

$$V_o(\text{ml}) = (V - v) \times \frac{P - p}{101} \times \frac{273}{273 + t}$$

ただし、P：測定時における大気圧 (kPa)

p：t℃における水の蒸気圧 (kPa)

### 31. pH測定法

pHは、ガラス電極によるpH計を用いて測定する。

pHは、基本的には溶液中の水素イオン活量を表す値であり、次式で定められている。この値は、希薄溶液においては溶液中の水素イオン濃度をその逆数の常用対数で示した値とかなりよく一致する。

$$\text{pH} = \text{pH}_s + \frac{E - E_s}{2.3026R T/F}$$

pH<sub>s</sub>: pH標準液のpH値

E：試料の液の中でガラス電極と比較電極を組み合わせた電池の起電力(ボルト)で、電池の構成は、次に示される。

ガラス電極 | 試料の液 || 比較電極

E<sub>s</sub>: pH標準液中でガラス電極と比較電極を組み合わせた電池の起電力(ボルト)で、電池の構成は、次に示される。

ガラス電極 | pH標準液 || 比較電極

R：気体定数

T：絶対温度

F：ファラデー定数

各温度における2.3026R T/Fの値(ボルト)は、右の表のとおりである。

液 温	2.3026RT/F	液 温	2.3026RT/F
5℃	0.05519	35℃	0.06114
10℃	0.05618	40℃	0.06213
15℃	0.05717	45℃	0.06313
20℃	0.05817	50℃	0.06412
25℃	0.05916	55℃	0.06511
30℃	0.06015	60℃	0.06610

以下、本試験法を用いる場合において、例えば、pH6.0～7.5 (1.0, 水20ml)と規定する場合は、本品1.0gを量り、水20mlを加えて溶かした液のpHが、6.0～7.5であることを示す。

#### pH標準液の調製

pH標準液は、pHの基準として用いる。pH標準液の調製に用いる水は、精製水を蒸留し、留液を15分以上煮沸し、二酸化炭素を追い出した後、二酸化炭素吸収管(ソーダ石灰)を付けて冷却する。pH標準液は、硬質ガラス瓶又はポリエチレン瓶に保存する。長期間の保存によってpHが変化することがあるから、通例、酸性のpH標準液は、3か月以内に使用し、塩基性のpH標準液は、二酸化炭素吸収管(ソーダ石灰)を付けて保存し、1か月以内に使用する。

シュウ酸塩pH標準液 pH測定用四シュウ酸カリウムを粉末とし、デシケーターで乾燥した後、その12.71gを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に1,000mlとする。

フタル酸塩pH標準液 pH測定用フタル酸水素カリウムを粉末とし、110℃で恒量になるまで乾燥した後、その10.21gを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に1,000mlとする。

リン酸塩pH標準液 pH測定用リン酸一カリウム及びpH測定用無水リン酸二ナトリウムを粉末とし、110℃で恒量になるまで乾燥した後、リン酸一カリウム3.40g (0.025グラム分子量)及びリン酸二ナトリウム3.55gを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に1,000mlとする。

ホウ酸塩pH標準液 pH測定用ホウ酸ナトリウムをデシケーター（水で潤した臭化ナトリウム）中に放置し、恒量とした後、その3.81gを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に1,000mlとする。

炭酸塩pH標準液 pH測定用炭酸水素ナトリウムをデシケーターで恒量になるまで乾燥する。その2.10gを正確に量る。pH測定用炭酸ナトリウムを300～500℃で恒量になるまで乾燥し、その2.65gを正確に量る。両者を合わせ、水を加えて溶かし、正確に1,000mlとする。

水酸化カルシウムpH標準液 pH測定用水酸化カルシウムを粉末とし、その5gをフラスコに入れ、水1,000mlを加え、よく振り混ぜ、23～27℃とし、十分に飽和した後、その温度で上澄液をろ過し、澄明なろ液（約0.02mol/l）を用いる。

これらのpH標準液の各温度におけるpH値を次の表に示す。この表にない温度のpH値は、表の値から内挿法により求める。

温度	シュウ酸塩 pH標準液	フタル酸塩 pH標準液	リン酸塩 pH標準液	ホウ酸塩 pH標準液	炭酸塩 pH標準液	水酸化カルシウム pH標準液
0℃	1.67	4.01	6.98	9.46	10.32	13.43
5℃	1.67	4.01	6.95	9.39	10.25	13.21
10℃	1.67	4.00	6.92	9.33	10.18	13.00
15℃	1.67	4.00	6.90	9.27	10.12	12.81
20℃	1.68	4.00	6.88	9.22	10.07	12.63
25℃	1.68	4.01	6.86	9.18	10.02	12.45
30℃	1.69	4.01	6.85	9.14	9.97	12.30
35℃	1.69	4.02	6.84	9.10	9.93	12.14
40℃	1.70	4.03	6.84	9.07		11.99
50℃	1.71	4.06	6.83	9.01		11.70
60℃	1.73	4.10	6.84	8.96		11.45

#### pH計の構造

pH計は、通例、ガラス電極及び比較電極からなる検出部と、検出された起電力に対応するpHを指示する指示部からなる。指示部には非対称電位調整用及び温度補償用つまみがあり、また感度調整用つまみを備えるものがある。

pH計は、次の操作法に従い、任意の種類のpH標準液のpHを、毎回検出部を水でよく洗った後、5回繰り返し測定するとき、その再現性が±0.05以内のものを用いる。

#### 操作法

ガラス電極は、あらかじめ水に数時間以上浸しておく。pH計は、電源を入れて5分間以上たってから使用する。検出部をよく水で洗い、付着した水は、ろ紙などで軽くふきとる。1点で調整する場合は、温度補償用つまみをpH標準液の温度と一致させ、検出部を試料の液のpH値に近いpH標準液中に浸し、2分間以上たってからpH計の指示が、その温度におけるpH標準液のpHになるように非対称電位調整用つまみを調整する。2点で調整する場合は、まず温度補償用つまみを液温に合わせ、通例、リン酸塩pH標準液に浸し、非対称電位調整用つまみを用いてpHを一致させ、次に試料の液のpH値に近いpH標準液に浸し、感度調整用つまみ又は標準液の温度にかかわらず温度補償用つまみを用いて同様に操作する。

以上の調整が終われば検出部をよく水で洗い、付着した水は、ろ紙などで軽くふき取った後、試料の液に浸し、測定値を読み取る。

## 操作上の注意

- (1) pH計の構造及び操作法の細部は、それぞれのpH計によって異なる。
- (2) pH11以上で、アルカリ金属イオンを含む液は、誤差が大きいので、アルカリ誤差の少ない電極を用い、更に必要な補正を行う。
- (3) 試料の液の温度は、pH標準液の温度と等しいことが望ましい。

## 32. 比重測定法

比重とは、物質の質量とその物質と等体積の標準物質の質量との比をいう。本試験法では比重 ( $d_t^t$ ) とは、試料と蒸留水とのそれぞれ  $t'$  °C、 $t$  °C における等体積の垂質量比をいい、単に比重と記載した場合は、別に規定するもののほか、試料と蒸留水との20°Cにおける等体積の垂質量比 ( $d_{20}^{20}$ ) をいう。比重の測定は、別に規定するもののほか、第1法、第2法又は第4法を用い、数値に約を付記してある場合は、第3法を用いてもよい。

### 第1法 比重瓶（ピクノメーター）による測定法

比重瓶は、通例、容量10～100mlの瓶で、温度計付きのすり合わせの栓と、標線及びすり合わせのふたのある側管とがある。

あらかじめ清浄にし、乾燥した比重瓶の垂質量 ( $W$ ) を精密に量る。次に栓とふたを取り、試料を満たして規定温度 ( $t'$  °C) より1～3°C低くし、泡が残らないように注意して栓をする。次に徐々に温度をあげ、温度計が規定の温度を示したとき、標線より上部の試料を側管から除き、側管にふたをする。次に外部をよくふいた後、垂質量 ( $W_1$ ) を精密に量る。さらに、同じ比重瓶で蒸留水を用いて同様に操作し、その規定温度 ( $t$  °C) における垂質量 ( $W_2$ ) を精密に量り、次式により比重 ( $d_t^t$ ) を求める。

$$d_t^t = \frac{W_1 - W}{W_2 - W}$$

### 第2法 シュプレングル・オストワルドピクノメーターによる測定法

シュプレングル・オストワルドピクノメーター (図) は、通例、容量1～10mlで、両端は、肉厚細管となっており、その一方の細管Aには標線Cがある。これにひょう量るとき、化学はかりのかぎに掛けるように白金線D (又はアルミニウム線などでもよい。) を付ける。

あらかじめ清浄にし、乾燥したピクノメーターの垂質量 ( $W$ ) を精密に量る。次に規定温度より3～5°C低くした試料中に標線のない方の細管Bを浸し、他方の細管Aにはゴム管又はすり合わせの細管を付けて、泡が入らないように注意しながら試料を標線Cの上まで静かに吸い上げる。次に規定温度 ( $t'$  °C) に保った水浴中にピクノメーターを15分間浸した後、細管Bの端にろ紙片を当て、試料の端を標線と一致させる。次に水浴から取り出し、外部をよくふいた後、垂質量 ( $W_1$ ) を精密に量る。更に同じピクノメーターで蒸留水を用いて同様に操作し、その規定温度 ( $t$  °C) における垂質量 ( $W_2$ ) を精密に量り、次式により比重 ( $d_t^t$ ) を求める。

$$d_t^t = \frac{W_1 - W}{W_2 - W}$$

### 第3法 浮きばかりによる測定法

規定温度用の浮きばかりで、要求される精度をもつものを用いる。浮きばかりは、エタノール又はエーテルで清浄にして用いる。

試料をよく振り混ぜ、泡がなくなってから浮きばかりを浮かべ、規定された温度において浮きばかりが静止したとき、メニスカスの上端で比重を読む。ただし、読み方が規定してある浮きばかりの場合にはその方法に従う。

### 第4法 振動式密度計による測定法

振動式密度比重計による比重の測定は、液体又は気体試料を含むセルの固有振動周期 $T$ (s)を測定することにより、試料の密度を求め、標準物質の質量から比重を求める方法である。密度を測定しようとする液体又は気体を導入された試料セルに振動を与えると、試料セルは試料の質量に依存した固有振動周期をもって振動する。試料セルの振動する部分の体積を一定とすれば、そのときの固有振動周期の二乗と試料の密度との間には直線関係が成立する。

本法によって試料の密度を測定するためには、あらかじめ、規定温度 $t'$ °Cにおいて二種類の標準物質(密度 $\rho_{s1}$ 、 $\rho_{s2}$ )につき、それぞれの固有振動周期 $T_{s1}$ 及び $T_{s2}$ を測定し、試料セル定数 $K_{t'}$ ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}\text{s}^{-2}$ )を次式より定めておく必要がある。

$$K_{t'} = \frac{\rho_{s1}^{t'} - \rho_{s2}^{t'}}{T_{s1}^2 - T_{s2}^2}$$

通例、標準物質として水及び乾燥空気が用いられる。温度 $t'$ °Cにおける水の密度 $\rho_{s1}^{t'}$ は別表より求め、乾燥空気の密度 $\rho_{s2}^{t'}$ は次式より計算する。ただし乾燥空気の気圧を $p$  kPaとする。

$$\rho_{s2}^{t'} = 0.0012932 \times \{273.15 / (273.15 + t')\} \times (p/101.325)$$

次にセル定数が定められた試料セルに試料を導入し、同様にして試料の固有振動周期 $T_T$ を測定すれば、先に求めた標準物質の固有振動周期 $T_{s1}$ 及び規定温度 $t'$ °Cにおける水の密度 $\rho_{s1}^{t'}$ を用い、次式より試料の密度 $\rho_T^{t'}$ を求めることができる。

$$\rho_T^{t'} = \rho_{s1}^{t'} + K_{t'} (T_T^2 - T_{s1}^2)$$

温度 $t$ °Cの水に対する試料の比重 $d_t^t$ は、別表に示した温度 $t$ °Cの水の密度 $\rho_{s1}^t$ を用いて次式より求められる。

$$d_t^t = \rho_T^t / \rho_{s1}^t$$

### 装 置

振動式密度比重計は、通例、内容積約1mlの管状でその一端を固定したガラス製の試料セルに初期振動を与える発振器、固有振動周期の検出部及び温度調節部から構成される。振動式密度比重計の試料セル室周辺の構造を図に示す。

### 操 作 法

試料セル、水及び試料を測定温度 $t'$ °Cにあらかじめ調製しておく。試料セルを水又は適当な溶媒を用いて洗浄した後、乾燥空気を通気して十分に乾燥する。乾燥空気の流れを止め、一定温度が保持されていることを確認した後、乾燥空気の与える固有振動周期 $T_{s_2}$ を測定する。別に、測定場所の大気圧 $p$  kPaを測定しておく。次に試料セルに水を導入し、水の与える固有振動周期 $T_{s_1}$ を測定する。水及び乾燥空気についてのこれらの値を用いて試料セル定数 $K_t$ を定める。

次に試料セル中に試料を導入し、一定温度が保持されていることを確認した後、試料の与える固有振動周期 $T_T$ を測定する。水及び試料の固有振動周期、水の密度 $\rho_{s1}^t$ 並びに試料セル定数 $K_t$ より、試料の密度 $\rho_T^t$ を求める。また、必要があれば、温度 $t$ °Cの水に対する試料の比重 $d_t^t$ は、表に示した水の密度 $\rho_{s1}^t$ を用いて計算される。

なお、試料セル中に試料又は水を導入するとき、気泡が入らないよう注意する必要がある。

温度(°C)	密度(g/cm <sup>3</sup> )	温度(°C)	密度(g/cm <sup>3</sup> )	温度(°C)	密度(g/cm <sup>3</sup> )	温度(°C)	密度(g/cm <sup>3</sup> )
0	0.99984	10	0.99970	20	0.99820	30	0.99565
1	0.99990	11	0.99961	21	0.99799	31	0.99534
2	0.99994	12	0.99950	22	0.99777	32	0.99503
3	0.99996	13	0.99938	23	0.99754	33	0.99470
4	0.99997	14	0.99924	24	0.99730	34	0.99437
5	0.99996	15	0.99910	25	0.99704	35	0.99403
6	0.99994	16	0.99894	26	0.99678	36	0.99368
7	0.99990	17	0.99877	27	0.99651	37	0.99333
8	0.99985	18	0.99860	28	0.99623	38	0.99297
9	0.99978	19	0.99841	29	0.99594	39	0.99259

### 33. 微生物限度試験法

微生物限度試験法は、試料中に存在する増殖能力を有する特定の微生物の定性試験及び定量試験に用いる。本試験法には、生菌数試験（細菌及び真菌）及び大腸菌試験が含まれる。試験を行うに当たっては、外部からの微生物汚染が起こらないように、細心の注意を払う必要がある。また、被検試料が抗菌作用を有する場合又は抗菌作用を持つ物質が混在する場合は、希釈、ろ過、中和又は不活化などの手段によりその影響を除去しなければならない。それぞれの原料又は製品の任意に選択した異なる数箇所から採取したものを混和し、試料として試験を行う。試料を液体培地で希釈する場合は、速やかに試験を行う。また、本試験を行うに当たっては、効果的な精度管理を確保するとともにバイオハザード防止に十分留意する。

#### 1. 生菌数試験

本試験は、好氣的条件において増殖し得る中温性の細菌及び真菌を測定する試験である。本試験では、低温菌、高温菌、好塩菌、嫌気性菌、特殊な成分を増殖に要求する菌等は、大量に存在していても陰性となることがある。本試験法には、メンブランフィルター法、~~ろ過法~~平板混釈法、~~ろ過法~~平板表面塗抹法及び液体培地段階希釈法（最確数法）の4つの方法がある。試験を行うときは、その目的に応じて適当と思われる方法を用いる。なお、ここに示した方法と同等以上の検出感度及び精度を有する場合は、自動化した方法の適用も可能である。細菌と真菌（かび及び酵母）では使

用培地及び培養温度が異なる。液体培地段階希釈法（最確数法）は細菌のみに用い得る試験法である。

#### 試料溶液の調製

試料の溶解又は希釈には、リン酸緩衝液（pH7.2）、ペプトン食塩緩衝液又は使用する液体培地を用いる。別に規定するもののほか、試料は10g又は10mlを使用する。ただし、試料の性質によっては、これと異なる量のものを使用しなければならない場合がある。試料溶液は、pH6～8に調整する。試料溶液は調製後1時間以内に使用しなければならない。

液状製剤及び可溶性固形剤：10g又は10mlを量り、上記の緩衝液又は液体培地と混和して100mlとし、試料溶液とする。不溶性物質を含む液剤の場合、混和直前によく振り、十分に均一化する。

不溶性固形剤：10gを量り、不溶性物質をできるだけ細かく摩砕して、上記の緩衝液又は液体培地中に分散させて100mlとし、試料溶液とする。ただし、試料の性質によっては、規定された量よりも大量の緩衝液又は液体培地で分散させても差し支えない。必要に応じてブレンダーなどで浮遊液を均一に分散させることも可能である。適当な界面活性剤（例えば、0.1w/v%ポリソルベート80）を加えて均一に乳化させてもよい。

脂質製品：脂質が主要な構成物質である半固形剤及び液剤などは10g又は10mlを量り、ポリソルベート20又はポリソルベート80のような界面活性剤を用いて、上記の緩衝液又は液体培地中に乳化させて100mlとし、試料溶液とする。この場合45℃以下の温度であれば加温して乳化させてもよい。ただし、30分間以上試料を加温してはならない。

#### 操作法

##### (1) メンブランフィルター法

本試験法は、試料に抗菌性物質が含まれる場合にこれを除去して試験する方法である。メンブランフィルターは、孔径0.45µm以下の適当な材質のものを使用する。フィルターの直径は約50mmのものが望ましいが、異なる直径のものも使用できる。フィルター、フィルター装置、培地などはすべて十分に滅菌されていなければならない。通例、20mlの試料溶液を量り、2枚のフィルターで10mlずつろ過する。必要に応じて試料溶液を希釈してもよい。菌濃度が高い場合は、1枚のフィルター当たり10～100個の集落が出現するように希釈することが望ましい。試料溶液をろ過した後、各フィルターは、ペプトン食塩緩衝液、リン酸緩衝液又は使用する液体培地などを洗浄液として用いて、3回以上ろ過洗浄する。1回のろ過洗浄に使用する洗浄液の量は約100mlとするが、フィルターの直径が約50mmと異なる場合には、大きさに従って洗浄液の量を調整する。脂質を含む試料の場合には、洗浄液にポリソルベート80などを添加してもよい。ろ過後、細菌の試験を行うときはソイビーン・カゼイン・ダイジェスト・カゼイン・寒天培地、真菌の試験を行うときは、通常抗生物質を添加した、サブロー・ブドウ糖・カゼイン・寒天培地、ポテト・デキストロース・カゼイン・寒天培地又はGP・カゼイン・寒天培地のいずれかの表面にフィルターを置く。なお、水分活性の低い食品で発生しやすい好乾菌（乾燥した条件を好むもの）を対象とする場合には、真菌用の培地としてM10Y寒天培地、ジケロラン・グリセロール（DG18）寒天培地等を用いる。細菌の試験は30～35℃で、真菌の試験は20～25℃でそれぞれ少なくとも5日間培養後、集落数を計測する。信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養後5日以前の計測値を用いてもよい。

##### (2) 希釈平板混釈法

本試験法では、直径9～10cmのペトリ皿を使用する。一希釈段階につき2枚以上の希釈培地を使用する。1mlの試料溶液又は試料を希釈した液を無菌的にペトリ皿に分注する。これにあらかじめ45℃以下に保温されて融けた状態にある滅菌した希釈培地15～20mlを加えて混和する。希釈培地としては、細菌の検出を目的とする場合はソイビーン・カゼイン・ダイジェス

トウモロコシ寒天培地を、真菌の検出を目的とする場合は、通常抗生物質を添加し、サブロー・ブドウ糖寒天培地、ポテト・デキストロース寒天培地又はGP寒天培地のいずれかを使用する。なお、水分活性の低い食品で発生した真菌(乾燥した条件を含む)を対象とする場合には、真菌用の培地としてWHY寒天培地、ゾウロウシ・アミゼン・ブドウ糖寒天培地等を用いる。培地の固化後、細菌の試験は30～35℃、真菌の試験は20～25℃で少なくとも5日間培養する。多数の集落が出現するときは、細菌の場合は一平板当たり300個以下の集落を持つ平板から、真菌の場合は一平板当たり100個以下の集落を持つ平板から得られる計測結果を用いて生菌数を算出する。信頼性の高い集落数の計測値が得られたと判断される場合に限り、培養後5日以前の計測値を用いてもよい。

(3) カンゼン寒天平板表面塗抹法

本試験法は、固化させ表面を乾燥させたカンゼン寒天培地上に0.05～0.2mlの試料溶液を載せ、コンラージ棒などで均等に塗抹する方法である。ペトリ皿、使用カンゼン寒天培地、培養温度、培養時間、生菌数算出法等は、カンゼン寒天平板混釈法と同様である。

(4) 液体培地段階希釈法（最確数法）

本試験法では、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地を、9.1mlの試験管の器具に10ml入れた試験管を4本使用する。試料液(試料10倍希釈液)をさらに10倍段階希釈し、試料100倍及0.1000倍希釈液を調製する。各希釈段階において、0.10mlの培地が入った3本の試験管をそれぞれに接種する。接種の試験管を本それぞれに1mlの試料希釈液を加えて10倍希釈試験管とする。次は、10倍希釈試験管をそれぞれから1計をとり、3本の試験管をそれぞれに混和し、100倍希釈試験管とする。さらには100倍希釈試験管をそれぞれから1計をとり、3本の試験管をそれぞれに混和し、1,000倍希釈試験管とする。10mlの培地が入った残りの4本の試験管は、対照として用いる。これらの試験管は30～35℃で5日間以上培養する。対照の試験管で微生物の増殖が観察されてはならない。結果の判定が難しい場合又はあいまいな結果の場合は、カンゼン寒天培地又は液体培地に約0.1mlを移植し、30～35℃で24～72時間培養し、増殖の有無を判定する。表から1g又は1ml当たりの最確数を求める。

下記の量の試料を加えた場合に 微生物の増殖が観察された試験管の数			試料 1g (又は 1ml) 当たりの微生物 の最確数	95%信頼限界
試験管当たり 0.1g (又は 0.1ml)	試験管当たり 0.01g (又は 0.01ml)	試験管当たり 1mg (又は 1μl)		
0	0	0	<3	0-0.1
0	0	1	3	0.1-0.5
0	1	0	3	0.1-10
0	1	1	6.3	1.3-17
0	2	0	6.3	1.3-17
0	3	0	11.1	3.3-35
1	0	0	3.6	0.3-17
1	0	1	7.2	1.2-17
1	0	2	11	1.35
1	1	0	7.1	1.1-20
1	1	1	11	1.35

1	2	0	11	4-35
1	2	1	15	5-38
1	3	0	16	5-38
2	0	0	9-2	1,5-35
2	0	1	14	4-35
2	0	2	20	5-38
2	1	0	13	4-38
2	1	1	20	5-38
2	1	2	27	9-91
2	2	0	21	5-40
2	2	1	23	9-91
2	2	2	35	9-91
2	3	0	29	9-91
2	3	1	36	9-91
3	0	0	23	5-91
3	0	1	38	9-104
3	0	2	64	16-181
3	1	0	43	9-181
3	1	1	75	17-199
3	1	2	120	30-360
3	1	3	150	30-380
3	2	0	93	18-360
3	2	1	150	30-380
3	2	2	210	30-400
3	2	3	290	30-990
3	3	0	240	40-990
3	3	1	460	90-1,980
3	3	2	1,100	200-4,000
3	3	3	2,100	

本品の量の試料を加える場合に微生物の増殖が観察された試験管の数			試料1.0g又は1.0ml当りの微生物の増殖数
試験管当りの 0.1cc又は0.1ml	試験管当りの 0.01cc又は0.01ml	試験管当りの 1.0cc又は1.0ml	
3	3	3	>1100
3	3	3	1100
3	3	1	500
3	3	0	200
3	2	3	200
3	2	2	210
3	2	1	150
3	2	0	90
3	1	3	160
3	1	2	120
3	1	1	70
3	1	0	40
3	0	3	95
3	0	2	60
3	0	1	40
3	0	0	23

#### 培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

*Escherichia coli* (NBRC 3972, ATCC 8739, NCI MB 8545), *Bacillus subtilis* (NBRC 3134, ATCC 6633, NCI MB 8054), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (NBRC 13276, ATCC 6538, NCI MB 9518862E), *Candida albicans* (NBRC 1594, ATCC 2091, ATCC 10231), *Aspergillus niger* (NBRC 0455, ATCC 16401) 又はこれらと同等と考えられる菌株を使用する。細菌はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地を用い、細菌は30から～35°Cで18～24時間、*Candida albicans* はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地、セブリン・ブドウ糖培地又はセブリン・ブドウ糖寒天培地を用い、20～25°Cで2～3日間、*A. niger* はセブリン・ブドウ糖寒天培地又はセブリン・ブドウ糖寒天培地を用い、20～25°Cで5～7日間培養する。

培養液のそれぞれをペプトン食塩緩衝液又はリン酸緩衝液で希釈し、1ml 当たり 50～200 個 (*A. niger* は 10～100 個) 前後の生菌を含む菌液を調製する。*A. niger* の孢子を懸濁する場合、希釈液に 0.05%の牛乳ソルベート 80 を加えてもいい。調製した菌液は2時間以内又は冷蔵保存した場合にも24時間以内に使用する。また、*B. subtilis* や *A. niger* は安定な孢子液を使用してもいい。使用する培地は、菌液を 1ml 接種し、指定された温度で5日間培養したときに、十分な増殖及び接種菌数の回収が認められなければならない。試料が存在下と存在下での菌数の差異が試料存在下での菌数の 1/5 以下又は5倍以上の場合、希釈、ろ過、中和、不活化等の手段によってその影響を除去しなければならない。培地、希釈液の無菌性並びに試験が無菌的に遂行されているかを検証するため

に、使用したペプトン食塩緩衝液又はリン酸緩衝液を対照とする。

## 2. 大腸菌試験

本試験は、大腸菌 (*Escherichia coli*) を測定する試験である。本試験で検出の目的とする大腸菌は、最終製品だけではなく、原料、製造工程の中間体等における微生物汚染を評価する場合に重要であり、それらの中に存在することは好ましくない。

### 試料溶液の調製

別に規定するもののほか、生菌数試験の試料溶液の調製の項を適用する。試料の溶解又は希釈に液体培地を使用する場合は、別に規定するもののほか、乳糖ブイヨン培地又はBGLB培地を使用する。

### 試験の手順

試料液10g又は10ml (試料1g又は1ml相当量) を量り、乳糖ブイヨン培地又はBGLB培地を加えて100mlとし、30～35℃で24～72時間培養する。増殖が観察された場合は、培養液を軽く振った後、白金耳等でとり、マッコンキー寒天メチレン培地上に塗抹し、30～35℃で18～24時間培養する。周囲に赤味がかかった沈降線の帯を持つ赤レンガ色のグラム陰性菌の集落を検出されない場合は、大腸菌陰性と判定する。上記の特徴を持つ集落が検出された場合は、EMB寒天メチレン培地上にそれぞれの集落を塗抹し、30～35℃で18～24時間培養する。EMB寒天メチレン培地上で金属光沢を持つ集落又は透過光下で青黒色を帯びた集落が観察されない場合は大腸菌陰性と判定する。上記の平板で大腸菌が疑われる集落については、IMViC試験 (インドール産生試験, メチルレッド反応試験, フォーガス・プロスカウエル試験及びクエン酸利用試験) 及び44.5℃での生育試験を行い、IMViC試験のパターンが「+---」で44.5℃での生育が陽性表に示す①及び②の結果の場合を大腸菌と判定する。また、大腸菌迅速同定用キットの使用も可能である。

	インドール産生試験	メチルレッド反応試験	フォーガス・プロスカウエル試験	クエン酸利用試験
①	陽性	陽性	陰性	陰性
②	陰性	陽性	陰性	陰性

### 培地の性能試験及び発育阻止物質の確認試験

試験には、*Escherichia coli* (NBRC 3973, ATCC 8739, NCIMB 8545) 又はこれらと同等の菌株を、乳糖ブイヨン培地、ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地又はソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地を用い、44.5℃で30～35℃で18～24時間培養して使用する。次に、ペプトン食塩緩衝液、リン酸緩衝液、乳糖ブイヨン培地等を用いて、1ml当たり約1,000個の生菌を含む溶菌液を調製する。必要に応じて、約1,000個/mlの生菌を含む大腸菌の菌液0.1mlを混和して、試料の存在下及び非存在下において、培地の有効性、抗菌性物質の存在等を試験する。

### 再試験

不確定な結果やあいまいな結果が得られた場合は、初回の2.5倍量の試料25g又は25mlを用いて再試験を行う。方法は最初の試験法と同じであるが、試料の増加に比例して、培地などの量を増加させて行う。

## 3. 緩衝液と培地

微生物限度試験用の緩衝液及び培地は次のものを用いる。他の培地でも類似の栄養成分を含み、試験対象となる微生物に対して類似の選択性及び増殖性を持つものは使用して差し支えない。

### (1) 緩衝液

#### (i) リン酸緩衝液 (pH7.2)

保存溶液：リン酸一カリウム34gを水約500mlに溶かす。水酸化ナトリウム溶液 (4.3→100) 約

175mlを加え、pH7.1~7.3に調整し、水を加えて1,000mlとし、保存溶液とする。高圧蒸気滅菌後、冷所で保存する。用時、保存溶液を800倍に希釈し、121℃で15~20分間滅菌して用いる。

(ii) ペプトン食塩緩衝液 (pH7.0)

リン酸一カリウム	3.56g
リン酸二ナトリウム	18.23g
塩化ナトリウム	4.30g
ペプトン	1.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、121℃で15~20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHは6.9~7.1である。0.1~1.0w/v%のポリソルベート20又はポリソルベート80を添加しても差し支えない。

(2) 培地

(i) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト寒天培地

カゼイン製ペプトン	15.0g
ダイズ製ペプトン	5.0g
塩化ナトリウム	5.0g
寒天	15.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、121℃で15~20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHは7.1~7.5である。

(ii) ソイビーン・カゼイン・ダイジェスト培地

カゼイン製ペプトン	17.0g
ダイズ製ペプトン	3.0g
塩化ナトリウム	5.0g
リン酸二カリウム	2.5g
ブドウ糖	2.5g
水	1,000ml

全成分を混和し、121℃で15~20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHは7.1~7.5である。

(iii) 抗生物質添加サブロー・ブドウ糖寒天培地

ペプトン (肉製品及びカゼイン製)	10.0g
ブドウ糖	40.0g
寒天	15.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、121℃で15~20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH5.4~5.8。使用直前に培地1L当たりベンジルペニシリンカリウム0.10gとテトラサイクリン0.10gを滅菌溶液として加える。ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代わりに培地1L当たりクロラムフェニコール0.050mgを加えても差し支えない。

(iv) サブロー・ブドウ糖ノース

ペプトン (肉製品及びカゼイン製)	10.0g
ブドウ糖	20.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、121℃で15~20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH5.4~5.8。

(v) 抗生物質添加ポテト・デキストロース寒天培地

ポテトエキス	4.0g
ブドウ糖	20.0g
寒天	15.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHは5.4～5.8である。使用直前に培地1L当たりベンジルペニシリンカリウム0.10g及びテトラサイクリン0.10gを滅菌溶液として加える。ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代わりに培地1L当たりクロラムフェニコール0.050mgを加えても差し支えない。

(vi) 抗生物質添加GP (グルコース・ペプトン) 寒天培地

ブドウ糖	20.0g
酵母エキス	2.0g
硫酸マグネシウム	0.5g
ペプトン	5.0g
リン酸一カリウム	1.0g
寒天	15.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpHは5.6～5.8である。使用直前に培地1L当たりベンジルペニシリンカリウム0.10g及びテトラサイクリン0.10gを滅菌溶液として加える。ベンジルペニシリンカリウムとテトラサイクリンの代わりに培地1L当たりクロラムフェニコール0.050mgを加えても差し支えない。

(vii) M10Y寒天培地

麦芽エキス	20.0g
酵母エキス	2.5g
白糖	100.0g
寒天	20.0g
水	1,000ml

全成分を混和し、加温溶解後121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。

(viii) シクロファン・グリセロール (DG18) 寒天培地

ペプトン	5.0g
ブドウ糖	10.0g
リン酸一カリウム	1.0g
硫酸マグネシウム	0.5g
ジクロファン	2.0mg
グリセロール	220.0g
寒天	15.0g
クロラムフェニコール	0.10g
水	1,000ml

グリセロール及びクロラムフェニコール以外の成分を混和し、加温溶解後、グリセロール及び6mlのエタノールで溶解したクロラムフェニコールを添加し、121℃で15～20分間高圧蒸気滅菌する。滅菌後のpH5.1～5.3。

(ix) 乳糖ブイオン培地