

独立行政法人 製品評価技術基盤機構委託

試験事業者認定事業関係業務に係る調査研究

(抗菌試験用コントロールサンプルの開発調査研究)

委託業務成果報告書(平成17年度)

平成 18 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. コントロールサンプル作製方法の調査、選定	3
3. 1 コントロールサンプルの品質目標	3
3. 2 生体高分子を用いた基材	3
3. 3 樹脂、ガラス、及び金属系材料	3
4. 生体高分子を用いたコントロールサンプル作製の検討	5
4. 1 目的	5
4. 2 コレステロール結合タンパク質の改良と評価およびコレステロール結合性タンパク質の無毒化と効率的な大量分取法の確立	5
4. 2. 1 <i>hlyA</i> フラグメントの作製	5
4. 2. 2 ベクターの作製	5
4. 2. 3 組み換え <i>pro-VCH</i> の発現	5
4. 2. 4 変異 <i>hlyA</i> フラグメントの調製	5
4. 2. 5 変異 <i>hlyA</i> 遺伝子産物の発現	6
4. 2. 6 組み換え <i>VCH</i> の精製	6
4. 2. 7 組み換え <i>VCH</i> のコレステロール結合活性	6
4. 2. 8 結果および考察	6
4. 3 バイオ基板の作製方法の検討	7
4. 3. 1 コレステロールと結合性のある基板の選択	7
4. 3. 2 シリコンウエハーバイオ基板の作製法	8
4. 4 コレステロール結合性タンパク質と結合性のある抗菌剤の探索	9
4. 5 抗菌剤が結合したバイオ基板の抗菌性評価	9
4. 5. 1 PVDF-バイオ基板の抗菌性評価	9
4. 5. 2 シリコンウエハーバイオ基板の抗菌性評価	9
4. 6 バイオ基板の表面分析	13
4. 6. 1 バイオ基板に結合した成分の生化学的評価	13
4. 6. 2 バイオ基板表面の接触角の測定	13
4. 6. 3 ESCA による PVDF 膜の表面分析	13
4. 6. 4 電子顕微鏡による PVDF とシリコンウエハーバイオ基板の超微細構造分析	14
4. 6. 5 原子間力顕微鏡によるシリコンウエハーバイオ基板の超微視的観察	15
4. 6. 6 シンクロトロン放射 X 線によるバイオ基板表面の X 線吸収微細構造 (XAFS) 分析	15
4. 7 まとめ	19
5. コントロールサンプルの作製検討 (無機系抗菌剤練り込み樹脂プレート)	22
5. 1 目的	22
5. 2 試験用プレートの作製	23

5. 2. 1	使用した銀系無機抗菌剤	23
5. 2. 2	マスターバッチ作製	23
5. 2. 3	抗菌剤含有樹脂プレート作製	23
5. 3	サンドペーパーによる表面研磨の検討	24
5. 3. 1	目的	24
5. 3. 2	実験1(手研磨)	24
5. 3. 3	結果と考察1	24
5. 3. 4	実験2(機械研磨)	27
5. 3. 5	結果と考察1	27
5. 4	サンドブラストによる表面研磨の検討	28
5. 4. 1	目的	28
5. 4. 2	実験1(再現性確認)	28
5. 4. 3	結果と考察1	28
5. 4. 4	実験2(最適条件検討)	30
5. 4. 5	結果と考察2	30
5. 4. 6	実験3(添加量検討)	37
5. 4. 7	結果と考察3	38
5. 4. 8	実験4(添加量検討2)	39
5. 4. 9	結果と考察4	39
5. 4. 10	実験5(後処理条件検討)	40
5. 4. 11	結果と考察5	41
5. 5	表面切削の検討	42
5. 5. 1	目的	42
5. 5. 2	実験1(添加量検討)	42
5. 5. 3	結果と考察1	42
5. 5. 4	実験2(再試験)	42
5. 5. 5	結果と考察2	42
5. 5. 6	実験3(後処理条件検討)	42
5. 5. 7	結果と考察3	43
5. 6	表面研磨の検討	45
5. 6. 1	目的	45
5. 6. 2	実験1	45
5. 6. 3	結果と考察1	45
5. 6. 4	実験2	45
5. 6. 5	結果と考察2	46
5. 7	研磨剤打ち込み検討	47
5. 7. 1	目的	47
5. 7. 2	実験	47

5. 7. 3	結果と考察	47
5. 8	レーザー加工検討	49
5. 8. 1	目的	49
5. 8. 2	実験	49
5. 8. 3	結果と考察	49
5. 9	表面エンボス加工の検討	56
5. 9. 1	目的	56
5. 9. 2	実験	56
5. 9. 3	結果と考察	56
5. 10	シンクロトロン放射 X 線による銀の分析(XAFS)	57
5. 10. 1	目的	57
5. 10. 2	実験	57
5. 10. 3	結果と考察	57
5. 11	まとめ	59
6.	調査研究のまとめ	61
6. 1	バイオ基板	61
6. 2	無機系抗菌剤練り込みプレート(表面研磨)	61
7.	今後の課題	63
7. 1	バイオ基板	63
7. 2	無機系抗菌剤練り込みプレート(表面研磨)	63
	(添付資料)	64
1.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会名簿	65
2.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会ワーキンググループ名簿	66
3.	本調査研究の実施計画及び研究体制	67
4.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会議事録	70
5.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員ワーキンググループ議事録	82
6.	調査研究の実施能力	90

1. まえがき

近年の我が国における抗菌加工製品市場の急激な拡大に対応し、健全な市場形成と消費者保護の観点から、平成12年12月にJIS Z 2801（抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果）が制定された。また、同時に当該JISに基づき抗菌効果を認定するための認定試験事業者（JNLA試験所）が立ち上がるなど、国内における抗菌加工製品の適正な市場形成に向けた環境整備が着実に進んできている。

工業標準化法に基づくJNLA制度での抗菌分野においては、均質で安定した技能試験品目は、測定の不確かさの推定に用いるコントロールサンプルとしても有効に利用でき、早急な開発が望まれるものである。

また、これらを活用することで、今後のMRA（国際的な相互認証）の環境整備や、国際間での抗菌分野における各種研究活動の重要な評価ツール提供による我が国のイニシアチブ確保に繋がることへの期待がもたれる。

現在、我が国が提案している抗菌性試験方法における国際標準（ISO）化作業が順調に進んでおり、平成18年3月時点で国際規格案（DIS）として提案されている。このISOが制定された暁にはコントロールサンプルのニーズは欧米圏を中心に大きくなるものと予想される。

平成16年6月10日、独立行政法人製品評価技術基盤機構において『試験事業者認定事業開発業務に係る調査研究業務』として、抗菌試験に用いる試験品目及び不確かさの推定に用いるコントロールサンプルの研究開発事業の公募が実施され、抗菌製品技術協議会がそれに応募し、審査の結果、調査研究の実施能力等も踏まえたうえで本事業委託先選定団体として選定された。

第1回委員会が平成16年7月14日に開催され、本事業には高度な研究開発が伴うことから実務を強力に推進する組織としてワーキンググループ（WG）が設置された。平成16年度においては本委員会が4回、WGが3回、また平成17年度においては本委員会が4回、WGが4回開催され、それぞれ精力的な討議と調査研究開発がおこなわれ所定の成果をおさめることができた。

特に、本調査研究のバイオ基板の表面分析においては、平成17年度先端大型研究施設戦略活用プログラムに選定され、大型放射光施設（Spring-8）を活用しての大きな成果を得ることができた。

これら2カ年にわたる調査研究成果は、ひとえに委員長をはじめとして委員メンバー全員の真摯な努力と、世界に先駆けた開発テーマに対する崇高なチャレンジ精神の賜物であるといえる。

本報告書は、2年間を調査研究期間とする本委託事業の2年度目である平成17年度の活動内容とその成果を最終報告としてまとめたものである。

2. 調査研究の目的

工業標準化法に基づく J N L A 制度の抗菌分野において、均質で安定した技能試験品目は、測定の不確かさの推定に用いるコントロールサンプルとしても利用でき、開発が望まれるものである。平成 1 3 年度より、委託調査として開発に取り組み、平成 1 5 年度にはプラスチック (PET) フィルムに水溶性銀系抗菌剤を塗工した試験片を、供給可能な体制で開発することができた。この試験品目の開発は、認定制度の運用に大きく寄与するものであったが、フィルムに塗布した抗菌剤を菌液中 (水溶液) にリリースさせるという性質上、溶解性能の制御等製造過程での調整が難しく、抗菌効果に十分な安定性がないという問題点がある。またこの試験品目をを用いる場合、J I S 試験方法の手順通りに試験を実施できない。

本調査研究では、製造過程が容易であり、より安価で安定した試験品目を開発することを目的とする。この調査の成果により、認定機関のみならず広く試験事業所でも入手できる試験品目の供給体制を目指す。

本調査研究においては以下の内容を平成 1 6 年度と平成 1 7 年度の 2 ヶ年間で実施する。

- 1) 安定した抗菌活性値をもち、J I S 試験方法に規定された方法で使用できる試験品目 (コントロールサンプル) を開発する。
- 2) 抗菌性のメカニズムを明確にし、データをもとに安定性を確認する。
- 3) 上記試験品目の製造技術及び供給体制を確立する。

3. コントロールサンプル作製方法の調査、選定

3. 1 コントロールサンプルの品質目標

本検討に用いるコントロールサンプルは、安定した抗菌活性値を持ち、JIS Z 2801 に規定された方法で使用できることが必要である。よって品質目標を下記のように設定した。

- ①JIS Z 2801 に規定された方法で評価できること。
- ②大腸菌、及び黄色ぶどう球菌に対する抗菌活性値が、ともにおよそ2.0～3.0であること。
- ③繰り返し誤差の標準偏差がおよそ0.5以下であること。
- ④有効期限が6ヶ月以上であること。
- ⑤適正な価格で工業的生産が可能であること。

3. 2 生体高分子を用いた基材

支持基材上にコレステロール分子層を一層ならべ、そこにコレステロール結合タンパク質を結合させる技術を、すなわち、プロテインアンカーを用いたナノ分子の基板固定化技術を、鈴鹿工業高等専門学校生物応用化学科、生貝 初教授が開発中である。このステロール結合タンパク質に抗菌活性を有する物質を定量的に結合させることが出来れば、基材上の抗菌活性値をナノレベルで制御することが可能と考えられるため、本基材(以下、バイオ基板という)をコントロールサンプルの候補材料として検討することとした。概念を図1に示した。

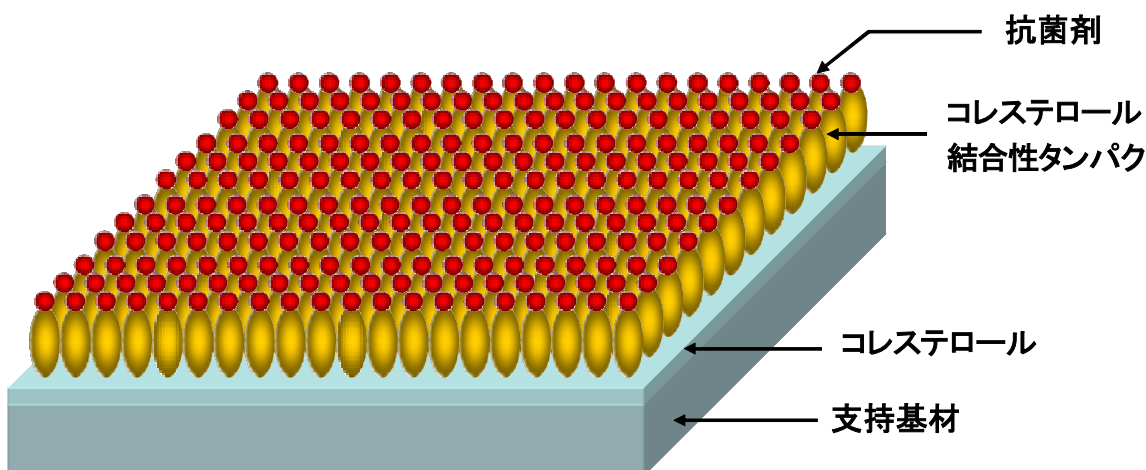


図1 生体高分子を用いた基材の概念図

3. 3 樹脂、ガラス、及び金属系材料

コントロールサンプル開発委員会、及びワーキンググループにおいてアイデア出しを行ない、可能性があると判断したものについて調査を行なった(結果は、中間成果報告書(H16年度分)第3章参照)。

そのうち①市販工学ガラス、及び②樹脂練込みプレート(表面研磨)について具体的検討を実施することとした。なお、前者については、「高価であるため繰り返し使用が必要となるが、繰り返し試験による再現性が得られなかったため、コントロールサンプルとして適さない。」と、平成16年度の調査研究により判断できたため、平成17年度は実施しなかった。

以上より、平成17年度の検討課題は下記の二つである。

表2 平成17年度に検討を行なうコントロールサンプル

分類	検討課題
バイオ基板	①プロテインアンカーを用いたナノ分子の基板固定化技術の検討
バイオ基板以外	②銀系無機抗菌剤練り込み樹脂(表面研磨)の検討

4. 生体高分子を用いたコントロールサンプル作製の検討

4.1 目的

量産可能な生体高分子を用いたコントロールサンプル(バイオ基板)を作製するために、() コレステロール結合タンパク質の改良と評価およびコレステロール結合性タンパク質の無毒化と効率的な大量分取法の確立、() バイオ基板の作製方法の検討、() コレステロール結合性タンパク質と結合性のある抗菌剤の探索、() 抗菌剤が結合したバイオ基板の抗菌性評価、() バイオ基板の表面分析について調査研究を行った。

4.2 コレステロール結合タンパク質の改良と評価およびコレステロール結合性タンパク質の無毒化と効率的な大量分取法の確立

ここでは、コレステロール結合タンパク質、すなわちコレラ菌が産生するコレラ菌溶血毒(以下 VCH)を毒性のないコレステロール結合タンパク質に改良し大量分取する方法を確立することを目的に研究を行った。その結果、毒性がなくコレステロール結合活性を持つ VCH を遺伝子組み換えによって作製し、大量に分取する方法を平成 16 年度に確立することができた。なお、これについての詳細な結果は中間報告を参照していただきたい。

平成 17 年度は、コレステロールと pro-VCH との結合状態を明らかにするために必要なデータとなる VCH のコレステロール結合領域を明らかにしたので以下報告する。

4.2.1. hlyA フラグメントの作製

Vibrio cholerae O1 N86 株のゲノム DNA を鋳型にして pro-VCH をコードする *hlyA* DNA フラグメント(約 2.2kb)を大量に作製した。

4.2.2 ベクターの作製

作製した pro-VCH-*hlyA* DNA フラグメントを、T7 プロモーターと poly His タグを持つ発現プラスミドベクター (pET-15b)に挿入した。

4.2.3 組み換え pro-VCH の発現

pro-VCH を発現する大腸菌をアンピシリン添加 LB 培地で培養し、途中 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside(IPTG)で組み換え VCH の発現を誘導した。

4.2.4 変異 *hlyA* フラグメントの調製

V. cholerae O1 N86 株のゲノム DNA と岡山県立大学の山本耕一郎教授より分与された 7 つの点突然変異 VCH((E156A, C157A, C157F, T158A, F159W, W163A, G170W)を鋳型として、enterokinase で切断できるように設計したプライマー-VCH-mature-EK-F (5'-TTT TTT GTC GAC ATG ACG ACG ACG ACA 銀 A AC 銀 CG AAA CAA ATA CCT TGC-3')とプライマー-VCH- mature-R-Myc Thr(5'-TTT TTT GGA TCC TAC TCG AGG

TCT TCT TCG GAA ATC AAC TTC TGT TCG CTG CCG CGC GGC ACC AGG GTA CCG TTC AAA TCA AAT TGA ACC CC-3')を組み合わせて、各点突然変異 VCH をコードする変異 *hly A* フラグメントを PCR によって大量増幅した。変異 *hlyA* フラグメント内の配列[GGATCC]と[GTCGAC]部分を制限酵素 *BamH* と *Sal* を用いて完全に消化後、変異 *hly A* フラグメント断片の回収を行った。

4.2.5 変異 *hlyA* 遺伝子産物の発現

ベクター-pET-15b 内の配列[CATATG]と[CTCGAG]を制限酵素 *Nde* と *Xho* を用いて完全に消化したベクター-DNA を調製し、変異 *hly A* フラグメント断片と連結した。このプラスミドを発現系大腸菌 *Rosetta.DE3* 株へ導入した形質転換株(7 株)をアンピシリン添加 LB 培地にそれぞれ培養し、途中 IPTG で組み換え VCH の発現を誘導した。

4.2.6 組み換え VCH の精製

各組み換え VCH を発現した大腸菌を集菌し、超音波処理で得られた上清に TALON コバルトビーズを加え、poly His タグを持つ組み換え VCH をコバルトビーズに吸着させた。イミダゾールを含む緩衝液でコバルトビーズから組み換え pro-VCH を遊離させて回収した。

4.2.7 組み換え VCH のコレステロール結合活性

96-Well Filtration Plate(ミリポア)のフィルターへ 100 mM コレステロールを 5 μ l (500 nmols)添加した。次に組み換え VCH(71nmols)、抗ウサギ VCH ポリクローナル抗体、ペルオキダーゼ結合抗ヤギウサギポリクローナル抗体を順に反応させた。二次抗体検出のために、*N,N'*-Bis(2-hydroxy-3-sulfopropyl) tolidine を加えた後、2M 硫酸によって発色させ、溶液の吸光度(450nm)を測定した。

4.2.8 結果および考察

本実験では pro-VCH の pro 領域の後に EK 切断部位を挿入した pro-VCH を用いた。EK 切断部位が挿入されていない pro-VCH と EK 挿入 pro-VCH のコレステロール結合活性を比較したがほぼ同じ値を示した。コレステロール結合領域と推定した領域に点変異を持つ pro-VCH を 7 つ VCH (E156A, C157A, C157F, T158A, F159W, W163A, G170W) を作製した。N 末端側に近いアミノ酸領域(156ECTF159)を置換した変異 pro-VCH のコレステロール結合活性を測定したところ、この活性が減少する傾向がみられた(図 1)。一方、C 末側 163 番目のトリプトファンや予想しているコレステロール結合領域から外れた 170 番目のグリシンの置換ではコレステロール結合活性に変化はみられなかった。置換したアミノ酸の中で、E156A と C157F の変異 VCH の活性の減少の割合がもっとも大きく、有意差も認められた。

アミノ酸配列 ECTFNNSWLWKN の疎水度は親水性の方へ傾いているので、この領

域は、膜には埋まっているが表面近くに位置するコレステロールの一部分と結合している可能性が考えられる。VCHがコレステロールのA環3位に存在するOHとB環の5位と6位の間にある2重結合を認識することを我々は既に明らかにしている。コレステロールが脂質2重層に埋め込まれた時、これらは膜表面近くに位置することが知られているので、アミノ酸配列ECTFNNSWLWKNと結合する可能性は高くなると考えられる。さらに極性アミノ酸である156番目のグリシンや157番目のシステインを疎水性アミノ酸であるアラニンに置換するとコレステロール結合活性が低下した原因は、膜表面近傍に位置するコレステロールA環3位のOHを中心とした部位との相互作用が減少するためと考えると合理的な説明ができる。また、フェニルアラニンの疎水度はシステインとほぼ同じで疎水度が低いことから、C157Fの置換によるコレステロール結合活性の減少の原因を疎水度の違いによって説明することは難しい。むしろフェニルアラニンの側鎖であるフェニル基がシステインの側鎖であるSHよりも構造が大きく結合時の立体障害が出やすくなることがコレステロール結合活性減少の原因となっているかもしれない。

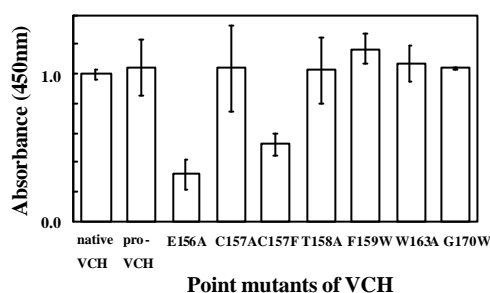


図1. 点突然変異 VCH のコレステロール結合活性

4.3 バイオ基板の作製方法の検討

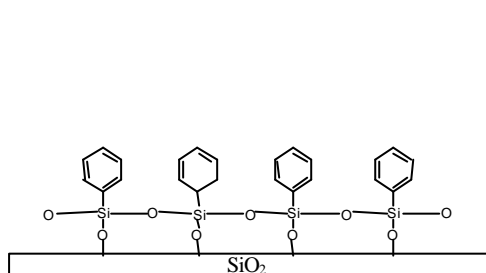
4.3.1 コレステロールと結合性のある基板の選択

平成16年度はコレステロールと結合性のある基板として多孔性 polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜(日本ミリポア)を使用しバイオ基板を作製した。PVDF膜の表面を光学顕微鏡で観察すると、一方が smooth 面でもう一方が rough 面であることが分かった。それぞれの面へコレステロール, pro-VCH, 抗菌剤(銀)を順に結合させて抗菌活性評価と表面分析を行ったところ、両面ともほぼ同一の抗菌活性があり表面の元素にも違いが認められなかった。したがって、PVDF膜は抗菌活性をもつバイオ基板の支持基板として使用できる可能性が見いだされた。なお、詳細については中間報告を参照していただきたい。

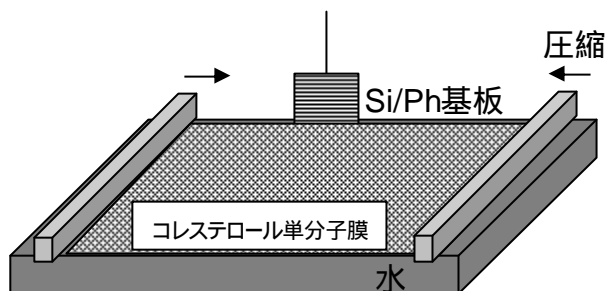
平成17年度はPVDF膜だけでなく表面がフラットなシリコンウエハも併せて支持基板になるかどうかを検討した。シリコンウエハとコレステロールとの間の物理的な吸着力を増大させるために、前処理としてシリコンウエハ表面上にフェニルトリクロロシラン(PhTCS)の自己組織化単分子膜を形成させた。

4.3.2 シリコンウエハ - バイオ基板の作製法

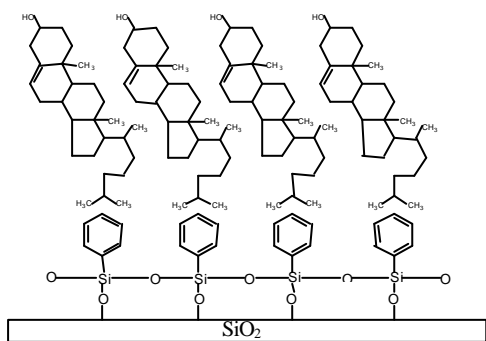
シリコンウエハ (5 x 5cm) を PhTCS 溶液に 2 時間浸漬後, エタノールとトルエンで洗浄し, PhTCS 自己組織化単分子膜をシリコンウエハ表面に結合させた (図 2A)。水面上で形成させたコレステロール単分子膜の疎水鎖 (大気相側) が, 基板の PhTCS 処理面 (疎水性) へ向くよう移行させ (図 2B), PhTCS 単分子膜の上にコレステロール単分子膜を吸着させた (図 2C)。次にこのシリコンウエハを 10ml のリン酸緩衝液に浸漬し, 500mM の pro-VCH (987.5 μ l) を緩衝液中に添加して室温で 1 hr 静かに攪拌した。リン酸緩衝液および逆浸透水で振とう洗浄 (それぞれ, 10ml \times 2 回 (3 分/1 回と 10ml \times 1 回 (3 分/1 回)) 後, 直ちに 10ml の銀イオン溶液に基板を浸漬し, ローテーターで攪拌しながら 24 時間放置した。滅菌逆浸透水で十分に洗浄し未結合成分を除去した。シリコンウエハをデシケーターの中に入れ, 真空ポンプで 30 分間吸引後, 24 時間放置して乾燥させた (図 2D)。



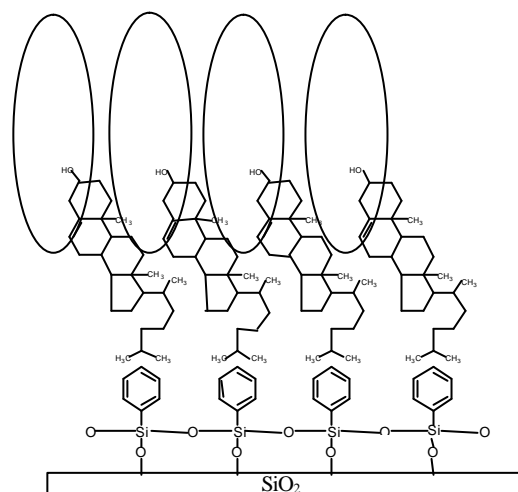
A PhTCS を基板上に自己組織化させたシリコンウエハ



B コレステロール単分子膜の PhTCS 基板への移行



C 自己組織化 PhTCS 膜にコレステロール単分子膜を吸着させた基板



D コレステロール単分子膜に結合した pro-VCH とバイオ基板の分子レベルで予想される構築モデル

図 2 シリコンウエハ - バイオ基板の作製法と支持基板上でのバイオ分子の結合

4.4 コレステロール結合性タンパク質と結合性のある抗菌剤の探索

有機系抗菌剤を抗菌剤に使用することを検討したが、pro-VCH に対する構造変化を引き起こすことが考えられたため、荷電した金属イオンを pro-VCH に結合させる方法を採用した。金属イオンとして銀イオンを使用した。銀イオンの供給法として銀電極の電気分解を試した。この電気分解した銀イオン水溶液を用いて抗菌活性が約 3 を示す PVDF - バイオ基板（後述）や抗菌活性が約 2~5 を示すシリコンウエハ製バイオ基板が作製できたが、溶液中の銀イオン濃度の測定が非常に難しいことや一定濃度のイオン溶液が作製できないことが最大の問題となった。この電気分解銀イオン水溶液の代わりに硝酸銀溶液を用いてバイオ基板を作製し、抗菌活性を評価したところ約 6 の抗菌活性値が認められた。また、バイオ基板に吸着させる金属イオンとして銀イオン以外に Ni イオンも抗菌剤として使用できることが分かった。

4.5 抗菌剤が結合したバイオ基板の抗菌性評価

4.5.1 PVDF - バイオ基板の抗菌性評価

100nM コレステロール (10mL), 500nM 79-kDa pro-VCH (10mL) を PVDF 膜 (5 x 5cm) に順に浸して結合させた後、銀イオン溶液の中に基板を浸して PVDF - バイオ基板を作製した。使用した銀イオン溶液は、350mA, 2 分間の銀の電気分解によって得られたイオン溶液を 5 μ m と 0.2 μ m のフィルターでろ過し、さらに滅菌水で 5 倍希釈したものである。4.3.1 で述べたように表裏構造の異なる PVDF 膜の smooth 面と rough 面それぞれにコレステロール, pro-VCH, 銀を積層して作製した 2 種類のバイオ基板で抗菌活性を評価したところ、smooth 面で 2.9, rough 面で 2.8 の抗菌活性値が得られた。この結果は、PVDF の表面構造の違いによって抗菌活性は影響を受けないことが分かった。また、コレステロール単分子膜を PVDF 膜に移行させた後、pro-VCH と銀イオンを順に結合させた PVDF - バイオ基板の抗菌活性も評価したところ、2.4 の抗菌活性値が得られたので、PVDF 膜へコレステロールの吸着させる方法は浸漬法と単分子膜法のどちらを用いても差し支えないことが分かった。一方、PVDF 膜そのもの、ならびにコレステロールのみを結合させた PVDF 膜を銀イオン溶液に浸漬して作製した基板は抗菌活性が認められなかった。したがって、PVDF 膜やコレステロールに対して銀は結合しないかあるいは結合しにくいと考えられた。これらの結果から、銀を抗菌剤として用いたバイオ基板に抗菌力を与えるためには、コレステロール, pro-VCH, 銀が順に PVDF 膜上に結合し、3 層構造を形成していることが必要であると考えられた。また、この積層構造において銀吸着に必要な成分は pro-VCH であることも明らかになった。なお、PVDF - バイオ基板の抗菌性評価に関する詳細な結果は中間報告を参照していただきたい。

4.5.2 シリコンウエハ - バイオ基板の抗菌性評価

4.3.2 で述べたシリコンウエハ - バイオ基板の抗菌性を評価した。抗菌評価は、JIS Z 2801 : 2000 に準拠した。供試菌は大腸菌 NBRC3972 株を用いた。抗菌剤である銀は硝酸

銀水溶液を用いてバイオ基板に担持した。

シリコンウエハに PhTCS, コレステロール, pro-VCH を順に結合させた基板を $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $100\mu\text{M}$, $1,000\mu\text{M}$ の硝酸銀水溶液に 25°C で 24 時間浸とう放置してシリコンウエハ - バイオ基板を作製した。コントロール基板として () 未処理シリコンウエハ, () PhTCS 自己組織化膜とコレステロール単分子膜を積層したシリコンウエハ, () PhTCS 自己組織化膜, コレステロール単分子膜, pro-VCH を積層した基板を 3 種類使用した。 $1\mu\text{M}$ と $10\mu\text{M}$ の硝酸銀水溶液で処理したバイオ基板は硝酸銀非存在下で作製したコントロール基板とほぼ同数の大腸菌が 24 時間培養後の基板表面から回収された (図 3)。 $100\mu\text{M}$ の硝酸銀水溶液でシリコンバイオ基板を処理すると, PhTCS 自己組織化膜, コレステロール単分子膜, pro-VCH が結合したコントロール基板の菌数はほとんど同じで抗菌活性は認められなかったが, 硝酸銀水溶液で処理したバイオ基板は抗菌活性値が 6.29 という強い活性を示した。さらに $1,000\mu\text{M}$ の硝酸銀水溶液で基板を処理すると 未処理シリコンウエハ, PhTCS - コレステロール処理シリコンウエハ および PhTCS - コレステロール - pro-VCH シリコンウエハ基板のすべてが 6.47 の抗菌活性値を示した。硝酸銀水溶液で処理したシリコンウエハ基板においても抗菌作用が認められるということは, シリコンウエハ本体へ銀が吸着していると考えられた。しかしながら, 硝酸銀とシリコンウエハの化学的結合かあるいは物理的な吸着が起きているのかどうかを本研究では明らかにすることができなかった。また, PhTCS - コレステロールおよび PhTCS - コレステロール - pro-VCH を積層した基板においても, シリコンウエハに直接結合しているのかあるいは表面に結合した成分に結合しているのかどうかを明らかにすることができなかった。

また, 塩化銀飽和水溶液を抗菌剤に用いたバイオ基板を作製し, その抗菌活性を評価した。難溶性塩化銀の水に対する溶解度は 20°C で 1.55ppm である。モル数にして $10.8\mu\text{M}$ であるので, $10\mu\text{M}$ の硝酸銀水溶液を用いて作製したバイオ基板で抗菌活性がなかったことから考えると, 塩化銀飽和水溶液で処理したバイオ基板が抗菌活性を示すことは期待できなかった。しかしながら, 飽和塩化銀水溶液の pH は中性付近にあり, pro-VCH タンパク質の構造や活性に及ぼす影響が少ないと考えられたので, 塩化銀飽和水溶液を抗菌剤として使用した。 2g の塩化銀粉末を 200mL の逆浸透水へ入れ, 22°C で 24 時間攪拌したものを塩化銀飽和水溶液として使用した。

硝酸銀水溶液で作製したバイオ基板と同様に () 未処理シリコンウエハ, () PhTCS とコレステロールを積層したシリコンウエハ, () PhTCS, コレステロール, pro-VCH を順に積層したシリコンウエハ, を塩化銀飽和水溶液に 25°C で 24 時間浸とう放置してシリコンウエハ - バイオ基板を作製した。また, バイオ基板に吸着した銀が, 洗浄によってどの程度失われるのか調べるために, 洗浄を 1 回 (弱く洗浄) と 3 回 (強く洗浄) 行った基板も作製した。

塩化銀飽和水溶液で処理したバイオ基板の抗菌活性の結果を図 4 に示した。硝酸銀水溶液で処理したバイオ基板と同様に未処理シリコンウエハは抗菌活性が認められなかった。

しかしながら，PhTCS - コレステロールを積層した基板は，洗浄が弱いと 3.86 の抗菌活性値が認められた。強く洗浄すると，0.89 という低い抗菌活性値を示した。一方，PhTCS - コレステロール - pro-VCH を積層した基板は，洗浄の強弱にかかわらずバイオ基板の抗菌活性値はそれぞれ 1.21 と 1.28 を示したので，銀イオンはコレステロール単分子膜に吸着しやすい性質があることが示唆された。しかしながら，pro-VCH をコレステロールに結合させることによって銀イオンのコレステロールへの吸着を低減できることが分かった。

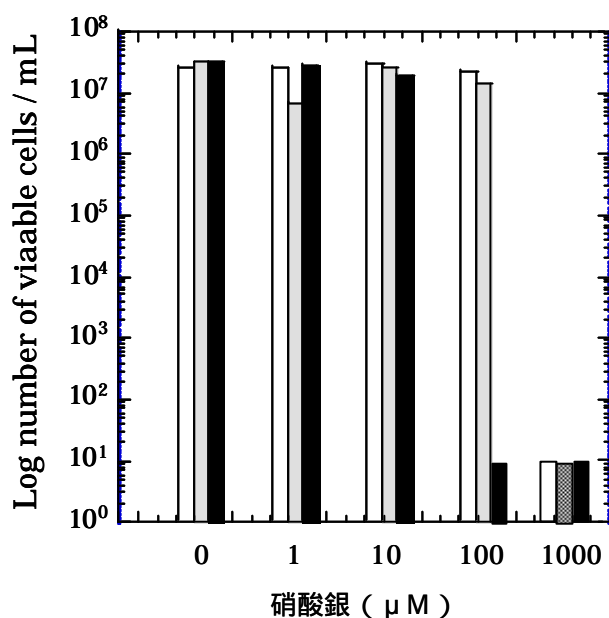


図3 硝酸銀水溶液を用いて銀イオンを吸着させたシリコンウエハ - バイオ基板の抗菌力。大腸菌を基板に 24 時間接触させた後，コロニー法によって菌数を算出した。バー：□，未処理シリコンウエハ；■，PhTCS，コレステロールを結合させたシリコンウエハ；▨，PhTCS，コレステロール，pro-VCH，銀を結合させたシリコンウエハ。各バイオ基板はすべて硝酸銀水溶液で最後に浸漬した。

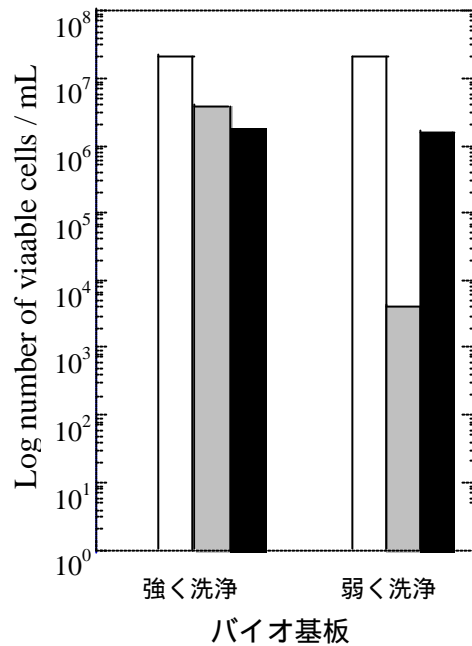


図 4 塩化銀飽和水溶液を用いて銀イオンを吸着させたシリコンウエハ - バイオ基板の抗菌力

大腸菌を基板に 24 時間接触させた後、コロニー法によって菌数を算出した。バー：○，未処理シリコンウエハ；■，PhTCS とコレステロールを結合させたシリコンウエハ；□，PhTCS，コレステロール，pro-VCH を結合させたシリコンウエハ。未処理シリコンウエハ以外の各バイオ基板はすべて飽和塩化銀水溶液で最後に浸漬した。強く洗うは、基板を塩化銀飽和水溶液に浸漬した後、200mL の逆浸透水で 5 分、3 回洗浄したものをいう。また、弱く洗うは、基板を塩化銀飽和水溶液に浸漬した後、200mL の逆浸透水で 5 分、1 回洗浄したものをいう。

4.6 バイオ基板の表面分析

4.6.1 バイオ基板に結合した成分の生化学的評価

PVDF膜を100nMのコレステロール溶液に浸して乾燥させた基板上にコレステロールが存在することがイミュノプロット法を用いて確認された。また、pro-VCHはコレステロールの濃度に依存して増加していくことも分かった。また、pro-VCHは、PVDF膜に直接結合せず、コレステロールが結合したPVDF膜にのみ結合することが分かった。この結果はpro-VCHがコレステロールを介してPVDF膜に結合していることを証明する間接的な証拠である。なお、PVDFを用いたバイオ基板の表面分析に関する詳細な結果は中間報告を参照していただきたい。

4.6.2 バイオ基板表面の接触角の測定

シリコンウエハ基板上に積層した成分が結合しているかどうかを確認するために、接触角の測定を行った(表1)。シリコンウエハにPhTCSを自己組織化させた基板は、PhTCSが疎水の性質を持ったために接触角が大きくなった。この基板にコレステロール単分子膜を吸着させた基板でも接触角はPhTCS基板と同程度の値を示した。次にpro-VCHを積層すると基板の接触角が小さくなった。これはpro-VCHがコレステロールの上に結合し基板最表面が親水性になったためであると考えられた。さらに銀イオン溶液で処理した基板は、pro-VCHよりも接触角がわずかに大きくなった。これは基板表面全体が銀で覆われたことによるものか、あるいは銀の結合によってタンパク質の高次構造が変化したことによるものであると考えられたが、その詳細については明らかにすることはできなかった。

表1 バイオ基板表面の接触角

バイオ基板作製段階のシリコンウエハ	接触角/度			
	1点目	2点目	3点目	平均
PhTCS	88.17	94.53	85.05	89.25
PhTCS - コレステロール	88.71	84.48	84.12	85.77
PhTCS - コレステロール - pro-VCH	65.24	66.07	67.15	66.15
PhTCS - コレステロール - pro-VCH - 銀	69.42	71.26	-	70.34

4.6.3 ESCAによるPVDF-バイオ基板の表面分析

ESCAによる分析は、銀ならびにコレステロールやタンパク質に由来する元素を検出するために行った。銀のメインピークである3d5/2と3d3/2は、それぞれ368eVと374eVにあるが、これらの2つのエネルギーピークは抗菌活性を有するPVDF-バイオ基板の分析を行っても確認できなかった。ESCAによって元素分析が可能な深度は基板表面から約

10nm までといわれているので、銀が 10nm よりさらに深いところあるいは PVDF 孔の内側に存在していれば測定は不可能であると考えられた。

さらに、pro-VCH が結合した PVDF - バイオ基板上から炭素、窒素、酸素の存在を示唆するスペクトルが観察された。炭素はコレステロールの構成元素でもあるが、コレステロールのみが結合した基板から同様のスペクトルが観察されなかったため、タンパク質由来の元素の存在を示唆するスペクトルと考えられた。また、pro-VCH 溶液に浸した PVDF 膜を ESCA によって分析したが、酸素、窒素、炭素のピークが観測されなかったため、pro-VCH が PVDF 膜に非特異的に吸着しないことを示す間接的な証拠と考えられる。なお、ESCA による PVDF - バイオ基板の表面分析に関する詳細な結果は中間報告を参照していただきたい。

4.6.4 電子顕微鏡による PVDF とシリコンウエハ - バイオ基板の超微細構造分析

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて PVDF 膜の表面分析を行った結果、タンパク質と思われる多数の構造体が観察された。しかしながら、電子顕微鏡像から pro-VCH であることを示す証明を得ることはできなかった。また、コレステロールや銀の存在を示す結果も SEM によって得られなかった。

次に、シリコンウエハ - バイオ基板の表面構造を SEM で観察したところ、基板表面に対して垂直方向に林立している無数のひも状の構造体を画像として捉えることができた (図 5A)。コントロールであるシリコンウエハや PhTCS - コレステロール単分子膜が結合した

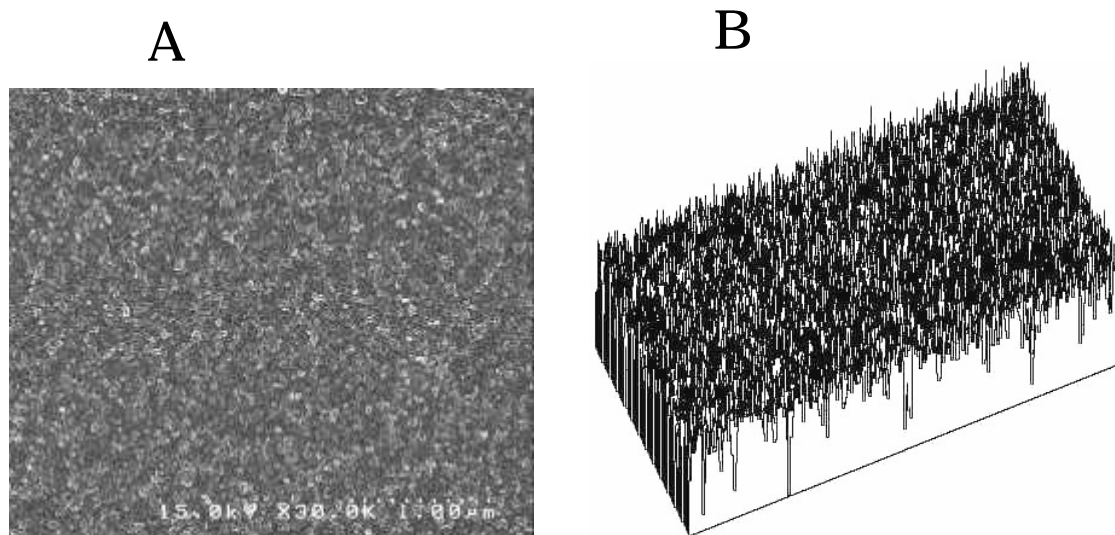


図 5 SEM による PhTCS - コレステロール - pro-VCH - 銀バイオ基板の表面構造の観察 A, PhTCS - コレステロール単分子膜をシリコンウエハ (5x5cm) に結合後、電気分解により作製した銀イオン水溶液を 5 倍希釈した溶液 10mL に 24 時間浸漬し 3 回逆浸透水で洗浄した基板を SEM で観察した。倍率、30,000 倍。B, NIH イメージで A の画像を 3 次元解析した立体図。

シリコウエ八ではこの構造体が観察されなかった。したがって、ひも状の構造体は pro-VCH である可能性が非常に高いと考えられる。この画像表面を NIH イメージで 3 次元解析すると、ひも状の構造体が基板表面に対し、垂直に林立していることが確認できた (図 5B)。

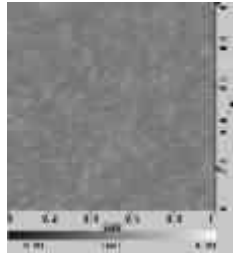
4.6.5 原子間力顕微鏡によるシリコウエ八 - バイオ基板の超微視的観察

原子間力顕微鏡 (AFM) を用いてシリコウエ八 - バイオ基板の表面構造を観察した。図 6A から C までのシリコウエ八の表面構造がフラットであるのに対し、図 6D と E は粒子構造が観察された。この粒子は SEM 像で観察されたひも状の構造体と同じ pro-VCH であると推測された。表面の粗さを示す Ra 値 (z 軸方向の長さ) は A から D までほぼ同じ数値を示した。シリコウエ八のみの Ra 値がもっとも小さく、凹凸が少ないことを示している。また、pro-VCH が基板表面に結合しているにもかかわらず、Ra 値に変化がみられないのは pro-VCH が同じ方向を向いてほぼ同じ高さで密に集合していることを示唆している。しかしながら、電気分解銀イオン水溶液で処理すると、表面構造が変化し Ra 値の増大がみられた。これは銀イオンによって pro-VCH の構造に影響を与えていると考えられる。また、NIH イメージを用いた 3 次元構造解析の結果も、PhTCS - コレステロールを積層したシリコウエ八表面の方が pro-VCH が結合している基板 (図 6G) よりもフラットであることを示している (図 6F)。

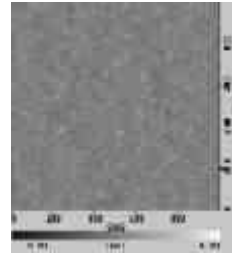
4.6.6 シンクロトロン放射 X 線によるバイオ基板表面の X 線吸収微細構造 (XAFS) 分析

SPring-8 の BL39XU のシンクロトロン放射 X 線を用いてバイオ基板の銀-K 吸収端の蛍光 XAFS スペクトルを測定した。XAFS は、XANES (X-ray absorption near edge structure: X 線吸収端近傍構造) と EXAFS (Extended X-ray absorption fine structure: 広域 X 線吸収微細構造) に X 線エネルギーによって分けることができる。XANES は吸収端近傍に現れる微細構造のことで、X 線吸収による別準位への (原子内部) 電子遷移によって制限される構造である。この分析によって電子状態 (価数、近接原子種、化学種の組成など) に関する情報が得られる。一方、EXAFS は吸収端から数十 eV 以上の振動構造のことを指し、X 線吸収により飛び出した光電子の干渉によって現れる。この分析によって目的原子の周りの局所構造 (原子間距離、配位数、モデル構造など) に関する情報が得られる。

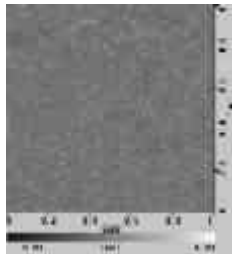
XAFS の測定条件は以下のとおりである。照射 X 線スリット幅: 0.04 mm (H) × 0.2 mm (W); 入射角: 0.1 mrad (=0.0057°, 全反射条件); 検出器: 16 素子 SSD 蛍光 X 線法 (薄膜試料, 水溶液試料), 透過法 (銀箔); 吸収端: 銀-K 吸収端。コントロール試料として、銀 foil (銀薄膜), 1 mM 硝酸銀水溶液を用いた。PhTCS - コレステロール - pro-VCH を積層したシリコウエ八を電気分解銀イオン水溶液に浸漬して作製したバイオ基板の XAFS を分析した。



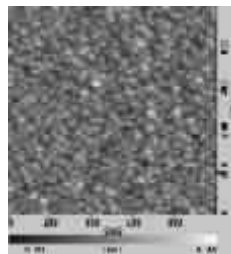
A シリコンウエハ
Ra :0.100±0.009nm



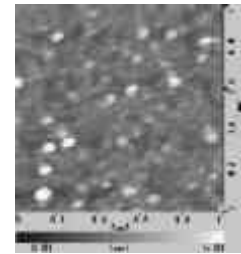
B PhTCS を結合させたシリコンウエハ
Ra :0.140±0.004nm



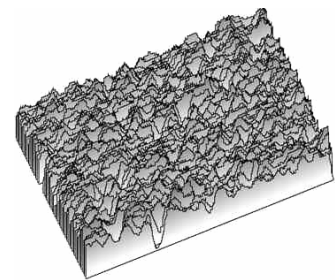
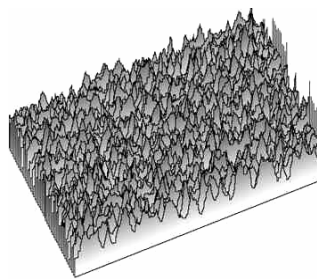
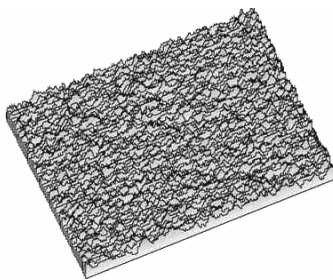
C PhTCS - コレステロールを結合させたシリコンウエハ
Ra :0.149±0.019nm



D PhTCS - コレステロール - pro-VCH を結合させたシリコンウエハ
Ra :0.149±0.019nm



E PhTCS - コレステロール - pro-VCH 銀を結合させたシリコンウエハ
Ra :0.326±0.019nm



G D の PhTCS - コレステロール - pro-VCH を結合させたシリコンウエハ表面の3次元解析

図 6 AFM によるシリコンウエハの表面構造の観察

図7は電気分解銀イオン水溶液の濃度を変えて作製した3種類のバイオ基板表面のXAFS分析によって得られた吸光度プロットである。銀イオン水溶液の濃度が増加すると、吸光度のジャンプ量が増大することが分かった。このジャンプ量は基板表面の銀存在量に比例すると考えられるので、銀イオン水溶液由来の銀が基板表面へ結合していることが推測できた。さらにXANESの規格化強度プロットを行った(図8)。銀が結合したバイオ基板と銀 foil のスペクトルは同じ形であったが、硝酸銀水溶液の波形は異なっていた。この結果はバイオ基板上に結合している銀が金属の状態で存在していることを示唆している。

さらにXANESのスペクトルをフーリエ変換した(図9)。コントロールである銀 foil のスペクトルの2.8の位置に現れているピークは銀-銀間距離、そして硝酸銀水溶液のスペクトルの1.9のピークは銀と水と水の酸素との距離をそれぞれ反映していると考えられた。5.11mg/mLと0.51mg/mLの銀イオン水溶液に浸漬したバイオ基板のスペクトルは、銀-銀間距離に相当する位置にピークが現れているので、銀イオンが還元され Ag^0 として基板上に存在していると考えられる。一方、0.05mg/mLの銀イオン水溶液に浸漬したバイオ基板のスペクトルは、 Ag^0 と Ag^+ が基板上に存在することを示唆している。したがって、基板上に存在する銀は基板を浸漬する銀イオン水溶液の濃度に依存して Ag^+ ないし Ag^0 に変化することが推測できた。また、塩化銀飽和水溶液を用いたバイオ基板についてもXAFS分析を行い、銀K-edge XANESスペクトルをフーリエ変換した(図10)。塩化銀飽和水溶液を用いると、銀が結合した基板を洗浄する強弱(回数)にかかわらず、基板上には Ag^0 と Ag^+ が共存して存在することが推測された。

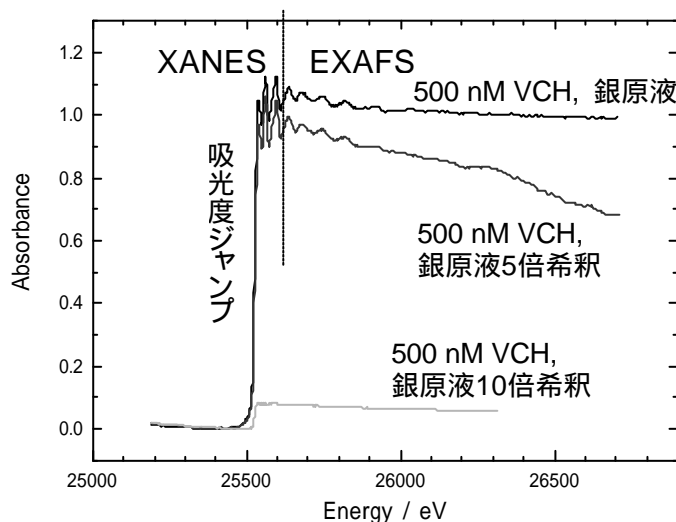


図7 PhTCS - コレステロール - pro-VCH - 銀を積層したシリコンウエハのXAFS分析
500nMのpro-VCH水溶液にPhTCS - コレステロール積層基板を浸漬後、3濃度の電気分解銀イオン水溶液(原液, 5.11mg/mL; 原液を5倍希釈, 0.51mg/mL; 原液を10倍希釈, 0.05mg/mL)にさらに浸漬して、基板表面に銀を結合させた。

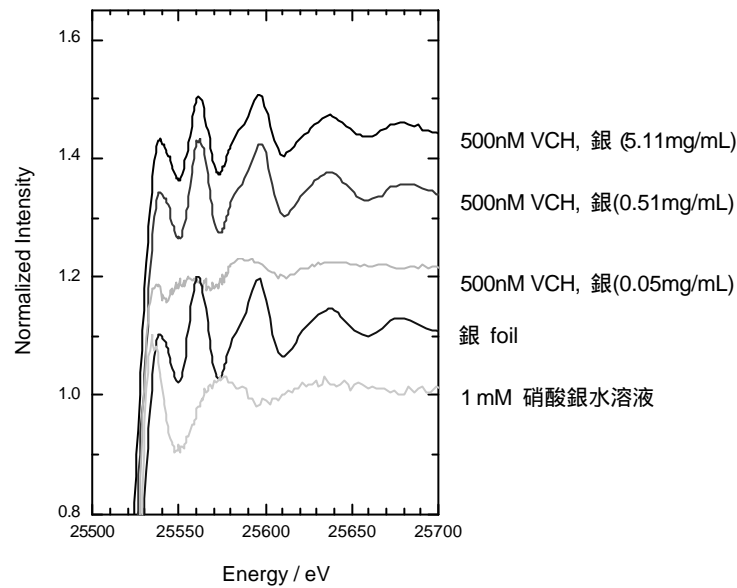


図 8 規格化強度プロットを行ったバイオ基板の XANES 解析
 金属銀と銀イオンのコントロールとして銀 foil と硝酸銀水溶液のデータも併せて図示した。

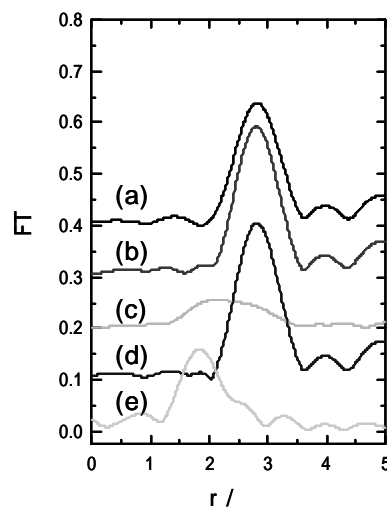


図 9 バイオ基板の銀 K - edge XANES フーリエ変換
 (a)500nM pro-VCH ,5.11mg/mL 銀イオン水溶液 (b)500nM pro-VCH ,0.51mg/mL 銀イオン水溶液 ,(c) 500nM pro-VCH ,0.51mg/mL 銀イオン水溶液 ,(d)銀 foil ,(e) 1mM 硝酸銀水溶液

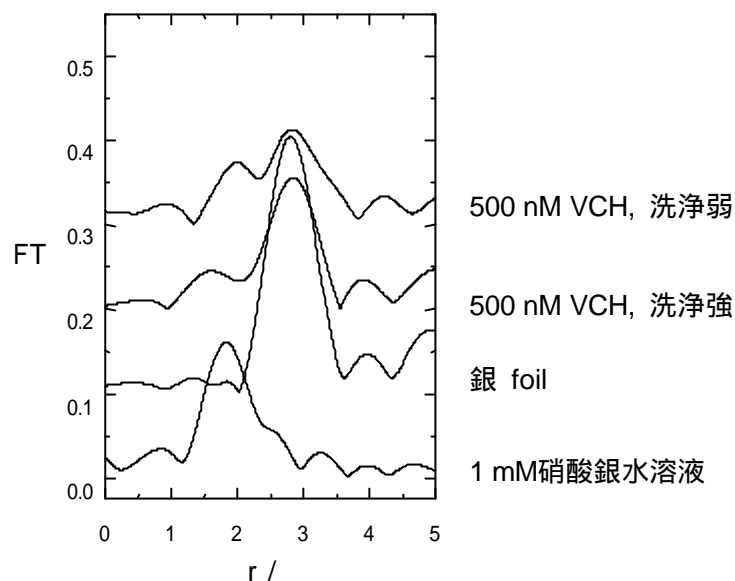


図 10 塩化銀飽和水溶液に浸漬した基板の銀 K - edge XANES フーリエ変換
洗淨強は，基板を塩化銀飽和水溶液に浸漬した後，200mL の逆浸透水で 5 分，3 回洗淨したものをいう。また，洗淨弱は，基板を塩化銀飽和水溶液に浸漬した後，200mL の逆浸透水で 5 分，1 回洗淨したものをいう。

4.7 まとめ

() コレステロール結合タンパク質の改良と評価およびコレステロール結合性タンパク質の無毒化と効率的な大量分取法の確立

毒性のない VCH として組み換え pro-VCH を大腸菌で大量に発現させ，分取する方法を確立した。本研究で開発された組み換え pro-VCH の分取システムは複雑なプロセスを経ないので，大規模な分取システムへ移行することも可能であると考えられる。また，VCH のコレステロール結合領域が ECTFNNSWLWKN であることを示唆する実験結果を得た。この領域は 65kDa の成熟型 VCH では N 末端側 13 から 24 の間に存在し，N 末端側に近いことが分かった。また，pro-VCH は 156 から 167 の間にあり，native VCH と同様のコレステロール結合活性があることは pro 領域の動きがコレステロールとの結合を阻害するものではないことを示している。したがって，pro 領域が結合した pro-VCH はバイオ基板の構成成分として最適であると考えられる。また，コレステロール結合領域の同定は，基板上でのコレステロールと VCH の結合様式の解明の一助になると考えられる。

() バイオ基板の作製方法の検討

PVDF 膜を支持台とした作製したバイオ基板に一定の抗菌性が認められたが，PVDF 膜多孔性かつ表面がフラットでないために表面の微細構造や積層成分の解析ができなかった。PVDF によるバイオ基板の開発と平行して，新たにシリコンウエハを用いたバイオ基

板の検討を行った。シリコンウエハに PhTCS の自己組織化単分子膜，コレステロール単分子膜，pro-VCH，銀を積層したバイオ基板を作製し，抗菌活性を評価したところ，6.3 の抗菌活性値が認められた。

() コレステロール結合性タンパク質と結合性のある抗菌剤の探索

銀の電気分解によって生成した銀イオンを用いて研究を行ってきたが，一定濃度の銀イオン溶液を確保や銀イオンの濃度を測定することが困難であった。そこで硝酸銀水溶液と塩化銀飽和水溶液を抗菌剤として用いてバイオ基板を作製し抗菌活性を評価した。その結果，これらの溶液で作製したバイオ基板には抗菌活性が認められた。特に硝酸銀は，恒常的に一定濃度の銀イオン水溶液をバイオ基板作製のための供給源として使用できる利点がある。

() 抗菌剤が結合したバイオ基板の抗菌性評価

PVDF 膜を支持台に用いて作製したバイオ基板の大腸菌に対する抗菌活性は約 3 程度の値を示すことが分かった。PVDF - バイオ基板と平行してシリコンウエハを支持台としたバイオ基板を作製した。塩化銀飽和水溶液を用いたバイオ基板の抗菌活性値は 0.9 から 3.9 の範囲にあったが，これに比べて硝酸銀水溶液を用いて作製したバイオ基板は 6.3 という非常に高い抗菌活性値を示した。硝酸銀水溶液の濃度を減らすことによって抗菌活性値が下がるかどうかを最優先課題として検討していく予定である。もし抗菌活性値下げることができれば，バイオ基板の抗菌活性値は任意にコントロールできる可能性が高いと考えられる。

() バイオ基板の表面分析

PVDF 膜上にコレステロールと pro-VCH が結合していることをイミュノプロット法と ESCA によって確認したが，銀の存在は確認できなかった。

シリコンウエハ基板の上に積層した成分が結合しているかどうかを定性的に確認するために接触角測定を行った。PhTCS を自己組織化させた基板は，PhTCS の疎水的性質のために接触角が大きくなっていったが，コレステロール単分子膜を吸着させても接触角に大きな変化はなかった。pro-VCH を上層に結合させると，表面が親水性になり基板の接触角が小さくなった。銀イオン溶液で処理し水で十分洗浄した基板は，pro-VCH よりも接触角がわずかに大きくなった。これらの結果は基板の上に PhTCS，コレステロール，pro-VCH，銀が順に結合していくことを示唆している。

PhTCS，コレステロール，pro-VCH，銀イオン溶液の順に結合させたシリコンウエハ表面の微細構造を AFM と SEM を用いて観察すると，基板に対して垂直方向に柱状の構造体が多数林立していた。柱状の構造体はコレステロールが結合した基板にのみ観察されたので，pro-VCH はコレステロールを介して結合していると考えられた。

極微量の元素分析が可能なシンクロトロン放射 X 線を用いて分析した。バイオ基板表面の XAFS(X 線吸収微細構造)スペクトルに明瞭な銀イオンの吸収が現れたので，基板の上に銀が存在することが明らかとなった。EXAFS 領域の振動構造解析によって，銀は主に Ag^0 お

よび Ag^+ として基板上に吸着されていることが示唆された。銀の吸着量と価数は、バイオ基板の作製条件に依存して変化した。また、銀イオン水溶液の濃度が低い方が吸着量は減少したが、一価の銀の割合が増加する傾向にあった。

5. コントロールサンプルの作製検討（無機系抗菌剤練り込み樹脂プレート）

5. 1 目的

銀系無機抗菌剤を練り込んだ樹脂で抗菌活性値をほとんど示さない場合でも、サンドペーパー等で表面研磨すると抗菌性能が発現することが多々ある。これは研磨により表面のスキン層が除去され、すなわち抗菌剤が頭出しされ、抗菌性能が発現すると考えられる。樹脂中に抗菌剤粒子がほぼ均一に存在し、かつスキン層を再現よく除去できれば安定した抗菌性能の発現が期待できる。

平成16年度は下記成果が得られた（詳細は、中間成果報告書参照）。

- ・サンドペーパー研磨により、抗菌活性値2～3程度のコントロールサンプルが得られる可能性が見出された。
- ・抗菌剤として銀担持リン酸ジルコニウムを用いた場合、大腸菌に対しては、適正添加量が0.1%未満、黄色ブドウ球菌に対しては0.3%弱であることがわかった。
- ・抗菌剤として銀担持ゼオライトを用いた場合、大腸菌に対しては、適正添加量が1.1～1.2%、黄色ぶどう球菌に対しては1.3～1.4%であることがわかった。
- ・サンドペーパー研磨は手作業であるにもかかわらず、抗菌性能の再現性は高い。しかし電子顕微鏡観察の結果、研磨剤粒子により生成した樹枝表面の引っかきキズ(溝)中に、研磨で掻き落とされた抗菌剤粒子が溜まっていることが観察された。こういった現象はバラツキの原因となるため、サンドペーパー研磨は、本目的に対してふさわしい方法とは言えない。
- ・工業的研磨方法としてバフ研磨を検討した結果、スキン層除去にバラツキがあり、本目的に対してふさわしい方法とは言えない。
- ・工業的研磨方法として表面切削を検討した結果、抗菌性能は表面未処理品と同程度であり、表面加工の効果は見られなかった。電子顕微鏡観察の結果、切削断面の抗菌剤粒子数は、未処理表面とほぼ同等であったことから、表面切削では頭出し効果がほとんどないことがわかった。
- ・工業的研磨方法としてサンドブラストを検討した結果、抗菌性能はサンドペーパー研磨よりやや低い安定している。

平成17年度は、上記研磨方法の見極め、新たな表面研磨方法の検討を実施する。

なお、抗菌剤粒子を均一に練り込むために、プレート作製時に直接抗菌剤を添加することはせずに、マスターバッチ（M/B）を用いる（マスターバッチメーカーに依頼し、実機で作製）。

また、表面研磨における抗菌性能発現には、抗菌剤粒子の粒径も変動要因と考えられるため、検討には2種の銀系無機抗菌剤を用いた。

適正添加量レベルをサンドペーパーによる表面研磨で見出し、その後、工業的研磨技術を確立することを本章の目的とする。

5. 2 試験用プレートの作製

5. 2. 1 使用した銀系無機抗菌剤

下記の2種を使用した。

表1 使用した銀系無機抗菌剤の代表品質

抗菌剤	グレード	銀含有率 (%)	亜鉛含有率 (%)	平均粒径 (μm)
銀担持 リン酸ジルコニウム	ハロン AG300 (東亜合成(株)製)	3.8	—	0.9
銀担持 ゼオライト	バクテキラー BM-502FC (富士ケミカル(株)製)	0.14	13.85	5.9

5. 2. 2 マスターバッチ作製

下記組成でマスターバッチ(以下、M/B)を作製した(作製:株へキサケミカル。H16年度に作製し、試験に用いたものを引き続き使用)。

表2 マスターバッチ組成

M/B名	使用抗菌剤	LDPE樹脂*1 (%)	分散剤 (%)	抗菌剤 (%)
HEM-0E712	AG300	87.0	3.0	10.0
HEM-0E709	BM-502FC	87.0	3.0	10.0

*1: 日本ユニカー(株)製 NUC8350

5. 2. 3 抗菌剤含有樹脂プレート作製

下記2機関で抗菌剤含有樹脂プレートを作製した。

(1) プレート①

- ・作製機関: 株へキサケミカル
- ・希釈樹脂: LDPE(日本ユニカー(株)製 NUC8350)、及びPP樹脂(日本ポリプロ(株)製MA3)
- ・成形方法: インジェクション成形
- ・金型: 100×50mm×2mm

(2) プレート②

- ・作製機関: 東亜合成(株)
- ・希釈樹脂: LDPE(日本ユニカー(株)製 NUC8350)、及びPP樹脂(日本ポリプロ(株)製MA3)
- ・成形方法: インジェクション成形
- ・金型: 100×100mm×2mm

5. 3 サンドペーパーによる表面研磨の検討

5. 3. 1 目的

先の検討で、サンドペーパー(#1000)の引っかきキズ(溝)の中に、研磨で掻き落とされた抗菌剤粒子が溜まってしまう問題が明らかとなった。そこで、粒度の影響、すなわちサンドペーパー研磨剤の粒径を抗菌剤粒子と同等あるいは、それ以下にした場合の影響を調べた。

5. 3. 2 実験1(手研磨)

1) 抗菌剤添加量を、0.3、0.4、及び0.5%として、PPプレート②を製作した(使用M/BはHEM-0E712)。プレートを4分割し、#10,000サンドペーパー(研磨剤粒度、0.5 μ m相当)で縦、横各10回研磨した。

2) JIS Z 2801により抗菌力評価した(黄色ぶどう球菌)。またプレート表面のSEM観察を行なった。

5. 3. 3 結果と考察1

抗菌力評価結果を図1に、SEM写真を写真1～2に示した。

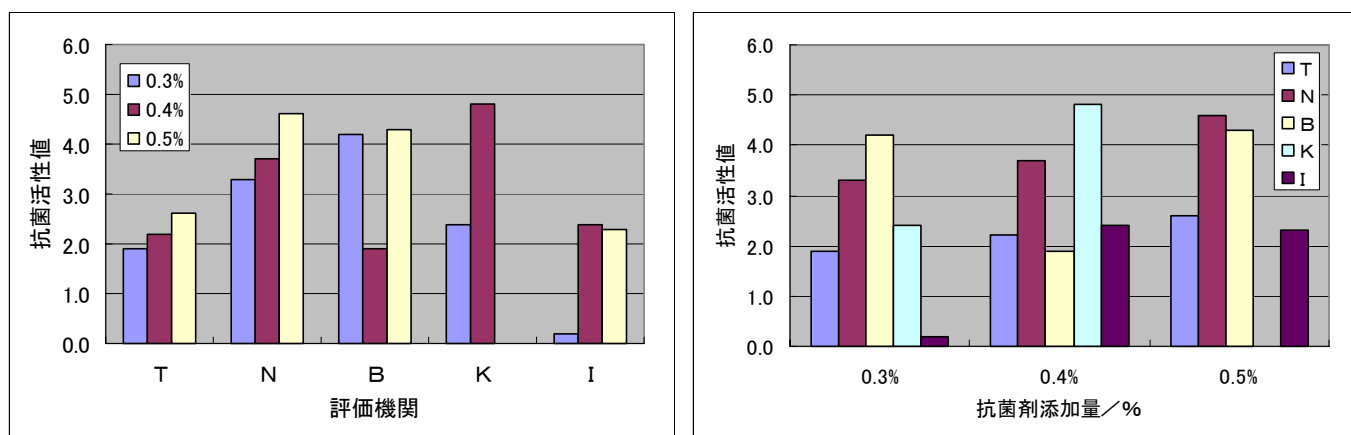


図1 抗菌力評価結果(#10,000サンドペーパー研磨品)

*T, N, B, K, Iは評価機関を示す

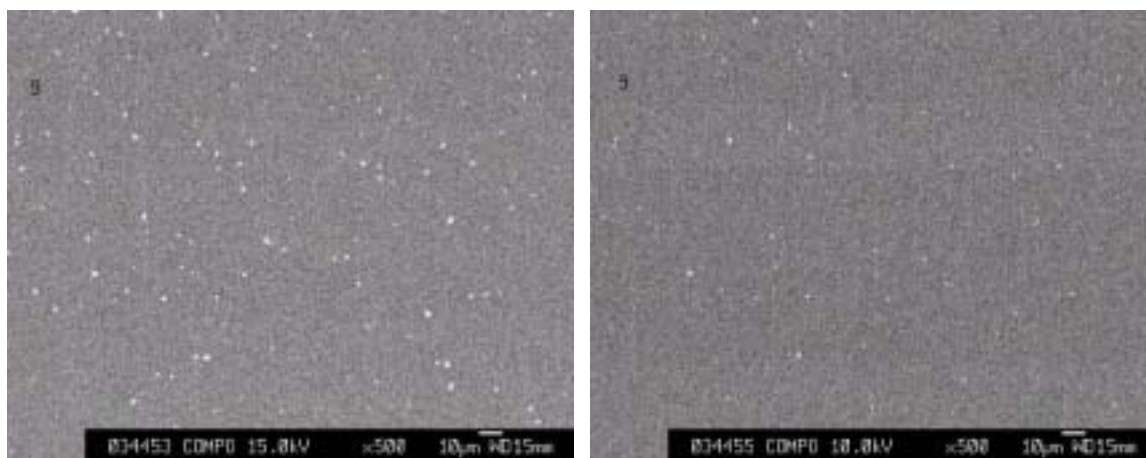


写真1 PPプレート①のSEM写真(反射電子像、 $\times 500$)

左: 加速電圧15kV, 右: 加速電圧10kV。

抗菌剤添加量0.3% (未研磨)

サンドペーパー研磨では、2機関で抗菌剤添加量と抗菌活性値に相関性が見られたが、他2機関では相関性が見られなかった(1機関はデータが揃っていないため不明)。

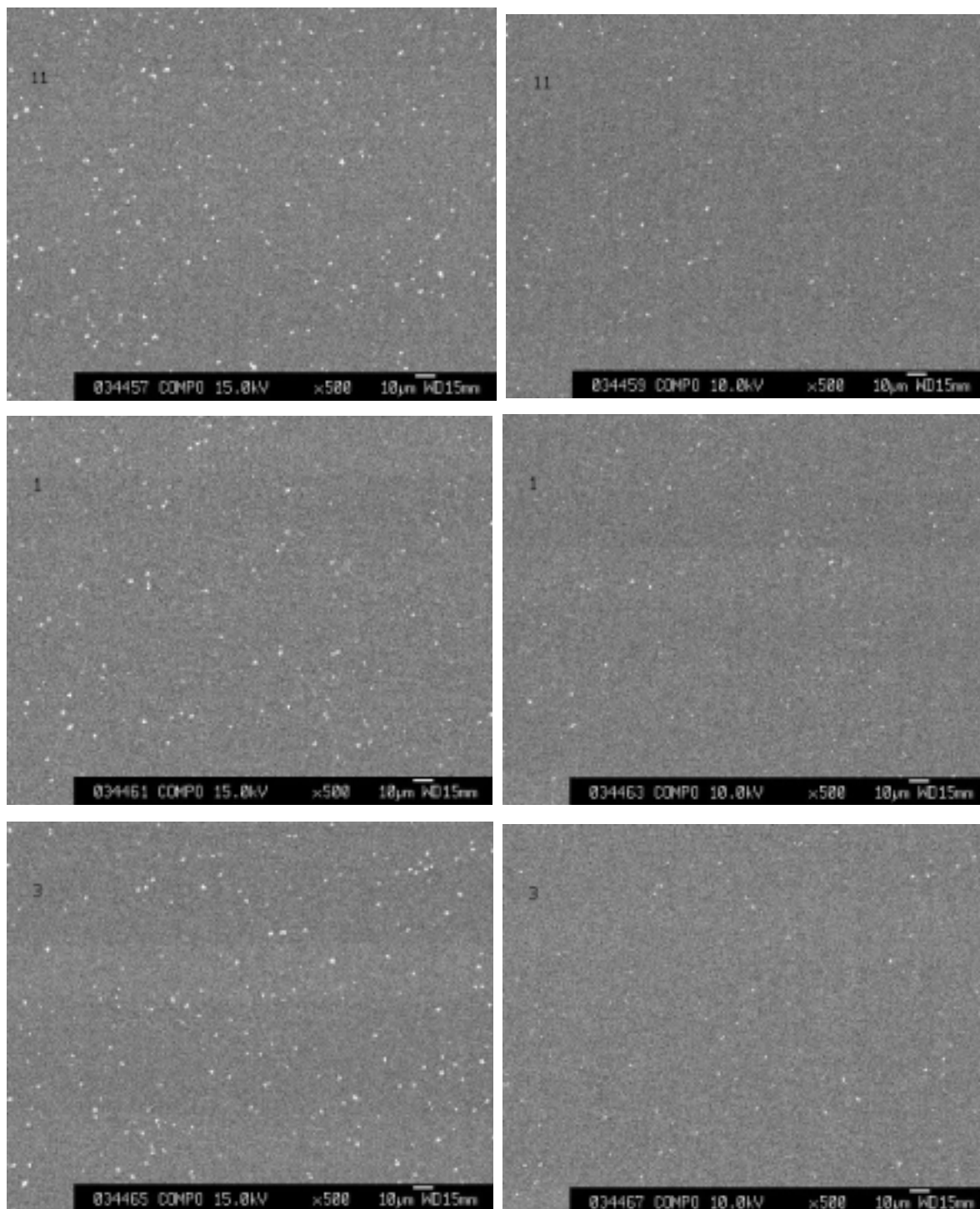


写真1 (つづき)

上段：抗菌剤添加量0.5% (未研磨)
中段：抗菌剤添加量0.3% (サンドペーパー研磨)
下段：抗菌剤添加量0.5% (サンドペーパー研磨)

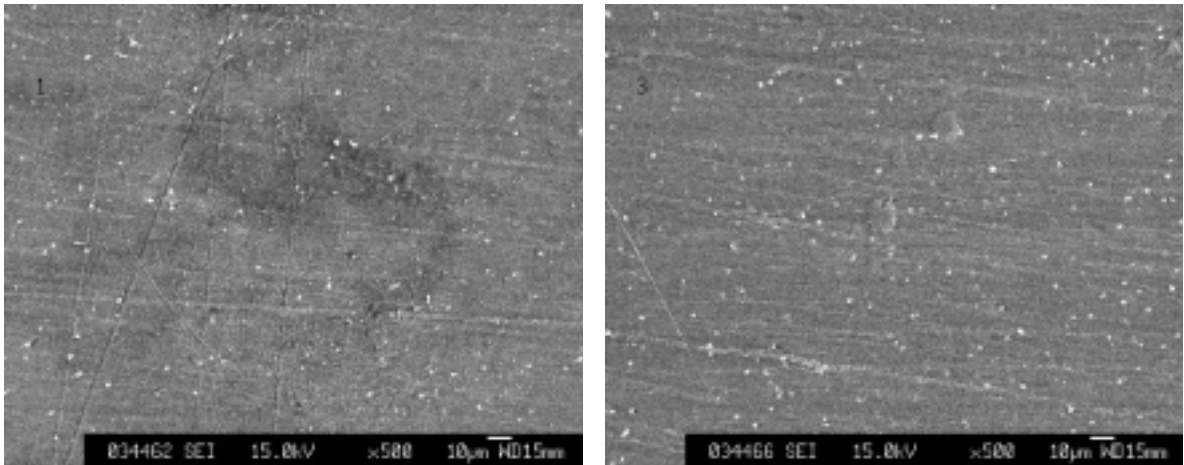


写真2 PPプレート①のSEM写真(2次電子像、×500)
 左：抗菌剤添加量0.3%、右：抗菌剤添加量0.5%

反射電子像は、2次電子像に比較して解像度は劣るものの、原子番号の大きな元素ほど明るく(白く)見えやすいため、抗菌剤粒子数をカウントするのに適した画像である。また加速電圧が高いほど、電子は試料表面から内部に入り込みやすくなるため、表面に露出していないものも捉えることができる。すなわち、加速電圧が下げることにより抗菌剤粒子が見えなくなる場合は、最表面に露出していないことがわかる。単位面積あたりの絶対値、及び加速電圧を下げることによる減少率を測定することにより、表面近傍における抗菌剤粒子の存在状態をある程度知ることができる。カウント結果を表3に示した。

未研磨品では、カウント数比率(10kv/15kv)が60%前後であるのに対し、サンドペーパー研磨品ではやや低く47%であったが、比率は抗菌剤添加量に依存していない。絶対値は、未加工品に比較しサンドペーパー品のほうが多いが、その差は期待したほどではなかった。

#1,000サンドペーパー(粒度15µm)で研磨した場合、溝の部分に抗菌剤粒子が溜まっているのが確認されたが、#10,000では、研磨剤の粒径が抗菌剤のそれと同等あるいはそれ以下のため、そういった現象は見られなかった。

表3 SEM観察 個数カウント結果

表面研磨	抗菌剤 添加量(%)	加速電圧 (kv)	個数	比率(%) (10kv/15kv)
未加工	0.3	15	129	47
		10	60	
	0.5	15	175	47
		10	82	
サンドペーパー	0.3	15	112	61
		10	68	
	0.5	15	169	57
		10	96	

以上より、サンドペーパーの研磨剤粒子を抗菌剤粒子と同等程度にすれば、溝の部分に抗菌剤粒子が溜まる問題は解決できることがわかった。今回の試料は、SEM観察によれば研磨が不十分である。そのため、抗菌力評価機関間でバラツキが見られたと思われるが、2機関の評価で相関性が見られたことから、研磨を十分行なえば、安定した抗菌性能を発現できる可能性が示唆された。

5. 3. 4 実験2 (機械研磨)

- 1) 5. 3. 2と同様にPPプレート②を作製した。抗菌剤添加量は、0. 15、及び0. 2%とした(この添加量とした理由は、5. 4参照)。
- 2) 回転研磨機(BUEHLER社製ECOMET II、回転数=500rpm)に、#4,000(3 μ m相当)サンドペーパーをセットし研磨を行なった。研磨は、試料に一定加重(1000g)を乗せ、1、及び2分間実施した。
なお、#4,000を用いたのは、研磨を確実に実施するためである(5. 3. 3の結果より、3 μ mであれば、溝の部分に抗菌剤粒子が溜まることはないと判断した)。
- 3) 後処理として、エタノール中に浸漬、一分間超音波を当て、終了後すぐ引き上げ、エタノール洗ビンで洗浄、風乾した。
- 4) JIS Z 2801により抗菌力評価した。

5. 3. 5 結果と考察2

抗菌力評価結果を図2に示した。図には、#1000サンドペーパーで手研磨したのも併せて示した(5. 4. 8参照)。黄色ぶどう球菌、大腸菌とも、#1000サンドペーパーで手研磨品より抗菌活性値が小さくなった。その原因として、研磨剤粒子が小さいため、研磨時間2分では短かったこと、研磨時の荷重が小さかったこと、及び超音波洗浄を行なったためプレート表面に頭出ししている抗菌剤粒子が剥れやすくなったこと等が考えられる。しかし、添加量が多いほど、また研磨時間が長いほど抗菌活性値が高いことから、抗菌剤の添加量も含め、最適条件を選定すれば安定した抗菌活性値が得られる見込が得られた。

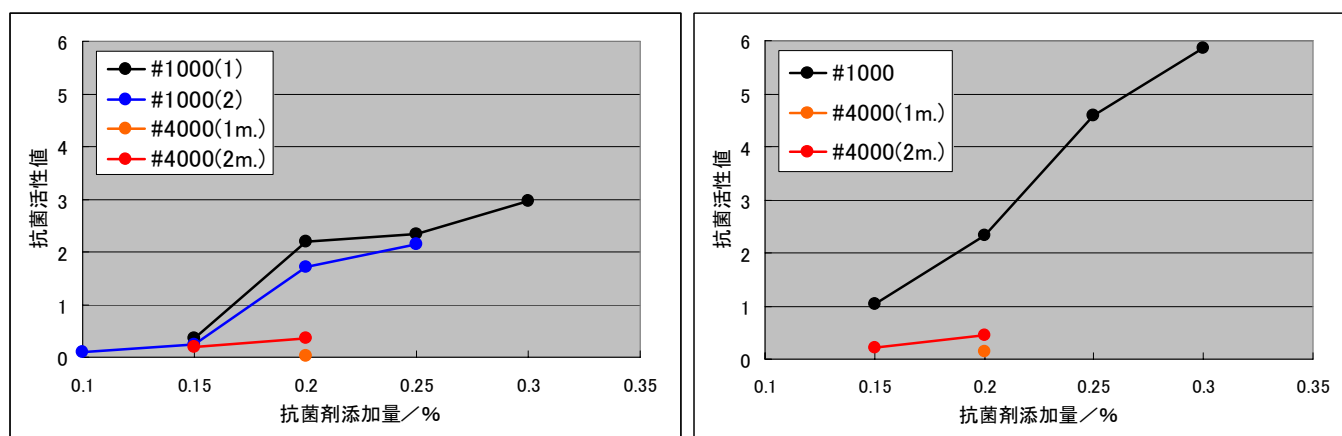


図2 抗菌力評価結果(#4000サンドペーパー研磨/超音波洗浄品)
左：黄色ぶどう球菌、右：大腸菌

5. 4 サンドブラストによる表面研磨の検討

5. 4. 1 目的

平成16年度の試験では、サンドペーパー研磨に比較して抗菌性能は低かったが、比較的安定した結果となった。本項では、サンドブラスト加工の再現性の確認、および最適条件検討を行なった。

5. 4. 2 実験1(再現性確認)

1) 5. 3. 2で作製したPPプレートを使用し、サンドブラスト機メーカーに委託し、サンドブラスト加工を実施した(研磨剤はWA-#600)。

2) JIS Z 2801により抗菌力評価(黄色ぶどう球菌)した。またプレート表面のSEM観察を行なった。

5. 4. 3 結果と考察1

抗菌力評価結果を図2に示した。3機関で抗菌剤添加量と抗菌活性値に相関性が見られ、かつ絶対値も揃っていた。他2機関では相関性が見られなかったもの、サンドペーパー研磨に比較して安定性の高い結果となっており、コントロールサンプルとして使用できる可能性が高いと考えられる。

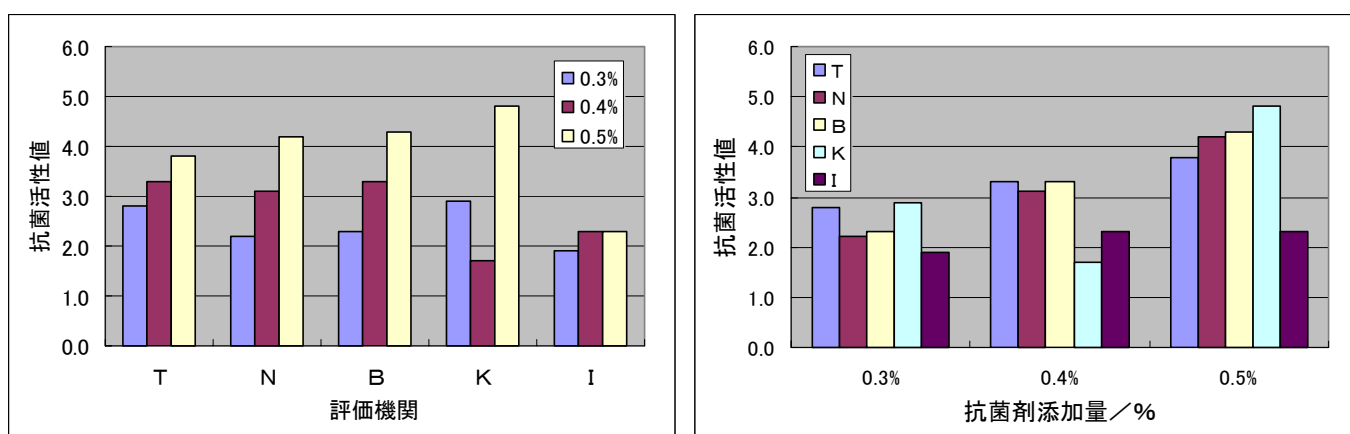


図3 抗菌力評価結果(サンドブラスト加工品)

*T, N, B, K, Iは評価機関を示す

SEM写真を写真3~5に示した。サンドブラスト加工では、研磨剤粒子と抗菌剤粒子が区別できないため、5. 3. 3で行なった粒子のカウントは行なわなかった。しかし、2次電子像(写真4)を見ると、抗菌剤添加品は、未添加品より明らかに粒子が多く見られ、サンドブラスト加工により、抗菌剤粒子のプレート表面への頭出しがなされたと思われる。

今後、バラツキを低下させるため、サンドブラスト条件の詳細検討を実施する。

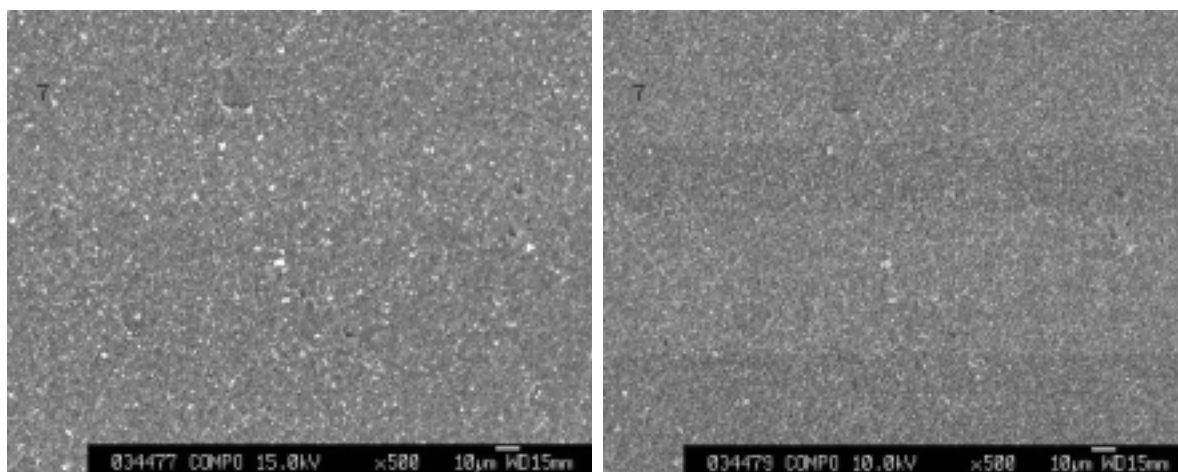
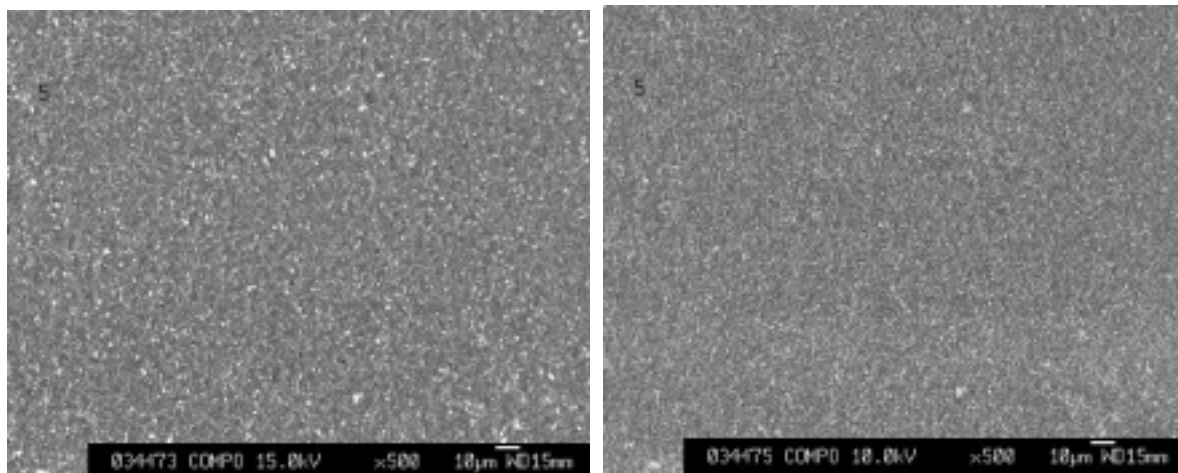


写真3 PPプレート①のSEM写真(反射電子像、×500)

左：加速電圧15kV，右：加速電圧10kV。

上段：抗菌剤添加量0.3% (サンドブラスト)

下段：抗菌剤添加量0.5% (サンドブラスト)

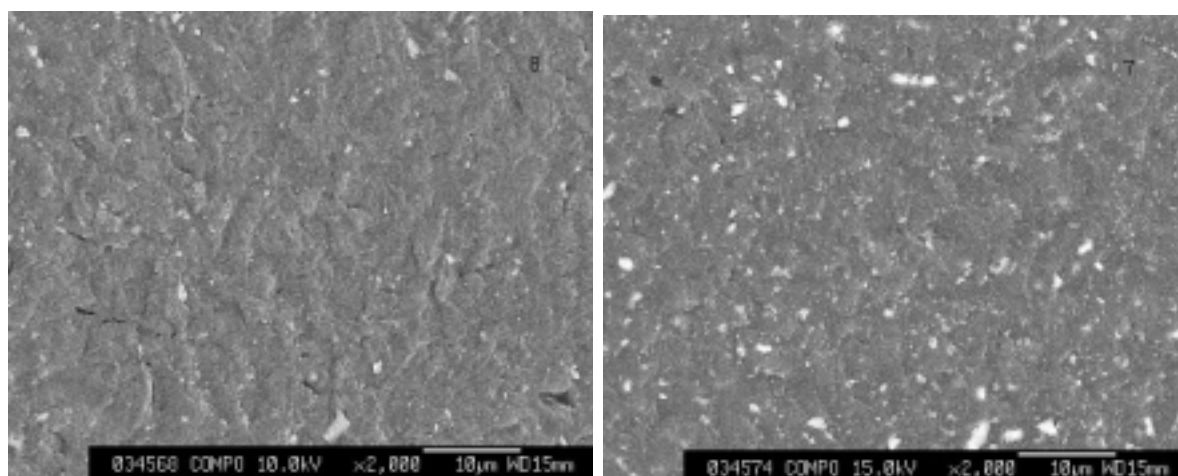


写真4 PPプレート①のSEM写真(反射電子像、×2,000)

左：抗菌剤未添加(サンドブラスト)，右：抗菌剤0.5%添加(サンドブラスト)

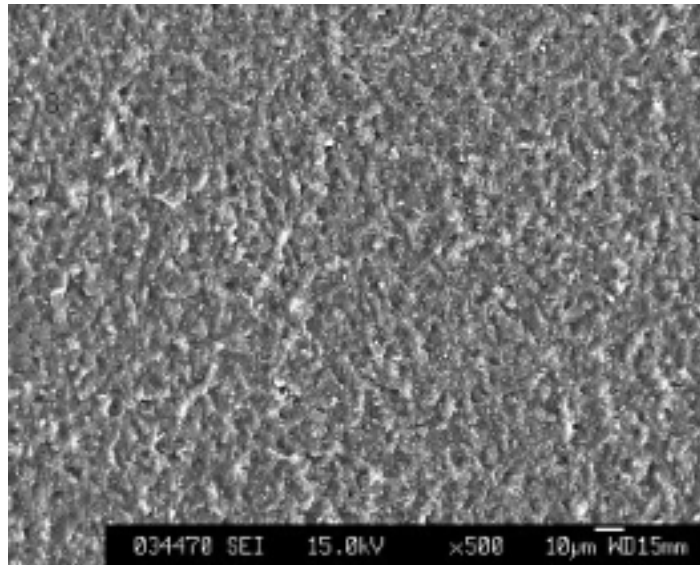


写真5 抗菌剤未添加PPプレート①のSEM写真(2次電子像、×500)

5. 4. 4 実験2(最適条件検討)

- 1) 銀担持リン酸ジルコニウム、および銀担持ゼオライトを用いて、PPプレート①を作製した(M/B使用)。抗菌剤添加量は、銀担持リン酸ジルコニウムは、5.4.3の結果より0.30%に、銀担持ゼオライトは、昨年度の結果より1.3%とした。
- 2) サンドブラスト委託加工業者に委託し、下記条件でサンドブラスト加工を実施した。
 - サンドブラスト加工条件
 - 1) 砥粒(White Alandom) #800、#400、#220
 - 2) 噴射圧 0.2MPa、0.35MPa、0.5MPa
 - 3) ブラスト時間 5秒、10秒
 *研磨剤はワンプスで再使用しない。
- 3) JIS Z 2801により抗菌力評価(黄色ぶどう球菌)した。

5. 4. 5 結果と考察2

抗菌力評価結果を表4、及び図3～4に示した。銀担持ゼオライトの場合、砥粒が#220では、条件に関係なく抗菌活性値が4前後で安定した結果となった(図3C)。噴射圧については、0.35MPaが最も安定性が高い(図3G)。ブラスト時間については、他の条件との関連性が高く一概に言えないが、10秒のほうが安定性が高いと考えられる。条件を設定する場合、条件変動に敏感でないこと(多少サンドブラスト加工条件がぶれても抗菌活性値がぶれないこと)が重要なので、砥粒#220、噴射圧0.35MPa、時間10秒が最適条件と考えられる。

1.3%添加で、抗菌活性値が最大で3程度と予想していたが、予想に反して高い抗菌性能を示した。抗菌剤添加量を減らした場合にも安定した結果が出るかどうかを確認する必要がある。

銀担持リン酸ジルコニウムの場合、砥粒の影響が非常に大きく、#220を用いた場合、最も安定した結果となった(図4C)。噴射圧、及びブラスト時間については、他の条件との関連性が高く一概に言えないが、0.35MPa、10秒が安定性が高いと考えられる(図4G)。ただし、銀担持ゼオライト同様、抗菌活性値が4前後であ

るので、抗菌剤添加量を減らした場合にも安定した結果が出るかどうかを確認する必要がある。

最も安定した結果となっている#220の砥粒を用いたサンプル及び、比較的安定した結果となっている噴射圧0.35MPaのサンプルについては、さらに3機関(試験機関2~4)で抗菌力評価を実施した(ただし#800の砥粒は、加工メーカーによれば、扱いにくいとのことなので、砥粒#400のみとした)。抗菌力評価結果を表4に併せて示した。各機関により対照の絶対値が異なるため、抗菌活性値が高いところでは比較がしにくい。そこで、便宜的ではあるが、最大の抗菌活性値を100%とし、比率で比較してみた。その結果を図5に示した。4機関とも同レベルにはなっていないが、比較的良い一致をみている。

以上より、サンドブラスト加工条件を選定することにより、抗菌性能のバラツキを最小限に押さえられる可能性があることが見出された。しかし、抗菌活性値が目標レベルより高かったため、次に添加量を減らしてPPプレートを作製し、最適条件(砥粒#220、0.35MPa、10秒)でサンドブラスト加工試験を行なう。

表4 サンドブラスト条件と抗菌力評価結果

No.	砥粒	噴射圧(Mpa)	時間(秒)	抗菌剤*1	試験機関1(n=1)		試験機関2(n=3)		試験機関3(n=3)		試験機関4(n=3)		
					初発	5.3	-	5.4	-	5.33	-	5.36	-
					対照	5.2	-	5.8	-	6.3	-	6.45	-
				生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値		
(1)	#800	0.2	5	709	3.5	1.8							
(2)	#800	0.2	10	709	1.3	4.0							
(3)	#800	0.35	5	709	1.6	3.7							
(4)	#800	0.35	10	709	1.0	4.3							
(5)	#800	0.5	5	709	2.5	2.8							
(6)	#800	0.5	10	709	3.7	1.6							
(7)	#400	0.2	5	709	1.3	4.0							
(8)	#400	0.2	10	709	1.0	4.3							
(9)	#400	0.35	5	709	2.1	3.1	1.0	>4.8	2.9	3.4	2.1	4.3	
(10)	#400	0.35	10	709	1.3	4.0	1.0	>4.8	2.6	3.7	4.1	2.4	
(11)	#400	0.5	5	709	2.6	2.6							
(12)	#400	0.5	10	709	4.1	1.1							
(13)	#220	0.2	5	709	1.5	3.8	1.3	4.5	1.1	5.2	1.2	5.3	
(14)	#220	0.2	10	709	1.3	4.0	1.0	>4.8	1.0	5.3	2.0	4.4	
(15)	#220	0.35	5	709	1.9	3.4	1.0	>4.8	1.5	4.8	1.0	5.5	
(16)	#220	0.35	10	709	1.3	4.0	1.0	>4.8	1.0	4.9	1.6	4.9	
(17)	#220	0.5	5	709	1.0	4.3	1.2	4.6	1.0	5.3	2.3	4.2	
(18)	#220	0.5	10	709	1.3	4.0	2.2	3.6	1.1	5.2	1.6	4.9	
709	-	-	-	709	4.9	0.4							
①	#800	0.2	5	712	3.8	1.5							
②	#800	0.2	10	712	2.7	2.6							
③	#800	0.35	5	712	4.2	1.1							
④	#800	0.35	10	712	2.6	2.7							
⑤	#800	0.5	5	712	4.0	1.3							
⑥	#800	0.5	10	712	2.9	2.4							
⑦	#400	0.2	5	712	4.1	1.2							
⑧	#400	0.2	10	712	3.9	1.3							
⑨	#400	0.35	5	712	3.8	1.4	1.3	4.5	2.6	3.7	2.4	3.9	
⑩	#400	0.35	10	712	3.9	1.4	3.6	2.2	3.3	3.1	4.1	2.2	
⑪	#400	0.5	5	712	4.8	0.5							
⑫	#400	0.5	10	712	4.9	0.4							
⑬	#220	0.2	5	712	2.0	3.3	1.0	>4.8	1.0	5.3	1.8	4.5	
⑭	#220	0.2	10	712	2.1	3.2	1.0	>4.8	1.0	5.3	3.7	3.7	
⑮	#220	0.35	5	712	1.0	4.3	1.0	>4.8	1.0	5.3	1.9	4.4	
⑯	#220	0.35	10	712	1.3	4.0	1.0	>4.8	1.0	5.3	2.3	4.0	
⑰	#220	0.5	5	712	1.0	4.3	1.0	>4.8	1.0	5.3	1.8	4.5	
⑱	#220	0.5	10	712	1.0	4.3	1.0	>4.8	1.2	5.3	2.9	3.4	
712	-	-	-	712	5.1	0.2							

*1 : 709 は銀担持ゼオライト、712 は銀担持リン酸ジルコニウム

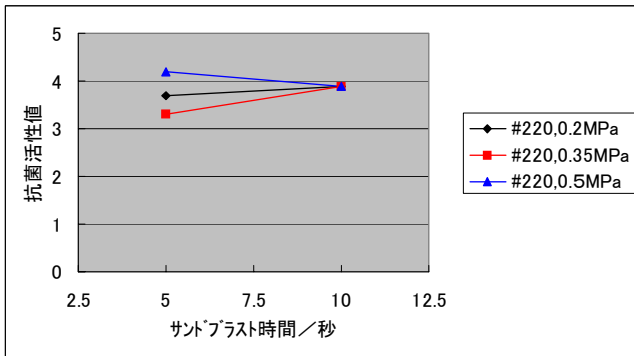
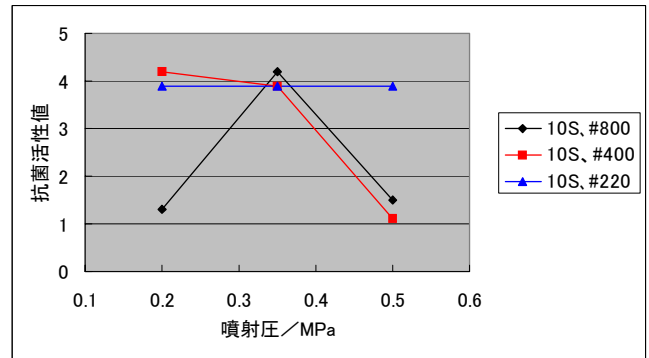
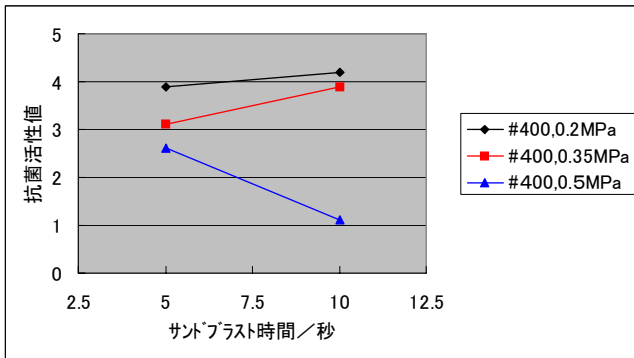
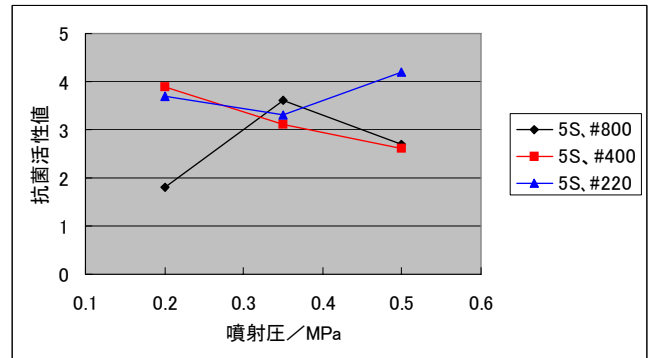
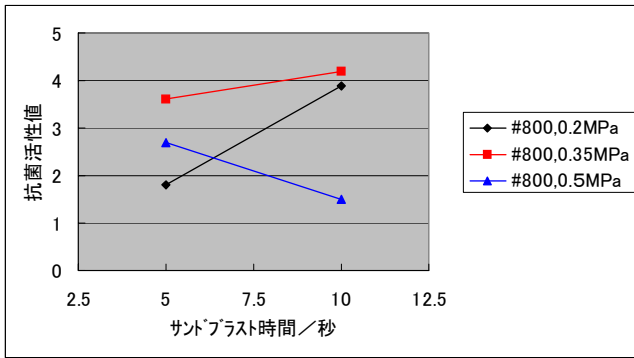


図4 サンドブラスト条件と抗菌活性値の関係 (銀担持ゼオライト n=1)

A	D
B	E
C	

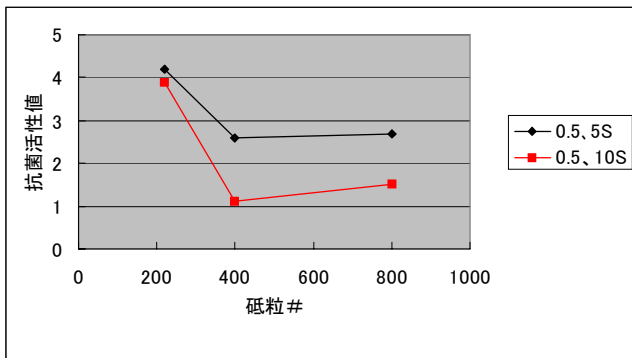
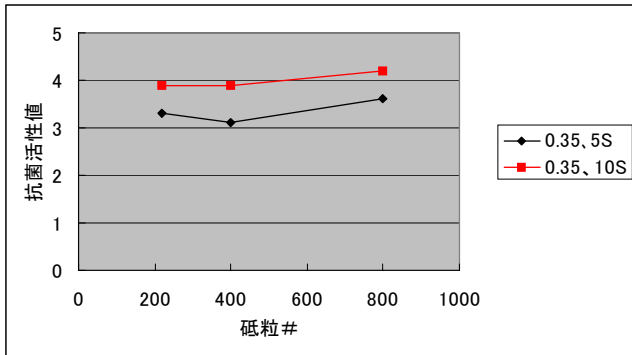
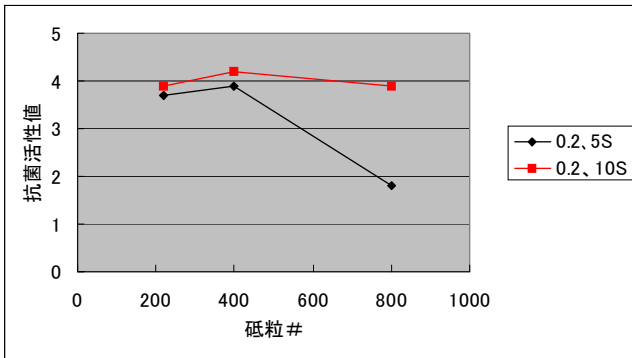


図4 (つづき)

F
G
H

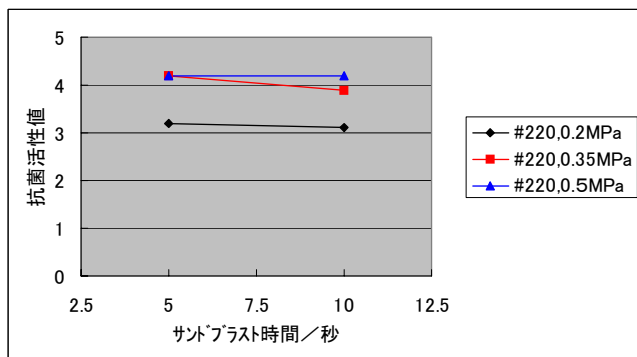
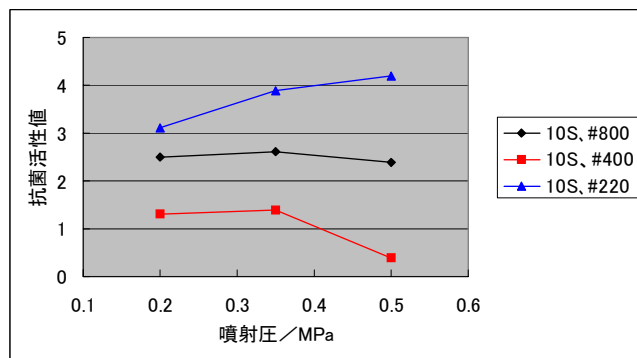
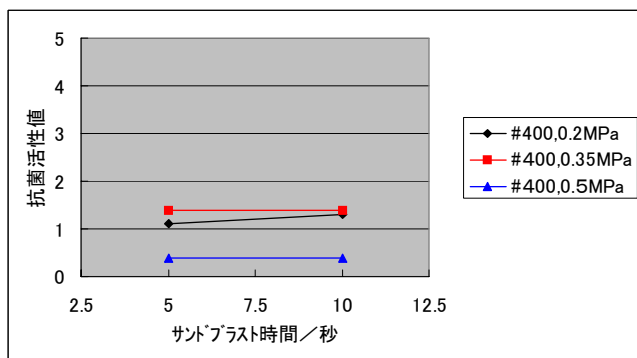
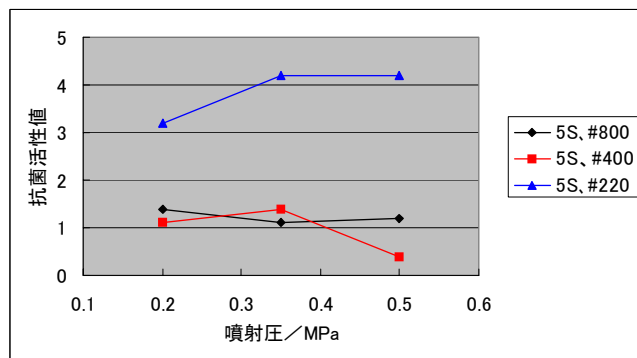
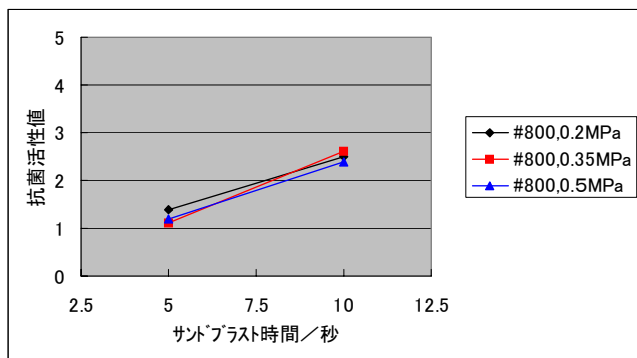


図5 サンドブラスト条件と抗菌活性値の関係
(銀担持リン酸ジルコニウム、n=1)

A	D
B	E
C	

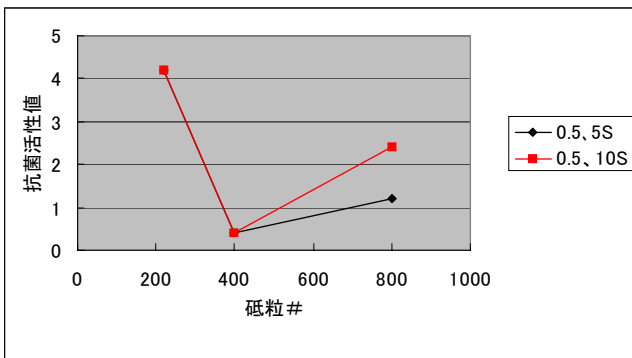
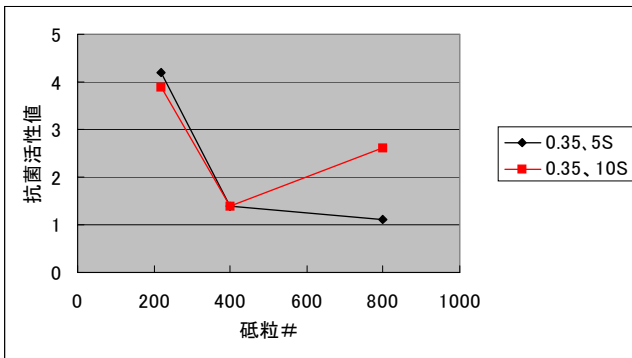
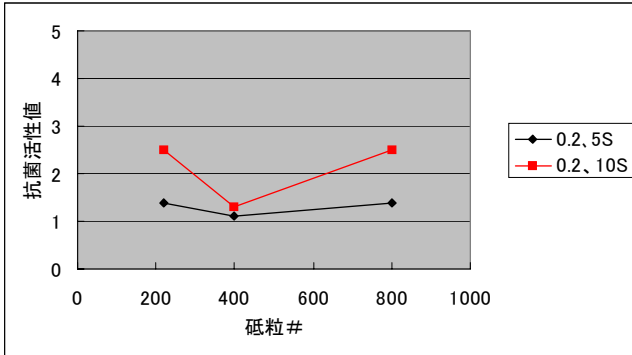


図5 (つづき)

F
G
H

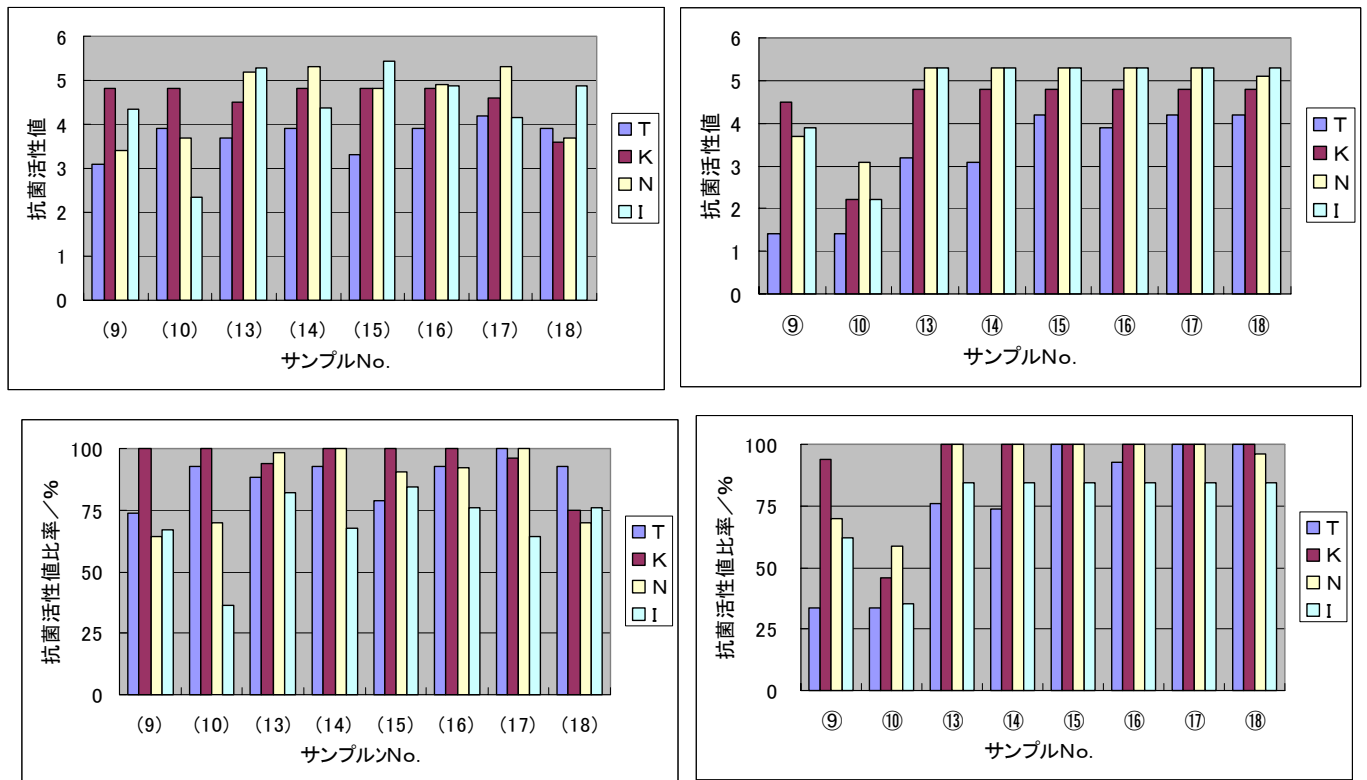


図6 4試験機関の比較（上図は抗菌活性値そのもの、
下図は、上限の抗菌活性値を100とした場合の比率）

5. 4. 6 実験3 (添加量検討)

- 1) 銀担持リン酸ジルコニウム、および銀担持ゼオライトを用いて、PPプレート①を作製した(M/B使用)。抗菌剤添加量は、銀担持リン酸ジルコニウムは、0.275および0.25%、銀担持ゼオライトは、1.2、および1.1%とした。
- 2) 5. 4. 4と同じ委託加工業者に委託し、下記条件でサンドブラスト加工を実施した。

○サンドブラスト加工条件

- 1) 砥粒(White Aladom) #220
- 2) 噴射圧 0.35MPa
- 3) ブラスト時間 10秒

*研磨剤はワンプラスで再使用しない。

- 3) サンドブラスト加工したままでは、プレート表面に粉体が付着している（研磨剤粒子は、抗菌性能を持っていないため問題はないが、プレートから剥れた抗菌剤粒子は、正の誤差の要因となる）。そこで付着粒子を除去するため、下記の後処理を実施した。

1. エアブロー：同一作業者が実施。
2. エタノールに浸漬すすぎ：エタノール中に一定時間浸漬し、引き上げ後、エタノール洗ビンで洗浄、風乾。同一作業者が実施。
3. エタノール中で超音波洗浄：エタノール中に浸漬、一分間超音波を当てる。終了後すぐ引き上げ、エタノール洗ビンで洗浄、風乾。同一作業者が実施。
4. エタノールで拭く：同一作業者が実施。

- 4) JIS Z 2801により抗菌力評価(黄色ぶどう球菌)した。

5. 4. 7 結果と考察 3

抗菌力評価結果を表5に示した。本試験に用いた試料の抗菌剤添加量は、先に求めた最適添加量範囲より低めであるにもかかわらず、評価した3機関とも、ほぼ4以上と高い値となった。そこでこれまでに作製したプレートの、実際の抗菌剤添加量を灰分測定により確認した(蓋付磁性るつぼに試料を少量入れ、750℃で2時間、完全に灰化させ、重量減少より灰分量を算出)。その結果を表6に示した。

表5 抗菌力評価結果一覧表

	抗菌剤	添加量(%)	後処理	抗菌活性値 (n=3)		
				機関1	機関2	機関3
1	銀リン酸ゼルコニウム	0.25	未処理	4.90	5.15	4.43
2	銀リン酸ゼルコニウム	0.25	エアブロー		5.15	4.46
3	銀リン酸ゼルコニウム	0.25	エタノール浸漬すすぎ		5.15	3.70
4	銀リン酸ゼルコニウム	0.25	エタノール超音波		4.88	4.27
5	銀リン酸ゼルコニウム	0.25	エタノール拭き		5.15	4.49
6	銀リン酸ゼルコニウム	0.275	未処理	4.90	4.97	3.88
7	銀リン酸ゼルコニウム	0.275	エアブロー		5.15	4.53
8	銀リン酸ゼルコニウム	0.275	エタノール浸漬すすぎ		4.92	3.68
9	銀リン酸ゼルコニウム	0.275	エタノール超音波		4.88	4.21
10	銀リン酸ゼルコニウム	0.275	エタノール拭き		5.02	4.38
11	銀ゼオライト	1.1	未処理	4.18	5.15	4.38
12	銀ゼオライト	1.1	エアブロー	4.90		
13	銀ゼオライト	1.1	エタノール浸漬すすぎ	3.90		
14	銀ゼオライト	1.1	エタノール超音波	4.90		
15	銀ゼオライト	1.1	エタノール拭き	4.90		
16	銀ゼオライト	1.2	未処理	4.19	5.15	4.15
17	銀ゼオライト	1.2	エアブロー	4.90		
18	銀ゼオライト	1.2	エタノール浸漬すすぎ	4.23		
19	銀ゼオライト	1.2	エタノール超音波	4.90		
20	銀ゼオライト	1.2	エタノール拭き	4.12		
Max.				4.90	5.15	4.90

表6 灰分測定結果 (n=3)

抗菌剤	添加量(%)	プレート	灰分測定結果(%)	計算値に対する割合(%)	備考
712	0.275	①	0.11	40	
712	0.3	②	0.27	90	
712	0.3	②	0.24	80	本試験
712	0.275	①	0.22	80	本試験
712	0.25	①	0.16	64	
709	1.3	①	1.16	89	
709	1.2	①	1.07	89	本試験
709	1.1	①	0.97	88	本試験
712	1.0	①	9.82	98	M/B
709	1.0	①	9.35	94	M/B
—	0	②	0.01	—	ブランク

抗菌剤 712：銀担持リン酸ゼルコニウム、 抗菌剤 709：銀担持ゼオライト

抗菌剤、及び樹脂には、若干の水分が含まれているため、灰分測定結果は、設計値より小さめの値を示す。よって理論値の90%程度であれば妥当とみなすことができる。

抗菌活性値2程度が発現する銀担持リン酸ジルコニウムの最適添加量を0.3%弱(0.275%)と決定したサンプルの、実際の添加量は0.11%であり、極端に低かった。よって、0.11%が妥当な添加量とすれば、その後に作製したものは、すべて添加量が過剰であったこととなる。

銀担持ゼオライトに関しては、抗菌活性値2程度が発現する最適添加量を1.3%と決定したサンプルについての測定がないため、ここでは何とも言えない。

サンドブラスト加工後の後処理についても、すべて条件で抗菌活性値が高かったため、どの方法が好ましいか見極めることができなかった。今後、灰分で抗菌剤の添加量を確認しながら、最適添加量を見直すこととする。

5.4.8 実験4(添加量検討2)

- 1) 銀担持リン酸ジルコニウム添加量を、0.15、0.20、0.25、及び0.30として(=Run1)、PPプレート②を作製した(使用M/BはHEM-0E712)。
- 2) 灰分測定用のブランクとして、銀リン酸ジルコニウム未添加品も作製した。
- 3) 銀担持リン酸ジルコニウムの含有率添加量をは0.10、0.15、0.20、及び0.25%とした以外は、上記と同様にプレート②を作製した(=Run2)。
- 4) 4分割し、#1000サンドペーパーで、縦、横各10回研磨した。
- 5) 灰分測定した(各プレート、及びM/B)。
- 6) 5.4.6と同じ条件でサンドブラスト加工した。
- 7) 後処理として、エタノールで拭いた。
- 8) JIS Z 2801により抗菌力評価した。

5.4.9 結果と考察4

灰分測定結果を図6に示した。ほぼ設計値どおり抗菌剤が含有されていることが確認された。サンドペーパー研磨品の抗菌力評価結果を図7に示した。抗菌剤添加量と抗菌活性値に相関性が認められた。また、Run1とRun2でほぼ同じ結果となっており再現性が見られた。黄色ぶどう球菌では、0.2ないし0.25%添加で抗菌活性値がおよそ2となった。大腸菌では、0.2%添加で抗菌活性値がおよそ2となった。

サンドブラスト加工品の抗菌力評価結果を図8に示した。サンドペーパー研磨より明らかに抗菌活性値が高くなった。加工後の後処理は、エタノールで拭くことのみ行なった。よってサンドブラスト加工により、はじき出された抗菌剤粒子が、表面に残存しているためと考えられる。評価機関Tの結果は、抗菌活性値と添加量に相関性が見られる。超音波洗浄等により、残留粒子を除去することにより、良好な結果が期待できると考えられる。

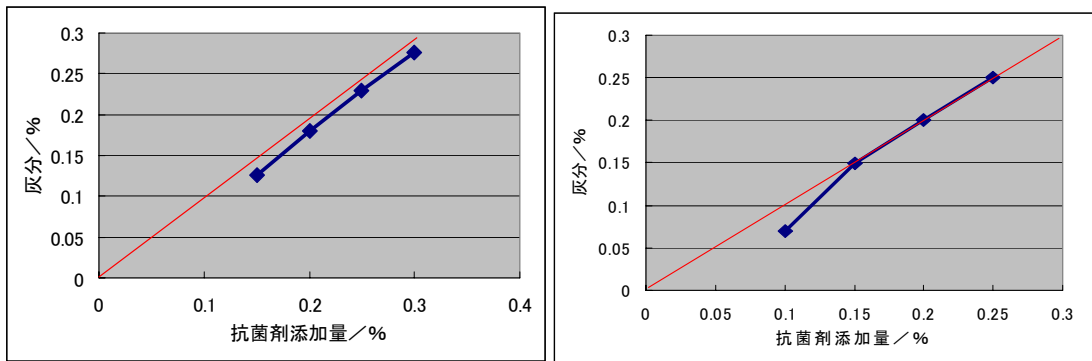


図7 灰分測定結果 (左: Run1、右: Run2)

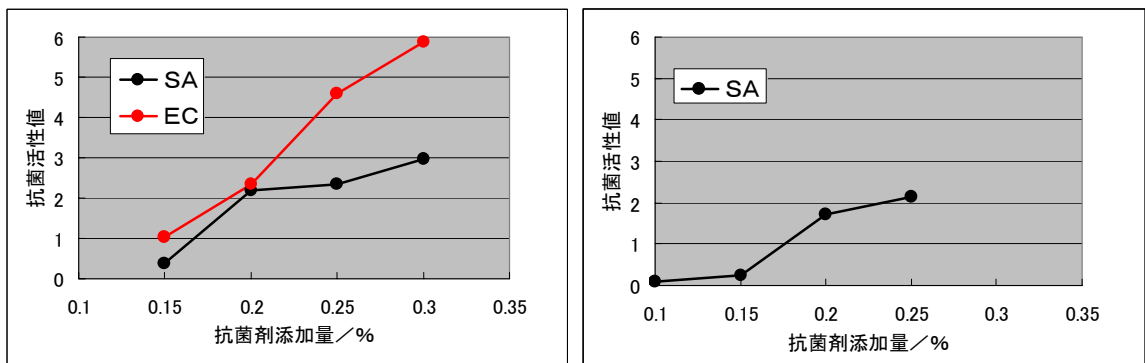


図8 サンドペーパー研磨品の抗菌力評価結果(左: Run1、右: Run2)

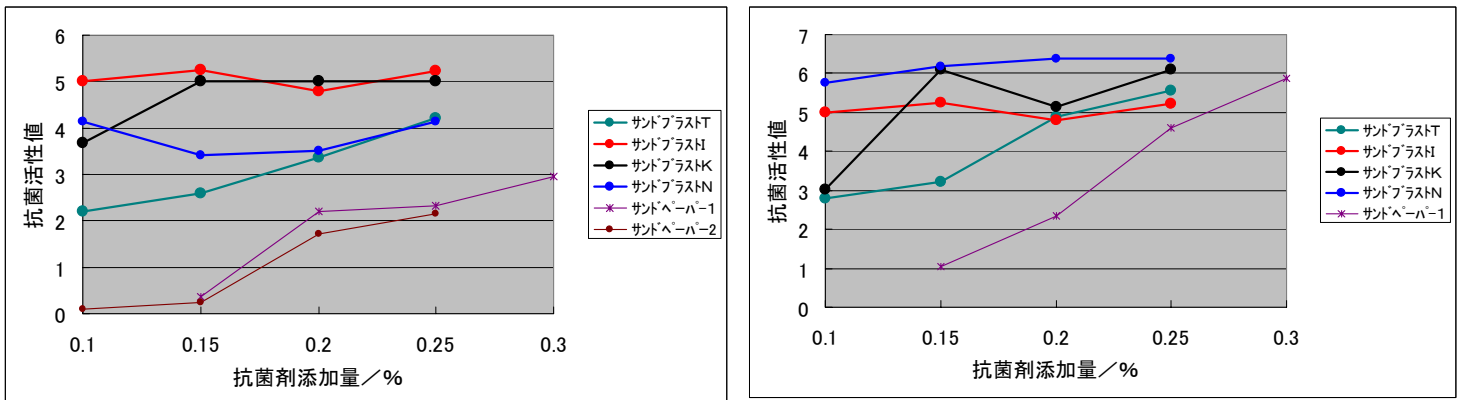


図9 サンドブラスト品の抗菌力評価結果(左: 黄色ぶどう球菌、右: 大腸菌)

*T, I, K, Nは評価機関を示す

5. 4. 10 実験5 (後処理条件検討)

- 1) 5. 3. 4で作製したPPプレートを用い、5. 4. 6と同じ条件でサンドブラスト加工した。
- 2) 後処理として、エタノール中に浸漬、一分間超音波を当て、終了後すぐ引き上げ、エタノール洗ビンで洗浄、風乾した。
- 3) JIS Z 2801により抗菌力評価した。

5. 4. 1 1 結果と考察5

抗菌力評価結果を図10に示した。図には、#1000 サンドペーパーで手研磨したもの、及びサンドブラスト加工、エタノール拭き品（本項と同じ評価機関(T)で実施したデータ）も併せて示した(5. 4. 8参照)。黄色ぶどう球菌では、エタノール拭き品とほぼ同じ抗菌活性値となった。他の評価機関の結果(図9)は、全般的に抗菌活性値が高いが、次のように考えられる。すなわちエタノールで拭くという操作だけでは、表面に付着している抗菌剤粒子を完全に除去できないが、超音波洗浄で除去できる可能性がある。エタノール拭きは、後処理で行なう、抗菌力評価の前処理で行なう、合計2回ある。よって評価機関によりエタノール拭きの影響に差があるが、評価機関Tにおいては、超音波洗浄と同程度まで付着粒子が除去できたものと考えられる。

一方、大腸菌においては、生菌数が検出限界以下となるほど高い抗菌活性値を示した。その原因については、SEM観察結果を待って検討したい。

以上より、黄色ぶどう球菌の結果を見る限り、コントロールサンプル作製の表面研磨方法として使用できる可能性があるが、大腸菌の結果から見ると目処は得られていない。

大腸菌における検討をさらに実施した上で、サンドブラスト加工使用可否の判断をしたい。

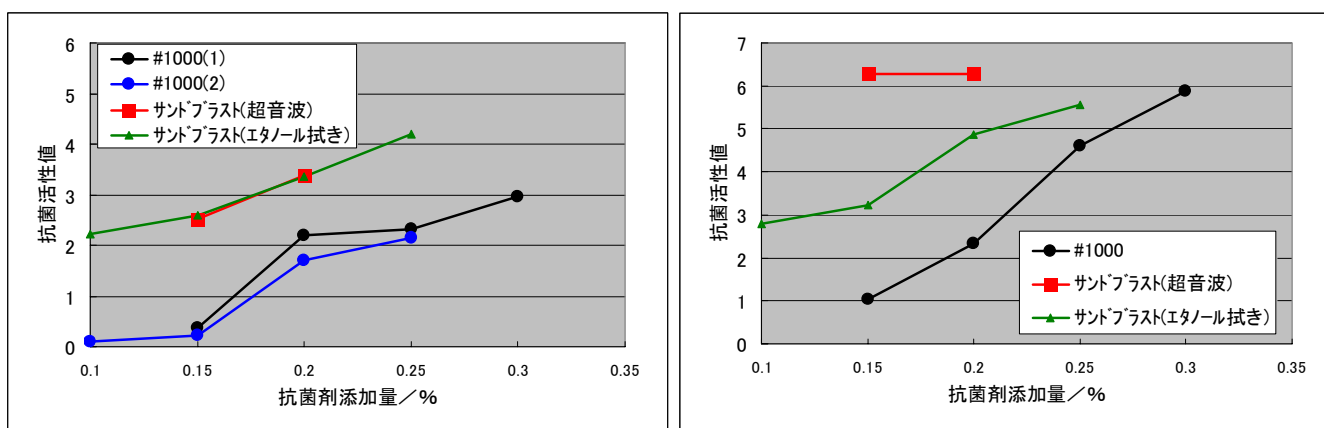


図10 サンドブラスト品の抗菌力評価結果(左：黄色ぶどう球菌、右：大腸菌)

5. 5 表面切削の検討

5. 5. 1 目的

先の試験では、表面切削したものは、未表面加工品と同程度の抗菌性能しか発現しなかった。プレート内部は、抗菌剤粒子がほぼ均一に存在しているため、抗菌剤の添加量を増やせば、安定した抗菌性能が発現できる可能性がある。そこで、抗菌剤添加量を増加し、抗菌性能との関係を調べた。

5. 5. 2 実験1(添加量検討)

- 1) 5. 3. 2と同様にPPプレートを作製した。抗菌剤添加量は0. 3～1. 0%まで、0. 1%刻みとした。
- 2) 表面切削委託加工業者に委託し、表面切削を実施した。表面切削は、表面層を所定の厚みで削る方法である。切削後の厚みを1. 8mmとした。
- 3) JIS Z 2801により、抗菌力評価した(黄色ぶどう球菌)。

5. 5. 3 結果と考察1

抗菌力評価結果を図9に示した。先の検討では、抗菌剤0. 3%添加で抗菌性能が全く認められなかったため、本試験では抗菌剤添加量を増加したが、予想に反し、ほとんどが検出限界以下となり、再現性が得られなかった。

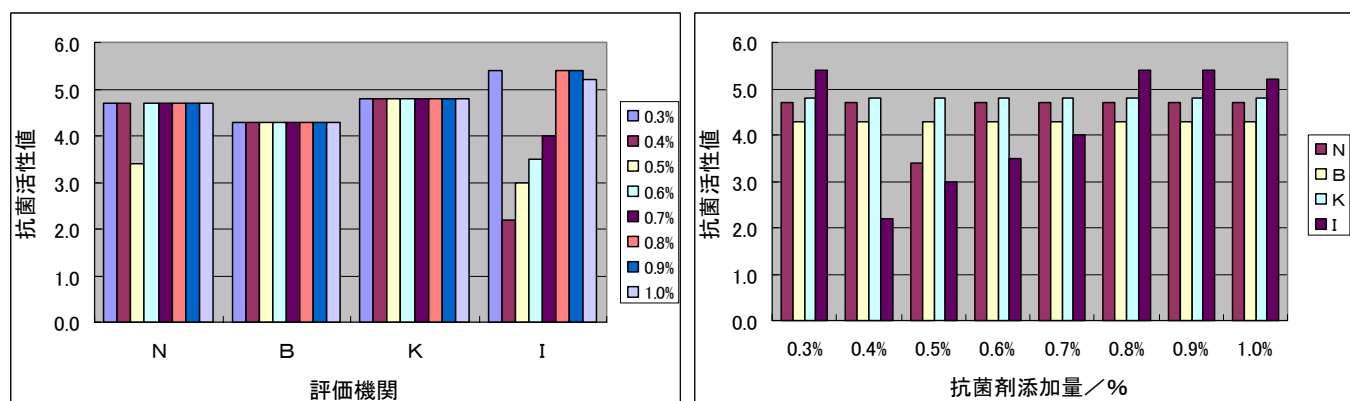


図11 抗菌力評価結果(表面切削加工品)
*N, B, K, Iは評価機関を示す

5. 5. 4 実験2(再試験)

- 1) 5. 3. 4で作製したPPプレートを使用し、再度表面切削を行なった。切削後の厚みは、プレートの反りや歪みによる削り残りが生じないために、1. 5mmとした。
- 3) JIS Z 2801により、抗菌力評価した。

5. 5. 5 結果と考察2

抗菌力評価結果を図10に示した。評価機関Nの大腸菌の結果を除いて、添加量と相関性が見られ、サンドペーパー研磨と比較的良好一致を示している。最適添加量は0. 2%程度であることがわかった。今後、サンドブラスト加工品同様、超音波洗浄等を実施し、バラツキを低下させられるかどうか検討する。

5. 5. 6 実験3(後処理条件検討)

- 1) 5. 4. 8と同様にPPプレートを作製した。ただし、抗菌剤添加量は、0.15、及び0.20%とした。
- 2) 5. 5. 4と同じ条件で表面切削加工した。
- 3) 後処理として、エタノール中に浸漬、一分間超音波を当て、終了後すぐ引き上げ、エタノール洗ビンで洗浄、風乾した。
- 4) JIS Z 2801により抗菌力評価した。

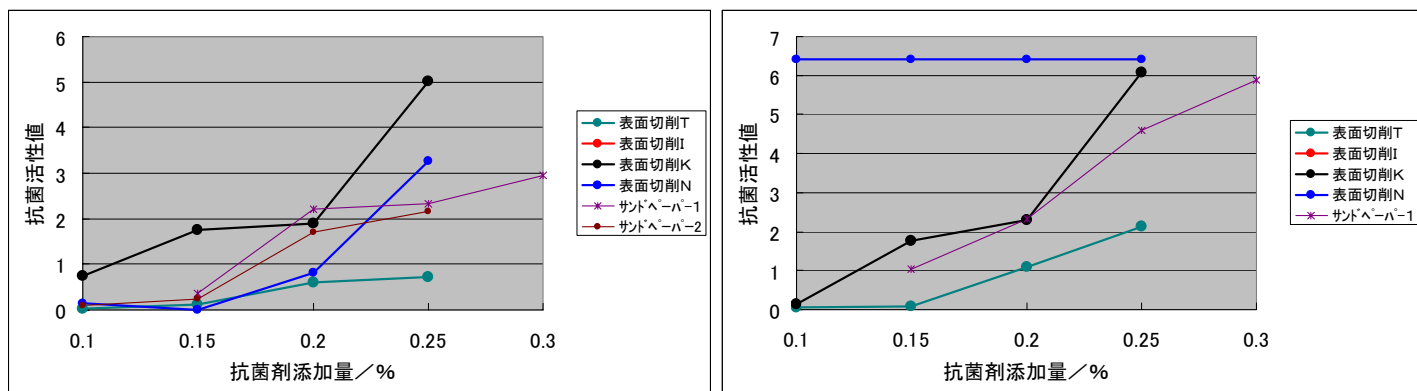


図 1.2 表面切削加工品の抗菌力評価結果(左：黄色ぶどう球菌、右：大腸菌)
*T, I, K, Nは評価機関を示す

5. 5. 7 結果と考察3

抗菌力評価結果を図 1.3 に示した。図には、#1000 サンドペーパーで手研磨したもの、及び表面切削加工、エタノール拭き品（本項と同じ評価機関(T)で実施したデータ）も併せて示した(5. 4. 8、及び5. 5. 4 参照)。黄色ぶどう球菌では、エタノール拭き品より高い値となった。他の評価機関の結果(図 1.2)も併せて見ると、0.2%添加品は、概ね抗菌活性値 1~2 の範囲に収まっている。0.25%程度添加することにより、安定した抗菌活性値が期待できる。

一方、大腸菌においては、エタノール拭き品より低い値となった。一般的に、同じ抗菌剤添加量であれば、大腸菌の抗菌活性値は、黄色ぶどう球菌のそれと同等か、あるいは高くなる。よって、本結果についてはさらなる検討が必要である。

以上より、黄色ぶどう球菌の結果を見る限り、コントロールサンプル作製の表面研磨方法として使用できる可能性があるが、大腸菌の結果から見ると目処は得られていない。

大腸菌における検討をさらに実施した上で、表面切削加工使用可否の判断をしたい。

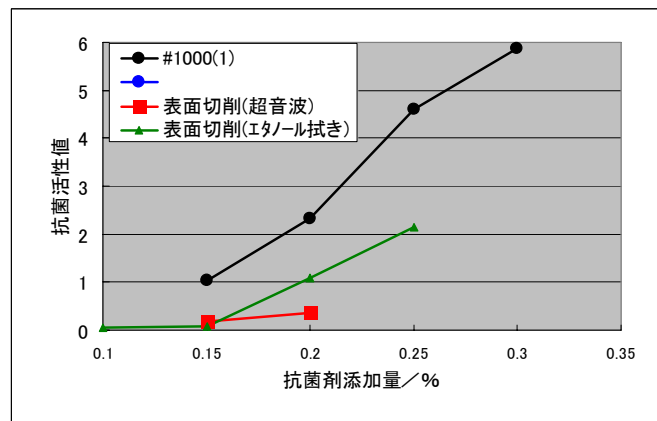
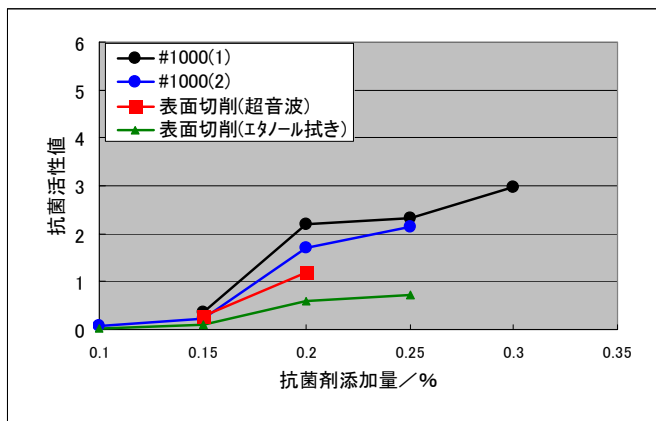


図 1 3 表面切削加工品の抗菌力評価結果(左：黄色ぶどう球菌、右：大腸菌)

5. 6 表面研磨の検討

5. 6. 1 目的

平成16年度の試験では、バフ研磨では、スキン層除去にバラツキがあり、本目的に対してふさわしい方法とは言えないと結論付けたが、バフ研磨という方法自体にバラツキがあるためか、あるいはその時の研磨試験そのものにバラツキがあるのか定かではなかった。よって、本項では、その確認を実施する。

5. 6. 2 実験1

- 1) 5. 4. 8で作製したPPプレートを使用し、表面研磨を行なった(委託加工先から詳細について未聴取、バフ研磨かどうか不明)。
- 2) 後処理として、窒素ブローした。
- 3) JIS Z 2801により抗菌力評価した。

5. 6. 3 結果と考察1

抗菌力評価結果を図11に示した。評価機関N及びKの結果は、抗菌活性値と添加量に比例関係が見られなかったが、評価機関Tは相関性が見られ、かつサンドペーパー研磨品と類似した結果となった。試験片を見ると研磨面がスムーズでないため、正規の機械では実施せず、かなりラフな作業状況が推定される。そのため、バラツキが出たものと考えられる。

しかし、添加量と相関性が得られたということは、研磨条件及び後処理条件を最適なものとするにより、コントロールサンプルとしての適用可能性があると考えられる。よって今後、別の加工業者に委託し確実にバフ研磨を実施し、また超音波を用いた後加工を実施することとする。

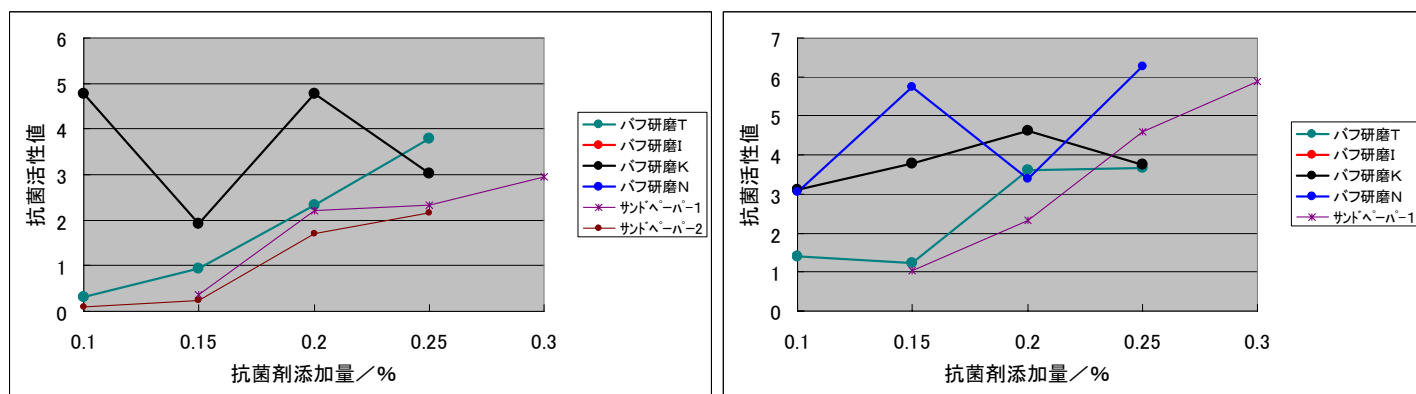


図14 表面研磨品抗菌力評価結果(左：黄色ぶどう球菌、右：大腸菌)

*T, I, K, Nは評価機関を示す

5. 6. 4 実験2

- 1) 5. 3. 4で作製したPPプレートを用い、表面バフ研磨を行なった。
- 2) 後処理として、エタノール中に浸漬、一分間超音波を当て、終了後すぐ引き上げ、エタノール洗ビンで洗浄、風乾した。
- 3) JIS Z 2801により抗菌力評価した(黄色ぶどう球菌および大腸菌)。

5. 6. 5 結果と考察2

抗菌力評価結果を図15に示した。図には、#1000 サンドペーパーで手研磨したもの、及び表面研磨、エタノール拭き品（本項と同じ評価機関(T)で実施したデータ）も併せて示した(5. 4. 8、及び5. 6. 2参照)。黄色ぶどう球菌では、0. 15%、0. 20%ともほぼ同じ抗菌活性値を示した。大腸菌の結果を見る限り、コントロールサンプル作製の表面研磨方法として使用できる可能性があるが、黄色ぶどう菌の結果から見ると目処は得られていない。

黄色ぶどう球菌における検討をさらに実施した上で、表バフ研磨加工使用可否の判断をしたい。

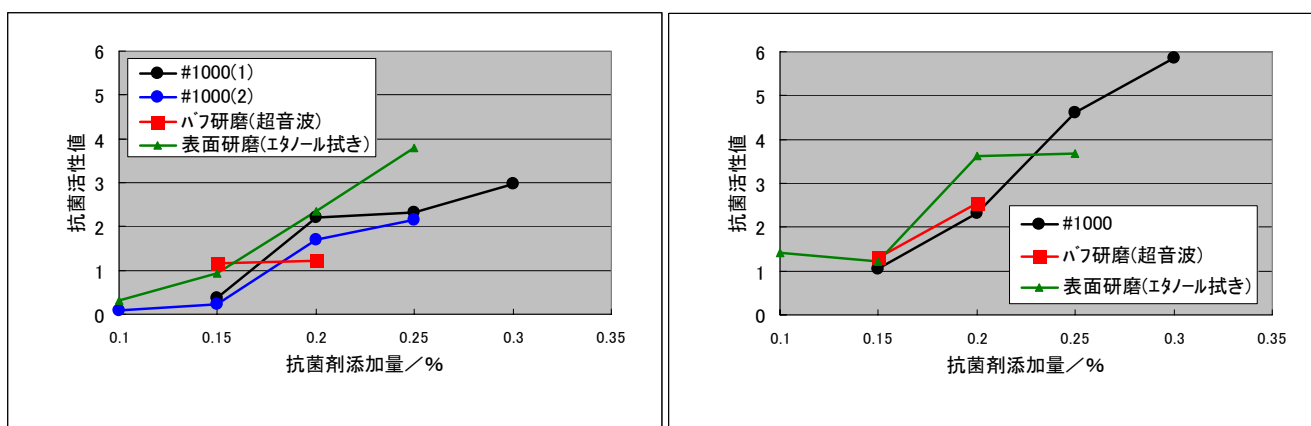


図15 バフ研磨品抗菌力評価結果(左：黄色ぶどう球菌、右：大腸菌)

5. 7 研磨剤打ち込み検討

5. 7. 1 目的

これまでは、抗菌剤を練り込んだ樹脂プレートの表面スキン層を除去する検討を行っていたが、本項では、逆の発想で未加工プレートに、抗菌剤粒子を打ち込むことを検討した。

5. 7. 2 実験

1) 抗菌剤を含まないプレート②を作製し、打ち込み検討用試料とした。
2) 抗菌剤粒子(銀担持ゼオライト)をサンドブラスト加工における研磨剤として用い、樹脂プレートをサンドブラスト加工した。加工条件は次のようである。なお、銀担持リン酸ジルコニウムは流動性が低いため、研磨剤として使用することができなかった。

- ・噴射圧： ①0. 3 5 M P a、 ②0. 5 M P a
- ・時間： 1 0 秒
- ・プレート： ①P E、 ②P P

3) 後処理として、エタノールで拭いた。

4) JIS Z 2801 により抗菌力評価した(黄色ぶどう球菌)。またプレート表面の S E M 観察を行なった。

5. 7. 3 結果と考察

抗菌力評価結果を図 1 2 に示した。噴射圧が高いほど、また柔らかい P E ほど抗菌活性値が高くなると予想されるが、その傾向は見られなかった。

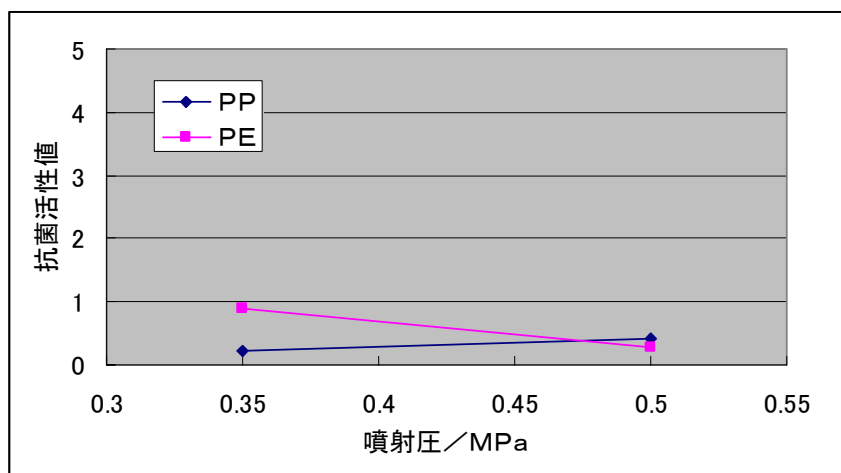


図 1 6 サンドブラスト噴射圧と抗菌活性値の関係

S E M 写真を写真 6 に示した。その結果、P E より P P のほうが、また 0. 3 5 より 0. 5 M P a のほうが表面の荒れが激しくなっているのがわかるが、ゼオライト粒子が埋め込まれているところは観察できなかった。隕石によるクレーター様のものができるだけであり、サンドブラストを用いた抗菌剤打ち込みは困難であることがわかった。本検討は、終了とした。

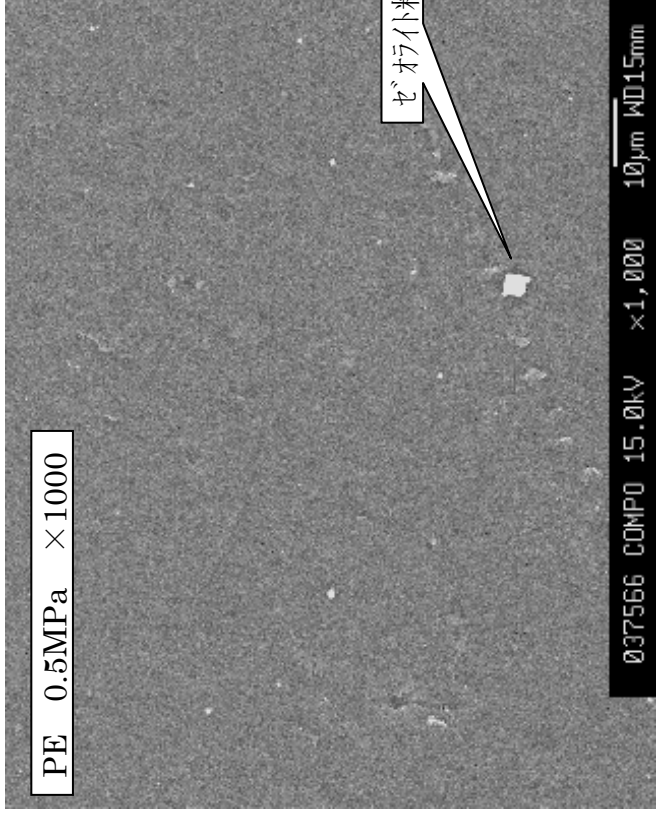
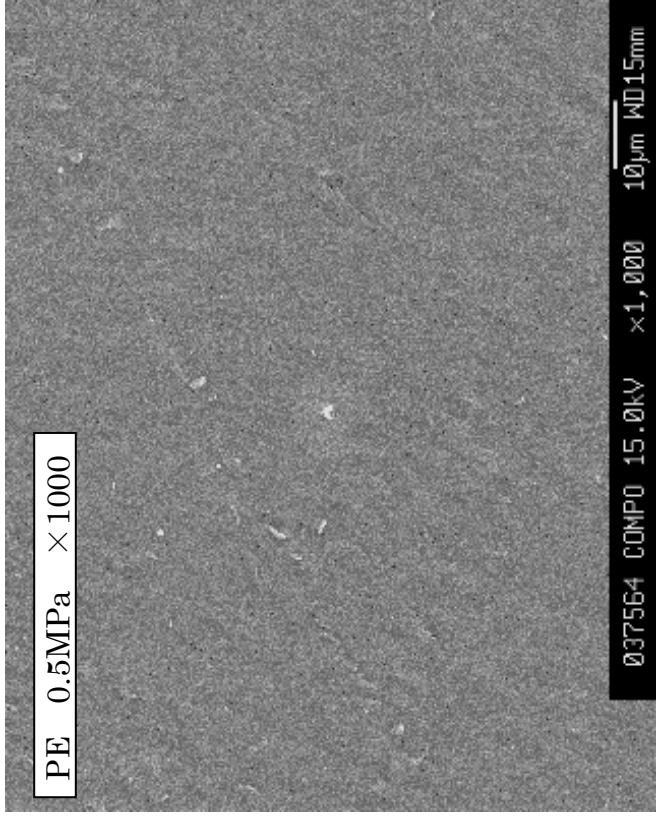
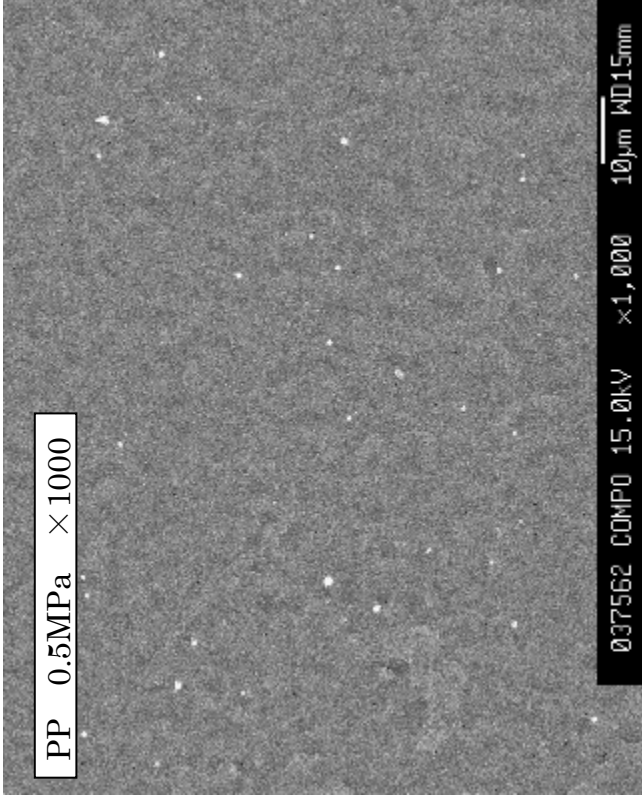
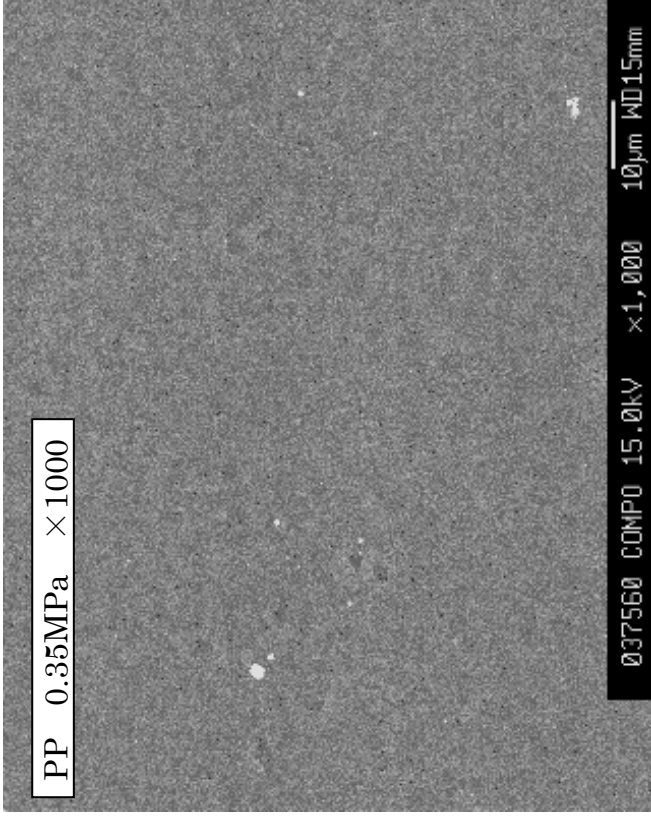


写真6 抗菌剤打ち込みプレート SEM写真

5. 8 レーザー加工検討

5. 8. 1 目的

レーザーは、微細穴あけ加工等に用いられるが、ここではレーザーを試料表面にスキャンすることにより、抗菌剤を練り込んだ樹脂プレートの表面スキン層を除去することを検討した。

5. 8. 2 実験

1) 5. 4. 6 で作製した P P プレートを使用し、レーザー加工業者に委託し、レーザー加工を施した。なお、照射するレーザーの強度は、委託先で予備検討を実施し、10～25 W で実施することとした。

2) JIS Z 2801 により抗菌力評価した(黄色ぶどう球菌)。またプレート表面の S E M 観察を行なった。

5. 8. 3 結果と考察

抗菌力評価結果を図 1 3 に示した。本試験に用いた試料は、5. 4. 6 で用いたものと同じであるため、レーザー加工してないものでも抗菌活性値が高い値となった。しかし、レーザー加工することにより抗菌活性値は低下した。

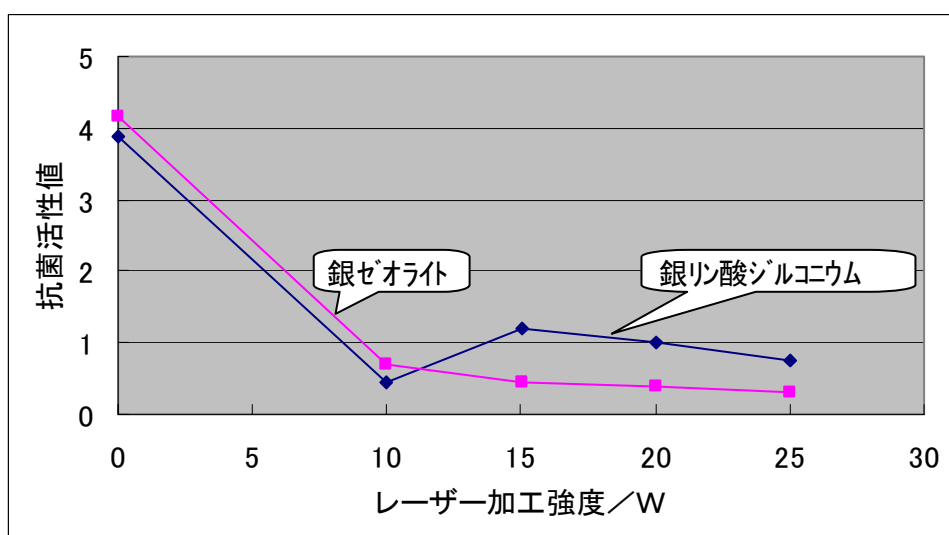


図 1 7 レーザー強度件と抗菌活性値の関係

S E M 写真を(反射電子像)を写真 7 に示した。加速電圧を 1 5 k v と 1 0 k v の 2 水準で測定した(加速電圧を変えて撮影する目的は、5. 3. 3 参照)。1 0 k v の写真で確認できる粒子数を数え、抗菌活性値との関係を図 1 4 にプロットした。その結果、銀担持リン酸ジルコニウム、銀担持ゼオライトとも、レーザー加工により粒子数が減少したため、抗菌活性値が低下したと推測される。

レーザー加工品は、見た目ではかなりの凹凸が見られる。表面が一旦融解し、再度固まったように見られる。すなわち、樹脂溶解時に抗菌剤が樹脂内部に沈み込み、固化する際に内部に閉じ込められたことが示唆される。なお S E M 観察は、凹凸の底の部分で実施した。上部は、ほとんど抗菌剤粒子が見られなかったためである。

レーザーの強度を、融解・固化が起こらない程度まで低下させることにより、最適な加工条件が存在する可能性もあるが、委託加工先によれば、5 W より強度を低下させると、安定した加工ができないとことであつたため、本検討は終了とする。

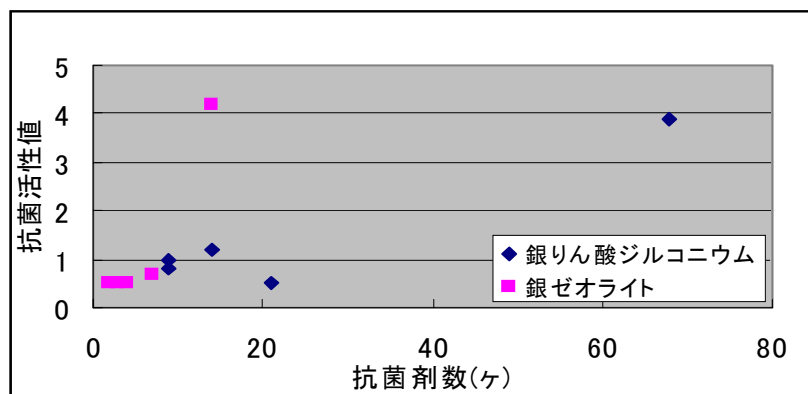


図 1 8 レーザー加工品の表面粒子数と抗菌活性値の関係

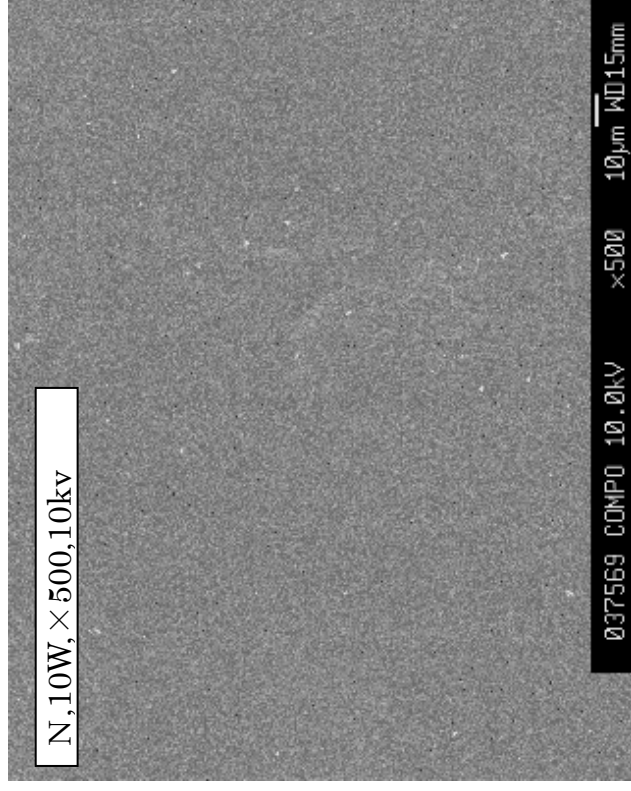
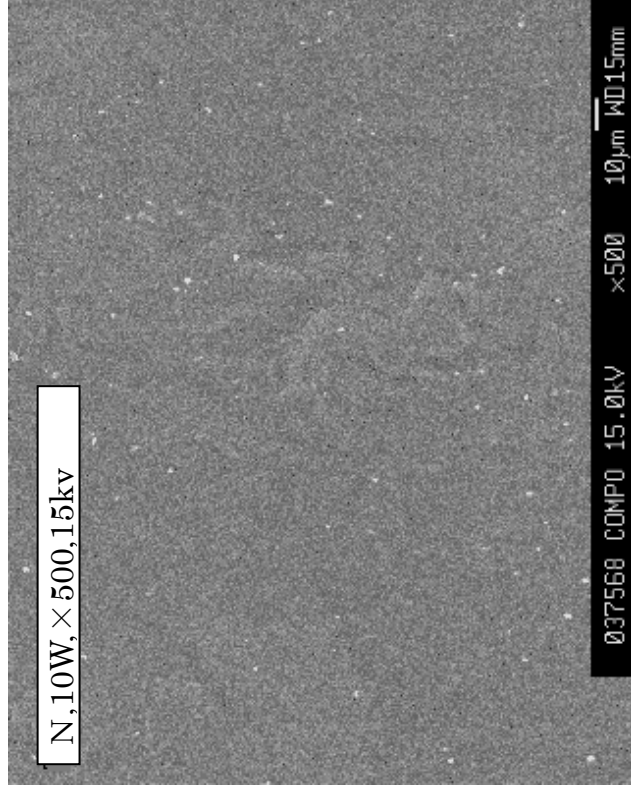
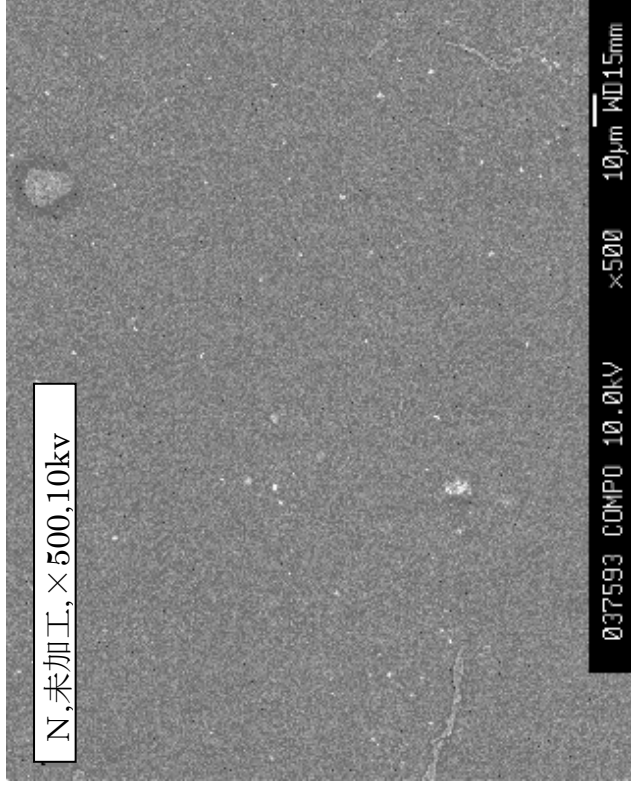
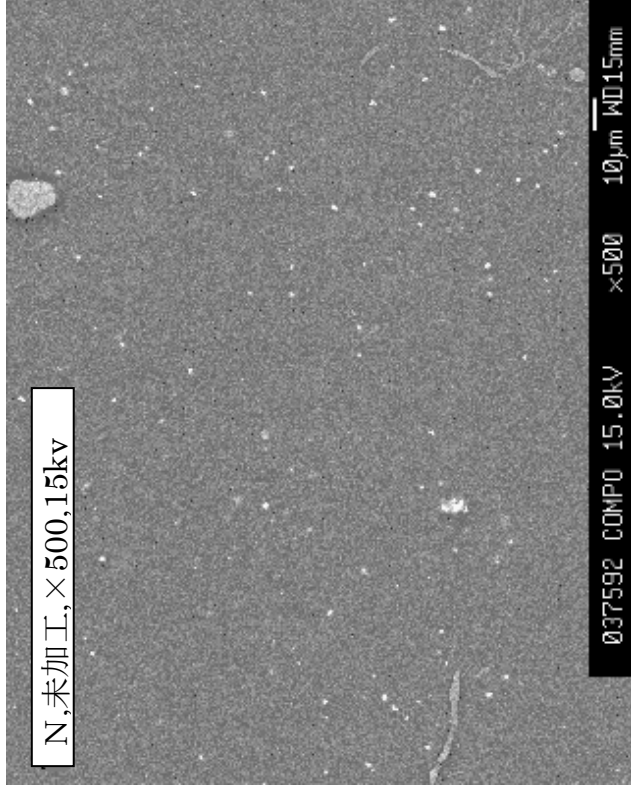


写真7 レーザー加工プレート of SEM写真(Nは銀担持リソ酸ジフルコハム、Bは銀担持セハロイ)

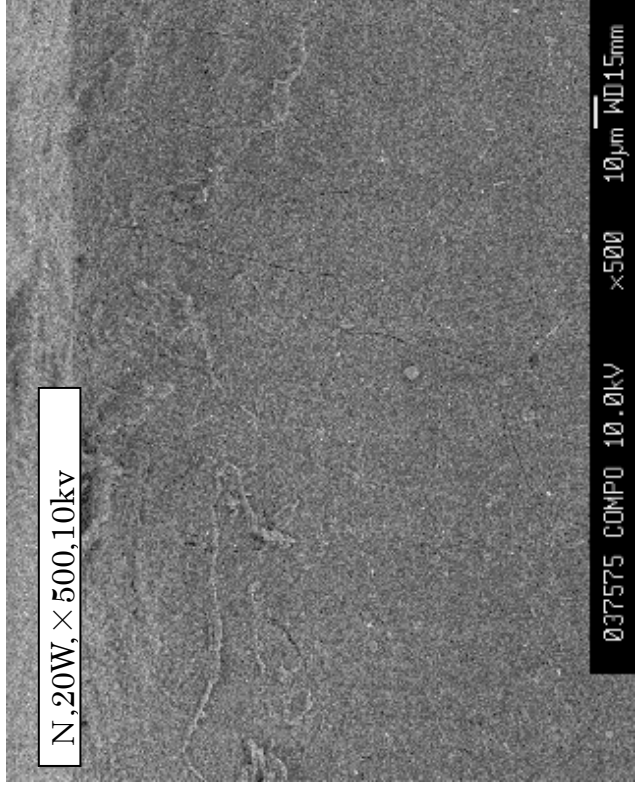
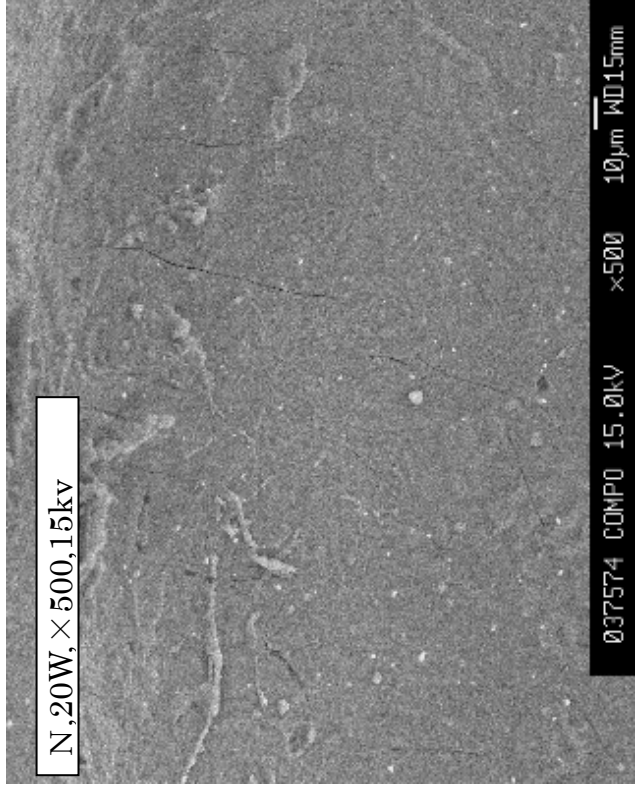
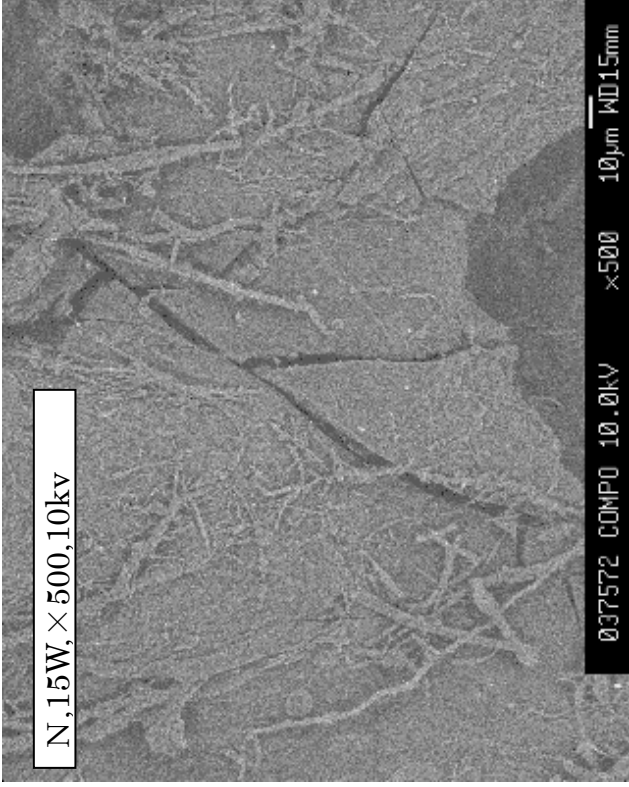
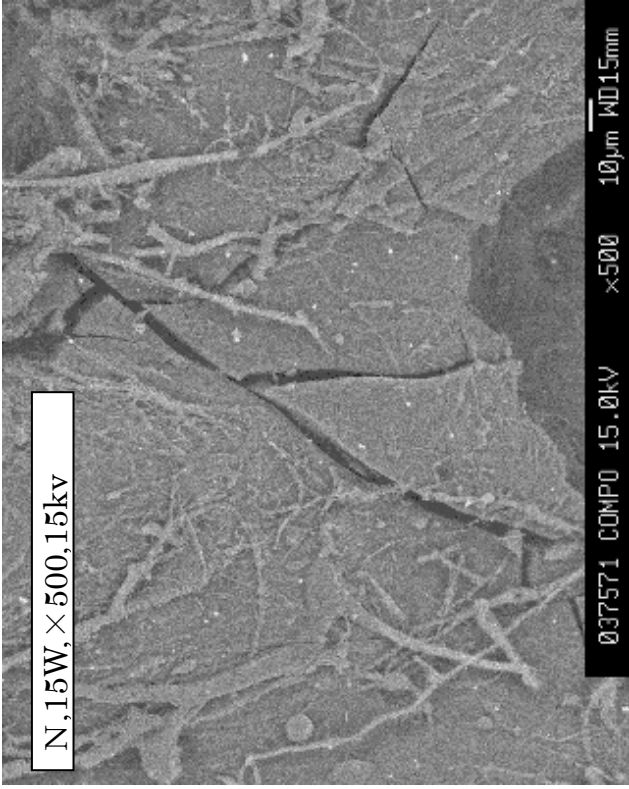


写真7 (つづき1)

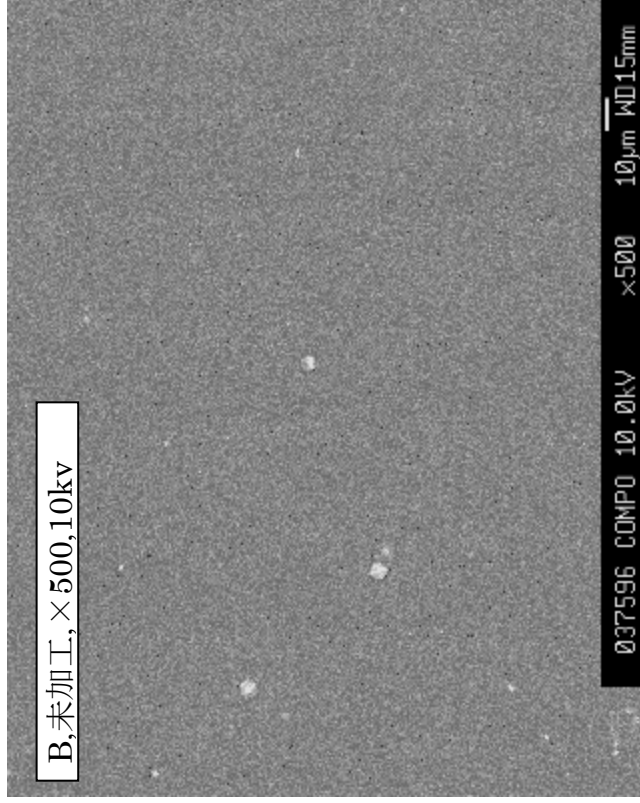
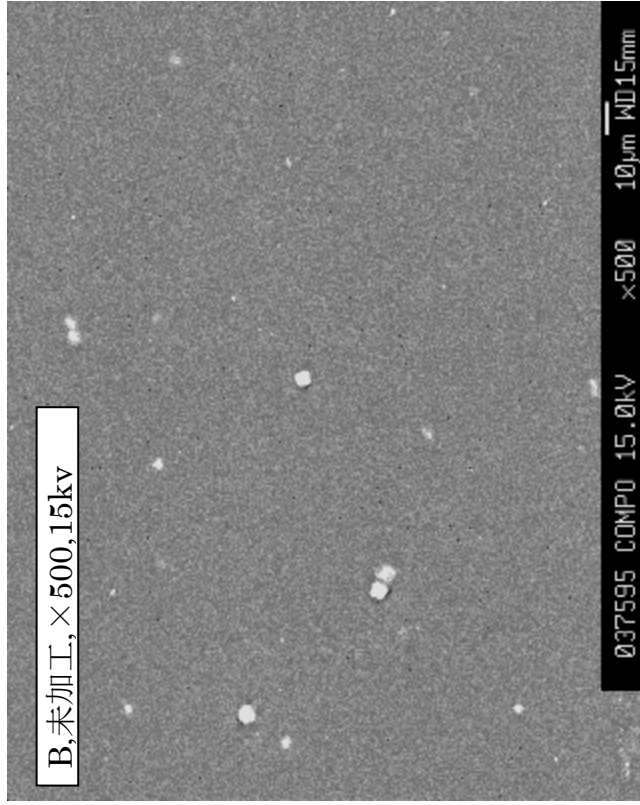
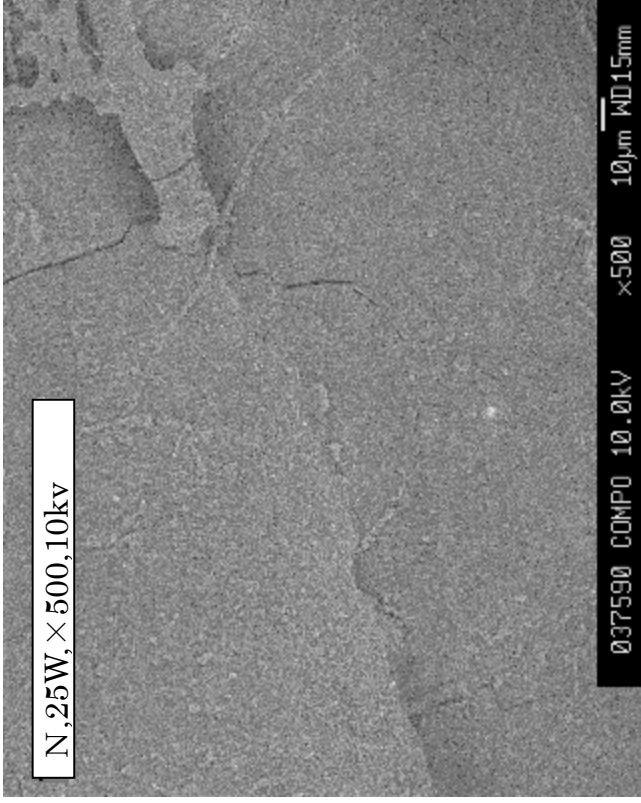
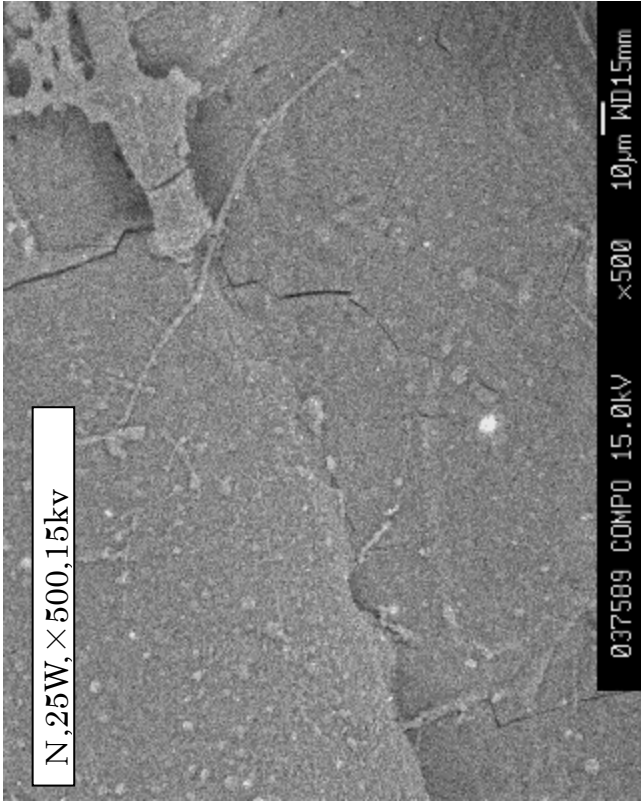


写真7 (つづき2)

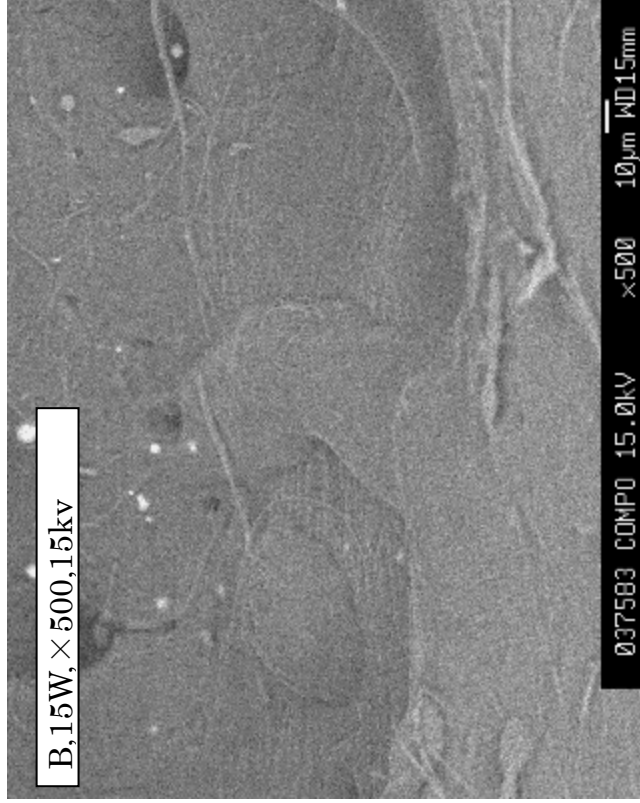


写真7 (つづき 3)

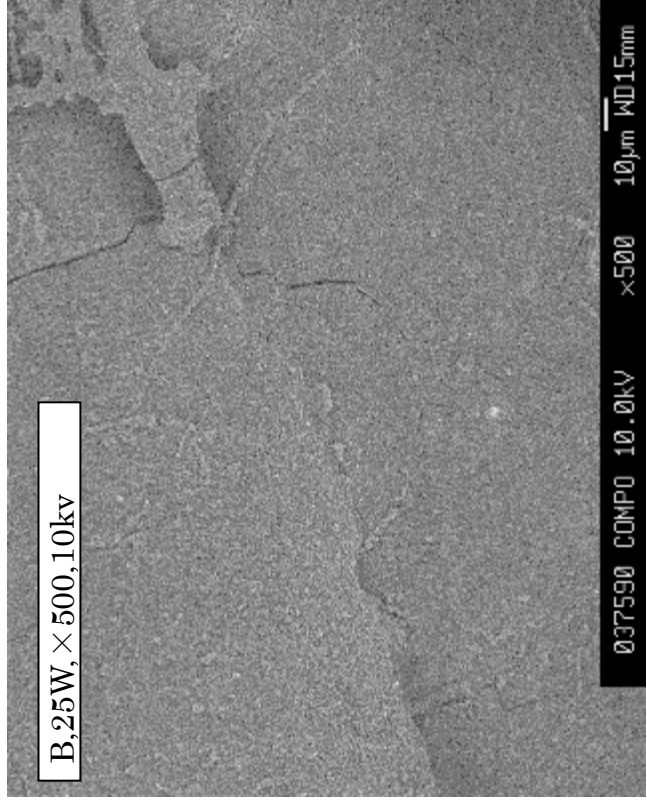
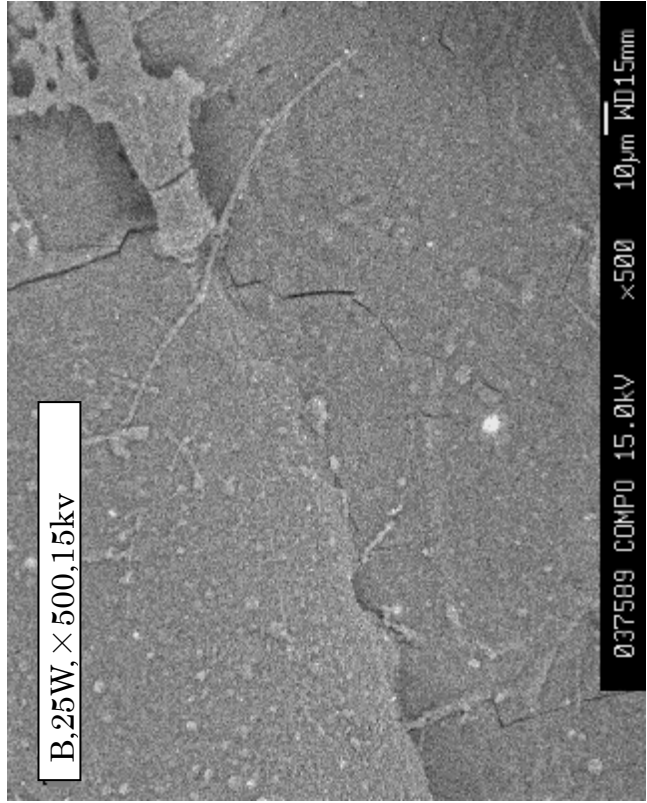
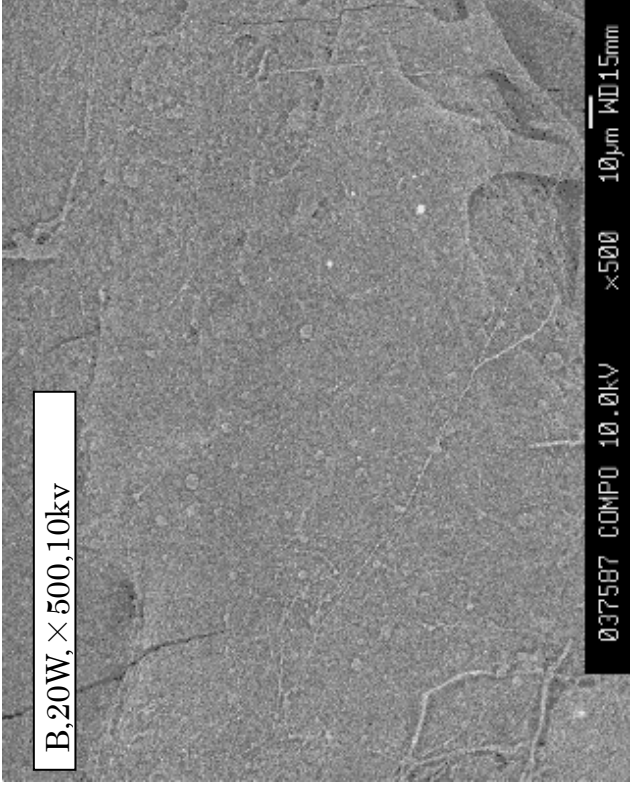
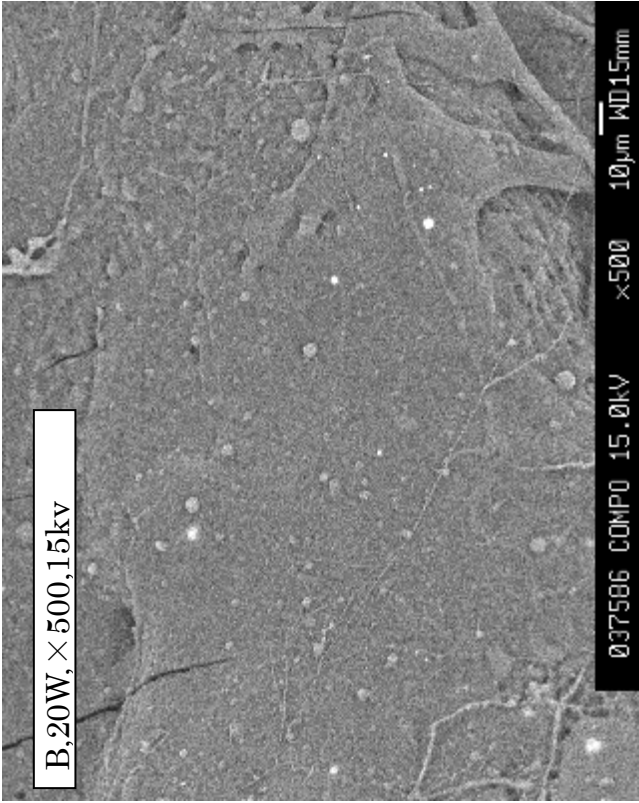


写真7 (つづき4)

5.9 表面エンボス加工の検討

5.9.1 目的

樹脂練り込み品の抗菌性能を安定して発現させる方法として、表面スキン層の除去、すなわち表面を何らかの方法で荒らすことを検討しているが、試験片をインジェクション成形する際に、凹凸をつけること（＝エンボス加工、エンボス仕上げをした金型で成形する）により安定した抗菌性能が発現できないかどうか検討する。

5.9.2 実験

1) M/B HEM-0E712を用い、プレート②を作製した。金型はエンボス仕上げをした既存品を用いた。エンボス仕上げは、凹凸の深い部分と浅い部分の2種がある。

2) JIS Z 2801により抗菌力評価した。

5.9.3 結果と考察

抗菌力評価結果を図15に示した。その結果、抗菌性能はほとんど見られなかった。灰分測定結果を図16に示したが、ほぼ所定量が添加されている。これまでの検討の結果、抗菌剤を0.2%添加し、後加工を施したものは抗菌性能が発現されているので、金型に凹凸をつけて成形するだけでは抗菌性能を発現させることはできず、成形後の表面加工は必須であることがわかった。

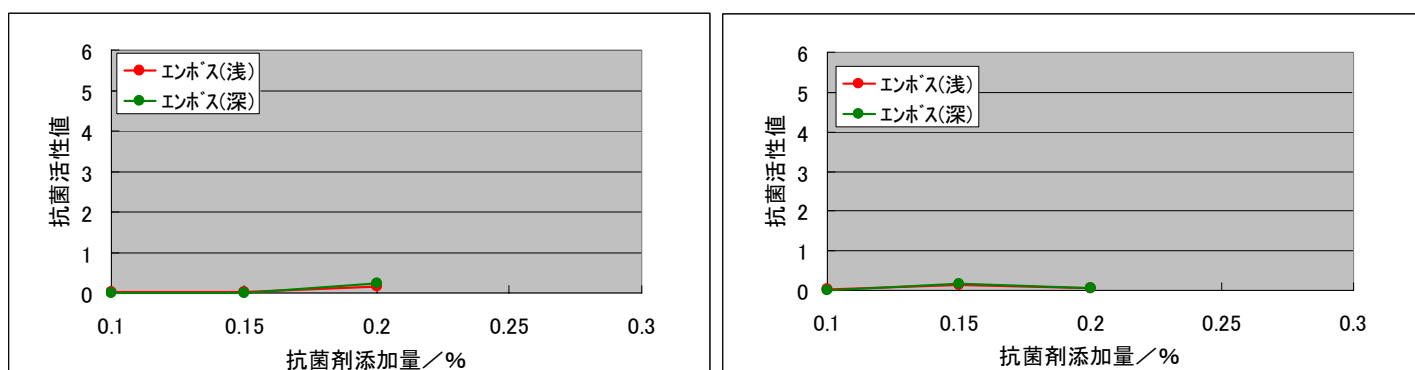


図19 エンボス加工品抗菌力評価結果(左：黄色ぶどう球菌、右：大腸菌)

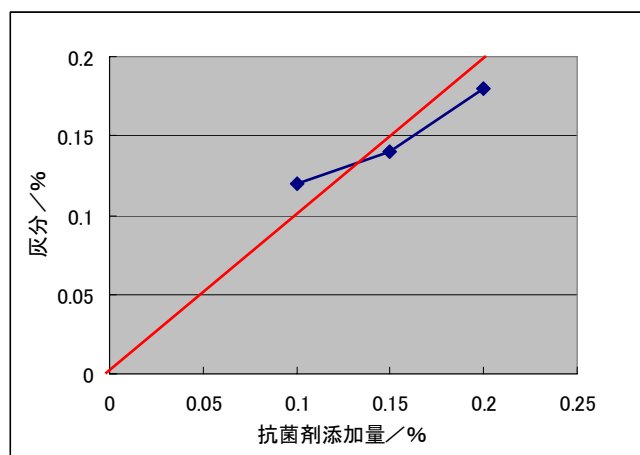


図20 エンボス加工品の灰分測定結果

5.10 シンクロトロン放射 X 線による銀の分析(XAFS)

5.10.1 目的

SPring-8のBL39XUのシンクロトロン放射X線を用いてバイオ基板の解析を実施したが(4.6.6参照)、銀担持リン酸ジルコニウムを添加したPPプレートも併せて試験を行ない、銀の状態について調べた。

5.10.2 実験

- 1) 5.4.6で作製したPPプレートを試験用試料とした(銀担持リン酸ジルコニウムは0.275%)。
- 2) XAFS測定条件は、4.6.6.1と同じである。

5.10.3 結果と考察

図16に吸光度生データを示した。図17には、硝酸銀水溶液、及び銀ホイルの結果も併せて規格化強度プロットを示した。さらにXANESについて詳細に解析するためにスペクトルをフーリエ変換した(図18)。その結果、銀担持リン酸ジルコニウムは硝酸銀水溶液とほぼ同じスペクトルを示すことがわかった。このことから、銀担持リン酸ジルコニウム中の銀は、イオンとして存在していることがわかった。すなわち、リン酸ジルコニウムへの銀の担持はイオン交換反応により行なっているが、イオン交換後も、陰電荷を帯びた結晶内のキャビティーにイオンとして存在していることが確認された。

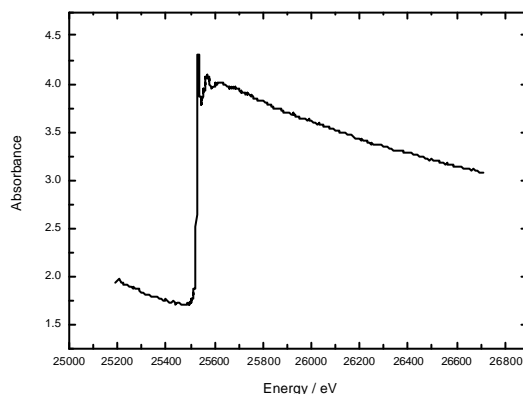


図 2 1 銀担持リン酸ジルコニウムを添加したPPプレートのXAFS分析

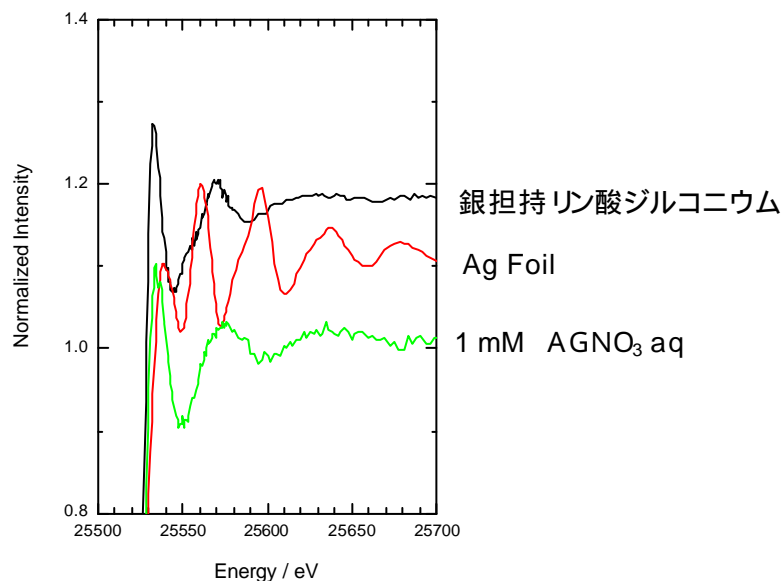


図 2 2 XANES分析の規格化強度プロット

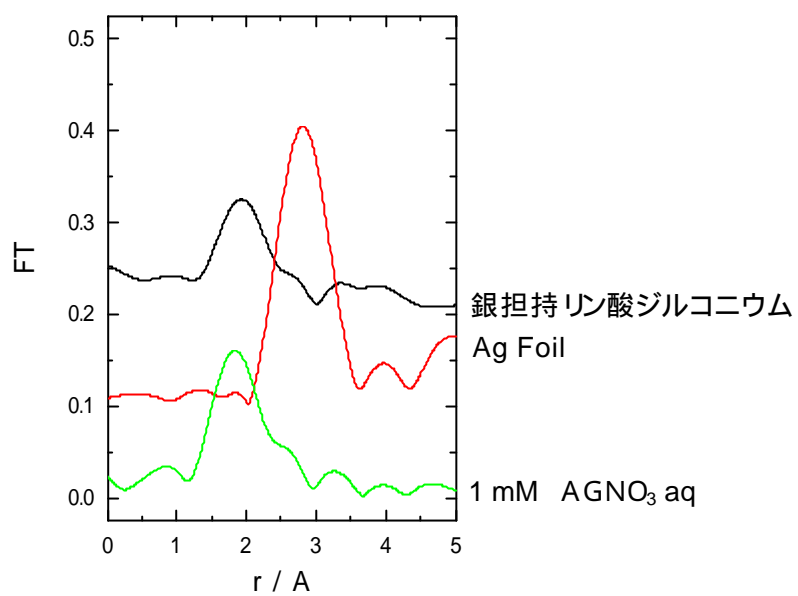


図 2 3 XANES分析のフーリエ変換プロット

5. 1 1 まとめ

これまでの検討の結果、つぎのことがわかった。

1. サンドペーパー研磨

銀系無機抗菌剤を練り込んだ樹脂プレート表面をサンドペーパー研磨することにより、抗菌剤添加量と抗菌活性値に相関性が見られた。

サンドペーパーの研磨剤粒子を抗菌剤粒子と同等程度にすれば、研磨キズ(溝)の部分に抗菌剤粒子が溜まる問題は解決できることがわかった。

回転研磨機を用いて研磨条件を一定にし(作業者によるばらつき排除)、後処理としてエタノール中で超音波洗浄することにより、安定した抗菌性能を発現できるコントロールサンプル作製の可能性が見出された。

2. サンドブラスト加工

樹脂プレート表面をサンドブラスト加工し、後処理としてエタノール中で超音波洗浄することにより、黄色ぶどう球菌では、抗菌剤添加量と抗菌活性値に相関性が見られた。また目標とする抗菌活性値、2～3のものが得られた。

大腸菌では十分な結果は得られていないが、サンドブラスト加工を用いることにより、安定した抗菌性能を発現できるコントロールサンプル作製の可能性が示唆された。

3. 表面切削加工

樹脂プレート表面を表面切削加工し、後処理としてエタノール中で超音波洗浄することにより、安定した抗菌性能を発現できるコントロールサンプル作製の可能性が見出された。

4. バフ研磨加工

樹脂プレート表面をバフ研磨し、後処理としてエタノール中で超音波洗浄することにより、大腸菌では、抗菌剤添加量と抗菌活性値に相関性が見られた。また目標とする抗菌活性値、2～3のものが得られた。

黄色ぶどう球菌では十分な結果は得られていないが、バフ研磨を用いることにより、安定した抗菌性能を発現できるコントロールサンプル作製の可能性が示唆された。

5. 樹脂プレートへの抗菌剤打ち込み

樹脂プレート表面(抗菌剤未添加)に抗菌剤粒子を、サンドブラスト機を用いて打ち込みことを検討したが、表面を若干荒らすだけとどまり、打ち込むことはできなかった。

6. レーザー加工

樹脂プレート表面をレーザー加工したが、レーザーで樹脂が溶解し、その際、抗菌剤が樹脂内部に沈み込み、固化する際に内部に閉じ込められてしまうことにより、抗菌性能が著しく低下した。

7. 凹凸をつけた(エンボス加工した)金型を用いて射出成形することにより、表面加工することなしに安定した抗菌性能を発現させることを期待したが、ほとんど示さなかった。成形後の表面加工は必須であることがわかった。

8. Spring-8 のシンクロトロン放射 X線を用いて、銀担持リン酸ジルコニウムを練り込んだ樹脂プレートの X A F S 解析を行なった。その結果、銀担持リン酸ジルコニウム中の銀は、イオンとして存在することが確認された。

9. 以上の結果をまとめると、表 9 のようになる。

表 1 6 表面研磨検討結果のまとめ

表面研磨方法	抗菌性能	再現性	工業的生産安定性
サンドペーパー研磨	△	○～△	○～△
サンドブラスト加工	○～△	△	○～△
表面切削加工	△	○～△	○
バフ研磨加工	○～△	△	○～△
樹脂プレートへの抗菌剤打ち込み	×		
レーザー加工	×		

6. 調査研究のまとめ

コントロールサンプルの調査研究を次の2つの方法を中心に実施し、下記の成果を得た。

分類	検討課題
バイオ基板	①プロテインアンカーを用いたナノ分子の基板固定化技術の検討
バイオ基板以外	②銀系無機抗菌剤練り込み樹脂（表面研磨）の検討

6. 1 バイオ基板

- 1) 支持基材／コレステロール／コレステロール結合性タンパク／抗菌剤からなるバイオ基板によるコントロールサンプル開発の目処を得ることができた。
- 2) 基板構成成分の機能、必要性を検討した結果、上記4成分が必須であることが確認できた。
 - ・支持基材：JIS Z 2801 で抗菌力評価が出来るための基板
 - ・コレステロール：支持基材とタンパクの結合
 - ・コレステロール結合性タンパク：必要な抗菌剤量の保持
 - ・抗菌剤：抗菌性能発現
- 3) 支持基材として、PVDF 及びフェニルトリクロロシランで自己組織化したシリコンウェハの検討を行ない、両者とも使用できることがわかった。そのうち、コントロールサンプルの作製のしやすさ、抗菌力評価のしやすさ等の理由により、後者を最終候補材料として選定した。
- 4) コレステロール結合性タンパクとして、毒性の無い **pro-VCH** を選定した。大腸菌で発現・分離することにより大量に **pro-VCH** を作製する方法を確立し、量産対応の目処を得た。
- 5) 抗菌剤としてタンパクとの結合性、安定性等を考慮して金属イオンに絞って検討した結果、銀を選定した。
- 6) PVDF／コレステロール／**pro-VCH**／銀よりなるバイオ基板で、抗菌活性値が2～3のものを得ることができた。
- 7) フェニルトリクロロシランで自己組織化したシリコンウェハー／コレステロール／**pro-VCH**／銀よりなるバイオ基板では、抗菌活性値が6を超えた。抗菌活性値が2～3となる作製条件を見出すことが必要である。
- 8) バイオ基板の表面分析を各種方法で実施した結果、免疫ブロット法、及び ESCA では、タンパク質、及び銀の存在は確認できなかった。AFM、SEM による観察の結果、**pro-VCH** がコレステロールを介して結合していることが示唆された。
- 9) 極微量の元素分析が可能なシンクロトロン放射 X線を用いて分析した(Spring-8)。その結果、基板上に銀が存在することが確認された。さらに EXANS 領域の振動構造解析によって、Ag は主に Ag^0 および Ag^+ として基板上に吸着されていることが示唆された。

6. 2 無機系抗菌剤練り込みプレート(表面研磨)

- 1) 銀系無機抗菌剤を練り込んで成形したプレートの表面スキン層を除去することにより(=表面加工により)、目標とする抗菌活性値を示すことが確認された。
- 2) 表面加工の方法としてサンドペーパー研磨、サンドブラスト加工、表面切削加工、バフ研磨

加工、及びレーザー加工を検討した結果、前4者で抗菌剤添加量と抗菌活性値の相関性が見られた(複数の機関で抗菌力評価し、そのうち一部で相関性が認めれるケースと、1菌種で相関性が認めれるケースあり)。抗菌活性値2~3を発現させるための、銀担持リン酸ジルコニウムの適正添加量は、黄色ぶどう球菌、大腸菌いづれに対しても、0.2ないし0.25%であることがわかった。

- 3) 各種表面加工を実施した場合、研磨剤粒子、および樹脂から掻き出された抗菌剤粒子が付着し、それが抗菌活性値に正の誤差を生じさせる。これらを除去する後処理方法を検討した。検討途中であるが、エタノール中で超音波洗浄する方法が好ましいと考えられる。

目標とするコントロールサンプルを作製するには到らなかったが、後処理処方を決定し、表面加工方法ごとに適切な抗菌剤添加量を設定すれば処方確立できるものと考えている。

- 4) シンクロトロン放射 X 線を用いて分析した結果、銀担持リン酸ジルコニウム中に銀は、Ag イオンとして存在することが示唆された。

7. 今後の課題

7. 1 バイオ基板

支持基板と抗菌剤としてシリコウエハと硝酸銀がそれぞれ有望であることが分かった。今後解決すべき問題としてシリコンと硝酸銀水溶液の反応を回避する方法を見いだす必要がある。その解決策の1つとしてアルカンチオール化合物と金の反応 (Au-S 結合) を利用する方法がある。本報告では、シリコン基板上にフェニルトリクロロシランを自己組織化させているが、基板表面を金にし、コレステロールを吸着させる物質としてSH基とフェニル基を両端に持つ化合物を用いれば容易に表面が金の基板に結合する。金は真空蒸着で薄膜を基板表面に作れば良く、その下層基材は金の蒸着が可能でフラットな面を持つものであれば何を使っても良いという利点がある。コスト的にみるとシリコンウエハは高価であり、アルカンチオール化合物と金の反応を利用した自己組織化膜の方が安価になる可能性がある。また、アルカンチオール化合物の方はSH基とフェニル基を両端に持つアルキル鎖は、自己組織化膜を形成しフェニル基が疎水性の空気相へ配向するので、PhTCS 単分子膜と同様にコレステロールの吸着剤として理想的である。市販と合成両面からこのようなアルカンチオール化合物の入手する方法を検討する必要がある。

SPring-8のシンクロトロン放射X線を用いてバイオ基板上にAgが存在することを確認したが、さらに詳細なAgの存在様式について検討を行う必要がある。また、極微量のAgがシンクロトロン放射X線によって検出できることが分かった。そこでこれまで不可能であると考えられていたバイオ基板から細菌へ移動したAgの検出を、シンクロトロン放射X線によって行うことを今度の課題としたい。

これら検討を加え、バイオ基板の作製処方決定後、実用に供することが可能な生産方法の確立を目指す。

7. 2 無機系抗菌剤練り込みプレート(表面研磨)

銀系無機抗菌剤を練り込んで成形したプレートを表面加工することにより、抗菌活性値をコントロールできる可能性が見出された。早急に付着粒子を除去できる後処理方法を確立した上で、最適表面加工方法の選定、及び最適添加量の設定を行なう。さらに、量産化方法の確立、評価機関内・評価機関間の誤差の検討、経時変化性、及び包装形態・製品仕様検討を実施する。

両基板とも、期間内に目標を達成することが出来なかったが、今後、抗菌製品技術協議会の活動として継続する。

バイオ基板は、H18年度末までに、シリコンウエハ基材を用いた材料の処方確立と量産化の目処つけることを目指す。

無機系抗菌剤練り込みプレート(表面研磨)は、上記検討をH18年度上期中にすべて終え、下期始めにはコントロールサンプルを供給開始できることを目指す。

[添付資料]

1. 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会名簿
2. 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会ワーキンググループ名簿
3. 実施計画、研究体制
4. 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会議事録
5. 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員ワーキンググループ議事録
6. 調査研究の実施能力

H17年度 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会名簿

(順不同, 敬称略)

	区分	氏名	所属	部署	役職
1	委員長	高麗 寛紀	徳島大学	工学部生物工学科	教授
2	副委員長	松岡 英明	東京農工大学	工学部生命工学科	教授
3	委員(WG)	生貝 初	鈴鹿工業高等専門学校	生物応用化学科	教授
4	委員	坂本 耕三	経済産業省	産業技術環境局認証課	課長補佐
5	委員	諸永 裕一	経済産業省	製造産業局デザイン・人間生活システム政策室	室長補佐
6	委員	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
7	委員	登坂 孜	(独)製品評価技術基盤機構	認定センター	次長
8	委員(WG)	杉本 茂	(財)日本食品分析センター	品質システム室	部長
9	委員	卜部 勝資	(社)繊維評価技術協議会	事務局	
10	委員(WG)	山本 則幸	東亜合成(株)	新事業企画開発部	部長代理
11	委員(WG)	今井 茂雄	(株)INAX	総合技術研究所 要素技術開発室	課長
12	委員(WG)	山本 幸一	石塚硝子(株)	抗菌試験所	所長
13	委員(WG)	八代 敏晴	富士ケミカル(株)	技術開発部	部長
14	オブザーバー	菅原 大門	経済産業省	産業技術環境局基準認証ユニット認証課	
15	オブザーバー	内藤 智男	経済産業省	製造産業局デザイン・人間生活システム政策室	係長
16	オブザーバー	稲葉 知英	(独)製品評価技術基盤機構	認定センター	主任
17	オブザーバー(WG)	川合 晶子	(独)製品評価技術基盤機構	認定センター	主任
18	オブザーバー	飯村 兼一	宇都宮大学	工学部応用化学科	助教授
19	事務局	藤本 嘉明	抗菌製品技術協議会		専務理事、 事務局長
20	事務局	林 進	抗菌製品技術協議会		常任理事

H17年度 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会ワーキンググループ名簿

(順不同、敬称略)

	区分	氏名及び役職	会社名及び所属	役職
1	リーダー	山本 則幸	東亜合成(株) 新事業企画開発部	部長代理
2	サブ リーダー	今井 茂雄	(株)INAX 総合技術研究所 要素技術開発室	課長
3	メンバー	生貝 初	鈴鹿工業高等専門学校 生物応用化学科	教授
4	メンバー	杉本 茂	(財)日本食品分析センター 品質システム室	部長
5	メンバー	八代 敏晴	富士ケミカル(株) 技術開発部	部長
6	メンバー	城戸 勝治	(株)ヘキサケミカル 開発一部 開発課	課長
7	メンバー	和田 邦身	(財)日本化学繊維検査協会 生物試験センター	センター長
8	メンバー	川合 晶子	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	主任
9	オブザー バー	林 進	抗菌製品技術協議会	常任理事
10	オブザー バー	藤本 嘉明	抗菌製品技術協議会	専務理事、 事務局長

[添付資料3]

本調査研究の実施計画及び研究体制

1. 調査研究実施計画

(1) 実施計画の内容

工業標準化法に基づくJNLA制度の抗菌分野において、均質で安定した技能試験品目は、測定の不確かさの推定に用いるコントロールサンプルとしても利用でき、開発が望まれるものである。現在、我が国提案のISO化作業を平行して進めており、ISO策定後のコントロールサンプルのニーズは欧米圏を中心に大きくなるものと予想される。平成13年度より、委託調査として開発に取り組み、平成15年度にはプラスチック(PET)フィルムに水溶性銀系抗菌剤を塗工した試験片を、供給可能な体制で開発することができた。この試験品目の開発は、認定制度の運用に大きく寄与するものであったが、フィルムに塗布した抗菌剤を菌液中(水溶液)にリリースさせるという性質上、溶解性能の制御等製造過程での調整が難しく、抗菌効果に十分な安定性がないという問題点がある。またこの試験品目を用いる場合、JIS試験方法の手順通りに試験を実施できないという国際的に通用しない難点がある。

本調査研究では、製造過程が容易であり、より安価で均質かつ安定した試験品目を開発することを目的とする。この調査の成果により、認定機関のみならず広く試験事業所でも入手できる試験品目の供給体制を目指す。

本調査研究における内容は以下のとおりである。

- 1) 安定した抗菌活性値をもち、JIS試験方法に規定された方法で使用できる試験品目(コントロールサンプル)を開発する。
- 2) 抗菌性のメカニズムを明確にし、データをもとに安定性を確認する。
- 3) 上記試験品目の製造技術及び供給体制を確立する。

(2) 研究実施場所

抗菌製品技術協議会

東京都渋谷区初台2-23-5

パシフィックパレス新代々木406号

(3)実施日程

1) 実施期間全工程 (平成16年7月～平成18年3月)

	平成16年						平成17年												平成18年		
	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
コントロールサンプルのアイデア抽出	→																				
コントロールサンプルの試作		→																			
コントロールサンプルの抗菌効果の確認試験		→																			
コントロールサンプルの評価			→																		→
コントロールサンプルの製造技術の確立							→														
コントロールサンプルの供給体制の確立																→					
報告書作成								→													→

2)－1 調査研究委員会 【平成16年度】 開催計画

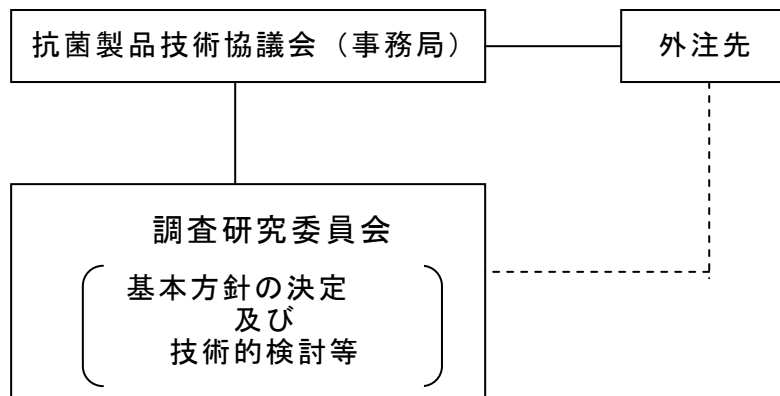
区分	月	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
	委員会開催			第1回			第2回		第3回		第4回

2)－2 調査研究委員会 【平成17年度】 開催計画

区分	月	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
	委員会開催			第1回			第2回			第3回			第4回

2. 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制



(2) 研究者氏名及び役職名

別添 委員会名簿参照

(3) 経理担当者氏名及び役職名

抗菌製品技術協議会 専務理事・事務局長 藤本 嘉明

[添付資料4]

抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会議事録

平成17年度 第1回委員会 議事録

◆ 日時 平成17年6月7日(火) 10:30~12:00

◆ 場所 南青山会館 中会議室

◆ 出席者(順不同、敬称略)

委員：高麗寛紀、生貝 初、今井秀孝、登坂 孜、杉本 茂、卜部 勝資、山本則幸、
今井茂雄、八代敏晴(欠席委員 松岡英明、佐野浩一、村越 正毅)

オブザーバー：稲葉知英、川合晶子

事務局：林 進、藤本嘉明

◆ 議事

1. 委託元および委員長ご挨拶

本年度第1回委員会であるため、本事業の委託元である独立行政法人製品評価技術基盤機構認定センター技術顧問の今井委員と本委員会の高麗委員長からご挨拶を頂いた。

2. コントロールサンプル(以下、CSと略記)開発状況について

(1) 生体高分子を用いたバイオ基板CSの開発状況

生貝委員より資料1~3により、バイオ基板CSの検討結果について概略以下の報告があった。

PVDF/コレステロール/タンパク質(proVCH)/銀からなるCSを試作し各構成成分の関係について以下の知見を得るとともに、抗菌性能発現の再現性を確認できた。

- ① proVCHの存在量をSATの発色量によって調査したところ、proVCHはCVDF膜上にコレステロールが存在しないと結合せず、CVDF膜に直接結合しない(図4)。そしてコレステロール濃度を上げてPVDF上のコレステロール量が増えるとその上に付くproVCHの存在量も増加した(図3)。
- ② しかし以前の実験では、PVDFにコレステロールなしで直接proVCHを処理しAgを作用させたものと、コレステロールをつけてからproVCHを処理しAgを作用させたものがほぼ同等の抗菌活性値を示していることから、PVDFにproVCHが特異的な結合をしている可能性もある。またPVDF上にコレステロールのみを付けproVCHなしでAgを作用させても抗菌活性値はない。(表1、表2)
- ③ ②の試験で、proVCHに作用させる銀の処理時間を1~24時間で振っても抗菌活性値に大きな差はなく、これはコレステロールがある場合もない場合もほぼ同様な結果となった。(表3)
- ④ 別の試験でコレステロールがある場合とない場合についてそれぞれproVCHの濃度を10nM~500nMと変えAgで処理し抗菌活性値を見ると、コレステロールがないものはあるものに比べ抗菌活性値が低くコレステロール存在効果が明確である。コレステロールを使用した場合にはproVCH濃度が高い方が抗菌活性値は高くなるが250nM以上では増加しないことから250nMでたんぱく質が飽和になっていると思われる。(表4)

⑤ 今後、コレステロールとタンパクの結合状態や基板上にある銀、タンパク質、コレステロールの存在を機器をつかって調査し、実証していきたい。

この報告に対して下記の質疑応答が行われた。

1) Q：このCSは一度使ったサンプルを再度使用することはできるか？

→A：可能。但し、銀イオンが細菌側に移行するのであれば繰り返し使用はできない。移行するかどうかは今後調査する必要がある。

2) 表1～3の実験で使用したタンパク質の濃度はどの位か？

→A：500 nMと濃い溶液を使っている。

以上の協議の結果、上記報告について了承された。

なお、事務局より本開発研究での実験解析を行うため、(財)高輝度光研究センターの装置を使用できるようSPrng-8プログラムに申請中との報告があった。

(2) 樹脂練りこみプレートのCSの開発状況

山本(則)委員より資料1-4に従い、以下の報告があった。

1) 銀リン酸ジルコニウム系無機抗菌剤(ノバロン)を0.3~1.0%PP樹脂に練り込み射出成型したプレートの表面を、サンドペーパー、サンドブラスト、表面切削加工し、抗菌性能を5試験機関で評価した。またサンプル表面も電子顕微鏡で観察した。

2) サンドペーパー研磨品では、抗菌試験機関により差があり、抗菌剤添加量と抗菌活性値が比例している抗菌試験機関と、比例していない試験機関とに分かれている。

3) サンドブラスト品では、抗菌剤添加量と抗菌活性値がほぼ比例しているが、この場合も試験機関によりバラつきが出ている。

4) 表面切削加工品では先の試験で抗菌性能が発現しなかった抗菌剤添加量0.3%の場合でも生菌数が検出限界以下に低下しており、再現性が得られなかった。

この報告について以下の質疑応答があった。

① Q：サンドブラストの研磨条件は把握しているか？またブラスト粉は繰り返し使用していないか

→A：研磨条件の詳細は未確認である。今後調査したい。ブラスト粉の再使用はしていない。

② Q：試験機関間の差が重要であり、①設備、人による差、②操作マニュアルの差をできるだけ小さくしないとCSの品質の影響か試験機関の差の影響かが把握できないのではないか？

→A：ご指摘の通りだと思う。今後は試験手順のプロトコールを作ったり、試験記録を残すなどの対応をとりたい。

協議の結果、今後は表面研磨をサンドブラストに絞り、研磨条件や試験機関差を小さくするための検討を行いたいとの提案があり了承された。

3. 今後の進め方について

山本(則)委員より資料1-5により今年度の研究開発スケジュールについて以下の提案があった。

この提案について以下の質疑応答、意見があった。

(1)Q：樹脂練り込みプレートの各種劣化試験の期間が3ヶ月となっているが経時変化をみるには短すぎるのではないか？

→A：表は開始時期を示したもので、試験期間はもっと長期を予定している。

また委託元（NITE）より、今年度は2月中旬に確定検査を行う必要があるのでそれまでに試験研究を終了するようとの要請があった。但し、正式成果報告書は提出はそれ以後でも可。従って全体スケジュール2月中旬に終了するよう見直すことになった

5. その他（次回委員会の開催予定）

9月13日 午後開催。時間、場所は後日事務局より連絡する。

以上

平成17年度 第2回委員会 議事録

- ◆ 日時 平成17年9月13日(火) 15:00~17:00
- ◆ 場所 南青山会館 小会議室
- ◆ 出席者(順不同、敬称略)
委員:松岡 英明、内藤 智男、生貝 初、今井秀孝、登坂 孜、卜部 勝資、杉本 茂、山本 則幸、今井 茂男、八代 敏晴
オブザーバー:川合 晶子
事務局:林 進、藤本 嘉明

◆ 議事

1. 平成17年度第1回委員会 議事録の確認

事務局が作成した原案を正式議事録とすることが承認された。

2. コントロールサンプルの開発進行状況について

バイオ基板の開発状況について、生貝委員より(資料2-3-1)、また試作されたバイオ基板コントロールサンプルの表面構造について生貝委員、山本委員より概略以下の報告がなされた。(資料2-3-1~2-3-3)

- (1) 基板の材料として、従来の多孔質のPVDFシートに代え、PVDEプレートとシリコンウェハを使用した。これら新しい基板の表面にコレステロール単分子膜を形成し、その上にたんぱく質(VCH)を結合させ、さらに銀水溶液で処理したサンプルは、いずれも抗菌活性値が5以上の抗菌活性を持つことが確認された。
- (2) シリコンウェハを基板に用いた場合、まずフェニルトリクロロシラン(PhTCS)で表面処理を行った後に、上記手順でコントロールサンプルを試作した。各工程終了毎に表面の接触角を測定した。PhTCH処理後の接触角は約89度である。この上にコレステロール膜(Cho)を形成しても接触角は86度と大きな変化がないが、Cho膜の上にVHCで処理した表面の接触角は66度と小さくなりたんぱく質の特性により親水性が上がる。さらにそれに銀を結合させると接触角は70度と接触角が減少し親水性が上がる。これは結合した銀自体の性質か、それによるタンパク質の高次構造の変化によるものと考えられる。
- (3) シリコンウェハを基に用いたSi/PhTCS/Cho/VCH/Ag試料のAFMで観察した結果、PhTCS処理面とそれをCho膜で被覆した表面は平滑であるが、pro-VCHを吸着させると球状物質と長細い構造が観察され、タンパクが横向きに配向している可能性がある。Agを結合させた後のAFM像では、銀ではないかと思われる部分も見出せるが、XPS分析では検出できなかった。
- (4) 一方、PVDF基板を使用して試作したバイオ基板をSEM, XMA, 蛍光X線により解析した。PVDF製のメンブランフィルターとプレートを基板としてその上にCho層とVCH層を載せAgを結合したサンプルはSEMで観察した結果、コレステロール(Cho)の存在は確認できなかったが、タンパク質の存在は認められた。またXMAや蛍光X線観察では銀は検出できなかった。
- (5) 今後、シリコンウェハの表面平滑性をチェックすると共に、その上にあるタンパク質(pro-VCH)の存在、VCHとコレステロールの結合状況、銀の存在等について

調査し、今回想定しているコントロールサンプルがモデル通りになっているかどうかを確認したい。

以上の報告に対して次のような質疑応答が行われた。

- ① Q：このタンパク質の長さはどれくらいか？
→A：10～20nmである。
- ② Q：銀の存在を何らかの方法で確認できないか？
→A：SEMでは無理だろう。ESCAであれば検出できる可能性がある。
- ③ Q：タンパク質の存在は確認できるか？
→A：金コロイド（抗体）を使えば、基板上のタンパク質の有無を確認できる。
- ④ Q：銀はタンパク質のてっぺんのみ結合するのか？
→A：どこにAgがくっつくかはまだ確認できていない。
- ⑤ Q：接触角はどのようにして測定するのか？
→A：液滴を落として横から見て画像で処理して測定する。
- ⑥ タンパク質がつくことにより接触角が大幅に変わることがわかったのは貴重な情報である。
- ⑦ サンプル表面にAgがついていることを確認できれば大きな進歩であり、このバイオ基板のアイデアがコントロールサンプルの形で実る可能性が高い（第4コーナーを回ったことになる）。
- ⑧ 今後、重要なことは均一な界面を作ることである。

以上の討議の結果、今後の試験を生員委員からの提案に従って進めることが承認された。

3. 銀系抗菌剤練り込みコントロールサンプルの開発の進捗状況

山本委員より開発状況について以下の説明が行われた（資料2-4）。

抗菌剤として銀ゼオライトと銀リン酸ジルコニウムを用い、それぞれこれまでの検討結果で得られた最適配合量（銀ゼオライト1.3%、銀リン酸ジルコニウム0.3%）でPP（ポリプロピレン）樹脂に練りこんだプレートを作成し、その表面を研磨するサンドブラストの条件（砥粒、噴射圧、ブラスト時間）を検討した。

その結果、銀ゼオライトでは砥粒を選択することにより他の条件にかかわらず比較的安定した抗菌活性値が得られること、銀リン酸ジルコニウムの場合は砥粒の影響が非常に強いこと、砥粒として#220、噴射圧0.35MPaの組み合わせで安定した抗菌活性値が得られることが明らかになった。いずれの抗菌剤を用いた場合も3.1～5.3と高い抗菌活性値であったことから、抗菌剤配合量は今回の条件よりも減少しても良い可能性が高い。今後、今回の試験で得られた砥粒、噴射圧、ブラスト時間の最適条件下で、より低い抗菌剤配合量の検討を行なう。また連続式サンドブラスト機等についても検討する予定。

これに対して以下の質疑応答が行なわれた。

- ①これまでの試験で、プレートの製造条件については大体固まってきたので、条件を大きく振る必要はないのではないかと。あとは研磨条件を中心に検討すればよい。
- ②Q：このコントロールサンプルは再使用できるか？
→A：繰り返し使用は想定していない。銀が溶出するため、繰り返しを続けていくと抗

菌活性値は低下する可能性がある。

③Q：サンプルの保存安定性はどのように考えているか？

→A：保存中の環境（ガス）の影響は調査したい。必要があれば窒素シールを行なう。

④製造直後の表面の状態を観察しておくことが必要だ。

以上の協議の結果、今後山本委員の提案した試験を実施することが承認された。

4. 今後の進め方

山本委員より資料2-6により、今後の開発スケジュール案が提案された。

この提案に対して以下の意見交換が行なわれた。

- ① 今年度の委託事業の中でバイオ基板と無機抗菌剤練り込み樹脂プレートでは、両方を同一のレベルで考えるのは無理である。
- ② バイオ基板コントロールサンプルでは、このアイデアが正しいことを確認することができれば十分な成果といえる。例えば、サンプルの表面に銀が存在していることが前提になっているので、これを確認することに注力して欲しい。
- ③ バイオ基板で現段階ではタンパク質を大量生産することは無理である。
- ④ NITE としては、理想としては今年度中に2つのコントロールサンプルが量産されることを期待しているが、もし量産化まで行けなくてもそこに行き着くための方向性は確認したいと考えている（特にバイオ基板の場合）。
- ⑤ 今後、バイオ基板は基礎的な部分を固めて学会で発表できるようにして欲しい。
- ⑥ 練り込みプレートではこの計画に従って供給できるところまで目指して欲しい。

協議の結果、以上の意見を踏まえた上で原提案のスケジュールに従って開発を進めることが承認された。

5. その他

次回委員会の開催予定日は12月6日を第1候補とし、本日欠席された高麗委員長のご都合をご確認する。（その後、高麗先生のご都合を確認したので12月6日に決定した。）

以上

平成17年度 第3回委員会 議事録

- ◆ 日時 平成17年12月6日(火) 15:00~17:00
- ◆ 場所 (財)日本食品分析センター 新館(日本水産油脂協会)第3会議室
- ◆ 出席者(順不同、敬称略)
委員:高麗 寛紀、松岡 英明、生貝 初、坂元 耕三、内藤 智男(諸永委員の代理)、今井秀孝、登坂 孜、卜部 勝資、杉本 茂、山本 則幸、今井 茂男、八代 敏晴
オブザーバー:川合 晶子
事務局:林 進、藤本 嘉明

◆ 議事

6. 平成17年度第2回委員会 議事録の確認

事務局が作成した原案中、以下を修正した上で正式議事録とすることが承認された。

- ・第1頁 2. コントロールサンプルの開発進行状況について
(2) 第6~7行目 「さらにそれに銀を結合させると接触角は70度と若干接触角が増え疎水性が上がる。」→「さらにそれに銀を結合させると接触角は70度と接触角が減少し親水性が上がる。」
- ・第2頁 質疑応答③
菌コロイド→金コロイド

7. コントロールサンプル(CS)の開発進行状況について

2-1. バイオ基板CSの開発状況

バイオ基板の開発状況について、生貝委員より概略以下の報告がなされた。(資料3-3)

- (5) シリコンウェハ表面をフェニルトリクロロシランで処理した基板にコレステロール単分子膜を形成し、その上にタンパク質(proVCH)を結合させ、さらに銀水溶液で処理したCSをSpring-8のUndulaterの放射光分析により解析したところ、CSの表面にAgの存在が確認され、またそのAgはイオン化していないことを示唆していることが判った。
- (6) 上記(1)において、CSのAg吸光度(即ち吸着量)は銀水溶液中のAg濃度に依存すること、またproVCH濃度を変えるとproVCH濃度を低くした方がCS上のAg吸着量が多いという興味ある結果を得た。
- (7) 参考として銀リン酸ジルコニウムを練り込んだ樹脂サンプル中のAgを同じSpring-8の放射光分析で検出すると硝酸銀中のAgと同じ波形を示しており、銀リン酸ジルコニウム中のAgはイオン状態であることを確認した。
- (8) (1)の各工程ごとにその表面上に置いた超純水の接触角を測定したところ、タンパク質表面の接触角よりもそこに銀を結合させた場合の接触角の方が小さく、銀の結合により親水性が上がることを再確認した。但し、銀濃度を変えても接触角はほとんど変わらず安定している。
- (9) (1)の各行程での表面状態をSEMで解析しタンパク質を結合させると表面に著しい凹凸が観察された。
- (10) 今後次のような検討を実施したい。

- ① 基板はシリコンウェハとし、フェニルトリクロロシラン以外のカップリング剤も検討する。
- ② 銀溶液として電気分解液以外に硝酸銀溶液や銀アンモニウム錯体も検討する。
- ③ タンパク質の定量を実施する。
- ④ CS 表面の TEM 観察、AFM 観察などを実施する。

以上の報告に対して次のような質疑応答が行われた。

- ⑨ Q : SEM 観察の際、前処理はしているか？
→A : 確認していないが、多分金か金パラジウム蒸着していると思う。
- ⑩ Q : CS 表面の銀はどのような状態か？
→A : イオン化はしていない。シスチンと銀の結合は共有結合であり、それを考えればこの CS についての Ag がイオン状態でなくても不自然ではない。
- ⑪ Q : タンパク質が結合すると表面の凹凸がはっきり出ているが、この表面粗度をコントロール可能か？
→A : コントロールすることは出来ない。結果として残るというだけである。
- ⑫ Q : CS の保存条件は結果に影響するか？
→A : 今後調査するが保存条件が品質に影響する可能性は大きい。良い条件を選べば調整は可。

2-2. 銀系抗菌剤練り込みコントロールサンプルの開発状況

山本委員より開発状況について以下の説明が行われた（資料 3-4-①～3-4-③）。

これまでの検討結果で得られた抗菌剤の最適配合量と思われる銀リン酸ジルコニウムでは 0.25～0.275%、銀ゼオライトでは 1.1～1.2% を PP（ポリプロピレン）樹脂に練りこんだプレートを作成し、その表面をサンドブラスト研磨したサンプルの抗菌活性値を測定したところほぼ 4 以上と目標値より高い値を示した。そこで以前のサンプルの灰分をチェックしたところ、以前のサンプル（H 社製）の実際の配合量は 0.11% と非常に低いことが判明した。

また抗菌剤を含まない樹脂プレート表面に銀ゼオライトをサンドブラストの砥粒として噴射圧により打ち込むことを検討したが、得られたサンプルの抗菌活性値は 1 以下と低く失敗した。

抗菌剤練り込み樹脂プレート表面をサンドブラストに変えてレーザー加工で処理する方法を検討したが、レーザー加工すると加工なしの試料に比べ抗菌活性値は低下した。レーザーにより表面が融解し固化しているため抗菌剤粒子が樹脂内部に閉じこめられた可能性もある。なおサンドペーパー研磨したサンプルでは抗菌剤添加量に依存して抗菌活性値が増加しており、この結果が再現できる処理方法を追求したい。

今後、抗菌剤添加量を変動させ成形加工したサンプルを作成し、サンドブラスト、切削加工、レーザー加工処理による抗菌活性値への影響を調査する。またサンドペーパーの機械研磨やフィルム状 CS も検討する。

以上の報告に対して以下の質疑応答、コメントがあった。

- (イ) Q : レーザー加工の価格はどうか？
→A : 今回はアイデアとして試しただけであり、価格は調べていない。

(ウ) 今回抗菌剤をサンドブラストで打ち込むテストを行っているが、繊維で使用されているスパッタリングという方法も参考になるかもしれない。

(エ) Q：今後市販されている抗菌フィルムを CS として利用する可能性はあるか？

→A：基板上に貼って平板を保つようにすれば可能性はある。

(オ) CS では、抗菌剤量に対し性能にリニアリティがあることが必要。その意味でサンドペーパー処理の結果は魅力的。

8. 今後の進め方

生貝委員、山本委員より資料 3-6 により、今後の開発スケジュールについて説明が行われ、以下のコメントがあった。

- ① 今年度の試験は 2 月 15 日までに終了すること。成果報告書はそれまでに原稿が完成している必要がある。
- ② バイオ基板ではこのアイデアの正しさを示すこと、練り込み樹脂プレートではサンプルを作成し試験プログラムにのせることが重要。
- ③ CS としては抗菌活性値が多水準であることを目指して欲しい。

4. その他

次回委員会の予定 1 月 30 日 10:30～（南青山会館 2 号会議室）

平成17年度 第4回委員会 議事録

- ◆ 日時 平成18年1月30日(月) 10:30~12:30
- ◆ 場所 南青山会館 2号会議室
- ◆ 出席者(順不同、敬称略)
委員:高麗 寛紀、松岡 英明、生貝 初、内藤 智男(諸永委員の代理)、今井秀孝、
登坂 孜、杉本 茂、卜部 勝資、山本 則幸、今井 茂男、八代 敏晴
(欠席;坂本 耕三)
オブザーバー:飯村 兼一、稲葉 知英、川合 晶子
事務局:林 進、藤本 嘉明

◆ 議事

9. 平成17年度第3回委員会 議事録の確認
事務局が作成した原案を正式議事録とすることが承認された。

10. コントロールサンプル(以下、CSと略記)の開発進行状況について

2-1. バイオ基板CSの開発状況

バイオ基板の開発状況について、生貝委員より概略の報告がなされた後、オブザーバーとして参加して頂いた宇都宮大学工学部の飯村兼一助教授からバイオ基板の表面状態をSpring-8の放射光分析装置によりXAFS解析した結果について説明が行われた。(資料4-3)

- (11) シリコンウェハ表面をフェニルトリクロロシランのトルエン溶液で処理した基板にコレステロール単分子膜を形成し(ここまでの工程は宇都宮大学が、タンパク質を付ける工程以降は鈴鹿高専が実施)、その上にタンパク質(proVCH)を結合させ、さらに銀電解水溶液(Ag濃度0.1、1、5)で処理したCSをXAFS解析の結果、CSの表面上のAg量は銀水溶液中のAg濃度には比例せずある濃度以上で飽和していること、またそのAgの状態は銀水溶液中のAg濃度が濃度1及び濃度5の場合にはAg-Ag間結合の割合が圧倒的に多いのに反し、濃度0.1の場合にはAgイオンの形であることが判った。
- (12) 上記(1)のAg濃度1の場合において、proVCH濃度を10倍、100倍に増やしてもCS上のAg吸着量はproVCH濃度には比例しない。またそのAgの状態はproVCH濃度に関係なくAg-Ag結合が多かった。
- (13) 銀電解水溶液の代わりにAgCl飽和溶液で処理を行った場合、処理後表面を純水で軽く洗浄した時のAg吸着量はしっかり洗浄した時のAg吸着量より多い。またこの洗浄加減の違いによりCS上のAgの状態には大きな差があり、軽く洗浄した場合のAgはイオン化している割合が多いのに対し、強く洗浄した場合はAg-Ag結合が強く認められる。
- (14) 参考として銀リン酸ジルコニウムを練り込んだ樹脂サンプル中のAgを同じSpring-8のXAFSで解析すると硝酸銀中のAgと同じ波形を示しており、銀リン酸ジルコニウム中のAgはイオン状態であることを確認した。
- (15) 今後次のような検討を予定している。
 - ① Ag濃度既知のAgCl又はAgNO₃水溶液を用い、Ag吸着量とAg結合状態の

解明。

- ② ProVCH への Ag 吸着部位を特定するための XAF 及び IR 分析。
- ③ 抗菌機構の解明
例えば大腸菌に Ag が取り込まれている場合の結合状態の解明
- ④ タンパク質による還元 ($\text{Ag}^+ \rightarrow \text{Ag}^0$) と Ag 金属粒子化の確認

以上の報告に対して次のような質疑応答、コメントが行われた。

- ⑬ Q: タンパク質 (proVCM) の濃度を変えた場合の Ag 吸着量のデータがあるが、タンパク質を使用しなかった場合のデータを採取する必要はないか?
→A: タンパク質がない場合は抗菌性がないという結果になっており、銀がついていないと考えられるため試験していない。
- ⑭ Q: 銀電解水を使用した場合、CS 上の銀吸着量はある銀濃度で飽和状態になっていることや AgCl 水溶液の場合に水洗浄の程度によって表面状態が変化しているところから見ると、CS 作成時の Ag 濃度が高すぎるのではないか?
→A: 確かにそういうことが言える。今後、もっと Ag 濃度が低い条件で試験をしたいと考えている。
- ⑮ Q: CS 上で Ag-Ag 結合があるということは Ag イオンが金属化していくということになる。この機構は判るのか?
→A: 現時点では判らないが今後の解析によって解明できる可能性はある。
- ⑯ Q: 今までのデータを見て、今後予定している 4 つの検討項目 (上記 (5)) の中で解明できそうなもの、難しいものはどれか?
→A: 4 項目とも解明出来ると思う。そのためには Spring-8 の解析も必要になる。これまで定性的に確認出来たことを定量化して追求するということになる。
- ⑰ C: CS としては Ag が安定して溶出していくものであることが必要と思う。
協議の結果、上記報告が承認された。

2-2. 銀系抗菌剤練り込みコントロールサンプルの開発状況

山本委員より開発状況について以下の報告が行われた (資料 4-4-①~4-4-③)。

無機銀系抗菌剤の配合量を変え PP 樹脂に練り込み成型したサンプルを一連の加工処理し、その抗菌性試験を複数の試験機関で評価した。

抗菌剤配合量とサンプル中の灰分はほぼ比例しており、計算通りの抗菌剤が練り込まれていることを確認した。

成型後サンドペーパーで研磨したサンプルの抗菌活性値は抗菌剤配合量とほぼ相関しており再現性もある。しかしサンドブラスト処理したものは全体に抗菌活性値が高めに出ており、削られた抗菌剤が表面に付着し残っていると思われる。表面切削したサンプルやバフ研磨したサンプルは一部の試験機関のデータしか採取出来ていないが、全体としてバラツキはあるものの抗菌剤配合量と抗菌活性値が相関しており、他の試験機関のデータを期待したい。表面をエンボス加工したサンプルでは抗菌性が非常に低く、期待できないことが判った。今後更に表面加工方法やその後の後処理法 (例えばエタノール中で超音波洗浄し削り滓を除去する方法など) を確定し、処方確立し本年夏以降の供試を図りたい。

以上の報告に対して次の質疑応答があった。

① Q：表面に存在したり溝に入っている抗菌剤は表面観察で判定できるか？

→A：判定可能である。

(イ) Q：試験機関によって抗菌性能がばらついているがどう考えているか。

→A：試験機関によるバラツキは当然存在する。これには種々の要因があるが、サンプルの前処理の方法もその一つである。

協議の結果、上記報告が承認された。

1 1. 今後の進め方

生貝委員、山本委員より口頭で以下の提案があった。

①バイオ基板ではこのアイデアの正しさが確認されプロトタイプのCSは作成できたので、今後この技術の完成度を高めることを目指したい。

②練り込み樹脂基板では、今年度中に処方を完成し秋には供試出来る体制を目指す。

これについて審議した結果、承認された。

1 2. 平成 17 年度成果報告書について

山本委員より資 4-6 により成果報告書の目次案について提案があり、承認された。なお委員会は今回をもって終了するため、報告書の内容については高麗委員長に一任することになった、今後報告書原文が作成した時点で高麗委員長がチェックし確認した上で、製本する。

1 3. その他

高麗委員長、事務局から本委員会メンバーに対する謝礼の挨拶があった。

以上

[添付資料5]

抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会ワーキンググループ 議事録

H 1 7 年度 第 1 回ワーキンググループ(WG) 議事録

- 1) 日時 2005. 5. 20 (金) 13:00~17:00
- 2) 場所 (株)INAX 名古屋ショールーム セミナールーム
- 3) 出席者(順不同、敬称略)
メンバー：川合 晶子、今井 茂雄、八代 敏晴、和田 邦身、山本 則幸(文責)
オブザーバー：松岡 英明、藤本 嘉明
*欠席 生貝 初、杉本 茂、城戸 勝治
- 4) 議事
 - (1) 前回議事録確認
議事録案を正式な議事録にすることが承認された。
 - (2) 前回本委員会概要報告
議事録を元に報告がなされた。詳細略。
 - (3) H 1 6 年度決算及びH 1 7 年度予算
H 1 6 年度の調査研究費外注費は、予算：3,600,00(消費税別)に対して、3,780,000(消費税込み)であり、予算どおりであった。H 1 7 年度予算は当初計画どおりで変更はなし。
 - (4) バイオ基板検討
生貝メンバー及び今井メンバー作成資料をもとに、今井メンバーより報告がなされた。
PVDF/コレステロール/pro-VCH/Ag、系において、抗菌性能が認められ、先の検討の再現性が得られた。今回初めて実施したPVDF/pro-VCH/Ag系においても同様の抗菌性能が認められ、PVDF→コレステロール→pro-VCH→Agの順で結合して得られたのかどうかは不明瞭となった。可視領域の発色法で定量した先の試験では(中間報告p.11、図3、図4)、コレステロールがPVDFに付着していること、及びpro-VCHはPVDFに対しコレステロールが存在しないと結合性を示さないことを示唆しているため、検出下限以下のpro-VCHがPVDFに非特異的な結合をしている可能性が考えられる。その仮定に立てば、PVDFに非特異的に吸着しているpro-VCH量が、抗菌性を発揮するに十分な量のAgが結合していることが考えられる。銀の作用時間を1~24時間まで振ったが、抗菌活性値に変化は見られず、銀の結合は1時間以内でほぼ終了していると考えられる。今後、下記実験が考えられる。
 - ① 2つのコントロールサンプル上に結合または存在しているAgの定量。
 - ② pro-VCHを減らしていき、PVDF+pro-VCH+Agのコントロールサンプルでは抗菌活性がなく、一方PVDF+コレステロール+pro-VCH+Agのコントロールサンプルは抗菌活性がある濃度を調べる。次にAg量を減らす実験を実施する。
 - ③ PVDF+pro-VCH+Agのコントロールサンプルで抗菌活性が得られたことから、コレステロールに結合しない適当なタンパク質を用いてPVDFに作用させ、さらにAgを添加した場合に、抗菌活性があるかどうかの確認。
上記報告に対し、各種議論があった。生貝先生が欠席のため、明確な結論

は得られなかったが、今後、次のように行なうこととした。

- ・PVDF／コレステロール／pro-VCH／Ag系、及びPVDF／pro-VCH／Ag系において、コレステロール、pro-VCH及びAgがどのように結合しているかを検証することが重要である。AFM観察で存在状態がわかる可能性があるので、検討する。
- ・実験データを採取する際、再現性、バラツキを考慮して行なう。
- ・基板と化合物を結合させる方法として、カップリング剤を用いる方法もある（その場合、PVDFは使えない）。今すぐ検討は行なわないが、頭に入れておく。
- ・現状のPVDFポラス基板(メンブランフィルター)に対する結合性を確認するため、PVDFプレート基板を用いた検討を行なう。

(5) 樹脂練り込みプレート検討

資料をもとに、山本メンバーより報告がなされた。

研磨剤粒子の細かいサンドペーパー研磨(#10,000、0.5 μm相当)、サンドブラスト加工、及び表面切削を行なった。その結果、先に抗菌効果が全く出なかった0.3%練り込み、表面切削では菌数が検出限界以下となり再現性が得られなかった。サンドペーパー研磨では、試験機関内、試験機関間でのバラツキが大きかった。サンドブラストでは、抗菌剤添加量と抗菌活性値との相関性が比較的高く、また試験機関間での差異も比較的少なかった。

サンドペーパー、サンドブラスト加工品についてSEM観察を行なった。サンドブラスト加工品については、研磨粒子も残存しているため、抗菌剤粒子の存在状況はよく把握できなかった。

議論の結果、今後はサンドブラスト加工に絞って検討を行なうこととした。抗菌剤として、先に銀リン酸ジルコニウムに限定することとしたが、粒径の影響が大きいと考えられるため、銀ゼオライトについても併せて検討することとした。

サンドブラスト加工は、業者委託で実施しているため詳細が不明である。次回は、実際の設備を見学して詳細加工条件を検討する。

－以上－

平成 17 年度 第2回ワーキンググループ(WG) 議事録

1) 日時 2005. 8. 30(火) 13:00~17:00

2) 場所 鈴鹿工業高等専門学校(三重県鈴鹿市)

3) 出席者(順不同、敬称略)

メンバー: 生貝 初、川合 晶子、今井 茂雄、杉本 茂、八代 敏晴、和田 邦身、
山本 則幸(文責)

オブザーバー: 林 進、藤本 嘉明

欠席委員: 城戸 勝治

4) 議事

1. 前回議事録確認

議事録案を正式な議事録とすることが承認された。

2. 前回本委員会概要報告

議事録を元に報告がなされた。

3. バイオ基板検討状況

生貝メンバーより、資料を元に報告がなされた。

AFM観察するため、平滑性の高いシリコンウェハーを基板として用いてバイオ基板を作製した。シリコンウェハーを疎水化するため、フェニルトリクロロシランで処理(自己組織化)し、その後、コレステロール、タンパク質(pro-VCH)、及び銀を反応させた。抗菌力評価の結果、抗菌性能が確認された。

シリコンウェハー上に、これら成分が載っているかどうか定性的に確認するため、接触角を測定したところ、コレステロール処理で若干低下(親水化)、タンパク質処理でかなり低下、銀イオン処理で、逆にやや増加した。コレステロール処理では有意差かどうかわからないが、タンパク質、及び銀イオン処理での接触角変化は、これらが結合したことの傍証となる。

宇都宮大学 飯村教授の協力で、AFM観察を実施した。フェニルトリクロロシラン処理品、及びコレステロール処理品は比較的平坦であるのに対し、タンパク質処理品は凹凸が激しく、タンパク質が載っていることが確認された。銀イオン処理品では、塊状のものが観察され、銀イオン以外に析出物が見られた。

バイオ基板のSEM観察結果、蛍光X線測定結果、XMA結果が、今井メンバー、及び山本メンバーよりなされた。後2者では、銀を検出できなかったが、SEM観察では、タンパク質処理したものはPVDFメンブランフィルター基板に物質が存在していることが確認された。また、コレステロール処理なしでタンパク質を直接処理したのも同じような物質が観察された。PVDFプレートを基板に用いたものは、銀イオン処理まで行なったものは、数10nm粒状のものが確認された(タンパク質処理まで行なった基板がないため、これが銀塊かタンパク質は不明)。

生貝メンバー、及び杉本メンバーより、基板上的タンパク質を定性的に確認するため、酵素抗体法を検討中である旨報告がなされた。

ディスカッションを踏まえ、今後次のように進めることとした。

- ・シリコンウェハーは、AFM観察用に用いた基板であるが、抗菌性能が発現していること、解析しやすいことから、当面は、シリコンウェハー基板を用いて検討する。
- ・シリコンウェハーはそのまま用いれるのではなく、フェニルトリクロロシラン処理で安定化させてから用いる。

- ・シリコンウェハー基板のコスト及び入手可否について調査する(担当:八代)。
 - ・シリコンウェハーが價格的に、あるいは資材供給面で使用不可であれば、平滑ガラス基板、あるいはPVDF基板を検討する。
 - ・銀電極を用いた銀イオン作製装置は、析出物が出来ている可能性があるため、銀化合物水溶液を用いて行なう(希薄硝酸銀水溶液、銀アンモニウム錯体水溶液等)。
 - ・シリコンウェハー基板を用いたサンプルを作製し(各段階)、SEM観察を行なう(SEM観察:今井)。
 - ・タンパク質定性のための酵素抗体法を引き続き検討する。同手法でコレステロールが定性できないかどうか併せて検討する(担当:杉本)。
 - ・今回用いたコレステロールは単分子膜であり、作製には熟練を要する。もっと簡単に作れるようにするため、コレステロールにリン脂質を配合することも検討する。
 - ・バイオ基板が抗菌性を発現するのは、固定化された銀とバクテリアとの接触によるのか、それと溶出した銀イオンによるのかを調べる必要があるが、他の検討が煮詰まってから行なうこととした。
 - ・バイオ基板を量産してもらえるところを調査しなければならない時期ではあるが、基板構成が固まっていないので、ある程度確定してから一気に調査することとした。
- * 担当者名無記載の項目は、生員メンバーの担当項目。

4. 樹脂練り込みプレート検討状況

山本メンバーより、資料を元に報告がなされた。

抗菌剤として比較的粒径の大きい銀担持ゼオライトと、粒径の小さい銀担持リン酸ジルコニウムを用い、砥粒径、噴射圧、噴射時間を振ってサンドブラスト加工を行なった。抗菌性能を評価したところ、銀担持リン酸ジルコニウムでは、砥粒#220、噴射圧0.35MPa、ブラスト時間5ないし10秒の条件が最も安定した抗菌性能となった。銀担持ゼオライトでは、砥粒#220、噴射圧0.35MPa、ブラスト時間10秒の条件が最も安定した抗菌性能となった。ただし、抗菌活性値が4前後と高いため、2前後のものを作製した場合にも同様の安定性が得られるかどうか確認が必要となる。一部サンプルについては、3検査機関で抗菌性能評価中。サンドブラスト加工メーカーより、抗菌剤をサンドブラスト粒子としてPPプレートに吹き付け、表面に埋め込ませる方法を提案された。現在、砥粒としての流動性があるかどうか確認中。

ディスカッションを踏まえ、今後次のように進めることとした。

・抗菌剤含有量を減らしてPPプレートを作製し、そのプレートを用いて、上記で定めた最適条件でサンドブラスト加工する。

銀担持ゼオライト:1.3⇒1.2、1.1%

銀担持リン酸ジルコニウム:0.3⇒0.275、0.25%

- ・抗菌性能は、保存株や継代培養回数によって大きく異なることもあるため、複数の試験機関で評価する場合は、可能な限り条件を併せる。
- ・サンドブラスト加工品の後処理についても検討する(拭く、窒素ブロー等)。
- ・これまでは手作業によるサンドブラスト加工であるが、バラツキをなくすためには、自動連続式の機械を用いるのが好ましいため、調査する(現在の委託先は未所有)。

ー以上ー

平成 17 年度 第3回ワーキンググループ(WG) 議事録

1)日時 2005. 11. 24(木) 12:30~17:00

2)場所 鈴鹿工業高等専門学校(三重県鈴鹿市)

3)出席者(順不同、敬称略)

メンバー:生貝 初、川合 晶子、今井 茂雄、杉本 茂、八代 敏晴、和田 邦身、
山本 則幸(文責)

オブザーバー:松岡 英明、林 進、藤本 嘉明

欠席委員:城戸 勝治

4)議事

1. 前回本委員会概要報告

議事録を元に報告がなされた。

2. バイオ基板検討状況

生貝メンバーより、資料を元に報告がなされた。

SPring-8のビームラインを用いて、銀のXAFS分析を行なった(実験は、宇都宮大学 飯村助教が実施)。その結果、次のことがわかった。なおすべての実験結果解析が終了するのは、1月の予定である。

- ・抗菌活性値が1.4のバイオ基板上の銀の存在が確認できた。
- ・レファレンスとして測定した硝酸銀と、バイオ基板上の銀は、スペクトルパターンが異なる。このことから、バイオ基板上の銀は、単純な銀イオンではないことがわかった。
- ・バイオ基板作製時の銀溶液濃度が高いほどスペクトル強度は強いが、直線関係にはない。よって結合する銀量がある濃度で飽和することが示唆された。
- ・バイオ基板作製時のタンパク質濃度が低いほどスペクトル強度は強い結果となった。興味深い結果であるが理由は不明である。
- ・銀溶液(原液)の測定も行なったが、検出されなかった。このことから、基板上で銀が相当量濃縮されていることが示唆された。
- ・銀担持リン酸ジルコニウムを練り込んだPPプレートを測定した結果、硝酸銀と同じスペクトルパターンを示した。このことから、液体中であれば固体中であれば、銀イオンであれば同じスペクトルを示すことがわかった。この結果を考え合わせると、バイオ基板上の銀はイオンでないことは確実と思われる。

また、今井メンバーより、バイオ基板の各作製プロセスのSEM観察結果の報告がなされた。ここで観察したサンプルは、SPring-8での測定に用いたものとは別に作製したものであるが、抗菌性能が認められなかったものである。シリコンウェハー上に、物質の存在は確認できるが、均一性が低いこと、及び銀溶液処理で、タンパク質が脱離したように見受けられた。銀の供給方法として電解以外にキレートもしくは超希薄硝酸銀などを検討する必要がある。

3. 樹脂練り込みプレート検討状況

山本メンバーより、資料を元に報告がなされた。

先のサンドブラスト加工品は、抗菌活性値が4前後と高かったため、抗菌剤添加量を減らし、先に見出した最適条件でサンドブラスト加工を行なった。その結果、今回も抗菌活性値が4以上の値となった。

原因追求のため、これまで作製したプレートの灰分測定を行なった。その結果、設計値と大きく外れるものがあり、最適添加量より多すぎたことがわかった。

別の方法として、未加工プレートに、抗菌剤粒子を打ち込むことを検討した。その結果、隕石によるクレーター様のものができるだけであり、埋め込みは困難であることがわかった。

サンドブラストの代わりに、レーザー加工により表面を荒らす加工を検討した。その結果、表面が一旦融解し、再度固まったことにより、表面近傍の抗菌剤が、逆に樹脂内部に閉じ込められたことが示唆された。このことは、加速電圧を変えたSEM観察によっても確認された。レーザー出力を下げることにより、程よい表面荒れの状態を作製できる可能性も考えられる。

4. 今後の予定

ディスカッションの結果、今後、次の検討を行なうこととした。

4-1. バイオ基板

- 1) SPring-8測定結果の解析継続
- 2) 基板は、シリコンウェハーに絞って検討を行なう(PVDFはペンディング)。
- 3) 基板はシリコンがベターか、ガラス基板ではいけないのか、再度確認する。
- 4) バイオ基板を作製し、抗菌力評価とSEM観察で再現性を確認する。
- 5) 保存時の経時変化という要因を排除するため、経時変化が起こりにくい条件で保管し、複数の機関で抗菌力評価する場合は、時期を揃えて行なう。
- 6) 来年度については、未定であるが、SPring-8での継続試験行なう方向で進める。
- 7) 銀溶液として、銀電極を用いる方法以外に、硝酸銀水溶液、あるいは銀アンモニウム錯体溶液も検討する。
- 8) タンパク質定性のための酵素抗体法を引き続き検討する。同手法でコレステロールが定性できないかどうか併せて検討する。

4-2. 樹脂練り込みプレート

- 1) 抗菌剤添加量のバラツキをなくすため、抗菌剤添加量を振ったサンプルを一連の成形加工で作製する(抗菌剤含有量は灰分測定で確認)。そのサンプルを用いて、次の表面加工を検討する。
 - ・サンドブラスト加工: これまでの検討で定めた最適条件
 - ・表面切削加工: 先の検討でバラツキ大で不可としたが、設計添加量と実際の添加量が一致していないことがわかったため、本当に駄目なのか見直す必要がある。
 - ・レーザー加工: 出力を下げても行なう。
- 2) サンドペーパー研磨品は比較的抗菌性能が安定しているので、機械的な表面研磨を検討する。
- 3) プレートではなく、フィルムでの加工を検討する(厚み: 150 μ m)。

○バイオ基板については、当初目標どおりのものが得られる可能性が見出された。しかし、今年度中にコントロールサンプルとして完成させることは困難と考えられるため、メカニズムの構築と実験室レベルでの完成を目指す。

一方、樹脂練り込みプレートについては、試験を加速し、次世代技能試験サンプルとして使えるよう目途をつける。

5. その他

会議後、生貝メンバーの実験室見学を行なった。

- 以上 -

平成 17 年度 第4回ワーキンググループ(WG) 議事録

1)日時 2006. 1. 25(水) 13:00~17:00

2)場所 日本食品分析センター 名古屋支所 会議室(愛知県名古屋市)

3)出席者(順不同、敬称略)

メンバー:生貝 初、川合 晶子、今井 茂雄、杉本 茂、和田 邦身、山本 則幸(文責)

オブザーバー:林 進、藤本 嘉明

欠席委員:八代 敏晴、城戸 勝治

4)議事

1. 前回議事録確認

議事録案を正式な議事録とすることが承認された。

2. 前回本委員会概要報告

議事録を元に報告がなされた。

3. バイオ基板検討状況

生貝メンバーより、資料を元に報告がなされた。

SPring-8のビームラインを用いて、Bio基板上の銀のXAFS分析を行なった(実験は、宇都宮大学 飯村助教授が実施)。その結果、次のことがわかった。

・Agに関して、2種類の異なる典型的なAg K-edge EXAFSスペクトルが存在する。

Type1 AgNO₃水溶液、Ag担持リンジルコニウム…Agイオンを示唆

Type2 Ag箔、本Bio基板(Agは電気分解およびAgClで担持)…金属銀を示唆

Bio基板の銀が、金属銀となる可能性として、電気分解時に生じた銀塊あるいはクラスターであることと、タンパク質のSH基と反応して銀イオンが還元されることが考えられるが、どちらであるか不明である。

・AFM観察の結果からは、銀塊やクラスターらしきものは認められなかった(この結果のみで否定できる訳ではない)。

・塩化銀飽和水溶液を用いた場合、洗浄度合いにより、銀の状態が異なる。すなわち、よく洗浄したものは金属銀の様相を呈し、軽く洗浄したものは銀イオンの様相を呈す。本試験は宇都宮大、飯村助教授が実施したため、詳細不明。今後、詳細を確認する。

・タンパク質濃度を高くするほど(銀負荷は同じ)、予想に反し、XAFSで銀の強度が小さくなる現象が観察されている。規格化することにより、タンパク質濃度が高いほど銀の強度が高くなる結果となった。ただし、なぜ規格すると逆転するのかを確認する必要がある。

・Bio基板を作製し、4機関で同時評価する予定であったが、新たな電気分解装置の入手が遅れたため、未実施である。

3. 樹脂練り込みプレート検討状況

山本メンバーより、資料を元に報告がなされた。

抗菌剤添加量を振った一連のPPプレートサンプルを作製し、サンドペーパー研磨したところ、抗菌性能は抗菌剤添加量に比例することが確認された。

そこで、サンドブラスト加工、表面切削加工、バフ研磨を実施した。サンドブラスト加工では、サンドペーパー研磨より抗菌性能が高かった。これは、はじ出された抗菌剤粒子が付着しているためと考えられる。超音波等でこれを除去できれば、安定した結果も期待できる。

表面切削については、1機関しかデータが出ていないが、抗菌剤添加量に比例する結果と

なった。バフ研磨品の抗菌力評価は実施中。

これらの表面状態を見るため、SEM観察を行なった。サンドブラスト品は、先と同様、研磨剤が多く残量しており、抗菌剤粒子との区別がつかなかった。表面切削、サンドペーパー研磨品は、表面に頭出ししているものと出ていないものが見られるが、添加量につれて抗菌剤粒子数は増加する傾向が見られた。

レーザー加工は、強度を10W(前回試験で最も低い条件)より下げると、安定した加工ができないとのことなので、中止とした。また、フィルム加工については、量産対応するところが見つかっていないため、ペンディングとした。

4. 今後の予定

ディスカッションの結果、今後、次の検討を行なうこととした。

4-1. Bio基板

- 1) 電気分解装置は、銀塊あるいはクラスター生成の可能性があるため、銀イオン供給源として、今後は用いない。かわりに、硝酸銀水溶液、および塩化銀水溶液を用いる。塩化銀水溶液は、銀イオン析出あるいは、微細固形分の混入の可能性があるため、メンブランフィルターで濾過して用いる。得られたサンプルは4試験機関で評価する。
- 2) 塩化銀水溶液を用いた場合、洗浄度により銀の様相が異なることに対して、飯村助教授に確認する。
- 3) 今年度中に、量産までは持っていくことは不可能であるが、プロトタイプは完成する見込みである。来年度は、抗技協独自でも検討を継続し、量産化を目指すこととした。
- 4) Spring—8では有用な情報が多く得られたため、飯村助教授の協力が得られれば、来年度も試験研究申請を行うこととした。
- 5) 飯村助教授の了解が得られれば、本委員会に、オブザーバー出席していただくことを提案することとした。

4-2. 樹脂練り込みプレート

- 1) 表面精密研磨(#1000サンドペーパーを用いた機械研磨、および電材関係の研磨機)を実施する。
- 2) 表面加工の後処理方法を検討する(超音波洗浄等)。
- 3) 今年度中に最終処方を決定する。
- 4) 夏を目処に量産体制を整備し、CSを供給できるようにする。

— 以上 —

調査研究の実施能力 (平成18年3月現在)

本調査研究に関連する抗菌製品技術協議会の調査研究の実績等は次に示すとおりである。

1. 平成13年度経済産業省委託独立行政法人製品評価技術基盤機構再委託事業「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」(平成14年3月成果報告書提出)を受諾し、調査研究を実施した。
2. 平成13年度での調査研究内容は、「標準試験片に要求される項目の洗い出しと作製法の提案」「標準試験片の検討」「標準試験片の仕様」「試験片の抗菌効果(安定性)の確認」であり、それぞれにおいて所定の成果をとりまとめた。特に、本調査研究の最終目標である認証標準物質を用いた「不確かさ」の推定方法と考え方のまとめに至るステップとして、2次標準物質の作製をおこなうとともに、不確かさを見積もるための特性要因図から上位3つの要因(試験菌株、培地、培養容器)を抽出し抗菌性試験結果に与える影響を評価した。
3. 平成14年度での調査研究内容は、13年度の結果を受け、「2次標準物質の完成度を高める」、「1次標準物質作成製法のアイデア出しと、ナノテクノロジーを駆使して1次標準物質の試作・作製」、「1次標準物質と2次標準物質とのSI単位へのトレーサビリティの確立のためのデータ収集と分析」、「海外における環境条件と不確かさ研究調査の状況把握」を行い、所定の成果をとりまとめた。特に、GaAsウエハを用いた1次標準物質候補については、きわめて安定性が高い抗菌力を得ることができた。また、2次標準物質は、水溶性コーティングによる製造法のさらなる改良を継続し、所期の目的に一段と近づけることができた。また、不確かさを見積もる参照法について、斬新なアプローチをすすめた。これらの成果については、本年3月にJNLA技術情報セミナーにて発表する機会が与えられ、高い評価を得た。
4. 平成15年度では、3か年のまとめとして標準試験片として絞り込んだGaAsウエハ及び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。この不確かさ推定の手順により、抗菌性試験における不確かさ推定の一事例をしめすことができた。

なお、上記以外にも本会が経済産業省及び独立行政法人製品評価技術基盤機構から委託・再委託により受諾した調査研究は以下のとおりである。

5. 平成11年度から12年度において、JIS Z2801 原案作成調査研究の事務局を受諾し、経済産業省「抗菌製品ガイドライン」に示された最短目標スケジュールを遵守し、平成12年12月20日官報公示につなげた。
6. 平成11年度から12年度において、JNLA 技能試験(生活分野 抗菌性試験)のプログラム企画書作成調査研究を受諾し、平成13年2月に報告書を取りまとめた。
7. 平成13年度において、抗菌陽性試験体実用化調査研究を受諾し、所定の仕様成果を取りまとめ、平成13年度実施のNITE抗菌技能試験への標準試験体として供給した。
8. 平成15年度において、経済産業省から3か年計画による基準認証研究開発事業(抗菌加工製品の試験方法の標準化)を受諾した。ISO/TC61/SC6の平成16年秋の国際年次大会で新業務項目(NWIP)が承認され、続いて平成17年秋の国際年次大会では委員会原案

[添付資料6]

(CD)が承認された。平成18年1月には国際規格原案(DIS)を事務局(DIN)に提出し、同年秋の国際年次大会においてDISが採択されることを目指し、活動を続行している。

以上

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諾で実施したものの成果である。