菌液又は胞子液の調製

試験菌として*Micrococcus luteus* ATCC 9341、*Micrococcus luteus* ATCC 10240、*Escherichia coli* ATCC 27166、*Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617、*Corynebacterium xerosis* NCTC 9755、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Bacillus brevis* ATCC 8185又は*Bacillus cereus* ATCC 19637を用いるときは、別に規定する場合を除き、次の方法により菌液又は胞子液を調製する。

① *Micrococcus luteus* ATCC 9341、*Micrococcus luteus* ATCC 10240、*Escherichia coli* ATCC 27166又は*Bordetella bronchiseptica* ATCC 4617の菌液の調製

18号培地に約１週間間隔で移植を繰り返し、32～37℃で培養しながら継代保存した試験菌を、使用に当たって２号培地に接種し、32～37℃で16～24時間培養し、菌液とする。あるいは、継代培養した試験菌を、18号培地約９mLを入れた試験管斜面寒天培地（内径16mm）に接種し、32～37℃で16～24時間培養した後、この試験管斜面寒天培地に生理食塩液10mLを加え、発育した菌を洗い落として他の試験管に移し、菌液とする。菌液は、５℃以下に保存し、*Micrococcus luteus* ATCC 9341にあっては５日以内に、その他の菌にあっては７日以内に使用する。

② *Corynebacterium xerosis* NCTC 9755の菌液の調製

１号培地に35～37℃で16～24時間３回継代培養する。これを２号培地に移植し、35～37℃で３～４時間振とう培養（振幅５cm、振動数110往復/１分）し、菌液とする。菌液は、用時調製する。

③ *Bacillus subtilis* ATCC 6633及び*Bacillus brevis* ATCC 8185の胞子液の調製

１号培地に約３か月間隔で移植を繰り返し、32～37℃で培養しながら継代保存した試験菌を、ルー瓶に入れた同培地に接種し、32～37℃で１週間以上培養して胞子を作らせる。

この胞子を、生理食塩液100mLに浮遊して、65℃で30分間加熱する。遠心分離を行い、胞子を採り、更に生理食塩液約50mLずつで３回遠心分離して洗った後、生理食塩液100mLに浮遊して、65℃で30分間加熱し、胞子液とする。胞子液は、５℃以下に保存し、６か月以内に使用する。

④ *Bacillus cereus* ATCC 19637の胞子液の調製

１号培地に約２週間間隔で移植を繰り返し、27～29℃で培養しながら継代保存した試験菌を、ルー瓶に入れた同培地に接種し、27～29℃で１週間以上培養して胞子を作らせた後、室温（約25℃）に約１週間放置する。この胞子を生理食塩液100mLに浮遊して、65℃で30分間加熱する。遠心分離を行い、胞子を採り、更に生理食塩液50mLずつで３回遠心分離して洗った後、生理食塩液100mLに浮遊し、65℃で30分間加熱し、胞子液とする。胞子液は、５℃以下に保存し、６か月以内に使用する。

円筒寒天平板の調製

別に規定する場合を除き、内径約90mmのペトリ皿を用いる場合は、基層用培地20mLを、内径約100mmのペトリ皿を用いる場合は、同培地21mLを、また、大型皿を用いる場合は、培地の厚さが２～３mmとなるように同培地を分注し、培地を平らに行き渡らせ、水平に静置して固化させ、基層とする。一度溶かし、試験菌の活力を阻害しない温度に冷却した各条に規定する種層用培地に、菌液又は胞子液を加え、十分に混和した後、ペトリ皿においては４mLを、大型皿においてはその厚さが1.5～2.5mmとなるように固めた基層上に分注し、基層の上面に一様に広がるように操作した後、水平に静置して培地を固化させ平板とする。４個の円筒（カップ）を、平板上に（内径約90mmのペトリ皿の場合には、半径約25mm、内径約100mmのペトリ皿の場合には、半径約28mmの円周上に）、隣り合う各々が中心に対して約90°となるように置き、円筒寒天平板を作る。また、大型皿平板を用いる場合は、ペトリ皿平板に準ずる配置に円筒（カップ）を置き、４個１組でペトリ皿１枚分とする。平板上に円筒（カップ）を置く際には、円筒（カップ）を10～13mmの高さから垂直に落とす。種層用培地に添加する菌液又は胞子液の量は、円筒寒天平板を培養したとき、高濃度の常用標準希釈液による阻止円の直径が20～25mmに、低濃度の常用標準希釈液による阻止円の直径が15～20mmになるように調整する。なお、円筒寒天平板の代わりに、平板に平板器底に達する直径7.9～8.1mmの円形のせん孔を施したせん孔寒天平板を用いることができる。

常用標準希釈液の調製

常用標準希釈液は、常用標準品適量を量り、各条の規定に従い、調製した希釈原液を使用に当たって高低２種類の規定濃度に希釈した液である（以下、高濃度の希釈液を「S_H」、低濃度の希釈液を「S_L」という。）。なお、常用標準品を量る場合には、別に規定する場合を除き、相対湿度50%以下の大気中で量り、化学はかりを用いる場合の秤取量は、次の表の常用標準品の秤取量の欄に掲げる量とし、同表の常用標準品の予備乾燥条件の欄に乾燥条件が記載されている場合にあっては、当該条件であらかじめ乾燥した後、規定量を量りとる。

また、希釈原液は、原則としてそれぞれ次の表の希釈原液の保存温度の欄に掲げる温度で保存して有効期間内に使用するものとし、常用標準希釈液は、用時調製する。

常用標準品名	常用標準品の秤取量	常用標準品の予備乾燥条件	希釈原液の保存温度	希釈原液の有効期間
常用標準アビラマイシン	約20mg（力価）相当量以上	2.67～3.33kPa, 60℃, ３時間	５℃以下	30日
常用標準エフロトマイシン	約12mg以上	—	５℃以下	５日
常用標準エンラマイシン	約20mg以上	0.27kPa以下, 60℃, ３時間	５℃以下	７日
常用標準オキシテトラサイクリン	約25mg（力価）相当量以上	—	５℃以下	７日
常用標準クロルテトラサイクリン	約25mg（力価）相当量以上	0.67kPa以下, 60℃, ３時間	５℃以下	２日
常用標準コリスチン	約30mg以上	0.67kPa以下, 60℃, ３時間	10℃以下	７日
常用標準サリノマイシン	約20mg（力価）相当量以上	0.67kPa以下, 60℃, ３時間	５℃以下	14日
常用標準セデカマイシン	約25mg（力価）相当量以上	—	５℃以下	２日
常用標準センデュラマイシン	約25mg（力価）相当量以上	0.67kPa以下, 100℃, ３時間	５℃以下	７日
常用標準タイロシン	約20mg（力価）相当量以上	0.67kPa以下, 60℃, ３時間	５℃以下	７日
常用標準ナラシン	約25mg（力価）相当量以上	—	５℃以下	14日
常用標準ノシヘプタイド	約20mg以上	0.67kPa以下, 60℃, ３時間	５℃以下	14日
常用標準バシトラシン	約30mg以上	0.67kPa以下, 60℃, ３時間	５℃以下	２日
常用標準バージニアマイシン	約20mg（力価）相当量以上	—	10℃以下	７日
常用標準ビコザマイシン	約20mg以上	—	５℃以下	４日
常用標準フラボフォスフォリポール	約20mg以上	—	10℃以下	14日
常用標準モネンシン	約20mg（力価）相当量以上	—	５℃以下	14日
常用標準ラサロシド	約20mg以上	—	５℃以下	30日