

4. 防カビ剤の防カビ効力評価試験法 (2012 年度版)

最小発育阻止濃度測定法

寒天平板希釈法によるカビに対するMIC測定法

1. 適用範囲

本試験方法は、防カビ剤に適用する。

2. 試験菌株¹

- (1) *Aspergillus niger* NBRC105649
- (2) *Penicillium pinophilum* NBRC6345

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) ガラス製試験管(長さ 170~200mm、外径 18mm)
- (2) 滅菌シャーレ(内径 80~100mm、高さ 15~25mm)
- (3) 恒温器(±1℃以内の精度で運転可能な機種)
- (4) ピペット(牛乳ピペット、1ml および 10ml 以上分注可能なメスピペットあるいは自動ピペッター)
- (5) 天秤(化学天秤)
- (6) オートクレーブ
- (7) 顕微鏡(光学顕微鏡)
- (8) pH メーター
- (9) 白金耳

脚注¹

試験菌は JISZ2911 等を参考にカビ抵抗性試験によく使用される *Penicillium pinophilum* と、自然耐性を持つといわれる *Aspergillus niger* を選択した。

記載した 2 菌種は、いずれも中湿性のカビであるため、用途によって *Eurotium tonophilum*, *Aspergillus penicillioides* などの好乾性のカビや、*Aurobasidium pullulans* などの好湿性のカビや、*Chaetomium globosum*, *Trichoderma virens* などのセルロース分解菌なども併せて使用するのが望ましい。

3.2 培地

(1) ポテトデキストロース寒天培地 (PDA 培地)

バレイショ抽出液	200g
ブドウ糖	20g
寒天	15g
精製水	1000ml

pH 5.6±0.2

(2) ぶどう糖ペプトン (GP 培地)

ぶどう糖	20.0g
酵母エキス	2.0g
硫酸マグネシウム	0.5g
ペプトン	5.0g
リン酸二水素カリウム	1.0g
精製水	1,000ml

pH 5.7±0.1

(3) スルホコハク酸ジオクチルナトリウム溶液¹

スルホコハク酸ジオクチルナトリウム溶液	0.05g
精製水	1,000ml

4. 試験方法

4.1 試験菌の培養

試験菌を PDA 培地に移植し、25±1℃で 7～14 日間培養する。

4.2 接種用菌液の調製

培養した試験菌の分生子を 0.005%スルホコハク酸ジオクチルナトリウム溶液に懸濁させ、子実体・菌糸体を除去した後、GP 培地で希釈し、分生子が $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ / ml となるように調製する²。

¹ JIS Z 2911 を参考に潤滑剤として 0.005%スルホコハク酸ジオクチルナトリウム溶液を選択した。

² 日本化学療法学会寒天平板希釈法では試験菌が細菌で、菌濃度は 10^6 / ml となっている。しかし本試験方法では、試験菌はかびであり分生子の大きさが細菌の大きさに比べて大きいため、1桁低めの $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ / ml とした。

4.3 試験液の調製

試料を精製水、エタノールあるいはDMSO等の溶媒に溶解、乳化、懸濁・希釈し、 $1000\ \mu\text{g/ml}$ を基準として順次2倍または1/2希釈液を調製し試験溶液とする。

4.4 感受性測定用平板の調製

滅菌後 $50\sim 60^\circ\text{C}$ に冷却した「1.5%寒天を加えたGP培地」に各試験溶液を培地の1/9量加え、十分に混合後、シャーレに分注・固化させて感受性測定用平板とする¹。

4.5 試験操作

接種用菌液を感受性測定用平板にニクロム線ループ(内径1mm)で1cm程度画線塗沫し²、 $25^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ 、7日間培養する。

4.6 判定

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試料の最低濃度を最小発育阻止濃度とする。

尚、微小集落でも2個以上³の連続集落が発育しているときは「発育」とみなす。

以上

¹ 試験液無添加のものも調製して対照試験を行うことが望ましい。

² 日本化学療法学会寒天平板希釈法では試験菌は2cm程度の画線塗沫となっている。しかし本試験方法では試験菌はかびであり、真菌(かび、酵母)の場合1cm程度の画線塗沫が一般的に行われている様なのでこれを採用した。

³ 日本化学療法学会寒天平板希釈法では5個以上の集落が発育しているとき「発育」としている。しかし本試験方法では試験菌はかびであり、かびの場合は2個以上の連続集落が発育しているとき「発育」とみなすことが一般的に行われている様なのでこれを採用した。

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