

独立行政法人 製品評価技術基盤機構委託

**試験事業者認定事業関係業務に係る調査研究
(抗菌試験用コントロールサンプルの開発調査研究)
委託業務中間成果報告書(平成16年度分)**

平成 17 年 3 月

抗菌製品技術協議会

目 次

1. まえがき	1
2. 調査研究の目的	2
3. コントロールサンプル作製方法の調査、選定	3
3. 1 コントロールサンプルの品質目標	3
3. 2 生体高分子を用いた基材の調査	3
3. 3 樹脂、ガラス、及び金属系材料の調査	3
3. 4 検討課題の選定	5
4. 生体高分子を用いたコントロールサンプル作製の検討	6
4. 1 目的	6
4. 2 コレステロール結合タンパク質の改良と評価	6
4. 2. 1 <i>hlyA</i> 遺伝子導入プラスミドの作製	6
4. 2. 2 組み換えVCHの発現と精製	6
4. 2. 3 組み換えVCHの生物活性	7
4. 3 バイオ基板の作製法	7
4. 4 バイオ基板の抗菌性評価	8
4. 4. 1 Ag を抗菌剤としたバイオ基板	9
4. 4. 2 その他の抗菌剤を用いたバイオ基板	10
4. 5 バイオ基板構成成分の評価	10
4. 5. 1 PVDF膜上に存在するコレステロールの検出	10
4. 5. 2 PVDF膜上に存在する79-kDa pro-VCHの検出	10
4. 5. 3 ESCAによるPVDF膜の表面分析	11
4. 6 まとめ	13
4. 6. 1 コレステロール結合性タンパク質の無毒化と効率的大量分取法の確立	13
4. 6. 2 コレステロールと親和性のある基板の選択	13
4. 6. 3 コレステロール結合性タンパク質と結合性のある抗菌剤の探索ならびに作製したバイオ基板の抗菌評価	14
5. コントロールサンプルの作製検討（無機系抗菌剤練り込み樹脂プレート）	15
5. 1 目的	15
5. 2 試験用プレートの作製	15
5. 2. 1 使用した銀系無機抗菌剤	15
5. 2. 2 マスターバッチ作製	15
5. 2. 3 抗菌剤含有樹脂プレート作製	15
5. 3 サンドペーパーによる表面研磨の検討	16
5. 3. 1 銀リン酸ジルコニウム	16
5. 3. 2 銀ゼオライト	20
5. 4 バフ研磨による表面研磨の検討	22

5. 5	表面切削による表面研磨の検討	23
5. 6	サンドブラストによる表面研磨の検討	24
5. 7	研磨表面の解析	25
5. 8	まとめ	30
6	コントロールサンプルの作製検討 (ガラス系材料)	31
6. 1	目的	31
6. 2	ガラス系材料調査	31
6. 3	市販光学ガラスの検討	31
6. 3. 1	試験に用いた試料	31
6. 3. 2	試験	32
6. 3. 3	試験結果	32
6. 4	まとめ	34
7	調査研究のまとめ果 (中間)	35
8	今後の課題	36
8. 1	バイオ基板	36
8. 2	無機系抗菌剤練り込みプレート (表面研磨)	36

(添付資料)

1.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会名簿	37
2.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会ワーキンググループ名簿	38
3.	実施計画、研究体制	39
4.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会議事録	42
5.	抗菌試験用コントロールサンプル開発委員ワーキンググループ議事録	53
6.	調査研究の実施能力	63

1. まえがき

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

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

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

現在、我が国が提案している抗菌性試験方法における国際標準（ISO）化作業が順調に進んでおり、ISO制定後のコントロールサンプルのニーズは欧米圏を中心に大きくなるものと予想される。

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

第1回委員会が平成16年7月14日に開催され、本事業には高度な研究開発が伴うことから実務を強力に推進する組織としてワーキンググループ（WG）が設置された。平成16年度においては本委員会が4回、WGが3回開催され、それぞれ精力的な討議と調査研究開発がおこなわれ着実に目標に向かってステップをすすめられたことは、ひとえに委員長をはじめとして委員メンバー全員の世界に先駆けた開発テーマに対する純粹かつ崇高なチャレンジ精神の賜物であるといえる。

本報告書は、2年間の調査研究期間とする本委託事業の初年度である平成16年度の活動内容とその成果を中間報告としてまとめたものである。

2. 調査研究の目的

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

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

本調査研究においては以下の内容を 2 ヶ年間で実施する。

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

3. コントロールサンプル作製方法の調査、選定

3. 1 コントロールサンプルの品質目標

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

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

3. 2 生体高分子を用いた基材の調査

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

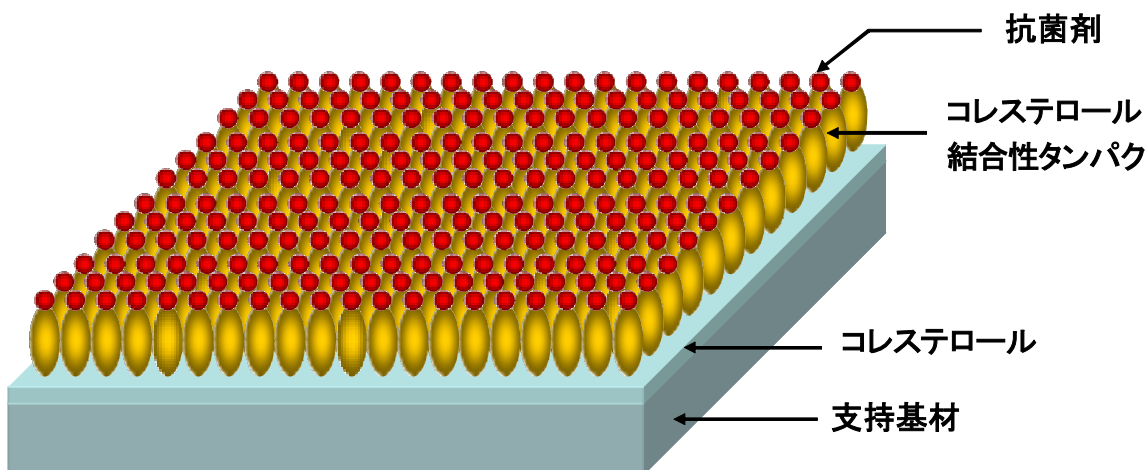


図1 生体高分子を用いた基材の概念図

3. 3 樹脂、ガラス、及び金属系材料の調査

コントロールサンプル開発委員会、及びワーキンググループにおいてアイデア出しを行ない、可能性があると判断したものについて調査を行なった。その結果を表1に示した。

表1 コントロールサンプル案とその調査結果

コントロールサンプル案	調査結果
樹脂練込みプレート (表面研磨)	<p>銀系無機抗菌剤を練り込んだ樹脂で抗菌活性値をほとんど示さない場合でも、サンドペーパー等で表面研磨すると抗菌性能が発現することが多々ある。これは、研磨により表面のスキン層を除去され、すなわち抗菌剤が頭出しされ、抗菌性能が発現すると考えられる。この特異なスキン層のために、成形品そのものでは抗菌活性値2程度に再現よく制御することはこれまでの経験上困難である。</p> <p>樹脂中には抗菌剤粒子はほぼ均一に存在することがわかっているため、スキン層を再現よく除去できれば安定した抗菌性能の発現が期待できる。</p>
市販光学ガラス	<p>市販光学ガラスは、重金属成分が配合されているものがあるため、抗菌活性値性能を示す可能性がある。これらガラスは、光学特性を制御するために、組成の制御が十分なされていると考えられる。</p> <p>抗菌活性値が2～3程度であれば、市販品を購入するだけでコントロールサンプルとすることも可能となる。</p>
板ガラス	<p>適正な組成を選択することにより、抗菌活性値2～3程度のものが得られる可能性はある。板ガラスは大量生産されているものであり、コントロールサンプル程度の少量生産には対応できないため、不適と判断した。</p>
釉薬(表面研磨)	<p>適正な組成を選択することにより、抗菌活性値2～3程度のものが得られる可能性はある。しかし厚さ方向でガラス成分が異なるため安定した抗菌活性値を出すのは困難と予想される。また工業的生産対応も困難のため不適と判断した。</p>
抗菌ステンレス	<p>市販品があるため、コントロールサンプルとしての適用可否を抗菌ステンレスメーカーに情報聴取した。その結果、抗菌活性値を十分コントロールした商品設計を行なっていないこと、またコントロールサンプルのための少量生産対応は困難であることから不適と判断した。</p>
抗菌アルマイト	<p>市販品があるため、コントロールサンプルとしての適用可否を抗菌アルマイトメーカーに情報聴取した。その結果、抗菌活性値を十分コントロールした商品設計を行なっていないこと、またコントロールサンプルのための少量生産対応は困難であることから不適と判断した。</p>
インクジェット方式	<p>インクジェットプリンターは、微量のインクを制御よく紙に吹き付け印刷する方法である。インクの代わりに抗菌性を有する液体、溶液、あるいは分散液を用いることにより、基板上に定量的に抗菌剤成分を乗せることができると考えられる。そこで、インクジェットプリンターメーカーに情報聴取した結果、現実的な対応は不可であることから、不適と判断した。</p>
銀担持アクリル	<p>アクリル繊維に銀を担持させた市販品がある。そこで、メーカーに情報聴取した結果、アクリル繊維に銀イオンを担持しているためフィルム化できないこと、及び抗菌活性値を十分コントロールした商品設計を行なっていないことから不適と判断した。</p>

表1 (つづき)

コントロールサンプル案	調査結果
亜鉛メッキ、亜鉛板	亜鉛も銀よりは低いものの、抗菌活性を有しているため、亜鉛メッキ板、もしくは亜鉛板がコントロールサンプルとして使用できる可能性がある。しかし表面が酸化されてしまったら抗菌効果がほとんど消失するため、酸化されない状態を維持する必要があるが、コントロールサンプル作製時、保管時、試験時を通じて酸化を簿防止することは現実的には困難であるため不適と判断した。

3. 4 検討課題の選定

以上の調査、下記について具体的検討を実施することとした。

表2 検討すべきコントロールサンプル

分類	検討課題
バイオ基板	①プロテインアンカーを用いたナノ分子の基板固定化技術の検討
バイオ基板以外	②光学ガラスのコントロールサンプルへの適用可否検討
	③銀系無機抗菌剤練り込み樹脂（表面研磨）の検討

4. 生体分子を用いたコントロールサンプル作製の検討

4. 1 目的

平成 16 年度は、実験室レベルにある生体分子を用いたコントロールサンプル（以下バイオ基板）研究を、量産可能な実用的レベルのバイオ基板にするために、以下の 3 点に焦点を絞って研究を行った。

- (1) コレステロール結合性タンパク質を無毒性で効率的に大量分取できるものへ改良する。
- (2) コレステロールと親和性ないし結合性のある基板の選択を行う。
- (3) コレステロール結合性タンパク質と結合性のある抗菌剤を探索し、その物質を結合させたバイオ基板を作製して抗菌性を評価する。

4. 2 コレステロール結合タンパク質の改良と評価

ここでは、コレステロール結合タンパク質、すなわちコレラ菌が産生するコレラ菌溶血毒（以下 VCH という）を、無毒性のコレステロール結合タンパク質に改良し、さらに簡便かつ大量発現・分取できる方法を確立することを目的に大腸菌を用いた遺伝子組み換え実験を行った。

4. 2. 1 *hlyA* 遺伝子導入プラスミドの作製

V. cholerae O1 N86 株からゲノム DNA を分離し、設計した 4 種類のプライマー、VCH-FLF、(TTT TGG ATC CCA TAT GCC AAA ACT CAA TCG TTG C)、VCH-MF (TTT TGG ATC CCA TAT GAA TAT CAA TGA ACC AAG TGG TG)、VCH-SF (TTT TGG ATC CCA TAT GAA CAG CGAAAC AA)、VCH-R3 (TTT TTT GTC GAC CGT TCAAAT CAAATT GAC) を組み合わせ、PCR により 79.5-kDa pro-VCH, 27-kDa pro-classical biotype VCH, 24-kDa pro-VCH fragment, 17-kDa pro をコードする 6 種類の *hlyA* フラグメントを大量に増幅させた。これらの *hlyA* フラグメントを制限酵素である *Nde* と *Xho* で消化し、DNA リガーゼを用いてベクター DNA (pET-15b, ヒスチジンタグを組み換えタンパク質のアミノ末端に挿入するようにつくられたベクター) と結合後、それぞれ非発現宿主菌である大腸菌 *JM109* 株コンピテント細胞に導入し、形質転換させた。アンピシリン耐性大腸菌 *JM109* 株のコロニーをランダムに複数個選択し、アルカリ法でプラスミド DNA の抽出を行った。得られたプラスミドを制限酵素 *Nde* I と *Xho* I で消化し、アガロース電気泳動を行った。その結果、組み換えプラスミドは設計した各プラスミドの長さとも一致したので、目的のプラスミドであると考えられた。

4. 2. 2 組み換え VCH の発現と精製

組み換え VCH を大量発現させるために、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ発現系宿主（大腸菌 *Rosetta.DE3* 株）へ形質転換を行う必要がある。そこで、大腸菌 *JM109* 株を用いて 4. 2. 1 で述べたプラスミドをそれぞれ *Rosetta.DE3* 株に形質転換し、大量培養した。各 *Rosetta.DE3* 株を超音波処理し、組み換え VCH タンパク質に融合させたヒスチジンタグと親和性の高いコバルトビーズを用いて、菌体内から組み換え VCH タンパク質を精製した。

精製画分を SDS-PAGE したところ、それぞれの画分に約 79kDa、約 27kDa、約 24kDa、約

17kDa の分子量を持つ単一のタンパク質バンドが出現した。設計した 79.5-kDa pro-VCH, 27-kDa pro-classical biotype VCH, 24-kDa pro-VCH fragment, 17-kDa pro の組み換え VCH の分子の質量は、それぞれ 79.5kDa, 27kDa, 24kDa, 17kDa であるので、期待されたとおりの分子の質量を持つタンパク質が発現していることが確認された。

精製したタンパク質が VCH であることを確認するために免疫ブロットを行ったところ、ウサギ抗 VCH 抗体またはウサギ抗ヒスチジntag抗体と組み換え VCH タンパク質は結合した。したがって、これらの組み換え VCH タンパク質はすべて VCH ないし truncated VCH と考えられた。表1には各組み換え VCH の収量を示した。

表1 大腸菌を 1,000mL培養した時の各組み換え VCH の収量

組み換え VCH	Yields (mg / 1,000mL)
79.5-kDa pro-VCH	5.0
27-kDa pro-classical biotype VCH	4.0
24-kDa pro-VCH fragment	6.0
17-kDa pro	6.0

4. 2. 3 組み換え VCH の生物活性

ここでは VCH の生物活性として、溶血活性と本研究のキーとなるコレステロール結合活性を調べた。はじめに、溶血活性を測定した。82.5-kDa pre-pro-VCH, 79.5-kDa pro-VCH, 27-kDa pro-classical biotype VCH, 24-kDa pro-VCH fragment, 17-kDa pro の組み換え VCH は、コレラ菌から精製した VCH とアミノ酸配列が同一であるにもかかわらず溶血活性を示さなかった。次に、各組み換え VCH のコレステロール結合活性を測定した。コレラ菌由来の 65-kDa pro-VCH のコレステロール結合活性を 100%とした時、組み換え VCH のコレステロール結合活性はそれぞれ 79.5-kDa pro-VCH が 112%, 27-kDa pro-classical biotype VCH が 31%, 24-kDa pro-VCH fragment が 24%, 17-kDa pro が 20%であった。

4. 3 バイオ基板の作製法

図1にバイオ基板の模式図を示した。このバイオ基板の構成成分は、基板の土台となる多孔性 polyvinylidene fluoride (PVDF) 膜 (日本ミリポア(株)製)、コレステロール (和光純薬工業(株)製、試薬特級)、79-kDa pro-VCH、Ag⁺溶液 (pH7.0) である。Ag⁺溶液は、(株)INAXより供与された電気分解装置を用いて作製した。溶液の Ag⁺濃度は、16V の定電圧で 60 秒通電した時、5mg/l の濃度であった。

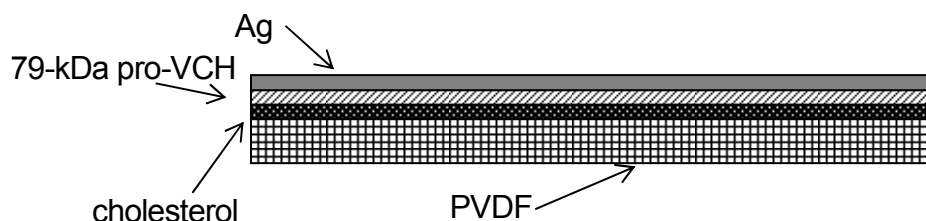


図1 バイオ基板の模式図

バイオ基板は次のように作製した。

5 x 5cm 角に切り出した PVDF 膜を所定濃度のコレステロールクロロホルム溶液に 10~20 秒間浸し、風乾した。さらにクロロホルムを完全に除去するために、デシケーター内に PVDF 膜を入れて真空ポンプで減圧乾燥を行った。コレステロール-PVDF 膜を 10mM リン酸-150mM NaCl 緩衝液, pH7.2 で 5 分間, 3 回洗浄した。所定濃度に調整された 10ml の 79-kDa pro-VCH (10mM リン酸-150mM NaCl 緩衝液, pH7.2 に溶解) 溶液にコレステロール-PVDF 膜を浸し, 25°C で 12 時間浸とう放置して PVDF 膜に吸着しているコレステロールに 79-kDa pro-VCH を結合させた。コレステロール-79-kDa pro-VCH-PVDF 膜を 10mM リン酸-150mM NaCl 緩衝液, pH7.2 で 5 分間, 3 回洗浄した。所定濃度に調整された 10ml の Ag⁺溶液にコレステロール-79-kDa pro-VCH-PVDF 膜を浸し, 25°C で 12 時間浸とう放置してコレステロールに結合している 79-kDa pro-VCH に Ag⁺を結合させた。さらに 100ml の超純水で 5 分間, 3 回洗浄した。プラスチックペトリシャーレの中に置いたコレステロール-79-kDa pro-VCH-Ag-PVDF 膜をデシケーター内に入れ, 真空ポンプで 60 分間減圧乾燥させたものをバイオ基板として使用した。容器, 緩衝液, 超純水はすべて滅菌したものを用いた。

4. 4 バイオ基板の抗菌性評価

10ml の普通ブイヨン (栄研化学株製) で 18 時間, 35°C で培養した大腸菌 ATCC25932 株を生理食塩水で 10³ 個 / ml になるように希釈した菌液を抗菌性評価に用いた。プラスチックペトリシャーレの中に置いたバイオ基板上に 0.4ml の希釈菌液を載せ, その上にポリエチレンフィルム (4 x 4cm) で覆った後, シャーレの蓋をした。適当な蓋つきプラスチック容器の中に, 水を入れたビーカーと共にバイオ基板が入ったプラスチックペトリシャーレを置き, 24±1 時間, 35°C で放置した。バイオ基板から 0.02% の Tween80 を含む生理食塩水をピペッティングすることによって大腸菌を洗い出し, 普通寒天培地に指示された倍率で希釈した洗い出し菌液を 0.1mL ずつ接種・塗抹後, 18 時間, 35°C で培養した。形成されたコロニーを計数し, 抗菌性を評価した。なお, PVDF 膜上に存在する細菌数は, シャーレ内に菌液を入れ, さらにフィルムで覆って 24 時間後に回収した菌数とほぼ同じであった。したがって, PVDF 膜で作製したバイオ基板には大腸菌は非特異的に結合しないと考えられた。

作製したバイオ基板の抗菌評価において問題となった点は, (1) PVDF 膜が多孔性であること, (2) PVDF 膜単独, ならびにコレステロールを吸着させた PVDF 膜にそれぞれ Ag⁺溶液を浸した基板でも抗菌性が強く現れたことであった。(1)については今年度十分に検討できなかったもので, 引き続き検討を行うものとした。(2)に関しては, Ag⁺が非特異的に PVDF 膜に結合することおよびコレステロールに Ag 結合性の物質が含まれている可能性が考えられた。そこで現在使用中のものとは異なるコレステロールを用いて抗菌性を評価した。コレステロールは, 和光純薬工業株製 (2 種類), シグマアルドリッチ社製 (2 種類), MPB 社製 (2 種類) の 6 種について検討した。いずれのコレステロールを用いてもコレステロールを吸着させた PVDF 膜に Ag⁺溶液を浸しただけで, 抗菌活性値が約 4 前後と高い値を示した。使用した銀溶液を目視すると, 銀イオンだけでなく, 黒色の浮遊物と沈殿が相当数観察された。おそらく, この黒色の物質は銀粒子と思われた。これが PVDF 膜に非特異的に吸着し, 抗菌作用を示していた可能性が高い

と考えられた。そこで、以後電気分解を行う電流値を下げて Ag^+ 溶液を作製し、さらにこの溶液を孔径 $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過滅菌し、超純水で希釈して使用した。

4. 4. 1 Ag を抗菌剤としたバイオ基板

実験条件は、 100nM コレステロール (10ml), 500nM 79-kDa pro-VCH (10ml) をそれぞれ PVDF 膜 ($5 \times 5\text{cm}$) に浸して段階的に結合させた後、 Ag^+ 溶液 (350mA , 2 分間の電気分解によって得られた Ag^+ 溶液を孔径 $5\ \mu\text{m}$ と $0.2\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過したもの滅菌水で 5 倍希釈した) の中に基板を浸した。

図 2 に Ag を抗菌剤として用いたバイオ基板の抗菌作用の結果を示した。A が 24 時間後のコントロールの大腸菌の菌数である。PVDF 膜の表面を実体顕微鏡で観察すると、表と裏で構造の違いが見られた。そこで、凹凸の少ない面を smooth 面、一方凹凸が多い面を rough 面と名付けて、それぞれの面を用いたバイオ基板を作製した(倍率 1,000 倍の実体顕微鏡で PVDF 膜表面を観察し、凹凸の少ないものを smooth, 凹凸の多いものを rough とした)。 Ag^+ を基板に作用させない場合、PVDF 単独, コレステロール-PVDF, およびコレステロール-79-kDa pro-VCH-PVDF 上から回収された大腸菌の菌数は $7 \times 10^5 / \text{ml}$ であったが、 Ag^+ を基板に作用させた場合、回収された大腸菌の菌数は $8.5 \times 10^2 / \text{mL}$ であった。Smooth 面と rough 面で作製した各基板から回収された菌数を測定したところ、ほぼ同じであった。これらの結果から、抗菌活性値は、smooth 面で 2.9, rough 面で 2.8 であることが分かった。

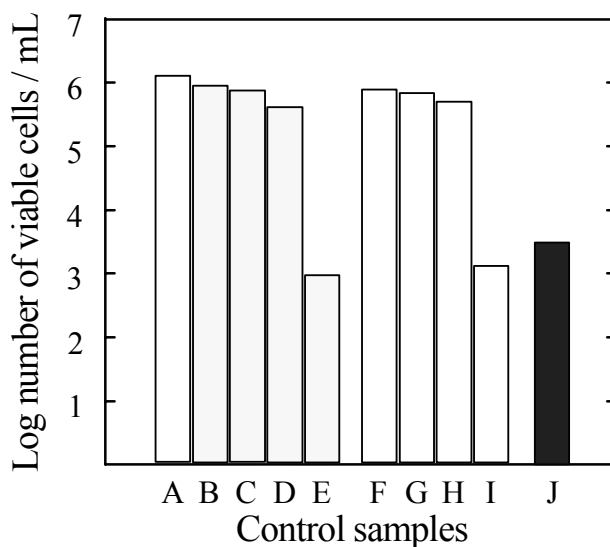


図 2 Ag を抗菌剤として用いたバイオ基板の抗菌作用

- A, プラスチックペトリシャーレ B, PVDF(smooth) alone
 C, PVDF(smooth) + Ag D, PVDF (smooth) + cholesterol + Ag
 E, PVDF (smooth) + cholesterol + 79-kDa pro-VCH + Ag
 F, PVDF (rough) alone G, PVDF (rough) + Ag
 H, PVDF (rough) + cholesterol + Ag
 I, PVDF (rough) + cholesterol + 79-kDa pro-VCH + Ag
 J, PVDF + 単分子膜 cholesterol + pro-VCH + Ag 。smooth と rough

水面上でコレステロール単分子膜を形成させ、コレステロールの 26 位と 27 位の CH₃ 基の方を PVDF 膜に接するように吸着させ、コレステロール単分子膜吸着 PVDF 膜を作った。この PVDF 膜に 79-kDa pro-VCH と Ag⁺ を結合させたバイオ基板の抗菌活性値を求めたところ、2.4 であった (図 2, J)。3 つのバイオ基板は Ag を結合させると、2 から 3 の抗菌活性値を示すことが分かった。これらの結果から、ほぼ目標の 2 ~ 3 の抗菌活性値を持つバイオ基板が作製できたことが明らかとなった。

4. 4. 2 その他の抗菌剤を用いたバイオ基板

バイオ基板に結合させる抗菌剤としてコバルトイオン、銅イオン、亜鉛イオン、ニッケルイオンが使用できるかどうか検討した。これらの金属イオンを選択した理由は、ヒスチジンタグが 79-kDa pro-VCH のアミノ末端に 6 個結合し、上記の 4 つの金属イオンは抗菌性があり、かつヒスチジンに選択的に結合しやすい遷移金属だからである。ヒスチジンにこれらの金属イオンを結合させるには、溶液の pH が中性領域であることが必要条件である。したがって、塩化コバルト、硫酸銅、塩化カリウム銅 (II)、塩化アンモニウム銅 (II)、塩化銅 (II)、塩化亜鉛溶液は pH が強酸性であったため、使用することはできなかった。一方、塩化ニッケル溶液の pH は 6.7 であったので、コレステロール-79-kDa pro-VCH-PVDF 基板を塩化ニッケル溶液に浸してニッケル結合バイオ基板を作製し、その抗菌性を評価した。

正に荷電するニッケルイオンが基板へ非特異的結合することを避けるために正に帯電処理した nylon66 を用いて抗菌活性を調べたところ、約 2 の抗菌活性値が得られた。しかしながら、菌を浮遊させるために用いた緩衝液 2-Morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate (MES) は S を組成として含むので、ニッケルイオンと反応して難溶性 NiS を形成し、PVDF 膜に沈着していることが考えられた。したがって、NiS によってバイオ基板の抗菌活性が増強している可能性があることを考慮しておく必要がある。

4. 5 バイオ基板構成成分の評価

4. 5. 1 PVDF 膜上に存在するコレステロールの検出

ウサギ抗コレステロール抗体を用いて PVDF 膜上に存在するコレステロールの検出と定量を行った (図 3)。この方法による検出限界は 1mM 程度であるため、100nM のコレステロール溶液を浸した PVDF 上にコレステロールが存在しているかどうか分からなかった。しかしながら、基質 *N,N'*-Bis (2-hydroxy-3-sulfopropyl) tolidine-2Na (SAT-3) の発色が膜表面全体に観察できたので、PVDF 膜上にコレステロールは存在すると思われた。

4. 5. 2 PVDF 膜上に存在する 79-kDa pro-VCH の検出

ウサギ抗 VCH 抗体を用いて PVDF 膜上に存在する 79-kDa pro-VCH を測定した。79-kDa pro-VCH はコレステロールの濃度に依存して SAT-3 の吸収が増加していくことが分かった (図 3)。縦軸の SAT-3 は二次抗体であるヤギ抗ウサギ IgG 抗体に結合したペルオキシダーゼによって発色した SAT-3 の吸収量を示す。この値はコレステロールの量に依存して吸収量が上昇する。

したがって、吸収の値が高いほど PVDF 膜上に存在するコレステロール量は多いと判定できる。

一方、79-kDa pro-VCH は、コレステロールが PVDF 膜に存在しないと、PVDF 膜上に結合しないことが分かった(図 4 の記号○)。

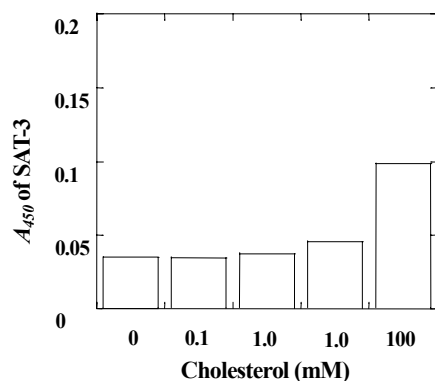


図 3 PVDF 膜上に存在するコレステロール

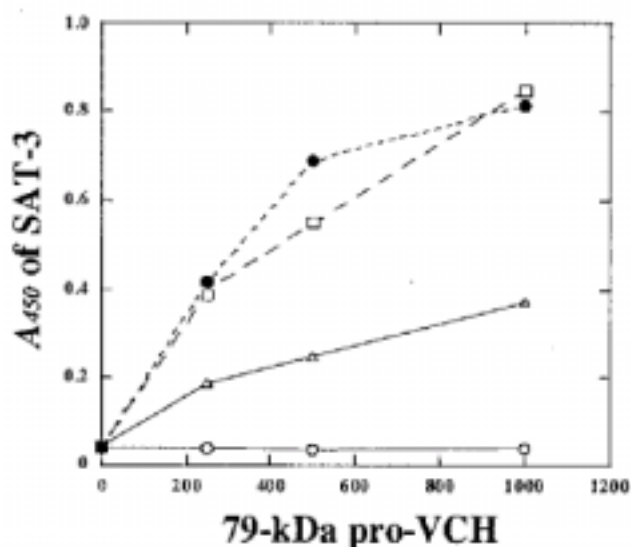


図 4 PVDF 膜上に存在する 79-kDa pro-VCH

記号：○, コレステロールなし；△, 1mM コレステロール；□, 10mM コレステロール；●, 100mM コレステロール

4. 5. 3 ESCA による PVDF 膜の表面分析

ESCA を用いて PVDF 膜表面の元素分析を行った。この分析の目的は、Ag の存在を確認することであるが、同時にコレステロールやタンパク質に由来する元素の確認ができることが期待される。

測定結果を図 5 に示したが、ここでスペクトル強度は、F1s 強度を 1 として規格化したものである。A は、PVDF smooth 面にコレステロール、79-kDa VCH、Ag を結合させたもの、B は、PVDF rough 面にコレステロール、79-kDa VCH、Ag を結合させたもの、C は PVDF smooth

面にコレステロール単分子膜をコレステロールのA環を上にして結合させ、さらにその上にコレステロール、79-kDa VCH, Ag を結合させたものである。尚、この分析は、宇都宮大学工学部飯村助教授に依頼して行なったものである。

AgのメインピークであるAg3d_{5/2}と3d_{3/2}は、それぞれ368eVと374eVに出現するはずであるが、今回の測定においては、これら2つのエネルギーピークを確認できなかった(図5A, B, C)。図2の抗菌活性の結果から推測すると、AgはPVDF膜上に存在している可能性が高い。また、ESCAを用いた表面分析によって検出できる元素は基板表面から約10nmの深さまでと言われているので、Agが10nmよりさらに深部あるいはPVDF孔の内側に存在していれば測定は不可能であると考えられる。今後、フラットなPVDF基板を使って測定をすることになっている。

一方、図5Aの4, Bの8, Cの9の各スペクトルから炭素, 窒素, 酸素が検出された。3つのスペクトルが検出されたバイオ基板は、79-kDa pro-VCHを結合させたものである。炭素と酸素はコレステロールの構成元素でもあるが、もしこれらの2つ元素がコレステロール由来であるならば、図5Aの3, Bの7でもC1sとO1sのスペクトルが観察されるはずである。したがって、炭素, 窒素, 酸素の存在を示すスペクトルはタンパク質由来のものと考えられる。また、PVDF表面がsmoothであってもroughであっても元素分析の結果は同一であった。この結果は、smooth面とrough面で作製したバイオ基板に存在する構成分子が同一であり、これによって抗菌活性に差がみられなかったのではないかと考えられる。しかしながら、バイオ基板を作製する際、smooth面あるいはrough面の一方に限定すべきである。経験上rough面の方が構造上一過性に水分を保持する性質があるので、タンパク質やAg溶液がPVDF膜と接触する時間が長くなる可能性がある。バイオ基板の品質管理の面から考えると、確実にタンパク質とAgをPVDF膜に結合させなければならないので、rough面への抗菌成分の構築が最適と考えられる。

図5Cのスペクトル10は、酸素, 窒素, 炭素のピークが観測されなかったため、79-kDa pro-VCHはPVDF膜に非特異的に吸着しないことを示している。これは、コレステロール非存在下において79-kDa pro-VCHはPVDF膜に結合しないことを示した4. 5. 2の図4のコレステロール非存在下(記号○)の結果を支持するものである。また、基板の各構成成分の三次元的な位置関係を考えると、コレステロールとAgは79-kDa pro-VCHよりも下層に位置している可能性があることが予想された。

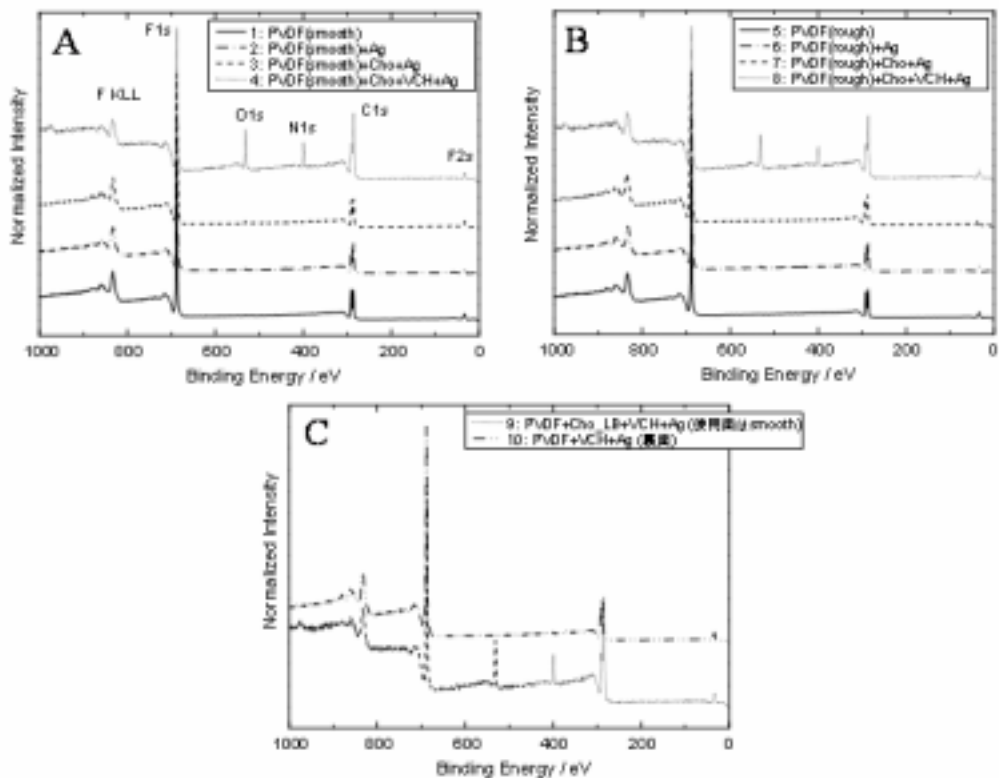


図5 ESCAによるバイオ基板の表面分析

4. 6 まとめ

4. 6. 1 コレステロール結合性タンパク質の無毒化と効率的な大量分取法の確立

組み換え体作製の目的である毒性のない組み換え VCH が得られた。さらに、収量が多く、コレステロール結合活性がコントロールであるコレラ菌由来 VCH とほぼ同一であった 79-kDa pro-VCH がバイオ基板の構成成分として最も適していると考えられた。

4. 6. 2 コレステロールと親和性のある基板の選択

コレステロールが PVDF 膜を含めさまざまな物質とイオン結合 (コレステロールへ塩を付加する) や共有結合 (コレステロールへ SH 基を導入) のような化学的結合法が可能であるかどうか調査したが、化学的に反応性の乏しい物質であるため、現状では化学的結合は難しいことが分かった。したがって、現在のところコレステロールと基盤の結合は、疎水性の PVDF 膜を用いた物理的な吸着以外の方法はないと考えられる。しかしながら、PVDF 膜上に一定量のコレステロールを留まらせる役割を PVDF 膜の孔が担っている可能性があり、今後詳細な研究を行う予定である。

4. 6. 3 コレステロール結合性タンパク質と結合性のある抗菌剤の探索ならびに作製したバイオ基板の抗菌評価

79-kDa pro-VCH と結合させることができる抗菌剤として Ag が最適であることが分かった。また、Ni も抗菌剤として使用できることが分かった。なお、バイオ基板の作成中に問題となった点は、79-kDa pro-VCH に Ag を結合させる際に、Ag⁺溶液中に混在した粒子状の Ag が PVDF 膜に非特異的に結合して抗菌作用を示したことである。今後の研究課題として、粒子状の Ag を生じさせない Ag⁺溶液の作製がある。

また、バイオ基板を構成する成分であるコレステロールと 79-kDa pro-VCH は PVDF 膜上に存在することが確認された。Ag は PVDF 膜上において検出されなかったが、作製した基板の抗菌活性値のデータは Ag が PVDF 膜上に存在することを示している。

最後に、平成 16 年度に行った研究から、提案した原理どおりに PVDF 膜上にコレステロール、コレステロール結合タンパク質、Ag が順に結合してバイオ基板が構築されていること、およびこのバイオ基板は目標の抗菌活性値を持つことが確認された。

5. コントロールサンプルの作製検討(無機系抗菌剤練り込み樹脂プレート)

5. 1 目的

無機系抗菌剤を樹脂に練り込んだ場合、表面層は特異な状態であるため、抗菌性能は、様々な条件に左右される。

抗菌剤粒子を均一に練り込むために、プレート作製時に直接抗菌剤を添加することはせずに、あらかじめマスターバッチ(以下、M/B)を作製することとした。そのM/Bは、マスターバッチメーカーに依頼し、実機で作製した。

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

当面はサンドペーパーによる表面研磨を行ない、適正添加量レベルを見出すこと、及びサンドペーパーに代わる工業的研磨技術を確立することを本章の目的とした。

5. 2 試験用プレートの作製

5. 2. 1 使用した銀系無機抗菌剤

下記の2種を選定した。

表1 使用した銀系無機抗菌剤の代表品質

抗菌剤	グレード	銀含有率 (%)	亜鉛含有率 (%)	平均粒径 (μm)
銀担持 リン酸ジルコニウム	ハロン AG300 (東亜合成(株)製)	3.8	—	0.9
銀担持 ゼオライト	バクテキラー BM-502FC (富士ケミカル(株)製)	0.14	13.85	5.9
	バクテキラー BM-102EC (富士ケミカル(株)製)	1.13	18.82	2.1

5. 2. 2 マスターバッチ作製

下記組成でマスターバッチを作製した(作製：(株)ヘキサケミカル)。

表2 マスターバッチ組成

M/B名	使用抗菌剤	LDPE (%)	分散剤 (%)	抗菌剤 (%)
HEM-0E712	AG300	87.0	3.0	10.0
HEM-0E708	BM-502FC	87.0	3.0	10.0
HEM-0E709	BM-102EC	87.0	3.0	10.0

5. 2. 3 抗菌剤含有樹脂プレート作製

下記条件で抗菌剤含有樹脂プレートを作製した。

(1) 銀リン酸ジルコニウム

- ・希釈樹脂：LDPE、及びPP樹脂

- ・成形方法：インジェクション成形
- ・金型：100×100mm×2mm
- ・M/B含有量：1～3%(抗菌剤として0.1～0.3%)

(2) 銀ゼオライト

- ・樹脂：LDPE、及びPP樹脂
- ・成形方法：インジェクション成形
- ・金型：100×100mm×2mm
- ・M/B含有量：5及び5.0%(抗菌剤として0.5及び5%)

5. 3 サンドペーパーによる表面研磨の検討

表面研磨条件を下記のように設定した。

①研磨-1：#1000 サンドペーパーにて縦、横各10回

②研磨-2：#1000 サンドペーパーにて縦、横各20回

研磨品の抗菌性能を JIS Z 2801 に従って実施した。

5. 3. 1 銀リン酸ジルコニウム

表3 抗菌力評価結果(大腸菌、研磨1)

試験 サンプル	E-N1		E-N2		E-N3		E-N4	
	A-a		A-b		B-a		B-b	
	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値
PE	初発	5.2		5.2		5.2		5.2
	対照	7.2	—	7.2	—	7.3	—	7.3
	0%(未処理)			7.3	-0.1			7.3
	0%(研磨-1)	7.3	-0.1			7.2	0.1	
PP	0.1%(研磨-1)	3.0	4.2	2.2	5.0	2.0	5.3	3.1
	0%(未処理)			7.3	-0.1			7.3
	0%(研磨-1)	6.0	1.2			5.8	1.5	
	0.1%(研磨-1)	2.3	4.9	2.6	4.6	2.0	5.3	1.5
								5.8

表4 抗菌力評価(黄色ブドウ球菌、研磨1)

試験n サンプル	S-N1		S-N2		S-N3		S-N4	
	C-a		C-b		D-a		D-b	
	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値
PE	初発	5.4		5.4		5.3		5.4
	対照	5.4	—	5.4	—	5.5	—	5.4
	0%(未処理)			5.1	0.3			5.1
	0%(研磨-1)	5.1	0.3			5.1	0.4	
PP	0.3%(研磨-1)	3.7	1.7	3.6	1.8	3.6	1.9	3.5
	0%(未処理)			5.2	0.2			5.1
	0%(研磨-1)	5.2	0.2			5.1	0.4	
	0.3%(研磨-1)	2.1	3.3	1.8	3.6	2.3	3.2	2.1
								3.3

表5 抗菌力評価(黄色ブドウ球菌、研磨2)

試験n	S-N5		S-N6		S-N7		S-N8	
サンプル	C-c		C-d		D-c		D-d	
	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値	生菌数(Log)	抗菌活性値
初発	5.3		5.4		5.2		5.3	
	5.2		5.2		5.2		5.3	
PE	0% (未処理)		5.0	0.2			5.1	0.2
	0% (研磨-2)	4.9	0.3		5.0	0.2		
	0.3%(研磨-2)	3.0	2.2	2.7	2.5	2.4	2.8	2.9
PP	0% (未処理)		5.1	0.1			5.1	0.2
	0% (研磨-2)	5.1	0.1		5.0	0.2		
	0.3%(研磨-2)	1.6	3.6	2.3	2.9	1.3	3.9	2.0

サンプル A・B・C・D は、成形ショット別

a・b・c・d は、一枚の成形品を4分割

a	b
c	d

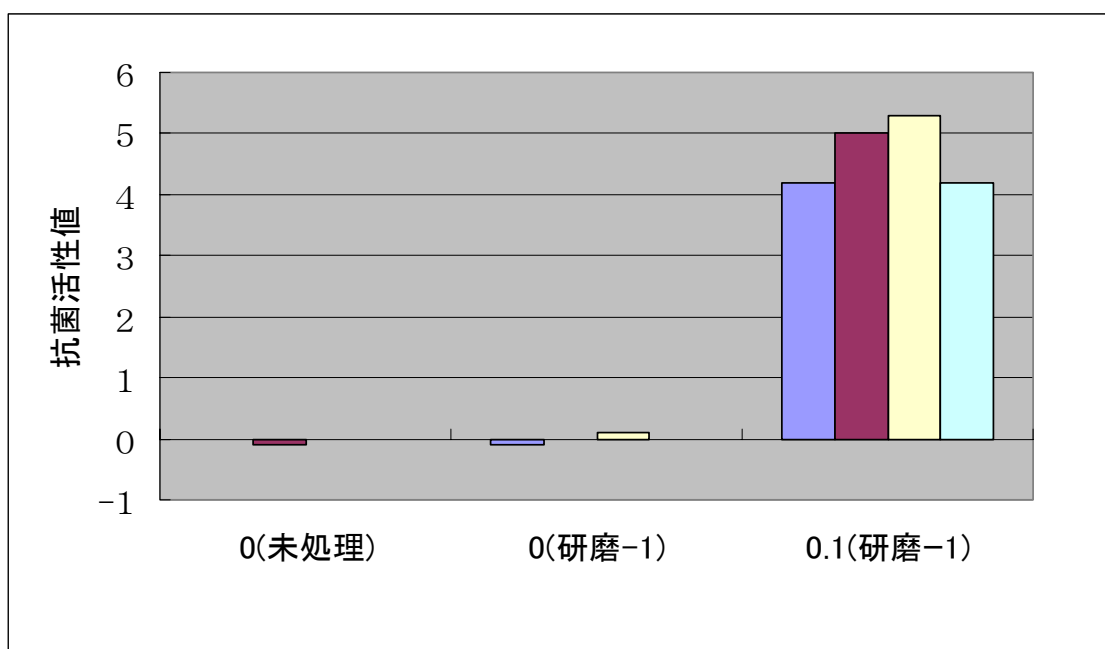


図1 抗菌力評価結果(LDPE、大腸菌)

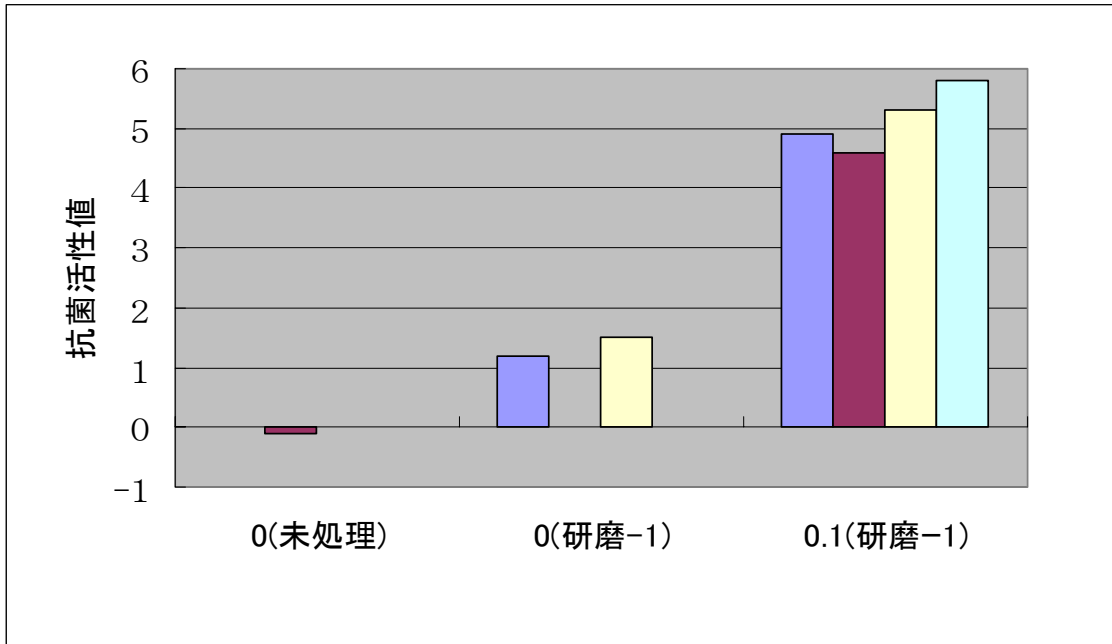


图2 抗菌力評価(PP、大腸菌)

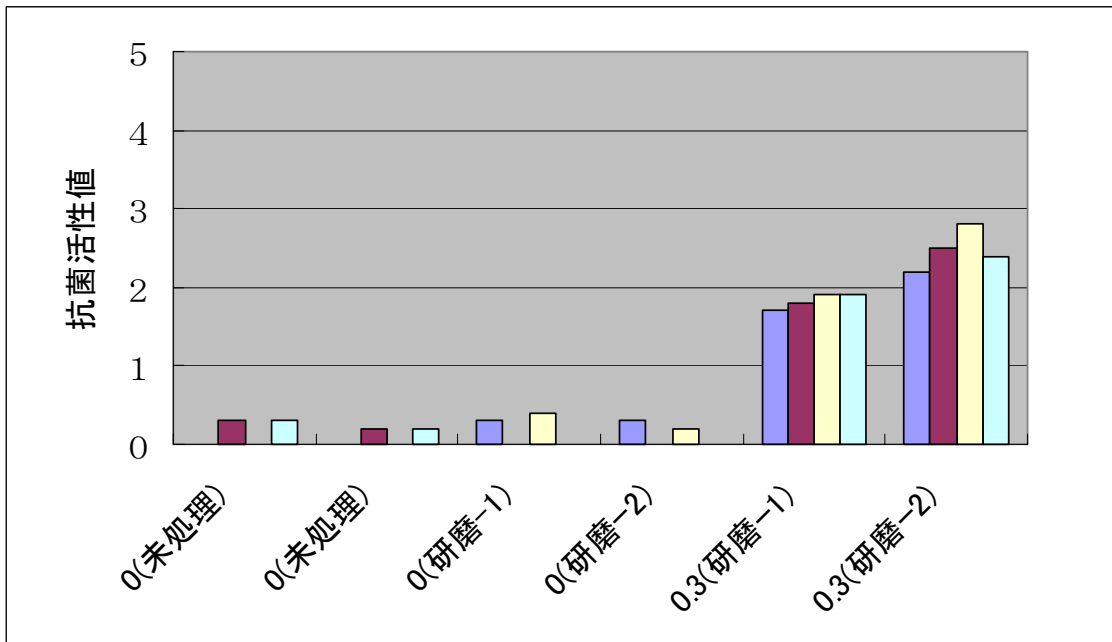


图3 抗菌力評価(LDPE、黄色ブドウ球菌)

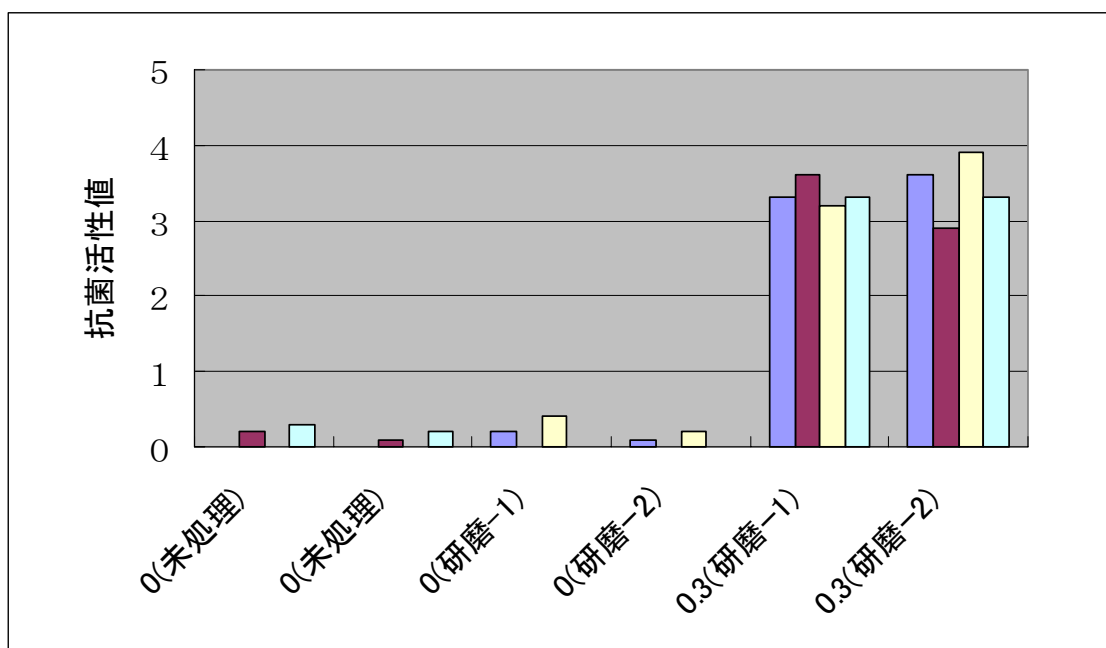


図4 抗菌力評価(PP、黄色ブドウ球菌)

以上の結果をまとめると下表のようになる。n=4の結果ではあるが、抗菌活性値2～3程度のコントロールサンプルが得られる可能性が見出された。大腸菌に対しては、適正添加量が0.1%未満、黄色ブドウ球菌に対しては0.3%弱であると考えられる。

表6 銀リン酸ジルコニウム練り込みPE,PP樹脂プレートの抗菌力評価のまとめ

菌種	樹脂	結果
大腸菌	LDPE	0.1%添加で抗菌活性値5前後。
	PP	0.1%添加で抗菌活性値5前後。
黄色ブドウ球菌	LDPE	0.3%添加で抗菌活性値2弱(研磨-1)、2～3(研磨-2)。研磨回数が多いほど若干、抗菌活性値が大きい。
	PP	0.3%添加で抗菌活性値3前後。研磨回数による抗菌活性値の差なし。

5. 3. 2 銀ゼオライト

表7 銀ゼオライト練り込みプレートの抗菌力評価結果1

サンプル	黄色ブドウ球菌		大腸菌	
	24時間後の生菌数	抗菌活性値	24時間後の生菌数	抗菌活性値
①PE 0%	3.3E+05	—	1.6E+07	—
②PE 5%(研磨-1)	<10	>4.5	<10	>6.2
③PE 5%(未処理)	3.6E+02	2.9	8.7E+05	1.2
④PP 0%	3.1E+06	—	1.6E+07	—
⑤PP 0.5%(研磨-1)	<10	>5.5	<10	>6.2
⑥PP 0.5%(未処理)	1.7E+04	2.2	8.9E+06	0.2
⑦PP 5%(研磨-1)	<10	>5.5	<10	>6.2
⑧PP 5%(未処理)	3.2E+04	1.9	6.9E+05	1.3

* 使用抗菌剤 ②,③,⑦,⑧:BM-502CFC、⑤,⑥:BM-102EC

本試験条件では、表面研磨したものはすべて生菌数が検出限界以下となったため、抗菌剤を銀含有量の少ないBM-502FCに絞り、引き続き検討を行なった。その結果、抗菌剤添加量が1～2%の間に抗菌活性値2～3を示す配合量があることが判明した(表8参照)。そこで、添加量を0.2%刻みでプレートを作製し、抗菌力評価を行なった(表9)。その結果、抗菌剤添加量として、黄色ブドウ球菌では1.3%～1.4%、大腸菌では1.1%～1.2%が適当との結果が得られた。

表8 銀ゼオライト練り込みプレートの抗菌力評価結果2

サンプル	黄色ブドウ球菌		大腸菌	
	24時間後の生菌数	抗菌活性値	24時間後の生菌数	抗菌活性値
PE 0%(未処理)	3.5E+04	—	2.1E+07	—
PE 0%(研磨-1)	1.0E+05	—	1.0E+07	—
PE 1%(研磨-1)	3.4E+03	1.0	6.8E+06	0.5
PE 1(未処理)	4.3E+04	0.4	6.7E+06	0.2
PE 2%(研磨-1)	4.6E+03	0.9	1.3E+01	6.2
PE 2(未処理)	<10	>4.0	<10	>6.0
PE 3%(研磨-1)	5.8E+02	1.8	1.3E+01	6.2
PE 3(未処理)	<10	>4.0	<10	>6.0
PE 4%(研磨-1)	3.7E+01	3.0	4.9E+02	4.7
PE 4(未処理)	<10	>4.0	<10	>6.0
PE 5%(研磨-1)	<10	>3.5	<10	>6.3
PE 5(未処理)	<10	>4.0	<10	>6.0

表9 銀ゼオライト練り込みプレート of 抗菌力評価結果3

サンプル	黄色ブドウ球菌		大腸菌	
	24時間後の生菌数	抗菌活性値	24時間後の生菌数	抗菌活性値
PE 1.0%(研磨-1)	1.9E+06	—	2.5E+07	—
PE 1.2%(研磨-1)	5.7E+05	0.5	8.5E+06	0.4
PE 1.4%(研磨-1)	3.2E+04	1.8	1.3E+04	3.3
PE 1.6%(研磨-1)	2.3E+03	2.9	1.0E+01	6.3
PE 1.8%(研磨-1)	4.0E+02	3.6	<10	<6.3
PE 2.0%(研磨-1)	<10	>5.2	<10	<6.3

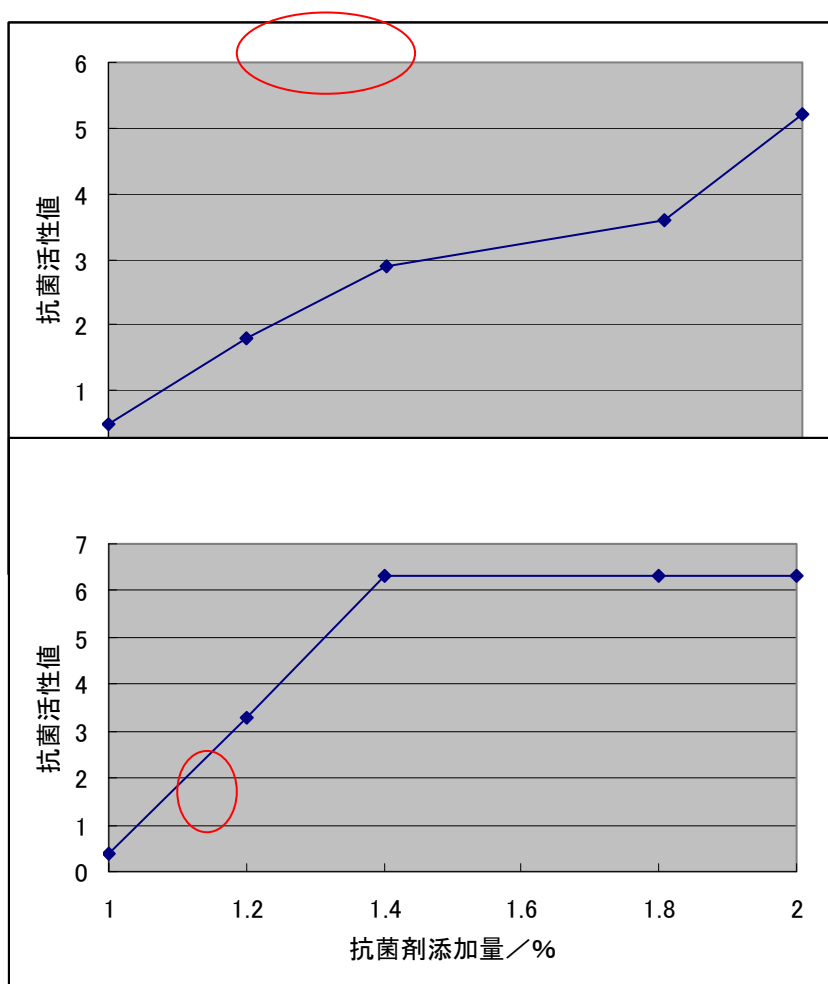


図6 抗菌剤添加量と抗菌活性値の関係(黄色ブドウ球菌)

5. 4 バフ研磨による表面研磨の検討

サンドペーパー研磨は人の手によるため、再現性に問題がある。再現性のよい量産処方を考えた場合、専門の業者による委託加工が必要である。工業的研磨方法を調査した結果、①バフ研磨、②表面切削、および③サンドブラスト加工が挙げられた。本項では、バフ研磨について検討を行った。

5. 2. 3で作製した銀リン酸ジルコニウム0.1%練り込みPEプレート、及び0.3%練り込みPPプレートを4等分し、業者委託によりバフ研磨した。

抗菌力評価を表10、11、及び図7、8に示した。

表10 抗菌力評価(大腸菌、バフ研磨)

サンプル			生菌数(log)	抗菌活性値
初発			5.2	—
対照			7.1	—
PE-1	0.1%	バフ研磨	2.3	4.8
PE-2	0.1%	バフ研磨	7.1	0.1
PE-3	0.1%	バフ研磨	7.0	0.1
PE-4	0.1%	サンドペーパー研磨	2.0	5.1

表11 抗菌力評価(黄色ブドウ球菌、バフ研磨)

サンプル			生菌数(log)	抗菌活性値
初発			5.4	—
対照			5.4	—
PP-1	0.3%	バフ研磨	2.6	2.7
PP-2	0.3%	バフ研磨	3.6	1.8
PP-3	0.3%	バフ研磨	3.0	2.4
PP-4	0.3%	サンドペーパー研磨	1.8	3.5

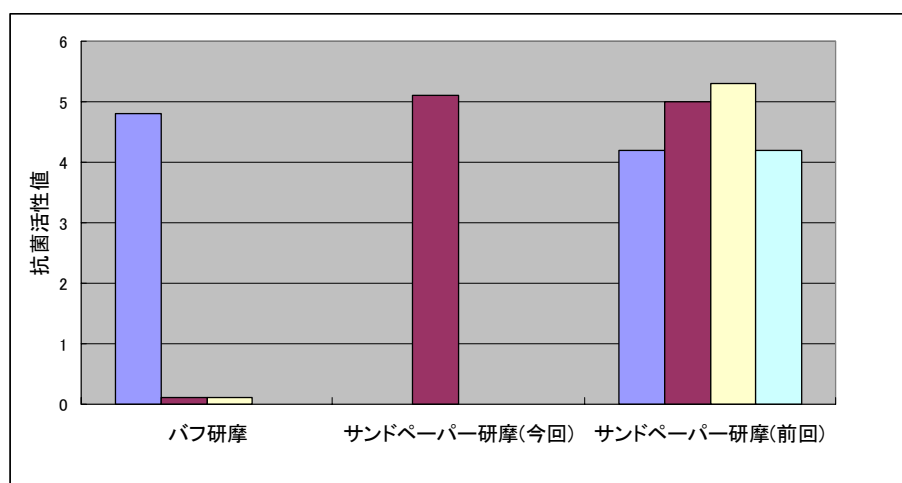


図7 抗菌力評価(大腸菌、バフ研磨)

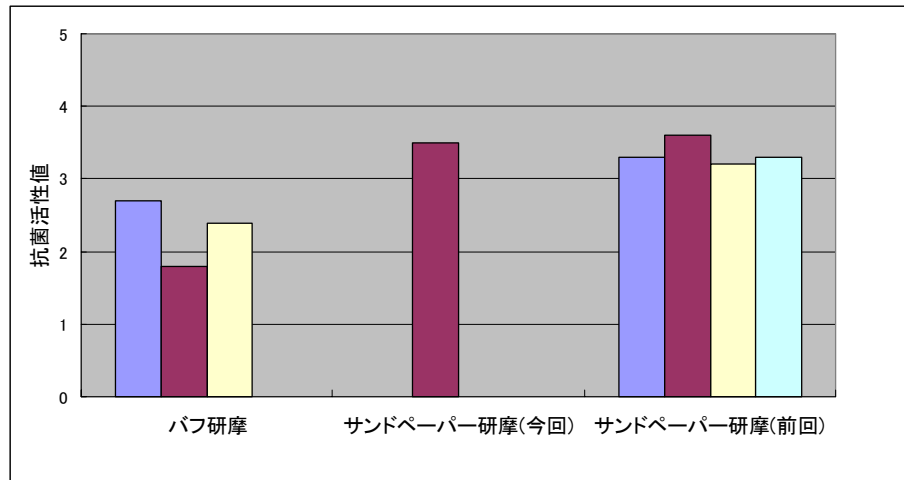


図8 抗菌力評価(黄色ブドウ球菌、バフ研磨)

抗菌力評価の結果、バフ研磨品にバラツキが見られた。同時評価したサンドペーパー研磨品は、前回の評価結果と同等であり、プレート製造ロット内、及び試験機関内での再現性が得られた。

バフ研磨品のバラツキは、試料バラツキ、あるいは評価バラツキではなく、スキン層除去にバラツキがあったと考えられる。

加工業者に見解を求めたところ、バフ研磨は、表面に光沢を持たせる方法で、表面の光沢を見ながら行なうものである。よって本目的に対してはふさわしい方法とは言えないとのことである。そこで、バフ研磨について詳細検討するよりも、別の方法を検討することとした。

5. 5 表面切削による表面研磨の検討

表面研磨の2つめの検討として、表面切削を行なった。表面切削は、表面層を所定の厚みで削る方法であるため、練り込み樹脂内部を表面とすることができる。

5. 2. 2で作製した含有M/Bを用いて、PPプレートを作製した。サンドペーパー研磨を行なった場合、抗菌剤含有量0.3% PP樹脂で、黄色ブドウ球菌に対して抗菌活性値が3強であったため、ここでは抗菌剤含有量を0.275%とした。

業者に依頼し表面切削を行ない、黄色ブドウ球菌に対する抗菌性評価を行なった。試験結果を、表12～14に示した。表面切削品は、3機関ともほとんど抗菌性能が認められなかった。サンドペーパー研磨品は、2機関で抗菌活性値がほぼ2となった。他1機関では3.5と高めであった。

表12 表面切削PP樹脂の抗菌力評価結果(試験機関①)

サンプル		生菌数(log)			AVE	抗菌活性値
初発		5.4	5.3	5.3	5.3	—
対照(PEシート)		5.3	5.2	5.3	5.3	—
PPプレート	未研磨	5.2	5.1	5.2	5.2	0.1
PPプレート	表面切削	5.0	5.1	5.0	5.0	0.3
PPプレート	サンドペーパー	1.2	1.8	2.0	1.8	3.5

表13 表面切削PP樹脂の抗菌力評価結果(試験機関②)

サンプル		生菌数(log)			AVE	抗菌活性値
初発		5.4	5.3	5.4	5.3	—
対照(PEシート)		6.1	6.3	6.3	6.2	—
PPプレート	未研磨					
PPプレート	表面切削	6.1	6.0	5.9	6.0	0.2
PPプレート	サンドペーパー	4.4	3.0	4.3	4.2	2.0

表14 表面切削PP樹脂の抗菌力評価結果(試験機関③)

サンプル		生菌数(log)			AVE	抗菌活性値
初発		5.4	5.5	5.5	5.5	—
対照(PEシート)		6.4	6.3	6.3	6.3	—
PPプレート	未研磨					
PPプレート	表面切削	6.4	6.4	5.7	6.2	0.1
PPプレート	サンドペーパー	4.6	4.5	4.4	4.5	1.8

5. 6 サンドブラストによる表面研磨の検討

表面研磨の3つめの検討として、サンドブラストによる表面研磨を行なった。これまで検討したサンドペーパー研磨、バフ研磨、表面切削はいずれも表面を横方向に擦る方法であるが、サンドブラストは微粉を高圧で対象物に吹き付ける方法であるため、表面を荒らすメカニズムがそれらとは異なる。

5. 5 で作製したPPプレートを用い、業者に依頼しサンドブラストを行なった。吹き付け条件は5条件で行なった。黄色ブドウ球菌に対する抗菌力評価を表15に示した。サンドブラスト条件による影響は少なく、抗菌活性値が約1となった。

表15 サンドブラスト処理PP樹脂の抗菌力評価結果(試験機関①)

サンプル		生菌数(log)		AVE(log)	抗菌活性値	
初発		5.3	5.2	5.3	—	
対照(PEシート)		5.2	5.1	5.2	—	
PPプレート	サンドブラスト処理	①	4.3	4.4	4.4	0.8
		②	4.5	4.2	4.4	0.8
		③	3.8	4.2	4.0	1.2
		④	4.3	4.3	4.3	0.9
		⑤	3.9	4.1	4.0	1.2

5. 7 研磨表面の解析

これまで、4種の表面研磨方法について検討を行ってきたが、その方法により抗菌性能が異なるのかを明らかにしなければ、今後どういった方向で検討を進めるのべきか決定できない。そこで、電子顕微鏡による表面観察を行なった。尚、ここではサンプルの都合上、バフ研磨品、及びサンドブラスト品については実施できなかつたため、追って行なうこととする。

SEM写真を写真1～4に示した。写真1は、表面切削品の二次電子像、および反射電子像である。白く見えるところが銀リン酸ジルコニウムの粒子である。通常、反射電子像は、原子番号の大きな元素ほど明るく（白く）見えるため、存在する元素の違いを見るときに用いるが、銀リン酸ジルコニウム含有PP樹脂においては、二次電子像でも充分見分けがつく。加速電圧15kVの像では、銀リン酸ジルコニウム粒子が左下と右上の2箇所見られる。加速電圧を10kV、5kVと下げていくと、右上の粒子像が消失している。加速電圧が高いほど、電子が表面より内部に入り込みやすくなるため、15kVで見られて、5kVで見えない粒子像は、表面に頭出しされていないものと考えられる（15kVで見えるものについては、頭出しされていると言い切ることはできない）。こういったことを踏まえて、未処理品、サンドペーパー研磨品、及び表面切削品を見てみる。

写真2は、未処理品の観察結果である。上図、下図を比較することにより、ノバロン粒子が露出しているかどうかはわからないものの、表面近傍での存在状態はわかる（上図で見られ下図で見られないものは、少なくとも露出していない）。写真視野内の粒子数をカウントすると、上図93個、下図57個であった。

写真3は表面切削品である。表面が荒れていてわかりづらいが、上図、下図に見られる銀リン酸ジルコニウム粒子数は、上図87個、下図32個であり、絶対数、比率とも未処理品とほぼ同じかそれ以下である。このことから、表面切削品は、表面は荒れているものの、銀リン酸ジルコニウム粒子の存在状態においては、未処理品と同等であるため抗菌性能が発現されなかつたと考えられる。また、プレートの表面近傍と内部は、ほぼ同じ状態で銀リン酸ジルコニウム粒子が存在していることが、すなわち、練り込みは均一であることが確認された。

写真4はサンドペーパー研磨品である。研磨でできた溝の中に、銀リン酸ジルコニウム粒子が存在しているのがわかる。研磨後、窒素ブローしているが、溝の中まで除去できなかったと思われる。このことから、サンドペーパー研磨品で抗菌性能が発現したのは、当初考えていた表面スキン層が除去されたためではなく、研磨で掻き落とされた銀リン酸ジルコニウム粒子がマイクロオーダーの溝の内部に留まっていたためと考えられる。



5kV



10kV

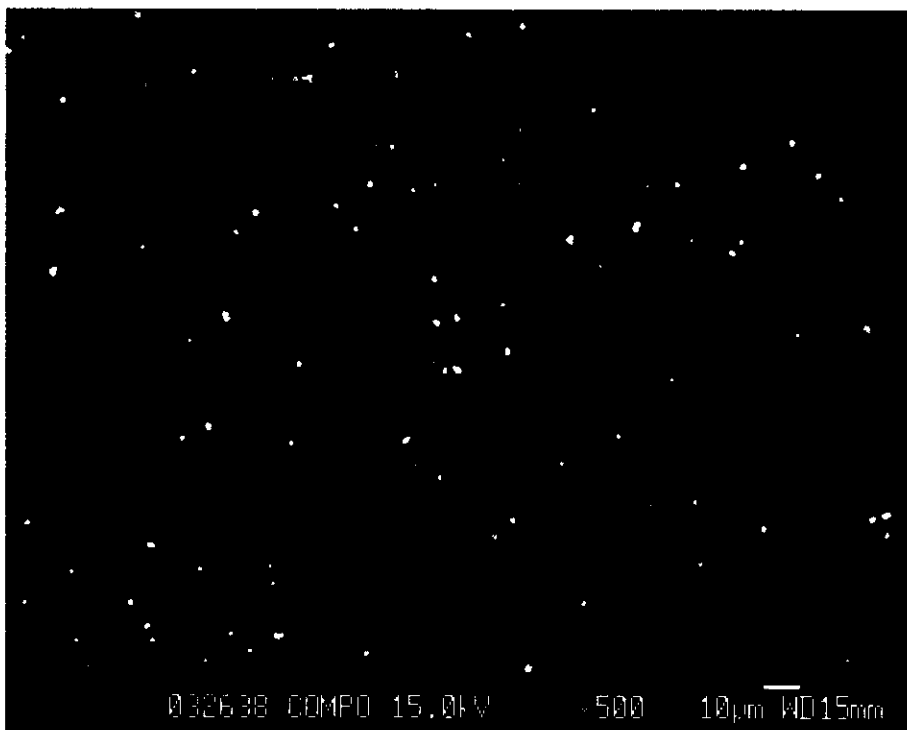


15kV

二次電子像



反射電子組成像



05004-002

装置 : JSM6330F

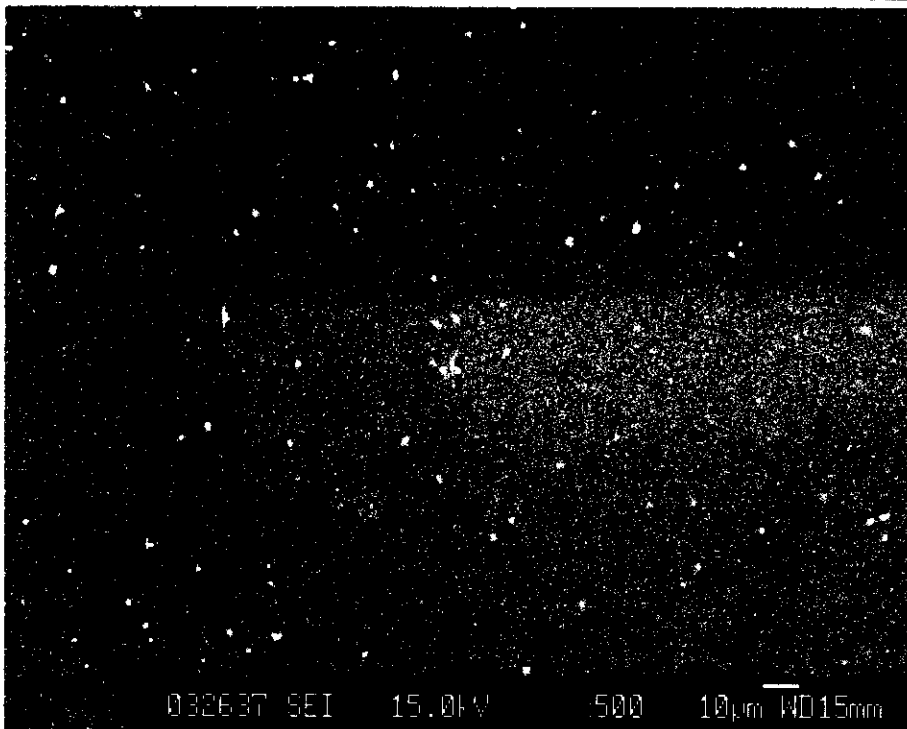
加速電圧 (kV) : 15.00

写真倍率 x500

画像 : COMPO

< 反射電子組成像 >

測定日 : 2005-01-18



05004-001

装置 : JSM6330F

加速電圧 (kV) : 15.00

写真倍率 x500

画像 : SEI

< 二次電子像 >

測定日 : 2005-01-18



05004-003

装置 : JSM6330F

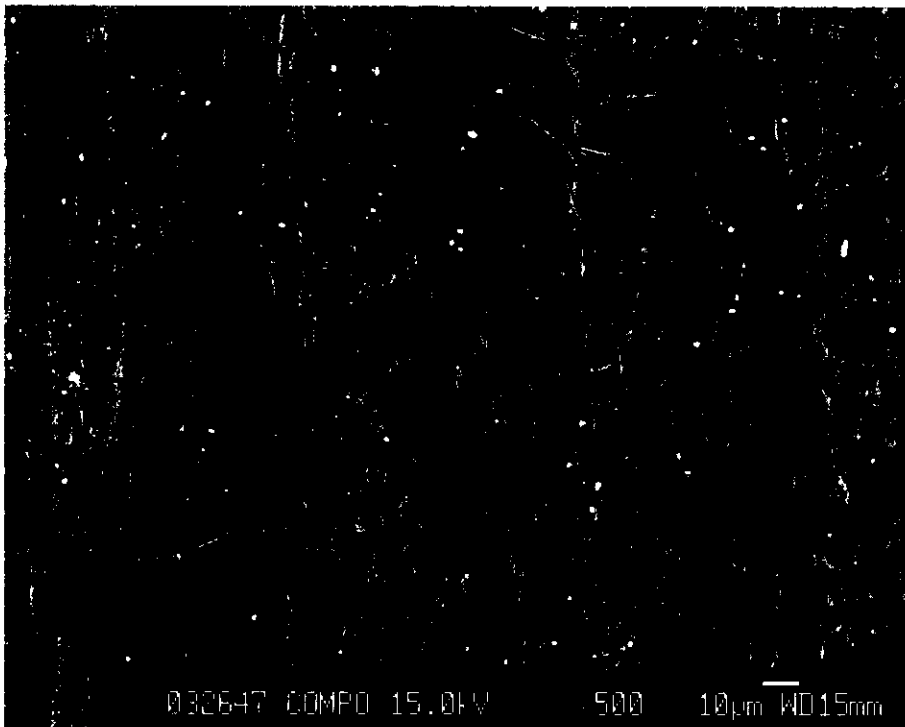
加速電圧 (kV) : 10.00

写真倍率 x500

画像 : SEI

< 二次電子像 >

測定日 : 2005-01-18



05004-011

装置 : JSM6330F

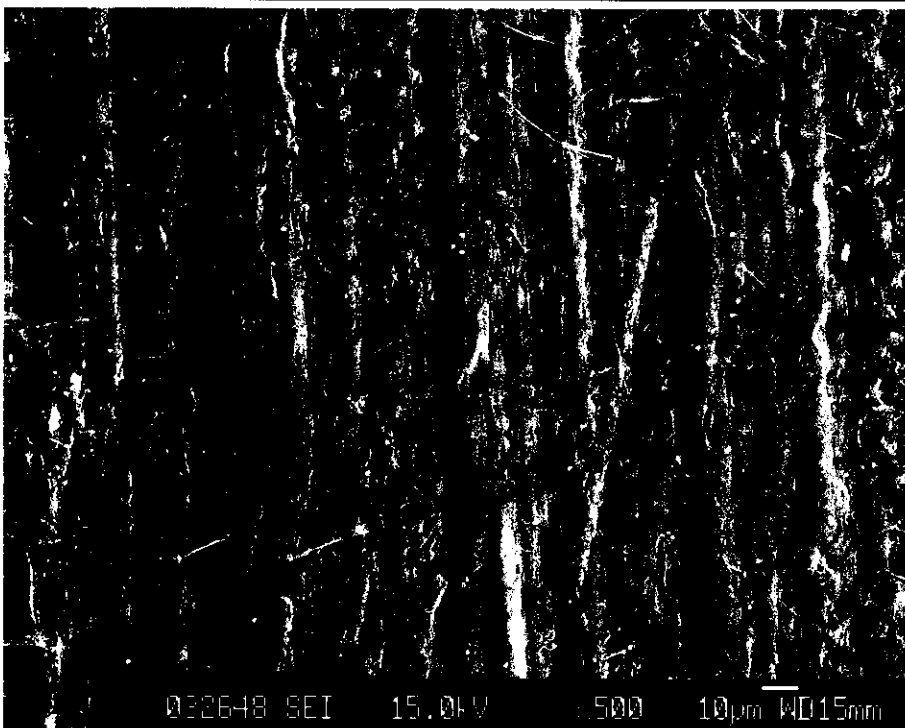
加速電圧 (kV) : 15.00

写真倍率 x500

画像 : COMPO

< 反射電子組成像 >

測定日 : 2005-01-18



05004-012

装置 : JSM6330F

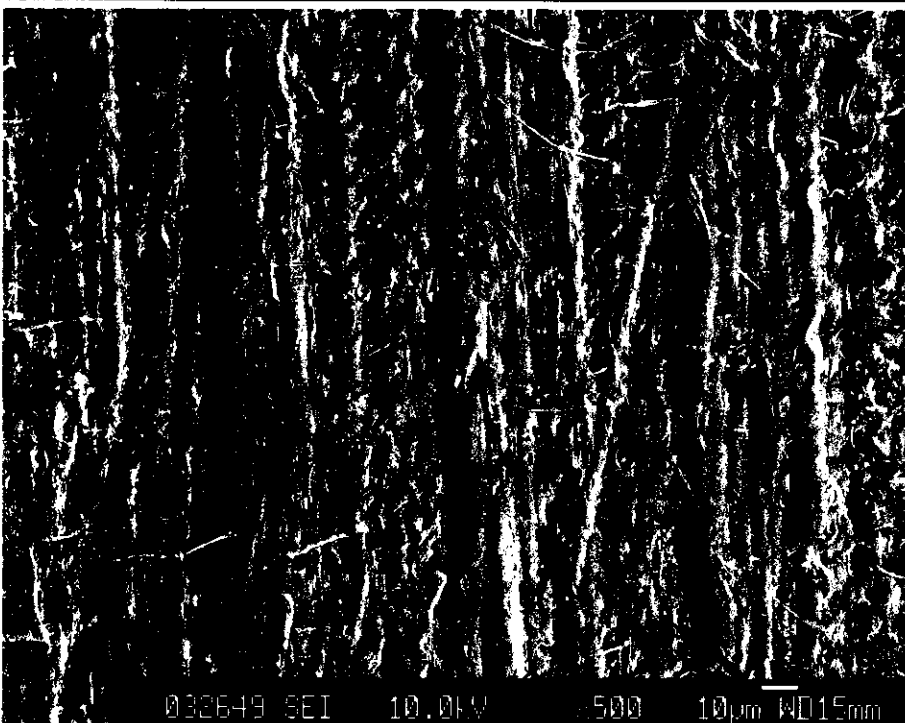
加速電圧 (kV) : 15.00

写真倍率 x500

画像 : SEI

< 二次電子像 >

測定日 : 2005-01-18



05004-013

装置 : JSM6330F

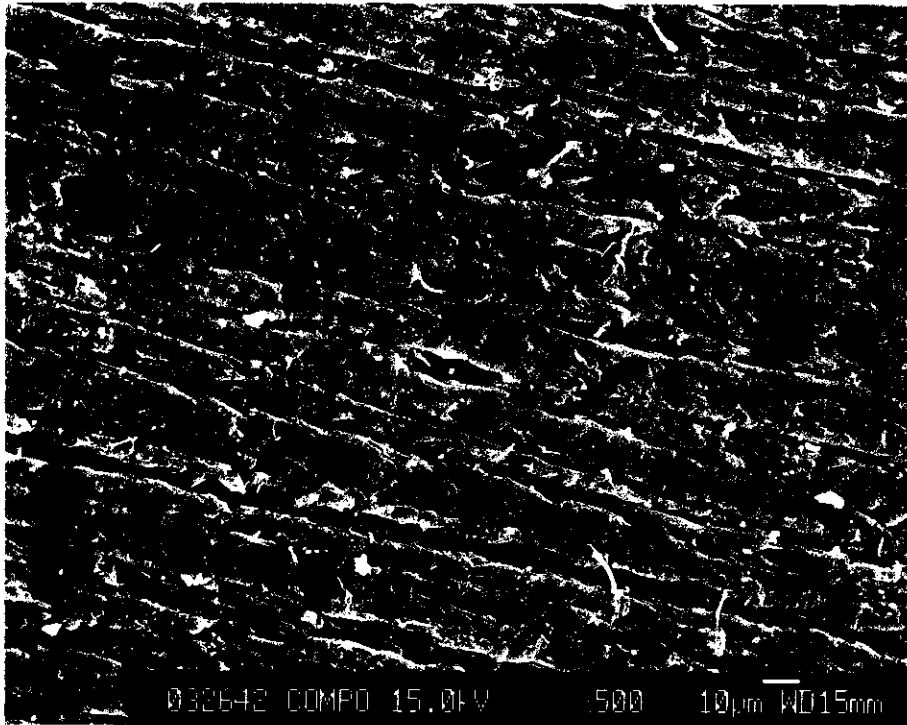
加速電圧 (kV) : 10.00

写真倍率 x500

画像 : SEI

< 二次電子像 >

測定日 : 2005-01-18



05004-006

装置 : JSM6330F

加速電圧 (kV) : 15.00

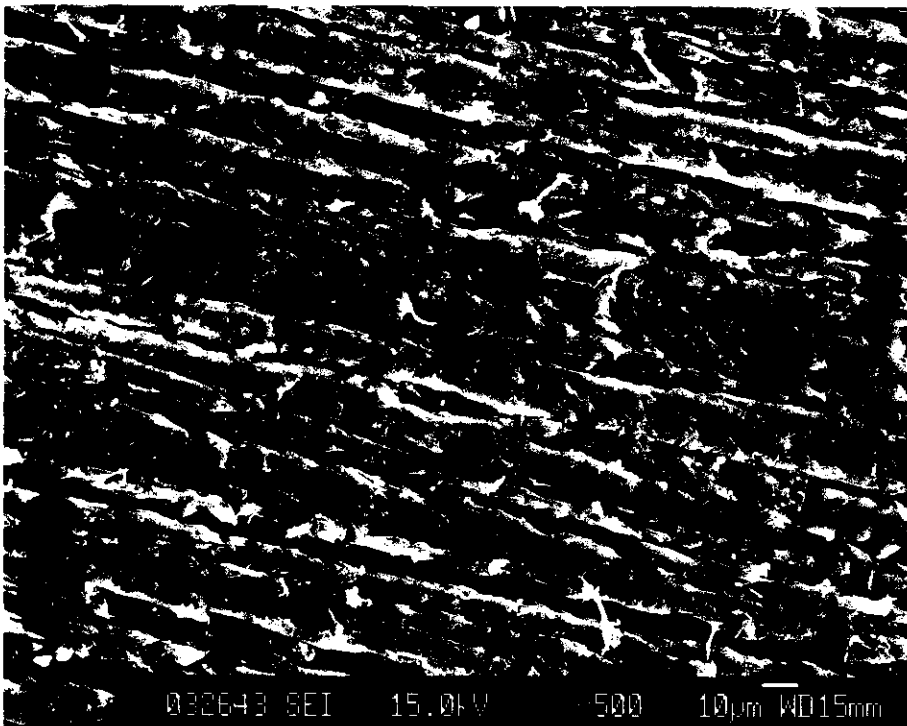
写真倍率 x500

画像 : COMPO

<反射電子組成像>

測定日 : 2005-01-18

032642 COMPO 15.0kV 500 10µm WD15mm



05004-007

装置 : JSM6330F

加速電圧 (kV) : 15.00

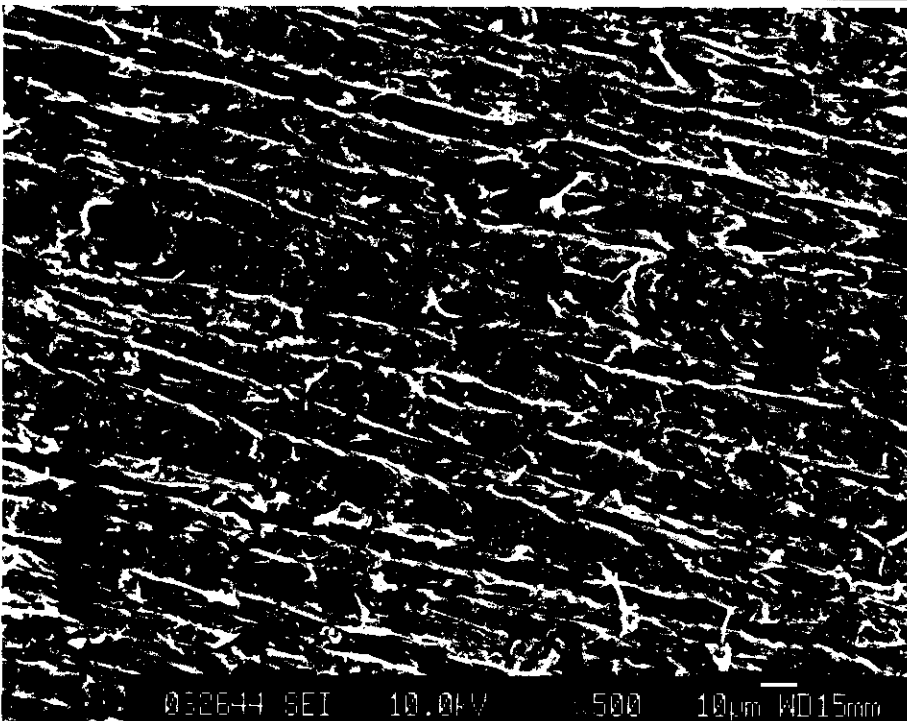
写真倍率 x500

画像 : SEI

<二次電子像>

測定日 : 2005-01-18

032643 SEI 15.0kV 500 10µm WD15mm



05004-008

装置 : JSM6330F

加速電圧 (kV) : 10.00

写真倍率 x500

画像 : SEI

<二次電子像>

測定日 : 2005-01-18

032644 SEI 10.0kV 500 10µm WD15mm

5. 8 まとめ

これまでの各種表面研磨の検討の結果をまとめると下表のようになる。抗菌性能、再現性、及び工業的生産安定性という3点で評価を行なったが、すべてを満足するものは見出せていない。

尚、銀リン酸ジルコニウムでM/Bを作製し、それを用いてプレートを作製することで、樹脂内に均一に練り込めることが確認できた。

表16 表面研磨検討結果のまとめ

表面研磨方法	抗菌性能	再現性	工業的生産安定性
サンドペーパー研磨	○	○	×
バフ研磨	○～△	×	△
表面切削	×	—	○
サンドブラスト	△	○～△	○～△

6. コントロールサンプルの作製検討(ガラス系材料)

6. 1 目的

ガラスはその組成を選ぶことにより、銀、銅などの抗菌金属をガラス修飾成分として均一に含有させることが可能である。よって、抗菌金属の含有を制御することにより、所定の抗菌性能を付与させることが可能であるので、コントロールサンプルとして調査することにした。

6. 2 ガラス系材料調査

ガラス系材料の候補として、次の3種類が考えられた。

①抗菌板ガラス

耐久性の良いガラス組成に銀を少量含有させればコントロールサンプルとして使用できる可能性はあると考えられるが、工業的生産を考慮すると少量では実質上生産は無理である。

②抗菌釉薬

組成を検討することによりコントロールサンプルとして使用できる可能性はあると考えられるが、これまでの知見により、釉薬の厚さ方向でガラス組成が変化し安定した抗菌活性値が出せないとと思われる。また、工業的生産を考慮すると少量では実質上生産が無理である。

③市販光学ガラス

市販光学ガラスは重金属成分を含有しており、抗菌性能を示す可能性がある。高価ではあるが実用レベルでの材料の入手も可能である。以上より、市販光学ガラスを予備検討することにした。

6. 3 市販光学ガラスの検討

抗菌金属として亜鉛-カドミウム-セレンを含む赤色系光学ガラス、亜鉛-銅-コバルトを含む青色系光学ガラス、銀を含む並ガラスを試料として、JIS Z 2801 による抗菌力試験を実施した。

6. 3. 1 試験に用いた試料 (寸法 50×50mm 厚み 2.5mm)

- 1) 着色光学ガラス GLASS TYPE R66 (研磨品) 単価 1枚 3,700円
抗菌活性成分 (亜鉛 11%、カドミウム 0.6%、セレン 0.1%)
- 2) 着色光学ガラス GLASS TYPE B390 (研磨品) 単価 1枚 4,200円
抗菌活性成分 (亜鉛 8%、銅 1%、コバルト 0.3%)
- 3) 銀含有並ガラス (研磨品)
抗菌活性成分 (銀 0.3%) 銀ガラスメーカー試作品 (参考)
- 4) 並ガラス (研磨品)
抗菌活性成分 (なし) (参考)

6. 3. 2 試験

安定性を調べるため、下記処理を行なった後、抗菌力評価を行なった。

- ①初期試験
- ②同一表面で再試験
- ③60°C 3日間 水浸漬後、再試験 (抗菌試験 50 回相当)

6. 3. 3 試験結果

抗菌力評価を表1～4、及び図1に示した。

表1 抗菌力評価結果(初期試験、黄色ブドウ球菌)

サンプル	n	生菌数(cfu/試料)	平均生菌数	抗菌活性値
接種直後対照区	1	9.8E4		
無加工フィルム	2	1.1E5	1.0E5	
TYPE R66	1	1.7E3		
抗菌	2	1.2E3	1.5E3	2.8
TYPE B390	1	6.5E3		
抗菌	2	2.5E3	4.5E3	2.3
銀含有並ガラス	1	< 1E2		
抗菌	2	< 1E2	< 1E2	> 3.9
並ガラス	1	3E2		
参考比較	2	2.3E3	1.3E3	2.8
対照区	1	1.1E6		
無加工フィルム	2	7.8E5	9.4E5	

表2 抗菌力評価(初期試験、大腸菌)

サンプル	n	生菌数(cfu/試料)	平均生菌数	抗菌活性値
接種直後対照区	1	1.4E5		
無加工フィルム	2	1.4E5	1.4E5	
TYPE R66	1	2.9E3		
抗菌	2	2.5E3	2.7E3	3.7
TYPE B390	1	6.4E3		
抗菌	2	6.4E3	6.4E3	3.3
対照区	1	1.8E7		
無加工フィルム	2	1.3E7	1.6E7	

表3 抗菌力評価(同一表面で再試験、黄色ブドウ球菌)

サンプル	n	生菌数(cfu/試料)	平均生菌数	抗菌活性値
接種直後対照区	1	1.3E5		
無加工フィルム	2	1.2E5	1.3E5	
TYPE R66	1	2E2		
抗菌	2	< 1E2	< 1.5E2	> 3.5
TYPE B390	1	< 1E2		
抗菌	2	8E2	< 4.5E2	> 3.0
銀含有並ガラス	1	< 1E2		
抗菌	2	< 1E2	< 1.0E2	> 3.6
並ガラス	1	1.7E5		
参考比較	2	2.8E5	2.3E5	0.3
対照区	1	4.2E5		
無加工フィルム	2	5.4E5	4.8E5	

表4 抗菌力評価(60°C3日間 水浸漬後、再試験:、黄色ブドウ球菌)

サンプル	n	生菌数(cfu/試料)	平均生菌数	抗菌活性値(平均)
接種直後対照区	1	1.3E5		
無加工フィルム	2	1.2E5	1.3E5	
TYPE R66	1	< 1E2		
抗菌	2	< 1E2	< 1E2	> 3.6
TYPE B390	1	< 1E2		
抗菌	2	< 1E2	< 1E2	> 3.6
対照区	1	4.2E5		
無加工フィルム	2	5.4E5	4.8E5	

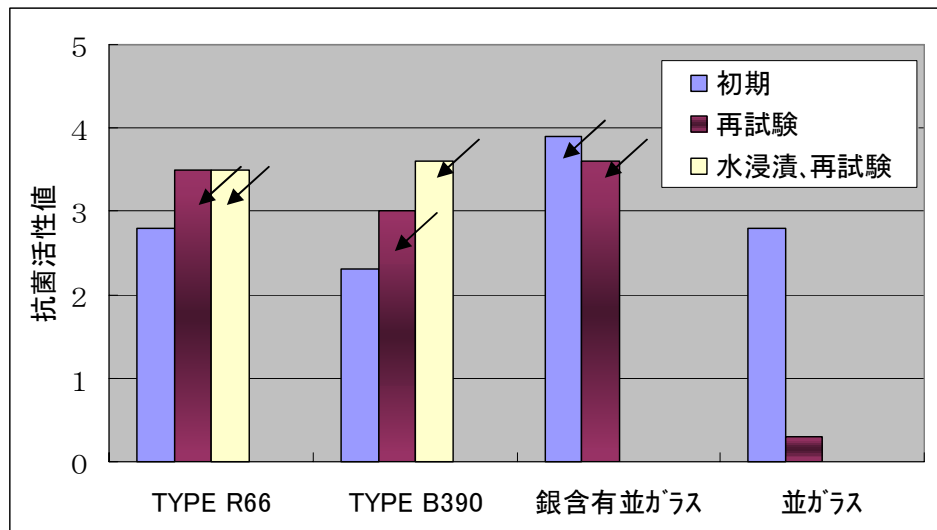


図1 抗菌力評価結果(黄色ブドウ球菌)

* 矢印を付したものは菌数が検出限界値以下となったもの

光学ガラスは、初期においてコントロールサンプルとして妥当な抗菌活性値が得られたが、同一表面で再試験をしたり、耐水後に再試験をすると抗菌活性値が高くなりすぎてしまった。また、銀ガラスは初期から抗菌活性値が高すぎた。

6. 4 まとめ

市販光学ガラスにて抗菌力評価をした結果、抗菌活性値が高すぎることに、及び抗菌活性値が変化して再現性が得られず、コントロールサンプルとして適さないと判断した。

7. 調査研究のまとめ (中間)

- コントロールサンプルの候補技術・材料を調査し、リストアップした。
- 予備調査の結果、①生体高分子を用いた基材、②銀系無機抗菌剤練り込みプレート、及び③光学ガラスの3つに絞り込み、検討を行なった。
- 生体高分子基材の検討の結果、次のことがわかった。
 - ・組み換え体作製の目的である毒性のない組み換え VCH が得られた。
 - ・79-kDa pro-VCH がバイオ基板の構成成分として最も適していることがわかった。
 - ・コレステロールと各種物質との結合性について調査した結果、化学的に反応性の乏しい物質であるため、現状では化学的結合は難しいことが分かった。
 - ・現状では、疎水性の PVDF 膜にコレステロールを物理的に吸着させる方法が最もよいと考えられる。しかしながら、使用した PVDF 膜は多孔性であるため、その影響を確認する必要がある。
 - ・79-kDa pro-VCH と結合させることができる抗菌剤として Ag が最適であることが分かった。ただし、Ag⁺溶液からは粒子状の Ag が析出し、PVDF 膜に非特異的に結合して抗菌作用を示す可能性があるため、粒子状 Ag を生じさせないことが重要である。
 - ・Ag 以外に、Ni も抗菌剤として使用できることが分かった。
 - ・バイオ基板を構成する成分である 79-kDa pro-VCH は PVDF 膜上に存在することが確認された。一方、コレステロールと Ag を確認することはできなかったが、作製した基板の抗菌活性値のデータはコレステロールと Ag が PVDF 膜上に存在することを示している。
 - ・以上の結果から、原理どおりに、PVDF 膜/コレステロール/コレステロール結合タンパク質/Ag からなるバイオ基板が構築され、目標とする抗菌活性値を示すことが確認された。
- 銀系無機抗菌剤練り込みプレートの検討の結果、次のことがわかった。
 - ・抗菌剤を練り込んで成形したプレートそのものではほとんど抗菌性能が発現しない場合でも、#1,000 サンドペーパー研磨により、目標とする抗菌活性値を示すことが確認された。
 - ・表面観察の結果、抗菌性能が発現するのは、当初仮定していた表面スキン層の除去によるものではなく、掻き取られた抗菌剤粒子が研磨でできたミクロンオーダーの溝の中に留まっているためであることがわかった。抗菌力評価の結果からだけ見るとかなり再現性は高い結果となっているが、そのメカニズムを考慮すると、再現性に問題があると言わざるを得ない。
 - ・バフ研磨により、抗菌性が発現するが、研磨バラツキが大きく、実際的な研磨方法とは言えない。
 - ・表面切削では、抗菌性がほとんど発現しなかった。表面観察の結果、表面は荒れているものの、抗菌剤粒子の存在状態は未研磨品と同等であることがわかった。
 - ・サンドブラストでは、サンドペーパー研磨よりは抗菌活性値が低いものの、安定した抗菌性能が発現できる可能性が見出された(試験点数が少ないため、再現性を確認する必要がある)。

- ・銀系無機抗菌剤粒子は、樹脂中にはほぼ均一に練り込まれていることがわかった。
 - 市販光学ガラスの検討の結果、初期においては妥当な抗菌活性値が得られたが、同一表面での再試験、あるいは耐水試験より抗菌活性値が大きく変化するため、コントロールサンプルとして適さないことがわかった。

8. 今後の課題

8. 1 バイオ基板

- H17年度は下記の検討を行ない、大量生産が可能なバイオ基板を完成させる。
 - 粒子状のAgを生じさせないAg⁺溶液の作製法を確立する。
 - フラットなPVDF基板および多孔性PVDF基板上に存在するコレステロール、79-kDa pro-VCH、及びAgを確認する。また、フラットPVDF基板および多孔性PVDF基板上に存在する各バイオ基板成分ならびに菌体へのAgの吸着を定量的に測定する。
 - バイオ基板の超微視的観察を原子間力顕微鏡や電子顕微鏡を用いて行う。
 - Agが結合したバイオ基板の抗菌活性値の誤差範囲が±0.5に納まるように基板構成成分の結合量を調節する。
 - バイオ基板の経時的劣化について検討し、6ヶ月以上抗菌作用が安定に持続する保存法を確立する。
 - バイオ基板の工業的製造法について具体化する。

8. 2 無機系抗菌剤練り込みプレート(表面研磨)

- H17年度は下記の検討を行ない、工業的生産が可能なコントロールサンプルを完成させる。
 - これまで2種の抗菌剤を用いて検討してきたが、検討の進んでいる銀リン酸ジルコニウムに絞って検討する。
 - サンドペーパーの粒度の影響、すなわち、研磨剤の粒径を抗菌剤粒子と同等あるいはそれ以下にした場合の影響を調べる(抗菌性、表面観察)。
 - サンドブラスト加工の検討継続(抗菌性、表面観察)。
 - 抗菌剤添加量を増加し、表面切削を行なう方法を検討する。すなわち、未研磨で抗菌活性値が2～3程度発現する量を練り込み、表面切削によりバラツキを低減させる。

[添付資料1]

H16年度 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会名簿

(順不同, 敬称略)

	区分	氏名	所属	部署	役職
1	委員長	高麗 寛紀	徳島大学	工学部	教授
2	副委員長	松岡 英明	東京農工大学	工学部	教授
3	委員(WG)	生貝 初	鈴鹿工業高等専門学校	生物応用化学科	教授
4	委員	佐野 浩一	経済産業省	産業技術環境局認証課	課長補佐
5	委員	村越 正毅	経済産業省	製造産業局デザイン・人間生活システム政策室	課長補佐
6	委員	今井 秀孝	(独)製品評価技術基盤機構	認定センター	技術顧問
7	委員	登坂 孜	(独)製品評価技術基盤機構	認定センター	次長
8	委員(WG)	杉本 茂	(財)日本食品分析センター	品質システム室	部長
9	委員	卜部 勝資	(社)繊維評価技術協議会	事務局	
10	委員(WG)	山本 則幸	東亜合成(株)	機能製品事業部商品開発センター	部長代理
11	委員(WG)	今井 茂雄	(株)INAX	総合技術研究所 要素技術開発室	課長
12	委員(WG)	山本 幸一	石塚硝子(株)	抗菌試験所	所長
13	委員(WG)	八代 敏晴	カネボウ化成(株)	化成品営業グループ	部長
14	オブザーバー	松井 順子	経済産業省	製造産業局デザイン・人間生活システム政策室	企画一係長
15	オブザーバー	稲葉 知英	(独)製品評価技術基盤機構	認定センター	主任
16	オブザーバー(WG)	川合 晶子	(独)製品評価技術基盤機構	認定センター	主任
17	事務局	藤本 嘉明	抗菌製品技術協議会		専務理事、 事務局長
18	事務局	林 進	抗菌製品技術協議会		常任理事

H16年度 抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会ワーキンググループ名簿

(順不同、敬称略)

	区分	氏名及び役職	会社名及び所属	役職
1	リーダー	山本 則幸	東亜合成(株) 機能製品事業部 商品開発センター	部長代理
2	サブ リーダー	今井 茂雄	(株)INAX 総合技術研究所 要素技術開発室	課長
3	メンバー	生貝 初	鈴鹿工業高等専門学校 生物応用化学科	教授
4	メンバー	杉本 茂	(財)日本食品分析センター 品質システム室	部長
5	メンバー	山本 幸一	石塚硝子(株) 抗菌試験所	所長
6	メンバー	八代 敏晴	カネボウ化成(株) 化製品営業グループ	所長
7	メンバー	城戸 勝治	(株)ヘキサケミカル 開発一部 開発課	課長
8	メンバー	和田 邦身	(財)日本化学繊維検査協会 生物試験センター	センター長
9	メンバー	川合 晶子	製品評価技術基盤機構 適合性評価センター 認定センター	主任
10	オブザー バー	林 進	抗菌製品技術協議会	常任理事
11	オブザー バー	藤本 嘉明	抗菌製品技術協議会	専務理事、 事務局長

[添付資料3]

本調査研究の実施計画及び研究体制

1. 調査研究実施計画

(1) 実施計画の内容

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

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

本調査研究における内容は以下のとおりである。

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

(2) 研究実施場所

抗菌製品技術協議会

東京都渋谷区初台2-23-5

パシフィックパレス新代々木406号

(3)実施日程

1) 実施期間全工程 (平成16年7月～平成18年3月)

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

2)－1 調査研究委員会 【平成16年度】 開催計画

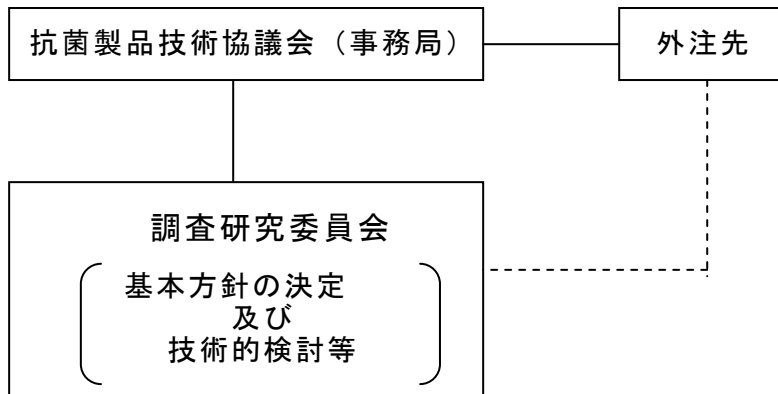
区分	月	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
委員会開催			第1回			第2回		第3回		第4回	

2)－2 調査研究委員会 【平成17年度】 開催計画

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

2. 研究体制

(1) 研究組織及び管理体制



(2) 研究者氏名及び役職名

別添 委員会名簿参照

(3) 経理担当者氏名及び役職名

抗菌製品技術協議会 専務理事・事務局長 藤本 嘉明

[添付資料4]

抗菌試験用コントロールサンプル開発委員会議事録

平成16年度 第1回 委員会議事録

○日 時 平成16年7月14日 10時～12時

○場 所 南青山会館

○出席者（順不同、敬称略）

委員：高麗 寛紀、松岡 英明、生貝 初、垣見 直彦、登坂 孜、卜部 勝資、山本 則幸、今井 茂雄、山本 幸一、早田 英司（八代委員の代理）

（欠席委員 佐野浩一委員、今井秀孝委員、杉本茂委員）

オブザーバー：松井 順子、川合 晶子

事務局：林 進、藤本 嘉明

○ 議事

1. 事業委託元代表（NITE認定センター次長登坂様）ご挨拶
2. 抗技協原課代表（経済産業省製造産業局デザイン・人間生活システム政策室課長補佐垣見様）ご挨拶
3. 自己紹介および委員長、副委員長選出

出席者全員が自己紹介を行った後、委員長として高麗委員をまた副委員長として松岡委員を選出した。なお副委員長は委員長を補佐するとともに委員長不在時には委員長代行を務めていただくことで了承された。

4. ワーキンググループの設置について

委員会の方針を具体化するためのワーキンググループ（WG）を設置したいとの提案が事務局からあり、WGメンバーとして生貝委員、杉本委員、山本則幸委員、今井茂雄委員、山本幸一委員、八代委員、オブザーバーの稲葉氏、川合氏が選出され、WG主査として山本則幸委員、副主査として今井茂雄委員が就任することが承認された。

5. 委託業務実施計画について

事務局より資料1-3に従って、本調査研究の目的、実施内容概略、2年間の試験計画等について説明があり、原案通り承認された。

6. コントロールサンプルの内容と開発計画について

- (1) その1（Protein anchorを用いたナノ分子の基板固定化技術の応用）

今井委員、生貝委員より資料1-4に基づいて提案内容の説明があり、以下の質疑応答、意見交換があった。

- ① Q：支持機材の表面が相当平滑でなければ提案図のようなモデルを得ることは難しいように思うが、支持基材として何を想定しているか？

→A：ガラス板、プラスチックフィルムを考えている。

- ② 支持基板は均一性が必要であり、島津製作所のDNAチップに使われているPDF膜のようなものでないと難しいのではないかと？
- ③ サンプルの表面状態がどうなっているかは、表面プラズマで観察すると良い。
- ④ Q：どのような抗菌剤を検討しようとしているのか？またタンパク質と抗菌剤はどのように結合させるのか？
→A：抗菌剤は有機系、無機系（銀イオン）の両方の可能性があり、タンパク質と抗菌剤は化学結合していることが理想である。反応はタンパク質のステロールの水酸基が関与する。
- ⑤ Q：表面のごく一部はモデル図のような構造になるかもしれないが、コントロールサンプル全体がこのような構造を持つことは極めて難しいと思われる。
→A：実際の試験サンプルとしてはすべてがこのような構造でなくても、マクロできちんとしたデータが得られるのであればサンプルとしての価値はある。
- ⑥ このようなサンプルは保管条件もきちんと規定しないとばらつきが多く使い物にならない。
- ⑦ どのくらいの大きさのタンパク質を選ぶかも重要だと思うが？
→A：ある報告では分子量は6.5万程度のものが良いといわれている。抗菌サンプルとしてどの程度が良いのかは今後の検討課題である。

(2) その2（抗菌加工材料表面を研磨してスキン層を除去し安定な抗菌性能を発現）

山本委員より①無機抗菌剤を練りこんだ樹脂プレート ②抗菌性金属を含有するガラスプレート ③抗菌性金属を含有するステンレスプレート に関して説明があり、以下の意見交換があった。

- ① 3種ともこのようなサンプルは均一性をどのように確保するかが重要であり、その点を理論的にも説明できることが期待される。例えば①の抗菌剤を練りこんだ場合では、抗菌剤の分散が均一である理由、②ガラスプレートの場合はガラス構造が均一である理由などが説明できることが好ましい。
- ② ガラスの場合などでは、保管方法によって抗菌性能が変化する可能性がある。製造条件を固めるだけでなく最適な保管条件も決めておく必要がある。
- ③ アクリル系抗菌繊維が実用化されている。この技術を利用してフィルム化できれば有力な候補になる。

今後、今回提案されなかったアイデアも含め、コントロールサンプルのアイデアを集め、開発方法の具体化をWGで検討する。

7. その他 次回委員会開催 10月28日（木）15:00～17:00

（場所は（財）日本食品分析センター 新館（日本水産油脂協会）三階第1会議室）

以上

平成 16 年度 第 2 回委員会 議事録

- ◆ 日時 平成 16 年 10 月 28 日 (木) 15:00~17:00
- ◆ 場所 (財) 日本食品分析センター新館 (日本水産油脂協会) 3 階第 1 会議室
- ◆ 出席者 (順不同、敬称略)
高麗寛紀、松岡英明、松井順子 (垣見委員の代理)、生貝 初、今井秀孝、登坂 孜、杉本 茂、卜部 勝資、山本則幸、今井茂雄、山本幸一、八代敏晴、川合 晶子、林 進、藤本嘉明 (文責)

◆ 議事

1. 第 1 回委員会議事録の確認

事務局作成の議事録案を正式議事録とすることが承認された。

2. コントロールサンプル (以下、CS と略記) の開発進行状況と今後の進め方について

(1) 第 1 回ワーキンググループ (WG) 会議報告

第 1 回委員会で設置することが認められた WG の第 1 回会議結果についてリーダーの山本 (則) 委員より以下の報告があった。

- ① CS の開発テーマとして、1) バイオ基板 2) その他に分け、2) その他については WG 内でアイデアを抽出し検討可否を決定した。(資料 2-3 参照)
- ② ②上記 1) 及び 2) について H16 年度の開発スケジュールと担当者を決めた。(資料 2-4 参照)

なお、第 1 回 WG 会議議事録の第 1 頁下から 2 行目及び第 2 頁第 1 行目の「コレラ菌毒素」は「コレラ菌溶血毒」に修正する。

(2) バイオ基板 CS の開発状況について

生貝委員より資料 2-6 により、PVDF 膜基板に結合したコレステロールにコレラ菌溶血毒素たんぱく質を結合しこれに銀イオンを担持させたサンプルの検討結果について概略以下の報告があった。

- ① コレステロールの PVDF 膜への結合量はコレステロール濃度に依存する。
- ② コレステロールに結合する溶血毒素たんぱく質としては Pro-65-kDa VCH が最も結合性が高く毒性も低いいため好ましいことが判った。
- ③ 溶血毒素タンパク質のヒスチジンの持つマイナス電荷を利用し Ag⁺ イオンを結合させたサンプルは、Ag⁺ を結合していないものに比べ大腸菌の生菌数が減少しておりこのサンプルが CS として期待できることを確認した。

この報告に関する討議を行った。主な内容は次の通り。

- 1) この CS の抗菌活性は、溶血毒素タンパク質に結合している Ag⁺ イオンが細菌 (大腸菌、黄色ブドウ球菌) のタンパク質に移行することによる。Ag⁺ イオンの二つのタンパク質への親和性は PH の影響を強く受けると思われる。
- 2) 溶血毒素タンパク質への Ag⁺ 付着量と大腸菌への移行量が相関するか検討が必要である。

り、A g の飽和吸着量も確認しておくが良い。

3) A g 移行量は測定環境の影響を受け、PH以外にも塩素イオン濃度などが影響するので、バッファー液の組成にも注意する必要がある。

4) Q : PVDF 膜表面の均一性はどうやって確保するのか？

→A : コレステロールよりも高い疎水性の膜を利用することによる。

5) C S の抗菌性能に再現性があれば、部分的に不均一性が残っても止むをえないのではないか。

(3) バイオ基板以外のC Sの開発状況について

山本（則）委員から資料2-7により概略以下の報告があった。

WGから提案されたアイデアの内、可能性が高いと思われる無機抗菌剤練込み樹脂プレート、市販光学ガラス、抗菌ステンレスについて検討を行った結果、

- ① LDPE（低密度ポリエチレン樹脂）とPP（ポリプロピレン樹脂）に銀リン酸ジルコニウム系抗菌剤を練りこんで射出成型し表面を研磨したプレートは、抗菌活性値2付近で1桁以内のばらつきに収まる可能性がある。この場合抗菌性能が研磨回数の影響を受けることがわかった。銀ゼオライト系抗菌剤を練りこんだものは抗菌剤配合量が多すぎて生菌数が検出限界以下となったため添加量の再検討が必要である。
- ② 光学ガラスは市販品を評価したところ、抗菌活性値が高すぎまた水浸漬で性能が変化するためCSとしては不適と判断した。
- ③ 抗菌ステンレスは、製造業者が抗菌活性値を制御する商品設計をしていないためCSとして検討することは不可能である。

この報告に対して以下の討議が行われた。

1) Q : 抗菌ステンレスは製品として実績があるようだがどうか？

→A : 市場にはあるが、CSとしては品質安定性の点で難しい。

2) Q : 抗菌アルマイトについて調査した結果はどうか？

→A : 製品にはなっているが、抗菌活性値のコントロールはできる状況でない。

3) Q : 樹脂練り込みプレートを研磨する時の研磨剤微粒子の影響はないか？

→A : 微粒子が残っていれば影響はあるかもしれないが、今回の試験ではブローで吹き飛ばし取り除いた後に評価している。

4) Q : 研磨回数が影響するとの報告があったが、(サンドペーパーではなく) 定量化できる研磨方法を考えた方が良いのではないか？

→A : バフ研磨、サンドブラスト等による研磨を検討したい。

5) 研磨厚みと抗菌剤粒の関係が抗菌性能に影響すると思われるので、研磨に際して配慮が必要である。

以上 (1) ~ (3) の討議の結果、WGの開発計画案に従って今後更に検討することが承認された。

3. その他

(1) 事務局より本調査研究の因子検証試験等に係る調査研究は外注する計画であるが、JNLA試験所企業2社から2年分の外注費の見積書を取り寄せた結果、安価であった(株)INAXに外注することにしたいとの提案があり、承認された。

(2) 次回、委員会の予定

12月13日 13:30～15:30 南青山会館 中会議室

以上

平成 16 年度 第 3 回委員会 議事録

- ◆ 日時 平成 16 年 12 月 13 日 (月) 13:30~15:30
- ◆ 場所 南青山会館 中会議室
- ◆ 出席者 (順不同、敬称略)
高麗寛紀、松岡英明、村越正毅、生貝 初、今井秀孝、登坂 孜、杉本 茂、卜部 勝
資、山本則幸、今井茂雄、八代敏晴、(欠席委員 佐野浩一、山本幸一)
オブザーバー：松井順子、川合晶子
事務局：林 進、藤本嘉明 (文責)

◆ 議事

4. 第 2 回委員会議事録の確認

事務局作成の議事録案を正式議事録とすることが承認された。

5. コントロールサンプル (以下、CS と略記) 開発進行状況と今後の進め方について

(1) バイオ基板 CS の開発状況と今後の進め方

生貝委員より資料 3-5-1 及び 2 により、バイオ基板 CS の検討結果について概略以下の報告があった。

①疎水性多孔質の PDDF シートにコレステロール膜を形成しその上にタンパク質 (proVCH) 膜を形成させ、更にこれに銀イオン電解液を処理し銀イオンを結合させたものの抗菌性能を大腸菌を用いて測定した。この結果、銀イオンを結合したサンプルは、銀イオンのないものに比べ生菌数が大幅に減少していた。

②上記試験で、タンパク質がなくコレステロールに直接銀イオンを結合したものの生菌数は減少しているが、タンパク質があった方がより大きく減少している。またコレステロール量が多いものの方が少ないものより生菌数は減少している。

この報告に対して以下の質疑応答、意見提出が行われた。

- 1) Q: 抗菌試験前後の CS 表面にある銀の量を定量しているか? → A: 銀の定量はしていない。定性的には E PMA により銀の測定中である。
- 2) (半) 定量でもよいから、Ag がどれだけあり、それがどれだけ細菌に移っているかが判らないと議論が進まない。
- 3) 定量的なデータがないままではこの CS を市場に出したときに CS そのものの信用性が失われてしまう。
- 4) 例えばコレステロールと Ag の結合定数、タンパク質の結合定数を計れば良い。測定に際して、PH の影響も把握しておく必要がある。
- 5) タンパク質末端のヒスチジンは強いリガンドであり、銀が外れにくい傾向がある。またヒスチジンだけでも細菌が死ぬ可能性もある。
- 6) タンパク質の種類を変えた場合は、Ag の量も変えて見た方が良い。
- 7) 銀は細菌に移行しないとだめか、移行せずとも固定された銀に細菌が接触するだけで効果があるかも調べたい点である。

8) P V D F 膜は多孔質であり、コレステロール、タンパク質、銀イオンが裏側や孔の側面にも付着するので C S の材質としては好ましくない。もっとフラットなフィルムを探した方が良い。裏面につかないようにするためには親水性と疎水性フィルムからなる複合シートも候補か？

9) フッ素系ポリマーフィルムとしては分析等に使用されているテドラーバッグが良い。

以上の議論をもとに協議し、今後の以下のように進めることにした。

- ① 基材シートとして当面テドラーバッグを使用する。
- ② 定量的データを取りながら進める。一つのサンプルでは A g 量が少なく測定不能な場合は、必要な量を確保するためサンプルを大量に作成することも考慮する。
- ③ C S のライフについても検討する。
- ④ 来年度からは製造条件も検討する必要がある、製造メーカーも探しておく。

なお、委託元 (N I T E) より、平成 1 6 年度が基礎試験であり平成 1 7 年度が製造試験であるとは特に区切っていない、2 年度にわたる試験のなかで必要な検討がきちんと行われれば、平成 1 7 年度に基礎的な試験が行われても問題ないとの見解が示された。

(2) バイオ基板以外の C S 開発状況と今後の進め方

山本委員、八代委員より以下の報告があった。

- 1) 銀系無機抗菌剤練り込みプレートについては、抗菌剤が銀リン酸ジルコニウムの場合、前回試験結果により選択した添加量の樹脂プレートを作成し、サンドペーパー研磨とバフ研磨を実施。サンドペーパーは再現性が得られたが、バフ研磨は効果が認められなかった (スキン層の剥離不十分と思われる) 。今後切削によるスキン層除去を検討する。一方、抗菌剤として銀ゼオライトを使用しサンドペーパーで研磨した場合の抗菌剤最適添加量を見出した。
- 2) 光学ガラス、抗菌ステンレス、抗菌アルマイトについて調査した結果、検討を中止した。インクジェットについては調査を継続する。

この報告について以下の質疑応答があった。

- ① Q : 切削はどのような装置で行うか？ → A : 詳しくは不明だが刃物のついた装置で表面を削る方法である。
- ② Q : バフ研磨はどのようにして行ったか？ → A : サンプルを固定し、バフのついた先端を移動させて行った。

協議した結果、今後以下のように進めることにした。

- 2) 表面スキン層の除去方法については今後切削、サンドブラストについても検討する。
- 2) 樹脂に練りこむ抗菌剤の種類については今年度中に一つに絞り込む。

3. 第 2 回ワーキンググループ (W G) 会議報告

第 2 回 W G 会議結果についてリーダーの山本 (則) 委員より資料 3 - 3 により報告があった。

- ③ バイオ基板CS 2)その他CSの開発状況について上記2.のような試験結果について報告、討議している。
- ④ 今後CSの製造方法についても検討していくがそのためにCSの市場性、製造必要量についても検討する必要がある。
- この報告について、資料3-3第1頁下から2行目の「今後、JISに従って試験を行う」との記載内容について質問があり、現在バ伐基板の抗菌性試験は生貝委員が行っているが、菌株が正式なものではないなど詳細な点でJIS通りではない部分があるため、今後ある時期からはJNLA試験機関に評価試験を依頼したいとの回答があった。

4. その他

次回、委員会の予定

平成17年2月16日(水) 15H~17H (その後都合により2月18日(金)に変更となっている。なお、議題は中間報告書ドラフトなどを予定。

以上

平成 16 年度 第 4 回委員会 議事録

- ◆ 日時 平成 17 年 2 月 18 日 (金) 15:00~17:00
- ◆ 場所 渋谷区勤労福祉会館 第 4 洋室
- ◆ 出席者 (順不同、敬称略)
高麗寛紀、松岡英明、松井順子 (村越正毅委員の代理)、生貝 初、登坂 孜、杉本 茂、
ト部 勝資、山本則幸、今井茂雄、山本幸一、八代敏晴、(欠席委員 佐野浩一、今井
秀孝、杉本 茂)
オブザーバー：稲葉知英、川合晶子
事務局：林 進、藤本嘉明 (文責)

◆ 議事

6. 第 3 回委員会議事録の確認

事務局作成の議事録案を正式議事録とすることが承認された。

7. コントロールサンプル (以下、CS と略記) 開発進行状況について

(1) 第 3 回ワーキンググループ会議の報告

山本WGリーダーから資料 4-3 に従って報告があり、了承された。

(2) バイオ基板CS の開発状況

生貝委員より資料 4-4 により、バイオ基板CS の検討結果について概略以下の報告があった。

①疎水性多孔質のミリポア製 PVDF シートの Smooth 面 (裏側) にコレステロール膜を形成しその上にタンパク質 (proVCH) で処理後、更にこれに銀イオン電解液を $5 \mu\text{m}$ 及び $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターで 2 回ろ過した液で銀イオンを結合させたものの抗菌性能を大腸菌を用いて測定したところ抗菌活性値は 2.91 であった。このとき、コレステロール層を Monolayer にした場合は抗菌活性値が 3.37 であった。

②上記試験で、PVDF シートの Rough 面 (表側) を使用した場合の抗菌活性値は 2.76 であった。

③上記試験で得たCS の表面 (抗菌試験前) を ESCA で分析したが、いずれでも Ag のピークは検出されず、ESCA 検出感度以下の微量の Ag により抗菌効果が発現していると思われる。

④①と同じ構成 (ただし基材は PVDF 膜以外に帯電処理ナイロン膜も使用) で銀以外の金属イオンを用いて同様なCS を試作し、抗菌効果があるものが認められた。

協議の結果、上記報告について了承された。

(2) バイオ基板以外のCS 開発状況

山本 (則) 委員より資料 4-5 に従い、以下の報告があった。

- 1) 今年度WGでCS のアイデアを出し合い、候補となったものについて調査した結果、銀系無機抗菌剤の樹脂練り込みプレートに絞り込んだ。

- 2) 樹脂練り込みプレートのうち銀系無機抗菌剤として銀ゼオライトを用いたCSについては、抗菌剤添加量を変えたプレートをサンドペーパーで研磨し抗菌性を評価し、抗菌活性値2～3が得られる抗菌剤添加量は黄色ブドウ球菌では1.3～1.4%、大腸菌では1.1～1.2%であることが判明した。
- 3) 銀系無機抗菌剤が銀リン酸ジルコニウムの場合、前回試験結果により0.275%添加量の樹脂プレートを作成し、研磨方法としてサンドペーパー研磨、表面切削、サンドブラストを検討した。抗菌活性値はサンドペーパー研磨品は約2、切削はほぼゼロ、サンドブラスト研磨約1と表面研磨法による差が出た。この結果を解析するため研磨プレート表面をSEMにより観察したところ、プレートの表面近傍と内部の抗菌剤濃度はほぼ均一であり、サンドペーパーで抗菌性能が発現したのは表面スキン層が除去されたためではなく研磨で掻き落とされた抗菌剤が発生した溝に留まっているためであること、切削した場合には樹脂内部に存在していた抗菌剤が掻き落とされた状態になっていることが推測された。

この報告について以下の質疑応答があった。

- ③ Q：切削機はどのような機構のものか？→A：詳しくは不明だが刃物のついた装置で表面を削る方法である。
- ④ Q：サンドペーパーの研磨剤はなにか？→A：一般的にはコランダムかダイヤモンドなどが使われているようであるが、今回使用したサンドペーパーはホームセンターで売られているもので内容は不明。

協議の結果、上記報告について了承された。

3. 今後の進め方について

山本（則）委員より資料4-6により来年度の研究計画について以下の提案があった。

(1) バイオ基板CS

- ① 抗菌金属イオンは当面銀イオンに絞って検討する。銀イオンは希薄濃度のものでもテストする。
- ② PVDF基板として、従来の多孔質膜に替えフラットシートでもテストする。
- ③ 分析機器を用いて、CSを構成する基材、コレステロール、タンパク質に担持された銀量を測定し、来年度前半（8月末）はこのCSの技術的検証に当てる。
- ④7月以降は製造委託先の調査や製造技術の確立についても検討する。

この提案について以下の意見があった。

- 1) 来年度は最終年度ではあるが、あせって先を急ぐのではなく銀の担持量やその挙動など基礎技術の一つ一つ検証していくことが必要ではないか。
- 2) 実用化を目指すのであれば、コスト的な見通しを持っておくことが必要である。材料費価格位は早めにチェックしておいて欲しい。

(2) 練り込み樹脂プレートCS

- ① 銀系抗菌剤は銀リン酸ジルコニウムに絞る。
- ② 研磨方法については従来より抗菌剤量を増加した（0.4～0.5%）プレートで表面切削を行う方法を中心に検討したい。
- ③ 9月以降に量産試作や劣化試験等を開始し製造技術の確立を目指す。

この提案に対し以下の意見があった。

- 1) プレート表面からの銀の溶出量を測定することで再現性の確認ができればこのCSの価値が上がるし、信頼されるので検討して欲しい。

バイオ基板および練り込み樹脂基板の今後の開発計画は、以上の意見を参考にしながらを原案通り進めることが承認された。

4. 成果中間報告書について

山本（則）委員から資料4-7に従って成果中間報告書の目次案について説明があり、今後この目次案にそって成果中間報告書をまとめることが承認された。

なお、成果中間報告書の内容については高麗委員長に一任することが決定した。

5. その他（来年度の委員会の開催予定）

平成17年5月16日の週に第1回のワーキンググループ会議を開催し、6月13日の週（候補6/16、17）に第1回委員会を開催する予定。第1回委員会については途中退席した高麗委員長のご都合を確認して決定する。

以上

[添付資料5]

抗菌試験用コントロールサンプル(CS)開発委員会ワーキンググループ
H16年度 議事録

2004.8.31

第1回ワーキンググループ(WG)議事録

- 1)日時 2004. 8. 6(金) 13:30~16:00
- 2)場所 (財)日本食品分析センター 名古屋支所 会議室(2F)
- 3)出席者(順不同、敬称略)
メンバー:今井 茂雄、生貝 初、山本 幸一、八代 敏晴、城戸 勝治、和田 邦身、
山本 則幸(文責)
オブザーバー:林 進、藤本 嘉明 * 欠席 杉本 茂
- 4)議事
 - (1)自己紹介
出席者全員が自己紹介した。
 - (2)委託業務概要、実施計画概要
本委員会事務局である林オブザーバーより、添付資料1に従って説明があった。
 - (3)過去の検討経緯
昨年度まで実施されていた経済産業省の委託調査研究である「不確かさの推定？」における検討状況概要について今井委員より説明があった。要点は下記のようなものである。
不確かさの推定を行なうにあたっては、標準試験片が必要であるため、主に次の3つについて検討を行なった。
 - ① ガラス基板に銀イオンをイオン注入する方法
抗菌活性値はバラツキが少なく安定しているが、0.5程度の値しか出なかったこと、及び高コストであることから、実用性が乏しいと判断した。
 - ② ガリウム砒素基板
抗菌活性値が約2.6で安定している。しかし高価であるため、繰返し使用できるのであれば標準試験片として使用可能であるが、菌液と接触することにより成分の溶出が起り、1回しか使用できない。よって、実用性が乏しいと判断した。
 - ③ アクリル樹脂コーティング
有機物に銀イオンを結合した抗菌剤を溶解性アクリル樹脂に添加し、樹脂基板にコーティングした。狙った抗菌活性値が再現良く出来なため、作製したものをすべて評価し適切な抗菌活性値のものを選別しなければならないこと、及び溶解性があるため、JIS通りの方法で評価が出来ず、下側にカバーフィルム、上側に試験片を置くというアレンジが必要なことから、標準試験片としては問題が多い。
 - (4)CS案(CS開発計画その1)について
生貝委員より、添付資料1に従って説明があった。さらに、本委員会での指摘事項に対する検討結果も併せて報告があった。
コレステロール結合活性を持つコレラ菌毒素の大量分取方法について目処が得ら

れた。

コレラ菌毒素を途中で切断し、N末側に別のタンパク質を2つ結合させることにより、塩基性物質を担持させることの見込を得た。金属イオンが結合できることは確認済。

検討を進めるに当たって、宇都宮大学の加藤先生、及び北里大学の岩橋先生にご協力いただける約束を取り付けてある。

(5) その他のCS案について

山本リーダーの、本委員会で説明したCS案の説明後、その他アイデアについてディスカッションを行なった。提案されたアイデアは(表1)参照。

(6) 今後の進め方

(6-1) CS開発計画その1(以下、バイオ基板という)について

- ・試料作製及び抗菌力予備評価は生貝メンバーが、試料の物性評価は今井メンバーが、抗菌力評価は杉本メンバーがそれぞれ中心に進める。
- ・生貝メンバー、今井サブリーダーで具体的検討内容を詰めて、スケジュールを作成する。
- ・宇都宮大学の加藤先生、及び北里大学の岩橋先生には、生貝メンバーを通じ、協力を正式にお願いする。協力に関して必要な費用の金額、及び名目(交通費、委託研究費等)については、生貝メンバー、今井サブリーダーが両先生と調整後、山本リーダー、今井サブリーダー、及び本委員会事務局で正式に決定する。
生貝メンバーが名古屋地区以外で打合せ、試験等を実施する場合は、交通費を支払う。

(6-2) その他CSについて

表1のように進めることとした。

(6-3) 共通事項

- ・資料購入、資料作製、抗菌力評価等、必要な経費は外注先を一本化し、すべてそこを通して行なう。外注先としてINAX(株)を候補とし、今井メンバーが社内調整する。
- ・CS開発は、本WGと抗菌技術委員会が連携して行なう。抗菌技術委員会では、JN LA機関を中心に抗菌力評価を行なう。バイオ基板、及びガラス系サンプルについては、杉本メンバーが橋渡し、取り纏め役とする。樹脂プレート、抗菌ステンレスは和田メンバーが橋渡し、取り纏め役とする。抗菌技術委員会メンバーへは、山本リーダー(=抗菌技術委員長)より、再度協力要請する。
- ・次回本委員会(10/28)に、途中経過をまとめて報告する。
- ・次回ミーティングは2月を目処とし、本委員会への初年度分の報告事項をまとめる。その間はメールのやりとり等で実務を遂行する。

—以上—

表1 CS

CS案	検討内容	検討可否	実施計画
樹脂練込みプレート (表面研磨)	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌剤を練り込んだ場合、表面(スキン層)のみ特異な状態なので、それを研磨で除去すれば、均一なCSが出来るのではないか。 ・インジェクション成型では、金型内ですべて均一ではないので、CSになり得るかどうか疑問である。 ・微小領域では不均一でも5cm□レベルでは均一性が出せるのではないか。 ・樹脂の選定が非常に大事である。 ・同じ樹脂グレードでも添加剤等は変わることがある。 	○	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌剤として、銀リン酸ジルコニウム(東亜合成)、及び銀セオライト(カネウ化成)を用いて試験を行なう。 ・樹脂はLLDPEを用いる。 ・ヘキサケカルで樹脂グレードを選定、M/Bを作製する。 ・東亜合成、カネウ化成でプレートを作製、表面研磨し抗菌力評価を行なう。 ・抗菌力評価は、必要であれば和田メンバーを取り纏め役とし、抗菌技術委員会へ委嘱する。
抗菌板ガラス (表面研磨)	<ul style="list-style-type: none"> ・組成的には検討することにより抗菌活性値2程度のもので得られる可能性はある。 ・工業的生産を考えると、CS程度の少量では、実質上生産は無理である。 	×	
抗菌釉薬 (表面研磨)	<ul style="list-style-type: none"> ・組成的には検討することにより抗菌活性値2程度のもので得られる可能性はある。 ・これまでの知見より、釉薬の厚さ方向でガラス成分は微妙に異なるため、安定した抗菌活性値は出せないのではないか。 ・工業的生産を考えると、CS程度の少量生産は難しいのではないか。 	×	
市販工学ガラス	<ul style="list-style-type: none"> ・市販の光学ガラスは重金属成分が配合されているものがあるため、抗菌性能を示すものがあるのではないか。 ・高価ではあるが市販されているので、実用レベルでの材の入手も可能である。 	△	<ul style="list-style-type: none"> ・市販品を購入し、抗菌性能を評価する。その結果を見ただ上で検討を継続するか否か判断する(石塚硝子)。 ・抗菌力評価は、必要であれば杉本メンバーを取り纏め役とし、抗菌技術委員会へ委嘱する。

表1(つづき) CS

CS案	検討内容	検討可否	実施計画
抗菌ステンレス (表面研磨)	<ul style="list-style-type: none"> ・抗菌ステンレスにもいろいろな方法が採用されており、CSとなりうる可能性はある。 ・樹脂プレートとは異なり、簡単に条件検討は出来ない。 	△	<ul style="list-style-type: none"> ・市販品を入手し、抗菌性能を評価する。その結果を見た上で検討継続可否か判断する(東亜合成)。 ・抗菌力評価は、必要であれば和田メンバーを取り纏め役とし、抗菌技術委員会へ委嘱する。
亜鉛メッキ、亜鉛板	<ul style="list-style-type: none"> ・亜鉛も銀程ではないが、抗菌効果があるため、適当な抗菌活性値が出るのではないか。 ・表面酸化されやすいので、再現あるサンプルにするには表面が完全に酸化された状態が好ましい。 ・酸化亜鉛はほとんど水溶性がなく、抗菌効果は期待できないのではないか。 	×	
銀含有アルマイト	<ul style="list-style-type: none"> ・銀を含有させた抗菌アルマイト加工した製品が市販されている(詳細は不明)。 	△	<ul style="list-style-type: none"> ・メーカーより情報を聴取し、適当な試験サンプルが入手可能であれば入手し抗菌性能を評価する。その結果を見た上で検討を継続するか否か判断する(カネホウ化成)。 ・抗菌力評価は、必要であれば和田メンバーを取り纏め役とし、抗菌技術委員会へ委嘱する。
銀担持アクリル	<ul style="list-style-type: none"> ・本委員会で提案があったため、メーカーに聴取。繊維に銀を担持させる方法で作製しているので、フィルム化は出来ないとのこと。 	×	
インクジェット	<ul style="list-style-type: none"> ・インクジェットプリンターは精度が高いので、抗菌剤を顔料の替わりに使用することで、制御されたCSが得られるのではないか。 ・微粒子の抗菌剤が必要となるが、ゾル状の銀系抗菌剤が市販されているので、使えるのではないか。 ・バインダー(ビヒクル)が必要となるので、やはりスキ層が問題になるのではないか。 	△	<ul style="list-style-type: none"> ・メーカーより情報を聴取し、今後、検討すべき技術か否かを半判断する。

第2回ワーキンググループ(WG)議事録

- 1) 日時 2004. 12. 1(水) 13:30~16:30
2) 場所 東亜合成(株) 名古屋支店 会議室
3) 出席者(順不同、敬称略)
メンバー: 今井 茂雄、生貝 初、八代 敏晴、城戸 勝治、和田 邦身、杉本 茂、
山本 則幸(文責)
オブザーバー: 藤本 嘉明 * 欠席 山本 幸一、川合 晶子

4) 議事

(1) 前回議事録確認

議事録案を正式な議事録にすることが承認された。

(2) 検討状況報告

(2-1) バイオ基板

生貝メンバーより資料を元に報告がなされた。

PVDF基板上に、配向させたコレステロール膜形成、さらにその上に配向させたタンパク質膜(proVCH)を形成させた。銀イオン電極の電気分解により得た銀イオン含有水溶液を用いて、その濃度を振って膜上に銀イオンを吸着させた。これらを用いて抗菌力評価を行なったところ、銀イオン濃度106mMの溶液を用いた場合に抗菌活性を示した(生菌数: 検出限界以下)。比較試験としてタンパク質膜を形成させないものに銀イオンを吸着させて抗菌力評価を行なったところ、約1の抗菌活性値を示した。

以上の結果から、上記方法でCSを作製できる目処が得られた。コレステロールにも銀イオンが吸着されるため、表面に結合部位が出ないようにタンパク質膜で覆うことが必要であることがわかった。以下に主な質疑応答結果を示した。

- ・コレステロールにも銀イオンが結合できるならタンパク質膜はなくてもよいのではないか。
⇒コレステロール膜では吸着させる銀イオンを制御できず、タンパク質膜が必要である。
- ・PVDF膜は薄いため使い勝手が悪い。代替材料はないのか。
⇒コレステロールを配向させるのは、疎水性の多孔質膜が必要である。今のところこれ以外に良いものが無いが、もしあれば変更可能である。
- ・抗菌活性値を制御するには、吸着させる銀イオン量をコントロールする必要がある。その方法として、吸着させる銀イオン量を制御する方法と、吸着サイトの量(=タンパク質量)を制御する方法が考えられるがどうか。
⇒工業的な製造方法を考えると(銀イオン含有水溶液に基板をディップ)、後者の方法が好ましい。しかし前述のように、コレステロール膜を完全に覆う必要があるため、吸着サイトの数をコントロールしたタンパク質で膜を形成する等の工夫が必要である。
- ・抗菌力評価方法が、JISと若干異なるところがあるが、その影響はないか。
⇒今後、JISに沿って試験を行なうようにする。また、ある段階では、複数のJNLA機関で評価してもらう。

(2-2) バイオ基板以外(銀リン酸ジルコニウムを用いた樹脂練りこみプレート)

山本(則)より、資料を元に報告がなされた。

銀リン酸ジルコニウムを用いた樹脂練りこみプレートの検討において、先の第2回本委員会資料で誤記があった。添付資料2-7、2/8頁、図において、増減値差ではなく、生残菌数がプロットされている。正しくは、増減値差が4~5である。

第2回本委員会で報告した資料の概要説明後、その後の検討状況について説明した。本CSにおいては、表面研磨がポイントであるため、業者に委託しバフ研磨を行なった。抗菌力評価を行なったところ、大腸菌においては、全く抗菌活性値を示さないものと、サンドペーパー研磨と同等のものがあった。黄色ブドウ球菌については、サンドペーパー研磨より約1桁低い結果となった。以下に主な質疑応答結果を示した。

・バフ研磨品でバラツキが出たのはサンプルバラツキではないか。
⇒同じプレートから切り出して比較評価として行なったサンドペーパー研磨品は、先の評価と同等の結果となっている。また、バフ研磨は研磨機を人が持って研磨をしていると思われるためバラツキの要因を含んでいる。これらのことより、バラツキの原因はバフ研磨にあると考えたほうが妥当である。

(2-3) バイオ基板以外(銀ゼオライトを用いた樹脂練りこみプレート)

八代メンバーより、資料を元に報告がなされた。

第2回本委員会で報告した資料の概要説明後、その後の検討状況について説明した。用いる抗菌剤を、銀担持量の少ない1種に絞り(添加量を多くすることができるため、プレート作製におけるバラツキを低減できる)、前回結果を踏まえて、最適担持量の検討を行なった。その結果、最適担持量が1~2%の範囲内にあることがわかった。現在、その範囲内で0.2%刻みで評価実施中である。

(2-4) バイオ基板以外(インクジェット方式)

今井メンバーより報告があった。セイコーエプソンに対して可能性を打診。現在、返事待ちである。精度の高い方法であるため、基板上に必要な抗菌成分量を載せることが出来ると思われるが、業者が工業的に実施してもらえるかどうかという問題がある。

(2-5) バイオ基板以外(ガラス系、金属系)

ガラス系の検討担当者である山本(幸)メンバー欠席のため、山本(則)より第2回本委員会で報告した資料の概要説明を行なった。山本(幸)メンバーの意見も含め議論した結果、ガラス系材料の検討はひとまず終了とした。

抗菌ステンレス、抗菌アルマイトについても市販製品はあるものの、抗菌力の制御が十分なされていないこと、及びメーカーサイドの協力が得られないことから検討を終了することとした。

(3) 今後の進め方について

- ・バイオ基板と、樹脂練り込みプレートの2つに絞って検討することとした。
- ・樹脂練り込みプレートの検討は、銀リン酸ジルコニウム、及び銀ゼオライトの2種について平衡して進め、今年度末には1つに絞り込む。

(3-1) バイオ基板

- ・コレステロールの濃度、及びproVCHの濃度を振って、抗菌性能への影響を調べる。
- ・proVCHの銀イオン吸着サイト数の制御について検討する。
- ・現在使用のPVDF膜のSEM観察を行なう。
- ・CS上の銀イオン定性、定量を試みる(EPMA等)

- ・工業的製造方法をイメージした製造フローを作成する。そのフローを元にメンバー全員で委託先の調査を行なう。
- ・CS開発に協力の得られている大学の先生に対して、こういった形で費用を支払うことが出来るか事務局で検討する。

(3-2) 樹脂練り込みプレート

- ・工業的に銀リン酸ジルコニウム含有PEプレートを作成し(含有量0.275%)、表面研削を業者委託により実施する。
- ・精度の高いバフ研磨先、およびサンドブラストについて調査を行ない、可能性があれば上記プレートを委託加工する。
- ・表面加工品の予備評価を行ない、可能性があれば、複数のJNLA機関で評価を行なう。
- ・銀ゼオライトの添加量を1~2%の間で0.2%刻みで振り、抗菌活性値2程度を発現する添加量を把握する。
- ・銀リン酸ジルコニウム系で良い表面加工条件が得られれば、銀ゼオライトについても同様に評価する。

(4) CSの有用性について

本調査研究は、製品評価技術基板機構の委託業務であるが、それ以外への展開について意見交換した。その結果、次の期待ができると思われる。今後、工業的なCS製造を検討する必要があるが、その際に数量的見通しを明らかにすることが重要であるため、今後さらに見通しの精度を高めていく。

- ・NITEの技能試験片
- ・抗技協内の活動における標準試験件(評価技術管理委員会、管理責任者講習等)
- ・抗技協メンバーの自主管理のための標準試験品の販売
- ・ISO化された後の、外国の機関からの引き合い
- ・精度の高いCSが出来れば、ポジティブサンプルとして利用されることも期待できる。そうなれば使用量は格段に増加すると考えられる。

(5) その他

第3回WGは、2005. 2(第4回本委員会前)か、2005. 4(来年度第1回本委員会前)に実施する。

—以上—

第3回ワーキンググループ(WG)議事録

- 1) 日時 2005. 2. 7(月) 13:30~17:00
 2) 場所 (財)日本食品分析センター 名古屋支所 会議室
 3) 出席者(順不同、敬称略)
 メンバー: 生貝 初、川合 晶子、今井 茂雄、八代 敏晴、和田 邦身、杉本 茂、
 山本 幸一、山本 則幸(文責)
 オブザーバー: 松岡 英明、藤本 嘉明、林 進 * 欠席 城戸 勝治

4) 議事

(1) 前回議事録確認

議事録案を正式な議事録にすることが承認された。

(2) バイオ基板検討

生貝先生より資料を元に報告がなされた。

Agイオンが、PVDFに結合する、あるいは不溶性化合物として析出するため、Ag以外の金属について検討を行なった。銅、亜鉛、コバルト、ニッケルについて検討を行なったところ、亜鉛、コバルト、銅ではほとんど抗菌性を示さなかったが、ニッケルでは抗菌性が発現した。前3者の水溶液はpHが約3であるため、proVCHIに含有されているヒスチジン基(-NH基)とキレート結合を生成しないが、ニッケル塩水溶液はpHが6.7であるため、キレート結合が生成されたためと考えられる。

ニッケル結合品の抗菌性をあげるため、コレステロール濃度、ニッケル濃度、及びproVCH結合時間を振ってみたが、抗菌性の向上は見られなかった。PVDFにニッケルを直接処理したもので抗菌性が見られた。これは両者に非特異的結合が現れたと推定されるため、基板としてPOSITIVEに帯電したナイロン-66を用いたところ、基板との非特異的結合は生じなかったと思われる。さらにニッケルの濃度を10mMから50mMに上げたところ、約2桁近い抗菌活性が得られた。しかし、ナイロン66+ニッケル、ナイロン66+コレステロール+ニッケルも同等の抗菌活性を示したことから、ニッケルイオンの挙動は明らかではない。

以下に主な質疑応答結果を示した。

- ・先の本委員会での指摘事項に対する検討が十分なされていない。それぞれの課題について検討を行ない、ひとつずつ結論付けて行くことが重要である。
 ⇒再度銀について、指摘事項に沿った検討を行なう。
- ・銀イオンがPVDFやコレステロールと結合するのであれば、PVDF/コレステロール/タンパク質/銀という4層構造でなく、もっと簡単な系でCSが出来る可能性があるのではないか。
 ⇒銀イオンがそれらに結合しているのではなく、銀はイオンとして安定して存在せず、例えば不溶性の酸化銀などは析出していると思われる。そういった析出物では銀担持量を制御できないため、4層構造は必要と考えられる。
- ・銀電極を用いる方法で安定した銀イオン溶液が生成できないのであれば、銀-アンモニウム錯体溶液を用いれば可能ではないか。

- ⇒pHが高いと-NH基とキレートを生成しない懸念もあるが試してみる。
- ・pHを中性付近に保つためには、用いる銀イオン含有水溶液をの濃度を数10ppbレベルまで下げたらどうか。塩化銀などは不溶性であるが、ppmレベルでは溶解している。
- ⇒塩化銀の飽和溶液を作製し、PB、NaOH、NH₃水などでpH調整し、精密ろ過し水溶液で試験してみる。
- ・CS状に結合した銀の定量、及び結合状態の確認ができないか。
- ⇒上記のように、低濃度の銀溶液を用いれば、担持前後の液中の銀イオン濃度が定量できると思われる。また、CS上の銀を硝酸等で溶出させ、必要なら濃縮することにより定量可能ではないか(計算により定量可能なレベルかどうか確認が必要)。
- ESCAを用いれば、銀の価数を調べることも可能である。しかし観察部位は平滑であることが必要であるため、ポーラスのPVDF基板では困難である。
- ・コレステロールが基板としっかり結合するためには基板の疎水性が必要とのことであるが、ナイロン-66はPVDFより親水性が高いため、結合性が低減する方向ではないか。既存のPVDFとコレステロールの結合性が高いのは、基材の化学的性質によるのではなく、細孔部分に吸着されているためではないか。
- ⇒平滑PVDF基板を用いて確認する。

以上の議論を踏まえ、今後次のように進めることとした。

- 1) 抗菌金属イオンを当面銀イオンに絞って、検討を行なう。
- 2) PVDF基板としてポーラスなフィルターだけではなく、シートを用いる(市販あり)。
- 3) ①PVDF/Ag、②PVDF/コレステロール/Ag、③PVDF/コレステロール/タンパク質/Agのサンプルを作製し、それぞれの材料への銀の担持量を調べる。
- 4) 銀イオン溶液として、銀-アンモニア錯体溶液、及び低濃度銀イオン溶液を用いる。
- 5) 基板上の銀の定量は、次の方法で試みる。
 - 1) 希薄溶液を用いることにより、吸着前後の銀イオン濃度の差より算出(ICP)。
 - 2) 濃硝酸等で全量溶解させ、必要により濃縮し測定する(ICP)。
- 6) 平滑基板サンプルでESCAを行なう。
- 7) ドライバッグ(PVF)が基材として使用できるかどうか確認する。さらにその他疎水性基材についても検討する(PTFE、PE、PP等)。

(3) 樹脂練り込みプレート

八代メンバーより、銀ゼオライト練り込みプレートに関し報告がなされた。

これまでの検討結果を踏まえ、抗菌剤の最適添加量を調べた。その結果、黄色ブドウ球菌では1.3~1.4%、大腸菌では1.1~1.2%が適当であることがわかった(サンドペーパー研磨の場合)

山本(則)よりメンバーより、銀リン酸ジルコニウム練り込みプレートに関し報告がなされた。

表面切削加工では、抗菌性がほとんど発現されなかった(表面未処理品と同等)。サンドブラスト加工では、サンドペーパー研磨よりやや低い抗菌活性が確認された。抗菌性能発現の有無の原因を調べるため、SEMによる表面観察を行なった。その結果つぎのことが明らかとなった。

- 1) プレートの表面近傍と内部は、ほぼ同じ状態で抗菌剤粒子が存在してる(練り込みは均一)。
- 2) 表面切削することにより、樹脂内部に存在していたノバロン粒子も掻き落とされ、結果的に粒子の状態は成形表面とほぼ同じになる(表面粗さは異なる)。
- 3) サンドペーパー研磨品で抗菌性能が発現したのは、当初考えていた表面スキン層が

除去されたためではなく、研磨で掻き落とされたノバロン粒子がミクロンオーダーの溝の内部に留まっていたためと考えられる。

現在、サンドペーパーの粒度を下げ、その影響を調査中である。また、サンドブラスト処理品の表面観察も実施中である。

以下に主な質疑応答結果を示した。

- ・抗菌剤添加量を増やすことにより、表面研磨なしで安定した抗菌活性値を発現できないか。
⇒これまでの経験から、抗菌活性値2付近では、プレート作製の再現性はあまりない。CSとするのはバラツキが大きい。
- ・表面切削した場合、未処理の表面と同等の抗菌剤の分布であるならば、もっと添加量を増やして表面切削したらどうか。そうすれば表面特異の性質が除去され、添加量に見合った抗菌性が発現できるのではないか。
⇒可能性があると思われるので、是非検討を行なう。
- ・現在、抗菌剤2種で検討しているが、ここで1種に絞ったらどうか。
⇒検討している2種は粒径が異なるため、表面処理で違った挙動を示す可能性はあるが、当面、検討の進んでいる銀リン酸ジルコニウムに絞って検討することとする。

以上の議論を踏まえ、今後次のように進めることとした。

- 1) 抗菌剤として銀リン酸ジルコニウムに絞って検討する。
- 2) サンドペーパーの粒度の影響を調べる(抗菌性、表面観察)。
- 3) サンドブラスト加工の検討を継続して行なう(抗菌性、表面観察)。
- 4) 抗菌剤添加量を増加し、表面切削を行なう方法を検討する。

(4) H16年度決算、中間報告

H16年度のおおよその使用実績が山本(則)メンバーより報告された。若干の微調整が残るが、概ね了承された。

受託元のNITEに対して、決まった書式特にないが、中間報告書の提出が必要である。提出期限:2005. 3. 25。報告書書式、執筆担当は後日山本(則)より連絡する。ただし目次案を早急に作成し、次回本委員会(2005. 2. 18)で報告する。

(5) H17年度スケジュール

H17年度開発スケジュール案を、作成し、次回本委員会(2005. 2. 18)で報告する。

—以上—

調査研究の実施能力 (平成16年6月現在)

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

1. 平成13年度経済産業省委託独立行政法人製品評価技術基盤機構再委託事業「細菌を用いた評価法におけるトレーサビリティの確立と不確かさの推定に関する調査研究」(平成14年3月成果報告書提出)を受諾し、調査研究を実施した。
2. 平成13年度での調査研究内容は、「標準試験片に要求される項目の洗い出しと作製法の提案」「標準試験片の検討」「標準試験片の仕様」「試験片の抗菌効果(安定性)の確認」であり、それぞれにおいて所定の成果をとりまとめた。特に、本調査研究の最終目標である認証標準物質を用いた「不確かさ」の推定方法と考え方のまとめに至るステップとして、2次標準物質の作製をおこなうとともに、不確かさを見積もるための特性要因図から上位3つの要因(試験菌株、培地、培養容器)を抽出し抗菌性試験結果に与える影響を評価した。
3. 平成14年度での調査研究内容は、13年度の結果を受け、「2次標準物質の完成度を高める」、「1次標準物質作成製法のアイデア出しと、ナノテクノロジーを駆使して1次標準物質の試作・作製」、「1次標準物質と2次標準物質とのSI単位へのトレーサビリティの確立のためのデータ収集と分析」、「海外における環境条件と不確かさ研究調査の状況把握」を行い、所定の成果をとりまとめた。特に、GaAsウエハを用いた1次標準物質候補については、きわめて安定性が高い抗菌力を得ることができた。また、2次標準物質は、水溶性コーティングによる製造法のさらなる改良を継続し、所期の目的に一段と近づけることができた。また、不確かさを見積もる参照法について、斬新なアプローチをすすめた。これらの成果については、本年3月にJNLA技術情報セミナーにて発表する機会が与えられ、高い評価を得た。
4. 平成15年度では、3カ年のまとめとして標準試験片として絞り込んだGaAsウエハ及びAgアクリル系コーティングフィルムの2試験片を用いて抗菌性試験における不確かさの推定のための5試験機関による繰り返し試験を実施した。この不確かさ推定の手順により、抗菌性試験における不確かさ推定の一事例をしめすことができた。

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

5. 平成11年度から12年度において、JIS Z2801 原案作成調査研究の事務局を受諾し、経済産業省「抗菌製品ガイドライン」に示された最短目標スケジュールを遵守し、平成12年12月20日官報公示につなげた。
6. 平成11年度から12年度において、JNLA 技能試験(生活分野 抗菌性試験)のプログラム企画書作成調査研究を受諾し、平成13年2月に報告書を取りまとめた。
7. 平成13年度において、抗菌陽性試験体実用化調査研究を受諾し、所定の仕様成果を取りまとめ、平成13年度実施のNITE抗菌技能試験への標準試験体として供給した。
8. 平成15年度において、経済産業省から基準認証研究開発事業(抗菌加工製品の試験方法の標準化)を受諾し、ISO/TC61/SC6に新業務項目(NWIP)及びWD原案を幹事国(DIN)に提出し、平成16年秋の国際大会での採択を目指している。

以上

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