

令和2年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	持続的抗菌・抗ウイルス作用をもつ生体適合性フィルターおよびナノ被膜技術の開発
研究者所属・氏名	研究代表者：生物理工学部生物工学科・鈴木高広 共同研究者：生物理工学部生物工学科・坂本 勝 ユニカ食品株式会社・沖野 圭修・大久保伸之 ナチュラルジャパン株式会社・田端 宣彦

1. 研究、開発・改良、提案目的・内容

新型コロナの感染対策として次亜塩素酸やアルコール消毒液が多用されているが、洗浄直後の除菌効果が高いものの、効果が持続しない問題がある。そこで、抗菌・抗ウイルス作用を有することが知られているホタテ貝殻を原料としたカルシウム製剤を用いて、消毒効果が持続する洗浄液の開発を目的とした。

2. 研究、開発・改良、提案経過及び成果

ホタテ貝殻由来のCa製剤は、抗菌・抗ウイルス作用を有することが報告されており¹⁻³⁾、Ca製剤の共同研究を実施中のユニカ食品(株)、ナチュラルジャパン(株)と共に、抗菌・抗ウイルス作用の持続性が高いCa製剤の開発に取り組んだ⁴⁾。アルコール消毒液や次亜塩素酸洗浄液は、消毒効果が持続しないため繰り返し洗浄作業が求められる。また、生体刺激性や皮膚炎症性があり、手荒れを起こす場合もある。一方、Ca洗浄液は皮膚刺激性が低く、Ca微粒子でマスクやフィルターを被覆したり、トイレの便座やドアノブ、手すり、床等を洗浄により、抗ウイルス作用が持続すると考えられるが、詳しい解析が行われていないのが実状である。

本研究は、Ca製剤の抗菌・抗ウイルス作用を解析することで、効果と持続性を高めたCa洗浄液の開発を試みた。

1. CaO水溶液によるウイルス不活化試験

ナチュラルジャパン（網走市）で製造したオホーツク産ホタテ貝殻から焼成粉碎したCaO製剤のコロナ賦活化効果を評価するために、北里環境科学センターにおいてネココロナウイルスの不活化評価試験を実施した。また、ノロウイルスの代替法として汎用されるネコカリシウイルスを用いたウイルス不活化試験を、日本食品分析センターにて実施した。

表1 ホタテ焼成CaO(0.2%)水溶液のネココロナウイルス不活化効果
(北里環境科学センター)

試験品	感染価(TCID ₅₀ /mL)			
	0(初期)	30秒間	2分30秒間	2時間
対照(PBS)	1.1E+06			1.3E+06
試験品		9.5E+03	1.1E+02	< 1.3E+01

表2 ホタテ焼成CaO(0.15%)水溶液のネコカリシウイルス不活化効果
(日本食品分析センター)

試験ウイルス	対象	log TCID ₅₀ /mL ^{*1}		
		開始時	5分後	10分後
ネコカリシウイルス ^{*2}	検体 ^{*3}	7.0	1.7	<1.5
	対照	7.0	***	6.5

TCID₅₀: median tissue culture infectious dose, 50%組織培養感染量

*1 作用液1 mL当たりのTCID₅₀の対数値

*2 ノロウイルスの代替ウイルス

*3 検体の0.15%溶液を調製し、約5分間かくはん後の上澄み液を使用

表 1 に北里環境科学センターで行ったネココロナウイルス不活化試験の結果を示す。ホタテ貝殻焼成 CaO 粉末を蒸留水に溶解した 0.2%水溶液を、スターラーで 15 分攪拌後、上清液 (pH 12.6) を用いて不活化試験に用いたところ、30 秒間処理により感染価が 10^2 倍、2.5 分間処理により 10^4 倍、2 時間処理により 10^5 倍以下に低下した。

同様に、表 2 に日本食品分析センターにおけるネコカリシウイルス不活化試験の結果を示す。0.15%水溶液上清 (pH 12.6) を用いた 10 分間処理により感染価が 10^5 倍以下に低下した。

以上のように、ホタテ貝殻焼成 CaO 水溶液により顕著な抗ウイルス効果が認められた。

2. CaO 水溶液による抗菌効果試験

CaO 水溶液による抗ウイルス作用と抗菌作用は相関性があると考えられるため、ホタテ貝殻を焼成粉碎した CaO 粉体 (ナチュラルジャパン) の溶解性と抗菌効果を分析した。CaO 原体を乳鉢と乳棒で微粉碎したのち篩 (38 μm メッシュ) に通し、細粒品(S)と粗粒品(L)に分級し被検試料とした。比較のために水酸化カルシウム $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 試薬、炭酸カルシウム製剤 (CaCO_3)、クエン酸カルシウム製剤 CaCit (UNICAL, ユニカ食品) を用いた。Ca 粉体試料の濃度を 0.001%~1%の範囲で段階的に調製し、溶解性試験および抗菌効果試験に用いた。また、市販のアルコール消毒液 (72.3%), 次亜塩素酸ナトリウム 6%水溶液 (キッチンハイター, 花王) を用いて、段階的に濃度を変えて抗菌効果を比較した。図 1 に実験に用いた被検試料の走査型電子顕微鏡画像、図 2 に粒度分布、表 3 に平均粒子径を示す。

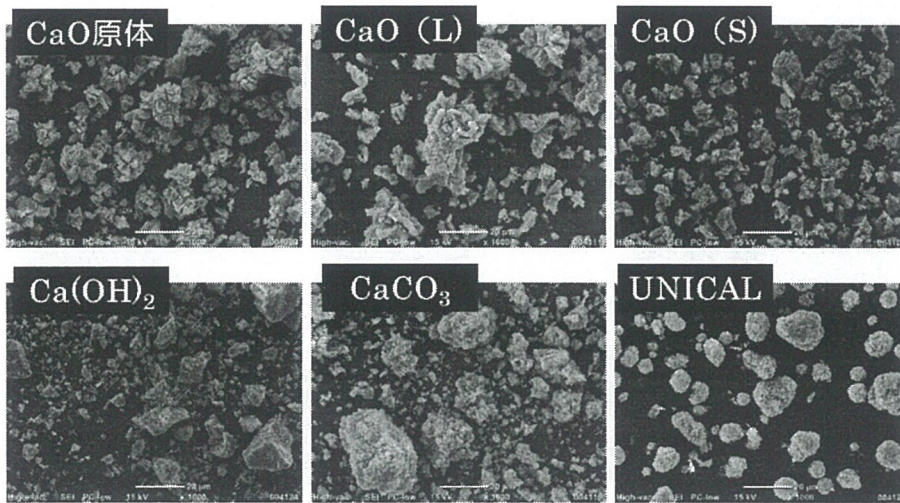


図 1 被験粉体の走査型電子顕微鏡画像

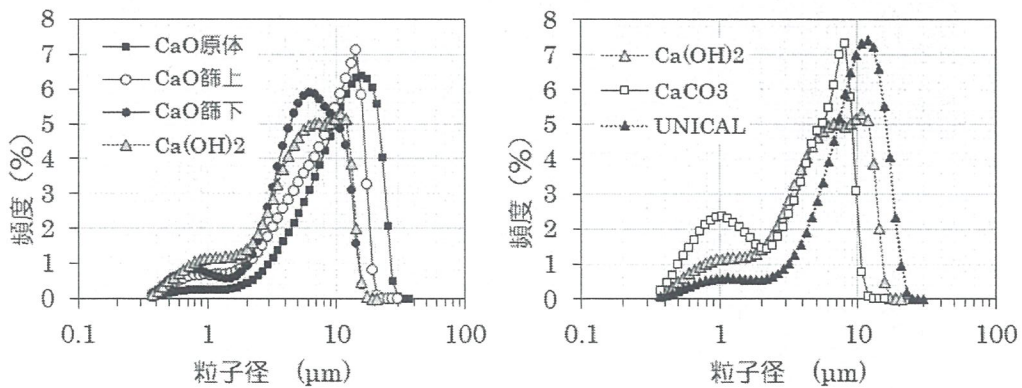


図 2 被験粉体の粒度分布

表 3 被験粉体の平均粒子径

	CaO 原体	CaO 篩上(L)	CaO 篩下(S)	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 試薬	CaCO_3 製品	UNICAL 製品
平均粒子径 μm	12.2	8.7	6.4	6.4	4.7	9.7

溶解性試験は、段階的に濃度を変えた Ca 水溶液の pH および濁度を測定し解析した。抗菌試験は、各試液 5 mL に対し、雑菌液（下水汚泥希釈液）を接種した培養液（培地組成：ポリペプトン 4 g/L、酵母エキス 2 g/L、ブドウ糖 1 g/L）を 1 mL 添加し、室温で 5 日間放置したのち濁度と pH の変動を測定し、雑菌の繁殖状況を比較した。

図 3 に CaO 粉体と比較粉体の濃度を変えて水に分散した溶解液の pH を示す。図 4 に濁度(OD)を示す。CaO は、0.05%以上の濃度で pH が 12 に上昇し、0.5%において濁度が顕著に増大した。溶解度が低下し不溶性微粒子が高密度に分散したことが分かる。

CaO(S)は CaO(L)よりも濁度が高く、水中で微細粒子が高密度に分散する CaCit⁴⁾と同等の濁度となった。CaO 粉体を微細化することで分散性が高まることが分かる。一方、CaCO₃は 0.5%の濃度でさらに濁度が高まったが、pH は 10.3 にとどまった。

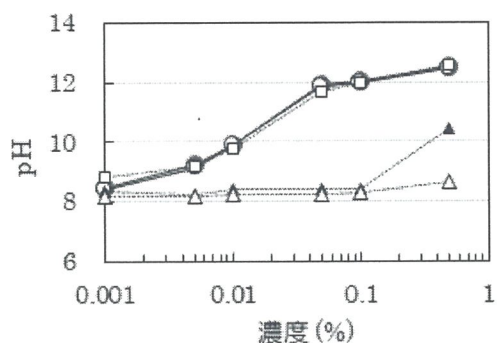


図 3 Ca 粉体分散液の pH

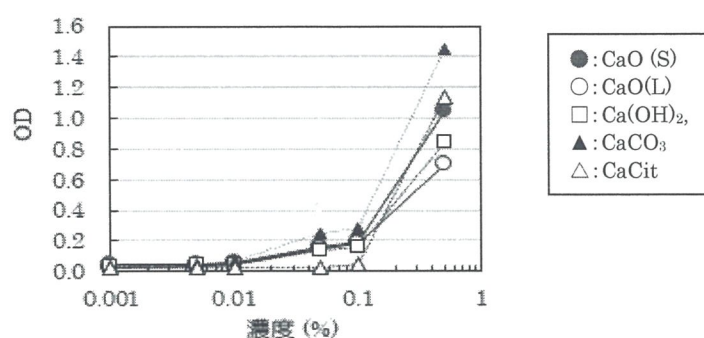


図 4 Ca 粉体分散液の濁度 (OD)

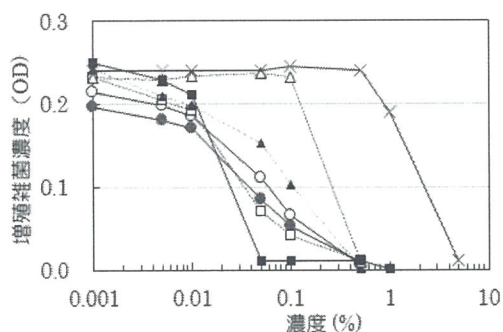


図 5 Ca 剤添加培養液の雑菌濁度(5d)

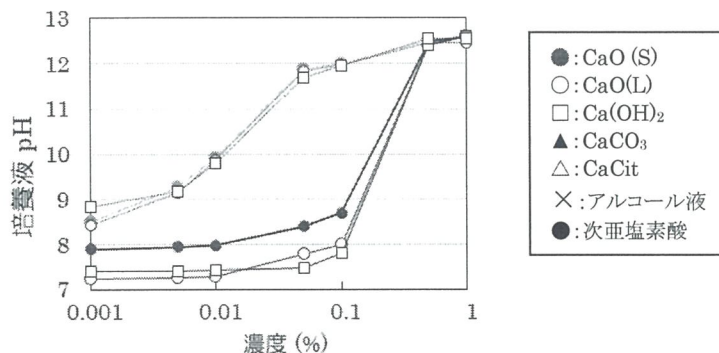


図 6 Ca 剤添加培養液の pH (破線:1 d, 実線:5 d)

図 5 に Ca 粉体試液に雑菌を接種し室温で 5 日間放置後の濁度を示す。比較のために次亜塩素酸 Na とアルコール希釈液の結果も示す。CaO(S)は 0.05%濃度で菌体濁度が半減し、0.5%では雑菌がほとんど増殖していないことが分かる。次亜塩素酸 Na の市販液は、衣服や器具などのつけ置き、トイレの便座やドアノブ、手すり、床等の洗浄には、200ppm (0.02%)での使用が推奨されており、同図からも高い殺菌効果が認められる。したがって、CaO(S)水溶液は 0.2%~0.5%ほどの濃度が必要であると考察される。

CaCO₃は 0.1%水溶液で菌体濁度が半減しており、0.5%水溶液では CaCit と共に CaO と同等の抗菌効果を示した。CaCit 水溶液は pH8.6 でも抗菌性があり、Ca 製剤は分散微粒子が菌体を吸着することで抗菌効果をもたらすことを示唆する。また、CaO 剤は水溶液中で Ca(OH)₂に変化するため、pH も濁度も抗菌性も同様の挙動を示し、CaO 剤の高い抗菌性には pH12 以上の強いアルカリ性が不可欠であることが分かる。そこで培養液の pH の変化を調べた結果を図 6 に示す。

CaO(S) 0.1%水溶液は、pH が初期の 12.0 から 5 日目に 8.7 に下降したが、Ca(OH)₂よりも pH が高く維持された。一方、0.5%以上の場合は pH が 12.6 に維持された。CaO 粉体を過飽和に添加した水溶液は強いアルカリ性が維持され雑菌繁殖が長期間抑えられるが、CaO 濃度が低い場合は雑菌繁殖により培養液 pH が低下したため、抗菌力が失われたと考察される。

3. 抗菌効果持続試験

抗ウイルス効果や抗菌力の持続性を調べるために、ろ紙短冊を各試液に 10 秒間浸したのち、40℃で 3 分、10 分、60 分乾燥したのち寒天培地に置き、雑菌繁殖抑制効果の持続性を調べた。その結果、次亜塩素酸 Na 希釈液、アルコール希釈液に浸漬したろ紙は寒天面で抗菌効果が低く、寒天（水分率

97%)により消毒液が希釈されたと考察される。一方、CaO 1%水溶液に浸したろ紙は、微粒子が表面に吸着することで抗菌効果が長時間持続する可能性が示唆されたが、図7に示すように雑菌汚染後の乾燥時間を長期化したろ紙の方が抗菌効果が低下した。CaO水溶液が乾燥したのちは、抗菌効果が徐々に低下することが示唆された。

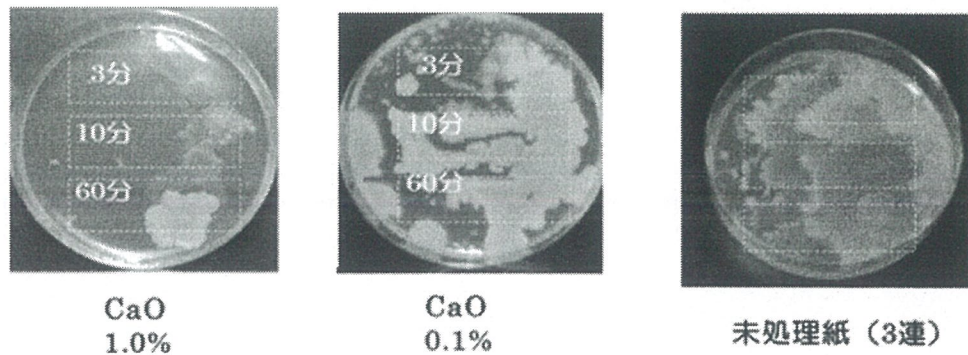


図7 ろ紙片を用いた抗菌効果持続性試験の結果

4. ホタテ貝殻焼成条件と溶解性

以上の結果から、ホタテ貝殻を焼成粉碎したCaO製剤の抗ウイルス効果を高めるためには、微粒子化することで分散性を高める必要があることが明らかとなった。一方、ナチュラルジャパンにおけるホタテ貝殻の焼成・粉碎加工プロセスを解析したところ、炉内温度が不均一なため、CaOの溶解性や粒子径にばらつきがあることを見出した。そこで、電気焼成炉を用いて焼成温度を950℃から1250℃まで段階的に変えて昇温時間3hおよび定温時間2hの条件で焼成実験を行ったところ、1075℃において分散性や溶解性が高まることが明らかとなった(図8)。

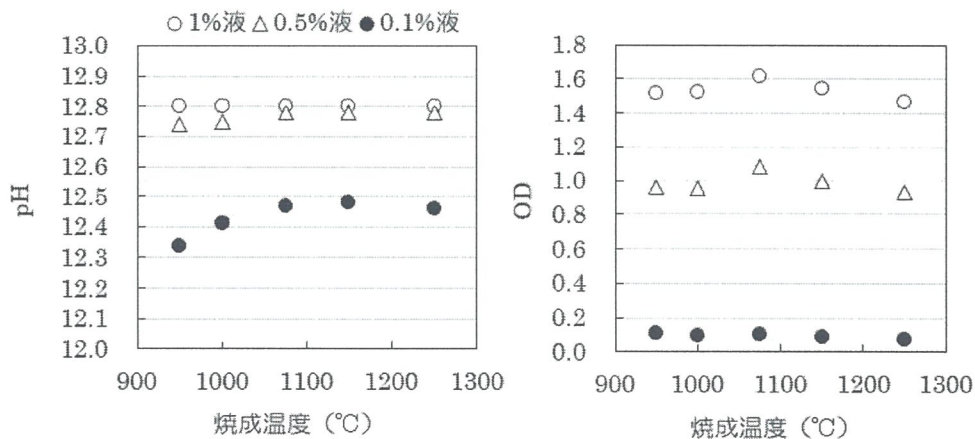


図8 ホタテ貝殻の焼成温度が溶解性と微分散性に与える影響

5. 結言

ホタテ貝殻を焼成粉碎したCaO製剤の抗菌・抗ウイルス効果は、微細粒子化(ナノ粒子化)により高まることが見出した。また、焼成工場の温度管理に問題があることが分かり、最適条件を検討したところ1075℃×2hの焼成条件により溶解性と分散性が高まることが見出した。

CaO水溶液に浸したろ紙片の抗菌性持続試験方法を検討し、乾燥により抗菌効果が低下するものの、持続性効果を確認することができた。

6. 参考文献

- 1) 村田亜悠美 他, 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, 富山大学看護学会誌, 7(2), 39-48, 2008
- 2) 澤井 淳 他, 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, 日本食品微生物学会誌, 20(1), 1-7, 2003
- 3) 澤井 淳 他, 酸化カルシウムを主成分とする焼成ホタテ貝殻粉末による枯草菌芽胞の殺菌, 防菌防黴, 35(1), 3-11, 2007
- 4) 鈴木高広 他, ホタテ貝殻を原料とする高吸収型カルシウム食品の人工胃液試験法による溶解性評価, 近畿大学生物理工学部紀要 43, 1-20, 2020年3月

3. 本研究と関連した今後の研究，開発・改良，提案計画

CaO 水溶液の抗菌・抗ウイルス効果は，主に pH12 以上のアルカリ性が作用していると報告されてきたが，今回の実験結果から，微粒子粉体に細菌やウイルスが吸着する作用も抗菌作用をもたらすことが見出された。ナノ粒子化することでウイルスの吸着殺菌性を高めると共に，マスクやフィルターやトイレの便座やドアノブ，手すり，床等の洗浄後に外観の白濁を抑えた被膜層を形成することで，長期間抗菌・抗ウイルス効果をもたらす技術開発が必要である。

新型コロナウイルス対策として，貝殻由来の抗菌・抗ウイルス製品が相次いで市販されているが，ほとんどの商品は透明な上清液を使用しているため持続性効果が乏しいと考えられる。抗ウイルス効果を持続するためには，ナノ粒子状の CaO 粉末の高濃度スラリーを製品化し，目詰まりすることなく均一に噴霧する技術開発が必要であり，企業側の商品開発と並行し，ナノ粒子スラリーの分散液が抗菌・抗ウイルス効果を実際に高めることを検証するための試験法を開発し，実証する必要がある。

ホタテ貝殻由来の CaO 製剤は，皮膚刺激性がほとんどなく，高い安全性が得られることも重要な利点であるが，さらに機能性を高めるために抗菌・抗ウイルス効果をもつ酸化チタンなどの添加効果や，容器内の沈殿凝集を防ぐ分散剤，噴霧液の乾燥を抑える保湿剤の配合条件を検討する計画である。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類 (著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
粉体工学会 2020 年度秋季大会	口頭	令和 2 年 11 月 18 日

5. 開発・改良，提案課題の成果発表等

これまでの研究成果を，関連学会大会および学術論文誌に発表を目指す。
新商品の上市の際に，プレスリリース等を検討したい。