

スポンジに対する台所用合成洗剤及び石けんの 除菌活性試験方法

監修：高麗寛紀

徳島大学工学部 教授

洗剤・石けん公正取引協議会

(平成 19 年 7 月 31 日改正)

目 次

序文.....	1
1.適用範囲.....	1
2.引用規格.....	1
3.定義.....	1
3.1 除菌.....	1
3.2 除菌活性値.....	1
4.試験の概要.....	1
5.試験の準備.....	2
5.1 試験に用いる細菌.....	2
5.2 薬品,材料及び器具.....	3
5.2.1 薬品.....	3
5.2.2 材料.....	3
5.2.3 器具.....	4
5.3 殺菌方法.....	4
5.3.1 乾熱殺菌.....	4
5.3.2 高圧蒸気殺菌.....	5
5.3.3 火炎殺菌.....	5
5.3.4 ろ過殺菌.....	5
5.3.5 器具の用意.....	5
5.4 培地など.....	5
5.4.1 培地.....	5
a) ニュートリエント培地濃縮液.....	5
b) トリプチックソイ寒天培地.....	6
c) トリプチックソイ寒天平板培地.....	6
d) ニュートリエント寒天培地.....	6
e) 斜面培地.....	6
f) 標準寒天培地.....	6
5.4.2 希釈液.....	6
a) リン酸緩衝液.....	7
b) 生理食塩水.....	7
c) リン酸緩衝生理食塩水.....	7

5.4.3	硬水濃縮液	7
5.5	細菌の保存	7
6.	試験方法	8
6.1	試験菌の前培養	8
6.2	試験片の調製	8
6.3	試料の調製	9
6.3.1	試験試料の調製	9
6.3.2	対照試料の調製	9
6.4	試験菌液の調製	9
6.4.1	菌液の調製	9
6.4.2	試験菌液の調製	9
6.5	試験操作	10
6.5.1	試験菌液の接種	10
6.5.2	試料の接種	10
a)	試験試料の接種	10
b)	対照試料の接種	10
6.5.3	初発菌数の測定	11
6.5.4	不活性化及び細菌の抽出	11
6.6	生菌数の測定	11
6.6.1	希釈系列の調製	11
6.6.2	混積平板培養	11
6.6.3	生菌数の計算	12
7.	試験結果	12
7.1	試験成立条件の判定	12
7.2	除菌活性値の計算	13
7.3	試験結果の記録	14
付表1	引用規格	14
付録 I	揉み回数及び揉み方	16
付録 II	不活性化剤の有効性の確認	17
a)	試験試料の準備	17
b)	試験菌液の準備	17
c)	不活性化剤の効果の確認	17
d)	不活性化剤の細菌に対する影響の確認	17
e)	不活性化剤の有効性の確認	17

付録Ⅲ	不活性化剤の例	18
	a) SCDLP 培地不活性化剤	18
付録Ⅳ	試験菌の抽出方法の確認	18
	a) 試験菌液の準備	18
	b) 試験菌の接種及び洗い出し	18
	c) 回収率の確認	19
	d) 抽出方法の有効性の確認	19
解説	20
I.	試験方法	20
II.	試験条件及び操作	20
1.	試験条件	20
1.1	試験温度	20
1.2	試験試料接触後の放置時間(接触時間)	20
1.3	試験片(スポンジ)	21
	a) 試験片の材質	21
	b) 試験片の大きさ	21
1.4	汚れ物質と濃度	22
1.5	試験菌	22
	a) 試験に用いる細菌	22
	b) 初発菌数	22
	c) 試験菌液の調製と接種量	23
1.6	試験試料	23
1.7	対照試料	23
2.	試験操作	24
2.1	前培養	24
2.2	試験片棒での揉み方並びに回数	24
III.	試験成立条件	24
1.	対照試料での菌数の増殖	24
2.	繰り返し試験でのばらつき	24
3.	不活性化剤	25
IV.	薬品, 材料及び器具入手先参考例	25
1.	スポンジ入手先例	25
2.	ねじ口瓶入手先例	25

3. ポンチ入手先例.....	26
-----------------	----

序文

本試験方法は、スポンジに対する台所用合成洗剤及び石けんの除菌効果を実験室レベルで評価することを目的としたものである。本試験方法における対象スポンジのモデル系やその取り扱い方については JIS L 1902 を、細菌の取扱い方また試験菌の準備方法などは JIS L 1902 及び JIS Z 2801 を参考にした。

1. 適用範囲

本試験方法は、家庭用品品質表示法に規定される台所用合成洗剤及び石けんを対象とし、スポンジの細菌に対する除菌効果を評価する試験方法について規定する。

2. 引用規格

付表1に示す規格は、本試験方法に引用されることによって、本試験方法の規定の一部を構成する。これらの引用規格は、その最新版を適用する。

3. 定義

本試験方法で用いる主な用語の定義は、次のとおりとする。

3.1 除菌

対象物から増殖可能な細菌数(生菌数)を有効量減少させること。ただし、カビ・酵母などの真菌類は含まない。

3.2 除菌活性値

細菌を接種した試験片に対照試料又は試験試料を接種し、一定時間放置した後に、それぞれの試験片に残存する生菌数を測定し、対照試料を接種した試験片の生菌数の常用対数値に対する試験試料を接種した試験片の生菌数の常用対数値の差で示す。

4. 試験の概要

適当な汚れと共に細菌を試験片(スポンジ)に接種し、所定時間放置する。その後、試験片に所定量の試験試料を接種し、所定時間後に不活性化剤にて、試験試料の細菌の増殖を抑制したり、

死滅させる性質を不活性化し、試験片に残存する細菌の生菌数を定量する。

表1 試験条件

試験温度	25±1 °C
接触時間	18 時間
試験片	軟質ウレタンフォーム(見掛け密度 16~22 kg/m ³ , 硬さ 50~150 N, 直径 24 mm, 厚さ 30 mm)
試験菌種	黄色ぶどう球菌, 大腸菌
試験菌液濃度及び接種量	7.0×10 ⁷ ~7.0×10 ⁸ cfu/mL, 0.5 mL
汚れ	0.3 (w/v)% ニュートリエント培地
試験試料濃度	原液
対照試料及び濃度	0.05 (w/v)% ポリソルベート 80 水溶液
試験試料及び対照試料接種量	0.5 mL
試験繰り返し回数	試験試料及び対照試料に対し, 少なくとも 3 回繰り返す

5. 試験の準備

5.1 試験に用いる細菌

試験に用いる細菌の種類は、次によるものとし、それぞれの細菌について試験を行う。

- 1) 黄色ぶどう球菌 (*Staphylococcus aureus*) (スタフィロкокカス・アウレウス)
- 2) 大腸菌 (*Escherichia coli*) (エシエリヒア・コリー)

試験に用いる細菌の菌株の一例を表 2 に示す。表 2 に示す保存機関以外から分譲された菌株を使用する場合は、分譲機関が国際微生物株保存連盟(WFCC : World Federation of Culture Collection)又は日本微生物株保存連盟(JSCC : Japan Society of Culture Collection)に加盟している機関であり、なおかつ表 2 と同一系の菌株とする。

表 2 試験に用いる細菌の菌株

細菌の種類	菌株の保存番号	菌株の保存機関名
黄色ぶどう球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ATCC6538P FDA209P NBRC12732	American Type Culture Collection Food and Drug Administration 独立法人 製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源センター
大腸菌 (<i>Escherichia coli</i>)	ATCC8739 NBRC3972	American Type Culture Collection 独立法人 製品評価技術基盤機構・生物遺伝資源センター

5.2 薬品, 材料及び器具

本試験方法で用いる薬品, 材料及び器具は, 特に指定がない限り次のものとする。

5.2.1 薬品

エタノール(C ₂ H ₅ OH)	JIS K 8101 に規定する 1 級以上のもの。
水	第14 改正日本薬局方の精製水の基準に適合するもの。
肉エキス	微生物試験用のもの。
ペプトン	微生物試験用のもの。
塩化ナトリウム(NaCl)	JIS K 8150 に規定する特級のもの。
寒天	JIS K 8263 に規定する特級のもの。
酵母エキス	微生物試験用のもの。
トリプトン	微生物試験用のもの。
グルコース	微生物試験用のもの。
カゼイン製ペプトン	微生物試験用のもの。
大豆製ペプトン	微生物試験用のもの。
レシチン	微生物試験用のもの。
ポリペプトン	微生物試験用のもの。
ニュートリエント培地	Difco 社製ニュートリエント培地(粉末)。
塩化カルシウム二水和物	JIS K 8122 に規定する特級のもの。
塩化マグネシウム六水和物	JIS K 8159 に規定する特級のもの。
水酸化ナトリウム(NaOH)	JIS K 8576 に規定する特級のもの。
塩酸(HCl)	JIS K 8180 に規定する特級のもの。
りん酸二水素カリウム	JIS K 9007 に規定する特級のもの。
ポリソルベート 80(Tween80)	ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート。対照試料調製用。

5.2.2 材料

スポンジ(試験片)	JIS K 6401 に合致する軟質ウレタンフォームで, 見掛け密度が 16~22 kg/m ³ , JIS K 6400 で測定したときの硬さが 50~150 N, 厚さは 30 mm で, 抗菌加工されていないもの。
ねじ口瓶	キャップ付きガラス製容器。キャップはパッキン付きのものであること(直径 50 mm, 高さ 90 mm, 110 mL 容量)。
ガラス製シャーレ	内径約 90 mm のもの。
プラスチック製滅菌シャーレ	菌数測定用。JIS K 0950 に規定するもの。

試験管	外径 18 mm×150 mm 程度の殺菌可能なガラス製試験管(金属キャップ付きが望ましい)。プラスチック製の殺菌済み使い捨て試験管又は遠沈管を用いてもよい。
ガラスビーズ	直径が 3～5 mm のもの。必ず新品のものを使用すること。
綿栓	青梅綿を使用したもの、又はシリコン栓、金属栓、モルトン栓など。

5.2.3 器具

安全キャビネット	JIS K 3800 に適合又は同等以上の性能を有するもの。
クリーンベンチ	JIS B 9922 に規定する微生物試験用に適合するもの。
オートクレーブ	少なくとも 15～25 分間、温度 121±1 °C (圧力 103 kPa 相当) に保てるもの。
恒温水槽	試験温度±1 °Cで調節できるもの。
培養器	37±1 °Cに調節できるもの。
pH 計	校正精度が 25 °Cで±0.1 pH のもの。
乾熱殺菌器	温度を 160～180 °Cに保てるもの。
試験管かくはん器	試験管を適当な速度で振盪し、内容液を混合できるもの。
分光光度計	波長 540～660 nm の範囲で測定できるもの。
ピペット	JIS K 0970 又は JIS R 3505 のクラス A に適合又は同等の精度をもつもの。
白金耳	先端のループが約 4 mm (約 10 μL) のもの。プラスチック製の殺菌済み使い捨てループを用いてもよい。
恒温器	温度 25±1 °Cに保てるもの。
ポンチ	直径 24 mm の革細工などに用いられる打ち抜き器。
試験片棒	直径 20 mm で長さ 150 mm 程度のもの。高圧蒸気殺菌が可能な材質として、ガラス製、ポリプロピレン製、ポリカーボネート製などが使用できる。

5.3 殺菌方法

5.3.1 乾熱殺菌

殺菌対象物を、160～180 °Cの乾熱殺菌器に入れ、30～60 分間保つ⁽¹⁾。

注⁽¹⁾ 乾熱殺菌終了後、殺菌対象物の綿栓、包装紙などが水でぬれたときは、その器具は用いてはならない。

5.3.2 高圧蒸気殺菌

オートクレーブに水を入れ、金網の棚に殺菌対象物を金網かごに入れて載せる。オートクレーブのふたを締めて加熱し、温度 121 °C (圧力 103 kPa 相当) に 15～25 分間保つ。加熱を止め、100 °C 以下に自然冷却後、排気弁を開き蒸気を抜き去り、ふたを開け殺菌したものを取り出し、必要に応じてクリーンベンチ又は安全キャビネット内で冷却する。オートクレーブは、培地、加工薬剤による汚染を防ぎ、清浄に保つため、必要に応じ中性洗剤で洗浄し、水で十分にすすぐ。

5.3.3 火炎殺菌

殺菌対象物又は部位をガス又はアルコールの火炎に当てる。白金耳の場合は十分に赤熱し、試験管の場合は 2～3 秒間火炎に当てる。

5.3.4 ろ過殺菌

被殺菌物が液体で、熱や圧力により変質する可能性がある場合、殺菌した孔径 0.45 μm 以下のフィルターを用い、殺菌した容器内に被殺菌物をろ過することにより殺菌物を得ることができる。注射器などによる加圧ろ過、あるいは真空ポンプなどによる吸引ろ過のいずれでも構わない。操作は必要に応じてクリーンベンチ又は安全キャビネットなどの清浄空間で行う。

5.3.5 器具の用意

試験管、フラスコなどのガラス製器具は、アルカリ又は中性洗剤で丁寧に洗浄し、水で十分すすいで乾燥してから乾熱殺菌するか、高圧蒸気殺菌したものをを用いる。

5.4 培地など

培地などは、次に示す組成のものを用いる。特に指定がある場合を除いて、同一の組成のものであれば、市販品を用いることができる。

5.4.1 培地

a) ニュートリエント培地濃縮液

モデル汚濁物質用。5.2.1 の水 1 000 mL に対して Difco 社製ニュートリエント培地 15g を採り、フラスコに入れて混合し、内容物を十分に溶解した後、pH 6.6～7.0 (25 °C) になるように水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整し、必要に応じて試験管に分注し、綿栓をして高圧蒸気殺菌する。調製後、直ちに使用しないものは 5～10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎたニュートリエント培地濃縮液は、用いてはならない。

b) トリプチックソイ寒天培地

5.2.1 の水 1 000 mL に対してカゼイン製ペプトン 15.0 g, 大豆製ペプトン 5.0 g, 塩化ナトリウム 5.0 g, 寒天粉末 15.0 g を採り, フラスコに入れて混合し, 沸騰する水浴中で加熱して内容物を十分に溶解した後, pH 7.1~7.5 (25 °C) になるように水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整し, 綿栓をして高圧蒸気殺菌する。調製後, 直ちに使用しないものは 5~10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎたトリプチックソイ寒天培地は, 用いてはならない。

c) トリプチックソイ寒天平板培地

菌の前培養用。b) に従って調製し, 溶解したトリプチックソイ寒天培地を滅菌済みシャーレに 15~20 mL 注ぎ, 内容物を凝固させる。調製後, 直ちに使用しないものは 5~10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎたトリプチックソイ寒天平板培地は, 用いてはならない。

d) ニュートリエント寒天培地

5.2.1 の水 1 000 mL に対して肉エキス 3.0 g, ペプトン 5.0 g, 寒天粉末 15.0 g を採り, フラスコに入れて混合し, 沸騰する水浴中で加熱して内容物を十分に溶解した後, pH 6.6~7.0 (25 °C) になるように水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整し, 綿栓をして高圧蒸気殺菌する。菌液を混釈する場合は培地の温度が 45~48 °C にしておく。調製後, 直ちに使用しないものは 5~10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎたニュートリエント寒天培地は, 用いてはならない。

e) 斜面培地

試験管に予め温めて溶解した d) のニュートリエント寒天培地を 6~10 mL 注ぎ, 綿栓をして高圧蒸気殺菌する。殺菌終了後, 清浄な室内に試験管を水平面に対して約 15 度傾けて置き, 内容物を凝固させる。調製後, 直ちに使用しないものは 5~10 °C の温度で保存する。凝結水がなくなったものは溶解し, 再び凝固させて使用する。調製後 1 か月以上過ぎた斜面培地は, 用いてはならない。

f) 標準寒天培地

5.2.1 の水 1 000 mL に対して酵母エキス 2.5 g, トリプトン 5.0 g, グルコース 1.0 g, 寒天粉末 15.0 g を採り, フラスコに入れて混合し, 沸騰する水浴中で加熱して内容物を十分に溶解した後, pH 7.0~7.2 (25 °C) になるように水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整し, 綿栓をして高圧蒸気殺菌する。菌液を混釈する場合は培地の温度が 45~48 °C にしておく。調製後, 直ちに使用しないものは 5~10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎた標準寒天培地は, 用いてはならない。

5.4.2 希釈液

a) リン酸緩衝液

リン酸二水素カリウム 34.0 g をメスフラスコに採り、5.2.1 の水 500 mL を加えて混合し、内容物を十分に溶解した後、pH 6.8～7.2 (25 °C) になるように水酸化ナトリウム溶液で調整する。さらに、水を加えて 1 000 mL とし、リン酸緩衝原液とする。必要に応じて試験管又は三角フラスコに分注し、綿栓をして高圧蒸気殺菌する。調製後、直ちに使用しないものは 5～10 °C の温度で保存する。調製後 6 か月以上過ぎたりん酸緩衝原液は、用いてはならない。

リン酸緩衝原液 1.25 mL を 5.2.1 の水で、1 000 mL に希釈する。目的に応じ、100 mL あるいは 9.0 mL ずつ分注し、オートクレーブを用い 121 °C で 15～25 分間殺菌する。調製後、直ちに使用しないものは 5～10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎたりん酸緩衝液は、用いてはならない。

b) 生理食塩水

5.2.1 の水 1 000 mL に対して塩化ナトリウム 8.5 g を採り、フラスコに入れて十分に溶解後、必要に応じて試験管に分注し、高圧蒸気殺菌する。調製後、直ちに使用しないものは 5～10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎた生理食塩水は、用いてはならない。

c) リン酸緩衝生理食塩水

a) のりん酸緩衝液を b) の生理食塩水 (0.85 % 塩化ナトリウム溶液) で 800 倍に希釈する。必要に応じて試験管又は三角フラスコに分注し、綿栓をして高圧蒸気殺菌する。調製後、直ちに使用しないものは 5～10 °C の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎたりん酸緩衝生理食塩水は、用いてはならない。

5.4.3 硬水濃縮液

塩化カルシウム二水和物 59.03 g 及び塩化マグネシウム六水和物 27.21 g をメスフラスコに採り、5.2.1 の水 500 mL を加えて混合し、内容物を十分に溶解した後、さらに水を加えて 1 000 mL とする。必要に応じて試験管又は三角フラスコに分注し、綿栓をして高圧蒸気殺菌するか、又はろ過殺菌する。この硬水濃縮液の濃度は、CaCO₃ 換算で 53.58 g/L である。調製後、直ちに使用しないものは室温で保存する。調製後 1 年以上過ぎた硬水濃縮液は、用いてはならない。

5.5 細菌の保存

細菌の移植は無菌的に行う。必要に応じて安全キャビネットを使用する。表 2 の公的菌株保存機関から分譲された乾燥細菌を、説明書に従って復水・増殖培養する。培養後、試験管かくはん器で十分にかくはんし、10 μL の白金耳を用いてニュートリエント寒天平板培地上に画線し、37±1 °C で 24 時間培養する。培養後、細菌の性状ならびに汚染のないことを確認する。

片手に元株と移植しようとする 5.4.1 e) の斜面培地を、他の手に白金耳の柄を持ってその手で綿栓を抜き取り、試験管の口を火炎殺菌する。白金耳を火炎殺菌し、新しい斜面培地の凝結水のある部分に白金耳のループを差し込んでよく冷却してから、元株のシャーレ又は試験管に入れ、細菌の繁殖面から1白金耳をかきとり、新しい斜面培地に塗抹⁽²⁾し、再び試験管の口を火炎殺菌し、元のように綿栓をする。白金耳は火炎殺菌しておく。移植を行った斜面培地を 37 ± 1 °C で 24~48 時間培養し、その後は、温度 5~10 °C で保存する。移植してから1か月以内に次の移植を同様にを行い継代培養する。継代培養は菌株保存機関から分譲された元株から数えて 10 回を限度とする。また、移植してから 1 か月以上過ぎたものは次の移植に用いてはならない。

注⁽²⁾ 図 1 のように、白金耳の先を凝結水につけて細菌を分散し、ここから斜面上方まで直線を引くか、又は白金耳の先を再び凝結水につけて蛇行させながら斜面上方まで線を引く。

備考 菌株保存機関から分譲された菌株を、凍結乾燥、凍結などの長期間保存可能な方法で保存した菌株にあつては、保存株を作成するために元株から培養した継代回数を保存菌株の継代回数とする。

この保存菌株を試験に用いる場合は、10 回から保存菌株の継代回数を引いた回数を使用限度とする。

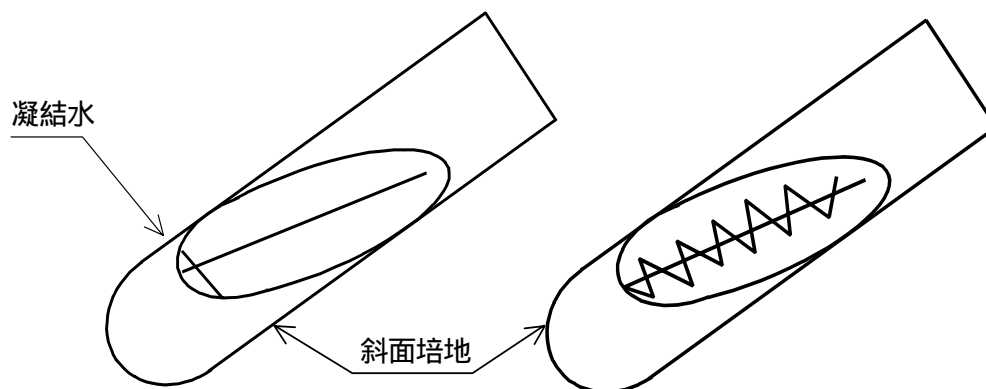


図 1 細菌の移植

6. 試験方法

6.1 試験菌の前培養

5.5 の保存菌株から 5.4.1 c) のトリプチックソイ寒天平板培地に1白金耳移植し、温度 37 ± 1 °C で 18~24 時間培養する。さらに、この培養菌から新たなトリプチックソイ寒天平板培地に 1 白金耳移植し、温度 37 ± 1 °C で 18~24 時間培養する。

6.2 試験片の調製

5.2.2 のスポンジを 5.2.3 のポンチで打ち抜いて、直径 24 mm の円柱状の試験片を調製する。試験試料用、対照試料用と初発菌数測定用で、それぞれ各 3 個以上の試験片を準備する。

6.3 試料の調製

6.3.1 試験試料の調製

試験試料は原液で使用する。試験試料は試験温度条件下に 1 時間以上静置して試験温度に馴染ませてから試験に用いる。

6.3.2 対照試料の調製

対照試料は 0.05 (w/v) % ポリソルベート 80 水溶液を殺菌して用いる。水溶液の調製には 5.2.1 の水を用いる。対照試料は試験日当日に調製し、試験温度条件下に 1 時間以上静置して試験温度に馴染ませてから試験に用いる。

6.4 試験菌液の調製

6.4.1 菌液の調製

殺菌済みのガラスビーズ (3~5 mm) 5 g を加えた **b)** の生理食塩水 20 mL の入った三角フラスコに 6.1 で前培養した試験菌の菌体を白金耳で採り、適当な方法で容器を振り、菌体を均一に懸濁させ、菌液を調製する。調製した菌液は分光光度計などを用いて⁽³⁾ 生菌数が $8.8 \times 10^8 \sim 1.7 \times 10^{11}$ cfu/mL⁽⁴⁾ であることを確認する。

注⁽³⁾ 分光光度計で生菌数を測定する場合は、菌液 1.0 mL をピペットで正確に採取し、5.2.1 の水又は 5.4.2 の適当な希釈液 9.0 mL の入った試験管に混ぜ、よくかくはんする。さらに、この試験管から 1.0 mL を殺菌済みのピペットで採り、5.2.1 の水又は 5.4.2 の適当な希釈液 9.0 mL の入った別の試験管に混ぜ、よくかくはんする。30 秒後に吸光度を測定する。このとき、予め吸光度と生菌数の関係を把握しておく。ただし、生菌数の推定が可能であれば、他の方法でも良い。

注⁽⁴⁾ cfu はコロニー形成単位 (colony forming unit) であり、本試験における生菌数に相当する。

6.4.2 試験菌液の調製

300 mL の殺菌済み容器に、5.3.2 の高圧蒸気殺菌、若しくは、5.3.4 のろ過殺菌した 5.2.1 の水 180 g、5.4.1 a) のニュートリエント培地濃縮液 50 g、5.4.3 の硬水濃縮液 250 μ L を添加混合する。そこに、6.4.1 で調製した菌液を総量が 250.25 mL として計算した時の菌数が $7.0 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^8$ cfu/mL となるように適量を添加混合し、5.3.2 の高圧蒸気殺菌、若しくは、5.3.4 のろ過殺菌した 5.2.1

の水で総量を 250.25 mL に調整したものを試験菌液とする。

なお、6.4.1 の菌液の調製から試験菌液の調製までは中断することなく行うこと。この試験菌液は、試験に用いるまでに、氷冷又は冷蔵操作を加えることなく、常温(25±1 °C)で扱い、2 時間以内に使用することとする。

6.5 試験操作

6.5.1 試験菌液の接種

6.2 の各試験片をそれぞれ殺菌した 5.2.2 のねじ口瓶に入れて、円柱の試験片が立つように置く。4.2 の試験菌液 0.5 mL を試験片に接種する。試験菌液が試験片に均一によく染み込むように殺菌した試験片棒で 10 回以上揉み、ふたをして 25±1 °C で 1 時間放置する。試験菌液は使用のたびにこまめによくかき混ぜながら使用する。

6.5.2 試料の接種

a) 試験試料の接種

6.5.1 の操作により、試験菌を接種し 1 時間放置した n 個 (n: 繰り返し回数。n ≥ 3) の試験片にそれぞれ 6.3.1 試験試料を接種する。接種する試験試料の量は、0.5ml となる重量を比重換算で求めて試験片に接種する。次に、試験試料が試験片に均一によく染み込むように殺菌済みの試験片棒で 100 回以上揉み(付録 I 参照)、ふたをして 25±1 °C の恒温器に入れ、18 時間放置する(表 1 接触時間)。

備考 試験片中で試験菌液と試験試料が均一に混ざることが、異常値を防止し、データのバラツキを抑制する上で重要である。そのため、試験試料を試験片に接種する際の揉む操作は重要な操作であり、必ず付録 I を参照して、揉み方については細心の注意を払って操作すること。

b) 対照試料の接種

6.5.1 の操作により、試験菌を接種し 1 時間放置した n 個 (n: 繰り返し回数。n ≥ 3) の試験片にそれぞれ 6.3.2 対照試料を 0.5 mL 接種する。次に、対照試料が試験片に均一によく染み込むように殺菌済みの試験片棒で a) と同様に 100 回以上揉み、ふたをして 25±1 °C の恒温器に入れ、18 時間放置する(表 1 接触時間)。

備考 揉む操作は 6.5.2 a) で述べたように重要な操作であり、付録 I を必ず参照して、揉み方については細心の注意を払って操作すること。

6.5.3 初発菌数の測定

6.5.1 の操作により、試験菌を接種し1時間放置した n 個 (n: 繰り返し回数。n \geq 3) の試験片にそれぞれ 5.4.2 b) の生理食塩水 0.5 mL を接種する。次に、接種した液が試験片に均一によく染み込むように殺菌済みの試験片棒で 6.5.2 a) と同様に 100 回以上揉む。その後、直ちに 6.5.4 の不活性化及び細菌の抽出の操作、次いで、6.6 の生菌数の測定の操作を行い、初発菌数の測定を行う。

備考 揉む操作は 6.5.2 a) で述べたように重要な操作であり、付録 I を必ず参照して、揉み方については細心の注意を払って操作すること。

6.5.4 不活性化及び細菌の抽出

付録 II の方法で有効性が確認された適当な不活性化剤(付録 III 参照) 20 mL を、試料を接種した試験片が入っているねじ口瓶に添加し、それぞれ、殺菌済みの試験片棒で 20 回以上揉み、試験片から細菌を抽出する(細菌抽出液)。

6.6 生菌数の測定

6.6.1 希釈系列の調製

6.5.4 の細菌抽出液を殺菌したピペットで正確に 1.0 mL 採取し、5.4.2 の適当な希釈液 9.0 mL の入った試験管に加え、十分にかくはんする。さらに、この試験管から 1.0 mL を新しいピペットで採り、別の試験管の希釈液 9.0 mL に入れて十分にかくはんする。この操作を順次繰り返して、10 倍希釈系列希釈液を作製する。

6.6.2 混釈平板培養

6.5.4 の細菌抽出液及び 6.6.1 の各希釈系列希釈液から、それぞれ 1.0 mL を滅菌済みシャーレ 2 枚に分注する。これらのシャーレ 1 枚当たり、45~48 °C に保温した 5.4.1 b) のトリプチックソイ寒天培地、又は 5.4.1 f) の標準寒天培地 15~20 mL を加え、よく混合する。シャーレのふたをして室温で放置し、培地が固まった後、シャーレを倒置し、温度 37 \pm 1 °C で 40~48 時間培養する。

培養後、原則として 30~300 個のコロニーが現れた希釈系列のシャーレのコロニー数を測定する。細菌抽出液 1.0 mL を分注した寒天平板においてもコロニー数が 30 個未満の場合は、そのコロニー数を測定する。コロニー数が 300 個を超える場合は、「>300」、「TNTC」⁽⁶⁾ 又は「計測不能」と記録する。いずれの寒天平板にもコロニーの形成が認められない場合には「<1」と表示する。また、コロニー数が希釈倍率と反比例の関係にない場合は、抗菌成分の影響によってコロニーの形成が抑制されていることが考えられるため、不活性化剤の使用又は希釈などによって抗菌成分の影響を受け

ずにコロニーが形成される方法を用いて生菌数を測定する。

注⁽⁵⁾ TNTC: Too Numerous To Count

参考 ここで規定する以外のコロニー数の採用方法については、日本薬学会編 衛生試験法・注解(2000) 1.2 微生物試験法 3) 菌数測定 (1) 混積平板培養法, 又は、厚生労働省監修 食品衛生検査指針 微生物編 2004, 2 汚染指標菌 1 細菌数を参考に
する。

6.6.3 生菌数の計算

測定したコロニー数から式(1)によって生菌数を求める。

$$N = C \times 10^M \times 21 \dots \dots \dots (1)$$

ここに, N : 生菌数 (cfu/試験片)

C : コロニー数(採用した2枚のシャーレのコロニー数平均値)。

M : 採用したシャーレに分注した希釈系列希釈液の希釈回数。細菌抽出液の原液(希釈なし)の場合は“0”とする。

21: 細菌抽出に用いた不活性化剤の液量 20 mL と試料の量, 試験菌液の量, 各 0.5 mL を合計した量 (mL)。

備考 生菌数は有効数字3けた目を四捨五入して2けたで表示する。希釈倍率 M が“0”でかつ生菌数が“<1”の場合の生菌数は“<21”と表示する。また、生菌数の平均値は、各繰り返しにおける生菌数測定値の常用対数値を平均し、有効数字3けた目を四捨五入して2けたの常用対数値で表示する。ここで、生菌数が“<21”の場合は、生菌数を“21”とし常用対数値を“1.3”として計算する。

7. 試験結果

7.1 試験成立条件の判定

次の6項目の試験成立条件をすべて満たすとき、その試験は有効と判定する。すべての条件を満たさない場合は、試験不成立と判定し、再度試験を実施する。

1) 初発菌数

6.5.3 の n 個 (n :繰り返し回数)の初発菌数の常用対数値の平均値が7.5~8.5であること。

2) 対照試料でのばらつき

6.5.2 の対照試料で処理した n 個 (n :繰り返し回数)の試験片について、生菌数の常用対数値の変動係数に関し、式(2)が成立すること。

$$CV_c(\%) = SD_c / Av_c \times 100 \leq 10 \dots \dots \dots (2)$$

ここに, CV_c : 変動係数⁽⁶⁾

SD_c : 対照試料で処理した試験片の生菌数の常用対数値の, n 個での標準偏差

Av_c : 対照試料で処理した試験片の生菌数の常用対数値をとり, n 個について平均した値

3) 対照試料の初発菌数からの増殖度合い

6.5.2 の対照試料で処理した n 個 (n:繰り返し回数) の試験片の生菌数の常用対数値と, 6.5.3 の n 個 (n:繰り返し回数) の初発菌数の常用対数値との差について, 式(3)が成立すること。

$$Av_c - Av_0 \geq 0.5 \dots \dots \dots (3)$$

ここに, Av_0 : 6.5.3 の初発菌数の常用対数値をとり, n 個について平均した値

4) 試験試料のばらつき

6.5.2 の試験試料で処理した n 個の試験片において, 各繰り返しでの試験片の生菌数の常用対数値での減少値 (各繰り返しにおける除菌活性値に相当する。7.2 参照) をそれぞれ式(4)で求め、その減少値の変動係数に関し, 式(5)が成立すること。ただし, 全ての繰り返しにおいて試験片の生菌数が 630 (cfu/試験片) 以下の場合, 又は Av_d が 1 未満の場合は, 本条件を適用しない。

$$\Delta(i) = Av_c - L_s(i) \dots \dots \dots (4)$$

ここに, $\Delta(i)$: 各繰り返しにおける除菌活性値

$L_s(i)$: 試験試料で処理した試験片における, 各繰り返しでの試験片の生菌数の常用対数値

i: 繰り返しの番号

$$CV_d(\%) = SD_d / Av_d \times 100 \leq 20 \dots \dots \dots (5)$$

ここに, CV_d : 変動係数⁽⁶⁾

SD_d : 式(4)で求めた $\Delta(i)$ の標準偏差値

Av_d : 式(4)で求めた $\Delta(i)$ の平均値

5) 不活性化剤の有効性

不活性化剤の有効性が付録 II の方法で確認されていること。

6) 試験片からの試験菌の回収率

試験片からの試験菌の回収率が付録 IV の方法で確認されていること。

注⁽⁶⁾ 各変動係数 (CV_c 及び CV_d) は, 小数点以下第 1 位を四捨五入し整数で表示する。

7.2 除菌活性値の計算

試験が成立した場合について, 式(6)によって除菌活性値を求める。除菌活性値は, 小数点以下第 2 位を四捨五入し, 小数点以下 1 けたで表示する。

$$\text{除菌活性値} = Av_c - Av_s \dots \dots \dots (6)$$

ここに、 A_{v_s} : 6.5.2 の試験試料で処理した試験片の生菌数の常用対数値をとり、n 個について平均した値

7.3 試験結果の記録

試験報告書は、少なくとも以下の内容を含まなければならない。

- a) 試験施設に関する情報
 - 1) 名称
 - 2) 住所
 - 3) 試験の実施に従事した主要職員の氏名
- b) 試験試料
 - 1) 試験試料名又は製品名
 - 2) ロット番号
 - 3) 製造者
 - 4) 試験試料受領日
 - 5) 保管方法
- c) 試験条件
 - 1) 試験操作実施日
 - 2) 試験試料濃度及び試験試料量
 - 3) 試験温度
 - 4) 汚れ物質名・製造者・ロット番号及び濃度
 - 5) 不活性化剤の組成
 - 6) 試験菌種
- d) 試験結果
 - 1) 初発菌数
 - 2) 試験試料及び対照試料で処理した試験片に残存する細菌の生菌数^(*)
 - 3) 試験成立条件の判定
 - 初発菌数
 - 対照試料でのばらつき(CV_D)
 - 対照試料の初発菌数からの増殖度合い
 - 試験試料でのばらつき(CV_d)
 - 不活性化剤の有効性
 - 4) 除菌活性値

付表1 引用規格

JIS B 9922	クリーンベンチ
JIS K 0950	プラスチック製滅菌シャーレ
JIS K 0970	プッシュボタン式液体用微量体積計
JIS K 3800	バイオハザード対策用クラスIIキャビネット
JIS K 8101	エタノール(99.5)(試薬)
JIS K 8122	塩化カルシウム二水和物(試薬)

JIS K 8150	塩化ナトリウム(試薬)
JIS K 8159	塩化マグネシウム六水和物(試薬)
JIS K 8180	塩酸(試薬)
JIS K 8263	寒天(試薬)
JIS K 8576	水酸化ナトリウム(試薬)
JIS K 9007	りん酸二水素カリウム(試薬)
JIS L 1902	繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果
JIS R 3505	ガラス製体積計
JIS Z 2801	抗菌加工製品－抗菌性試験方法・抗菌効果
JIS K 6400	軟質ウレタンフォーム試験方法
JIS K 6401	クッション用軟質ウレタンフォーム

付録 I 揉み回数及び揉み方

試験精度の確保の為、試験菌液と試料を試験片の中で均一に混合することが必要である。揉み方は写真 1, 2 で示したように行い、試験片の中に試験菌液と試料が均一に混合し、多くの液が試験片に吸いこまれるように心掛けて揉む。揉み回数は、均一性を確保するために揉み回数 100 回以上とした。



写真 1. スポンジに含まれている液をよりよく吐き出させるため、ねじるようにしながら、急激に押し潰す。次にスポンジに試料をよりよく染み込ませるため、満遍なく試料を吸い上げるように緩やかに引き上げる。目安として 1 往復約 1 秒のリズムで揉むこと。揉み方が早いと(1 秒に 2-3 回)、スポンジの形が戻る前に試験片棒で押されるので、スポンジの中まで液が染み込まず、バラツキ等の原因になりやすい。



写真 2. 容器内に飛散した菌液と試験試料をよく均一化するため数十回毎にスポンジで内壁を拭う。

付録Ⅱ 不活性化剤の有効性の確認

不活性化剤の有効性を試験試料及び試験菌種ごとに、以下の手順により確認する。

a) 試験試料の準備

6.3.1 に従って試験試料を準備する。

b) 試験菌液の準備

6.4 に従って試験菌液を準備する。試験菌液は、恒温水槽で試験温度に調整する。試験菌液の生菌数は、6.6.1 の希釈系列の調製及び6.6.2 の混積平板培養法により測定する。

c) 不活性化剤の効果の確認

試験菌種及び試験試料ごとに 2 本の殺菌した試験管を準備する。各試験管に不活性化剤 10.0 mL, さらに a) で準備した試験試料 0.25 mL を正確に加え、試験管かくはん器で約 3～5 秒間激しくかくはんする。次いで、b) で準備した試験菌液 0.25 mL を加え、再び試験管かくはん器で約 3～5 秒間激しくかくはんする。直ちに、試験温度に設定された恒温器で混合液を 2 時間静置する。2 時間後、試験管を取り出し、試験管かくはん器で約 3～5 秒間かくはんしてから、混合液をそれぞれ 2 枚のプラスチック製滅菌シャーレにピペットで正確に 1.0 mL ずつ採取し、6.6.1 の希釈系列の調製及び6.6.2 の混積平板培養法により生菌数を測定する。

試験試料の代わりに 5.4.2 b) の生理食塩水 0.25 mL を加えた試験管を準備し、同様の方法で陰性対照試験を行う。

d) 不活性化剤の細菌に対する影響の確認

c) と同様に、試験菌種及び試験試料ごとに 2 本の試験管を準備し、各試験管に不活性化剤 10.0 mL を加える。次に、b) で準備した試験菌液 0.25 mL を正確に加え、試験管かくはん器で約 3～5 秒間激しくかくはんする。直ちに、試験温度に設定された恒温器で混合液を 2 時間静置する。2 時間後、試験管を取り出し、試験管かくはん器で約 3～5 秒間かくはんしてから、混合液をそれぞれ 2 枚のプラスチック製滅菌シャーレにピペットで正確に 1.0 mL ずつ採取し、6.6.1 の希釈系列の調製及び6.6.2 の混積平板培養法により生菌数を測定する。

e) 不活性化剤の有効性の確認

次の基準が満たされた場合、不活性化剤が有効とする。

- 1) b) の試験菌液の生菌数が $7.0 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^8$ cfu/mL であること。
- 2) c) の不活性化剤の効果の確認において、試験試料を加えた系の生菌数が試験試料の代わりに 5.4.2 b) の生理食塩水を加えた系(陰性対照)の生菌数の ± 50 %以内である。

- 3) d)の不活性化剤の細菌に対する影響の確認において、試験後の生菌数が添加した生菌数の±50 %以内である。

付録Ⅲ 不活性化剤の例

不活性化剤は本試験方法の付録Ⅱに従って個々の試験試料に対する有効性を確認する。尚、ここに挙げた以外の不活性化剤でも、付録Ⅱに従って有効性が確認されれば使用してもよい。

a) SCDLP 培地不活性化剤

5.2.1 の水 1 000 mL に対してカゼイン製ペプトン 17.0 g, 大豆製ペプトン 3.0 g, 塩化ナトリウム 5.0 g, リン酸水素二カリウム 2.5 g, グルコース 2.5 g, レシチン 1.0 g を採り、フラスコに入れて混合し、内容物を十分に溶解した後、ポリソルベート80を7.0 g 加えて溶解させる。pH 6.8~7.2 (25 °C) になるように水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整し、必要に応じて試験管又は三角フラスコに分注し、綿栓をして高圧蒸気殺菌する。調製後、直ちに使用しないものは5~10 °Cの温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎた SCDLP 培地不活性化剤は、用いてはならない。

付録Ⅳ 試験菌の抽出方法の確認

試験片からの試験菌の洗い出しについては、以下の方法で試験菌種ごと及び回収方法ごとにその回収率を予め確認すること。回収率の確認は、各試験機関で年 1 回行えばよい。ただし、スポンジのロット、規格、又は購入先に変更がある場合や、試験者変更など回収率に影響を及ぼす可能性のある変更がある場合などには、試験菌種ごとに回収率を確認する。

a) 試験菌液の準備

6.4 に従って生菌数が $7.0 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^8$ cfu/mL の試験菌液を調製する。次に、5.4.2 の適当な希釈液を用いて、異なる濃度の 3 段階の試験菌液 (1×10^8 cfu/mL, 1×10^6 cfu/mL 及び 1×10^4 cfu/mL 程度が望ましい) を調製する。試験菌液の生菌数は、6.6.1 の希釈系列の調製及び 6.6.2 の混釈平板培養法により測定する。

b) 試験菌の接種及び洗い出し

6.5.1 に従って各濃度の試験菌液をそれぞれ 3 個の試験片に接種する。その後、5.4.2 b) の生理食塩水 0.5 mL 接種し、試験片に均一によく染み込むように殺菌済みの試験片棒で 100 回以上揉む。その後、付録Ⅱの方法で有効性が確認された適当な不活性化剤 20 mL を用いて、6.5.4 の操作に従い、試験片に接種した試験菌を抽出する。

c) 回収率の確認

b)の各細菌抽出液について、それぞれ生菌数を 6.6.1 の希釈系列の調製及び 6.6.2 の混積平板培養法により測定する。試験菌液ごとの回収率を次式に従って計算する。

$$\text{試験菌の回収率(\%)} = N_1 / (N_0 \times 0.5) \times 100$$

ここで N_0 : 試験菌液の生菌数(cfu/mL)

N_1 : 試験片から回収した生菌数(cfu/試験片)の平均値

0.5: 試験菌液を試験片に接種した量(mL)

d) 抽出方法の有効性の確認

次の基準が満たされた場合、その洗い出し方法を有効とする。

- 1) 各生菌数濃度での回収率が 10 %以上であること。
- 2) 各生菌数濃度での回収率の最大値と最小値の比が 2 以下であること。

スポンジに対する台所用合成洗剤及び石けんの除菌活性試験方法 解説

この解説は、本体に記載した事柄及びこれに関連した事柄を説明するもので、本試験方法の一部ではない。

I. 試験方法

本試験方法は、対象スポンジのモデル系やその取り扱い方については JIS L 1902 (繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果) の定量試験を、細菌の取扱い方また試験菌の準備方法などは JIS L 1902 及び JIS Z 2801 (抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果) を参考にした。

II. 試験条件及び操作

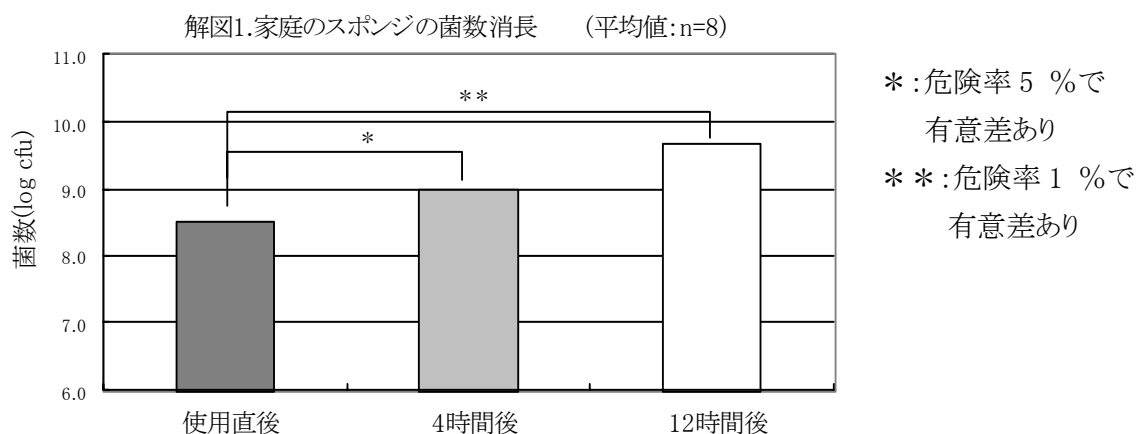
1. 試験条件

1.1 試験温度

試験片を放置する温度としては、一般的に室温を想定した試験が 25 °C で行われていることから 25 °C を採用した。

1.2 試験試料接触後の放置時間(接触時間)

一般家庭で使用される台所用スポンジは食中毒菌などの複数の細菌で汚染されており、スポンジ 1 個当たり $10^8 \sim 10^9$ cfu もの細菌が検出されることが知られている(解¹)。台所で日常使用中のスポンジについて、細菌の増え方を調べると、実際の家庭スポンジでは菌数が多く、増える傾向にある(解図1)。このように、台所で日常使用中のスポンジは家庭衛生におけるリスクの一つとなっている。



スポンジに対する台所用合成洗剤及び石けんの除菌活性試験においては、消費者ベネフィットから一般家庭において起こり得るリスクの高い、つまり細菌が十分増える傾向にある実験環境・条件にすることが望ましい。しかしながら、一般家庭で使用中のスポンジをそのまま試験に使用することは、実験精度、データ再現性の点で甚だ難しい為、本試験用には実験データが振れにくい未使用の新しいスポンジを用いることとした。この新しいスポンジで、一般家庭スポンジで細菌が増える状況を実験により再現するために、試験試料、対照試料を細菌と共に接種した後の試験片の放置時間として18時間(25℃)を設定した。

注^(解1)石井 宮次ら, 生活衛生, 35, p.228~232(1991)

1.3 試験片(スポンジ)

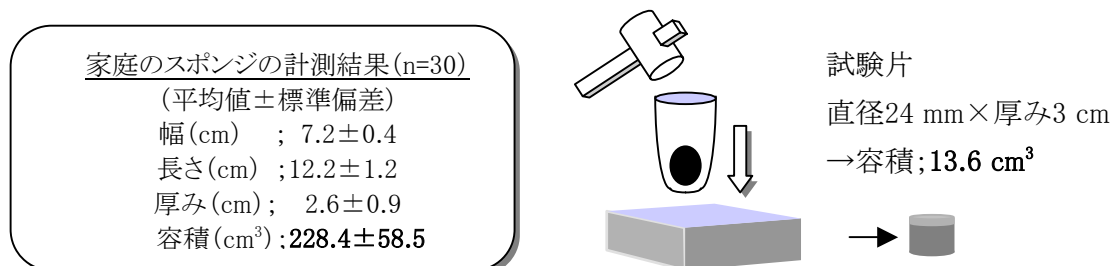
a) 試験片の材質

一般家庭で使用されるスポンジの素材は、軟質ウレタンフォームやセルロースなどがあり、軟質ウレタンフォームが約70%以上を占めている。しかし、「抗菌」を訴求したものも多く出まわっており、市販のスポンジをそのまま本試験方法に供することは試験の精度と再現性の面から好ましくはない。そこで、本試験方法では、抗菌加工していない軟質ウレタンフォームを用いることとし、同じ品質のものを安定的、かつ試験実施者が容易に入手でき、かつ一般家庭で使用されるスポンジ材質(軟質ウレタンフォーム)の仕様に概ね合致するものとして、JIS K 6401 の規格に合った見掛け密度(16~22 kg/m³)で、JIS K 6400 で測定したときの硬さが、一般家庭で使用されるスポンジとほぼ同じ硬さ(50~150 N)のスポンジを試験片として試験に供する事とした。

b) 試験片の大きさ

一般家庭で使用される代表的なスポンジには、様々の大きさのものがあるが、一般家庭より収集したスポンジの容積は平均 228.4 cm³であった。本試験方法では、試験操作に適した大きさの試験片を調製するため、操作性を考慮して革細工などで使用されるポンチ(直径 24 mm)で打ち抜くこととした。解図 2 で示したように、打ち抜いた試験片の容積は 13.6 cm³であり、一般家庭で使われているスポンジの約 16 分の 1 の容積である。

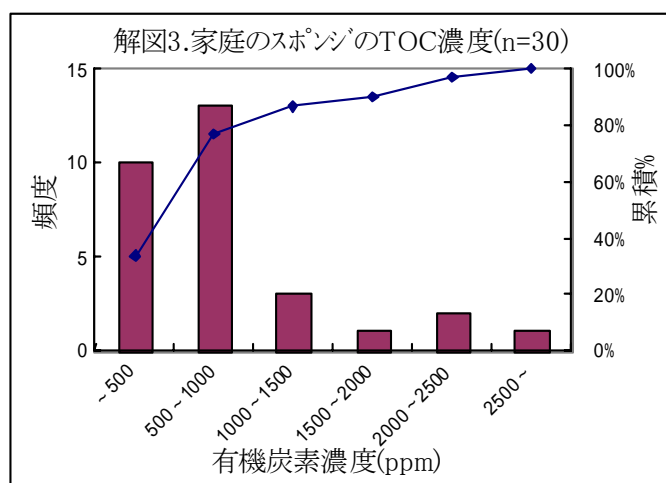
解図 2. 家庭のスポンジの大きさと試験片の大きさ



1.4 汚れ物質と濃度

汚れ物質としては、抗菌性試験方法・抗菌効果(JIS Z 2801, 並びに JIS L 1902)に栄養成分として採用されているニュートリエント培地を採用した。その濃度は実際に家庭で使用されているスポンジの汚濁度(解図3)を考慮し、試験菌液中で0.3%になるように設定した。0.3%ニュートリエント培地の全有機炭素量は2500ppm(解²)であり、実際の家庭でのスポンジの汚濁度(全有機炭素量)の最大値と一致する。

注(解²) ppm:parts per million の略。濃度・存在比などを表わす。無次元量の単位。1ppmは1mg/1000mLに相当する。



1.5 試験菌

a) 試験に用いる細菌

石井らによると(解¹)、一般家庭のスポンジには、大腸菌群の細菌やぶどう球菌といったグラム陰性菌やグラム陽性菌も検出されることが報告されている。

細菌を用いた試験を実施する上で、剤に対する感受性が異なる可能性があるグラム陽性菌とグラム陰性菌の両方を用いることは通常良く行われる。そこで、細菌の選択に当たっては、一般に良く試験される細菌で入手や取り扱いが困難でないことを重視し、グラム陽性菌として黄色ぶどう球菌を、グラム陰性菌として大腸菌をそれぞれ選択した。

b) 初発菌数

石井らによると(解¹)、一般家庭で使用されているスポンジ1個当たりの菌数は $10^{8\sim 9}$ cfuである。本試験方法では、試験片の容積が一般家庭でのスポンジの容積の1/16であることを考慮し、試験片当たりの菌数が $3.5 \times 10^7 \sim 3.5 \times 10^8$ cfu(= $10^{8\sim 9}$ cfu \div 16, 対数値で7.5~8.5)になることを試験成立条件に設定した。〈本体7.1参照〉

c) 試験菌液の調製と接種量

新品のスポンジである試験片に接種する試験菌液の量は、一般家庭のスポンジの含水量約 8 mL の約 16 分の 1 (解説 I 1.3 b)) にあたる 0.5 mL とした。その中に含まれる、細菌、汚れ物質は、一般家庭のスポンジの汚濁量とほぼ同じになるように、菌数 $3.5 \times 10^7 \sim 3.5 \times 10^8$ cfu (解説 I 1.5 b)) と、汚れ物質としてニュートリエント培地が 0.3 % 濃度 (解説 I 1.4) を含有し、かつ水道水と同じ硬度 (解³) となるように設定した。その為に、細菌、ニュートリエント培地、硬水それぞれについては、予め濃縮液を調製し、所定の濃度となるように配合している。即ち、汚れ物質のニュートリエント培地は、1.5 % 濃度 (15 g/1 000 mL 本体 5.4.1 a)) で予め調製し、39 mL の精製水に 10 mL 添加することで約 5 分の 1 に希釈される。この液に 3 000 °DH (解⁴) の硬水濃縮液 (本体 5.4.5) を 0.05 mL 添加することで 1 000 倍に希釈される。次いで、その液に、細菌の濃縮液として $5.0 \times 10^9 \sim 5.0 \times 10^{10}$ cfu/mL に調製した菌液 (本体 6.4.1) を 0.7 mL 配合することで約 70 倍 (49.75 mL/0.7 mL) に希釈され、最終的に設定条件である、ニュートリエント培地 0.3 %、硬度 3 °DH、菌数は $7.0 \times 10^7 \sim 7.0 \times 10^8$ cfu/mL の試験菌液が調製できる。この試験菌液 0.5 mL を試験片に接種することで初発菌数は $3.5 \times 10^7 \sim 3.5 \times 10^8$ cfu/試験片となる。

注 (解³) 日本の水道水の硬度は 2.3~4.4 °DH 程度 (沖縄の 14.2 °DH を除く) であり、3 °DH 及び 5 °DH での除菌活性値は同程度である。また、JIS K 3362 の合成洗剤試験方法中の 9.2 台所用合成洗剤の洗浄力評価方法の b) の 14) 使用水の項で硬質表面に対する洗浄力評価用の硬水として規定されている硬度も 3 °DH であることから 3 °DH に設定した。

注 (解⁴) °DH: ドイツ硬度。水 100 mL に含まれる硬度成分の量を酸化カルシウムに換算した mg 数で表す。換算式: °DH = CaCO_3 (mg/L) \times 0.056

1.6 試験試料

試験試料は、本来ならば、現在の日本で市販されている台所用合成洗剤及び石けんの表示にあるスポンジ除菌の使用量約 8 mL の接種を要するが、本試験法ではポンチで打ち抜く試験片の調製によって生じた容積比 16 分の 1 (解説 I 1.3 b)) に相当する 0.5 mL を接種する。〈本体 6.3.1 参照〉

1.7 対照試料

対照試料は、性状が安定で、容易に入手可能であり、かつ再現性の良い除菌活性を示す必要がある。ポリソルベート 80 は、微生物試験でよく使用されている試薬であり、性状が安定しており、入手が容易である上に、細菌に対する作用が少ない。また、0.05 (w/v) % ポリソルベート 80 水溶液は再現性の良い除菌活性を示す。したがって、対照試料として 0.05 (w/v) % ポリソルベート 80 水溶液を採用した。〈本体 6.3.2 参照〉

2. 試験操作

ここに記載した試験は、微生物の取扱いに関する基礎知識がないと、細菌に感染したり、試験を正しく実施できないおそれがあるため、微生物学の基礎を習得した者が行う必要がある。

なお、当然のことであるが、細菌の取扱いは安全キャビネット内で行い、また使用済み器具、培地及び試料など試験菌と直接接触又は接触した可能性のあるものは、高圧蒸気殺菌又は試験菌を十分に殺菌できる他の殺菌法を用いて殺菌してから処分をしなければならない。

2.1 前培養

JIS Z 2801 にならい、固体(斜面)培地による前培養を2回行うものとした(細菌の活性を揃える為)。また培養時間も JIS Z 2801 を参考に 18~24 時間とした(定常期の細菌)。

2.2 試験片棒での揉み方並びに回数

試験菌液の試験片への接種時、試験片への試験試料及び対照試料の接種時、初発菌数の測定時、試験片からの細菌の抽出時における揉み回数は、試験精度の検討を行いそれぞれ設定した。揉み方は本体の付録 I を参照して行う。〈本体 6.5.1,6.5.2,6.5.3,6.5.4 参照〉

III. 試験成立条件

1. 対照試料での菌数の増殖

本体 7.1 の 3) は、試験片自体に抗菌性がないことの確認と、一般家庭スポンジで細菌が増える状況(解説 I 1.2)を試験で再現できたかどうかを確認する為に設定した。

2. 繰り返し試験でのばらつき

本体 7.1 の 2) 及び 4) は、それぞれ対照試料及び試験試料での、試験片の生菌数のばらつき(変動係数)に関する規定である。本規定は、洗剤・石けん公正取引協議会の除菌試験 WG で行った試験結果を統計処理し、本試験方法にある程度習熟した試験担当者が試験を行う場合、おおよそ 95 % 以上の試験が有効となる値に設定した。

また、試験試料で全ての繰り返しにおいて試験片の生菌数が 630 (cfu/試験片) 以下の場合、又は各繰り返しに対する除菌活性値 (Δ (i)) が全て 1 以下の場合、本判定条件を適用しないことにした。生菌数が 630 (cfu/試験片) 以下の場合に適用しないとしたのは、生菌数 630 (cfu/試験片) 以下に相当する混釈平板培養でカウントされる生菌数が 30 個以下であり、希釈なしのシャーレのコロニー数が 30 個以下では生菌数を正確に測定できないからである。また、各繰り返しに対する除菌活

性値 ($\Delta(i)$) が全て 1 以下の場合に適用しないとしたのは、変動係数はその分母 (Av_{Δ}) が小さいと、繰り返しでの生菌数のばらつきが小さくても大きくなる傾向があり、また本試験方法が除菌効果を判定する方法であり、除菌活性値が 1 以下である場合、正確な活性値を出すことに大きな意味がないと考えたからである。

3. 不活性化剤

洗剤の除菌効果を混積培養法によって求めようとする場合、試験後(作用後)の生菌数測定において、残存する洗剤成分や除菌剤がコロニー形成を阻害する可能性がある。したがって、正確な生菌数を測定するためには予め洗剤成分や除菌剤の抗菌作用をなくす必要がある。剤の抗菌作用(解⁵)をなくすために使用されるのが、不活性化剤である。

注(解⁵) 抗菌作用とは、細菌の増殖を阻害したり、死滅させる作用である。

本体の付録Ⅱ e) の不活性化剤の有効性に関する規定は、不活性化剤が以下の 2 点を満たすことを要求している。

- 1) 使用した不活性化剤が、洗剤成分を不活性化し、正確な生菌数が測定できること。
- 2) 不活性化剤自体が、細菌の増殖や生育に対して影響を与えないこと。

IV. 薬品、材料及び器具入手先参考例

本試験で使用する、試験材料、器具の入手先例を以下に示した。しかしながら、材料、器具の入手先は下記入手先に限定するものではなく、本体 5.2.2 又は 5.2.3 に記載されている要件を満たし、使用に支障がないものであれば良い。

1. スポンジ入手先例

アキレス株式会社

〒160-8885 東京都新宿区大京町 22

TEL:03-5379-4546 FAX:03-3359-6543

品種名:OH, HD

2. ねじ口瓶入手先例

日電理化硝子株式会社

〒657-0066 神戸市灘区篠原中町 1-1-18

TEL:078-801-4873 FAX:078-801-4572

品種名:ねじ口瓶・SV-110

3. ポンチ入手先例

株式会社クラフト社

〒167-0051 東京都杉並区荻窪 5-16-15 山陽ビル 1F

TEL:03-3393-2229 FAX:03-3393-2228

品種名:ハトメ抜き(商品コード 8261, 80号:24mm)。