

平成15年度 独立行政法人製品評価技術基盤機構委託

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16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. 抗菌性試験における不確かさの推定とトレーサビリティ確保のアプローチ | 3 |
| 3.1 抗菌性試験の特徴(empirical method) | 3 |
| 3.2 不確かさに影響する要因と推定の方法 | 3 |
| 3.3 標準試験片の選定 | 5 |
| 3.4 トレーサビリティの確保について | 5 |
| 3.5 抗菌性試験の実施試験機関及び試験条件 | 5 |
| 4. 標準試験片の評価(GaAs ウェハー) | 6 |
| 4.1 H14 までの調査結果と H15 年の調査目的 | 6 |
| 4.2 GaAs ウェハーの仕様 | 6 |
| 4.3 GaAs ウェハーの抗菌性試験 | 7 |
| 4.4 GaAs ウェハーからの溶出成分量と抗菌活性 | 14 |
| 4.5 まとめ | 16 |
| 5. 標準試験片の評価(水溶性銀系抗菌剤含有ワニス塗布型 PET フィルム) | 17 |
| 5.1 Ag アクリル系コーティングフィルムの材料 | 17 |
| 5.2 Ag フィルム標準試験片の作製と仕様 | 18 |
| 5.3 塗工均一性試験 | 21 |
| 5.4 Ag フィルムの抗菌性試験 | 22 |
| 5.4.1 予備試験(試験濃度の決定) | 22 |
| 5.4.2 抗菌性試験 | 24 |
| 5.5 まとめ | 26 |
| 6. 調査研究の3年間のまとめ | 27 |
| 7. 課題 | 32 |
| (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) | 33 |
| 2. 実施計画・委員会開催日程・研究体制 | 34 |
| 3. 調査研究委員会委員及び同分科会委員名簿 | 36 |
| 4. 抗菌性試験データ集及び不確かさの算出データ | 37 |
| 5. 実験記録用紙 | 48 |
| 6. GaAs ウェハー製品安全データシート(MSDS) | 52 |
| 7. 「標準物質の不確かさの評価試験」依頼書 | 56 |
| 8. 拡張不確かさ(U)の算出方法 | 57 |
| 9. GaAs ウェハーの抗菌性試験 手順書 及び GaAs ウェハーの抗菌性試験(再試験) 手順書 | 58 |
| 10. Ag アクリル系フィルムの抗菌性試験 手順書 | 67 |
| 11. コントロールサンプルを用いた「抗菌性試験の不確かさ」の見積り事例 | 72 |

1. まえがき

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、抗菌製品ガイドラインを公表した。ガイドラインに対応して、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)が制定され、同時に工業標準化法に基づく試験事業者認定制度(JNLA)において、抗菌性試験が認定区分に加えられ当該分野の試験所認定が開始された。

一方、JNLAは、試験所認定における国際規格がISO/IEC Guide25からISO/IEC17025:1999に改正されたことに対応して、新規申請については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[JIS Q 17025:2000]を適用し、同時に「試験の不確かさに関する要求事項」を適用する方針を表明した。

試験所における「測定の不確かさ」の概念はこれまで馴染みのないものであり、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(を用いるバイオアッセイ)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おり、抗菌性試験においても、試験所認定制度の運用において不確かさの推定についてのガイドとなりうる実施例が必要とされている。

現在、わが国の抗菌加工製品の生産拠点や技術をアジアや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規格は、国家規格(JIS Z 2801:2000)から国際規格(ISO規格)へステップアップすることが国内外で求められており、不確かさを考慮した試験方法の再設計(試験法のISO規格化作業)が必要である。一方で国際的市場においては、国際基準適合を受けている信頼性のある試験所のデータが求められ、One-Stop-Testing(一つの試験所で得られたデータが、世界中で受入れられるような仕組み)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、また我が国の試験所認定制度を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)が平成13年度に設置され平成14・15年度と継続されることとなった。

なお、平成15年度の本調査研究は独立行政法人製品評価技術基盤機構から抗菌製品技術協議会に委託され、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3の表1に、および「同分科会」を添付資料の表2に記載した。

この報告書は、平成13年度、平成14年度に引き続き平成15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

バイオアッセイの分野における「不確かさ(uncertainty)の推定」について、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、測定値のトレーサビリティを確保するための認証標準物質の供給は、まだ国際的にも、日本においても整備途中の領域である。

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、試験所認定制度の国際的な対応を推進し、将来の国際規格化の作業の準備のために、国際的にも困難とされる微生物を用いたバイオアッセイの分野で先駆的に「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・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、均一で安定な標準物質が作製できれば、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、試験所認定制度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(管理試料)として不確かさの推定という要求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作成を目指す意義も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、平成14年度においてPhase 2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

Phase 2

- ・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)

Phase 3

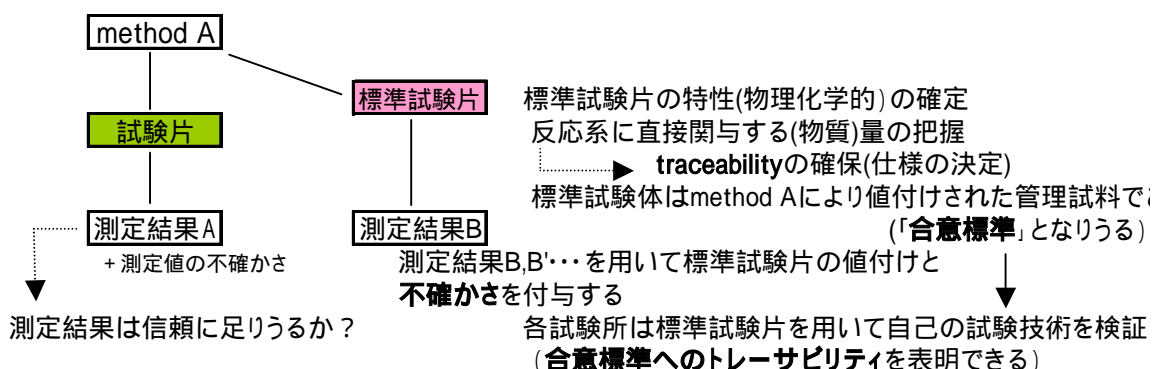
- ・認証標準物質を用いた「不確かさ」の推定方法と考え方まとめ
- ・経済活動のグローバル化を考慮した認証標準物質の作製供給体制の確立

本年度は平成14年度の成果をもとに、選定した標準試験片についてSI単位へ結びつけることを意識しながら均一性・安定性に関する基礎データを取得、確認するとともに、抗菌性試験における不確かさの推定のモデルを提供することを目的とする。

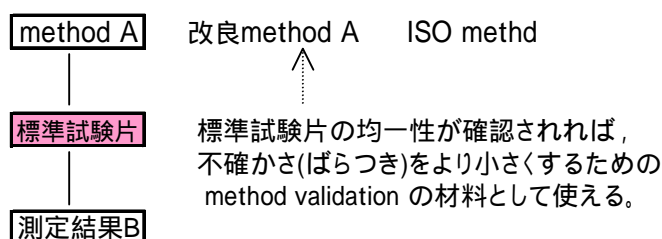
3. 抗菌性試験における不確かさの推定とトレーサビリティ確保のアプローチ

3.1 抗菌性試験の特徴 (empirical method)

< 抗菌性試験における不確かさとトレーサビリティの関係 >



< 次のステップとして >



抗菌性試験は、定められた菌株と定められた試験条件(接種菌量、接触時間、接触方法など)に従って試験を実施し、そこで得られた結果を抗菌活性値とするものである。試験の成立条件として 初期菌数のばらつき 接種菌数と回収菌数の確認 ブランクフィルム(又は無加工試験片)の24時間処理における菌の評価 が定められている。

しかし、規格に定められた試験方法に従って試験を実施したという事を除いて、試験結果の適切性を客観的に評価するのが難しい。適切な抗菌活性を示す陽性試験片(標準試験片)があれば、実施した試験の適否を直接的に示すことができるし、また他の試験所の結果との相互比較という点においても客観的な比較が可能となる。

均一で安定な抗菌効果を発揮できる陽性試験片(標準試験片)が存在し、抗菌性試験において良好な再現性が得られれば、これを用いて試験結果の不確かさを表明することができると考えられる。また、試験所はこの標準試験片を使用して自らの試験技能の検証を行うことができる。

一方で、この試験片は現行試験法の改良における共通試料としても有用であり、よりばらつきの少ない試験条件の設定や、国際的試験法(ISO試験法)の提示の中で諸外国の方法との比較を行うときの共通材料としても機能することが期待される。(collaborative studyが可能となる。)

3.2 不確かさに影響する要因と推定の方法

平成13年度報告書の「3.2 抗菌 JIS Z 2801における不確かさ成分の同定と解析」において示した特性要因図(添付資料1)から不確かさに影響する主要な要因として以下の表に示すものをピックアップした。

これらの要因のばらつきを個々に推定するのは難しいので、試験の工程すべてを含めて(すなわち

上記の主要な要因を含めて)標準試験片を使用して、繰り返し試験を実施することによってばらつきを推定する方法を採用した。ただし、本調査研究では、試験所間の試験条件を合わせるために表に示した材料については同じロット(及び同じ容器)のものを使用した。

| 要因 | 影響の大小 | 要素 | 試験の実施条件 | 全工程の不確かさ |
|-------|-------|---|--|----------|
| 要員/操作 | 大 | ・作業者 ・洗い出し ・希釈 | * 1 * 1 | ↓ |
| 菌株 | 大 | ・菌株 ・菌液の調製 | 同一ロット | |
| 培地の調製 | 大 | ・普通寒天培地 ・NB培地, 1/500 NB ・SCDLP ・リン酸緩衝液 | 同一ロット 同一ロット * 1 * 1 | |
| 試験片 | ? | ・ブランクフィルム ・陽性試験片 | 同一ロット (均一で安定) | |
| 培養 | 大 | ・温度 ・湿度 | 同一の容器 | |
| 器具・装置 | 小 | ・天秤 ・直尺 ・pHメーター ・マイクロピペット ・シャーレ | traceability traceability traceability | |

* 1 調製の手順や使用期限を詳細に定めた手順書に基づいて試験を実施した。

JNLAの試験における測定の不確かさの適用に関する方針(2003年4月1日)では、『試験方法ごとにカテゴリー分類を行い、類に分類されたものについては「測定の不確かさを推定する手順」を作成し、その手順に基づき不確かさの値の推定(見積もり)を行う。』としている。

このカテゴリー 定量試験Bでは、以下のいずれかによって不確かさを推定することになっている。

十分な数のコントロールサンプル(laboratory control samples)を用いる方法。

不確かさの主な構成要素の確認及び測定の不確かさの合理的な推定による方法(例えば、測定の不確かさを数式モデルとして表現できないような試験方法に適用する。)

不確かさの全ての要素を特定しており、ISO「測定の不確かさの表現の指針」に従って計算された、詳細な測定の不確かさの評価方法(例えば、試験における測定の不確かさを数式モデルとして表現できる試験方法に適用する。)

その他、適切と認められる方法

現状では、を適用してその主要な要素を考慮した不確かさの推定を行うのが指針に沿ったアプローチと考えられるが、現実には個々の要因ごとに不確かさを推定するのは難しい。

標準試験片が利用できるようなになれば、これを使用して繰り返し試験を実施することにより不確かさを推定するを適用することができるようになる。

従って、本調査研究では適切な抗菌活性値をもつ標準試験片を選定し、安定性、均一性を確認して、この試験体を複数の試験所で試験する(繰り返し試験)ことにより不確かさの推定を行なった。

3.3 標準試験片の選定

平成14年度調査報告書の成果から2つの試験片を選定した。

(1) GaAsウェハー

平成14年度の調査結果では、抗菌活性値が2～3という標準試験片として理想的な数値が得られた。また、GaAsウェハーは純度が極めて高い物質にもかかわらず、半導体分野で高度な品質管理のもとで大量・安定的に生産され、市場に供給されているので入手が比較的容易であるなど、標準試験片としての必要条件を備えている物質である。

(2) Agアクリル系コーティングフィルム

平成13年、14年の調査研究の結果からは、抗菌活性値のロット間のばらつきについて問題を残すものの、量産性と製造コストの面では安価で大量に供給することが可能な(したがって日常の試験における管理試料としても使用可能な)、標準試験片として極めて有用な物質であると考えられた。今年度は、さらに製造法を改良して品質の安定した標準試験片の完成を目指す。

3.4 トレーサビリティーの確保について

抗菌活性値は生菌数の減少率から算出される無名数である(単位がない)。したがって、厳密に言えば抗菌活性値についてはSI単位へのトレーサビリティーは存在しないといえる。

しかし、標準試験片の仕様を規定する際に抗菌活性値に直接影響を及ぼす物質(量)についての(物理化学的)特性を確定し、この量(SI単位)の把握をトレーサビリティーの確保と関連付けた。

この観点から (1)GaAsウェハーにおいてはGaAsの純度、面方位、表面粗さなどを仕様から確定すること、また (2)Agアクリル系コーティングフィルムについては抗菌剤として機能しているAgの量を測定して均一性を確認すると同時に、この標準試験片のAg濃度を測定することによってSI単位へのトレーサビリティーを確保するという考え方を導入した。

一方ISO/IEC 17025の5.6.2.2.2では、SI単位へのトレーサビリティーが当てはまらない場合には認証標準物質、関係者によって合意されている「合意標準」へのトレーサビリティーが要求されている。本調査研究で選定・作製された標準試験片が関係者による「合意標準」としての評価を受けることができれば、試験機関はこれらの標準試験片を使用して(又はこれらの標準試験片を用いた技能試験に参加することによって)「合意標準」へのトレーサビリティーを表明できることになる。この観点からいえば、抗菌性試験においてトレーサビリティーを確保するためには、「合意値」をもつ(標準)試験片は極めて有用である。

3.5 抗菌性試験の実施試験機関及び試験条件

3.5.1 試験実施機関

以下に示す5試験機関(順不同)が、抗菌性試験を担当した。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。

株式会社INAX(以下、INAX)

石塚硝子株式会社

住友大阪セメント株式会社

財団法人 化学繊維検査協会(以下、化検)

財団法人 日本食品分析センター(以下、日食)

3.5.2 試験条件

GaAsウェハー及びAgアクリル系コーティングフィルムのそれぞれについては、以下のような条件で試験を実施した。

1) 試験方法

JIS Z 2801に準拠して、それぞれの標準試験片の特性に合わせた詳細な「抗菌性試験手順書(以下手順書)」を作成し、これに基づいて試験を実施した。GaAsウェハー用の手順書は添付資料9に、Agフィルム用の手順書は添付資料10に示した。

2) 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 *Staphylococcus aureus* (NBRC 12732)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。各試験機関は複数回の抗菌性試験を実施したが、それぞれの試験は同じ時期に実施しているので試験菌株は同じ継代数の菌株を使用した。(継代は各機関で行なった。)

3) 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及びカバーフィルムは、日食が一括購入して各試験機関に配付した。

普通寒天培地(栄研化学 300g)

普通ブイヨン培地(栄研化学 100g)

カバーフィルム(オルガノ製 ストマッカ-袋): 試験機関で必要なサイズに無菌的に裁断して使用した。

培養容器(Jallee タイトボックス No.5): 平成14年度の調査研究で使用した容器を引き続き使用した。(化検にはINAXから同じ容器を配付した。)

4. 標準試験片の評価(GaAsウェハー)

4.1 平成14年度までのGaAsの調査結果と平成15年度の調査目的

平成14年度の調査結果において、1試験機関の結果であるが、GaAsウェハーは2.0~3.0の抗菌活性値を示し、標準試験片として使用できる可能性が明らかになった。しかし、GaAsウェハーは繰返し使用すると抗菌活性値が不安定になることも明らかになった。この結果から、GaAsウェハーは標準試験片として使用できるのは1回限りであると考えられる。

平成15年度の調査では、GaAsウェハーの表面状態、評価する試験機関の違いが抗菌活性に与える影響を評価する。

4.2 GaAsウェハーの仕様

GaAsウェハーは、砒化ガリウム99.9%以上(金属砒素として51.8%)の板状固体であり、物理化学的に均一な結晶構造を持つ化合物単結晶である。今年度の評価試験に使用したGaAsウェハーの仕様は次に示すとおりである。また、製品安全データシート(MSDS)を添付資料6に示した。

1) 成長法:VB

2) 導電型:半絶縁性

3) ドーパント:無添加

4) 転位密度(EPD): 10,000 cm⁻²

- 5) 比抵抗: $5 \times 10^7 \sim 4 \times 10^8 \text{ } \Omega \cdot \text{cm}$
- 6) 電子移動度: $3,000 \text{ cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$
- 7) 面方位:
仕様A (100) $\pm 0.30^\circ$ (ジャスト品: 試験品A、試験品Dとして使用)
仕様B (100) 2° オフ $\langle 110 \rangle \pm 0.3^\circ$; 2° オフ品: 試験品Cとして使用)
- 8) 表面仕上げ: 両面ミラー
- 9) 最終洗浄: スーパークリーン
- 10) フラットネス: WARP $5 \mu\text{m}$
- 11) パッケージ: ウェハトレー、N2パック
- 12) 厚さ: $625 \pm 25 \mu\text{m}$
- 13) 直径: $100.0 \pm 0.3\text{mm}$ (4インチ)、 $76.0 \pm 0.3\text{mm}$ (3インチ)
- 14) 面取り: 0.25mmR
- 15) OF: $32.5 \pm 1.0\text{mm}$ (4インチ)、 $22.0 \pm 1.0\text{mm}$ (3インチ)
- 16) IF: $18.0 \pm 1.0\text{mm}$ (4インチ)、 $12.0 \pm 1.0\text{mm}$ (3インチ)
- 17) OF, IF位置: EJフラット(または、USフラット)

4.3 GaAsウェハの抗菌性試験

4.3.1 GaAsウェハの表面状態が抗菌活性に与える影響

GaAsウェハの表面状態が抗菌活性に与える影響を、表面の再洗浄の有無と面方位のカット面角度の違いから評価する。

4.3.1.1 試験片

試験片A (ジャスト品: 長期保管後、再洗浄あり^{注1)}) 通常の出荷品の状態

試験片B (ジャスト品: 長期保管後、再洗浄なし) 在庫品の状態

試験片C (2° オフ品) 通常の出荷品、表面面方位の違い

注1) 通常、2ヶ月以上経過した在庫品は、再洗浄により表面の酸化膜をいったん除去して新品と同じ状態にして出荷する。

対照区にはストマッカ-袋 (PE) を切断したフィルムblankを使用した。

試験片A (再洗浄あり) と試験片B (再洗浄なし) の結果を比較すると、自然酸化膜の膜厚の影響が、また試験片A (ジャスト品) と試験片C (2° オフ品) の結果を比較すると、面方位の影響が明らかになる。

基本仕様は4.1に示した。ウェハサイズは、現在4インチが主流とのことで4インチのものを購入し、ダイヤモンドペンでカットして9cmシャーレに入るように計画した。しかし、切断加工が不十分であり、GaAsウェハは90mmシャーレに入らなかったものもあったため角シャーレを使用した場合もあった。

4.3.1.2 試験方法

「GaAsウェハの抗菌性試験 手順書」(添付資料9)にしたがって試験した。

4.3.1.3 試験結果

詳細データは添付資料4に示した。

(1) Log(生菌数)のzスコア、平均値、標準偏差

表1 Log(生菌数)のzスコア

| 試験片 | 評価機関 | N数 | | |
|------------------------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| フィルム ブランク (接種直後) | A | 1.35 | 1.03 | 1.14 |
| | B | 0.66 | 0.19 | 0.01 |
| | C | 0.27 | 0.00 | 0.38 |
| | D | 0.40 | 0.12 | 0.52 |
| | E | 1.09 | 1.14 | 1.04 |
| フィルム ブランク | A | 1.55 | 1.55 | 1.76 |
| | B | 0.04 | 0.01 | 0.19 |
| | C | 0.40 | 0.45 | 0.38 |
| | D | 1.09 | 1.34 | 1.22 |
| | E | 0.00 | 0.10 | 0.04 |
| GaAsウェハA | A | 0.69 | 0.67 | 0.68 |
| | B | 0.54 | 0.53 | 0.63 |
| | C | 0.91 | 1.11 | 1.05 |
| | D | 0.00 | 0.11 | 0.06 |
| | E | 0.78 | 0.74 | 0.51 |
| GaAsウェハB | A | 1.46 | 1.37 | 1.37 |
| | B | 0.90 | 0.97 | 0.86 |
| | C | 0.00 | 0.34 | 0.45 |
| | D | 0.53 | 0.03 | 0.04 |
| | E | 0.45 | 0.58 | 0.38 |
| GaAsウェハC | A | 0.92 | 0.95 | 1.01 |
| | B | 0.85 | 0.77 | 0.76 |
| | C | 0.94 | 0.70 | 0.75 |
| | D | 0.04 | 0.00 | 0.13 |
| | E | 0.53 | 0.48 | 0.54 |

表2 Log(生菌数)の平均値、標準偏差

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 |
|--------------------|------|------|
| フィルムブランク (接種直後) | 5.40 | 0.09 |
| フィルムブランク | 6.23 | 0.38 |
| GaAsウェハA | 3.69 | 1.52 |
| GaAsウェハB | 4.52 | 0.56 |
| GaAsウェハC | 4.01 | 1.18 |

(N = 15)

(2) 抗菌活性値のzスコア、平均値、標準偏差

表3 抗菌活性値のzスコア

| 試験片 | 評価機関 | N数 | | |
|-----------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| GaAsウェハーA | A | 0.79 | 0.77 | 0.79 |
| | B | 0.31 | 0.30 | 0.40 |
| | C | 1.21 | 1.41 | 1.35 |
| | D | 0.00 | 0.11 | 0.06 |
| | E | 1.02 | 0.97 | 0.75 |
| GaAsウェハーB | A | 1.73 | 1.65 | 1.65 |
| | B | 0.22 | 0.29 | 0.19 |
| | C | 0.90 | 1.22 | 1.34 |
| | D | 0.48 | 0.00 | 0.07 |
| | E | 1.12 | 1.24 | 1.06 |
| GaAsウェハーC | A | 1.05 | 1.08 | 1.13 |
| | B | 0.53 | 0.46 | 0.44 |
| | C | 1.34 | 1.11 | 1.16 |
| | D | 0.04 | 0.00 | 0.13 |
| | E | 0.85 | 0.79 | 0.85 |

表4 抗菌活性値の平均値、標準偏差

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 |
|-----------|------|------|
| GaAsウェハーA | 2.54 | 1.79 |
| GaAsウェハーB | 1.71 | 0.83 |
| GaAsウェハーC | 2.22 | 1.45 |

(N = 15)

4.3.1.4 考察

(1) GaAsウェハー表面の再洗浄が抗菌活性に与える影響

ジャスト品において、再洗浄ありが再洗浄なしと比較するとLog(生菌数)が小さく、抗菌活性値が大きいことが明らかになった。これは、再洗浄でGaAsウェハー表面の酸化膜を除去したために、GaAsウェハー表面の抗菌活性が大きく現れたと考えられる。

しかし、再洗浄ありが再洗浄なしと比較するとLog(生菌数)、抗菌活性値ともに標準偏差が大きくなることも明らかになった。これは、再洗浄でGaAsウェハー表面の酸化膜を除去したが、除去のレベルが不均一であったために、GaAsウェハー表面の抗菌活性が不安定に現れたためと考えられる。

この結果、GaAsウェハー表面の再洗浄は抗菌活性を大きくするが、ばらつきも大きくすることが明らかになった。

(2) 面方位のカット面角度がGaAsウェハーの抗菌活性に与える影響

再洗浄ありにおいて、ジャスト品の方が2°オフ品と比較すると僅かにLog(生菌数)が小さく、抗菌活性値が大きいことが明らかになった。しかし、この差は再洗浄の有無と比較すると僅かである。

この結果、面方位のカット面角度の違いは、再洗浄の有無と比較してGaAsウェハーの抗

菌活性に与える影響は小さいことが明らかになった。

(3) その他の要因がGaAsウェハーの抗菌活性に与える影響

この試験では、保護ケースから取り出して試験を行なうまでの時間(表面酸化の違い)、菌液接種操作の際の光の照射の程度、使用したシャーレの種類と洗い出し法など、試験機関による試験実施状況に違いがあった。

したがって、GaAsウェハーに照射される光による影響^{注2}及びカット作業によりGaAsの微粉末がウェハーに付着している影響やウェハー開封後の酸化や表面汚染の程度の違いなどが抗菌活性に影響を与えた可能性も考えられた。

注2) GaAsの場合バンドギャップに対応する光の波長が赤外であるため、より短波長の可視光が当たれば光励起によりGaAs表面に電子・正孔対が発生する。この時GaAs表面に接している菌液中に溶存酸素が存在すれば、伝導帯に発生した電子により溶存酸素が還元されて微量の活性酸素が発生する反応が起こる。(GaAsの伝導帯のエネルギー準位が、この反応の酸化還元電位よりも高いため)。従って、活性酸素により菌が死滅するのであれば、強い光が当たるほど活性酸素の量が増えて抗菌活性値が高くなることが考えられる。

以上の結果から、光の照射や酸化に対する影響を同等にする試験条件を設定して、再度試験を実施した。

4.3.2 GaAsウェハーの抗菌活性試験及び

表面に照射される光の量が抗菌活性に与える影響

4.3.2.1 試験片

試験片D (ジャスト品) 通常の出荷品の状態

基本仕様は4.1に示した。ただし、基板サイズは3インチとし9cmシャーレに入るようにした。GaAsウェハーを切断加工しないことで、裁断片や微粉末がGaAsウェハーに付着し、抗菌活性に影響する可能性を排除した。

対照区にはストマッカ-袋 (PE) を切断したフィルムブランクを使用した。

4.3.2.2 試験方法

「GaAsウェハーの抗菌性試験(再試験) 手順書」(添付資料9)にしたがって試験した。

各試験機関では、試験実施直前に窒素パックを開封して直ちに試験に使用するようにし、開封後の保管環境や時間による表面状態の変化や汚染に起因した影響を最小限にするようにした。また、試験中のGaAsウェハーへの光照射を可能な限り遮断した。(可能であればそのときの照度を測定した。)

なお、試験機関Eでは、試験中のウェハーに強力な光を照射して、光がGaAsウェハーの抗菌活性に与える影響についても評価した。

4.3.2.3 試験結果

詳細データは添付資料4に示した。

(1) Log(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

表5 Log(生菌数)のzスコア

| 試験片 | 評価機関 | N数 | | |
|------------------------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| フィルム ブランク (接種直後) | A | 0.10 | 0.00 | 0.68 |
| | B | 3.30 | 3.47 | 3.43 |
| | C | 0.91 | 1.99 | 1.36 |
| | D | 0.33 | 0.94 | 0.05 |
| | E | 0.66 | 0.45 | 0.21 |
| フィルム ブランク 光照射無 | A | 0.40 | 0.42 | 1.86 |
| | B | 1.94 | 0.03 | 0.64 |
| | C | 0.79 | 0.50 | 0.00 |
| | D | 4.38 | 4.26 | 1.57 |
| | E | 0.76 | 0.27 | 0.79 |
| GaAsウェハD 光照射無 | A | 0.65 | 0.98 | 0.92 |
| | B | 0.21 | 0.09 | 0.00 |
| | C | 1.51 | 1.55 | 1.46 |
| | D | 0.58 | 0.36 | 0.26 |
| | E | 0.60 | 0.57 | 0.43 |

表6 Log(生菌数)の平均値、標準偏差

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 |
|--------------------|------|------|
| 光照射無(全試験機関) | | |
| フィルムブランク (接種直後) | 5.43 | 0.10 |
| フィルムブランク 光照射無 | 6.45 | 0.12 |
| GaAsウェハD 光照射無 | 3.89 | 1.14 |
| (N = 15) | | |
| 光照射の有無(試験機関Eのみ) | | |
| GaAsウェハD 光照射無 | 2.78 | - |
| GaAsウェハD 光照射有 | 2.22 | - |
| (N = 3) | | |

(2) 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

表7 抗菌活性値のzスコア

| 試験片 | 評価機関 | N数 | | |
|------------------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| GaAsウェハD 光照射無 | A | 0.62 | 0.92 | 0.87 |
| | B | 0.19 | 0.08 | 0.00 |
| | C | 1.39 | 1.42 | 1.34 |
| | D | 0.67 | 0.47 | 0.37 |
| | E | 0.58 | 0.56 | 0.43 |

表8 抗菌活性値の平均値、標準偏差、拡張不確かさ(U)

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 | 拡張不確かさ(U) |
|------------------------|------|------|-----------|
| 光照射無(全試験機関) | | | |
| GaAsウェハD 光照射無 | 2.57 | 1.20 | 2.78 |
| (N = 15) | | | |
| 光照射の有無(試験機関Eのみ) | | | |
| GaAsウェハD 光照射無 | 3.70 | - | - |
| GaAsウェハD 光照射有 | 4.21 | - | - |
| (N = 3) | | | |

表9 GaAsウェハー試験片Dを用いた5試験機関の試験結果に基づいて不確かさを推定した事例

| 試験片D | 1 | 2 | 3 | 合計 | 標準偏差 | 平均 | 平均の平均 |
|------|------|------|------|-------|------|------|-------|
| A | 1.96 | 1.50 | 1.58 | 5.04 | 1.20 | 1.68 | 2.57 |
| B | 3.20 | 2.79 | 2.91 | 8.90 | | 2.97 | |
| C | 0.79 | 0.74 | 0.86 | 2.39 | | 0.80 | |
| D | 3.93 | 3.63 | 3.48 | 11.04 | | 3.68 | |
| E | 3.80 | 3.76 | 3.57 | 11.13 | | 3.71 | |

| 3.5E-01 | 要因 | 平方和 | 自由度 | 分散 | F値 | 分散の期待値 |
|---------|------|-------|----------|------|---------------------|----------------------------|
| | A試験所 | 19.88 | 4 | 4.97 | 141.12 | $(e)^2 + 3(a)^2$ |
| | e誤差 | 0.35 | 10 | 0.04 | 0.02 | $(e)^2$ |
| | 全体 | 20.23 | 14 | 1.44 | | |
| | e | 0.19 | | | F(0.05,4,10)=3.48 | 有意差あり |
| | a | 1.28 | 1.644712 | | t(0.05, 14) = 2.145 | |
| | uc | 1.30 | 1.679926 | | | |
| | U | 2.78 | | | | <u>抗菌活性値 = 2.57 ± 2.78</u> |

4.3.2.4 考察

- (1) 菌液の接種操作における光の照度については、10Lx程度が3試験機関(A, B, E), 120Lx程度が1機関(D), 1500~2000Lxが1機関(C)であった。またこの操作に要した時間は、10分以内が4機関、25分が1機関であった。
- (2) 菌の洗い出し操作では10Lx程度が2機関(A, B), 65~120Lxが2機関(D, E), 1800~2300Lxが1機関(C)であった。洗い出しの時間は、各機関とも1~3分/枚で合計30分程度であった。
- (3) このように試験は、光の照度、照射時間も制限下で実施されており、また短時間のうちに菌液接種の操作を行なっているため、光の影響及び開封後のウェハー表面の自然酸化(酸化膜の形成)については、第1回目の試験条件に比べるとかなり制御された条件下で試験が実施されたと考えている。
- (4) 光照射の影響については、試験機関Eの結果から、光照射有(約29000Lx)の方が光照射無と比較して、GaAsウェハーDのLog(生菌数)は0.56小さくなり、抗菌活性値は0.51大きくなった。この結果、GaAsウェハーの抗菌活性は、光照射の影響を受けることが明らかになった。ただし、今回の試験において、光照射時の照度は極めて高かったため、通常試験環境の光照射下でGaAsウェハーの抗菌活性がどの程度影響を受けるのかは明らかでない。今後の検討が必要である。
- (5) これまでの2回の試験の結果から試験機関間のばらつきは大きい一方、一方で試験機関内のばらつきはそれほどでもない傾向があり、GaAsウェハーにおける抗菌性試験では、これまでに考慮されていないバラツキの要因がある可能性も示唆された。
- (6) 試験機関内の(抗菌活性値の)バラツキの大きさを再評価するため、試験機関Eにおいて繰返し試験(再現性試験)を実施することにした。

4.3.3 GaAsウェハーの抗菌活性試験

4.3.2.1における光照射無の再現性確認試験を行なった。試験は試験機関Eのみが実施した。

4.3.3.1 試験片

GaAsウェハー

試験片E(ジャスト品:再洗浄有)

試験片A(ジャスト品:再洗浄有)と同仕様のウェハー5枚を用いた。サイズは4インチで切断加工せずに角シャーレに入れて評価した。

対照区にはストマック-袋(PE)を切断したフィルムブランクを使用した。

4.3.3.2 試験方法

4.3.2.2と同様の方法で行なった。光照射等の実施条件も同じである。

4.3.3.3 試験結果

(1) Log(生菌数)の平均値、標準偏差

表10 Log(生菌数)の平均値、標準偏差

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 |
|--------------------|------|------|
| フィルムブランク (接種直後) | 5.34 | 0.03 |
| フィルムブランク 光照射無 | 6.31 | 0.02 |
| GaAsウェハE 光照射無 | 1.47 | 0.52 |

(N = 5)

(2) 抗菌活性値の平均値、標準偏差

表11 抗菌活性値の平均値、標準偏差

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 |
|------------------|------|------|
| GaAsウェハE 光照射無 | 4.61 | 0.52 |

(N = 5)

4.3.3.4 考察

光照射の条件は、菌液接種時は約5 Lx、洗い出し時は約65 Lxと試験片Dのときと同様であったが、GaAsウェハ試験片Eの抗菌活性値は、試験片Dと比較すると0.91大きくなった。この結果からは、光照射無の時のGaAsウェハの抗菌活性の再現性は確認できなかった。これは今回の試験の方が試験片Dのときと比較して試験菌株の継代回数が多く、試験菌の活性が低くなりGaAsの抗菌活性の影響を大きく受けたためと考えられる。

4.4 GaAsウェハからの溶出成分量と抗菌活性

4.4.1 目的

GaAsウェハの抗菌活性をGa、Asの溶出量の観点から評価する。

4.4.2 評価方法

抗菌性試験時の洗出しに用いたSCDLPブイオン培地に含まれるGa、As量とLog(生菌数)の関係から評価する。溶出量は、GaはICP発光分析法、Asは原子吸光光度法で測定した。評価は試験機関Bで実施した。

4.4.2.1 ヒ素の測定

試験溶液の調製

検体0.1～0.2 gをケルダールフラスコに秤取し、硝酸・硫酸・過塩素酸を加え湿式分解を行った。さらに水適量と飽和シュウ酸アンモニウムを加え再度加熱し、硫酸白煙を上げた。放冷後、ろ紙(No.5C[東洋濾紙株式会社])を用いて全量フラスコ(50ml)に移し、40%ヨウ化カリウム溶液5 mlを加え30分放置後、10%アスコルビン酸溶液5 mlを加えた。更に水を加え50

mlとし、これを試験溶液とした。

標準溶液の調製

ヒ素標準溶液(0.1 ppm(用時調製))から、1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 mlを全量フラスコ(100 ml)にとり、水適量と硫酸10 mlを加え、試料溶液と同様に40 %ヨウ化カリウム溶液10 mlを加え30 分放置後、10 %アスコルビン酸溶液10 mlを加えた。更に水を加え100 mlに定容した。

測定

0.6 %水素化ほう素ナトリウム-0.5 %水酸化ナトリウム溶液及び塩酸(5+1)をセットし、標準溶液及び試験溶液を水素化物発生-原子吸光光度計に導入し測定した。

原子吸光光度計操作条件

機 種: SpectrAA 220[ハリアン テクノジーズ ジャパン リミテッド]
水素化物発生装置: VGA-77型[ハリアン テクノジーズ ジャパン リミテッド]
ガス圧力: アルゴン 0.4 fkg/cm²
測定波長: 193.7 nm
石英加熱セル温度: 925

4.4.2.2 ガリウムの測定

試験溶液の調製

検体0.5 g ~ 1.0 gに硝酸5 mlを加え、乾固させた後、硝酸500 µlと水を加え30分間加温し、水で50 mlに定容したものを試験溶液とした。

標準溶液の調製

市販のガリウム標準液(1000 µg/ml)50 µlをとり、硝酸500 µlを加えて、水で50 mlに定容したものを標準原液とした。標準原液を1 %硝酸で希釈して、0, 0.01, 0.05及び0.1 µg/mlに調製したものを標準溶液とした。

測定

標準溶液及び試験溶液をICP発光分析装置に導入し測定した。

ICP発光分析装置操作条件

機 種: Optima 3300DV[株式会社 パーキンエルマー ジャパン]
高周波出力: 1,300 W
ガス流量: アルゴン(プラズマガス) 15 L/min
アルゴン(補助ガス) 0.5 L/min
アルゴン(キャリアーガス) 0.80 L/min
試料導入量: 1.00 mL/min
ネブライザー: クロスフロー型
プラズマ観測位: 軸方向
測定波長: 294.364 nm(ガリウム)

4.4.3 試料

試料は4.3.1の洗出液SCDLPブイオン培地を用いた。試料は抗菌活性値の低かった試験機関Bと抗菌活性値の高かった試験機関Dからサンプリングした(試験機関Dはサンプリングした試料を試験機関Bに送付した)。

4.4.4 試験結果

表12 GaAsウェハーからのGa、As溶出量とLog(生菌数)

| | 試験機関B | | | 試験機関D | | |
|----------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| | Ga (ppm) | As (ppm) | Log (生菌数) | Ga (ppm) | As (ppm) | Log (生菌数) |
| GaAsウェハA | 3.6 | 4.0 | 5.12 | 1.0 | 1.7 | 3.92 |
| GaAsウェハB | 3.0 | 3.4 | 4.98 | 1.6 | 1.7 | 4.19 |
| GaAsウェハC | 3.3 | 3.6 | 5.16 | 1.4 | 2.0 | 3.91 |
| フィルムブランク | <1 | <0.1 | 6.43 | <1 | <0.1 | 5.92 |

(N = 3の平均値)

4.4.5 考察

- (1) GaAsウェハーからのGa、Asの溶出量とLog(生菌数)の間に特に相関は見られなかった。また、試験機関Bと試験機関Dの結果を比較すると、試験機関Dの方が、Log(生菌数)が小さいにも関わらず、GaAsの溶出量は少ない結果になった。この結果から、GaAsウェハーの抗菌活性の発現が溶出の影響でない可能性が考えられる。
- (2) また、試験機関Dの試料は試験機関Bの試料と比較して、輸送等の関係で洗出しから溶出量の測定までに時間が経過したために試料を入れた容器にGaとAsが付着して測定では検出されなかった可能性も考えられる。
- (3) GaAsの抗菌活性作用(菌に対する作用)については今後の検討が必要である。

4.5 まとめ

- (1) GaAsウェハーの表面状態と抗菌活性
GaAsウェハーを再洗浄すると抗菌活性値は大きくなるが、拡張不確かさ(U)が大きくなる。GaAsウェハーの面方位のカット面角度がジャスト品と2°オフ品の抗菌活性値の差は再洗浄の有無に比較すると僅かである。
- (2) GaAsウェハーへの光照射と抗菌活性
GaAsウェハーの抗菌活性は光照射の影響を受けて大きくなる可能性がある。しかし、これは光照射量が極めて高い場合であり、通常の試験室レベルの光照射量がGaAsウェハーの抗菌活性に与える影響は定かでない。
- (3) GaAsウェハーからの溶出成分量と抗菌活性
GaAsウェハーからのGa、Asの溶出量と抗菌活性の間に特に相関は見られなかった。
- (4) 5試験機関で可能な限り同一な試験条件(光の照射、表面の酸化)で実施した試験片Dについての試験結果では、抗菌活性値2.75、標準偏差1.20、拡張不確かさ3.48であった。試験条件を同一にしたにもかかわらず、試験機関間のばらつきは大きい結果であった。
- (5) 同一試験機関における繰返し試験の結果においても、ばらつく傾向がみうけられた。
- (6) GaAsウェハーの抗菌活性の作用機作が不明である点、及び現在の試験法でGaAsの試験を実施するときに試験機関でバイアスを起こすような要因があるのかどうかも含めて今後の検討が必要である。

5. 標準試験片の評価(水溶性銀系抗菌剤含有ワニス塗布型PETフィルム)

5.1 標準試験片(Agアクリル系コーティングフィルム)の材料

標準試験片の作製に使用した材料は、平成14年度調査研究で使用したものと同一である。

5.1.1 塗工液

標準試験片の作製に使用した塗工液組成を下記に示す。

- (1) 抗菌剤: 明治乳業株式会社製 TSC-N(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)
- (2) ポリマー: ポリアクリルアルキルエステル / メタアクリル酸共重合物のアンモニア中和物
- (3) 添加剤: ジアセチレン系界面活性剤1%
- (4) 溶剤 : 水

5.1.2 ポリマーの種類、性状等(平成14年度調査報告書から引用)

(1) 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: エマルジョン重合タイプ(THF溶液, GCPでは測定できなかった; 数百万以上と推定)
- (3) 不揮発成分: 22.5 ± 1.0 % (150 / 20分乾燥後の残量)
- (4) 溶剤: 水
- (5) 粘度: 1500 ± 500 cps (BM型粘度計 # 3 / 12rpm at 25)

(2) 膨潤度

菌液に接触して膨潤し、抗菌剤を速やかにリリースする。

(3) 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。

(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。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) pH

7.5 ± 0.5 (25)

(5) 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 |

5.1.3 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。

5.2 標準試験片の作製と仕様

本調査研究で作製した標準試験片の作製条件及び仕様を下記に示す。

- (1) 塗工液: 5.1.1.1参照
- (2) 抗菌剤濃度: 0、300、350、400、450、500、550、600(単位ppm)
- (3) 膜厚: $5 \pm 1 \mu\text{m}$
- (4) 基材: 日清紡製PETフィルム(E-5101)、裏面マット加工品、膜厚 $50 \mu\text{m}$
- (5) 塗工条件
塗工方法: マイクログラビア(版斜線50線)
乾燥条件: 第一オープン: $140^\circ\text{C}/10\text{Hz}$ 、第二オープン: $140^\circ\text{C}/10\text{Hz}$
塗工速度: $3\text{m}/\text{min}$
- (6) 作製日: 2003年9月5日

5.2.1 評価用標準試験片作製条件の検討

- (1) 生産の経緯
 - ・2003年8月 1日 塗工本機のプロセス条件設定
 - ・2003年8月21日 塗工本機のプロセス条件設定
 - ・2003年9月 5日 評価用生産
- (2) 検討項目(平成14年度の調査で積み残しとなった問題点)
 - 生産機の変更
平成14年度まで用いてきた試験塗工機は安定的な生産が困難である状況から、銀系標準試験体の生産を本機生産に切り替え、生産条件等最適化を図った。
 - 残留アンモニアの定量
試料をGe結晶板に密着させ入射角度60度を用いてFT-IR(ATR)法で測定した。1729 cm^{-1} 付近のアクリル樹脂のエステル($\text{C}=\text{O}$)の吸収スペクトルとアンモニアは1548 cm^{-1} ($\text{N}-\text{H}$)付近の吸収スペクトルの比より、アンモニア残量($=S(\text{N}-\text{H})/S(\text{C}=\text{O})$)を規格化した。
- (3) 抗菌性試験法
標準試験片を $40 \pm 2\text{mm}$ 角の正方形に切り取り試験片とした。被覆フィルムに試験菌液をそれぞれ滴下後、試験片を被せて 35°C で培養し、24時間後の生菌数を測定した(倒置法)。
 - 試験方法 JIS Z 2801
 - 試験菌 Staphylococcus aureus NBRC 12732 (黄色ブドウ球菌)
 - 試験菌液の調製
 - 1) 試験菌を普通寒天培地に移植し、 35°C で前培養した。
 - 2) 前培養した試験菌の菌体1白金耳を、 $1/500\text{NB}$ に希釈し、菌数が約 10^5 個/mlとなるように調製したものを、試験菌液とした。
 - 被覆フィルム オルガノ製 ストマッカー用フィルム(PEフィルム)
 - 試験操作
試験片をシャーレに入れ、被覆フィルムに試験菌液0.4mlを滴下した。滴下水滴の上に試験片を被せ、シャーレのふたを閉め 35°C 、相対湿度90%で24時間培養後、試験片の生菌数を測定した。

生菌数の測定

試験片をSCDLP培地10mlで洗い出し、回収液とする。この回収液について、混釈平板培養法により生菌数を測定し、培養後の菌数を求めた。

5.2.2 銀系標準試験片生産条件検討結果

5.2.2.1 本機生産機の生産条件設定（2003年8月1日）

表1 本機生産機の生産条件設定 生産条件一覧

| 抗菌濃度 | オープン温度[] | | 基材温度 [] | 風量 [Hz] | 水ラビング* ¹ [回] | アンモニア* ² (測定日8/7) |
|--------|-----------|-----|-------------|------------|----------------------------|---------------------------------|
| | 第1 | 第2 | | | | |
| Oppm | 130 | 130 | 96 | 15/15 | 68 | 0.064 |
| 400ppm | 130 | 130 | 96 | 15/15 | 138 | 0.057 |
| 400ppm | 125 | 125 | 96 | 15/15 | 88 | 0.078 |
| 450ppm | 125 | 125 | 96 | 15/15 | 88 | 0.069 |
| 450ppm | 140 | 140 | 104 | 15/15 | >250 | 0.039 |

抗菌剤Lot:C24 塗液NV(不揮発分):15% リバーズ200% *³

*¹ 水に浸した綿布で塗工層をこすり、塗工層が剥げ落ちるまでの往復回数、耐水性をみている

*² 1548cm-1と1789cm-1のピーク強度比

*³ フィルムと逆方向にロールを廻す(リバーズ)が、このときの面速度が2倍(6m/min)です。

本試験系による抗菌試験の結果は試験不成立(接種24hr対照区の生菌数が1+E4以下)となった。本機生産機はジェットノズル式オープンであるため試験塗工機に比べ温風の風量が高く、塗布された塗工材の表面が特に乾きやすい傾向がある。その結果抗菌層深部のアンモニアが正常な状態まで乾燥できなかった可能性が高い。

5.2.2.2 塗工本機のプロダクション条件設定（2003年8月21日）

塗工本機のプロダクション条件設定での知見を踏まえ、風量を2/3(10Hz)に落とした条件での再塗工を試みた。

表2 塗工本機のプロダクション条件設定 生産条件一覧

| 試作No | 抗菌濃度 | オープン温度 | | 基材温度 [Hz] | 風量 [Hz] | 水ラビング [回] | アンモニア (測定日8/26) |
|------|------|--------|-----|--------------|------------|--------------|--------------------|
| | | 第1 | 第2 | | | | |
| A1 | 0 | 100 | 100 | 67 | 10/10 | 5 | |
| A2 | 0 | 100 | 125 | 75 | 10/10 | 8 | |
| A3 | 0 | 100 | 140 | 84 | 10/10 | 10 | |
| A4 | 0 | 120 | 140 | 87 | 10/10 | 40 | 0.100 |
| A5 | 0 | 140 | 140 | 89 | 10/10 | 75 | 0.079 |
| A6 | 0 | 140 | 160 | 99 | 10/10 | >100 | 0.058 |
| A7 | 350 | 120 | 140 | 89 | 10/10 | 90 | |
| A8 | 350 | 140 | 140 | 91 | 10/10 | 108 | |
| A9 | 350 | 140 | 160 | 98 | 10/10 | >200 | |
| A10 | 400 | 120 | 140 | 91 | 10/10 | 40 | 0.090 |
| A11 | 400 | 140 | 140 | 91 | 10/10 | 43 | 0.085 |
| A12 | 400* | 140 | 140 | 91 | 10/10 | 95 | 0.053 |
| A13 | 400 | 140 | 160 | - | 10/10 | 130 | 0.057 |

抗菌剤Lot:C25 塗液NV:15% リバーズ200% *マークのみ塗工速度を2m/minに設定

表3 塗工本機の生産条件設定 試作標準試験片の抗菌性試験結果

| 試作 No | 生菌数 | | | | | | | | 抗菌 活性値 |
|----------|--------|--------|--------|--------|---------|----------|-----|--------|-----------|
| | 接種直後 | | | | 接種24hr後 | | | | |
| | n-1 | n-2 | n-3 | 平均 | n-1 | n-2 | n-3 | 平均 | |
| A4 | 2.0E+5 | 1.9E+5 | 2.0E+5 | 2.0E+5 | 1.2E+5 | 1.0E+5 | - | 1.1E+5 | - |
| A5 | 2.0E+5 | 1.8E+5 | 1.9E+5 | 1.9E+5 | 1.2E+5 | 9.5E+4 | - | 1.1E+5 | - |
| A6 | 2.1E+5 | 2.0E+5 | 2.0E+5 | 2.0E+5 | 1.1E+5 | 1.1E+5 | - | 1.1E+5 | - |
| A7 | - | - | - | - | 1.4E+3 | 1.1E+2 | - | 7.6E+2 | 2.2 |
| A10 | - | - | - | - | 4.0E+1 | 2.0E+2 | - | 1.2E+2 | 3.0 |
| A11 | - | - | - | - | 8.0E+1 | 6.0E+4** | - | 8.0E+1 | 3.1 |
| A12 | - | - | - | - | 1.4E+2 | 1.1E+2 | - | 1.3E+2 | 2.9 |
| A13 | - | - | - | - | 5.0E+1 | 1.0E+2 | - | 7.5E+1 | 3.2 |

接種菌数:3.6 + E5 **異常値としてネグレクト

本生産条件下で目的とする抗菌活性値の範囲内に入ることが判明し、今回の評価用標準試験片については、生産条件設定 で実施することにした。

5.2.2.3 本機生産機による評価用標準試験片の作製(2003年9月5日)

表4 評価用標準試験片 生産条件一覧

| 作成 No | 抗菌 濃度 | オープン温度[] | | 基材温度 [] | 風量 [Hz] | 水ラビング [回] | アンモニア (測定日9/9) |
|----------|----------|-----------|-----|-------------|------------|--------------|-------------------|
| | | 第1 | 第2 | | | | |
| B1 | 300 | 140 | 140 | 89 | 10/10 | 37 | |
| B2 | 350 | 140 | 140 | 90 | 10/10 | 38 | 0.054 |
| B3 | 400 | 140 | 140 | 92 | 10/10 | 47 | 0.079 |
| B4 | 450 | 140 | 140 | 92 | 10/10 | 39 | |
| B5 | 500 | 140 | 140 | 91 | 10/10 | 50 | |
| B6 | 550 | 140 | 140 | 91 | 10/10 | 35 | |
| B7 | 600 | 140 | 140 | 91 | 10/10 | 79 | |
| B8 | 0 | | 140 | 91 | 10/10 | 44 | 0.071 |

抗菌剤Lot:C25 塗液NV:15% リバーズ200%

表5 評価用標準試験片の抗菌性試験結果

| 作成 No | 生菌数 | | | | | | | | 抗菌 活性値 |
|----------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|-----|---------|-----------|
| | 接種直後 | | | | 接種24hr後 | | | | |
| | n-1 | n-2 | n-3 | 平均 | n-1 | n-2 | n-3 | 平均 | |
| B8 | 5.7E+5 | 5.0E+5 | 4.3E+5 | 5.0E+5 | 2.7E+5 | 1.5E+5 | - | 2.1E+05 | - |
| B2 | - | - | - | - | 1.2E+3 | 9.5E+2 | - | 1.1E+03 | 2.3 |
| B3 | - | - | - | - | 6.5E+2 | 9.1E+2 | - | 7.8E+02 | 2.4 |

接種菌数:6.0+E5

5.2.2.4 作製条件検討結果のまとめ

表2・表3の結果から、本機生産ラインではオープン温度が120/140度設定から140/160度設定までの広範囲な設定で安定的な抗菌活性値が得られることがわかった。

またATR法による残留アンモニアの定量は精度良く評価できることが示唆され、品質管理項目と

して使用可能であると判断した。そのときの管理幅を0.054～0.101とした。

5.3 塗工均一性試験

標準試験片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、標準試験片1枚当り(40×40mm)の銀量を測定した。

5.3.1 試料及び試料数

当評価に用いた標準試験片は、表4で作製したもの(作製日:2003年9月5日)

350ppm:5枚(n=5)

450ppm:5枚(n=5)

5.3.2 サンプルング方法

保存していた標準試験片10セットから無作為に2セット選び出した後、これら2セットに入っている計8枚の標準試験片の内5枚を無作為に選び出し、これを評価用試料とした。

5.3.3 銀の理論推定値

350ppm 1.2 μg / 標準試験片1枚(16cm²)

450ppm 1.4 μg / 標準試験片1枚(16cm²)

参考:計算式

銀量(μg) = 塗布量(g) × 濃度(ppm) × 0.95 × 107.9/301

5.3.4 銀量の測定

試料である標準試験片350ppm及び450ppmの各5枚について、原子吸光光度法により、試料1枚当りの銀の定量試験を行った。

試験溶液の調整

試料の標準試験片1枚をケルダールフラスコに量り、硝酸10ml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5mlを加え、再度加熱した。

内容物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。さらに硝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。

試験方法

試験溶液全量又は一部を200ml容分液漏斗に移し、50%クエン酸水素二アンモニウム溶液10ml及びプ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0.25ppm、0.5ppm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%クエン酸水素二アンモニウム溶液10ml及びプ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。

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: 328.1 nm
- ・フレーム: 空気-アセチレン

5.3.5 試験結果

表6 試験片の重量及び銀の定量試験結果

| 試験片 No. | 350ppm | | 450ppm | |
|------------|----------------|---------------------|----------------|---------------------|
| | 試験片重量 (g/枚) | Ag量 (μ g/枚) | 試験片重量 (g/枚) | Ag量 (μ g/枚) |
| 1 | 0.1205 | 0.90 | 0.1190 | 1.34 |
| 2 | 0.1213 | 1.02 | 0.1188 | 1.02 |
| 3 | 0.1205 | 0.83 | 0.1201 | 1.15 |
| 4 | 0.1204 | 0.96 | 0.1193 | 1.09 |
| 5 | 0.1201 | 0.82 | 0.1193 | 1.31 |
| 平均 | 0.1206 | 0.91 | 0.1193 | 1.18 |
| 標準偏差 | | 0.09 | | 0.14 |

350ppm, 450ppmの試験片各5枚について、銀の定量試験を行った。350ppmでは1枚あたりの銀の量は0.91 μ g/個 標準偏差0.09 μ g/個 変動係数(CV)9.4%, また450ppmでは1枚あたりの銀の量は1.18 μ g/個 標準偏差0.14 μ g/個 変動係数(CV)11.8%であり均一な試験片であると考えられた。

5.4 Agフィルムの抗菌性試験

5.4.1 予備試験(試験に使用する試験体[Ag濃度]の決定)

- (1) 予備試験(担当:試験機関B、E)

標準試験片(300ppm, 350ppm, 400ppm, 450ppm, 500ppm, 550ppm, 600ppm: 2003年9月作製)の抗菌性能をJIS Z 2801に準拠し倒置法を用いて評価した(標準試験片表面のエタノール拭きはしない)。

- (2) 2試験機関で行なった予備試験結果を表7に示した。

表 7 予備試験

試験機関

E

[1] 共通菌株 (黄色ブドウ球菌 NBRC12732)

| サンプル | No | 希釈倍数 | カウント | 生菌数 (cfu/試料) | 平均 生菌数 | LOG (生菌数) | 抗菌活性値 | 抗菌活性値 (平均) |
|------------|----|------|-------|-----------------|-----------|--------------|-------|---------------|
| 接種直後対照区 | 1 | 2 | 282 | 2.8E+5 | | 5.45 | | |
| (フィルムブランク) | 2 | 2 | 309 | 3.1E+5 | 3.0E+5 | 5.49 | | |
| 接種24hr対照区 | 1 | 3 | 135.5 | 1.4E+6 | | 6.13 | | |
| (フィルムブランク) | 2 | 3 | 208 | 2.1E+6 | 1.7E+6 | 6.32 | | |
| 0 ppm | 1 | 1 | 253 | 2.5E+4 | | 4.40 | 1.83 | |
| (試験片) | 2 | 1 | 301 | 3.0E+4 | 2.8E+4 | 4.48 | 1.76 | 1.79 |
| 300 ppm | 1 | 1 | 317.5 | 3.2E+4 | | 4.50 | 1.73 | |
| (試験片) | 2 | 1 | 129.5 | 1.3E+4 | 2.2E+4 | 4.11 | 2.12 | 1.89 |
| 350 ppm | 1 | 1 | 95.5 | 9.6E+3 | | 3.98 | 2.25 | |
| (試験片) | 2 | 1 | 117 | 1.2E+4 | 1.1E+4 | 4.07 | 2.17 | 2.21 |
| 400 ppm | 1 | 0 | 326.5 | 3.3E+3 | | 3.51 | 2.72 | |
| (試験片) | 2 | 1 | 300.5 | 3.0E+4 | 1.7E+4 | 4.48 | 1.76 | 2.01 |
| 450 ppm | 1 | 0 | 122.5 | 1.2E+3 | | 3.09 | 3.15 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 144.5 | 1.4E+3 | 1.3E+3 | 3.16 | 3.08 | 3.11 |
| 500 ppm | 1 | 0 | 123.5 | 1.2E+3 | | 3.09 | 3.14 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 296 | 3.0E+3 | 2.1E+3 | 3.47 | 2.76 | 2.91 |
| 550 ppm | 1 | 0 | 215.5 | 2.2E+3 | | 3.33 | 2.90 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 165.5 | 1.7E+3 | 1.9E+3 | 3.22 | 3.02 | 2.96 |
| 600 ppm | 1 | 0 | 52 | 5.2E+2 | | 2.72 | 3.52 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 51 | 5.1E+2 | 5.2E+2 | 2.71 | 3.53 | 3.52 |

試験機関

B

[1] 共通菌株 (黄色ブドウ球菌 NBRC12732)

| サンプル | No | 希釈倍数 | カウント | 生菌数 (cfu/試料) | 平均 生菌数 | LOG (生菌数) | 抗菌活性値 | 抗菌活性値 (平均) |
|------------|----|------|--------|-----------------|-----------|--------------|-------|---------------|
| 接種直後対照区 | 1 | 2 | 212 | 2.1E+5 | | 5.33 | | |
| (フィルムブランク) | 2 | 2 | 222 | 2.2E+5 | 2.2E+5 | 5.35 | | |
| 接種24hr対照区 | 1 | 3 | 351.5 | 3.5E+6 | | 6.55 | | |
| (フィルムブランク) | 2 | 3 | 278.5 | 2.8E+6 | 3.2E+6 | 6.44 | | |
| 0 ppm | 1 | 1 | 275.75 | 2.8E+4 | | 4.44 | 2.06 | |
| (試験片) | 2 | 2 | 39.5 | 4.0E+4 | 3.4E+4 | 4.60 | 1.90 | 1.97 |
| 300 ppm | 1 | 2 | 53 | 5.3E+4 | | 4.72 | 1.77 | |
| (試験片) | 2 | 2 | 42 | 4.2E+4 | 4.8E+4 | 4.62 | 1.88 | 1.82 |
| 350 ppm | 1 | 1 | 320.5 | 3.2E+4 | | 4.51 | 1.99 | |
| (試験片) | 2 | 1 | 174 | 1.7E+4 | 2.5E+4 | 4.24 | 2.26 | 2.11 |
| 400 ppm | 1 | 1 | 64 | 6.4E+3 | | 3.81 | 2.69 | |
| (試験片) | 2 | 1 | 89.5 | 9.0E+3 | 7.7E+3 | 3.95 | 2.55 | 2.61 |
| 450 ppm | 1 | 0 | 128 | 1.3E+3 | | 3.11 | 3.39 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 115.5 | 1.2E+3 | 1.2E+3 | 3.06 | 3.44 | 3.41 |
| 500 ppm | 1 | 0 | 61.5 | 6.2E+2 | | 2.79 | 3.71 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 78 | 7.8E+2 | 7.0E+2 | 2.89 | 3.61 | 3.65 |
| 550 ppm | 1 | 0 | 248 | 2.5E+3 | | 3.39 | 3.10 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 145.5 | 1.5E+3 | 2.0E+3 | 3.16 | 3.34 | 3.20 |
| 600 ppm | 1 | 0 | 86 | 8.6E+2 | | 2.93 | 3.56 | |
| (試験片) | 2 | 0 | 84.5 | 8.5E+2 | 8.5E+2 | 2.93 | 3.57 | 3.57 |

2 試験機関の試験結果はよく一致した結果であった。また、抗菌活性値と銀量の濃度依存性も認められ、標準試験片の作製は良好な結果であると判断し、この試験片を使用して評価試験を実施することとした。なお、評価試験は銀濃度350ppm及び450ppmの抗菌活性値2～3付近の試験片2水準を使用することとした。

5.4.2 抗菌性試験

5.4.2.1 標準試験片

無加工試験片 0ppm

抗菌加工試験片 350ppm 及び 450ppm

ただし、対照区にはフィルムblank(ストマッカ-袋:PE)を使用した。

試験片は、各濃度ごとにPEの小袋に入れ、これらを遮光したアルミパックに入れて保管された形で配付された。

5.4.2.2 試験方法

「Agアクリル系フィルムの抗菌性試験 手順書(以下手順書)」(添付資料10)にしたがって試験した。

製造元から配付された同一ロットのAgフィルムをそれぞれの試験機関で保管し、この試験片を用いて2回の繰り返し試験を実施した。1回目の試験は、平成15年10月上旬に、2回目の試験は11月上旬に実施した。

5.4.2.3 試験結果

表8 抗菌活性値のzスコア(1回目の試験)

| 試験片 | 評価機関 | N数 | | |
|---------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 350 ppm | A | 1.17 | 0.86 | 1.14 |
| | B | 0.75 | 0.52 | 0.75 |
| | C | 0.37 | 0.83 | 0.18 |
| | D | 1.76 | 2.37 | 2.00 |
| | E | 0.00 | 0.11 | 0.03 |
| 450 ppm | A | 0.72 | 0.74 | 0.54 |
| | B | 0.25 | 0.94 | 0.67 |
| | C | 0.57 | 0.47 | 0.59 |
| | D | 3.61 | 0.91 | 1.32 |
| | E | 0.00 | 0.45 | 0.14 |

表9 抗菌活性値のzスコア(2回目の試験)

| 試験片 | 評価機関 | N数 | | |
|---------|------|------|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| 350 ppm | A | 0.43 | 0.48 | 0.69 |
| | B | 0.00 | 0.32 | 0.00 |
| | C | 0.03 | 0.03 | 0.05 |
| | D | 2.56 | 2.54 | 5.13 |
| | E | 1.39 | 1.10 | 1.23 |
| 450 ppm | A | 0.57 | 0.91 | 0.47 |
| | B | 0.62 | 0.62 | 0.00 |
| | C | 1.10 | 0.93 | 0.83 |
| | D | 1.53 | 1.45 | 0.67 |
| | E | 0.67 | 0.59 | 0.05 |

表10 抗菌活性値の平均値、標準偏差(試験1回目)

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 |
|------------------------|------|------|
| 全試験機関 | | |
| Agフィルム 350 ppm | 1.99 | 0.69 |
| Agフィルム 450 ppm | 2.63 | 0.92 |
| (N = 15) | | |
| 4試験機関(試験機関Dを除く) | | |
| Agフィルム 350 ppm | 1.72 | 0.42 |
| Agフィルム 450 ppm | 2.29 | 0.45 |
| (N = 12) | | |

表11 抗菌活性値の平均値、標準偏差(試験2回目)

| 試験片 | 平均値 | 標準偏差 |
|------------------------|------|------|
| 全試験機関 | | |
| Agフィルム 350 ppm | 2.02 | 0.59 |
| Agフィルム 450 ppm | 2.69 | 0.70 |
| (N = 15) | | |
| 4試験機関(試験機関Dを除く) | | |
| Agフィルム 350 ppm | 1.78 | 0.26 |
| Agフィルム 450 ppm | 2.42 | 0.41 |
| (N = 12) | | |

5試験機関による結果の解析を試みたが、1機関が抗菌活性値でZスコアが2を超えた(疑義あり)の結果であったので詳細な解析は4試験機関の結果を用いて実施した。

この試験では、4試験機関が2種類の試験片を用いた抗菌性試験を2回反復したことになる。また、測定の上返し数は3回である。反復と試験機関の関係はランダム化できないので、分割型の実験と解釈して、分散分析を行なった。分散分析の結果の要約と不確かさの算出結果を以下に示す。

表12 4試験機関の結果にもとづく分散分析表(その1)

| 変動要因 | 偏差平方和 | 自由度 | 不偏分散 | 分散比 | 5%棄却 | 1%棄却 | |
|-----------|-------|-----|------|-------|-------|------|----|
| 反復(R) | 0.08 | 1 | 0.08 | 1.33 | 4.152 | 7.51 | |
| 試験機関(B) | 4.96 | 3 | 1.65 | 27.56 | 2.904 | 4.47 | |
| R × B(e1) | 0.84 | 3 | 0.28 | 4.67 | 2.904 | 4.47 | ** |
| 試験片(A) | 4.69 | 1 | 4.69 | 78.17 | 4.152 | 7.51 | ** |
| B × A | 0.42 | 3 | 0.14 | 2.33 | 2.904 | 4.47 | |
| R × A | 0.03 | 1 | 0.03 | 0.50 | 4.152 | 7.51 | |
| R × B × A | 0.10 | 3 | 0.03 | 0.56 | 2.904 | 4.47 | |
| 誤差(e2) | 1.92 | 32 | 0.06 | | | | |
| 合計 | 12.96 | 47 | | | | | |

二次誤差(e2)で試験片(A)、(B×A)、(R×A)、(R×B×A)、一次誤差(e1:R×B)を検定した結果、一次誤差(R×B)が有意差ありとなった。したがって反復(R)と試験機関(B)は一次誤差(R×B)で検定した。また、有意差のない(R×A)及び(R×B×A)は二次誤差(e2)にプールした。これらを分散分析表(その2)にまとめた。

表13 4試験機関にもとづく分散分析表(その2)

| 変動要因 | 偏差平方和 | 自由度 | 不偏分散 | 分散比 | 5%棄却 | 1%棄却 | |
|----------|-------|-----|----------|-------|-------|------|----|
| 反復(R) | 0.08 | 1 | 0.08 | 0.29 | 10.1 | 34.1 | |
| 試験機関(B) | 4.96 | 3 | 1.65 | 5.98 | 9.28 | 29.5 | |
| e1(R×B) | 0.83 | 3 | 0.28 | | | | |
| 試験片(A) | 4.69 | 1 | 4.69 | 85.71 | 4.116 | 7.41 | ** |
| B×A | 0.42 | 3 | 0.14 | 2.56 | 2.871 | 4.39 | |
| (A×R)+ | - | - | - | | | | |
| (R×B×A)+ | - | - | - | | | | |
| 誤差(e2) | 1.97 | 36 | 0.054722 | | | | |
| 合計 | 38.41 | 47 | | | | | |

反復(R)及び試験機関(B)はともに有意な差は認められなかった。

分散の期待値は、一次誤差 e1: $e1^2$ 、試験機関(B): $e1^2+12 B^2$ であるから

$$e1 = 0.28 = 0.526、B = (1.65 - 0.28) / 12 = 0.3379$$

合成標準不確かさ(UC)は、試験機関(B)と一次誤差(e1)の分散成分を考慮し(繰返し3)で、

$$UC = (B^2 + e1^2/3) = (0.338^2 + 0.28/3) = 0.4555$$

拡張不確かさ [t(47,0.05)=2.01] は、 $0.4555 \times 2.01 = 0.92$ となった。

5.5 まとめ

9月5日製造のAgアクリル系コーティングフィルムについて、2回(10月及び11月実施)の反復試験を行なった。2回の試験結果から、350ppmの試験片では1.8~2.0、450ppmでは2.3~2.7の抗菌活性値を示した。

Zスコアによる判定で疑義ありとされた試験機関を除いた4試験機関の試験結果に基づいて分散分析を行なったところ、反復にも試験機関にも有意差がない結果となった。このことは、今回の試験では、安定した試験片を用いることにより試験機関間に整合性のある結果が得られたといえる。

4試験機関が反復試験を行なったときのバラツキをもとに算出した拡張不確かさ(=試験方法の不確かさ)[k=2]は、0.92であった。

本機生産で製造した当該ロット品は、標準試験片として十分有用であると評価できた。

6. 調査研究の3年間のまとめ

6.1 調査研究の経過

平成13年度の調査研究(初年度)は、抗菌性試験における不確かさに影響を及ぼす要因の洗い出し(特性要因図の作成)を行ない、試験菌株、培地、培養容器の3項目を抽出した。また、不確かさの推定に使用する標準試験片として要求される要件の洗い出しと試作品の作製を行なった。

試作したAgアクリル系コーティングフィルムについて、抗菌剤添加濃度及び抗菌効果の安定性について検討を加えた。Agアクリル系コーティングフィルムは課題はあるものの標準試験片としての有用性が示唆された。

文献調査では、日本臨床化学会(JSCC)における酵素活性測定用標準物質の認証や実際の臨床測定への関連付けのスキームについて調査し、トレーサビリティの確保について抗菌分野においても同ようなスキームの構築が可能かどうか検討することになった。

平成14年度は、(二次)標準試験片として有望なAgアクリル系コーティングフィルムの完成に向けて引き続き検討を行なった。同時に、より精度の高い(一次)標準試験片の作製/選定を行なった。

(一次)標準試験片としては、イオン注入法によりAg⁺を石英ガラスに注入した試験片、半導体基板として使用されているGaAsウェハを選定した。については試作品を作成し、については市販品を入手しそれぞれ抗菌性試験を実施し評価した。

Ag+イオン注入ガラスについては、イオン注入処理における技術的問題及び製作コストの面から現段階では標準試験片とするのは困難と判断した。一方、GaAsウェハについては、Ga及びAsの溶出により繰り返し使用が出来ないことが判明したものの、1回目の抗菌性試験では抗菌活性値2~3の値を示した。1回限りの使用という条件はつくが、物理化学的スペックが明確になっていること、電子工業部品として量産されており、日常的に入手可能な物質であることから(一次)標準試験片として有望であることが示唆された。GaAsウェハについては次年度試験機関を増やして検討することとした。

Agアクリル系コーティングフィルムの評価については、1回目の抗菌性試験において試験片が菌液により膨潤して広がる(4cm×4cm以上の面積に菌液が広がる)ことが観察されたため、試験法を一部変更し倒置法(試験片とカバーフィルムを上下逆にする)により試験を実施することにした。

塗工液の銀量の均一性については、Ag量を測定し均一であることを確認した。しかし、フィルムの乾燥条件により塗工膜中に残留するアンモニア量の変動し、これが抗菌活性値に影響を及ぼしていると推定された。したがって、抗菌活性値の安定した標準試験片を作製するには加熱乾燥工程をより厳密に制御できること、及びそのための管理項目として残留アンモニアの量をスペックとして反映させることが重要であることが明らかとなった。

文献調査については、欧米の細菌を用いた抗菌/静菌に関する試験方法に規定されている試験条件(試験菌株、培養温度、培養時間)について調査した。また、微生物分野の試験における不確かさの推定に関する文献調査も実施した。

平成15年度は、標準試験片として絞り込んだGaAsウェハ及びAgアクリル系コーティングフィルムの2試験片を用いて抗菌性試験における不確かさの推定のための5試験機関による繰り返し試験を実施した。その結果の詳細は本報告書中4章及び5章に記載したとおりである。

これらの試験結果にもとづいて「不確かさ」を推定した。また、これらの標準試験片は抗菌性試験における「合意標準」として測定のトレーサビリティの確立に寄与できるものであると考えている。

本報告書に示した不確かさの推定の手順により、抗菌性試験における不確かさの推定の一事例を示すことができたと考えている。ただし、これには均一で安定な標準試験片の存在があつてこそなし得たものである。なお、本年度は文献調査は実施しなかった。

6.2 まとめ

6.2.1 標準試験片の選定・作製

これまでの調査研究の結果から最終的に選定・作製した標準試験片は次の2試験片である。

GaAsウェハー

砒化ガリウム99.9%以上(金属砒素として51.8%)の板状固体であり、物理化学的に均一な結晶構造を持つ化合物単結晶である。純度が極めて高い物質にもかかわらず、半導体分野で高度な品質管理のもとで大量・安定的に生産され、市場に供給されているので入手が比較的容易であり、標準試験片としての必要条件を備えている。

Agアクリル系コーティングフィルム(Agフィルム)

3年にわたる調査研究の中で試作を繰返し、製造条件を詰めていき、バラツキの少ない安定した抗菌活性を示す試験片の開発を行なったが極めて困難な作業であった。

本年度は本機生産の導入により、製造条件の安定化をはかり、残存アンモニア量を工程パラメータとするなどして、バラツキの少ない安定したAgフィルムの作製に挑んだ。その結果、現行JIS Z 2801ならびにJNLAの技能試験に対応可能な標準試験片の作製に成功した。

6.2.2 トレーサビリティの確立

抗菌活性値については厳密に言えば測定値のSI単位へのトレーサビリティは存在しないといえる。しかし、標準試験片の仕様において抗菌活性値に直接影響を及ぼす物質(量)又は(物理化学的)特性を確定し、この量(GaAsウェハーの純度やAgフィルムのAg量)を把握することによってSI単位へのトレーサビリティの確保と関連付けた。

一方でISO/IEC 17025では、SI単位へのトレーサビリティが当てはまらない場合には「合意標準」へのトレーサビリティが要求されている。

ISO GUIDE 35によれば、標準物質(reference material)は、測定装置の校正、測定方法の評価又は材料(materials)に値を付与するために1つ以上の特性地が十分に均一で、適切に確定されている材料又は物質と定義されている。また、認証標準物質(certified reference material)は、認証書の付いた標準物質で、ひとつ以上の特性値が、その特性値を表す単位を正確なトレーサビリティが確立された手順によって認証され、各認証値にはある表記された信頼水準での不確かさが付いているもの、と定義されている。

本調査研究において選定、評価した標準試験片は、上記のような厳密な意味での標準物質に該当するものではない。しかし、「合意標準」へのトレーサビリティを確立するという点からは、これらの標準試験片が関係者による「合意標準」としての評価を受けることができれば、目的を達成できるものと考えている。

試験機関は、このような標準試料片について試験をすることにより(又はこのような標準試験片を用いた技能試験に参加することによって)、「合意標準」へのトレーサビリティを表明できることになる。

6.2.3 不確かさの推定

GaAsウェハー及びAgアクリル系コーティングフィルムについて、5試験機関で実施した抗菌性試験の結果をもとに抗菌活性値(平均値)とその不確かさを推定した。不確かさの推定の結果は、本報告書4章(GaAsウェハー)及び5章(Agフィルム)及び[添付資料4]の表4及び表7に示した。

また、試験機関においてコントロールサンプルを用いて繰返し試験を実施し、これらの測定値から不確かさを算出する場合の見積り事例として、添付資料11に「コントロールサンプルを用いた抗菌性試験の不確かさの見積り事例」を示した。

本報告書中に示した算出例は、JNLAの試験における測定の不確かさの適用に関する方針(2003年4月1日)の「カテゴリー 定量試験B」 十分な数のコントロールサンプル(laboratory control samples)を用いる方法 を適用して不確かさを推定した。

ここではBタイプの評価は行わずに、標準試験片を用いた繰返し試験の結果に基づくAタイプの評価のみを利用した推定である。(測定に影響を及ぼす主要な要因はすべて試験操作の中に含まれて評価され则认为。))

本報告書では、標準試料片を用いた繰返し試験を実施したが、例えばインハウスの試験所(抗菌製品製造メーカーの試験所)などでは自社製品で抗菌活性値が適切(2~4)で均一で安定な製品(試験片)があれば、これを繰返し試験することにより不確かさの推定を行うこともできる。

6.2.4 標準試験片の有用性

抗菌性試験のようなempirical method における「トレーサビリティの確立」と「測定の不確かさの推定」のためには、一定の反応を安定的に示す標準試験片の存在が極めて有用であることが確認できた。

このような標準試験片が安価で容易に入手することができれば、それぞれの試験機関において繰返し試験を行なうことにより、自らが行なっている抗菌性試験における不確かさの推定が可能になる。さらには、日常的な試験の場面で管理試料(control sample)として使用することも可能であり、試験の品質の保証という点からも貢献するものと考えられる。

さらに、各国で現在使用されている類似の試験法の国際間比較においても、あるいは国際規格を制定する際の試験法の検討という場面においてもこのような標準試験片の存在意義は極めて大きいといえる。このような関係を概念図で示すと図-1及び図-2のようになる。

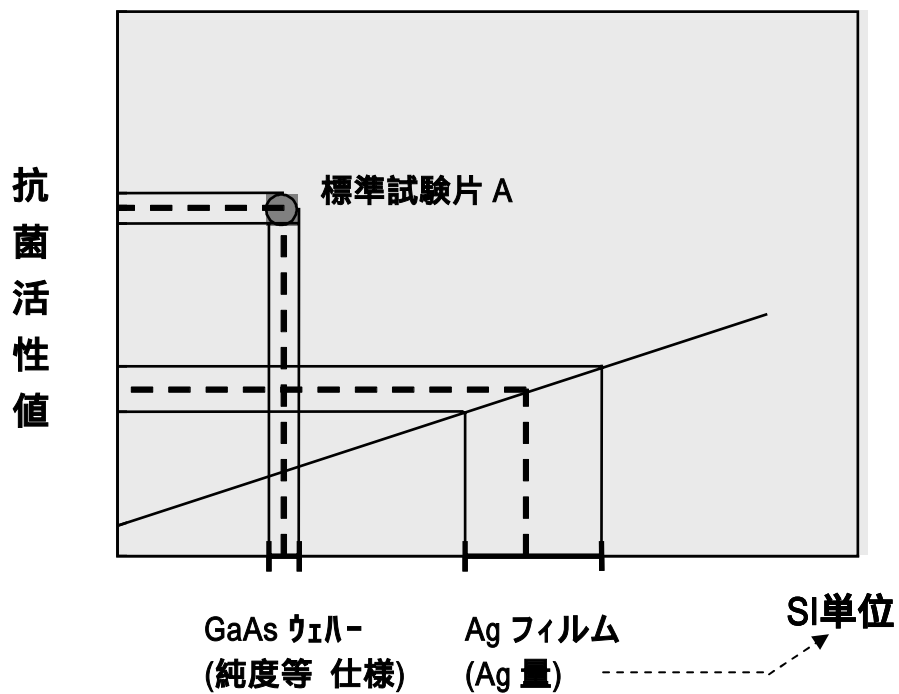


図 2 標準試験片 A と標準試験片 B の関係
 (平成 14 年度報告書を一部改変)

7. 課題

7.1 GaAsウェハー

GaAsウェハーの抗菌活性の作用機作については、不明な点が多い。洗い出し液の分析においてGa及びAsの溶出が認められたが、それぞれがどの程度どのように試験菌に対して抗菌作用を及ぼしているのか不明である。また、光照射による(活性酸素の発生が)抗菌作用を増強することも確認された。

本調査研究では、試験機関間のバラツキが認められたがこの原因については不明である。

ウェハー自体は、物理化学的にきわめて均一であり、製品間のバラツキも少ない物質と考えられるので、この試験機関で偏りの出る結果となったことについては、抗菌の作用機作の究明及び抗菌性試験方法の見直しを含めて、より詳細な検討が必要である。

7.2 Agアクリル系コーティングフィルム

Agフィルムについては、加熱乾燥条件が抗菌活性に大きな影響を及ぼすため、ロット間で抗菌活性値の変動が生じるのはある程度やむを得ないことと考えられるが、ISOを視野に入れた国際的にも通用する(海外にも供給可能な)標準試験片の完成という点ではなお課題が残っている。現時点では、生産ロットごとに5水準程度の複数条件で作製したものを適切な性能評価で選別し、標準試験片として使用可能なもの(抗菌活性値)を確定することが必要であると考えている。

また、製品化に当たっては、Ag濃度、残アンモニア濃度など標準試験片の品質スペックを明確化することも必須であると考えている。

比較的安価に日常の試験においても使用可能な試験片であるので、入手(利用)を希望する試験機関に対して、広く有効に利用可能となるような供給体制を確立することも必要である。

以上のように、Agフィルムの現状を考えると、供給体制の確立に当たってはメーカーの検査に加えて、例えば抗菌製品技術協議会のような団体がさらに抗菌活性値の確認を実施するなどの品質確認を行い、供給する体制が望ましいと考えている。

また、製造した標準試験片の使用有効期間をできるだけ長くする保管(保存)条件の検討も必要である。

以 上

[添付資料1]

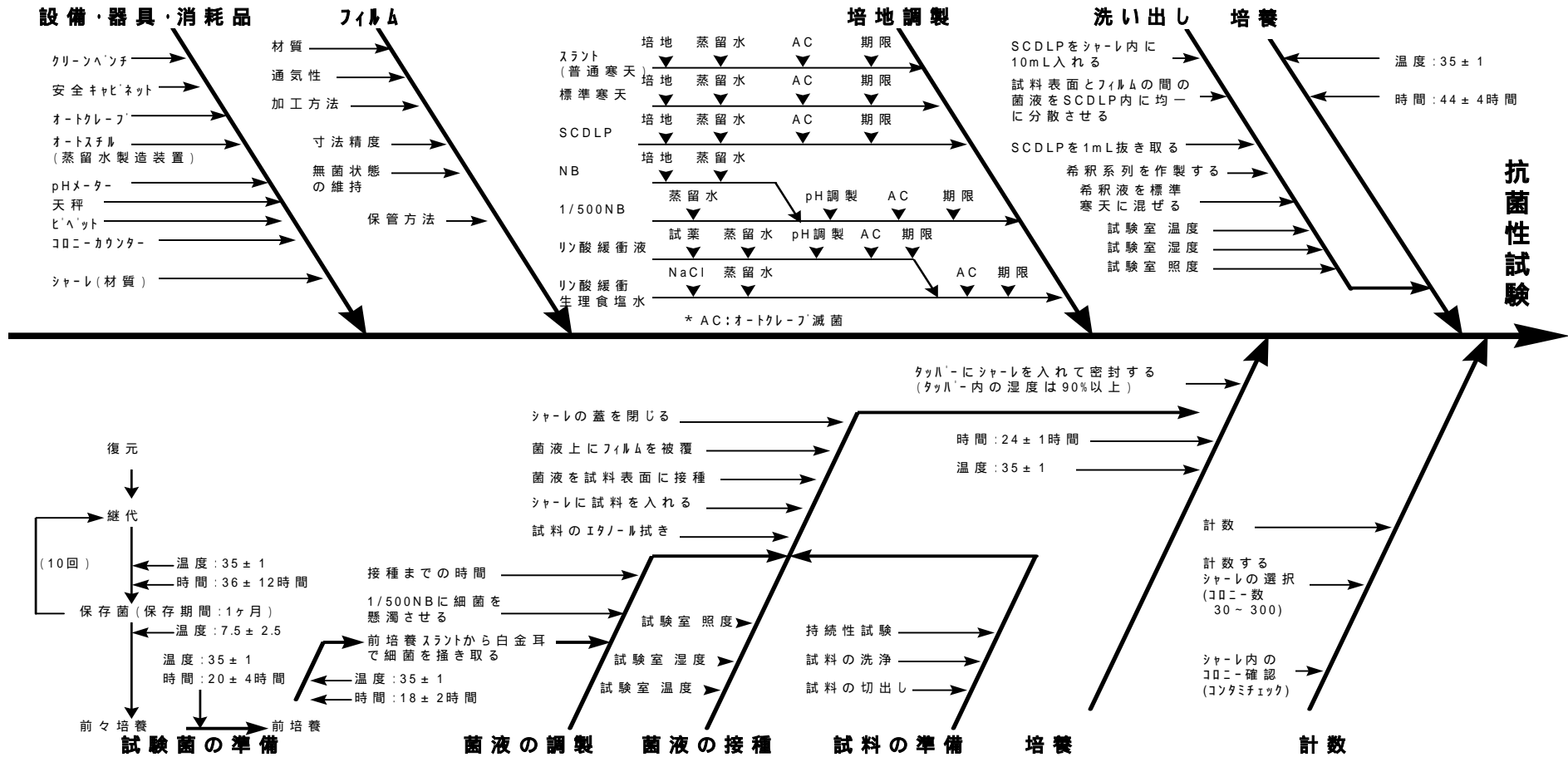


図1 抗菌性試験の特性要因図(平成13年度報告書より)

[添付資料2]

実施計画・委員会開催日程

表1 実施日程

| 区分 \ 月 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 |
|---------------------------------------|---|---|---|---|---|----|----|----|---|---|---|
| GaAsウェル-の選定 | | | → | | | | | | | | |
| GaAs ウェル- の抗菌性試験 | | | | → | | | | | | → | |
| Agアクリル系コーティングフィルム ¹ の作製 | → | | | | | | | | → | | |
| Agアクリル系コーティングフィルム ¹ の抗菌性試験 | | | | → | | | | | → | | |
| 抗菌性試験の不確かさを推定する方法の策定 | | | | | | → | | | → | | |
| 報告書の作成 | | | | | | | | | → | | → |

表2 委員会開催日程

| 区分 \ 月 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 1 | 2 | 3 |
|--------|---|---|-----|---|-----|-----|----|-----|---|-----|---|
| 本委員会 | | | 第1回 | | | 第2回 | | | | 第3回 | |
| 分科会 | | | 第1回 | | 第2回 | 第3回 | | 第4回 | | 第5回 | |

[添付資料 3]

調査研究委員会委員及び同分科会委員名簿

1. 本委員会

| | 氏名 | 所属 |
|------------|--------|---|
| 委員長 | 高麗 寛紀 | 徳島大学 学長補佐、工学部 生物工学科 教授 |
| 委員 | 松岡 英明 | 東京農工大学 工学部 生命工学科 教授 |
| 同上 | 高津 章子 | (独)産業技術総合研究所 計測標準研究部門 無機分析科 環境標準研究室長 |
| 同上 | 岩本 威生 | (社)日本化学工業協会 技術部 部長 |
| 同上 | 今井 茂雄 | (株)I N A X 基盤技術研究所 資源循環研究室長 |
| 同上 | 杉本 茂 | (財)日本食品分析センター 品質システム室 部長 |
| 同上 | 卜部 勝資 | 繊維製品新機能評価協議会 |
| 同上 | 和田 邦身 | (財)日本化学繊維検査協会 大阪事業所 生物試験センター センター長 |
| 同上 | 佐野 浩一 | 経済産業省 産業技術環境局 認証課 課長補佐 |
| 同上 | 菅原 昭栄 | (独)製品評価技術基盤機構 認定センター 認定業務課 参事官 |
| オブザーバ ー | 今井 秀孝 | (独)製品評価技術基盤機構 認定センター 技術顧問 |
| 同上 | 祖父江 良蔵 | (独)製品評価技術基盤機構 認定センター 認定企画課 主査 |
| 同上 | 川合 晶子 | (独)製品評価技術基盤機構 認定センター 認定企画課 主任 |
| 事務局 | 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 |

2. 分科会

| | 氏名 | 所属 |
|------------|--------|---|
| 主査 | 杉本 茂 | 1. に表記 |
| 委員 | 今井 茂雄 | 同上 |
| 同上 | 和田 邦身 | 同上 |
| 同上 | 鴻巣 正幸 | 三愛石油(株) 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 | 八尾 秀樹 | 住友電気工業(株) 半導体事業部 技術部 主席 |
| 同上 | 早田 英司 | カネボウ化成(株) 化成品開発チーム マネージャー |
| 同上 | 大橋 茂夫 | 石塚硝子(株) アドバンスガラスカンパニー R & Dセンター 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 |
| 同上 | 祖父江 良蔵 | (独) 製品評価技術基盤機構 認定センター 認定企画課 主査 |
| オブザーバ ー | 川合 晶子 | (独) 製品評価技術基盤機構 認定センター 認定企画課 主任 |
| 事務局 | 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 |

[添付資料4]

GaAsウェハー抗菌性試験(試験片A, B, C) 試験結果表 1

試験機関: A (9/3接種)

[1] 共通菌株(黄色ブドウ球菌 NBRC12732)

| サンプル | No | 希釈倍数 | カウント | 生菌数(cfu/試料) | 平均生菌数 | 抗菌活性値 | 抗菌活性値(平均) |
|--|----|------|------|-------------|--------|-------|-----------|
| 接種直後対照区 (フィルムプランク) | 1 | 3 | 34 | 3.4E+5 | 3.2E+5 | | |
| | 2 | 3 | 31 | 3.1E+5 | | | |
| | 3 | 3 | 32 | 3.2E+5 | | | |
| 接種24hr対照区 (フィルムプランク) 共通容器 | 1 | 3 | 60 | 6.0E+5 | 4.9E+5 | | |
| | 2 | 3 | 38 | 3.8E+5 | | | |
| | 3 | 3 | 49 | 4.9E+5 | | | |
| GaAsウェハー- No.1(A) (ジャスト品:再洗浄あり) 共通容器 | 1 | 2 | 236 | 2.4E+5 | 2.3E+5 | 0.32 | 0.33 |
| | 2 | 2 | 218 | 2.2E+5 | | 0.35 | |
| | 3 | 2 | 234 | 2.3E+5 | | 0.32 | |
| GaAsウェハー- No.2(B) (ジャスト品:再洗浄なし) 共通容器 | 1 | 2 | 235 | 2.4E+5 | 2.1E+5 | 0.32 | 0.36 |
| | 2 | 2 | 203 | 2.0E+5 | | 0.38 | |
| | 3 | 2 | 202 | 2.0E+5 | | 0.38 | |
| GaAsウェハー- No.3(C) (2° オフ品) 共通容器 | 1 | 2 | 233 | 2.3E+5 | 2.7E+5 | 0.32 | 0.26 |
| | 2 | 2 | 261 | 2.6E+5 | | 0.27 | |
| | 3 | 3 | 32 | 3.2E+5 | | 0.19 | |

試験機関: B (9/4接種)

[1] 共通菌株(黄色ブドウ球菌 NBRC12732)

| サンプル | No | 希釈倍数 | カウント | 生菌数(cfu/試料) | 平均生菌数 | 抗菌活性値 | 抗菌活性値(平均) |
|--|----|------|-------|-------------|--------|-------|-----------|
| 接種直後対照区 (フィルムプランク) | 1 | 2 | 190 | 1.9E+5 | 2.1E+5 | | |
| | 2 | 2 | 217.5 | 2.2E+5 | | | |
| | 3 | 2 | 229.5 | 2.3E+5 | | | |
| 接種24hr対照区 (フィルムプランク) 共通容器 | 1 | 3 | 291.5 | 2.9E+6 | 2.7E+6 | | |
| | 2 | 3 | 284 | 2.8E+6 | | | |
| | 3 | 3 | 233.5 | 2.3E+6 | | | |
| GaAsウェハー- No.1(A) (ジャスト品:再洗浄あり) 共通容器 | 1 | 2 | 115.5 | 1.2E+5 | 1.4E+5 | 1.37 | 1.30 |
| | 2 | 2 | 109 | 1.1E+5 | | 1.39 | |
| | 3 | 2 | 181 | 1.8E+5 | | 1.17 | |
| GaAsウェハー- No.2(B) (ジャスト品:再洗浄なし) 共通容器 | 1 | 2 | 93 | 9.3E+4 | 9.5E+4 | 1.46 | 1.45 |
| | 2 | 2 | 104.5 | 1.0E+5 | | 1.41 | |
| | 3 | 2 | 87.5 | 8.8E+4 | | 1.49 | |
| GaAsウェハー- No.3(C) (2° オフ品) 共通容器 | 1 | 2 | 180 | 1.8E+5 | 1.5E+5 | 1.18 | 1.27 |
| | 2 | 2 | 132 | 1.3E+5 | | 1.31 | |
| | 3 | 2 | 125 | 1.3E+5 | | 1.33 | |

試験機関: C (9/10接種)

[1] 共通菌株(黄色ブドウ球菌 NBRC12732)

| サンプル | No | 希釈倍数 | カウント | 生菌数(cfu/試料) | 平均生菌数 | 抗菌活性値 | 抗菌活性値(平均) |
|--|----|------|------|-------------|--------|-------|-----------|
| 接種直後対照区 (フィルムプランク) | 1 | 2 | 205 | 2.1E+5 | 2.1E+5 | | |
| | 2 | 2 | 222 | 2.2E+5 | | | |
| | 3 | 2 | 198 | 2.0E+5 | | | |
| 接種24hr対照区 (フィルムプランク) 共通容器 | 1 | 3 | 95 | 9.5E+5 | 8.4E+5 | | |
| | 2 | 3 | 74 | 7.4E+5 | | | |
| | 3 | 3 | 84 | 8.4E+5 | | | |
| GaAsウェハー- No.1(A) (ジャスト品:再洗浄あり) 共通容器 | 1 | 1 | 76 | 7.6E+3 | 8.9E+3 | 2.05 | 1.98 |
| | 2 | 1 | 134 | 1.3E+4 | | 1.80 | |
| | 3 | 1 | 56 | 5.6E+3 | | 2.18 | |
| GaAsウェハー- No.2(B) (ジャスト品:再洗浄なし) 共通容器 | 1 | 1 | 86 | 8.6E+3 | 1.7E+4 | 1.99 | 1.70 |
| | 2 | 1 | 198 | 2.0E+4 | | 1.63 | |
| | 3 | 1 | 223 | 2.2E+4 | | 1.58 | |
| GaAsウェハー- No.3(C) (2° オフ品) 共通容器 | 1 | 1 | 61 | 6.1E+3 | 8.3E+3 | 2.14 | 2.01 |
| | 2 | 1 | 72 | 7.2E+3 | | 2.07 | |
| | 3 | 1 | 117 | 1.2E+4 | | 1.86 | |

この調査研究は、独立行政法人 製品評価技術基盤機構からの受託
で実施したものの成果である。