

Calcinated egg shell as a candidate of biosecurity enhancement material

バイオセキュリティ原料の候補としての焼成卵殻

要約

酸化カルシウムが主成分である焼成卵殻の粉末および水溶液が鳥インフルエンザ (AIV)、ニューカッスル病 (NDV)、伝染性ファブリキウス嚢病 (IBDV)、サルモネラ菌 (SI)、および大腸菌 (E.coli) に対する殺菌剤としての有効性の評価を行った。

焼成卵殻カルシウム粉末は、ウシ胎児血清 (FBS) が 33%ある中で 3 分以内にこれらのウイルスを不活性化した。焼成卵殻カルシウム溶液中では、FBS5%ある中で AIV を除いて、すべての病原体を 1 時間以内に不活性化した。

FBS のない条件では、農場の厳しい環境に似せて 2 週間日光に曝し、7 回水で懸濁した後であってもすべての病原体と AIV と NDV の不活性化が確認された。

雛の成長試験では、鶏用ゲージで焼成卵殻カルシウムを用いた場合の安全性を確認するために実施して飼料と敷料に加えても安全であることが示唆された。

結果、焼成卵殻カルシウムは、農場におけるバイオセキュリティ強化に有効であると示唆された。

(キーワード)

焼成卵殻カルシウム、農場レベル HACCP、鳥類病原体の不活化、家畜バイオセキュリティ

はじめに

食品の安全のために日本の農林水産省は、畜産農家の HACCP 認定基準を発表した。

HACCP 農家として採択された農家の認定評価は、農家 HACCP の有機認定として 2011 年から始まった。

農家レベルの HACCP は、畜産農家の主要な生産拠点の生産性と安全性の改善が目的である、

農家として生物学的な危険は、サルモネラ菌、大腸菌、鳥インフルエンザウイルス、ニューカッスルウイルス、伝染性ファブリキウス嚢病を含めたものである。

これらの病原体は人畜共通感染し、そしていくつかは国内の動物に対しても伝染性がある、しかしながら農家のバイオセキュリティの強化は農家段階での HACCP がもっとも重要で

ある。

2003年以來 アジア各国の土着性からなる H5N1 サブタイプに起因する高原性鳥インフルエンザが発生し、いくつかのアジアの国で HPAI に対してワクチンを使用していたことが主な理由である。

高原性インフルエンザは世界の家禽産業での深刻な病気の1つである。

アメリカでの H5N8 型と H5N2 型の HPAI による発生は5千万羽前後の鳥類の屠殺を引き起こした。

ニューカッスル病は高い伝染性と世界中すべての家禽産業に大きな不安となる。

農家のバイオセキュリティ強化は、伝染病制御に大変重要である。

カルシウム水酸化物が主な成分の消石灰は日本の農家で幅広く消毒剤として使われているが眼について問題があり、もし眼に消石灰が入れば失明する。

消石灰の消毒効果は、パウダーで長い期間維持するがもし雨に濡れると硬化する。

加えて、消石灰は酸素や雨水で二酸化炭素と組み合わせた時に炭酸カルシウムになり、pH は低下し、消毒効果の不活性化をもたらすことになることと報告されている。

農家でスプレー消毒する時は怠りなく何度もスプレーする必要がある、なぜなら降雨により水で湿った時、長期間有機物にさらされることになることと効果がなくなる。

キューピーグループは、毎年日本国内で鶏卵生産の10%となる250,000トンの扱いがあり、副産物として25,000トンの卵殻が発生している。

主成分は焼成卵殻カルシウム (Egg-CaO)

酸化カルシウムは水に混ぜることで水溶液は水酸化カルシウムなり、pH が 12.0 より高くなる。

24時間さらしても pH12.0 は保持されることを報告した。

我々はまたホタテ貝殻パウダー溶液の pH12.3 で AIV は不活性化しなくて pH13.0 で不活性化したことを報告した。

そのうえで 12.5 を超える水溶液はインフルエンザに不活性化を見出せる。

我々の知見から卵殻 CaO は抗ウイルス活性についての調査はない。

上記のことから卵殻 CaO は農家のバイオセキュリティの強化に役立つことが推測される。

本研究は、AIV と NDV と IBDV とときどき発生する家禽に深刻な感染症のウィルスを標的にしたものである。

加えて、食中毒を引き起こすサルモネラ菌と大腸菌にも農家のバイオセキュリティの強化の資材としての評価をした。

【材料と方法】

焼成卵殻パウダー

焼成卵殻パウダーは、900℃で加熱され、パウダーの粒子直径の平均は 15μm の焼成卵殻パ

ウダーはキューピータマゴから提供された。

焼成卵殻カルシウムの3%と10%の懸濁液は、それぞれ3分間の12000xg遠心分離し再蒸留水により作成したものをそれぞれ3%と10%の焼成卵殻カルシウム溶液として使用した。両方ともpHは12.7を示した。

Viruses：ウイルス

低い病原性 AIV は、A/duck/Aomori/395/04/(H7N1)で佐藤系 NDV は鶏卵で培養した。一定の分量後、使用まで-80℃で保存した。

D78 系 IBDV ワクチンは、購入した。

:細胞培養

イヌ腎臓尿管上皮細胞由来細菌株細胞は AIV と NDV に使用した。

胚繊維芽細胞 (CEF) は、説明されている通り胚含有卵 10 日前から調製して IBDV 滴定に利用した。

成長培地(GM)は、イーグル最少必須培地ウシ胎仔血清と L グルタミン 0.3mg/ml と炭酸水素ナトリウム 1.4mg/ml と抗生物質-抗菌物質混合液を用いて調製した。

維持培地 (MM) は、FBS なしで GM と同じく調製した。

ウイルスは、連続 10 倍希釈してイヌ腎臓尿管上皮細胞由来細菌株細胞に AIV と NDV と IBDV 由来 CEF を 96 穴組織培養プレートに接種した。

AIV には 0.2µg/ml のトリプシンを各セルに加えた。

プレートは、5%二酸化炭素の存在下 37℃で培養した。

AIV と NDV には、3 日前に接種し、ウイルス誘導細胞変性させて、赤血球凝集素 (HA) 培養上清の活性を 0.5%鶏赤血球で確認した。

IBDV と CPE には、5 日前に接種して滴定して得ておいた。

50%の組織培養感染用量は、Behrens and Karber の方法によって決めた。

細菌

NRBC103673 系大腸菌は、製品評価技術基盤機構から購入し、そしてサルモネラティス (SI) は藤川博教授 (東京農工大獣医学科公衆衛生研究室) から懇意で提供いただいた。

利用時に、これらの細菌は、DHL 寒天培地の上で継代培養して 37℃で一晩培養した。

コロニーは LB 培地に採って培養し、そして DHL 寒天培地に説明されている通り滴定した。

有機原料は取り除き、LB 培地は 1,750xg で 20 分遠心して沈殿物は PBS に再懸濁させた。

これは、PBS に 2 回遠心分離と再懸濁させた。

懸濁液は最近洗浄として利用した。

大腸菌とサルモネラティスは連続 10 倍希釈して DHL 寒天培地に接種した。

シャーレは一晚 37℃で培養してコロニー数を列挙した。

力価は ml 当たりのコロニー形成単位で計算した。

病原体に対する焼成卵殻カルシウムの不活化活性の評価

3%と 10%の焼成卵殻カルシウム溶液の 400μl マイクロチューブに AIV と NDV と IBDV のウイルス 100μl を混合させる。

有機物存在下での抗ウイルス活性評価は、ウイルスを FBS の半量として 300mg の焼成卵殻カルシウムを加えた 150μl の混合物をマイクロチューブに混ぜる。

3 分間室温で培養後、ウイルスは MM の 900μl か 850μl で回収して、17400xg で 3 分間遠心分離して、それぞれの各感受性細胞に滴定した。

焼成卵殻カルシウムの病原体に対する不活化活性の評価

F3%と 10%の焼成卵殻カルシウム溶液を 400μl マイクロチューブに 100μl のウイルス (AIV と NDV と IBDV) と細菌 (サルモネラティスと大腸菌) を混合して室温で培養 (3 分間と 1 日) し、その時テストする溶液の pH が 8.2 くらいになるようにウイルスは 1M HEPES (pH 7.2) バッファーと細菌は 1M Tris-塩酸バッファーで 500μl 中和した。

中和したサンプルは、DHL 寒天培地プレートにそれぞれの感受性細胞に滴定した。

有機物に対する溶液の不活化活性評価は、マイクロチューブに焼成卵殻カルシウムと FBS 25μl に 100μl のウイルスと細菌を加えて、その後テスト溶液は pH をウイルスは 1M HEPES バッファーと 1M Tris-塩酸の 500μl で中和して、1M HEPES バッファーと 1M Tris-塩酸はウイルスと細菌を入れる前に調製した。

各溶液は 3 回テストして力価は測定値 ± 標準偏差で示した。

:減少係数の算出

病原体に対する不活化効果は減少係数を用いて決めた。

$RF = \log_{10}(\text{amount of untreated intact pathogens/ml}) - \log_{10}(\text{amount of treated pathogen with Egg-CaO /ml})$.

$RF = \log_{10}(\text{未処理の無傷の病原体数}) - \log_{10}(\text{卵殻カルシウム処理の病原体数})$

不活性化は、RF が 3 以上の時とした。

過酷な条件下での殺ウイルスの評価

焼成卵殻カルシウムは、次のように環境への適応後 AIV と NDV の殺ウイルス不活性化効果の持続性について評価した。

焼成卵殻カルシウム 3g の量を 90mm のペトリ皿に注ぎ、このようにして平米当たり 0.5kg のフィールドに似せた条件とした。

シャーレは、8 週間朝から夜まで日光の下を保持した。

もう 1 つの焼成卵殻カルシウムパウダーを含んだシャーレは、湿気と乾燥の条件で保持した後その持続効果を別々に調製されて維持し測定した。

シャーレに入れた焼成卵殻カルシウムパウダーは、シャーレ当り 10ml で塩素を含まない水で懸濁した。

これらのシャーレは、干上がるまで日光下に保持した。

この手順を 10 回繰り返した。

シャーレの焼成卵殻カルシウムパウダーの量は、乾燥した後 10 回と同様に日光下 8 週間以下のために収集した。

マイクロチューブ中の 100mg の焼成卵殻パウダーは、AIV と NDV50 μ l と一緒に培養した。

ウイルスは MM の 450 μ l で回収して連続 10 回希釈して MDCK 細胞にて培養した。

鶏生長試験は、飼料と敷料に加えた焼成卵殻カルシウムパウダーの安全性

飼料添加した焼成卵殻カルシウムパウダーの提案の可能性は、説明通り MAFF のプロトコールに従って 8 日齢の 18 匹の鶏を用いた。

動物試験は東京農工大学の動物福祉ガイドライン第 26-45、27-20 の許可により厳格に行った。

商業用日齢のオスの雛で、ワクチン接種なし、以下、従来の雛を指定して関東(株)から購入した。

6 羽ごとラットゲージに 8 日齢までアイソレーター内で保持し試験に用いた。

ゲージ 1 つは、0.1% の焼成卵殻カルシウムパウダーを加えた飼料とノーマル敷料を提供し、1 つのゲージには、ノーマル飼料と 10% の焼成卵殻カルシウムパウダーを提供し、一方もう 1 つのゲージは対照区として保持しノーマル飼料とノーマル敷料を提供した。

体重増体は 6 日間観察した。

SPCC ソフトは統計分析に SPCC ソフトを用いた。

得られた体重はダンカンの多重分析を用いて分散分析とスチューデント t-テストにより分析した。

パラメータの違いは、有意差 $P < 0.05$ で検定した。

【結果】

焼成卵殻カルシウムパウダーの殺ウイルスの評価

表 1 に示した。焼成卵殻カルシウムパウダーは 3 分間で検出可能以下に不活性化し、この能力はすなわち FBS の 33% で有機物存在の影響を受けなかった。

RF を計算すると、焼成卵殻カルシウムパウダーは 3log より 3 分以内にウイルス力価の減少で有効であった。

表 1 焼成卵殻カルシウムパウダーの殺ウイルス効果

ウイルス		AIV		NDV		IBDV	
		+	-	+	-	+	-
FBS33%添加		+	-	+	-	+	-
培養期間	対照区	7.50 ^{a)}	7.88	7.75	8.42	7.13	7.13
	3分間	<2.50	<2.50	<2.50	<2.50	<2.50	<2.50
RF ^{b)}		>5.00	>5.38	>5.25	>5.92	>4.63	>4.63

a) log₁₀TCID₅₀/ml として

b) 減少係数(RF)=log₁₀ (未処理の総ウイルス量) - log₁₀ (焼成卵殻カルシウムによる処理区の総ウイルス量)

Evaluation of the inactivation activity of Egg-CaO solutions against pathogens:

病原体に対する焼成卵殻カルシウム溶液の不活化活性の評価

病原体を加える前に溶液の pH は細菌のために 1M Tris-HCl とウイルスのために 1M HEPES に中和し、1M Tris-HCl と 1M HEPES は試験溶液病原体不活性化を防ぐために非病原体力価減少は陽性の対照との対比を観察した。

サルモネラチアと大腸菌に対する 3% 焼成卵殻カルシウム溶液の細菌への効果は、表 2 に示した。

サルモネラチアの試験の力価は、それぞれ 0 秒培養で 5% FBS8 のあるなしで CFU/ml あたり 8.17±0.14 と 8.28±0.11 であった。

サルモネラチア力価は、焼成卵殻カルシウム溶液添加時にそれぞれ FBS あるなしにより 3分間で 2.10±0.10 と 2.00 以下に低下した。

RF は 6 以上と計算された。

大腸菌は、また 3 分以内に検出可能レベル以下に不活性化した。

10% 溶液の結果は同様に、すべての細菌は培養 3 分以内に非検出レベルに不活性化した。

(データ未表示)

3% 焼成卵殻カルシウム溶液の AIV と NDV と IBDV の殺ウイルス効果は表 3 にまとめた。

予備試験では、AIV は、3 分間以内に不活性化しなくて、一方 1 時間培養した後に AIV は FBS なしで不活性化した(表 2)。

しかしながら FBS 存在下では AIV は 3% と 10% の焼成卵殻カルシウム溶液は 1 時間培養後も不活性化しなかった。

NDV と IBDV は、FBS あるなしで 3 分以内に不活性化した。

表2 3%焼成卵殻カルシウム溶液の殺細菌効果

細菌		サルモネラ		大腸菌	
		+	-	+	-
FBS					
対照区		8.68±0.29 ^{a)}	9.03±0.39	8.38±0.04	9.06±0.33
培養時間	0秒	8.17±0.14	8.28±0.11	8.19±0.04	8.73±0.31
	3分間	2.10±0.10	<2.00±0.00	<2.00±0.00	<2.00±0.00
RF ^{b)}		6.07	>6.58±0.19	>7.03±0.39	>6.38±0.04

a) log₁₀TCID₅₀/ml として

b) 減少係数(RF)=log₁₀(未処理の総ウイルス量) - log₁₀(焼成卵殻カルシウムによる処理区の総ウイルス量)

表3 3%の上清液の殺ウイルス効果

ウイルス		AIV		NDV		IBDV	
		-	+	-	+	-	+
FBS							
対照区		8.33±0.22	7.42±0.44 ^{a)}	7.00	6.88±0.16	6.87±0.20	
培養時間	0秒	7.91±0.08	6.17±0.44	7.00	7.37±0.24	7.36±0.24	
	3分	NT ^{b)}	3.75±0.75	<2.50	1.90±0.10	1.90±0.10	
	1時間	3.83±0.79	NT	NT	NT	NT	
RF ^{c)}		4.50±0.66	3.67±0.94	>4.50	>4.63	4.97±0.10	

a) log₁₀TCID₅₀/ml として

b) 未試験

c) 減少係数(RF)=log₁₀(未処理の総ウイルス量) - log₁₀(焼成卵殻カルシウムによる処理区の総ウイルス量)

厳しい条件下の殺ウイルスの評価

図1に示したようにサンプルをAIVとNDVを用いて3分間培養した時日中日光下で保持しても2週間焼成卵殻カルシウムはその効果を保持した。

焼成卵殻カルシウムパウダーを濡らし乾燥下の状態にし、サンプルをAIVとNDVを用いて3分間で評価した時、6回再懸濁しても3分の培養中に高い効果が実証された(図2)。

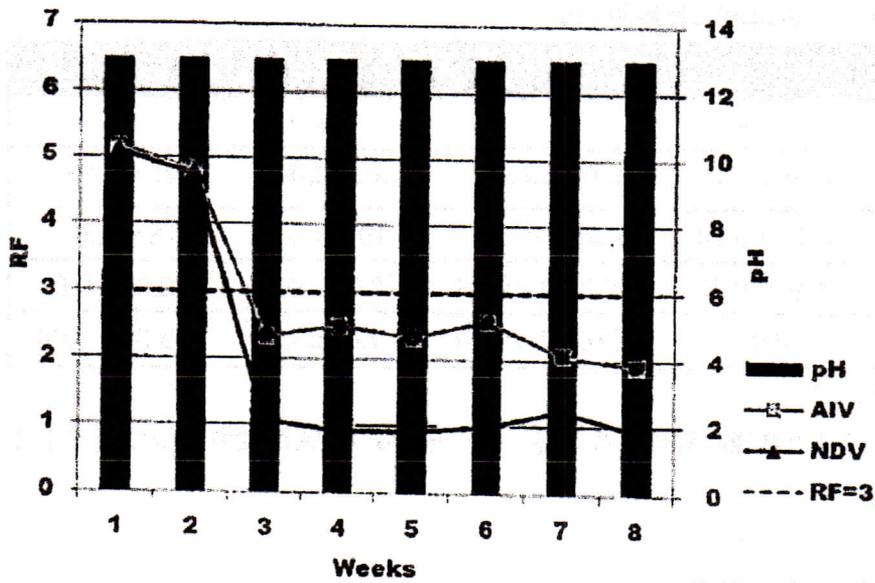


図1 日光に曝した後の焼成卵殻カルシウムの殺ウイルス効果

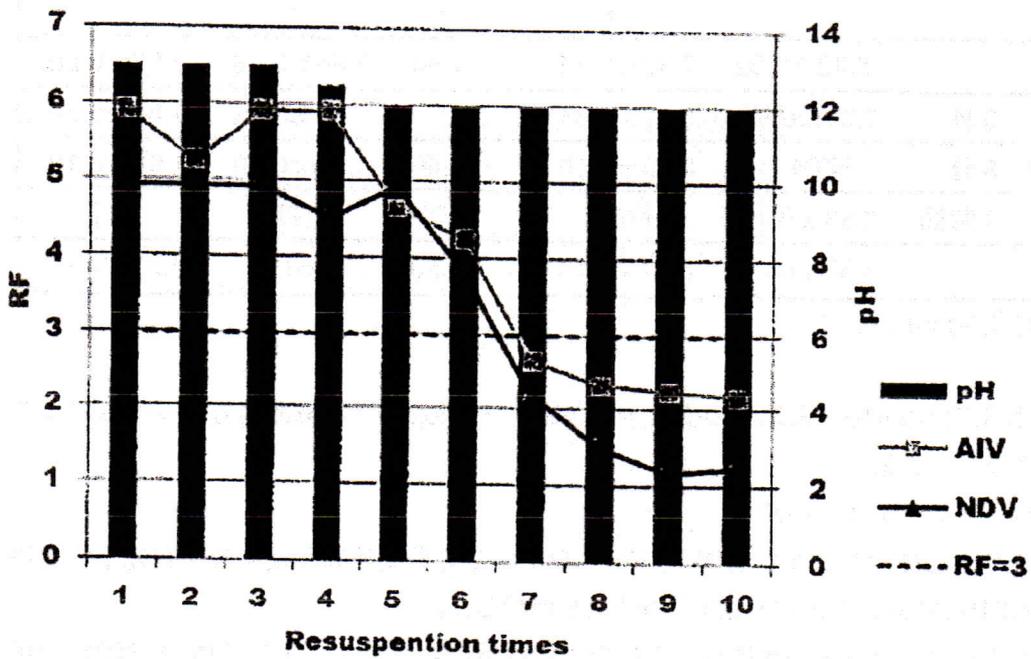


図2 湿気と乾燥の条件にした後の焼成卵殻カルシウムの殺ウイルス効果

焼成卵殻カルシウムパウダーが鶏の生長パフォーマンスへの飼料と敷料の効果
 説明通りに MAFF の手順に従い安全性試験は正気の体重を焼成卵殻カルシウムパウダー処
 理区と対照区を比較した。

これらはすべてのグループの開始時の日齢に差はなかった。

6日後の終了時の体重はグループ間の有意差は示さず評価された。

成長率は、焼成卵殻カルシウムパウダーのあるなしお生長パフォーマンスの効果があるかどうかを ADG の期間で表します。

結果は、各試験の開始する日齢の制御での比較した時に差は明らかでなかった (表 4)。

表 4 焼成卵殻カルシウムによる雛の成長パフォーマンス

	Initial BW (g)	Final BW (g)	ADG ^{a)} (g)
Control	79.40±5.84 ^{b)}	112.23±4.19	5.47±1.26
Treatment(10%litter)	78.03±3.93	109.58±6.28	5.26±0.45
Treatment(0.5%feed)	74.72±1.82	111.52±4.53	6.14±0.68

a) 日増体量

b) 鶏 6 羽の同群の測定値±標準偏差において有意差なし (P>0.05)

結論

焼成卵殻カルシウムパウダーは、FBS33%の有機物存在下でも 3 分以内に AIV と NDV と IBDV を不活性化できた。

焼成卵殻カルシウムパウダーの殺ウイルス活性は家禽農場で糞を含めた敷料や食品など多くの有機物が占めていることを考慮しても農場条件下で用いることが適切であることが観測された。

消石灰と生石灰も敷料の細菌不活性化の有効性を示した。

AAIV は、比較的脱水、中性洗剤と界面活性剤でその感度が増強して脂質包みために不活性化は容易である。

しかしながら、それは pH2 で 5 分さらすとその伝染力は 100%失出すると報告があるが pH12 への 12 分暴露では伝染力の効果はない。

Thammakarn らは、pH12.3 では AIV 不活性化できないとしているが、pH13.0 は不活性化できると報告している。

表 3 に示したように、AIV は 3%の焼成卵殻カルシウム溶液は FBS 存在しないで 3 分以内処理の 3%の焼成卵殻カルシウム溶液は不活性化できなかったが、1 時間処理後は不活性化した。

5%FBS 存在下では、1 時間培養した後、AIV は不活性化しなかった (データ未掲載)。

表 2 と 3 で示したように、3%の焼成卵殻カルシウム溶液は 5%FBS 存在下で 3 分以内に、AIV を除くすべての病原体を不活性化した (RF>3)。

主な決定的要因は高い pH13 付近と思われるけれど溶液の pH は病原体を加える前に 1M HEPES と 1MTris-HCl で中和した時に、全く不活性化しないことは実証された (表 2、表

3、0秒)。

AIVの実証データは、前述のように高いpHに耐性がある。

過酷な条件で、それは消石灰を3週間日光下で殺ウイルス効果を維持して(RF>3)そのサンプルがLPAIV(H7N1)を用いて3分で評価した時に3回懸濁した濡らしと乾燥下で高い効果(RF>3)を示した報告した。

加えて、それは降雨後も示し、消石灰は硬化してそれは石灰の表面からサンプルを採取は難しい。

これらのことを考えると焼成卵殻カルシウムは消石灰より6回の濡らしと乾燥下で保った時にも長く効果を持っていた。

鶏に対して焼成卵殻カルシウムパウダーの安全性試験はMAFF手順に従って行いそして鶏が8日齢になって開始した。

これらは処理区と対照区の間ADGに有意差はなかった。

この意味は焼成卵殻カルシウムパウダーを例え1週齢位の危険な時期に用いても、危害はなく、0.5%を鶏の飼料に添加し、敷料に10%加えても安全に用いることができる。

Bennettらは敷料に5%を超えた石灰は孵化雛に対して軽度の要因と報告しているが0.5%以下の石灰で眼と呼吸器に現れる。

これらは49日齢に雛に続いた。

本研究は、焼成卵殻カルシウムは農場条件下でも病原体の短時間の接触により家禽の優勢なウイルスと細菌を不活性化のために良い効果がある。

焼成卵殻カルシウムを産業廃棄物かの貴重になるかは、卵殻の価格変更するための焼成方法の開発が必要である。

謝辞

焼成卵殻カルシウムパウダーを提供いただいたキューピータマゴ(株)にお礼申し上げます。

本研究は旗影会財団の2014年と2015年の補助をいただいた。

(参考文献省略)