

(2) 最小発育阻止濃度測定法Ⅱ (2012年度版)

光触媒抗菌剤の MIC 測定法

1. 適用範囲

本試験法は粉末状光触媒抗菌剤に適用する。

2. 試験菌株¹

- (1) *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 (ATCC 6538P)
- (2) *Escherichia coli* NBRC 3972 (ATCC 8739)

3. 試験の準備

試験で用いる薬品、器具等は特に指定がないかぎり、日本工業規格に規定するものおよび日本薬局方に規定するものを用いる。

3.1 器具、機器

- (1) L字形試験管² (ガラス製、長さ 130~140mm、高さ 110~120mm、外径 18mm)
- (2) 振とう機³、恒温水槽⁴および振とう培養機 (±1℃以内の精度で運転可能な機種)
- (3) 恒温器 (±1℃以内の精度で運転可能な機種)
- (4) 紫外線照射装置⁵
- (5) 紫外線強度計⁶ (測定波長域 310~400nm)

3.2 培地

(1) 普通寒天培地 (NA 培地)

肉エキス	5.0 g
ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
寒天	15.0 g
精製水	1,000 ml

pH 7.0~7.2

¹ 試験菌は、グラム陽性菌またはグラム陰性菌の代表として各 1 種類を選択した。

² L字形試験管の栓は空気が透過するシリコ栓を用いる。

³ モノード振とう、水平振とうあるいは上下振方式の振とう機いずれも使用可とする。モノード振とう機はタイテック社の「ユニットシェーカー・モノシンⅡA」などがある。

⁴ 原則として振とう機と組み合わせて恒温水槽を用いる。サンプルと光源が十分離れていて、サンプルの温度が上昇しない場合は、振とう培養機を用いても良い。

⁵ ブラックライト蛍光灯は概ね波長が 310~400nm の紫外線を放出する。いわゆる殺菌灯から出る紫外線より波長が長いものである。なお、使用する光源の本数、出力数については規定しない。

⁶ 取り扱い説明書の記載に基づき、紫外線強度計は定期的に校正すること。なお、一般的に紫外線強度計はメーカーによって測定波長域および感度などが微妙に違うので、測定値が一致しないことが多い。特にドーム状とフラット型の受光部を持つ紫外線強度計では測定値が 3 倍程度異なる場合があるので注意する。

(2) ミューラー・ヒントン・ブイヨン培地 (MHB 培地) ¹

肉抽出液	300.0 g
カザミノ酸	17.5 g
可溶性デンプン	1.5 g
精製水	1,000 ml

pH 7.3±0.1

4. 試験方法

4.1 試験菌の培養

試験菌を NA 培地に移植し、35～37℃で 24 時間培養する。この培養菌を MHB 培地に一白金耳量移植し、35～37℃で 16～20 時間培養する。

4.2 接種用菌液の調製

MHB 培地²で培養液を希釈し、菌数が $1.0\sim 5.0\times 10^4$ /ml となるように調製する。

4.3 試験用培地の調製

滅菌した L 字形試験管に滅菌した MHB 培地 10ml を分注する³。試料⁴をこの培地に $100\mu\text{g/ml}$ を基準として順次 2 倍量または $1/2$ 倍量ずつ添加したものを 2 系列用意する（「明条件試験」と「暗条件試験」）⁵。試料添加後培地の pH を測定し、試料添加前の pH と比べて ± 0.5 の範囲に収まっていなければ pH 調整を行う。これとは別に試料無添加の試験用培地を 2 つ（「明条件対照」と「暗条件対照」）用意する。このように調製した培地に接種菌液⁶ 0.1ml を接種する。

1 日本化学療法学会の寒天平板希釈法ではミューラー・ヒントン寒天培地が用いられている。MHB 培地は栄研化学（寒天培地のみ）、DIFCO、BBL、Merck 製などがある。

2 希釈に用いた MHB 培地は日本化学療法学会標準法を準用した。接種用菌液の菌数については、同標準法と同程度の接種菌数となるように設定した。

3 L 字形試験管は乾熱滅菌（160～180℃で 120 分以上）、MHB 培地は高圧蒸気滅菌（121℃で 15 分間）、シリコ栓は適切な方法（高圧蒸気滅菌後、乾燥等）で滅菌して試験に供する。

4 培地に直接試料を入れるので、試料由来の微生物が試験結果に影響を及ぼすことが考えられ、試料は無菌であることが望ましい。そのため滅菌が可能なものはあらかじめ試料を滅菌（滅菌方法としては乾熱滅菌以外に、高圧蒸気滅菌、ガス滅菌などがある。）しておくことが望ましい。

① 高温加熱が可能な試料

試料を 160～180℃で 120 分以上加熱して試料の滅菌および乾燥を行う。乾燥後はシリカゲルを入れたデシケータ中で放冷させる。

② 高温加熱が不可能な試料

試料を適当な方法で滅菌後、試料が変質しない温度範囲および時間内で乾燥させる。これをシリカゲルを入れたデシケータ中で放冷させる。この場合は乾燥および滅菌条件を明記する。加熱温度または時間が不十分であると *Bacillus* 属の孢子が生残することがあるので注意する。

5 規格値が $800\mu\text{g/ml}$ であることから、3,200、1,600、800、400、200、100、50、 $25\mu\text{g/ml}$ で試験してもよい。

6 日本化学療法学会標準法と同程度の菌数とするため接種菌液を 0.1ml とした。

4.4 試験操作

試料が均一に混合されるように振とうし（振とう数 100～200 rpm、水平および上下振とうの場合は振幅 40～60mm、モノド振とうの場合は振幅 0～24 度）、「明条件試験」及び「明条件対照」試験用培地では紫外線照射¹しながら、「暗条件試験」及び「暗条件対照」試験用培地では遮光して、35～37℃で 24 時間振とう培養する。

なお、「明条件対照区」試験用培地は最も紫外線強度の強い位置（ブラックライト蛍光灯ランプの中央付近）で培養する。

4.5 試験成立条件

下記の試験成立条件をすべて満たす時、その試験は有効と見なす。

- (1) 培養後、肉眼観察²により「暗条件対照」試験培地で試験菌の発育³が認められること。
- (2) 培養後、肉眼観察により「明条件対照」試験培地で試験菌の発育が認められること。

4.6 判定⁴

培養後、肉眼観察により試験菌の発育の有無を調べ、発育が認められない「明条件試験」試験用培地及び「暗条件試験」試験用培地の最低濃度をそれぞれ「明条件」最小発育阻止濃度及び「暗条件」最小発育阻止濃度とする。

以上

本書の一部あるいは全部を無断で複写複製することは、法律で認められた場合を除き、著作権の侵害になります。

抗菌製品技術協議会

¹ 振とう機に L 字形試験管を取り付けた状態での菌液上面の位置で測定し、紫外線強度をフラット型の受光部を持つ紫外線強度計で測定する場合は 0.4～1.0 mW/c m²、ドーム型の受光部を持つ紫外線強度計で測定する場合は 1.2～3.0 mW/c m²となるようにブラックライト蛍光灯ランプの位置を調整する。試験菌の種類によって紫外線強度が変わっても良い。但し、MIC 値に照射した紫外線強度を付記すること。なお、黄色ブドウ球菌に関しては上記の紫外線強度範囲の上限では「明条件対照区」で繁殖しない、すなわち、4.5 の試験成立条件（2）を満たさない場合があるので、下限近くの紫外線強度に設定した方が良い。

光源が点灯して 30 分以上経ってから、紫外線強度を測定すること。

² 肉眼観察により試験菌の増殖が確認できる菌数は少なくとも 10⁶/ml 以上である。

³ 試験菌の発育の有無は肉眼観察により判定を行う。試料の濁りにより試験菌の発育の有無が判定できない場合は次の方法により判定する。培地をリン酸緩衝生理食塩水*で 10,000 倍に希釈し、白金またはニクロム線ループ（内径 1mm）を用いて普通寒天培地に画線し、試験菌の発育の有無を調べる。

* リン酸緩衝生理食塩水:KH₂PO₄34g を精製水 500ml に溶解し、1N NaOH で pH7.2 に調整後、精製水を加えて 1,000ml とする。この 1.25ml を生理食塩水（0.85%NaCl）で 1,000ml にし、121℃で 15 分間高圧蒸気滅菌する。

⁴ 用いたブラックライト蛍光灯の種類・型式・本数、L 字形試験管の菌液上面までの距離、菌液上面の位置（蛍光灯中央部および端部）での紫外線強度、用いた紫外線強度計などについて試験結果に記載する。