

超水の細菌及びウイルスに対する効果確認試験

試験報告書

試験番号：197364N

株式会社食環境衛生研究所

〒379-2107

群馬県前橋市荒口町 561-21

TEL027-230-3411 FAX027-230-3412

作成日：2020年3月27日

1. 表題

超水の細菌及びウイルスに対する効果確認試験

2. 目的

超水の細菌及びウイルスに対する効果を確認するために実施した。

3. 試験依頼者

名称 株式会社 山製作所
所在地 埼玉県さいたま市中央区本町東 4-9-13

4. 試験実施施設

名称 : 株式会社食環境衛生研究所
所在地 : 群馬県前橋市荒口町 561-21
運営管理者 : 久保 一弘

5. 試験実施者

試験責任者 : 松本 彰平
試験担当者 : 近藤 実紀、宮崎 翔太

6. 試験日程概要

試験開始日 : 2020年3月5日
報告書提出日 : 2020年3月27日

7. 供試菌及び供試ウイルス

株式会社食環境衛生研究所にて保有している 3 菌種及び 1 ウイルス種を試験に供試した。

供試菌

1) *Escherichia coli* ATCC25922 (以下、*E.coli*)

供試ウイルス

2) *Swine influenza virus* H1N1 IOWA 株 (以下、SIV)

8. 試験資材

名称 : 超水

※試験資材は原液で使用した。

9. 区の設定

区	検体	検査時点 (分)	反復数	
			菌	ウイルス
対照	滅菌生理食塩水	0、5	3	1
試験	試験資材	0、5	3	1

上記のとおり、2つの区を設定した。菌については1菌種あたり3反復、ウイルスについては1ウイルス種あたり1反復を実施した。

10. 菌液調製方法

菌	培地名	培養温度 (°C)	培養時間 (時間)
<i>E.coli</i>	ブレインハートイン フュージョン寒天培地	35±2	18

上記のとおり、ブレインハートインフュージョン寒天平板培地上で所定の温度及び時間で培養後、白金耳で菌を掻きとり、生理食塩水に懸濁及び希釈したものを供試菌液とした。

11. ウイルス液調製方法

- 1) SIV を MDCK 細胞に接種した。
- 2) 37 °C で 1 時間吸着後、接種ウイルス液を除去し、滅菌 PBS で 2 回洗浄した。
- 3) MEM 培地を加え、37 °C、5 %CO₂ 下で培養した。
- 4) 70～80 % 程度の細胞変性効果 (以下、CPE) が観察された時点で、培養上清を回収した。
- 5) 回収した培養上清を、3000 rpm で 30 分間遠心後、遠心上清を分注し、-70 °C 以下で保存したものを供試ウイルス液とした。

12. 試験手順及び方法

1) 試験方法

(1) 菌液の接種及び菌数測定

- ① 検体 10 mL を試験管内に用意した。
- ② 検体の中に菌液を 0.1 mL 接種した。

なお、菌液接種直後はボルテックスミキサーにより 1 秒間攪拌を行い、その後検体は 25°C で静置した。

- ③ 対照区は、接種後 0 分 (直後) 及び 5 分の時点において、検体を試験管から採取して別の試験管に分注し、滅菌生理食塩水で 10 倍階段希釈した。
- ④ 試験区は、接種後 1 分及び 5 分の時点において、検体を試験管から採取

して別の試験管に分注し、滅菌生理食塩水で 10 倍階段希釈した。

- ⑤ 各希釈液を寒天平板培地に塗抹後、所定の温度及び時間にて培養した。
(用いる培地、培養温度及び時間については「10.菌液調製方法」参照)
- ⑥ 培養後、発育したコロニーから菌数を測定した。

(2) ウイルス液の接種及びウイルス力価測定

試験実施前に、資材を 10 倍階段希釈後、MDCK 細胞に接種し、37 °C、5 % CO₂ 下で 5 日間培養した。MDCK 細胞が正常な形状を示さなかった場合、資材による細胞毒性有り と判定し、本試験では細胞毒性が確認された希釈倍率を試験から除外した。

その結果、原液で細胞毒性が確認されたため、本試験における検出限界は 10^{1.5} TCID₅₀/mL とした。

- ① 検体 1 mL を試験管内に用意した。
- ② 検体の中に SIV 液を 0.1 mL 接種した。
なお、接種直後はボルテックスミキサーにより 1 秒間攪拌を行い、その後検体は 25°C で静置した。
- ③ 対照区は、接種後 0 分（直後）及び 5 分の時点において、検体を試験管から採取して別の容器に分注し、MEM 培地で 10 倍階段希釈した。
- ④ 試験区は、接種後 5 分の時点において、検体を試験管から採取して別の容器に分注し、MEM 培地で 10 倍階段希釈した。
- ⑤ 希釈液を MDCK 細胞に接種後、37 °C、5 % CO₂ 下で 5 日間培養した。
- ⑥ 各ウェル内の培養上清を回収し、赤血球凝集反応によりウイルスの増殖の有無を確認し、ウイルス力価 (TCID₅₀) を測定した。

2) 評価

菌及びウイルスの試験結果において、検査時点ごとに、対照区に対して試験区の減少率 (%) を算出し、効果を確認した。菌の試験結果については、3 反復の平均値で算出した。

なお、本試験において減少率は以下の式で算出した。

$$\text{減少率 (\%)} = \frac{\text{対照区} - \text{試験区}}{\text{対照区}} \times 100$$

13. 結果

1) *E.coli*

結果を表 2 及び図 2 に示した。

試験区の菌数について、接種後 5 分で検出限界未満 ($< 1.0 \times 10$ cfu/mL) であった。

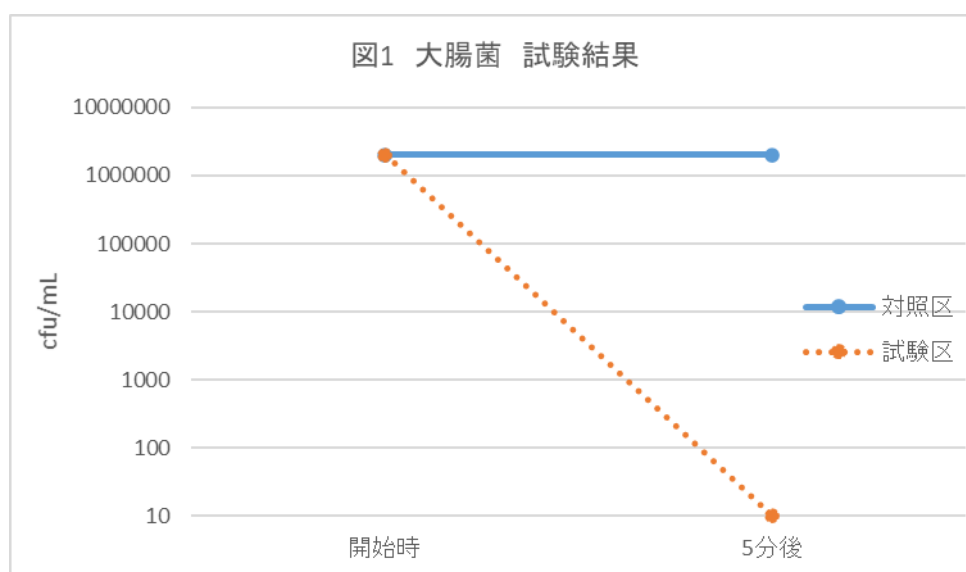
対照区と比較した際の試験区の減少率は、接種後 1 分及び 5 分で $> 99.999\%$ であった。

表 1 *E.coli* 菌数測定結果

時間(分)	対照区	試験区	減少率(%)
0	2.0×10^6	2.0×10^6	-
5	2.0×10^6	$< 1.0 \times 10$	> 99.999

¹⁾ : 接種後 5 分の対照区と比較した際の減少率

単位;cfu/mL



2) SIV

結果を表 2 及び図 2 に示した。

試験区のウイルス力価について、接種後 5 分で $10^{1.5}$ 未満 TCID₅₀/mL であった。

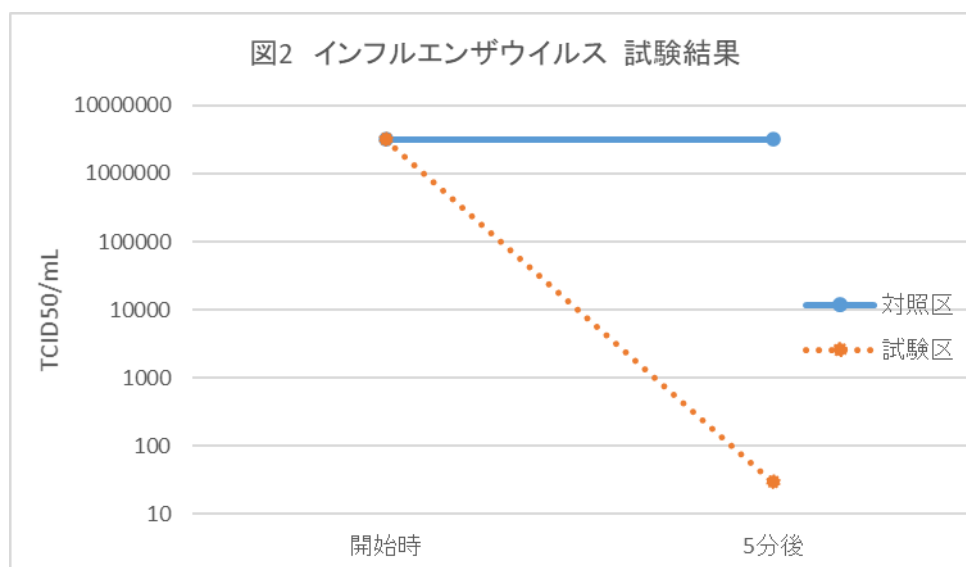
対照区に対して試験区の減少率は、接種後 5 分で > 99.999% であった。

表 2 SIV ウイルス力価測定結果

時間 (分)	対照区	試験区	減少率 (%)
0	$10^{6.5}$	-	-
5	$10^{6.5}$	$<10^{1.5}$	> 99.999

¹⁾ : 接種後 5 分の対照区と比較した際の減少率

単位; TCID₅₀/mL



14. 考察

本試験は、資材（超水）の細菌及びウイルスに対する効果を確認するために実施した。試験の結果、*E.coli*において、試験区の菌数が接種後 5 分で検出限界未満（ $< 1.0 \times 10 \text{ cfu/mL}$ ）であった。対照区と比較した際の試験区の減少率は、5 分で $> 99.999\%$ であった。

SIV において、試験区の菌数が接種後 5 分で検出限界未満（ $< 10^{1.5} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$ ）であった。対照区と比較した際の試験区の減少率は、接種後 5 分で $> 99.999\%$ であった。