

リビングテクノロジー 株式会社 様

試験報告書

「電解次亜水（クローラ水）」の殺菌効力試験

北生発 26_0059 号

平成 26 年 6 月 24 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

「電解次亜水（クローラ水）」の各種細菌および酵母に対する殺菌効力を確認することを目的とした。尚、試験菌種には細菌と酵母を合わせて 12 菌種を用いた。

2. 依頼者

名称：リビングテクノロジー 株式会社

所在地：〒101-0062 東京都千代田区神田駿河台 3-4 日専連朝日生命ビル 3 階

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

平成 26 年 6 月 11 日～平成 26 年 6 月 17 日

5. 試験水

1) 試験水名称

「ミニクローラ ハード水」(有効塩素濃度設定値 約 90 ppm) 2,000 mL

「ミニクローラ ソフト水」(有効塩素濃度設定値 約 30 ppm) 2,000 mL

2) 試験水の取扱い

貴社から冷蔵便で送付された試験水を平成 26 年 6 月 11 日に受領し、試験までの間は遮光し $5 \pm 5^\circ\text{C}$ で保存した。試験時には、有効塩素濃度および pH を測定した。

6. 試験条件

1) 作用時間：0 (初期)、30 秒

Candida albicans のみ 0 (初期)、30 秒、1 分

2) 作用温度： $20 \pm 2^\circ\text{C}$

7. 試験菌と菌液の調製方法

1) 試験菌

① *Staphylococcus aureus* (MRSA) IID1677 (メチシリン耐性黄色ぶどう球菌)

② *Acinetobacter calcoaceticus* NBRC12552 (アシネトバクター)

③ *Citrobacter freundii* NBRC12681 (サイトロバクター)

④ *Enterobacter aerogenes* NBRC12010 (エンテロバクター)

⑤ *Klebsiella pneumoniae* NBRC13277 (肺炎桿菌)

- ⑥ *Proteus mirabilis* NBRC105697 (プロテウス)
- ⑦ *Pseudomonas aeruginosa* NBRC13275 (緑膿菌)
- ⑧ *Burkholderia cepacia* NBRC14595 (バークホルデリア)
- ⑨ *Serratia marcescens* NBRC12648 (セラチア)
- ⑩ *Enterococcus faecalis* ATCC29212 (腸球菌)
- ⑪ *Streptococcus pyogenes* ATCC14289 (化膿レンサ球菌)
- ⑫ *Candida albicans* NBRC1594 (カンジダ)

2) 菌液の調製

凍結保存された菌株を前培養して、約 10^7 CFU/mL に調製し、これを試験菌液とした。

各試験菌の前培養および菌液調製条件を表 1 に示した。

表 1. 前培養および菌液調製条件

試験菌	前培養条件	菌液調製液	菌数測定条件	不活性化剤
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	Tryptic Soy Agar (Difco, 以下TSA) 36 ± 2°C 18~24時間	滅菌 イオン交換水	TSA 36 ± 2°C 40~48時間	0.3%チオ硫酸ナトリウム 添加SCDLP培地
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
<i>Citrobacter freundii</i>				
<i>Enterobacter aerogenes</i>				
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				
<i>Proteus mirabilis</i>				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>				
<i>Burkholderia cepacia</i>				
<i>Serratia marcescens</i>				
<i>Enterococcus faecalis</i>	TSA 36 ± 2°C, 18~24時間 炭酸ガス培養		TSA 36 ± 2°C, 40~48時間 炭酸ガス培養	
<i>Streptococcus pyogenes</i>				
<i>Candida albicans</i>	ポテトデキストロース 寒天培地 (日水, 以下PDA) 25 ± 2°C, 48時間		PDA 25 ± 2°C 4日間	

8. 試験方法

1) 殺菌効力試験

殺菌効力試験は以下の手順により行った。

50 mL 容量の遠心管に各試験水10 mLを分取し、 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ に保持した。そこへ試験菌液0.1 mLを加え、試験管ミキサーで混合して0 (初期)、30秒間作用させた。尚、*C. albicans*のみ作用時間を0 (初期)、30秒、1分間とした。所定時間作用後、1 mLを不活性化剤^{*1} 9 mLに添加して、試験菌に対する殺菌作用を停止させ、これを菌数測定用試料液とした。尚、作用時間 0 (初期) および陰性対照は、試験水の代わりに滅菌生理食塩液を用いた。

※1；不活性化剤として有効性を確認した0.3%チオ硫酸ナトリウム添加SCDLP培地 (栄研化学) を用いた。試験液の不活性化剤としての有効性確認試験手順と結果を7, 8頁に示した。

2) 菌数測定

菌数測定用試料液を原液として、滅菌生理食塩液で10倍段階希釈列を作製し、試料液原液および希釈液の各1 mLをシャーレに移し、TSA培地約20 mLと混合、固化させて $36 \pm 2^\circ\text{C}$ で48時間培養した。尚、*S. pyogenes* は $36 \pm 2^\circ\text{C}$ で48時間炭酸ガス培養 (三菱ガス化学) し、*C. albicans* はPDA培地約20 mLと混合、固化させて $25 \pm 2^\circ\text{C}$ で4日間培養した。培養後、培地上に発育した集落を数えて、試験水1 mLあたりの試験菌数を求めた (検出限界値10 CFU/試験水1 mL)。

3) 有効塩素濃度およびpH測定

試験前に各試験水の有効塩素濃度をハンディ水質計AQUAB AQ-102 (柴田化学, ヨウ素試薬による吸光光度法) で、pHをCOMPACT pH METER (HORIBA, B-212ガラス電極法) で測定した。

9. 試験結果

各試験水の各種細菌および酵母に対する試験結果を表2に示し、有効塩素濃度およびpHの測定結果を表3に示した。

試験結果より、「ミニクローラ ハード水」および「ミニクローラ ソフト水」共に、全ての試験菌に対して30秒間の作用で、試験菌数を検出限界値未満 (<10 CFU/mL)まで減少させた。尚、全ての試験菌における所定時間作用後の対照菌数は、初期菌数から大きな変動はなく、試験系に問題がないことを確認した。

10. コメント

本試験では、「ミニクローラ ハード水」および「ミニクローラ ソフト水」の各種細菌および酵母に対する殺菌効力を確認した。

本試験は、試験水の基本的な殺菌効果を調べる試験系であり、有機物負荷の無い条件である。その結果、今回用いた電解次亜水（クローラ水）のうち、有効塩素濃度の低い「ミニクローラ ソフト水」においても、30 秒間の作用で全ての試験菌を検出限界値未満まで減少させる効果を認めた。本試験水は電解次亜水であり、次亜塩素酸ナトリウムの希釈液と同等の性質を持つと判断され、その活性成分は次亜塩素酸および殺菌活性の微弱な次亜塩素酸イオンであると思われる。

電解次亜水は、有機物により効果が急激に減弱する。実使用では、汚染物による負荷の存在が想定されるため、本試験と同等の効果を得ることは難しいと思われる。例えば、風呂場の壁などにスプレーして使用する場合は、石鹼や身体からの有機物の付着を洗浄除去してから用いると、効果の減弱が抑えられると考えられる。次のステップとして、汚濁物質を負荷した EN 1276:2009 に準拠した試験による評価や、実生活使用モデルに対する効果の確証が望まれる。

以上

表 2. 各試験水による各種細菌および酵母に対する殺菌効力試験結果

試験菌名	菌株番号	対照			「マイクロラ ハード水」 (有効塩素濃度84 mg/L, pH8.4) ^{※2}		「マイクロラ ソフト水」 (有効塩素濃度39 mg/L, pH8.0) ^{※2}	
		0秒	30秒	1分	30秒	1分	30秒	1分
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	IID1677	1.0×10^5	1.1×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	NBRC 12552	1.8×10^5	1.2×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Citrobacter freundii</i>	NBRC12681	4.2×10^5	4.1×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Enterobacter aerogenes</i>	NBRC12010	3.3×10^5	3.4×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NBRC13277	3.0×10^5	3.6×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Proteus mirabilis</i>	NBRC105697	5.8×10^5	4.7×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NBRC13275	3.7×10^5	3.8×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Burkholderia cepacia</i>	NBRC14595	3.3×10^5	3.2×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Serratia marcescens</i>	NBRC12648	4.9×10^5	4.2×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC29212	2.0×10^5	1.8×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC14289	3.7×10^5	3.7×10^5	/	<10	/	<10	/
<i>Candida albicans</i>	NBRC1594	2.4×10^5	2.3×10^5	2.1×10^5	<10	<10	<10	<10

検出限界値：10 CFU/mL

菌数単位：CFU/mL

※2 有効塩素濃度；AQUAB AQ-102 (柴田科学, ヨウ素試薬による吸光度法, 測定範囲 0~300 mg/L)

pH；COMPACT pH METER (HORIBA, B-212 ガラス電極法)

表 3. 各試験水の有効塩素濃度および pH の測定結果

試験水	塩素濃度(mg/L) ^{※3}		pH ^{※4}	
	設定値	測定値	設定値	測定値
「ミニクローラ ハード水」	90	84	8.2	8.4
「ミニクローラ ソフト水」	30	39	8.2	8.0

※3 ; AQUAB AQ-102

(柴田科学, ヨウ素試薬による吸光光度法, 測定範囲 0~300 mg/L)

※4 ; COMPACT pH METER (HORIBA, B-212 ガラス電極法)

11. 不活性化剤の有効性確認試験

1) 目的

試験水による試験菌に対する殺菌作用を停止させる目的で使用する不活性化剤の有効性を確認した。なお試験水は有効塩素濃度の高い、「ミニクローラ ハード水」を用いた。

2) 方法

不活性化剤（0.3%チオ硫酸ナトリウム添加 SCDLP 培地）9 mL に試験水 1 mL を加え混合した（試験水 10 倍希釈）。これに約 $10^3 \sim 4$ CFU/mL の菌液を 0.1 mL 接種し、常温で 20 分間作用させた後、この混合液の菌数を測定した。

なお、対照として、試験水のかわりに滅菌蒸留水（大塚製薬）を用いた。

不活性化剤の有効性は、第十六改正日本薬局方 4.05・I・3.5 に準拠し、下記判定基準によって判定した。

判定基準： B （不活性化剤処理後の菌数） / A （対照の菌数） $\times 100 = 50 \sim 200\%$ 以内

3) 結果

試験結果を表 4 に示した。対照との菌数の比率は 98～115%であり、11. 2) 項に示した判定基準以内であった為、不活性化剤は試験水に対して有効と判定した。

表 4. 不活性化剤の有効性確認試験結果

試験水	試験菌	使用不活性化剤 (試験水希釈率)	菌数 (CFU/mL)		(A)との比 (%)	有効性の 判定結果 ^{※6}
			対照 (A)	不活性化剤 (B)		
「マイクロラ ハード水」 (有効塩素濃度84 mg/L, pH8.4)	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	0.3%チオ硫酸Na 添加SCDLP (栄研) (10倍)	5.1×10^1	5.2×10^1	102	有効
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		5.5×10^1	6.1×10^1	111	有効
	<i>Citrobacter freundii</i>		1.9×10^2	1.9×10^2	100	有効
	<i>Enterobacter aerogenes</i>		1.5×10^2	1.6×10^2	107	有効
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		1.3×10^2	1.3×10^2	100	有効
	<i>Proteus mirabilis</i>		1.9×10^2	2.0×10^2	105	有効
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		1.3×10^2	1.5×10^2	115	有効
	<i>Burkholderia cepacia</i>		1.4×10^2	1.4×10^2	100	有効
	<i>Serratia marcescens</i>		1.7×10^2	1.7×10^2	100	有効
	<i>Enterococcus faecalis</i>		7.9×10^1	7.9×10^1	100	有効
	<i>Streptococcus pyogenes</i>		1.6×10^2	1.6×10^2	100	有効
	<i>Candida albicans</i>		9.2×10^1	9.0×10^1	98	有効

※5 ; B/A × 100

※6 ; 比率が 50~200%以内で有効と判定した (第十六改正日本薬局方)