

卵殻由来焼成カルシウムによる バイオセキュリティ強化と HACCP の確立

東京農工大学大学院農学研究院獣医衛生学研究室・教授 竹原 一明

■ 緒 言

畜産・食品業界では、家畜感染症対策並びに食中毒防除のため、危害要因分析・必須管理点管理方式(HACCP)の確立が急務である。厚生労働省は、HACCP 基準を将来的に義務化すべく、2014 年 5 月 12 日食安発 0512 第 6 号として、食品等事業者が実施すべき管理運営基準に関する指針の改正を行い、従来の基準「従来型基準」に加え、「HACCP 導入型基準」を規定した。農林水産省も、農場 HACCP 認証取得農場を 2018 年までに政府目標として 500 戸とした。HACCP の危害要因の中でも、特に病原微生物の制御は必須であるが、現在、食肉処理場や農場において、バイオセキュリティを長期的に高める消毒薬はない。また、従来の消毒薬は、有機物存在下において効果が著しく減弱する。

そこで、食品添加物として認められている焼成カルシウムに着目した。過去にホタテ貝殻由来焼成カルシウム(SSP)では、その粉末に殺微生物効果が認められ(Tsujimura et al. 2013)、SSP 粉末粒子径を小さくナノ化(平均粒子径 500nm)した場合には、その液体にも殺微生物効果が認められた(Thammakarn et al. 2014)。鶏糞を還元焼結処理して得られるバイオセラミック粉末(BCX)は、即効性はないものの、殺微生物作用があり、敷料への添加や餌への添加で病原体を制御できることを示した(Takehara et al. 2009)。本研究においては、食品副産物である鶏卵卵殻由来の焼成カルシウムについて、殺微生物効果があるかどうかを調べ、さらに、動物での感染抑制の可能性を調べた。これらの基礎的研究により、農場のバイオセキュリティを強化することで農場 HACCP の確立に資することができると考えた。

■ 方 法

1. 殺菌・殺ウイルス効果を示す卵殻焼成カルシウム生成の検討：まず、異なる温度条件で焼成処理して得られた卵殻焼成カルシウム粉末について、サルモネラ、大腸菌、鳥インフルエンザウイルス(AIV)、ニューカッスル病ウイルス(NDV)、伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)を用いて、*in vitro*での各種病原体に対する 99.9%以上の不活化能を指標に調べ、焼成法の最適条件を探った。不活化試験は、具体的には、焼成カルシウム粉末 200mg にウイルスあるいは細菌を 100 μ l 添加し、一定感作時間後、培地 900 μ l で添加微生物を回収し、10 倍階段希釈後に感染価をそれぞれの測定系(ウイルスは細胞培養、細菌は寒天平板培地)で測定した。
2. 待ち受け消毒資材としての評価：上記条件で得られた不活化能を認めた卵殻焼成カルシウム(Egg-CaO)粉末について、更なる検討を行った。Egg-CaO 粉末を野外に散布し、太陽光線下、あるいは降雨を模して湿潤と乾燥を繰り返し、殺菌・殺ウイルス効果を指標に、効果の持続性を調べた。
3. 実験動物でのバイオセキュリティ強化試験(農場 HACCP 対応)
ニワトリひなを用いた *in vivo* 試験：Egg-CaO 粉末をひな飼養環境下に用い、農林水産省の「ひなの成長試験」に従い、ひなの体重増加の推移を指標に、どの程度の濃度まで Egg-CaO 粉末が添加可能かを検討した。その後、本研究室で確立した、特定病原体フリー(SPF)ニワトリひなで水平感染抑制試験を用いて、Egg-CaO の感染抑制効果を調べた。

■ 結 果

1. 焼成方法の検討及び殺微生物効果
鶏卵殻を 600°C で焼成処理した場合、得られた粉末の pH は 9.2 だった。830°C あるいは 910°C で焼成した場合、pH は 12.5 となった。これまでのホタテ貝殻由来 CaO では、高 pH でないと殺微生物効果が得られていない。そこで、900°C 以上で得られた焼成卵殻を Egg-CaO 粉末として、以降の実験に用いた。なお、用途を拡大するため、液体利用も考え、Egg-CaO 粉末の 3% あるいは 10% スラリーに対して、振動により粉末粒子をより小さな粒子にすることを試みた。結果として pH は 13.7 に至る場合も認められたが、平均粒子径は 15 μ m 程度にとどまり、ナノ化には至らなかった。
上記 pH12.5 以上を示す Egg-CaO 粉末を用い、ウイルスとして、鳥インフルエンザウイルス(AIV)、ニューカッスル病ウイルス(NDV)及び伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス(IBDV)、細菌として、大腸

菌(EC)及びサルモネラ・インファンティス(SI)を用いて、殺微生物効果を調べた。AIV、NDVあるいはIBDVの力価は、未処理対照では、1mlあたり、 $10^{7.3-8.0}$ の50%組織培養感染量(TCID₅₀: $10^{7.3-8.0}$ TCID₅₀/ml)を示したが、Egg-CaO粉末処理3分間後には、検出限界未満($<10^{2.5}$ TCID₅₀/ml)を示し、99.9%以上の不活化が認められた。EC及びSIにおいても、コロニー形成単位(CFU/ml)で測定したところ、同様の99.9%以上の不活化が認められた。これらEgg-CaO粉末の不活化作用は、5%牛胎児血清による有機物存在下においても影響を受けなかった。

続いて、液体での殺微生物効果を調べた。Egg-CaO粉末の10%液の遠心上清(水溶液)に10分の1量の微生物を添加し、3分間あるいは1時間室温で静置し、その後、力価を測定した。AIVは、3分間の感作では10分の1程度の力価の低下が認められた(90%抑制)。1時間感作することにより、1,000～10,000分の1に力価が低下した(99.9%以上抑制)。NDVでは、3分間の感作で検出限界未満($<10^{2.5}$ TCID₅₀/ml)となった。細菌の場合、ECあるいはSIは、3分間感作で、いずれも検出限界未満($<4.0 \times 10^{2.0}$ CFU/ml)となった。

2. 待ち受け消毒としての効果

Egg-CaO粉末をシャーレに採り、野外環境に曝した。降雨を模すため、1日汲み置きの上水道水をシャーレに加え、空気中で自然乾燥させる方法で、湿潤・乾燥を繰り返した。湿潤・乾燥4回後までpHは12.5以上を示し、粉末はAIV及びNDVも検出限界未満まで不活化できた。太陽光に当たったのち、1週間ごとに粉末を回収した場合は、3週間までAIVが検出限界まで不活化された。

3. *in vivo* 安全性試験

ニワトリひなの成長試験では、敷料に敷料重量の10倍量のEgg-CaO粉末を添加すると、成長が著しく抑制された。鶏糞を還元焼結処理して得られるバイオセラミック(BCX:Takehara et al., 2009)と比較すると、添加量を少なくする必要があった。敷料へのEgg-CaO粉末の10%添加及び餌への0.1%添加では、体重増加に負の影響は認められなかった。そこで、ニワトリひな飼養環境下に、Egg-CaO粉末を敷料への10%、飼料への0.1%添加において、IBDVの水平感染抑制試験を実施したところ、無添加対照と比較して、感染の抑制は認められなかった。

■ 考察

鶏卵卵殻由来焼成カルシウム(Egg-CaO)粉末においても、900°C以上で焼成することにより、pH12.5以上の粉末が得られ、3分間という短時間で、99.9%以上の微生物を不活化できる殺微生物効果が認められた。特に、ウイルスではエンベロープを有するウイルス(AIV、NDV)に加え、比較的消毒薬に対して抵抗性を示すエンベロープを有さないウイルス(IBDV)に対しても、殺ウイルスを示したことは、汎用性が考えられた。さらに、粉体で用いる場合、有機物存在下においても、効果の減弱は認められず、農場など、現場において有効と考えられた。

液体利用に関しては、10%の濃い濃度で用いた場合でも、その遠心上清(水溶液)は、AIVの不活化には1時間を要した。ホタテ焼成カルシウムでは、平均粒子径20 μ mでは、殺ウイルス効果が認められず、平均粒子径を500nmに小さくさせること(ナノ化)で、3%水溶液で5秒間の短時間でAIVの不活化に成功している(Thammakarn et al., 2014)。今回試みた振動法では、平均粒子径は15 μ m程度に留まり、ナノ化粒子は得られなかった。その結果として、液体での殺AIV効果は、十分とは言えなかった。液体利用を考える場合、今後、粒子径を小さくする工夫が必要である。ただし、殺NDVや殺菌効果については、99.9%以上の不活化能を示したことから、現状のEgg-CaO粉末の水溶液でも利用可能と考えられた。

ニワトリひなでの*in vivo*実験においては、鶏糞由来バイオセラミック(BCX)においては、敷料の10倍量を添加しても、増体量に影響は認められなかったが、Egg-CaO粉末の場合、ひなの体重増加は低下した。そこで、敷料の10%添加にしたところ、体重への影響はなかった。しかし、IBDVでの感染抑制試験を行ったところ、十分な感染抑制効果は、得られず、動物飼養の周辺に散布する待ち受け消毒での利用法が考えられた。実際、野外への散布を模した試験においては、3週間後まで、殺AIV効果が認められた。

■ 要約

鶏卵卵殻由来焼成カルシウム(Egg-CaO)粉末の殺微生物効果を調べた。900°C以上で焼成した場合、得られたEgg-CaO粉末は、アルカリ性pH12.5以上を示し、有機物存在下においても、ウイルスや細菌を3分以内に不活化した。野外条件下でも、降雨4回後や太陽光下3週間後においても、pH12.5以上を維持し、殺微生物効果が維持された。これらは、待ち受け消毒資材としてEgg-CaO粉末が有

効であることを示している。動物飼養下での利用においては、更なる検討が必要である。液体利用に関しては、水溶液にある程度の効果は認められたが、粉末粒子径をより小さくするなどの改良が望ましいと考えられた。

■ 文 献

Takehara K, Chinen O, Jahangir A, Miyoshi Y, Ueno Y, Ueda S, Takada Y, Ruenphet S, Mutoh K, Okamura M, Nakamura M. (2009) Ceramic powder made from chicken feces: anti-viral effects against avian influenza viruses. *Avian Dis.* 53:34-38.

Thammakarn C, Satoh K, Suguro A, Hakim H, Ruenphet S, Takehara K. (2014) Inactivation of avian influenza virus, Newcastle disease virus and goose parvovirus using solution of nano-sized scallop shell powder. *J. Vet. Med. Sci.* 76(9):1277-1280.

Tsujimura M, Thammakarn C, Yamada Y, Satoh K, Hasegawa T, Ruenphet S, Takehara K. (2012) Antiviral activity of scallop-shell powder against avian influenza virus and goose parvovirus. *Trans. Mat. Res. Soc. J.* 37(4):567-570.