

ATP 解析を用いた陶磁器製品フィルム密着法の検討

田栗利紹・右田雄二・上田成一・阿部久雄*

Estimation of Film covering method for ceramics in ATP analysis

Toshitsugu TAGURI, Yuji MIGITA, Seiichi UEDA, Hisao ABE

Key word : Film covering method, ceramics, ATP analysis

キーワード: フィルム密着法, 陶磁器, ATP 解析

はじめに

近年、消費者の抗菌加工製品に対する関心の高まりに伴い、陶磁器業界でも抗菌処理を施した製品に対する要望が増加し、平成 9 年度から 11 年度前半にわたり、本研究所と窯業技術センターが共同で行ってきた陶磁器製品の抗菌処理に関する研究の中で、抗菌力試験についての知見を報告する。

抗菌加工製品の抗菌力試験で推奨されているフィルム密着法^{1,2)}(表1)は、菌数測定に混釈培養法を用いているが、操作が煩雑なことから、培養に 48 時間必要なため迅速な評価ができないことが欠点としてあげられる。一方で、ATP 解析法は、蛍の発光様式を利用した方法で、細菌数をリアルタイムで計測する事が可能である^{3,4)}(図1)。今回、陶磁器製品の抗菌力試験の中で、迅速化および簡便化を主目的として、菌数測定に ATP 法(以下 A 法)を応用し、従来の混釈培養法(以下 B 法)と比較検討した。加えて、ATP 法の中で、検体を洗浄ろ過することにより精度を高めたる過法(以下 C 法)についても併せて検討した。

材料及び方法

試験菌は *Escherichia coli* IFO 3972 を用い、フィルム被覆までの行程は全てフィルム密着法(1998 年度版マニュアル^{1,2)})に準拠し、菌数測定を A 法、B 法および C 法で行った。

A 法: 24 時間培養後の試験菌液(初期接種量 400 μ l)の 100 μ l を、直接 ATP 解析装置(AF-100、東亜電波工業)にて定量した。

B 法: 試験菌液の 200 μ l を、混釈培養法にて定量した。

C 法: 試験菌液の 100 μ l を、洗浄ろ過した後、ATP 解析装置にて定量した。

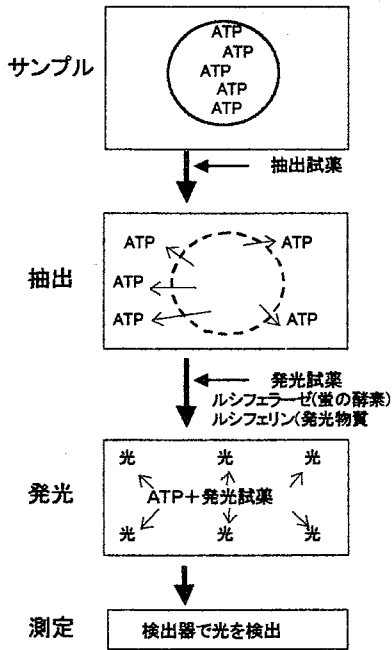
検討項目: ①調整菌液(10³~10⁸ cfu/ml)の抗菌未処理テストピースへの添加回収試験。②市販抗菌剤を添加した抗菌処理テストピースの抗菌力試験。

表 1 抗菌加工製品の抗菌力試験法 I

フィルム密着法(1998 年度版)

試験菌	<i>Escherichia coli</i> IFO 3972 <i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732
菌液調整	500 倍に希釈した普通ブイオンで調整 (菌数: 1.0 ~ 5.0 × 10 ⁵ /ml)
菌液接種	菌液 0.4ml/試料 25cm ² の割合、抗菌試料、 無加工試料、対照について n=3 で実施
フィルムの被覆	PE フィルムの設置
保存	24 時間保存(温度 37 ± 1 °C, RH90%以上)
生菌数測定	標準寒天平板培養法(35 ± 1 °C, 40 ~ 48h)
表示	増減値差を求める(24 時間保存後における 抗菌試料菌数と無加工試料菌数の対数値差)

※長崎県窯業技術センター



結果

ATP量と生菌数の間には、 $10^3 \sim 10^8$ cfu/mlでは、高い相関が認められたが、 10^2 以下では相関は認められなかった(図2)。

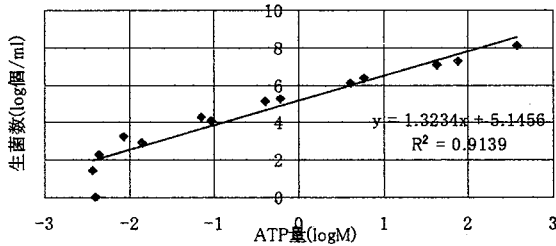


図2 ATP量と生菌数の相関図

抗菌未処理テストピースの添加回収試験成績において、A法は、 10^4 以上で、C法は 10^3 以上で、B法との間に差は認められなかった(表2)。従って、ATP法は、直接法よりもろ過法の精度が高く、定量下限値は 10^3 であることが実証された。

市販抗菌剤テストピースの抗菌力試験成績で、増減値差が2.0未満を示し抗菌力を認めなかったピース22検体では、A、B、C法の成績に差は認められなかったが、増減値差が2.0以上を示し、強い抗菌力を示したピース16検体では、差が認められた(表3)。即ち、B法の増減値差 5.06 ± 1.98 に対し、A法 1.92 ± 0.81 およびC法 2.8 ± 0.83 であり、各々対数値で3.15、2.27の差が認められた。

表2 混釈培養法(B法)とATP直接法(A法)およびATPろ過法(C法)における添加回収試験成績の比較

調整菌液 オーダー	混釈培養法			ATP法(直接法)		ATP法(ろ過法)	
	添加生菌数	回収生菌数	回収率	回収生菌数	回収率	回収生菌数	回収率
8	8.52	8.45	99.2%	8.58	100.7%	8.33	97.8%
7	7.41	7.45	100.5%	7.77	104.8%	7.51	101.2%
6	6.49	6.43	99.1%	6.76	104.2%	6.49	100.1%
5	5.47	5.33	97.4%	5.68	103.9%	5.46	99.8%
4	4.44	4.43	99.7%	4.55	102.6%	4.15	93.4%
3	3.45	3.50	101.5%	4.20	121.7%	3.61	104.6%
2	2.44	2.57	105.5%	4.29	176.1%	3.73	153.0%
1	1.44	1.46	101.3%	4.47	310.1%	3.84	266.5%

表3 混釈培養法(B法)とATP直接法(A法)およびATPろ過法(C法)における市販抗菌剤テストピース抗菌力試験成績(増減値差)の比較

分類	検体数	混釈培養法	ATP法			
			直接法		ろ過法	
<2	22	0.57 ± 0.62	0.75 ± 0.66	-0.19	0.60 ± 0.87	-0.03
$2 \leq$	16	5.06 ± 1.98	1.92 ± 0.81	3.15	2.80 ± 0.83	2.27

増減値差 = \log_{10} [「無加工試験区」/「抗菌加工試験区」]

考察

結果をまとめると次のようになる。

① $10^3 \sim 10^8$ cfu/ml で ATP法と生菌数に高い相関が認められた。

② $10^3 \sim 10^8$ cfu/ml の添加回収試験で ATP法と混釈培養法に差は認められなかった。

③ 抗菌力試験において、増減値差2.0未満の検体には ATP法と混釈培養法に差は認められなかったが、増減値差2.0以上の検体には認められた。

以上のことを考慮して、ATP法を用いたフィルム密着法の検査フローを図3に示した。菌数測定にATP法を応用することで、フィルム密着法の問題点である迅速性と簡便性の点が改善され、簡便かつ効率的に抗菌力試験を実施することができると考える。

③について、ATPで計測された細菌全てが、コロニーを作ることができなかつたと推察され、供試菌が、混釈培養中に VNC⁽⁵⁾(Viable but Non-Culturable: 培養できないが生物活性をもった菌、その状態)と呼ばれる状態になった可能性があると考えられた。

参考文献

- 1) 抗菌製品技術協議会: 抗菌製品技術協議会試験法, 事務局(財団法人日本食品分析センター内, TEL 03-3469-7138 Fax 03-3469-7814) (1998)
- 2) 高山正彦: プラスチック分野における抗菌力試験法, 防菌防黴誌, 25, NO.3, 163 ~ 169, (1997)
- 3) 羽毛田靖: ATP法による細菌数測定装置の基礎と応用, 防菌防黴誌, 25, No.8, 457 ~ 466, (1997)
- 4) Bioprobe カタログ: (株)真崎商店, TEL 095-865-3131 Fax 095-865-3130
- 5) 山本啓之, 木暮一啓: *Viable but Non-Culturable* (VNC) の概念による細菌感染症へのアプローチ, 日本細菌学雑誌, 54, 631-638, (1999)

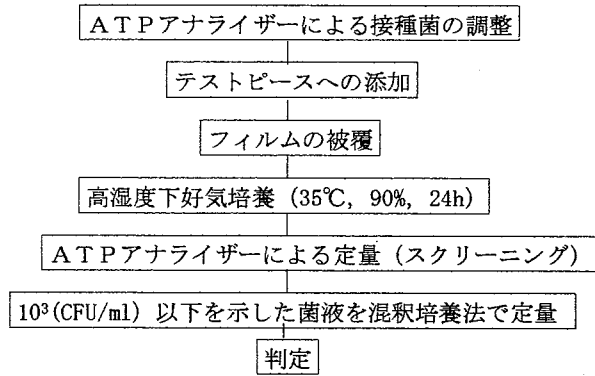


図3 ATP法を用いたフィルム密着法

最後に、ATP法について、若干の補足を加える。本法は、今回示した抗菌力試験法におけるフィルム密着法のような特殊な試験法においてのみ応用可能なのではない。一般的には、リアルタイムの定量計算が可能であることを利用して、HACCPにおける微生物制御等への応用研究がよく知られている^{3,4)}。研究の内容は、基本的には本研究同様、混釈培養法との比較検証がテーマとなっている。

ATP法の問題点として、本研究で言及したように、定量下限値が比較的高いことと使用コストの問題がある。しかし、あくまでスクリーニングあるいは実用性に主観をおいて、利用法を考慮すれば、様々な衛生検査においても応用の幅は広がってくる。例えば、単純に菌液を調整することや定量法のバリデーションへの利用が考えられる。

今後は、VNCに関連して、今回残った問題点の解決や、ATP法を衛生検査に対する実用的な活用法として利用する道を模索したい。