

平成13年度 経済産業省委託

**抗菌陽性標準試験体の実用化試験
委託調査研究成果報告書**

平成14年3月

抗菌製品技術協議会

目 次

1. まえがき1
2. 調査研究の目的1
3. 抗菌陽性標準試験体の作製条件の検討	
3.1 抗菌効果に及ぼす膜厚及び塗工乾燥条件の影響【実験1】2
3.2 抗菌剤添加濃度の検討【実験2】7
3.3 抗菌陽性標準試験体の電子線滅菌に対する耐性評価【実験3】8
3.4 水溶化させる中和物質の検討【補足実験】8
4. 抗菌陽性標準試験体の評価	
4.1 試料9
4.2 均質性試験11
4.3 抗菌性試験13
4.4 考察19
5. 技能試験に供する抗菌陽性標準試験体の仕様	
5.1 抗菌陽性標準試験体の形態20
5.2 カバーフィルムの形態20
6. まとめ22
(添付資料)	
1. 抗菌標準試験片実用化委員会・分科会の委員名簿23
2. 各試験機関のデータ24
3. 拡張不確かさ(U)の算出方法30
4. 各試験機関のzスコア31
5. 「抗菌陽性標準試験体作製の試験」手順書33

1.まえがき

抗菌JIS Z 2801:2000 抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果(平成12年12月20日制定)に連動して実施されるJNLA試験所認定制度立ち上げのため、平成11年度から実施された「抗菌技能試験プログラム開発に関する調査(調査1)」において抗菌技能試験プログラムを開発し、そして、平成13年度以降実施する技能試験に提供できる抗菌陽性標準試験体の作製と評価に関する大筋の見通しを「抗菌技能試験プログラム開発に関する調査(調査2)」で得ることができた。

本成果をもとに平成12年度第1回技能試験を実施することができた。第1回技能試験が「枯草菌芽胞液を用いる菌の接種・回収試験」「MIC測定試験」という基本的な微生物の取り扱いに関する技能であったのに対し、平成13年度予定の技能試験に抗菌陽性標準試験体として実用化するには、なお未検討の課題が残されており、このため平成12年度で得られた成果を基に次回技能試験にこの抗菌陽性標準試験体を実用的に提供出来るよう、平成13年度も調査研究を継続することとなった。

本研究は、経済産業省が(独)製品評価技術基盤機構に委託したものを抗菌製品技術協議会に再委託され、平成13年8月2日から平成14年3月15日の期間実施された。

本調査研究を実施するにあたり、「抗菌陽性標準試験体実用化委員会」及び「同分科会」を設置した。「抗菌陽性標準試験体委員会」は調査研究実施計画の策定及び「同分科会」報告事項の審議承認、「同分科会」は「同委員会」で策定された実施計画に基づく調査研究の実施及び報告書の作成等実務的業務を中心に行った。

「抗菌陽性標準試験体実用化委員会」の委員名簿を添付資料の表1に、および「同分科会」を表2に記載する。

この成果報告書は、平成12年度に実施した「抗菌技能試験プログラムの開発に関する調査報告書」に引き続き平成13年度に行われた調査研究の活動内容とその成果についてまとめたものである。

2.調査研究の目的

平成13年度には、抗菌JIS Z 2801:2000 抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果において抗菌加工を施した製品の表面における、細菌に対する抗菌性試験方法及び抗菌効果について規定された、5.2 プラスチック製品などの試験方法に適用される平板試料を用いた抗菌技能試験の実現を目指すものである。

抗菌という微生物を用いた試験に供する技能試験用試験体(認証標準物質)の開発と実用化は、国際的にも極めて画期的かつ難易度の高い課題である。

本委員会の目標達成のための平成13年度の主な課題としては、

- 1) 抗菌陽性標準試験体の作製と抗菌効果による精度確認
- 2) 抗菌陽性標準試験体荷姿、保管(包装)方法及び品質保証期間の検討
- 3) 抗菌陽性標準試験体量産技術の検討

であり、上記を目的として、抗菌陽性標準試験体実用化にむけた本調査研究を行なった。

3. 抗菌陽性標準試験体の作製条件の検討

平成12年度に実施した「抗菌技能試験プログラムの開発に関する調査」において抗菌陽性標準試験体(以下、標準試験体)の可能性を見出した。その成果を受けて平成13年度においては標準試験体の作製条件を中心にその実用化に向けた検討を行った。

3.1 抗菌効果に及ぼす膜厚及び塗工乾燥条件の影響【実験1】

(1) 標準試験体の作製条件

標準試験体の製造時に於ける膜厚のバラツキと塗工乾燥条件が抗菌効果に及ぼす影響を調査する目的で下記の試験を行った。

1) 塗工液

- ①ワニス : アクリル系水系ワニス
- ②抗菌剤 : 水溶性銀有機系抗菌剤
- ③希釈液 : イオン交換水(1:1)

2) 抗菌剤添加濃度

0ppm, 600ppm, 2000ppm

3) 塗工条件

- ①基材 : PETフィルム(東洋紡(株)製、品番E-5101) 膜厚50 μ m
- ②塗工方法: パーコーター #30,#36(膜厚はそれぞれ4 μ m, 6 μ m)
- ③乾燥機 : SEIWARIKO製FDR-345-5オープン
- ④塗工乾燥条件: 100 $^{\circ}$ C-3min, 100 $^{\circ}$ C-30min

4) 作製日

2001年4月12日

(2) 抗菌性試験方法

JIS試験法(JIS Z 2801)に準拠した東洋インキ製造(株)試験規格法で実施した。

1) 試験菌種

Staphylococcus aureus IFO 12732(黄色ブドウ球菌)

2) 試験菌の調製

- ①試験菌をSCD培地に移植し、35 $^{\circ}$ Cで8時間培養(前培養)した。
- ②前培養液を滅菌生理食塩水で、菌数が約10⁵個/mlとなるように希釈し試験菌液とした。尚、抗菌剤以外の要因により菌数が減少せぬように栄養分としてSCD培地を0.2%添加した。

3) 試料の調製

各抗菌濃度の標準試験体を1片5cmの四角形に切断した。

4) 試験操作

試料をシャーレに入れ、試料の試験面に菌液0.4mlを滴下した。滴下水滴の上にカバーフィルムを被せシャーレの蓋を締め、35 $^{\circ}$ C・相対湿度90%で19時間保存後、試料表面の生菌数を測定した。

5) 生菌数の測定

試料を滅菌生理食塩水10mlで洗い出し、回収液とする。この回収液について、普通寒天培地を使用した寒天平板法(35 $^{\circ}$ C、24時間培養)により生菌数を測定し、保存後の

菌数を求めた。

(3) 試験結果

試験結果を表1及び表2に示す。

表1 塗工乾燥条件100°C-3minにおける抗菌性試験結果

No.	抗菌剤濃度 [ppm]	塗工材膜厚 [μ m]	塗工乾燥条件	生菌数	生菌数 Ave.	Log (生菌数)	Log (生菌数) Ave	抗菌活性値
1	0	4	100°C-3min	1.8E+5	2.0E+5	5.26	5.30	0.35
				2.3E+5		5.36		
				1.9E+5		5.28		
2	0	6	100°C-3min	1.2E+5	1.2E+5	5.08	5.08	0.57
				1.1E+5		5.04		
				1.4E+5		5.15		
4	600	4	100°C-3min	1.3E+2	1.0E+2	2.11	1.72	3.93
				ND		1.00		
				1.3E+2		2.11		
				ND		1.00		
				2.6E+2		2.42		
5	600	6	100°C-3min	1.3E+2	7.8E+1	2.11	1.67	3.98
				ND		1.00		
				1.3E+2		2.11		
				ND		1.00		
				1.3E+2		2.11		
7	2000	4	100°C-3min	ND	0	1.00	1.00	4.65
				ND		1.00		
				ND		1.00		
7	2000	6	100°C-3min	ND	0	1.00	1.00	4.65
				ND		1.00		
				ND		1.00		

接種菌数: $4.5E+5$ ($\text{Log}(4.5E+5)=5.65$)

表2 塗工乾燥条件100°C-30minにおける抗菌性試験結果

No.	抗菌剤 濃度 [ppm]	塗工材 膜厚 [μm]	塗工 乾燥条件	生菌数	生菌数 Ave.	Log (生菌数)	Log (生菌数) Ave	抗菌 活性値
10	0	4	100°C-30min	ND	-	-	-	-
				3.0E+3				
				ND				
11	0	6	100°C-30min	ND	-	-	-	-
				ND				
				ND				
13	600	4	100°C-30min	ND	-	-	-	-
				ND				
				ND				
				ND				
14	600	6	100°C-30min	1.3E+2	-	-	-	-
				ND				
				1.3E+2				
				ND				
16	2000	4	100°C-30min	ND	-	-	-	-
				ND				
				ND				
17	2000	6	100°C-30min	5.2E+2	-	-	-	-
				1.3E+2				
				3.9E+2				

接種菌数: 4.5E+5 (Log(4.5E+5)=5.65)

(4) 考察

1) 標準試験体作製時における乾燥時間の影響

100°C-3min塗工乾燥条件下での評価結果では、抗菌剤濃度-生菌数の間に有意な関係が認められるが(表1, 表5)、100°C-30min塗工乾燥条件下ではその有意性は見られない(表2)。このワニス構成する樹脂は、揮発性塩基性物質で中和することによって水溶化させるタイプで、その成膜乾燥時に水と揮発性塩基性物質が揮発することで樹脂を不溶化させている。

このため、100°C-30min塗工乾燥条件下では樹脂の不溶化が進み、塗膜表面の抗菌剤濃度と塗膜全体の抗菌剤濃度とが必ずしも一致しなくなるだけでなく、過剰な乾燥時間により塗膜表面に抗菌効果を有する物質が生成している可能性もあり、抗菌剤濃度-生菌数の間は全く相関のない関係となっている。この結果、当樹脂系において抗菌剤濃度と生菌数に相関を持たずには塗膜にある程度の水溶性を保持させること、すなわち適度な塗工乾燥条件を選ぶことで成膜中の揮発性塩基性物質の量をコントロールすることが最も重要な因子であることが判明した。なお、100°C-3min塗工乾燥条件ではエッジ部分に「もや」が発生(100°C-30min塗工乾燥条件では未発生)するが、これが抗菌効果への影響はなかった。

2) 膜厚と抗菌効果の関係

100°C-3minの塗工乾燥条件下で標準試験体の膜厚を4μm, 6μmに調製することにより、膜厚の差による抗菌効果に及ぼす影響を評価した(表1)。その結果、膜厚が厚くなるに従い生菌数は減少傾向にあるが、抗菌剤濃度の及ぼす影響に比べ非常にその効果は少ない(図2)ことが明らかになった。従って、4μm ~6μm程度の膜厚のバラツキによる生菌数に対する影響は少ないと考えられる。

3) 評価結果の統計学的分析

標準試験体の抗菌剤濃度及び膜厚が与える生菌数への影響を統計学的に取扱い、その影響を評価した。尚、抗菌剤濃度600ppmにおける生菌数試験は4μm, 6μmそれぞれにおいて繰返し数(n)5回のデータは有るが、取扱いが困難になるため3回分のデータを無作為に抽出して今回の解析に使用した(表3)。

その結果(表4, 5, 6参照)を、下記にまとめる。

- ①抗菌剤濃度に対する生菌数の変化は1%有意であり、生菌数に対する寄与率も非常に高い。
- ②抗菌層膜厚に対する生菌数の変化には有意差はなく、誤差の範囲である。
- ③濃度と膜厚の交互作用も見られない。

表3 分散分析諸条件

要因		水準		繰返し数
A	抗菌剤濃度	1	0ppm	3
		2	600ppm	3*
		3	2000ppm	3
B	抗菌層膜厚	1	4μm	3
		2	6μm	3

*5%有意/**1%有意

表4 分散分析表

No	要因	平方和	自由度	不変分散	分散比	寄与率	検定
1	抗菌剤濃度	86.63	2	43.31	87.39	92.43	**
2	抗菌層膜厚	0.02	1	0.02	0.04	0	
3	濃度×膜厚	0.04	2	0.02	0.04	0	
	誤差e	5.94	12	0.05		7.56	
	合計	92.65	17				

*5%有意/**1%有意

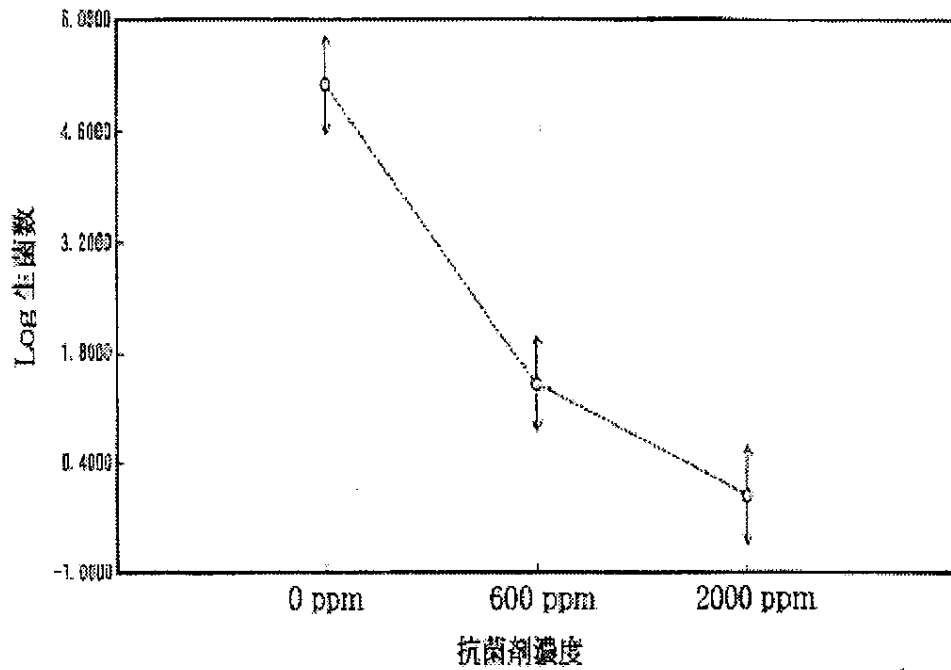


図1 抗菌剤濃度と生菌数(95%信頼区間推定)

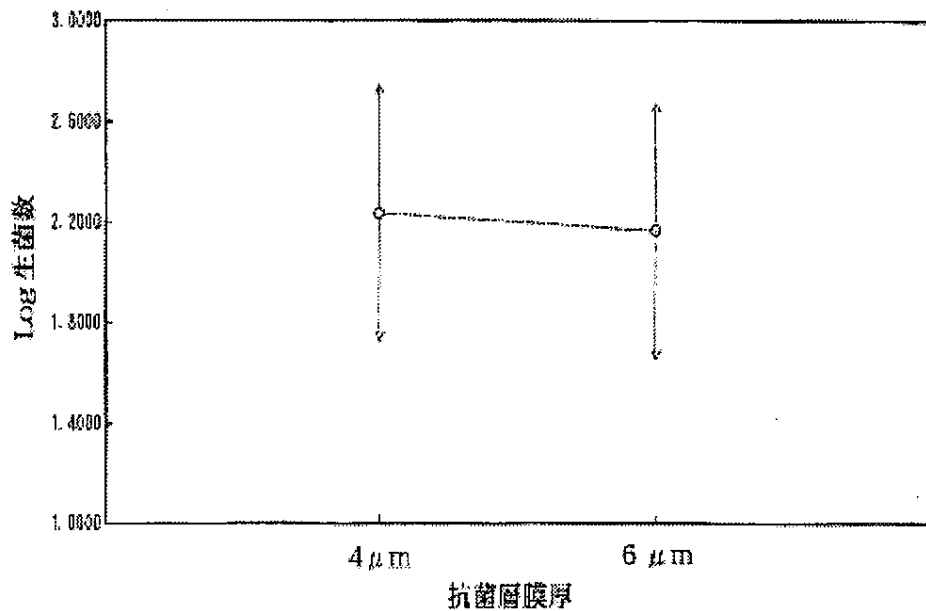


図2 抗菌層膜厚と生菌数(95%信頼区間推定)

3.2 抗菌剤添加濃度の検討【実験2】

完全に滅菌状態となる2000ppmまでの抗菌領域における抗菌剤の最適添加濃度を決定するために、前年度実施された「抗菌技能試験プログラムの開発に関する調査報告書」から、3試験機関の抗菌性試験データをまとめ、図.3は全ての試験において等しい誤差が含まれているものと推定したときの「推定値プロット(95%)」を図示したものである。

また、表5は2因子間の差の推定(95%)を行ったものであり、この結果からA3(400ppm)はA1(0ppm)からもまたA5(2000ppm)からも1%有意に差のあることがわかり、抗菌活性値2前後を示す抗菌領域における抗菌剤添加濃度を400ppmと決定した。

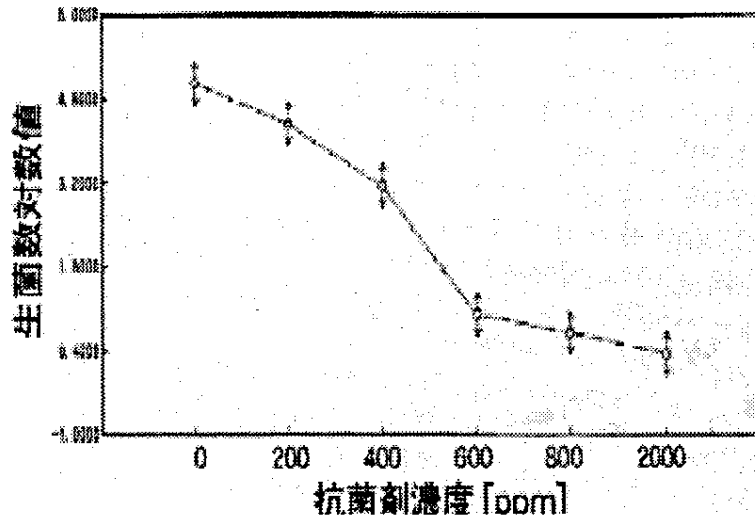


図3 推定値プロット(95%)

表5 差の推定(95%)

A因子1	A因子2	平均値1	平均値2	差	上限(95%)	下限(95%)	lsd	検定
A1	A2	4.8565	4.1946	0.6619	1.1771	0.1468	0.5151	*
A1	A3	4.8565	3.1519	1.7046	2.2198	1.1895	0.5151	**
A1	A4	4.8565	0.9992	3.8573	4.3724	3.3422	0.5151	**
A1	A5	4.8565	0.7092	4.1473	4.6624	3.6322	0.5151	**
A1	A6	4.8565	0.3673	4.4892	5.0044	3.9741	0.5151	**
A2	A3	4.1946	3.1519	1.0427	1.5578	0.5276	0.5151	**
A2	A4	4.1946	0.9992	3.1954	3.7105	2.6802	0.5151	**
A2	A5	4.1946	0.7092	3.4854	4.0005	2.9702	0.5151	**
A2	A6	4.1946	0.3673	3.8273	4.3424	3.3122	0.5151	**
A3	A4	3.1519	0.9992	2.1527	2.6678	1.6376	0.5151	**
A3	A5	3.1519	0.7092	2.4427	2.9578	1.9276	0.5151	**
A3	A6	3.1519	0.3673	2.7846	3.2998	2.2695	0.5151	**
A4	A5	0.9992	0.7092	0.2900	0.8051	-0.2251	0.5151	
A4	A6	0.9992	0.3673	0.6319	1.1471	0.1168	0.5151	*
A5	A6	0.7092	0.3673	0.3419	0.8571	-0.1732	0.5151	

*5%有意 / **1%有意

3.3 抗菌陽性標準試験体の電子線滅菌に対する耐性評価【実験3】

標準試験体の滅菌に関して、現在最も有望な滅菌手法として電子線滅菌が挙げられている。工業的には6MeV級電子線の照射(30kGy程度)を考えているが、電子線照射により抗菌性に悪影響の出る恐れがあるためその評価を行なった。

(1)標準試験体

実験に供した標準試験体は下記の通りである(作製日:2000年7月28日)。

- ①ワニス:アクリル系水性ワニス
- ②抗菌剤:銀有機系抗菌剤(400ppm添加品)
- ③基 材:PETフィルム(E5101)膜厚50 μ m

(2)電子線滅菌

- ①装 置 :日新ハイボルテージ社製EBC-300
- ②滅菌条件:60kGy@200kV

(3)抗菌性試験方法

3.1(2)抗菌性試験法と同じ

(4)実験結果

試験結果を表6に示す。

表6 電子線滅菌に対する耐性評価

抗菌剤濃度	n	生菌数(個)	
		滅菌処理サンプル	未処理サンプル
400ppm	1	1.5E+4	3.1E+4
	2	2.0E+4	1.4E+4

実験数は少ないが、電子線滅菌処理前後において、生菌数の変化は特に認められない。この結果から、電子線滅菌は標準試験体の抗菌性に影響を与えないと判断される。

3.4 水溶化させる中和物質の検討【補足実験】

今回採用したアクリル系水系ワニスは、前述したように揮発性塩基性物質で中和させることで水溶化させるものであり、その水溶性をある程度維持するためには成膜中の揮発性塩基性物質の量をコントロールする必要がある。

これをできるだけ避けるためには、水溶化させる中和物質に不揮発性のものを選択する方がよいのではないかと考え、候補なるものを幾つか選び検討したが、いずれの系も成膜化することはできなかった。

原因については今のところ明らかとはなっていないが、今回の試験体の大きな特徴である水溶性コントロールすることは最も重要なことである。水溶性を維持は、抗菌活性のばらつきを抑えることになり、なお製膜方法については改良の余地は残っていると考えられる。

4. 抗菌陽性標準試験体の評価

4.1 試料

前項「3.抗菌陽性標準試験体の作製条件の検討」で得られた結果を踏まえて、抗菌評価用の標準試験体を下記の条件で作製した。

(1)標準試験体の作製条件

1) 塗工液

- ①ワニス: アクリル系水系ワニス
- ②抗菌剤: M社製 水溶性銀有機系抗菌剤(抗菌活性としてのMIC測定結果を表7に示す)
- ③希釈剤: イオン交換水(1:1)

2) 抗菌剤濃度

0ppm, 400ppm, 2000ppm(抗菌層の膜厚は全て $5\pm 1\mu\text{m}$)

3) 塗工条件

- ①基材 : PETフィルム(E-5101) 膜厚 $50\mu\text{m}$
(裏面: マット/表面: 光沢面(コロナ処理面)塗工)
- ②塗工方法 : マイクログラビア
(版: 斜線50線/リバース回転: 140/塗工速度: 4m/min/テンション4kg-5kg)
- ③塗工乾燥条件 : 第一オープン: 130°C/第二オープン: 130°C/第三オープン: 140°C
/第四オープン: 40°C
上記塗工乾燥条件は: 「3.1(1) 3)塗工条件」に示す100°C-3minに相当する。

4) 作製日(塗工日): 2001年8月30日

(2)標準試験体の提供形態

- 1) シート寸法: 50mm×60mm(裏表識別のため、四方の一角を縦・横7mmカット)。
- 2) 裏表識別 : 右肩が切断されている上面の光沢面が塗工面。裏面マット加工。
- 3) 包装形態 : 標準試験体を抗菌剤濃度(M社製: 抗菌性については表7参照、0ppm, 400ppm, 2000ppm)毎に各々PE小袋(縦95mm×横70mm)に入れて、各々3濃度を1セットにしてアルミPET袋(縦155mm×100mm)にパック詰めする。
- 4) 枚数 : 0ppm6枚、400ppm3枚、2000ppm3枚(1セット当り)
- 5) ラベル表示
 - ①PE小袋 : 品名、濃度(0ppm、400ppm、2000ppm)、数量、製造ロット
 - ②アルミPET袋 : 品名、製造ロット、数量
- 6) 滅菌方法 : 電子線滅菌(照射条件 30kGy)

(3)カバーフィルムの提供形態

今回標準試験体と合わせて、抗菌評価用として使用するカバーフィルム(材質: PE/膜厚: $100\mu\text{m}$)についても下記の形態で提供することにした。

- 1) シート寸法 : 40mm±1mm四方
- 2) 裏表表示 : 機能的な差はなく表示はしない
- 3) 包装形態 : チャック付PE袋
- 4) 枚数 : 50枚(1パック当たり)

- 5) ラベル表示 : 品名、数量
 6) 滅菌法 : γ 線照射(照射条件 30kGy)

表7 M社製抗菌剤のMIC(最小発育阻止濃度)測定結果
 <代表的な細菌、酵母、カビそれぞれの菌株について測定>

菌株		MIC(ppm)
大腸菌	(<i>Escherichia coli</i>)	<2
枯草菌	(<i>Bacillus subtilis</i>)	<2
黄色ブドウ球菌	(<i>Staphylococcus aureus</i>)	31.3
緑膿菌	(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	15.6
カンジダ	(<i>Candida albicans</i>)	1000
酵母	(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	125
コウジカビ	(<i>Aspergillus niger</i>)	>1000
黒酵母	(<i>Aureobasidium pullulans</i>)	>1000
すすカビ	(<i>Cladosporium cladosporioides</i>)	>1000
青カビ	(<i>Penicillium citrinum</i>)	>1000
フダリウム	(<i>Fusarium moniliforme</i>)	1000
クモの巣カビ	(<i>Rhizopus stolonifer</i>)	1000
MRSA(臨床分離株)		
	(<i>Staphylococcus aureus</i> B#5-1)	78.1
	(<i>Staphylococcus aureus</i> B#5-2)	78.1
	(<i>Staphylococcus aureus</i> B#5-3)	78.1
病原菌(臨床分離株)		
緑膿菌	(<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B#17-1)	39.1
	(<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B#17-2)	19.5
カンジダ菌	(<i>Candida albicans</i> Y#1-1)	>10000
	(<i>Candida albicans</i> Y#1-4)	>10000

M社提供データより

4.2 均質性試験

標準試験体の均一性を評価する方法として、抗菌剤中に含有される銀(Ag)を指標物質に選び、標準試験体1枚当たり(50×60mm、右肩切断)の銀(Ag)量を測定した。

(1) 試料及び試料数

当評価に用いた試料である標準試験体は4.1(1)で作製したもの(塗工日:2001年8月30日)。

1) 400ppm (ロットJMG011226-2):5枚(n=5)

2) 2000ppm (ロットJMC010830-3):5枚(n=5)

(2) サンプルング方法

保存している標準試験体15セットから無作為に5セット選び出した後、各セットに入っている400ppm用PE小袋及び2000ppm用PE小袋から無作為に、標準試験体各々1枚を選び出し、計各5枚を評価用試料とした。

(3) 銀(Ag)量の理論推定値

1) 400ppm 2.4 μm/標準試験体1枚(29.76cm²)

2) 2000ppm 11.4 μm/標準試験体1枚(29.76cm²)

(4) 理論推定値の計算

1) PETフィルムの重量

0.6944

0.6909

0.6960

0.6892

0.6861

平均 0.6913(g/100cm²)

(換算)

0.2057(g/29.757cm²)

2) 標準試験体の重量

①400ppm

0.2223

0.2232

0.2210

0.2250

0.2252

平均 0.2233 (g/29.757cm²)

平均塗布量0.0176g/試験体1枚

銀(Ag)理論推定値 2.4 μg/試験体

②2000ppm

0.2236

0.2217

0.2228

0.2234

0.2206

平均 0.2224(g/29.757cm²)

平均塗布量0.0167g/試験体1枚

銀(Ag)理論推定値 11.4 μg/試験体

3) 参考: 計算式

$$\text{Ag量}(\mu\text{g}) = \text{塗布量}(\text{g}) \times \text{濃度}(\text{ppm}) \times 0.95 \times 107.9 / 301.0$$

(5) 銀(Ag)量の測定

試料である標準試験体400ppm及び2000ppmの各5枚について、原子吸光光度法により、試料1枚あたりの重量の測定及び銀の定量試験を行った。

1) 試験溶液の調製

試料の試験体1枚をケルダールフラスコに量り、硝酸10 mlを加えて穏やかに加熱した。激しい反応がおさまった後、硫酸5 mlを加え、再度加熱した。内溶液が暗色になり始めたら硝酸を2 mlずつ追加し、内容物がほとんど無色になるまで加熱を続けた。さらに硫酸の白煙が発生するまで加熱を続け、操作を終了した。放冷後、内容物をメスフラスコに移し、試験溶液とした。

2) 試験方法

試験溶液全量又は一部を200 ml容分液漏斗に移し、50 %クエン酸水素ニアンモニウム溶液10 ml及びブロムチモールブルー試液2滴を加え、アンモニア水で中和し、水を加えて約100 mlとした。次いで10 %DDTC溶液10 mlを加えて混和し、5分間放置した後、メチルイソブチルケトン10 mlを正確に加え、5分間激しく振とうした。静置後、メチルイソブチルケトン層を分取し、原子吸光光度計を用いて吸光度を測定した。別に銀標準液から濃度0.25ppm、0.5ppm及び1.0 ppmの銀標準溶液を調製し、各々10 mlを正確に量り、200 ml容分液漏斗に入れ、水40 ml、50 %クエン酸水素ニアンモニウム溶液10 ml及びブロムチモールブルー試液2滴を加え、以下、試験溶液と同様の操作を行い、得られた吸光度から作成した検量線を用いて試験溶液中の銀濃度を求めた。

3)原子吸光光度計測定条件

- ①機 種: AA-890(日本ジャーレルアッシュ株式会社)
- ②光 源: 銀中空陰極ランプ(浜松ホトニクス株式会社)
- ③測定波長: 328.1 nm
- ④フレーム: 空気-アセチレン

(6)試験結果

試験結果を表8に示した。

表8 試料の重量及び銀の定量試験結果

試料の 抗菌剤添加量 (ppm)	測定回数 (回)	重量 (g/枚)	銀量 (μ g/枚)
400	1	0.2247	2.78
	2	0.2249	2.34
	3	0.2223	2.72
	4	0.2236	2.74
	5	0.2201	2.58
	平均		0.2231
2000	1	0.2203	13.1
	2	0.2240	9.71
	3	0.2233	8.91
	4	0.2227	12.3
	5	0.2214	12.8
	平均		0.2223

4.3 抗菌性試験

(1) 試験機関

次の3試験機関(順不同)が、抗菌性試験の評価を担当した。その選定理由として、昨年度までの調査研究において評価を担当した機関で、これまでのデータの整合性の確保とともに、JNLA試験所認定を予定している評価技術としても高いレベルにあること、があげられる。

- ①財団法人日本食品分析センター(以下、日食)
- ②株式会社サンギ(以下、サンギ)
- ③株式会社INAX(以下、INAX)

(2) 試験方法

JIS Z 2801に準拠して作成した「抗菌陽性試験体作製の試験」手順書(作成日:2001年10月25日)に従って試験を行った。なお、上記試験機関中の1機関が、試験条件等を確認するための予備試験を実施している。

(3) 試料

標準試験体(東洋インキ製造(株) 作製/抗菌剤添加量 0ppm, 400ppm, 2000ppm)を使用した。

(4) 試験菌

日食が各試験機関からの発注窓口となり同一ロットの黄色ブドウ球菌を保存機関(IFO:財団法人発酵研究所)から菌株を各試験機関に配布した。その菌株を各試験機関で復元して使用した。

(5) 培地

試験に与える影響が大きいと考えられる普通ブイオン培地(NB)と普通寒天培地は、あらかじめ各試験機関に配布した。

(6) カバーフィルム

東洋インキ製造(株)より、各試験機関に配布した。

(7) 培養容器

(株)INAXより、各試験機関に配布した。

(8) 試験スケジュール

- ①1回目実施週(試料調製から 1週) 10月29日～
- ②2回目実施週(試料調製から 2週) 11月05日～
- ③3回目実施週(試料調製から 4週) 11月19日～
- ④4回目実施週(試料調製から 6週) 12月03日～
- ⑤5回目実施週(試料調製から 9週) 12月21日～
- ⑥6回目実施週(試料調製から15週) 02月04日～

表9 試験スケジュールと作業内容

作業内容	試験回数					
	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	6回目
○前々培養	10/29	11/05	11/19	12/03	12/21	02/04
斜面培地						
NB						
1/500NB						
○前培養	10/30	11/06	11/20	12/04	12/25(*)	02/05
斜面培地						
りん酸生食水						

標準寒天						
SCDLP						
○接種	10/31	11/07	11/21	12/05	12/26	02/06
○洗い出し	11/01	11/08	11/22	12/06	12/27	02/07
○計数(接種直後)	11/02	11/09	11/23	12/07	12/28	02/08
○計数(培養後)	11/03	11/10	11/24	12/08	12/29	02/09
◎細菌継代	10/26(1回目)	11/19(2回目)	12/10(3回目)	01/07(4回目)		

* 12/21に前々培養された試験菌は12/22~25の期間は5~10℃に保存されて、
12/25に前培養に供した。

(9)試験結果

①生菌数の評価

1) 生菌数

(平均; 0ppmはN=3, 400ppmはN=9, 2000ppmは1~4回目N=9, 5回目N=6, 6回目N=9)

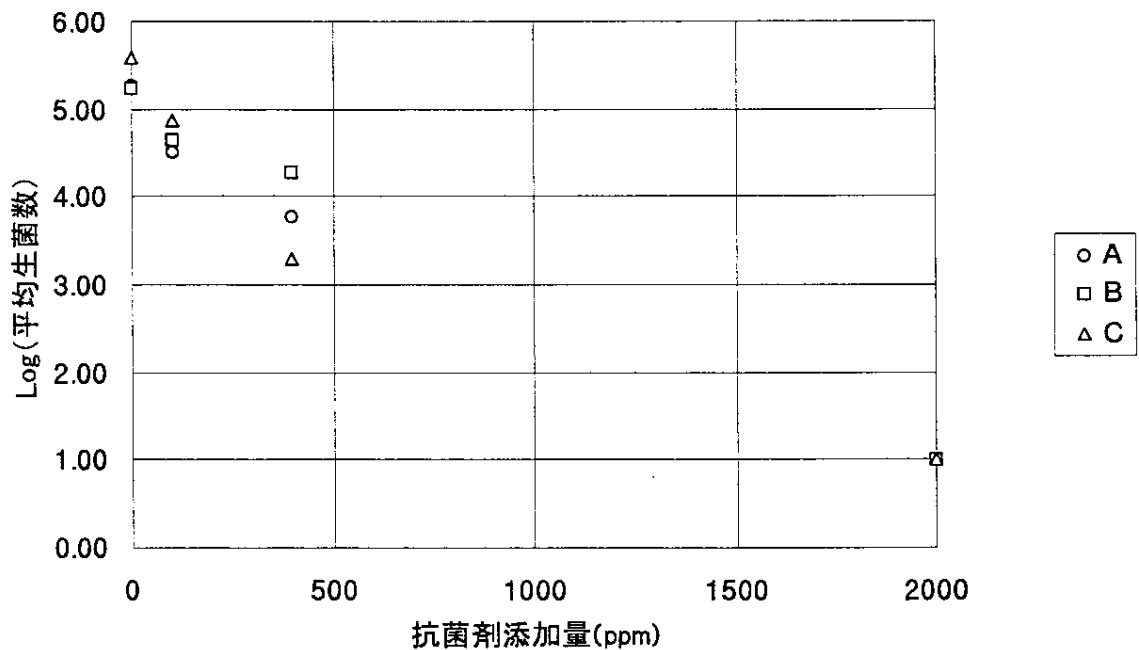


図4 抗菌剤添加量とLog(平均生菌数)の関係(1回目)

* 抗菌剤添加量の0(ppm)のデータは接種直後、100(ppm)付近のデータは
培養後の抗菌剤添加量0(ppm)の生菌数を示す

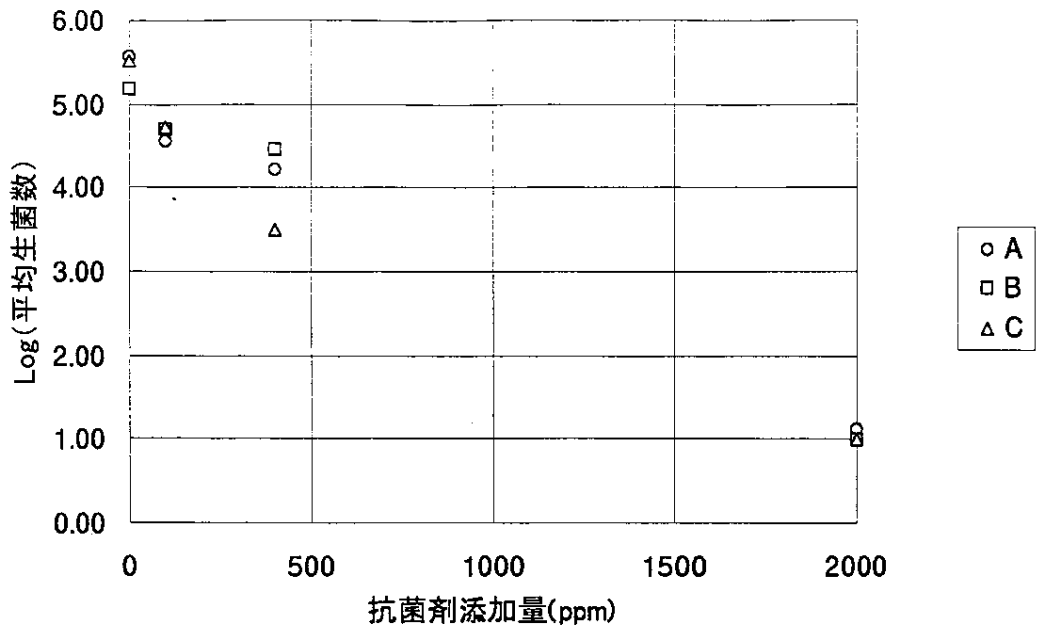


図5「標準試験体の抗菌剤添加量」と「Log(平均生菌数)」の比較(2回目)

* 抗菌剤添加量の0(ppm)のデータは接種直後、100(ppm)付近のデータは培養後の抗菌剤添加量0(ppm)の生菌数を示す

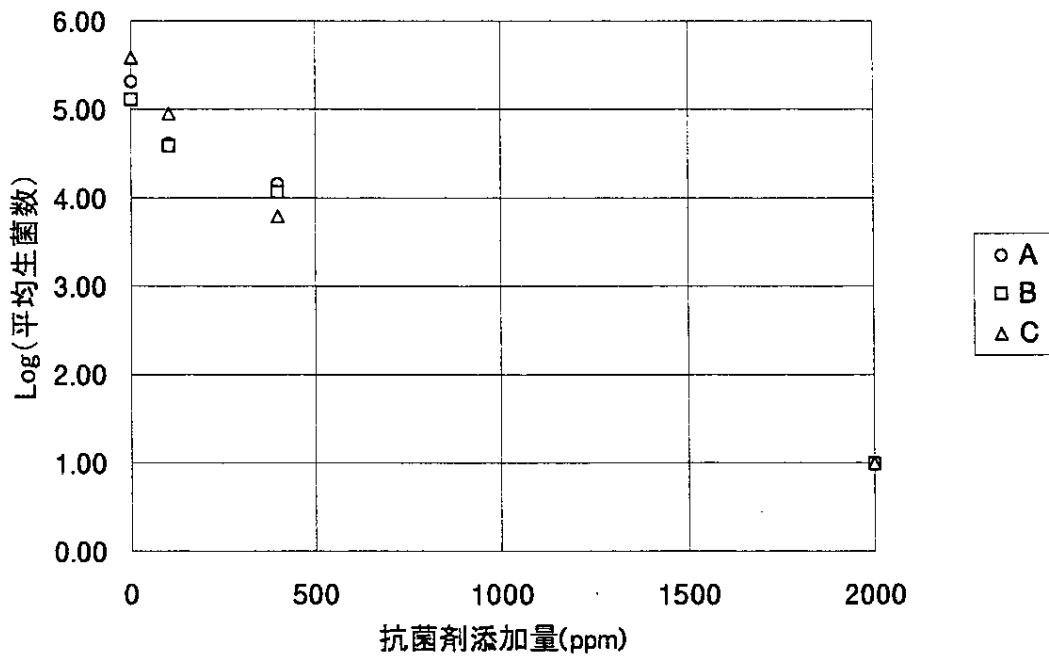


図6 抗菌剤添加量とLog(平均生菌数)の関係(3回目)

* 抗菌剤添加量の0(ppm)のデータは接種直後、100(ppm)付近のデータは培養後の抗菌剤添加量0(ppm)の生菌数を示す

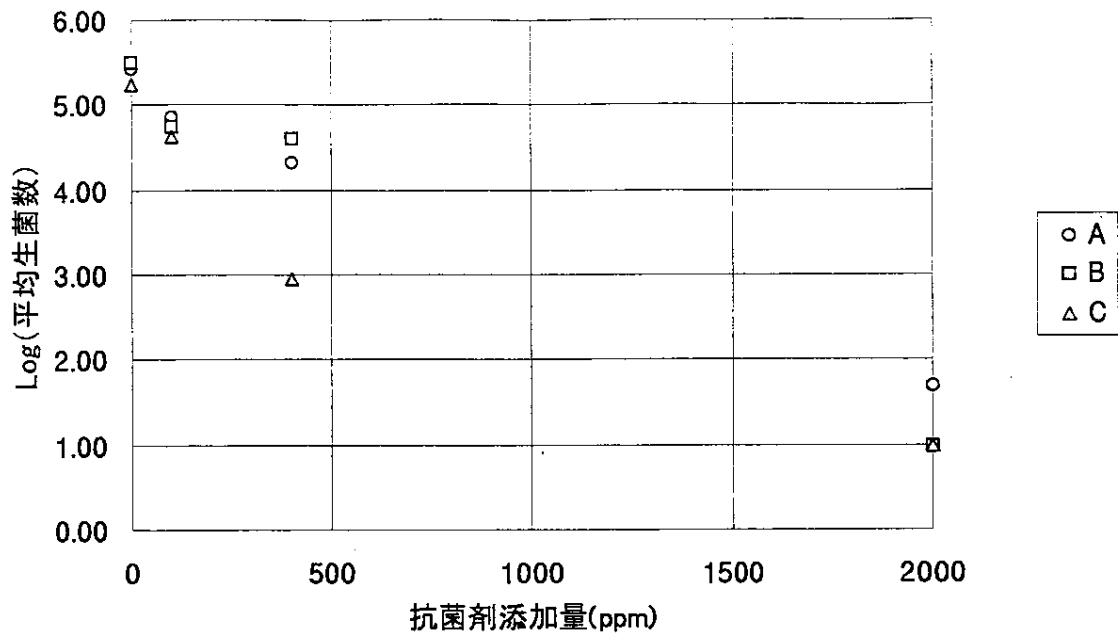


図7 抗菌剤添加量とLog(平均生菌数)の関係(4回目)

* 抗菌剤添加量の0(ppm)のデータは接種直後、100(ppm)付近のデータは培養後の抗菌剤添加量0(ppm)の生菌数を示す

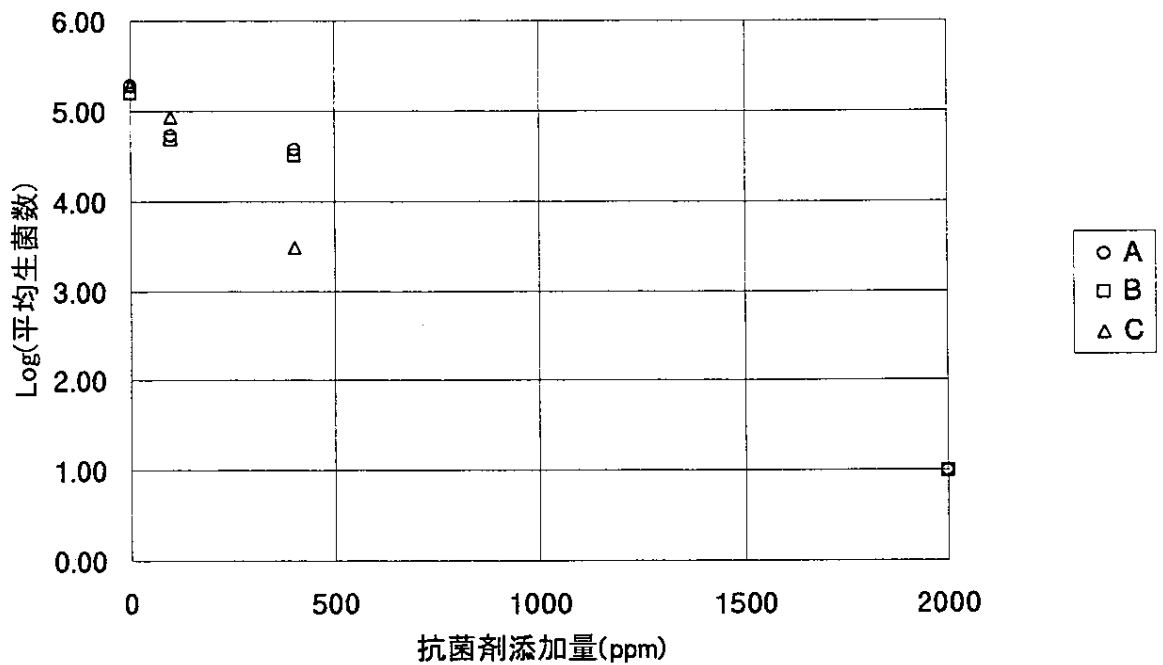


図8 抗菌剤添加量とLog(平均生菌数)の関係(8回目)

* 抗菌剤添加量の0(ppm)のデータは接種直後、100(ppm)付近のデータは培養後の抗菌剤添加量0(ppm)の生菌数を示す

* 試験機関Cの2000(ppm)のデータは無し。

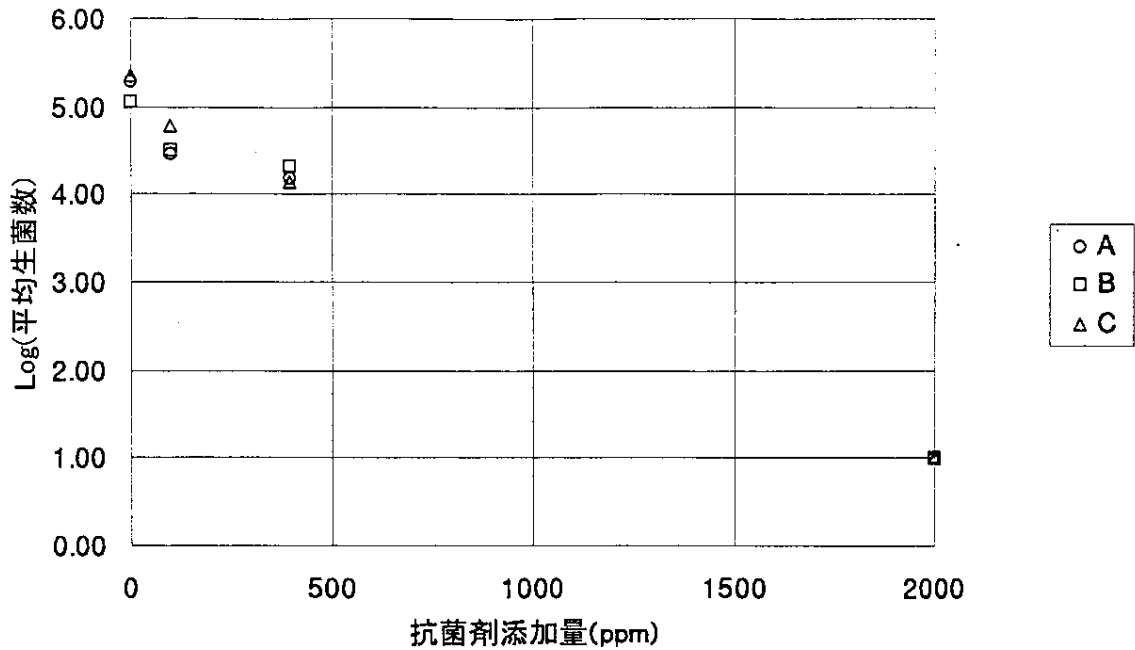


図9「標準試験体の抗菌剤添加量」と「Log(平均生菌数)」の比較(6回目)

* 抗菌剤添加量の0(ppm)のデータは接種直後、100(ppm)付近のデータは培養後の抗菌剤添加量0(ppm)の生菌数を示す

2) 生菌数の標準偏差と拡張不確かさ(U)

表10 Log(生菌数)の標準偏差

試料の抗菌剤添加量(ppm)	試験回数					
	1	2	3	4	5	6
0(接種直後)	0.17	0.18	0.21	0.11	0.06	0.14
0	0.17	0.13	0.19	0.13	0.15	0.17
400	0.45	0.45	0.25	0.33	0.46	0.16
2000	0.00	0.12	0.00	0.35	0.00	0.00

表11 Log(生菌数)の拡張不確かさ(U)

試料の抗菌剤添加量(ppm)	試験回数					
	1	2	3	4	5	6
0(接種直後)	0.38	0.40	0.48	0.25	0.13	0.32
0	0.37	0.28	0.43	0.29	0.32	0.37
400	1.06	1.06	0.52	0.76	1.09	0.34
2000	0.00	-	0.00	0.73	0.00	0.00

* -: 算出不能

②抗菌活性値の評価

1) 抗菌活性値(平均; 400ppmはN=9, 2000ppmは1~4回目N=9, 5回目N=6, 6回目N=9)

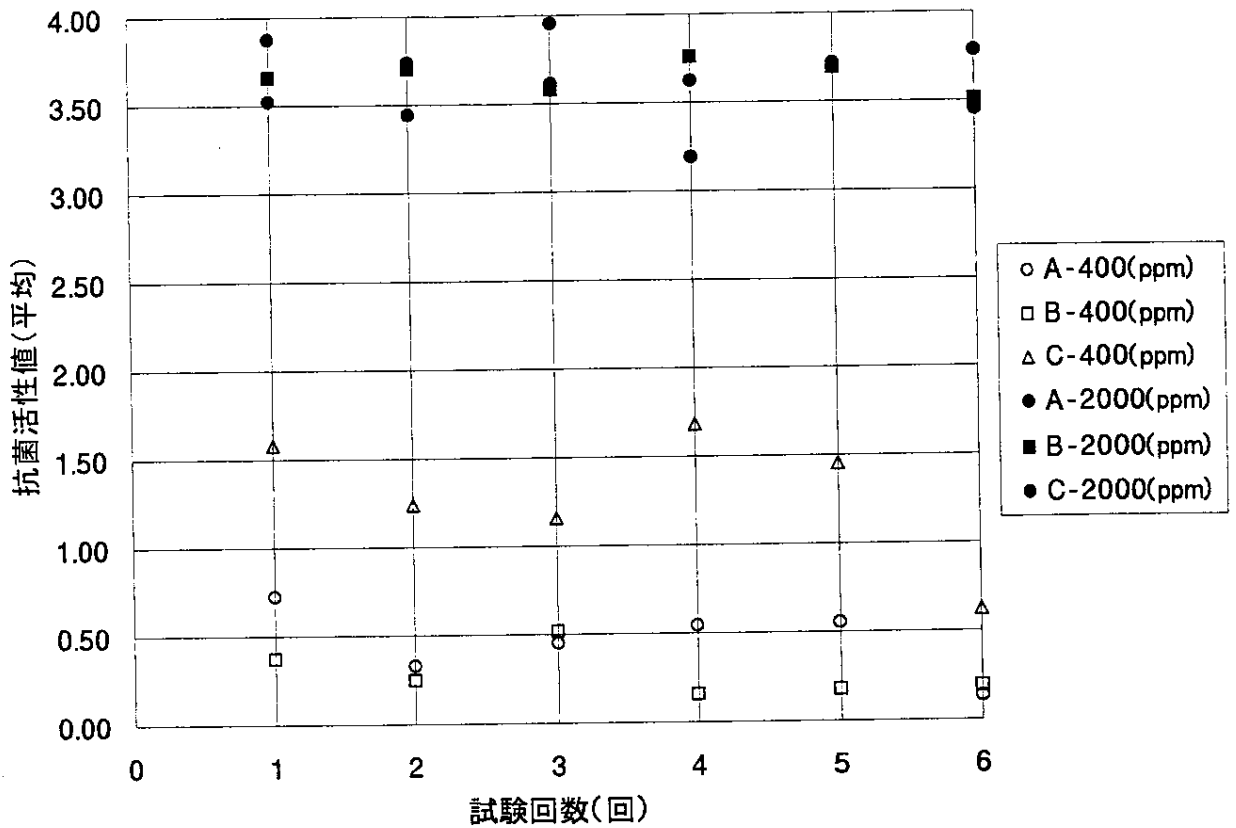


図10 試験回数と抗菌活性値(平均)

2) 抗菌活性値の標準偏差と拡張不確かさ(U)

表12 抗菌活性値の標準偏差

試料の抗菌剤 添加量(ppm)	試験回数					
	1	2	3	4	5	6
400	0.55	0.49	0.36	0.69	0.56	0.27
2000	0.15	0.16	0.17	0.32	0.02	0.15

表13 抗菌活性値の拡張不確かさ(U)

試料の抗菌剤 添加量(ppm)	試験回数					
	1	2	3	4	5	6
400	1.30	1.15	0.83	1.65	1.33	0.63
2000	0.35	0.34	0.41	0.65	0.04	0.34

4.4 考察

技能試験において、本標準試験体を使用の可否についてzスコアを用いて判断した。

zスコア計算式

$$z = (x - X) / s$$

x: 各試験機関で得られたデータ

X: 各試験機関で得られたデータのメジアン

s: 各試験機関で得られたデータの正規四分位数範囲

Zスコアの判定基準

$|z| \leq 2$ 満足

$2 < |z| < 3$ 疑義あり

$|z| \geq 3$ 不満足

(1) 均質性試験の結果より

1) 抗菌剤添加量400(ppm)

均質性試験のデータ5個をzスコア計算式で判定すると、データ5個全て(100%)がzスコアの判定基準を満足している。この結果より、この抗菌剤添加量400(ppm)の標準試験体1枚当りの銀(Ag)量の安定度は良好であり、技能試験において、この標準試験体を使用することは結果の評価に十分有効であると考えられる。

2) 抗菌剤添加量2000(ppm)

均質性試験のデータ5個をzスコア計算式で判定すると、データ5個全て(100%)がzスコアの判定基準を満足している。この結果より、この抗菌剤添加量2000(ppm)の標準試験体1枚当りの銀(Ag)量の安定度は良好であり、技能試験において、この標準試験体を使用することは結果の評価に十分有効であると考えられる。

(2) 抗菌性試験の結果より

1) 抗菌剤添加量400(ppm)

各試験機関の6回分の全てデータ162個を1回分の試験(データ27個)ごとにzスコア計算式で判定する。

①Log(生菌数): 162個中159個(約98%)がzスコアの判定基準を満足している。

(2個は「疑義あり」、1個は「不満足」であった)

②抗菌活性値: 162個中160個(約99%)がzスコアの判定基準を満足している。

(2個は「疑義有り」であった)

この結果より、この抗菌剤添加量400(ppm)の標準試験体の抗菌効果の安定性は良好であり、技能試験において、この標準試験体を使用することは結果の評価に十分有効であると考えられる。

2) 抗菌剤添加量2000(ppm)

全ての試験機関のLog(生菌数)の全データ162個中、158個が1.00(約98%相当)であるので、各試

験機関のデータは安定していると判断した。

この結果より、この抗菌剤添加量2000(ppm)の標準試験体の抗菌効果の安定性は良好であり、技能試験において、この標準試験体を使用は十分有効であると考えられた。

なお、標準試験体の抗菌剤添加量0(ppm)を用いて評価した接種直後対照区及び対照区において、各試験機関とも接種直後対照区の生菌数は10の5乗レベル、対照区の生菌数は10の4乗レベルと安定した結果であり、各試験機関の抗菌性試験の方法は安定していると考えられた。

以上の結果から、抗菌剤添加量400(ppm)の「疑義あり」、「不満足」のデータ及び2000(ppm)の1.00以外のデータが発現した原因は抗菌性試験の方法でなく、標準試験体自体に起因すると考えられる。

5. 技能試験に供する抗菌陽性標準試験体の仕様

平成13年度に実施した標準試験体の実用化検討の結果、今回開発した標準試験体は十分に技能試験用として使用できることが確認できたため、カバーフィルムと併せてその納入仕様ををあらためて下記のように決定した(図11に標準試験体とカバーフィルムを示す)。

5.1 抗菌陽性標準試験体の形態

(1)シート寸法:50mm×60mm(±1mm)

(2)シート構成

- ①基材 :PETフィルム 50 μ m(裏面マット加工)
- ②塗膜層 :膜厚 5±1 μ m
- ③ワニス :アクリル系水系ワニス
- ④抗菌剤 :水溶性銀有機系抗菌剤

(3)裏表識別 :右肩が切断されている上面の光沢面が試験面。裏面マット加工。

(4)包装形態 :標準試験体を抗菌剤濃度(0ppm,400ppm,2000ppm)毎に各々PE小袋(縦95mm×横70mm)に入れ、これら3濃度を1セットにしてアルミPET袋(縦155mm×100mm)にパック詰めする。

(5)枚数 :0ppm 7枚、400ppm 4枚、2000ppm 4枚(1セット当り。各濃度、予備を1枚ずつ含む)

(6)ラベル表示

- ①PE小袋 :濃度(無加工試験体、レベル1、レベル2)、数量製造ロット、裏表識別
- ②アルミPET袋:品名(JNLA技能試験用標準試験体)、管理No、数量、製造ロット、製造年月日、使用期限、注意事項

(7)滅菌処理 :電子線照射(照射条件:30kGy)

(8)保存

- ①使用期間 :シート製造後4ヶ月以内に使用すること。
- ②保存条件 :直射日光が当たらない場所で保存のこと。
ただし、長期保存(1ヶ月以上を目処とする)の場合は要冷蔵(5~10℃)。

5.2 カバーフィルムの形態

(1)シート寸法 :40mm±1mm四方

(2)シート材質 :PEフィルム 100 μ m

(3)裏表識別 :機能的な差異はなく、裏表の表示はしない

- (4)包装形態 :チャック付アルミPET袋
- (5)枚数 :50枚(1パック当たり)
- *カバーフィルムの梱包形態としては標準試験体1セットに1パック(50枚)を同封する。
- (6)ラベル表示 :品名(JNLA技能試験用カバーフィルム)、サイズ、数量、製造ロット、
「滅菌処理済」表示、注意事項
- (7)滅菌処理 :電子線照射(照射条件:30kGy)
- (8)保存
- ①使用期間 :特に定めない。
 - ②保存条件 :室温保存。

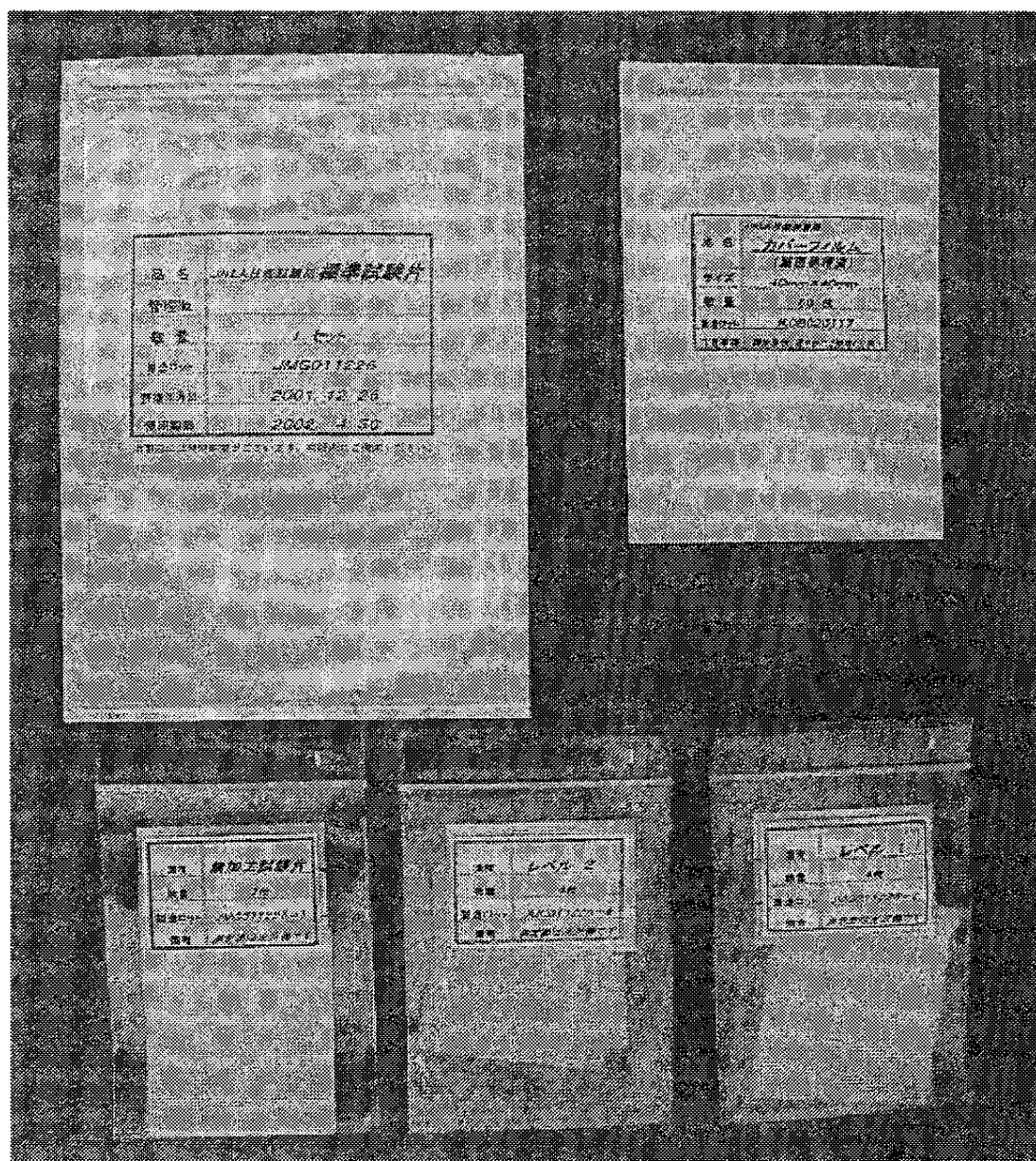


図11 JNLA技能試験用の標準試験体とカバーフィルム

6.まとめ

抗菌JIS Z 2801:2000 抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果(平成12年12月20日制定)に連動して実施されたJNLA試験所認定制度で、平成13年度以降に実施する技能試験に提供できる、実用化のための抗菌陽性標準試験体の作製と評価を行った。

本委員会の目標達成のための主な課題として、

1) 試験体の抗菌効果による精度確認

抗菌剤添加量400ppm、2000ppmの標準試験体を用い、3試験機関によって全4回の抗菌効果の評価を行った結果、抗菌効果の安定度は、zスコアの判定基準を満足し良好な結果を得たことから技能試験用標準試験体として供することに十分であるという判断に至った。

また、標準試験体中の銀(Ag)量の測定を原子吸光光度法を用いて行なったところ、銀(Ag)理論推定値に近似していることを確認し、抗菌剤の添加量から標準試験体の均質性についての確認を行った。

2) 試験体荷姿、保管(包装)方法及び品質保証期間の検討

シート寸法、シート構成(基材、塗膜層、ワニス、抗菌剤)、裏表識別加工、包装形態、枚数、ラベル表示(PE小袋、アルミPET袋)、滅菌処理(電子線照射)、保存(使用期間、保存条件)について試験体荷姿などの仕様を決定し、品質保証期間(4ヶ月間)についてもあわせて実験で確認した。

また、今回標準試験体と合わせて、抗菌評価用として使用するカバーフィルム(材質:PE/膜厚:100 μ m)についても統一形態での提供を可能とした。

3) 試験体量産技術の検討

標準試験体の製造時に於ける膜厚のバラツキと塗工乾燥条件が抗菌効果に及ぼす影響を調べることで量産における製造条件を確定した。また、電子線照射により抗菌効果に影響を与えないことをあわせて確認した。

以上の成果から、抗菌JIS Z 2801:2000(抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果)において抗菌加工を施した製品の表面における、細菌に対する抗菌性試験方法及び抗菌効果について規定された、「5.2 プラスチック製品などの試験方法」に適用される平成13年度抗菌技能試験の実現を可能とした。

抗菌という微生物を用いた試験に供する技能試験用抗菌陽性標準試験体(認証標準物質)の開発と実用化は、国際的にも極めて画期的なことである。

また、今後の課題として、更に試験体の安定性を向上させるため樹脂系の変更等更なる改善と、長期耐久性の評価、細分化した抗菌活性値を有する試験体製造等が上げられる。

以上

[添付資料1]

表1 抗菌陽性標準試験体実用化委員会委員名簿

	氏名	所属
委員長	今井 茂雄	(株)INAX 基礎研究所 バイオ研究室長
専門委員	鈴木 昌二	(財)日本食品分析センター 東京本部 業務部付課長
	水上 義勝	カネポー化成(株)化成品営業グループ 専任部長
	藤田 恵二郎	(株)サンギ 研究開発部 中央研究所 副主席研究員
	鴻巣 正幸	三愛石油 研究所 グループリーダー
	伊東 孝司	東洋インキ製造(株)エコロジーセンター 品質担当部長
	高尾 研治	川崎製鉄(株)技術研究所ステンレス鋼研究部門 主任研究員(課長)
委員	上戸 亮	経済省 産業技術環境局 認証課 課長補佐
	別所 敏明	(独)製品評価技術基盤機構 適合性評価センター 試験所認定課長
事務局	井上 英武	抗菌製品技術協議会 専務理事
	林 進	抗菌製品技術協議会 常任理事
	藤本 嘉明	抗菌製品技術協議会 事務局長

表2 同分科会委員名簿

	氏名	所属
分科会長	今井 茂雄	(株)INAX 基礎研究所 バイオ研究室長
専門委員	鈴木 昌二	(財)日本食品分析センター 東京本部 業務部付課長
	水上 義勝	カネポー化成(株)化成品営業グループ 専任部長
	藤田 恵二郎	(株)サンギ 研究開発部 中央研究所 副主席研究員
	鴻巣 正幸	三愛石油 研究所 グループリーダー
	伊東 孝司	東洋インキ製造(株)エコロジーセンター、品質担当部長
	高尾 研治	川崎製鉄(株)技術研究所ステンレス鋼研究部門 主任研究員(課長)
事務局	井上 英武	抗菌製品技術協議会 専務理事
	林 進	抗菌製品技術協議会 常任理事
	藤本 嘉明	抗菌製品技術協議会 事務局長