ホタテ焼成微粒子付着バガスピスを混抄した機能紙の抗菌特性

小田 涼太^{*1, #}・木村 照夫^{*1}・稲垣 寛^{*2}・勝圓 進^{*3}

Anti-bacterial Effect of High Performance Paper with Attached Scallop Particles to Bagasse Pith

Ryota Oda^{*1, #}, Teruo Kimura^{*1}, Hiroshi Inagaki^{*2}, and Susumu Katsuen^{*3}

^{*1}Department of Advanced Fibro-Science, Kyoto Institute of Technology,
Goshokaido-cho, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

^{*2}Kobe Women's University, 2-1 Higashisumaoayama, Suma-ku, Hyogo 654-8585, Japan

^{*3}Kurabo Industries Ltd., 4-31, 2-Chome, Kyutaro-machi Chuo-ku, Osaka 541-8581, Japan

Abstract : A high performance antimicrobial paper was fabricated using composite of sugar cane bagasse pith and burned scallop particles with sugar cane bagasse pulp. The paper that was fabricated without degassing the composite pith had higher the scallop particle concentration on the top of surface displayed a greater value of anti-bacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* than paper prepared that were mixed with degassing the composite pith and only mixed with scallop particle after 30minutes of cultivation. However the bagasse pulp and pith had antimicrobial activity as well as the scallop particle, the activity was not constant. The paper that was fabricated without degassing the composite pith had the stable activity and the quick effect.

(Received 23 December, 2013 ; Accepted 17 March, 2014)

1. 緒 言

抗菌加工製品は、特に日本において、清潔志向の高まりから一般生活にも浸透しており、台所用品、風呂用品さらには肌着や下着等多くの分野で使用されている[1]。また、一般生活以外においても、例えば病院における免疫低下患者へのメチシリン耐性黄色ぶどう球菌(MRSA)による院内感染が問題となっており[2-3]、抗菌加工製品の需要は増々と増大している。抗菌性物質として使用可能なホタテ貝殻焼成粒子(以下、ホタテ粒子と称す)の水溶液はMRSAに対しても抗菌性を示すことが知られている[4]。このホタテ粒子を用いて、例えば通常のベッドシートに抗菌性を付与する場合に紛体あるいは溶液では扱いにくい、紙状にすることでシートの下に敷くことが可能となり、簡便に抗菌性を付与できると考えられる。また、既報[5]において、サトウキビの搾りかすから得られるバガスピス(以下、ピスと称す)にホタテ粒子を物理的に付着後、それを混抄し作製した機能紙は、ピスとパルプを単純に混抄、あるいはピスを用いずホタテ粒子のみを混抄した場合に比べ、ホタテ粒子の歩留まりが向上す

ること、さらにはホタテ粒子付着後のピスに対する脱気の有無で、ホタテ粒子の紙中での分布を変えることができる。このようなホタテ粒子を付着させたピスから構成される機能紙は、天然材料かつ未利用資源利用材料であり、人体のみならず地球環境にも配慮した抗菌紙であると言える。本報では、この抗菌紙の有効利用を図るために、紙の作製条件を種々変化させ、ホタテ粒子の紙中での分散状態が得られた抗菌紙の抗菌性に及ぼす影響について、MRSAを対象に考察した。

2. 実 験

2.1 MRSAの最小発育阻止濃度の測定

まず最初に、抗菌性を発現できると考えられる紙中のホタテ粒子濃度を決定するために、ホタテ粒子水溶液のMRSAに対する最小発育阻止濃度(MIC)を以下の方法で測定した。すなわち、ホタテ粒子(東京ナノバイオテクノロジー社製)を蒸留水に分散させ、7.8から4000 µg/mlでの2倍希釈ずつ段階希釈した水溶液を作製した。そこに1×10⁵ 個/mlに調製したMRSA(IID-1677)を各水溶液に接種した。数分後に、各水溶液に接種した菌液1mlをシャーレに添加して寒天培地を加え、37℃にて24時間、静置培養後、菌の発育をコロニー形成によって判定し、MICを決定した。

corresponding author

^{*1} 京都工芸繊維大学

^{*2} 神戸女子大学

^{*3} 倉敷紡績株式会社

2.2 ホタテ粒子複合ピスを用いた抗菌紙の作製

抗菌紙は既報[5]と同様の方法によって作製した。すなわち、JIS-P-8222(パルプ—試験用すき紙の調製方法)を参考に、紙の原料としてサトウキビバガスから作られたパルプ(Environmental Pulp and Paper Company Limited(タイ)製、以下パルプと称す)を叩解し、カナダ標準濾水度を97mlにしたパルプ(坪量54g/m²)に、サトウキビの芯部であるピスにホタテ粒子を付着させ粉碎したもの(以下、SPと称す)を、種々の比率で変化させて混抄した。また、抄紙時の条件としては、SPを脱気せず混抄(case1)、水中で脱気したSPを混抄(case1-D)、ホタテ粒子、ピスおよびパルプを単純に混抄(case2)、ピスを用いずホタテ粒子のみを混抄(case3)ならびにcase2、case3においてそれぞれ脱気処理したcase2-Dおよびcase3-Dの6通りに変化した。また、抗菌性を明確にするために、ホタテ粒子濃度が約10倍ずつ異なるように、各caseにおいて3水準の濃度の異なる抗菌紙を作製した。これらの抗菌紙は各オーダーごとに、最も低い濃度からGroupA、BおよびCと呼ぶことにする。

2.3 電子顕微鏡観察

それぞれのcaseで作製した紙のSPの分布状態を調べるために、走査型電子顕微鏡(SEM)(VE-9800:株式会社KEYENCE)を用いて紙の表裏面と断面を観察した。表面とは抄紙時における原料混合物が積層上面であり、裏面とは抄紙機のタンク下部に設置したワイヤーメッシュに接している側を意味する。断面観察には、垂直スライサー(HS-1型:ジャスコエンジニアリング株式会社)を用いて切断した試料を用いた。

2.4 EPMA カラーマッピング

ホタテ粒子の表面の分布状態、とくに抗菌性試験結果に影響を及ぼすと考えられる露出しているホタテ粒子の分布状態をより詳細に調査するために電子線マイクロアナライザ(EPMA)(JXA-8200:日本電子株式会社製)を用いて、カルシウムを対象元素としてカラーマッピングを行った。表裏面についてはSEM同様、表面が抄紙時における原料混合物の積層上面であり、裏面とは抄紙機のタンク下部に設置したワイヤーメッシュに接している側を意味する。

2.5 孔径測定

作製した紙の孔径は、キャピラリーポロメータ(CFP-1100-AXL-ESA:PMI社製)によって測定した。本機での測定時にはサンプルに表面張力既知の液体を浸潤させる必要があり、その液体としてGALWICK(表面張力1.6×10⁻⁴N/cm²:PMI社製)を用いた。

2.6 MRSA に対する抗菌性試験

作製した各機能紙のMRSAに対する抗菌作用を調べるために、JIS L1902(繊維製品の抗菌性試験方法及び抗菌効果)を参考に抗菌性試験を行った。すなわち、各サンプル0.4gをバイアル瓶に入れ、オートクレーブで高圧蒸気殺菌後、クリーンベンチ内で60分間乾燥したものを試験片

とし、そこに、3×10⁵個/mlの菌液を0.2ml接種し、37℃にて所定時間(30, 60, 1440分)培養した。菌数は、菌液接種直後および培養後に生理食塩水20mLを加え、手振り(振幅30cm, 30回振とう)で各検体から菌を洗い出し、トリプチケースソイ寒天培地を用い、37℃にて48時間、混釈平板培養を行い測定した。また、殺菌活性値は常法に従って算出した。

2.7 抗菌性試験結果に対する有意差検定

抗菌性試験結果に対する有意差検定は、3水準以上含むデータの場合において、まず一元配置分散分析による有意差検定を行った。有意差($P<0.01$)が認められた場合、Holm法により水準間の多重比較検定を行い、 $P<0.01$ の場合に有意差があると判断した。2水準での比較は t 検定を行い、 $P<0.01$ の場合に有意差があると判断した。

3. 結果と考察

3.1 MRSA の最小発育阻止濃度

各焼成ホタテ粒子水溶液の状態は、4000μg/mlでは白濁かつ沈殿が生じており、2000μg/mlでは白濁していた。それ以下の濃度では透明であった。このことは、ホタテ粒子の主成分が水酸化カルシウムであり、水酸化カルシウムの水への溶解度が0.17g/100ml(25℃)であることから、その溶解度を単位換算すると1700μg/mlとなり、観察された状態と一致した。これらの2倍ずつ段階希釈した各水溶液によってMRSAに対するホタテ粒子のMICを測定した結果、Table1に示す通り、その濃度は500μg/mlであった。

Table 1 Minimum inhibitory concentration of burned scallop particles aqueous solution for MRSA.

Concentration (μg / ml)	MRSA
4000	—
2000	—
1000	—
500	—
250	+
125	+
62.5	+
31.3	+
15.6	+
7.8	+

3.2 抗菌紙中のホタテ粒子濃度

MICの結果(500μg/ml)に基づき、抗菌性試験において、接種した菌液が0.2mlであり、試験片の重量が0.4gであることから、抗菌紙のホタテ粒子濃度が0.25mg/g以上において、MRSAに対する抗菌性を発現すると期待できる。そこで、抗菌紙のホタテ粒子濃度が0.25mg/g以上になるように、さらに抗菌性を確実に発現させるために、ホタテ粒子濃度のオーダーが1桁ずつ変わるように各抗菌紙を作製した。作製した抗菌紙のホタテ粒子濃度をTable2に示す。各caseによって多少の差異はあるものの最低ホ

タテ粒子濃度が0.23mg/g以上であることが確認できた。またホタテ粒子の分散状態を変えた抗菌紙における分散状態の差異が抗菌性に及ぼす影響を見出すために、各 case の濃度のオーダーが統一されるように抗菌紙を作製し、各 Group において同等のオーダーとなっていることが確認できた。

Table 2 Concentrations (mg/g) of burned scallop particles in antibacterial papers.

	case1	case1-D	case2	case2-D	case3	case3-D
Group A	0.32	0.23	0.26	0.31	0.25	0.26
Group B	3.34	1.91	2.01	2.86	2.08	2.12
Group C	24.29	15.10	13.14	23.38	12.16	12.61

3.3 抗菌紙中のホタテ粒子分散状態

case1 では、抄紙工程において水中に懸濁している SP が抄紙タンク内の水面にその多くが浮遊するため、タンク下方から水抜きを行い脱水し、紙層形成をしていく際に、最後に沈降して積層することにより SP を紙表面に集中させることができるのに対し、case1-D では SP を水中で脱気することによって、タンク内の水面に浮遊することなく、紙中のパルプと SP を比較的均一分散して混抄することができることが分かっている[5]。本報において、それぞれの条件で作製した紙の SP の分散状態について、SEM 観察した結果を Fig. 1 に示す。既報[5]と同様に、ピスを用いて脱気していない case1 および case2 ではピスは

Fig. 1 SEM photomicrographs of distribution of scallop particle in paper for each case (Bagasse pith or composite pith : enclosed in circle with arrow, Scallop particles : dashed arrow).

表面上に観察され、脱気した case1-D および case2-D ではピスは紙内部に存在していることが確認された。

EPMA によるカラーマッピングの結果を Fig. 2 に示す。画像の赤色箇所が表面上に存在しているホタテ粒子であり、それ以外はパルプに覆われ、露出していないと考えられる。case1 において表面に露出しているホタテ粒子がその他の case よりも多いことが EPMA によって明らかとなった。

Fig. 2 EPMA mapping images for Ca in each paper.

3.4 抄紙条件が MRSA に対する抗菌性に及ぼす影響

Fig. 3 は、各 Group、各 case に対する菌接種 30 分培養後の殺菌活性値を示す。まず Group 内での比較を行った。各 case での Group A 内および Group B 内における有意差は確認されず、Group C においては、Table 3(1)に示す通り、case1 と case2 で全ての case に対して有意差があった。したがって、菌接種 30 分培養後では、濃度の低い Group A および Group B では作製条件の違いによって抗菌性に有意な差はなかったが、濃度の最も高い Group C において case1 が最も高い抗菌性を示したと言える。次に、Group 間で比較すると、Group A と Group B において Group B は Group A よりもホタテ粒子濃度が約 10 倍高く、殺菌活性値は上昇したものの、有意差が確認されたのは case1, case 2-D および case3-D であり、その変化は小さかった。一方で Group C では、case1, case2 および case3-D において

Fig. 3 Values of antibacterial activity in each group after 30minutes of cultivation. One asterisk and two asterisks indicate a significant difference for Group A and for Group B in each case, respectively ($P<0.01$).

Fig. 4 Values of antibacterial activity of case1 in Group A and Group B after 30, 60 and 1440 minutes of cultivation, respectively. One asterisk indicates a significant difference for Group A ($P<0.01$).

Table 3 Correspondence table of significant difference of antibacterial activity within every group of cultivation time for each case in Group C. “Y” indicate the combination has significant difference, and “N” indicate the combination has no significant difference.

(1) 30min	case1	case1-D	case2	case2-D	case3
case1-D	Y	-	-	-	-
case2	Y	Y	-	-	-
case2-D	Y	N	Y	-	-
case3	Y	N	Y	N	-
case3-D	Y	N	Y	N	N

(2) 60min	case1	case1-D	case2	case2-D	case3
case1-D	Y	-	-	-	-
case2	Y	Y	-	-	-
case2-D	Y	N	Y	-	-
case3	Y	N	Y	N	-
case3-D	Y	N	Y	N	N

(3) 1440min	case1	case1-D	case2	case2-D	case3
case1-D	Y	-	-	-	-
case2	Y	N	-	-	-
case2-D	N	Y	Y	-	-
case3	Y	N	N	Y	-
case3-D	N	N	N	N	N

Group A および Group B に対し有意差があり、とくに case1 および case2 では高い殺菌活性値を示したが、case1-D と case3 ではどの Group とも有意差はなかった。

ここで、作製した紙の孔径を測定した結果、最大径が $0.2\mu\text{m}$ であり、MRSA の菌体直径が $0.7\mu\text{m}$ 程度[6]とされていることから、MRSA が紙内部に入りやすい状態ではないため、MRSA が紙表面により多く存在していると考えられる。したがって、SP を用いている case1 と case1-D において、case1 が高い殺菌活性値を示したのは、SP が紙表面に比較的多く存在しているために MRSA と SP が接触する可能性が高く、その結果として高い殺菌活性値を示したと推察される。次に case2 が高い殺菌活性値を示し

た理由としては、ホタテ粒子に起因する抗菌性のみならず、バガスピスやバガスパルプも抗菌性を有していることが挙げられる。サトウキビには抗菌性物質として、エピカテキンの存在が知られており[7]、またそのエピカテキンが MRSA に対して抗菌性があることもわかっている[8]。ホタテ粒子を混抄した抗菌紙と同様に、バガスピスやバガスパルプに対して菌接種 30 分培養後の殺菌活性値を測定した結果それぞれ 0.94 および 0.56 であり、菌数の低下が確認された。また case2 は case1 と同様に脱気処理をしていないことにより表面付近に比較的多くのビスが存在しているため、case2 においても高い殺菌活性値を示したと推察した。

Fig. 4 に、Group A および Group B における case1 の菌接種後 30, 60, 1440 分培養後の殺菌活性値を示す。Group A および Group B では、菌接種後 30 分培養では殺菌活性値に有意差があり、さらに菌接種後 30 分培養と 60 分培養ではともに殺菌活性値は上がった。しかしながら、菌接種後 60 分培養において Group A と Group B の殺菌活性値に差はなくなり、さらに 1440 分培養では、60 分培養と比較して殺菌活性値が上昇することはなかった。したがって、本報では MRSA のホタテ粒子溶液の MIC より抗菌紙中に含まれるホタテ粒子量を設定したが、前述のように MRSA が紙の表面上に存在していると考えられるため、紙表面付近のホタテ粒子が抗菌活性を示し、抗菌紙中に含まれる全てのホタテ粒子が抗菌性に寄与するわけではないと考えられ、Group A ならびに Group B のホタテ粒子量では十分な抗菌性が発現されないと判断された。そこで、次に各 case での菌接種後 30, 60, 1440 分培養後の殺菌活性値については、最も濃度の高い Group C における結果について吟味する。

Fig. 5 に Group C における各 case の菌接種後 30, 60, 1440 分培養後の殺菌活性値、Table3 に各 case における各培養時間グループ内の有意差検定の結果を示す。Group C

Fig. 5 Values of antibacterial activity of Group C in each case after 30, 60 and 1440minutes of cultivation, respectively. One asterisk and two asterisks indicate a significant difference for 30min and for 60min of cultivation in each case, respectively ($P<0.01$).

では、培養時間が長くなると、case2を除き殺菌活性値は上昇した。JISにおいては、殺菌活性値が0以上においてその試料は抗菌性を有すると判断されるが、とくにcase1では、30分および60分培養において抗菌活性値は2.5以上であり、他の全てのcaseと比較して有意差のある高い殺菌活性値を示し、1440分培養においても高い殺菌活性値を維持した。一方で、菌接種後30分培養において2.0以上の高い殺菌活性値を示したcase2は、60分培養後においては30分培養後よりも殺菌活性値が上がったが、1440分培養後には低下した。またcase3-Dでは、1440分培養後の殺菌活性値は、培養時間の違いによる比較では有意差があったが、1440分培養後内の他のcaseと比較した場合、有意差が確認されなかった。これらの原因については、サトウキビ由来のバガスが天然物であるため、前述の通り抗菌性を発現するとされるエピカテキンの存在量にバラツキがある[7]ためと考えられるが、その詳細は本報では明らかにすることはできなかった。

これらの結果より、天然物が元来有している抗菌性の発現の程度をコントロールすることは困難であることが示唆されたのに対して、SPを用いて脱気処理をせず紙表面のホタテ粒子濃度を高めたcase1の条件で作製した抗菌紙は安定的に高い殺菌活性値を示し、MRSAに対して有効的な抗菌紙であると言える。

4. 結 言

本報ではピスの多孔質部にホタテ粒子を付着させたSPを用いて抗菌紙を作製し、MRSAに対する抗菌性を評価した。SPを脱気せず、抄紙タンク内の水面に懸濁しているSPの多くを浮遊させた状態で抄紙することによって、脱水時の紙層形成の最後にSPを沈降、積層させ、紙表面のSP濃度を高めた抗菌紙は、ホタテ粒子付着ピスを用いないで作製した抗菌紙と比較して、MRSAに対する高い抗菌性が、とくに菌接種後30分培養の時点で確認された。すなわち、ホタテ粒子水溶液単体と同様に、ホタテ粒子をピスを用いて紙に抄き込むことによっても即効性に優れた抗菌紙が得られることが明らかになった。

また、バガスパルプやピス自体にも抗菌性があったが、これらは天然物であることから、含まれている抗菌性物質にバラツキがあるため、安定的な抗菌性を紙に付与することは容易でないことが示唆された。一方で、SPと混抄し、抗菌性物質であるホタテ粒子の分散を表面に集中させることによって、高い抗菌性を安定して発現できると考えられる。

文 献

1. Fuji Keizai Co., Ltd, Osaka Marketing Division, "Koukinkakouseihin no naigaisijyounikansuru choshouhoukoushyo", Fuji Keizai Co., Ltd, p.1 (2004).
2. Y. Tanabe, *Jpn. J. Clin. Dermatol.*, **66**, 88 (2012).
3. T. Sano, *J. Med. Soc. Toho Univ.*, **59**, 320 (2012).
4. T. Yoshida, N. Koyama, S. Okuda, K. Sasaya, C. Fukuhara and T. Kohriyama, *Bull. Res. Inst. Interdiscip. Sci., Hachinohe Inst. Technol.*, **1**, 117 (2002).
5. R. Oda, T. Kimura and H. Inagaki, *Sen'i Gakkaishi*, **70**, 3 (2014).
6. M. Yamamura, M. Noda, U. Ito, I. Takase, S. Asai, M. Nakanishi, J. Ohsawa, M. Shinoda and Isamu Namikawa, *Jpn. J. Oral Biol.*, **35**, 21 (1993).
7. D. Kannar, B. J. Kitchen, *United States Patent*, US 20100291006 A1.
8. M. Toda, S. Okubo, Y. Hara and T. Shimamura, *Jpn. J. Bacteriol.*, **46**, 839 (2009).