

平成13年度 経済産業省委託

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

平成14年3月

抗菌製品技術協議会

目 次

1. まえがき1
2. 調査研究の目的1
3. 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	
3.1 標準物質の必要性2
3.2 抗菌JIS Z 2801における不確かさ成分の同定と解析4
3.3 バイオ(微生物・生化学)に係わる試験法における標準物質調査5
3.4 標準物質の検討と選定6
4. 標準試験片の検討	
4.1 基本設計7
4.2 膜厚及び乾燥条件の抗菌性能に及ぼす影響7
4.3 抗菌剤添加濃度の検討7
4.4 電子線滅菌に対する耐性評価7
4.5 結論7
5. 標準試験片の仕様	
5.1 標準試験片の試作8
5.2 抗菌剤(Ag)の定量9
5.3 抗菌性試験(標準試験片の予備試験)9
5.4 結論10
6. 試験片の抗菌効果(安定性)の確認	
6.1 標準試験片11
6.2 抗菌性試験(5試験機関)11
6.3 試験結果13
7. 総括(今後の課題)25
(添付資料)	
1. 調査研究委員会委員及び同分科会委員名簿27
2. 抗菌性試験データ集30
3. 抗菌陽性試験片「不確かさ評価」試験の試験手順説明会 実施報告書31
4. 抗菌陽性試験片「不確かさ評価」試験の依頼書33
5. 拡張不確かさ(U)の算出方法34
6. 「抗菌陽性試験片「不確かさの評価試験」手順書36

1. まえがき

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)が制定されると同時に我が国では、JNLAにおいて、抗菌性試験方法が認定範囲に加えられて、当該分野の試験所の認定が開始された。

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

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

以上のように、試験方法と試験所認定制度について国際的な対応が迫られている。

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

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

この報告書は、平成13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

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

スケジュールとしては、以下の3つのPhaseを想定している。

■ Phase 1

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

■ Phase2

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

- ・日米欧の環境調査(細菌種・室温・清浄度)

■ Phase3

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

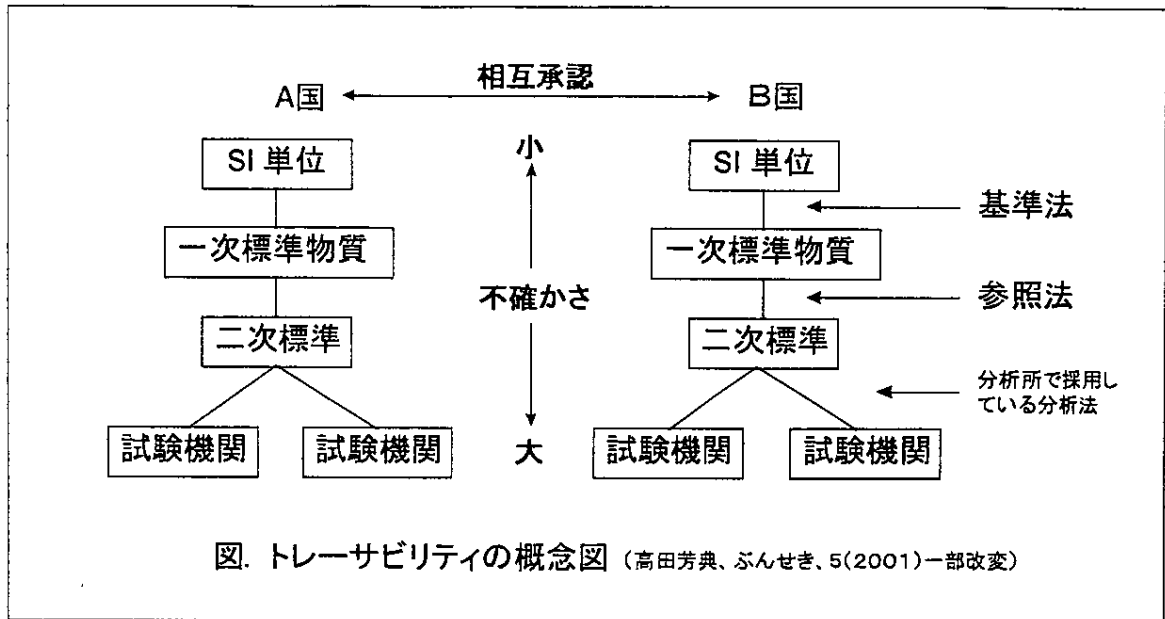
本年度はまず、標準物質作製のアイデア出し、標準物質試作品の抗菌性の確認試験及び均一性・安定性に関する基礎データの収集を目的とする。

3. 標準物質に要求される項目の洗い出しと作製法の提案

3.1 標準物質の必要性

- ・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)が制定されると同時に我が国では、JNLAにおいて、抗菌性試験方法について認定範囲に加えられて、当該分野の試験所の認定が開始された。
- ・JNLAは、これまでの国際規格ISO/IEC Guide 25から大幅に改正されたISO/IEC17025に対応するにあたりJNLAでは、新規申請を2001年7月から、既認定試験事業者に対する立ち入り検査においては2002年1月から、すべての試験事業者にはISO/IEC17025を適用し、同時に「試験の不確かさに関する要求事項」を適用する方針であることをすでに公表している(国際的には2002年末の完全移行で合意)。
- ・ISO/IEC17025は、校正及び試験に対して不確かさを推定するよう要求している。
- ・ISO/IEC17025は、校正や標準物質類の値の正しさを保証し維持するために、それらの値がSI(国際単位系)にトレーサブルであり、かつそのトレーサビリティを維持するための校正プログラムを確立するよう要求している。また、SIへのトレーサビリティ確保は、国家計量標準につながるに繋がることによって達成できるとしている。
規格の特徴である試験結果の信頼性を示す指標である「不確かさ(uncertainty)」についての要求事項は、電気や物理の分野においても各国の方針が、未だ明確にまとまっていない状況にある。
- ・ましてや化学及び生命科学の分野は、国際的にも最も手のつけ難い分野であるという認識で、今なお国際的な議論の最中でありこの概念の統一理解・利用には至っていない。
- ・測定結果のトレーサビリティを供給する認証標準物質の役割は、まだ国際的に完全に確立されているとはいえない。
- ・試験所は、不確かさの最も寄与率の高い要因を特定し、それらを小さくするように努力する必要がある。(引用「ISO/IEC17025の解説とその適用指針(丸善株式会社)」)

・残念ながら、世界的に見ても標準物質が整備されているものは極めてわずかである。したがって、トレーサビリティの確保には、今後国際的協調による、あるいは国家機関及び民間での精力的な標準物質の開発が期待される。



3.2 抗菌JIS Z 2801における不確かさ成分の同定と解析

抗菌性試験における不確かさを見積もるために、試験時の作業を特性要因図(Fish Bone Diagram)で分解して、不確かさに影響を与える要因の抽出を実施した。特性要因図を図1に示す。

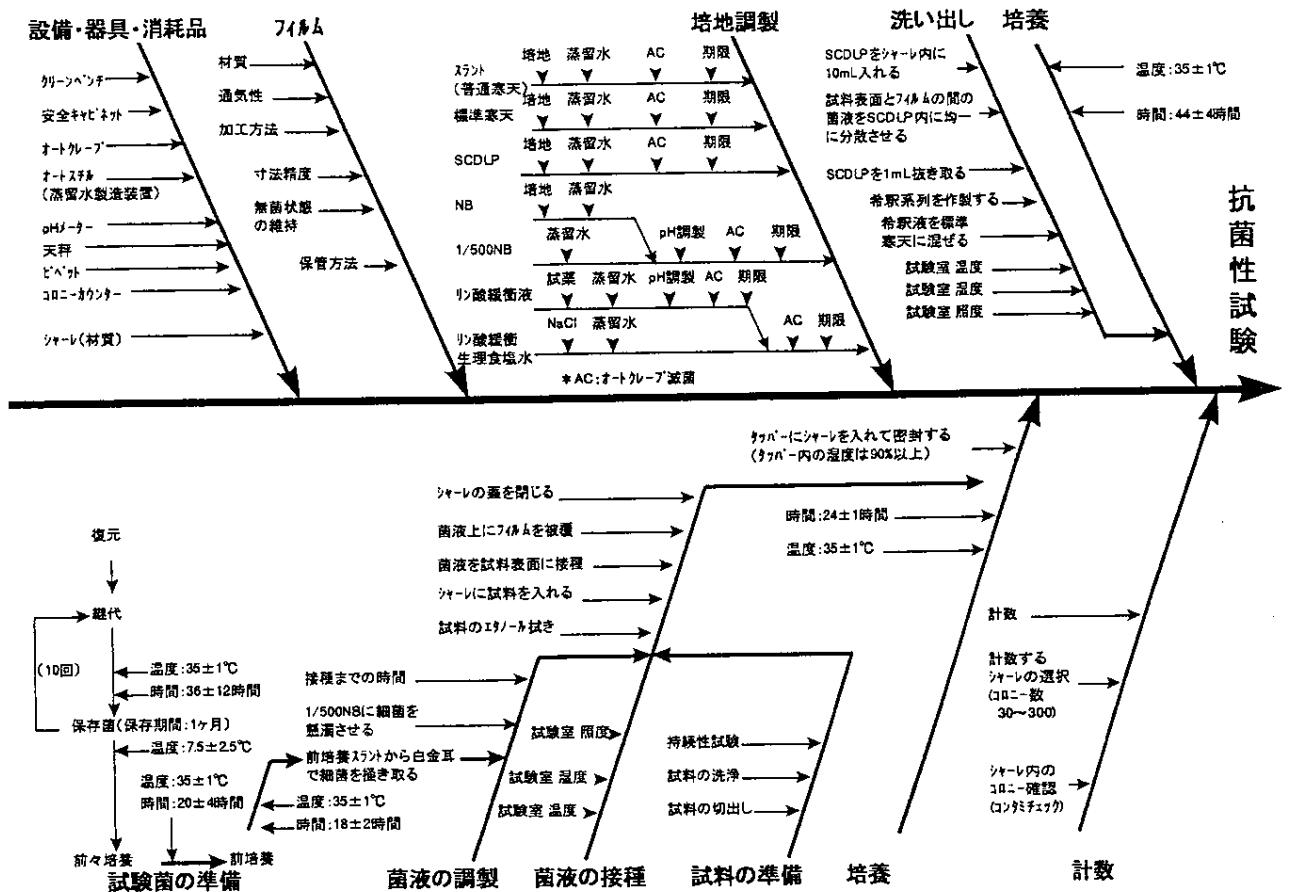


図1 抗菌性試験の特性要因図(Fish Bone Diagram)

今回の試験では抗菌性試験における不確かさを見積もるために、特性要因図から次の項目を抽出した。

- (1) 菌株(継代回数、前々培養、前培養を含む)

試験菌の活性が抗菌性試験に与える影響を評価する。

- (2) 培地(NB、普通寒天)

試験菌の培養に関係する普通寒天培地、菌液に関係するNB培地が抗菌性試験に与える影響を評価する。

- (3) 培養の容器(接種後の試験片を培養する)

接種後の培養環境(特に湿度)が抗菌性試験に与える影響を評価する。

3.3 バイオ(微生物・生化学)に係わる試験法における標準物質調査

生物系、生化学系試験における標準物質の規格(不確かさを含む)及びトレーサビリティの確保について文献調査を実施した。

現在、生化学系分析(試験)に関しては、臨床化学の分野において測定トレーサビリティと標準物質についての整備がすすんでいるので、この分野について調査を行った。臨床化学分析の測定体系は、「物質濃度を測定する場合」、「酵素活性を測定する場合」、「免疫成分を測定する場合」、「生理活性の力価測定」の4つに分けて取り扱われている。その中から、酵素活性及び標準物質をキーワードに認証値の決定や測定体系に関する文献を調査した。

(1) 研究プロジェクトのスタート

日本臨床化学会(JSCC)では、1994年に酵素活性測定用標準物質の確立を目的として研究を開始した。この時のテーマは

- ① 設定すべき酵素標準物質の種類、定義、規格、誤差許容範囲の検討
- ② 標準物質の値付けを実施するためのリファレンスラボラトリーの育成
- ③ 認証のための団体の選択
- ④ 標準物質製造ワーキンググループの組織化

であった。結果的に、③に関してはJCCLS[日本臨床化学標準化協議会]の認証委員会が担当し、また、④においては、検討の結果、既存製品の1つを適当と判断し該当メーカーが製造を担当した。こうした経緯を経て1997年11月に常用酵素標準物質が作成されるに至った。

今年度の本委員会の活動を考えると、②はJNLA認定試験所に相当し、④の後半は本年度の抗菌性試験における標準物質作製とよく似た状況であり、全体として不確かさ委員会での活動の妥当性が確認できた。

(2) 標準物質について

酵素活性測定系では、JSCC実用基準法(JSCC勧告法)を基準として測定体系が構築されている。実際には、実用基準法を実用面からアレンジしたJSCC常用基準法により値付けされ、認証委員会により認証された常用酵素標準物質(常用ERM)を用いて、各試薬メーカーは検量用酵素標準物質(検量用ERM)の値付けを行っている。それぞれの試験施設では、日常検査法においてこの検量用ERMを用いて検量(検量係数を設定)することによりトレーサビリティの確保と施設間差の縮小が可能になった。常用酵素標準物質の役割としては、

- ① 検量用酵素標準物質の開発と評価
- ② 日常検査法の開発と評価
- ③ 精度管理評価用試料の開発と評価

また、検査用酵素標準物質(キャリブレーション)の使い方は、

- ① 日常検査法に限定して使用: 試薬とセットになって供給される
- ② 予め常用ERMを標準としてその日常検査法で正確に測定値を与えておく

などである。

臨床検査における酵素活性測定は、測定機器と測定試薬キットと管理試料は試薬メーカーごとにセットで使われることが普通であり、この測定系の中で検量用ERMの果たす役割は大きい。

抗菌性試験をこの測定系にそのまま当てはめることはできないが、

- ① 基準の測定法により常用ERMを定める。
- ② この常用標準物質の値を日常試験法に伝播するために検量用ERMを作製し、これを用いて日常検査法を管理する。

というアプローチは、抗菌試験分野における標準物質の開発とトレーサビリティ及び不確かさの推定を進めるにあたって示唆に富むものであると考えられる。

(3)参考文献

1. 検量用ERM(酵素用キャリブレーション)を利用した酵素活性測定
佐藤睦子, 齊藤篤, 下平一憲, 中居恵子, 伊藤忠一
医学検査, 50, No.5, 700-704(2001)
2. 自動機器分析に要求される標準化 校正方式の標準化
桑克彦, 臨床検査, 44, No.8, 864-871(2000)
3. 酵素活性測定体系の確立 ERMによる標準化作業
永峰康孝, 徳島県医師会報, No.345, 16-19(2000)
4. ERMの正しい使用方法
下村弘治, Med Technol, 27, No.11, 1213-1218(1999)
5. 日常検査における正確さの伝達と検証方法 酵素活性測定における検量とトレーサビリティ
本永秀夫, 都臨技会誌, 27, No.2, 37-38(1999)
6. 酵素標準物質(ERM)
亀井幸子, 検査と技術, 26, No.10, 908-910(1998)
7. 標準物質 日本臨床検査標準協議会(JCCLS)における認証委員会
菅野剛史, 臨床検査, 41, No.12, 1659-1660(1997)
8. 標準物質 JCSS常用酵素標準物質
伊藤啓, 臨床検査, 41, No.12, 1630-1635(1997)
9. 血清酵素活性測定³⁷C法の基準と使い方
桑 克彦, 検査と技術, 23, No.3, 183-190(1995)
10. Validation of an Enzyme Calibrator-An IFCC Guideline
FERARD G., EDWARDS J., KANNO T., et al
Clin Biochem 31, No.6, 495-500(1998)
11. 常用酵素標準物質の規格 臨床化学29, No.2 77-92 (2000)
12. クオリティマネジメント・酵素・試薬専門委員会
標準物質の作製・管理・運用に関する指針
臨床化学 30, No.3, 185-188(2001)

3.4 標準物質の検討と選定

標準物質として、平成12年度に実施した「抗菌技能試験プログラムの開発に関する調査」で検討した標準試験片が使用可能なことを見出した。また、平成13年度に実施された「抗菌陽性試験片実用化委員会」の報告書を参照して、まずは入手可能な標準物質として東洋インキ製造株式会社(以下東洋インキ)製の標準試験片を用い評価検討することとした。

4. 標準試験片の検討

標準試験片の作製条件の検討については、主に平成13年度に実施された「抗菌陽性試験片実用化委員会」の報告書を引用し、その概要について記述する。

4.1 基本設計

不確かさ評価用の標準試験片を作製するにあたって、その抗菌性能のバラツキを可能な限り少なくするためには塗膜中の抗菌剤の分布を均一化する必要があるとの考えた。そのワニス及び抗菌剤のいずれもが水溶性であり、かつその成膜乾燥時に抗菌剤の均一性を維持した状態で固化する材料として次のものを選択した。

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

尚、このワニスを構成する樹脂は、揮発性塩基性物質で中和することによって水溶化させるタイプで、その成膜乾燥時に水と揮発性塩基性物質を揮発させることで樹脂を不溶化させるものである。

4.2 膜厚及び乾燥条件の抗菌性能に及ぼす影響

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

(1)乾燥条件の検討

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

(2)膜厚の検討

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

4.3 抗菌剤添加濃度の検討

2000ppmまでの抗菌領域における抗菌剤の最適添加濃度を定めるために、平成12年度に実施された「抗菌技能試験プログラムの開発に関する調査報告書」から3試験機関の抗菌性試験データをまとめた。その一つとして2濃度間の差の推定(95%)を行ったところ、400ppmは0ppmからも2000ppmからも1%に有意に差のあることが確認されたため、抗菌領域における抗菌剤の最適添加濃度は400ppmと決定した。

4.4 電子線滅菌に対する耐性評価

抗菌剤400ppm添加品に対して電子線を60kGyを照射し、抗菌性能に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は与えないことが確認された。

4.5 結論

今回取りあげたワニス系の塗料を塗布した標準試験片は、成膜時の乾燥条件をコントロールすることによって、抗菌性能の不確かさを評価する標準試験片として十分検討に耐える特性であるとの判断に至った。

5.標準試験片の仕様

5.1 標準試験片の試作

今年度は、外観環境の異なる条件下で計2回試作を行い、その中で不確かさ評価用として適切な標準試験片を選択することにした。

(1)試作1

- ①塗工液 : 4.1の基本設計と同じ
- ②抗菌剤濃度: 0ppm, 400ppm, 2000ppm
- ③膜厚 : 5±1 μm
- ④塗工条件 : 基材 PETフィルム(E-5101)、膜厚50 μm
塗工方法 マイクログラビア(版:斜線50線/リハース回転:140/塗工速度:40m/min
/テンション4kg-5kg)
- ⑤乾燥条件 : 第一オーブン:130°C/第二オーブン:130°C/第三オーブン140°C/第四オーブン40°C
注)各オーブンの温度は上下とも同じ
- ⑥作製日 : 2001年8月30日

(2)試作2

- ①塗工液 : 4.1の基本設計と同じ
- ②抗菌剤濃度 : 0ppm, 400ppm, 800ppm
- ③膜厚 : 5±1 μm
- ④塗工条件 : 基材 PETフィルム(E-5101)、膜厚50 μm
塗工方法 0ppm: マイクログラビア(版:斜線50線/リハース回転:200/塗工速度:
4m/min/テンション2.5kg-2.5kg)
400,800ppm: マイクログラビア(版:斜線50線/リハース回転:160/塗工速度:
4m/min/テンション2.5kg-2.5kg)
- ⑤乾燥条件 : 0ppm (第一オーブン:130-130°C/第二オーブン:130-130°C/第三オーブン100-130°C
/第四オーブン70°C)
400,800ppm(第一オーブン:130-130°C/第二オーブン:140-140°C/第三オーブン100-140°C
/第四オーブン80°C)
注)オーブン温度の左側は上側オーブン温度、右側は下側オーブン温度
- ⑥作製日 : 2001年12月26日

5.2 抗菌剤(Ag)の定量

(1)銀(Ag)の測定方法

各濃度の標準試験片について、細断した試料約0.1～0.5gをケルダールフラスコに取り、硝酸及び硫酸を加えて加熱分解(湿式灰化)する。アンモニア水で中和後、ジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム溶液を加えて、銀をメチルイソブチルケトン溶液に抽出し、これを原子吸光光度法(波長328.0nm、フレイム:空気-アセチレン)で測定した。

(2)銀(Ag)の定量結果

①試作1(2001年8月30日作製)

試作1の銀(Ag)の定量結果を表1に示す。

表1 試作1の銀(Ag)の定量

測定	銀量(μg/標準試験片1枚)	
	標準試験片400ppm	標準試験片2000ppm
1	2.78	13.1
2	2.34	9.7
3	2.72	8.9
4	2.74	12.3
5	2.58	12.8
平均	2.63	11.4

注)銀量の理論推定値 400ppm: 2.40 μg/標準試験片1枚
2000ppm: 11.37 μg/標準試験片1枚

②試作2(2001年12月26日作製)

試作2の銀(Ag)の定量結果を表2に示す。

表2 試作2の銀(Ag)の定量

測定	銀量(μg/標準試験片1枚)	
	標準試験片400ppm	標準試験片800ppm
1	2.41	5.41
2	2.56	4.96
3	2.80	4.84
4	2.55	4.77
5	2.49	4.74
平均	2.56	4.94

注)銀量の理論推定値 400ppm: 2.56 μg/標準試験片1枚
800ppm: 4.44 μg/標準試験片1枚

5.3 抗菌性試験(標準試験片の予備試験)

(1)予備試験1(担当:財団法人日本食品分析センター)

標準試験片(2001年8月作製)の抗菌性能をJIS Z 2801に準拠して評価した(標準試験片表面のエタノール拭き無し、洗い出しのシャーレの希釈系列は1枚ずつ)。結果を表3に示す。

0ppm, 400ppm, 2000ppmの各濃度についてその抗菌性能を評価した結果(N=3)、設計通りの抗菌性能が得られたため、本標準試験片が評価用サンプルとして供することが可能であることを確認した。

表3 予備試験1の結果

抗菌剤添加量	生菌数(CFU/枚)				抗菌活性値
	1	2	3	平均	
0(接種直後)	1.9E+5	1.7E+5	1.9E+5	1.8E+5	—
0	6.5E+4	7.5E+4	6.4E+4	6.8E+4	—
400	1.7E+4	4.2E+3	3.1E+3	8.1E+3	0.9
2000	<10	<10	<10	<10	3.8

* 試験菌種は黄色ブドウ球菌(IFO12732)

* 接種直後と培養後の生菌数はフィルムblankでも同時に評価した。

接種直後(平均):1.7E+5(CFU/枚)、培養後(平均):2.3E+6(CFU/枚)

2) 予備試験2(担当: 株式会社INAX)

標準試験片(2001年12月作製)の抗菌性能を栄養濃度(1/100NB,1/50NB)を2水準、培養時間(1hr, 3hr, 6hr)を3水準設定して評価した。結果を表4, 表5に示す。

400ppm, 800ppmの各濃度についてその抗菌性能を評価した結果(N=2)、設計通りの抗菌性能が得られなかった。12月作製の標準試験片が不確かさの評価用に適さなかった理由は、8月作製時との外気温度の差による成膜乾燥条件の違い、塗工装置の一部オープン不良等が原因として考えられる。

表4 予備試験2の結果(栄養濃度 1/100NB)

抗菌剤添加量	培養時間1(hr)		培養時間3(hr)		培養時間6(hr)	
	平均生菌数(CFU/枚)	抗菌活性値	平均生菌数(CFU/枚)	抗菌活性値	平均生菌数(CFU/枚)	抗菌活性値
0	1.1E+5	-	1.3E+5	-	1.2E+5	-
400	1.0E+5	0.1	1.1E+5	0.1	1.0E+5	0.1
2000	1.2E+5	-0.1	8.8E+4	0.2	6.4E+4	0.3

* 試験菌種は黄色ブドウ球菌(IFO12732)、接種菌数は1.0E+5(CFU/枚)。

表5 予備試験2の結果(栄養濃度 1/50NB)

抗菌剤添加量	培養時間1(hr)		培養時間3(hr)		培養時間6(hr)	
	平均生菌数(CFU/枚)	抗菌活性値	平均生菌数(CFU/枚)	抗菌活性値	平均生菌数(CFU/枚)	抗菌活性値
0	1.7E+5	-	1.5E+5	-	1.5E+5	-
400	1.5E+5	0.0	1.3E+5	0.1	9.8E+4	0.2
2000	1.4E+5	0.1	1.3E+5	0.1	6.9E+4	0.4

* 試験菌種は黄色ブドウ球菌(IFO12732)、接種菌数は1.2E+5(CFU/枚)。

5.4 結論

以上予備試験の結果、2001年8月作製の標準試験片を不確かさ評価用として使用することに決定した。

6. 標準試験片の抗菌効果(安定性)の確認

6.1 標準試験片

本試験には全て2001年8月に東洋インキで作製された標準試験片を用いた。

- (1)抗菌剤添加量 0ppm(Lot.No. JMC010830-1)
- (2)抗菌剤添加量 400ppm(Lot.No. JMGO10830R)
- (3)抗菌剤添加量 2000ppm(Lot.No. JMGO10830R)

6.2 抗菌性試験 (5試験機関)

(1)試験機関

次の5試験機関(順不同)が、抗菌性試験の評価を担当した。その選定理由として、いずれの試験機関もJNLA試験所認定を取得もしくは予定している評価技術としても高いレベルにあること、があげられる。

- ①株式会社INAX(以下、INAX)
- ②ユニチカガーメンテック株式会社(以下、ユニチカ)
- ③財団法人日本紡績検査協会(以下、ポーケン)
- ④財団法人日本化学繊維検査協会(以下、カケン)
- ⑤財団法人日本食品分析センター(以下、日食)

(2)試験方法及びその説明会

試験方法は、JIS Z 2801に準拠して作成した「抗菌陽性試験片 不確かさ評価の試験手順書(以下手順書)」に従った(手順書は2/19に各試験機関に送付)。

また、試験所間の技術的な違い(操作や解釈の違い)をできる限りなくすことを目的とした「『抗菌陽性試験片 不確かさ評価』試験の試験手順説明会」を実施した(2/13; 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 近畿支所)。

(3)試験菌

①共通菌株

日食が申し込み窓口となり黄色ブドウ球菌の菌株を保存機関(IFO: 財団法人発酵研究所)に一括して発注した。菌株はIFOから各試験機関に配布され、その菌株を各試験機関で復元して使用した。

②各試験機関で保有の菌株

各試験機関で保有している黄色ブドウ球菌の菌株を使用した。

(4)培地・培養容器

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

- ①普通寒天培地(栄研化学 300g E-MC01 Lot.No. 1Z106)
- ②普通ブイヨン培地(栄研化学100g E-MC35 Lot.No. 19103)
- ③培養容器(Jallee タイトボックス No.5)

(5)カバーフィルム (Lot.No. KDB020117)

カバーフィルムは東洋インキ製のものを使用した。

(6)試験実施日

2002/02/25(月)～03/04(月)

(7)検討する試験条件

1) 菌株(保存菌株、前々培養、前培養)

表6に菌株の条件(継代回数、斜面培地調製条件、オートクレーブ条件を含む)を示す。

表6 菌株の条件

菌株	菌株の斜面培地	前(々)培養の斜面培地	オートクレーブの条件
共通菌株 継代回数 全機関: 1回	共通の培地 (試薬蒸留水を使用)	共通の培地 (試薬蒸留水を使用)	121℃ 15~20分
各試験機関 で保有して いる菌株 継代回数 機関A: 7回 機関B: 7回 機関C: 6回 機関D: 10回 機関E: 9回	各試験機関の培地 (各試験機関で使用し ている蒸留水を使用)	各試験機関の培地 (各試験機関で使用し ている蒸留水を使用)	各試験機関で 実施している条件

2) 培養容器(標準試験片に接種した菌液を培養する容器)

- ① 共通の容器
- ② 各試験機関で使用している容器

3) 標準試験片の抗菌剤添加量

- ① 400(ppm)
- ② 2000(ppm)

(8) 評価する標準試験片の枚数

表7に本試験で評価する標準試験片の枚数と試験条件を示す。今回、以下の評価を各試験機関全ての標準試験片をまとめて評価することとした。

表7 評価する標準試験片の枚数

抗菌剤 添加量(ppm)	共通菌株		各社の菌株	
	共通容器	各機関容器	共通容器	各機関容器
フィルムブランク* (接種直後)	3	—	3	—
0	3	—	3	—
400	3	3	3	3
2000	3	—	—	—

* 抗菌剤添加量0ppmの試験片が不足したため、接種直後の生菌数はフィルムブランクで測定(フィルムブランクは各試験機関で用意)。「—」: 試験未実施

6.3 試験結果

(1) 試験データの評価(生菌数)

試験データを生菌数で評価した結果を図2～図8に示す。試験データは生菌数または平均生菌数をLog(生菌数)またはLog(平均生菌数)に変換して処理した。培養時間0(hr)の生菌数はフィルムブランクの生菌数である。

1) 試験片の抗菌剤添加量とLog(平均生菌数)の比較

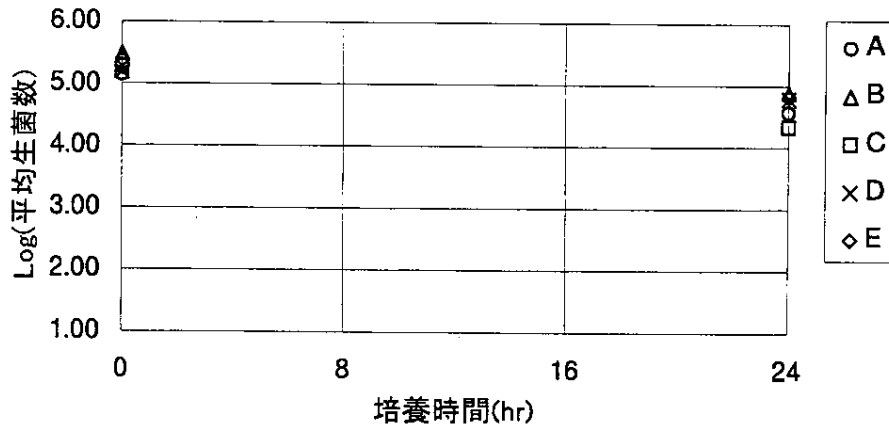


図2 抗菌剤添加量(0ppm)の場合の培養時間とLog(平均生菌数)の関係
—共通菌株・共通容器—

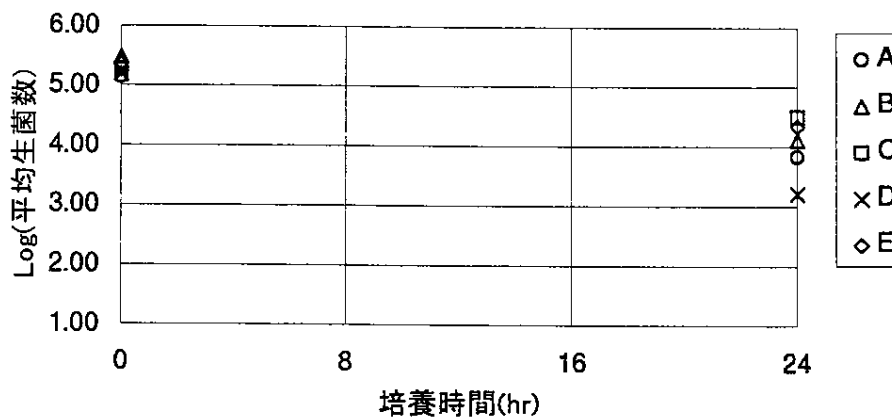


図3 抗菌剤添加量(400ppm)の場合の培養時間とLog(平均生菌数)の関係
—共通菌株・共通容器—

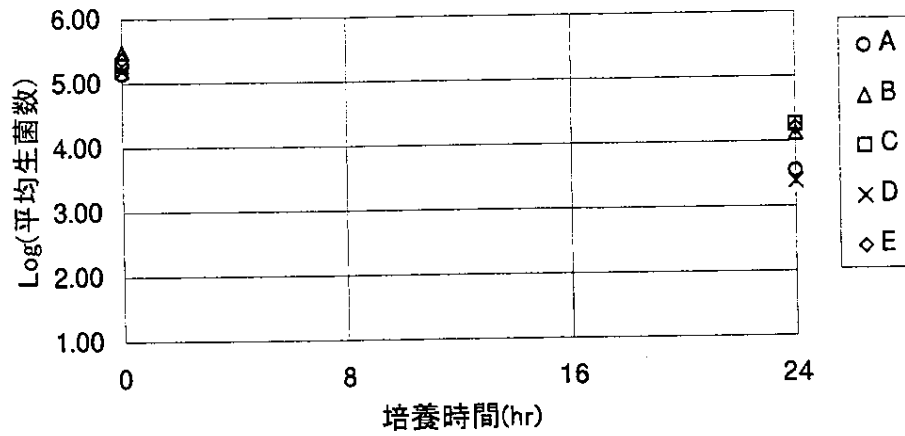


図4 抗菌剤添加量(400ppm)の場合の培養時間とLog(平均生菌数)の関係
 —共通菌株・各試験機関容器—

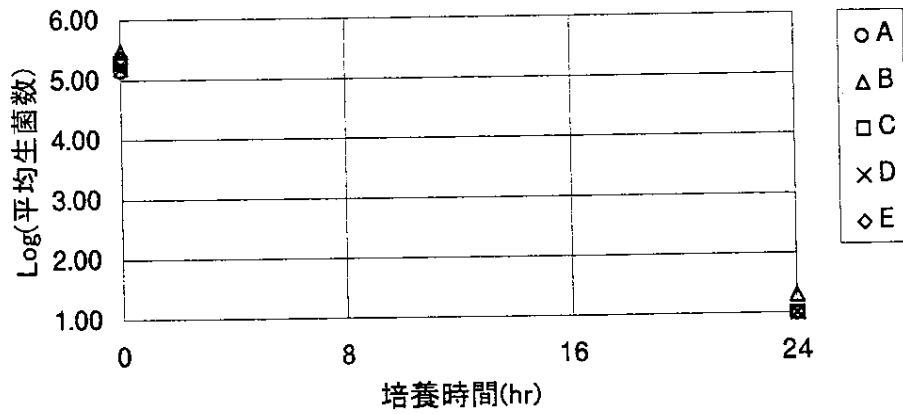


図5 抗菌剤添加量(2000ppm)の場合の培養時間とLog(平均生菌数)の関係
 —共通菌株・共通容器—

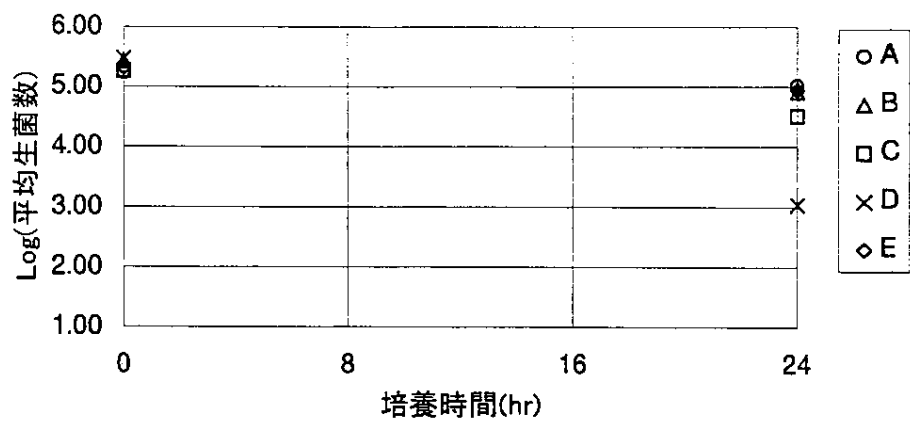


図6 抗菌剤添加量(0ppm)の場合の培養時間とLog(平均生菌数)の関係
 —各試験機関の菌株・共通容器—

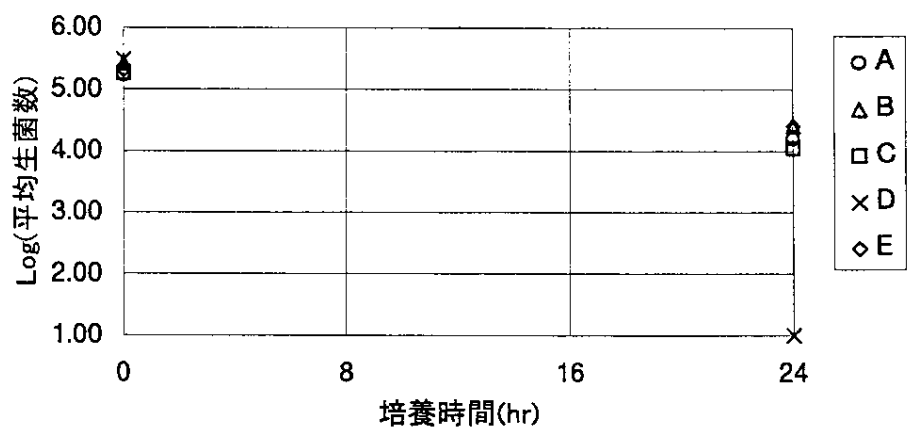


図7 抗菌剤添加量(400ppm)の場合の培養時間とLog(平均生菌数)の関係
 —各試験機関の菌株・共通容器—

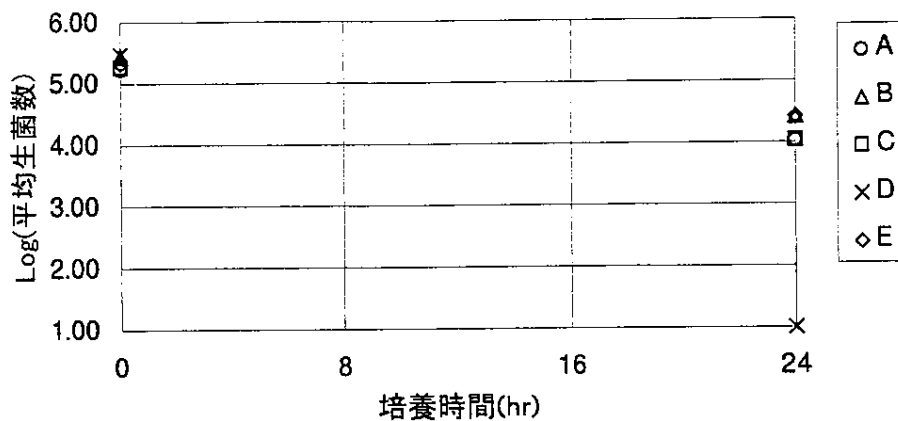


図8 抗菌剤添加量(400ppm)の場合の培養時間とLog(平均生菌数)の関係
 —各試験機関の菌株・各試験機関の容器—

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

Log(生菌数)の標準偏差を表8、拡張不確かさ(U)の推定結果を表9、zスコアによる判定結果を表10に示す。

表8 Log(生菌数)の標準偏差

抗菌剤添加量 (ppm)	試験菌株	
	共通	各試験機関保有
0(フィルムブランク)	0.13	0.10
0	0.22	0.83
400	0.48[0.40]	1.34[1.35]
2000	0.16	—

*「—」: 試験未実施

*[]: 各試験機関の容器で培養した結果

表9 各試験のLog(生菌数)の拡張不確かさ(U)

抗菌剤添加量 (ppm)	試験菌株	
	共通	各試験機関保有
0(フィルムブランク)	0.28	0.22
0	0.47	1.78
400	1.04[0.86]	2.90[2.92]
2000	0.31	—

*「—」: 試験未実施

*[]: 各試験機関の容器で培養した結果

表10 Log(生菌数)のzスコアによる判定

抗菌剤添加量 (ppm)	試験機関	菌株					
		共通			各試験機関		
		1	2	3	1	2	3
0(フィルムブランク)	A	0.88	1.11	0.88	0.48	0.95	0.71
	B	1.23	0.94	1.06	0.87	0.71	0.87
	C	0.00	0.00	0.41	0.32	0.71	0.48
	D	0.41	0.70	0.88	1.35	1.11	1.27
	E	0.35	0.35	0.47	0.16	0.00	0.00
0	A	0.46	0.77	1.08	0.26	0.58	0.29
	B	0.77	0.35	0.12	0.19	0.24	0.03
	C	1.39	1.97	1.89	0.69	1.08	1.06
	D	0.27	0.12	0.46	4.18	4.81	6.30
	E	0.19	0.00	0.15	0.05	0.58	0.00
400	A	0.56	0.43	0.81	0.10	0.08	0.52
	B	0.00	0.00	0.09	0.57	1.35	0.39
	C	0.81	0.81	0.86	0.26	0.00	0.10
	D	2.29	1.99	1.61	7.99	7.99	7.99
	E	0.36	0.54	0.54	0.83	0.86	0.91
400 [各試験 機関の容器]	A	1.07	1.11	1.31	0.96	1.00	0.65
	B	0.00	0.00	0.08	0.44	0.44	1.33
	C	0.24	0.42	0.24	0.22	0.00	0.07
	D	1.05	1.63	1.87	6.92	6.92	6.92
	E	0.08	0.30	0.24	0.26	0.35	0.35

* 黒塗り部分はzスコアが2.0以下にならず、結果に疑義有りとなったデータである。

また、抗菌剤添加量2000ppmのデータは全て15点中14点が1.00となったため
zスコアを求めることは出来なかった。

(2) 試験データの評価(抗菌活性値)

試験データを抗菌活性値で評価した結果を図9～図12に示す。

1) 試験機関と抗菌活性値の比較

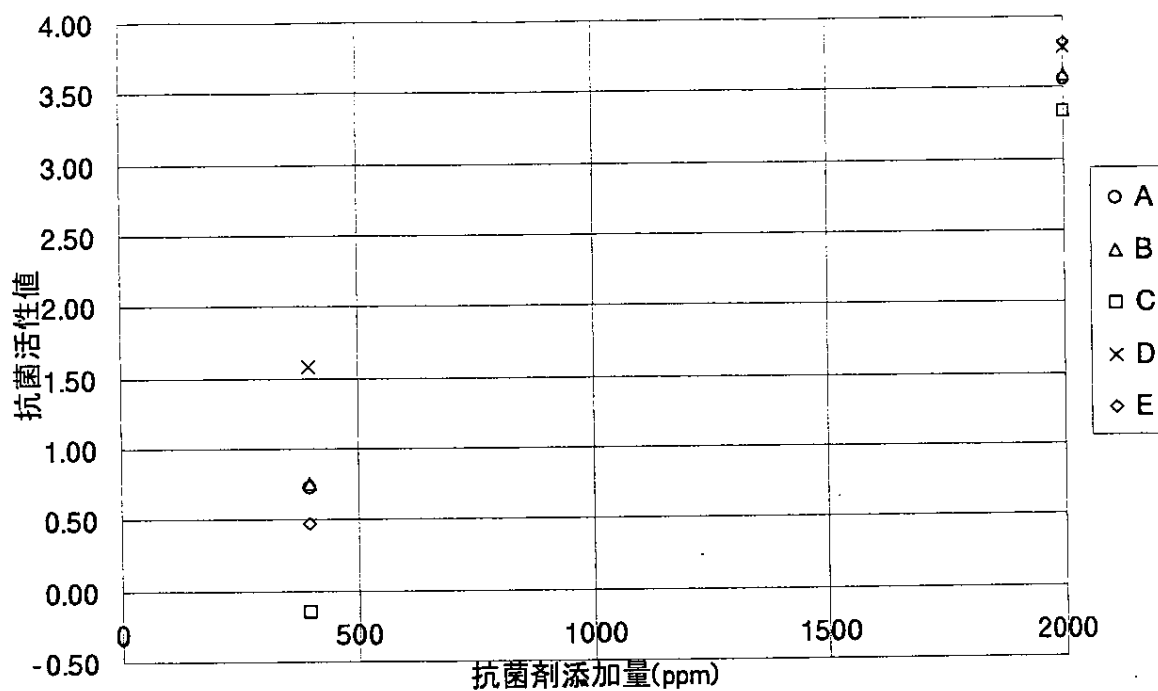


図9 標準試験片の抗菌活性値(共通菌株・共通容器)

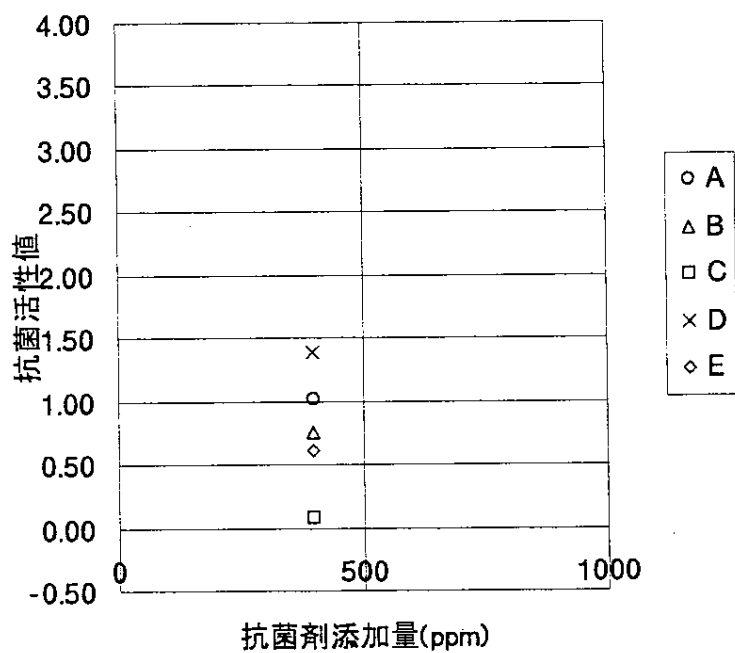


図10 標準試験片の抗菌活性値
(共通菌株・各試験機関の容器)

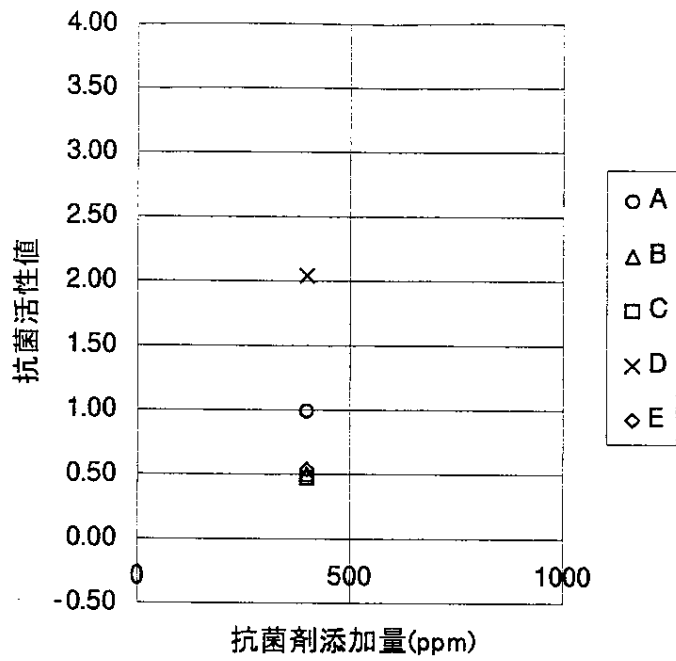


図11 標準試験片の抗菌活性値
(各試験機関の菌株・共通容器)

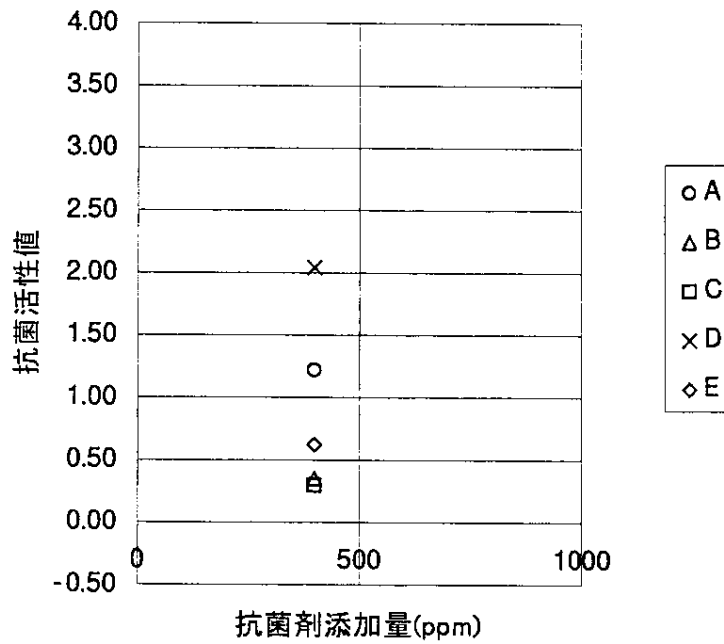


図12 標準試験片の抗菌活性値
(各試験機関の菌株・各試験機関の容器)

2) 抗菌活性値の標準偏差

抗菌活性値の標準偏差を表11、拡張不確かさ(U)の推定結果を表12、zスコアによる判定結果を表13に示す。

表11 抗菌活性値の標準偏差

抗菌剤添加量 (ppm)	試験菌株	
	共通	各試験機関保有
400	0.59[0.47]	0.62[0.68]
2000	0.22	—

*「—」: 試験未実施

*[]: 各試験機関の容器で培養した結果

表12 Log(生菌数)の拡張不確かさ(U)

抗菌剤添加量 (ppm)	試験菌株	
	共通	各試験機関保有
400	1.27[1.01]	1.34[1.46]
2000	0.47	—

*「—」: 試験未実施

*[]: 各試験機関の容器で培養した結果

表13 抗菌活性値のzスコアによる判定

抗菌剤添加量 (ppm)	試験機関	菌株					
		共通			各試験機関		
		1	2	3	1	2	3
400	A	0.00	0.22	0.40	0.77	0.64	1.15
	B	0.15	0.26	0.04	0.00	0.66	0.18
	C	3.14	3.17	3.24	0.18	0.40	0.35
	D	3.79	3.28	2.55	3.16	3.16	3.16
	E	0.69	0.91	0.95	0.11	0.18	0.20
400 [各試験 機関の容器]	A	0.53	0.61	0.84	0.96	0.99	0.77
	B	0.03	0.00	0.05	0.12	0.12	0.71
	C	1.68	1.88	1.63	0.58	0.43	0.36
	D	1.09	1.86	2.14	2.12	2.12	2.12
	E	0.25	0.51	0.46	0.06	0.00	0.00
2000	A	0.65	0.65	0.65	-	-	-
	B	1.43	0.28	0.28	-	-	-
	C	1.26	1.26	1.26	-	-	-
	D	0.00	0.00	0.00	-	-	-
	E	0.08	0.08	0.08	-	-	-

* 黒塗り部分はzスコアが2.0以下にならず、結果に疑義有りとなったデータである。

* 「 — 」 : 試験未実施

(3) 試験結果からの考察

1) 各試験機関の試験結果のバラツキ

各試験機関の試験結果のバラツキを比較するために、各試験機関ごと(n=3)の生菌数の標準偏差/平均生菌数(%)と全体(n=15)の生菌数の標準偏差/平均生菌数(%)を比較検討した。図13に接種直後のフィルムブランク(共通菌株)、図14に抗菌剤添加量0ppm(共通菌株, 共通容器)、図15に抗菌剤添加量400ppm(共通菌株, 共通容器)の生菌数の標準偏差/平均生菌数(%)を示す。

図13より、標準偏差/平均生菌数(%)は全体では30%を超えているのに対し、各機関では全て10%以下である。この結果から、試験全体のバラツキと比較して、各試験機関におけるバラツキは小さくなる傾向が確認された。図14の抗菌剤添加量0ppm、図15の抗菌剤添加量400ppmにおいても同様の傾向が確認された。また、バラツキは培養後の方が接種直後と比較すると大きくなる傾向が確認された。

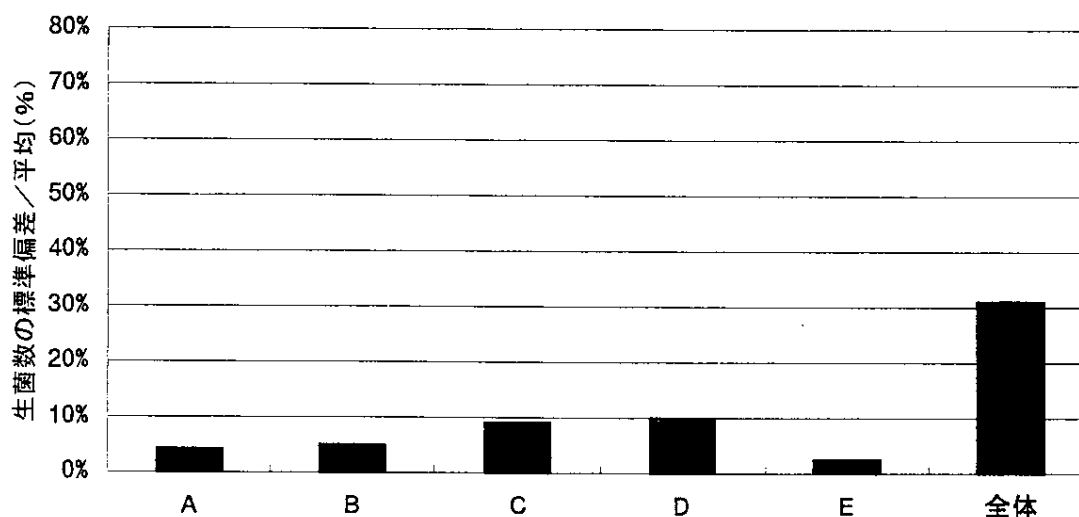


図13 フィルムブランクの標準偏差/平均生菌数(%)

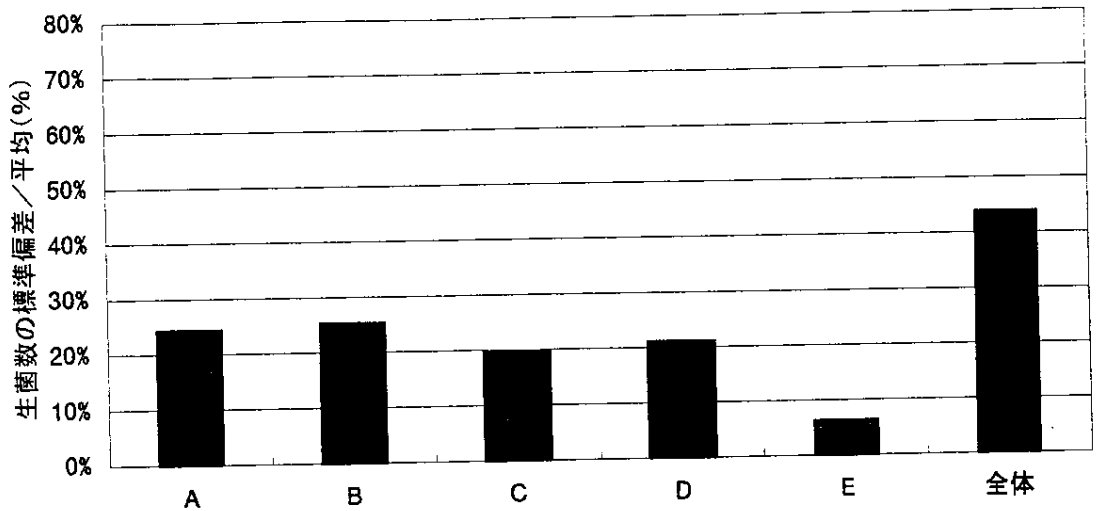


図14 抗菌剤添加量0ppmの標準偏差／平均生菌数(%)

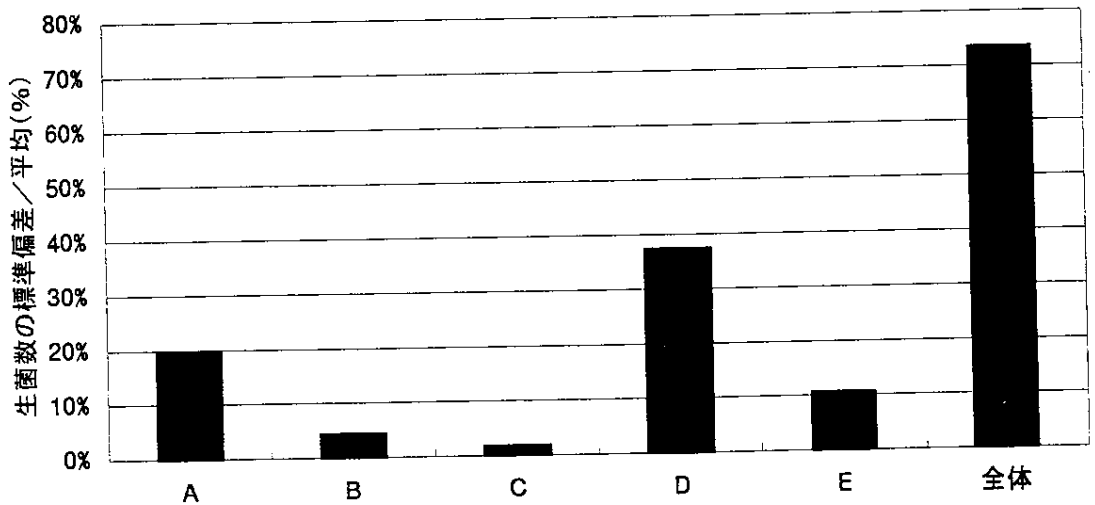


図15 抗菌剤添加量400ppmの標準偏差／平均生菌数(%)

2) 試験機関間のバラツキの要因

① 接種直後の生菌数

図16に接種直後の生菌数と抗菌剤添加量0ppmの培養後の生菌数の関係(共通菌株, 共通容器)を、図17に接種直後の生菌数と抗菌剤添加量400ppmの培養後の生菌数の関係(共通菌株, 共通容器)を示す。図16及び図17より、接種直後の生菌数は $1.4E+5 \sim 3.0E+5$ と各試験機関で大きく異なる。図16より、接種直後の生菌数と抗菌剤添加量0ppmの培養後の生菌数の間に相関($R^2 = 0.3867$)があることが確認された。また、図17より、

抗菌作用のある標準試験片である抗菌剤添加量400ppmの場合も、接種直後の生菌数と培養後の生菌数の間に弱い正の相関($R^2 = 0.0968$)が確認された。

結論として、培養後の生菌数は接種直後の生菌数の差異が影響することが確認された。接種直後の生菌数は極力狭い範囲でそろえることが望ましいと考えられる。

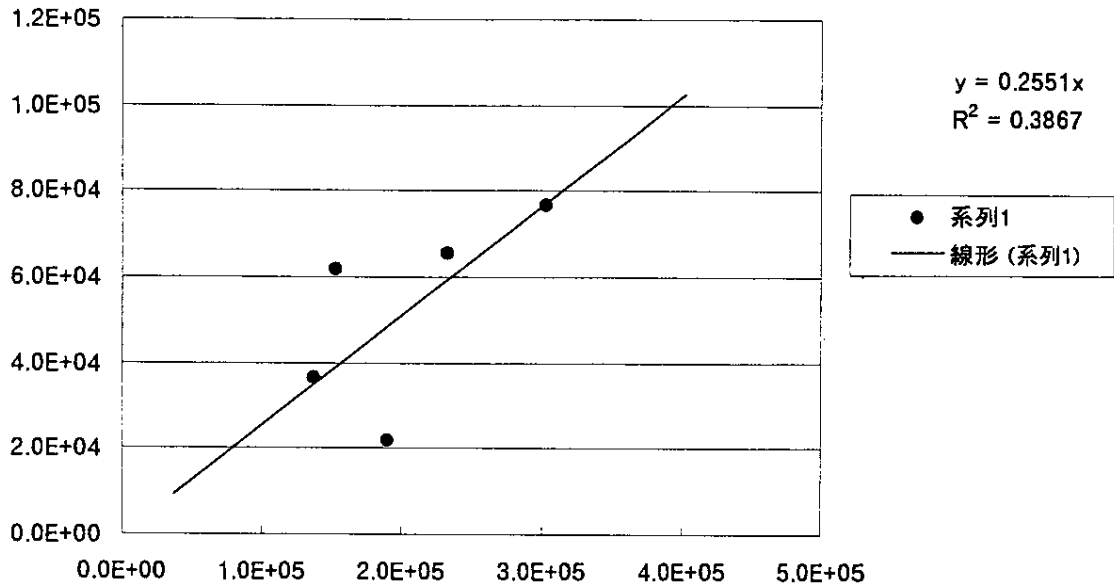


図16 接種直後の生菌数と抗菌剤0ppmの培養後の生菌数の関係
(共通菌株, 共通容器)

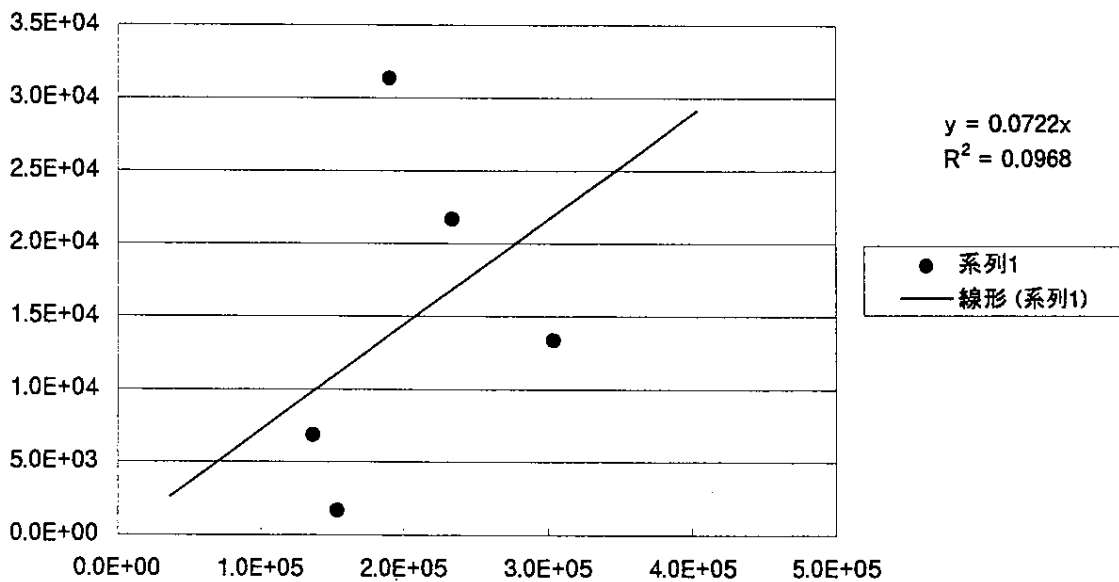


図17 接種直後の生菌数と抗菌剤400ppmの培養後の生菌数の関係
(共 通 菌 株 , 共 通 容 器)

②菌株の影響

図18に接種直後の生菌数と抗菌剤添加量0ppmの試験後の生菌数の関係(各試験機関で保有されている菌株, 共通容器)を示す。共通菌株でなく、各試験機関で保有されている菌株を用いた場合は、接種直後の生菌数と抗菌剤0ppmの培養後の生菌数の間に正の相関は確認されず、バラツキは大きい。これは試験菌の継代数、菌株を保存するスラント(普通寒天培地)の種類の違いなどで、試験菌の増殖能が異なるためと考えられる。

結論として、抗菌性試験結果に及ぼす菌種の差異の影響は極めて大きく、試験結果のバラツキを小さくするためには、菌株の条件(継代回数、培地の種類など)を揃えることは重要であると考えられる。

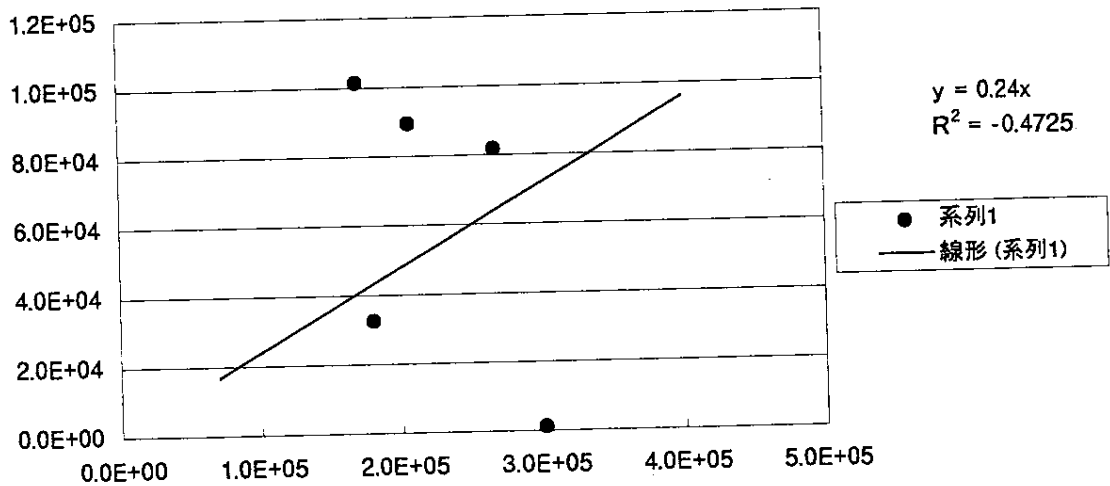


図18 接種直後の生菌数と抗菌剤0ppmの培養後の生菌数の関係(各試験機関保有株, 共通容器)

3)分散分析による試験結果の解析

今回の試験において、菌株2種類、培養容器2種類で評価された抗菌剤添加量400ppmの標準試験片の試験結果(抗菌活性値)を分散分析で解析した。その結果を表14に示す。

表14 抗菌剤添加量400ppmの標準試験片の試験結果の分散分析表

要因	平方和S	自由度φ	不偏分散V	分散比F	5%棄却	1%棄却	判定
試験機関(b)	17.66	4	4.41	405.13	2.61	3.83	**
菌株(a)	0.49	1	0.49	44.77	4.09	7.31	**
培養容器(c)	0.04	1	0.04	3.58	4.09	7.31	
a×b	1.27	4	0.32	29.25	2.61	3.83	**
a×c	0.04	1	0.04	3.40	4.09	7.31	
b×c	0.23	4	0.06	5.38	2.61	3.83	**
b×a×c	0.13	4	0.03	2.97	2.61	3.83	*
誤差	0.43	40	0.01				
合計	20.29	59					

* 斜線部分は統計的にデータを算出しない条件

表14より、今回の試験において、各試験条件が結果に与える影響は次の通りであると考えられる。

- ①分散比と棄却条件を比較すると、試験機関の違いと菌株の違いは試験結果に大きな影響を与える(試験機関、菌株とも1%棄却の条件を満たしている)。
- ②培養容器の違いが試験結果に与える影響は小さい(5%棄却の条件を満たさない)。
尚、試験機関、菌株、培養容器の相互作用については、試験機関の差が関与しているため、相互作用があるとは考えられない。

7. 総括(今後の課題)

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

初年度である平成13年度は、標準物質となる標準試験片を作製することができればトレーサビリティの確立が可能となること。そして文献調査の結果、酵素活性測定において本委員会のアプローチと類似の事例が見出され活動内容の妥当性について確認した。

しかし、現時点では細菌の分野で「トレーサビリティの確立」と「不確かさの推定」に関する既報は見つかっておらず、今回の委員会のテーマの先進性が窺い知れるところとなっている。

これまで、抗菌性試験方法(JIS Z 2801)における特性要因図(Fish Bone Diagram)を用い不確かさ成分の同定と解析を試み、その中で試験菌株・培地・培養容器の3項目を抽出した。

また、評価のための抗菌性試験を実施するにあたり、標準物質となりうるものを探索した結果、水溶性のコーティングによる試験片(東洋インキ製)を用い評価検討することとした。JISの中では詳細が明記されていない点などを全て手順書として明文化し、国内の5試験機関を選抜し試験を実施し基礎データの収集を行った。その結果、1試験機関においては菌株によらずはずれ値となり、本試験でおさえた要因以外がバラツキの発生原因となっている可能性が示唆された。一方他の試験機関においては機関内におけるデータにおいては安定な結果が得られることがわかった。今後は、試験機関間でのバラツキ原因の解明と標準試験片自体のバラツキをさらに押さえていく必要がある。

また一方で、黄色ブドウ球菌を用いた場合、24時間培養後の生菌数が接種直後の菌数よりも一桁近く減少していることから、少なくとも増加に転じるよう試験方法の条件変更、もしくは標準試験片の改良が必要であると考え。この点を改善しなければ、国際的に通じるものとはならないことが委員会の中でも指摘された。

今回使用した標準試験片は、水溶性であるコーティングであることを特徴とする使い捨てであること、抗菌剤を有機物と混合して塗布したものであり、ばらつきの要因として抗菌剤自体の変動、乾燥条件による有機物(ワニス)の状態の変動、塗布量の変動、抗菌剤濃度の変動、等々の変動因子が多い点などから二次標準物質として位置付けられる。

以上の本年度の検討結果をうけ、来年度は、

- 1) 抗菌性試験方法(JIS Z 2801)におけるばらつきの因子を明確にしなが、不確かさの見積もりに関する事例集となる、多面的な評価を実施していく。
- 2) 今年度検討できなかった一次標準物質作製法のアイデア出しを行い、その試作・作製に挑み、これを二次標準物質・SI単位へのトレーサビリティの確立を試みとともに、抗菌性に関する精度データの収集

を行う。

- 3) 認証標準物質を用いた不確かさに関する調査範囲を海外に拡げ、海外の環境条件の把握についてもあわせて調査を行なっていく。ことを予定している。

この委員会活動の成果が、JIS Z 2801のリファインとISO化への第一歩となり、細菌の分野で初となるトレーサビリティの確立と不確かさの推定方法についての国際的な提案になることを期待する。

以上

[添付資料1]

細菌を用いた評価法によるトレサビリテイの確立と不確かさの推定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	郵便	住所	TEL/FAX/E-mail address
委員長 ○	高麗 寛紀	徳島大学 工学部 生物工学科 教授	770-	徳島県徳島市南常三島町2-1	0886-56-7408 0886-55-7025
委員 ○	松岡 英明	東京農工大学 工学部 生命工学科 教授	184-001 2	東京都小金井市中町2-24-16	0423-88-7029 0423-87-1503
同上 ×	高津 章子	産総研 計測標準研究部門 無機分析科 環境標準研究室長	305-856 3	茨城県つくば市梅園1-1-1 1中央3-10	0298-61-6394 0298-61-6865 akiko-takatsu@aist.go.jp
同上 ○	今井 茂雄	(株) INAX 基礎研究所 バイオ研究室長	479-858 8	愛知県常滑市港町3-77	0569-43-4866 0569-43-4883 imai@i2.inax.co.jp
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	151-006 2	東京都渋谷区元代々木町52-1	03-3469-1914 03-3469-7009 sugimotos@jfrl.or.jp
同上 同上	ト部 勝資 上戸 亮	繊維製品新機能評価協議会 経済省 産業技術環境局 認証課 課長補佐	100-890 1	東京都千代田区霞ヶ関1-3-1	03-3501-9473 03-3580-8598 kamito-ryo@meti.go.jp
同上	別所 敏明	(独) 製品評価技術基盤機構 適合性評価センター 試験所認定課長	151-006 6	東京都渋谷区西原2-49-10	03-3481-1939 03-3481-1937 bessho-toshiaki@meti.go.jp

事務局	祖父江 良蔵	(独)製品評価基盤機構 適合性評価 技術センター 試験所認定課 主査	151-006 6	渋谷区西原2-49-10	03-3481-1939 03-3481-1937 sobue-ryouzo@meti.go.jp
オブザー バー 不要	井上 英武	抗菌製品技術協議会 専務理事	151-006 1	東京都渋谷区初台2-23- 5パシフィックパレス402 号	03-5365-2650 03-5365-2651 h-inoue@kohkin-siaa.co m
同上 不要	林 進	抗菌製品技術協議会 常任理事	151-006 1	東京都渋谷区初台2-23- 5パシフィックパレス402 号	同上

1. 分科会

	氏名	所属	〒	住所	TEL・FAX	
					1. に表記	同上
分科会長	今井 茂雄	1. に表記		1. に表記	同上	
専門委員	杉本 茂	同上		同上		
○	水上 義勝	カネボウ化成(株) 化成品営業グルー プ 専任部長	530-005 4	大阪市北区南森町1-4-1 9	6-6362-0855 y.mizukami@psc.kaneb o.co.jp	
○	藤田 恵二郎	(株)サンギ 研究開発部 中央研究所 副首席研究員	344-000 1	埼玉県春日部市不動院野27 45-1	048-752-0120 fujita@sangi.co.jp	
○	鴻巣 正幸	三愛石油 研究所 グループリーダー	311-243 4	茨城県潮来市島須3075- 11 中堀工業団地内	0299-80-3731 0299-80-3732 mkounosu@san-ai-oil.co jp	
○	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	173-866 6	東京都板橋区加賀1-12- 1	03-3962-6949 03-3962-2063 koji.ito@toyoink.co.jp	
○	高尾 研治	川崎製鉄(株) 技術研究所ステンレス 鋼研究部門 主任研究員(課長)	260-083 5	千葉県千葉市中央区川崎町1	043-262-2892 043-262-2031 takao@kawasaki-steel.c o.jp	

○	大橋 茂夫	石塚硝子(株) 研究所 部長	466-872 1	名古屋市昭和区高辻町1-1-15	052-871-3316 052-871-6106 otashi@ishizuka.co.jp
---	-------	----------------	--------------	------------------	---