

繊維製品の抗菌性試験の実施体制の確立

川 戸 伸 一*

当センターにおいて繊維製品の抗菌性試験を実施するために検討を行い、概ね実施できる見込みが得られたので報告する。

1 はじめに

令和元年(2019)年 12 月から世界中に急速拡大した新型コロナウイルス感染症(COVID-19)により、繊維製品の抗ウイルス性・抗菌性機能への注目が高まり、当センターにこれらに関する試験等の相談が多く寄せられた。しかし、当センターでは 20 年以上前に抗菌加工の研究を行った実績があるが¹⁾、その後ウイルスや細菌に関する試験を行っておらず、技術も途絶え対応できていない。

このため、当センターにおいて繊維製品の抗菌性試験(JIS L1902)を実施するために検討を行った。

2 試験内容

2.1 検討を行った試験

JIS L1902(2015)には菌液吸収法、トランスファー法、菌転写法及びハロー法の4法が規定されている。

このうち、当センターの機器の所有状況や想定される試験ニーズを考慮し、菌液吸収法とハロー法に絞って検討を行った。

2.2 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(株))、ポリソルベート 80(富士フィルム和光(株))を用いた。

試験菌株は(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* NBRCNo.12732)及び肺炎桿菌

(*Klebsiella pneumoniae* NBRCNo.13277)を乾燥標品として入手した。乾燥標品からの復元にはL-乾燥標品復元用培地(復水液 702(粉末・アンプル)及び復元培養基 802 のセット)(日本製薬(株))を、また復元後の菌の冷凍保存にグリセロール(MP Biomedicals)を用いた。

2.3 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 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))。

2.4 試験方法

2.4.1 菌株の乾燥標品からの復元及び保存

乾燥標品からの復元は、NBRC の説明書に従った。

復元後の菌株の長期保存は、L-乾燥標品復元用培地のNo.702 の液体培地約 4.5mL にグリセロールを約 0.7mL 加えて攪拌・オートクレーブ処理したものに、No. 802 の平板培地に培養した菌体を掻き取ってこれを懸濁して菌液を調製し、1.5mL チューブに約 0.5mL ずつ分注してディープフリーザーでマイナス 60℃で保存した。

*企画連携課 主任研究員

通常の試験使用時は、冷凍保存の菌液を自然解凍して普通寒天培地に復元したものを斜面培地により継代培養して保存したものを用いた。継代培養は JIS L1902 では 1 ヶ月以内に移植、その回数は 10 回を限度としている。検討では 5 回以内を限度とした。

2.4.2 菌液吸収法

JIS L1902 に従い試験を行った。試験に用いる細菌は、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。試験接種菌液の調製は分光光度計で菌液の吸光度 (600nm)^{2,3)}を測定し、前培養 C 終了後の培養液を 20 倍希釈のトリプトンソーヤブイオン培地で適宜希釈し規定の菌液濃度に調製した。

対照試料 (添付白布 綿 3-1 号) 及び試験試料 (抗菌加工済み綿 100% のシャツ) を裁断して作成した試験片 (0.40g ± 0.05g) をバイアル瓶 (各 6 本) に入れ、オートクレーブ処理後に試験接種菌液を接種し、うち 3 本を接種直後に不活化剤 (ポリソルベート 80) を含んだ生理食塩水で洗い出して接種直後の生菌数を標準寒天培地による混積平板培養法で測定した (図1)。残る 3 本は 18~24 時間培養し、同様に洗い出して生菌数を測定し、抗菌活性値の計算を行った。

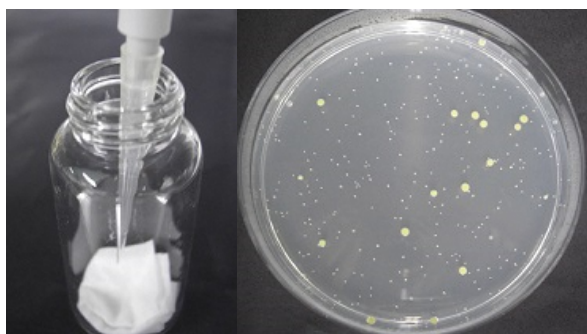


図1 試験片への菌液接種及び混積平板培養法による黄色ぶどう球菌のコロニー

2.4.3 ハロー法

JIS L1902 附属書 JA に従い試験を行った。試験に用いる細菌は、標準寒天培地に画線塗抹したものをブイオン培地に移植して培養後、分光光度計で菌液の吸光度を測定し、ブイオン培地で適宜希釈して規定の菌液

濃度に調製した。この菌液 1mL を滅菌済シャーレに入れ、普通寒天培地 15mL を加えて混積平板培地を調製し、安全キャビネット内で余分な水分を乾燥させた。

対照試料 (添付白布 綿 3-1 号) 及び試験試料 (抗菌加工済み綿 100% のシャツ) を直径 28mm の円形の試験片に裁断し、ガラスシャーレに入れてオートクレーブ処理した。その後、前述の混積平板培地の中央に載せ、培地を傷つけないよう注意しながら L 字型の金具で試験片を押して培地に密着させ、倒置培養してハローの有無を確認した。

3 結果

3.1 菌液吸収法

試験結果は表1のとおりで、今回試験試料に用いた (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 5.9 (黄色ぶどう球菌) 及び 6.6 (肺炎桿菌) と高い値を示した。対照試料 (添付白布 綿 3-1 号) 上での細菌の増殖値は 2.5 (黄色ブドウ球菌) 及び 3.7 (肺炎桿菌) であった。混積平板培地上でのコロニーは、肺炎桿菌は概ね 20~24 時間の培養で、黄色ぶどう球菌は 40~48 時間の培養で確認できた。

3.2 ハロー法

試験結果は図2及び表2のとおりで、試験試料の抗菌性 (ハロー有り) を確認できた。ハロー法は定性試験であり、ハローの有無のみで判定するが、ハローの幅は黄色ぶどう球菌は 2.8mm、肺炎桿菌は 0.6mm と大きく異なった。

ハロー法は試験片を培地に密着させる必要があるが JIS 記載の滅菌済ピンセットではなく L 字型のステンレス製金具を用いることで、より容易に行うことができた。

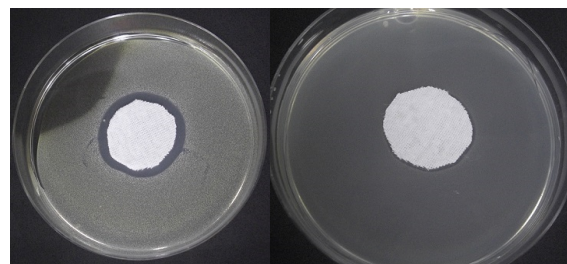


図2 ハロー法試験

左: 黄色ぶどう球菌 右: 肺炎桿菌

表1 菌液吸収法の定量試験結果(混積平板培養法)

試験菌、NBRC No.	黄色ぶどう球菌 12732		肺炎桿菌 13277	
	Staphylococcus aureus		Klebsiella pneumoniae	
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			
接種菌液濃度(CFU/mL) (1×10^5 CFU/mL ~ 3×10^5 CFU/mL)	2.4×10^5		2.0×10^5	
対照試料 3 検体の最大最小差(log) (成立条件1以下)	接種直後	培養後	接種直後	培養後
	0.082	0.258	0.081	0.064
試験試料 3 検体の最大最小差(log) (成立条件2以下)	接種直後	培養後	接種直後	培養後
	0.180	0.000*	0.213	0.000*
対照試料の増殖値 F ($F = \log C_t - \log C_0$) (成立条件 1.0 以上)	+2.5 ($\log C_t: +7.9, \log C_0: +5.4$)		+3.7 ($\log C_t: +8.5, \log C_0: +4.8$)	
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)	-3.4 ($\log T_t: +2, \log T_0: +5.2$)		-2.9 ($\log T_t: +2, \log T_0: +4.9$)	
抗菌活性値 (A=F-G) 2.0 ≤ A < 3.0 効果が認められる。 3.0 ≤ A 強い効果が認められる。	5.9		6.6	
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			
試験片の培養時間	22 時間			

※ 洗い出し液 1mL を入れたシャーレでのコロニー数が 3 検体とも 1 以下。

表2 ハロー法による定性試験結果

試験菌、NBRC No.	黄色ぶどう球菌 12732		肺炎桿菌 13277	
	Staphylococcus aureus		Klebsiella pneumoniae	
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			
菌濃度(CFU/mL) (10^6 CFU/mL ~ 10^7 CFU/mL)	2.9×10^6		6.2×10^6	
ハロー幅の平均値(mm)	2.8		0.6	
ハローの有無(ハロー幅の平均値 >0 : ハロー有り =0 : ハロー無し)	あり		あり	
試験片の形状、培地への設置方法	28mm 円形、培地に密着させ倒置			
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			
培養時間	26 時間		28 時間	

3.3 菌液吸収法の課題

3.3.1 試験菌の性状について

抗菌性試験では用いる試験菌の性状の保持が重要である。試験コストを削減する上で、乾燥標品を試験の都度購入するのではなく、グリセロール添加による菌株の冷凍保存が有効と考えられるが、冷凍物から復元した試験菌が対照試料の試験片上で増殖しない事例がみられた(表3)。このため、冷凍物から復元した試験菌は、抗菌加工済の試験試料を用いた試験の実施までに、対照試料の試験片上での増殖(対数値で1以上=10倍以上に菌数が増加)を確認しておく必要があることが分かった。

また、試験片に接種する菌液は分光光度計による菌液の吸光度を用いて菌液濃度を推定し調製した^{2,3)}。研究開始当初は試験工程削減のため 10^6 CFU/mLで調製していたが、乾燥標品から直接復元した試験菌を冷凍物から復元した試験菌に切り替えた後にばらつきが大きくなった。最終的に 10^8 CFU/mLでの調製に変更し、より安定して調製できるようになった(図3、図4)。しかし、冷凍物の復元日の違い(分注したチューブの違い)で、同程度の吸光度でも菌数に差がみられ、規定の菌数範囲を逸脱することがみられた。

表3 対照試料の試験片上での増殖(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)
9/7 乾燥体より復元	2.7	3
12/14 冷凍物より復元	2.5~3.2	4
2/12 冷凍物より復元	-0.2~0.3	2
2/21 冷凍物より復元	2.6	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 試験成立条件は $F = 1.0$ 以上

3.3.2 ATP発光測定法による定量について

混釈平板培養法による生菌数での評価方法は、培地でのコロニー形成に時間がかかるため、5~7 勤務日を要する。黄色ぶどう球菌の場合、試験実施の前週に前培養Aを実施して培養後の平板を $5\sim 10^\circ\text{C}$ で保存しておき、月曜日に前培養B、火曜日に前培養C及び試験片への接種、水曜日に培養後の試験片から洗い出して混釈平板培養を行い、金曜日にコロニーが確認できる。

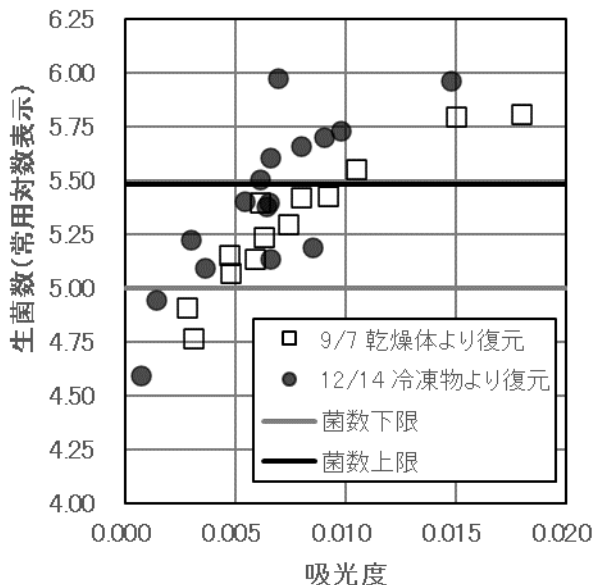


図3 吸光度と調製菌数の関係
(黄色ぶどう球菌: 10^6 CFU/mL)

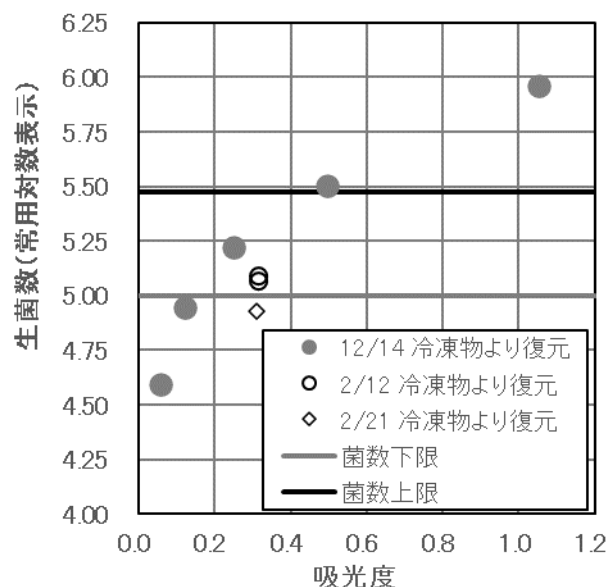


図4 吸光度と調製菌数の関係
(黄色ぶどう球菌: 10^8 CFU/mL)

一方、細菌に含まれるATP(アデノシン三リン酸)量を発光測定法により計測する方法であれば、4日で可能と考えられる。発光測定法では試薬等にコストがかかる点が課題であるが、同法による試験も検討しておくことが必要と考えられる。

4 まとめ

当センターにおいて繊維製品の抗菌性試験(JIS L1902)を実施するために検討を行い、当センターで実施できる見込がついた。

但し、冷凍物から復元した試験菌が対照試料の試験片上で増殖しない事例や、菌液調製の際に同程度の吸光度でも規定の菌数範囲を逸脱する事例がみられたことから、地域事業者からの依頼試験対応時に安定して実施できるよう、試験片上での増殖試験や菌数調製試験等の追加検討を行い、知見を得ておく必要がある。また、ATP発光測定法による試験も検討しておくことが必要と考えられる。

参考文献

- 1) 浜岡容子ほか;繊維の抗菌加工に関する研究-ハイパーシルクの応用-,京都府織物指導所研究報告, No. 31(1997), pp13-17
- 2) 小西正朗,堀内淳一;細胞の増殖を捉える-計測法から比速度算出まで-,生物学, Vol.93,No.3(2015), pp149-152
- 3) 川崎晋ほか;食品中における損傷菌の試験法・評価法,日本防菌防黴学会誌, Vol.48,No.9(2020), pp23-27