

平成14年度 経済産業省委託

細菌を用いた評価法におけるトレーサビリティ  
の確立と  
不確かさの推定に関する調査研究  
委託調査研究成果報告書

平成15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	.....2
3. 1次標準物質の作製と不確かさの評価	.....3
3.1 1次標準物質のアイデア出しと選定	.....3
3.2 イオン注入法	.....3
3.2.1 作製方法	.....3
3.2.2 試験方法	.....4
3.2.2.1 抗菌性試験	.....4
3.2.2.2 表面分析(ESCA)	.....5
3.2.3 結果と考察	.....6
3.3 GaAsウエハ	.....7
3.3.1 GaAsウエハの仕様	.....7
3.3.2 試験方法	.....7
3.3.2.1 抗菌性試験	.....7
3.3.2.2 溶出試験	.....10
3.3.2.3 表面分析(AFM , FE-SEM)	.....10
3.3.3 結果と考察	.....12
4. 2次標準物質の作製と不確かさの評価	.....13
4.1 ワニス系の塗料を塗布したPETフィルム	.....13
4.2 作製方法	.....13
4.2.1 使用抗菌剤	.....13
4.2.2 ポリマーの種類(組成、分子量、不揮発成分、溶媒、粘度)	.....13
4.2.3 膨潤度	.....13
4.2.4 添加剤	.....13
4.2.5 塩基の種類と作用機構	.....13
4.2.6 pH	.....13
4.2.7 ポリマーに関する残存モノマー	.....13
4.2.8 加熱による変化	.....14
4.2.9 電子線に対する耐性	.....14
4.2.10 膜厚及び乾燥条件が抗菌性能に及ぼす影響	.....14

4.3 試験方法	14
4.3.1 抗菌性試験	14
4.3.1.1 1回目の試験	14
(1) 予備試験(INAX)	14
(2) 本試験	15
4.3.1.2 2回目の試験	20
(1) 予備試験(日食)	20
(2) 本試験	20
4.3.1.3 抗菌性試験に使用するフィルムが 培養後の生菌数に与える影響	25
4.3.2 銀の定量(原子吸光)	27
4.4 2次標準物質の要因分析	28
4.4.1 重回帰分析	28
4.4.2 抗菌剤濃度とLog(平均生菌数)	30
4.5 試験菌の活性評価	31
4.5.1 リボタイピング	31
4.5.2 最小発育阻止濃度(MIC)	31
4.6 2次標準物質の残された課題	32
4.6.1 2次標準物質をより完成させるための残された課題	32
4.6.2 試験規模の拡大	32
5. 1次標準物質と2次標準物質の不確かさを見積もる参照法の策定	33
6. 日米欧亜の環境調査及び海外不確かさ試験関連文献調査	36
6.1 日米欧亜の環境調査	36
6.2 不確かさ関連文献調査	37
6.2.1 文献1	37
6.2.1 文献2	37
7. 総括(今後の課題)	40
(添付資料)	
1. 抗菌性試験の特性要因図(平成13年度報告書より)	41
2. 実施計画・委員会開催日程・研究体制	42
3. 調査研究委員会委員及び同分科会委員名簿	45
4. 抗菌性試験データ集	47
5. 実験記録用紙	64
6. 「抗菌陽性試験片 不確かさの評価試験」依頼書	68
7. 拡張不確かさ(U)の算出方法	70
8. 「抗菌陽性試験片 不確かさの評価試験」手順書	71

## 1. まえがき

平成8年6月のO-157の集団食中毒を契機に日本の抗菌市場は一気に拡大することとなった(約8000億円; 富士経済「抗菌・殺菌・除菌関連市場の現状と将来展望」1997年)。そこで、平成10年12月に経済産業省(旧 通商産業省)の生活関連新機能加工製品懇談会は、業界ごとに自主基準を整備するための抗菌製品ガイドラインを発表した。ガイドラインに対応し平成12年12月にJIS Z 2801:2000(抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果)が制定すると同時に我が国では、工業標準化法に基づく試験事業者認定制度(JNLA)において、抗菌性試験方法が認定範囲に加えられて、当該分野の試験所の認定が開始された。

現在、わが国の抗菌加工製品の生産拠点や技術をアジアを中心とする欧米など海外に急速に移転しつつある状況から、抗菌加工製品に関する国家規格(JIS Z 2801:2000)のみならず、グローバルスタンダード(国際規格)とすることが国内外で求められている。抗菌加工製品(抗菌剤)に関する国際規格化は、わが国企業の優位性を有する新技術・新製品の国際市場への波及化につながるとともに、わが国産業の国際競争力強化に大きく寄与するものと考えられる。

一方、JNLAは、これまでの国際規格ISO/IEC Guide 25から大幅に改正されたISO/IEC17025に対応するにあたり、新規申請を2001年7月から、既認定試験事業者に対する立ち入り検査においては2002年1月から、すべての試験事業者にISO/IEC17025を適用し、同時に「試験の不確かさに関する要求事項」を適用する方針であることをすでに公表している(国際的には2002年末の完全移行で合意)。

この規格の特徴の一つは、試験結果の信頼性を示す指標である「不確かさ(uncertainty)」の考え方の導入があげられる。これまでにない要求事項であり電気や物理の分野においても各国の方針が、未だ明確にまとまっていない状況にある。まして微生物の分野においては、国際的にも最も手のつけ難い分野であると考えられている。

以上のように、試験方法とJNLAについて国際的な対応が迫られている。すなわち、国際規格化作業において不確かさを考慮した試験方法の再設計が必要であり、抗菌という微生物を用いた試験方法は、今後の我が国の重点課題である「健康・環境・バイオテクノロジー」という分野を網羅するものであり、標準化を視野に入れた研究開発の推進としても重要である。また、一方で国際的な取引が行われている市場において、信頼性のある試験所が認定国際基準適合を受けていることが求められ、One-Stop-Testing(一つの試験所で得られたデータが、世界中で受け入れられるような仕組み)の合理化・効率化の恩恵はきわめて大きい。

そこで、将来の国際規格化の準備を視野に入れ、また我が国のJNLAを今後ISO/IEC 17025にあわせた運用にするため、経済産業省から独立行政法人製品評価技術基盤機構へ「試験事業者認定事業委託費」に係る委託調査研究を実施することとなり、その一環として「細菌を用いた評価法におけるトレーサビリティの確立と不確かさの推定に関する調査研究」に関する委員会(以下;不確かさ委員会)を平成13年度に設置することとなった。なお、本調査研究は抗菌製品技術協議会に再委託を行われ、不確かさ委員会ならびに不確かさ分科会において検討を行った。

「細菌を用いた評価法におけるトレーサビリティの確立と不確かさの推定に関する調査研究委員会」の委員名簿を添付資料の表1に、および「同分科会」を表2に記載した。

この報告書は、昨年に引き続き平成14年度に行われた「細菌を用いた評価法におけるトレーサビリティの確立と不確かさの推定に関する調査研究」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

試験結果の信頼性を示す指標である「不確かさ(uncertainty)」についての要求事項は、電気や物理の分野においても各国の方針が、未だ明確にまとまっていない状況にある。ましてや化学及びバイオの分野は、国際的にも最も手のつけ難い分野であるという認識で、今なお国際的な議論の最中であり、この概念の統一理解・利用には至っていない。また、測定結果のトレーサビリティを供給する認証標準物質の役割は、まだ国際的に完全に確立されているとはいえない。

本調査研究の目的は、JIS Z 2801:2000が細菌を用いた評価法であること、JNLAの国際的な対応を協力に推進し、将来の国際規格化の作業の準備のために、国際的にも前例がなく困難とされる微生物の分野で先駆的に「トレーサビリティの確立」と「不確かさの推定」に関する調査と推定方法について検討を行うとともに、これらの検討に必要不可欠となる「標準物質の作製」を目指すものである。

すなわち、精密で安定な標準物質の作製ができれば、データを基盤とした理論的かつ説得力のある国際的に通用する不確かさを考慮した試験方法のデザイン(JIS Z2801の国際整合性を持たせた改良)が可能となるとともに、JNLAにおいても技能試験や試験所内のコントロールサンプルとして不確かさの要求とトレーサビリティの確保を実現することができる。バイオの分野での標準物質の作製は極めて困難とされるが、その効果はきわめて大きいと考える。JIS Z2801をケーススタディーにして、わが国におけるバイオテクノロジーとナノテクノロジーを駆使して標準物質の実現と国際規格化を目指す意義は、抗菌分野の国際的イニシアチブを確保する観点からきわめて大きなものといえる。

平成13年度調査研究を始めるにあたり以下のようなスケジュールを作成(3つのPhaseを想定)し、平成13年度においてPhase 1の課題を中心に実施した。

### ■ Phase 1

- ・バイオの分野で「トレーサビリティ」・「不確かさ」の見積もり方法のデザイン
- ・試験要因の洗い出し
- ・認証標準物質に関する調査と作製
- ・認証標準物質精度データの収集(均一性・安定性に関する基礎データの収集)
- ・一次標準物質作製法のアイデア出し

### ■ Phase2

- ・どの要因が不確かさに寄与するかの特定と見積もり
- ・認証標準物質を用いた不確かさに関する調査検討
- ・SI単位に結びつく一次標準物質の作製と精度データの収集
- ・日米欧の環境調査(細菌種・室温・清浄度)

### ■ Phase3

- ・認証標準物質を用いた「不確かさ」の推定方法と考え方まとめ
- ・経済活動のグローバル化を考慮した認証標準物質の作製供給体制の確立

本年度はまず、一次標準物質に関する作製を中心課題とし、SI単位に結びつけることを検討しながら、抗菌効果における均一性・安定性に関する基礎データの収集を目的とする。

### 3. 1次標準物質の作製と不確かさの評価

#### 3.1 1次標準物質のアイデア出しと選定

抗菌性試験の不確かさを推定するためには、1次標準物質が必要である。その1次標準物質として、次の2種類を選定した。

- (1) イオン注入法で作製した試験片(以下;イオン注入法)
- (2) GaAsウエハ

#### 3.2 イオン注入法

##### 3.2.1 作製方法

###### (1) 基材

朝日テクニグラス(株)製のED-Cグレードの石英ガラス(表1)。サイズ50mm×50mm、厚さ2mm。

表1 石英ガラスの純度の代表値(単位 ppm)

グレード	Al	Ca	Cu	Fe	Na	K	Li	Mg	Mn	Ti	OH
ED-C	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<1

(出典: 石英ガラス製品案内 朝日テクニグラス株式会社カタログ)

###### (2) 注入するイオン

(株)高純度化学の塩化銀をイオン化して調製したAg<sup>+</sup>(107) (以下、Ag<sup>+</sup>)

###### (3) イオン注入の機関と装置

###### ① 注入機関

(株)イオン工学センター

###### ② 注入装置

RD200M型(日新電機(株))の200KeVのイオン注入装置)

###### (4) イオン注入条件

###### ① 注入深さ

基材表面から3nm

###### ② 注入するイオン量

注入するイオン量は基材表面から3nmの深さに存在するガラス(SiO<sub>2</sub>)のSiとOの原子総数に対して0.1, 2.5, 100(atom%)とした。

3nmの位置のAg<sup>+</sup>濃度は同位置に存在する全てのイオン数及び原子数に対して次の通りと考えられる。

$$\text{試験片のAg}^+\text{濃度(atom\%)} = \frac{\text{注入したAg}^+\text{数}}{(\text{注入したAg}^+\text{数} + \text{SiとOの原子総数})} \times 100$$

例. Ag<sup>+</sup>を100(atom%)注入した場合

$$\text{試験片のAg}^+\text{濃度(atom\%)} = 100 / (100 + 100) \times 100 = 50(\text{atom\%})$$

\* このイオン注入の注入深さと注入量は注入装置側の設定であり、実際に試験片に注入されたイオンの注入深さと注入量については、試験片の表面分析で評価する。

### 3.2.2 試験方法

#### 3.2.2.1 抗菌性試験

##### (1) 評価方法

JIS Z 2801:2000に準拠。但し、菌株、培地、培養容器は2次標準物質と共通にした。

##### (2) 評価機関

(株)INAX 分析センター

##### (3) 試験菌種

*Staphylococcus aureus* (NBRC 12732)

##### (4) 結果

##### ① イオン注入(0.1, 2.5atom%) (表2)

表2 イオン注入(0.1, 2.5atom%)の抗菌効果<sup>a)</sup>

	平均生菌数	抗菌活性値 (標準偏差)
接種直後対照区 (フィルムブランク)	$3.2 \times 10^5$	—
対照区 (フィルムブランク)	$3.2 \times 10^6$	—
イオン注入 (0.1atom%)	$9.8 \times 10^5$	0.52 (0.15)
イオン注入 (2.5atom%)	$8.9 \times 10^5$	0.56 (0.14)

<sup>a)</sup>全項目N=5で算出

##### ② イオン注入(100atom%)

イオン注入(100atom%)では抗菌活性値2.0以上となった(接種直後対照区と対照区はN=5、イオン注入(100atom%)はN=1)。この試験片の抗菌効果耐久性を抗菌性試験の繰返して評価した(図1)。図中の接種直後対照区と対照区の誤差範囲は各試験回数におけるLog(生菌数)の最大値と最小値を示す。

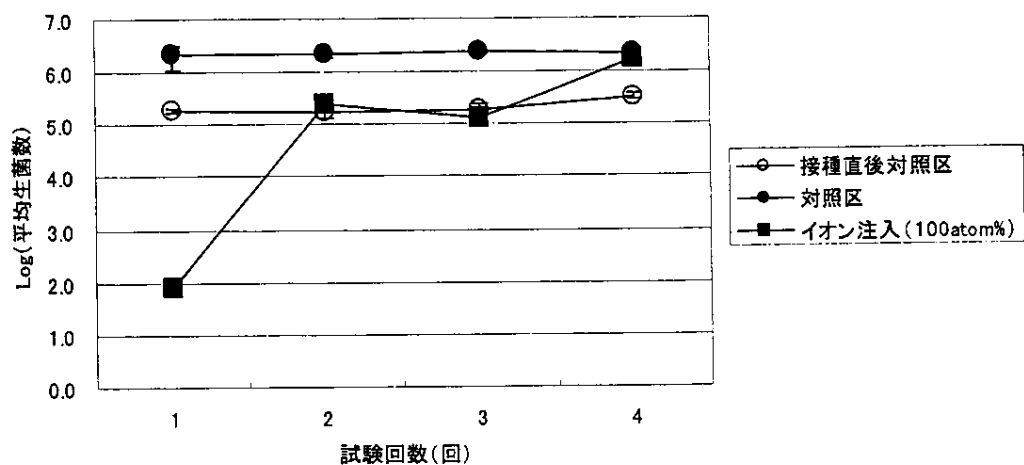


図1 イオン注入(100atom%)の抗菌効果の変化

### ③試験片に注入されたイオン量と抗菌活性値

試験片に注入されたイオン量(注入装置側の設定)と抗菌活性値の関係を図2に示す。

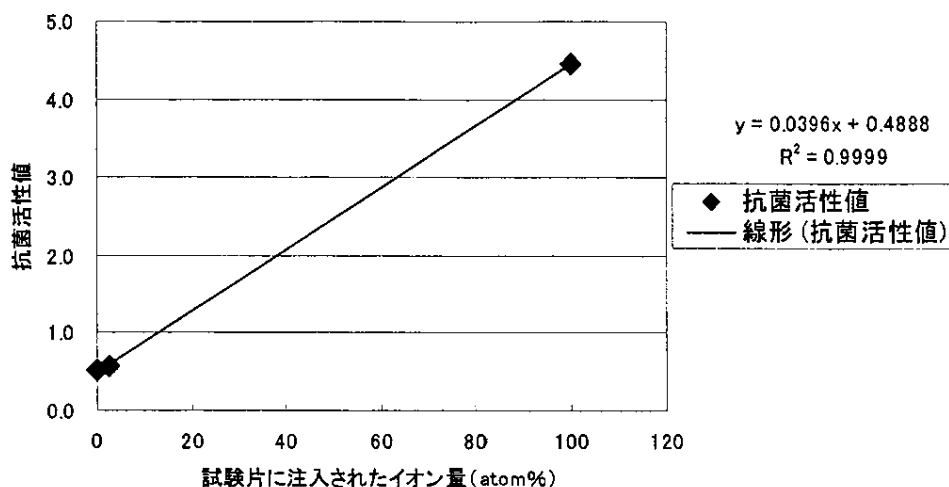


図2 試験片に注入されたイオン量と抗菌活性値

### 3.2.2.2 表面分析(ESCA)

#### (1)評価方法

ESCA(X線光電子分光法)による元素分析

#### (2)評価機関

(株)東レリサーチセンター

#### (3)結果

抗菌効果の発現した試験片であるイオン注入(100atom%)表面を(株)東レリサーチセンターのESCAで分析した結果を表3に示す。尚、検出された元素は表3に示すC, O, Si, Ag, N, Clのみであった。また、表3の結果を元素組成O, Si, Agのみで換算したものを表4に示す。

表3 イオン注入(100atom%)表面の元素組成(atom%)

	C	O	Si	Ag	N	Cl	Agの状態
最表面	5	3	1	2	0	0	Ag <sup>+</sup>
	0.8	0.8	5.1	.64	.09	.48	
3nm	8	5	3	1		0	Ag <sup>+</sup>
	.48	7.2	2.8	.29		.16	
10nm	0	6	3	0		0	Ag <sup>2+</sup>
	.19	5.1	4.4	.08		.06	
	4	5	0				
		9	8				

—:未検出



表4 イオン注入(100atom%)表面の元素組成(atom%)

	O	Si	Ag
最表面	63.49	31.08	5.43
3nm	62.68	35.91	1.41
10nm	65.35	34.57	0.08

### 3.2.3 結果と考察

#### (1) 注入量されたAg<sup>+</sup>量

抗菌効果が得られたイオン注入(100atom%)試験片を表面分析した結果、注入されたAg<sup>+</sup>量は3nmの深さに1.41atom%、最表面に存在するAg<sup>+</sup>量を加算しても6.84atom%であった(表4)。この結果から、Ag<sup>+</sup>は注入装置側の設定である「基材表面から3nmの深さに100atom%(=イオン注入後、基材表面から3nmの深さに存在する全てのイオン数及び原子数に対するAg<sup>+</sup>濃度50atom%)」に対して約14%(6.84/50×100%)しか注入されていない。この原因として、基材に注入されたAg<sup>+</sup>が後から注入されたAg<sup>+</sup>に弾き出された、またはプラスの電荷を有するAg<sup>+</sup>が注入されたことで試験片表面がプラスの電荷を有し、注入装置から出力されたAg<sup>+</sup>が電気的な反発によって弾かれたために、試験片表面のAg<sup>+</sup>量は注入装置側の設定と比較して少なくなったと考えられる。

#### (2) 抗菌活性値

今回の評価で、抗菌活性値2.0以上となった試験片は注入されたAg<sup>+</sup>量が100atom%のみであった(図1)。イオン注入量0.1, 2.5atom%で抗菌効果が発現しなかったのは注入されたAg<sup>+</sup>量が不足したためと考えられる。図2より、抗菌活性値2.0以上となるAg<sup>+</sup>のイオン注入量は注入装置側の設定で38.2atom%(=(2.0-0.4888)/0.0396)以上と考えられる。

### 3.3 GaAsウェハ

#### 3.3.1 GaAsウェハの仕様

(1) 製造業者、納品日

製造業者は日本エクシード(株)。

納品日は、GaAsウェハAが02/11/07、GaAsウェハBが03/01/15。

(2) 寸法、精度

①サイズ:  $\Phi 76.2 \pm 0.2 \text{mm}$

②厚み:  $600 \pm 15 \mu\text{m}$

③そり:  $15 \mu\text{m}$ 以下

④TTV:  $6 \mu\text{m}$ 以上

(3) 結晶

①結晶系: 閃亜鉛型面心立方

②格子定数:  $5.65 \text{ angst.} (=0.565 \text{nm})$

③面方位: 100

④不純物: 添加せず

⑤純度: 6N(99.9999%)

⑥GaとAsの存在: GaとAsが1:1で入っている。

(4) 面処理

①表面: Mirror仕上げ

②側面、裏面: Etched

(5) 比抵抗

$1.0 \times 10^7 \Omega \cdot \text{cm}$ 以上

#### 3.3.2 試験方法

##### 3.3.2.1 抗菌性試験

(1) 評価方法

イオン注入法と同様

(2) 評価機関

(株)INAX 分析センター

(3) 試験菌種

*Staphylococcus aureus* (NBRC 12732)

(4) 結果

GaAsウェハAとBは納品日の異なる同仕様、同ロットの製品である。GaAsウェハAについて1回目はN=5、2回目以降は1枚破損したためN=4で評価した。接種直後対照区と対照区は全てN=5で評価した。図中の誤差範囲は各試験回数におけるLog(生菌数)の最大値と最小値を示す。GaAsウェハAの結果を図3及び表5~10に、GaAsウェハBの結果を図4及び表11~15に示す。

①GaAsウェハ

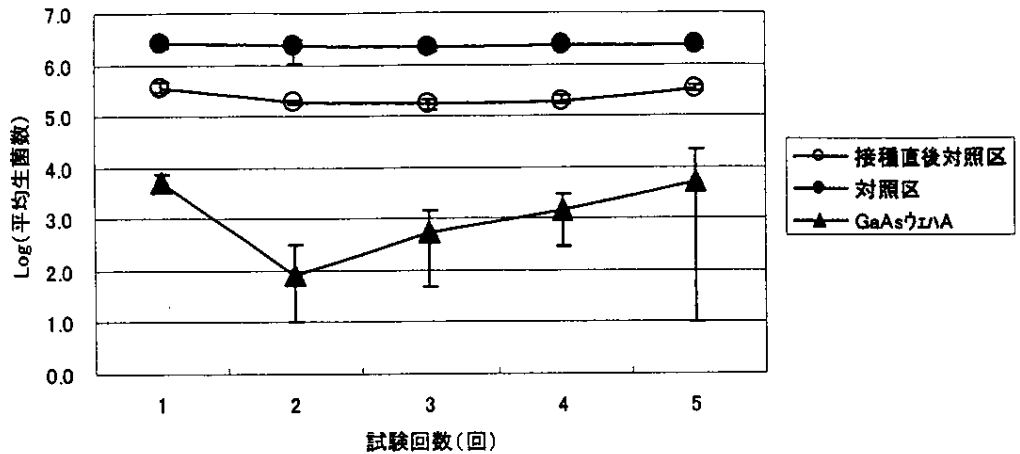


図3 GaAsウェハの抗菌効果の変化

表5 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験1回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.55	0.07
24	フィルムブランク	6.41	0.05
	GaAsウェハ	3.73	0.15

表6 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験2回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.29	0.03
24	フィルムブランク	6.36	0.20
	GaAsウェハ	1.93	0.75

表7 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験3回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.25	0.07
24	フィルムブランク	6.33	0.03
	GaAsウェハ	2.72	0.63

表8 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験4回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.30	0.07
24	フィルムブランク	6.38	0.04
	GaAsウェハ	3.18	0.48

表9 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験5回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.51	0.05
24	フィルムブランク	6.36	0.04
	GaAsウェハ	3.73	1.48

表10 GaAsウェハAの抗菌活性値の平均値、標準偏差

試験回数	平均値	標準偏差
1	2.68	0.15
2	4.43	0.75
3	3.61	0.63
4	3.20	0.48
5	2.63	1.48

②GaAsウェハB

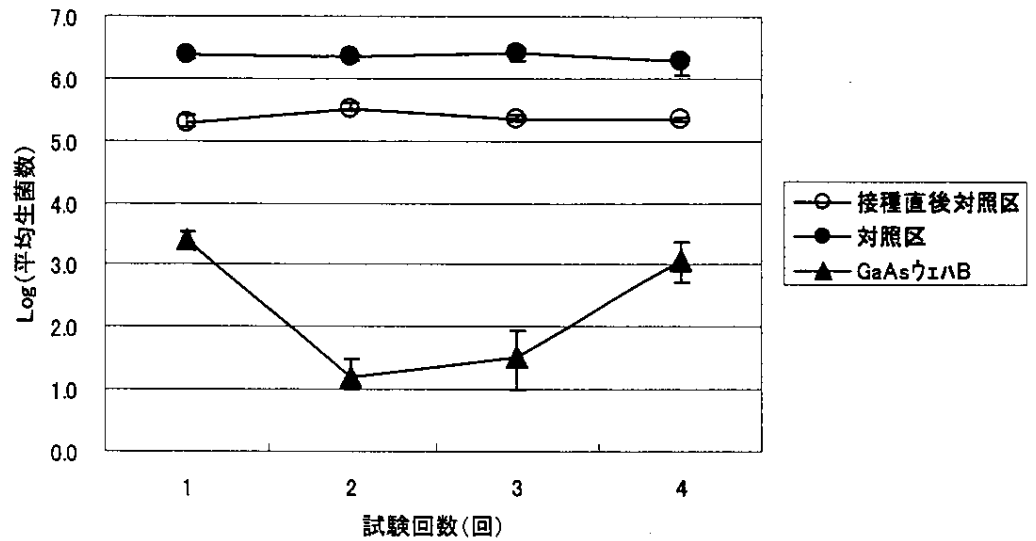


図4 GaAsウェハBの抗菌効果の変化

表11 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験1回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.30	0.07
24	フィルムブランク	6.38	0.04
	GaAsウェハB	3.41	0.10

表12 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験2回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.51	0.05
24	フィルムブランク	6.36	0.04
	GaAsウェハB	1.20	0.22

表13 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験3回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.36	0.04
24	フィルムブランク	6.41	0.08
	GaAsウェハB	1.53	0.40

表14 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差(試験4回目)

培養時間(hr)	試験片の仕様	平均値	標準偏差
0(接種直後)	フィルムブランク	5.35	0.02
24	フィルムブランク	6.29	0.12
	GaAsウエハB	3.07	0.28

表15 GaAsウエハBの抗菌活性値の平均値、標準偏差

試験回数	平均値	標準偏差
1	2.97	0.10
2	5.16	0.22
3	4.88	0.40
4	3.22	0.28

### 3.3.2.2 溶出試験

#### (1) 評価方法

評価方法は抗技協の「抗菌製品の安全基準」の溶出試験方法(4%酢酸に60°Cで30分間浸漬)に準拠した。新品のGaAsウエハを2枚用意して、1枚ずつ別々に20mLの酢酸に浸漬させた。Gaの溶出量は1枚のGaAsウエハを浸漬させた酢酸20mL全量をICP発光分光分析法で測定した。Asの溶出量は別の1枚のGaAsウエハを浸漬させた酢酸20mL全量を水素化物発生ICP発光分光分析法で測定した。

#### (2) 評価機関

(株)INAX分析センター

#### (3) 結果

GaAsウエハの1枚当りから、Gaが2.08mg/酢酸20mL、Asが2.03mg/酢酸20mL検出された。

### 3.3.2.3 表面分析(AFM、FE-SEM)

#### (1) 評価方法

GaAsウエハの表面状態をAFM(原子間力顕微鏡)とFE-SEM(電界放射型走査電子顕微鏡)で観察した。また、AFMの観察結果から表面粗さ(Ra; 中心線表面粗さ)を評価した。

#### (2) 評価機関

(株)INAX分析センター

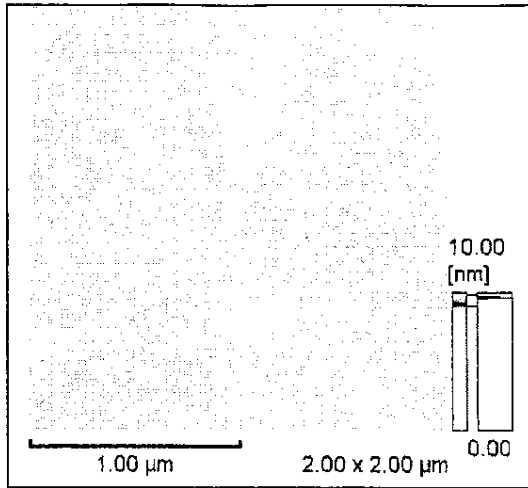
#### (3) 結果

GaAsウエハの表面のRaを表16に、AFMによる観察結果を図5に、FE-SEMによる観察結果を図6に示す。

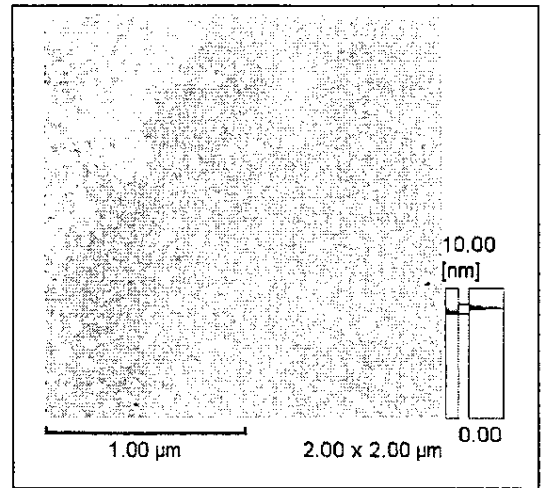
表16 GaAsウエハの表面のRa

	Ra(nm)
新品	0.24
溶出試験後	0.66
抗菌性試験 5回目終了後 <sup>a)</sup>	A1:0.44 A5:1.59

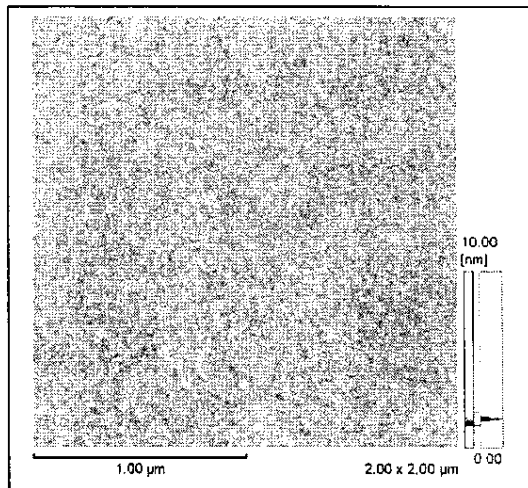
<sup>a)</sup>A1、A5はGaAsウエハAのN=5内の識別記号



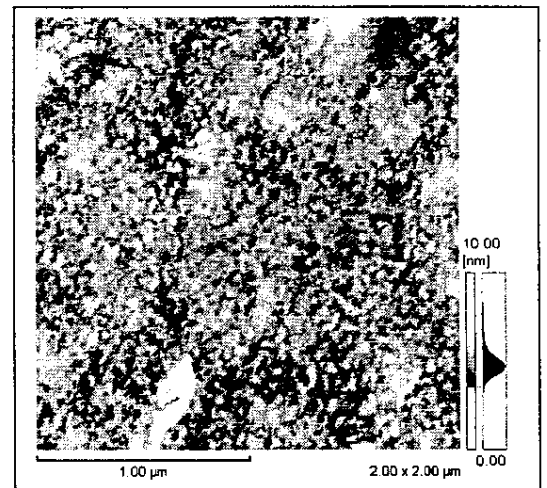
GaAsウェハ(新品)



GaAsウェハ(溶出試験後)

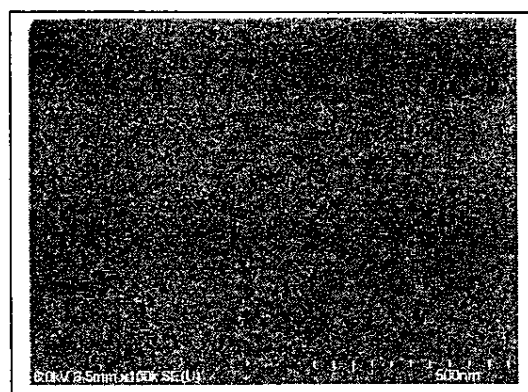


GaAsウェハA1(抗菌性試験5回後)

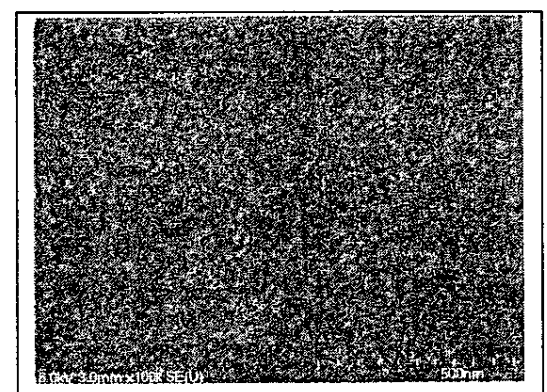


GaAsウェハA5(抗菌性試験5回後)

図5 AFMによるGaAsウェハの表面分析



GaAsウェハ(新品)



GaAsウェハ(溶出試験後)

図6 FE-SEMによるGaAsウェハの表面分析

### 3.3.3 結果と考察

#### (1) 溶出試験と表面分析

溶出試験によって、GaAsウェハからはGaとAsの溶出が検出され(3.3.2.2(3))、GaAsウェハの表面は新品と比較してRaが高くなることが明らかになった(表16)。また、AFMによる表面粗さの検出限界は0.1nmであり、GaAsウェハ表面は新品では表面粗さが検出されないほど平滑であるのに対して、溶出試験後では0.1nm以上の表面粗さが存在することが明らかになった(図5)。この結果から、GaAsウェハは酢酸に接触するとGa、As等の構成成分が溶出するために、Raが大きくなったと考えられる。

#### (2) 抗菌活性値

抗菌性試験1回目のGaAsウェハA, Bの抗菌活性値は2.68(標準偏差0.15)、2.97(標準偏差0.10)となり、抗菌活性値2.0以上で標準偏差も0.10~0.15と非常に安定していた(図3, 4, [添付資料4][1](2)表1, 表6)。これは、GaAsウェハから溶出するGa、As等の構成成分の中に細菌増殖を抑制する成分が含まれており、その成分の抗菌性試験1回目の溶出量が安定していたためであると考えられる。

しかし、抗菌性試験2回目以降のGaAsウェハA, Bの抗菌活性値は1回目と比較すると高くなるが、標準偏差も高くなり不安定となった(図3, 4, [添付資料4][1](2)表2~5, 7~9)。これは、GaAsウェハから溶出する細菌増殖を抑制する成分の量が、抗菌性試験2回目以降では不安定であったためと考えられる。

#### (3) 抗菌性試験5回目終了後のGaAsウェハA1とA5

抗菌性試験5回目終了後のGaAsウェハの表面は新品と比較するとRaが高くなり(表16)、表面粗さが大きくなることが明らかになった(図5)。これはGaAsウェハの表面が菌液と接触することでGa、As等の構成成分が溶出するために、Raが大きくなったと考えられる。溶出試験の結果(3.3.3.(1))の結果と併せると、GaAsウェハの表面は酢酸、菌液等の溶液と接触するとGa、As等の構成成分が溶出するためにRaが大きくなったと考えられる。GaAsウェハA1とA5のRaはA1<<A5であるが(表16)、Raと抗菌活性値(図3, 添付資料[4][1](2)表1, 表5)の大小関係が反対である根拠は不明であり、今後の検討課題とする。

## 4. 2次標準物質の作製と不確かさの評価

### 4.1 ワニス系の塗料を塗布したPETフィルム

標準試験体(ワニス系の塗料を塗布したPETフィルム)の塗工条件は以下の通りである。

- (1) 塗工液: 4.2参照
- (2) 抗菌剤濃度: 0,350,400,450,500,550,600,2000(単位ppm)
- (3) 膜厚:  $5 \pm 1 \mu\text{m}$
- (4) 塗工条件: 基材 PETフィルム(E-5101)、膜厚 $50 \mu\text{m}$   
塗工方法 マイクログラビア(版50線/リバース回転150rpm/塗工速度4m/min  
/テンション4-5kg)
- (5) 乾燥条件: 加熱温度 第1~第4オープン いずれも $110^\circ\text{C}$  パス回数 2回
- (6) 作製日: 2002年09月19日

### 4.2 作製方法

当標準試験体で使用したワニス及び抗菌剤の内容は以下のとおりである。

#### 4.2.1 使用抗菌剤

o-メルカプトベンゾアト銀(1)ナトリウム-水和物オリゴマー(明治乳業株式会社製 TCS-N)

#### 4.2.2 ポリマーの種類(組成、分子量、不揮発成分、溶剤、粘度)

- (1) 組成: ポリアクリル酸アルキルエステル/メタアクリル酸共重合体
- (2) 分子量: THF溶液, GCPでは測定できなかった(エマルジョン重合タイプ)。
- (3) 不揮発成分:  $22.5 \pm 1.0 \%$  ( $150^\circ\text{C}$ /20分乾燥後の残量)
- (4) 溶剤: 水
- (5) 粘度:  $1500 \pm 500 \text{ cps}$  (BM型粘度計#3/12rpm at  $25^\circ\text{C}$ )

#### 4.2.3 膨潤度

菌液(水)に接触し、膨潤し、抗菌剤を速やかにリリースする。

#### 4.2.4 添加剤

なし

#### 4.2.5 塩基の種類と作用機構

アンモニアによる中和作用で水溶解性を保持:

メタクリル酸アンモニウム塩のアンモニアを塗工後の乾燥工程で部分的に分解し、メタクリル酸に戻し、水溶解性を低下させる。

#### 4.2.6 pH

$7.5 \pm 0.5$  ( $25^\circ\text{C}$ )

#### 4.2.7 ポリマーに関する残存モノマー

エチルアクリレートモノマー	ND(20ppm以下)
メチルメタアクリレートモノマー	ND(20ppm以下)
メタアクリル酸モノマー	850ppm



## 4.2.8 加熱による変化

加熱によりアンモニアが揮発し、水に難溶になる。

9月19日作製の標準試験体塗膜中の残留アンモニア量をIRで測定した。

オープンを通すことで塗膜中の残留アンモニア量は安定し、再現性のよい2次標準試験体が得られるようになった(表17)。

表17 加熱による変化

パス回数	濃度 (ppm)	基準となるアクリル酸エステル のピーク強度(1729cm <sup>-1</sup> )	アンモニアN-H基のピーク強度 (1548cm <sup>-1</sup> )	強度比
1	0	0.20	0.05	0.25
1	400	0.13	0.01	0.077
2	0	0.17	0.01	0.059
2	400	0.19	0.01	0.053

## 4.2.9 電子線に対する耐性(H13 報告書より引用)

抗菌剤400ppm添加品に対して電子線を60kGyで照射し、抗菌性能に及び及ぼす影響を調べた結果、60kGyの電子線滅菌処理では生菌数に影響を与えないことが確認された。

### 4.2.10 膜厚及び乾燥条件が抗菌性能に及び及ぼす影響(H13 報告書より引用)

抗菌性能のバラツキを生み出す要因として最も可能性の高いものとして塗膜の膜厚と成膜時の乾燥条件を取り上げ調査した。

#### (1) 乾燥条件の検討

100℃-3min と100℃-30min の2条件で、抗菌効果の影響を調べた結果、前者では抗菌剤濃度-生菌数の間に有意な関係が認められたが、後者ではその有意性が全く認められなかった。この結果より、標準試験片の抗菌性能を均一にするためには塗膜を完全に固化するのではなく、ある程度の水溶性を保持させることが重要であると確認された。

#### (2) 膜厚の検討

乾燥条件100℃-3min の下で、抗菌剤濃度として3水準(0ppm,600ppm,2000ppm)及び膜厚として2水準(4μm,6μm)で膜厚の差に対する抗菌性能に及び及ぼす影響を評価した結果、4~6μm程度の膜厚のバラツキでは生菌数に対する影響はないとの結論に達した。

## 4.3 試験方法

### 4.3.1 抗菌性試験

#### 4.3.1.1 1回目の試験

##### (1) 予備試験(担当:株式会社 INAX)

標準試験片(350ppm, 400ppm, 450ppm:2002年9月作製)の抗菌性能を試験片表面のエタノール拭き無しでJIS Z 2801に準拠して評価した(表18)。

表18 予備試験の結果

	平均生菌数	抗菌活性値 (0ppm)	抗菌活性値 (フィルムブラン ク)
無加工品(0ppm) 接種直 後	3.5E+5	—	—
無加工品(0ppm) 24時間 後	1.3E+5	—	—
フィルムblank 接種直 後	3.1E+5	—	—
フィルムblank 24時間 後	2.5E+6	—	—
抗菌試験片(350ppm)	4.6E+4	0.44	1.74
抗菌試験片(400ppm)	8.9E+3	1.15	2.45
抗菌試験片(450ppm)	3.3E+4	0.59	1.89

無加工品(0ppm)を対照にした抗菌活性値は、設計よりやや低い値であったが、標準試験片としての評価用サンプルとして供することが可能であることを確認した。なお、無加工品において、24時間培養後の生菌数が減少する傾向が認められた。

本試験は、400ppmの試験片を使用することとした。

## (2) 本試験

### 1) 標準試験片

- ①無加工品 0ppm
- ②抗菌加工試験片 400ppm

### 2) 試験機関(5試験機関)

次の5試験機関(順不同)が、抗菌性試験の評価を担当した。これらの試験機関は、いずれもJNLA試験所認定を取得している試験所である。

- ①株式会社INAX(以下、INAX)
- ②石塚硝子株式会社
- ③株式会社シナネンゼオミック
- ④住友大阪セメント株式会社
- ⑤財団法人 日本食品分析センター(以下、日食)

### 3) 試験方法

JIS Z 2801に準拠して作成した「抗菌性標準試験片 不確かさ評価の試験手順書(以下手順書)」に従った(手順書は10/28に各試験機関に送付)。

### 4) 試験菌(共通菌株)

日食が申し込み窓口となり黄色ブドウ球菌(NBRC12732)の菌株を保存機関(NBRC:独立行政法人製品評価技術基盤機構 生物遺伝資源センター)に一括して発注した。菌株は、NBRCから各試験機関に配付され、その菌株を各試験機関で復元して使用した。

### 5) 培地・培養容器

試験に与える影響が大きいと考えられる次の培地と培養容器は、INAXが一括購入して各試験機関に配付した。

- ①普通寒天培地(栄研化学 300g)
- ②普通ブイヨン培地(栄研化学 100g)
- ③培養容器(Jallee タイトボックス No.5)

### 6) カバーフィルム

東洋インキ製造(株)のものを使用した。

### 7) 試験結果

1回目の試験結果を表19～23に示す。

①生菌数と抗菌活性値

表19 本試験結果(1回目):JNLA評価機関 A, B, C, D, E)<sup>a), b)</sup>

2次標準物質	A		B		C		D		E	
	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値
抗菌剤0ppm (接種直後)	3.1E+5	-	1.6E+5	-	2.8E+5	-	2.6E+5	-	2.6E+5	-
	2.9E+5	-	2.2E+5	-	1.5E+5	-	2.4E+5	-	2.7E+5	-
	2.8E+5	-	2.1E+5	-	2.1E+5	-	2.6E+5	-	2.6E+5	-
平均	2.9E+5	-	2.0E+5	-	2.1E+5	-	2.5E+5	-	2.6E+5	-
フィルムブランク (接種直後)	2.9E+5	-	2.1E+5	-	3.1E+5	-	2.4E+5	-	2.6E+5	-
	2.7E+5	-	2.6E+5	-	2.5E+5	-	2.4E+5	-	2.7E+5	-
	2.6E+5	-	2.2E+5	-	2.5E+5	-	2.6E+5	-	3.0E+5	-
平均	2.7E+5	-	2.3E+5	-	2.7E+5	-	2.4E+5	-	2.8E+5	-
抗菌剤0ppm (培養後)	7.3E+4	-	1.4E+5	-	2.2E+4	-	4.3E+4	-	1.8E+5	-
	7.3E+4	-	1.1E+5	-	2.1E+4	-	4.9E+4	-	1.8E+5	-
	8.7E+4	-	1.3E+5	-	1.6E+4	-	3.9E+4	-	1.8E+5	-
平均	7.7E+4	-	1.3E+5	-	1.9E+4	-	4.4E+4	-	1.8E+5	-
フィルムブランク (培養後)	2.5E+6	-	3.9E+5	-	5.4E+5	-	6.8E+5	-	2.4E+6	-
	1.8E+6	-	5.6E+5	-	4.5E+5	-	5.2E+5	-	2.5E+6	-
	2.6E+6	-	6.2E+5	-	4.3E+5	-	8.2E+5	-	2.1E+6	-
平均	2.3E+6	-	5.2E+5	-	4.7E+5	-	6.7E+5	-	2.3E+6	-
抗菌剤400ppm-1 (培養後)	2.0E+4	0.59(2.06)	1.3E+4	1.01(1.62)	2.8E+4	0.00(1.23)	1.9E+4	0.37(1.56)	1.0E+5	0.25(1.36)
	2.1E+4	0.57(2.04)	1.5E+4	0.94(1.55)	2.0E+4	0.00(1.38)	1.8E+4	0.39(1.58)	9.8E+4	0.27(1.37)
	2.1E+4	0.57(2.04)	1.4E+4	0.95(1.56)	2.0E+4	0.00(1.37)	1.7E+4	0.42(1.61)	8.1E+4	0.35(1.46)
平均	2.1E+4	0.58(2.05)	1.4E+4	0.97(1.58)	2.2E+4	0.00(1.32)	1.8E+4	0.39(1.58)	9.4E+4	0.29(1.39)
抗菌剤400ppm-2 (培養後)	2.3E+4	0.53(2.01)	1.1E+4	1.07(1.69)	3.4E+4	0.00(1.14)	1.8E+4	0.38(1.56)	9.0E+4	0.30(1.41)
	1.9E+4	0.61(2.09)	8.2E+3	1.19(1.80)	2.5E+4	0.00(1.27)	1.8E+4	0.39(1.58)	1.1E+5	0.22(1.33)
	3.4E+4	0.36(1.83)	1.4E+4	0.96(1.76)	2.3E+4	0.00(1.31)	1.2E+4	0.55(1.74)	9.4E+4	0.28(1.39)
平均	2.5E+4	0.49(1.96)	1.1E+4	1.06(1.75)	2.7E+4	0.00(1.23)	1.6E+4	0.43(1.62)	9.7E+4	0.27(1.38)

<sup>a)</sup>菌活性値の( )内はフィルムブランクを基準に算出した数値である。

<sup>b)</sup>抗菌活性値「0.00」は実際の計算値がマイナスであることを示す(データの統計処理上、抗菌活性値が0.00以下の場合は全て0.00とする)。

②Log(生菌数)のzスコア、平均値、標準偏差、拡張不確かさ(U)の推定(1回目)

表20 各試験片のLog(生菌数)のzスコア<sup>a)</sup>

試験片の抗菌剤 濃度(ppm)	試験機関	N数		
		1	2	3
0 (接種直後)	A	1.20	0.75	0.60
	B	3.30	1.05	0.90
	C	0.45	3.45	1.50
	D	0.00	0.30	0.00
	E	0.00	0.30	0.00
フィルム ブランク (接種直後)	A	1.50	0.60	0.00
	B	3.00	0.00	2.10
	C	2.40	0.30	0.60
	D	1.20	0.90	0.00
	E	0.00	0.60	1.80
0	A	0.00	0.00	0.21
	B	0.77	0.49	0.64
	C	1.34	1.41	1.70
	D	0.59	0.44	0.69
	E	1.00	1.03	1.03
フィルム ブランク	A	1.23	0.93	1.25
	B	0.52	0.17	0.09
	C	0.22	0.39	0.43
	D	0.00	0.24	0.17
	E	1.19	1.21	1.06
400-1	A	0.00	0.19	0.19
	B	1.86	1.30	1.30
	C	1.30	0.09	0.00
	D	0.28	0.47	0.74
	E	6.61	6.42	5.68
400-2	A	0.00	0.33	0.74
	B	1.31	1.80	0.82
	C	0.74	0.20	0.04
	D	0.37	0.41	1.06
	E	2.45	2.82	2.53

<sup>a)</sup>黒塗り部分のデータはzスコアが2.0以下にならず、  
疑義有りと判定されたことを示す。

表21 各試験片のLog(生菌数)の平均値、標準偏差、拡張不確かさ<sup>a)</sup>

培養時間(hr)	試験片の抗菌剤濃度(ppm)	平均値	標準偏差	拡張不確かさ(U)
0 (接種直後)	0	5.38 [5.43]	0.09 [0.03]	0.19 [0.07]
	フィルムブランク	5.41 [5.42]	0.05 [0.03]	0.09 [0.07]
24	0	4.83	0.36	0.78
	フィルムブランク	5.98	0.33	0.71
	400-1	4.40 [4.26]	0.31 [0.09]	0.66 [0.20]
	400-2	4.41 [4.26]	0.35 [0.19]	0.74 [0.41]

<sup>a)</sup>[ ]内の数値はzスコアで疑義有りとは判定されたデータ(表20)を除いて算出した結果である。

③ 抗菌活性値のzスコア、平均値、標準偏差、拡張不確かさ(U)の推定(1回目)

表22 各試験片の抗菌活性値のzスコア<sup>a)</sup>

試験片の抗菌剤濃度(ppm)	試験機関	N数		
		1	2	3
400-1 (無加工試験片)	A	0.84	0.767	0.76
	B	2.61	2.32	2.36
	C	1.64	1.64	1.64
	D	0.08	0.00	0.13
	E	0.59	0.51	0.17
400-2 (無加工試験片)	A	0.61	0.94	0.08
	B	2.82	3.31	2.37
	C	1.55	1.55	1.55
	D	0.00	0.04	0.69
	E	0.33	0.65	0.41
400-1 (フィルムブランク)	A	2.81	2.70	2.70
	B	0.34	0.06	0.00
	C	1.85	1.01	1.07
	D	0.00	0.11	0.28
	E	1.12	1.07	0.56
400-2 (フィルムブランク)	A	1.38	1.64	0.80
	B	0.35	0.71	0.58
	C	1.41	1.00	0.87
	D	0.06	0.00	0.51
	E	0.55	0.80	0.61

<sup>a)</sup>黒塗り部分のデータはzスコアが2.0以下にならず、疑義有りとは判定されたことを示す。

表23 各試験片の抗菌活性値の平均値、標準偏差、拡張不確かさ<sup>a)</sup>

対照	試験片の抗菌剤濃度(ppm)	平均値	標準偏差	拡張不確かさ(U)
無加工試験片	400-1	0.45 [0.32]	0.33 [0.22]	0.72 [0.48]
	400-2	0.46 [0.30]	0.37 [0.21]	0.81 [0.47]
フィルムブランク	400-1	1.59 [1.47]	0.26 [0.13]	0.57 [0.27]
	400-2	1.59	0.28	0.60

<sup>a)</sup>[ ]内の数値はzスコアで疑義有りとは判定されたデータ(表22)を除いて算出した結果である。

#### 8) 1回目の試験の考察

抗菌活性値2.0を目標に試験設計したが、試験機関の平均値は無加工試験片基準で0.45~0.46、フィルムブランク基準で1.59であった(表23)。zスコアで疑義有りとは判定されたデータを除いた場合、標準偏差と拡張不確かさ(U)は小さくなるが、平均値は無加工試験片基準で0.30~0.32、フィルムブランク基準で1.47~1.59であった(表23)。

無加工品(抗菌剤0ppm)において24時間処理後に菌数が接種菌数より減少しており、抗菌剤以外の成分による抗菌性が認められた(表19)。これは、塗膜中の残留アンモニアによるものと考えられる。この残留アンモニアの量のバラツキが、抗菌剤を添加した標準試験片のバラツキにどの程度影響を及ぼしているかを知る必要がある。

また、抗菌加工試験片では、4cm×4cmのカバーフィルムを超える範囲で、菌液が広がって抗菌加工面が膨潤している状態が観察された。このことは4cm×4cmの面積より広範囲で菌液と抗菌剤が接触している可能性が示唆された。

この結果から、2回目の試験を計画した。1回目の抗菌活性値より高い結果となるように450ppm~600ppmの標準試験片を用いて試験を計画した。ここで、活性値の算出には抗菌性が認められた無加工品(0ppm)ではなく、フィルムブランクを対照にすることにした。

さらに、菌液と抗菌加工試験片の接触面積が4cm×4cm以上に広がらないようにするために、試験片とカバーフィルムの位置を逆に(倒置して)、抗菌性試験を行うことにした。

### 4.3.1.2 2回目の試験

#### (1) 予備試験(担当:日食)

標準試験片(400ppm, 450ppm, 500ppm, 550ppm, 600ppm:2002年9月作製)の抗菌性能を試験片表面のエタノール拭き無しでJIS Z 2801に準拠して評価した(表24)。

表24 予備試験の結果

	平均生菌数	抗菌活性値 (0ppm)	抗菌活性値 (フィルムブランク)
無加工品(0ppm)接種直後	2.0E+5	—	—
無加工品(0ppm)24時間後	1.4E+4	—	—
フィルムブランク 接種直後	2.3E+5	—	—
フィルムブランク 24時間後	2.1E+5	—	—
抗菌試験片(400ppm)	2.3E+4	0	0.9
抗菌試験片(450ppm)	1.9E+4	0	1.0
抗菌試験片(500ppm)	1.0E+4	0.1	1.3
抗菌試験片(550ppm)	5.8E+3	0.3	1.5
抗菌試験片(600ppm)	5.2E+3	0.4	1.6

本試験では、500ppm及び600ppmの抗菌試験片を使用することとした。抗菌活性値はフィルムブランクを対照として算出する。

#### (2) 本試験(2回目の試験)

##### 1) 標準試験片

- ① 抗菌加工試験片 500ppm
- ② 抗菌加工試験片 600ppm
- ③ フィルムブランク

##### 2) 試験機関(5試験機関)

1回目の試験を行った試験機関で実施した。

##### 3) 試験方法

試験片とカバーフィルムを倒置して試験する以外は、1回目と同じ JIS Z 2801に準拠した「第2回 不確かさ評価の試験手順書(以下手順書)」に従った(手順書は12/02に各試験機関に送付)。

##### 4) 試験菌

1回目の試験に使用した共通菌株で各試験機関が保有・維持していたものを使用した。

##### 5) 培地・培養容器

1回目の試験と同じものを使用した。

##### 6) カバーフィルム

カバーフィルムは、各試験機関で使用しているストマッカーフィルムを5cm×5cmに切断したものを使用した。

##### 7) 試験結果

2回目の試験結果を表25～29に示す。

①生菌数と抗菌活性値

表25 本試験結果(2回目;JNLA評価機関 A, B, C, D, E)<sup>a), b)</sup>

2次標準物質	A			B			C			D			E		
	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	生菌数 (CFU/枚)	抗菌活性値	
抗菌剤0ppm (接種直後)	2.7E+5	-	2.3E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	2.5E+5	-	
	2.8E+5	-	2.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.5E+5	-	1.5E+5	-	3.1E+5	-	
	2.5E+5	-	2.3E+5	-	1.5E+5	-	1.5E+5	-	1.7E+5	-	1.7E+5	-	2.9E+5	-	
平均	2.7E+5	-	2.4E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	2.8E+5	-	
フィルム	2.7E+5	-	2.3E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	2.5E+5	-	
フランク	2.8E+5	-	2.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.5E+5	-	1.5E+5	-	3.1E+5	-	
(接種直後)	2.5E+5	-	2.3E+5	-	1.5E+5	-	1.5E+5	-	1.7E+5	-	1.7E+5	-	2.9E+5	-	
平均	2.7E+5	-	2.4E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	1.6E+5	-	2.8E+5	-	
抗菌剤0ppm (培養後)	2.8E+4	-	1.1E+5	-	3.6E+3	-	3.6E+3	-	1.5E+4	-	1.5E+4	-	1.1E+5	-	
	3.6E+4	-	1.6E+5	-	3.6E+3	-	3.6E+3	-	1.3E+4	-	1.3E+4	-	1.3E+5	-	
	1.7E+4	-	3.5E+5	-	2.6E+3	-	2.6E+3	-	2.1E+4	-	2.1E+4	-	1.2E+5	-	
平均	2.7E+4	-	2.1E+5	-	3.3E+4	-	3.3E+4	-	1.6E+4	-	1.6E+4	-	1.2E+5	-	
フィルム	2.8E+6	-	3.1E+5	-	1.3E+5	-	1.3E+5	-	1.0E+4	-	1.0E+4	-	7.8E+5	-	
フランク	2.8E+6	-	1.5E+5	-	1.5E+5	-	1.5E+5	-	1.4E+4	-	1.4E+4	-	1.5E+6	-	
(培養後)	1.8E+6	-	4.4E+5	-	1.1E+5	-	1.1E+5	-	2.3E+4	-	2.3E+4	-	7.1E+5	-	
平均	2.5E+6	-	3.0E+5	-	1.3E+5	-	1.3E+5	-	1.6E+4	-	1.6E+4	-	9.8E+5	-	
抗菌剤	1.8E+4	0.18(2.15)	5.0E+1	3.62(3.78)	8.0E+3	0.00(1.21)	8.0E+3	0.00(1.21)	3.4E+3	0.68(0.67)	3.4E+3	0.68(0.67)	1.5E+4	0.89(1.81)	
500ppm	1.2E+4	0.34(2.30)	<10	4.32(4.48)	1.1E+4	0.00(1.08)	1.1E+4	0.00(1.08)	5.3E+3	0.49(0.48)	5.3E+3	0.49(0.48)	1.4E+4	0.93(1.84)	
(培養後)	1.9E+4	0.14(2.10)	1.0E+1	4.32(4.48)	8.0E+3	0.00(1.21)	8.0E+3	0.00(1.21)	5.8E+3	0.45(0.44)	5.8E+3	0.45(0.44)	1.3E+4	0.98(1.89)	
平均	1.6E+4	0.21(2.18)	2.3E+1	3.95(4.11)	8.9E+3	0.00(1.16)	8.9E+3	0.00(1.16)	4.8E+3	0.53(0.52)	4.8E+3	0.53(0.52)	1.4E+4	0.93(1.85)	
抗菌剤	1.3E+4	0.53(2.29)	1.0E+1	4.32(4.48)	3.9E+3	0.00(1.52)	3.9E+3	0.00(1.52)	3.0E+3	0.74(0.72)	3.0E+3	0.74(0.72)	5.7E+3	1.32(2.24)	
600ppm	7.6E+3	0.61(2.51)	<10	4.32(4.48)	4.9E+3	0.00(1.42)	4.9E+3	0.00(1.42)	3.1E+3	0.72(0.71)	3.1E+3	0.72(0.71)	5.8E+3	1.31(2.23)	
(培養後)	2.7E+4	0.36(1.96)	1.0E+1	4.32(4.48)	5.8E+3	0.00(1.35)	5.8E+3	0.00(1.35)	2.1E+2	1.89(1.88)	2.1E+2	1.89(1.88)	6.6E+3	1.26(2.17)	
平均	1.6E+4	0.49(2.19)	1.0E+1	4.32(4.48)	4.8E+3	0.00(1.43)	4.8E+3	0.00(1.43)	2.1E+3	0.89(0.88)	2.1E+3	0.89(0.88)	6.0E+3	1.29(2.21)	

<sup>a)</sup>抗菌活性値の( )内はフィルムフランクを基準に算出した数値である。

<sup>b)</sup>抗菌活性値「0.00」は実際の計算値がマイナスであることを示す(データの統計処理上、抗菌活性値が0.00以下の場合は全て0.00とする)。



②Log(生菌数)のzスコア、標準偏差、拡張不確かさ(U)の推定による判定(2回目)

表26 各試験片のLog(生菌数)のzスコア<sup>a)</sup>

試験片の抗菌剤濃度(ppm)	試験機関	N数		
		1	2	3
フィルムブランク (接種直後)	A	0.44	0.50	0.19
	B	0.00	0.25	0.06
	C	1.00	1.00	1.13
	D	1.07	1.25	0.94
	E	0.19	0.75	0.56
0	A	0.00	0.16	0.29
	B	0.91	1.14	1.62
	C	1.31	1.30	1.52
	D	0.38	0.47	0.16
	E	0.90	0.97	0.93
フィルムブランク	A	1.20	1.33	1.05
	B	0.00	0.48	0.20
	C	0.56	0.43	0.67
	D	2.08	1.87	1.59
	E	0.55	0.92	0.49
500	A	0.92	0.51	1.05
	B	5.94	7.82	7.82
	C	0.00	0.35	0.00
	D	1.00	0.49	0.38
	E	0.76	0.67	0.54
600	A	0.64	0.29	1.12
	B	4.08	4.08	4.08
	C	0.15	0.00	0.11
	D	0.32	0.30	2.08
	E	0.11	0.11	0.20

<sup>a)</sup>黒塗り部分のデータはzスコアが2.0以下にならず、疑義有り判定されたことを示す。

表27 各試験片のLog(生菌数)の標準偏差、拡張不確かさ<sup>a)</sup>

培養時間(hr)	試験片の抗菌剤濃度(ppm)	平均値	標準偏差	拡張不確かさ(U)
0(接種直後)	フィルムブランク	5.33	0.12	0.25
24	0	4.49	0.67	1.43
	フィルムブランク	5.41 [5.72]	0.79 [0.52]	1.70 [1.14]
	500	3.44 [3.99]	1.17 [0.23]	2.52 [0.50]
	600	3.14 [3.87]	1.19 [0.26]	2.56 [0.56]

<sup>a)</sup>[ ]内の数値はzスコアで疑義有り判定されたデータ(表26)を除いて算出した結果である。

③抗菌活性値のzスコア、標準偏差、拡張不確かさ(U)の推定による判定(2回目)

表28 各試験片の抗菌活性値のzスコア<sup>a)</sup>

試験片の抗菌剤 濃度(ppm)	試験機関	N数		
		1	2	3
500 (無加工試験片)	A	0.53	0.25	0.59
	B	5.31	6.50	6.50
	C	0.83	0.83	0.83
	D	0.32	0.00	0.07
	E	0.68	0.75	0.83
600 (無加工試験片)	A	0.39	0.18	0.69
	B	3.34	3.34	3.34
	C	0.69	0.69	0.69
	D	0.00	0.02	1.07
	E	0.54	0.53	0.49
500 (フィルム ブランク)	A	0.39	0.57	0.32
	B	2.42	3.30	3.30
	C	0.79	0.95	0.79
	D	1.46	1.70	1.75
	E	0.04	0.00	0.06
600 (フィルム ブランク)	A	0.17	0.49	0.30
	B	3.35	3.35	3.35
	C	0.94	1.09	1.19
	D	2.10	2.12	0.42
	E	0.10	0.09	0.00

<sup>a)</sup>黒塗り部分のデータはzスコアが2.0以下にならず、疑義有り判定されたことを示す。

表29 各試験片の抗菌活性値の標準偏差、拡張不確かさ<sup>a)</sup>

対照	試験片の抗菌剤 濃度(ppm)	平均値	標準偏差	拡張 不確かさ(U)
無加工試験片	500	1.16 [0.42]	1.56 [0.37]	3.37 [0.82]
	600	1.40 [0.68]	1.61 [0.65]	3.48 [1.39]
フィルム ブランク	500	1.99 [1.43]	1.32 [0.67]	2.84 [1.48]
	600	2.30 [1.97]	1.25 [0.43]	2.69 [0.97]

<sup>a)</sup>[ ]内の数値はzスコアで疑義有り判定されたデータ(表28)を除いて算出した結果である。

#### 8) 2回目の試験の考察

抗菌活性値2.0を目標に抗菌剤濃度500ppm及び600ppmについて、フィルムブランクを対象に試験を実施した。

2回目の試験では、試験片とカバーフィルムを倒置する方法で抗菌効果を評価したが、4cm×4cmの抗菌加工面は、カバーフィルム(下敷きフィルムとして使用)とよく密着しており、菌液が抗菌加工面に一様に広がっている状態で、抗菌性試験が有効であったことが確認された。

フィルムブランクを基準とした場合の抗菌活性値の平均は500ppmで1.99、600ppmで2.30、標準偏差は500ppmで1.32、600ppmでは1.25、拡張不確かさは500ppmで2.84、600ppmで2.69であった(表29)。また、zスコアで疑義有りとは判定されたデータを除いた場合、標準偏差と拡張不確かさ(U)は小さくなり、抗菌活性値の平均は500ppmで1.43、600ppmで1.97となった(表29)。

さらに、zスコアで疑義有りを判定されたデータを除いた24時間培養後のLog(生菌数)の標準偏差と拡張不確かさを比較すると、試験1では標準偏差が0.09~0.36、拡張不確かさが0.20~0.78であったが(表21)、試験2では標準偏差が0.23~0.67、拡張不確かさが0.50~1.43となり(表27)、試験2は試験1と比較すると標準偏差、拡張不確かさともに全体的に大きくなった。試験1と試験2の違いはカバーフィルムであり、試験1のカバーフィルムは共通品が各試験機関に配布されたが、試験2では各試験機関が保有しているスタマッカーフィルムを5cm角に切断してカバーフィルム(試験2では下敷きフィルム)として使用した。このスタマッカーフィルムの違いが試験結果に影響を与える可能性が考えられたので、この点についても検討を加えた。

### 4.3.1.3 抗菌性試験に使用するフィルムが培養後の生菌数に与える影響

抗菌性試験で使用するフィルム(ポリエチレンフィルム)が培養後の生菌数に与える影響を第1回目の抗菌性試験のデータを用いて評価した。

#### (1) 各試験機関の条件(表30)

表30 各試験機関の試験条件<sup>a)</sup>

	試験機関				
	A	B	C	D	E
[1]継代回数	1	1	1	1	1
[2]前々培養(hr)	23.5	25.0	23.0	24.0	23.5
[3]前培養(hr)	18.5	19.5	20.0	24.0	17.5
[4]接種後の培養時間(hr)	24.0	23.5	24.0	24.0	24.0
[5]培地のAC時間(hr)	0.33	0.25	0.25	0.25	0.25
[6]1/500NB					
(1)AC前のpH	7.15	7.00	7.01	7.18	7.00
(2)AC後の冷蔵保存時間(hr)	119.5	46.5	46.0	—(48.0)	41.5
[7]スラットのAC後の保存時間					
(1)前々培養用(hr)	4.5	6.0	3.0	—	3.0
(2)前培養用(hr)	4.0	6.0	5.5	—	4.5

<sup>a)</sup>「—」は記録に明記無し、( )内は記録からの推定値、ACはオートクレーブ。

#### (2) 試験結果

表31 フィルムと試験片の生菌数

	試験機関				
	A	B	C	D	E
[1]接種直後					
フィルム	$2.7 \times 10^5$	$2.3 \times 10^5$	$2.7 \times 10^5$	$2.4 \times 10^5$	$2.8 \times 10^5$
[2]培養後					
(1)フィルム	$2.3 \times 10^6$	$5.2 \times 10^5$	$4.7 \times 10^5$	$6.7 \times 10^5$	$2.3 \times 10^6$
(2)試験片400-1	$2.1 \times 10^4$	$1.4 \times 10^4$	$2.2 \times 10^4$	$1.8 \times 10^4$	$9.4 \times 10^4$
(3)試験片400-2	$2.5 \times 10^4$	$9.4 \times 10^3$	$2.7 \times 10^4$	$1.6 \times 10^4$	$9.7 \times 10^4$

表32 フィルムと試験片の生菌数変化<sup>a)</sup>

	試験機関				
	A	B	C	D	E
(1)フィルム	+750	+130	+75	+180	+740
(2)試験片400-1	-92	-94	-92	-93	-66
(3)試験片400-2	-91	-96	-90	-93	-65

<sup>a)</sup>生菌数変化(%) = 「(培養後の生菌数 - 接種直後の生菌数) / 接種直後の生菌数」 × 100

表33 試験片の抗菌活性値

	試験機関				
	A	B	C	D	E
試験片400-1	2.05	1.58	1.32	1.58	1.39
試験片400-2	1.96	1.62	1.23	1.62	1.38

(3) 考察

1) フィルム

表31と表32よりフィルムの培養後の生菌数と生菌数変化は各試験機関で違いがあることが確認された。各試験機関で菌液調製品と培養容器が共通品目であり、表31より試験条件と接種直後の生菌数が揃っており、菌液の接触している被覆フィルムは共通であるが、下敷きに用いたフィルムは各試験機関で異なる。

これより、フィルムの培養後の生菌数と生菌数変化の違いは下敷きに用いたフィルムの違いによる影響である可能性があると考えられる。

(被覆フィルム、下敷きフィルム、菌液の関係は試験手順書参照)

2) 試験片

① 生菌数

表31より試験片の培養後の生菌数は試験機関Eを除くと $9.7 \times 10^3$ と $\sim 2.7 \times 10^4$ と安定しており、試験機関Eも $9.4 \times 10^4 \sim 9.7 \times 10^4$ と10の4乗の範囲に収まった。これは各試験機関で「1) フィルム」と同様の条件が揃っていることに加えて、各試験機関で接種した試験片も共通である。つまり、菌液調製品、被覆フィルム、試験片、培養容器と菌液中の生菌数に影響する条件を各試験機関で共通に揃えることが出来たので、培養後の生菌数は安定したと考えられる。

② 生菌数変化と抗菌活性値

表33より各試験機関の試験片の抗菌活性値のバラツキは大きい。ここで、抗菌活性値が1.3(小数点以下第2位切り捨て)である試験機関CとEの試験片400-1について検討する。表32よりフィルムの生菌数変化は試験機関Cでは75%増加に対して試験機関Eではその約10倍の740%増加である。しかし、試験片400-1の生菌数変化は試験機関Cでは92%減少に対して試験機関Eはその約2/3倍の66%減少である。フィルムと試験片400-1の生菌数変化が大きく異なる試験機関CとEの抗菌活性値が同じになったのはフィルムの生菌数変化が試験片400-1の生菌数変化よりも大きく影響したためであると考えられる。これより、抗菌活性値は試験片の生菌数変化よりもフィルムの生菌数変化に大きく影響を受けると考えられる。

(4) まとめ

不確かさ試験の結果から、抗菌性試験におけるフィルムの違いは次の影響を与える可能性があることが確認された。

- 1) 培養後の生菌数と生菌数変化(表31, 32より)
- 2) 抗菌活性値(表33より)

### 4.3.2 銀の定量(原子吸光)

独立行政法人 製品評価技術基盤機構が抗菌性試験の平成14年度 技能試験に提供するプラスチック試験片(500ppm)について、均一性確認のために試験片の銀の測定を実施(試験依頼)した。ここでは、この試験報告書を引用させていただいた。

#### (1) 試験方法

##### ① 試験菌液の調整

検体1個をケルダールフラスコに量り、硝酸10mlを加え、穏やかに加熱した。激しい反応が収まった後、硝酸5mlを加え、再度加熱した。内容液が暗色になり始めたら硝酸を2ml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 測定

試験溶液全量又は一部を200ml容分液漏斗に移し、50%クエン酸水素ニアンモニウム溶液10ml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100mlとした。次いで10%DDTC溶液10ml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10ml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0.25、0.5及び1.0ppmの銀標準溶液を調製し、各々10mlを正確に量り、200ml容分液漏斗に入れ、水40ml、50%クエン酸水素ニアンモニウム溶液10ml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

機種：AA-890[日本ジャーレルアッシュ株式会社]  
光源：銀中空陰極ランプ[浜松ホトニクス株式会社]  
測定波長：328.1nm  
フレーム：空気-アセチレン

#### (2) 試験条件

プラスチック試験片A及びBの500ppm試験片を各5枚使用して、試験片1個当たりの重量を測定後、原子吸光光度法により銀の定量試験を行った。なお、試験は5回行い、結果は検体1個当たりの銀重量で示した。

#### (3) 試験結果(表34)

各5枚(合計10枚)の試験片について銀の定量試験を行ったが、1枚あたりの銀の量は、 $1.236 \mu\text{g}/\text{個}$ 標準偏差  $0.131 \mu\text{g}/\text{個}$ であり、均一な試験片であると考えられた。

表34 検体重量及び銀の定量試験結果

検体	試験回数	重量 (g/個)	銀含有量 ( $\mu\text{g}/\text{個}$ )
A	1	0.1211	1.00
	2	0.1215	1.25
	3	0.1188	1.36
	4	0.1202	1.21
	5	0.1205	1.22

B	1	0.1194	1.03
	2	0.1197	1.25
	3	0.1197	1.31
	4	0.1194	1.35
	5	0.1203	1.38

#### 4.4 2次標準物質の要因分析

##### 4.4.1 重回帰分析

###### (1) データ

データは1回目の試験結果を用いた(表35)。

###### (2) 変化要因

- 1) 抗菌剤濃度
- 2) 接種後の培養時間
- 3) 試験機関

\*「3) 試験機関」は数値でない。依存変数は生菌数とした。

###### (3) 重回帰分析結果

- 1) 最大要因は抗菌剤濃度。 $R^2=0.447$ (自由度76)
- 2) 第2の要因が培養時間であり、抗菌剤濃度と併せて $R^2=0.719$ (自由度75)。  
培養時間(0と24時間)の寄与はその差の0.272(予想より寄与率は大きかった。これは残存アンモニアの影響が出たためと考えられる)。
- 3) 第3の要因は試験機関の区別であり、変化要因を3つ併せて $R^2=0.798$ (自由度71)。  
試験機関の寄与はその差の0.079(予想外に小さい値)。

###### (4) 結論

現在の2次標準物質は、未知の要因が約20%未知残されている。アンモニア残存と生菌数のデータがあれば寄与率が判明し、残りの要因の大きさが推定できる。

表35. 重回帰分析に使用したデータ

No.	試験機関	生菌数	抗菌剤濃度	培養時間	No.	試験機関	生菌数	抗菌剤濃度	培養時間
1	1	310000	0	0	41	4	18000	400	24
2	1	290000	0	0	42	4	12000	400	24
3	1	280000	0	0	43	5	98000	400	24
4	2	160000	0	0	44	5	110000	400	24
5	2	220000	0	0	45	5	94000	400	24
6	2	210000	0	0	46	1	18000	500	24
7	3	280000	0	0	47	1	12000	500	24
8	3	150000	0	0	48	1	19000	500	24
9	3	210000	0	0	49	2	50	500	24
10	4	260000	0	0	50	2	0	500	24
11	4	240000	0	0	51	2	10	500	24
12	4	260000	0	0	52	1	13000	600	24
13	5	260000	0	0	53	1	76000	600	24
14	5	270000	0	0	54	1	27000	600	24
15	5	260000	0	0	55	2	10	600	24
16	1	20000	400	24	56	2	0	600	24
17	1	21000	400	24	57	2	10	600	24
18	1	21000	400	24	58	1	73000	0	24
19	2	13000	400	24	59	1	73000	0	24
20	2	15000	400	24	60	1	87000	0	24
21	2	14000	400	24	61	2	140000	0	24
22	3	28000	400	24	62	2	110000	0	24
23	3	20000	400	24	63	2	130000	0	24
24	3	20000	400	24	64	3	22000	0	24
25	4	19000	400	24	65	3	21000	0	24
26	4	18000	400	24	66	3	16000	0	24
27	4	17000	400	24	67	4	43000	0	24
28	5	100000	400	24	68	4	49000	0	24
29	5	98000	400	24	69	4	39000	0	24
30	5	81000	400	24	70	5	180000	0	24
31	1	23000	400	24	71	5	180000	0	24
32	1	19000	400	24	72	5	180000	0	24
33	1	34000	400	24	73	1	28000	0	24
34	2	11000	400	24	74	1	36000	0	24
35	2	8200	400	24	75	1	17000	0	24
36	2	14000	400	24	76	2	110000	0	24
37	3	34000	400	24	77	2	160000	0	24
38	3	25000	400	24	78	2	350000	0	24
39	3	23000	400	24					
40	4	18000	400	24					



#### 4.4.2 抗菌剤濃度とLog(平均生菌数)の変化

##### (1) データ

データは1回目と2回目の試験結果を用いた。但し、Zスコアで2.0以上となった試験機関のデータは除いた。

- 1) 抗菌剤濃度0ppm: 試験機関Bを除いたフィルムブランク(接種直後)の1回目の12データ。
- 2) 抗菌剤濃度400ppm: 試験機関Eを除いた1回目の24データ。
- 3) 抗菌剤濃度500ppm: 試験機関Bを除いた2回目の12データ。
- 4) 抗菌剤濃度600ppm: 試験機関B, Dを除いた2回目の9データ。

##### (2) 結果

抗菌剤濃度とLog(平均生菌数)の関係を図7に示す。図中の誤差範囲は各抗菌剤濃度におけるLog(生菌数)の標準偏差と最小値を示す。

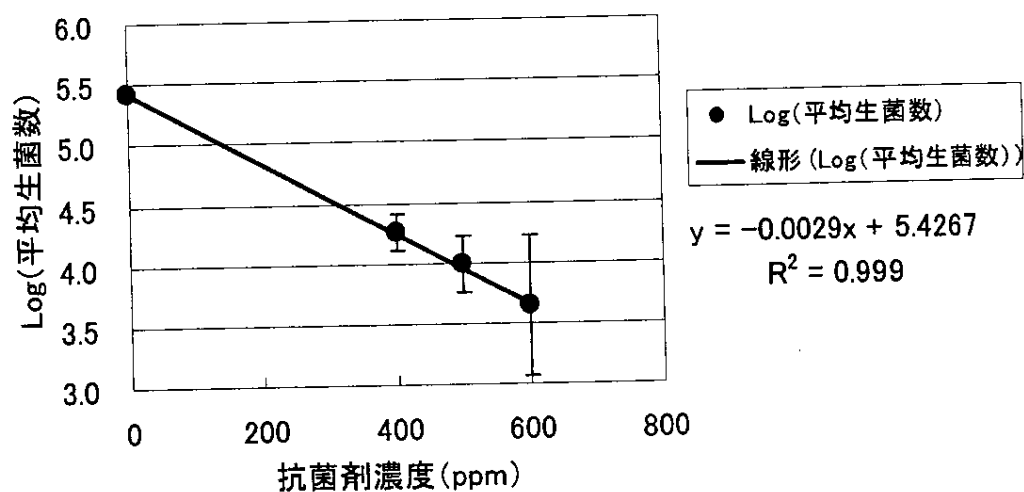


図7 抗菌剤濃度とLog(平均生菌数)

##### (3) 結論

現在の2次標準物質において、接種直後及び培養後のLog(平均生菌数)と抗菌剤濃度の間には相関関係があり、決定係数 $R^2=0.999$ から相関係数 $r=(R^2)^{1/2}=0.999$ となり、相関の高いことが明らかになった。但し、抗菌剤濃度が高くなるほど、Log(平均生菌数)の標準偏差が高くなることが明らかになった。

## 4.5 試験菌の活性評価

### 4.5.1 リボタイピング

H13年度の共同試験を実施した5試験機関が自社で保有・維持していた黄色ブドウ球菌(5種類)及び新たに購入した共通菌株(1菌株)の計6菌株について、菌株の同等性を確認するために、リボタイピングによるNNAパターンの比較及び感受性確認のためにMIC測定を実施した(表36)。

リボプリンター システム[クオリコン社]を用いて6菌株についてリボプリントパターンを解析した。結果を表×に示した。菌株1)~4)及び6)は同じリボグループであったことから、菌株レベルで同一であると考えられた。

ただし、菌株5)もその他の5菌株と非常に類似したリボプリントパターンであることから、すべての菌株が菌株レベルで同一である可能性は高いと考えられた。

表36 検体のリボタイピング<sup>a)</sup>

菌株	リボグループ	同定結果*	リボプリントパターン			
			1kbp	5	10	15 50
1)	RIBO1 245-61-S-8	<i>Staphylococcus aureus</i>				
2)	RIBO1 245-61-S-8	<i>Staphylococcus aureus</i>				
3)	RIBO1 245-61-S-8	<i>Staphylococcus aureus</i>				
4)	RIBO1 245-61-S-8	<i>Staphylococcus aureus</i>				
5)	RIBO1 245-97-S-1	<i>Staphylococcus aureus</i>				
6)	RIBO1 245-61-S-8	<i>Staphylococcus aureus</i>				

<sup>a)</sup>リボプリンターシステム内のデータベースとの比較に基づく同定結果

### 4.5.2 最小発育阻止濃度(MIC)

試験菌株に対する薬剤の最小発育阻止濃度(MIC)の測定を実施した。薬剤[1,2-ベンズイソチアゾリン(以下「BIT剤」)及び塩化ベンザルコニウム]を任意濃度添加した寒天平板培地に試験菌株の菌液を塗抹、培養後、発育が阻止された最小濃度をもって最小発育阻止濃度とした(表37)。

#### (1) 薬剤

- 1) BIT剤10%液
- 2) 塩化ベンザルコニウム10%液

#### (2) 増菌用培地

Mueller Hinton Broth(Difco)

#### (3) 感受性測定用培地

Mueller Hinton Agar(Difco)

#### (4) 感受性測定用平板の作製

滅菌精製水を用いて薬剤の有効成分濃度16,000 g/ml溶液をそれぞれ調製した。これを滅菌精製水で順次2倍希釈し、2倍希釈系列溶液を調製した。次に滅菌、溶解後50~60℃に保った感受性測定用培地に、各希釈系列溶液をそれぞれ1/9量添加し、

十分に混合後、シャーレに分注、固化させて感受性測定用平板とした。

(5) 接種用菌液の調製

各試験菌株を普通寒天培地[栄研化学株式会社]で35 °C±1 °C、18~24時間培養後、増菌用培地に接種し、35 °C±1 °C、18~20時間培養後、菌数が約10<sup>6</sup>/mlとなるように増菌用培地で希釈し、接種用菌液とした。

(6) 培養

感受性測定用平板に接種用菌液を樹脂製ループ(内径約1 mm)を用いて1~2 cm程度画線塗抹し、35 °C±1 °C、18~20時間培養した。

(7) 判定

培養後、発育が阻止された最小濃度をもって検体に対する薬剤の最小発育阻止濃度とした。

表37 検体に対する薬剤の最小発育阻止濃度(MIC)

薬剤	MIC( g/ml) <sup>a)</sup>					
	菌株1)	菌株2)	菌株3)	菌株4)	菌株5)	菌株6)
BIT剤	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
塩化ベンザルコニウム	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25

<sup>a)</sup>有効成分濃度を示す。

(8) 結論

表36及び表37の結果からは、6菌株についてリポタイプパターン、薬剤感受性とも違いは認められず、菌株レベルでの相違はないと考えられた。

## 4.6 2次標準物質の残された課題

### 4.6.1 2次標準物質をより完成させるための残された課題

(1) ポリマーの分子量測定(4.2.2)

(2) ポリマーの添加剤(4.2.5)

一般にエマルジョン重合の場合は、界面活性剤とアラビアガムなどの安定剤を添加する。抗菌性に影響のある成分はないことをメーカに確認する必要がある。

(3) 残留アンモニア量の把握(4.2.4)

メタクリル酸アンモニウム塩のアンモニアを塗工後の乾燥工程で部分的に分解し、メタクリル酸に戻し、水溶性を低下させる(この作用は塗工厚み幅を小さくできなかったため、膨潤した状態で抗菌剤をリリースする速度、溶出速度をコントロールすることにより、厚さの影響を抑えることを狙ったものである。したがって、洗い出し液で剥がれると抗菌剤量の変動することになる。)

(4) アンモニアの抗菌性に対するデータが必要(4.2.5)

(5) メタアクリル酸モノマーの抗菌性を確認する必要がある(4.2.7)

標準試料片の製造時における重要管理点は、加熱乾燥工程である。次年度は、グラビアコーターを使用して乾燥することにより、加熱状態が安定し、標準試験片のロット間の安定性や均一性は、より一層の向上が期待できる。工程管理の手法として、残留アンモニアの量をIRで測定することは一つの手段として有効であろうが、抗菌活性値測定のための標準物質としては、作製された標準試験片にどの程度の残留アンモニアが存在するか絶対値を把握し、抗菌剤添加標準試験片の抗菌活性値のバラツキにどの程度関与しているかを知ることが必要である。次年度は、このような視点を踏まえた標準試料片の作製と評価を行う。

### 4.6.2 試験規模の拡大

改良された試験片を用いて、データ数を増やし(繰り返し試験を実施する、共同試験の参加試験所を増やすなど)不確かさの推定を行う。

### 5. 1次標準物質と2次標準物質の不確かさを見積もる参照法の策定

1次標準物質、2次標準物質それぞれについて、抗菌活性値ならびにSI単位に結びつける分析値と不確かさを求め、1次標準物質の抗菌活性値を基準に2次標準物質の値の補正をする(図8, 9)。

1次標準物質の候補としてGaAsウエハを例にすると、抗菌性を規定するGaとAsの溶出速度はGaAs結晶面により物理定数として1儀的に決定される。1次標準物質の候補としてGaAsウエハを例にすると、SI単位への結びつけ方としては、ウエハの品質項目と考えられる、1)純度、2)表面粗さ、3)結晶のカット角度をもとにし、一方で抗菌活性値を求め不確かさを付与した値付けを行う。同様に2次標準物質としては現在使用しているワニス系コートPETフィルムでAgの定量でSI単位へ結び、不確かさとともに抗菌活性値の値付けを行う。

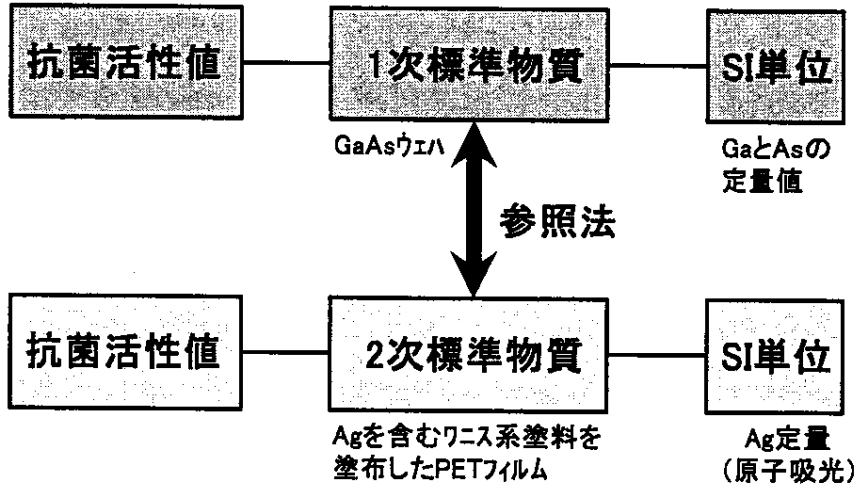


図8 1次標準物質と2次標準物質の関係

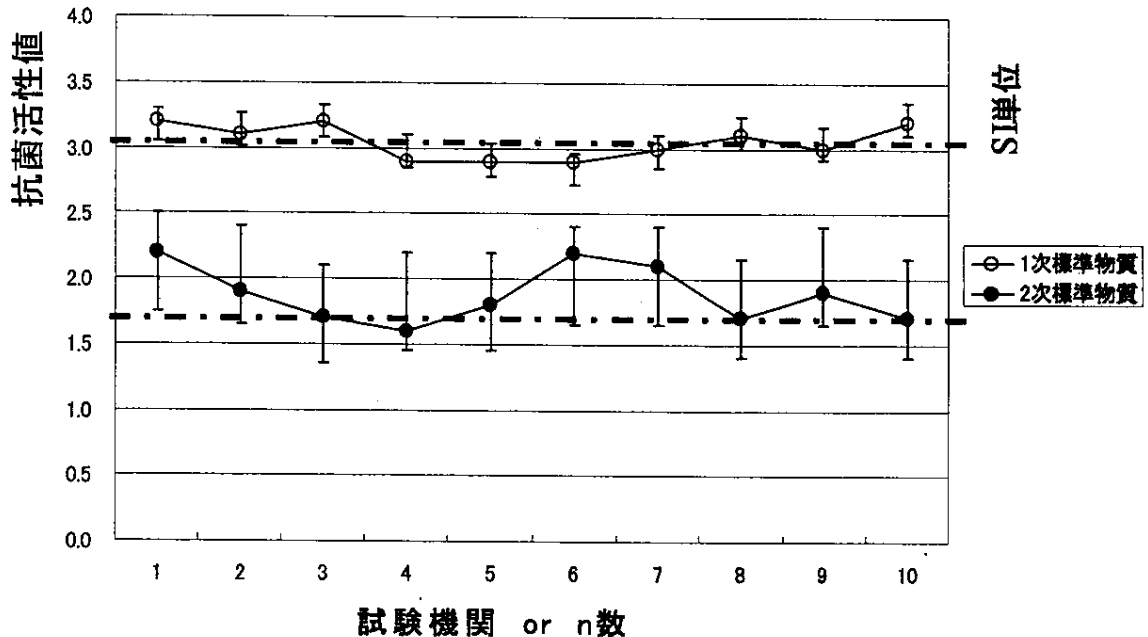


図9 各標準物質の抗菌活性値とSI単位



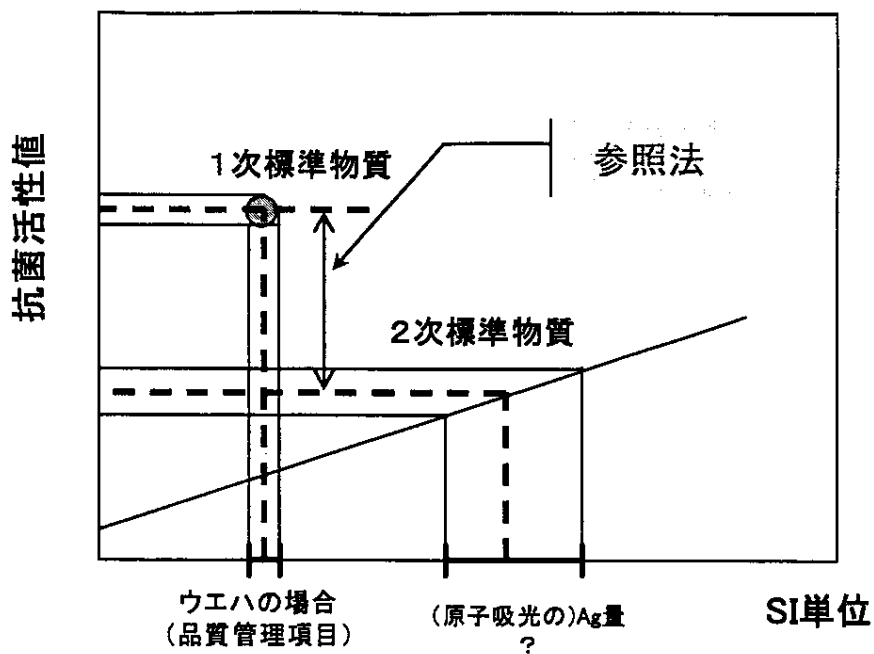


図11 1次標準物質と2次標準物質の関係

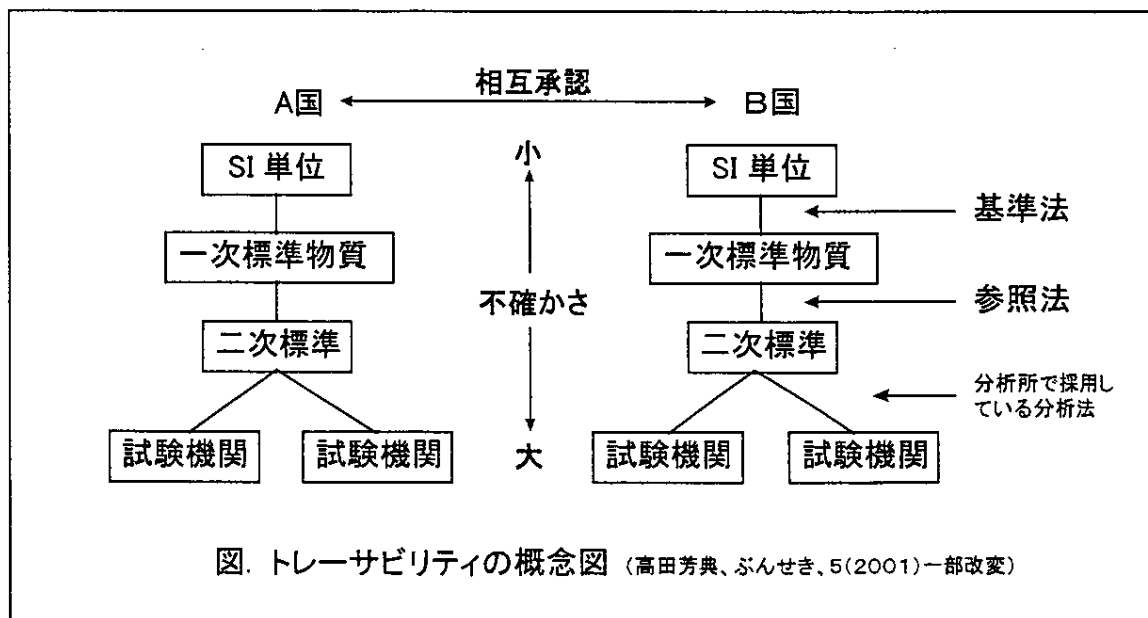


図. トレーサビリティの概念図 (高田芳典、ぶんせき、5(2001)一部改変)

図12 トレーサビリティの概念

## 7. 総括(今後の課題)

本調査研究は、国際的にも前例がなく困難とされる細菌を用いた評価法において「標準物質の作製」を試み、これをもとに「トレーサビリティの確立」と「不確かさの推定」に関する調査と推定方法について検討を行うことを目的としている。

2年目の平成14年度は、1次標準物質のアイデア出しとその試作・評価を主要課題とした。

1次標準物質について3つの候補が上げられ、そのうち石英ガラスへのAgのイオン注入法と、GaAsウエハを用いた標準物質について評価検討を行った。イオン注入法については、100atom%で抗菌活性値が4.5という抗菌力の石英ガラスを得ることができた。抗菌活性値2.0前後となるAgの注入条件を今後さらに検討し、作製した標準物質の安定性について評価する必要があるとともに、イオン注入法は製作コストが高く、さらに石英ガラスへのイオン注入は最表面の機構など未解明の分野であるなど新たな課題が明らかとなった。

一方、GaAsウエハを1次標準物質とする試みは、今回の評価の結果、抗菌活性値は2.68(標準偏差0.15)ときわめて安定性が高い抗菌力を得ることができた。GaAsウエハは、半導体分野で大量生産されていることから、純度が極めて高い物質であるにもかかわらず比較的安価に入手可能であることなど有利な点が多い。また、同一メーカーの別ロットについても評価したところ、安定な結果を得ることができた。今回、これまで知見がなかったGaAsウエハが抗菌活性を持つことが明らかとなり、この成果を公知にするために公開技報として技術を公開する手続きをとった。今後は、複数の試験機関による評価と別メーカーのウエハについても評価を行うとともに、溶出による安全性についてさらに検討する必要がある。

昨年度注力した2次標準物質は、水溶性コーティングによる2次標準物質の製造法をひき続き改良し、抗菌力の関係について評価を継続した。2次標準物質に要求される量産性とコストに関してはクリアするものの、標準物質としての均質性と安定性については、未だ改良の余地を残している。本委員会の調査研究結果を受け、平成14年度のNITEの技能試験用標準物質(抗菌剤濃度)を決定し配布するに至った。2次標準物質については今後新しい製法も視野に入れ、さらに継続的な検討が必要である。

また、JISの中では詳細が明記されていない点などを全て手順書として明文化し、国内の5JNLA試験機関を選抜し「菌株」と「培地」、「保存容器」を統一して抗菌試験を実施したところ、各試験機関で用いている同一メーカーのフィルムが生菌数に影響を及ぼすことが明らかになった。

以上の本年度の検討結果をうけ、今後国際的に通用する1次標準物質と2次標準物質を完成し、微生物の分野で国際的にも初めてとなるであろう「トレーサビリティの確立」と「不確かさの推定法」についてまとめ、認証標準物質の供給体制を確立しなければならない。また、これを用いた抗菌性試験方法(JIS Z 2801)における不確かさを考慮した試験条件の見直しと改良を加え、将来なされる国際規格化作業に繋げることを希望する。

以上

# [添付資料1]

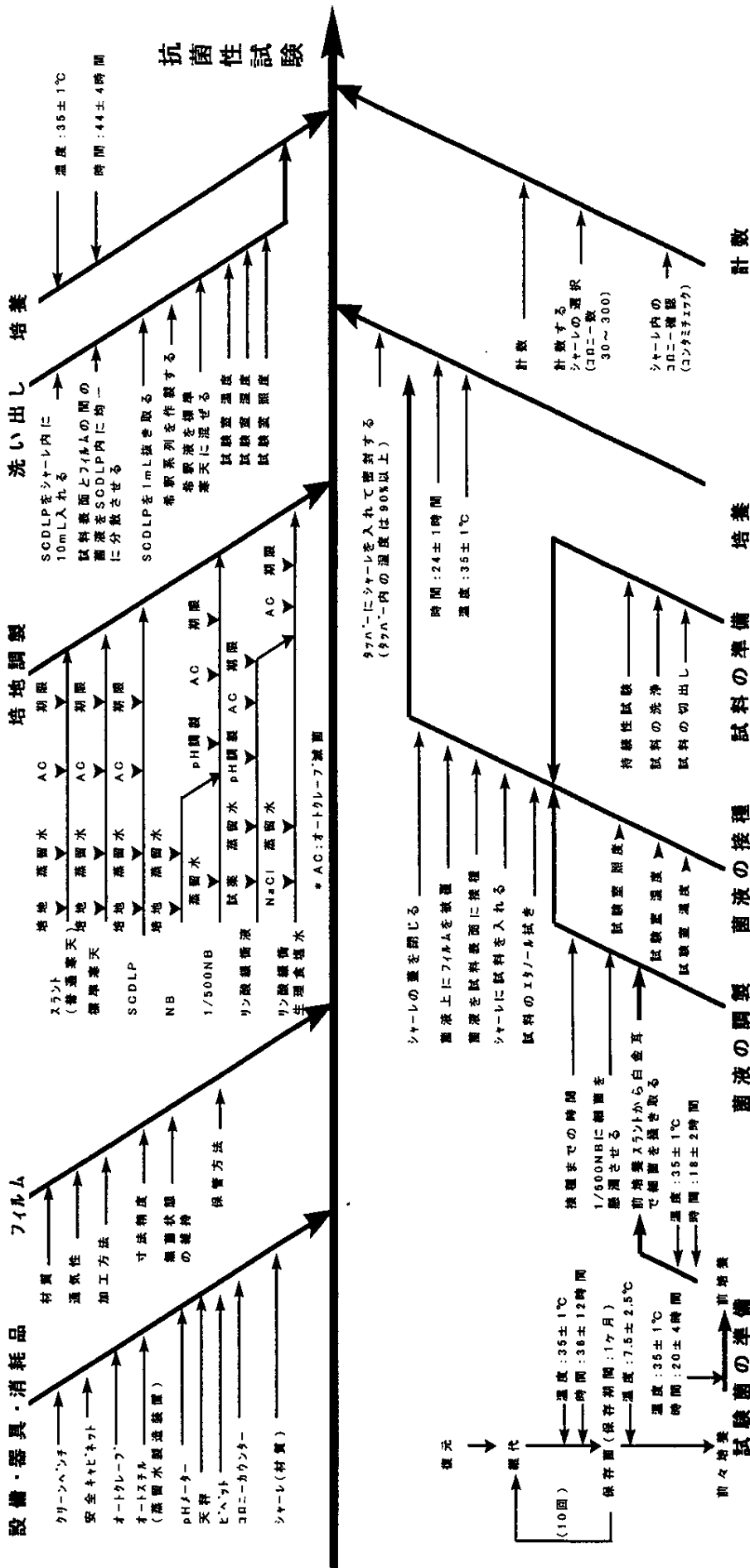


図1 抗菌性試験の特性要因図(平成13年度報告書より)



表2 分科会

	氏名	所属
分科会長	今井 茂雄	1. に表記
専門委員	杉本 茂	同上
同上	水上 義勝	カネボウ化成(株)化成品営業グループ 専任部長
同上	谷 典明	(株)アルバック千葉超材料研究所 第1研究部 第2研究室長
同上	鴻巣 正幸	三愛石油 研究所 グループリーダー
同上	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
同上	池田 薫	日本板硝子(株)NGFカンパニー 開発部 新商品開発グループ 主席技師
同上	大橋 茂夫	石塚硝子(株)研究所 部長
同上	矢澤 孝子	住友大阪セメント(株)新材料事業部 機能材料事業グループ評価チーム 課長代理
事務局	祖父江 良蔵	(独)製品評価技術基盤機構 適合性評価センター 認定センター 認定企画課 主査
オブザー バー	井上 英武	抗菌製品技術協議会 専務理事
同上	林 進	抗菌製品技術協議会 常任理事
同上	藤本 嘉明	抗菌製品技術協議会 事務局長