

(2) 試験法Ⅱ (2016年度版)

シェーク法

1. 適用範囲

この試験法¹は、何らかの抗菌機能を付与された抗菌加工製品（以下製品とする）の抗菌力試験に適用する²。本試験法は、試験試料が特殊な形状または小物の場合など³に適した抗菌力試験方法である。ただし、抗菌加工製品の抗菌性試験方法—JIS Z 2801 法が適用できる試験試料については、原則として本試験法を用いてはならない。

2. 試験菌

2.1 試験菌株⁴

-
- 1 試験片表面積と菌液及び菌数との関係を同じにすることが重要である。そうしないと試験結果に変動が生じやすいので注意する。
 - 2 表面の一部が抗菌加工されているものは抗菌加工面積が規定量となるように試験片を調整する。
 - 3 次のような抗菌加工製品においては本試験を適用してはならない。
 - (1)本試験法で規定する試料表面積と菌液量の比が維持できない製品
 - (2)振とうすることにより、剥がれたり試験片が変化するもの
 - (3)紙、布、不織布など繊維状で厚みが無視できないもの
 - (4)本試験法を適用する特殊な形状の試験試料のうち、連続気泡のスポンジ製品など嵩高く、菌液との馴染みが均一に得られない試料について以下の条件で試験する。
 - ① 菌液への非イオン界面活性剤（Tween80）を 0.05% 添加できる。
 - ② 試料と菌液をなじませる操作として菌液接種後に試料をピペットの先や**コンラージ棒**などで数回押す。
 - ③ 試験試料の全表面積は気泡を考慮せず、表面を平滑と想定した寸法で算出する。また形状は、厚みが 3mm 以下の試料片で 2~4 個とする。

本試験実施にあたり下記の点について注意する。

- ・振とう容器の蓋が緩くなり菌液が漏れるおそれがある。その防止には蓋部分をテープシールすることが有効である。
- ・試料の清浄化の方法としてはアルコール噴霧を基本にしているが、スポンジ製品は多孔質で乾燥させにくい問題がある。清浄化にあたっては依頼者と試験者の間で協議にて適当な方法（オートクレーブ処理、乾熱殺菌、紫外線照射、EOG 殺菌など）を決め、その条件を報告書に明記すること。
- ・スポンジ製品は**水道水を用いる機会が多いことから、依頼者と試験者の間で協議のうえで、耐水性試験を水道水を用いて処理してもよい（その際は、報告書に明記すること）、多孔質で耐水試験処理後の乾燥が長時間になる場合がある。乾燥にあたっては依頼者と試験者の間で協議し適当な条件を決め、その条件（方法・温度・時間など）を報告書に明記すること。**

⁴ 試験菌は、グラム陽性菌又はグラム陰性菌の代表として各一種類を選択した。なお、SEK で

(1) *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 (ATCC 6538P)

(2) *Escherichia coli* NBRC 3972 (ATCC 8739)

2.2 試験菌の保存

菌株保存機関より入手した保存菌株を普通寒天培地¹に移植し、温度 35±1℃で 48 時間培養後 5～10℃で冷蔵保存する。保存有効期間は1ヶ月間とし、1ヶ月以内ごとに継代培養し、継代回数は5回までとする。

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及び日本薬局方に規定するものを用いる。

3.1 器具、機器及び材料

- (1) ピペット（牛乳ピペット及び10ml以上分注可能なメスピペット）
- (2) 恒温器（±1℃以内の精度で運転可能な機種）
- (3) 振とう培養機²（±1℃以内の精度で運転可能な機種）
- (4) 滅菌シャーレ（内径80mm～100mm、高さ15mm～25mm）
- (5) 滅菌コップ³（滅菌検査用コップとして市販されている内容積60mlの検査用コップ（栄研器材など）を使用する）

3.2 培地等

(1) 普通ブイヨン培地（NB 培地）

肉エキス	3.0 g
ペプトン	10.0 g
塩化ナトリウム	5.0 g
精製水	1,000 g

pH 7.0～7.2

(2) 普通寒天培地（NA 培地）

NB 培地(1)に肉エキスを 2.0g、寒天を 1.5%添加したもの

(3) 標準寒天培地（SA 培地）

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	15.0 g
精製水	1,000 g

pH 7.1±0.1

(4) エタノール（純度 99%以上）

¹ 培養は斜面培地とする。なお、培養に用いる培地の乾燥度合いにより菌の薬剤感受性が影響を受けるため、培地は調整後 24 時間以内のものを使用する。

は、*Staphylococcus aureus* 及び *Klebsiella pneumoniae* を使用している。

- 2 振とう培養機は水平方向振とう数 $150 \pm 10 \text{rpm}$ 、振幅 $30 \pm 5 \text{mm}$ 、温度調節精度 $\pm 1^\circ\text{C}$ で運転可能な機種を使用する。
- 3 滅菌コップは、コップの形状が異なると試験結果に差異が生じるので栄研器材製滅菌 60ml 検査用コップ（外径 63mm、深さ 35mm、内容積 60ml）、又は同等品を使用する。

(5)リン酸緩衝生理食塩水

KH_2PO_4 34g を精製水 500ml に溶解し、1 N NaOH で pH7.2 に調整後、精製水を加えて 1,000ml とする。この液 1.25ml を生理食塩水（0.85%NaCl）で 800 倍に希釈して 1,000ml とする。

4. 試験試料及び無加工試料

抗菌力試験で対象とする試験試料は、原則として製品そのもの¹とする。無加工試料とは抗菌加工をしていない製品のことを言う。スポンジが試料の場合、その大きさを記録して結果とあわせて報告する。

5. 試験方法

5.1 試験菌の培養²

- (1) 試験菌を NA 培地に移植し、温度 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 16～24 時間培養（前々培養）³する。
- (2) 前項 (1) で前々培養した菌を NA 培地に 1 白金耳⁴移植し、温度 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で 16～20 時間培養（前培養）する。

5.2 接種用菌液の調製

NB 培地を滅菌精製水で 500 倍に希釈し、pH を 7.0 ± 0.2 に⁵調製した「1/500 NB 培地」に、前培養した菌を均一に分散させて、菌数が $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^4$ 個/ml となるように調製したものを接種用菌液とする。

5.3 試験片の調製

- (1) 試験試料⁶を全表面積の合計⁷が $32 \pm 5 \text{ cm}^2$ となるように¹切断又は複数個用意し、原則

1 シェーク法は特殊な形状または小物の製品についても試験が可能であるので、試験試料は製品そのものを用いるものとする。

2 培養を液体培養で行なうと、接種用菌液に液体培地成分が混入し、試験結果に影響を及ぼす可能性があるため前培養は NA 培地とする。なお、培養に用いる培地の乾燥度合により菌の薬剤感受性が影響を受けるため、培地は調製後の直ちに使用しない場合、**5～10℃の温度で保存する。調製後、1ヶ月以上過ぎた培地は用いてはならない。**

3 前々培養、及び前培養は斜面培地とする。

4 前培養に使用する菌に限り、前々培養した後 5～10℃で冷蔵保存 3 日以内までのものを使用してよい。

5 1/500 NB 培地は、塩酸または水酸化ナトリウムで pH を 7.0 ± 0.2 に調製した後、滅菌してから使用する。pH が外れる場合は、(3)2.6 のリン酸緩衝液のみを用いて希釈してもよい。

6 吸水性がある試験試料については原則として適用してはならない。

7 形状が複雑で表面積の算出が困難な試験片の場合でも、何らかの方法で表面積を求め菌液及び菌数との関係を同じにする。ここで言う試験片の表面積とは、試験試料のもともとの表面（固

としてその全面²についてエタノール³を染み込ませた⁴局方ガーゼまたは脱脂綿で軽く2~3回拭いた後、乾燥したもの（前処理）を3個用意し、これらを抗菌加工試験片とする。

- (2) 無加工試料を表面積の合計が $32 \pm 5 \text{ cm}^2$ となるように切断または複数個用意し、抗菌加工試験片と同様に前処理したものを3個用意し、これらを無加工試験片とする。

5.4 試験操作

- (1) 抗菌加工試験片（3個）及び無加工試験片（3個）を、それぞれ滅菌コップに入れ、そこに接種用菌液を表面積が 32 cm^2 に対して 10 ml ($1.0 \sim 5.0 \times 10^5$ 個の菌を含む) の比率で接種して蓋をした後、温度 $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ の恒温振とう機に入れ、滅菌コップが移動しないように振とう台に固定して、滅菌コップを 24 ± 1 時間振とうする。振とう条件は、振幅 30 mm 、水平方向振とう数 150 rpm とする。⁵
- (2) 対照区用に3個の滅菌コップを用意し、それぞれに接種用菌液 10 ml ($1.0 \sim 5.0 \times 10^5$ 個の菌を含む) を接種して蓋をした後、温度 $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ の恒温振とう機に入れ、(1)と同条件で浸透する。

5.5 生菌数の測定

- (1) 3個の滅菌コップを用意し、それぞれに接種用菌液 10 ml を接種し、直ちにこの液 1 ml 中の生菌数を、SA培地を使用した寒天平板培養法⁶（温度 $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ で $40 \sim 48$ 時間培

有表面という) のことであり、試験片を作るために切断又はスライスすることにより新しくできた表面（新表面という）は除外する。新表面は試験試料のもともとの表面でなく、固有表面と抗菌力において相違する可能性があるため、試験片の新表面は固有表面 ($32 \pm 5 \text{ cm}^2$) の10%以下 ($3 \pm 0.5 \text{ cm}^2$) とする。新表面も抗菌面であれば除外しない。

- 1 フィルム状の試験試料については、前項の制限の範囲で細かく裁断したものを試験片としてもよい。又、紙、布、不織布など吸水性があっても、厚さが無視できるものはフィルムの場合と同様に扱ってよい。
- 2 試験片表面には、離型剤、洗浄剤、潤滑剤、手の脂などの汚れが付着していることがある。これらのある程度除去しないと試験結果が安定しないことがあるので、原則として試験片全面の汚れを拭き取ってから試験するものとする。
- 3 拭き取り液としては、滅菌水では油分が取れない可能性もあり、油分の除去もある程度期待できるエタノール（純度99%以上）を用いることとした。なお、イソプロピルアルコール、アセトン、トルエンなどは、試験片表面を溶かすことがあるので用いてはならない。
- 4 試験片をエタノールに浸漬、または試験片に噴霧してはならない。あくまで試験片に付着している油分など汚れのある程度除去するのが目的であり、短時間に処置するとともに乾燥を十分に行なう。
- 5 振とう条件は機械により異なるので、振幅 $30 \pm 5 \text{ mm}$ 、水平方向振とう数 $150 \pm 10 \text{ rpm}$ を許容範囲とする。ただし、振とうすることにより崩れる試料は、振幅、水平振とう数を小さくしてもかまわない。試験結果に、振幅、水平振とう数を明記する。
- 6 生菌数測定は、「食品、添加物等の規格基準（昭和34年12月28日厚生省告示第370号）」

養)により測定し、3個の生菌数(「接種直後対照区」)の対数値の平均値¹を求め、その値をAとする。なお、生菌数測定時の希釈は、滅菌リン酸緩衝生理食塩水を用いて行なうものとする。

- (2) 保存24時間後の対照区用滅菌コップ(3個)について、それぞれ滅菌コップの液1mlの中の生菌数を、SA培地を使用した寒天平板培養法(温度 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で40~48時間培養)により測定し、3個の生菌数(「対照区」)の対数値の平均値を求め、その値をBとする。
- (3) 保存24時間後の無加工試験片(3個)について、それぞれ滅菌コップの液1mlの中の生菌数を、SA培地を使用した寒天平板培養法(温度 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で40~48時間培養)により測定し、3個の生菌数(「無加工試験区」)の対数値の平均値を求め、その値をCとする。
- (4) 保存24時間後の抗菌加工試験片(3個)について、それぞれ滅菌コップの液1mlの中の生菌数を、SA培地を使用した寒天平板培養法(温度 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で40~48時間培養)により測定し、3個の生菌数(「抗菌加工試験区」)の対数値の平均値を求め、その値をDとする。

6. 試験成立条件

下記4項目の試験成立条件をすべて満たすとき、その試験は有効と見なす。

- (1) 「接種直後対照区」および「対照区」の各3個の対数値の生菌数について、次式による計算を行ない、その計算値²が0.2以下であること。

$$(\text{最高対数値} - \text{最低対数値}) / (\text{対数平均値}) \leq 0.2$$

- (2) A(「接種直後対照区」の対数値の平均値)に対するB(「対照区」の対数値の平均値)の減少³が1以下であること。

$$A - B \leq 1$$

- (3) 「接種直後対照区」の各3個の生菌数について、それらの平均値が $1.0 \sim 5.0 \times 10^5$ 個/カップの範囲にあること。
- (4) 「無加工試験区」の各3個の生菌数が⁴すべて 1.0×10^3 個/カップ以上であること。

に記載の「細菌数(生菌数)の測定方法」などを参考に行なう。

¹ 3個の生菌数について、1個ずつ対数値にしてから平均し、3桁目を四捨五入して2桁で表示する。なお、生菌数が10未満の場合、表示は「<10」とし、対数値の計算は「10」で実施する。ただし、全ての測定値が「<10」のときの対数値の平均値は「<1」と表示する。

² 計算値は小数点2桁目を切り上げて有効数字1桁に丸めて表示する。

³ 減少は小数点1桁目を切り上げて表示するものとする。

⁴ すべてが 1.0×10^3 個/カップ以上とならない場合は無加工試料自体に抗菌力があることになり、試験が成立しない。その場合には、次のような試験方法の変更あるいは試験片の前処理などを行ってから再試験を行う。

- ① 接種用菌液の栄養分を多くし、無加工試料の抗菌力をキャンセルする方法

7. 試験結果の表示

次式により「抗菌活性値」を計算¹し、小数点以下2桁目を切捨て小数点以下1桁に丸めて表示する。

$$(C-A) - (D-A) = (C-D)$$

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

ABS樹脂、塩化ビニル樹脂などのように比較的抗菌力が弱い場合は、接種用菌液の栄養分を標準の1/500NBより多く、例えば1/100NB、1/50NB、1/10NBなどとするにより無加工試料の抗菌力をキャンセルできることがある。

なお、この場合には試験方法に接種用菌液の栄養分を明記する。

② 無加工試料に含まれる抗菌物質を乾燥により揮散させる方法

メラミン樹脂、FRP樹脂、アミノ系塗料、メラミン系塗料などのように遊離のホルマリンを含むものは、無加工試料自体が強い抗菌力を示すものが多い。この場合には試料を乾燥させることによりホルマリンを揮散させ、抗菌力をなくすことができる。最適な乾燥温度と時間は、試料の材質などにより異なるので、実際に乾燥温度と時間を変えて前処理を行った無加工試料の抗菌力試験結果から判断する。

なお、この場合には試験方法に前処理条件を明記する。

¹ C（「無加工試験区」の対数値の平均値）あるいはC（「抗菌加工試験区」の対数値の平均値）が「<1」の場合は、「1」として計算するものとする。

改訂：平成28年9月13日