

2. 抗菌加工製品の抗菌力評価試験法

(1) 試験法 I (1998 年度版)

フィルム密着法¹ 廃棄

1. 適用範囲

本試験法は、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。

ただし、本試験法²は、試験試料に接種した菌液が偏ったり、こぼれたりすることがないような平滑な表面を持ち、被覆フィルムの密着性が良い板、ブロック、シート、フィルムなどの抗菌力試験に適した方法である。本試験法が適用できる試験試料の表面の材質としては、プラスチック、ゴム、塗料、セラミックスなど親水性、撥水性は問わないが、吸水性のほとんど無いもの³が望ましい。

2. 試験菌

2.1 試験菌株⁴

(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⁵に移植し、温度 35～37℃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する。なお、継代回数は 10 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、機器および材料

(1) 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）

(2) 恒温器（± 1℃以内の精度で運転可能な機種）

(3) デシケーター

¹ JNLA(試験所認定制度)に伴い平成 17 年 3 月末までに本試験法によるデータで登録されたものが全て JIS Z 2801 法で再試験・登録されるまでの期間、暫定的に本試験法を記載する。

² 本試験法は、試験片に接種した菌液の上に被覆フィルムを乗せるという簡単な操作で撥水性の材質でも試験片に菌液を均一にかつ確実に接触させることができ、ほとんどの材質に適用できる応用範囲の広い試験方法である。しかし、試験片の表面が凹凸など被覆フィルムを密着させにくいものの場合には適用できない。

³ 被覆フィルムを被せなくても菌液が自然に広がってしまう試験試料、および空気（酸素）がなよい。くると抗菌力の発現が妨げられる試験試料については、フィルムを被せないで試験を行ってもよい。

⁴ 試験菌は、グラム陽性菌及びグラム陰性菌から各 1 種類を選択した。なお、JIS L 1902 では、*Staphylococcus aureus* および *Klebsiella pneumoniae* を使用している。

⁵ 培養は斜面培地を用いる。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製後、原則として 24 時間以内のものを使用する。

- (4)滅菌シャーレ（内径 80 mm～100 mm、高さ 15 mm～25 mmのもの）
 (5)被覆フィルム¹（微生物検査用として市販されている「ストマッカー400 型用ポリ袋（オルガノ：180 mm×300 mm×0.09 mm）」などを無菌的に 40±2 mm角の大きさに切って作る）²
 (6)下敷きフィルム（被覆フィルムを 50 mm角以上の大きさに切って作る）

3.2 培地等

(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	1,000 ml

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

(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 ml

pH 7.1±0.1

(4) SCDLP 培地

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
リン酸一水素カリウム	2.5 g
グルコース	2.5 g
レシチン	1.0 g
ポリソルベート 80	7.0 g
精製水	1,000 ml

pH 6.8～7.2

(5)エタノール（純度 99%以上）

(6) リン酸緩衝生理食塩水

KH₂PO₄ 34g 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。

¹ 被覆フィルムについては、常に同じ品質のものが得られ滅菌する必要もないことから「ストマッカー用ポリ袋」を無菌的に切って、袋の内面を試験試料に密着させて使用すると便利である。

² 凹凸のある試験試料で、被覆フィルムでは密着しにくい場合には、市販の薄手のポリエチレンフィルムを使用してもよい。

4. 試験試料および無加工試料

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とする。ただし、製品と形状が違っていても同じ加工方法で作られ、抗菌力も同等の結果になると判断されるときは、それを試験試料¹としてもよい。

無加工試料とは抗菌加工をしていない製品のことを言い、試験試料と同じ材料および加工方法で作らなければならない。

5. 試験方法

5.1 試験菌の培養²

- (1) 試験菌を NA 培地³に移植し、温度 35～37℃で 16～24 時間培養（前々培養）する。
- (2) 前項 (1)で前々培養した菌⁴を NA 培地に 1 白金耳移植し、温度 35～37℃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⁵で 500 倍に希釈し pH を 7.0±0.2 に調製⁶した「1/500 NB 培地」⁷に、前培養した菌を均一に分散させたものを接種用菌液とする。

¹ 製品形状が特殊など本試験法の適用が困難な場合は、「抗菌加工製品の抗菌力試験法Ⅱ（シェーク法）」が制定されるまでの暫定処置として、抗菌力についてほぼ同等の結果になると考えられる別の加工方法で作られたものを試験試料としてもよい。ただし、実際の製品以外を試験試料とした場合は、試験結果にその旨を記載する。

² 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 24 時間以内のものを使用することが望ましい。

³ 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 NA 培地を用いる。なお、前々培養、およ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もよい。

⁵ pH 調整後の滅菌により pH が変動し範囲から外れる場合は、リン酸緩衝液（KH₂PO₄ 34g 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 とし、この液 1.25ml を精製水で 800 倍に希釈して 1,000ml としたもの。）を用いて希釈してもよい。

⁶ 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。

⁷ *S.aureus* の場合、菌の分散液に 1/500 NB 培地より希釈倍率が大きいものを用いると無加工試験片を用いた保存 24 時間後の生菌数が安定せず、著しく減少することがあるので、1/500 NB 培地を用いることとした。なお、菌の分散液に 1/500 NB 培地より希釈倍率が小さいものを用いても良い。ただし、その場合には試験方法に希釈倍率を記載する。

5.3 試験片¹の調製

- (1) 試験試料を標準として 50±2 mm角（厚さ 10 mm以内²）の正方形³に切断し、原則としてその全面についてエタノール⁴を染み込ませた局方ガーゼまたは脱脂綿で軽く 2～3 回拭いた⁵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⁶を試験試料と同じ大きさに切断し、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）および無加工試験片（3 個）を、それぞれ滅菌シャーレに入れ、その試験面に接種用菌液⁷0.4ml（1.0～5.0×10⁵の菌を含む）を接種し、その上に被覆フィルム⁸を被せて蓋をした後、温度 35±1℃⁹、相対湿度 90%以上の条件下で保存¹⁰する。

¹ 試験片が変質したり抗菌力などに影響がないと判断される場合は、試験片をエタノールで清拭して油分などの汚れを除去した後、乾熱滅菌、高圧蒸気滅菌、ガス滅菌滅菌などの滅菌処理を行ってもよい。なお、陶磁器のような多孔質材料とのコンポジットやセメントのような多孔質材料のものについては、Bacillus 属の孢子などが生残していることがあるので、試験片をエタノールで清拭して油分などの汚れを除去した後、乾熱滅菌（160～180℃で 120 分以上行う）を行う。陶磁器、ホウロウ、ガラスなどのセラミックス、金属、セメントなどについても同様な処理を行うことが望ましい。

² 試験片の厚さは、シャーレに支障なく入る厚さとして 10 mm以内とする。10 mmを越える場合は 10 mm以内にスライスするが、試験試料のもともとの面を必ず残してスライスしその残した面で試験する。

³ 試験片の大きさは、面積が同じであれば長方形でも差し支えない。ただし、1/4 の面積より小さくしてはならない。なお、試験試料の大きさなどから標準の試験片の面積が取れない場合は、その試験片の大きさを記載する。

⁴ 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。これらはある程度除去しないと試験結果が安定しないことがあり、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。拭き取り液としては、滅菌水では油分が取れない場合もあり、油分の除去が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。

⁵ 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を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。

⁶ 無加工試料とは、抗菌加工をしていない製品のことをいう。

⁷ 試験片の大きさが標準でない場合の接種菌液の量は、被覆フィルムの面積比で案分する。ただし、試験片当りに接種する菌数は、面積が小さくなくても接種菌液量が少なくなっても、標準の試験片の場合と同様に 1.0～5.0×10⁵とする。なお、このような規定に基づく菌液量を接種しても、陶磁器、タイル、ホーロー、ガラスなどの濡れ性が極めて良い試験片では、わずかな傾斜で被覆フィルムが移動したり、被覆フィルムの端から菌液が漏れ出すといった事故が起きやすく、このような問題点を解決するために、接種菌液の量を規定量の 1/4 を限度に減じてよい。

⁸ 試験片の大きさが標準でない場合の被覆フィルムの大きさは、外周からそれぞれ 2.5～5.0 mm控えた大きさとする。

⁹ 試験片の保存温度を冷却機能がない恒温器の使用も考慮に入れ、夏場での温度制御が可能な 35±1℃としたが、製品の使用条件に即した保存温度で試験を行ってもよい。その場合には試験方法に保存温度を記載する。

¹⁰ 試験片を入れたシャーレの保存は、飽和リン酸二水素アンモニウム水溶液を内容量の 5%以上入れたデシケータに入れ、温度 35±1℃にて保存するか、温度 35±1℃、相対湿度 90%以上の条件となることを前もって確認した他の方法でもよい。なお、恒温恒湿器の使用は、器内の風で

- (2) 対照区用に 3 個の滅菌シャーレを用意し、それぞれに置いた下敷きフィルム¹の上に接種用菌液 0.4ml を接種し、その上に被覆フィルムを被せて蓋をした後、温度 35±1℃、相対湿度 90%以上の条件下で保存する。

5.5 生菌数の測定

- (1) 3 個の滅菌シャーレを用意し、それぞれ各試験片に接種したのと同量の接種用菌液を入れ、その上に被覆フィルムを被せた後、直ちにそれぞれ被覆フィルムに付着している菌を SCDLP 培地 (10ml)を用いてシャーレ中に十分に洗い出し²、この洗い出した液 1ml 中の生菌数を、SA 培地を使用した寒天平板培養法³(温度 35±1℃で 40~48 時間培養)により測定し、3 個の生菌数(「接種直後対照区」)の平均値⁴を求め、それを 10 倍した値を 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シャーレ (3 個)について、それぞれ前項の滅菌シャーレと同様にして測定した 3 個の生菌数(「対照区」)の平均値を求め、それを 10 倍した値を B とする。
- (3) 保存 24 時間後の無加工試験片 (3 個)について、それぞれ試験片および被覆フィルムに付着している菌を SCDLP 培地 (10ml)を用いて滅菌シャーレ中に十分に洗い出し、この洗い出した液 1ml 中の生菌数を、SA 培地を使用した寒天平板培養法(温度 35±1℃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」)の平均値を求め、それを 10 倍した値を 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、それぞれ無加工試験片と同様にして測定した 3 個の生菌数(「抗菌加工試験区」)の平均値を求め、それを 10 倍した値を 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 個の生菌数について、次式による計算を行ない、その計算値⁵が 0.2 以下であること。

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

菌液が乾燥したり、また内容積が大きいと所定の湿度に達する時間が長くなるなど問題があるので好ましくない。

- ¹ 下敷きフィルムを用いる理由は、シャーレに直接菌液を接種した場合より菌の洗い出し収率が良くなることによる。
- ² 試験片および被覆フィルムに付着している菌の洗い出しは次のように行なう。まず、滅菌したピンセットで被覆フィルムを試験片から剥がし取り、滅菌ピペットまたは滅菌スポイトを使用してそれらに洗い出し液 (SCDLP 培地 10ml) をかける。次にシャーレに溜まった液を、滅菌ピペットなどで吸い取り、再び掛ける操作を 3 回繰り返して洗い出した後、その液を十分に混合し、速やかに生菌数測定に供する。なお、シャーレ内で洗い出しを行うのではなくて、試験片を別の容器に移して洗い出してもよい。
- ³ 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)」に記載の「細菌数 (生菌数) の測定方法」などを参考にして行なう。
- ⁴ 3 個の生菌数の平均値は、有効数字 3 桁目を四捨五入した各測定値を算術平均し、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、平均値の計算は「10」で計算する。ただし、全ての測定値が「<10」のときの平均値は「<10」と表示する。
- ⁵ 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。

(2) A (「接種直後対照区」の平均値) に対する B (「対照区」の平均値) の減少率¹が 90% 以下であること。

$$\{(A-B) / A\} \times 100 \leq 90$$

(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 $1.0 \sim 5.0 \times 10^5$ / 枚の範囲にあること。

(4) 「無加工試験区」の各 3 個の生菌数がすべて 1.0×10^3 / 枚以上²であること。

7. 試験結果の表示

次式により「抗菌活性値」を計算³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。

$$\{ \log (C/A) - \log (D/A) \} = \{ \log (C/D) \}$$

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

¹ 減少率は有効数字 3 桁目を切り上げて有効数字 2 桁に丸めて表示するものとする。

² すべてが 1.0×10^3 / 枚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

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 などとすること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記載する。

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記載する。

③ 吸水性の試料にリン酸緩衝生理食塩水を含ませて、乾燥による菌の死滅を防ぐ方法

フローリングの塗装のように菌液を吸収しやすい試料は乾燥によって菌が死滅することが多い。このような場合には、リン酸緩衝生理食塩水を入れたシャーレに滅菌した試験片を入れ、約 12 時間放置した後、試料表面の水分を拭き取って試験に供すると良い。ただし、フローリング塗装の場合は基材である合板の接着剤に遊離のホルマリンが含まれるため、前出のようなホルマリン対策を行わないと良い結果が得られないことが多い。

なお、この場合には試験方法に前処理条件を記載する。

³ C (「無加工試験区」の平均値) あるいは C (「抗菌加工試験区」の平均値) が「<10」の場合は、「10」として計算するものとする。