

ウェットワイパー類の除菌性能試験方法

改正：令和3年5月13日

監修：高麗寛紀

徳島大学名誉教授

(一社) 日本衛生材料工業連合会
日本清浄紙綿類工業会

目次

1	原理	3
2	試験菌	3
2.1	試験菌株	3
2.2	試験の保存	3
3	薬品、材料および器具	4
3.1	通常の試験装置及び消耗器材	4
3.2	試薬および培地	5
3.2.1	水	5
3.2.2	通常の微生物用試薬	5
3.2.3	培地	5
3.2.4	リン酸緩衝液	6
3.2.5	湿潤剤	7
3.2.6	不活性化剤	7
3.3	対照試験布	7
3.3.1	対照試験布	7
3.3.2	対照試験布の洗浄	7
3.4	拭取り装置	7
3.5	試験担体	8
4	試験菌液の調整	8
4.1	モデル汚れ物質の調整	8
4.2	試験菌の前培養	8
4.3	菌液の調整	8
4.4	試験菌液の調整	8
4.5	試験菌液の生菌数測定	9
5	拭き取り操作	9
5.1	試験菌の接種	9
5.2	乾燥直後の試験菌の回収	9
5.3	対照試料	10
5.4	試験試料	10
5.5	拭取り操作	10
5.5.1	拭取り装置の準備	10
5.5.2	拭取り操作	10
5.6	残存菌の回収	10
6	混釈平板培養法による残存生菌数の測定	11
6.1	混釈平板培養法	11
6.2	生菌数の測定	11
7	試験結果	11
7.1	試験結果の計算及び表示	11
7.2	試験成立条件	11
7.3	除菌活性値の計算	12
7.4	試験結果の報告	12
付録 I	試験菌株	14
付録 II	不活性化剤の有効性の確認	14
付録 III	試験菌の回収手順の設定	14
付録 IV	モデル処方調整	15
付録 V	対照試料・試験試料の装着	16
付録 VI	技能試験	17
付録 VII	Q&A	18

1 原理

適当な汚れと共に細菌を試験担体（ステンレス板）に接種し、乾燥後拭取り装置に設置する。試験試料（ウェットワイプまたは対照液を塗布した綿布）を巻きつけたおもりで試験担体上を所定回数拭取り、5 分間静置する。5 分後、試験担体を不活性化剤に移し、試験試料の細菌の増殖を抑制したり死滅させる性質を不活性化させた後、試験担体上の生菌数を測定する。

試験試料の除菌活性値は、対照試料及び試験試料で拭取り後、それぞれの試験担体上に残存する生菌数の常用対数値の差で示す。

2 試験菌

2.1 試験菌株

試験に用いる細菌の種類は、次のとおりとし、それぞれの菌について試験を行う。ただし、特定の適用に必要な場合は、これら以外の菌株を追加的に用いてもよい。

試験用の細菌の菌株は、国際微生物株保存連盟又は日本微生物株保存連盟に加入している機関において保存されている同一系の菌株を使用する（付録 I 参照）。

- *Escherichia coli*（大腸菌）
- *Staphylococcus aureus*（黄色ぶどう球菌）

2.2 試験の保存

細菌の移植は無菌的に行う。公的菌保存機関（付録 I 参照）から購入した乾燥細菌を、説明書に従って復水・増殖培養する。培養後、試験管攪拌器で十分に攪拌し、10 μL の白金耳を用いてニュートリエント寒天平板培地上に画線し、35±1 °C で 24 時間培養する。培養後、細菌の性状ならびに汚染のないことを確認する。

JIS Z 2801 の 5.2.5 に従い細菌の保存を行う。（片手に元株と移植しようとする斜面培地（3.2.3 参照）を、他の手に白金耳の柄を持ってその手で綿栓を抜き取り、試験管の口を火炎殺菌する。白金耳を火炎殺菌し、新しい斜面培地の凝結水のある部分⁽¹⁾に白金耳のループを差し込んでよく冷却してから、元株のシャーレ又は試験管に入れ、細菌の繁殖面から 1 白金耳をかきとり、新しい斜面培地に塗抹⁽²⁾し、再び試験管の口を火炎殺菌し、元のように綿栓をする。白金耳は火炎殺菌しておく。移植を行った斜面培地を 35±1 °C で 24～48 時間培養し、その後は、温度 5～10 °C で保存する。）

移植してから 1 か月以内に次の移植を同様に行い継代培養する。継代培養は 10 回を限度とする。また、移植してから 1 か月以上過ぎたものは次の移植に用いてはならない。

注⁽¹⁾ 図 1 参照

⁽²⁾ 図 1 のようにまず凝結水に細菌を分散し、ここから斜面上方まで直線を引

く。いったん培地から白金耳の先端を離し、再び凝結水につけ、今度は蛇行させながら斜面上方まで線を引く。

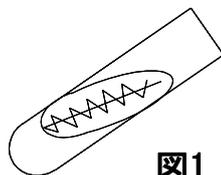


図1

3 薬品、材料および器具

3.1 通常の試験装置及び消耗器材

クリーンベンチ	JIS K 3800 に規定する微生物学用に適合するもの。
オートクレーブ	少なくとも 15～25 分間、温度 121 ± 1 °C、圧力 103 KPa に保てるもの。
恒温水槽	試験温度 ± 1 °Cで調節できるもの。
培養器	35 ± 2 °Cに調節できるもの。
ストップウォッチ	1 秒単位で測定できるもの。
メトロノーム（アプリでも可）	120/min を正確に刻めるもの。
pH 計	較正精度が 25 °Cで ± 0.1 pH のもの。
試験管攪拌器	例えば、Vortex®ミキサー等
ピペット	JIS K 0970 又は JIS R 3505 のクラス A に適合又は同等の精度をもつもの。
白金耳	微生物試験用のもの。
プラスチック製殺菌済みシャーレ	菌数測定用。JIS K 0950 に規定するもの。
試験管	径 18 mm × 150 mm 程度の殺菌可能なガラス製試験管。 (金属製、またはプラスチック製のキャップ付きが望ましい。)
試験担体（ステンレス板）	幅 26 mm × 長さ 152 mm × 厚み 0.8～1.2 mm 。表面仕上げ 2B 程度のもの。繰り返し使用可能であるが、見た目表面が傷ついたものは使用しない。
ストマッカー袋	微生物試験用のもの。
ピンセット	微生物試験に使用できるもの。
コンラージ棒	微生物試験用のもの。

3.2 試薬および培地

試薬は分析用か微生物学的目的に適したものとする。調製に関する製造業者の取扱説明書等がある場合は、それに従う。

3.2.1 水

使用水は細菌に対して細菌の増殖を抑制したり、死滅させる性質のある物質を含まないものとする。蒸留水、脱イオン水または精製水を用いてもよい。

3.2.2 通常の微生物用試薬

標準寒天培地	微生物試験用のもの。
普通寒天培地	微生物試験用のもの。
普通ブイヨン培地	微生物試験用のもの。
水酸化ナトリウム (NaOH)	1 級以上のもの。
炭酸ナトリウム(Na ₂ CO ₃)	1 級以上のもの。
非イオン界面活性剤	ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート。[ポリソルベート 80 (Tween80)]
精製水	最新版の日本薬局方の規定に準じるもの。
消毒用アルコール	最新版の日本薬局方の規定に準じるもの。
牛血清アルブミン Fraction V	微生物試験用のもの。

3.2.3 培地

標準寒天培地	培地の調製説明書に従って標準寒天培地（酵母エキス 2.5 g、トリプトン 5 g、グルコース 1 g、寒天粉末 15 g）を溶解し調製する。pH 7.0~7.2 (25 °C)になるように調整後、オートクレーブを用い 121 °Cで 20 分間高圧蒸気殺菌する。培地ビンが冷却した後、蓋を閉めて使用まで室温で保管する。菌液を混釈する場合は培地の温度を 46~48 °Cにしておく。直ちに使用しないものは 5~10 °Cで保管し、調製後 1 ヶ月以上過ぎた寒天培地は用いてはならない。
普通寒天培地	JIS Z 2801 の 5.2.4 の規定に準じるもの。（精製水又はイオン交換水 1000 mL に対して肉エキス 5 g、ペプトン 10.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g、寒天粉末 15 g を採り、フラスコに入れて混合し、沸騰する水浴中で加熱して内容物を十分に溶解した後、pH が 7.0~7.2 (25 °C)になるよう水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整し、綿

栓をして高圧蒸気殺菌する。市販の培地を購入し使用する場合は、製造業者の取扱説明書に従って調製する。) 菌液を混釈する場合は培地の温度を 46~48 °C にしておく。調製後直ちに使用しないものは 5~10 °C で保管し、調製後 1 ヶ月以上過ぎた培地は用いてはならない。

斜面培地

JIS Z 2801 の 5.2.4 の規定に準じるもの。(試験管にあらかじめ温めて溶解した普通寒天培地を 6~10 mL 注ぎ綿栓をして高圧蒸気殺菌する。殺菌終了後、清浄な室内に試験管を水平面に対して約 15 度傾けて置き、内容物を凝固させる。) 直ちに使用しないものは 5~10 °C で保管し、調製後 1 ヶ月以上過ぎた培地は用いてはならない。凝縮水がなくなったものは溶解し、再び凝固させて使用する。

普通ブイヨン培地

JIS Z 2801 の 5.2.4 の規定に準じるもの。(精製水又はイオン交換水 1000 mL に対して肉エキス 3g、ペプトン 10.0 g、塩化ナトリウム 5.0 g を採り、フラスコに入れて混合し、内容物を十分に溶解した後、pH が 7.0~7.2 (25 °C) になるよう水酸化ナトリウム溶液又は塩酸溶液で調整し、綿栓をして高圧蒸気殺菌する。調製後直ちに使用しないものは 5~10 °C で保管し、調製後 1 ヶ月以上過ぎた培地は用いてはならない。

3.2.4 リン酸緩衝液

0.25M リン酸緩衝液原液

リン酸二水素カリウム 34g を水 500 mL に溶解し、1 N の水酸化ナトリウム溶液で pH 7.2 に調製した後、希釈して 1 L にする。直ちに使用しないものは 5~10 °C で保管し、調製後 6 ヶ月以上過ぎたリン酸緩衝液原液は用いてはならない。

リン酸緩衝液

0.25M リン酸緩衝液原液 1.25 mL を水に溶解し、希釈して 1 L にする。目的に応じ、100 mL あるいは 9 mL ずつ分注しオートクレーブを用い 121 °C で 15~25 分間高圧蒸気殺菌する。直ちに使用しないものは 5~10 °C で保管し、調製後 1 ヶ月以上過ぎたリン酸緩衝液は用いてはならない。

3.2.5 湿潤剤

ポリソルベート 80 を 5 g および炭酸ナトリウム 5 g 溶解し、水で希釈して 1 L にする。直ちに使用しないものは冷蔵庫中 4~8 °C で保管し、調製後 6 ヶ月間以上過ぎた湿潤剤は用いてはならない。

3.2.6 不活性化剤

所定の時間での除菌効果を評価するため、評価試料から試験担体に移行する除菌成分の効果を、所定時間に停止する必要がある。そのために除菌成分を不活化することができる物質を不活性化剤という。

不活性化剤の条件として、

- a) 不活性化剤に評価試料を添加した際、直ちに除菌成分の不活化をすることができる。
- b) 不活性化剤自体が試験菌に対して毒性を持たないこと。

の 2 点を満たすこととし、付録Ⅱの方法で確認する。尚、不活性化剤の有効性の確認は、試験菌種ごと及び評価試料の種類ごとに行う。

不活性化剤の例を下に示す。

(例) SCDLP ブイヨン培地 (栄研化学社製)

調製法：本品 38 g を精製水 1000 mL に加温溶解し、適当な容器に分注して高圧蒸気滅菌して試験に供する。(精製水 1000 mL 中、トリプトン 17 g、ソイペプトン 3 g、ブドウ糖 2.5 g、塩化ナトリウム 5 g、リン酸 2 カリウム 2.5 g、レシチン 1 g、ポリソルベート 80.7 g)

3.3 対照試験布

3.3.1 対照試験布

JIS L0803 染色堅ろう度試験用添付白布に規定されている、かなきん 3 号。

3.3.2 対照試験布の洗浄

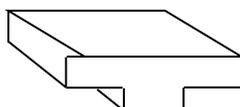
湿潤剤 (3.2.5 参照) 2.5 mL および炭酸ナトリウム 2.5 g を水に溶解して 5 L の洗浄液を調製する。大きさが約 1 × 3 m² の対照試験布 (3.3.1 参照) を 5 L の洗浄液に入れ、1 時間煮沸する。微量の湿潤剤をすべて取り除くため、水を替えて更に約 5 分間煮沸する。更に、4~5 L の冷水で約 5 分間攪拌する。試験布を紐に掛けて乾燥させる。

乾燥後、試験布を 15 × 10 cm² の大きさに切断し、オートクレーブ殺菌後、クリーンベンチ内で風乾する。

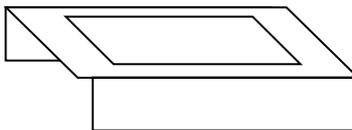
3.4 拭取り装置

下図に示す 3 つの器具 (おもり、ガイド、レール) を、組立てて使用する。使用前に適当な方法ですべての器具を滅菌する。

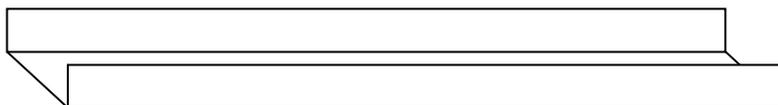
- a) おもり (150 g)



b) ガイド



c) レール



3.5 試験担体

試験担体（ステンレス板、**3.1** 参照）を、アルカリ性洗剤で丁寧に洗浄し⁽³⁾、水道水で十分にすすぎ、更に精製水（洗浄瓶を使用）ですすぐ。十分すすいだ後、アルコールで洗浄（滅菌）し、クリーンベンチ内等で乾燥させた後使用する。

注⁽³⁾ （例）実験用の強アルカリ洗剤を指示通り希釈し、希釈した液に浸漬させ、約10分間超音波洗浄する。実験室用の強アルカリ洗剤としては、Extran MA01（MERCK 社製）などがある。

4 試験菌液の調整

4.1 モデル汚れ物質の調整

水と牛血清アルブミン Fraction とを用いて、6 g/L の濃度の牛血清アルブミン水溶液を調製する。この水溶液はろ過殺菌して試験に供する。牛血清アルブミン水溶液は試験の直前に調製し、試験日当日のみの使用とする。

4.2 試験菌の前培養

2.2 の斜面培地保存菌を、斜面培地（**3.2.3** 参照）上に1白金耳移植し、 35 ± 1 °Cで16～24時間培養する。さらに、この培養菌から新たな斜面培地に1白金耳移植し、 35 ± 1 °Cで16～20時間培養する。

4.3 菌液の調整

4.2 で前培養した試験菌の菌体1白金耳量を適量の普通ブイヨン培地に均一に分散させ、顕微鏡による直接観察又はその他の適切な方法により菌数を推定する。この菌液は普通ブイヨン培地を用いて適宜希釈し、菌数が $1\sim 5 \times 10^9$ 個/mLとなるように調製する。この菌液は試験温度条件下で1時間静置してから試験に供する。

4.4 試験菌液の調整

4.1 のモデル汚れ物質と1時間静置後の**4.3** の菌液を試験管に等量ずつ加え、直ちに試験管攪拌器などで試験菌を十分に懸濁させ、氷水に保存する。尚、この試験菌液は、氷水に保管し4時間以内に使用すること。

4.5 試験菌液の生菌数測定

4.4 において調製した試験菌液の生菌数 N (cfu/mL) を、混釈平板培養法 (6 参照) によって確認する。生菌数の計算は、測定したコロニー数から次式により求められる。

$$N = C \times D$$

ここに、 C : コロニー数 (採用した 2 枚のシャーレのコロニー数平均値)

D : 希釈倍率 (採用したシャーレに分注した希釈液の希釈倍率)

5 拭き取り操作

拭き取り操作 (5.1 から 5.6) は、クリーンベンチ等の風を切った (試験担体に風が当たらない) 状態で行う。

5.1 試験菌の接種

試験菌液 (4.4 参照) の入った試験管を試験管攪拌器で軽く攪拌し、菌液を均一にする。試験菌液 0.01 mL をピペッターで採り、試験担体中央に線を引くように接種し、試験担体中央部 (図 2 参照。約 : 幅 15 mm × 長さ 90 mm) に白金耳等を用いて塗り広げ、風を切ったクリーンベンチ内で 5 分から 10 分、見た目乾燥するまで放置する。見た目乾燥するまでの時間がほぼ一定の場合は、乾燥時間を定めても良いが、乾燥に要した時間を記録しておくことが望ましい。

尚、拭き取り操作においては、試験試料、対照試料、乾燥直後のプレートそれぞれ 3 枚ずつ準備し、残存菌数の確認に使用する。

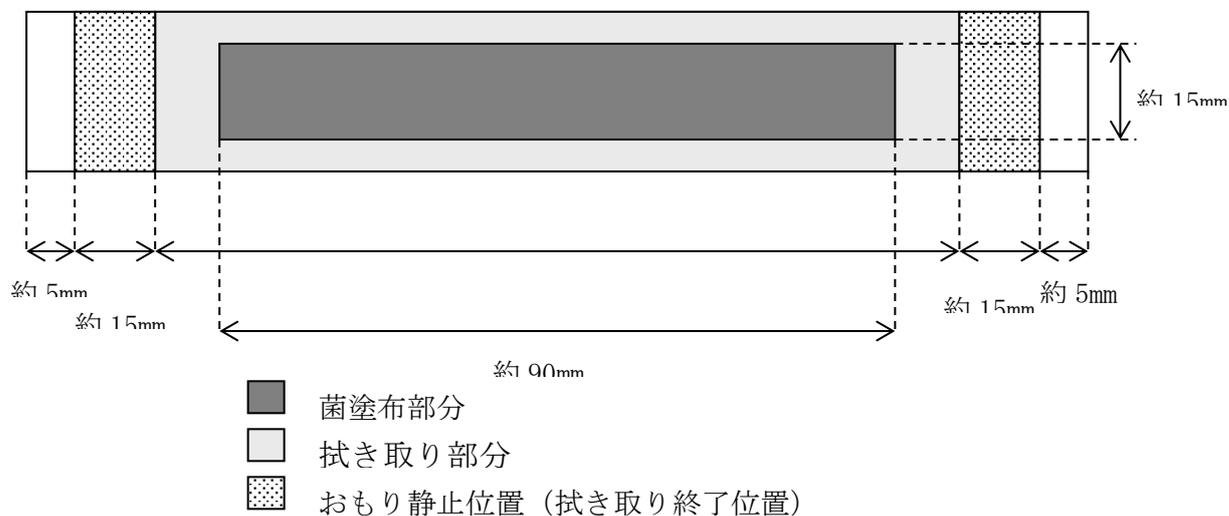


図 2 試験担体における試験菌液の接種と拭き取りの位置

5.2 乾燥直後の試験菌の回収

試験試料が乾燥した後、試験担体を殺菌済みのピンセットで取り、ストマッカー袋に入れ、室温に戻した不活性化剤 20 mL (又は不活性化が確認された量) を加えて、付録 III で確認された方法 (揉み強さ、揉み時間) で試験担体から菌を洗い出し、混釈平板培養法 (6 参照) により残存菌数の測定を行う。この試験担体に対しては拭き取り操作は行わない。

5.3 対照試料

洗浄・殺菌した $15 \times 10 \text{ cm}^2$ の対照試料布 (3.3 参照) を両端を切断したストマッカー袋の内側に置く。次に、対照試験布重量の 1.5 倍量の 3.2.4 のリン酸緩衝液 (例えば、対照試験布の重量が 1.5 g の時、2.25 mL のリン酸緩衝液) をピペットで標準白布の 5 ヶ所 (4 隅および中央) にできるだけ等量になるように接種する。接種後直ちに、ストマッカー袋を折りたたみリン酸緩衝液が標準白布全面に均等に含浸されるように、ストマッカー袋の外側から手でリン酸緩衝液を広げる。10 分間放置後、直ちにおもりに装着し、ふき取り操作を行う (5.5 参照)。

5.4 試験試料

試験試料は、未開封の製品を使用する。開封後、製品使用方法に準じ取り出し口から 2 から 3 枚ぐらいは除き、できるだけ内部にあるウェットワイプを試験に使用する (個包装タイプは除く)。尚、試料によっては、縦方向の伸びと横方向の伸びが異なるものがある。その場合、伸びの大きい方向とふき取り方向が同じになるようにおもりに装着すること。また、試料は、2 枚重ねて使用する。但し治具に収まらない場合は 1 枚で使用する。

5.5 拭取り操作

5.5.1 拭取り装置の準備

試験菌液が見た目乾燥した後 (5.1 参照)、試験担体を菌液が接種された面を上にして装置のレール上に設置し、次にガイドを片面に設置する。おもりに対照試料または試験試料を装着し (付録 V 参照)、おもりの底面部にたるみができないように注意しながら、ガイド上面の開口部に試験試料を装着したおもりを設置する。余分な試験試料が拭取り操作の障害となるようであれば、適宜切断する。

5.5.2 拭取り操作

対照試料または試験試料を装着したおもりをガイドに設置し、おもりを上から軽く抑え、試料表面が試験担体表面に密着するようにする。その後、直ちにガイド部分横を持ち、上から圧をかけないように、レールに沿って試験担体上を 120 拍/分のメトロノームで正確に刻みながら 5 往復させ試験担体表面を拭取る (試験時間 5 秒)。この時、ガイドを途中で止めることのないように注意する。尚、拭き取りは試験担体の両端 5 mm を残した内側に対して行う (図 2 参照)。

5.6 残存菌の回収

拭取り操作が終了後、ガイドおよび試験試料を装着したおもりをレール上から取除く。風等がプレート表面にかかるのを防ぐため、直ちにレール上に風除け用の適当な板 (プラスチック製など) を置き、試験担体をレール上で 5 分間放置する。その後、レール上からそれぞれの試験担体をすばやく殺菌済みのピンセットで取り出し、ストマッカー袋に入れ、室温に戻した不活性化剤 20 mL (又は不活性化が確認された量) を加えて、付録 III で確認された方法 (揉み強さ、揉み時間) ⁽⁴⁾ で試験担体から菌を洗い出す。

注⁽⁴⁾ 1.5 分間ストマッカー袋の外側から試験担体表面を良く擦り、10 分間放置後、再度試験担体表面を 1 分間擦る。

6 混積平板培養法による残存生菌数の測定

6.1 混積平板培養法

5.6 のストマッカー袋を再びよく揉み、沈殿している可能性のある試験菌を均一に分散させ、新しいピペットを用いて不活性化剤を 1 mL 採り、リン酸緩衝液 (3.2.4 参照) 9 mL を入れた試験管に移し、試験管攪拌器を用いて 10 秒間激しく攪拌する。さらに、この試験管から 1 mL を新しいピペットで採り、希釈液 9 mL を入れた別の試験管に移し、試験管攪拌器を用いて 10 秒間激しく攪拌する。この操作を順次繰り返し、10 倍希釈法による希釈系列を作成する。洗い出し原液を含む各希釈系列の試験管から、それぞれ別のシャーレ 2 枚に新しいピペットで溶液 1 mL を採り、46~48 °C に保温した標準寒天培地⁽⁵⁾ 約 15~20 mL をシャーレに加え混合した後室温で放置し、培地が固まったら、シャーレを倒置し、35±1 °C で 48±4 時間培養する。

注⁽⁵⁾ 付録 II の不活性化の有効性の確認試験で使用した寒天培地

6.2 生菌数の測定

48 時間培養後、300 以下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計数する。コロニー数が 300 を超える場合は、「>300」、「TNTC」⁽⁶⁾ または「計測不能」と記録する。洗い出し原液 1 mL を分注した寒天平板においてもコロニー数が 30 個未満の場合は、そのコロニー数を測定し、いずれの寒天平板にもコロニーの形成が認められない場合は「<1」と記録する。

注⁽⁶⁾ Too Numerous To Count: 多すぎて計測できず。

7 試験結果

7.1 試験結果の計算及び表示

試験担体上に残存した生菌数を下式により求める。

$$Nc \text{ or } (Nd) \text{ or } (Ne) = C \times D \times V$$

ここに、
Nc: 対照試料を用いて行った試験の残存生菌数 (cfu/試験担体 1 枚)
Nd: 試験試料を用いて行った試験の残存生菌数 (cfu/試験担体 1 枚)
Ne: 乾燥直後における残存生菌数 (cfu/試験担体 1 枚)
C: 集落数 (採用した 2 枚のシャーレのコロニー数平均値)
D: 希釈倍率 (採用したシャーレに分注した希釈液の希釈倍率)
V: 洗い出しに用いた不活性化剤の液量 (mL)

生菌数は有効数字 3 桁目を四捨五入して 2 桁で表示する。コロニー数が「<1」の場合 (6.2 参照)、生菌数は「<20」と表示する (V が 20 mL の場合)。生菌数平均値を求める場合は、各試験系 (試験担体 2 枚 1 組) での生菌数 Nc (Nd) (試験担体 1 枚あたり) を算術平均し、有効数字 3 桁目を四捨五入して 2 桁で表示する。生菌数が「<20」の場合は、「20」として平均値を計算する。

7.2 試験成立条件

次の 5 つの条件が満たされた場合にのみ、その試験結果を有効とする。

- 試験菌液中の生菌数: $N = 0.5 \sim 2.5 \times 10^9$ cfu/mL
- 対照試料でふき取った後の残存生菌数: $\text{Log}(N \times 0.01) - \text{Log } Nc < 3$

- c) 不活性化剤の有効性が確認されていること。
- d) 乾燥直後における残存生菌数が、試験菌液の生菌数の 10%以上であること。

$$Ne/(N \times 0.01) \times 100 > 10 \%$$

ここに、 N：試験菌液の生菌数 N (cfu/mL)

Nc：対照試料を用いて行った試験の残存菌数 (cfu/試験担体 1 枚)

Ne：乾燥直後における残存生菌数 (cfu/試験担体 1 枚)

- e) 対照試料及び試験試料でふき取った後、それぞれのくり返し (3 回) において、残存菌数の最大値の対数値と最小値の対数値の差が、1 以下であること。

7.3 除菌活性値の計算

3 回の試験を試行した後、7.2 で試験が成立した場合について、次式によって除菌活性値を求める。

$$R = A - B$$

ここに、R：除菌活性値

A：対照試料で 3 回試行した結果の生菌数(Nc)の常用対数値の平均値 (個)

B：試験試料で 3 回試行した結果の生菌数(Nd)の常用対数値の平均値 (個)

7.4 試験結果の報告

試験報告書は、少なくとも以下の内容を含まなければならない。

a) 試験施設に関する情報

- 1) 名称
- 2) 住所
- 3) 試験の実施に従事した主要職員の氏名

b) 試験試料

- 1) 試験試料名又は製品名
- 2) ロット番号 (ある場合)
- 3) 製造者
- 4) 試験試料受領日
- 5) 試験試料受領日から長期保管した場合は、その保管方法。

c) 試験条件

- 1) 試験操作実施日
- 2) 試験菌種およびその保存菌の継代回数 (2.2 参照)
- 3) 不活性化剤の組成
- 4) 各ふき取り操作で使用した試験試料の枚数 (1 枚か 2 枚か)。

d) 試験結果

- 1) 試験菌液中の生菌数
- 2) 試験試料及び対照試料で処理した試験担体上の生菌数(?)
- 3) 試験成立条件の判定
 - 試験菌液の生菌数
 - 対照試料でふき取った後の残存生菌数
 - 不活性化剤の有効性
 - 乾燥直後における残存生菌数
- 4) 除菌活性値

注(7) 試験試料で処理した試験単体上の生菌数の計測では、各希釈系列希釈液（原液も含む）のコロニー数も記載する。

付録 I 試験菌株

2.1 に規定される細菌の種類は、次のようにする。

1.2.2 に規定される細菌の種類	保存番号	菌体保存機関名
<i>Escherichia coli</i> (大腸菌)	ATCC 8739	American Type Culture Collection (米国基準微生物株保存期間)
	NBRC 3972	独立行政法人製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源センター
<i>Staphylococcus aureus</i> (黄色ぶどう球菌)	ATCC 6538P	American Type Culture Collection (米国基準微生物株保存期間)
	NBRC 12732	独立行政法人製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源センター

付録 II 不活性化剤の有効性の確認

a) 不活性化剤試験方法

殺菌した試験担体を用いて、拭取り操作 (5.3 参照) を行う (試験菌液は接種しない)。その後、ルール上からそれぞれの試験担体をすばやく殺菌済みのピンセットで取り出し、ストマッカー袋に入れ、不活性化剤 20 mL を加えて、約 40 秒間、試験担体の表面を手で揉み、試験担体上に残存している薬剤を洗い出す。薬剤が均一になるようストマッカー袋を手で揉み、不活性化剤を試験管 2 本に移し、大腸菌及び黄色ブドウ球菌の試験菌液 (4.4 参照) を 100,000 倍に希釈したものを、各々 1/100 量添加し、そのまま室温で 30 分間放置する。不活性化剤 1 mL を 2 枚のシャーレに取り、混釈平板培養法 (6 参照) に従って不活性化剤中の生菌数 (NT, cfu/mL) を測定する。対照として、不活性化剤のみに試験菌液を同様に添加し、そのまま室温で 30 分間放置したものの生菌数 (NC, cfu/mL) も測定する。

b) 不活性化剤の有効性の評価

以下の条件を、評価対象細菌全てに対して満たした場合にのみ、不活性化剤として使用することができる。不活性化が確認できなかった場合、不活性化剤の組成、量、混釈に用いる寒天培地の組成を変更する。

$$NT/NC > 0.5$$

付録 III 試験菌の回収手順の設定

試験担体からの試験菌の洗い出しについては、以下の方法で試験菌種ごとにその回収率を予め確認すること。回収率の確認は、試験担当者ごとにそれぞれの菌種に対し少なくとも各一回行うこと。また、試験布の規格又は購入先に変更がある場合は、試験菌種ごとに再度回収率の確認を行うこと。

a) 試験菌液の準備

5.1 に従って生菌数が $0.5 \sim 2.5 \times 10^9$ cfu/mL ($1.0 \times 10^9 \sim 2.0 \times 10^9$ cfu/mL が望ましい) の試験菌液を調製する。次に、3.2.4 のりん酸緩衝液を用いて、3段階の異なる濃度の試験菌液 (1×10^9 cfu/mL, 1×10^7 cfu/mL 及び 2×10^5 cfu/mL 程度が望ましい。) を調製する。試験菌液およびその希釈菌液の生菌数は、混釈平板培養法 (6 参照) により測定する。

b) 試験菌の接種・回収

- ① a) で準備した試験菌液 0.01 mL を試験担体に接種し、風を切ったクリーンベンチ内で見た目乾燥するまで放置する (5.1 参照)。
- ② 試験担体を殺菌済みのピンセットを用いてストマッカー袋に入れ、不活性化剤 20 mL (又は不活性化が確認された量) を加え、ストマッカー袋の外から、試験菌接種面を約 1.5 分間擦りながら菌を不活性化剤に揉み出す。
- ③ 洗い出した後、ストマッカー袋をよく揉み、洗い出された試験菌が不活性化剤に均一になるようにする。
- ④ そのまま、所定時間⁽⁶⁾ 放置する。
- ⑤ 所定時間放置後、ストマッカー袋の外から、試験菌接種面を再度約 1 分間揉み、不活性化液をよく混ぜる。
- ⑥ 不活性化液 1 mL を採取し、混釈培養法による残存生菌数の測定 (5.5 参照) を行う。
- ⑦ a) で準備した異なる濃度の試験菌液を用いて、①～⑥を繰り返す。

注⁽⁶⁾ 所定時間は、5、10 分、15 分の 3 水準とし、各濃度および各所定時間での試験菌の回収率を次式で計算し、各濃度での試験菌の回収率が一定値に達した時間を本試験で採用する。

$$\text{回収率 (\%)} = \text{Ne} / (\text{N} \times 0.01) \times 100$$

ここに、N : 試験菌液の生菌数 N (cfu/mL)

Ne : 乾燥直後における残存生菌数 (cfu/試験担体 1 枚)

付録 IV モデル処方調整

本除菌試験の手合わせ・判定試験等で使用するモデル処方について規定する。モデル処方として、下記 3 処方を試験当日に準備し、試験当日のみ使用すること。

モデル処方

	処方 1	処方 2
塩化ベンザルコニウム (%)	0.02	0.05
エタノール (%)	0	50
プロピレングリコール (%)	5	5

a) モデル処方液の準備

下記表に記載の量の精製水をメスシリンダーで測り採り、100 mL のガラス製三角フラスコまたはビーカーに入れる。次に、電子式攪拌機等がかき混ぜながら、下

記表に記載の量の 95% エタノール、プロピレングリコール、10% 塩化ベンザルコニウム溶液を順次ピペットで加える。尚、塩化ベンザルコニウムはプラスチックなどに吸着しやすいので、モデル処方液の調整では、必ずガラス製の容器を使用すること。

試薬	参考	採取量 (mL)	
		処方 1	処方 2
精製水	—	95	45
95% エタノール	試薬特級	-	50
プロピレングリコール	試薬特級	5	5
10% 塩化ベンザルコニウム溶液	試薬特級	0.2	0.5

b) モデル処方試験布の準備

5.3 に従って、標準白布重量の 1.5 倍量のモデル処方液（例えば、標準白布の重量が 1.5 g の時、2.25 mL のモデル処方液を含浸させる）を標準白布に含浸させ、10～15 分間放置後（できる限り、10 分に近い時間放置）、ふき取り操作を行う（5.5 参照）。

付録 V 対照試料・試験試料の装着

対照試料・試験試料をおもりに装着する場合は、特に支障がなければ下記手順に従って行うことが望ましい。

手順

- ① 両端を切ったストマッカー袋の内側に対照試料または試験試料を広げ、試料中央部におもりを置く（写真 1）。
- ② 対照試料または試験試料の両端をおもり上部に折る（写真 2）。
- ③ 残りの両端もおもり上部に折る（写真 3）。
- ④ 対照試料または試験試料が弛まないように注意しながら折った部分をまとめる（写真 4）。
- ⑤ 対照試料または試験試料を装着したおもりをガイドの設置する（写真 5）。



写真1



写真2



写真3



写真4



写真5

付録 VI 技能試験

除菌を標榜するウエットワイパー類の自主基準7.1、試験成績書の提出の規定に基づき、本除菌試験を行う能力を評価するための技能試験方法を定める。

(1) 書類審査

- 資格要件：JNLA 若しくは試験検査登録制度で認定又は登録されている試験機関。
- 添付した申請書に記載し提出。

(2) 技能審査

- ① 試験項目： ウエットワイパー類の除菌試験（本試験書）、2 菌種
- ② 試験試料
 - モデル処方 1 および 3（付録 IV 参照）
 - 市販ウエットワイパー1 品（日清工が無作為に選択）
- ③ ウエットワイパー類の除菌試験（本試験書）に従い試験を行い、得られた除菌活性値の値により、日清工技術委員会で判定・承認を行う。

付録 VII Q&A

3.2 試薬および培地

Q. 培地の推奨銘柄などあれば、お知らせください。

A. 特に銘柄の指定または推奨はありませんが、本試験の開発に参加していただいた試験機関で使用している培地のメーカー名を、参考まで下に示しました。

使用培地銘柄（参考）

- 標準寒天培地： 栄研化学(株)、日水製薬(株)
- 普通寒天培地： 日水製薬(株)、日水製薬(株)
- 普通ブイヨン培地： 栄研化学(株)、栄研化学(株)

3.2.6 不活性化剤

Q. 栄研化学の SCDLP ブイヨン培地を使用する場合は、実施機関独自で評価は不要と考えてよろしいですか。

A. 本試験書に（例）として記載している培地を使用する場合でも、試験機関ごとに「不活性化剤の有効性の確認試験は試験菌種ごと及び評価試料の種類ごとに行う。」ことは必要です。

3.3.2 対照試験布の洗浄

Q. 対照試験布の洗浄で使用する「水」は、水道水でも可ですか。

A. この操作で使用する水は、最初の洗浄（湿潤剤および炭酸ナトリウムを溶解した水）では、必ずイオン交換水か蒸留水などの Ca イオンなどを含まない水を使用してください。また、それ以降のすすぎでは、水道水を使用している機関もあるようですが、できればイオン交換水か蒸留水を使用して下さい。

Q. 対照試験布として、JIS L 1902 の菌液吸収法で使用している標準綿布をそのまま使用することは可能でしょうか？

A. JIS L 1902 の菌液吸収法で使用している標準綿布をそのまま用いても、同等な結果が得られることを確認してから使用してください。

4.1 モデル汚れ物質の調整

Q. 牛血清アルブミン水溶液のろ過殺菌では、メンブランフィルターを使われると思いますが、メンブランフィルターの仕様をご提示ください。

また、牛血清アルブミン FractionV ですが、FractionV のものであれば何でもいいのでしょうか？

A. 滅菌する場合は、孔径 $0.2\mu\text{m}$ 以下のものを使用してください。尚、JIS L1902 記載の孔径 $0.4\mu\text{m}$ は、試験菌の補足を目的としたもので、滅菌には適さないと思われます。

また、牛血清アルブミン FractionV は、FractionV のものであれば、特に指定はありません。

7.4 試験結果の報告

Q. d) 試験結果の注(7)の「各希釈系列希釈液（原液も含む）のコロニー数も記載する。」の意味をご説明ください。6.2 で 300 以下のコロニー数が現れたもののみ計測すればよいことになっているので、各希釈系列のコロニー数まで記載する必要はないのではないかと？

A. 注(7)の意味は、不活性化が正常に行われていることを確認するためのものです（確認できない場合もありますが）。一般に、コロニー数は希釈倍率に反比例の関係にあります。しかしながら、抗菌成分の影響によってコロニーの形成が抑制されている場合には、反比例関係にならないこともあるため、300 以下の場合、各希釈のコロニー数を記載するようにしました。また、反比例関係にならない場合は、適切な不活性化剤または希釈等により、抗菌成分などの影響が出ないように方策を講ずる必要があります。尚、300 以上のものについては、「>300」と記載していただいで結構です。

付則 平成 25 年 4 月 1 日 制定
令和 3 年 5 月 13 日 改正

ウェットワイパー類の除菌性能試験方法作成委員会 構成表

	氏名	所属
	五味 満 裕	小林製菓株式会社
	大 村 勲	ピジョン株式会社
	坂 東 健 司	ユニ・チャーム株式会社
	釜 付 秀 範	アサヒグループ食品株式会社
	大 嶋 洋 介	白十字株式会社
	射 本 康 夫	(一社) 日本繊維製品品質技術センター
	中 嶋 絵 里	(一社) 日本繊維製品品質技術センター
(事務局)	中 村 仁 美	(一社) 日本衛生材料工業連合会

(一社) 日本衛生材料工業連合会

〒105-0013 東京都港区浜松町 2-8-14 浜松町 TS ビル 9F

電話 (03) 6403-5351

FAX (03) 6403-5350