

4. 防カビ剤の防カビ効力評価試験法 (2018 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* NBRC 105649
- (2) *Penicillium pinophilum* NBRC 6345

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 170~200 mm、外径 18 mm)
- (2) 滅菌シャーレ (内径 80~100 mm、高さ 15~25 mm)
- (3) 恒温器 (±1 °C 以内の精度で運転可能な機種)
- (4) ピペット (牛乳ピペット、1 ml および 10 ml 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 JIS Z 2911 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	200 g
ブドウ糖	20 g
寒天	15 g
精製水	1 000 ml
	pH 5.6±0.2

(2) ぶどう糖ペプトン (GP 培地)

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

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 °C 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、試験菌はカビであり分生子の大きさが細菌の大きさに比べて大きいいため、1 桁低めの $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ /ml とした。

4.3 試験溶液の調製

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、800 µg/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。尚、試験溶液を段階希釈で調製する際は同一の溶媒を用いる。

4.4 感受性測定用平板および対照試験用平板の調製

滅菌後50～60℃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。同様の手順で、試験溶液無添加および試験溶液の調製に用いた溶媒のみを同量添加した平板を調製し、この2種類の平板を対照試験用平板とする。

4.5 試験操作

接種用菌液を感受性測定用平板および2種類の対照試験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℃±1℃、7日間培養する。

4.6 判定

培養後、感受性測定用平板を肉眼観察して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、感受性測定用平板では微小集落でも2個以上²の連続集落が発育しているときは「発育」とみなす。

また、培養後の2種類の対照試験用平板を肉眼観察して十分にカビの集落が発育していることを確認する。発育不良の場合(集落自体が発育しない、微小集落の発育等)、溶媒の種類を変更するか試験溶液の試料濃度を変更し、培地への添加量を溶媒の特性に応じて減じて再試験する³。

以上

-
- 1 日本化学療法学会寒天平板希釈法では試験菌は2 cm 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カビであり、真菌（カビ、酵母）の場合1 cm 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。
 - 2 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カビであり、カビの場合は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。
 - 3 エタノールや DMSO 等の有機溶媒を規定の添加量（培地の 1/9 量）で使用した場合、カビの発育が著しく阻害されることがある。一例として、エタノールは 1/99 量以下、DMSO は 1/19 量以下の添加量で十分な集落の発育が確認されている。

改訂：平成 30 年 12 月 11 日

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