50～99.9質量%である。本発明のバイオフィルム除去剤における水の含有量は、好ましくは60質量%以上であり、より好ましくは70質量%以上であり、さらに、75質量%以上が好ましく80質量%以上であることが好ましい。本発明のバイオフィルム除去剤は、(a)成分と水とを含有する液体の形態(例えば液体組成物)である。

30

【0031】

本発明のバイオフィルム除去剤中の(a)成分の含有量は0.1～50質量%である。0.3～30質量%が好ましく、0.3～15質量%がより好ましく、0.7～4質量%が更に好ましい。本発明のバイオフィルム除去剤中の炭素数8～22の脂肪酸塩の含有量は、0.1～50質量%が好ましく、0.3～30質量%がより好ましく、0.3～15質量%が更に好ましく、0.7～4質量%がより更に好ましい。本発明のバイオフィルム除去剤中の(a1)成分の含有量は、0.1～50質量%が好ましく、0.3～30質量%がより好ましく、0.3～15質量%が更に好ましく、0.7～4質量%がより更に好ましい。本発明のバイオフィルム除去剤中の(a1-1)成分の含有量は、0.1～50質量%が好ましく、0.3～30質量%がより好ましく、0.3～15質量%が更に好ましく、0.7～4質量%がより更に好ましい。本発明のバイオフィルム除去剤は、(a1)成分と水の合計含有量が95～100質量%、更に98～99.9質量%であることが好ましい。

40

【0032】

本発明のバイオフィルム除去剤のpH(25)は、バイオフィルム除去効果の点から、6～12.5の範囲が好ましく、7～12の範囲がより好ましく、7.5～11.5の

50

範囲が更に好ましく、8～11の範囲が特に好ましい。ここで、バイオフィルム除去剤のpH(2.5)は、HORIBA pH Meter F-21(株)堀場製作所製)を用いて原液を測定した値である。

【0033】

本発明のバイオフィルム除去剤は、カルシウムや鉄などの多価金属イオンを捕捉しバイオフィルム除去効果を更に高める観点から、多価金属イオン捕捉剤〔以下、(b)成分という〕を含有することが好ましい。

【0034】

多価金属イオン捕捉剤の好適な具体例としては、ニトリロ三酢酸(NTA)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ジエチレントリアミン五酢酸(DPTA)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDTA)、ヒドロキシエチリデンジホスホン酸(HEDP)、アミノトリメチレンホスホン酸(ATMP)、又はそれらの塩などが挙げられる。中でも、EDTA又はその塩が、(a)成分との併用において高いバイオフィルム除去効果をもたらすため好ましい。またEDTAの塩としてはナトリウム塩、カリウム塩などが挙げられるが、カリウム塩がより好ましい。

【0035】

これら多価金属イオン捕捉剤を使用する場合、その含有量は捕捉対象である多価金属イオン濃度に応じて適宜変更し得るが、本発明のバイオフィルム除去剤中、0.05～2.5質量%が好ましい。

【0036】

また、これら多価金属イオン捕捉剤を使用する場合、バイオフィルム除去性の観点から、(b)成分と(a)成分の含有量の質量比(b)/(a)は0.05～0.3が好ましい。

【0037】

本発明のバイオフィルム除去剤は、バイオフィルムへ作用させる場面においては、通常、水溶液、水分散剤液等の液体の形態で用いられる。その場合、本発明のバイオフィルム除去剤は、そのまま、或いは、水、有機溶剤で希釈して、用いることができる。

【0038】

本発明のバイオフィルム除去剤中の水溶性有機溶剤の含有量は0～15質量%であることが好ましい。本発明における水溶性有機溶剤の炭素数は4～10である。水溶性有機溶剤としては、1,3-ブチレングリコール、ジプロピレングリコール、イソプレングリコール、エチルジグリコールが挙げられる。

【0039】

本発明のバイオフィルム除去剤中の水溶性有機溶剤の含有量は、バイオフィルム除去性の観点から、0～10質量%であることが好ましく、0～5質量%であることがより好ましく、0～3質量%であることが更に好ましい。本発明のバイオフィルム除去剤は有機溶剤を含まないことが好ましい。

【0040】

本発明のバイオフィルム除去剤は、炭素数16～18の不飽和脂肪酸カリウム塩を0.1～50質量%(混合する成分の合計量を基準として)、及び、水を50～99.9質量%(混合する成分の合計量を基準として)混合することで製造できる。必要に応じて(b)成分などの任意成分を混合することができる。これにより、炭素数16～18の不飽和脂肪酸カリウム塩を0.1～50質量%(配合する成分の合計量を基準として)、及び、水を50～99.9質量%(配合する成分の合計量を基準として)配合してなる本発明のバイオフィルム除去剤を得ることができる。

【0041】

[バイオフィルム除去方法]

本発明のバイオフィルム除去剤は、タンパク質構成比率がBSA(ウシ血清アルブミン)換算で45質量%以上のバイオフィルムの除去に好適に用いられる。本発明のバイオフィルム除去剤を用いてバイオフィルムを除去する方法としては、バイオフィルム、例えば

10

20

30

40

50

、固体表面に形成されたバイオフィームに、本発明のバイオフィーム除去剤を、浸漬、塗布あるいは散布等により、接触させる方法が挙げられる。例えば、(a)成分を好ましくは0.3~30質量%、より好ましくは0.3~15質量%、更に好ましくは0.7~4質量%、及び残部の水を含有する本発明のバイオフィーム除去剤を、バイオフィームと接触させる方法が挙げられる。このとき、更に、スポンジ、タオル、ブラシ、水流などの物理力を加えてもよい。バイオフィーム除去剤を接触させておく時間は、付着しているバイオフィームの量、バイオフィーム除去剤の濃度、接触時の温度、物理力の有無により異なるが、通常は数秒から数時間の範囲であり、作業性も考慮すると、好ましくは10秒以上、より好ましくは10秒~1時間であり、更に好ましくは10秒~30分、特に好ましくは10秒~10分である。接触処理後は、剥離、溶解などにより固体表面から除去されたバイオフィームを、流水などにより速やかにすすぎ流すことが望ましい。また、バイオフィーム除去剤を接触させておく温度は、厳密に制御する必要はないが、0~100の範囲にあることが好ましく、10~80の範囲にあることがより好ましく、20~50が更に好ましい。

10

【0042】

本発明のバイオフィーム除去剤が除去対象とする好適なバイオフィームは、固体表面等に形成された、タンパク質構成比率がBSA(ウシ血清アルブミン)換算で45質量%以上のバイオフィームである。ここで、固体表面としては、ステンレスなどの金属表面(例えば、配水管など)、ポリスチレンやテフロン(登録商標)などの合成高分子表面、皮膚などのタンパク質を含む天然物由来の高分子表面などが挙げられる。すなわち、本発明の除去剤は、皮膚に形成されたバイオフィームの除去に用いることができる。また、本発明の除去剤は、硬質表面に形成されたバイオフィームの除去に用いることができる。

20

【0043】

背景技術欄にて述べた通り、バイオフィームは、微生物が固体表面に付着し増殖する過程において、微生物細胞内から多糖やタンパク質、核酸などの高分子物質を産生して構造体を形成したものである。一般的に微生物の種類、また同じ微生物でも由来や微生物が置かれた固体表面状態を含む環境によって形成されるバイオフィームの組成が異なることが知られているが、本出願人は、固体表面に付着し増殖する微生物の種類によって、形成されるバイオフィームの高分子物質組成が大きく異なり、バイオフィームを形成する組成によって従来開発されてきたバイオフィーム除去剤や各種界面活性剤のバイオフィーム除去性に大きく影響していることを見出した。微生物が形成するバイオフィームの組成について、下記表1に示す通り、黄色ブドウ球菌(NBRC13276)はタンパク質(70.6質量%;BSA換算)の極めて多いバイオフィームを形成することを確認した(実験方法の詳細は<バイオフィーム構成比率の測定方法>欄に記載)。

30

【0044】

【表1】

菌	由来(菌株)	タンパク質 (質量%)*1	多糖 (質量%)*2	核酸 (質量%)*3
黄色ブドウ球菌	NBRC13276	70.6	19.6	9.8

40

*1 Lowry法(ウシ血清アルブミン換算)

*2 フェノール硫酸法(マンノース換算)

*3 全体固形分量-(タンパク質量+多糖量)

【0045】

本発明のバイオフィーム除去剤は、タンパク質構成比率がBSA(ウシ血清アルブミン)換算で45質量%以上のバイオフィーム(例えば、アシネトバクター由来のバイオフィ

50

ルム)に対して優れた除去効果を発現する。予期せぬことに、本発明のバイオフィルム除去剤は、従来のバイオフィルム除去剤では除去が非常に困難であった、タンパク質構成比率がBSA(ウシ血清アルブミン)換算で50質量%以上にも達するバイオフィルム(例えば、黄色ブドウ球菌由来のバイオフィルム)に対して、より一層高い除去効果を奏することを確認した(実施例参照)。すなわち、本発明のバイオフィルム除去剤は、黄色ブドウ球菌の生成するバイオフィルムに対して特に高い除去性能を示す。

【0046】

<バイオフィルム構成比率の測定方法>

人体に有害、ないしは美観の面から不良である原因菌として知られている黄色ブドウ球菌(NBRC13276)を選択し、これに由来するバイオフィルムについて、そのタンパク質、多糖、核酸の比率を以下の方法で測定した。

黄色ブドウ球菌はTSB No.2液体培地(シグマ社製)で、37℃、20時間培養した。各種菌の培養液を滅菌生理食塩水で100倍に希釈後、黄色ブドウ球菌はTSB No.2寒天培地に、10枚塗抹し、それぞれ、37℃で48時間培養した。140 mM NaCl、10 mM EDTAを含むpH 7.5の水溶液(A液と略す)を各寒天培地上に5 ml添加し、菌層部をコンラージ棒で掻きとる操作を各プレートに対し2回実施し、菌液を回収した。回収した菌液を30分間攪拌し、8000 rpm、20 min 15℃で遠心分離した。上澄みを回収し、0.2 μmのメンブレンフィルター(Nalgene filtration product社)でろ過した。一方、菌層にA液100 mlを加え、同様に攪拌し、液を遠沈管に集め、1分間ボルテックス(Scientific Industry社、G-560)にて攪拌を行い、遠心分離、ろ過する操作を3回行った。ろ液を集め、透析セルロースチューブに封入し、5Lのイオン交換水下で48時間(2回イオン交換水を交換)透析し、低分子化合物を除いた。

回収した液体をLowry法(測定キットはナカライテスク社製)で測定し、測定キットの指示に従い、ウシ血清アルブミンによる検量線からタンパク質濃度を定量し、タンパク質由来のバイオフィルム量とした。また回収した液体をフェノール硫酸法によって、マンノースによる検量線から多糖類濃度を定量し、多糖類由来のバイオフィルム量とした(参考文献:Hodge, J.E. and Hofreiter, B.T. 1962. Methods in Carbohydrate Chemistry vol.1, pp.380-394)。さらに、回収した液体について260nmの吸収極大を測定して核酸の存在を確認後、透析分の固形分からタンパク質量と多糖類量を引いて核酸量とし、核酸由来のバイオフィルム量とした。

【実施例】

【0047】

実施例1~13及び比較例1~22

表2、3に示す成分を用い、実施例1~13及び比較例1~17、19~22は<バイオフィルム除去剤の調製1>の方法により、また、比較例18は<バイオフィルム除去剤の調製2>の方法により、表2、3に示す組成のバイオフィルム除去剤を調製した。得られたバイオフィルム除去剤のバイオフィルム除去性能を下記要領で評価した。結果を表2、3に示す。

【0048】

<バイオフィルム除去剤の調製1>

100 mlのガラスビーカーに、スターラーピース(直径8 mm x 30 mm、増田理化学工業製)を挿入し、さらにバイオフィルム除去剤の出来上がり質量が100 gとなるように、表2、3に示す質量比率にて、全ての成分を投入した。ウォーターバスにて80℃まで昇温し、100 rpmで30分間攪拌した。水溶液の外観が均一になったことを確認し、室温(25℃)まで冷却した。

【0049】

<バイオフィルム除去剤の調製2>

100 mlのガラスビーカーに、スターラーピース(直径8 mm x 30 mm、増田理化学工業製)を挿入し、さらにバイオフィルム除去剤の出来上がり質量が100 gとなるように、表3に示す質量比率にて、全ての成分を投入した。室温(25℃)下、100 rpm

で5分間攪拌し、混合物の外観が均一になったことを確認した。

【0050】

<バイオフィルム除去性能の評価>

黄色ブドウ球菌(NBRC13276)1株を、25mlのTBS No.2培地(シグマ社製)で37、22時間振盪培養した(得られた液を「菌液」とよぶ)。波長600nmの光により菌液の濁度を測定し(濁度計 HITACHI社製 U-2800)、濁度が0.1となるようにTBS No.2培地で菌液を希釈した(得られた液を「希釈した菌液」と呼ぶ)後、底面が平面である滅菌96ウェルプレート(ファルコン社製)の各ウェルに希釈した菌液を0.15ml添加して、37、24時間あるいは48時間静置培養した。また、ポジティブコントロールとして、同じプレートの異なるウェルに菌を含まないTSB No.2培地を0.15ml加えたサンプルも調製した。上澄みを廃棄後、各ウェルに0.2mlの滅菌イオン交換水(以下、滅菌水という)を添加し、上澄みを廃棄する操作(以下、washという)を3回行った。次いで、各ウェルに0.2mlの滅菌水を添加し、表2、3に示す各バイオフィルム除去剤を添加する直前まで保持した。

10

上澄みの廃棄直後、特に記載がない限り、室温(25)で保存した表2、3に示す各バイオフィルム除去剤を各ウェルに添加し、室温(25)で1分放置した。なお室温以外のサンプルに関しては、サンプルを各温度のインキュベーターにあらかじめ1晩保存し、上澄みの廃棄直後、サンプルの温度が変化しないようすばやく各ウェルに添加した。

その後上澄みを廃棄し、2回washした。また、バイオフィルム除去剤の代わりに滅菌水を用いて同様の操作を行ったものをネガティブコントロールとし、ポジティブコントロールは滅菌水で同様の操作を実施した。

20

その後、各ウェルに、クリスタルバイオレット(和光純薬工業(株)製)の0.1%水溶液0.2mlを添加し、室温で10分放置した。滅菌水で1回washした後、95%エタノール溶液(シグマ社製)0.2mlを各ウェルに添加し、4で一晩放置した。次いで、各ウェルに関し、570nmの吸光度を測定した。得られた吸光度値を下記の式に代入し、バイオフィルム除去率を算出した。

なお、上記全ての工程は無菌状態にて実施した。

【0051】

バイオフィルム除去率(%) = $100 \times [(A_n - A_p) - (A_s - A_p)] / (A_n - A_p)$

30

式中、

A_s : サンプル吸光度

A_n : ネガティブコントロール吸光度

A_p : ポジティブコントロール吸光度

【0052】

【表 2】

		実施例														
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
バイオフィーム除去剤	組成(質量%)	(a1)	0.5	1	1	0.9	0.8	0.7	3	5	10					
		(a1-1)										1				1
		オレイン酸K塩														
		リンノール酸K塩														
		ハルミトレイン酸K塩											1			
		リノール酸K塩												1		
		オレイン酸Na塩														
		カプリル酸Na塩														
		3,5-トリメチルヘキサン酸K塩														
		カプリン酸Na塩														
		ミリスチン酸K塩				0.1	0.2	0.3								
		パルミチン酸Na塩														
		パルミチン酸K塩														
ステアリン酸Na塩																
ステアリン酸K塩																
エルカ酸K塩																
ヤン油脂肪酸アルギニン塩																
ラウリン酸TEA塩																
ラウレス-6酢酸Na塩																
モノオレイン酸ホリオキシエチレンソルビタン(20EO)																
トリオレイン酸ホリオキシエチレンソルビタン(20EO)																
ホリオキシエチレンオレイルエーテル(8EO)																
(b) エチレンジアミン四酢酸四Na塩			0.1													
塩化ナトリウム														0.1		
イオン交換水		99.5	99.0	98.9	99.0	99.0	99.0	97.0	95.0	90.0	99.0	99.0	99.0	98.9		
(a)成分中の(a1)成分の割合(質量%)		100	100	100	90	80	70	100	100	100	100	100	100	100		
全陽イオン(水素イオンを除く)中のカルシウムイオンの割合(質量%)		100	100	75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	65		
		菌種														
		黄色ブドウ球菌														
培養時間(時間)		48														
接触温度(°C)		25														
接触時間(分)		1														
バイオフィーム中のタンパク質量(質量%)		70.6														
バイオフィーム除去率(%)		72.8	77.4	79.0	75.4	72.6	50.5	80.3	58.8	52.6	70.0	89.6	84.5	45.9		

【 0 0 5 3 】

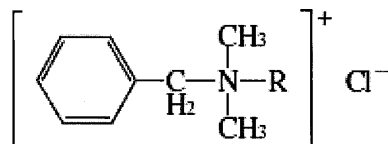
10

20

30

40

- ・オレイン酸Na塩：オレイン酸（ルナックO - LL - V、花王株式会社製）をNaOH（試薬）により完全中和して用いた
 - ・リシノール酸Na塩：リシノール酸（試薬）をNaOHにより完全中和して用いた
 - ・パルミトレイン酸K塩：パルミトレイン酸（試薬）をKOHにより完全中和して用いた
 - ・リノール酸K塩：リノール酸（試薬）のKOHによる完全中和物
 - ・モノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン（20EO）：レオドール TW - O120V 花王株式会社製
 - ・トリオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタン（20EO）：レオドール TW - O320V 花王株式会社製
 - ・ポリオキシエチレンオレイルエーテル（8EO）：エマルゲン 408 花王株式会社製
 - ・カプリル酸Na塩：カプリル酸ナトリウム（試薬）
 - ・3, 5, 5 - トリメチルヘキサン酸K塩：3, 5, 5 - トリメチルヘキサン酸カリウム（試薬）を0.5M - KOHにより中和して用いた
 - ・カプリン酸Na塩：カプリン酸ナトリウム（試薬）
 - ・ミリスチン酸K塩：ミリスチン酸カリウム（試薬）
 - ・パルミチン酸Na塩：パルミチン酸ナトリウム（試薬）
 - ・ステアリン酸Na塩：ステアリン酸ナトリウム（試薬）
 - ・エルカ酸K塩：エルカ酸をKOHにより完全中和したもの
 - ・ヤシ油脂肪酸アルギニン塩：アミノソープAR - 12 味の素株式会社製〔ヤシ油脂肪酸組成はメーカーから開示されていない。ただし、一般にヤシ油脂肪酸中の（a1）成分含有量は数質量%程度であり（例えば、「新版 脂肪酸化学」[稲葉恵一、平野二郎編著、幸書房 昭和56年9月5日発行]によれば、オレイン酸含有量は5質量%）、明らかに本発明の（a1）成分（不飽和脂肪酸アルカリ金属塩）の含有量は0質量%である。そのため、表中では、これを用いた比較例9は、（a）成分中の（a1）成分の割合を「0質量%」と示した。〕
 - ・ラウリン酸TEA塩：ラウリン酸（試薬）とトリエタノールアミン（試薬）により製造
 - ・ラウレス - 6 酢酸Na塩：カオーアキポ RLM - 45NV 花王株式会社製
 - ・エチレンジアミン四酢酸四Na塩：試薬
 - ・塩化カルシウム：試薬
 - ・アミラーゼ：ノボザイムズ社製、ターマミル120L
 - ・塩化ベンザルコニウム：試薬（下記構造を有する）
- 【0055】
【化1】



〔R：炭素数14のアルキル基〕

【0056】

以下に本発明のバイオフィilm除去剤の具体的な使用態様を示す。

<処方例：洗浄剤組成物>

オレイン酸カリウム塩：3質量%

1, 3 - ブチレングリコール（1, 3 - ブチレングリコール - P（協和発酵ケミカル株式会社））：10質量%

水：87質量%

を含有する洗浄剤組成物を調製した。

実施例 1 等と同様の方法にて黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを調製し、バイオフィルム除去率を測定した。バイオフィルム除去率は 71.5% であった。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 K	31/20	(2006.01)	A 6 1 K	31/20	
A 6 1 K	31/201	(2006.01)	A 6 1 K	31/201	
A 6 1 K	31/202	(2006.01)	A 6 1 K	31/202	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
B 0 8 B	3/08	(2006.01)	B 0 8 B	3/08	Z

- (56)参考文献 特開2011-241263(JP,A)
 特表平11-508618(JP,A)
 特表平11-508619(JP,A)
 特表平11-508620(JP,A)
 国際公開第2010/119966(WO,A1)
 米国特許出願公開第2011/0105612(US,A1)
 米国特許出願公開第2004/0037904(US,A1)
 欧州特許出願公開第00294808(EP,A1)
 特開2004-027031(JP,A)
 特開2002-316922(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 1 D 1 / 0 4
 A 6 1 K 3 1 / 2 0
 A 6 1 K 3 1 / 2 0 1
 A 6 1 K 3 1 / 2 0 2
 A 6 1 K 4 5 / 0 0
 A 6 1 K 4 7 / 0 4
 A 6 1 K 4 7 / 4 6
 A 6 1 P 3 1 / 0 0
 B 0 8 B 3 / 0 8
 C 1 1 D 3 / 3 3
 C 1 1 D 3 / 3 6