カビ抵抗性試験方法(日本工業規格)について(1)*

飯 塚 広** (東京大学応用微生物研究所)

I. 緒 言

このたびカビ抵抗性試験方法という日本工業規格[JIS]としてはやや異色な規格が制定、公布されたが、この原案作成ならびに原案審議になすざわった者として、ここにその内容を紹介し、併せて将来のために御批判を頂ければ甚だ幸と考える次第である。

さて微生物が工業製品や工業材料に発生して損害を及ぼすことは、ことにカビに関しては肉眼的である場合が多いために古くから知られていたところであり、本邦では気候風土の点からもその感が深かったのであるが、工業製品や工業材料の製造者あるいは使用者のこの問題についての関心や対策は系統づけられるほど充分なものではなかった。もちろん防腐や防カビという見地からは従来も幾多の個々の研究がなされ、また技術的な成果もあげられているが、それらは特に微生物の損害を受けやすい比較的に特殊なものが対象とされていたように見受けられる。しかし微生物による被害はこのように特殊なものばかりかという、必ずしもそうではないのであって微生物の損害あるいは影響を受けた種々な対象を機会あるごとに調べてみると、それらのなかには工業製品や工業材料に含まれるものも多数存在する現状なのである。いいかえれば、ようやく工業製品や工業材料が具備すべき資格の一つとして『微生物に対する抵抗性』があたかも保健、衛生上からの食糧品に対するごとく、産業、通商上から要求される段階となっているということである。この傾向は本邦のみに限らず特に最近10年間に米、英両国其他においてもカビに対する抵抗性についてそれを規定する各種の工業規格が次々と制定されつつあり、本邦からの特需あるいは輸出に際しても勿論それらが適用されるのである。しかも直接それらの対象となるのは従来は微生物とは縁の遠かった専門分野であるため、関係者はその取扱上に必要以上の困難と混乱をきたしているように見受けられる。

このような内外事情もあって昭和30年9月に工業技術院では日本工業規格としてカビに対する抵抗性試験規格の原案作成を財団法人醸酵協会(会長黒野勘六博士)に依頼した。同会ではこのためにカビ委員会を設け、原案の内容を、現行の外国の規格を充分カバー出来てしかも本邦の微生物学的特殊事情をも折り込んだものであることとし、更に専門委員会を設けて内外の研究報告や米英両国の現行規格、特需などの仕様書を参考として十数回の会議を重ねて立案し、昭和31年3月に原案を答申するに至った。この工業標準案は同年6月、日本工業標準調査会に設けられたカビ試験方法専門委員会(務台蔵人委員長)に付託され、ここではカビの研究者ばかりでなく、繊維、染色、皮革、塗料、電機、通信、航空計器、電線、工芸などの関係工業界の代表と使用者の代表も委員として参加し、現在の工業界の実情からなるべく遊離しないような考慮のもとに審議が進められた。また対象別による各分科会の討論や修正も併行し、結局昭和32年2月に第7次案をもって専門委員会案とし、同年3月、日本工業標準調査会の審議を終り、3月29日通産大臣名によって制定されるに至ったのである。

このような制定経過の大要からも判るようにこの規格は対象とする品目は以下にもしるすようにかなり広範囲にわたっているが、今回は除外したものも沢山あり、また対象によっては微生物としてもカビばかりでは不十分なものもある。日本工業規格は規定によれば少くとも3年経過するごとに日本工業標準調査会で審議されることになっているから、将来は一層適切な内容にしてゆきたいと考えている。

II. カビ抵抗性試験法

UDC 620.193.82
日本工業規格 JIS Z 2911—1957

1. 適用範囲

* Methods of Testing Fungal Resistance. [Japanese Industrial Standard. JIS Z 2911—1957]
By Hiroshi IIZUKA (Institute of Applied Microbiology, University of Tokyo)

** 日本工業標準調査会委員(通産省)

註: 本稿は2度に亘って技術欄に掲載される。

この規格はとくにカビ抵抗性を必要とする工業製品または工業材料のカビに対する抵抗性の試験方法について規定する。

備考 この規格は製品または材料の規格あるいは仕様書にカビに対する抵抗性を試験することが規定された場合に適用する。

2. 試験に用いるカビ

試験に用いるカビ（以下試験用のカビという）の種類はつぎのとおりとする（参考！参照）。

- 第1群 (1) アスペルギルス・ニゲル ATCC 6275 (*Aspergillus niger* ATCC 6275)
 (2) アスペルギルス・ニゲル ATCC 9642 (*Aspergillus niger* ATCC 9642)
 (3) アスペルギルス・フラブス ATCC 9643 (*Aspergillus flavus* ATCC 9643)
 (4) アスペルギルス・テレウス PQMD 82 j (*Aspergillus terreus* PQMD 82 j)
 (5) アスペルギルス・グラウクス・トノヒルス G. 5 (*Aspergillus glaucus* var. *tonophilus* G. 5)
- 第2群 (1) ペニシリウム・シトリナム ATCC 9849 (*Penicillium citrinum* ATCC 9849)
 (2) ペニシリウム・ルテウム ATCC 9644 (*Penicillium luteum* ATCC 9644)
- 第3群 (1) リゾープス・ニグリカンズ S. N. 32 (*Rhizopus nigricans* S. N. 32)
 (2) ムコール・スピネセンズ IAM・Mu 3 (*Mucor spinescens* IAM・Mu 3)
- 第4群 (1) クラドスポリウム・ヘルバルム IAM・F 517 (*Cladosporium herbarum* IAM・F 517)
 (2) プルラリア・プルランス IAM・F 24 (*Pullularia pullurans* IAM・F 24)
 (3) トリコデルマ T-1 ATCC 9645 (*Trichoderma* T-1 ATCC 9645)
- 第5群 (1) ケトミウム・グロボスム ATCC 6205 (*Chaetomium globosum* ATCC 6205)
 (2) アスペルギルス・フミガッス IAM・2612 (*Aspergillus fumigatus* IAM・2612)
 (3) フザリウム・モニリホルメ USDA 1004・1 (*Fusarium moniriforme* USDA 1004・1)
 (4) ミロテシウム・ベルカリヤ USDA 1334・2 (*Myrothecium verrucaria* USDA 1334・2)
 (5) メムノニエラ・エチナータ AMC 37 (*Memnoniella echinata* AMC 37)

備考 試験用のカビの元株はつぎの機関のうちどれかで保管されたものとする。

工業技術院 発酵研究所

東京大学 応用微生物研究所

3. 試験の準備

3.1 薬品および材料 この規格に用いる薬品および材料は断りのないかぎりつぎのものとする。

アルコール (C_2H_5OH)	JIS K 8102	1 級以上
塩化カリウム (KCl)	JIS K 8121	"
塩化第二水銀 (昇コウ) ($HgCl_2$)	JIS K 8139	"
寒 天	JIS K 8263	1 級
酢 酸 (CH_3COOH)	JIS K 8355	1 級以上
硝酸アンモニウム (NH_4NO_3)	JIS K 8545	"
ブドウ糖 ($C_6H_{12}O_6$)	JIS K 8824	"
硫 酸 (H_2SO_4)	JIS K 8951	"
硫酸第一鉄 ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	JIS K 8978	"
硫酸マグネシウム ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	JIS K 8995	"
リン酸-アンモニウム ($NH_4H_2PO_4$)	JIS K 9006	"
リン酸-カリウム (KH_2PO_4)	JIS K 9007	"

ペプトン：日本薬局方の一般試験法の試験に定めるペプトン

ガーゼ：日本薬局方に定めるガーゼ

綿：青梅綿

白米：内地産ウルチ米

水：蒸留水とする

清水：日本薬局方の常水基準に適合する常水

3.2 器具 この規格に用いる器具のうちつぎにしるすものは断りのないかぎりつぎの規定に適合するものとする。

試験管 15 mm	JIS R 3616（ただし口形状はリップのないものでよい）
ペトリーサラ 90 mm	JIS R 3615
フラスコ	JIS R 3605
三角フラスコ	JIS R 3606

3.3 殺菌 この規格に用いる器具および材料を殺菌するにはつぎの方法で行う。

3.3.1 乾熱殺菌 試験管、フラスコ、三角フラスコはあらかじめ、清水で丁寧に洗って乾かしたのち綿センをして、またペトリーサラは同様に水洗いし乾かしたのち白紙⁽¹⁾ですぎ間なく包んで乾熱殺菌器に入れ、これを加熱し乾熱殺菌器内部の空気温度 170°C に約 1~2 時間保ち綿または紙⁽²⁾が焦げて黄色になったのを限度として加熱を止め器具を取り出す。

3.3.2 湿熱殺菌 つぎの 2 つの方法のいずれかで行う。

(1) 高圧法： オートクレープの底に近いところにタナを設け、タナの下に清水を入れる⁽³⁾。乾熱殺菌を終わった試験管、フラスコまたは三角フラスコに培養基を入れ元のように再び綿センをし、オートクレープのタナの上に器具を置いてセロハンまたは硫酸紙でおおい、オートクレープのフタをする。ガス抜きコックを開きオートクレープを加熱して中の清水を沸騰させる。蒸気が激しく出続けてから 10 分間ののちコックを閉じ、さらに加熱を続けオートクレープの内部の圧力⁽⁴⁾を指定の値に保って指定の時間置き加熱を止めコックを開いてオートクレープの内部の蒸気を抜き去ったのちフタを除き器具を取り出す。

(2) 常圧法： コッホ氏蒸気殺菌器のタナの下に清水を入れる⁽³⁾。乾熱殺菌を終わった試験管、フラスコまたは三角フラスコに培養基を入れ元のように再び綿センをし、殺菌器のタナの上に置いて、セロハンまたは硫酸紙でおおい、殺菌器のフタをする。殺菌器を加熱して清水を沸騰させる。フタの上部蒸気噴出口から蒸気が激しく出はじめてから 1 時間後に加熱を止め、すぐにフタを除き器具を取り出し、20~30°C の室に置く。この殺菌を 24 時間ごとに 3 回繰返す。

3.3.3 火炎殺菌 ガスまたはアルコールの火炎に白金線または白金耳をあてて赤熱させる。

3.3.4 アルコール殺菌 ガーゼまたはあらかじめ清水で洗った器を 65~70 容量%のアルコールに 1 時間以上浸す⁽⁵⁾。

3.4 培養基

3.4.1 バレイショ汁寒天培養基 大粒で傷のないバレイショを清水でよく洗い、皮をむき、芽の部分は深くえぐって周囲約 10 mm まで取り除き、約 10 mm のサイの目に切る。切ったバレイショを 200 g 採って、酢酸の 3% 水溶液に浸して 30 分間おいたのち、清水で洗い、ホウロウ引の容器に入れ、水を 1 l 加えて直火で 1 時間煮沸する。内容物をすぐにガーゼでこし、水を補って 1 l とし、ブドウ糖 20 g と寒天 25 g を加えて、フラスコ 2000 cc に入れ、沸騰する水浴中で熱して、内容物を十分に溶解したのち湿熱殺菌する。高圧法の場合の圧力および時間は 1.4~1.6 kg/cm²（または 126~129°C）30 分間とする。

バレイショ汁寒天培養基は作ってから 1 カ月以上過ぎたものは用いてはならない。

3.4.2 斜面培養基 乾熱殺菌した試験管 15 mm の中にあらかじめ温めて溶解した 3.4.1 のバレイショ汁寒天培養基を約 6 cc 注ぎ、元のように綿センをしてから湿熱殺菌する。高圧法の場合の圧力および時間は 1.4~1.6 kg/cm²（または 126~129°C）30 分間とする。

殺菌が終わったならば清浄な室内に試験管を水平面と約 15 度傾けて置き、内容物を凝固させる。

斜面培養基は作ってから 1 カ月以上過ぎたものは用いてはならない。

3.4.3 平板培養基 両手のそでをそれぞれひじまできまり、0.1% 昇コウ水に浸したガーゼで丁寧に両手、両腕をぬぐう⁽⁶⁾。無菌箱⁽⁶⁾の内部全面に 0.1% 昇コウ水を噴霧器で吹きかける。乾熱殺菌を終わったペトリーサラ 90 mm を無菌箱の外でフタを上にしたまま紙を破り手早く中に入れる。培養基⁽⁷⁾を入れた別の容器は温めて培

注 (1) 和紙の手スキアブラ入紙または洋紙の上ザラ 45 ポンドまたは上質 50 ポンド程度のものを標準とする。

(2) 乾熱殺菌が終わったのち綿センまたは紙が水または培養基などでぬれたときはその器具を試験に使ってはならない。

(3) 水蒸気を吹き込んで加熱するオートクレープまたはコッホ氏蒸気殺菌器には底に清水を入れない。したがってこの場合は中の清水は沸騰しない。

(4) 圧力をはかる代りに内部の水蒸気の温度をはかり指定の温度に保ってもさしつかえない。

養基をとかし、底および側面を 0.1% 昇コウ水でぬぐい綿センを約 5 mm 抜きゆるめ火炎にあてて外側を焼き同時に器具のクビ部をも火炎で少し加熱し、必要に応じて 0.1% 昇コウ水でぬぐったガラス棒でおさえて綿センの火を消したのち無菌箱の中に入れる。無菌箱に両手を入れ、培養基を入れた容器の綿センをとり、メスシリンダー⁽⁸⁾で培養基を 25cc はかり、ペトリーサラのフタを少しあけて、これを注ぎ、すぐにペトリーサラのフタをする。ペトリーサラは無菌箱から取り出し水平に置いて培養基を凝固させる。

平板培養基は作ってから 2 日以上過ぎたものは用いてはならない。

3.5 カビの保存と使用

3.5.1 カビの保存 カカビの移植は断りのないかぎり無菌箱の中で行う。無菌箱の使用は 3.4.3 の方法に準ずる。試験管のガラス部分は 0.1% の昇コウ水に浸したガーゼでぬぐい、綿センは火炎で焼き試験管のクビ部はさらに火炎で加熱してから、また白金耳の柄は 0.1% 昇コウ水でぬぐい白金線は火炎殺菌してから無菌箱に入れる。片手に元株と移植しようとする 3.4.2 の斜面培養基を、他の手に白金耳を持って綿センを抜きとり、カビの元株の胞子を 5 白金耳とり斜面培養基の表面にすりつけ、元のように綿センをして外に取り出す。白金耳は異ったカビを移植するごとに火炎殺菌する。移植された斜面培養基は温度 25~28°C に保った場所に置いて 10~20 日間培養し、そののちは温度 0~15°C に保った場所に置いて保存する。移植してから 3 カ月以内に培養面から胞子を 5 白金耳とり新しい斜面培養基に移植して同様に培養保存し、3 カ月以内ごとにこれを繰返す。

移植してから 3 カ月以上過ぎたものはつぎの移植に用いてはならない。

3.5.2 カビの使用 3.6 の胞子懸濁液および 8.4 のライスフラスコの調製に用いるカビは 3.5.1 によって保存されたカビを、新しい斜面培養基に移植し温度 25~28°C に保った場所に置いて、第 1 群 (5) については 20 日間、その他については 10 日間培養したのち第 1 群 (5) については 30 日間以内に、その他については 10 日間以内に使用するものとする。

3.6 胞子懸濁液

3.6.1 湿潤剤添加殺菌水の調製 スルホコハク酸ジオクチルナトリウム (Dioctyl sodium sulfosuccinate)⁽⁹⁾ を清水に 0.005% 加えて溶かしたのち、乾熱殺菌した三角フラスコ 50 cc に 10 cc 入れ湿熱殺菌する。高圧法の場合の圧力および時間は 1.1~1.3 kg/cm² (または 122~125°C) で 20 分間とする。

3.6.2 単一胞子懸濁液の調製 3.5.2 によって作られた斜面培養から無菌箱の中で胞子を 5 白金耳採り 3.6.1 の湿潤剤添加殺菌水に加える。三角フラスコは元のように綿センをし無菌箱の外にとり出し、激しく振り動かして胞子を十分に分散させる。内容物を清潔なガーゼでこし、ロ液を単一胞子懸濁液とし、別の三角フラスコ 50 cc に受けてセンをしておく。

単一胞子懸濁液は調製したのち、24 時間以上過ぎたものは試験に用いてはならない。

3.6.3 混合胞子懸濁液の調製 三角フラスコ 100 cc に幾種かの 3.6.2 単一胞子懸濁液を等容量ずつ採り、混合してこれを混合胞子懸濁液とする。

混合胞子懸濁液は三角フラスコに入れてセンをしておく。

混合するカビの種類はそれぞれの試験の項で指定する。

混合胞子懸濁液は単一胞子懸濁液を調製したのち 24 時間以上過ぎたものは試験に用いてはならない。

3.6.4 胞子懸濁液の確認 試験の際には 3.4.1 のパレイショ汁寒天培養基を用いて平板培養基を作り、その試験に用いるカビの胞子懸濁液 1 cc を培養面に均等にまきかけ、フタをして試料と同じ温度を保った場所に置いて平行して培養する。第 1 群 (5) の単一胞子懸濁液については 20 日間、その他のカビの単一または混合胞子懸濁液 (第 1 群 (5) を含むものを含む) については 5~10 日間ののちに培養面を調べ、菌糸が全面に密に

注 (5) 両手および腕の殺菌はなるべくたびたび行う。

(6) 無菌箱の戸は常に閉じておく。開らく必要のあるときは開らし方をなるべく小さくし、手早く閉じるようにする。無菌箱の内部に昇コウ水を吹きかけたのちは、昇コウ水でぬぐったものか、または火炎殺菌かアルコール殺菌をしたもののほかは入れてはならない。

(7) 培養基の種類および組成はそれぞれの項で指定する。

(8) メスシリンダーは、あらかじめアルコール殺菌し、同じ方法で殺菌したガーゼをしぼって付着しているアルコールをぬぐいとり、直ちに無菌箱に入れておいて使用する。

(9) 参考 2 を見ること。

繁殖していないときは、この孢子懸濁液を用いて行った試験は効果が無いものとする。

試験の効果がなかった場合には、別の斜面培養の孢子で孢子懸濁液を作り再試験を行う。

4. 試験の通則

4.1 試料・器具・材料の取扱方法 この試験に用いる試料・器具・材料は清潔なビンセットまたは清潔な手で取り扱い、その際汚れ、傷つきなどのないように十分注意しなければならない。

4.2 培養試験

4.2.1 培養 試料をそれぞれの規定に従って処理し、規定のカビを接種したのち、規定の条件に保って培養する。

4.2.2 接種 試料にカビを接種するには、孢子懸濁液を噴霧器またはピペットで試料の表面に均等にまきかける。ただし繊維製品についての乾式法および被覆電線についてはそれぞれ規定された方法による。

4.3 試験結果の表示

4.3.1 試験結果の調査 4.2.1 の培養の結果、試料の表面に生じた菌糸の発育状態を肉眼でしらべる。ただし被覆電線においては 8.5.4 の方法により表面漏エィ抵抗および耐電圧を測定する。

4.3.2 試験結果の表示方法 試験結果の表示方法は表 1 のとおりとする。

ただし繊維製品についての乾式法および被覆電線を除く。

表 1 試験結果の表示方法

菌 糸 の 発 育	カビ抵抗性の表示
試料の接種した部分に菌糸の発育が認められない。	3
試料の接種した部分に認められる菌糸の発育部分の面積は、全面積の 1/3 をこえない。	2
試料の接種した部分に認められる菌糸の発育部分の面積は、全面積の 1/3 をこえる。	1

5. 一般工業製品の試験

5.1 適用範囲 この箇条はつぎの工業製品を試験する場合について規定する。

電気機器……ラジオ・通信機器・電動機など
計測機器……圧力計・測量機械・羅針盤など
光学機器……顕微鏡・双眼鏡・写真機など
木竹製品……計算尺・包装材料・スダレなど
合成樹脂製品……成型品・シート・管など

5.2 試験方法 試料をそのまま、またはこれを部品に解体したのち、その全表面または指定した部分に 5.3 に規定する混合孢子懸濁液をまきかける。まきかける量は試料の見かけの表面積 $30 \times 30 \text{ mm}$ に対して 0.5 cc の割合とする。まきかけたのち温度 $28 \pm 2^\circ \text{C}$ 、湿度 $95 \pm 5\%$ に保った場所に置いて、5.3 に規定した期間培養する。

5.3 試験用のカビおよび培養期間 試験に用いる孢子懸濁液のカビの種類と培養試験の期間とは、表 2 のとおりとする。

表 2 一般工業製品の試験におけるカビの種類と培養期間

種 別	カビの種類	培養試験の期間
電 気 機 器 計 測 機 器 光 学 機 器 合 成 樹 脂 製 品 木 竹 製 品	第 1 群の (1)	4 週 間
	第 2 群の (1)	
	第 3 群の (1)	
	第 4 群の (1)	
	第 5 群の (1)	2 週 間
ガ ラ ス 製 部 品	第 1 群の (1) および (5)	
	第 2 群の (1)	4 週 間
	第 3 群の (1)	
	第 4 群の (1)	
	第 5 群の (1)	

(未 完)