

ホタテ貝殻焼成粉末の殺菌および殺インフルエンザウイルス作用について

村田亜悠美¹⁾，小尾信子²⁾，中平比沙子¹⁾，宮原龍郎¹⁾，落合宏¹⁾

¹⁾ 富山大学医学部看護学科感染看護学

²⁾ 同医学科和漢診療学

要 旨

ホタテ貝殻焼成粉末 (HSSP) の殺菌および殺インフルエンザウイルス作用を検討した。微細 HSSP (平均粒径 $3.5 \mu\text{m}$: f-HSSP) の 0.15% 生理食塩水懸濁液に 5 分接触させた場合、大腸菌の生残菌数は検出限界以下であったが、緑膿菌と黄色ブドウ球菌の生残率は、それぞれ $3 \times 10^{-3}\%$ と 2.5% であり、大腸菌に最も強く殺菌作用を示した。f-HSSP、粗製 HSSP (平均粒径 $18.4 \mu\text{m}$: c-HSSP)、酸化カルシウムおよび水酸化カルシウムの 0.15% 生理食塩水懸濁液はほぼ同じ pH (12.6~12.76) を示した。しかし、これら 4 試薬の大腸菌に対する経時的殺菌力を比較したところ、5 分接触では全ての試薬においても生残率は検出限界以下であったものの、2 分より短い接触時間域で f-HSSP が他 3 試薬より 10~1000 倍強い殺菌作用を示した。さらに、f-HSSP 生理食塩水懸濁液は、濃度と接触時間依存的にインフルエンザウイルス A 型 PR8 株と B 型 Sing 株の感染性を失活させた。しかし、f-HSSP (37°C, 30 分接触) は少なくとも A 型 PR8 株の赤血球凝集活性には影響を与えなかった。0.75% 生理食塩水懸濁液の殺インフルエンザウイルス作用を 4 試薬間で比較したところ、f-HSSP は短時間接触域で、c-HSSP よりおよそ 1000 倍強かったが、酸化カルシウムと水酸化カルシウムよりは弱い傾向を示した。これらの結果は、f-HSSP は強い大腸菌殺菌作用に加え、殺インフルエンザウイルス作用があることを示している。いずれにしても、このように少なくとも c-HSSP より強力な抗微生物作用を有する f-HSSP は、感染看護の視点からも、様々な医療器具・看護器材の有用な天然資材と思われた。興味あることは、リン酸緩衝食塩水に懸濁すると、これらの作用は 100 倍から 1000 倍に減弱することであった。この知見に加え、4 試薬間の生物活性の強さの違いの研究は今後の検討課題として残った。

キーワード

ホタテ貝、殺菌作用、殺インフルエンザウイルス作用、感染看護

序 文

我が国の平成12年度におけるホタテ貝生産量は約52万トン、そのうち、不要になった貝殻は約15万トンであり、廃棄物として処理されている¹⁾。そのため、貝殻を有効利用する試みがいろいろと行われている。しかし、そのほとんどは石灰石との差別化が図れていないと言われており、ホタテ貝殻の多くは産業廃棄物として海沿いに山積みされているのが現状であり、さらにそれによる悪臭や土壌汚染などの深刻な問題が起きており、新しい再利用の方法の開発が必要とされている^{2,3)}。

ホタテ貝殻は主要成分として炭酸カルシウム(CaCO_3)を含んでおり、無機物の資源としてカルシウムの調合に使われている²⁾。貝殻粉末を700°C以上で高熱処理することによって、貝殻中 CaCO_3 は酸化カルシウム(CaO)に変化する²⁾。このような加熱工程を経てできた酸化カルシウムを主成分とするホタテ貝殻粉末は、ホタテ貝殻焼成粉末 heated scallop-shell powder (HSSP)と呼ばれている^{2,4)}。さらにHSSPは、水と反応することにより水酸化カルシウム(Ca(OH)_2)となる。この水溶液は殺菌作用を持つとの報告も多く^{1,2,5,6)}、水に溶解することで強いアルカリ性を呈し、この高pHが殺菌作用の第一義的要因と考えられている¹⁾。大友らの報告では、700°C以上で焼成したHSSPの懸濁液はpH12を超え¹⁾、吉田ら⁵⁾の実験ではHSSP懸濁液はpH12.7、澤井ら⁶⁾の実験ではpH12.4を示し、いずれもHSSP懸濁液には、殺菌作用が認められたとしている。しかし、HSSP懸濁液の殺菌作用に関しては、単に高pHだけでは説明できない付加的要因があることも指摘されている^{5,6)}。また、通常アルカリは、水溶液では OH^- イオンが比較的高濃度になるため、腐食性があり、濃厚水溶液は皮膚を冒す⁷⁾。しかし、HSSP懸濁液は強アルカリにもかかわらず、米国における14日間の刺激性試験で、刺激は蒸留水以下であるという結果が明らかにされている⁸⁾。さらに、大腸菌、サルモネラ菌、ブドウ球菌、枯草菌芽胞に対して殺菌効果を示したとの研究結果もあり、ホタテ貝殻を感染予

防の分野で有効利用できる可能性が示唆されている²⁾。

感染症による死亡者は依然として多く、また耐性菌の出現など難治性感染症や新興・再興感染症、人畜共通感染症など新たな感染症の問題が起きている⁹⁾。さらに現在世界では高齢化が進んでおり、特に我が国においては顕著であり、65歳以上の高齢人口は昭和25年に総人口の5%であったものが、平成16年には2488万人で19.5%を占め、今後も増加を続け、平成62(2050)年には3586万人で36%に達するものと推計されている¹⁰⁾。高齢者は免疫力が低下しており、易感染者といえる。それに加え、医療の発展とともに、化学療法を様々な治療に伴う易感染状態にある患者も少なくないという状況下で、日和見感染症や耐性菌の出現など新たな形で感染症に注意を払わなければならない。そのような感染症に対する予防・対策の手段を考えていくことは重要と考えられる。インフルエンザを巡る状況もきびしいものがある。特に重篤化のハイリスク群である高齢者のインフルエンザ対策、また乳幼児のインフルエンザ脳症も深刻な問題となっている¹¹⁾。さらにトリインフルエンザのヒトへの感染例の問題も浮上してきている。HSSPは野菜などの食品への応用も試みられており^{6,8)}、人体への影響が少ない中で抗微生物効果が得られる可能性があり、身近な感染予防への応用が期待される。

このような状況下、殺菌性に関する知見が集積しつつあるHSSPではあるが、インフルエンザ感染予防という観点から、ホタテ貝殻の殺インフルエンザウイルス作用について明らかにすることは意義あるものと考えられる。今回、粉末平均粒径が $3.5\mu\text{m}$ である微細HSSP(f-HSSP)とそれより粗く平均粒径が $18.4\mu\text{m}$ の粗製HSSP(c-HSSP)の両者を使用できる機会を得た。そこで、大腸菌・緑膿菌・黄色ブドウ球菌に対するHSSPの殺菌作用に加えて、新規課題として、インフルエンザウイルスに対する作用を検証することを目的として本研究を行った。

材料と方法

1. 試薬とその調製

f-HSSP および c-HSSP は東京ナノ・バイオテクノロジー社より分与を受けた。実験に際し、適量秤量後、滅菌生理食塩水（生食水）に0.15%として浮遊させ、よく攪拌後生食水で適宜希釈した。対照として、酸化カルシウム、水酸化カルシウム（和光純薬）を同様に生食水に浮遊させ用いた。一部の実験では、生食水の代わりにリン酸緩衝生食水（PBS）を用いた。これらの試薬は、生理食塩水とPBSを除き用時調製した。

2. 殺菌作用の検討

1) 供試菌株

黄色ブドウ球菌（ATCC25923）、大腸菌（ATCC3630）および緑膿菌（ATCC28853）を用いた。実験に際し、液体培地（Muller-Hinton broth; MHB, Difco）にて一晩培養し、新鮮培養菌液として用いた。

2) 経時的殺菌作用の検討

適宜希釈した試薬液に、新鮮培養菌液を1/10量加え、よく攪拌後37°C恒温槽に入れた。この時を、接触0時間とした。その後経時的に、菌液の一部を採取し、滅菌生食水で適宜希釈後、その50 μ lをコンラツ棒でMHB寒天培地に塗布し培養した。対照として試薬の代わりに滅菌生食水を用いた。1実験区に2枚の寒天平板を用い、翌日出現したコロニー数の平均値を生残菌数（CFU/ml）とし、最終的には実験群の生残菌数/対照群の生残菌数 \times 100により生残率（%）として表現した。

3. 殺インフルエンザウイルス作用の検討

1) 供試インフルエンザウイルス株と細胞

A型インフルエンザウイルスPR/8/34(A型PR8)(ソ連型)株およびB型Singapore/222(B型Sing)株の感染漿尿液を適宜滅菌生食水で希釈しウイルス液として用いた。

ウイルス増殖細胞としてイヌ腎由来Mardin-Darby canine kidney(MDCK)細胞を、8%ウシ胎仔血清（56°C, 30分非働化済）加Eagle's

minimum essential medium(MEM)で培養し用いた。ウイルス数は、2枚のシャーレを用いたMDCK細胞を用いたブラック法¹²⁾で調べた。

2) 殺インフルエンザウイルスの経時的検討

室温にて、適宜希釈した試薬に、ウイルス液を1/10量加えた。この時を、接触0時間とした。その後、経時的に採取したウイルス液の生残ウイルス量をブラック法で算定、殺菌作用と同様に生残率を求めた。

3) インフルエンザウイルスの赤血球凝集価の測定

f-HSSP懸濁液にA型PR8株ウイルス液を1/10量加え、37°Cで30分放置後、常法に従いマイクロプレート法で赤血球凝集(hemagglutination: HA)価を求めた¹³⁾。

結果

1. 殺菌作用

1) f-HSSP

最初に、種々濃度（0.05%~0.15%）のf-HSSP生食水懸濁液に接触した大腸菌、緑膿菌および黄色ブドウ球菌の生残率を経時的に測定した。

大腸菌の場合、対照菌数は 7.9×10^8 CFU/ml（100%）であったが、0.15%接触により、生残率は、30秒で0.76%、さらに1分接触では0.006%、2分接触で0.0003%と対数的に低下し、5分接触では生残菌数が検出限界以下になった。0.10%の場合、30秒接触で51%と減少率はわずかであったが、1分接触で0.038%に低下し、さらに2分接触では0.0009%と0.15%の生残率に迫り、最終的に5分接触では生残菌数が検出限界以下になった。しかしながら、0.05%では、5分接触においても18%と抗菌作用は殆ど認められなかった（図1a）。

緑膿菌では、いずれの濃度においても、2分以下の短時間接触後の生残菌数は、対照（ 1.7×10^9 CFU/ml）とほぼ同じであり、抗菌性は認められなかった。5分接触では、0.15%のみ0.0003%と強い抗菌作用が認められたが、0.10%と0.05%では、それぞれ8%と81%であり、顕著な生残率の低下は認められなかった（図1b）。

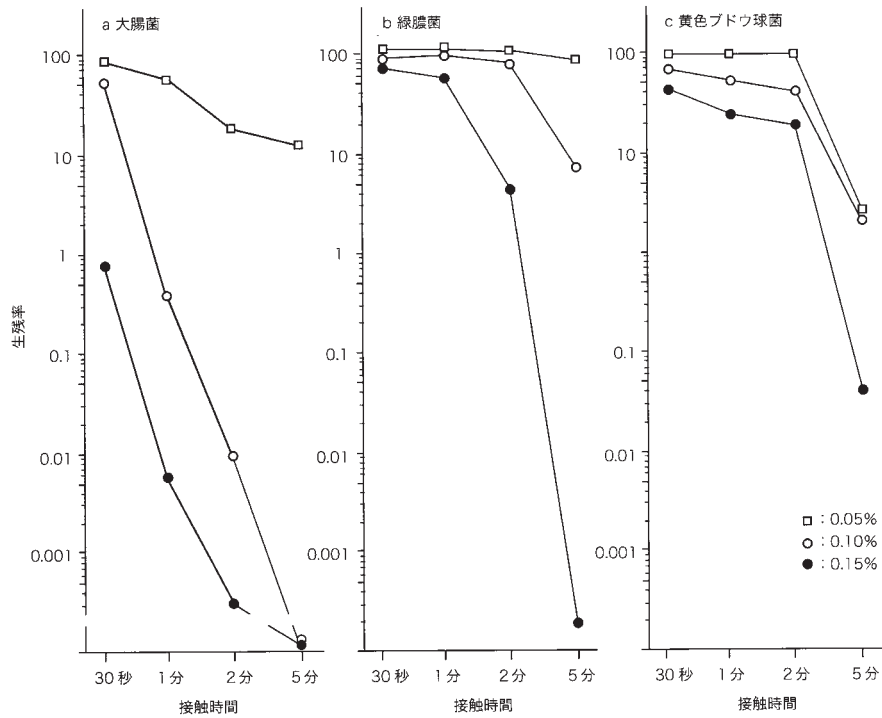


図1. f-HSSPの3菌種に対する殺菌作用

表1 供試4試薬懸濁液のpH

試薬	濃度(%)	溶媒別pH*	
		生食水	PBS
f-HSSP	0.15	12.76	12.78
c-HSSP	0.15	12.77	12.78
CaO	0.15	12.60	12.87
Ca(OH) ₂	0.15	12.76	12.79

* 生食水：生理食塩水、PBS：リン酸緩衝生食水

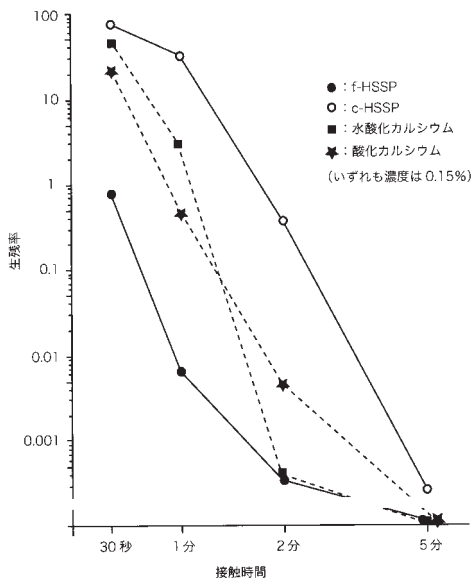


図2. 4種試薬の大腸菌に対する殺菌作用の比較

また、黄色ブドウ球菌の場合、いずれの濃度においても、接触時間5分においてはじめて、対照の 6.9×10^8 CFU/mlの2%~2.5%とわずかな生残率の低下が認められたにすぎなかった(図1c)。

3菌種に対するf-HSSPの抗菌力を濃度と接触時間の点から比較すると、大腸菌に対して最も強く、次いで緑膿菌であり、黄色ブドウ球菌に対してはほとんど抗菌性を示さないという結果であった。この結果を基に、以下の実験では大腸菌を用いた。

2) f-HSSPとc-HSSP、酸化カルシウムおよび水酸化カルシウムの大腸菌に対する殺菌力の比較

表1に示したように、0.15%生食水懸濁液のpHはf-HSSPとc-HSSPで、それぞれ12.76と12.77であった。これらのpH値は、純試薬である酸化カルシウム(pH12.6)と水酸化カルシウム(pH12.76)に極めて近似していた。そこで、濃度を0.15%に固定し、これら4試薬の大腸菌に対する殺菌力を同様に比較した。図2に示したように、5分接触では、生残率は検出限界以下~0.0003%とどの試薬も強い殺菌力を示したが、2分接触より短くなると試薬間で生残率に違いが

認められるようになった。2分接触をみると、f-HSSPと水酸化カルシウムの生残率は近似(0.0003%と0.0005%)していたが、酸化カルシウム(0.004%)のほぼ10倍低かった。1分接触の場合、f-HSSPの生残率(0.063%)は水酸化カルシウムと酸化カルシウムより100倍低かった。さらに、この2分と1分接触でc-HSSPとf-HSSPの生残率の違いは1000倍以上であった。また、30秒接触では、f-HSSPと他3試薬の生残率の違いはほぼ100倍であった。

これらから、ほぼ同じpHを示したにもかかわらず、殺菌力に違いがあり、特に短い接触時間でその差は顕著になり、f-HSSPが最強、酸化カルシウムと水酸化カルシウムは中間、c-HSSPが最も弱いとランキングされた。

2. HSSPの殺インフルエンザウイルス作用

1) f-HSSP

A型PR8株とB型Sing株に対するf-HSSP懸濁液の抗ウイルス作用を0.075%、0.05%および0.025%3種類の濃度を用い、生残ウイルス数(PFU/ml)の経時的变化を測定し、生残率を求

めた。生細胞を用いたプラック法で生残ウイルス数を測定することから、使用濃度は、殺菌作用より低濃度(0.075%以下)に設定した。また、各濃度の10倍希釈でMDCK細胞へ感染させると、細胞毒性で細胞が剥脱したことから、 10^2 倍以上の希釈域で測定せざるを得なかった。従って、検出限界を500 PFU/mlとした。

A/PR8株の場合、対照の 1.6×10^8 PFU/mlに対して、0.075%では、30秒、1分、5分接触により、対照の0.035%、0.006%、0.0006%と対数的に接触時間に依存して減少し、最終的に10分接触で検出限界以下になった。0.05%では、30秒接触で0.75%と減少率の程度は弱いものの、以後の生残率の推移は0.075%の場合に近似し、最終的に10分接触で生残ウイルス数が検出限界以下になった。しかしながら、0.025%では、30秒接触は有効ではなく(生残率100%)、1分接触でも、13.8%とかなりの数のウイルスが生残した。以後5分と10分接触においても、0.001%および0.0006%と対数的な減少を示したものの検出限界以下には達しなかった(図3a)。

B型Sing株の場合、いずれの濃度においても、

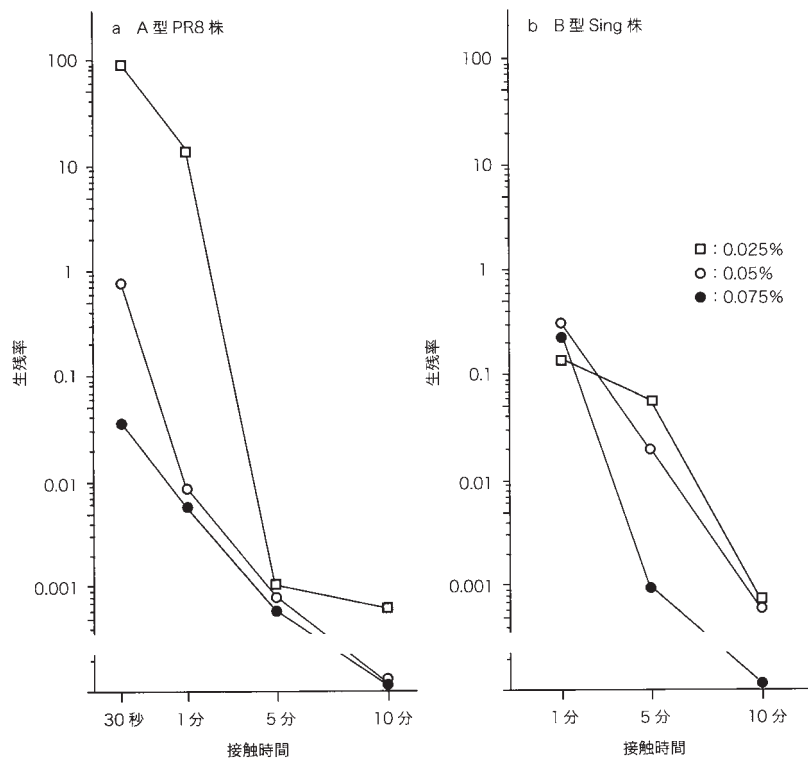


図3. f-HSSPの殺インフルエンザウイルス作用

1分接触により生残ウイルス数が、対照 (2.8×10^8 PFU/ml) の0.13%~0.3%に減少した。それ以降、0.075%の場合、5分接触で、0.001%へと減少し、10分接触で検出限界以下になった。0.05%と0.025%はほぼ同じ経時的推移を示し、5分接触の0.02%~0.06%の生残率は、10分接触で、0.0006%~0.0007%と急激に低下した(図3b)。

2) f-HSSPとc-HSSP, 酸化カルシウムおよび水酸化カルシウムの殺インフルエンザウイルス作用の比較

濃度を0.075%に固定し、これら4試薬のA型PR8株に対する殺菌力を同様に比較した。図4に示したように、対照 8.3×10^7 PFU/mlのウイルス量に対して、c-HSSPは、30秒と1分接触でそれぞれ19.2%と13.3%が生残した。これらの値は、f-HSSPの各対応接触時間における生残率のほぼ1000倍と100倍に相当した。その後5分接触においてはじめて、0.04%とf-HSSP懸濁液のおよそ4.4倍のレベルに到達し、最終的に10分接触では、f-HSSP懸濁液同様、検出限界以下となった。一方、水酸化カルシウムと酸化カルシウムは、30秒と1分では、ほぼf-HSSPと同程度の生残率

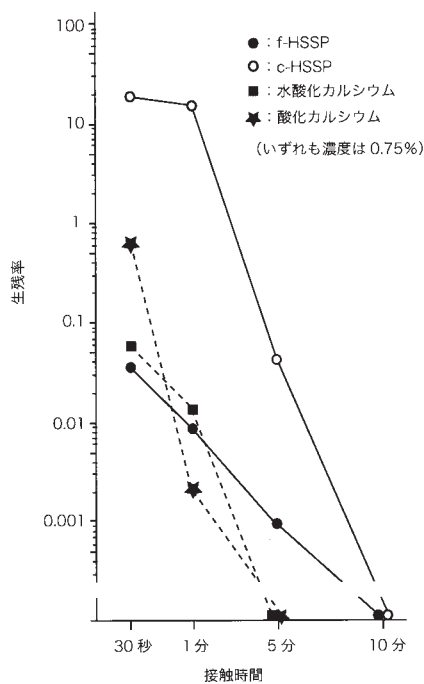


図4. 4種試薬の殺インフルエンザウイルス(A型PR8株)作用の比較

表2 f-HSSPのインフルエンザウイルスA型PR8株のHA活性に及ぼす影響

	濃度(%)別HA価			
	0.075	0.015	0.005	0.0
f-HSSP	128	128	128	128

を示したが、5分接触で検出限界以下に達し、この時点をつえればf-HSSPより強い殺インフルエンザウイルス作用を示した。

3) f-HSSPのA型PR8株HA活性に及ぼす影響
f-HSSP懸濁液処理(37°C, 30分)後のA型PR8株のHA活性を調べた結果を表2に示した。非処理対照ウイルスの128HA価に対して、f-HSSP懸濁液処理ウイルスは、いずれの濃度においても128HA価を示し、f-HSSP懸濁液はウイルスのHA活性に影響を与えないことが明らかにされた。

3. 生食水およびPBS懸濁 f-HSSPの殺菌および殺インフルエンザウイルス作用の比較

生食水で調製したf-HSSP懸濁液とPBSで調製したf-HSSP懸濁液の殺菌および殺インフルエンザウイルス作用を、大腸菌とA型PR8株を用いて検討した。

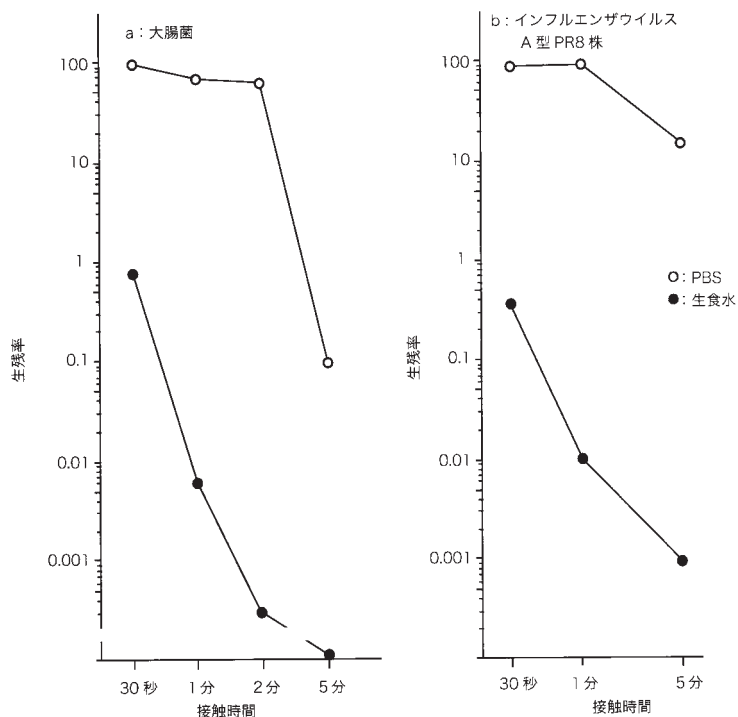


図5. 生食水およびPBS懸濁f-HSSPの抗微生物作用の比較 (f-HSSPの濃度はaで0.15%, bで0.075%)

図5 aに示したように、0.15%生食水懸濁f-HSSPと接触した大腸菌生残率は、30秒～2分に向けて対数的に低下し、5分接触で生残菌数が検出限界以下になった。対照的に、PBSで同一濃度に懸濁した場合、30秒～2分接触により、対照菌数 (7.0×10^8 CFU/ml) の82.9%～61.4%が生残し、5分接触においても、0.1%が生残していた。

また、図5 bに示したように、0.75%生食水懸濁f-HSSPは、インフルエンザウイルスA型PR8株は、30秒から5分接触により、対照 (3.1×10^8 PFU/ml) の0.036%から0.0009%へと対数的に減少した。一方、PBSで同濃度に懸濁した場合、30秒、1分および5分後の生残ウイルス数は、それぞれ、対照の81.3%、94.4%および16.2%であった。

考 察

毎年15万トンも破棄されている¹⁾ ホタテ貝殻の有効利用の観点から、HSSP懸濁液の抗菌性に関する研究がはじまり、知見が集積しつつある^{1,2,5,6)}。ホタテ貝殻の抗菌性について、2001年には、大腸菌、黄色ブドウ球菌や枯草菌に対する殺菌性²⁾、真菌やMRSAに対する殺菌性⁵⁾についての報告がみられる。しかし、今回用いたf-HSSPのような微細粉末を用いた研究はなく、また、インフルエンザウイルスに対するHSSPの作用を調べた報告もまだない。

f-HSSPの殺菌性に関する検討に際し、生食水に懸濁する方法および使用濃度は既報²⁾を参考にした。f-HSSP生食水懸濁液のpHを測定すると、0.15%、0.075%および0.05%で、それぞれpH12.76、12.77および12.49であり、どの濃度においてもほとんど近似したpHであり、強アルカリ性を呈した。その結果、供試3菌種の中では、大腸菌が最も高い感受性を示し、緑膿菌では、0.15%f-HSSP懸濁液の5分接触でのみ0.0003%に減少した。黄色ブドウ球菌は、最も感受性が低かった。HSSPの緑膿菌に対する抗菌性に関しての報告はほとんどみられないが、澤井ら²⁾の報告をみると、今回の結果と一致して大腸菌が黄色

ブドウ球菌より感受性が高いデータを示し、また大友ら¹⁾は、黄色ブドウ球菌死滅には1時間が必要であったと報告している。大腸菌と緑膿菌はグラム陰性であり、グラム陽性である黄色ブドウ球菌に比べて細胞壁は極めて薄い。また、黄色ブドウ球菌は、食塩耐性(10%の食塩存在下で増殖できる)を示す¹⁴⁾点も前2菌種と異なる。今回見いだされた菌種によるf-HSSP懸濁液に対する感受性の違いは、このような菌の性状を一部反映していることも考えられる。医療器具の無菌保証水準は $<10^{-6}$ が達成目標となっている¹⁵⁾。このことを考慮すると、HSSP懸濁液の抗菌力を何らかの形で医療分野に応用する際は、広域スペクトラムが要求され、少なくとも0.15%を用いることが推奨されると考えられた。

最も感受性の高かった大腸菌について、f-HSSP懸濁液とc-HSSP懸濁液の殺菌力を比較したところ、接触時間が短い2分以内では、f-HSSP懸濁液の方が生残菌数はほぼ100倍少なく、5分接触でも少なくとも10倍以上は少ないことが明らかになった。また、5分接触後の大腸菌と黄色ブドウ球菌の生残菌数の減少率を比較すると、今回のf-HSSP懸濁液は、0.15%と0.10%のいずれも澤井の報告²⁾よりおよそ10倍は強いものであった。

高pHを呈する酸化カルシウムとそれを多く含有するHSSPは、代表的アルカリ液である水酸化ナトリウムに比べ、強い殺菌作用あるいは殺芽胞作用を有することが示されている⁶⁾。今回使用したf-HSSP、c-HSSP、酸化カルシウムおよび水酸化カルシウムの0.15%生食水およびPBS懸濁液のpHは、12.6～12.87の極めて近似した範囲にあった。また、上記したように、f-HSSP懸濁液の0.15%～0.05%の間でも、これらのpHとほぼ同じであった。このように、いずれの試薬も高pHを呈したにもかかわらず、f-HSSP懸濁液の大腸菌に対する殺菌作用は、濃度依存性であり、かつ0.15%においては他3試薬よりも強力であった。同様に、近似したpHを示すにもかかわらず、f-HSSP/生食水に比べ、f-HSSP/PBSの抗微生物活性は1/100～1000倍に極めて減弱するという新知見を得た。これらの事実は、f-HSSPの

c-HSSPより、時には酸化カルシウムや水酸化カルシウムより強力な作用は、単に高pHだけでは説明できないことを意味していると考えられた。

ホタテ貝殻の主成分(95%)である炭酸カルシウムは、一般的に利用されている鉱石(石灰岩)に比べ白色度と純度が高く組成の変動が少ないことが特徴とされている¹⁶⁾。これを焼成することにより酸化カルシウムと二酸化炭素に変化し、この結果炭酸カルシウム全てが酸化カルシウムになると仮定すると、HSSPの99%は酸化カルシウムからなると考えられている⁶⁾。さらに水に懸濁すると、水酸化カルシウムとなり、強いアルカリ性(pH12~13)を示すことで、微生物に対する抑制・死滅という効果が得られるとされている¹⁾。また、高pHに第一義的抗微生物作用があるとする報告¹⁾と、それ以外の因子の相乗作用を主張する報告がある⁶⁾。

そこで、f-HSSPとc-HSSP懸濁液(0.15%)の酸化カルシウム濃度を、純試薬の酸化カルシウム懸濁液を標準としてメチルキシレノールブルー法(E-HAテスト, 和光)で測定したところ、f-HSSP懸濁液の濃度は標準懸濁液の88.5%を示したが、c-HSSP懸濁液は標準の58%であり、f-HSSP懸濁液の酸化カルシウム含有量はc-HSSP懸濁液の1.5倍多いことが示された。このことから、酸化カルシウム含有量の差が、c-HSSP懸濁液とf-HSSP懸濁液の大腸菌に対する殺菌作用、また殺インフルエンザ作用の差の一つの大きな要因と考えられた。一方、酸化カルシウムが水との反応により生じた水酸化カルシウムは、リン酸存在下においては、第一~第三リン酸カルシウムという化学的に安定したいずれかの化合物に変換する¹⁷⁾。今回、f-HSSPをPBSに懸濁した時には、一部にこれらのリン酸塩が生成され、相対的に酸化あるいは水酸化カルシウム濃度が下がり、その結果、殺菌・殺インフルエンザ活性低下に結びついたものとも推定できた。逆にいえば、f-HSSP中の酸化あるいは水酸化カルシウムは、殺菌力を高めることに貢献しているものと考えられた。澤井らは、HSSPの殺菌活性は、高pHが主要な要因であることに間違いはないが、酸化カルシウムから発生した活性酸素種(特にスーパー

オキシド: O_2^-)も殺菌の要因の一つであることを提唱している⁶⁾。また、吉田は、同様にOHラジカルが産生されていることを報告し、菌内ATP量減少と核酸や蛋白質の漏出が死滅の原因としている。加えて、 Ca^{2+} の役割について、細菌表面に結合することにより細菌の溶解は保護されているとしている。今回、0.15%のf-HSSP懸濁液で10分処理し死滅した大腸菌を走査電子顕微鏡で観察したところ、吉田の報告(八戸工業大学大学院博士論文)に一致して、非処理対照の大腸菌の形態と変わらないことを観察している。今回得られた知見と先行研究の結果を総合すると、HSSP懸濁液の殺菌力は、高pHを基盤に、さらに活性酸素種の産生が相乗的に作用し高まっているとの推定も可能と考えられた。しかし、これだけでは、f-HSSP懸濁液が酸化あるいは水酸化カルシウム懸濁液より強い殺菌作用、特に速効性を説明することはできない。ちなみに、0.15%で生食水に混濁した後pH12になる時間を調べると、f-HSSP懸濁液、c-HSSP懸濁液、酸化カルシウム懸濁液および水酸化カルシウム懸濁液は、それぞれ1分、1分50秒、3分および1分30秒であった。このことは、f-HSSP懸濁液では、酸化から水酸化カルシウムへの変換がc-HSSP懸濁液より速く、さらに、酸化あるいは水酸化カルシウム懸濁液より迅速に高pHを形成できることを意味している。この変換過程で、f-HSSPは有効なラジカル物質あるいは未知なる有効物質を、より多くかつ迅速に産生する化学的特性を有し、その結果、4種の試薬の中で、速効性を備え、かつ最強の抗菌性を示すのか、興味深い問題である。これについては今後の研究課題と考えている。

f-HSSPの殺インフルエンザウイルス作用の検討の結果、A型PR8株の生残率は、0.075%と0.05%の接触により、濃度依存かつ時間依存的に低下し、最終的に10分接触で検出限界以下になった。B型Sing株においては、A型PR8株と同様の傾向で減少したが、10分接触では、0.075%のみが検出限界以下へと減少させた。ウイルス株2株の検討ではあるが、今回、0.075%のf-HSSP懸濁液、10分接触では高い殺インフルエンザウイルス作用が認められた。f-HSSP懸濁

液の殺インフルエンザウイルス作用が、c-HSSP懸濁液より強い点とPBS懸濁液により減弱する点では殺菌作用と同じであった。しかし、酸化あるいは水酸化カルシウム懸濁液より弱い点では、殺菌作用とは明らかに異なる結果を示した。このことから、インフルエンザウイルス死滅には、細菌の死滅に比べ、高pHであることそれ自体がより大きく作用し、活性酸素種などは必要なものの、その殺ウイルスにおける比重は低いとも考えられた。これらの結果とウイルスの細胞吸着に必要なHA活性がf-HSSP懸濁液の30分処理でも保持されていたことと併せて考えると、上記にあるように、ウイルス形態には変化を与えないが、ウイルス内部からの核酸や蛋白質漏出が死滅の原因とも考えられた。これらの機構に関する研究も今後の課題である。

今回、HSSP懸濁液、特にf-HSSP懸濁液に強い殺菌作用・殺インフルエンザウイルス作用があることが認められたが、その殺菌性は工業、農業、医療分野など様々な分野で応用が試みられている^{6,18,19)}。しかし、今回の結果からも、HSSPは粉末の状態ではなく、水に溶解することで抗微生物作用を得られるという点でさらなる工夫が必要と考えられた。この点で、既に利用が開始されている歯磨き添加剤などは適切な利用法と思える。感染看護の視点からは、マスクやガウンなどの身につける感染予防具をはじめ、敷布やカーテン、あるいは排泄器など皮膚に直接接触するような器具に対する抗微生物効果の利用という形での応用も期待される。今後そのような感染予防におけるHSSPの有効利用・応用の方法について、調査・研究が行われていくことが望まれた。

謝 辞

f-HSSPおよびc-HSSPを分与して頂いた東京ナノ・バイオテクノロジー社に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) 大友良光, 小笠原和彦, 横澤幸仁: ホタテ貝殻焼成粉末の細菌発育抑制要因について. 青森県環境保健センター研究報告 13:1-4, 2002.
- 2) Sawai J. Shiga H. and Kojima H.: Kinetic analysis of bactericidal action of heated scallop-shell powder. *Inter. J. Food. Microbiol.* 71:211-218, 2001.
- 3) 山岸暢: ホタテ貝殻を利用した複合材料の開発 ホタテ貝殻未利用資源の有効利用に関する研究(平成14~16年度). 北海道立工業試験場情報 26:7, 2003.
- 4) 山本明美・坂牛美由紀・村上淳子・横澤幸仁・古川寿伯・古川章子: ホタテ貝殻焼成粉末のホルムアルデヒド吸着・分解作用に関する研究. 青森県環境保健センター研究報告 13:9-14, 2002.
- 5) 吉田朋央, 小山信次, 奥田慎一, 笹谷広治, 福原長寿, 小比類巻孝幸: ホタテ貝殻セラミックスの抗菌機能について. 八戸工業大学異分野融合科学研究所紀要 1:117-120, 2003.
- 6) 澤井淳, 五十嵐英夫, 菊池幹夫: 加熱処理した貝殻粉末の抗菌活性を応用した微生物制御. *食品微生物学会雑誌* 20(1):1-7, 2003.
- 7) 講談社出版研究所編: 世界科学大事典1. pp156-157, 講談社, 東京, 1977.
- 8) 小山信次: ホタテ貝殻を有効利用した新しい機能性材料の開発と実用化. *農林水産技術研究ジャーナル* 28(6):38-42, 2005.
- 9) 松本哲哉: 感染症の病体と感染制御. *東京医科大学雑誌* 64(3):213-221, 2006.
- 10) 厚生統計協会編: 国民の福祉の動向・厚生 の指標 臨時増刊 53(12):102, 2006.
- 11) 横田俊平, 河島尚志: インフルエンザの治療. *医学のあゆみ* 206(9):627-632, 2003.
- 12) Tobita K.: Permanent canine kidney (MDCK) cells for isolation and plaque assay of influenza B viruses. *Med. Microbiol. Immunol.* 162(1):23-27, 1975.
- 13) Ochiai H., Sakai S., Hiraabayashi T.,

- Shimizu Y. and Terasawa K. : Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells. *Antiviral Res.*27:425-430, 1995.
- 14) 水口康雄, 中山宏明, 南嶋洋一: ナースのための微生物学改訂4版. 南山堂, 東京, 2003.
- 15) 恵口利一郎: ホスピタル・サニテーションにおけるサニタリーデザインとバイオバーデン. 改訂版消毒剤 基礎知識と適正使用, 高杉益充編, pp86-101, 医薬ジャーナル社, 東京, 1990.
- 16) 北海道共同石灰株式会社: 廃棄物であるホタテ貝殻を原料とする高品位軽質炭酸カルシウムの製造方法の工業化. 平成14年度循環型社会構築促進技術実用化開発事業. 補助事業結果報告書: 2003.
- 17) 社団法人日本化学会編: 化学便覧 応用化学編 I (第5版), pp691-692, 丸善株式会社, 東京, 1995.
- 18) 島袋智広, 塚越慎, 荊木祐司, 塚越卓, 松田浩: ホタテ貝殻の歯科材料への再利用 1. 貝殻の構造および抗菌性. *日本歯科保存学雑誌* 46(1): 31-36, 2003.
- 19) 巢瀬忠之, 塚越卓, 渡辺住純, 保阪義昭: ホタテ貝殻を原材料とする骨充填材の開発. *21(3): 181-189, 2001.*

Bactericidal and virucidal activities of heated scallop shell powders

Ayumi MURATA¹⁾, Nobuko OBI²⁾, Hisako NAKAHIRA³⁾,
Tatsuro MIYAHARA¹⁾, and Hiroshi OCHIAI¹⁾

Departments of Infedion Control Nusing¹⁾, and Oriental Medicine²⁾,
Faculty of Mecine, University of Toyama, Sugitani 2630, Toyama 930-0194, Japan.

Abstract

We investigated bactericidal and virucidal activities of scallop shell powder (HSSP), of which main component is CaO possibly converting to Ca(OH)₂ in water. After 5-min contact with 0.15% saline suspension of fine HSSP (f-HSSP) with the mean particle diameter (mpd) of 3.5 μm, survival rate of *Escherichia (E) coli* was uncountable, but these values of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were 3×10⁻³ % and 2.5%, respectively, suggesting that *E.coli* shows the highest sensitivity to f-HSSP. Time-related bactericidal study, using 0.15% saline suspension of f-HSSP, crude HSSP (c-HSSP) with the mpd of 18.4 μm, CaO and Ca(OH)₂, indicated that f-HSSP among these 4 reagents shows the strongest activity against *E. coli* especially in a shorter contact time range (less than 2 min), although pH values of suspensions were almost the same (12.6 to 12.76) in all reagents. Importantly, this study clearly demonstrated that saline suspension of f-HSSP shows virucidal activity against both influenza A/PR8 and B/Sing viruses in dose- and contact time-dependent manners, and 10-min contact with 0.75% f-HSSP induces a complete loss of infectivity of both viruses. Furthermore, treatment with 0.75% f-HSSP at 37°C for 30 min did not affect hemagglutinating activity of A/PR8 virus. The virucidal activity of f-HSSP was also almost 1000-fold stronger than that of c-HSSP in a shorter contact time range, but seemed to be weaker than those of CaO and Ca(OH)₂ which could induce a complete loss of infectivity by as short as 5-min contact. Taking together, it is suggested that f-HSSP might be a useful natural product to prepare various medical and nursing devices from the point of view of infection control. Interestingly, bactericidal and virucidal activities of f-HSSP became 100 to 1000-fold weaker when it was suspended in the phosphate-buffered saline instead of saline. In addition to this finding, differences in biological activities among 4 reagents shown in this study remained to be solved.

Key words

heated scallop shell powder, bactericidal activity, inactivation of influenza virus, infection control nursing