

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

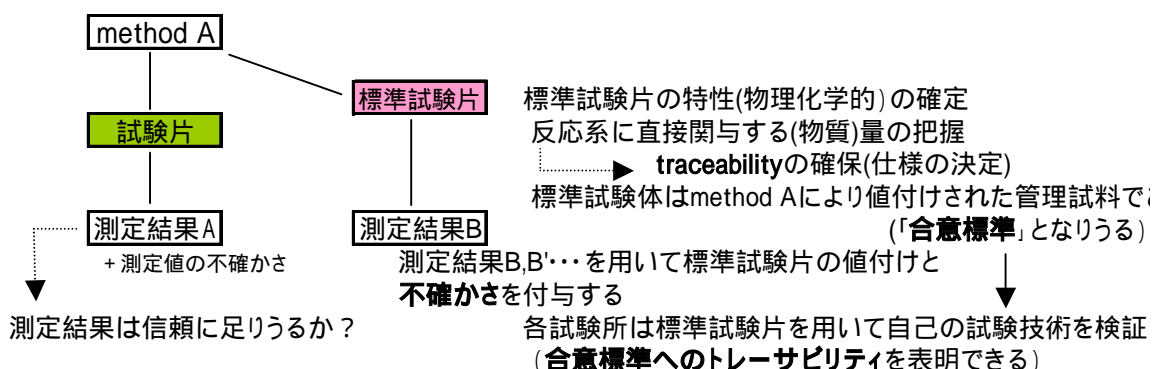
- ・認証標準物質を用いた「不確かさ」の推定方法と考え方まとめ
- ・経済活動のグローバル化を考慮した認証標準物質の作製供給体制の確立

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。

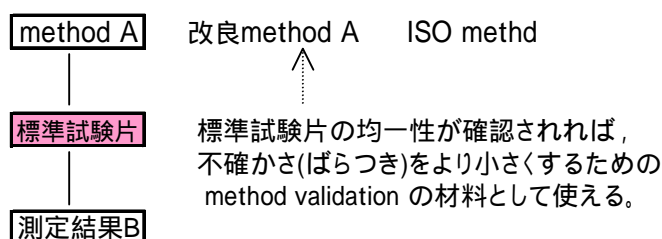
3. 抗菌性試験における不確かさの推定とトレーサビリティ確保のアプローチ

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くなれば、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E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E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ウェハーA	3.6	4.0	5.12	1.0	1.7	3.92
GaAsウェハーB	3.0	3.4	4.98	1.6	1.7	4.19
GaAsウェハー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設定
 - ・2003年8月21日 塗工本機のプロセス設定
 - ・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。 1729cm^{-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 1548cm^{-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ブランク(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)	0.1200	1	0.1200	0.40	10.13	34.12	
試験機関(B)	4.6569	3	1.5523	5.18	9.28	29.46	
R × B(e1)	0.8991	3	0.2997	13.84	2.90	4.46	**
試験片(A)	4.4408	1	4.4408	205.12	4.15	7.50	**
B × A	0.3887	3	0.1296	5.98	2.90	4.46	
R × A	0.0133	1	0.0133	0.62	4.15	7.50	
R × B × A	0.1160	3	0.0387	1.79	2.90	4.46	
誤差(e2)	0.6928	32	0.0217				
合計	11.3276	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	
繰返(R)	0.1200	1	0.1200	0.40	10.13	34.12	
試験機関(B)	4.6569	3	1.5523	5.18	9.28	29.46	
e1(R×B)	0.8991	3	0.2997				
試験片(A)	4.4408	1	4.4408	194.46	4.11	7.50	**
B×A	0.3887	3	0.1296	5.67	2.87	4.46	**
誤差(e2)	0.8221	36	0.0228				
合計	11.3276	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

$$e1 = 0.2997 = 0.548、B = \{(1.5523-0.2997)/12\} = 0.323$$

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、

$$UC = (B^2 + e1^2/3) = (0.323^2 + 0.2997/3) = 0.452$$

拡張不確かさ $[t(47,0.05)=2.01]$ は、 $0.452 \times 2.01 = 0.91$ 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。))

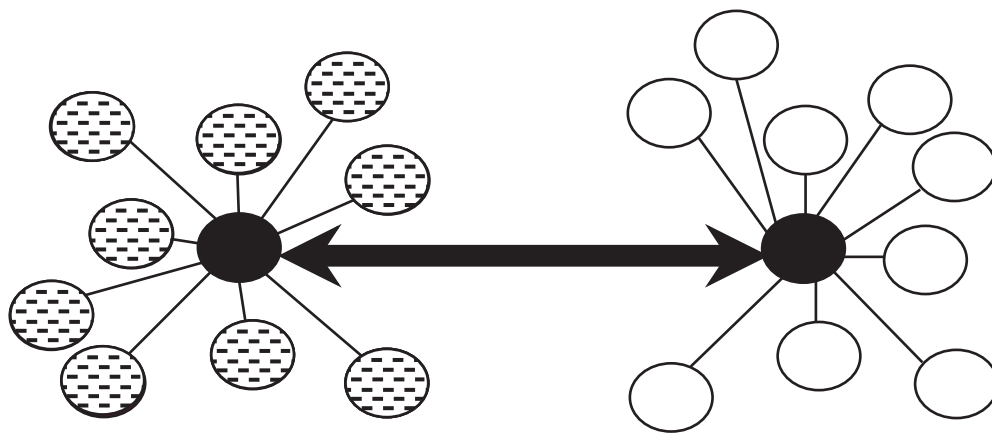
本報告書では、標準試料片を用いた繰返し試験を実施したが、例えばインハウスの試験所(抗菌製品製造メーカーの試験所)などでは自社製品で抗菌活性値が適切(2~4)で均一で安定な製品(試験片)があれば、これを繰返し試験することにより不確かさの推定を行うこともできる。

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。

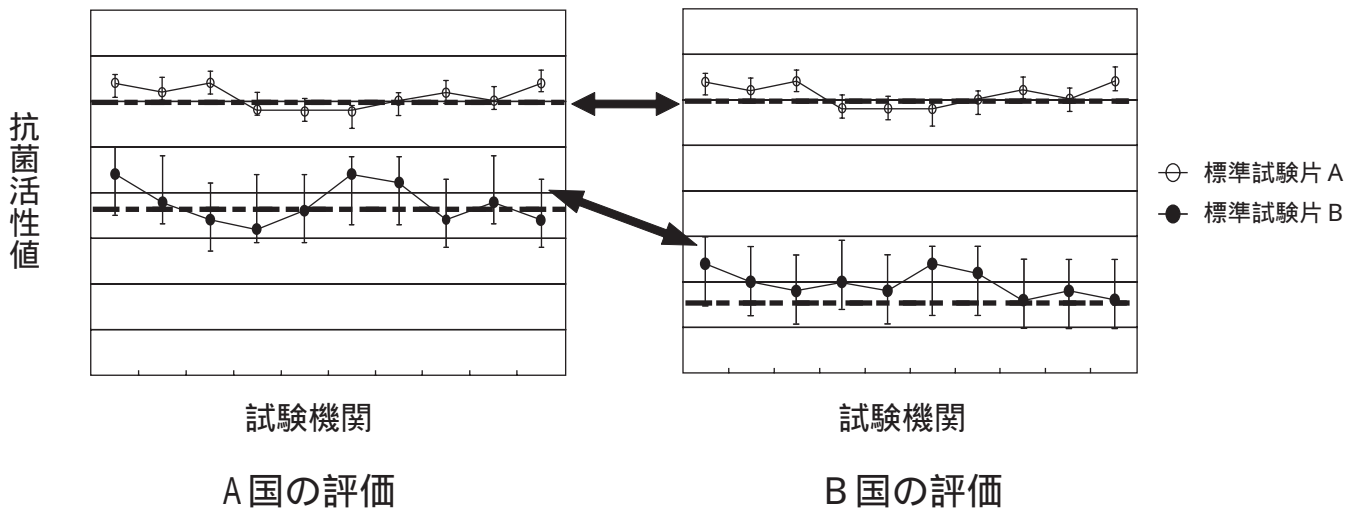
さらに、各国で現在使用されている類似の試験法の国際間比較においても、あるいは国際規格を制定する際の試験法の検討という場面においてもこのような標準試験片の存在意義は極めて大きいといえる。このような関係を概念図で示すと図-1及び図-2のようになる。



A国

B国

- : 標準試験片 (A国合意標準)
- ◐ : A国試験所 (A国Method)
- : B国試験所 (B国Method)



{ A国では、標準試験片 A (合意標準) より
 トレーサビリティが確立されている。 }

図1 標準試験片を介した国際間相互比較
 (平成14年調査報告を一部改変)

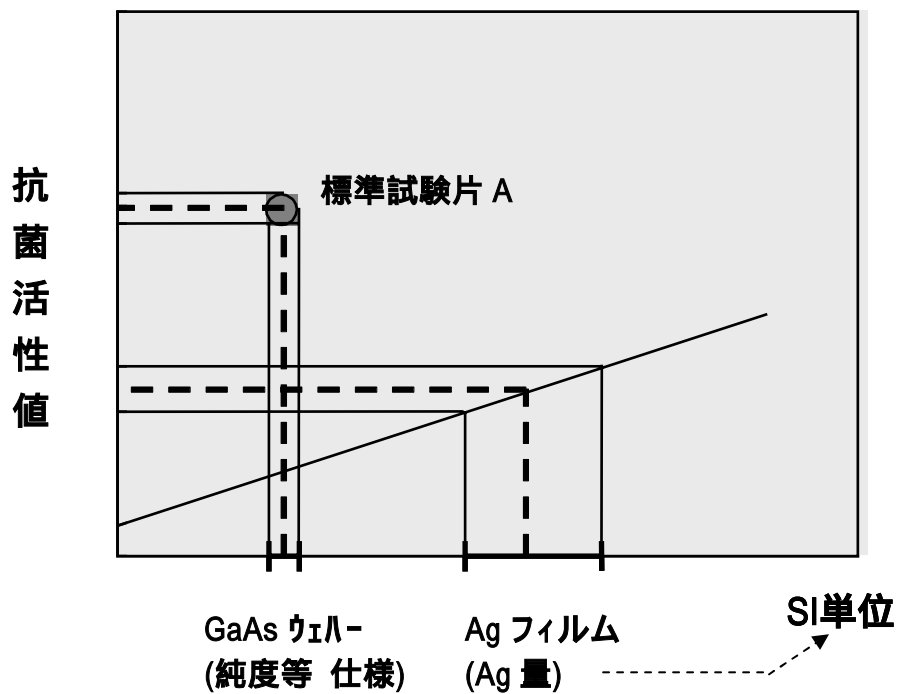


図 2 標準試験片 A と標準試験片 B の関係
 (平成 14 年度報告書を一部改変)

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]

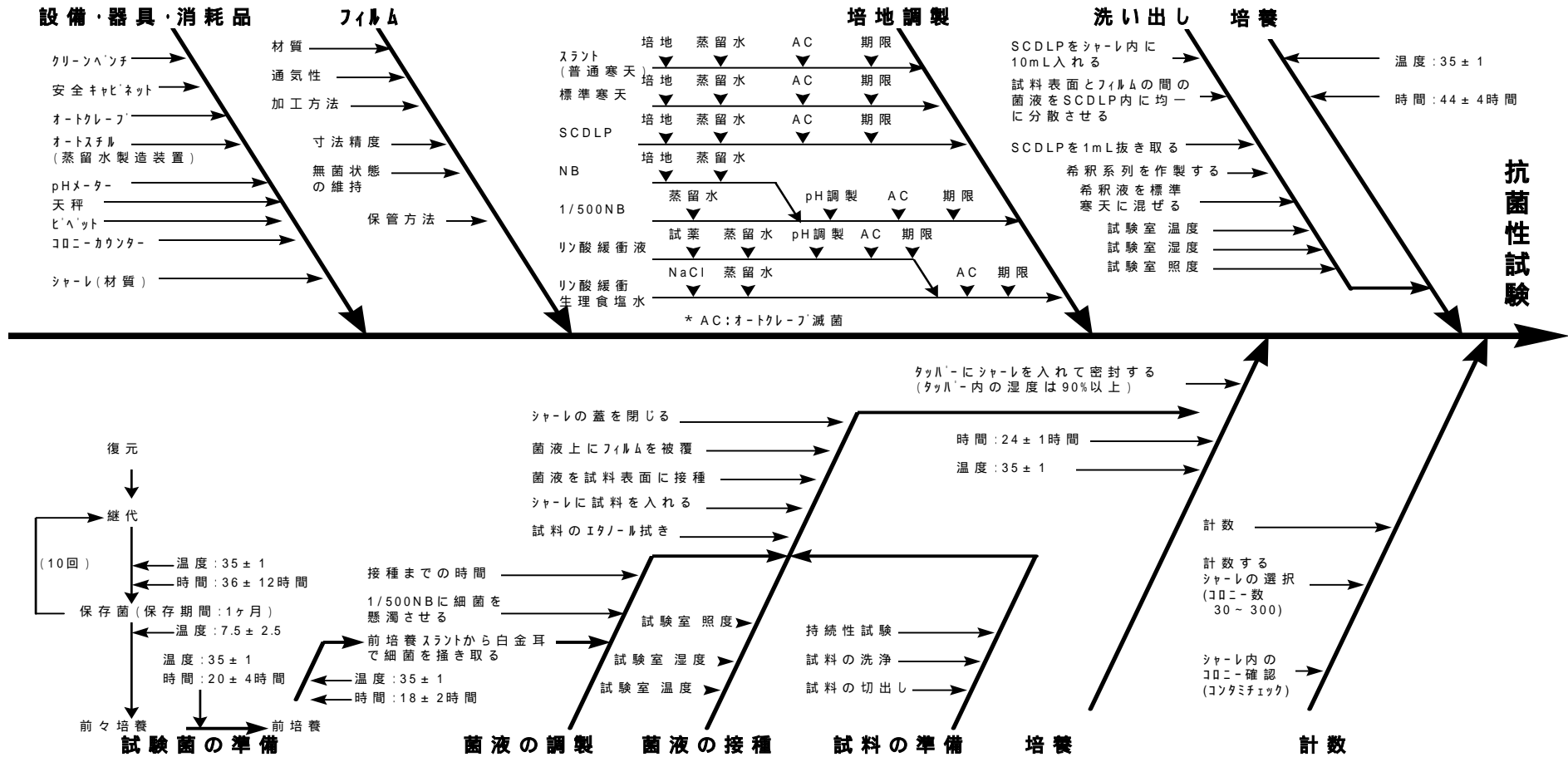


図1 抗菌性試験の特性要因図(平成13年度報告書より)

[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 (フィルムブランク)	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 (フィルムブランク) 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 (フィルムブランク)	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 (フィルムブランク) 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 (フィルムブランク)	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 (フィルムブランク) 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	

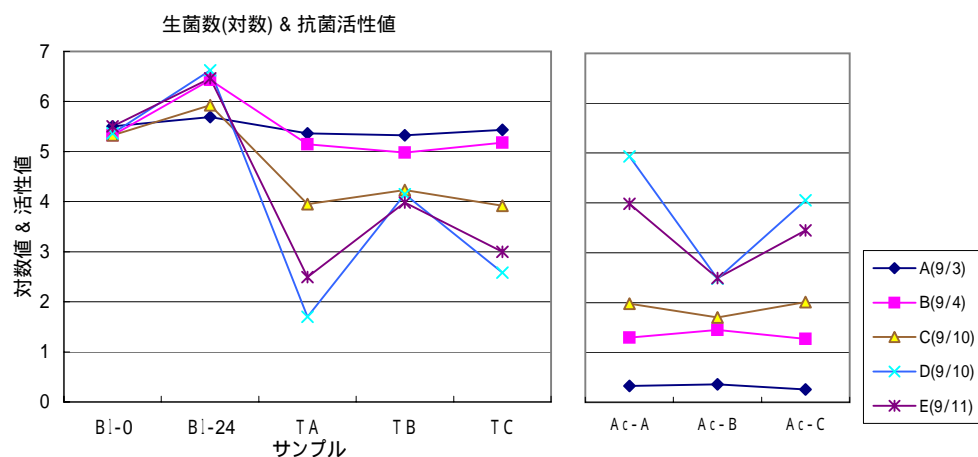
[1] 共通菌株 (黄色ブドウ球菌 NBRC12732)

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	249	2.5E+5	2.3E+5		
	2	2	230	2.3E+5			
	3	2	206	2.1E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク)	1	4	42	4.2E+6	4.2E+6		
	2	4	44	4.4E+6			
	3	4	41	4.1E+6			
共通容器	1	0	8	8.0E+1	5.0E+1	4.72	4.93
	2	0	3	3.0E+1		5.15	
	3	0	4	4.0E+1		5.02	
GaAsウイルス- No.1 (A) (ジャスト品:再洗浄あり)	1	1	207	2.1E+4	1.4E+4	2.31	2.48
	2	1	118	1.2E+4		2.55	
	3	1	98	9.8E+3		2.64	
共通容器	1	0	21	2.1E+2	3.8E+2	4.30	4.05
	2	0	51	5.1E+2		3.92	
	3	0	42	4.2E+2		4.00	

[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	31.5	3.2E+5	3.2E+5		
	2	2	320.5	3.2E+5			
	3	2	310.5	3.1E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク)	1	3	281	2.8E+6	2.9E+6		
	2	3	309.5	3.1E+6			
	3	3	293	2.9E+6			
共通容器	1	0	15	1.5E+2	3.1E+2	4.29	3.98
	2	0	19	1.9E+2		4.19	
	3	0	58	5.8E+2		3.71	
GaAsウイルス- No.2 (B) (ジャスト品:再洗浄なし)	1	1	98.5	9.9E+3	9.6E+3	2.48	2.49
	2	1	79	7.9E+3		2.57	
	3	1	109.5	1.1E+4		2.43	
共通容器	1	0	96	9.6E+2	1.0E+3	3.49	3.45
	2	0	119	1.2E+3		3.39	
	3	0	95	9.5E+2		3.49	

希釈倍数は、指数(例えば10倍のとき1, 100倍のとき2)を入力する。



GaAsウェハーの抗菌性試験結果(試験片D)
試験結果表 2

試験機関 A

[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	287	2.9E+5	2.9E+5		
	2	2	283	2.8E+5			
	3	3	31	3.1E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク) 共通容器	1	3	255	2.6E+6	2.4E+6		
	2	3	254	2.5E+6			
	3	3	204	2.0E+6			
GaAsウェハー- No.1(3インチ) (ジャスト品:通常品) 共通容器	1	1	259	2.6E+4	5.4E+4	1.96	1.64
	2	2	75	7.5E+4		1.50	
	3	2	62	6.2E+4		1.58	

試験機関 B

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	181.5	1.8E+5	1.8E+5		
	2	2	177.5	1.8E+5			
	3	2	178.5	1.8E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク) 共通容器	1	3	201.5	2.0E+6	2.6E+6		
	2	3	272.25	2.7E+6			
	3	3	299	3.0E+6			
GaAsウェハー- No.1(3インチ) (ジャスト品:通常品) 共通容器	1	0	163	1.6E+3	3.0E+3	3.20	2.93
	2	1	42	4.2E+3		2.79	
	3	0	319.5	3.2E+3		2.91	

試験機関 C

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	32	3.2E+5	3.4E+5		
	2	3	37	3.7E+5			
	3	3	34	3.4E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク) 共通容器	1	3	240	2.4E+6	2.5E+6		
	2	3	251	2.5E+6			
	3	3	271	2.7E+6			
GaAsウェハー- No.1(3インチ) (ジャスト品:通常品) 共通容器	1	3	41	4.1E+5	4.1E+5	0.79	0.80
	2	3	46	4.6E+5		0.74	
	3	3	35	3.5E+5		0.86	

試験機関 D

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	296	3.0E+5	3.0E+5		
	2	2	321	3.2E+5			
	3	2	281	2.8E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク) 共通容器	1	4	53	5.3E+6	4.2E+6		
	2	4	52	5.2E+6			
	3	3	213	2.1E+6			
GaAsウェハー- No.1(3インチ) (ジャスト品:通常品) 共通容器	1	0	50	5.0E+2	9.6E+2	3.93	3.64
	2	0	99	9.9E+2		3.63	
	3	0	139	1.4E+3		3.48	

[1]暗条件 照度 9.60 ~ 9.85 Lx (接種時)

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	259	2.6E+5	2.7E+5		
	2	2	266.5	2.7E+5			
	3	2	275	2.8E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク)	1	3	304.5	3.0E+6	3.0E+6		
	2	3	282.5	2.8E+6			
共通容器	3	3	306	3.1E+6			
GaAsウエハ- No.1(3インチ)	1	0	47	4.7E+2	6.0E+2	3.80	3.70
(ジャスト品:通常品)	2	0	51.5	5.2E+2		3.76	
共通容器	3	0	80.5	8.1E+2		3.57	

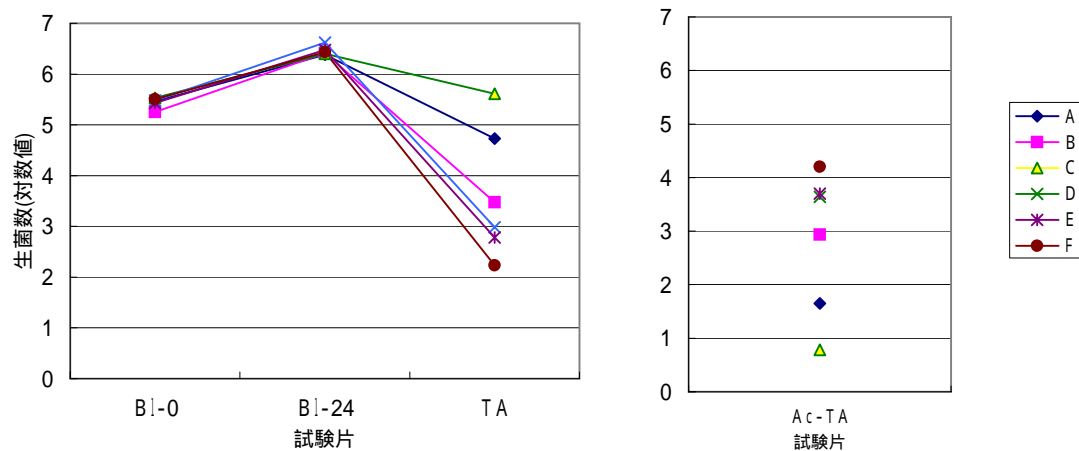
[2]明条件 照度 28300 ~ 29100 Lx (接種時)

記号 F

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	265.5	2.7E+5	3.2E+5		
	2	2	322	3.2E+5			
	3	2	375	3.8E+5			
接種24hr対照区 (フィルムプランク)	1	3	280	2.8E+6	2.7E+6		
	2	3	273	2.7E+6			
共通容器	3	3	250.5	2.5E+6			
GaAsウエハ- No.1(3インチ)	1	0	13.5	1.4E+2	1.7E+2	4.30	4.21
(ジャスト品:通常品)	2	0	20	2.0E+2		4.13	
共通容器	3	0	16	1.6E+2		4.22	

希釈倍数は、指数(例えば10倍のとき1, 100倍のとき2)を入力する。

生菌数(対数値)と抗菌活性値



GaAsウェハー-抗菌性試験(試験片E) 試験結果表 3

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	抗菌活性値	抗菌活性値(平均)
接種直後対照区 (フィルムブランク)	1	2	212	2.1E+5	2.2E+5		
	2	2	231.5	2.3E+5			
	3	2	204	2.0E+5			
	4	2	208.5	2.1E+5			
	5	2	231.5	2.3E+5			
接種24hr対照区 (フィルムブランク)	1	3	212	2.1E+6	2.0E+6		
	2	3	196	2.0E+6			
	3	3	212	2.1E+6			
	4	3	200	2.0E+6			
	5	3	201	2.0E+6			
GaAsウェハー(4インチ) (ジャスト品:再洗浄あり)	1	0	1	1.0E+1	5.0E+1	5.31	4.61
	2	0	0	1.0E+1		5.31	
	3	0	12.5	1.3E+2		4.21	
	4	0	8.5	8.5E+1		4.38	
	5	0	2	2.0E+1		5.01	

希釈倍数は、指数(例えば10倍のとき1, 100倍のとき2)を入力する。

- 1) 接種時の照度は 5.13 ~ 5.33 Lx
- 2) GaAsウェハー(4インチ)の仕様は第1回納入の仕様Aと同じ「ジャスト品で再洗浄あり(通常品)」。
* 第1回納入のGaAsウェハー(仕様A)の抗菌活性値(平均)は3.98。

GaAsウェハ－(試験片A,D)による不確かさの推定(算出事例)
結果表 4

試験片A

試験機関	1	2	3	合計	標準偏差	平均	平均の平均
A	0.32	0.35	0.32	0.99	1.80	0.33	2.53
B	1.30	1.39	1.17	3.86		1.29	
C	2.05	1.80	2.18	6.03		2.01	
D	4.72	5.15	5.02	14.89		4.96	
E	4.29	4.19	3.71	12.19		4.06	

3.9E-01

要因	平方和	自由度	分散	F値	分散の期待値
A試験所	44.79	4	11.20	287.68	$(e)^2+3(a)^2$
e誤差	0.39	10	0.04		$(e)^2$
全体	45.17	14	3.23		
e	0.20			F(4,10,0.05)=3.48	有意差あり
a	1.93	3.719151		t(14,0.05) = 2.145	
uc	1.94	3.758071			
U	4.16				抗菌活性値 = 2.53 ± 4.16

試験片D

試験機関	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(4,10,0.05)=3.48	有意差あり
a	1.28	1.644712		t(14,0.05) = 2.145	
uc	1.30	1.679926			
U	2.78				抗菌活性値 = 2.57 ± 2.78

試験片A+D

試験機関	試験片A			試験片D			合計	標準偏差	平均	平均の平均
	1	2	3	4	5	6				
A	0.32	0.35	0.32	1.96	1.50	1.58	6.03	1.49	1.01	2.53
B	1.30	1.39	1.17	3.20	2.79	2.91	12.76		2.13	
C	2.05	1.80	2.18	0.79	0.74	0.86	8.42		1.40	
D	4.72	5.15	5.02	3.93	3.63	3.48	25.93		4.32	
E	4.29	4.19	3.17	3.80	3.76	3.57	22.78		3.80	

1.3E+01

要因	平方和	自由度	分散	F値	分散の期待値
A試験所	51.43	4	12.86	24.71	$(e)^2+6(a)^2$
e誤差	13.01	25	0.52		$(e)^2$
全体	64.44	29	2.22		
e	0.72			F(4,25,0.05)=2.76	有意差あり
a	1.43	2.056325		t(29,0.05) = 2.045	
uc	1.61	2.576663			
U	3.28				抗菌活性値 = 2.53 ± 3.28

[添付資料4]

Agアクリル系コーティングフィルムの抗菌性試験(試験1回目)

試験結果表 5

試験機関 A

[1] 抗菌活性値(フィルムブランクを基準)

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 (フィルムブランク)	1	2	285	2.9E+5	3.2E+5		
	2	3	32	3.2E+5			
	3	3	34	3.4E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	119	1.2E+6	1.1E+6		
	2	3	110	1.1E+6			
	3	3	104	1.0E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	149	1.5E+5	1.3E+5		
	2	2	109	1.1E+5			
	3	2	128	1.3E+5			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350 ppm)	1	2	82	8.2E+4	7.1E+4	1.13	1.19
	2	2	53	5.3E+4		1.32	
	3	2	79	7.9E+4		1.15	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450 ppm)	1	1	157	1.6E+4	1.4E+4	1.85	1.89
	2	1	159	1.6E+4		1.84	
	3	1	111	1.1E+4		2.00	

試験機関 B

[1] 抗菌活性値(フィルムブランク基準)

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 (フィルムブランク)	1	2	236	2.4E+5	2.6E+5		
	2	2	258.5	2.6E+5			
	3	2	296.25	3.0E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	4	37.5	3.8E+6	3.0E+6		
	2	3	258	2.6E+6			
	3	3	280.5	2.8E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	62	6.2E+4	7.1E+4		
	2	2	89.5	9.0E+4			
	3	2	62	6.2E+4			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350 ppm)	1	1	149.5	1.5E+4	1.7E+4	2.31	2.26
	2	1	207	2.1E+4		2.17	
	3	1	148.5	1.5E+4		2.31	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450 ppm)	1	1	71.5	7.2E+3	4.1E+3	2.63	2.87
	2	0	199	2.0E+3		3.18	
	3	0	322.75	3.2E+3		2.97	

試験機関 C

[1] 抗菌活性値(フィルムブランク基準)

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 (フィルムブランク)	1	3	34	3.4E+5	3.9E+5		
	2	3	41	4.1E+5			
	3	3	43	4.3E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	90	9.0E+5	8.5E+5		
	2	3	65	6.5E+5			
	3	3	99	9.9E+5			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	92	9.2E+4	6.4E+4		
	2	2	56	5.6E+4			
	3	2	43	4.3E+4			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350 ppm)	1	1	205	2.1E+4	2.5E+4	1.62	1.53
	2	2	39	3.9E+4		1.34	
	3	1	155	1.6E+4		1.74	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450 ppm)	1	1	90	9.0E+3	8.6E+3	1.97	1.99
	2	1	76	7.6E+3		2.05	
	3	1	93	9.3E+3		1.96	

[1] 抗菌活性値(抗菌剤添加量 ブランクフィルムの試験片基準)

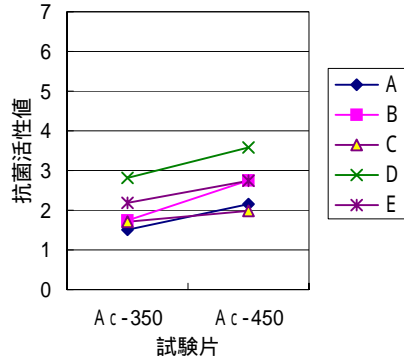
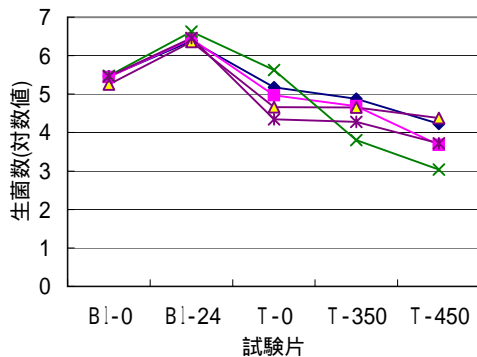
サンプル	No	希釈倍数	カウント	生菌数(cfu/試料)	平均生菌数	抗菌活性値	抗菌活性値(平均)
接種直後対照区 (フィルムブランク)	1	2	225	2.3E+5	2.1E+5		
	2	2	203	2.0E+5			
	3	2	191	1.9E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	179	1.8E+6	2.1E+6		
	2	3	271	2.7E+6			
	3	3	174	1.7E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	140	1.4E+5	2.4E+5		
	2	2	255	2.6E+5			
	3	3	31	3.1E+5			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350ppm)	1	0	243	2.4E+3	1.7E+3	2.93	3.08
	2	0	103	1.0E+3		3.31	
	3	0	175	1.8E+3		3.08	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450ppm)	1	0	1	1.0E+1	7.1E+2	5.32	3.47
	2	0	143	1.4E+3		3.16	
	3	0	68	6.8E+2		3.49	

[1] 抗菌活性値(フィルムブランク基準)

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 (フィルムブランク)	1	2	258	2.6E+5	2.8E+5		
	2	2	294	2.9E+5			
	3	2	288.5	2.9E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	156	1.6E+6	1.9E+6		
	2	3	206	2.1E+6			
	3	3	210	2.1E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	1	292.5	2.9E+4	2.4E+4		
	2	1	231.5	2.3E+4			
	3	1	189.5	1.9E+4			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350 ppm)	1	1	272	2.7E+4	2.8E+4	1.85	1.83
	2	1	319.5	3.2E+4		1.78	
	3	1	255	2.6E+4		1.87	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450 ppm)	1	1	71	7.1E+3	9.7E+3	2.43	2.29
	2	1	163.5	1.6E+4		2.07	
	3	1	55.5	5.6E+3		2.54	

希釈倍数は、指数(例えば10倍のとき1, 100倍のとき2)を入力する。

生菌数(対数值)と抗菌活性値



Agアクリル系コーティングフィルム抗菌性試験(試験2回目)
試験結果表 6

試験機関 A

[1] 抗菌活性値(抗菌剤添加量 0ppmの試験片基準)

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 (フィルムブランク)	1	2	287	2.9E+5	2.9E+5		
	2	2	283	2.8E+5			
	3	3	31	3.1E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	223	2.2E+6	2.4E+6		
	2	3	263	2.6E+6			
	3	3	236	2.4E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	151	1.5E+5	1.5E+5		
	2	2	152	1.5E+5			
	3	2	151	1.5E+5			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350 ppm)	1	2	68	6.8E+4	7.5E+4	1.55	1.51
	2	2	71	7.1E+4		1.53	
	3	2	86	8.6E+4		1.45	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450 ppm)	1	1	152	1.5E+4	1.7E+4	2.20	2.14
	2	1	239	2.4E+4		2.00	
	3	1	133	1.3E+4		2.26	

試験機関 B

[1] 抗菌活性値(抗菌剤添加量 0ppmの試験片基準)

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 (フィルムブランク)	1	2	287	2.9E+5	2.8E+5		
	2	2	267.75	2.7E+5			
	3	2	273.5	2.7E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	331.5	3.3E+6	2.7E+6		
	2	3	191	1.9E+6			
	3	3	283.75	2.8E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	109.5	1.1E+5	9.4E+4		
	2	2	85.5	8.6E+4			
	3	2	86.5	8.7E+4			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350 ppm)	1	2	53	5.3E+4	4.9E+4	1.71	1.74
	2	2	39.5	4.0E+4		1.83	
	3	2	53	5.3E+4		1.71	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450 ppm)	1	0	333	3.3E+3	4.8E+3	2.91	2.75
	2	1	33	3.3E+3		2.91	
	3	1	77	7.7E+3		2.54	

試験機関 C

[1] 抗菌活性値(抗菌剤添加量 0ppmの試験片基準)

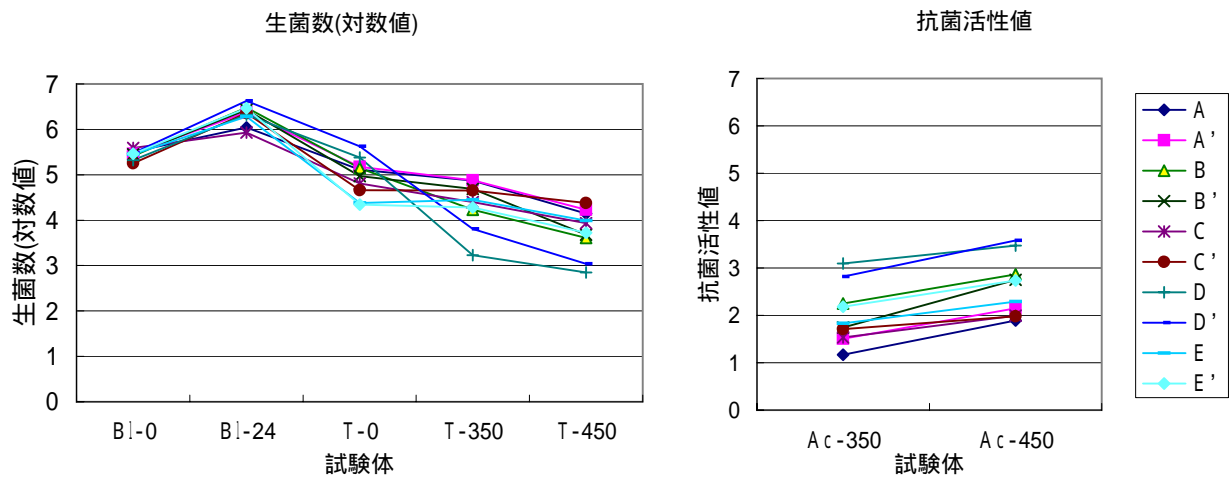
サンプル	No	希釈倍数	カウント	生菌数(cfu/試料)	平均生菌数	抗菌活性値	抗菌活性値(平均)
接種直後対照区 (フィルムブランク)	1	2	188	1.9E+5	1.8E+5		
	2	2	181	1.8E+5			
	3	2	163	1.6E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	282	2.8E+6	2.3E+6		
	2	3	257	2.6E+6			
	3	3	138	1.4E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	54	5.4E+4	4.6E+4		
	2	2	38	3.8E+4			
	3	2	45	4.5E+4			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350ppm)	1	2	45	4.5E+4	4.5E+4	1.70	1.70
	2	2	45	4.5E+4		1.70	
	3	2	46	4.6E+4		1.69	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450ppm)	1	1	293	2.9E+4	2.4E+4	1.89	1.97
	2	1	230	2.3E+4		1.99	
	3	1	199	2.0E+4		2.05	

[1] 抗菌活性値 (抗菌剤添加量 ブランクフィルムの試験片基準)

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 (フィルムブランク)	1	2	296	3.0E+5	3.0E+5		
	2	2	321	3.2E+5			
	3	2	281	2.8E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	4	53	5.3E+6	4.2E+6		
	2	4	52	5.2E+6			
	3	3	213	2.1E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	2	89	8.9E+4	4.2E+5		
	2	2	131	1.3E+5			
	3	3	105	1.1E+6			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350ppm)	1	1	91	9.1E+3	6.4E+3	2.67	2.82
	2	1	92	9.2E+3		2.66	
	3	0	99	9.9E+2		3.63	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450ppm)	1	0	149	1.5E+3	1.1E+3	3.45	3.58
	2	0	169	1.7E+3		3.40	
	3	0	16	1.6E+2		4.42	

[1] 抗菌活性値 (抗菌剤添加量 0ppmの試験片基準)

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 (フィルムブランク)	1	2	294	2.9E+5	2.9E+5		
	2	2	298	3.0E+5			
	3	2	266.5	2.7E+5			
対照区 (フィルムブランク)	1	3	294	2.9E+6	2.9E+6		
	2	3	281.5	2.8E+6			
	3	3	283	2.8E+6			
無加工試験片 (抗菌剤添加量 0ppm)	1	1	288	2.9E+4	2.2E+4		
	2	1	195.5	2.0E+4			
	3	1	165.5	1.7E+4			
抗菌加工試験片 No.1 (抗菌剤添加量 350 ppm)	1	1	167.5	1.7E+4	1.9E+4	2.23	2.17
	2	1	216.5	2.2E+4		2.12	
	3	1	193.5	1.9E+4		2.17	
抗菌加工試験片 No.2 (抗菌剤添加量 450 ppm)	1	1	32.5	3.3E+3	5.3E+3	2.94	2.74
	2	1	36.5	3.7E+3		2.89	
	3	1	89	8.9E+3		2.51	



Agフィルムによる不確かさの推定(算出事例) 結果表7

4試験機関が2種類の試験片について試験を2回反復した。測定の繰返し数は3回。

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)	0.1200	1	0.1200	0.40	10.13	34.12	
試験機関(B)	4.6569	3	1.5523	5.18	9.28	29.46	
R × B(e1)	0.8991	3	0.2997	13.84	2.90	4.46	**
試験片(A)	4.4408	1	4.4408	205.12	4.15	7.50	**
B × A	0.3887	3	0.1296	5.98	2.90	4.46	
R × A	0.0133	1	0.0133	0.62	4.15	7.50	
R × B × A	0.1160	3	0.0387	1.79	2.90	4.46	
誤差(e2)	0.6928	32	0.0217				
合計	11.3276	47					

二次誤差(e2)で(A)、(B × A)、(R × A)、(R × B × A)、一次誤差(e1:R × B)の分散比を検定した結果、一次誤差(R × B)が有意差ありとなった。

分割(実験)の意味は無作為化(ランダム)できないのでそのために生じるバラツキを許容することになり、交互作用に相当するものを誤差とみなし、これでRとBを検定する。有意でない交互作用は反復Rに関するものを集めて二次誤差にプールする。

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	
繰返(R)	0.1200	1	0.1200	0.40	10.13	34.12	
試験機関(B)	4.6569	3	1.5523	5.18	9.28	29.46	
e1(R × B)	0.8991	3	0.2997				
試験片(A)	4.4408	1	4.4408	194.46	4.11	7.50	**
B × A	0.3887	3	0.1296	5.67	2.87	4.46	**
誤差(e2)	0.8221	36	0.0228				
合計	11.3276	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。

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	分散の期待値
反復(R)	0.1200	1	0.1200	0.40	10.13	34.12	$e2^2+24 R^2$
試験機関(B)	4.6569	3	1.5523	5.18	9.28	29.46	$e1^2+12 B^2$
e1(B × R)	0.8991	3	0.2997				$e1^2$

分散の期待値から標準不確かさを算出する。

$$e1 = \sqrt{0.2997} = 0.548$$

$$B = \sqrt{\{(1.5523 - 0.2997) / 12\}} = 0.323$$

合成標準不確かさの計算は、試験機関(B)と一次誤差(e1)の分散を考慮(繰返し3)

$$uc = \sqrt{(B^2 + e1^2/3)} = \sqrt{(0.323^2 + 0.2997/3)} = 0.452$$

$$U = 0.452 \times 2.01 = 0.91 \text{ (拡張不確かさ)}$$

$$t(47, 0.05) = 2.01$$

[添付資料5]

試験機関 _____
 オペレーター(イニシャル) _____
 オペレーター(イニシャル) _____

「GaAs 抗菌試験片 不確かさの評価試験」 実験記録用紙()

[1] 培地調製・接種・洗い出し

日程	作業項目	オペレーター or	記録
1日目 (/)	前々培養 (共通菌株)		保存菌(継代日 月 日) 前々培養開始: 時 分~()
	前々培養 (各社の菌株)		保存菌(継代日 月 日; 継代回数 回目) 前々培養開始: 時 分~()
	スラント(共通)		オートクレーフ(設定 分/ 取出 時 分)
	スラント(各社)		オートクレーフ(設定 分/ 取出 時 分)
	1/500NB		静置時 pH: オートクレーフ(設定 分/ 取出 時 分)
	2日目 (/)	前培養(共通菌株)	
前培養(各社菌株)			前培養開始: 時 分~()
スラント(共通)			オートクレーフ(設定 分/ 取出 時 分)
スラント(各社)			オートクレーフ(設定 分/ 取出 時 分)
リソ酸緩衝生食水			リソ酸緩衝液(調製日 月 日) オートクレーフ(設定 分)
SCDLP			オートクレーフ(設定 分)
標準寒天培地			オートクレーフ(設定 分)
3日目 (/)		菌液調製開始(共通)	
	菌液調製開始(各社)		時 分~
	接種開始(共通)		時 分~
	接種開始(各社)		時 分~
	接種後の培養開始		時 分()
	接種直後対照区 洗い出し後の培養開始		時 分~
	接種時の環境測定		室温 ~ 照度(接種時のサンプル上) ~ Lx
4日目 (/)	培養後の洗い出し		培養終了 時 分
			洗い出し開始 時 分
			洗い出し後の培養開始 時 分
	洗い出し時の環境測定		室温 ~ 照度(接種時のサンプル上) ~ Lx
(計数)	接種直後の洗い出し		計数: 月 日(培養 時間; 培養後冷蔵 有 or 無)
	培養後の洗い出し		計数: 月 日(培養 時間; 培養後冷蔵 有 or 無)

試験機関
 オペレーター(イニシャル)
 オペレーター(イニシャル)

「GaAs 抗菌試験片 不確かさの評価試験」 実験記録用紙()

【2】培地・試薬の種類

培地	メーカー	Cat.No	Lot.No.
NaCl			
試薬蒸留水			
普通寒天(各社)			
標準寒天			
SCDLP			
リン酸二水素カリウム			
水酸化ナトリウム			

【3】試験設備

試験設備	メーカー	型番・品番
培養用恒温器		
オートクレーブ		
クリーンベンチ or 安全キャビネット (使用の場合)		
温度計		
試験管攪拌器(使用の場合)		
コロニーカウンター(使用の場合)		

【4】その他(試験において、手順書通りでない点を記載して下さい)

以上

[添付資料5]

「抗菌試験片(フィルム) 不確かさの評価試験」 実験記録用紙()

試験機関 _____

オペレーター(イニシャル) _____

オペレーター(イニシャル) _____

[1] 培地調製・接種・洗い出し

日程	作業項目	オペレーター or	記録
1日目 (/)	前々培養 (共通菌株)		保存菌(継代日 月 日) 継代数() 代) 前々培養開始: 時 分 ~ ()
	スラント(共通)		オートクレーフ(設定 分 / 取出 時 分)
	1/500NB		静置時 pH: オートクレーフ(設定 分 / 取出 時 分)
2日目 (/)	前培養(共通菌株)		前培養開始: 時 分 ~ ()
	スラント(共通)		オートクレーフ(設定 分 / 取出 時 分)
	リン酸緩衝生食水		リン酸緩衝液(調製日 月 日) オートクレーフ(設定 分)
	SCDLP		オートクレーフ(設定 分)
	標準寒天培地		オートクレーフ(設定 分)
3日目 (/)	菌液調製開始(共通)		時 分 ~
	接種開始(共通)		時 分 ~
	接種後の培養開始		時 分 ()
	接種直後対照区 洗い出し後の培養開始		時 分 ~
	接種時の環境測定		室温 ~ 照度(接種時のサンプル上) ~ Lx
4日目 (/)	培養後の洗い出し		培養終了 時 分
			洗い出し開始 時 分
			洗い出し後の培養開始 時 分
	洗い出し時の環境測定		室温 ~
(計数)	接種直後の洗い出し		計数: 月 日(培養 時間; 培養後冷蔵 有 or 無)
	培養後の洗い出し		計数: 月 日(培養 時間; 培養後冷蔵 有 or 無)

[2] 培地・試薬、フィルム・blankの種類

培地	メーカー	Cat.No	Lot.No.
NaCl			
試薬蒸留水			
標準寒天			
SCDLP			
リン酸二水素カリウム			
水酸化ナトリウム			
blankフィルム(ストマッカー袋)			

【3】試験設備

試験設備	メーカー	型番・品番
培養用恒温器		
オートクレーブ		
クリーンベンチ or 安全キャビネット (使用の場合)		
温度計		
照度計		
試験管攪拌器(使用の場合)		
CO ₂ -カウンター(使用の場合)		

【4】その他(試験において、手順書通りでない点を記載して下さい)

24時間後の塗膜の膨潤状態や洗い出しのときの様子なども記録してください。

以 上

添付資料6

作成日:1996.02.15
改訂日:2001.12.19

製品安全データシート (Material Safety Data Sheet :MSDS)

1. 製品及び会社情報

製品名 : ガリウムひ素
会社名 : 住友電気工業株式会社
住所 : 兵庫県伊丹市昆陽北1-1-1
担当部署 : 半導体事業部
緊急連絡先 : Tel 0727-72-2281 Fax 0727-71-0282
: Tel 0727-71-3024 Fax 0727-71-0282

2. 組成、成分情報

単一製品、混合物の区分 : 単一製品
化学名 : 砒化ガリウム
成分及び含有量 : ガリウムひ素99.9%、金属砒素として51.8%
化学式又は構造式 : GaAs
官報公示整理番号 : 化審法(1) - 580
CAS No. : 1303 - 00 - 0
NIOSH No. : LW8800000
EC No. : 215 - 114 - 8
通知対象物質 : 第1種指定化学物質、特定第1種指定化学物質
危険有害成分 : 砒化ガリウム

3. 危険有害性の要約【危険有害性の分類】

分類の名称 : OECD分類に該当なし
有害性 : 板状固体であるが、粉塵となっている場合は吸入しやすい。

4. 応急措置

眼に入った場合

直ちに多量の水で15分間以上洗い流す。

皮膚に付着した場合

直ちに汚染された衣服やくつ等を脱がせ、付着物または接触部を石けん水で洗浄し、多量の水を用いて洗い流す。

吸入した場合

直ちに患者を毛布等にくるんで安静にさせ、新鮮な空気のある場所に移し、鼻をかませ、うがいをさせる。呼吸が困難な場合または呼吸が停止している場合には直ちに人工呼吸を行う。

飲み込んだ場合

可能であれば、指を喉に差し込んで吐き出させ、その後コップ1~2杯の水または牛乳を与える。

5. 火災時の措置

消火方法

本製品は燃えない物質である。周辺火災には、速やかに容器を安全な場所に移す。移動不可能な場合には容器及び周囲に散水して冷却する。初期の火災には、粉末、二酸化炭素、乾燥砂等を用いて消火する。大規模火災の場合には、水噴霧または水消火を行う。

消火剤

粉末、二酸化炭素、乾燥砂(初期消火)、水(大規模火災)

消火を行う者の保護(保護具等)

火災時には、有害な酸化砒素(As_2O_3)の煙霧が発生するので、消火作業には必ず空気呼吸器、その他保護具を着用する。

添付資料6

6. 漏洩時の措置

人体に対する注意事項

発じんする場合は防じんマスクや不浸透性手袋等の保護具を着用する。

環境に対する注意事項

排水溝に流水等を用いて流出させてはいけない。

除去方法

飛散した物を掃き集めるか、真空掃除機で吸引する等できるだけ飛散発じんしないようにして、空容器等に回収する。

7. 取扱い及び保管上の注意

取扱い: 技術的対策 (取扱者の暴露防止、火災爆発の防止など)

- ・接触、吸入防止のため不浸透性手袋等の個人保護具を着用する。
- ・取扱ったのち手、顔、うがい等身体のていねいな洗浄をする。

保管: 適切な保管条件

- ・常温(0～30)の多湿でない室内に保管する。
- ・万一、こぼしても地下浸透しない床材質とし、回収が容易な構造とする
- ・容器が破裂しないように工夫、材質選定をする。
- ・貯蔵場所は、その他のものと明確に区分する。

8. 暴露防止措置

設備対策

粉塵が発生する作業所においては必ず密閉された装置、機器又は局所排気装置を使用する。

許容濃度

- ・管理濃度 : 設定されていない。
- ・許容濃度 : 設定されていない。
- ・日本産業衛生学会 (2000年度版) : 吸入性粉塵 2mg/m³、総粉塵8mg/m³(第3種粉塵、その他無機及び有機粉塵)
- ・ACGIH('00年度版) : 無機ヒ素化合物として TWA 0.01mg/m³

保護具

- ・呼吸用保護具 : 防塵マスク、送気マスク
- ・保護眼鏡 : ゴーグル型保護眼鏡
- ・保護手袋 : 不浸透性手袋
- ・保護衣 : 保護衣

9. 物理的及び化学的性質

形状	: 板状固体
色	: 暗灰色
臭い	: なし
融点	: 1238
可燃性	: なし
比重	: 5.316(20)
溶解度	: 水に不溶(常温)

添付資料6

10. 安定性及び反応性

安定性

- ・危険有害な分解生成物 : 火災等の場合は、毒性の強い酸化砒素() As_2O_3 が発生する。酸またはアルカリと接触すると有毒なガスが発生する。
- ・水との反応性 : なし

11. 有害性情報

刺激性(皮膚、目)

皮膚に対する刺激性はない(*4)。

急性毒性

- マウス - LD50 4.7g/Kg (腹腔内) *3
- マウス - LD30 1.0g/Kg (腹腔内) *4

亜急性毒性

モルモットにLD50の1/10を21日間経口投与時、一般毒性を示す(*3)。

慢性毒性

ハムスターにガリウムひ素0.25mg/回×1回/週×15週間投与し2年間の観察において、投与1年目以降の生存率は対照群と比較して有意に減少する傾向が認められた(*2)。

がん原性

- ・ハムスターにガリウムひ素0.25mg/回×1回/週×15週間投与し2年間観察で肺腫瘍性は認められない(*2)。
- ・ラット、マウスに0.01mg~1mg/m³、2年間吸入投与で雌のラットのみ発ガン性明瞭、他は発ガン性なし(*7)。

変異原性

サルモネラ菌と大腸菌で、ガリウムひ素5~1000 µg/plateの条件では、ガリウムひ素の変異原性は認められない(*5)。

その他

ガリウム砒素は難溶性の物質であるが、生体内では一部溶解し、分離生成した無機砒素の大半はメチル化されほとんど毒性のないメチルアルソン酸(MAA)やジメチルアルシン酸(DMAA)になり主に尿中へ排泄される(*1、*2)。MAAやDMAAの毒性は、無機砒素に比較すると1/50~1/100程度になる。無機砒素のメチル化は、解毒機構である(*1、*2)。

12. 環境影響情報

残留性/分解性

産業廃棄物としてガリウムひ素製品が自然環境中に放出されたとしても、通常の条件でガリウムひ素からひ素が容易に溶出することは無い(*2)。

蓄積性

鯉の蓄積性は問題とならない程度と判断されている(*6)。

魚毒性

ヒメダカLC50は10 µg/ml以上、通常の使用方法で毒性の問題ないA類にガリウムひ素は該当する(*6)。

13. 廃棄上の注意

ガリウムひ素は、廃棄の方法について政令の定める技術上の基準に従わなければ、廃棄してはならない。又、「廃棄物の処理及び清掃に関する法律」の特別管理産業廃棄物処理基準に従うこと。

添付資料6

14. 輸送上の注意

注意事項	: 容器が落下、転倒または破損することがないように積載する。
国連分類	: 非該当
国連番号	: なし

15. 適用法令(全ひ素を対象とした規制)

廃棄物の処理及び清掃に関する法律	: 有害物質(第2条)(特別管理産業廃棄物)
農用地の土壤汚染防止等に関する法律	: 特定有害物質(第2条)
水質汚濁防止法	: 有害物質(第2条の2)
水道法	: 規制物質(第4条)
海洋汚染防止法	: A類物質等
労働安全衛生法	: 通知対象物(砒素およびその化合物 政令番号456)
化学物質管理促進法	: 第一種指定化学物質 (砒素及びその無機化合物 政令番号第252号) 特定第1種指定化学物質(砒素及びその無機化合物)

16. その他の情報

参考資料

- * 1 ガリウムひ素系半導体環境保全関連資料(財団法人日本環境衛生センター 1987年)
- * 2 山内 博:「ガリウムひ素の話(1)」労働の科学 44(1);29-32,1989.
- * 3 Roschina T.A. : Gig Tr Prof Zabol,10;30-33,1966.
- * 4 Fadeev A.I. :Gig Tr Prof Zabol,24(3);45,1980.
- * 5 三菱化成安全科学研究所試験報告書「 - 族化合物の微生物を用いる突然変異試験」4A417,1984.
- * 6 三菱化成安全科学研究所試験報告書「ガリウムひ素のコイへの凝縮度試験」MITES REPORT No.5A160,1985.
- * 7 NTP Technical Report No. TR-492 "Toxicology and Carcinogenesis Studies of Gallium Arsenide in F344/N Rats and B6C3F1 mice(Inhalation Studies) “ 1999
(NIOSH : National Insutitute for Occupational Safety and Health)

注)平成6年9月19日付け官報第1487号の交付により「砒化ガリウム及びこれを含有する製剤」が毒物指定から除外された。

[添付資料7]

「標準物質」の不確かさ評価試験のお願い

2003/07/23

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分科会
杉本 茂

(独)製品評価技術基盤機構から抗菌製品技術協議会に調査研究、「平成15年度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調査研究」が委託されたのに伴い同委員会及び分科会が設置されました。

先日(7月11日)第1回目の委員会が開催され、今年度の実施計画が承認されました。また、同日午後には分科会が開催され、承認された実施計画に基づいて具体的な作業の内容について議論が行なわれました。

分科会の席でお願いしましたが、当委員会で選定した標準物質の評価を分科会の委員であり、かつJNLAの試験機関であります貴試験所にご協力いただきますよう、改めてお願い申し上げます。

一次標準物質の候補であるGaAsウェハの試験及び二次標準物質の候補である抗菌加工フィルムについて8月～11月に実施の予定です。

標準物質の候補試料の評価試験の協力(参加)についてご快諾頂ければ幸いです。

1. ご依頼する試験機関

- (1) 石塚硝子(株)
- (2) (株)INAX 分析センター
- (3) 住友大阪セメント(株)
- (4) (財)日本化学繊維検査協会
- (5) (財)日本食品分析センター

2. 試験内容

候補となる標準物質試料をJIS Z 2801に準拠して作成した「標準物質 不確かさ評価の試験手順書」に従い試験する(別途配布予定)。

3. 試験評価(Part. 1; 8～9月実施, Part 2; 10～11月実施予定)

1) 試験条件

- | | |
|-----------------|---|
| ・ 菌株 | 共通の菌株(復元方法は別途指示) |
| ・ 培地 | 共通の普通ブイヨン培地、普通寒天培地 |
| ・ 培養容器 | 共通の培養容器(PPタッパー) |
| ・ 試験片(オペレータ 1名) | Part 1; GaAs ウェハ(2社)
Part 2; プラスチック試験片 |

2) 試験スケジュール

別途ご連絡します。

4. 試験費用

実施いただきます試験費用については、委員会予算内で薄謝支給を致します。

以上

[添付資料 8]

本報告書中の拡張不確かさ(U)の算出方法

例. 「GaAs ウェハー 試験片 D」

表. 抗菌活性値

試験所	N 数			合計	平均	平均の平均
	1	2	3			
A	1.96	1.50	1.58	5.04	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	

表. 分散分析表

要因	平方和 S	自由度	分散 V	F 値	分散の期待値
試験所(A)	19.88	4	4.97	141.12	$\frac{e^2}{3} + 3 \frac{A^2}{A^2}$
誤差(e)	0.35	10	0.04		$\frac{e^2}{e^2}$
全体(T)	20.23	14	1.44		-

* S

・ $S_T =$ 「各データの 2 乗」の総和 (「各データの総和」の 2 乗) / 全データ数

・ $S_A =$ 「各試験所の合計の 2 乗」の総和 / 各試験所のデータ数
 $-$ (「各データの総和」の 2 乗) / 全データ数

・ $S_e = S_T - S_A$

*

・ $T =$ 全データ数 - 1

・ $A =$ 全試験所数 - 1

・ $e = T - A$

* $V = S /$

表. 拡張不確かさの推定

繰返し誤差の標準偏差 (e)	0.19
試験所間バラツキの標準偏差 (A)	1.28
合成標準不確かさ (uc)	1.30
拡張不確かさ (U)	2.78

* $uc = (\frac{e^2}{e^2} + \frac{A^2}{A^2})^{1/2}$

* $U = k \times uc$ ($k: t(14, 0.05) = 2.145$)

したがって、

GaAs ウェハー (試験片 D) の抗菌活性値は、 2.57 ± 2.78 (95% 信頼区間) である。

以 上

[添付資料 9]

GaAs ウェハーの抗菌性試験手順書

[経緯]

昨年の当分科会で GaAs ウェハーについて抗菌性試験を実施した(株)INAX 今井さんから手順書(案)を頂きました。今年度、試験を担当される試験所の方に見ていただき、試験をイメージしながら記載内容に過不足がないか確認をお願いします。

基本的には昨年(H14 年度)の 2 次標準試料片の試験手順を踏襲しています。(ただし、倒置法ではありませんので、念のため。)また、この手順書に特に記述がない事項は、JIS Z 2801 にしたがうことを前提にしています。

1 菌株 黄色ブドウ球菌 NBRC(IFO) 12732：共通菌株を使用

2 薬品，材料，及び器具

試薬，培地類：各試験所で使用されているもの

ただし，次の試薬，培地類は共通品目を使用

1. 普通寒天培地：栄研化学 300 g E-MC01 (日食より配付)
2. 普通プイヨン培地：栄研化学 100 g E-MC35 (日食より配付)
3. 試薬蒸留水：高速液体クロマトグラフ用 (各試験機関で用意)
(NB, 1/500NB, スラント調製用に使用する)

シャーレ：各試験所で使用しているものを使用

密封容器：PP 製密封容器 (INAX より配付)

フィルムブランク：ストマッカーフィルム 5cm 角に切断する。(日食より配付)

GaAs ウェハー試験片：3 種類 各 4 枚入り 分科会支給(INAX より配付)

GaAs ウェハーの種類： ジャスト基板(再洗浄なし) ジャスト基板(再洗浄あり)
2°オフ基板

住友電工 八尾さんのご提案(参考資料 参照)に沿って 3 種類の試験片について試験を実施します。なお、ウェハーの大きさが 4 インチと云うことで、このまま使うのはスケールが大きくなりすぎる(シャーレなど)ので、これを 9 cm シャーレに入るようにカットして使うことにし、このカットを(株)INAX で担当していただくことになりました。

カバーフィルム：ストマッカーフィルム 4cm 角に切断する。(日食より配付)

3 滅菌方法

JIS にしたがう。

4 培地の調製

普通ブイオン培地(NB) : 当日調製

保存期間は調製日当日限り(普通ブイオン培地の調製日に 1/500NB を調製する。)

普通寒天培地(斜面培地) : 当日調製, 滅菌後 3 時間以上経過してから使用する。

保存期間は調製日当日限り

1/500 NB : 滅菌後, 24 時間以上経過してから使用する。

調製日当日に滅菌する。調製時の pH 調整は水酸化ナトリウム溶液のみを使用する。高速液体クロマト用の蒸留水を使用して 1/500NB を調製すると pH は酸性になるので, 水酸化ナトリウムのみで調整可能である。(1/500NB の pH 調整時に pH が 7.2 を超えた場合は, 塩酸は使用して pH を戻すことはしない。その 1/500NB は廃棄して再度作り直す。)

5 菌株の継代

JIS に従う。(各試験所の手順による。)

6 試験操作

1) 前々培養(35±1 , 20±4 hr), 前培養(35±1 , 18±2 hr) は JIS に従う。(各試験所の手順による。)

2) フィルムブランク 分科会から配付されたストマッカーフィルムを使用する。

接種直後の生菌数の測定 3 枚

24hr 後の生菌数 3 枚

3) GaAs ウェハー試験片(3 種類) 分科会から配付された GaAs ウェハー試験片を使用する。

24 hr 後の生菌数 3 枚

4) フィルムブランク, GaAs ウェハー試験片のエタノール拭きは実施しない。

カバーフィルムもエタノール拭きはしない。

5) 試験菌液の調製

1/500 NB を用いて適宜希釈し, 菌数が $5 \sim 8 \times 10^5$ 個/ml となるように調製する。

(JIS の規定より狭い範囲で設定している。)

ただし, 「試験菌液をすぐに使用しない場合は氷冷(0) 保存し, 保存後 4 時間以内に使用する」ことはしない。

6) 試験菌液の接種は次の方法で実施する。

接種は 1 セット(3 枚)の試験片の 1 枚ごとに実施する。

試験片 1 枚に接種するごとに, 滴下した試験菌液の上に滅菌ピンセットでフィルムを被せる。

菌液がフィルムの端からこぼれないように注意しながら, フィルムの上から軽く押さえつけて, 試験菌液がフィルム全体に行き渡るようにする。

試験片 1 枚の接種及びフィルム被覆が終了した後, シャーレのふたをする。

7) 接種は次の順番で実施する。

フィルムブランク 3 枚(接種直後) フィルムブランク 3 枚(24hr 培養後)

GaAs ウェハー試験片 3枚(24 hr 培養後)

8) 試験片の培養

35±1 , 相対湿度 90%以上で 24±1 hr 培養する。

9) 洗い出しと菌数測定

(1) 試験菌液接種直後のフィルムブランクの洗い出し

試験菌液を接種した直後のフィルムブランク 3個について、フィルムブランク及び被覆フィルムに付着している菌液の洗い出しを実施する。洗い出しは接種した順番に行う。SCDLP 培地はピペット等で正確に 10ml 計量して、洗い出しに使用する。

いずれの洗い出し方法においても、フィルムブランク及び被覆フィルムに付着している菌液を十分に洗い出す。洗い出しが終了した容器内の SCDLP 培地を洗い出し液とし、直ちに生菌数の測定を実施する。

(2) 培養後のフィルムブランク及び GaAs ウェハーの洗い出し

培養後のフィルムブランク及び GaAs ウェハーについて(1)と同様に試験片を洗い出す。洗い出しは接種した順番に行う。

(3) 寒天平板培養法による生菌数の測定：JIS にしたがう。(シャーレ 2 枚使用)

洗い出し液 1ml をピペットで正確に採取し、シャーレ(×0)に 1ml 入れる。さらに洗い出し液 1ml をピペットで正確に採取し、希釈用のりん酸緩衝生理食塩水 9ml が入った試験管に 1ml 入れ、試験管ミキサーで十分に混合する。

の希釈液 1ml をピペットで正確に採取し、次のシャーレ(×1)に 1ml 入れる。さらに の希釈液 1ml をピペットで正確に採取し、次のりん酸緩衝生理食塩水に 1ml 入れる。同様の作業を繰り返し、10 倍希釈系列希釈液を作る。その作業を試験管 3 本目[シャーレ(×3)]まで作る。

希釈系列を作成した順番に、シャーレ 1 枚当たり、46~48 で保温された標準寒天培地 10~20ml を加えて、よく混合する。

シャーレのふたをして室温で放置し、標準寒天培地がシャーレ内で平板上に固まったことを目視で確認した後、シャーレを倒置し、低温恒温器(インキュベーター)で温度 35±1 で 44±4 時間培養する。

培養後、原則として 30~300 個の集落が見られた希釈系列のシャーレの集落数をコロニーカウンターで測定する。洗い出し液 1ml を分注した寒天培地(×0)においても集落数が 30 個未満の場合は、その集落数を測定する。いずれの寒天培地にも集落の形成が認められない場合は < 1 と表示する。

培養終了時に直ちに測定できない場合はシャーレを 5±1 で保温する。

7 生菌数の計算 測定した集落数から式(1)によって生菌数を求める。: JIS にしたがう。

$$N = C \times D \times V \dots\dots\dots (1)$$

ここに、N：生菌数(試験片 1 個当たり)

C：集落数(採用した 2 枚のシャーレの集落数平均値)

D：希釈倍数(採用したシャーレに分注した希釈液の希釈倍数。すなわち

シャーレに書かれていた×2などの数値。)

V：洗い出しに用いたSCDLP培地の液量(ml)

生菌数は有効数字3桁目を四捨五入して2桁で表示する。集落数が<1の場合の生菌数は“<10”と表示する。生菌数平均値を求める場合は、試験片3個の各生菌数測定値を算術平均し、有効数字3桁目を四捨五入して2桁で表示する。生菌数が“<10”の場合は“10”として平均値を計算する。

8 試験結果

a) 試験成立条件の判定 次の3項目の試験成立条件をすべて満たすとき、その試験は有効とする。すべての条件を満足していない場合は、試験不成立と判定する。

(1) フィルムブランクの接種直後の生菌数の対数値について、次式が成立する。

$$(L_{max} - L_{min}) / (L_{mean}) \leq 0.2$$

ここに L_{max} ：生菌数対数値の最大値

L_{min} ：生菌数対数値の最小値

L_{mean} ：3個のフィルムブランクの生菌数対数値の平均値

(2) フィルムブランクの接種直後の生菌数平均値は、 $2.0 \sim 3.2 \times 10^5$ 個の範囲内である。

[コメント：本試験に限り、接種直後の生菌数平均値の基準範囲を狭くするため。]

(3) フィルムブランクの24時間後の生菌数は、3個の値がすべて 1.0×10^4 個以上である。

b) 抗菌活性値の計算 試験が成立した場合について、式(2)によって抗菌活性値を求める。数値は、小数点以下2桁目を切り捨て、小数点以下1桁で表示する。

$$R = [\log(B/A) - \log(C/A)] = [\log(B/C)] \dots\dots\dots (2)$$

ここに、R：抗菌活性値

A：フィルムブランクの接種直後の生菌数(n=3)の平均値(個)

B：フィルムブランクの24時間後の生菌数(n=3)の平均値(個)

C：GaAs ウェハ-の24時間後の生菌数(n=3)の平均値(個)

以上

[参考資料]

以下に八尾さんからの連絡内容を掲載します。

添付ファイルにGaAs基板の提案仕様を示します。

電子デバイス用の半絶縁性基板で、現在もっとも生産量の多い結晶成長法
(V B、V G F : この2つは品質同等)と基板サイズ(4インチ)を選びました。

昨年度は3インチ基板を使われておりますが、現在3インチ半絶縁性基板の需要はわずかで、
当社では4インチ用の結晶から3インチの結晶をくり抜いて3インチ基板を製造しております
ため、3インチ基板の方が価格が高くなってしまいます。

(なお、現在は4インチから6インチへの移行が徐々に進行しています。)

提案仕様は、面方位の仕様だけが2種類あります。仕様Aはジャスト基板、仕様Bは2°オフ
基板と通常呼ばれます。この2種類が半絶縁性基板の最も一般的な面方位になります。

この仕様で少量であれば、新たに設計・製造しなくても大口ユーザー向けに現在製造している
もの一部をなんとか転用できると思います。また、在庫調査の結果、ジャスト品
は1ロット50枚程度の在庫(2年前に製造)がありました。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しますが、今
回は特別にそのまま出荷することも可能です。

以上のことから、今回は次の3種類の基板で以下の1)~3)の評価が可能であると考えます。

- ・ジャスト品(在庫)、再洗浄なし
- ・ジャスト品(在庫)、再洗浄あり
- ・2°オフ品(転用)

1) ジャスト品(再洗浄なし)とジャスト品(再洗浄あり)の結果を比較すれば、自然酸化膜
の膜厚の影響がわかります。

2) ジャスト品(再洗浄あり)と2°オフ品の結果を比較すれば、基板面方位の影響がわかり
ます。

3) いずれも両面ミラーの仕様ですが、表面側のみに最終仕上げ研磨が施されていますので、
表面と裏面の結果を比較すれば、表面ラフネスの影響がわかります。

GaAs ウェハーの抗菌性試験（再試験）手順書

[経緯]

GaAs ウェハー（3種類）について9月上～中旬に抗菌性試験を実施した。その結果は、抗菌活性値の高い結果，中程度の結果，低い結果の3通りにきれいに分かれた。

この結果については，ウェハーに対する光照射が抗菌活性に影響している可能性が問題点と指摘され（光には特に注意を払っていなかった。），またウェハーが大きかったことで90mm シャーレを急遽角シャーレに換えるなどの操作そのものの不統一も起こった。

したがって，あらためてこのような点を調整して再試験を実施することにした。

試験手順については，赤字部分が新たに記載された内容です。

その他は，前回と同じです。また，試験記録も内容を一部追加しています。

1 菌株 黄色ブドウ球菌 NBRC(IFO) 12732：共通菌株を使用

8月に同時入手し，各試験所で維持している菌株

2 薬品，材料，及び器具

試薬，培地類：各試験所で使用されているもの

ただし，次の試薬，培地類は共通品目を使用

1．普通寒天培地：栄研化学 300g E-MC01（日食配付品）

2．普通ブイヨン培地：栄研化学 100g E-MC35（日食配付品）

3．試薬蒸留水：高速液体クロマトグラフ用（各試験機関で用意）

（NB，1/500NB，スラント調製用に使用する）

シャーレ：各試験所で使用しているものを使用

密封容器：PP製密封容器（INAX配付品）

フィルムブランク：ストマッカーフィルム 5cm角に切断する。（日食配付品）

GaAs ウェハー試験片：3インチ ジャスト基板(通常品) [一種類のみ]

配付されたウェハーは 試験当日までそのまま室温暗所で保管する。(ウェハーは，一枚ずつ窒素充填でアルミパックされているので，試験まで開封しない。)

3インチなので，90mmシャーレを使用して試験する。エッジはない。

カバーフィルム：ストマッカーフィルム 4cm角に切断する。（日食配付品）

3 滅菌方法

JISにしたがう。

4 培地の調製

普通ブイヨン培地(NB)：当日調製

保存期間は調製日当日限り（普通ブイヨン培地の調製日に1/500NBを調製する。）

普通寒天培地(斜面培地)：当日調製，滅菌後3時間以上経過してから使用する。

保存期間は調製日当日限り

1/500 NB：滅菌後，24時間以上経過してから使用する。

調製日当日に滅菌する。調製時の pH 調整は水酸化ナトリウム溶液のみを使用する。高速液体クロマト用の蒸留水を使用して 1/500NB を調製すると pH は酸性になるので、水酸化ナトリウムのみで調整可能である。(1/500NB の pH 調整時に pH が 7.2 を超えた場合は、塩酸は使用して pH を戻すことはしない。その 1/500NB は廃棄して再度作り直す。)

5 菌株の継代

JIS に従う。(各試験所の手順による。)

6 試験操作

1) 前々培養(35 ± 1 , 20 ± 4 hr) , 前培養(35 ± 1 , 18 ± 2 hr) は JIS に従う。(各試験所の手順による。)

2) フィルムブランク 分科会から配付されたストマッカーフィルムを使用する。

接種直後の生菌数の測定 3 枚

24hr 後の生菌数 3 枚

3) GaAs ウェハー試験片 分科会から配付された GaAs ウェハー試験片を使用する。

24 hr 後の生菌数 3 枚

4) フィルムブランク , GaAs ウェハー試験片のエタノール拭きは実施しない。

カバーフィルムもエタノール拭きはしない。

5) 試験菌液の調製

1/500 NB を用いて適宜希釈し、菌数が $5 \sim 8 \times 10^5$ 個/ml となるように調製する。
(JIS の規定より狭い範囲で設定している。)

ただし、「試験菌液をすぐに使用しない場合は氷冷(0) 保存し、保存後 4 時間以内に使用する」ことはしない。

6) 試験菌液の接種は次の方法で実施する。

接種は 1 セット(3 枚)の試験片の 1 枚ごとに実施する。

試験片 1 枚に接種するごとに、滴下した試験菌液の上に滅菌ピンセットでフィルムを被せる。

菌液がフィルムの端からこぼれないように注意しながら、フィルムの上から軽く押さえつけて、試験菌液がフィルム全体に行き渡るようにする。

試験片 1 枚の接種及びフィルム被覆が終了した後、シャーレのふたをする。

7) 接種は次の順番で実施する。

フィルムブランク 3 枚(接種直後) フィルムブランク 3 枚(24hr 培養後)

GaAs ウェハー試験片 3 枚(24 hr 培養後)

ウェハーに(蛍光灯, 自然光を問わず)光が当たってからシャーレを恒温器に収納するまでの時間を記録する。ウェハーに光の照射を避けるために、クリーンベンチの蛍光灯は点灯しない。(当然紫外灯も)試験室の蛍光灯は、作業に支障を与えない程度に消す。(状態を記録する。可能であれば、照度を測定する。)

8) 試験片の培養

35 ± 1 , 相対湿度 90%以上で 24 ± 1 hr 培養する。

9) 洗い出しと菌数測定

(1) 試験菌液接種直後のフィルムブランクの洗い出し

試験菌液を接種した直後のフィルムブランク 3 個について、フィルムブランク及び被覆フィルムに付着している菌液の洗い出しを実施する。洗い出しは接種した順番に行う。SCDLP 培地はピペット等で正確に 10ml 計量して、洗い出しに使用する。

いずれの洗い出し方法においても、フィルムブランク及び被覆フィルムに付着している菌液を十分に洗い出す。洗い出しが終了した容器内の SCDLP 培地を洗い出し液とし、直ちに生菌数の測定を実施する。

(2) 培養後のフィルムブランク及び GaAs ウェハーの洗い出し

洗い出し操作においても、可能な限り光の照射を避けて操作を行なう。

培養後のフィルムブランク及び GaAs ウェハーについて(1)と同様に試験片を洗い出す。洗い出しは接種した順番に行う。洗い出しは、フラッシング(吹き付け)により洗い出しを行なう。(ストマッカ - は使用しない。)

(3) 寒天平板培養法による生菌数の測定：JIS にしたがう。(シャーレ 2 枚使用)

洗い出し液 1ml をピペットで正確に採取し、シャーレ($\times 0$)に 1ml 入れる。さらに洗い出し液 1ml をピペットで正確に採取し、希釈用のりん酸緩衝生理食塩水 9ml が入った試験管に 1ml 入れ、試験管ミキサーで十分に混合する。

の希釈液 1ml をピペットで正確に採取し、次のシャーレ($\times 1$)に 1ml 入れる。さらに の希釈液 1ml をピペットで正確に採取し、次のりん酸緩衝生理食塩水に 1ml 入れる。同様の作業を繰り返し、10 倍希釈系列希釈液を作る。その作業を試験管 3 本目[シャーレ($\times 3$)]まで作る。

希釈系列を作成した順番に、シャーレ 1 枚当たり、46~48 で保温された標準寒天培地 10~20ml を加えて、よく混合する。

シャーレのふたをして室温で放置し、標準寒天培地がシャーレ内で平板上に固まったことを目視で確認した後、シャーレを倒置し、低温恒温器(インキュベーター)で温度 35 ± 1 で 44 ± 4 時間培養する。

培養後、原則として 30~300 個の集落が現れた希釈系列のシャーレの集落数をコロニーカウンターで測定する。洗い出し液 1ml を分注した寒天培地($\times 0$)においても集落数が 30 個未満の場合は、その集落数を測定する。いずれの寒天培地にも集落の形成が認められない場合は < 1 と表示する。

培養終了時に直ちに測定できない場合はシャーレを 5 ± 1 で保温する。

7 生菌数の計算 測定した集落数から式(1)によって生菌数を求める。: JIS にしたがう。

8 試験結果

[7, 8 は変更なしなので省略]

以 上

[参考資料]

以下に八尾さんからのウェハーの表裏及び酸化膜と光に対する影響のコメントを転載しますので、再確認をお願いします。

- ・いずれも両面ミラーの仕様ですが、表面側のみに最終仕上げ研磨が施されていますので、表面と裏面の結果を比較すれば、表面ラフネスの影響がわかります。

試験面は容器(トレー)のふた(ラベルあり)を開けたときに、その容器の下側を向いている面です。今度のウェハーには、レーザーで表面(試験面)に文字が打ってあるそうです。

- ・ウェハ表面は製造後ウェハ表面は製造後大気中で瞬時に酸化膜を形成する。その酸化膜の成長は徐々に進行し約3ヶ月で2~3nmとなって安定する。電子・通信用途では通常、酸化膜がそこまで成長しないうちに使用する。酸化膜の成長は光、湿度によっても変化するので取扱い上注意が必要。

- ・光の影響について

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・正孔対が発生します。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ですが活性酸素が発生する反応が起こります。

(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)

したがって、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ます。

[添付資料 10]

Ag アクリル系フィルムの抗菌試験（共同実験）手順書

特に記述がない限り，JIS Z 2801 にしたがう。

1 菌株 黄色ブドウ球菌 IFO 12732：共通菌株を使用

(GaAs ウェハで使用了した菌株を使用する。継代数を試験記録に記入してください。)

2 薬品，材料，及び器具

試薬，培地類：各試験所で使用されているもの

ただし，次の試薬，培地類は GaAs で使用了した共通品目を使用する。

1. 普通寒天培地：栄研化学 300 g E-MC01（日食より配付）
2. 普通ブイヨン培地：栄研化学 100 g E-MC35（日食より配付）
3. 試薬蒸留水：高速液体クロマトグラフ用（各試験機関で用意）
(NB, 1/500NB, スラント調製用に使用する)

- ・ シャーレ：各試験所で使用しているものを使用
- ・ 密封容器：PP 製密封容器（INAX より配付）
- ・ 試験片(Ag/PET フィルム) パッケージ入り：東洋インキ(株)配付品
フィルムブランク：8 枚入り(4cm 角)
抗菌加工試験片(300, 350, 400, 450, 500, 550, 600ppm, 4cm 角)：各 4 枚入
(4cm 角) ただし，試験に使用する試験片はこのうちの 2 濃度を使用しますが，
その濃度については後日(10/6～7)今井委員又は杉本から連絡します。
無加工試験片(0ppm)：4 枚入り(4 cm 角)
下敷きフィルム：50 枚入り(5cm 角) 別パッケージ

3 滅菌方法

JIS にしたがう。

4 培地の調製

普通ブイヨン培地(NB)：当日調製

保存期間は調製日当日限り（普通ブイヨン培地の調製日に 1/500NB を調製する。）

普通寒天培地(斜面培地)：当日調製，滅菌後 3 時間以上経過してから使用する。

保存期間は調製日当日限り

1/500 NB：滅菌後，24 時間以上経過してから使用する。

調製日当日に滅菌する。調製時の pH 調整は水酸化ナトリウム溶液のみを使用する。高速液体クロマト用の蒸留水を使用して 1/500NB を調製すると pH は酸性になるので，水酸化ナトリウムのみで調整可能である。（1/500NB の pH 調整時に pH が 7.2 を超えた場合は，塩酸は使用して pH を戻すことはしない。その 1/500NB は廃棄して再度作り直す。）

5 菌株の継代

JIS に従う。(各試験所の手順による。)

6 試験操作

1) 前々培養(35 ± 1 , 20 ± 4 hr) , 前培養(35 ± 1 , 18 ± 2 hr) は JIS に従う。(各試験所の手順による。)

2) フィルムブランク(4cm 角)

接種直後の生菌数の測定 3 枚 24 hr 後の生菌数の測定 3 枚

3) 無加工試験片(0ppm)

24 hr 後の生菌数 3 枚

4) 抗菌加工試験片(2 濃度の試験片を使用する。)

24 hr 後の生菌数 3 枚 (2 濃度)

5) 試験片のエタノール拭きは実施しない。

6) 試験菌液の調製

1/500 NB を用いて適宜希釈し、菌数が $5 \sim 8 \times 10^5$ 個/ml となるように調製する。
(JIS の規定より狭い範囲で設定している。)

ただし、「試験菌液をすぐに使用しない場合は氷冷(0) 保存し、保存後 4 時間以内に使用する」ことはしない

7) 試験菌液の接種は次の方法で実施する。

接種時において、試験片を置く場所の照度は 1200 ~ 1500Lx とする。(照度が不足する場合は蛍光灯を持ち込んでも良い)

< JIS の方法を変更して、試験片とカバーフィルムを倒置して試験をする。 >

すなわち、まず 5cm 角の下敷きフィルム (= カバーフィルム) を置き、そこに試験菌液を滴下する。そこに 4cm 角の試験片を(抗菌面を菌液に接触するように)かぶせる。

接種は 1 セット (3 枚) の試験片の 1 枚ごとに実施する。

試験片 1 枚ごとに、下敷きフィルムに試験菌液を滴下しその上に滅菌ピンセットで試験片を被せる。

菌液が試験片の端からこぼれないように注意しながら、試験片の上から軽く押さえつけて、試験菌液が試験片全体に行き渡るようにする。

試験片 1 枚の接種及びフィルム被覆が終了した後、シャーレのふたをする。

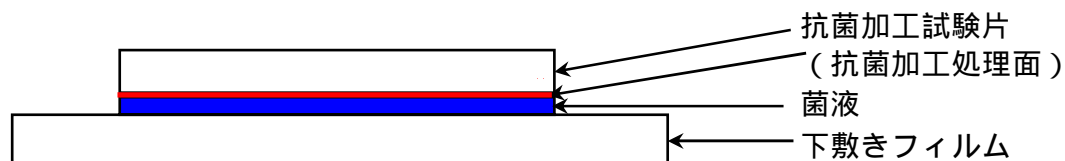


図.1 抗菌試験の仕様

8) 接種は次の順番で実施する。

フィルムブランク 3枚(接種直後) フィルムブランク 3枚(24 hr 培養後) 無加工試験片(0ppm) 3枚(24 hr 培養後) 抗菌加工試験片(第一水準) 3枚(24 hr 培養後) 抗菌加工試験片(第二水準) 3枚(24 hr 培養後)

9) 試験片の培養

35±1 , 相対湿度 90%以上で 24±1 hr 培養する。

10) 洗い出しと菌数測定

(1) 試験菌液接種直後の試験片の洗い出し

試験菌液を接種した直後のフィルムブランク 3個について、フィルムブランク及び下敷きフィルムに付着している菌液の洗い出しを実施する。洗い出しは接種した順番に行う。SCDLP 培地はピペット等で正確に 10ml 計量して、洗い出しに使用する。

いずれの洗い出し方法においても、フィルムブランク及び下敷きフィルムに付着している菌液を十分に洗い出す。洗い出しが終了した容器内の SCDLP 培地を洗い出し液とし、直ちに生菌数の測定を実施する。

(2) 培養後の試験片の洗い出し

培養後の試験片について(1)と同様に試験片を洗い出す。洗い出しは接種した順番に行う。洗い出しは、フィルムブランク、試験片及び下敷きフィルムに付着している菌液を試験片からモヤ状の液が出なくなるまで完全に洗い出す。

(3) 寒天平板培養法による生菌数の測定：JIS にしたがう。(シャーレ 2枚使用)

洗い出し液 1ml をピペットで正確に採取し、シャーレ(×0)に 1ml 入れる。さらに洗い出し液 1ml をピペットで正確に採取し、希釈用のりん酸緩衝生理食塩水 9ml が入った試験管に 1ml 入れ、試験管ミキサーで十分に混合する。

の希釈液 1ml をピペットで正確に採取し、次のシャーレ(×1)に 1ml 入れる。さらに の希釈液 1ml ピペットで正確に採取し、次のりん酸緩衝生理食塩水に 1ml 入れる。同様の作業を繰り返し、10倍希釈系列希釈液を作る。その作業をシャーレ(×3)試験管 3本目まで作る。

希釈系列を作成した順番に、シャーレ 1枚当たり、46~48 で保温された標準寒天培地 10~20ml を加えて、よく混合する。

シャーレのふたをして室温で放置し、標準寒天培地がシャーレ内で平板上に固まったことを目視で確認した後、シャーレを倒置し、低温恒温器(インキュベーター)で温度 35±1 で 44±4 時間培養する。

培養後、原則として 30~300 個の集落が現れた希釈系列のシャーレの集落数をコロニーカウンターで測定する。洗い出し液 1ml を分注した寒天培地(×0)においても集落数が 30 個未満の場合は、その集落数を測定する。いずれの寒天培地にも集落の形成が認められない場合は < 1 と表示する。培養後、直ちに測定できない場合はシャーレを 5±1 で保温する。

7 生菌数の計算

測定した集落数から式(1)によって生菌数を求める。: JIS にしたがう。

$$N = C \times D \times V \quad \dots\dots\dots (1)$$

ここに、N : 生菌数 (試験片 1 個当たり)

C : 集落数 (採用した 2 枚のシャーレの集落数平均値)

D : 希釈倍数 (採用したシャーレに分注した希釈液の希釈倍数。すなわちシャーレに書かれていた $\times 2$ などの数値。)

V : 洗い出しに用いた SCDLP 培地の液量 (ml)

生菌数は有効数字 3 桁目を四捨五入して 2 桁で表示する。集落数が < 1 の場合の生菌数は “ < 10 ” と表示する。生菌数平均値を求める場合は、試験片 3 個の各生菌数測定値を算術平均し、有効数字 3 桁目を四捨五入して 2 桁で表示する。生菌数が “ < 10 ” の場合は “ 10 ” として平均値を計算する。

8 試験結果

a) 試験成立条件の判定 次の 3 項目の試験成立条件をすべて満たすとき、その試験は有効とする。すべての条件を満足していない場合は、試験不成立と判定する。

以下の「無加工試験片」は、「フィルムブランク」に置き換える。

(1) 無加工試験片の接種直後の生菌数の対数値について。次式が成立する。

$$(L_{max} - L_{min}) / (L_{mean}) \leq 0.2$$

ここに L_{max} : 生菌数対数値の最大値

L_{min} : 生菌数対数値の最小値

L_{mean} : 3 個の試験片の生菌数対数値の平均値

(2) 無加工試験片の接種直後の生菌数平均値は、 $1.0 \sim 4.0 \times 10^5$ 個の範囲内である。

(3) 無加工試験片の 24 時間後の生菌数は、3 個の値がすべて 1.0×10^3 個以上である。

b) 抗菌活性値の計算 試験が成立した場合について、式(2)によって抗菌活性値を求める。数値は、小数点以下 2 桁目を切り捨て、小数点以下 1 桁で表示する。

$$R = [\log(B/A) - \log(C/A)] = [\log(B/C)] \quad \dots\dots\dots (2)$$

ここに、R : 抗菌活性値

A : 無加工試験片の接種直後の生菌数 ($n = 3$) の平均値 (個)

B : 無加工試験片の 24 時間後の生菌数 ($n = 3$) の平均値 (個)

C : 抗菌加工試験片の 24 時間後の生菌数 ($n = 3$) の平均値 (個)

以 上

付録

H15 不確かさ共同試験において東洋インキ製造(株)より配付される試料片の内容は以下のようになっています。

内容

試験片(銀濃度)	0 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
	300 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
	350 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
	400 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
	450 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
	500 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
	550 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
	600 ppm	×	4枚	(4 × 4 cm)	
フィルムブランク			8枚	(4 × 4 cm)	1パッケージ

カバーフィルム			50枚	(5 × 5 cm)	1パッケージ
---------	--	--	-----	------------	--------

〔添付資料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」の見積もり事例

ここに示すのはコントロールサンプルを用いた場合の一例である。

本事例を参考にして各試験所の規模・技術レベルなどに合わせ、抗菌性試験の「不確かさ」の見積もりの推定に活用してもらいたい。

1 はじめに

抗菌性試験は抗菌加工を施した材料(抗菌加工製品)表面の細菌増殖の抑制効果を、抗菌加工を施す前の材料(無加工製品)表面と比較する相対評価試験である。この評価の結果は抗菌活性値という無次元の数値で表現される。

そこで、抗菌性試験の「不確かさ」見積もりにあたり;

- ・ カテゴリーは「 定量試験B 」、Type Aの不確かさとして評価する。
- ・ 抗菌性試験の「不確かさ」は、試験所ごとに推定を行う。
- ・ 抗菌性試験に使用される試験菌は大腸菌、黄色ブドウ球菌の2菌種であるため、各試験菌種で出来るだけ均質な材料を用い、実験標準偏差を求め、これから抗菌性試験の「不確かさ」を推定する。
- ・ 抗菌性試験は試験担当者間のばらつきが結果に影響することが考えられるため、そのばらつきを考慮する必要がある。

2 「不確かさ」の推定にあたって基本的な考え方

「不確かさ」の推定にあたり試験所は、抗菌性試験における特性要因図をあらかじめ描き、要因成分(例えば、コントロールサンプルの安定性や試験担当者などの要因)を特定、評価しておくことが必要となる。優位な要因が特定された場合、原因究明を行い試験所の品質レベルの向上に役立てることができる。

以下、これらの要因が有意ではないことを前提として、十分な規模の実験を計画・実施することであらかじめ「不確かさ」の評価を行うものとする。

つまり、実験標準偏差を用いて「平均の実験標準偏差」を求め、それを総不確かさとして拡張不確かさを求める(包含係数は信頼の水準95%を与える有効自由度のt分布表からkを求め)。従って、実際の評価サンプル(基材や抗菌剤の種類の違い)によっては、不確かさが変化することを考慮しておく必要がある。

また、試験所の「かたより」は標準物質が無いので評価できないが、その近似値はJNLA技能試験等の試験所間比較プログラムに参加することで把握できる。

1) 試験担当者

資格付与された試験担当者全員を対象とする。また、試験担当者が複数の場合、抗菌性試験の「不確かさ」の過小評価を避けるために、試験所の判断で最もバラツキの大きな試験担当者のデータのみを採用する場合もある。

2) 抗菌性試験のデータ数と試験間隔

JIS Z 2801:2000(以下、JIS法)に準拠した抗菌性試験を複数回実施する(例、6ヶ月間隔

で定期的を実施する)。これは、測定結果の再現性 (Reproducibility) を評価するためである。試験の間隔及び1回の試験で得られるデータ数は、試験所ごとに規定する。

3) コントロールサンプル

試験所は抗菌性試験の「不確かさ」の推定の実施手順を定め、出来るだけ均質な抗菌性を有する試験体 (コントロールサンプル) を試験所ごとに選択する。

但し、試験所が均質なコントロールサンプルを準備できない場合は、供給可能な機関 (抗菌製品技術協議会など) から入手しても良い。

3 抗菌性試験の「不確かさ」の推定事例の実際 (黄色ブドウ球菌の場合)

本事例における規定 (前提) 条件を以下に示す。

- ・ 試験所が資格付与した試験担当者全員が対象である。
- ・ 試験所が用意した均質な試験体を用いて、試験担当者1人につき10個のサンプルを用いて試験を実施する ($n_1 = 10$)。
- ・ 上記の不確かさを求める試験は、6ヶ月ごとに定期的を実施する。
- ・ 試験担当者の変更があった場合は、直ちに試験 (この場合は全員が対象) を実施する。
- ・ 不確かさの推定には最新のデータ2回分を採用する (担当を外れたデータは除外)。

したがって、

ここで、抗菌活性値は無加工試験片の平均生菌数を基準に各抗菌加工試験片の生菌数から算出することから、試験担当者1人につき1回の抗菌性試験で10個 (n_1) 得られる。また、全てのデータ数はデータ2回の試験担当者の数に n_1 を乗じて算出し、包含係数 k は全てのデータ数の自由度、信頼の水準95%から得られる。

なお、通常のJIS法では、1サンプルの抗菌活性値は同一のサンプル3個の平均値から算出されるため、繰返回数 $n_2 = 3$ とする。

抗菌性試験の「不確かさ」の推定事例を以下に示す。

3.1 試験担当者変更なしの場合の不確かさの推定法

1) 試験担当者2人の場合

Table1 コントロールサンプルの抗菌活性値

試験担当者	各試験担当者のデータ									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1 (最新)	2.10	2.01	2.05	2.00	1.91	2.13	2.20	2.04	1.89	1.92
A2 (最新)	1.55	1.41	1.55	1.63	1.48	1.60	1.55	1.41	1.39	1.21
A1 (前回)	2.21	2.04	2.03	1.93	1.97	1.97	1.86	1.90	1.91	1.93
A2 (前回)	1.43	1.65	1.41	1.53	1.60	1.64	1.55	1.57	1.54	1.70

・実験標準偏差: $s = 0.27$ (全てのデータから算出)

・平均の実験標準不確かさ: $uc = s / \sqrt{n_2} = 0.27 / \sqrt{3} = 0.15$

・拡張不確かさ (包含係数 $k = 2.02$): $U = k \times uc = 2.02 \times 0.15 = 0.31$

* 包含係数は信頼の水準95%を与える有効自由度39のt分布表から $k = 2.02$ とした。

2) 試験担当者1人の場合

Table2 コントロールサンプルの抗菌活性値

試験 担当者	各試験担当者のデータ									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1 (最新)	2.10	2.01	2.05	2.00	1.91	2.13	2.20	2.04	1.89	1.92
A1 (1回前)	2.21	2.04	2.03	1.93	1.97	1.97	1.86	1.90	1.91	1.93

・実験標準偏差: $s = 0.10$ (全てのデータから算出)

・平均の実験標準不確かさ: $uc = s / \sqrt{n_2} = 0.10 / \sqrt{3} = 0.06$

・拡張不確かさ (包含係数 $k = 2.09$): $U = k \times uc = 2.09 \times 0.06 = 0.12$

* 包含係数は信頼の水準95%を与える有効自由度19のt分布表から $k = 2.09$ とした。

3.2 試験担当者変更の場合の不確かさの推定法

1) 試験担当者の変更の場合

Table3 コントロールサンプルの抗菌活性値

試験 担当者	各試験担当者のデータ									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1 (最新)	2.10	2.01	2.05	2.00	1.91	2.13	2.20	2.04	1.89	1.92
A3 (最新)	2.34	2.35	2.33	2.38	2.30	2.25	2.40	2.42	2.29	2.38
A1 (前回)	2.21	2.04	2.03	1.93	1.97	1.97	1.86	1.90	1.91	1.93
A2 (前回)	1.43	1.65	1.41	1.53	1.60	1.64	1.55	1.57	1.54	1.70

・実験標準偏差: $s = 0.19$ (A1;最新, A3;最新, A1;前回から算出)

・平均の実験標準不確かさ: $uc = s / \sqrt{n_2} = 0.19 / \sqrt{3} = 0.11$

・拡張不確かさ (包含係数 $k = 2.04$): $U = k \times uc = 2.04 \times 0.11 = 0.22$

* 包含係数は信頼の水準95%を与える有効自由度29のt分布表から $k = 2.04$ とした。

2) 試験担当者の人数減少の場合

Table4 コントロールサンプルの抗菌活性値

試験 担当者	各試験担当者のデータ									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1 (最新)	2.10	2.01	2.05	2.00	1.91	2.13	2.20	2.04	1.89	1.92
A1 (前回)	2.21	2.04	2.03	1.93	1.97	1.97	1.86	1.90	1.91	1.93
A2 (前回)	1.43	1.65	1.41	1.53	1.60	1.64	1.55	1.57	1.54	1.70

・実験標準偏差: $s = 0.10$ (A1; 最新, A1; 前回から算出)

・平均の実験標準不確かさ: $uc = s / \sqrt{n_2} = 0.10 / \sqrt{3} = 0.06$

・拡張不確かさ (包含係数 $k = 2.09$): $U = k \times uc = 2.09 \times 0.06 = 0.12$

* 包含係数は信頼の水準95%を与える有効自由度19のt分布表から $k = 2.09$ とした。

3) 試験担当者の人数増加の場合

Table5 コントロールサンプルの抗菌活性値

試験 担当者	各試験担当者のデータ									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A1 (最新)	2.10	2.01	2.05	2.00	1.91	2.13	2.20	2.04	1.89	1.92
A2 (最新)	1.55	1.41	1.55	1.63	1.48	1.60	1.55	1.41	1.39	1.21
A3 (最新)	2.34	2.35	2.33	2.38	2.30	2.25	2.40	2.42	2.29	2.38
A1 (前回)	2.21	2.04	2.03	1.93	1.97	1.97	1.86	1.90	1.91	1.93
A2 (前回)	1.43	1.65	1.41	1.53	1.60	1.64	1.55	1.57	1.54	1.70

・実験標準偏差: $s = 0.34$ (全てのデータから算出)

・平均の実験標準不確かさ: $uc = s / \sqrt{n_2} = 0.34 / \sqrt{3} = 0.19$

・拡張不確かさ (包含係数 $k = 2.01$): $U = k \times uc = 2.01 \times 0.19 = 0.39$

* 包含係数は信頼の水準95%を与える有効自由度49のt分布表から $k = 2.01$ とした。

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託
で実施したものの成果である。