

群技セ第2601-243号

令和3年9月6日

株式会社サトカンパニー
取締役社長 茂木佐登志 様

群馬産業技術センター
所長 小宅 勝



共同研究報告書

令和3年7月12日付けで共同研究契約を締結した下記の研究が終了したので、関係書類を添えて報告します。

記

- | | |
|---------|--|
| 1 研究課題 | 小型ナノテクビーム装置の除菌効果の評価 |
| 2 研究目的 | 密閉空間で小型ナノテクビーム装置を稼働させることにより、微生物の除菌効果を評価する。 |
| 3 研究内容 | 寒天培地中に塗布した微生物を設置し、除菌効果を評価する。 |
| 4 研究期間 | 令和3年7月12日から令和3年8月13日まで |
| 5 担当研究者 | バイオ・微生物係 独立研究員 渡部貴志、技師 柳澤昌臣 |
| 6 研究結果 | 別紙のとおり |

研 究 結 果

1 はじめに

株式会社サトカンパニーが開発した小型ナノテクビーム装置の除菌効果を評価するため、寒天培地中に塗布した微生物を設置し、密閉空間でこの装置を稼働させた場合の生菌数を計数する。

2 方法

2-1 菌液の調製

JIS 法 (JIS Z 2801) による抗菌性試験で用いられる大腸菌 *Escherichia coli* NBRC 3972 および黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 を除菌試験の供試株として用いた。JIS 法に準じて除菌試験用の菌液を調製した。すなわち、Nutrient agar (NA) 培地 (DIFCO) でリフレッシュした供試株を、500 倍希釀した Nutrient broth 培地 (NB500) (関東化学) に懸濁し、菌数を約 10^8 cells/mL となるように調製した。さらに、NB500 で 5×10^4 cells/mL となるように希釀したものと原液とし、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10 倍希釀したものを準備した。

2-2 除菌試験

抗菌試験や食品等の微生物試験で生菌数を確認する時に用いる標準寒天培地 (栄研化学)、および標準寒天培地を 5 倍希釀し、寒天を 20 g/mL となるように加えた 1/5 標準寒天培地を作成した。微生物自動連続希釀塗布装置 (EDDY JET、(株) GCI クレオス製) を用い、プラスチックシャーレ中の各培地に対し 2-1 で調製した菌液を 50 μ L/枚となるように塗布した (図 1)。



図 1 微生物自動連続希釀塗布装置で塗布している様子

菌液を入れたプラスチックビーカーからシリンジで 50 μ L 採取し、寒天培地を固めたプラスチックシャーレに螺旋状に塗布する。

内寸法 1600 mm × 600 mm × 700 mm のクリーンベンチ内に小型テクノビーム装置と、菌液を塗布した培地を設置した（図 2）。小型ナノテクビーム装置を稼働させた後、3 時間まで 1 時間に培地を回収した。なお、対照は 10 倍希釀した菌液を塗布した培地のみを使用し、別のクリーンベンチに設置して 3 時間後に回収した。回収した培地は 37°C で 2 日間静置培養し、生育したコロニー数をカウントして生菌数を計数し、運転前の生菌数からの減少率を除菌率として算出した。

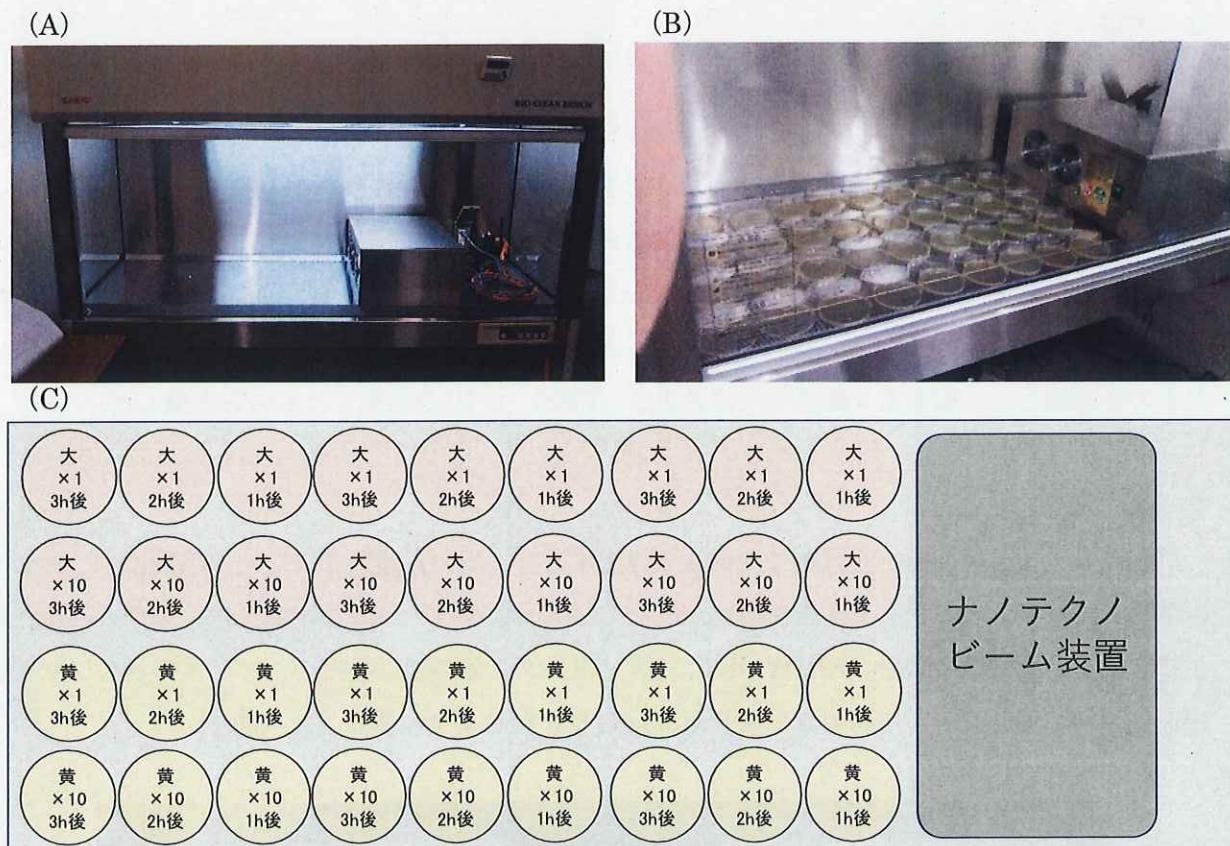


図 2 除菌試験実施の様子

A: クリーンベンチに小型ナノテクビーム装置を設置した様子。B: クリーンベンチのガラス窓を下ろし、培地を設置して小型ナノテクビーム装置を運転している様子。C: 各培地（プラスチックシャーレ）の配置図であり、大は大腸菌、黄は黄色ブドウ球菌を塗布した培地を示す。また、×1 は原液、×10 は 10 倍希釀の菌液を塗布した培地を示す。1~3h 後は、それぞれの時間毎に取り出した時間を示す。

3 結果と考察

3-1 標準寒天培地での除菌試験

まず、抗菌試験や微生物試験で生菌数を調べる時に用いる標準寒天培地に菌液を塗布し、小型ナノテクビーム装置を運転したときの生菌数の変化を調べた。その結果、大腸菌では運転2時間後と3時間後で徐々に生菌数の低下が確認されたが（表1）、紫外線（UV）照射やオゾン処理のように30分間で死滅するというような劇的な除菌効果ではなかった。一方、黄色ブドウ球菌では1時間後から除菌効果が認められ、2時間後には90%以上の効果が得られていた（表2）。今回の試験結果は、3枚の平均値を示しているが、装置の近くに設置した培地の方が生菌数は低い傾向にあった（データ略）。

以上の結果より、ナノテクビーム装置には、寒天培地に付着した大腸菌と黄色ブドウ球菌に除菌効果があることが確認された。一方で、自然界や人の生活空間では、食品等が付着した汚れなどの有機物の塊がある場所を除くと、一般的には貧栄養状態であると考えられる。しかしながら、標準寒天培地には、菌の増殖に使われる栄養成分が含まれているため、除菌による菌数の減少と増殖による菌数の増加とが同時に起きていることが推測される。ナノテクビーム装置を実際に使う環境での真の除菌効果の評価に近づけるためには、以上のことと検証することが必要と考えられる。

表1 標準寒天培地での大腸菌の生菌数の評価（N=3）

大腸菌	生菌数（個/枚）		除菌率（%）
	×1	×10	
対照 0h	—	181	—
対照 3h	—	184	—
運転 1h	∞	183	0.0
運転 2h	∞	162	10.5
運転 3h	∞	112	38.4

∞：検出限界以上

表2 標準寒天培地での黄色ブドウ球菌の生菌数の評価（N=3）

黄色ブドウ球菌	生菌数（個/枚）		除菌率（%）
	×1	×10	
対照 0h	—	195	—
対照 3h	—	196	—
運転 1h	∞	168	14.2
運転 2h	260	9	95.6
運転 3h	43	2	99.1

∞：検出限界以上

3-2 1/5 標準寒天培地での除菌試験

先の3-1の検討結果から、生育を抑えるため標準寒天培地の栄養成分を5分の1に希釀した培地を用いた追加試験を行うことにした。なお、標準寒天培地の寒天の添加量は15 g/Lであるが、一般細菌数を調べるために栄養成分をもともと薄めに調製してあることから、単純に培地の添加量を5分の1に希釀して寒天を15 g/Lとなるように補完しても、培地から水分が出てきやすくなる。そこで、寒天の添加量は20 g/Lとなるように補完することにした。

まず、大腸菌の生菌数の変化を見てみると、運転1時間後から徐々に菌数が低下し始め、3時間後には90%以上の除菌効果が確認された（表3）。また、その時の各培地の様子を見たところ、大腸菌のコロニーは薄く広がってしまい、ぼやけた画像になってしまふが時間が進むとともに菌数が減少している様子が確認できる（図3）。つづいて、黄色ブドウ球菌の生菌数の変化を見てみると、運転1時間後には99%以上の除菌効果が確認できた（表4、図4）。なお、運転2時間後からは×1のものも生菌数が0となっているため、計算上は100%の除菌率と計算されているが、より濃度の高い菌液での検証はしていないので、99.99%以上の除菌率とみなすのが妥当と考えられる。これらのことから、貧栄養な状態であると考えられるナノテクビーム装置を実際に使う環境下では、少なくとも大腸菌は3時間の運転で90%以上、黄色ブドウ球菌では1時間の運転で99%以上の除菌効果があると推測できる結果が得られた。

表3 1/5 標準寒天培地での大腸菌の生菌数の評価 (N=3)

大腸菌	生菌数 (個/枚)		除菌率 (%)
	×1	×10	
対照 0h	—	220	—
対照 3h	—	251	—
運転 1h	∞	188	14.5
運転 2h	∞	50	77.3
運転 3h	61	5	97.9

∞ : 検出限界以上

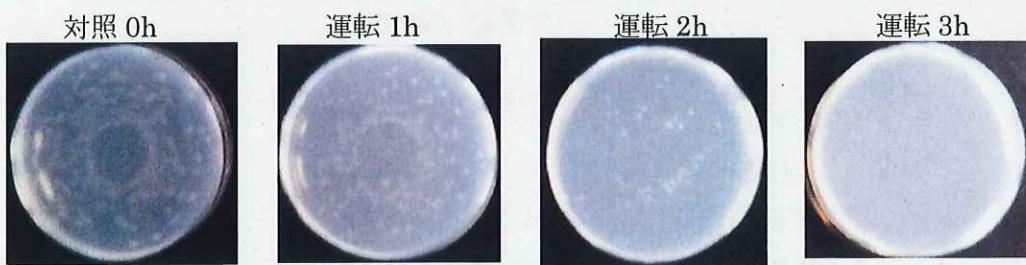


図3 1/5 標準寒天培地での大腸菌の生育の様子

表4 1/5 標準寒天培地での黄色ブドウ球菌の生菌数の評価 (N=3)

黄色ブドウ球菌	生菌数 (個/枚)		除菌率(%)
	× 1	× 10	
対照 0h	—	175	—
対照 3h	—	165	—
運転 1h	16	1	99.4
運転 2h	0	0	100.0
運転 3h	0	0	100.0

∞ : 検出限界以上

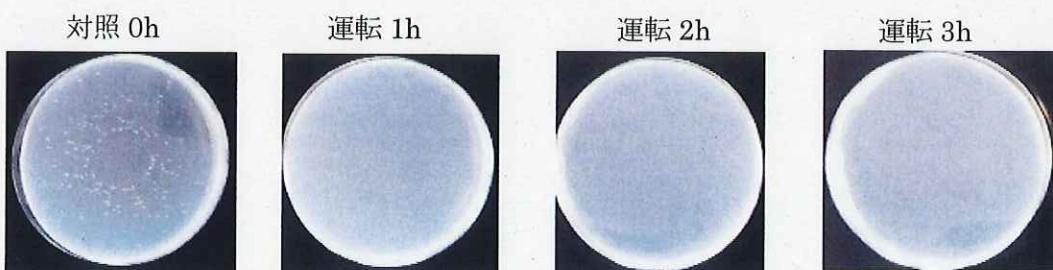


図4 1/5 標準寒天培地での黄色ブドウ球菌の生育の様子

4 まとめ

本研究では、株式会社サトカンパニーが開発した小型ナノテクビーム装置の除菌効果を評価するため、寒天培地上に塗布した大腸菌、黄色ブドウ球菌の生菌数の変化を調べた。内寸法 1600 mm × 600 mm × 700 mm の空間において、培地上に付着した大腸菌と黄色ブドウ球菌の除菌効果は有意に認められたため、装置から発生する何らかの成分が除菌作用を有していると考えられる。また、寒天培地の栄養成分が薄い方が、除菌率が高くなっているため、貧栄養の環境下を浮遊している菌についても、密閉状態であれば空間除菌効果はあると推測される。

実際の環境下での評価が難しいため、今回の試験結果は目安にしかならないが、貧栄養な状態であると考えられるナノテクビーム装置を実際に使う環境下では、少なくとも大腸菌は3時間の運転で90%以上、黄色ブドウ球菌では1時間の運転で99%以上の除菌効果があると推測できる。

