

住宅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) 1/2 ニュートリエント培地.....	5
b) ニュートリエント寒天培地.....	6
c) 斜面培地.....	6
d) ニュートリエント寒天平板培地.....	6
e) トリプチックソイ寒天培地.....	6
f) 標準寒天培地.....	6
5.4.2 希釈液.....	7
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	9
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	モデル汚れ物質の調製	9
6.4.2	菌液の調製	10
6.4.3	試験菌液の調製	10
6.5	試験操作	10
6.5.1	試験菌液の接種	10
6.5.2	試験試料の接種	11
6.5.3	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	12
6.6.3	生菌数の計算	12
7.	試験結果	13
7.1	試験成立条件の判定	13
7.1.1	菌液の生菌数の計算	13
7.1.2	試験片上の理論生菌数の計算	13
7.1.3	抽出操作の有効性の確認	13
7.1.4	試験成立条件の判定	14
7.2	除菌活性値の計算	15
7.3	試験結果の記録	15
付表 1	引用規格	16
付録 I	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Ⅱ 不活性化剤の例	18
a) LP 希釈液	18
付録Ⅲ 試験での注意点	18
a) 試験片の調製	18
b) モデル汚れ物質の調製	18
c) 菌液の調製	18
d) 試験菌液の接種	19
e) 試験試料の接種	19
f) 不活性化及び細菌の抽出	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 試験試料接触時間	20
1.3 試験菌	20
a) 試験に用いる細菌	20
b) 試験菌液濃度	21
c) 試験菌液接種量	21
1.4 汚れ	21
1.5 試験試料	21
a) 試験試料希釈水(濃度調製水)	21
b) 試験試料接種量	22
1.6 対照試料	22
1.7 培地	22
2. 試験操作	23
2.1 前培養	23
2.2 試験菌液の接種と乾燥	23
III. 試験成立条件	23
1. 繰り返し試験でのばらつき	23
2. 不活性化剤	24
3. 抽出操作の有効性の確認	24

IV.	薬品,材料及び器具の入手先参考例.....	25
1.	牛血清アルブミンの例.....	25
2.	ステンレス鋼製円板の入手先例.....	25

序文

本試験方法は、住宅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表面のモデル系やその取り扱い方については EN 13697 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合成洗剤及び石けんで住宅用又は家具用に供されるものを対象とし、硬質表面上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液又は試験試料液を接種し、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(ステンレス鋼製円板)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、試験片上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	5 分間
試験片	ステンレス鋼製円板(直径 20 mm, 表面グレード 2B)
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	1.25×10 ⁸ ~6.25×10 ⁸ cfu/mL, 0.01 mL
汚れ	1.5 (w/v)% 牛血清アルブミン Cohn Fraction V
試験試料濃度	製品のラベル記載の使用濃度又は除菌の訴求を行う濃度。 表示のない場合は原液使用
試験試料用濃度調製水	53.58 mg/L (CaCO ₃ 換算), Ca/Mg モル比 = 3
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	0.1 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 独立行政法人 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 独立行政法人 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。
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。
牛血清アルブミン Cohn Fraction V	微生物試験用のもの。
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

ステンレス鋼製円板(試験片)	両表面を JIS G 0203 に規定の No.2 B に仕上げた, 直径 20 mm のステンレス鋼板 SUS304。厚さは 1.0~1.5 mm 程度が好ましい。
ガラス製シャーレ	試験片殺菌用。ステンレス鋼製円板(直径 20 mm)が入るもの。
プラスチック製滅菌シャーレ	菌数測定用及び細菌培養用。JIS K 0950 に規定するもの。
試験管	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。

バイアル瓶	細菌抽出用。上記のステンレス鋼製円板が出し入れでき、底面は平らで底面の直径が4～5 cm程度のガラス製のものが望ましい。広口ガラス瓶などを用いてもよい。
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。
ろ紙	JIS P 3801に規定する定性分析用又は定量分析用に相当するもの。
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℃(圧力103 kPa相当)に保てるもの。
恒温水槽	45～48℃の範囲で±1℃で調節できるもの。
培養器	37±1℃に調節できるもの。
ストップウォッチ	1秒単位で60分まで測定できるもの。
pH計	校正精度が25℃で±0.1 pHのもの。
乾熱殺菌器	温度を160～180℃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、内溶液を混合できるもの。
超音波洗浄装置	出力100 W程度のもの。
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	先端のループが直径約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。

5.3 殺菌方法

5.3.1 乾熱殺菌

殺菌対象物を、160～180℃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。また、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) 1/2 ニュートリエント培地

5.2.1 の水 1 000 mL に対して肉エキス 1.5 g、ペプトン 2.5 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、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 1/2 ニュートリエント培地は、用いてはならない。

b) 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, 又は下記の c) の斜面培地又は d) のニュートリエント寒天平板培地を作成する場合は培地の温度を 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。

c) 斜面培地

試験管にあらかじめ温めて溶解した b) 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。

d) ニュートリエント寒天平板培地

高圧蒸気殺菌済みの b) のニュートリエント寒天培地が冷めて固化しないうちに, 5.2.2 のプラスチック製滅菌シャーレに 15~20 mL 注ぎ, ふたをして冷ます。培地が固まった後シャーレを倒置し, 室温で 1 昼夜置く。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平板培地は, 用いてはならない。

e) 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。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 か月以上過ぎたトリプチックソイ寒天培地は, 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、 $37\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 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 c) 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 $37\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ で24~48時間培養し、その後は、温度5~10 $^\circ\text{C}$ 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。

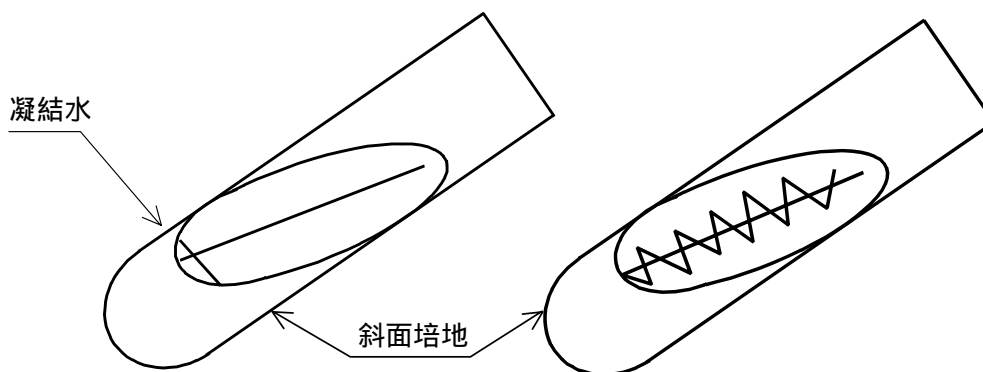


図1 細菌の移植

6. 試験方法

6.1 試験菌の前培養

5.5 の保存菌株を 5.4.1 d) のニュートリエント寒天平板培地上に1白金耳移植し、 $37\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ で18~24時間培養する。さらにこの培養菌から新たなニュートリエント寒天(平板)培地上に1白金耳移植

し、 37 ± 1 °Cで18～24時間培養する。

6.2 試験片の調製

試験片は2n枚(n:繰り返し回数。 $n \geq 3$)用意する。2n枚のうちn枚は試験試料用、残りのn枚は対照試料用に用いる。5.2.2のステンレス鋼製円板を、アルカリ性洗剤で丁寧に洗浄し(付録III.a参照)、水で十分すすいで乾燥させた後、アルコールで洗浄する。乾燥させた後、中にろ紙を敷いたふた付きガラスシャーレ内に試験に使用する面を上にして置き、ふたをして乾熱殺菌する。ただし、一度試験に使用したり、試験菌液を塗布したステンレス鋼製円板を、再使用してはならない。

6.3 試料の調製

6.3.1 試験試料の調製

試験試料が液体の場合は、ラベル記載の使用濃度、又は除菌訴求を行う濃度に調製する。原液での使用のみを想定している場合には、希釈せずにそのまま使用してよい。また試験試料が粉末や固体状の場合は、ラベル記載の使用濃度、又は除菌訴求を行う濃度に調製する。

上記の試験試料の濃度調製に際しては、53.58 mg/L(CaCO_3 換算)硬水をあらかじめ殺菌し、試験空間に1時間以上静置して試験空間の温度(25 ± 1 °C)に馴染ませたものを用いる。53.58 mg/L(CaCO_3 換算)硬水は5.4.3の硬水濃縮液を殺菌済みの水で1000倍に希釈したものを用いることができる。試験試料の濃度調製は試験の直前に行う。希釈せずに用いる以外の試験試料は、濃度調製から1時間以内に使用する。希釈せずに用いる試験試料を評価する際には、試験温度条件下に1時間以上静置して試験温度(25 ± 1 °C)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。対照試料は試験温度条件下に1時間以上静置して試験温度(25 ± 1 °C)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 モデル汚れ物質の調製

5.2.1の水と5.2.1の牛血清アルブミン Cohn Fraction V(解説IV.1参照)とをもちいて30 g/Lの濃度の牛血清アルブミン水溶液を調製する。この水溶液はろ過殺菌して試験に供する。牛血清アルブミン水溶液は試験の直前に調製し、試験日当日のみの使用とする。

6.4.2 菌液の調製

殺菌済みの三角フラスコに、試験温度条件下で 1 時間以上静置して試験温度 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) になじませた 5.4.1 a) の 1/2 ニュートリエント培地少量 (約 5 mL) と、殺菌済みガラスビーズ適量 (約 3~5 g) とを加えておく。ここに 6.1 で前培養した試験菌の菌体を 1 白金耳添加する。手又は試験管かくはん器で毎分 150 回転を最大として 3 分間かくはんする。この際に、一度使用したガラスビーズを再使用してはならない。

生菌数を分光光度計などを用いて推定する⁽³⁾ (顕微鏡による直接観察又はその他の適切な方法を用いてもよい)。殺菌済みの新しい試験管に少量 (約 1 mL) 移し、適当量の 1/2 ニュートリエント培地を加え、試験管かくはん器で均一になるようにかくはんし、生菌数を $2.5 \times 10^8 \sim 12.5 \times 10^8$ cfu/mL⁽⁴⁾ に調製したものを菌液とする。菌液は試験温度 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) 条件下で 1 時間静置してから試験に供する。この菌液は、1 時間静置後から試験温度 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) 条件下でさらに 2 時間は使用可能である。ただしこの間に氷冷又は冷蔵操作を加えてはならない。

注⁽³⁾ 分光光度計を用いて生菌数を推定する場合は、菌を分散させたものから少量 (0.5 mL 程度) をとり、5.2.1 の水又は 5.4.2 の適当な希釈液で 10 倍に希釈し、よくかくはんしてから 30 秒後に吸光度を測定する。測定波長は 660 nm を基準とする。あらかじめ把握しておいた吸光度と生菌数の関係を用いて生菌数を推定する。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。

6.4.3 試験菌液の調製

1 時間静置後の 6.4.2 の菌液 1.0 mL に、6.4.1 のモデル汚れ物質 1.0 mL を加え混合する。混合後 2 分間静置したものを試験菌液として用いる。試験菌液は調製後速やかに使用する。試験片が多い場合は、6.4.1 のモデル汚れ物質と 6.4.2 菌液とを混合して新たに試験菌液を調製し直すものとする。

なお、6.4.2 の菌液調製から試験に用いるまでに、細菌を含む液は試験温度 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) 条件下で扱い、氷冷又は冷蔵操作を加えてはならない。

6.5 試験操作

6.5.1 試験菌液の接種

6.2 で調製した試験片は、表面が水平になっていることを確認した上で、試験温度条件下に 1 時間以上静置して試験空間の温度 ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) になじませる。試験片を水平に置いて、2 分間静置後の 6.4.3 の試験菌液を再度かくはんしてからピペットで正確に 0.01 mL 量りとり、試験片の表面にできるだけ素早く均一に塗布する。塗り残しは周囲から 1 mm 以内になるようにできるだけ全面に塗り広げ

る。シャーレのふたをして、試験片上の試験菌液が外見上乾くまで⁽⁵⁾ 25±1℃で静置する。試験菌液の塗布・乾燥の間は、クリーンベンチ(安全キャビネット)のエアを止めた状態で操作する。接種した試験菌液が試験片の端からろ紙へ流れ出したものは以後の操作に用いてはならない。

注⁽⁵⁾ 試験空間の湿度などの条件により外見上乾くまでの時間(乾燥時間)は異なり一律に規定できないため、各試験空間において試験片ごとに外見上乾くまでの最低の時間静置するものとする。乾燥時間は60分以内とし、60分を超える場合は湿度を変えて60分以内になるように設定する。予め各試験空間での乾燥時間の目安をつかむ予備実験を行っておくのが好ましい。予備実験方法として電子天秤などを用いて接種試験菌液の試験片上の残存重量から乾燥の度合いを推定する方法もあるが、外見上乾くまでの最低時間静置すると、接種試験菌液の試験片上の残存重量は接種直後に比べて約3%以下(目安)になる。

6.5.2 試験試料の接種

6.5.1 で試験片上の試験菌液が外見上乾くまで静置した後直ちに、試験菌液を塗布した表面に、試験試料をピペットで正確に0.1 mLを量りとりできるだけ素早く均一に塗布する。その際、試験菌液を塗布した部分すべてを試験試料が覆うようにする。また塗布時に機械力がかからないよう注意する。シャーレのふたをして25±1℃で5分間静置する。接種した試験試料が試験片の端からろ紙へ流れ出したものは、以後の操作に用いてはならない。

6.5.3 不活性化及び細菌の抽出

殺菌済みの5.2.2のバイアル瓶に不活性化剤(付録I, 付録II参照)10.0 mLを正確に入れておく。この中に試験試料塗布後5分間静置した6.5.2の試験片を静かに投入する。試験試料を試験片表面全面に塗布し終えてから不活性化剤中に投入するまでの時間が正確に5分間になるようにする。投入の際には試験片を水平に保ち表面の塗布液がこぼれないように(試験片表面に残留している試験試料はすべて不活性化剤中に移すように)注意して、不活性化剤中で試験片の試験菌液を塗布した面が上になるようにする。

試験片を投入したバイアル瓶に殺菌済みのガラスビーズを適量入れ、手で毎分150回転を最大として1分間かくはんする。この際、試験片の上をガラスビーズが効率よく転がるように注意して、試験片表面からの細菌の抽出が完全におこなわれるように配慮する。一度使用したガラスビーズを再使用してはならない。

6.6 生菌数の測定

6.6.1 希釈系列の調製

6.5.3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 混積平板培養

6.6.1 の細菌抽出液及び各希釈液から、それぞれ 1.0 mL を殺菌済みシャーレ 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) のニュートリエント寒天培地又は 5.4.1 e) 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±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⁽⁶⁾ 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次式によって生菌数を求める。

$$N = C \times 10^M \times 10 = C \times 10^{M+1} \dots\dots\dots (1)$$

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。

10 : 細菌抽出に用いた不活性化剤の液量 (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。コロニー数が“<1”の場合の生菌数は“<10”と表示する。生菌数の常用対数の平均値を求める場合は、試験片 n 枚(n :繰り返し回数)の各生菌数測定値の常用対数を平均し、有効数字 3 けた目を四捨五入して 2 けたで表示する。生菌数が“<10”の場合は、“10”すなわち常用

対数値を1として平均値を計算する。

7. 試験結果

7.1 試験成立条件の判定

7.1.1 菌液の生菌数の計算

6.4.2の菌液(1時間静置後)の生菌数 N_0 を、混積平板培養によって次式から求める(6.6.1と6.6.2を参照)。

$$N_0 = C \times 10^M \dots\dots\dots (2)$$

ここに、 N_0 : 菌液の生菌数 (cfu/mL)

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

生菌数 N_0 は有効数字3けた目を四捨五入して2けたで表示する。

7.1.2 試験片上の理論生菌数の計算

菌液の生菌数 N_0 (7.1.1参照)から試験片上の理論生菌数 N_t を以下の通り計算する。

$$N_t = N_0 \times 0.5 \times 0.01 = N_0 / 200 \dots\dots\dots (3)$$

ここに、 N_t : 試験片上の理論生菌数 (cfu/試験片)

0.5 : 菌液から試験菌液調製時の希釈率

0.01 : 試験片への試験菌液の接種量 (mL)

理論生菌数 N_t は有効数字3けた目を四捨五入して2けたで表示する。

7.1.3 抽出操作の有効性の確認

対照試料で処理した試験片上の生菌数 N_c を6.6.3の方法で計算する。 N_c の常用対数値の、n枚(n:繰り返し回数)の試験片についての平均値 Av_c と、7.1.2の理論生菌数 N_t の常用対数値 L_t を計算する。次の条件が満たされた場合、その細菌種に対しての抽出操作は有効とする。

$$-1.0 \leq Av_c - L_t \leq +0.5 \dots\dots\dots (4)$$

ここに、 Av_c : 対照試料で処理した試験片上の生菌数の常用対数値をとり、n枚について平均した値

L_t : 理論生菌数 N_t の常用対数値

L_t 及び Av_c は有効数字3けた目を四捨五入して2けたで表示する。

7.1.4 試験成立条件の判定

次の 5 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。1 項目でも条件を満たさないものがある場合は、試験不成立と判定し、再度試験を実施する。

1) 菌液の生菌数

菌液の生菌数(7.1.1 参照)が $2.5 \times 10^8 \sim 12.5 \times 10^8$ cfu/mL であること。

2) 対照試料でのばらつき

対照試料で処理した n 枚の試験片について、生菌数の常用対数値の変動係数 CV_C 値に関し、次式(5)が成立すること。

$$CV_C (\%) = SD_C / Av_C \times 100 \leq 10 \quad \dots\dots\dots (5)$$

ここに、 CV_C : 変動係数⁽⁷⁾

SD_C : 対照試料で処理した試験片上の生菌数の常用対数値の、n 枚での標準偏差

3) 試験試料でのばらつき

試験試料で処理した n 枚の試験片について、生菌数の常用対数値の減少値 $\Delta(i)$ (各繰り返し操作における除菌活性値に相当する。7.2 参照)を、それぞれ次式(6)により計算しておく。その減少値 $\Delta(i)$ の変動係数 CV_Δ 値に関し、式(7)が成立すること。ただし、全ての繰り返しにおいて生菌数が 300 (cfu/試験片)以下の場合、又は Av_Δ が 1 未満の場合は、本条件を適用しない。

$$\Delta(i) = Av_C - L_S(i) \quad \dots\dots\dots (6)$$

ここに、 $L_S(i)$: 試験試料で処理した試験片上の生菌数の常用対数値(n 枚の試験片についてそれぞれ計算する)

(i) : 繰り返しの番号

$$CV_\Delta (\%) = SD_\Delta / Av_\Delta \times 100 \leq \alpha \quad \dots\dots\dots (7)$$

$\alpha = 20$: 試験に供した細菌が黄色ぶどう球菌の場合

$\alpha = 25$: 試験に供した細菌が大腸菌の場合

ここに、 CV_Δ : $\Delta(i)$ の変動係数⁽⁷⁾

SD_Δ : $\Delta(i)$ の n 枚についての標準偏差

Av_Δ : $\Delta(i)$ の n 枚について平均値

参考 大腸菌に限り、すべての繰り返しデータを採用した時に式(7)が成立しない場合は、繰り返し回数 n を 5 以上とし、 $\Delta(i)$ の最大値と最小値を除いた残りのデータ(3 点以上)に式(7)を適用してもよいものとする。最大値又は最小値が 2 点以上ある場合は、1 点を除くものとする。

4) 不活性化剤の有効性

不活性化剤の有効性が付録 I の方法で確認されていること(付録 I 参照)。

5) 抽出操作の有効性

抽出操作の有効性が 7.1.3 の方法で確認されていること(7.1.3 参照)。

注⁽⁷⁾ 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、次式によって除菌活性値を求める。除菌活性値は、小数点以下 2 けた目を四捨五入し、小数点以下 1 けたで表示する。

$$\text{除菌活性値} = Av_C - Av_S \cdots \cdots \cdots (8)$$

ここに、 Av_S : 試験試料で処理した試験片上の生菌数の常用対数値をとり、n 枚について平均した値（有効数字 3 けた目を四捨五入して 2 けたで表示する）

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) 試験試料の調製方法
- 3) 試験試料濃度
- 4) 試験温度
- 5) 使用水（試験試料濃度調製水又は希釈水）硬度
- 6) 汚れの種類及び濃度
- 7) 不活性化剤
- 8) 試験菌種

d) 試験結果

- 1) 菌液中の生菌数
- 2) 試験試料及び対照試料で処理した試験片上に残存する細菌の生菌数
- 3) 試験成立条件
 - 菌液の生菌数及び試験片上の理論生菌数
 - 対照試料でのばらつき(CV_C)
 - 試験試料でのばらつき(CV_D)
 - 不活性化剤の有効性
 - 抽出操作の有効性
- 4) 除菌活性値

付表 1 引用規格

JIS B 9922	クリーンベンチ
JIS G 0203	鉄鋼用語(製品及び品質)
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 P 3801	ろ紙(化学分析用)
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

付録 I 不活性化剤の有効性の確認

不活性化剤の有効性を試験菌種及び試験試料ごとに、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。菌液(6.4.2 参照)の生菌数を、混積平板培養法(操作については 6.6.1 及び 6.6.2 を、計算方法は 7.1.1 を参照)により測定する。

c) 不活性化剤の効果の確認

試験菌種数×試験試料数×2 だけの殺菌済み試験管を準備する。試験菌種及び試験試料ごとに以下の操作を行う。

試験管に殺菌済みの不活性化剤 10.0 mL、さらに a) で準備した試験試料 0.1 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。かくはん後、b) で準備した試験菌液 0.01 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。25±1℃で混合液を 5 分間静置する。5 分後、再び試験管かくはん器で約 3~5 秒間かくはんしてから、10 倍希釈系列希釈液を作製し(6.6.1 参照)、混積平板培養(6.6.2 参照)により生菌数を測定する。

試験試料の代わりに 5.4.2 の適当な希釈液 0.1 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、試験菌種数×2 だけの殺菌済み試験管を準備し、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 0.01 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。25±1℃で混合液を 5 分間静置する。5 分後、再び試験管かくはん器で約 3~5 秒間かくはんしてから、10 倍希釈系列希釈液を作製し(6.6.1 参照)、混積平板培養(6.6.2 参照)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) の試験菌液調製に用いる菌液生菌数が $2.5 \times 10^8 \sim 12.5 \times 10^8$ 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 の適当な希釈液を加えた系(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Ⅱ 不活性化剤の例

不活性化剤は本試験方法の付録Ⅰ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Ⅰに従って有効性が確認されれば使用してもよい。

a) LP 希釈液

5.2.1 の水 1 000 mL に対してポリペプトン 1.0 g, レシチン 0.7 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 20.0 g 加えて溶解させる。pH 7.0~7.4 (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 LP 希釈液は, 用いてはならない。

付録Ⅲ 試験での注意点

a) 試験片の調製

試験片は成形加工時のひずみ(円板に切り出す際のかえりなども含む)が無く, 水平面上に置いたとき試験片表面も水平になるものを用いる。ガラスシャーレの中にもろ紙を敷く理由は, 試験片をシャーレ内ですべりにくくして操作性をあげるためである。試験片の殺菌方法として乾熱殺菌を用いる理由は, 高圧蒸気殺菌だと殺菌中に敷いたろ紙が水分を含み波打つことがあり, 試験片表面が水平に保たれない場合があることを避けるためである。また 6.2 の試験片調製の際の洗浄方法の例を以下に挙げる。〈本体 6.2 参照〉

(例) ステンレス鋼製円板を Extran[®]MA01 (MERCK 社製強アルカリ洗剤) の 5 倍程度の希釈液に浸漬させ, 約 10 分間超音波洗浄する。

b) モデル汚れ物質の調製

牛血清アルブミン水溶液は加熱によって変性するため, 殺菌方法としてはろ過殺菌を用いる。〈本体 6.4.1 参照〉

c) 菌液の調製

前培養した試験菌の菌体を 1/2 ニュートリエント培地に分散させる際には, 細菌の変性, 活性の低下を防ぐために, 激しくかくはんしすぎない(毎分 150 回転を最大とする)ように注意する。また菌液 1 時間静置の操作は, 試験結果を安定させるために重要である。菌液は, 1 時間静置後から試験温度

(25±1℃)条件下でさらに 2 時間静置してから使用しても試験結果に大きな影響がないことが経験的にわかっているが、すべての試験条件について確認しているわけではない。〈本体 6.4.2 参照〉

d) 試験菌液の接種

試験菌液を接種する際には、試験片の接種面が水平になっていることを確認する。水平でないと接種された試験菌液の乾燥の仕方がばらついたり、接種する試験菌液や試験試料が試験片の端から紙へ流れ出す恐れがあるためである。また、気流の違いによる乾燥条件のばらつきを防ぐために、試験菌液の塗布・乾燥の間はクリーンベンチ(安全キャビネット)のエアーストップするもの(気流なし)とした。〈本体 6.5.1 参照〉

e) 試験試料の接種

試験試料の塗布は、試験片上の試験菌液が外見上乾いた直後に行う。2n 枚の試験片で同時に試験する際には、外見上乾いたものから順次試験試料(又は対照試料)の塗布を行う。試験菌液、試験試料の塗布は 30 秒以内を目安に素早く行う。〈本体 6.5.2 参照〉

f) 不活性化及び細菌の抽出

試験片を不活性化剤中に投入する際には、殺菌済みピンセットで試験片の直径方向を上方からつかむと、塗布面を水平に保ちながら、かつピンセットが試験片上の試験試料に接触しない状態で投入することができる。2n 枚の試験片で同時に試験する際には、試験試料(又は対照試料)の塗布終了後の時刻をすべて記録しておく、2n 枚の試験片についてのそれぞれ 5 分間の計測が1つのストップウォッチで可能になる。また、試験片表面からの細菌抽出を補助するために投入するガラスビーズは、かくはん時に転がる余裕を残して、多すぎないように適量を投入する。〈本体 6.5.3 参照〉

住宅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、本体に記載した事例，並びにこれらに関連した事柄を説明するもので，試験方法の一部ではない。

I. 試験方法

本試験方法は，対象表面のモデル系やその取り扱い方については EN 13697 (Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2))を参考に，細菌の取り扱い方やそれに関わる器具などの取り扱い方については，JIS Z 2801 (抗菌加工製品 - 抗菌性試験方法・抗菌効果)及び JIS L 1902 (繊維製品の抗菌性試験方法)を参考に作成している。

II. 試験条件及び操作

1. 試験条件

1.1 試験温度

試験温度(25℃)，試験中の温度ふれ幅(±1℃)に関しては，EN 13697 を参考に，試験のばらつきが出にくいように設定した。

1.2 試験試料接触時間

試験試料接触時間は，試験 EN 13697 の細菌に対する殺菌力評価の標準条件(5分)を参考に，試験試料の接種及び試験試料接触後の細菌抽出(除菌成分の不活性化)操作ぶれを考慮し，試験の操作上無理のない条件として，5分間とした。〈本体 6.5.2 参照〉

1.3 試験菌

a) 試験に用いる細菌

住宅一般環境には，グラム陽性菌及びグラム陰性菌などの多くの菌種が存在することは知られている。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，抗菌試験などでも良く用いら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。〈本体 5.1 参照〉

b) 試験菌液濃度

試験菌液濃度(試験片上の初発菌数)の設定に関しては、試験試料での除菌活性をどの程度の幅で見たいか(除菌活性値が最高でいくらまで必要か)という点が重要になる。これに加え、乾燥工程中の試験片上での細菌の死滅量を(乾燥に弱い大腸菌での値を参考に) $1 \log_{10}$ 程度と見積もり、さらに濃度の上下幅を5倍とることにより、菌液濃度として $2.5 \times 10^8 \sim 12.5 \times 10^8$ cfu/mLとした。この菌液と汚れ物質(水溶液)と等量混合(濃度半減)して得られる試験菌液を 0.01 mL 塗布すると、試験片あたりの理論生菌数は $1.25 \times 10^6 \sim 6.25 \times 10^6$ cfu/試験片となる。この濃度条件ならば乾燥工程中の試験片上での細菌の死滅量を $1 \log_{10}$ としても、理論的には除菌活性値は最高4以上の値が得られることになる。〈本体 6.4.2 及び 7.1.4 参照〉

c) 試験菌液接種量

当初は EN 13697 にならい、直径 20 mm の試験片に対し 0.05 mL の接種量を設定していたが、乾燥時間の短縮などを目的に接種量の少量化を検討した。ただし少なすぎると接種量の操作ぶれが無視できなくなる点、試験片全面に塗り広げることが困難になる点なども考慮して、最終的に EN 13697 記載の量の 1/5 の 0.01 mL に設定した。(これに伴い、試験片上の細菌数・培地成分・汚れ成分の絶対値を揃えるために、試験菌液濃度・培地濃度・汚れ濃度ともに EN 13697 記載の5倍にするように変更した。)<本体 6.5.1 参照〉

1.4 汚れ

EN 13697 では、標準的な汚れ(妨害)物質として牛血清アルブミン Cohn Fraction Vを用いており、さらに試験試料の用途に応じて2段階(接種する試験菌液中で 0.3 g/L と 3 g/L)の汚れ濃度(それぞれ清浄条件と汚濁条件に相当)が設定されているが、本試験方法では多様な用途に対応できるように、汚濁条件に合わせ一律設定した(試験片に接種する試験菌液中で 3 g/L)。ただし上記の試験菌液接種量の少量化・高濃度化検討に伴い、結果として、30 g/L の汚れ物質(水溶液)と菌液とを等量混合(濃度半減)して、最終的に接種する試験菌液を調製することとした。(試験試料中の除菌成分は、添加した汚れ物質だけでなく試験菌液に含まれる培地成分によっても妨害を受ける可能性があるが、ここではその影響は無視することにした。)<本体 6.4.1 参照〉

1.5 試験試料

a) 試験試料希釈水(濃度調製水)

試験試料が液体である場合の希釈水及び固体である場合の濃度調製水は、日本の水道水の硬度条件を反映したものでなくてはならない。日本の水道水の硬度は $2.3 \sim 4.4$ °DH (解¹)程度(沖縄の 14.2 °DHを除く)であるが、希釈水(濃度調製水)として用いる水の硬度が 3 °DH であるか 4 °DH

であるかによる除菌活性値の差は無視できるものと考えられる。そこで、本試験方法では JIS K 3362 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 3 °DH 硬水を用いることにした。〈本体 6.3.1 参照〉

注(解¹) °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=CaCO₃ (mg/L) × 0.056

b) 試験試料接種量

試験試料の接種量は、接種時の操作性、及び試験の精度確保などの理由から、EN 13697 に記載の接種量(0.1 mL)を参考とし、現在日本で市販されている住宅用合成洗剤及び石けんの使用量を反映させた。すなわち、市場で流通している製品の形態・用途・使用方法は多様であるが、特に広く普及している原液スプレータイプについて、そのスプレー時の液量と付着面積の関係を検討し、以下(※)のような結果を得たことから、試験試料の接種量として 0.1 mL が妥当であると判断した。

なお、試験試料の接種量は、除菌対象面に直接スプレーすることを前提に設定しており、掃除目的で道具を使い塗り広げるなどの作業を伴う方法における使用量ではない。

(※)原液をスプレーして使用するタイプのものについて、現在日本国内で市販されている製品を調査したところ、1 回のスプレーでの液量は約 0.8~1.0 mL のものが多かった。また実使用を想定して対象面から約 10~20 cm 離れたところからスプレーした場合、対象面での付着パターンは約 5~7 cm のほぼ円形(付着面積にして約 20~40 cm²)になるものが多かった。これらの値から単位面積当たりの付着液量を計算すると、試験片(3.1 cm²)当たり約 0.1 mL と見積もられる。〈本体 6.5.2 参照〉

1.6 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〉

1.7 培地

JIS L 1902 で最終的な菌液濃度調製に使用している培地(1/20 ニュートリエント培地)にならった。ただし、検討の段階において、解説 II 1.3 c) に記載のように試験菌液接種量を 1/5 に変更した。結果として、1/2 ニュートリエント培地で濃度調製した菌液と、汚れ物質(水溶液)とを等量混合(濃度半減)して、最終的に接種する試験菌液を調製することとした。〈本体 5.4.1 a) 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ものが行う必要がある。

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(細菌の活性をそろえるため)。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)。〈本体 6.1 参照〉

2.2 試験菌液の接種と乾燥

試験菌液の接種と乾燥の操作は、試験結果にも直接影響を及ぼすもので、本試験方法の中でも特に重要な部分である。本試験方法では、試験菌液の接種量と乾燥方法を規定するにあたって、EN 13697 の方法を参考にしながらも、次の2点に注意して改良を加えた。ポイントは、(1)乾燥条件を穏やかにすることで操作ぶれによる乾燥状態の変化を小さくすること、(2)乾燥空間と(乾燥後に試料塗布などを行う)試験空間との環境条件差を縮めることで両空間の間の移動によるぶれを小さくすること、の2点である。試験に用いる細菌のうち特に大腸菌では、乾燥状態の僅かな差によって除菌剤に対する感受性が大きく異なることが確認されており、(1)は特に重要である。

上記の要請から、乾燥空間の温度を EN 13697 規定の 37 °C から 25 ± 1 °C に下げた。すなわち乾燥とその後の操作を同じ空間で行うことになり、操作の簡易化にもつながった。また乾燥中は気流による影響を極力避けるためにクリーンベンチ(キャビネット)のエアは止めるように規定した。乾燥条件を穏やかにした代わりに、試験菌液の接種量を EN 13697 に規定の量の 1/5 倍(0.01 mL)、かつ試験菌液の濃度(細菌数、培地濃度ともに)を 5 倍にすることで、乾燥時間が長くないようにした。〈本体 6.5.1 参照〉

III. 試験成立条件

1. 繰り返し試験でのばらつき

本体 7.1.4 の 2) 及び 3) は、それぞれ対照試料及び試験試料での処理直後の試験片上の生菌数の常用対数値のばらつき(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た結果に基づいている。また、試験試料で全ての繰り返しで生菌数が 300 (cfu/試験片) 以下の場合、又は各繰り返しに対する減少値 Δ (i) (除菌活性値) 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 300 (cfu/試験片)

以下の場合に適用しないとしたのは、生菌数 300 (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コロニー数が 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(解²)。

また、各繰り返しに対する減少値 $\Delta(i)$ (除菌活性値)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_d ($\Delta(i)$ の平均値)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、変動係数の値自体は大きくなる傾向があることに加えて、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。

なお、乾燥に弱い大腸菌で試験した場合には、乾燥工程における操作ぶれがやや大きめに出ることは不可避と考え、繰り返し回数を多くとる(nが5以上)場合に限り、最もぶれが大きくなったと考えられる $\Delta(i)$ の最大値と最小値を 1 点ずつ除いたデータ(3 点以上)に関して成立条件を課すものとした。

注(解²) 衛生試験法・注解2000, 日本薬学会編(2000), p.51-53, 又は, 食品衛生検査指針 微生物編, 社団法人 日本食品衛生協会(1990), p.70-77

2. 不活性化剤

洗剤の除菌効果を混釈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生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³)をなくすために使用されるのが、不活性化剤である。

注(解³) 抗菌作用とは、細菌に対する増殖阻害、死滅作用である。

本体の付録 I 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。

3. 抽出操作の有効性の確認

本体 7.1.4 の試験成立条件 5)では、接種に使用する菌液から算出した理論生菌数と、実際に試験菌液接種・乾燥・対照試料接種・抽出という一連の操作を行った場合に得られる生菌数とのずれを規定している。通常の微生物操作では1けた(常用対数値で1)程度のぶれは考えられることから、両者(共に対数値)のぶれを±0.5 とした。さらに一連の操作を行った場合、特に乾燥の工程において乾燥に弱い大腸菌では1けた(常用対数値で1)程度死滅する場合があることを確認し、下限を-1まで広げることにした。〈本体 7.1.3 参照〉

IV. 薬品, 材料及び器具の入手先参考例

本試験で使用する, 薬品, 材料の入手先例を以下に示した。しかしながら, 薬品, 材料の入手先は下記入手先に限定するものではなく, 本体 5.2.1 又は 5.2.2 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. 牛血清アルブミンの例

牛血清アルブミン Cohn Fraction Vは複数の品番のものが市販されているが, 本試験に使用できる品番の例を挙げる。

(例) ALBUMIN,BOVINE Fraction V Powder A-2153 (SIGMA 社製)

2. ステンレス鋼製円板の入手先例

5.2.2 に規定されるステンレス鋼製円板の入手先例を以下に挙げる。

日本テストパネル大阪株式会社

本社 〒535-0013 大阪市旭区森小路 2-2-31

TEL:06-6953-1661 FAX:06-6955-1850

洗剤・石けん公正取引協議会

〒103-0027 東京都中央区日本橋 3-13-11

電話 (03) 3271-4301

FAX (03) 3281-1870