

ACTech消石灰 フィールド試験規格

作成日：2025年2月

この試験方法は、ACTech消石灰および消石灰などの農場の地面に散布する資材の細菌に対する抗菌性試験方法および抗菌効果について規定したものです。

試験目的

ACTech消石灰を実際の農場環境に設置し、有効期間を検討する。また、本試験規格では、散布する試験基材および負荷条件を任意に選択することで、実際の農場における使用環境を可能な限り反映し、有効性を評価確認することを目的にしています。

試験概要

試験菌：黄色ブドウ球菌・大腸菌・芽胞菌から1種または2種

試験片

資材の調整：粉末散布または乳液塗布から選択

基材の選択：樹脂・アスファルトから1種を選択

試験期間：8週までの任意の期間

測定点：試験期間中の6点まで（試験開始時を含む）

試験片数：各測定点ごとに2～3個

負荷条件：なし・BSA0.3%・模擬唾液・鶏糞5%上澄み液のいずれか1種を選択

作用時間：10分（負荷なし）・60分（負荷あり）

抗菌活性値の算出（R）

U：24時間後の対照試験片の生菌数の対数値（培養時間は培地記載の方法に従う）

A：24時間後の試験片の生菌数の対数値（培養時間は培地記載の方法に従う）

$R = U - A$

標準試験内容

以下に記載した標準試験の内容で問題がない場合は、p11の試験申し込み書をご記入の上、クリーンケアまたは販売会社までご連絡ください。
折り返し、試験担当者よりご連絡差し上げます。申し込み後の流れは、p10をご覧ください。

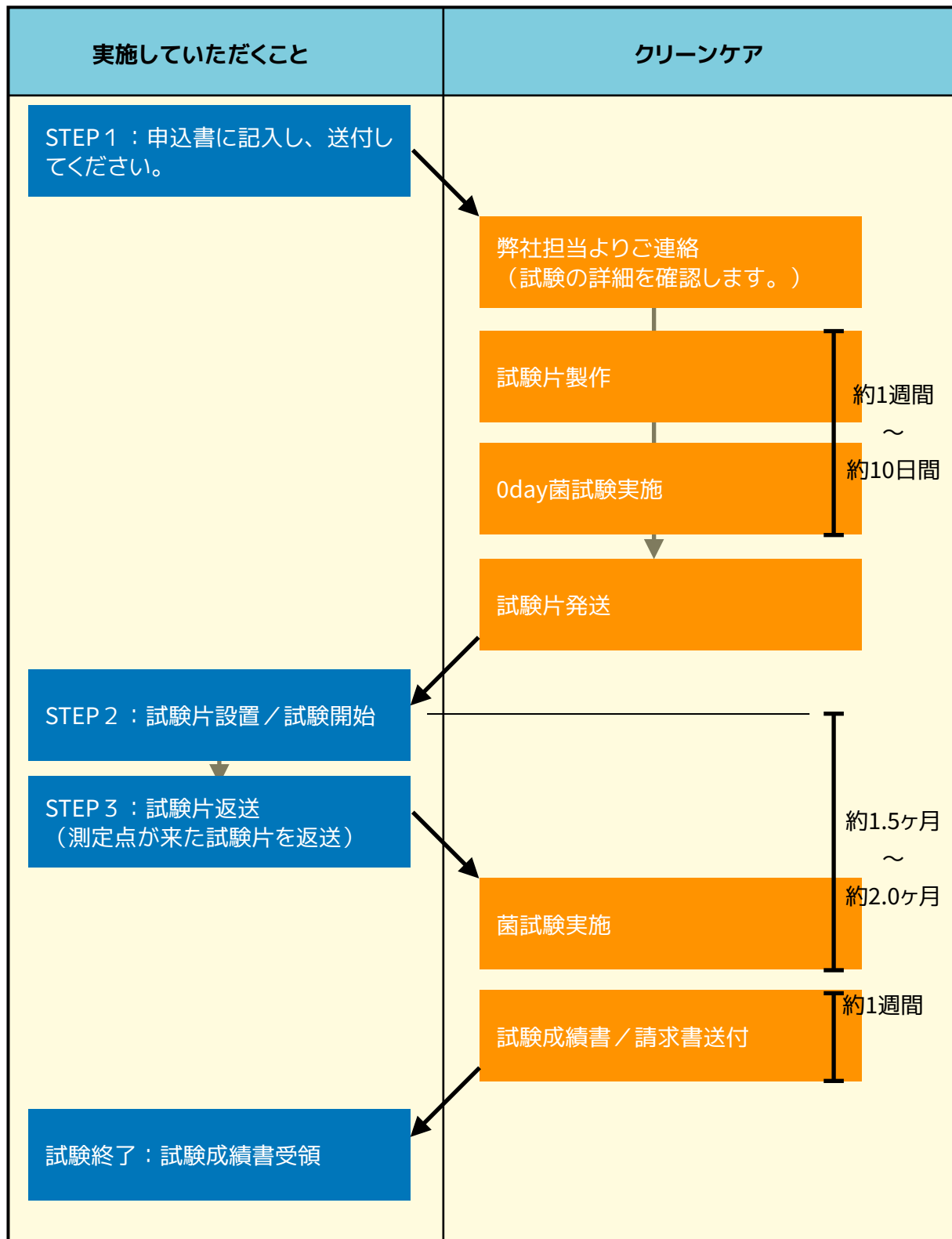
標準試験内容

試験条件	詳細	
試験片基材	樹脂	
試験菌	黄色ブドウ球菌	
測定点	6点	0day, 7day, 2w, 3w, 4w, 6w,
負荷	なし	
試験資材	ACTech消石灰／対照（炭酸Ca）	
試験片数（測定点ごとのn数）	2	
試験終了	抗菌活性値が1以下になった測定点で試験を終了する。	
備考	資材の送料は北海道・沖縄を除き費用に含まれます。	
菌試験回数	18回（測定点ごとに対照1回／ACTech消石灰2回）	
試験期間	申し込みより約2ヶ月	
費用合計	¥50,000円	

菌の種類、測定点、基材の選択、期間を含めオプションで任意に試験方法をアレンジすることができます。

ご希望の場合は、p12のカスタム試験申込書を参考にして、申込書をご記入ください。

お申込み後の流れ



試験申込書

会社名	
部署	
担当者名	
住所	〒
連絡先電話番号	
E-Mail	
試験片送付先住所	
試験担当者名	
試験担当者連絡先	携帯
	E-Mail
試験条件	☐ 標準試験 ☐ カスタム試験

申込書送付先

有限会社クリーンケア	FAX	06-6584-0249
	Mail	cleancare@qu.main.jp
	住所	〒550-0021 大阪府大阪市西区川口 3-1-1 4

カスタム試験内容

カスタム試験内容

試験条件		希望する条件にチェックマークを記入してください。			追加費用
試験片基材	標準	☐ 樹脂			無料
	オプション	☐ アスファルト			+ 1000円×試験片数
試験菌	標準	☐ 黄色ブドウ球菌			無料
	オプション	☐ 大腸菌			無料
	オプション	☐ 芽胞菌			+ 1000円×試験片数
測定点（標準6点）		☐ 1day	☐ 3day	☐ 7day	0dを含め 6 点まで無料
		☐ 10day	☐ 2w	☐ 3w	
		☐ 4w	☐ 5w	☐ 6w	
		☐ 7w	☐ 8w	☐ 0d	
試験資材	標準	☐ ACTech消石灰			無料
	オプション	☐ 消石灰 ☐ 他（ ）			+ 1000円×試験片数
試験片数（n数）	標準	2	点		
	オプション		点		
		追加 1 点ごとに + 1000円×測定点数			
試験終了	標準	抗菌活性値が 1 以下になった時点で終了する。			
	オプション	☐ 抗菌活性値に関わらずすべての測定点で試験を実施する。			

上記にご検討事項をご記入の上、試験申込書と一緒に送りください。
 折り返し担当者よりご連絡いたします。試験の条件によっては実施できない場合があります。
 合わせて見積書を作成し添付します。

試験詳細

I. 試験片の準備

以下の計算に従って、必要な数の試験片を作成する。

必要試験片数：菌種×測定点数×n数×資材種＋対照

例) 菌種1、測定点数5点(0day,1w,2w,4w,8w)、n数3、資材 ACTech消石灰乳の場合

$$1 \times 5 \times 3 \times 1 + 1 = 18$$

試験片作成手順

I. アスファルト基材 (p8参照)

- (1) 塩ビ樹脂製CU排水キャップ呼び径100に直径5mmの穴を5箇所あける。
- (2) 5mmアスファルトを40g敷き詰めて硬化させる
- (3) 硬化後二酸化塩素ガスを用いて殺菌する
 1. 試験資材を粉末で散布する場合は、10g (1kg/m²) をアスファルト面に均一に散布する。
 2. 乳液で散布する場合は、20%乳液を調整し10g (1kg/m²) をアスファルト面に均一に散布する。

II. 樹脂基材

- (1) PVCビニールプレート(1.5mm厚 Φ110mm) を用意する。
- (2) 二酸化塩素ガスを用いて殺菌する
 1. 試験資材を粉末で散布する場合は、5gを樹脂面に均一に散布する。
 2. 試験資材を乳液で散布する場合は、20%乳液を調整し5gを均一に塗布する。

II. 試験片設置および環境条件の設定

- I. 任意の農場の地面に試験片を設置します。降雨などの天候要因がなるべく同じになる場所で、人や車両の出入りが少ない場所に設置します。
- II. 試験片の側面に、試験開始日と回収予定日を記載します。

なお、消石灰を含む試験片を評価する場合、特に有効期間を検証する目的で本試験を実施する場合は、降雨による炭酸Ca化を考慮し、設置する環境に即した降雨特性に基づいて、任意のタイミングで水を散布することで定量的な評価が可能です。

(参照：国土交通省 気象庁 過去の気象データ検索参照)

天候なりゆきで試験を行う場合は、期間中降雨があった日を記録します。

III. 試験片の回収と送付

測定点が来たタイミングで試験片を回収し、ラベルに必要事項を記入の上、袋に入れて以下の住所に送ってください。

有限会社クリーンケア
〒550-0021 大阪府大阪市西区川口3-1-14
電話：06-6584-0240
大久保

III. 菌試験

1. 試験法の選択

菌試験は、直接法または回収法のいずれかを用いて実施します。

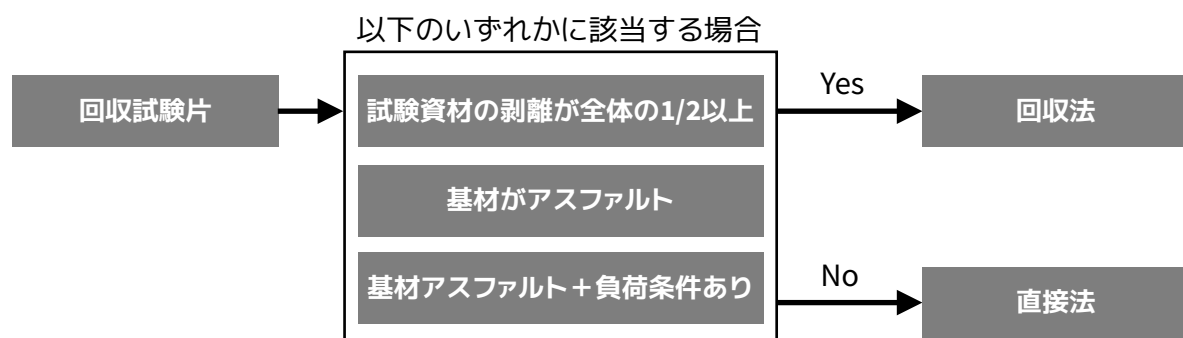
直接法は試験片に直接菌液を滴下した後、試験資材を中和不活性化したのち、培地に段階希釈を行って培養する方法です。

この方法は、実際の農場で糞や唾液などが落下した環境に近いと推奨されますが、試験片の資材が剥離脱落したり、アスファルトを基材にしている場合は困難な場合があります。

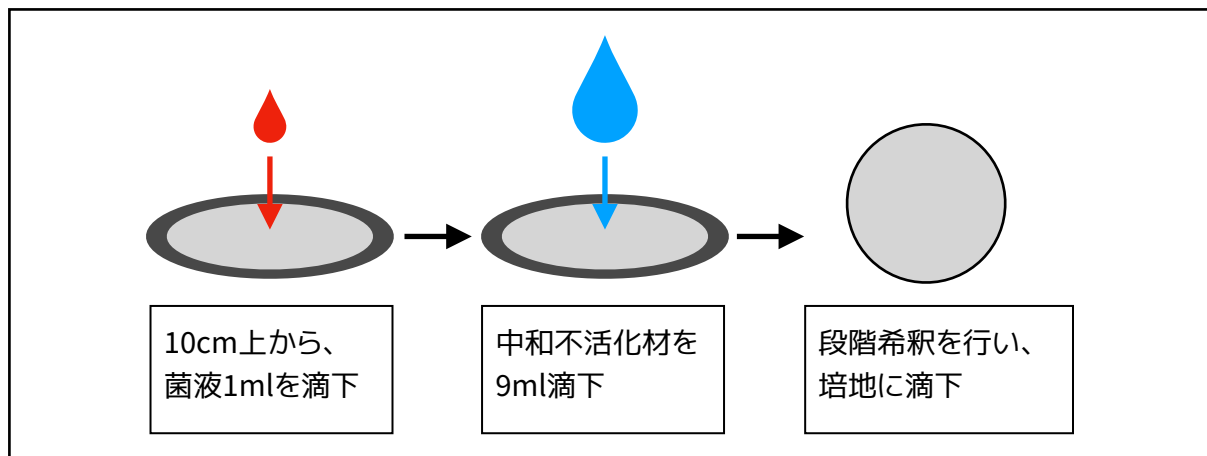
その場合は、次の回収法で試験を行います。

回収法は、試験片から試験資材を滅菌したヘラで削り取り、回収した資材を用いて試験を行います。試験片から回収できる量が使用する農場環境や試験期間によって異なるため、試験可能な検体の数は、その時によって異なります。

<試験法選択フロー>

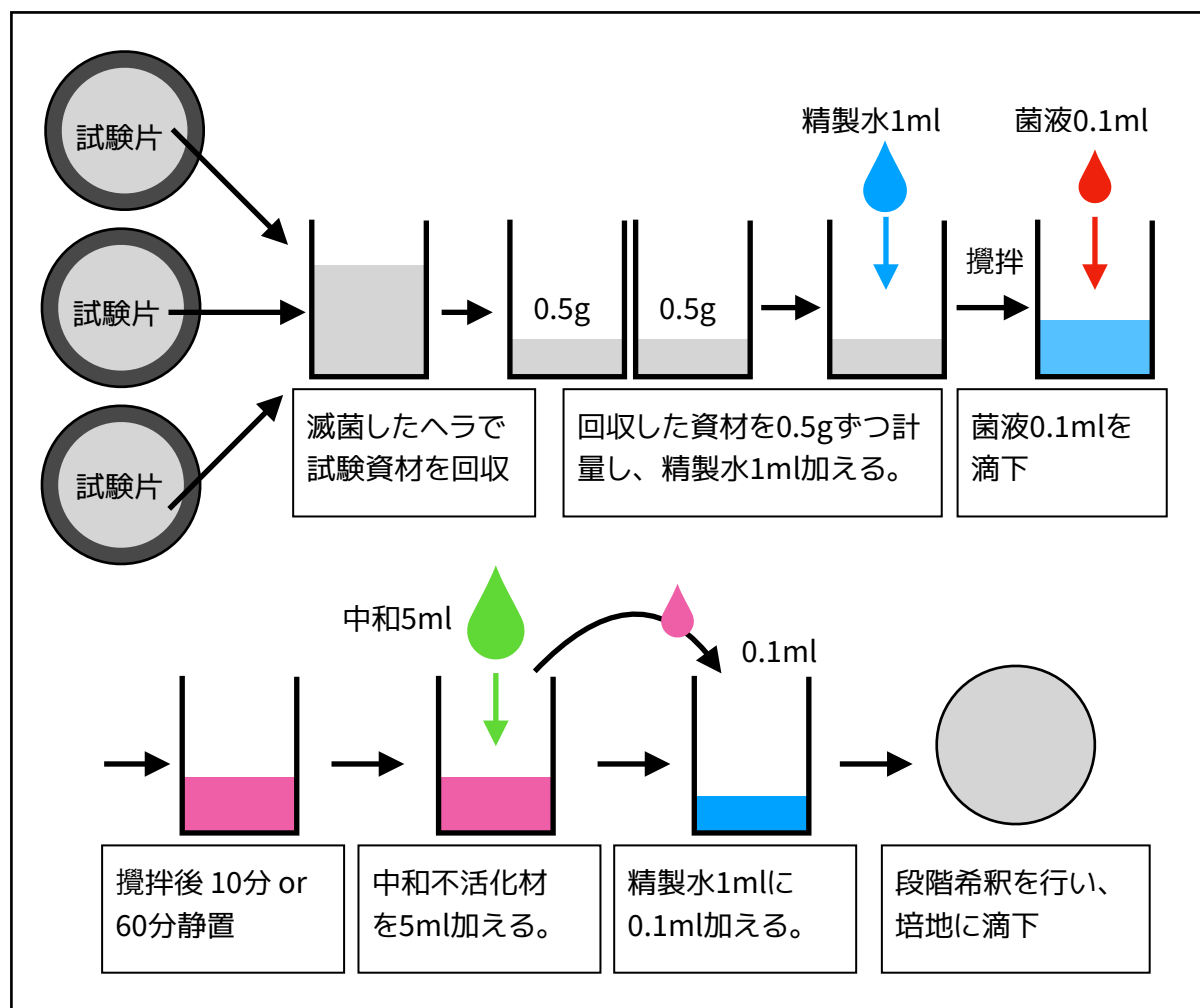


2. 直接法の手順



- 1) 菌液を $10^7 \sim 10^8$ cfu/mlにあらかじめ調整する。
- 2) 試験条件に応じて、負荷を調整した9mlに菌液を1ml加えて試験菌液とする。
- 3) 回収した試験片の中心から10cm程度上の位置から、試験菌液を1ml滴下する。
- 4) 10分 または 負荷をかけた場合は60分静置する。
- 5) 資材を不活化する中和剤を9ml加える。
- 6) 試験片から液を回収し、定法に従って培地に滴下培養する
- 7) 生育したコロニーを計数する。
- 8) 対照は試験片に炭酸カルシウム20%溶液を塗布したものをを用いて同様に行う。

3. 回収法の手順



- 1) 菌液を $10^8 \sim 9$ cfu/mlにあらかじめ調整する。
- 2) 試験条件に応じて、負荷を調整し9mlに対して菌液を1ml加えて試験菌液とする。
- 3) 回収した試験片から滅菌したヘラで資材を回収して集める。
- 4) 試験資材を0.5gずつ計量して分ける。
- 5) 精製水を1ml加えてボルテックスミキサーで20秒攪拌する。
- 6) 菌液を0.1ml加えて、20秒攪拌する。
- 7) 10min または負荷をかけた場合は60min静置する。
- 8) 資材を不活化する中和剤を5ml加えて20秒攪拌する。
- 9) 上澄を0.1ml取り精製水1mlに加える。
- 10) 定法に従って段階希釈し、培地に滴下培養する
- 11) 生育したコロニーを計数する。
- 12) 対照は炭酸Caを0.5g計量して1)～11)と同様に試験を行う。

4. 負荷の調整方法

BSA0.3%

試薬	量
BSA（ウシ血清由来）	0.3g
精製水	99.7g

模擬唾液

試薬	量
塩化ナトリウム	0.7g
塩化カリウム	0.15g
ムチン	0.5g
精製水	適量（100gに調整）
リン酸緩衝液（pH6.8～7.2）	適量（pHを合わせる）

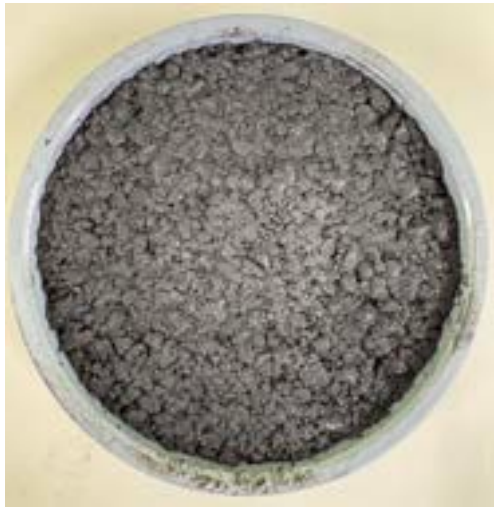
- 1) あらかじめ少量の精製水にNaCl・KClを溶解する
- 2) ムチンを少しずつ添加し、均一に混和
- 3) ほぼ全量の精製水を加えてよく攪拌
- 4) 最後にpHを6.8～7.2程度に調整し、100 gにメスアップ

鶏糞5%上澄み液

試薬	量
塩化ナトリウム	0.7g
塩化カリウム	0.15g
ムチン	0.5g
精製水	適量（100gに調整）
乾燥鶏糞	5g

- 1) あらかじめ少量の精製水にNaCl・KClを溶解する
- 2) ほぼ全量の精製水を加えてよく攪拌
- 3) 乾燥鶏糞を加えてよく攪拌する。
- 4) 遠心分離を行う。
- 5) 上清を回収

参考１）試験片 アスファルト基材



アスファルトを基材にする場合は、水の透過性があるので、塩ビ樹脂に水抜き用の穴を開けて使用します。

内径115mmに対して、アスファルトは40gを締め固めて使用します。

樹脂基材



樹脂を基材にする場合は、塩ビ製直径110mm厚さ1.5mmの樹脂プレートを使用します。

参考2) 中和剤

消石灰を含む資材を使用する場合は、菌との作用後に適切に中和を行わないとキャリーオーバーにより正確な殺菌効果試験ができない場合がある。

特に、作用時間における効果の検証を試験の目的とする場合は、十分なモル濃度の中和剤を使用して確実に資材の活性を止めることで、作用時間における有効性を判断できる。

一方で、経時変化による消石灰の劣化時期の確認を目的とする場合は、炭酸Ca化によりpHの低下が見られるため、中和の有無に関わらず殺菌効果は得られない。

実際の農場環境では、「10分」という作用時間に特別な意味があるわけではないため、作用時間は任意に設定しても特に問題はない。農場に落下した菌・ウイルスを殺菌または不活化するという目的から「作用が早いに越したことはない」と考えられるので、負荷なしで10分、負荷ありで60分の作用時間を設定しているが、依頼者の判断で作用時間は変更できる。

塩素系または4級アンモニウム塩を含む資材の場合は、公定法で定められているニュートライジング緩衝液を使用する。ニュートライジング緩衝液がない場合は、レシチン・ポリソルベート80・チオ硫酸ナトリウム・塩化ナトリウム・リン酸二水素カリウム・リン酸水素二ナトリウムを用いて、pH7.2前後に調整したものを用いる。

参考3) 生菌数の計数

培地上に形成されたコロニーに対して、1つの希釈倍率毎にn数の平均値を求め、希釈倍率を乗じる。菌液の摂取量が0.1mlであったばあいには、計数値を10倍する。

平均コロニー数がどの希釈倍率でも30個以下の場合は、最も希釈倍率が低い培地のコロニー数とする。10倍、100倍希釈でいずれも30個以下のコロニー数の場合は、10倍希釈の検体をコロニー数として記載する。

異なる希釈倍率で30～300個のコロニーが観察された時は、2つの差を求め、2倍以上の開きが見られる場合は、希釈倍率の低い方のコロニー数を採用する。

100倍と1000倍で、それぞれ平均コロニー数が110と40cfuの場合は、差が2倍以上あるので、 $1.1 \times 10^4 \text{cfu/ml}$ とする。

2つの希釈倍率のコロニー数の差が2倍以下の場合は、2つの希釈倍率の平均値を採用する。

100倍と1000倍で、それぞれコロニー数が83と52cfuの場合は、差が2倍以下となり、希釈倍率全ての平均値を求める。この場合は、n数すべてで計算した平均値を採用する。

n数2で、100倍希釈が82と85、1000倍希釈が54と62の場合、

$(8200+8500+54000+62000) \div 4 = 33175 \quad 3.3 \times 10^4 \text{cfu/ml}$ とする。