

株式会社 アピア 御中

報 告 書

アピザス OK・W 製剤の抗菌効果試験 (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)

(試験実施期間: 2010 年 6 月 7 日～2010 年 6 月 16 日)

平成 22 年 6 月 21 日

特定非営利活動法人

バイオメディカルサイエンス研究会

株式会社 予防医学推進センター



試験題目 :アピザス OK・W 製剤の抗菌効果の試験

試験委託者 :株式会社 アピア

試験受注者 :NPO 法人 バイオメディカルサイエンス研究会

株式会社 予防医学推進センター

〒169-0075 東京都新宿区高田馬場 1-28-3 エ新ビル 801 号

TEL:03-3200-6752, 6804 FAX:03-3200-5206

試験期間 :2010 年 6 月 7 日～2010 年 6 月 16 日

試験施設 :NPO 法人 バイオメディカルサイエンス研究会 習志野実験室

〒275-0024 千葉県習志野市茜浜 1-12-3

TEL:047-451-2419 FAX:047-451-2439

試験実施者 :NPO 法人 バイオメディカルサイエンス研究会

大久保 梢 (試験検査主任技師)

木ノ本 雅通 (実験計画責任者)

目的

アピザス OK・W 製剤のメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対する抗菌効果を検討する

試験材料及び方法

(試験期間:2010 年 6 月 7 日～2010 年 6 月 16 日)

I 試験材料

1. 試験品

アピザス OK・W (使用濃度:0.3%)

2. 供試菌

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA) IID 1677 *Staphylococcus aureus*

3. 使用培地

下記の市販培地を用いた

A. 普通寒天培地

(パールコア® 普通寒天培地‘栄研’ 栄研化学株式会社
製造番号 E-MC63)

B. トリプトソイブイオン

(パールコア® トリプトソイブイオン培地‘栄研’ 栄研化学株式会社
製造番号 E-MC64)

II 試験方法

1. 供試菌液の調製

1) 供試菌液の調製

- (1) 普通寒天培地に供試菌を前培養する。
- (2) 発育コロニーを1エーゼ釣菌し、トリプトソイブイオンにて 37℃、24 時間培養する。
- (3) 発育した菌を培地試験管のまま滅菌生理食塩水を用いて、遠心操作 (3000rpm, 5min) により 2 回洗浄する。
- (4) 洗浄後の菌を滅菌生理食塩水で 3ml にメスアップし供試菌液とする。

2) 供試菌液の濃度測定

- (1) 供試菌液を原液として滅菌生理食塩水で $1 \sim 10^{-7}$ まで 10 倍段階希釈法により、菌液を調製する。
- (2) 希釈した菌液の $10^{-5} \sim 10^{-7}$ を各 0.1ml とり、それぞれを培地に滴下する。
- (3) 滴下した菌液に 50℃で加温液化させた寒天培地を加え、菌液と混釈する。
- (4) 数分後、固化した培地上に、さらに培地を薄く重層する(適量)。
- (5) 37℃、24～48 時間、培養する。
- (6) 培養後、目視でコロニーカウントが可能な菌液の濃度を基準に、供試菌液の濃度を算定する。

2. 本試験

1) 試験手順

- (1) 試験品(原液)0.9ml を tube に測りとり、調製した供試菌液 0.1ml (10^6 CFU) を加え、5 秒間攪拌し混合液とする。
- (2) 対照として、(1)の試験品に代えて滅菌生理食塩水を用い、同様に混合液を調製する。
- (3) 30 分後、混合液を 10 倍希釈を滅菌生理食塩水により調製する。
- (4) 希釈菌液の 0.1ml を培地に滴下し、均一になるように培地全面に塗布する。
- (5) 37℃にて 48 時間培養後、菌発育の有無を観察する。
37℃、48時間で菌発育が無かった場合、更に室温にて 5 日間培養し、菌発育の有無を観察する。

表 1. 供試菌と試験品の培養前接触時間

	供試菌濃度	培養菌濃度	接触時間(分)
試験品	10^6 CFU	$10^3 \sim 10^4$ CFU	30
対照	10^6 CFU	$10^3 \sim 10^4$ CFU	30

CFU: colony forming units

2) 判定方法

培養の結果、対照に菌のコロニー形成が認められ、試験品にそれが認められないか、あるいは認められた場合でも、対照との差が明らかに有意であれば、試験品の本菌に対する一定の抗菌効果が有り、と判定する。

結果と考察

1. 供試菌液の濃度

供試菌液濃度は 3.0×10^8 CFU/ml と算出された。

よって、本試験に使用した MRSA の菌液の濃度は 3.0×10^6 CFU となる。

2. 本試験の結果

試験の結果は、写真および表 2 に示すとおり、MRSA では、 37°C 、48 時間経過後、菌は観察されなかった。さらに、室温で 5 日間培養しても菌は全く観察されなかった。

これに対し、対照では接種菌量とほぼ同量の 10^5 CFU の菌が培地上に観察された。

	試験品	対照
	MRSA	
原液	 0 CFU/dish	 > 10^5 CFU/dish
10倍希釈	 0 CFU/dish	 > 10^4 CFU/dish

写真 普通寒天培地上における供試菌の培養結果 (37°C 、48 時間)

表 2. 試験品の接触前後における供試菌の培養成績
(菌数は供試菌の原液濃度に換算した値)

供試菌	菌液	接触前	接触後
MRSA	試験品	3.0×10^6 CFU	0 CFU
	対照	3.0×10^6 CFU	$> 10^6$ CFU

3. 結果判定と考察

以上の結果から、試験品は、本試験に用いたMRSAの発育を接触時間30分以内に阻止することが分かった。また、培養後1週間以上経過しても菌が観察されなかったことから、菌は試験品により完全に死滅されたと考えられる。

なお、ここでいう接触時間は、試験品と供試菌の混合液を培地に接種するまでの時間をいい、培地上での接触時間は除外して表記したものである。しかし、試験品の供試菌に対する発育阻止効果が、試験品の原液により発揮されるものとすれば、培養にいたるまで原液は10分の1に希釈されているので、培地上での接触時間は、結果に影響を及ぼす要因ではないと考えられる。

本試験で培養成績に明らかな異同が認められた点は、興味ある今後の検討課題である。

まとめ

試験品アピザス OK・W は、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の増殖に影響を与える効果があった。

本試験では試験品の効果があるか否かを簡易に行うため試験委託者の了解のもとに、今回の方法で便宜的に実施したものである。

したがって、結果の再現性あるいは試験品と供試菌の濃度関係および他菌種その他の方法は試みていない。また、結果の解析等には触れていないことを付記する。