

# 展望

バイオフィルムの形成と金属材料表面-9

## HACCP対応抗菌エコプレーティングとバイオフィルム Antibacterial Eco-plating Based on HACCP and Biofilm

鈴鹿工業高等専門学校 材料工学科 教授 兼松秀行 Hideyuki Kanematsu  
鈴鹿工業高等専門学校 生物応用化学科 教授 生貝 初 Hajime Ikigai  
(独)物質・材料研究機構 半導体材料研究センター 主席研究員 吉武道子 Michiko Yoshitake

### 1 緒言

抗菌ブームと言われて久しい。時を同じくして、世紀末の90年代、巷ではいくつもの物騒な出来事が平行して起こった。いくつかの食品会社における異物混入や食中毒事件、病原性大腸菌O-157の大流行、多剤耐性菌による院内感染、炭疽菌の問題などなど、一般庶民の健康に関する不安をかき立てる細菌がらみのニュースは後を絶たなかった。一方において日本人は清潔好きという伝説もあり、これらが相乗効果を生み出して、抗菌ブームを押し上げたのかもしれない。しかしながら、細菌と材料との相互作用を学問的に検討することは、広く環境と材料の相互作用を考えることの一環であり、その知見は環境と調和した材料開発を目指す動きにつながるものである。21世紀の我が国は高齢化社会であり、高機能材料に囲まれたある種ストレス社会から成熟した質の高い社会への移行に伴って、機能中心の材料開発から環境と調和した材料開発へと、材料設計のコンセプトをかなりの程度変化させる必要があるといえる。著者らは、抗菌ブームのような“はやり”とは一線を画し、むしろ環境調和・環境負荷低減の視点から抗菌性を見つめ直し、材料と環境のインターフェースである材料表面への抗菌性付与とその成膜プロセスなどを検討してきた。更に最近では、実際の環境において細菌の普遍的な増殖形態の1つと考えられているバイオフィルムと抗菌加工材料との関わりについて検討を始めている。これら著者らの試みを本稿において紹介し読者諸氏のご参考に供したい。

### 2 熱処理合金化めっき法<sup>1-8)</sup>

著者らの抗菌性プレーティングは、食缶、飲料缶に多用されるすずめっきをはじめとして、やや広い用途を持つ亜鉛めっきやニッケルめっきに対して、抗菌性を有する金属元素、

具体的には以前から抗菌性を有することでよく知られている銀や銅といった元素と合金化し、純金属の表面皮膜では発現しえなかった抗菌性を持たせることにある。皮膜の合金化に関しては様々な方法が考えられる。合金めっきはその一つであり、Fig.1の概念図に示すように、水溶液から二種類以上の金属元素を同時に銅などの基板上に電析させるプロセスである。この方法は一段階のプロセスで合金皮膜を形成させることができ、工程がシンプルというメリットがある。しかしながら、実際は二種類以上の金属元素を同時に電析させる条件は限られており、それを可能にするために、シアン化合物など環境によくない錯体化合物を使用しなければならなかったりする可能性がある。環境へ配慮する心遣いが表面処理業界に求められている時代にあって、学問的な興味は別として、これは工業プロセスとしては一つの大きなデメリットであるといえる。そこで既に述べたように、著者らはこのデメリットを解消する熱処理合金化めっきを提案してきた。Fig.2にそのプロセスの概念図を示す。まず二層膜、場合によっては三層以上の多層膜を形成させる工程があり、更に熱処理を行うことにより、これらの表面層を熱拡散により合金化させるのである。この方法では工程は増えるかもしれないが、合金皮膜の構成要素である各金属元素の単相皮膜が、様々な方法により作製可能であるため、環境負荷の低いプロセスが選択可能となる。たとえば、後ほど説明する抗菌性のある銀を皮膜母金属に合金化させる場合には、水溶液で多用されるシア

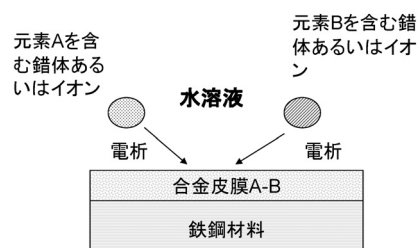


Fig.1 合金電析の概念図

ン化合物では環境負荷性が高く、これを気相からの皮膜作製法の一つであるスパッタリング法を用いて作製した。こういった環境負荷性（および実用的にはコストとの兼ね合いとなろうが）も考慮して広い範囲で皮膜製造法を選択できるという点において、熱処理合金めっき法には大きな利点があるといえる。これに加えて、熱処理によって皮膜の製造条件をコントロールでき、たとえば従来の合金めっき法のような電気化学的な製造条件（電流密度、電圧）によるコントロールよりもより簡単であると考えている。本稿では以下、この熱処理合金めっき法により形成した抗菌性を発現する合金めっきの製造法とその特徴について述べたい。

### 3 HACCP対応抗菌プレーティングとその抗菌性評価

さて、前章で説明した合金めっき製造プロセスを用いることにより、様々な合金めっきを製造することが可能となる。これを食品加工関係に適用しようとしたとき、その安全性に関して、HACCP（Hazard Analysis and Critical Control Point）という考え方がとても重要な意味を持つ<sup>9,10</sup>。Fig.3<sup>11</sup>、

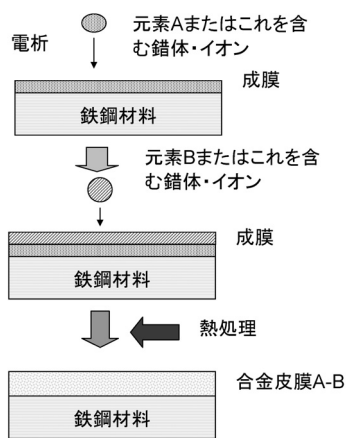


Fig.2 熱処理合金めっき法の概念図

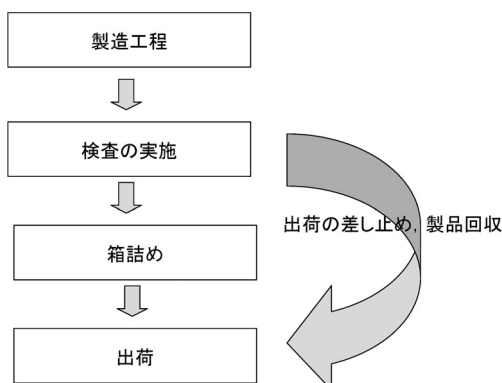


Fig.3 従来の食品加工工程と検査の関係

Fig.4<sup>11</sup>に従来の食品加工工程の安全性と比較したときのHACCPの考え方を模式的に紹介した。HACCPはハセップあるいはハサップと称し、我が国では危害分析重要管理点と訳されている。従来の食品製造プロセスはFig.3に示すように、出荷直後の最終製品に対して抜き取り検査を行い、もし問題があれば出荷差し止めあるいは製品回収という形をとる。これに対して、HACCPではFig.4に示すように、工程の中にいくつかの重要管理点（Critical Control Point：CCP）を設けて、各ポイントにおいて問題が生じれば直ぐに対応する形をとっているため、“想定外”の問題を未然に防ぐことがより容易となる。

このようなHACCPに対応した衛生管理が行われるプロセスにおいて用いられる材料表面はいかにあるべきか、どのように設計されるべきかが、食品加工関係の表面処理技術を考えてとき、きわめて重要である。具体的には、Fig.5に示すように、工程中に摩耗、あるいは腐食により環境中に有害な元素が流失することがないように配慮が必要である。またそれに加えて、抗菌性も併せ持つような表面設計が望ましい。このような表面皮膜を実現することにより、より信頼性・安全性が高い材料の創出が可能となるといえる。

環境への優しさという点では、すずめっきは現状では大きな問題を抱えていない。しかしながら、後述するように、著しい抗菌性は示さないようである。そのため、すずに抗菌性の高い（しかも環境に優しい金属であることが望ましい）金属元素を添加することにより抗菌性を高めた環境に優しいHACCP対応エコプレーティングを検討することとなった。

この検討に先立ち、めっき可能な各種金属の抗菌性の

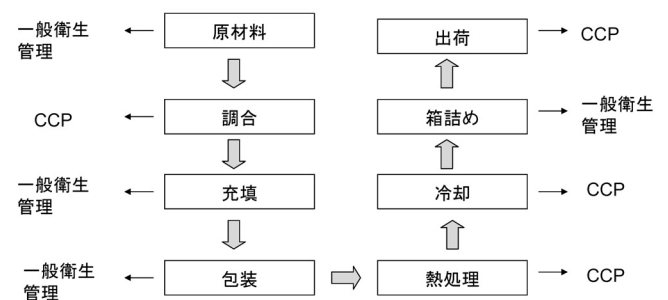


Fig.4 HACCP方式の衛生管理の一例

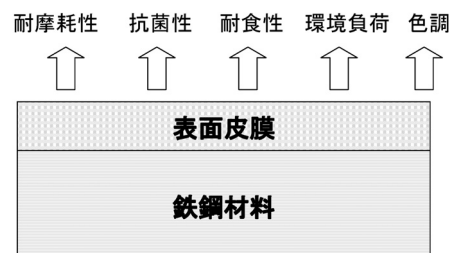


Fig.5 HACCP対応抗菌エコプレーティングに必要とされる特性

チェックを行った<sup>12)</sup>。表面処理において汎用金属の中から、亜鉛、マンガン、ニッケル、銅、コバルト、クロム、チタン、アルミニウム、銀、マグネシウム、鉄を選び、これらの粉末を普通寒天培地に所定濃度添加し、121℃で20分間高圧蒸気滅菌を行った。寒天培地は金属粉末が沈殿しないように攪拌しながら固化させた。前培養した大腸菌 (*Escherichia coli*)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) をそれぞれ  $10^6$ /ml になるように生理食塩水で希釈した菌液 (0.1 ml) を金属粉末入り寒天培地に接種・塗抹後、37℃で18時間培養し、形成されたコロニーを数えた。亜鉛、マンガン、ニッケル、銅、コバルトの粉末をそれぞれ含む寒天培地は金属粉末を含まない培地に比べて著しい抗菌作用が認められた (Fig.6)。同様にクロム、チタン、アルミニウム、銀は、細菌が完全に死滅するまでには至らなかったが、抗菌作用は明瞭に認められた (Fig.7)。一方、マグネシウムと鉄に関しては、添加した金属粉末重量と菌数の減少との間に相関性がなかったため、抗菌性はないと考えられる (Fig.8)。これらの結果から、ここで使用した11種類の金属は、大腸菌、肺炎桿菌、黄色ブドウ球菌に対して、抗菌性を強く示すグループ、やや強く示すグループ、全く示さないグループに分類された。表面皮膜に抗菌性を持たせるために使用する金属を選択するのに際し、この分類を直ぐに適用することは問題があると思われるが、それでも表面設計のための一つの指標となることは確実である。著者らはこれらの結果から想定される金属自体の抗菌性と環境

負荷性を加味しながら、すずとの合金めっきを設計することが望ましいと考えている。

合金めっきを作る前に、金属材料表面の抗菌活性を評価する方法を検討した<sup>13)</sup>。上記の金属粉末の抗菌性評価の結果をもとに、毒性が低く抗菌活性が高いめっき可能な金属として亜鉛を選択した。亜鉛めっきを施した鋼 (JIS SS400) の抗菌性評価を Fig.9 に示すスライドカルチャー法で行った。めっき試料は  $10 \times 10$  mm に切り出したものを用いた。ガラスシャーレの中に置いたV字型ガラス棒の上にスライドガラスを載せ、160℃、1時間乾熱滅菌した。冷却後、スライドガラスの上に大腸菌を塗布した普通寒天培地 ( $1.5 \times 1.5$  cm) とめっき鋼板を順に載せ、乾燥を防ぐために2 ml の滅菌水をシャーレの中に入れて37℃、24時間培養した (Fig.10)。Fig.10- (2) は培養後、めっき鋼板を培地上から取り除いた。その結果、大腸菌は、めっき鋼板を載せていない培地では表面全体に増殖していたが (Fig.10- (1))、めっき鋼板を載せた寒天培地では亜鉛めっきが接触していた部分に増殖は認められなかった (Fig.10- (2))。これは寒天培地上に遊離した亜鉛イオンが大腸菌に作用して抗菌性をしめしていることを示唆している。したがって、スライドカルチャー法によって亜鉛の抗菌作用は簡便な定性的評価が可能であることがわかった。しかしながら、抗菌力が強いめっきを開発するためには、定量的に抗菌性評価をしながら詳細なめっき条件を決定していく必要があると考えられる。そこで抗菌加工製品の定量的な抗菌性評価法として用いられているフィルム密着

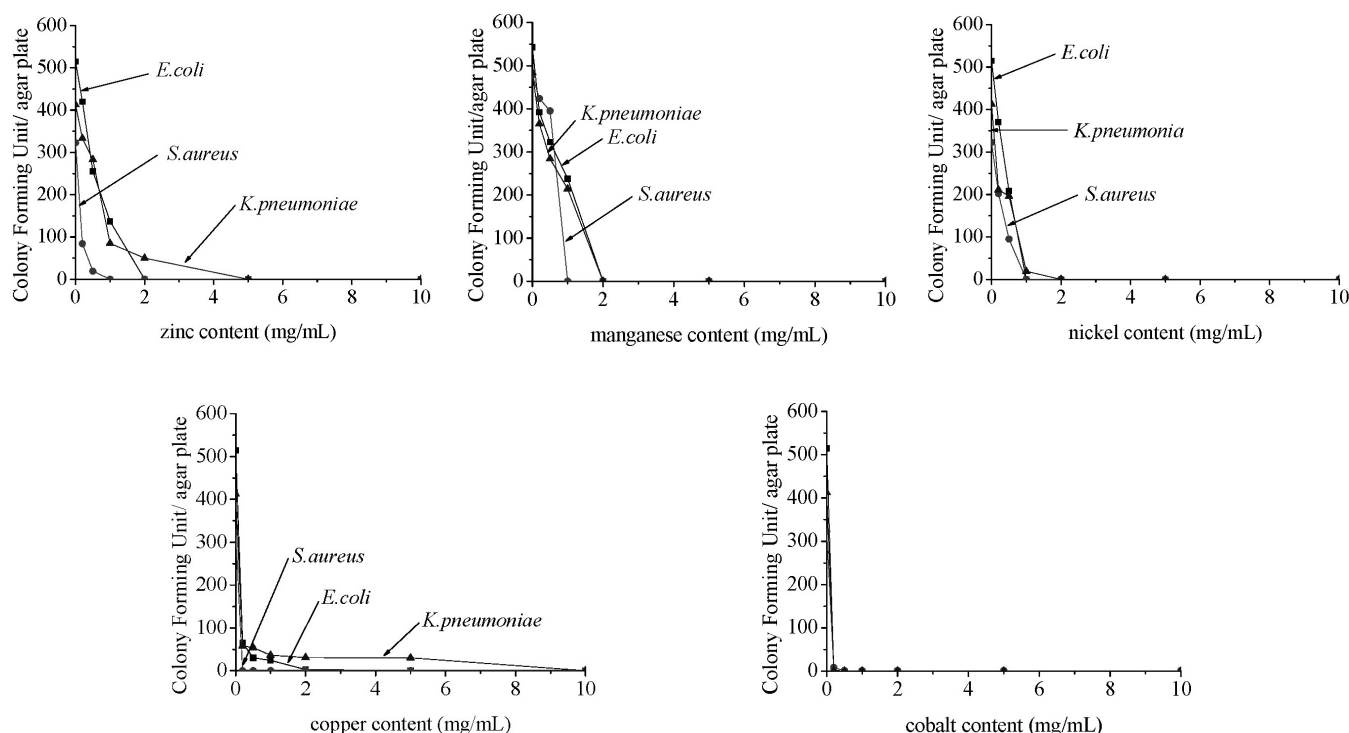


Fig.6 亜鉛、マンガン、ニッケル、銅、コバルト粉末の抗菌作用

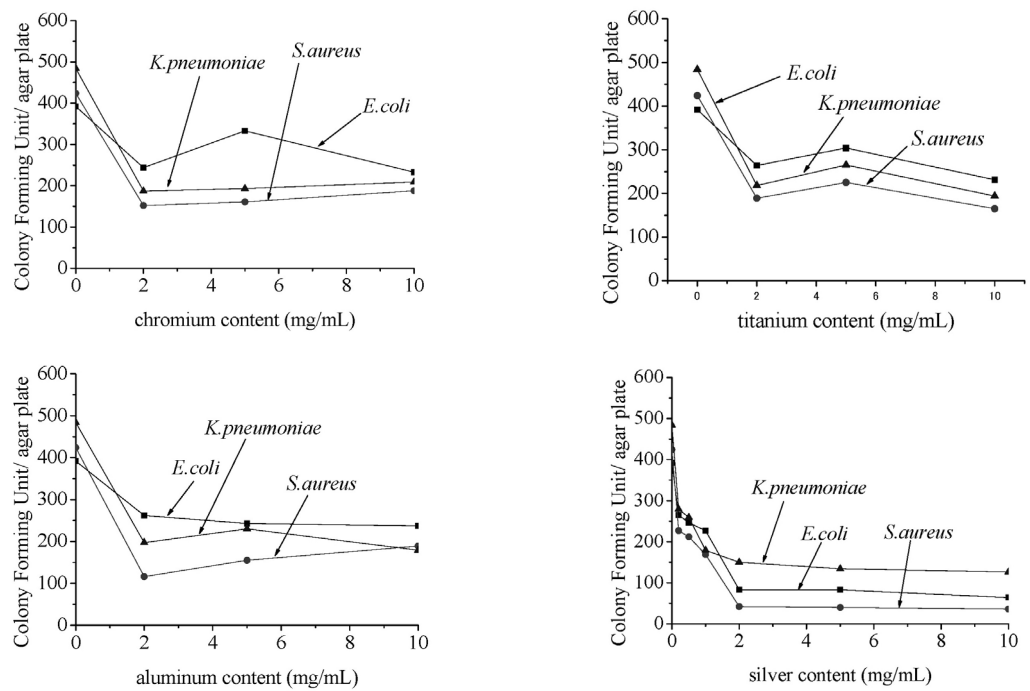


Fig.7 クロム、チタン、アルミニウム、銀粉末の抗菌作用

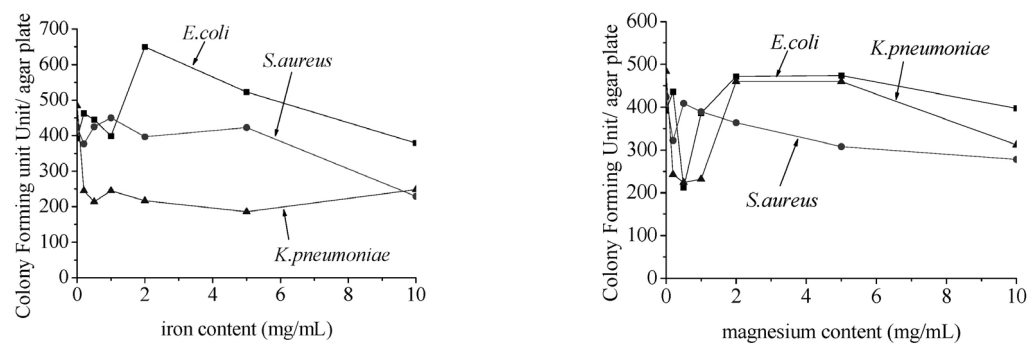


Fig.8 マグネシウム、鉄粉末の抗菌性評価

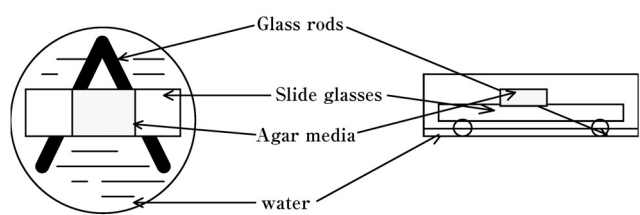
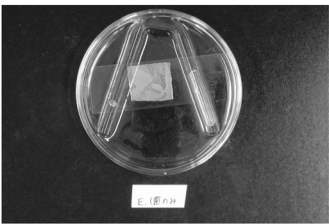


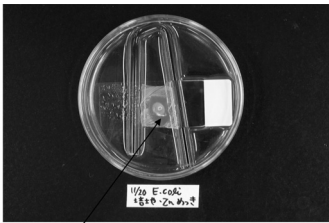
Fig.9 スライドカルチャー法の概念図

法<sup>14)</sup>による抗菌試験をめっき銅板に対して行った。

フィルム密着法はJISにおいて規格化されたJIS Z2801 (抗菌加工製品—抗菌性試験法・抗菌効果) による抗菌試験法である。フィルム密着法 (一部改変) を簡単に紹介すると、まず対象とする細菌を10 mlのブイヨン中で35℃、18時間培養し、滅菌水を用いて10<sup>5</sup>/mlまで希釈する。この細菌懸濁液400  $\mu$ lをめっき銅板 (5 cm×5 cm) 上に滴下し、水分の蒸発を防ぐために表面をエタノールで殺菌したポリエチレン



(1)培地のみ



垂鉛めっき接触部分  
(2)垂鉛めっき銅板を置いた培地

Fig.10 スライドカルチャー法を用いた垂鉛めっき銅板の抗菌性評価



フィルム (4 cm × 4 cm) で覆う。このめっき銅板を滅菌シャーレの中に移して、相対湿度 99 %、35℃で 24 時間保持する。フィルムと銅板に付着した細菌は 0.2 % Tween 80 を加えた 0.9 % 食塩水 (10 ml) を用いてプラスチックシャーレ内で十分に洗い流す。この細菌懸濁液 (100 μl) を普通寒天培地に接種しコンラージ棒を使って塗り広げた後、35℃、1 晩培養する。翌日、寒天上に形成された細菌のコロニーを数えてコロニー数の減少によって抗菌活性を評価する。Table.1 に本法を用いて大腸菌に対するすずめっきの抗菌活性を評価した結果<sup>15-18)</sup>を示した。既に述べたように、すずめっきではコロニーの減少が見られず、抗菌性を示さないことは明らかである。

次に、抗菌作用がないすずめっきに、抗菌活性が高い銅、銀を合金化させた試料を熱処理合金化めっき法により作製して、どの程度抗菌性が付与されるかどうかをフィルム密着法により検討した。Fig.11、Fig.12 に銅めっき銅板、銀めっき銅板<sup>19)</sup>の合金めっきが形成される様子を模式的に示す。Fig.11 の場合は構成層すべてがめっきで形成されたが、Fig.12 の場合は、スパッタリングによって銀の単相膜が形成された。しかしながら、いずれの場合も、水溶液からのめっきのみで構成可能であるし、またスパッタリングのよう

な気相からの成膜およびその他いかなる方法での作製が可能である。最終的に熱処理によって得られる合金層は同じものであるが、その生成条件は構成法によって若干異なる。スパッタリング法を用いる利点は、銀の場合大きいと考えている。なぜならば、銀を水溶液からめっきするには環境負荷の高いシアン化物が多用されるが、スパッタリング法を用いることによりシアン化物の使用を回避することができるからである。スパッタリング法は、水溶液からのめっきに比べると高価な装置を必要とする点でコスト高につながるというおそれを抱くむきもあろうかと思われるが、銀はきわめて低い量で抗菌性を発現することが知られており、それほど厚く成膜する必要がないため、コストと環境負荷性の低減を併せて考えると従来のめっきよりもむしろ有効ではないだろうか。Table.2 に銅めっき銅板、Table.3 に銀めっき銅板の大腸菌に対する抗菌性をフィルム密着法で評価した結果を示す。いずれもコントロールと比較して著しくコロニー数が減少しており、銅や銀の抗菌性が銅板表面で発現されていることがわかる。銅あるいは銀はいずれもすずとの金属間化合物層が試料最表面に形成されていた。銅あるいは銀の単相でも抗菌性は試料表面で発現されるが、熱処理を施して合金層を形成させても抗菌性が発現されることは明らかである。合金層を形成させる工業的な意味は、単相では硬さ、耐磨耗性、耐食性などが不十分であるが、合金層はこれらに関する高い特性が得られることと、基板と合金層との密着性が上がることによって試料の耐久性が高まることが挙げられる。

銅や銀の抗菌性はどのようにして発現されるのであろうか。様々な考え方がこれまで提案されているが、著者らは次のように考えている。湿潤環境中 (したがって通常の大気中) においては、量的に少ないとしても、材料表面の金属は必ずイオン化している。このフリーな金属イオンが細菌と接触す

Table.1 すずめっきのフィルム密着法による抗菌性評価試験結果

| 時間(hr) | 試料      | 大腸菌(ATCC25922)                        |
|--------|---------|---------------------------------------|
| 0      | コントロール  | 9.50 × 10 <sup>4</sup> cfu/agar plate |
| 24     | コントロール  | 2.04 × 10 <sup>6</sup> cfu/agar plate |
|        | Snめっき試料 | 7.51 × 10 <sup>5</sup> cfu/agar plate |

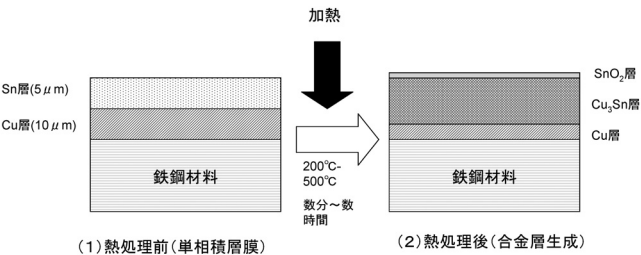


Fig.11 熱処理合金化めっき法によるすず-銅合金皮膜の生成

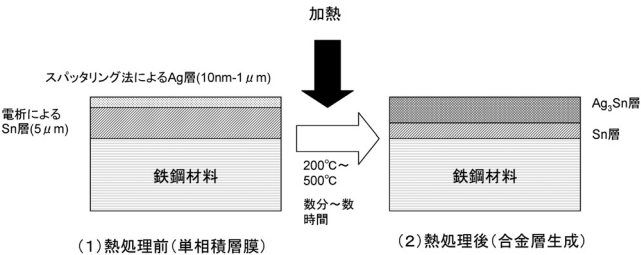


Fig.12 熱処理合金化めっき法によるすず-銀合金皮膜の生成

Table.2 すず-銅合金めっきのフィルム密着法による抗菌性評価試験結果

| 時間(hr) | 試料          | 大腸菌(ATCC25922)                        |
|--------|-------------|---------------------------------------|
| 0      | コントロール      | 9.50 × 10 <sup>4</sup> cfu/agar plate |
| 24     | コントロール      | 2.04 × 10 <sup>6</sup> cfu/agar plate |
|        | すず-銅合金めっき試料 | 0 cfu/agar plate                      |

Table.3 すず-銀合金めっきのフィルム密着法による抗菌性評価試験結果

| 時間(hr) | 試料          | 大腸菌(ATCC25922)                        |
|--------|-------------|---------------------------------------|
| 0      | コントロール      | 7.63 × 10 <sup>4</sup> cfu/agar plate |
| 24     | コントロール      | 1.35 × 10 <sup>4</sup> cfu/agar plate |
|        | すず-銀合金めっき試料 | 0 cfu/agar plate                      |

ると、細菌の細胞膜や細胞内にあるタンパク質などの生体高分子との間でバイオリガントを形成する<sup>20)</sup>。これによって生体高分子の機能が阻害されれば、細菌は通常の代謝反応が維持できなくなり、最終的に増殖停止や細胞死を招くことになる。個々の金属が有する抗菌力は金属イオンの解離量に依存するものと考えられる (Fig.13)。

## 4 バイオフィーム形成による表面皮膜の抗菌性とその評価

前章で述べた実験結果は、抗菌性という観点から個々の細菌と金属との間の相互作用を調べたものである。しかしながら、環境中において細菌が固体表面上に付着して増殖するとき、多くの細菌はその表面においてバイオフィームと呼ばれる集合体を形成していることが知られている<sup>21, 22)</sup>。細菌は、寒天培地上では1個の細菌が2分裂増殖しながら前述した半円や扁平状のコロニーと呼ばれる細菌集団を形成する。一方、液体培地中では2分裂増殖しながら、単一または複数の菌の集合体 (2連、4連、8連、連鎖状)、あるいはブドウ球菌のように塊になるが、肉眼では分散して見える。しかしながら、試験管の中で液体培養した細菌は培養液中だけに存在するようにみえるが、試験管の内側表面にもバイオフィームという皮膜状の構造体を作って細菌の集団が付着している。

固体表面上に付着した細菌は、高密度になると菌体外に大量の多糖類を分泌し、増殖した細菌全体をこの多糖類で覆ってマトリックス構造 (バイオフィーム) を形成する。バイオフィームはほとんどの細菌が形成し、その形成は細菌の密度に対応して働くクオラムセンシングという制御系が関与する<sup>22)</sup>。バイオフィームを形成する場合は、ガラス・プラスチック・金属などから我々の体内の臓器まで何でもよく、おそらく細菌が付着可能であればあらゆるものがその形成を促す対象物となる。我々の身の回りでは風呂場・台所・トイレなどの水回りの設備に細菌のバイオフィームは形成されてい

る。バイオフィームのマトリックス構造は殺菌剤の透過を阻害したり熱を伝えにくい性質があるため、時に我々の生活に影響を及ぼすことがある。たとえば、食品加工分野ではラインの細菌汚染を防ぐために最新の注意をはらって残渣の洗浄・除去・高温などの殺菌作業が行われているが、洗浄しにくいデッドスペースにおいてバイオフィームが形成された場合、完全な殺菌処理ができない可能性がある<sup>10)</sup>。実際、過去においてこの種の細菌汚染が原因で新聞紙上を賑わせた事例があることをご存知の読者もおられるかもしれない。

以上のように固体表面で増殖した細菌がバイオフィームという形態で集まっているのは一般的なことのようであるので、バイオフィームとめっき金属との関係を調べなおすことは、実用的な観点からきわめて重要である。そこで著者らは現在、熱処理合金化めっき法により形成されたHACCP対応抗菌めっきとバイオフィームとの相関に着目して検討を始めている。まだ緒に就いたばかりであるが、ここにその一端をご紹介したい。

バイオフィームを形成しやすい細菌として緑膿菌が知られている。著者らはこれを用いて抗菌めっき処理した銅板試料表面でのバイオフィームの形成を評価した。バイオフィームの形成は次のように行った。普通ブイヨンで18時間、35℃で培養した緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa* PAO1) を、滅菌水で2倍に希釈した普通ブイヨンに $10^5 \sim 10^6$ /mlの菌数になるように加えて細菌懸濁液を作製した。24穴プラスチックプレートのウェルに菌液を2ml入れ、めっき銅板を菌液の中に浸漬するように立てかけた後、インキュベーターの中に35℃、24時間静置した。銅板表面のバイオフィーム形成は、クリスタルバイオレット染色によって次のように確認した。銅板を未使用のウェルに移し、滅菌水で数回洗浄後、0.2%クリスタルバイオレットを1ml加え室温に1時間放置した。銅板を取り出し、非特異的に結合しているクリスタルバイオレットが溶出しなくなるまで銅板表面を洗浄し標本とした。バイオフィームに結合したクリスタルバイオレットは1mlのエタノール中に銅板を浸漬して溶出させた。銅板表面に付着した菌数の測定は以下の方法により行った。銅板を未使用のウェルに移し、滅菌水で数回洗浄した。滅菌水を除いた後、0.2%のTween 20 (1ml) で洗い出し、この内の0.1mlを普通寒天培地に接種後、塗抹した。寒天培地を35℃で18時間培養し、形成されたコロニー数から菌数を計算した。Fig.14にその結果の一例を示す。この試料は熱処理合金化めっき法により銅 (JIS SS400) 上に金属間化合物層 ( $\text{Ag}_3\text{Sn}$  層) が数 $\mu\text{m}$ 形成された試料である。炭素銅上に5 $\mu\text{m}$ すずめっきを施したすずめっき銅板上に銀がスパッタリングにより1 $\mu\text{m}$ 積層され、これを220℃にて10min熱処理することにより金属間化合物層皮膜を有した銅板が得られ

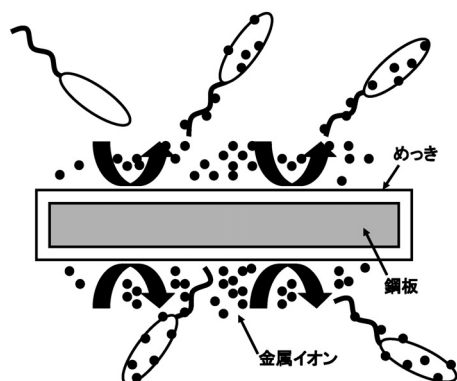


Fig.13 めっき金属抗菌性発現の模式図

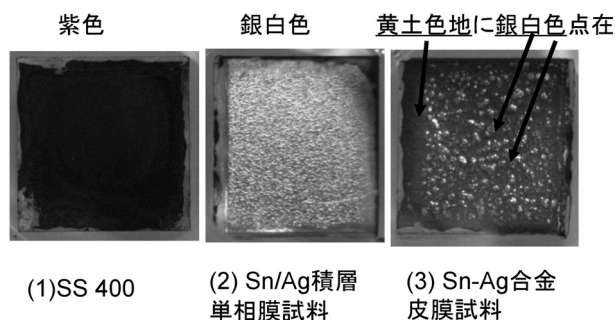


Fig.14 SS400銅板表面上での緑膿菌のバイオフィルム形成と銀皮膜によるバイオフィルムの形成阻害

る。これに上記の手続きによりバイオフィルムが形成されたものである。Fig.14- (1) は基板のSS400であり、クリスタルバイオレットにより完全に染まっており、バイオフィルムが形成されていたことは明らかである。一方、Fig.14- (2) ははずと銀がSS400上に積層された試料であり最上層は銀である。そのため強い抗菌性を示しており、全くクリスタルバイオレットにより染色されなかった。Fig.13- (3) は最上層が $\text{Ag}_3\text{Sn}$ からなる金属間化合物であった。この場合もクリスタルバイオレットによって染色されていないので、バイオフィルムは形成しなかったと考えられる。既に述べたように銀単相のみでなく、はずと銀の金属間化合物層も抗菌性を示す。したがって、緑膿菌はフリーな銀イオンの抗菌力により生育が妨げられバイオフィルムの形成が阻害されたことがわかった。

## 5 将来展望

以上本稿において、著者らのHACCP抗菌エコプレーティングに関する取組を紹介した。これまで数年にわたって得られた結果をまとめたものであるが、これに加えて、特に最近の研究として、より普遍的な抗菌性の評価のために必要なバイオフィルム形成との関連に言及した。本稿中に述べたように、材料の抗菌性の研究は環境研究へとつながる点において、将来への扉を開く重要な研究テーマであると著者らは考えている。本稿がさらなる抗菌材料の活発な研究のきっかけとなれば幸いである。21世紀は環境の世紀である。その意味から、これにとどまらず、環境との調和の中で材料設計を考える大きな動きにつながっていき、材料／環境のインターフェースとして材料表面を調製する表面技術というコンセプトを持った研究がこれまでよりもいっそう盛んになるきっかけになれば幸甚である。

### 参考文献

1) 兼松秀行, 小林達正, 沖猛雄: 表面技術, 51 (2000) 11,

1170.

- 2) 兼松秀行, 小林達正, 沖猛雄: 熱処理, 41 (2001) 2, 93.
- 3) 兼松秀行, 小林達正, 和田憲幸, 沖猛雄: 日本金属学会報, までりあ, 41 (2002) 10, 713.
- 4) Hideyuki Kanematsu, Tatsumasa Kobayashi, Noriyuki Wada and Takeo Oki: Plating & Surface Finishing, Journal of the American Electroplaters and Surface Finishing Society, Inc., Vol.89, November Issue, (2002), 56.
- 5) Tatsumasa Kobayashi, Hideyuki Kanematsu, Michiko Yoshitake and Takeo Oki: Transactions of the Institute of Metal Finishing, The INTERNATIONAL journal for surface engineering and coatings, November issue, 80 (2002) 6, 194.
- 6) Tatsumasa Kobayashi, Hideyuki Kanematsu, Noriyuki Wada and Takeo Oki: Transactions of the Institute of Metal Finishing, 81 (2003) 1, 32.
- 7) 兼松秀行, 沖猛雄: 高温学会誌, 30 (2004) 4, 191.
- 8) Hideyuki Kanematsu, Hajime Ikigai, Michiko Yoshitake: Journal of Applied Surface Finishing, 2 (2007) 1, 43.
- 9) 米虫節夫: こうして防ぐ! 食品危害, 日科技連, (2003)
- 10) 米虫節夫, 角野久史: 食の安全性を究める食品衛生洗浄・殺菌編, 日科技連, (2006)
- 11) 財団法人食品産業センターJAFIC ホームページ: <http://www.shokusan.or.jp/haccp/basis/>
- 12) Hajime Ikigai, Hideyuki Kanematsu, Yasushi Kikuchi and Takeo Oki: Proceedings of AESF Sur/Fin 2004 & Interfinish 2004 World Congress, Navy Pier, Chicago, IL, June 28-July 1, (2004), 996.
- 13) 生貝初, 兼松秀行, 黒田健介, 菊池靖志: 材料とプロセス, 日本鉄鋼協会, 17 (2004) 6, 1125.
- 14) 抗菌製品技術協議会: 抗菌加工製品の抗菌力評価試験法, (1998), 13.
- 15) Hajime Ikigai, Hideyuki Kanematsu, Kensuke Kuroda and Akira Ohmori: Proceedings of SFIC Sur/Fin 2005, June 13-16, 2005, St. Louis, Missouri, USA, (2005), 497.
- 16) Hideyuki Kanematsu, Hajime Ikigai and Michiko Yoshitake: SFIC Proceedings SUR/FIN 2006, Milwaukee, WI, USA, (2006), 864.
- 17) 兼松秀行, 生貝初, 吉武道子: 東海化学工業会会報, 252 (2006), 9.

- 18) 兼松秀行, 江崎尚和, 生貝初, 沖猛雄: 特願2005-171670, 出願日2005年6月10日
- 19) 吉武道子, 兼松秀行, 生貝初: 特願2007-193551, 出願日2007年7月25日
- 20) International Council on Mining & Metals: MERAG (Metal Environmental Risk Assessment Guidance), (2005), 25.
- 21) 森崎久雄: ふえらむ, 12 (2007) 4, 191.
- 22) M.H. Rashid, K. Rumbaugh, L. Passador, D.G. Davies, A.N. Hamood, B.H. Iglewski and A. Kornberg: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97 (2000) 17, 9636.
- (2007年9月11日受付)