

日羽協試験方法	一般生菌数測定試験	JDFA-SH001 2019/07
---------	-----------	-----------------------

## 序文

本試験方法は、羽毛製品に用いる羽毛原料を対象とし、羽毛中に存在する生菌数を測定する試験方法について規定する。

### 1. 引用規格

次に掲げる規格は、この規格に引用されることによって、この規格の規定の一部を構成する。これらの引用規格は、その最新版（追補を含む。）を適用する。

JIS K 0950	プラスチック製滅菌シャーレ
JIS K 0970	ピストン式ピペット
JIS K 8150	塩化ナトリウム（試薬）
JIS K 3800	バイオハザード対策用クラスⅡキャビネット
JIS L 1902	繊維製品の抗菌試験方法及び抗菌効果
JIS R 3505	ガラス製体積計
JIS Z 8401	数値の丸め方
JIS Z 8802	pH 測定方法

### 2. 試験上の注意

試験の担当者は、微生物学的技術の訓練を受け、十分な知識と経験を持って実施する必要がある。

### 3. 器具及び装置

- (1) 培養器 37 °C±2 °Cの温度を維持できるもの。
- (2) ウォーターバス 45 °C～48 °Cの範囲で±1 °Cで調整できるもの
- (3) ボルテックスミキサ 微生物試験用のもの。
- (4) クリーンベンチ又は安全キャビネット 微生物試験対応のもので、安全キャビネットは JIS K 3800 に規定するもの。
- (5) 冷蔵庫 5 °C～10 °Cの温度を維持できるもの。
- (6) 天びん（秤） 0.01 g 単位を測定できるもの。
- (7) ピペット この規格で測定する容量に適切なもので、先端がガラス製又はプラスチック製であり、かつ、JIS K 0970 又は JIS R 3505 のクラス A に適合したもの若しくは同程度の精度をもつもの。
- (8) バイアル瓶 容量 30 mL のねじ蓋式のガラス瓶で、ポリテトラフルオロエチレン又はシリコンのパッキンを使用し、ポリプロピレン、ポリカーボネート又は他の適切な材料で作られたキャップを使用したもの。
- (9) シャーレ JIS K 0950 に規定する 90A 号
- (10) ピンセット 滅菌できる材料で作られたもの。
- (11) オートクレーブ 温度 121 °C±2 °C（圧力 103 kPa±5 kPa 相当）に保てるもの。
- (12) 乾熱滅菌器 温度を 160 °C～180 °Cに保てるもの。
- (13) pH 計 JIS Z 8802 に規定する pH 計。
- (14) 試験管 滅菌可能なガラス製試験管。
- (15) アルミニウムホイール アルミニウム製の箔で適切な大きさのもの。

### 4. 器具等の滅菌方法

ガラス製及びプラスチック製器具は、アルカリ又は中性洗剤で十分に洗浄し、水で十分にすすいで乾燥してから滅菌したものを用いる。なお、無菌生産製品を用いる場合は、滅菌をする必要はない。

#### (1) 乾熱滅菌

滅菌対象物を乾熱殺菌器中に入れ、180 °Cで 30 分間、170 °Cで 60 分、または 160 °C

で2時間加熱し、滅菌する。

(2) 高压蒸気滅菌

滅菌対象物をオートクレーブ中に入れ、設定温度 121 °C及び設定圧力 103kPa で15分間加熱し、滅菌する。

5. 試薬及び培地

培地などは次に示す組成のものを用いる。また、同一の組成のものであれば、市販品を用いることができる。

調製後、直ちに使用しない場合、保存中に水分蒸発による液量変化がないよう、十分に密栓し、5 °C～10 °Cの温度で保存し、1か月以上過ぎたものは使用してはならない。

(1) 水

微生物学用培地の作製に使用できる分析用品質のもので、新規に蒸留され、イオン交換したもので、限外ろ過したものと及び/又は逆浸透膜でろ過した、あらゆる毒性物質及び細菌成長阻害物質を含んでいないもの。

(2) 生理食塩水

次の成分をよくかくはんし、その後、オートクレーブによって滅菌したもの。

－ 塩化ナトリウム 8.5 g

－ 水 1000 mL

(3) SCDLP 培地

次の成分をよくかくはんし、pHを 7.2±0.2 に調整した後、オートクレーブによって滅菌したもの。

－ 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

－ リン酸水素二カリウム 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

－ 水 1000 mL

(4) 標準寒天培地

次の成分をよくかくはんし、pHを 7.2±0.2 に調整した後、オートクレーブによって滅菌したもの。

－ 脱水酵母エキス 2.5 g

－ カゼイン製トリプトン 5.0 g

－ グルコース 1.0 g

－ 寒天 12.0 g～15.0 g<sup>1)</sup>

－ 水 1000 mL

注<sup>1)</sup>必要質量は、製品のゲル強度による。

6. 試験手順

6-1. バイアル瓶の滅菌

バイアル瓶の口をそれぞれアルミニウムホイルで覆った状態で乾熱滅菌し、滅菌後は常温になるまで冷却する。バイアル瓶のキャップはアルミニウムホイルで包み、オートクレーブに入れ、高压蒸気滅菌する。オートクレーブから取り出した後は、乾燥させる。

6-2. 試験試料の採取

クリーンベンチ又は安全キャビネット内に天秤を設置し、エアーを止めた状態で滅菌済みのピンセットを用いて試験試料 0.10 g±0.01 g をバイアル瓶内に採取する。これを1検体として、3検体もしくは必要に応じてそれ以上用意する。(n: 繰り返し

し回数。n≧3)

### 6-3. 洗い出し

それぞれのバイアル瓶内に試験試料が巻き上がらないように注意しながら SCDLP 培地 20 mL を加える。加えた後、キャップをして手振り（振幅約 30 cm、30 回、約 1 往復/1 秒）またはボルテックスミキサ（平板、ゴム製保持部にバイアル瓶の下部を押し付け、5 秒×5 サイクル）による振とうを行い、各検体から付着している細菌を洗い出す。

### 6-4. 生菌数の測定

- (1) ピペットで、洗い出し液 1 mL を採り、生理食塩水 9.0 mL±0.1 mL が 入った試験管に加え、よくかくはんする。さらに、この試験管から 1 mL を新しいピペットで採り、生理食塩水 9.0 mL±0.1 mL が入った別の試験管に加え、よくかくはんする。この手順を繰り返す、それぞれの希釈が 10 倍希釈になるように希釈系列を作製する。洗い出し原液と各希釈系列の試験管からそれぞれ別の滅菌済みシャーレ 2 枚に新しいピペットで 1 mL を入れる。
- (2) 45 °C～48 °C に温めたウォーターバスで保持しておいた標準寒天培地をシャーレに約 15 mL 加え、よくかくはんする。次に、室温で静置し、培地が固化したら、シャーレを逆さにし、37 °C±2 °C、40～48 時間培養する。
- (3) 培養後に、30 個～300 個のコロニーが現れた 希釈系列のシャーレのコロニー数を測定する。洗い出し液 1 mL を入れたシャーレの測定可能なコロニー数が 30 個未満の場合は、そのコロニー数を測定する。もし、洗い出し液 1 mL を入れたシャーレ 2 枚ともにコロニーの形成が認められない場合にはコロニー数を <1 とする。

## 7. 生菌数の計算

測定したコロニー数より式 (1) によって、1 検体当たりの生菌数を計算する。その後各検体の生菌数を算術平均し、式 (2) によって試験試料 1 g 当たりの生菌数を計算する。数値は有効数字 3 桁目を JIS Z 8401 の規則 B によって 2 桁に丸める。

$$M=C \times R \times 20 \quad \dots (1)$$

ここに、

$M$ : 1 検体当たりの生菌数

$C$ : 採用した二つのシャーレのコロニー数の平均値 (CFU)

$R$ : 希釈倍率

20: 洗い出しに用いた SCDLP 培地の液量 (mL)

$$N=M_{\text{mean}} \times 10 \quad \dots (2)$$

ここに、

$N$ : 試験試料 1 g 当たりの生菌数 (CFU/g)

$M_{\text{mean}}$ : 各検体の生菌数の算術平均値

10: 試験試料 1 g 当たりに換算

コロニー数  $C$  が <1 の場合は、 $C$  を 1 と置いて生菌数を算出する。なお、3 検体すべてのコロニー数が <1 の場合には、試験試料 1 g 当たりの生菌数は  $<2.0 \times 10^2$  CFU/g と表示する。

繰り返し回数  $n$  を 4 以上とした場合には、その算術平均値としても良い。

以上  
(2019/July/22)