

洗濯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

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.....	2
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.....	4
5.2.3 器具.....	4
5.3 殺菌方法.....	5
5.3.1 乾熱殺菌.....	5
5.3.2 高圧蒸気殺菌.....	5
5.3.3 火炎殺菌.....	6
5.3.4 ろ過殺菌.....	6
5.3.5 器具の用意.....	6
5.4 培地など.....	6
5.4.1 培地.....	6
a) ニュートリエント寒天培地.....	6
b) トリプチックソイ寒天培地.....	6
c) 斜面培地.....	7
d) 組織培養フラスコ水平培地.....	7
e) 標準寒天培地.....	7
5.4.2 希釈液.....	7
a) リン酸緩衝液.....	7
b) 生理食塩水.....	8
c) リン酸緩衝生理食塩水.....	8
5.4.3 硬水濃縮液.....	8

5.4.4	ウマ血清溶液	8
5.4.5	湿潤剤	8
5.5	細菌の保存	9
5.6	試験布の洗浄	9
6.	試験方法	10
6.1	試験菌の前培養	10
6.2	試験片の調製	10
6.3	スピンドルの調製	10
6.4	試験菌液の調製	11
6.5	試験操作	12
6.5.1	試験菌液の接種	12
6.5.2	試験片の挿入	13
6.5.3	試験試料溶液の調製	13
6.5.4	洗浄操作	13
6.5.5	不活性化及び細菌の抽出	14
a)	試験片上に残存する細菌の抽出	14
b)	試験試料及び対照試料溶液の不活性化	14
6.6	生菌数の測定	14
6.6.1	希釈系列の調製	14
6.6.2	混釈平板培養	14
6.6.3	生菌数の計算	15
a)	試験菌液の生菌数	15
b)	試験片上及び試験試料溶液中の生菌数	15
7.	試験結果	16
7.1	試験成立条件の判定	16
7.2	除菌活性値の計算	17
7.3	試験結果の記録	17
付表 1	引用規格	19
付録	不活性化剤の有効性の確認	20
a)	試験試料溶液の準備	20
b)	試験菌液の準備	20
c)	不活性化剤の効果の確認	20
d)	不活性化剤の細菌に対する影響の確認	20

	e) 不活性化剤の有効性の確認	20
付録	不活性化剤の例	21
	a) レセーン培地不活性化剤	21
	b) SCDLP 培地不活性化剤	21
付録	試験菌の抽出方法の確認	21
	a) 試験菌液の準備	21
	b) 試験菌の接種及び洗い出し	22
	c) 回収率の確認	22
	d) 抽出方法の有効性の確認	22
付録	装置図	23
	a) スピンドルの図	23
	b) 回転装置の図 (例)	23
付録	試験試料及び試験試料溶液の調製 (例)	24
	a) 試験試料の調製	24
	b) 試験試料溶液の調製	24
付録	実験操作注意点	24
	a) 試験片及びスピンドルの準備	24
	b) 試験菌液の準備及び接種	25
	c) 試験試料の準備	25
	d) 試験試料溶液と試験菌との接触時間	25
	e) 不活性化及び混釈平板培養	25
付録	乾燥時間測定方法	26
 洗濯用合成洗剤及び石けんの除菌活性試験方法解説		27
	・ 試験方法	27
	・ 試験条件及び操作	27
	1. 試験条件	27
	1.1 試験温度	27
	1.2 試験時間	28
	1.3 試験菌	28
	a) 試験に用いる細菌	28
	b) 初発細菌数	28

1.4	汚れ	28
1.5	試験試料.....	28
a)	試験試料濃度.....	28
b)	試験試料溶液量及び負荷布重量.....	28
c)	試験試料溶液硬度.....	29
1.6	対照試料.....	29
1.7	試験片挿入位置.....	29
2.	試験操作	29
2.1	細菌の前培養	29
	試験成立条件	30
1.	繰り返し試験でのばらつき	30
2.	不活性化剤.....	30

序文

本試験方法は、洗濯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操作方法は、AOAC の Official Method 972.04 及び A.N. Petrocci, P. Clarke の方法 (Journal of the Association of Official Analytical Chemists 52: 836-842, 1969) を、細菌の取扱方法及び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。また、洗浄時間、温度、硬度、浴比、洗剤濃度などの試験条件は、日本における実際の洗濯機洗いの条件を考慮して設定した。

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洗濯用合成洗剤及び石けんを対象とし、繊維製品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を対照試料溶液及び試験試料溶液で洗浄後、それぞれの試験片に残存する生菌数を測定し、対照試料溶液洗浄試験片に対する試験試料溶液洗浄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(綿布)に接種し乾燥した後、試験片を負荷布を巻き付けたスピンドルに挿入する。スピンドルをそれぞれ対照試料溶液及び試験試料溶液を入れた試験容器に投入し、試験容器を所定温度で所定時間、一定速度で回転させる。スピンドルを容器から取り出し、直ちに試験片を不活性化剤に投入し、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させる。その後、適切な方法で試験片から細菌を洗い出し、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
試験時間	10 分間
試験布	綿布(かなきん 3 号), 試験片は 2.5 × 3.75 cm ² (各繰り返しで 3 枚使用)
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	5.0 × 10 ⁸ ~ 5.0 × 10 ⁹ cfu/mL, 20 µL/枚
汚れ	5.0 (v/v)% ウマ血清
試験試料濃度	ラベル記載の通常の洗濯条件での使用量に相当する濃度
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用濃度調製水	53.58 mg/L (CaCO ₃ 換算), Ca/Mg モル比 = 3
試料溶液量	250 mL
負荷布重量及び浴比	負荷布重量: 15.0 ± 0.5 g, 浴比: 16.7 (L/kg)
回転数	1 分当たり 60 ± 3 回転
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*) (スタフィロコッカス・アウレウス)
- 2) 大腸菌 (*Escherichia coli*) (エシェリヒア・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。
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。
レセーンブローズ粉末	微生物試験用のもの。
ウマ血清粉末又は溶液	微生物試験用のもので，熱不活化したもの。
塩化アンモニウム	JIS K 8116 に規定する特級のもの。
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。
炭酸ナトリウム	JIS K 8625 に規定する特級のもの。
りん酸二水素アンモニウム	JIS K 9006 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。対照試料調製及び試験布洗浄用。

5.2.2 材料

スピンドル	直径 1.6 mm のステンレス線を、横が 50 mm、縦が 47 mm の“コ”の字型が 2 個連結した形に曲げる。このとき、2 個の“コ”の字型の間隔が 8 mm、角度が 150° になるようにする。さらに、両端を適当な方法で尖らせる(付録 a) 参照)。
試験布	JIS L 0803 に規定する染色堅ろう度試験用添付白布(綿)、かなきん 3 号。長さが少なくとも、3 m 以上のもの。1 m × 3 m 程度のものが望ましい。
安全ピン	ステンレス製。
組織培養フラスコ	容量約 200 mL のオートクレーブ可能なキャップ付ガラス製組織培養フラスコ。
ガラス製シャーレ	試験片殺菌用。外径約 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	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	ウマ血清溶液保存用。容量 2 mL 程度のものが望ましい。
遠沈管	細菌抽出用。オートクレーブ可能な、容量 50 mL のプラスチック製のもの。殺菌済み使い捨てのものを用いても良い。
ガラスピース	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 2 種(定性分析用)に相当するもので、密度が 125 ± 15 g/m ² のもの。ADVANTEC No.2(東洋濾紙株式会社)など。
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	25 ± 1 で調節できるもの。
培養器	35 ± 2 及び 37 ± 1 に調節できるもの。
ストップウォッチ	1 秒単位で測定できるもの。
pH 計	較正精度が 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。
分光光度計	波長 540 ~ 660 nm の範囲で測定できるもの。
乳鉢又は粉碎機	1 回の操作で 30 g 程度の顆粒状試料を粉状にすることができるもの。
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。
密閉容器	6.2 の試験片の調湿及び 6.5.1 の試験菌液接種後の試験片の乾燥で使用。例えば、容量が約 9L (例えば、内寸法: 215 × 220 × 200 mm 程度) のもの。
試験容器	スピンドルに適合し、オートクレーブ及び密封できるガラス容器で、十分なヘッドスペースがあるもの。容量 480 ± 20 mL のふたとリングの付いたメーソンジャー又は金属製キャップ付き広口ガラス瓶が望ましい。
回転装置	試験容器をその重心付近を中心とした垂直円軌道で、1 分当たり 60 ± 3 回転の回転速度で回転させることができる装置。JIS L 0844 に規定される回転装置 (Launder-O-meter) も使用可能であるが、操作性を考慮するといくつかの試験容器を並列に固定できる装置が望ましい(付録 b) 参照)。

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 (圧力 103 kPa 相当)に 15～25 分間保つ。加熱を止め、100 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) 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)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 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。

b) トリブ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) 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 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) 斜面培地

試験管にあらかじめ温めて溶解した a) 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 の温度で保存する。凝縮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) 組織培養フラスコ水平培地

組織培養フラスコにあらかじめ温めて溶解した a) のニュートリエント寒天培地を 35 mL 注ぎ, 綿栓をして高圧蒸気殺菌する。殺菌終了後, 清浄な室内に組織培養フラスコを水平に置き, 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 の温度で保存する。調製後 1 か月以上過ぎた組織培養フラスコ水平培地は, 用いてはならない。

e) 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) 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 にしておく。調製後, 直ちに使用しないものは 5 ~ 10 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) 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 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。

りん酸緩衝原液 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 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℃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1000 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℃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℃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1000 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。

5.4.4 ウマ血清溶液

ウマ血清が粉末状である場合、取扱説明書に従い、ウマ血清の粉末に所定量の殺菌水を加え溶解し、元の状態(100 v/v%)に戻す。溶解したウマ血清液をキャップ付きのバイアル瓶に1 mLずつ分注する。調製後、直ちに使用しないものは-20℃の温度で保存する。調製後1年以上過ぎたウマ血清液は、用いてはならない。

また、ウマ血清が液体である場合、そのまま使用する。直ちに使用しないものは-20℃の温度で保存する。購入後1年以上過ぎたウマ血清液は、用いてはならない。

5.4.5 湿潤剤

5 gのポリソルベート80及び炭酸ナトリウム5 gを水に溶解し、希釈して1000 mLにしたものを湿潤剤として用いる。調製後、直ちに使用しないものは5～10℃の温度で保存する。調製後6か月以上過ぎた湿潤剤は、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 μ L 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 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 ± 1 で 24~48 時間培養し、その後は、温度 5~10 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。

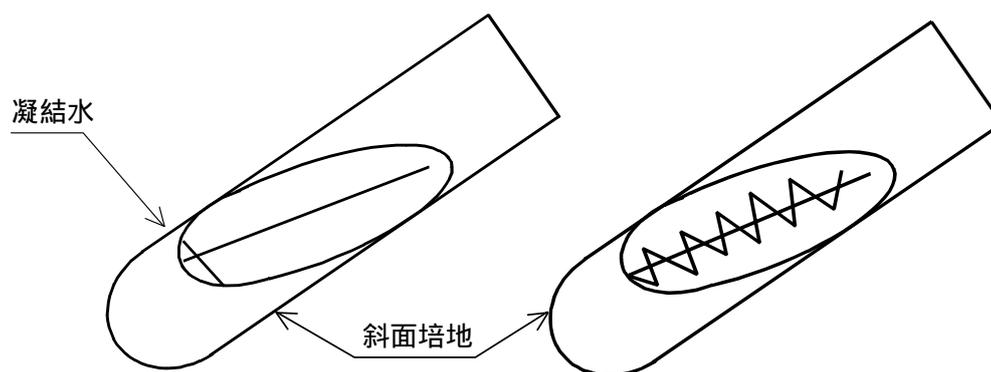


図 1 細菌の移植

5.6 試験布の洗浄

5.4.5 の湿潤剤 2.5mL 及び炭酸ナトリウム 2.5 g を水に溶解して 5 L の洗浄液を調製する。5.2.2 の試験布を 4~5 L の洗浄液に入れ、1 時間煮沸する。微量の湿潤剤をすべて取り除くため、水を替

えてさらに約5分間煮沸する。さらに、4～5 Lの冷水で約5分間かくはんする。試験布を紐に掛けて乾燥させる。

6. 試験方法

6.1 試験菌の前培養

5.5の保存菌株を1白金耳採取し、5.4.1 c)の斜面培地上に画線し、 37 ± 1 で18～24時間培養する。次に、5.4.2 a)のりん酸緩衝液100 mLを三角フラスコに入れ、オートクレーブを用い121 で15～25分間殺菌し、室温に戻ってからピペットを用いてりん酸緩衝液5 mLを取り、培養した斜面培地上に注ぎ、試験管かくはん器(5～10秒程度、2回)を用いて中ぐらの速度でかくはんし、細菌を分散させる。この菌液をりん酸緩衝液を入れた三角フラスコに戻し、三角フラスコを試験管かくはん器などで軽くかくはんし菌液が均一になるようにする。ピペットを用いて菌液2 mLを5.4.1 d)の組織培養フラスコ水平培地に移し、寒天の表面に菌液を延ばす。ピペットで余分な菌液を取り出した後、組織培養フラスコにキャップをかぶせ寒天の側が下になるようにし、水平にして 37 ± 1 で18～24時間培養する。

6.2 試験片の調製

5.6の洗浄済みの試験布を 2.5 ± 0.1 cm × 3.8 ± 0.1 cmの長方形の試験片に切り、3枚1組の試験片をろ紙⁽³⁾を敷いたガラス製シャーレに載せ、ふたをしてから、アルミホイルなどで包み、オートクレーブを用い121 で25分間殺菌する。殺菌後、包み(アルミホイル等)を外し、シャーレのふたをしたまま見た目乾燥するまで室温等で放置する(1晩以上放置することが望ましい)。なお、シャーレ内部に水滴等が無いことを確認すること。見た目乾燥後、シャーレのふたをしたまま105 で60分間乾燥し、そのままシリカゲルを入れた殺菌済みの密閉容器に入れ、室温で十分に放冷する(一晩置くことが望ましい)。

注⁽³⁾ ろ紙がガラス製シャーレに収まるように、ろ紙周辺を適宜切り取る(径が90 mmのろ紙の場合、2～3 mm程度切り取る)。

6.3 スピンドルの調製

5.6の洗浄済みの試験布に幅5.3 cmになるように印をつけ、はさみなどで切れ目をつけ繊維方向に手で切り裂く。切り裂いた部分のほつれを取り去り、長さ 275 ± 2 cmで切断し包帯状の負荷布(幅 5.2 ± 0.1 cm、長さ 275 ± 2 cm)を作製する。スピンドルの一端を負荷布の端から約7.5～8 cmの部分に通し、さらにもう一端をスピンドルの幅が9.5～10 cmになるように負荷布に通すことによりスピンドルの外側の水平延長部を負荷布に固定する⁽⁴⁾。次に、3本の水平延長部の回りに十分な張力を持って三角形の底辺部が12回巻きになるように巻き付け、負荷布の最後の端を12巻目の負荷布にステ

プレス製安全ピンで固定し、余分な部分を 15 cm 以下の長さで、望ましくは 5~10 cm 程度を切り取る⁽⁴⁾。試験片の挿入及び回収をすばやく行うため、試験片を挿入する負荷布位置にプラスチック製のタグなどで印をつける⁽⁵⁾。負荷布を巻き付けたスピンドルをオートクレーブで 121℃、25 分間殺菌する。冷却し、使用するまで室温で無菌的に保存する。

保存してある負荷布を巻き付けたスピンドル(殺菌済み)を使用する場合、試験前日にりん酸水素二ナトリウム飽和水溶液を入れた殺菌済みの密閉容器に入れ、一晩静置し無菌的に調湿を行う。オートクレーブで殺菌したものを当日使用する場合、巻き付けた負荷布が十分に湿った状態であれば、調湿せずに使用してよい。

注⁽⁴⁾ 図 2 参照。

注⁽⁵⁾ 試験片をスピンドル底辺の中央部から 9 巻き目と 10 巻き目の負荷布の間及び 10 巻き目と 11 巻き目の負荷布の間に挿入するため(6.5.2を参照)、タグを 10 巻き目に付けると作業がやり易い。

備考 スピンドルに巻き付けた負荷布は、幅 5.2 ± 0.1 cm、長さ 260~270 cm である。この負荷布重量は相対湿度 76 % 下で 14.6~15.7 g である(相対湿度 76 % での負荷布重量 11 mg/cm^2)。

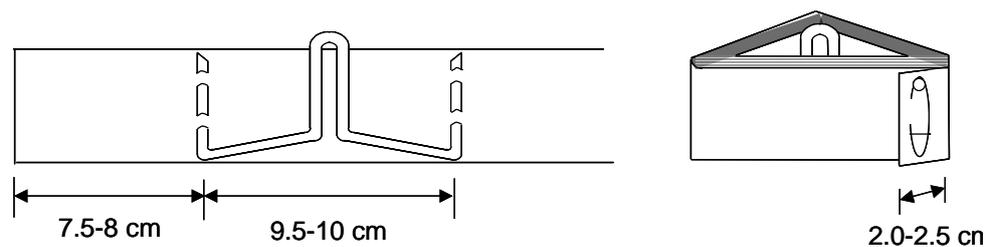


図 2 負荷布のスピンドルへの巻き付け

6.4 試験菌液の調製

6.1 で前培養した試験菌(組織培養フラスコ水平培地)に 5.4.2 a) のりん酸緩衝液 10 mL と 5.2.2 の殺菌済みのガラスビーズ 5 g を加え、ガラスビーズを寒天の表面に転がして細菌を回収する。細菌が寒天の表面から完全に洗い出されたことを確認する。殺菌済みのピペットを用いて培養フラスコ当たり約 3 mL の試験菌液を殺菌済みの新しい試験管に移し、試験管かくはん器で十分にかくはんする。菌液の吸光度を分光光度計で測定し⁽⁶⁾、生菌数を推定する。採取した菌液 1.0 mL を正確に殺菌済みの新しい試験管に移し、適量のリん酸緩衝液を加え生菌数を $5.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^9$ cfu/mL⁽⁷⁾ ($1.0 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ cfu/mL が望ましい)に調製し、試験管かくはん器で均一になるようにかくはんする。

生菌数を調製した後、菌液 1.9 mL を正確に新しい殺菌済みの試験管に移し、5.4.4 のウマ血清溶液 0.1 mL を加えて、最終濃度が試験菌液中で 5 (v/v) % となるようにし、試験管かくはん器など(2~3 秒、1~2 回程度)で均一になるようにかくはんする。この菌液は氷冷保存すると 4 時間は使用可

能である。試験菌液の生菌数を混積平板培養法で測定する。必要ならば、さらに多くの試験菌液を同様の方法で調製する。尚、試験菌液の生菌数は、6.6.1 により 10 倍希釈系列希釈液を調製し、6.6.2 の混積平板培養法によって測定する。

注⁽⁶⁾ 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。よくかくはんしてから 30 秒後に吸光度を測定する。このとき、あらかじ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⁽⁷⁾ 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。

6.5 試験操作

6.5.1 試験菌液の接種

6.4 の試験菌液の入った試験管を試験管かくはん器で軽くかくはんし、菌液を均一にする。6.2 の殺菌、乾燥した試験片を 3 枚一組とし、試験片に直接風が当たらないよう、風を切ったクリーンベンチ内で下記手順に従って、試験菌液の接種を行う。

- 1) まず 1 枚目の試験片を殺菌済みのピンセットで持ち上げ、試験片の中心部に殺菌済みの 5.2.1 の水 10 μ L を接種する。殺菌済みの 5.2.1 の水が完全に広がった後 (約 5 秒後)、ガラス製シャーレ中のろ紙上に戻し、次の試験片に殺菌済みの 5.2.1 の水を同様に接種する。
- 2) 3 枚の試験片それぞれに、殺菌済みの 5.2.1 の水 10 μ L を接種後、1 枚目の試験片を殺菌済みのピンセットで持ち上げ、試験片の中心部に試験菌液 20 μ L を接種し、試験片をピンセットでつまんだまま試験菌液が完全に広がるまで静かに待つ (約 5 秒)。このとき、試験片に風等が当たらないよう十分に注意する。試験菌液が完全に広がった後、ガラス製シャーレ中のろ紙上に戻し、次の試験片に試験菌液を同様に接種する。
- 3) 3 枚の試験片それぞれに、殺菌済みの 5.2.1 の水、試験菌液を接種、ガラス製シャーレにふたをする。1)~3)の操作は、1 組 (試験片 3 枚) 当たり 2~3 分以内で行うこと。
- 4) 1)~3)の操作をシャーレ 3 個分行い、ふたをしたまま 35 ± 2 に調温してある培養器中のりん酸水素二ナトリウム飽和水溶液で調湿された殺菌済みの密閉容器 (5.2.3 参照) に外気があまり入り込まないように注意しながら入れ、密閉し、接種した試験片を所定時間乾燥させる⁽⁸⁾。

注⁽⁸⁾ 試験菌が乾燥により損傷を受けることを防ぐため、試験菌接種後の試験片の乾燥は、りん酸水素二ナトリウム飽和水溶液を入れた殺菌済みの密閉容器内で行う。りん酸水素二ナトリウム飽和水溶液を入れた密閉容器は試験片乾燥の少なくとも 3 時間前に、好ましくは試験前日から 35 ± 2 に調温してある培養器に入れておく。

また、試験菌を試験片に接種した後は、試験片上の菌に直接風など(エアコンの風、安全キャビネット、クリーンベンチの風)が当たらないように注意する。

また、乾燥に要する時間は、試験環境や時期によって異なることがありうる。したがって、付録 VII の方法で予め含水率が一定値(10±2%程度)になる時間を測定し、その時間に更に所定時間(10～15分程度)を加えた時間を乾燥時間とする。尚、乾燥時間を試験報告書に記載すること。

6.5.2 試験片の挿入

試験片が乾燥した後、殺菌済みの手袋で 6.3 の負荷布を巻き付けたスピンドルの側面を持ちながら、殺菌済みのピンセットを用いて、試験片をスピンドルに巻いた負荷布の 9 巻き目と 10 巻き目の間に 1 枚、10 巻き目と 11 巻き目の間に 2 枚挿入する。

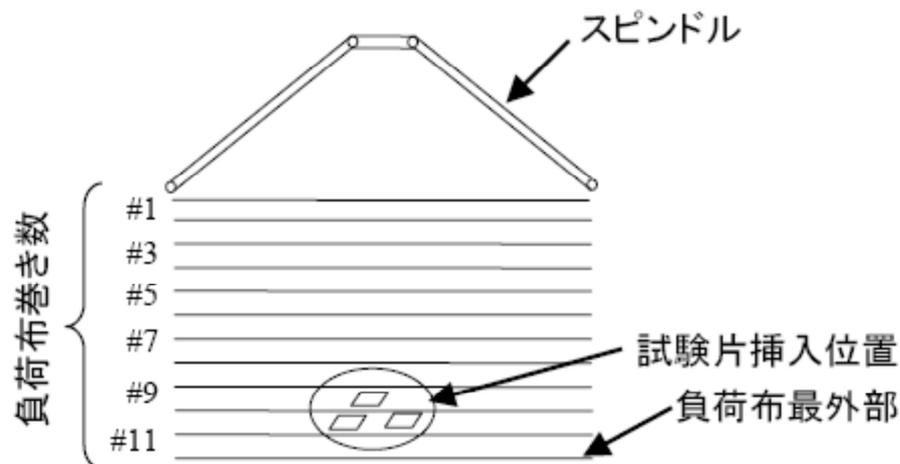


図 3 試験片挿入位置

6.5.3 試験試料溶液の調製

1 試料に対し少なくとも 3 つの試験容器に、適当な方法(付録 参照)で 4. の表 1 に規定する条件に調製した試験試料溶液⁽⁹⁾及び対照試料溶液をそれぞれ 250 mL ずつ入れる。試験試料溶液の調製方法を試験報告書に記載する。

注⁽⁹⁾ 試験試料溶液の調製は、6.5.1 の試験菌液の接種における乾燥中に行い、乾燥した試験片を 6.3 の殺菌、調湿したスピンドルに挿入後、2 分以内に 6.5.4 の洗浄操作を行えるようにする。

6.5.4 洗浄操作

試験試料溶液又は対照試料溶液の調製後、直ちにクリーンベンチ内で無菌的に 6.5.2 の試験片

を挿入したスピンドルをスピンドル正面が回転面に対し垂直になるように、6.5.3 の試験試料溶液の入った試験容器に入れ、容器を密封し、付録 b) の回転装置に設置する。回転速度 60 ± 3 回転/分で 10 分間回転後、回転装置から試験容器を取り出し、クリーンベンチ内で容器を開けて、溶液から殺菌された手袋をはめた手で無菌的にスピンドルを取り出す。溶液温度を測定し、 ± 2 (= 試験温度) の範囲にあることを確認し、温度を記録する。

6.5.5 不活性化及び細菌の抽出

a) 試験片上に残存する細菌の抽出

スピンドルからそれぞれの試験片をすばやく殺菌済みのピンセットで取り出し、3 枚の試験片を 1 組とし、付録 の方法で有効性が確認された適当な不活性化剤(付録 参照) 30 mL⁽¹⁰⁾ を入れた容量 50 mL の遠沈管に移し、試験管かくはん機で付録 の方法で定めた時間激しくかくはんする。

注⁽¹⁰⁾ 不活性化剤の量は、試験片 1 枚あたり 10 mL となるように 30 mL (10 mL × 3) とした。

b) 試験試料及び対照試料溶液の不活性化

ピペットを用いて試験試料及び対照試料溶液を 1.0 mL 採り、不活性化剤 9.0 mL を入れた試験管に移し、試験管かくはん器を用いて 10 秒間激しくかくはんし、5 分間放置する。

6.6 生菌数の測定

6.6.1 希釈系列の調製

6.4 の試験菌液、6.5.5 a) の細菌抽出液及び 6.5.5 b) の試験試料溶液及び対照試料溶液の不活性化剤希釈液を、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、試験管から 1.0 mL を新しいピペットで採り、希釈液 9.0 mL の入った別の試験管に入れて十分に混合する。この操作を順次繰り返して、10 倍希釈系列希釈液をそれぞれ作製する。

6.6.2 混釈平板培養

6.6.1 の各希釈系列希釈液及び原液(希釈なし)から、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 ℃ に保温した 5.4.1 のニュートリエント寒天培地⁽¹¹⁾ 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 ℃ 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」⁽¹²⁾ 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⁽¹¹⁾ トリプチックソイ寒天培地又は標準寒天培地を用いてもよい。

注⁽¹²⁾ 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) 混釈平板培養法、又は、厚生省生活衛生局監修 食品衛生検査指針 微生物編 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

a) 試験菌液の生菌数

6.6.2 で採用した各希釈段階のコロニー数より、試験菌液の生菌数を式(1)によって求める。

$$N_0 = C \times 10^M \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここに、 N_0 : 試験菌液の生菌数 (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の平均値)

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。試験菌液の原液 (希釈なし) の場合は、“0”とする。

b) 試験片上及び試験試料溶液中の生菌数

6.6.2 で採用した各希釈段階のコロニー数より、各試験片上の生菌数及び試験試料溶液中 (及び対照試料溶液中) の生菌数を式(2)によって求める。

$$N = C \times 10^M \times 10 = C \times 10^{M+1} \quad \dots\dots\dots (2)$$

ここに、 N : 生菌数 (試験片上の生菌数の場合は cfu/試験片、試験試料溶液及び対照試料溶液の場合は 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の平均値)

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。細菌抽出液及び不活性化剤希釈液の原液 (希釈なし) の場合は“0”とする。

10: 係数⁽¹³⁾

注⁽¹³⁾ 試験片上の生菌数は、試験片1枚当たり10 mLの不活性化剤に細菌を抽出し、また試験試料溶液中 (及び対照試料溶液中) の生菌数は、1 mLを9.0 mLの不活性化剤で希釈してから、混釈平板培養法によって測定する。従って、試験片上の生菌数及び試験試料溶液中 (及び対照試料溶液中) の生菌数を求めるためには、混釈平板培養

法で得られた測定値を 10 倍する必要があることから、係数として 10 を付した。

備考 a)及びb)で求めた生菌数は、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“< 10”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“< 10”の場合は、生菌数を“10”とし常用対数値を“1”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。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) 試験菌液の菌数

6.4 の試験菌液の菌数が $5.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^9$ cfu/mL であること。

2) 対照試料でのばらつき

対照試料溶液において、洗浄操作後の試験片上の生菌数の常用対数値の変動係数に関し、式(3)が成立すること。

$$CV_c(\%) = SD_c / Av_c \times 100 \quad 10 \dots\dots\dots (3)$$

ここに、 CV_c : 変動係数⁽¹⁴⁾

SD_c : 対照試料溶液における、各繰り返しでの試験片上の生菌数の常用対数値の標準偏差値

Av_c : 対照試料溶液における、各繰り返しでの試験片上の生菌数の常用対数値の平均値

3) 試験試料でのばらつき

試験試料溶液において、洗浄操作後の各繰り返しでの試験片上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上の生菌数が 300 個以下の場合、又は式(4)の各 (i) が全て 1 以下の場合、本条件を適用しない。

$$(i) = Av_s - L_s(i) \dots\dots\dots (4)$$

ここに、 $L_s(i)$: 試験試料溶液における、各繰り返しでの試験片上の生菌数の常用対数値

i: 繰り返しの番号

$$CV (\%) = SD / Av \times 100 \quad 20 \dots\dots\dots (5)$$

ここに、 CV : 変動係数⁽¹⁴⁾

SD : 式(4)で求めた (i)の標準偏差値

Av : 式(4)で求めた (i)の平均値

4) 不活性化剤の有効性

不活性化剤の有効性が付録 の方法で確認されていること。

5) 試験片上の細菌の回収率

試験片上の細菌の回収率が付録 の方法で確認されていること。

注⁽¹⁴⁾ 各変動係数は、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。

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

ここに、 Av_s : 試験試料溶液における、試験片上の生菌数の常用対数値の平均値

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) 試験試料の調製方法
- 3) 試験試料濃度及び試験試料量
- 4) 試験温度
- 5) 使用水硬度
- 6) 汚れ物質名・製造者・ロット番号及び濃度(汚れの種類及び濃度)
- 7) 試験菌液接種後の試験片の乾燥時間(6.5.1 参照)
- 8) 試験片挿入位置
- 9) 不活性化剤の組成
- 10) 試験菌種

d) 試験結果

- 1) 試験菌液中の生菌数⁽¹⁵⁾
- 2) 試験試料及び対照試料で処理した試験片上の生菌数⁽¹⁵⁾

- 3) 試験成立条件の判定
 - 試験菌液の生菌数
 - 対照試料でのばらつき (CV_c)
 - 試験試料でのばらつき (CV)
 - 不活性化剤の有効性
- 4) 除菌活性値

注⁽¹⁵⁾ 各希釈系列希釈液(原液も含む)のコロニー数も記載する。

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 キャビネット
JIS K 8101	エタノール(99.5) (試薬)
JIS K 8116	塩化アンモニウム(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 8625	炭酸ナトリウム(試薬)
JIS K 9006	りん酸二水素アンモニウム(試薬)
JIS K 9007	りん酸二水素カリウム(試薬)
JIS L 0803	染色堅ろう度試験用添付白布
JIS L 0844	洗濯に対する染色堅ろう度試験方法
JIS L 1902	繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果
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 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) 試験試料溶液の準備

本試験における最も高い濃度の試験試料溶液を、付録 に従って準備し、恒温水槽で試験温度に調整する。

b) 試験菌液の準備

6.4 に従って試験菌液を準備する。ただし、ここではウマ血清は加えない。次に、5.4.2 a) のりん酸緩衝液を用いて、試験菌液の生菌数を $6.0 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^3$ cfu/mL に調製し、これを試験菌液とする。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、6.6.2の混釈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9.0 mL、さらに a) で準備した試験試料溶液 1.0 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 1.0 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水槽で混合液を 20 分間静置する。20 分後、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、混釈平板培養を行う。

試験試料溶液の代わりにりん酸緩衝液 1.0 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 9.0 mL を加える。次に、b) で準備した試験菌液 1.0 mL を正確に加え、試験管かくはん器で約 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水槽で混合液を 20 分間静置する。20 分後、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、混釈平板培養を行う。

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)の試験菌液生菌数が $6.0 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^3$ 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

代わりにりん酸緩衝液を加えた系(陰性対照)の生菌数の±50%以内であること。

- 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%以内であること。

付録 不活性化剤の例

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

a) レセーン培地不活性化剤

レセーンブロー粉末 25.7 g 及び 70 g のポリソルベート 80 を容量 1 000 mL のステンレス製ビーカーに取り、水を約 500 mL 加える。完全に溶けるまでマグネチックスターラでかくはんしながら溶液を煮沸する。加熱器を切り、かくはんしながら放置する。冷却後(70 未満)、水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液でpHを7.0に調整し、水を加えて1 000 mLにする。オートクレーブを用い121 で15~25分間殺菌する。オートクレーブ後分離するのを防ぐため、熱いうちに試験管かくはん器などでかくはんする。調製後、直ちに使用しないものは5~10 の温度で保存する。調製後、2か月以上過ぎたレセーン培地不活性化剤は、用いてはならない。

b) 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、りん酸水素二カリウム 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) 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 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 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、各試験機関で一度行えばよい。ただし、試験布の規格又は購入先に変更がある場合は、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 $5.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^9$ cfu/mL ($1.0 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ cfu/mL が望ましい)の

試験菌液を調製し、ウマ血清を 5 (v/v) % になるように加える。次に、5.4.2 a) のりん酸緩衝液を用いて、異なる濃度の 3 段階の試験菌液 (1×10^9 cfu/mL, 1×10^7 cfu/mL 及び 2×10^5 cfu/mL 程度が望ましい。) を調製する。試験菌液の生菌数は、6.6.2 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 枚の試験片に接種し、所定の密閉容器内で所定時間乾燥する。乾燥後、3 枚の試験片を 1 組とし、付録 の方法で有効性が確認された適当な不活性化剤 30 mL を入れた容量 50 mL の遠沈管に投入し、試験管かくはん器で所定時間激しくかくはんし、試験片に接種した試験菌を洗い出す。

試験管かくはん器でのかくはんの所定時間については、1, 2, 3 分間について検討し、回収率が最大かまたは平衡に達した時間とすること。

c) 回収率の確認

試験菌液及び洗い出し液中の生菌数を、6.6.2 の混釈平板培養法で測定し、各試験菌液の回収率を次式に従って計算する。

$$\text{試験菌の回収率 (\%)} = (N_1 \times 10) / (N_0 \times 0.02) \times 100 = 5 \times 10^4 \times (N_1 / N_0)$$

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/mL)

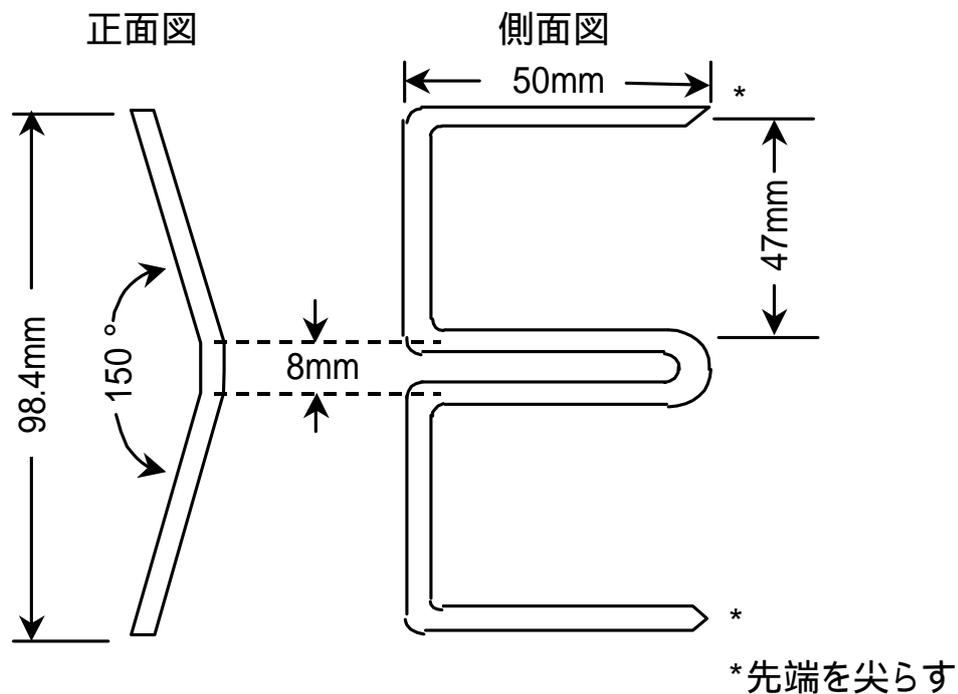
d) 抽出方法の有効性の確認

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。

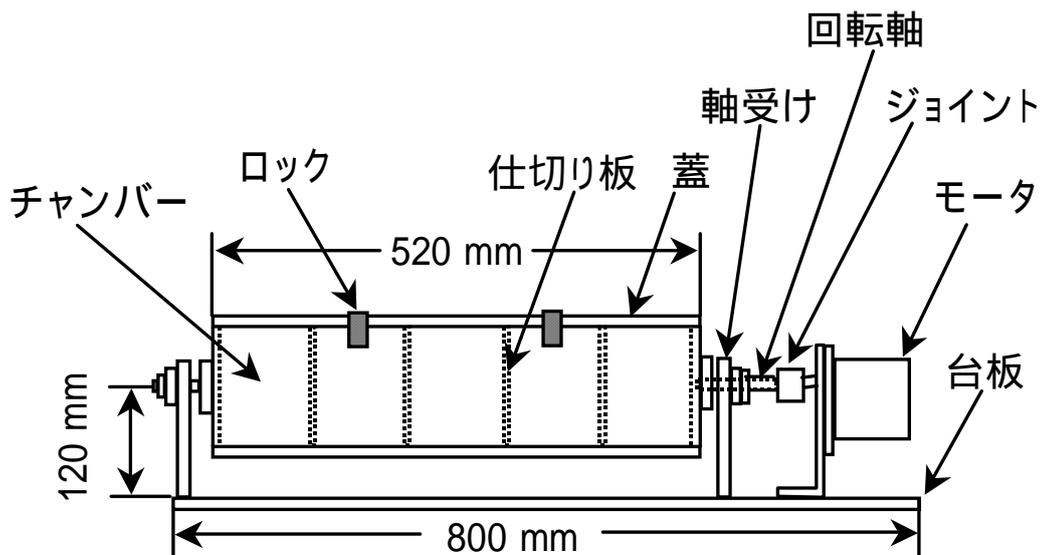
付録 装置図

a) スピンドルの図



出典: A.N. Petrocci, P. Clarke, Journal of the Association of Official Analytical Chemists **52**, 836-842, (1969)

b) 回転装置の図 (例)



付録 試験試料及び試験試料溶液の調製(例)

a) 試験試料の調製

試験試料が粒状の場合、少なくとも最小販売単位の試験試料を縮分器にかけ、約 30 g 程度の試験試料が得られるまで繰り返す。縮分により得られた試験試料の全量(約 30 g)を乳鉢又は粉碎機(例えば、ブレンダーミキサー)にて粉碎し、均一化する。粉碎・均一化は、見た目が均一になるまでにとどめる。例えば、ブレンダーミキサーを使用する場合、10 秒ごとの粉碎・静置を 3 回繰り返す。

注 粉碎により、不安定になることがあるので、粉碎後は直ちに使用し、翌日以降では使用しないこと。

b) 試験試料溶液の調製

空の試験容器をふたとともにオートクレーブを用い 121 で 15~25 分間殺菌する。ふたをつけたまま、 ± 1 (= 試験温度)に調節した水浴に少なくとも 20 分間つけておき、試験容器が試験温度になるようにする。

また、三角フラスコに 5.2.1 の水 1 000 mL 及び所定量の 5.4.3 の硬水濃縮液 1 mL を入れ、水面が分かるように三角フラスコの外側に印をつける。オートクレーブを用い 121 で 15~25 分間殺菌する。殺菌後、予め殺菌しておいた水で容量を 1 000 mL に再調製し、 ± 1 (= 試験温度)に調節した水浴に三角フラスコを少なくとも 60 分間つけておき、液の温度が試験温度になるようにする。液の温度が ± 1 であることを確認し、温度を記録する(ただし、初めの実験で、設定時間で ± 1 になることを確認したら、毎回行う必要はない。)

次に、三角フラスコを水浴から取り出し、クリーンベンチ内で必要量の試験試料及び殺菌済みのかくはん子を入れ、電磁かくはん器で正確に 4 分間かくはんし十分に溶解させる。試験試料溶解後、直ちに三角フラスコから所定量(250 mL)の試験試料溶液を温度調整した試験容器に分注する。1 試料に対し少なくとも 3 つの試験容器を準備する。

対照試料の 0.05 (w/v) % ポリソルベート 80 水溶液も同様の方法で調製する。

付録 実験操作注意点

a) 試験片及びスピンドルの準備

- 1) 試験片の調湿を十分行う。一晩調湿したほうが好ましい。
- 2) スピンドルに巻きつける負荷布の張り具合はいつも同程度であるようにする。スピンドルの角度は送付中や保存中に変わることがあるので、負荷布を巻く前にその角度が 150° であることを確認する。

b) 試験菌液の準備及び接種

- 1) 6.4 の組織培養フラスコから回収した希釈前の菌液濃度は通常 10^{10} cfu/mL 程度である。菌数が $5.0 \times 10^8 \sim 5.0 \times 10^9$ cfu/mL ($1.0 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ cfu/mL が望ましい)になるよに 5.4.2 a) のりん酸緩衝液で希釈した後、ウマ血清溶液を添加する。
- 2) 菌液を試験片に接種する場合、菌液がろ紙に染み出すことを防ぐため、試験片を殺菌済みのピンセットで持ち上げながら、接種する。接種後試験菌液が完全に広がるまで待ち(約 5 秒)、殺菌済みのガラスシャーレのろ紙上に戻す。

c) 試験試料の準備

約 1 g かそれ以上の試験試料を量り取り、試験試料溶液を調製することが望ましい。

d) 試験試料溶液と試験菌との接触時間

- 1) 試験試料溶液と試験片との接触時間が各繰り返しで、できるだけ同じになるようにスピンドルの挿入の順番と取り出しの順番を同じにする。
- 2) 回転終了後、スピンドルからの試験片の取り出し、不活性化剤への投入をできるだけ早く行う。好ましくは、各繰り返しでのスピンドルからの取り出し・投入を 2 分以内に行う。

e) 不活性化及び混釈平板培養

- 1) 不活性化剤は、本試験方法の付録 に従って、個々の試験試料に対する有効性を確認する。
- 2) 試験片と不活性化剤との接触時間が各繰り返しでできるだけ同じになるように、試験片の挿入の順番と取り出しの順番を同じにする。
- 3) 試験菌の取り出しの各工程(例えば、抽出後、希釈系列希釈液の調製、混釈平板培養時)で、菌液を取り出す前に菌液が十分に均一となるように、かくはん又は振盪を行う。

付録 乾燥時間測定方法

- 1) 5.6の洗浄済みの試験布を2.5 cm × 3.75 cmの長方形の試験片に切り、3枚1組の試験片をろ紙を敷いたガラス製シャーレに入れ、ふたをしてから、105℃で60分間乾燥。5組(試験布15枚)必要。殺菌操作は不要。
- 2) 乾燥後、シャーレのまま、シリカゲルを入れた密閉容器に入れ、十分に放冷する(1晩置くことが望ましい)。
- 3) シリカゲルを入れた密閉容器から1組(試験布3枚)を取り出し、それぞれの重量を測定し乾燥重量とする。
- 4) その後、まず1枚目の試験片を殺菌済みのピンセットで持ち上げ、試験片の中心部に殺菌済みの5.2.1の水10 μLを接種する。殺菌済みの5.2.1の水が完全に広がった後(約5秒後)、ガラス製シャーレ中のろ紙上に戻し、次の試験片に殺菌済みの5.2.1の水を同様に接種する。
- 5) 3枚の試験片それぞれに、殺菌済みの5.2.1の水10 μLを接種後、1枚目の試験片を殺菌済みのピンセットで持ち上げ、試験片の中心部に殺菌済みの5.2.1の水20 μLを接種する。できるだけ風等の当たらない場所で、試験片をピンセットでつまんだまま、殺菌済みの5.2.1の水が完全に広がるまで静かに待ち(約5秒)、ガラス製シャーレ中のろ紙上に戻して、次の試験片に殺菌済みの5.2.1の水を同様に接種する。
- 6) 5)の操作が終わった後、直ちに重量を測定し、この重量を、乾燥時間0分の重量とする。
- 7) さらに3)、4)及び5)の操作を行った後に、接種の終わったシャーレを、ふたをしたまま35±2℃に調温してある培養器中のりん酸水素二ナトリウム飽和水溶液を入れた殺菌済みの密閉容器に外気があまり入り込まないように注意しながら入れ、密閉し、接種した試験片を所定時間(10、20、30、40、60分)乾燥させる。乾燥後、シャーレごと試験布を取り出し、直ちにそれぞれの試験布重量を測定する。
- 8) 7)で試験片を取り出してから30分以上経過した後、3)から7)の操作をそれぞれ繰り返して、残りの所定時間で乾燥、重量測定を行う。
- 9) 次式により含水率を算出する。

$$\text{含水率(\%)} = (\text{調湿器での乾燥後の重量} - \text{乾燥重量}) / \text{乾燥重量} \times 100$$

洗濯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。

・試験方法

本試験方法における操作方法は、AOAC の Official Method 972.04 (第 16 版, Bacteriostatic Activity of Laundry Additive Disinfectants) 及びアメリカ合衆国環境保護局で Disinfecting laundry additives 及び Sanitizing Laundry additives の除菌効力試験として推薦されている A.N. Petrocci, P. Clarke の方法 (Journal of the Association of Official Analytical Chemists 52: 836-842, 1969) を参考としている。尚、本試験方法で用いられる洗濯試験機は JIS L 0844 (洗濯に対する染色堅ろう度試験方法), ISO-C01 ~ C05 (Textiles- Tests for colour fastness-Part C01 ~ C05), ISO-C06 (Textiles- Tests for colour fastness-Part C06: Colour fastness to domestic and commercial laundering) 及び AATCC Test Method 61 (Colorfastness to Laundering, Home and Commercial: Accelerated) などで規定されている Launder-O-meter を参考としている。

試験条件は、日本における実際の洗濯機洗いの条件 (洗浄時間, 温度, 硬度, 浴比, 洗剤濃度) を考慮して設定した。

・試験条件及び操作

洗濯用合成洗剤及び石けんの除菌活性試験は、ラベル記載の通常の洗濯条件で行うこと。通常の洗濯条件を逸脱し、消費者が日常的に行うことができない使用方法 (例えば、通常使用量を逸脱した使用量や温水での使用など) に基づく試験条件は適当でない。また、本試験方法及び基準は通常の洗濯機での使用方法を前提としており、つけ置き専用洗剤や一般洗剤のつけ置きでの使用下の除菌活性を評価するものでない。

1. 試験条件

1.1 試験温度

参考とした A.N. Petrocci, P. Clarke の方法では、25℃ であり、かつ日本では室温を想定した試験は一般的に 25℃ で行われている。また、本試験での洗浄力判定用指標洗剤^(解1)の除菌活性値が 20 と 25℃ で同程度であった。したがって、実験室での温度制御が比較的容易である 25℃ で実験を行うことにした。

注^(解1) JIS K 3362 合成洗剤試験方法中の 9.1 衣料用合成洗剤の洗浄力評価方法の b) 10) に規定する洗浄力判定用指標洗剤

1.2 試験時間

現在、日本で使用されている家庭用洗濯機の洗剤での洗浄時間は 10 分程度であることから、本試験での試験時間を 10 分間とした。

1.3 試験菌

a) 試験に用いる細菌

着用した衣料(洗濯物)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よく知られている^(解²)。また、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、一般によく試験される菌であって入手や取扱いが困難でないことを重視し、グラム陽性菌の代表として黄色ぶどう球菌を、グラム陰性菌の代表として大腸菌をそれぞれ選択した。

注^(解²) 皆川 基, 小沢 敦, 森 忠敬; 織消誌, 13, 103 (1972) など

b) 初発細菌数

初発細菌数は、細菌の付着が著しいと考えられる洗濯物、例えば靴下や襟などの細菌数を参考とした。皆川らが測定した靴下の細菌数が $1 \times 10^3 \sim 8 \times 10^7$ cfu/cm² である^(解³)ことから、本試験での初発細菌数は約 2×10^6 cfu/cm² となるようにした。

注^(解³) 皆川ら; 織消誌, 17, p256 (1976)

1.4 汚れ

汚れの種類としては、参考とした A.N. Petrocci, P. Clarke の方法と同様に、ウマ血清を用いることとした。また、汚れの量に関しては、皆川らが測定した靴下の蛋白汚れの量 (2.1 ~ 16.5 mg/g)^(解³)を参考として、ウマ血清量が約 10 mg/g となるようにした。

1.5 試験試料

a) 試験試料濃度

ラベル記載の通常の洗濯条件での使用量に相当する濃度で行うこと。

b) 試験試料溶液量及び負荷布重量

2000 年 5 月に日本石鹼洗剤工業会の洗たく科学専門委員会が行った「全自動洗濯機使用者における最近の洗濯実態」(2001 年 4 月発行)によると、全自動洗濯機使用者の平均的な浴比(1 キロの洗い物を洗うときの水量)は 16.8 (L/kg) であった。そこで、試験試料溶液量及び負荷布重量を

それぞれ 250 mL 及び 15 ± 0.5 g とした。この場合の浴比は、16.7 (L/kg) である。

c) 試験試料溶液硬度

日本の水道水の硬度は $2.3 \sim 4.4$ °DH (解⁴) 程度(沖縄の 14.2 °DH を除く)であり、 3 °DH 及び 4 °DH での除菌活性値は同程度である。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 (53.38 mg/L CaCO_3 換算)を用いることにした。

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 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結果を示す。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。

1.7 試験片挿入位置

参考とした A.N. Petrocci, P. Clarke の方法では、「2 枚の試験片を 6 巻き目と 7 巻き目の負荷布の間に並べて挿入し、3 枚目の試験片を 7 巻き目と 8 回巻き目の負荷布の間に挿入する。」と記載されている。しかしながら吸着性の薬剤(塩化ベンザルコニウム)を含有する合成洗剤で、試験片を Petrocci らの記載通りの位置に挿入した場合と最外部の位置に挿入した場合とで、塩化ベンザルコニウムの吸着量が位置により異なり、除菌活性値において無視できない差があることが指摘された。そこで、試験片の挿入位置による除菌活性値の差を低減するため、負荷布間の最内部と最外部以外の位置に挿入することにした。

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 細菌の前培養

細菌の活性をそろえるため、JIS Z 2801 にならい固体培地(斜面培地及び組織培養水平培地)による前培養を 2 回行うものとした。

用いる細菌の状態としては、着用衣類に付着している細菌は定常期にあると考えられ、また手技の簡便性という観点から JIS Z 2801 にならい定常期の細菌を用いることとした。

・試験成立条件

1. 繰り返し試験でのばらつき

本体 7.1 の 2) 及び 3) は、それぞれ対照試料溶液及び試験試料溶液での、試験片上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、試験試料溶液で全ての繰り返しにおいて試験片上の生菌数が 300 (cfu/試験片) 以下の場合、又は各繰り返しでの除菌活性値((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 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。また、各繰り返しに対する除菌活性値((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(CV)はその分母(各繰り返しの除菌活性値の平均値)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(CV)は大きくなるからである。

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。

洗剤・石けん公正取引協議会 除菌活性試験方法作成委員会 構成表

	氏名	所属
	伊 澤 啓 文	花王株式会社
	花 井 淳 也	花王株式会社
	久保田 浩美	花王株式会社
	竹 内 虎 之	ニッサン石鹸株式会社
	熊 谷 善 敏	プロクター・アンド・ギャンブル・ジャパン株式会社
	石 田 佳 樹	Proctor & Gamble International Operation SA
	蓼 沼 裕 彦	ライオン株式会社
	長谷川 貴通	ライオン株式会社
(事務局)	片 桐 勤	洗剤・石けん公正取引協議会