

イメディカ 株式会社 様

試験報告書

洗浄剤「エコノミックプロ」塗布試料による

大腸菌に対する抗菌試験（持続性試験）

～JIS Z 2801 準拠～

北生発 2016_0037 号

2016 年 5 月 27 日

神奈川県相模原市南区北里 1 丁目 15 番 1 号
一般財団法人 北里環境科学センター
理事長 伊藤 俊 洋

試験内容を公表する際は、結果の表記等について専門的な立場から確認させていただいております。なお、確認目的と申込様式は、ホームページに掲載しております。
(http://www.kitasato-e.or.jp/?page_id=87)

1. 試験目的

洗浄剤「エコノミックプロ」塗布試料による、大腸菌に対する抗菌効果を確認することを目的とした。尚、本試験は「JIS Z 2801:2012 抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果」（以下、JIS Z 2801 と記載）を参考とし、試験品を硬質表面（ポリスチレン素材）に塗布・乾燥後の、大腸菌に対する抗菌効果の持続性を評価した。

2. 依頼者

名 称：イメディカ 株式会社

所在地：〒350-0042 埼玉県川越市中原町 2-7-8

3. 試験機関

名 称：一般財団法人 北里環境科学センター

所在地：〒252-0329 神奈川県相模原市南区北里 1-15-1

担 当：微生物部バイオ技術課

4. 試験期間

2016年5月10日～2016年5月26日

5. 試験品

1) 試験品

① 洗浄剤「エコノミックプロ」

（貴社情報：*Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium* 等が原液中に合計 10^7 CFU/mL 程度含まれる）

② O社製「次亜系殺菌消毒剤」（次亜塩素酸ナトリウム 6%溶液）

2) 試験液

「エコノミックプロ」は蒸留水を用いて 10%（10倍希釈）および 1%（100倍希釈）に、「次亜系殺菌消毒剤」は 300倍希釈し、これを試験液とした。

3) 受領日

2016年5月9日

6. 使用材料および培地・試薬

1) 材料

細胞培養用ディッシュ（ependorf, ϕ 60 mm \times 15 mm, polystyrene, 以下、試験片用シャーレと記載）※1

※1: 細胞培養処理（Tissue culture treated）をした親水性シャーレ

2) 培地

- ① Tryptic Soy Agar (Difco, 以下、TSA と記載)
- ② 普通ブイヨン培地 (栄研化学, 以下、NB と記載)
- ③ SCDLP ブイヨン培地 (栄研化学, 以下、SCDLP と記載)
- ④ XM-G 培地 (日水製薬, 以下、XM-G と記載)

3) 試薬

- ① 大塚蒸留水 (大塚製薬, 日本薬局方 注射用水, 硬水調製用, 以下、蒸留水と記載)
- ② 塩化ナトリウム (和光純薬工業, 以下、0.85%溶液を生理食塩液と記載)

7. 試験品塗布試料 (試験片) の作製

試験液を試験片用シャーレに塗布・乾燥させて、以下の試験品塗布試料 (以下、試験片と記載) を作成した。

1) 試験片の種類

- ① 試験片 A: 「エコミックプロ」10%溶液を1回塗布, 以降1%液を9回塗布
- ② 試験片 B: 「エコミックプロ」1%溶液を10回塗布
- ③ 試験片 C: 「エコミックプロ」10%溶液を1回塗布, 以降1%液を2回塗布
- ④ 試験片 D: 「次亜系殺菌消毒剤」300倍希釈液・1回塗布

2) 作製スケジュール

表-1 参照。

表-1. 作製スケジュール

	試験液	塗布回数	塗布日									
			5/10 (火)	5/11 (水)	5/12 (木)	5/13 (金)	5/16 (月)	5/17 (火)	5/18 (水)	5/19 (木)	5/20 (金)	5/23 (月)
試験片A	「エコミックプロ」 1日目:10% その後1%	10回	塗布1回	塗布2回	塗布3回	塗布4回	塗布5回	塗布6回	塗布7回	塗布8回	塗布9回	塗布10回
試験片B	「エコミックプロ」 1%	10回	塗布1回	塗布2回	塗布3回	塗布4回	塗布5回	塗布6回	塗布7回	塗布8回	塗布9回	塗布10回
試験片C	「エコミックプロ」 1日目:10% その後1%	3回				塗布1回			塗布2回			塗布3回
試験片D	「次亜系 殺菌消毒剤」 300倍希釈液	1回										塗布1回

3) 作製方法詳細

試験片用シャーレ内を、消毒用エタノールを適量含ませた脱脂綿で拭き上げ、完全に乾

燥させた（以下、前処理と記載）。乾燥後、試験液を 1 mL ^{※2} 滴下し、振盪培養器（タイテック, Shake-LR）に乗せて試験液がシャーレ全体に均一に行き渡るように振盪しながら、半日～1 日かけて完全に乾燥させ、試験片とした（写真-1 参照）。尚、試験片 A および B は、前記操作を 10 回、試験片 C は 3 回行った。

※2: 洗剤・石けん公正取引協議会が定める「住宅用合成洗剤及び石けんの除菌活性試験方法」の解説 1.5 試験試料, b) 試験試料接種量より、試験片用シャーレの面積から接種量を計算し、試験液をスプレーボトルに入れて用いる場合を想定したスプレー1 回の相当量を 1 mL とした。



写真-1. 試験片作成状況

8. 試験菌および試験菌液の調製

1) 試験菌

Escherichia coli NBRC3972（大腸菌）

2) 試験菌液の調製

凍結保存された菌株を TSA で 36 ± 2 °C・18 時間培養した。発育した集落をかき取り、1/500 濃度の NB で約 10^2 個/mL に調製し、これを試験菌液とした。

9. 試験方法

「JIS Z 2801」に準拠した。詳細を以下に示した。

1) 試験片への菌液接種および作用

試験菌液 0.7 mL を試験片に均一に行き渡るように接種し、湿度 90%RH 以上、温度 35 ± 1 °C で、24 時間作用させた。尚、試験液を塗布していない試験片を対照とした。

2) 菌数測定

24時間作用後に試験片内に 10 mL の SCDLP を加え、10 回ピペッティングを行って試験片表面から試験菌を洗い出して菌数測定用試料液とした。これを試料原液として、滅菌生理食塩液で希釈液を作製し、試料原液および希釈液の各 1 mL をシャーレに移し、XM-G 約 20 mL と混合、固化させて 37 ± 1 °C で 18 時間培養した。培養後、培地上に発育した集落を数えて、試験片 1 枚あたりの試験菌数を求めた（定量下限値 10 CFU/試験片）。

3) 抗菌活性値の算出

得られた試験菌数から、下記式を用いて抗菌活性値（ R ）を算出した。

$$R = (U_t - U_0) \cdot (A_t - U_0) = U_t \cdot A_t$$

R : 抗菌活性値（数値は小数点以下 2 桁目を切り捨て、小数点 1 桁で表示）

U_0 : 無加工試験片（対照）の接種直後の生菌数の対数値の平均値

U_t : 無加工試験片（対照）の 24 時間後の生菌数の対数値の平均値

A_t : 抗菌加工試験片（試験液塗布試験片）の 24 時間後の生菌数の対数値の平均値

10. 試験結果

大腸菌に対する抗菌試験結果を表-2 に示した。

対照（試験液塗布無し試験用シャーレ）24 時間後の試験菌数、対数値の平均値（以下、 U_t と記載）は、7.09 であった。

「エコノミックプロ」試験液で作製した試験片 A, B, C では、24 時間後の試験菌数、対数値の平均値（以下、 A_t と記載）が全て 1.0（定量下限値未満）となり、抗菌活性値は 6.0 であった。一方、「次亜系殺菌消毒剤」300 倍希釈液を 1 回塗布・乾燥させた試験片 D の A_t は、対照の U_t とほぼ同等の 7.01 となり、抗菌活性値は 0.0 以下となった。また、参考として培養後の培地を写真-2 に示した。

11. コメント

本試験では、「エコノミックプロ」希釈液を硬質表面にスプレーし、乾燥した後でも抗菌性能が持続しているかを確認することを目的として評価を行った。

すなわち、「エコノミックプロ」10%または 1%溶液を硬質表面に塗布・乾燥させ、「JIS Z 2801」による試験法により抗菌性を調べた。尚、試験方法は既報（北生発 2015_0365 号）に準じたが、試験片用シャーレの試験菌増殖性を高めるために前処理工程^{※3}を追加した。

その結果、「エコノミックプロ」試験液で作製した試験片 A, B, C は、全て定量下限値未満となり、持続的な抗菌性が期待できることが明らかとなった。一方、「次亜系殺菌消毒剤」300 倍希釈液を 1 回塗布・乾燥させた試験片は、対照と同等の試験菌増殖が認められ、持

統的な抗菌効果は認められなかった。

本試験では清浄条件下を想定して、接種する試験菌数を「JIS Z 2801」の規定菌数よりも少ない条件下（約 1/1000）で評価した。そのため今後は、汚れた条件を想定した実使用モデルに対する効果の検証が望まれる。

※3: 既報（北生発 2015_0365 号）の結果より、「次亜系殺菌消毒剤」で作製した試験片では試験菌の増殖が認められたのに対し、対照とした試験液塗布なしの試験片においては増殖が認められなかった。この結果より、試験片用シャーレの細胞培養処理が試験菌の増殖に影響を与えることが推測された。そこで本試験では、試験片用シャーレの前処理を行うことで、試験菌の増殖性に影響を与えないようにした。

以上

表-2. 大腸菌に対する抗菌試験結果

試験片名	試験液 ^{※4} 塗布回数 (合計 塗布量)	繰返 n数	作用時間 (hr)				抗菌活性値 R ^{※5} $R=U_t \cdot A_t$
			直後		24		
			試験菌数 個/試験片	対数值	試験菌数 個/試験片	対数值	
対照 (シャーレ) 試験液塗布なし	—	1	3.8×10^2	2.580	1.2×10^7	7.079	
		2	3.4×10^2	2.531	1.2×10^7	7.079	
		3	4.2×10^2	2.623	1.3×10^7	7.114	
		平均値		2.58 U_0		7.09 U_t	
試験片A 「エコミックプロ」 1回: 10%溶液 2~10回: 1%溶液	10回 (10%: 1 mL) (1%: 9 mL)	1			<10	1.000	6.0
		2			<10	1.000	
		3			<10	1.000	
		平均値				1.00 A_t	
試験片B 「エコミックプロ」 1~10回: 1%溶液	10回 (1%: 10 mL)	1			<10	1.000	6.0
		2			<10	1.000	
		3			<10	1.000	
		平均値				1.00 A_t	
試験片C 「エコミックプロ」 1回: 10%溶液 2・3回: 1%溶液	3回 (10%: 1 mL) (1%: 2 mL)	1			<10	1.000	6.0
		2			<10	1.000	
		3			<10	1.000	
		平均値				1.00 A_t	
試験片D 「次亜系 殺菌消毒剤」 300倍希釈液	1回 (1 mL)	1			1.0×10^7	7.000	—
		2			1.1×10^7	7.041	
		3			1.0×10^7	7.000	
		平均値				7.01 A_t	

試験菌: *Escherichia coli* NBRC3972 (大腸菌)

対数值を計算する際、<10 は 10 とした。

※4: 1 mL = スプレー 1 回相当量

※5: $R = (U_t \cdot U_0) \cdot (A_t \cdot U_0) = U_t \cdot A_t$ (抗菌活性値が 0 以下の場合は「—」と示した)

R : 抗菌活性値 (数値は小数点以下 2 桁目を切り捨て、小数点 1 桁で表示)

U_0 : 無加工試験片 (対照) の接種直後の生菌数の対数值の平均値

U_t : 無加工試験片 (対照) の 24 時間後の生菌数の対数值の平均値

A_t : 抗菌加工試験片 (試験液塗布試験片) の 24 時間後の生菌数の対数值の平均値

参考

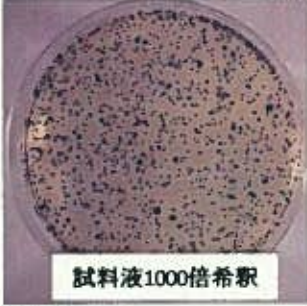

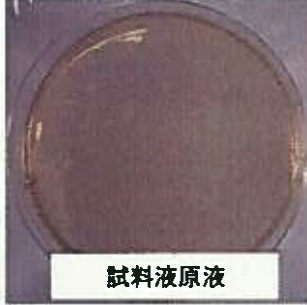

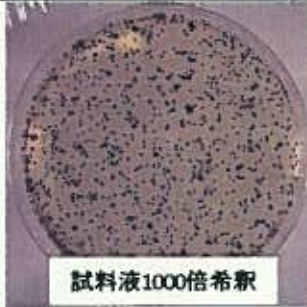
試験片	試験液 塗布回数 (合計塗布量)	24 時間作用後
対照 (シャーレ) 試験液塗布なし	—	 試料液1000倍希釈
試験片A 「エコノミックプロ」 1回: 10%溶液 2~10回: 1%溶液	10回 (10%: 1 mL) (1%: 9 mL)	 試料液原液
試験片B 「エコノミックプロ」 1~10回: 1%溶液	10回 (1%: 10 mL)	 試料液原液
試験片C 「エコノミックプロ」 1回: 10%溶液 2・3回: 1%溶液	3回 (10%: 1 mL) (1%: 2 mL)	 試料液原液
試験片 D 「次亜系 殺菌消毒剤」 300倍希釈液	1回 (1 mL)	 試料液1000倍希釈

写真-2. 大腸菌に対する抗菌試験結果 (参考)

[対照および試験片 D の青色コロニー: 大腸菌, A~C のコロニー: エコノミックプロ含有菌]