

(3) 最小殺菌濃度測定法 I (2012 年度版)
最小殺菌濃度 (MBC) 測定法

1. 適用範囲

本試験法は、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定できない抗菌剤などに適用する。

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) ガラス製三角フラスコ (300ml 容)
- (2) 蓋付滅菌済合成樹脂製遠沈管² (50ml 容ポリプロピレン製遠沈管)
- (3) 蓋付滅菌済合成樹脂製チューブ (13ml 容ポリプロピレン製チューブ)
- (4) ガラス製試験管 (長さ 170~200mm、外径 18mm)
- (5) 振とう培養機 (±1℃以内の精度で運転可能な機種)
- (6) 恒温器 (±1℃以内の精度で運転可能な機種)
- (7) 合成樹脂製ピペットまたは合成樹脂製ピペッター (0.1~1.0ml まで分注可能なもの)
- (8) コンラージ棒

3.2 培地

(1) 普通ブイヨン培地 (NB 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
精製水	1,000ml

pH 7.0~7.2

(2) 普通寒天培地 (NA 培地)

NB 培地(1)に寒天を 1.5%添加したもの

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 銀の吸着を考慮して、試料または試料液と接触する容器および器具は合成樹脂製とした。本試験法の検討では、CORNING 社製の遠沈管 (No.25331CTF50)、チューブ (No.25226ST17PO) を用いた。

4. 試験方法

4.1 試験菌の培養

300ml 容三角フラスコに NB 培地 50ml を入れ滅菌後、この培地に試験菌を一白金耳移植し、35~37℃で 18 時間、振とう数 80~100rpm で振とう培養する。さらに、この培養液 0.1ml を新たな NB 培地 50ml に接種し、35~37℃で菌数¹が 10^8 / ml となるまで 2~4 時間振とう培養する。

なお、2~4 時間培養しても 660nm の吸光度が約 0.2 に達しない場合はその培養を止め、再度新たな NB 培地 (50ml) を使って培養する。

4.2 接種用菌液の調製

培養液を冷却下² (10℃以下) 2,000rpm 以上、10 分間遠心分離し、上澄み液を捨て菌体を集める。集めた菌体から培地成分を取り除くため、10℃以下に冷却した滅菌精製水³に菌体を懸濁させた後、同様に遠心分離し菌体を再び集める。これらの操作を 3 回繰り返す。

このようにして培地成分が取り除かれた菌体を最終的に、10℃以下に冷却した滅菌精製水に懸濁させ、それを適宜希釈して菌数が $2.0\sim 4.0\times 10^6$ / ml となるように調製して、接種用菌液を得る。

なお、調製した接種用菌液は速やかに冷蔵保存し、1 時間以内に使用する。この菌液の生菌数は使用時に混積平板培養法により測定する。

4.3 試験液の調製

合成樹脂製遠沈管 (50ml 容) に試料⁴64mg を量り取り、滅菌精製水 10ml を加えタッチミキサーなどで攪拌した後、超音波を 5 分間かけて十分に分散させる。

この分散液 (試料を $6,400\ \mu\text{g} / \text{ml}$ を含む) を $30\pm 1^\circ\text{C}$ で 2 時間保持⁵した後、タッチ

¹ 660nm の吸光度は約 0.2 のとき菌数は約 10^8 / ml である。

² 冷却装置がない遠心分離装置を使用する場合は、培養液をあらかじめ 5~10 分間氷冷した後、速やかに遠心分離する。

³ 精製水は局方を用いる。

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 $160\sim 180^\circ\text{C}$ 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* 属の胞子が生残することがあるので注意する。

⁵ 銀の溶出量を一定にするために希釈前に $30\pm 1^\circ\text{C}$ で 2 時間保持する。

ミキサーなどで攪拌しさらに超音波を5分間かけて得られた試料分散液1mlを、あらかじめ用意しておいた30°Cの滅菌精製水1mlを入れた合成樹脂製チューブ（13ml容）に、加えて混合することにより2倍希釈液¹を得る。

同様にして順次2倍希釈して、3,200、1,600、800、400、200、100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{g/ml}$ の試料濃度の分散液がそれぞれ1ml入った合成樹脂製チューブ（13ml容）を用意する。次に、これらにそれぞれ接種用菌液1mlを加えて試験液²を得る。

これらとは別に、試料濃度3,200 $\mu\text{g/ml}$ のブランク用試験液（接種用菌液無添加）を入れた合成樹脂製チューブ、および接種用菌液だけの試験液をいれた合成樹脂製チューブを用意する。また、比較対照として原子吸光用銀標準液を滅菌精製水で希釈した比較対照用試験液³を調製する。

4.4 試験操作

試験液を調製後、直ちに30±1°Cの恒温振とう機⁴にセットし、振とう数100rpm（水平振とう）で1時間振とう培養する。また振とう条件（振とう数、振幅）を試験結果に明記する。

培養後、コンラージ棒を用いて試験液0.1mlをNA培地平板に一樣に塗抹し、35～37°Cで48時間培養する。

なお、ブランク用試験液については、その0.1mlずつを2枚のNA培地平板にコンラージ棒を用いて一樣に塗抹し、1枚はそのまま35～37°Cで48時間培養（「ブランク1」⁵）する。残りの1枚にはさらに1,000倍希釈した接種用菌液だけの試験液0.1mlをコンラージ棒を用いて一樣に塗抹し、35～37°Cで48時間培養（「ブランク2」⁶）する。

また、接種用菌液だけの試験液については、生菌数をNA培地⁷を用いた混釈平板培養法で測定（「ブランク3」⁸）する。

¹ 希釈液の操作には、合成樹脂製のピペットあるいはピペッターを用いる（ガラス製のものは使用しない）。

² 試験液の試料濃度は、1,600、800、400、200、100、50、25、12.5、6.25、3.13 $\mu\text{g/ml}$ となる。

³ 比較対照用試験液は銀濃度で6.25、3.13、1.56、0.78、0.39、0.2、0.1、0.05、0.025、0.013 $\mu\text{g/ml}$ のものを用意する。

⁴ 試験液の温度を速やかに30±1°Cにする必要があるため恒温水槽が望ましいが、コンタミに注意する。

⁵ 「ブランク1」は試料が無菌であるか否かを確認するために行う。

⁶ 「ブランク2」は試験菌が試料の影響を受けずに生育できるか否かを確認するために行う。

⁷ 生菌数の測定には標準寒天培地、SCD寒天培地などを用いてもよい。

⁸ 「ブランク3」は試験菌が30±1°Cで1時間振とう培養した後においても、初発の菌数とほぼ変化がないことを確認するために行う。

4.5 試験成立条件

下記の試験成立条件¹をすべて満たすとき、その試験は有効と見なす。

- (1) 「ブランク 1 操作」において、ブランク用試験液を塗抹した NA 培地平板には菌の生育を認めない。
- (2) 「ブランク 2 操作」において、試験液を塗抹した NA 培地平板には 30 個以上の試験菌の集落を認める。
- (3) 「ブランク 3 操作」において、接種用菌液だけの試験液の初発の生菌数と培養後の生菌数との抗菌活性値は±30%以下²である。
- (4) 比較対照用試験液を用いて試験した銀の MBC は $0.025 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ の範囲³に収まる。

4.6 判定

培養後、菌の生育を認めない試験液の試料の最小濃度を最小殺菌濃度（MBC）とする。なお、混釈平板培養法による菌数測定において生育した試験菌の集落が 5 個以下のときは、菌の生育を認めないと判定する。

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 試験成立条件(1)と(2)を満たせば、試料は無菌で、試験菌は試料の影響を受けずに生育できたと判断される。

² この条件が満たされておれば試験菌はほぼ初発菌数を維持していると考えられるので、試験において菌の生育が認められない場合は試料の殺菌作用により試験菌が死滅したと見なすことができる。

³ 4ヶ所の実験室で比較対照用試験液を用いて銀の MBC を測定したところ $0.05 \sim 0.1 \mu\text{g/ml}$ の範囲にあったので、上下 1 段階の幅を持たせて $0.025 \sim 0.2 \mu\text{g/ml}$ とした。