

原著論文 スプレー型オゾン水生成装置の除菌効果評価法の検討

*内藤博敬¹⁾、谷 幸則¹⁾、上條章雄²⁾、城井康弘³⁾、辻 むつみ⁴⁾

¹⁾ 静岡県立大学 食品栄養科学部 環境生命科学科
〒422-8526 静岡県静岡市駿河区谷田 52-1

²⁾ 株式会社ドリーム・ブレイン
〒105-0001 東京都港区虎ノ門 2-8-1 虎の門電気ビル 3 階

³⁾ ノーランドパシフィック株式会社
〒101-0051 東京都千代田区神田神保町 1-62 和光ビル 2 階

⁴⁾ 静岡県環境衛生科学研究所 医薬食品部
〒420-8637 静岡県静岡市葵区北安東 4-27-2

受理 2017. 10. 31

要旨 近年、電解技術の発展によってオゾン水製造装置の小型化が急速に進んでいる。中でもスプレー型オゾン水製造装置は、食品衛生、介護や医療分野などで幅広い利用が期待されている。通常スプレー除菌の評価は、噴霧前の薬液に対して行われるが、スプレー型オゾン製造装置は通電することでオゾンが発生するため、その原料水にはオゾンが含まれず、噴霧後のオゾン水に対して除菌効果を評価する必要がある。しかし、スプレー噴霧後の除菌効果を評価する標準的な手法は無い。そこで、スプレー噴霧による除菌効果を評価すべく試験法を検討した。カバーガラスに菌液を塗布した評価試験片を作成し、木片を台座として置くことで、噴霧時の吹き飛ばしや浸漬による過剰な洗浄効果を抑えることができると考えた。噴霧後に試験片を液体培地に浸して生残する菌を回収し、トリプトソーヤ寒天培地に塗布して計数することで除菌効果を数値化した。陰性対照である超純水噴霧と比較してオゾン水の噴霧では、大腸菌および黄色ブドウ球菌に対して強い除菌効果が認められた。また、JIS Z 2801 に準じて抗菌活性を算出すると、抗菌効果を認める 2.0 以上をクリアしていた。さらに、原料水に界面活性剤を加えた場合や、有機物を負荷した場合の抗菌性についても検討し、いずれもこの試験法で評価できることを確認した。これにより、本試験法をオゾン水スプレーの除菌評価試験法として提案する。

キーワード : オゾン水、オゾン水生成装置、オゾン水スプレー噴霧、除菌効果評価法

1. 目的

近年、電極の進歩や電解技術の向上によってオゾン水生成装置の小型化が進んでおり、スプレー型のオゾン水生成装置の開発も成されている¹⁾。オゾン水スプレーによる消毒は、オゾンの強い酸化力と反応の速さ、分解して酸素と水になる環境負荷の低さから、今後幅広い分野での利用が期待される。現在、家庭、飲食店や介護現場などで汎用されているスプレー消毒の効果判定は、噴霧される消毒剤の抗微生物効果（除菌効果および殺菌効果）で評価されている^{2, 3)}。また、スプレー噴霧で消毒剤を塗布した対象物などの抗菌評価は、「JIS Z 2801:2010 抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果」⁴⁾ で規格化されている。しかし、これらの評価法は消毒剤としての液剤および液剤の噴霧塗布面に対して消毒効果を評価するものであり、噴霧後の液剤の消毒効果を直接評価する手法ではない。そのため、純水などを原料水とするスプレー型オゾン水生成装置の評価法とすることはできない。また、オゾン水をスプレーボトルに入れて噴霧する場合や、オゾンと同様に消毒成分が分解し易い消毒剤をスプレーボトルに入れて噴霧する場合においても、噴霧後の消毒効果を評価する必要がある。スプレーは広範囲に効果を示す反面で標的表面との接触が不十分となる可能性があり、大気中へのスプレー噴霧による空間除菌や、噴き付け面への除菌効果の実質的な評価が、一般的なスプレー

製品評価の視点からも求められている。こうしたことから米国では、AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) International Official Method に記載されている AOAC Germicidal Spray Products Test (AOAC 961.02) をオゾン水スプレーのスクリーニング試験として推奨している^{5,6)}。この方法は 60 個の試験対象片に対してスプレー噴霧し、直接培養した時に 59 個以上が陰性となれば除菌効果を有するとする方法であるが、スプレーの性能、噴霧回数や液量についての記述は無い。そのため、スクリーニングとしては有用であるが、抗菌効果のように数値化することができない。そこで本研究では、開発されたスプレー型オゾン水生成装置を用い、スプレー噴霧による除菌効果の、規格基準制定に向けた評価手法として数値化可能な微生物試験法の確立を試みた。

2. 材料と方法

2.1 試験菌株と至適試験菌量

細菌は、細胞壁を構成するペプチドグリカン層の厚いグラム陽性菌と、薄いグラム陰性菌に大別される。これらは化学物質や薬剤に対する感受性が異なる可能性があるため、消毒や抗菌を謳う製品の評価は、少なくともそれぞれの細菌を用いて行う必要がある。本研究では、前述の「JIS Z 2801:2010」で指定されているグラム陽性細菌の黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) とグラム陰性細菌の大腸菌 (*Escherichia coli*) を試験対象とし^{4,7)}、独立行政法人製品評価技術基盤機構より分与された黄色ブドウ球菌 (NBRC12732) および大腸菌 (NBRC3972) を用いた。黄色ブドウ球菌はニュートリエントブロス液体培地、大腸菌は LB 液体培地それぞれ 10 mL に植菌し、37°C で 16 時間、振盪培養して前培養液とした。前培養液を $10^3 \sim 10^7$ 倍希釈し、トリプトソヤ平板培地 3 枚ずつに塗布して 37°C で一晩静置培養し、生菌数を計数した。

赤堀ら⁸⁾の規定した 9 倍量オゾン水 (4 mg/mL) で殺菌効果が得られる菌量の限界は、 $5 \times 10^5 \sim 10^6$ 個であることを著者らは報告している⁷⁾。この先行研究に従い、本研究では前培養液を 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 個 / 100 μ L となるようリン酸緩衝液 (PBS) で希釈し、試験菌液とした。

2.2 スプレー噴霧後の除菌試験法の検討

スプレー噴霧後の除菌効果を検討するにあたって、大気中の微生物の影響およびスプレー噴霧時の風圧によって細菌が吹き飛ばすことが考えられたため、試験は全てクリーンベンチ内で行うこととした。シャーレや時計皿などを試験対象片として菌液を直接塗布した場合、スプレー噴霧によって菌は洗い流されることなく貯留するため、スプレーの洗浄効果によって除去される菌量が加味されない。また、菌液を塗布した試験対象片を用いて、シャーレや時計皿内で噴霧した場合には、噴霧した過剰の噴霧液に試験対象片が浸ってしまうため、スプレー噴霧による正確な除菌効果の評価としては不相当である。そこで、試験対象片の下に台座を作ることで、噴霧時の吹き飛ばしや浸漬による過剰な洗浄効果を抑えたと考えた。また、試験対象片を液体培地で直接培養するのではなく、液体培地中に回収した生菌を平板に塗布し計数することで数値化を試みた⁹⁾。

濾紙上に 35 mm シャーレの蓋を逆さに置き、あらかじめオートクレーブした木片 (断面積 1×0.4 cm、長さ約 1 cm に切った割箸) を台座として設置し、その上にカバーガラス (1.8×1.8 cm²) を置いた (図 1)。このカバーガラス上に、試験菌液 100 μ L を滴下し、菌液が完全乾固しないように注意しながら 2~4 時間程度風乾して試験対象片を作成した。この試験対象片に、約 5 cm 上からスプレー式オゾン水生成装置を 1 回 (約 0.5 mL) または 2 回 (約 1.0 mL) 噴霧することとした。スプレー式オゾン水生成装置は、SPE (Solid Polymer Electrolyte) 電解法^{10,11)}を用いた機器を、国立東京工業高等専門学校物質工学科より借用した¹⁾。このスプレー式オゾン水生成装置は、室温で原料水に超純水を用いた場合に約 4 mg/L の溶存オゾン濃度が得られることを、複数回のバックテスト (共立理化学研究所、測定範囲: 0.1~5 mg/L) により確認している。

噴霧後の試験対象片との接触時間を 5 分とし、0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液を 1 回噴霧の場合は 200 μL 、2 回噴霧の場合は 400 μL をオゾン水噴霧後の試験対象片に滴下し、付着している溶液中の残留オゾンを分解した。あらかじめ 35 mm シャーレにトリプトソーヤ液体培地を 1 mL 入れておき、この試験対象片を入れて軽く振盪し、残存する生菌を回収した。回収した菌液を 100 μL ずつトリプトソーヤ平板 3 枚に塗布し、37°C で一晩静置培養して生育したコロニーを計数し、平均値を生残菌数とした。試験は少なくとも 2 回行い、1 度目に生残菌数が多く計数が容易でなかった場合には、適宜トリプトソーヤ液体培地で希釈して平板 3 枚に塗布し、37°C で一晩静置培養して生育したコロニーを計数した。

JIS Z 2801⁴⁾ では、陰性対照の生残菌数から試験結果の生残菌数を除して抗菌活性値を得ている。本試験法では、試験対象片に接種した生菌数 (U_0)、通電なしで噴霧した場合 (オゾン発生させないで原料水を噴霧した場合) の生残菌数 (U_t)、試験スプレー後の生残菌数 (A_1) のそれぞれの対数値の平均を求め、次式によって抗菌活性値を算出した。

$$(\log U_t - \log U_0) - (\log A_1 - \log U_0) = \log U_t - \log A_1 = \text{抗菌活性値} (>2.0 \text{ の時 } 99\% \text{ 以上を殺菌})$$

2. 3 有機物負荷によるスプレー型オゾン水生成装置の除菌効果評価

有機物負荷にはウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) を用いた¹²⁾。PBS で試験菌液を希釈する際に、菌液 100 μL あたり 2 mg/mL BSA を 1 μL (負荷量 2 μg) または 10 μL (負荷量 20 μg) 加え、カバーガラス上に添加し、風乾した。有機物負荷を加えた場合のスプレー型オゾン水生成装置の評価には、100 mg/L クエン酸+100 mg/L 非イオン界面活性剤 (ポリオキシエチレンラウリルエーテル 130K) 混合溶液 (pH3.7) を原料水として用い^{14,15)}、2. 2 で確立したスプレー噴霧後の除菌試験法に準じて試験し、抗菌活性値を求めた。この時のオゾン水濃度もパックテストにより 3~4 mg/L の溶存オゾン濃度が得られることを確認し、また、原料水として pH 調整剤および界面活性剤を添加した超純水ではパックテストが反応しないことを確認した。

3. 結果と考察

3. 1 スプレー噴霧後のオゾン水の除菌効果と抗菌活性値の算出

予備試験として、確立した試験方法に従って前培養液を $1 \times 10^5 \sim 10^7$ 個/100 μL となるよう希釈し、カバーガラスに 100 μL 滴下して風乾した後、トリプトソーヤ液体培地に浸けて生菌を回収したところ、大腸菌、黄色ブドウ球菌ともに全ての菌量で初期菌量の約 1/2 に減少していた。これらの細菌は乾燥に弱いため、風乾工程での減菌は避けられないことから、試験毎にこの風乾後菌量を計数して接種生菌数 (U_0) を得ることとした。大腸菌に対する試験結果を図 2 および表 1 に、黄色ブドウ球菌に対する試験結果を図 3 および表 1 に示す。

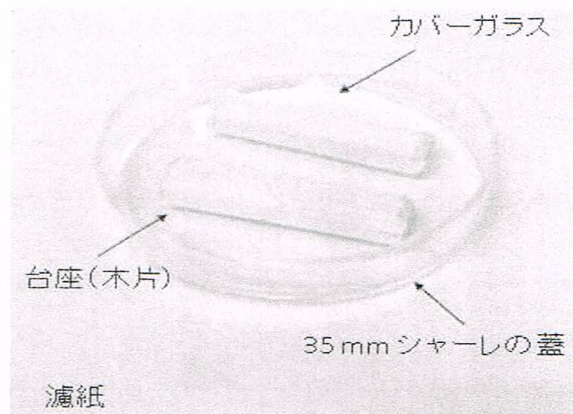


図 1 試験対象片となるカバーガラスの設置方法

濾紙上にシャーレの蓋を逆さに置き、オートクレーブした木片をセットして、その上にカバーガラスを乗せ、菌液を滴下後乾燥して試験対象片とした。

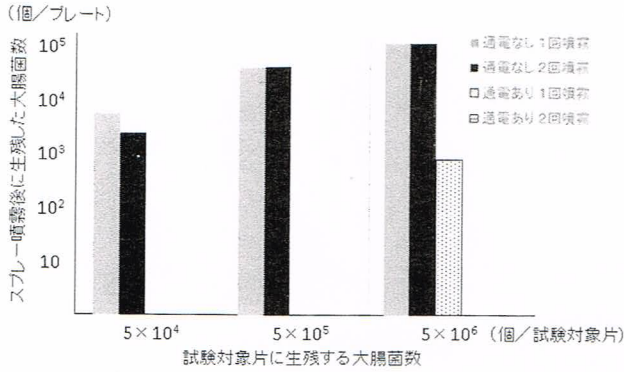


図 2 原料水に超純水を用いてスプレー噴霧した場合の大腸菌に対する除菌効果

通電してオゾン水を噴霧することで、超純水の噴霧よりも強い除菌作用が見られた。 5×10^6 個の生菌に対して1回の噴霧では除菌しきれず、713 個/プレートの生菌が残存した。

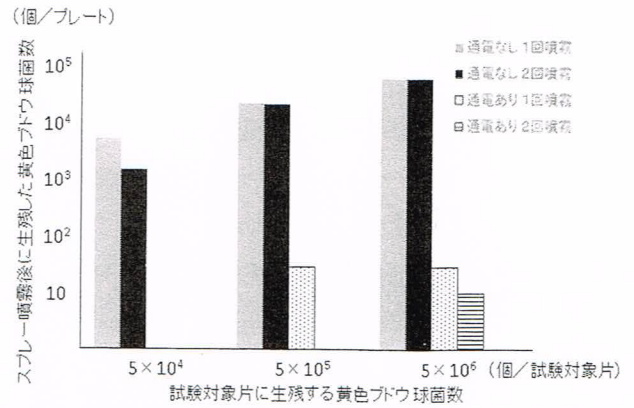


図 3 原料水に超純水を用いてスプレー噴霧した場合の黄色ブドウ球菌に対する除菌効果

通電してオゾン水を噴霧することで、超純水の噴霧よりも強い除菌作用が見られた。 5×10^5 個および 5×10^6 個の生菌に対して1回の噴霧でいずれも 28 個/プレートが、 5×10^6 では 2 回の噴霧でも 10 個/プレートの生菌が残存した。

表 1 超純水を原料水としたスプレー型オゾン水生成装置の除菌効果

試験菌 (数)	大腸菌 (個/100 μ L)			黄色ブドウ球菌 (個/100 μ L)		
	5×10^4	5×10^5	5×10^6	5×10^4	5×10^5	5×10^6
通電なし 1回噴霧 (超純水)	4900	36000	146000	5000	20800	56000
	2200	36800	118000	1400	20000	56000
通電あり 1回噴霧 (オゾン水)	0	0	713	0	28	28
	0	0	0	0	0	10
抗菌活性値	3.7	4.6	2.6	3.7	2.9	3.3
	3.3	4.6	5.5	3.1	4.3	4.7

数値はスプレー後の生残菌数

いずれの菌に対しても、通電してオゾン水を噴霧することで、超純水の噴霧よりも強い除菌作用が見られた。大腸菌では 5×10^6 個の生菌に対して 1 回のオゾン水噴霧では除菌しきれず、713 個/プレート (試験対象片に換算すると 7130 個) の生菌が残存した。黄色ブドウ球菌では、 5×10^5 個および 5×10^6 個の生菌に対して 1 回のオゾン水噴霧でいずれも 28 個/プレート生残しており、 5×10^6 では 2 回の噴霧でも 10 個/プレートの生残菌を認めた。

オゾン水噴霧の結果からだけでは生残菌数が等しく除菌効果に菌量依存性がないように見えるが、通電しない超純水噴霧での生残菌数 (カバーガラス上に洗い流されずに残った菌数) が 2×10^4 個および 5.6×10^4 個といずれも 10^4 個オーダーであったことから、近似の除菌効果を示したものと考えられる。また、表 1 に示したように、JIS Z 2801 で示されている抗菌活性計算式に従って抗菌活性値を算出すると、いずれの場合もオゾン水噴霧によって 99% 以上の死滅率を示す 2.0 以上をクリアしていた。

表 1 に示した超純水噴霧の結果から、1 回ないし 2 回の超純水噴霧でも、 $5 \times 10^4 \sim 10^6$ の生菌に対して、1 ~ 2 桁の除菌能を有することがわかった。噴霧後にシャーレの蓋に溜まった液 100 μ L を、トリプトソーヤ液体培地 10 mL で 37°C 一晩、振盪培養した結果、超純水噴霧では全てで白濁し菌の増殖が見られたが、オゾ

ン水を噴霧した全てで菌の増殖が見られなかった。このことから、超純水噴霧では洗浄効果によって除菌されていることがわかり、オゾン水の殺菌効果を示すためにも、試験対象片からこぼれた液に対して定量的に計数することが望ましいことが示された。

3. 2 スプレー型オゾン水生成装置の原料水に pH 調整剤および界面活性剤を添加した場合の除菌効果評価

オゾン水生成に用いる原料水は、電極の負担を考慮すると超純水が望ましい。しかし、一般へのスプレー型オゾン水生成装置の普及を考慮すると、水道水の利用、オゾン水中のオゾンの安定化を考慮した pH 調整剤（クエン酸）の利用あるいは、消毒の相乗効果が期待できる界面活性剤の添加などについての検討が必要になる。また、消毒法などの国際的な微生物処理評価において、微生物そのものに対する効果だけでは不十分であり、有機物を含んだ対象への微生物処理効果が求められているが^{12,16)}、オゾンは速やかに有機物と反応して分解してしまうため有機物負荷条件下における除菌効果の測定が難しい。有機物負荷処理した試験対象片に対して、超純水から生成したオゾン水（4 mg/L）を 1 mL 滴下洗浄し、確立した試験法に従って残存する生菌の計数を試みたが再現性が得られなかった。そこで、オゾン水生成に用いる原料水に 100 mg/L クエン酸 + 100 mg/L 非イオン界面活性剤（ポリオキシエチレンラウリルエーテル 130K）を加えてオゾン水の安定化と消毒効果の増強を図り、この混合溶液を原料水とした場合の除菌効果を、超純水を電解した場合と同様に確立した試験法で評価した。大腸菌に対する試験結果を図 4 および表 2 に、黄色ブドウ球菌に対する試験結果を図 5 および表 2 に示す。いずれの菌に対しても、通電してオゾン水を噴霧することで生残する菌は確認されず、抗菌活性値もすべて 2.0 以上であった。

クエン酸による殺菌効果に加えて界面活性剤の洗い流し効果もあって、表 1 の超純水の場合と比較して通電しない場合でも生残菌数が半数～3 桁減少しており、特に黄色ブドウ球菌での減少が顕著であった。ただし、純水以外の薬剤を含む原料水を用いて電解オゾン水を生成させる場合の評価には、試験対象片上に添加する細菌数を増やすための予備試験を行う必要性が示唆された。

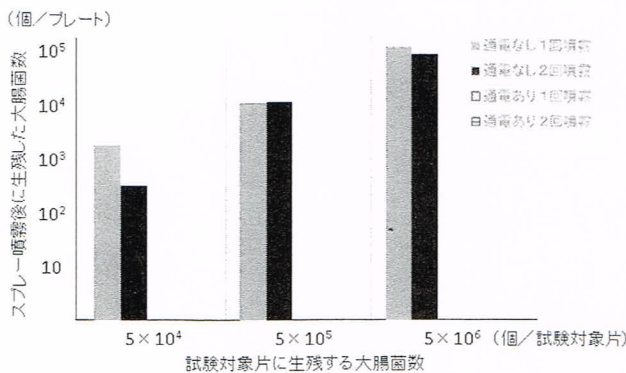


図 4 界面活性剤およびクエン酸を含んだ原料水でスプレー噴霧した場合の大腸菌に対する除菌効果

pH 調整剤および界面活性剤添加した原料水を使った場合、通電してオゾン水を噴霧することで生残する大腸菌は確認されなかった。

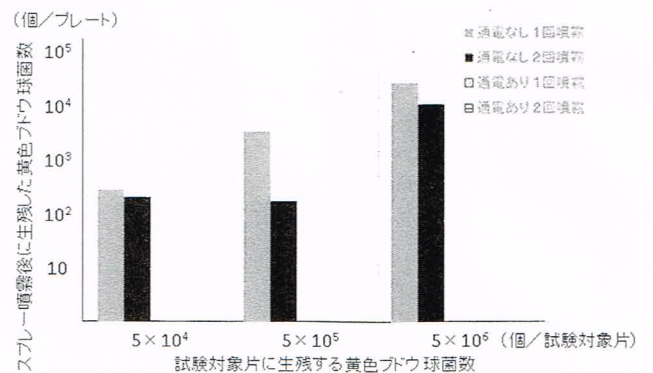


図 5 界面活性剤およびクエン酸を含んだ原料水でスプレー噴霧した場合の黄色ブドウ球菌に対する除菌効果

pH 調整剤および界面活性剤添加した原料水を使った場合、通電してオゾン水を噴霧することで生残する黄色ブドウ球菌は確認されなかった。

表 2 原料水に界面活性剤およびクエン酸を添加した場合のスプレー型オゾン水生成装置の除菌効果

試験菌 (数)		大腸菌 (個/100 μL)			黄色ブドウ球菌 (個/100 μL)		
		5×10 ⁴	5×10 ⁵	5×10 ⁶	5×10 ⁴	5×10 ⁵	5×10 ⁶
通電なし	1 回噴霧	1600	9600	100800	280	3300	26800
	2 回噴霧	302	9800	73600	207	172	10600
通電あり (オゾン水)	1 回噴霧	0	0	0	0	0	0
	2 回噴霧	0	0	0	0	0	0
抗菌活性値	1 回噴霧	3.2	4.0	5.0	2.4	3.5	4.4
	2 回噴霧	2.5	4.0	4.9	2.3	2.2	4.0

数値はスプレー後の生残菌数

3. 3 有機物負荷によるスプレー型オゾン水生成装置の除菌効果評価

3.2の結果、pH調整剤および界面活性剤を原料水に添加した場合、極めて強い除菌力が発揮されることが明らかとなったことから、この混合溶液を原料水としてスプレー型オゾン水生成装置による有機物負荷条件下の除菌効果を評価した。表3に結果を示したように、有機物負荷量 2μg とし、通電してオゾン水を2回噴霧した場合には生残菌は確認されなかった。また、1度の噴霧でも、大腸菌では 5×10⁶ に対して 2 個、黄色ブドウ球菌では 5×10⁵ に対して 6 個、5×10⁶ で 28 個の生残する菌を確認したが、抗菌活性値はすべて 2.0 以上であった。一方、表4に示したように、有機物負荷量 20 μg では、大腸菌 5×10⁴ に対して 1 回および 2 回噴霧、5×10⁵ に対して 2 回噴霧、黄色ブドウ球菌 5×10⁴ および 5×10⁵ に対して 2 回噴霧で生残菌は確認できなかったが、大腸菌 5×10⁵ に対する 2 回噴霧で 320 個、黄色ブドウ球菌 5×10⁴ に対する 1 回噴霧で 1 個、5×10⁵ に対しては 1 回噴霧で 266 個、5×10⁶ に対する 1 回噴霧では 116 個の生残菌を確認した。これらの抗菌活性値は 2.0 以上であった。

表 3 菌液に有機物 (BSA 2 μg) を負荷した場合のスプレー型オゾン水生成装置の除菌効果

試験菌 (数)		大腸菌 (個/100 μL)			黄色ブドウ球菌 (個/100 μL)		
		5×10 ⁴	5×10 ⁵	5×10 ⁶	5×10 ⁴	5×10 ⁵	5×10 ⁶
通電なし	1 回噴霧	20240	154000	224000	11000	144000	146000
	2 回噴霧	17500	132000	166000	12800	142000	138000
通電あり (オゾン水)	1 回噴霧	0	0	2	0	6	28
	2 回噴霧	0	0	0	0	0	0
抗菌活性値	1 回噴霧	4.3	5.2	5.0	4.0	4.4	3.7
	2 回噴霧	4.2	5.1	5.2	4.1	5.2	5.1

数値はスプレー後の生残菌数

また、大腸菌 5×10⁶ に対する 1 回および 2 回噴霧および黄色ブドウ球菌 5×10⁶ に対する 1 回噴霧では、生残菌数が通電なしの結果とほとんど変わらず、抗菌活性は認められなかった。今回、オゾン水中の溶存オゾン濃度 (3~4 mg/L) と有機物負荷量とのバランスから、抗菌活性値が得られる菌量 (5×10⁵) と得られない菌量 (5×10⁶) が明確になった。今後、今回の結果を参考にして、スプレー型オゾン水製造装置のみならず、オゾン水の有機物負荷試験を検討する際のオゾン水中の溶存オゾン濃度、有機物負荷量と接種菌量の割合を検討する必要がある。

また、表4に示した有機物負荷量 20 μg、大腸菌 5×10⁴ および 5×10⁶ に対して通電せずに噴霧した場合で、1 回噴霧よりも 2 回噴霧時の方が明らかに生残菌数が多かった。この理由は不明であるが、菌種の選定

や実験手技を含めて、有機物負荷試験については今後さらなる検討を行なう予定である。

表 4 菌液に有機物 (BSA 20 μg) を負荷した場合のスプレー型オゾン水生成装置の除菌効果

試験菌 (数)		大腸菌 (個/100 μL)			黄色ブドウ球菌 (個/100 μL)		
		5×10^4	5×10^5	5×10^6	5×10^4	5×10^5	5×10^6
通電なし	1 回噴霧	4500	51000	320000	3100	25300	312000
	2 回噴霧	9700	49000	432000	2450	13300	300000
通電あり (オゾン水)	1 回噴霧	0	320	312000	1	266	306000
	2 回噴霧	0	0	320000	0	0	116
抗菌活性値	1 回噴霧	3.7	2.2	0.0	3.5	2.0	0.0
	2 回噴霧	4.0	4.7	0.1	3.4	4.1	3.4

数値はスプレー後の生残菌数

4. 結論

本研究ではオゾン水スプレーに着目し、スプレー剤の除菌試験法について検討した。木片を台座として置くことで、噴霧時の吹き飛ばしや浸漬による過剰な洗浄効果を抑え、生菌数を計数することが可能な手法を考案した。また、JIS Z 2801 に準拠し、抗菌活性値を算出することで数値化することも示した。確立した手法を用いれば、電解前の原料水に pH 調整剤や界面活性剤などの薬剤を添加した場合でも抗菌活性の評価が可能であることから、オゾン水評価の難点である有機物負荷試験についても応用できる可能性が示唆された。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、小型オゾン水生成装置 (オゾン水スプレー試作機) を貸与いただきました、国立東京工業高等専門学校物質工学科・北折典之先生に感謝いたします。また、本研究の計画段階から御指導いただきました、摂南大学名誉教授・中室克彦先生ならびにデノラ・ペルメレック株式会社・錦 善則技師長に深謝いたします。

6. 参考文献

- 1) 北折典之、松石早矢、武末早織、中井貴章、宇野雅晴、錦 善則、純水の SPE 電解によるオゾン水生成用陽極材料の検討. 医療・環境オゾン研究、22: 105-113 (2015).
- 2) 大野 章、“medicina 増刊号: これだけは知っておきたい検査のポイント第9集”、第52巻、522-527 (2015)、(医学書院、東京).
- 3) J. Turnidge, M. Ferraro and J. Jorgensen, Susceptibility test methods: General considerations. 10th Edition, 1115-1121 (2011), (Manual of Clinical Microbiology, Washington, DC).
- 4) 日本工業規格、抗菌加工製品-抗菌性試験. 方法・抗菌効果 (JIS Z 2801:2010).
- 5) M. R. Pines, F. S. Tomasino, P. M. Cottrill, C. G. Hamilton and E. A. Parker, Procedural revision to the AOAC germicidal spray products as disinfectants test method: Establishment of minimum and maximum log density values for test microbes on inoculated carriers. *J. AOAC International*, 96: 567-572 (2013).
- 6) C. O'Donnell, B. K. Tiwari, P. J. Cullen and R. G. Rice, “Ozone in Food Processing”, 277-280 (2012).
- 7) 内藤博敬、谷 幸則、メンブランフィルター法を応用したオゾン水の殺菌効果評価法の検討. 医療・環境オゾン研究、23: 127-131 (2016).
- 8) 赤堀幸男、村上篤司、星 昭二、オゾン水の殺菌効果と院内感染予防への応用. 日本集中治療医学会雑誌、

7: 3-10 (2000).

- 9) 矢野一好、吉田靖子、新開敬行、土屋悦輝、藪内 清、金子光美、岩崎謙二、市川久浩、セルロース吸着・凝集法による水中ウイルス試験法の検討. 水道協会雑誌、60: 10-23 (1991).
- 10) S. Stucki, G. Theis, R. Kötz, H.Devantay and H. J. Christen, In situ production of ozone in water using a membral electrolyzer. *J. Electrochem. Soc.*, 132: 367-371 (1985).
- 11) A. Kraft, M. Stdelmann, M. Wünsche and M. Blaschke, Electrochemical ozone production using diamond anodes and a solid polymer electrode. *Electrochemistry Communications*, 8: 883-886 (2006).
- 12) European Committee for Standardization, Chemical disinfectants. Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas. Test method and requirements (phase 2, step 1), (BS EN 13704:2002).
- 13) 岩田和佳、中室克彦、水中溶存オゾンの半減期の制御方法に関する研究. 医療・環境オゾン研究、22: 66-72 (2016).
- 14) A. I. T. Walker, V. K. H. Brown, L. W. Ferrigan, R. G. Pickering and D. A. Williams, Toxicity of sodium lauryl sulphate, sodium lauryl ethoxysulphate and corresponding surfactants derived from synthetic alcohols. *Food Cosmet. Toxicol.*, 5: 763-769 (1967).
- 15) 野田 衛、上間 匡、ノロウイルスの不活化に関する研究の現状. *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, 129: 37-54 (2011).

A Method for Evaluating the Sterilization Performance of Spray-Type Ozonated Water Generators

Hiroataka NAITOU¹⁾, Yukinori TANI¹⁾, Akio KAMIJO²⁾, Yasuhiro JOEY³⁾ and Mutsumi TSUJI⁴⁾

¹⁾ Department of Environmental and Life Sciences, School of Food and Nutritional Sciences,
University of Shizuoka

52-1 Yada, Suruga-ku, Shizuoka-shi, Shizuoka 422-8526, Japan

²⁾ Dream brain

Tranomom Denki Bldg. 3F, 2-8-1, Tranomon, Minato-ku, Tokyo 105-0001, Japan

³⁾ Norland Pacific Inc.

Wako Bldg. 2F, 1-62, Jinbo-cho, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0051, Japan

⁴⁾ Shizuoka Institute of Environment and Hygiene

4-27-2, Kitaando, Aoi-ku, Shizuoka-shi, Shizuoka 420-8637, Japan

In recent years, advances in electrode technology have led to rapid miniaturization of ozonated water-generating devices. Spray-type ozonated water generators, in particular, are expected to be utilized in diverse fields, including food hygiene, nursing care, and medicine. In general, the sterilization performance of spray-type devices is evaluated based on the antimicrobial properties of a disinfectant in the bottle before being atomized. However, in spray-type ozonated water generators, ozonated water is generated via atomization from pure water with no antimicrobial activity. Therefore, it is necessary to assess the sterilizing potency of the atomized ozonated water generated by this type of device. However, no standardized technique exists for evaluating the sterilization effects of a disinfectant after being atomized. In the present study, we evaluated the sterilization performance of a spray-type ozonated water-generating device using an experimental method. First, we prepared test specimens by applying a

microbial solution on microscope coverslips and then mounted each coverslip on a wooden pedestal, which was placed inside a Petri dish lid. This placement was intended to prevent the specimen from being blown away or being excessively washed when subjected to spraying. After spraying, the specimen was immersed in a liquid medium to collect surviving microbes. The microbial solution was then spread on Trypto-Soya agar medium, and colonies were counted to numerically evaluate the sterilization performance. Compared with ultrapure water used as a negative control, the atomized ozonated water exhibited a strong sterilizing effect on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. In accordance with the JIS Z 2801 protocol, the score exceeded 2.0, indicating antimicrobial activity. Subsequently, we tested the effects of a surfactant and organic matter loading on antimicrobial activity of atomized ozonated water. The results of these tests were also successfully evaluated using the same method. Consequently, we hereby propose this experimental method as a new approach for evaluating the potency of atomized ozonated water.

Key words : ozonated water, ozonated water generators, atomized ozonated water, sterilization performance