

明 細 書

発明の名称：

クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制剤

技術分野

[0001] 本発明は、クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制剤に関する。

背景技術

[0002] クロストリディオイデス・デフィシル感染症 (Clostridioides (Clostridium) difficile infection, CDI) は、抗菌薬使用などによる消化管細菌叢の破綻により発症することが多い。その殆どは、抗菌薬を使用していることが多く、さらに、加齢や基礎疾患の有無等が罹患因子となる。

[0003] CDIのほとんどが消化管感染症であり、症状は下痢や腹痛が多いが、発熱や白血球増多を伴うこともあり、重篤になれば中毒性巨大結腸、イレウス、消化管穿孔により死に至る場合もある。

[0004] クロストリディオイデス・デフィシルは消化管に保有しているが症状を呈しない「キャリア」が認められ、抗菌薬がよく使用される入院患者ではこの「キャリア」が多くみられる。クロストリディオイデス・デフィシルは、CDI患者および無症候キャリアの糞便とともに排泄され、医療従事者の手指を含めた環境を汚染し、医療関連感染として問題となる。したがって、オムツ交換のような排泄ケアが必要な高齢者が多く入院し、抗菌薬適正使用を含めた感染管理が充分に行われていない医療現場では、よく認められる感染症である。しかし抗菌薬の乱用や感染管理が充分でない医療機関では、CDIに対する関心および知識が低いため、本疾患が適切に診断されずに、発生率が表面上低いことが多く問題視されている。

このように医療機関や高齢者施設では、CDIが慢性化しやすい環境にあり、感染予防策を講じる必要性が議論されている。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：ディフィシル菌感染症の基礎と臨床，モダンメディア56巻10号，2010 www.eiken.co.jp/modern_media/backnumber/pdf/MM1010_01.pdf

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、鋭意努力した結果、エンテロコッカス・フェカリスの死菌がクロストリディオイデス ディフィシル菌の増殖を抑制できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0008] 本発明の要旨は以下の通りである。

(1) エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制剤。

(2) エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制用非経口医薬製剤。

(3) エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制用殺菌剤、消毒剤、抗菌剤、除菌剤又は洗浄剤。

(4) エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、外用医薬品。

(5) エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、衛生用品。

発明の効果

[0009] 本発明により、クロストリディオイデス ディフィシル菌の増殖を抑制できる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2020 - 43740の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例1の試験結果（生菌数（ $\times 10^3$ CFU/mL））を示す。○：対照群、□

：低濃度群（被験物質濃度：0.64 mg/mL）、△：高濃度群（被験物質濃度：64 mg/mL）。対照群と比較したときの有意差（**： $p<0.01$ ）。

発明を実施するための形態

- [0011] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。
- [0012] 本発明は、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制剤を提供する。本発明は、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を用いて、クロストリディオイデス ディフィシル菌の増殖を抑制する方法も提供する。また、本発明は、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、クロストリディオイデス ディフィシル菌の増殖を抑制する方法に用いる薬剤を提供する。
- [0013] エンテロコッカス・フェカリス (*Enterococcus faecalis*) は、生体応答調節物質 (Biological Response Modifier, BRM) 活性 (薬学誌 112:919-925 1992; 薬学誌 113:396-399 1992; 動物臨床医学 3:11-20 1994) を有する乳酸球菌として知られている。エンテロコッカス・フェカリス EF-2001 株は日本ベルム株式会社 (東京都千代田区永田町2-14-3) から入手できる。
- [0014] *Enterococcus Faecalis*-2001 株は、正常の人の糞便から採取することができ、下記の性質を有している。
- [0015] グラム陽性球菌である。コロニーの形 (トリプトソーヤ寒天培地、24 時間培養)：直径1.0 mm, スムーズ、正円形、白色コロニー菌形態：球から卵円形 (1.0 × 1.5 μ m) 液体培地でよく連鎖する。芽胞非形成。通性嫌気性。グルコースを発酵し乳酸産生 (最終 pH 4.3)。ガス非産生。カタラーゼ陰性。10~45℃で増殖 (最適は37℃)。pH 9.6、6.5% NaCl、40% bile に増殖。0.04% 亜テルルサンカリウム 陽性。0.01% テトラゾリウム 陽性。0.1% メチレンブルーミルク 陽性。アルギニンを加水分解。アミグダリン、セロビオース、フルクトース、ガラクトース、グルコース、グリセロール、ラクトース、マルトース、マンノース、マンニトール、リボース、サリシン、シュクロース、メレチトース、ソルビトールを発酵して酸産生。60℃、30分 耐性。カゼイン、ゲラチンを消化。チロシ

ンを脱炭酸しチラミンに。Lancefield抗原グループ D。GC% 35.0 ± 1.0%

エンテロコッカス・フェカリスは、死菌であるとよく、菌体には、破壊処理（ホモジナイズ処理、酵素処理、超音波処理など）、加熱、乾燥（凍結乾燥、噴霧乾燥など）等の処理が施されてもよい。加熱処理により、生菌が死菌となりうる。エンテロコッカス・フェカリスの死菌には腸管免疫賦活作用が期待できる。菌体の粒径は、0.05 μm ~ 50 μm であるとよく、好ましくは、0.08 ~ 20 μm であり、より好ましくは、0.1 ~ 10 μm である。菌体は、希釈剤と混合した後、糊料を添加して、顆粒状としてもよい。希釈剤や糊料は、食品や医薬品に添加するものとして許可されている材料から選択するとよい。

[0016] エンテロコッカス・フェカリスの死菌は、クロストリディオイデス ディフィシル菌の増殖に対して抑制的に作用する。クロストリディオイデス ディフィシル菌の増殖を抑制することにより、クロストリディオイデス ディフィシル菌感染症を予防及び/又は治療することができる。エンテロコッカス・フェカリスの死菌を非経口製剤の有効成分として、医薬に用いることができる。また、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を殺菌剤の有効成分として、医薬品や医薬部外品に用いることができる。エンテロコッカス・フェカリスの死菌を消毒剤の有効成分として、医療機器の殺菌や外用（ヒトや動物の皮膚）に用いることができる。エンテロコッカス・フェカリスの死菌を抗菌剤又は除菌剤の有効成分として、衛生用品に用いることができる。さらにまた、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を身体、器具、設備、施設などの洗浄に用いることにより、クロストリディオイデス ディフィシル菌の増殖を抑制することができる。よって、本発明は、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、クロストリディオイデス ディフィシル菌増殖抑制用殺菌剤、消毒剤、抗菌剤、除菌剤又は洗浄剤を提供する。また、本発明は、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、外用医薬品も提供する。さらに、本発明は、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、衛生用品も提供する。

[0017] 本発明において、エンテロコッカス・フェカリスの死菌を用いて、殺菌、消毒、除菌又は洗浄を行うには、エンテロコッカス・フェカリスの死菌をヒトや非ヒト動物の身体の表面（皮膚、粘膜など）に適用するとよい。あるいはまた、エンテロコッカス・フェカリスの死菌をヒトや非ヒト動物の身体が接触しうる器具、設備、施設などの表面に適用してもよいし、ヒトや非ヒト動物が呼吸をする空間に噴霧又は散布してもよい。

[0018] エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、殺菌剤、消毒剤、抗菌剤、除菌剤又は洗浄剤は、スプレー剤（エアゾール剤、ポンプスプレー剤）、貼付剤（水性型のパップ剤、油性型のプラスター剤など）、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、外用固形剤、外用液剤（リニメント剤、ローション剤など）などの剤形に製剤化され、外用医薬品（外用医薬組成物）、医薬部外品又は衛生用品として使用されるとよい。

製剤の基剤としては、炭化水素類（ワセリン、流動パラフィンなど）、高級脂肪酸及びそのエステル類（アジピン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、それらのエステルなど）、ロウ類（ミツロウ、ラノリンなど）、高級アルコール（セタノール、ステアリルアルコールなど）などの油性成分、水、多価アルコール（グリセリン、1, 3-プロパンジオール、プロピレングリコールなど）、低級アルコール（エタノール、イソプロパノールなど）などの水性成分、界面活性剤（ステアリン酸グリセリン、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルコールエーテル、カルボン酸塩、硫酸エステル塩など）、保存剤（パラオキシ安息香酸エステル類など）、抗酸化剤（亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸など）、pH調節剤（クエン酸水和物、乳酸、酢酸など）などを用いるとよい。

[0019] エンテロコッカス・フェカリスの死菌の製剤中における含量は、製剤の種類により異なるが、通常0.001～100質量%、好ましくは0.01～100質量%である。

[0020] エンテロコッカス・フェカリスの死菌の使用量は、クロストリディオイデス・ディフィシル菌の増殖抑制効果が確認できる量であればよく、剤型、適

用部位、患者の年齢、体重、基礎疾患の有無や種類などにより異なるが、例えば1回当たりの使用量は、成人の場合、エンテロコッカス・フェカリスの死菌の量に換算して、皮膚又は鼻腔・口腔内粘膜に0.01～500 mg/mL程度、好ましくは0.05～300 mg/mL程度、より好ましくは0.1～100 mg/mL程度の濃度で、1日に1回から数回（例えば、2回、3回、4回、5回程度）使用するとよい。エンテロコッカス・フェカリスの死菌をヒトや非ヒト動物以外に適用する（例えば、器具、設備、施設などの表面や空間に適用する）場合も、上記と同様の使用量で使用する事ができる。

[0021] エンテロコッカス・フェカリスの死菌は、ガーゼ、脱脂綿、アルコール綿、綿棒、包帯、マスク、手袋、絆創膏、サージカルテープ、清拭用品（タオル、シートなど）、ウェットティッシュ・クロス、おしぼり、石鹸、排泄用凝固剤などに添加してもよい。

[0022] エンテロコッカス・フェカリスの死菌を含有する、非経口医薬製剤は、外用剤〔スプレー剤（エアゾール剤、ポンプスプレー剤）、貼付剤（水性型のパップ剤、油性型のプラスター剤など）、軟膏剤、クリーム剤、ゲル剤、外用固形剤、外用液剤（リニメント剤、ローション剤など）〕、注射剤、輸液、眼科用剤（点眼剤、洗眼剤、眼軟膏剤など）、坐剤などの剤形に製剤化され、医薬品として使用することができる。

外用剤（スプレー剤など）の基剤としては、炭化水素類（ワセリン、流動パラフィンなど）、高級脂肪酸及びそのエステル類（アジピン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、それらのエステルなど）、ロウ類（ミツロウ、ラノリンなど）、高級アルコール（セタノール、ステアリルアルコールなど）などの油性成分、水、多価アルコール（グリセリン、1, 3-プロパンジオール、プロピレングリコールなど）、低級アルコール（エタノール、イソプロパノールなど）などの水性成分、界面活性剤（ステアリン酸グリセリン、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルコールエーテル、カルボン酸塩、硫酸エステル塩など）、保存剤（パラオキシ安息香酸エステル類など）、抗酸化剤（亜硫酸水素ナトリウム、アスコルビン酸など

）、pH調節剤（クエン酸水和物、乳酸、酢酸など）などを用いるとよい。外用剤は、皮膚、鼻腔又は口腔粘膜に適用されるとよい。

注射剤及び輸液は、溶剤〔水性溶剤（蒸留水、生理食塩水、リンゲル液など）、非水性溶剤（エタノール、プロピレングリコール、植物油など）〕、溶解補助剤（グルタミン酸、アスパラギン酸、ポリソルベート80など）、保存剤（塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムなど）、安定化剤（亜硫酸塩、ピロ亜硫酸ナトリウムなど）、乳化剤・懸濁剤（レシチン、モノステアリン酸アルミニウムなど）、緩衝剤（酸、アルカリ、クエン酸塩など）、着色剤などを用いて製剤化することができる。製剤は、製造の最終工程において滅菌するか、無菌操作法によって製造されるとよい。また、無菌の凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌の注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。注射剤及び輸液は、皮膚内又は皮膚若しくは粘膜を通して体内に適用される。鼻腔を通して適用されてもよい。投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与、鼻腔内投与が挙げられる。

点眼剤は、溶剤〔水性溶剤（滅菌精製水、生理食塩水など）、非水性溶剤（エタノール、プロピレングリコール、植物油など）〕、緩衝液、等張化剤、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウムなど）、粘稠剤（メチルセルロース、コンドロイチン硫酸など）、懸濁化剤（非イオン性界面活性剤など）、着色剤などを用いて製剤化することができる。

洗眼剤は、生理食塩液、ホウ酸液、塩化ベンゼトニウム、緩衝液などを用いて調製することができる。

眼軟膏剤は、基剤として、パラフィン、流動パラフィンなどを用いて、必要に応じて、保存剤、安定化剤などを添加して、製剤化することができる。

坐剤は、基剤〔油脂性基剤（カカオ脂、ヤシ油、パーム核油など）、水溶性基剤（グリセロゼラチン、マクロゴールなど）〕、界面活性剤（レシチン、コレステロールなど）などを用いて製剤化することができる。

- [0023] エンテロコッカス・フェカリスの死菌の医薬製剤中における含量は、製剤の種類により異なるが、通常0.001~100質量%、好ましくは0.01~100質量%である。
- [0024] エンテロコッカス・フェカリスの死菌の投与量は、クロストリディオイデス・ディフィシル菌の増殖抑制効果が確認できる量であればよく、剤型、適用部位、患者の年齢、体重、基礎疾患の有無や種類などにより異なるが、例えば1回当たりの投与量は、成人の場合、エンテロコッカス・フェカリスの死菌の量に換算して、0.01~500 mg/mL程度、好ましくは0.05~300 mg/mL程度、より好ましくは0.1~100 mg/mL程度の濃度で、1日に1回から数回（例えば、2回、3回、4回、5回程度）投与するとよい。
- [0025] また、本発明の抗菌剤を製品にコーティングしたり、練りこむことにより、抗菌タオル、抗菌プラスチック食器製品、抗菌玩具類、抗菌PC関連製品、抗菌文房具などを製造することもできる。

実施例

- [0026] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

〔実施例1〕 乳酸菌EF-2001株のクロストリディオイデス・ディフィシル菌に対する作用確認試験

要約

乳酸菌のクロストリディオイデス・ディフィシル菌に対する作用を検討した。

接種菌液1 mLに対して、乳酸菌の低濃度液（1.63 mg/mL）あるいは高濃度液（163 mg/mL）を0.65 mLの割合で添加し、乳酸菌の濃度が0.64 mg/mLあるいは64 mg/mLの条件下でクロストリディオイデス・ディフィシル菌を嫌気培養した。培養開始時、培養後12時間、24時間及び48時間の生菌数を測定した。乳酸菌の低濃度（0.64 mg/mL）及び高濃度（64 mg/mL）条件下とも、培養後12時間、24時間及び48時間で、対照群と比較してクロストリディオイデス・ディフィシル菌の生菌数の有意な減少が認められた。このことから、乳酸菌は

、クロストリディオイデス・ディフィシル菌の増殖に対して抑制的に作用することが推測された。

材料及び方法

1. 被験物質

1.1. 被験物質

名称：乳酸菌粉末EF-2001（日本ベルム株式会社）（加熱殺菌した*E. faecalis*、径は500 nm=0.5 μm）

性状：黄褐色の粉末

保管条件：室温（18.0～28.0℃）、遮光、防湿

保管場所：試験施設の被験物質保管室の保管庫

2. 投与検体

2.1. 被験物質の調製方法

乳酸菌粉末EF-2001の必要量を秤量（電子天秤：XP205DR、メトラー・トレド株式会社）し、GAMブイヨン（15.3.4.参照）で500 mg/mLとなるように調製した。この500 mg/mL液を用いてGAMブイヨンで163 mg/mL及び1.63 mg/mLとなるように希釈した。乳酸菌粉末は沈殿するため、良く攪拌し、懸濁した。用時調製とした。

3. 病原微生物

3.1. 使用菌株

Clostridioides(*Clostridium*) *difficile* (ATCC43255、以下*C. difficile*)

3.2. 保存条件

超低温フリーザー（設定温度：-80℃、MDF-394AT、三洋電機株式会社）で用時まで凍結保存した。

3.3. 試薬

- (1) GAM寒天培地（日水製薬株式会社）
- (2) GAMブイヨン培地（日水製薬株式会社）
- (3) 生理食塩液（株式会社大塚製薬工場）

3.4. GAMブイヨンの調製

GAMブイオン粉末を29.5 g秤量し、注射用水（株式会社大塚製薬工場）500 mLに懸濁後、オートクレーブ（LSX-500、株式会社トミー精工）処理（115℃、15分間）した。調製後は冷蔵の条件下で保存した。

3.5. 前培養

*C. difficile*の保存菌株を解凍し、GAM寒天培地に接種し、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37℃設定の恒温器（ILE800、ヤマト科学株式会社）で5日間培養した。培養後、コロニーを釣菌し、GAMブイオン培地に加え、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37℃設定の恒温器で2日間培養した。培養後の培養液を接種菌原液とした。

3.6. 接種菌液の調製及び生菌数測定

接種菌原液をGAMブイオン培地で10倍希釈したものを接種菌液とした。

生菌数確認は、接種菌液の一部を採取し、生理食塩液で適宜希釈し、GAM寒天培地に塗抹後、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37℃設定の恒温器で5日培養した。培養後のコロニー数をハンディコロニーカウンター（CC-1、アズワン株式会社）で計測し、接種菌液1 mL中に含まれる生菌数を算出した。その結果、接種菌液濃度は 2.8×10^5 CFU/mLであった。

使用後の残余接種菌液は、オートクレーブ（LSX-500、株式会社トミー精工）処理（121℃、15分間）したのち、廃棄した。

4. 試験方法

4.1. 増殖抑制試験

4.1.1. 試験群構成

群	試験群	被験物質濃度 (mg/mL)	<i>C. difficile</i> 菌液濃度 (CFU/mL)
1	対照	0*	1.7×10^5
2	低濃度	0.64	1.7×10^5
3	高濃度	64	1.7×10^5

表示濃度は混合後の最終濃度。

* : GAMブイオンを添加した。

4.1.2. 試験方法

試験管に接種菌液1 mLに対して、調製した検体液（1.63 mg/mL液及び163 mg/mL液）をそれぞれ0.65 mLの割合で添加し、脱酸素剤を充填した嫌気ジャーに入れ、37℃設定の恒温器で培養した。培養開始時、培養12、24及び48時間後にそれぞれ試験管を取り出し、培養液の一部を採取し、適宜希釈して、CCFA培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）に培養液原液、希釈液を塗抹後、37℃設定の恒温器で5日間嫌気培養した。培養後のコロニー数をハンディコロニーカウンターで計測し、生菌数を算出した。対照として、検体液の代わりにGAMブイヨンを加えた。サンプル数は5とした。

5. 結果のまとめ

生菌数は平均値及び標準誤差を算出した。

有意差検定は、生菌数について、対照群vs 検体群でWilcoxonの順位和検定を用いて行った。

危険率は5%を有意とし、それぞれ5%未満及び1%未満に分けて表示した。

なお、統計解析は市販の統計プログラム（SASシステム：SASインスティテュートジャパン）を用いた。

試験成績

試験結果をTable 1、Appendix 1-1～1-3及び図1に示した。

対照群のクロストリディオイデス・ディフィシル菌の生菌数は、培養開始時で 360.0 ± 75.9 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養12時間後で 3680.0 ± 239.6 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養24時間後で 3880.0 ± 475.8 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養48時間後で 33020.0 ± 2267.5 ($\times 10^3$ CFU/mL)であった。

低濃度群のクロストリディオイデス・ディフィシル菌の生菌数は、培養開始時で 306.0 ± 22.7 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養12時間後で 33.2 ± 4.9 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養24時間後で 27.1 ± 6.7 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養48時間後で 15.7 ± 4.9 ($\times 10^3$ CFU/mL)であった。対照群と比較して、培養後12時間、24時間及び48時間で有意な生菌数の減少が認められた。

高濃度群のクロストリディオイデス・ディフィシル菌の生菌数は、培養開始時で 300.0 ± 22.1 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養12時間後で 12.0 ± 1.1 ($\times 10^3$ CFU/

mL)、培養24時間後で 8.4 ± 3.4 ($\times 10^3$ CFU/mL)、培養48時間後で 5.7 ± 3.2 ($\times 10^3$ CFU/mL)であった。対照群と比較して、培養後12時間、24時間及び48時間で有意な生菌数の減少が認められた。

考察

乳酸菌のクロストリディオイデス・ディフィシル菌に対する作用を、経時的に生菌数を測定することにより検討した。

乳酸菌の低濃度 (0.64 mg/mL) 及び高濃度 (64 mg/mL) 条件下とも、培養後12時間、24時間及び48時間で、対照群と比較してクロストリディオイデス・ディフィシル菌の生菌数の有意な減少が認められた。このことから、乳酸菌はクロストリディオイデス・ディフィシル菌の増殖に対して抑制的に作用することが推測された。

[0027] (Table 1)

Table 1. Viable count

Group	Control	Low concentration	High concentration
Number of samples	5	5	5
Hours after incubation			
0	3680.0 $\pm$ 75.9	306.0 $\pm$ 22.7	300.0 $\pm$ 22.1
12	3680.0 $\pm$ 239.6	33.2 $\pm$ 4.9 **	12.0 $\pm$ 1.1 **
24	3880.0 $\pm$ 475.8	27.1 $\pm$ 6.7 **	8.4 $\pm$ 3.4 **
48	33020.0 $\pm$ 2267.5	15.7 $\pm$ 4.0 **	5.7 $\pm$ 3.2 **

Each value shows mean ($\times 10^3$ CFU/mL) $\pm$ S.E.

Significantly different from the control group (**; $p < 0.01$).

[0028] (Appendix 1-1~1-3)

Appendix 1-1. Individual viable count

Control group				
Sample No.	Hours after incubation			
	0	12	24	48
1	660.0	4500.0	5200.0	24200.0
2	310.0	3200.0	2600.0	36900.0
3	250.0	3200.0	3000.0	35700.0
4	310.0	3700.0	4200.0	34500.0
5	270.0	3800.0	4400.0	33800.0
Number of samples	5	5	5	5
Mean	360.0	3680.0	3880.0	33020.0
S.E.	75.9	239.6	475.8	2267.5

Unit: $\times 10^3$ CFU/mL.

Appendix 1-2. Individual viable count

Low concentration group				
Sample No.	Hours after incubation			
	0	12	24	48
1	340.0	33.0	41.0	13.0
2	370.0	33.0	1.7	31.0
3	240.0	17.0	33.0	0.5
4	280.0	35.0	31.0	15.0
5	300.0	48.0	29.0	19.0
Number of samples	5	5	5	5
Mean	306.0	33.2	27.1	15.7
S.E.	22.7	4.9	6.7	4.9
Significance	NS	**	**	**
Statistical method	WL	WL	WL	WL

Unit: $\times 10^3$ CFU/mL.Significantly different from the control group (**: $p < 0.01$).

NS: Not significantly different from the control group.

WL: Analysis by Wilcoxon's test.

Appendix 1-3. Individual viable count

High concentration group				
Sample No.	Hours after incubation			
	0	12	24	48
1	340.0	13.0	0.4	0.5
2	290.0	9.0	0.4	0.4
3	240.0	13.0	15.0	0.5
4	360.0	10.0	10.0	15.0
5	270.0	15.0	16.0	12.0
Number of samples	5	5	5	5
Mean	306.0	12.0	8.4	5.7
S.E.	22.1	1.1	3.4	3.2
Significance	NS	**	**	**
Statistical method	WL	WL	WL	WL

Unit: $\times 10^3$ CFU/mL.Significantly different from the control group (**: $p < 0.01$).

NS: Not significantly different from the control group.

WL: Analysis by Wilcoxon's test.

[0029] [製品例1] 除菌液、抗菌スプレー剤、除菌シート

下記の処方で、除菌液を調製した。

(処方)

乳酸菌粉末EF-2001 (日本ベルム株式会社) (加熱殺菌した*E. faecalis*、径は500 nm=0.5 μ m) 0.6 質量%

グリセリン0.05 質量%

カプリン酸モノグリセリド0.50 質量%

エタノール50 質量%

精製水 残量

全量100 質量%

上記溶液を市販のポンプ式スプレー容器に充填し、抗菌スプレー剤を製造した。また、上記溶液をガーゼやティッシュに浸して除菌シートを製造した。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0030] 本発明は、クロストリディオイデス・ディフィシル菌の感染症の予防及び/又は治療、殺菌、消毒、除菌、洗浄などに利用できる。