

繊維製品の抗菌性試験の実施体制の確立Ⅱ

川 戸 伸 一*

繊維製品の抗菌性試験について、2020 年度の検討で概ね当センターで実施できる見込みを得たが、定量試験の菌液吸収法では繊維製品に接種した菌が増殖しない事例や接種菌濃度の規定範囲逸脱事例がみられたことから、菌液の調製について追加検討を行い、安定して試験の実施が可能となった。また、定性試験のハロー法の菌液濃度の事例を整理し、一定の吸光度で規定濃度範囲の菌液が調製できることが確認できた。併せて、菌液吸収法を生菌数ではなく ATP (adenosine triphosphate: アデノシン三リン酸) の量で定量する手法 (ATP 発光測定法) を検討し、同法で実施する際の課題が明らかになった。

1 はじめに

2019 年 12 月から世界中に拡大した新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) による繊維製品の抗ウイルス性・抗菌性機能への注目の高まりを受けて、2020 年度に「繊維製品の抗菌性試験の実施体制の確立」¹⁾ に取り組み、当センターで繊維製品の抗菌性試験 (菌液吸収法及びハロー法) を概ね実施できる見込みが得られた。課題として、菌液吸収法では繊維製品に接種した菌が増殖しない事例や接種菌濃度の規定範囲逸脱事例がみられたことから、菌液の調製について追加検討を行った。

また、2021 年度は繊維加工の検討で抗菌性を持つ薬剤の試験布への定着確認の為にハロー法を多数回実施したことから、同法実施時の事例を整理し、調製菌液濃度と吸光度の関係を検討した。

併せて、菌液吸収法を生菌数ではなく ATP 量で定量する方法 (ATP 発光測定法) を行い、同法で実施する際の課題を検討した。

2 試薬・機器

2.1 試薬・培地等

純水、トリプトンソーヤブイオン (日水製薬 (株))、標準寒天培地 (日水製薬 (株))、乾燥ブイオン (日水製薬 (株))、普通寒天培地 (日水製薬 (株))、塩化ナトリウム

(特級) (富士フィルム和光純薬 (株))、ポリソルベート 80 (富士フィルム和光純薬 (株)) を用いた。

試験菌株は 2020 年に (独) 製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター (NBRC) より黄色ぶどう球菌 (*Staphylococcus aureus* NBRC No.12732) 及び肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumonia* NBRC No.13277) の乾燥標品を入手し、乾燥標品から復元したものをグリセロール (MP Biomedicals) を含む液体培地に加え、1.5 mL チューブに約 0.5 mL ずつ分注してディープフリーザーにマイナス 60 °C で冷凍保存しているものを用いた¹⁾。

ATP 発光測定法による定量は、前述の試薬・培地等に加え、りん酸二水素ナトリウム (富士フィルム和光純薬 (株))、スクロース (富士フィルム和光純薬 (株))、ルシフェール ATP 標準試薬セット (キッコーマンバイオケミファ (株))、ルシフェール HS セット (キッコーマンバイオケミファ (株)) を用いた。

2.2 使用機器

純水製造装置 Elix Essential UV3 (Merck)、乾熱器 STAC-5100 ((株) 島津理化)、精密天秤 Cubis MCE125S-2S01-U (Sartorius)、電子天秤 UW6200H ((株) 島津製作所)、オートクレーブ SP200F (ヤマト科学 (株))、ウォーターバス BM500 (ヤマト科学 (株))、シェーキングバス BW201 (ヤマト科学 (株))、安全キャビネット

*企画連携課 主任研究員

(2021 年度研究課題)

SCV1907EC II AB3 (日立アプライアンス(株))、低温インキュベータ BITEC-300 ((株)島津理化)、分光光度計 UV-2450 ((株)島津製作所)、攪拌機 Vortex Genie2 (Scientific Industries)、ディープフリーザー-VT-78 (日本フリーザー(株))、ルミテスター-C-110 (キッコーマンバイオケミファ(株))を用いた。

3 試験方法

3.1 菌液吸収法の接種菌濃度及び増殖能力の確認

ディープフリーザーにマイナス 60 °C で 1.5 mL チューブ中に冷凍保存している菌株から菌を復元後¹⁾、JIS L1902 8.1 菌液吸収法に従い前培養 A (標準寒天培地に画線塗抹培養)、B 及び C (トリプトンソーヤブイオン培地による振とう培養。B は 19 時間、C は 3 時間培養)を行った。前培養 C 終了後の培養液を 20 倍希釈トリプトンソーヤブイオン培地を用いて希釈し、分光光度計で菌液の吸光度測定 (600 nm) 及び混釈平板培養法による生菌数の測定を行った。

最初に培養液を 2、5、10、20、40 倍に希釈した菌液 (10^8 CFU/mL レベル) の吸光度を測定後、20 倍希釈トリプトンソーヤブイオン培地で 10^3 倍に段階希釈し接種菌液 (10^5 CFU/mL レベル) とし、これらの菌液の生菌数を測定した。得られた測定結果を用い、規定菌数範囲となる目標吸光度に調製した菌液の生菌数及びこれを試験片 (添付白布 綿 3-1 号) に接種して 20 時間培養後の生菌数 (増殖値) の測定を行った。

吸光度と生菌数の関係及び試験片での増殖値は、冷凍保存しているチューブ毎や継代培養の回数により違いが生じるのではないかと考え、冷凍保存しているチューブから 4 回復元し、また継代培養は 8 代まで行い、それぞれ接種菌液の吸光度と生菌数の測定及び試験片へ接種後の増殖値の測定を行った。

3.2 ハロー法実施時の調整菌液濃度と吸光度確認

ハロー法は JIS L1902 附属書 JA に従い行った。試験は継代培養していたものを標準寒天培地に画線塗抹して培養後、ブイオン培地に移植して一晚培養後の培養液を別のブイオン培地で適宜希釈した菌液の吸光度測定 (600 nm) 及び混釈平板培養法による生菌数の測定

を行った。

なお、実際のデータは、試験法の検討を新たに行ったのではなく、別の繊維加工の検討で抗菌性を持つ薬剤の試験布への定着確認の為にハロー法を多数回実施した際のデータ (黄色ぶどう球菌: 25 回、肺炎桿菌: 23 回) を整理することで得た。

3.3 菌液吸収法のATP発光測定法による定量

ATP 標準試薬を用いて 2×10^{-8} 、 2×10^{-9} 、 2×10^{-10} mol/L の ATP 標準試料を準備し、ルシフェール HS セットの発光試薬 (ルシフェリン、ルシフェラーゼ及び酢酸マグネシウムを主成分とした凍結乾燥品をトリシン緩衝液で溶解したもの) を加えてルミテスターで発光量を測定し、検量線を作成してから前培養 C 終了後の培養液を適宜希釈して規定 ATP 濃度の接種菌液を調製した。

接種菌液を試験片 (添付白布 綿 3-1 号) に接種し、接種直後及び 20 時間培養後に不活化剤 (ポリソルベート 80) を含んだ生理食塩水で試験片の洗い出しを行い、菌液調製用緩衝液 (スクロース及びりん酸二水素ナトリウムで調製)、ルシフェール HS セットの ATP 抽出試薬 (界面活性剤) 及び発光試薬を加えてルミテスターで発光量を測定、別途作成した洗い出し用の検量線より ATP 量を求めた。

4 結果

4.1 菌液吸収法の接種菌濃度及び増殖能力の確認

冷凍保存チューブからの菌復元を 2021 年 2 月から 2022 年 1 月にかけて 3~4 ヶ月毎に 1 回、計 4 回復元を行い、調製した菌液の吸光度と生菌数を測定し、図 1 及び図 2 が得られた。得られたデータから図中に対数近似曲線を描いている。肺炎桿菌に比べて黄色ぶどう球菌は、同じ吸光度でも復元毎に生菌数の違いが大きく、曲線同士の間隔が広がっている。

継代培養を重ねた場合について、2021 年 2 月に冷凍保存チューブから復元したものをを用い、黄色ぶどう球菌は 7 代、肺炎桿菌は 8 代まで継代培養を行い、菌液の吸光度と生菌数を測定し、図 3 及び図 4 が得られた。異なる冷凍保存チューブからの復元の場合と比べて、曲線同士の間隔の広がり小さかった。特に肺炎桿菌

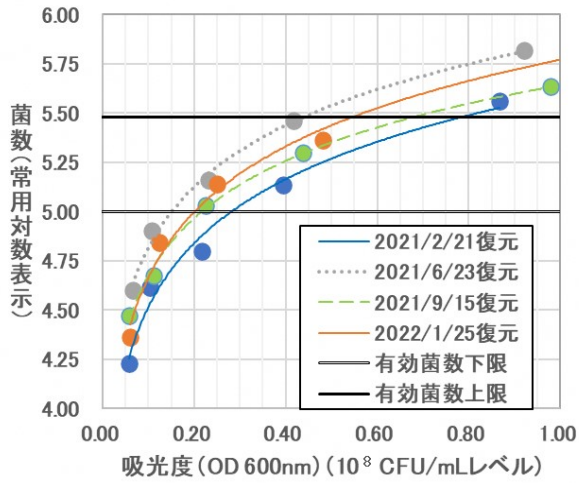


図1 冷凍保存チューブからの復元毎の吸光度-菌数曲線(黄色ぶどう球菌)

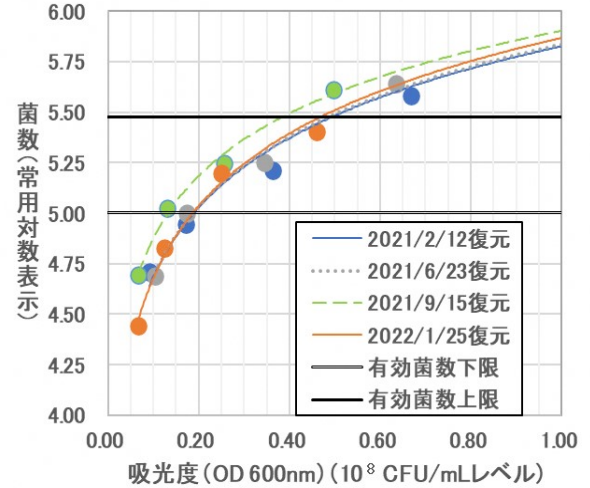


図2 冷凍保存チューブからの復元毎の吸光度-菌数曲線(肺炎桿菌)

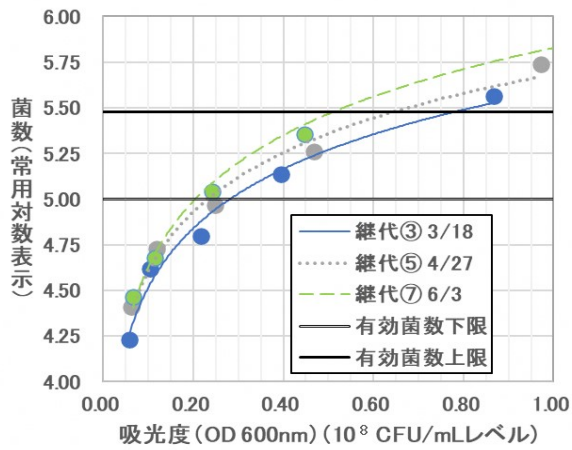


図3 継代培養回数毎の吸光度-菌数曲線(黄色ぶどう球菌 2021年2月21日冷凍物から復元丸数字は継代回数)

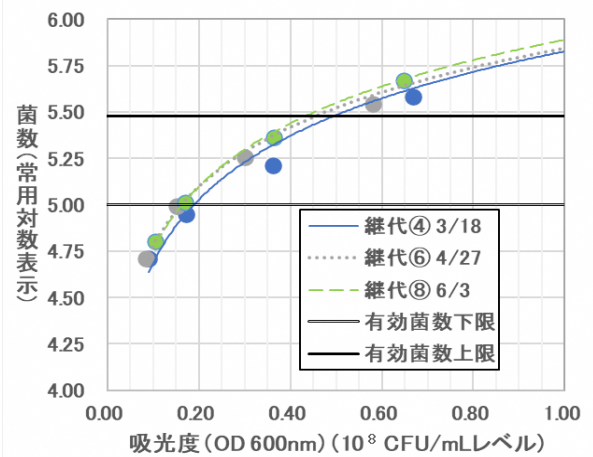


図4 継代培養回数毎の吸光度-菌数曲線(肺炎桿菌 2021年2月12日冷凍物から復元丸数字は継代回数)

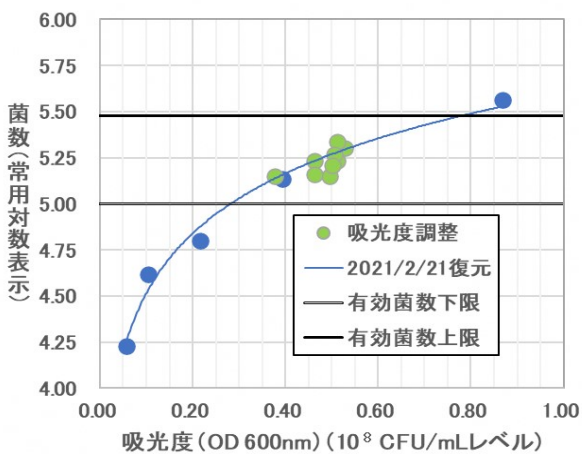


図5 吸光度-菌数曲線から濃度調製した菌液データ(黄色ぶどう球菌)
曲線は2021年2月21日冷凍物を復元し作成

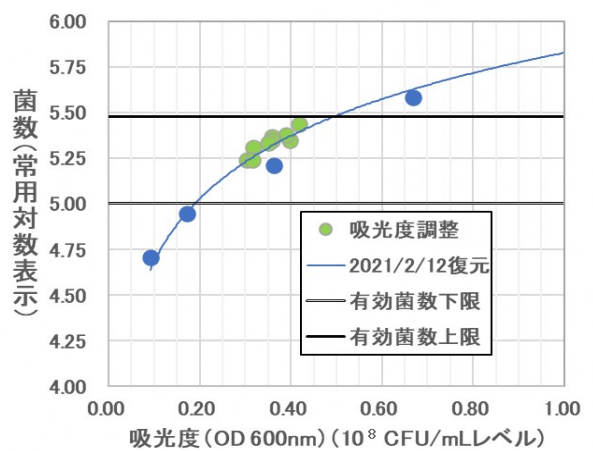


図6 吸光度-菌数曲線から濃度調製した菌液データ(肺炎桿菌)
曲線は2021年2月12日冷凍物を復元し作成

の場合は曲線が近接している。

菌液吸収法を実施する都度、吸光度と生菌数の関係を明らかにしてから菌液を調製するのでは作業効率が悪い。継代数を重ねても異なる冷凍保存チューブからの復元の場合と比べて、曲線同士の間隔の広がり小さかったことから、冷凍保存から菌を復元した時に吸光度と生菌数を測定して吸光度-菌数曲線を作成し、この曲線から目標吸光度を推定し、接種菌液を調製することが有効と考えられる。この確認のため、まず 2021 年 2 月に復元したものについて吸光度-菌数曲線を作成し、黄色ぶどう球菌は 7 代、肺炎桿菌は 8 代まで継代培養を行い、その間にそれぞれ 9 回接種菌液の調整を試み、全て規定の濃度範囲で菌液を調製することができた(前ページ、図 5 及び図 6)。

表 1 試験片上での増殖(黄色ぶどう球菌)

| 使用菌の状態 | 増殖値 F ^{※1,2} | 試験実施数 (n) |
|---------------------------------|--------------------------|--------------|
| 2020/9/7 乾燥体 ^{※3} より復元 | 2.7 | 3 |
| 2020/12/14 冷凍物より復元 | 2.5~3.2 | 4 |
| 2021/2/12 冷凍物より復元 | -0.2~0.3 | 2 |
| 2021/2/21 冷凍物より復元 | 2.0~2.6 | 5 |
| 2021/6/23 冷凍物より復元 | 1.4~2.7 | 4 |
| 2021/9/15 冷凍物より復元 | 2.7 | 1 |
| 2022/1/25 冷凍物より復元 | 2.2 | 1 |

※1 及び※2 は表 2 の下部参照

※3 NBRC から入手した乾燥標品

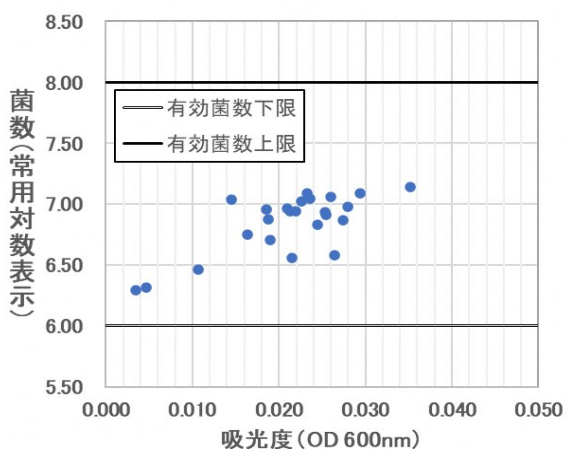


図 7 ハロー試験に用いた菌液の吸光度-菌数
(黄色ぶどう球菌)

2020 年度の検討で繊維製品に接種した菌が増殖しない事例があったことから、冷凍保存チューブからの復元毎に試験片(添付白布 綿3-1号)での菌の増殖状況を確認した(表 1 及び表 2)。その結果、2021 年 2 月 12 日に復元した黄色ぶどう球菌の事例以外は試験成立条件(増殖値 F=1.0 以上)を満足した。このため、通常は問題ないと考えられるが、安定して試験を実施するために冷凍保存チューブからの復元毎に菌の増殖状況を確認することが重要と考えられる。

4.2 ハロー法実施時の調整菌液濃度と吸光度確認

2021 年度に繊維加工の検討でハロー法を実施し、同法の調製菌液濃度と吸光度のデータが多数得られた。定性試験であるハロー法は、菌液吸収法に比べて

表 2 試験片上での増殖(肺炎桿菌)

| 使用菌の状態 | 増殖値 F ^{※1,2} | 試験実施数 (n) |
|--------------------|--------------------------|--------------|
| 2020/12/14 冷凍物より復元 | 3.6~3.7 | 2 |
| 2021/2/12 冷凍物より復元 | 3.5~4.0 | 5 |
| 2021/6/23 冷凍物より復元 | 3.4~3.9 | 4 |
| 2021/9/15 冷凍物より復元 | 3.7 | 1 |
| 2022/1/25 冷凍物より復元 | 3.5 | 1 |

※1 $F = \log C_t - \log C_0$

$\log C_t$ 培養後の生菌数の常用対数

$\log C_0$ 接種直後の生菌数の常用対数

※2 試験成立条件 F=1.0 以上

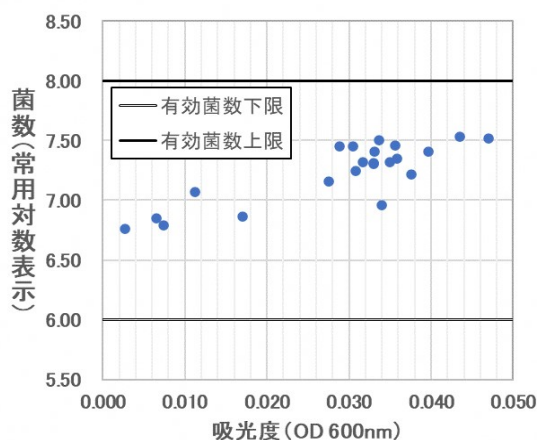


図 8 ハロー試験に用いた菌液の吸光度-菌数
(肺炎桿菌)

菌液の規定濃度範囲が広い。このため異なる冷凍保存チューブからの復元や継代培養の回数の違いを無視して同法実施時の調製菌液濃度と吸光度の関係を図7及び図8に整理したところ、一定の吸光度で菌液濃度が調製可能であることが確認できた。

4.3 菌液吸収法のATP発光測定法による定量

市販のルシフェール ATP 標準試薬セット、ルシフェール HS セット及び肺炎桿菌を用いて、菌液吸収法の定量を ATP 発光測定法で行った。試験結果は表3のとおりで、(一社)繊維評価技術協議会の SEK マーク認証の綿 100 %シャツは抗菌活性値が 2.4、対照試料(添付白布 綿3-1号)の増殖値は2.1であった。試験操作は、試験実施の前週に前培養Aを実施して培養後の平板培地を 5~10 °Cで保存しておき、試験実施週に3日間(前培養 B、前培養 C 及び試験片への接種、培養後の洗い出し・測定)で行うことができた。

ATP 発光測定法による定量は、コロニー形成に時間を要する混積平板培養法に比べて試験日数を1~2日間短縮できることが確認できた。しかし、市販の試薬キットの分包量(試薬量)に余裕が無く、例えば発光試薬は最低でも5.4 mL 必要(接種菌液調製に3試行実施

表3 菌液吸収法の ATP 発光測定法による定量結果

| | | |
|---|--|-------|
| 試験菌、NBRC No. | 肺炎桿菌 13277 <i>Klebsiella pneumoniae</i> | |
| 菌株入手元 | (独)製品評価技術基盤機構 バイオテクノロジーセンター | |
| 接種ATP濃度 (mol/L) (1×10^{-9} mol/L ~ 3×10^{-9} mol/L) | 2.6×10^{-9} | |
| 対照試料3検体の最大最小差 (log) | 接種直後 | 培養後 |
| (成立条件1以下) | 0.126 | 0.224 |
| 試験試料3検体の最大最小差 (log) | 接種直後 | 培養後 |
| (成立条件2以下) | 0.131 | 0.07 |
| 対照試料の増殖値 $F(F = \log C_t - \log C_0)$ (成立条件0.5以上) | +2.1 ($\log C_t: -8.5, \log C_0: -10.6$) | |
| 試験試料の増殖値 $G(G = \log T_t - \log T_0)$ ($\log C_0 > \log T_0$ の場合、 $\log T_0$ を $\log C_0$ に置き換えて計算) | -0.3 ($\log T_t: -10.8, \log T_0: -10.5$) | |
| 抗菌活性値 ($A = F - G$) $2.0 \leq A < 3.0$ 効果が認められる。 $3.0 \leq A$ 強い効果が認められる。 | 2.4 | |
| 対照試料 | 綿(添付白布 綿3-1号) | |
| 試験試料 | 綿100%シャツ SEKマーク認証 第四アンモニウム塩処理 | |
| 試験片の滅菌方法 | オートクレーブ(121 °C、15分) | |
| 試験片の培養時間 | 20時間15分 | |

と仮定)なのに対し、5.5 mL しかないため、培養液のおおよその ATP 量を事前に把握し、効率よく希釈して接種菌液調製を行わないと試薬が足りず、測定できなくなるのが判明した。試薬キットも混積平板培養法と比べて高額で、事業者からの依頼試験を同法で実施していくには課題が多いと考えられた。

5 まとめ

当センターにおいて繊維製品の抗菌性試験 (JIS L1902) を実施するため、2020 年度の検討で課題として残った事項について追加検討を行い、以下のことが明らかとなった。

- (1) 冷凍保存チューブから菌を復元した時に吸光度と生菌数を測定して吸光度-菌数曲線を作成し、この曲線から目標吸光度を推定して接種菌液を調製し、併せて対照試料の試験片(添付白布 綿3-1号)での菌の増殖状況を確認することが有効である。
- (2) ハロー法の調製菌液濃度は、冷凍保存チューブからの復元や継代培養の回数の違いに関係なく、一定の吸光度で菌液濃度が調製可能である。
- (3) 菌液吸収法の ATP 発光測定法による定量は、混積平板培養法に比べて試験日数を短縮できる。しかし、市販の試薬キットの分包量(試薬量)に余裕がなく、試薬キットも高額で、事業者からの依頼試験を同法で実施するには課題が多い。

参考文献

- 1) 川戸伸一, 京都府織物・機械金属振興センター研究報告, No.55 (2021), pp. 1-5