

3. ホタテ貝殻焼成酸化カルシウム (BiSCaO) の 殺菌・消毒剤としての有用性と安全性

福田 孝一¹, 秦 裕樹¹, 比留間寿美代¹, 高山 智宏²,
安藤 尚子¹, 石原 雅之^{1*}, 中村 伸吾¹

1. 初めに

わが国では、環境基本法が平成5年、循環型社会形成推進基本法が平成12年12月に公布された。そして環境と経済が両立した循環型社会を形成するための取り組みとして、様々な産業廃棄物に対して3R (Reduce 抑制, Reuse 再使用, Recycle 再資源化) が求められている¹⁾。

加工後に大量に廃棄されるホタテ貝の貝殻などの廃棄物の処理は大きな問題となっている。我が国における平成30年度のホタテ貝の水揚げ量は農林水産省統計によると約48万tであり、その35%程度を占める“貝殻”は産業廃棄物として扱われている。廃棄ホタテ貝殻の一部は農業用土壌改良剤や家畜用飼料に利用され、また漁場造成資材、建築資材、金属精錬材料、環境保全剤として利用されている。しかしこれらの多くはホタテ貝殻をそのまま或いは粉碎し、貝殻の主成分である炭酸カルシウム (CaCO₃) を原料として使用するものがほとんどであり、その市場はごく限られている¹⁾。この問題を解決するためには、ホタテ貝殻からより付加価値の高い資源を生み出す必要がある。

国内外にはCaCO₃の原料となる石灰石が大量に存在し、石灰石を石油や天然ガスなどの化石燃料で焼成して得られる焼成カルシウムとして生石灰 (酸化カルシウム (CaO)) やその水和物である消石灰 (水酸化カルシウム (Ca(OH)₂)) も生産されている²⁻⁴⁾。他方、Ca(OH)₂が主成分であるホタテ貝殻由来の焼成カルシウムは、殺菌・消臭効果が高く、純度の高い高品質な製品が上市されており、食品や環境衛生のために使用されている⁵⁻⁸⁾。

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) による最近の世界的な新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の流行は大きな危機を引き起こしている^{9, 10)}。エタノール、次亜塩素酸製剤などの消毒・殺菌剤は広範な殺微生物活性、特にウイルスのエンベロープを破壊することにより、

SARS-CoV-2に対しても大きな活性を示すことが期待できるが、それらは揮発性が高かったり、有機物との共存下では失活したりするため、殺菌/消毒適用には高濃度の消毒液が必要となる¹¹⁻¹³⁾。有害な副作用や環境破壊なしにSARS-CoV-2をはじめとする病原微生物あるいはウイルスを有効に減らすことができ、且つ生体に優しい消毒剤は、環境衛生と公衆衛生のために不可欠である。

現在ホタテ貝殻焼成カルシウムは、食品添加物等としていくつかが市販されているが、高純度のCaOであるBiSCaO[®] (heated Bio-Shell Calcium Oxide: プラスラポ(株), 横浜)^{14, 15)}を除いて、ほとんどがCaOを水和させたCa(OH)₂が主成分の製品である²⁻⁴⁾。

本解説では、我々が研究材料としているBiSCaOを基にした懸濁液^{9, 10)}、分散液¹⁴⁾、コロイド分散液¹⁵⁾及びBiSCaO Water^{16, 17)}の殺菌・消臭剤及び消毒剤としての効果を既存の焼成カルシウム製剤と比較検討し、続いてBiSCaO懸濁液やBiSCaO含有軟膏の感染創傷に対する除菌および創傷治癒促進効果について述べる。

2. ホタテ貝殻焼成酸化カルシウム (BiSCaO) の除菌・消臭剤としての有用性

2-1. BiSCaO含有液体の調製と特性

石灰石を焼成して造る生石灰や消石灰は、吸着剤、有害廃棄物浄化剤、排ガス処理剤、土地改良剤などとして、幅広く利用されている重要な無機化合物である。しかし石灰石は重金属等有害な不純物の含有量が高く、化石燃料を使って焼成して得られる生石灰や消石灰には多くの有害燃焼産物が含有されている¹⁻¹³⁾。一方、ホタテ貝殻はほとんどCaCO₃と少量のタンパク質・糖質等有機物質から構成されており、有害不純物の含有量は少ない。BiSCaOは1450℃での電気炉高温焼成で製造され、CaO

¹防衛医科大学校・防衛医学研究センター・医療工学研究部門 〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2 ☎04-2995-1618

²防衛医科大学校病院・歯科口腔外科 〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2 ☎04-2995-3970

2187-431X/2021/0810-0405 \$02.00/0© 2021 Soc. Antibact. Antifung. Agents, Jpn

純度が99.5%と高いことが明らかとなっている^{14,15)}。CaO 微粉末の供給源として産業廃棄物であるホタテ貝殻は安価で容易に入手可能である。

ホタテ貝殻を焼成して得られる CaO 微粉末においても、製造方法が異なると CaO の含有量や CaO 微粉末の形態が異なっている。ホタテ貝殻を700~800℃以上で焼成すると X 線回折スペクトルにおいて CaO のピークが認められるようになり、焼成温度が高くなるにつれて CaO のピークが高くなったことが報告されている¹⁸⁾。ホタテ貝殻の流動層における連続焼成を調べた細田らにより、生石灰と比較して、貝殻からの CaO は比表面積が小さく、細孔径が大きいことが述べられている¹⁹⁾。また生石灰に比して、BiSCaO は水和速度が遅く、生ずる反応熱による最高温度は生石灰のそれよりも低くなっている²⁰⁾。

同じホタテ貝殻焼成カルシウムでもその製造工程が異なる場合、その性状が異なっている。ホタテ貝殻粉末を1450℃で4時間加熱・自然冷却後、乾燥粉碎した BiSCaO-6 (平均粒径: 6 μm) の粉末では BET 法による比表面積が2.3 m²/g であり、1100℃で4時間加熱後粉碎した BiSCaO-2000 (平均粒径: 2 mm) では、0.8 m²/g と報告されている¹⁴⁾。またほとんどの他の市販貝殻焼成カルシウムは Ca(OH)₂ が主成分である。これは、水和反応による発熱リスクを避けるため湿式粉碎が行われていることが多く、焼成カルシウムの冷却時、微粉碎時、保存時での水蒸気との水和反応が原因と考えられる。このように、ホタテ貝殻を焼成して得られる BiSCaO は、生石灰とその形状や性状が異なると同時に、製造工程の違いによって同じ BiSCaO でも性状が異なっている。これらの差異は、BiSCaO の殺菌活性に影響を与えている。

BiSCaO 自体は、強アルカリ条件下 (pH > 12.3) では水に難溶性であるため、高濃度の BiSCaO を含む水懸濁液は、沈殿のためにスプレーノズルを目詰まりさせる傾向がある^{14,15)}。このため、安定で目詰まりを起ささない BiSCaO 液体形態を考案する必要がある。この沈殿は、Na₂HPO₄¹⁴⁾ や Na-polyPO₄¹⁵⁾ などのリン化合物を BiSCaO 懸濁液に添加し、それぞれ半透明で沈殿物を伴わない分散液や、上清の透明層と分散しやすい層として急速に生成する白色の凝集層から構成されるコロイド分散液とすることで防止できる¹⁵⁾。これら BiSCaO 分散液とコロイド分散液は、沈殿を伴う BiSCaO 懸濁液よりも高い脱臭能と殺菌活性を有している^{14,15)}。さらに我々は、強力な殺微生物・消臭活性を有する無色透明で pH が12.7を超える BiSCaO Water を開発した^{16,17)}。BiSCaO Water は低温下で純水に10 wt%の BiSCaO を加え、上澄みを回収し、さらに同量の純水を BiSCaO 沈殿物上に静かに注ぎ、再び上澄みを注意深く採取する

ホタテ貝殻焼成酸化カルシウム (BiSCaO)



図1. BiSCaO 液体形態とその活性・応用

工程を100回繰り返すことで調製される。これらの BiSCaO 含有液は、その形態に応じて、(1) マスクや防護服の除菌と再利用、(2) 医療現場の除菌・除染、(3) 浄水や水質浄化への適用、(4) 大災害時での環境衛生の確保のため有用であると考えている (図1)。

2-2. BiSCaO Water, 懸濁液, 分散液, コロイド分散液の殺微生物活性

ホタテ貝殻焼成酸化カルシウム (BiSCaO) は、さまざまな病原菌^{6,21)}、鳥インフルエンザウイルス²²⁾、芽胞菌²³⁾、真菌類²⁴⁾ およびバイオフィーム²⁵⁻²⁷⁾ を除去できる。さらに、BiSCaO は食品の貯蔵寿命を延ばすための添加剤として使用されている²⁸⁾。BiSCaO に含まれる CaO は、水和反応によって Ca(OH)₂ に簡単に変換されて、BiSCaO が消毒活性を示す主要なメカニズムであると考えられる強塩基が生成される。たとえば、一般生菌数 (TC) と大腸菌群数 (CF) の両方に対する CaO の消毒活性は、同じ pH での Ca(OH)₂ 溶液の消毒活性よりも高くなる^{14,15)}。BiSCaO 懸濁液 (0.2 wt%) は、汚染された木材と豚の皮片を殺菌して TC と CF の両方を減少させることが明らかになっており、同濃度の HOCl (pH 6.5) や NaClO (pH 9.5) よりも効果的である^{7,8)}。さらに BiSCaO 懸濁液と比較して、ポビドンヨードとクロルヘキシジングルコン酸では10倍以上の濃度が消毒に必要であった^{7,8)}。

BiSCaO Water は、無色透明で強アルカリ性 (pH > 12.7) を示す。BiSCaO Water は、15分以内にウイルス、菌、真菌を含む多種・多様な病原微生物を排除することが *in vitro* アッセイで明らかになった¹⁶⁾。さらに、BiSCaO Water は、エタノール、BiSCaO および BiSCaO (OH)₂ 懸濁液、ポビドンヨード、NaClO、BiSCaO 分散液およびコロイド分散液と比較して、一般生細菌懸濁液で汚染された豚肉に対して、より高い消臭と殺菌効果を示した^{16,17)}。

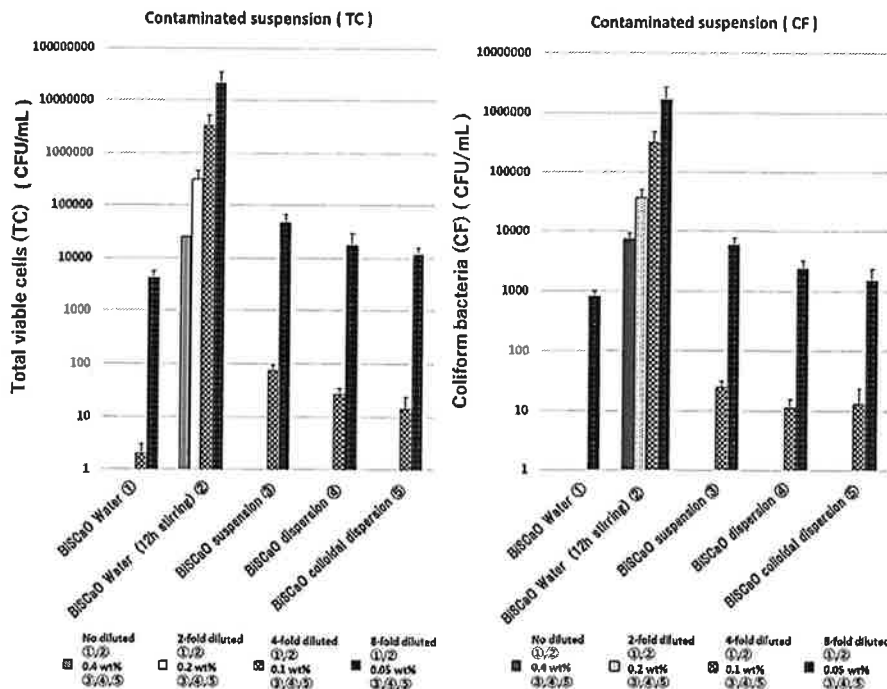


図2. 各 BiSCaO 含有液体の TC 及び CF 除菌活性

10% Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) と0.1 wt% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む浴槽残り水を37°Cで24時間培養した場合、TC および CF の値は、それぞれ80±11コロニー形成単位 (CFU)/mL および 32±7 CFU/mL から9.8×10⁷±3.1×10⁷ CFU/mL および2.1×10⁷±0.5×10⁷ CFU/mLへと大きく増加した。未希釈 (最終的に2倍希釈) および2倍希釈 (最終的に4倍希釈) の BiSCaO Water, および0.4および0.2 wt% (それぞれ最終的に0.2および0.1 wt%) の BiSCaO 懸濁液, BiSCaO 分散液, および BiSCaO コロイド分散液で処理した場合、TC および CF の CFU/mL はいずれも検出限界 (<10 CFU/mL) 以下であったのに対し、0.1 wt% (最終0.05 wt%) および0.05 wt% (最終0.025 wt%) の BiSCaO 懸濁液, 分散液, およびコロイド分散液で処理した後は TC および CF がそれぞれ10-100 および1000-10,000 CFU/mL と、生存菌体が検出された (図2)。対照的に、BiSCaO Water を空气中で12時間攪拌した場合、未希釈 (最終2倍希釈) で処理しても約10,000 CFU/mL の TC および CF が認められている¹⁶⁾。

BiSCaO が大きな抗菌スペクトルを有することは今までの多くの研究によって明らかになっている。表1に我々が研究材料としている BiSCaO から製造された無色透明な BiSCaO Water (pH 12.7) の病原微生物に対する殺菌活性を示す。

表1からわかるように、BiSCaO waterによって、大腸菌 (*Escherichia(E.) coli*), 緑膿菌 (*Pseudomonas (P.) aeruginosa*) そしてサルモネラ菌 (*Salmonella*)

表1. 病原性細菌に対する BiSCaO Water の除菌活性

Bacterial Strain	0 min	1 min	5 min	15 min
	(CFU)	(CFU)	(CFU)	(CFU)
<i>E. coli</i>	-	3.6×10 ⁵	<10*	<10*
<i>E. coli</i> (control)	6.7×10 ⁵	-	-	6.1×10 ⁵
<i>E. coli</i> (O157:H7)	-	6.4×10 ⁵	4.6×10 ²	<10*
<i>E. coli</i> (O157:H7) (control)	6.9×10 ⁵	-	-	6.6×10 ⁵
<i>P. aeruginosa</i>	-	1.4×10 ⁴	<10*	<10*
<i>P. aeruginosa</i> (control)	2.7×10 ⁵	-	-	4.0×10 ⁵
<i>Salmonella</i>	-	2.1×10 ⁴	<10*	<10*
<i>Salmonella</i> (control)	7.1×10 ⁵	-	-	7.7×10 ⁵
<i>S. aureus</i>	-	1.1×10 ⁵	1.1×10 ¹	<10*
<i>S. aureus</i> (control)	3.4×10 ⁵	-	-	4.7×10 ⁵

<10* : nondetected, - : not determined, CFU : colony forming units

のCFUは5分以内に検出限界以下になり、5分後に大腸菌 (O-157:H7) の99%が除去され、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*: グラム陽性菌) の97%が除去された。表2は BiSCaO Water がインフルエンザ A (Influenza A:H1N1, SARS-CoV-2と同じくエンベロープウイルスの一種) や、ネコカリシウイルス (Feline calicivirus, Norovirus) を含む非エンベロープウイルスの一種) に対して強い除染活性を有することを示している¹⁶⁾。このように、BiSCaO Water は広範な殺微生物・除染活性を示し、エンベロープウイルスである SARS-CoV-2 に対しても大きな除染活性を示すことが期待できる。

2-3. BiSCaO の殺菌作用機構と安全性

CaO の水和反応は強塩基を生成し、BiSCaO 含有液

表2. エンペロープ及び非エンペロープ型ウイルスに対する BiSCaO Water の除染効果

Virus Strain	0 min	1 min	5 min	15 min
<i>Feline calicivirus</i>		<1.5*	<1.5*	<1.5*
	(TCID ₅₀ /mL)	(TCID ₅₀ /mL)	(TCID ₅₀ /mL)	(TCID ₅₀ /mL)
<i>Feline calicivirus</i> (control)	6.7	-	-	7.0
<i>Influenza A</i> (H1N1)		1.7	<1.5*	<1.5*
<i>Influenza A</i> (H1N1) (control)	6.0	-	-	6.0

<1.5* : nondetected, - : not determined, TCID₅₀ : tissue culture infectious dose

の脱臭能および殺菌作用の主要なメカニズムであると考えられる^{14,15)}。BiSCaO の pH と殺菌・消臭活性は、Ca(OH)₂ に富んだ貝殻焼成カルシウムのそれらよりも高い。さらに、BiSCaO 含有液は、同じ pH の NaOH 溶液より高い殺菌・消臭活性を示す。これは、アルカリ度だけでは BiSCaO の強力な脱臭および殺菌特性を説明できないことを示している。BiSCaO の高い消毒活性は、BiSCaO 粒子の周囲に形成される薄い水層の OH⁻ 濃度が溶媒中よりも高いためであるかもしれない^{14,15)}。強アルカリ性は確かに BiSCaO の脱臭および殺菌活性の主な原因であるが、BiSCaO から生成される活性ラジカル種の生成も付加的殺菌因子である可能性がある^{6,14,15)}。

他方、BiSCaO Water は無色透明で、pH > 12.7 である^{16,17)}。金属またはプラスチックの滑らかな表面にスプレーして乾燥させると白色の粉体が生成する。BiSCaO Water の乾燥粉体を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した結果、微粒子 (1~2 μm) が互いに凝集していることがわかった¹⁷⁾。元素マッピング法により解析した結果、空気に触れた BiSCaO Water 中に生成するマイクロ/ナノ粒子や自然乾燥させた時に生じる白色微粉末の組成は酸素、炭素およびカルシウムであることがわかり、これは CaCO₃ であることを示唆している。X 線回折測定の結果から確かに CaCO₃ であることが示された¹⁷⁾。

BiSCaO Water は、攪拌して十分に空気に触れさせると、一時間で白濁する。さらに24時間後には pH は約 11 に下がってしまう (図3)。対照的に、BiSCaO 懸濁液、分散液、コロイド分散液の pH は、24時間全く低下しなかった。この結果は、BiSCaO Water 中に生成した不溶性微粒子は、Ca²⁺ と空気中の CO₂ の反応によって生成する CaCO₃ であること、そして BiSCaO 懸濁液、分散液、コロイド分散液には CaO あるいは Ca(OH)₂ が微粒子中に存在し、pH を維持するためヒドロキシイオン (OH⁻) を補充し続けたことを示唆している¹⁷⁾。

BiSCaO Water の生体適用における重要な懸念として、pH が12.7 を超える強アルカリ性であることが指摘されている。BiSCaO Water をプラスチック板、鉄板、材木や紙などの素材表面に噴霧し、湿った表面の pH についてマイクロタフ電極を用いた卓上 pH メーターで測定した。噴霧直後の表面の pH は全表面で 12.62 ± 0.02 であり、元の BiSCaO Water の pH (>12.7) よりもやや

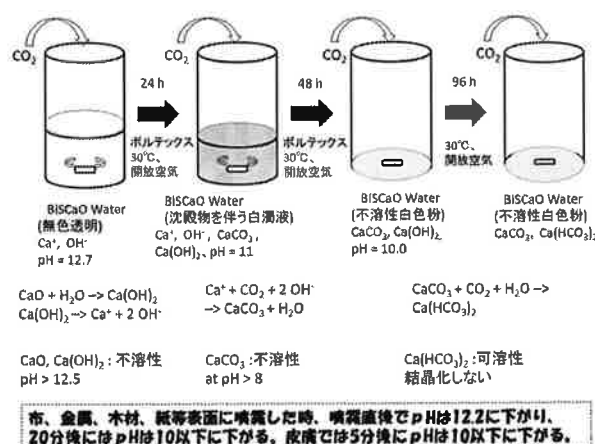


図3. CaO の化学変化と安全性

下回っていた。また、3分後および10分後には pH はそれぞれ12および11を下回り、20分後には全表面で10を下回っていた。同様に、BiSCaO Water をヘアレスラットの背部皮膚に噴霧した時も1分後には約 pH 11.5、3分後には pH 9.5 に下がった。この実験で、ヘアレスラットの背部皮膚に副作用となる障害は観察されることはなく、BiSCaO Water の安全性が示唆された。しかしながら今後、ヒトの手の洗浄やうがいに適用していく際には、ヒト検体使用のための倫理委員会の承認を受けることが必要である¹⁷⁾。

これらの結果は、BiSCaO Water を様々な素材や皮膚の表面に噴霧しても、安全であることを示唆している。さらに pH の低下に伴って生成する CaCO₃ は、胃制酸薬、腐蝕防止剤や植物の肥料として一般に使われていることから、飲み込んでも少量であれば安全であると考えられる。また吸い込んでも、さらなる反応により可溶性の炭酸水素カルシウム (Ca(HCO₃)₂) を形成するので危険性はないと思われる¹⁷⁾。

2-4. BiSCaO の懸濁液と軟膏による感染創傷に対する除菌および創傷治癒促進効果

臨床現場では、緑膿菌 (*P. aeruginosa*) は主要な院内細菌および日和見病原体である。緑膿菌は創傷に感染する可能性があり、創傷治癒障害に関与していることが知られている²⁹⁾。全身投与された抗生物質は、慢性肉

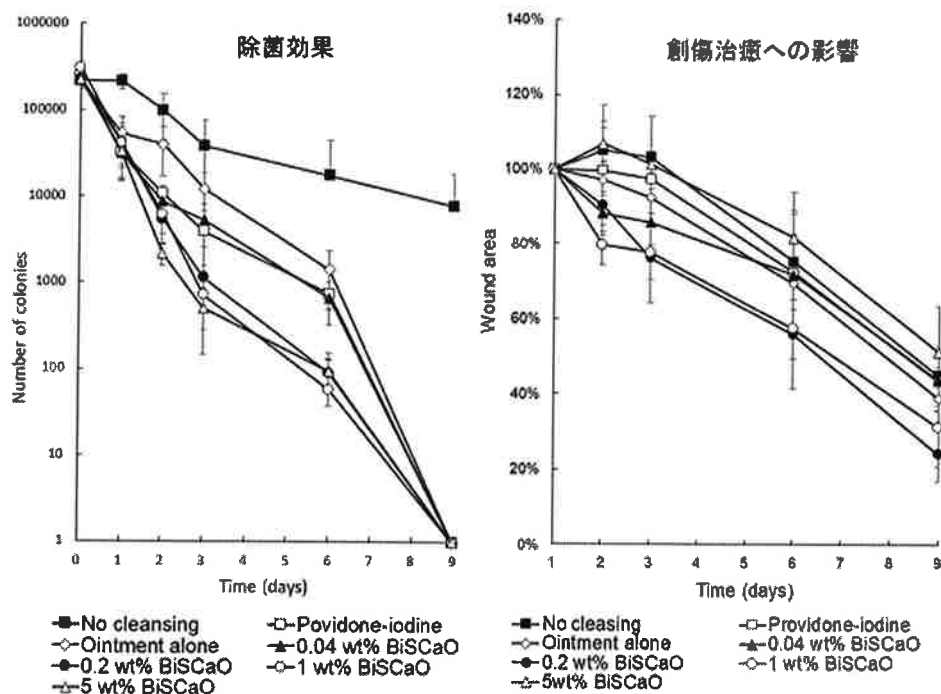


図4. BiSCaO軟膏の感染創除菌効果と創傷治癒への影響

芽形成創の細菌のレベルを効果的に低下させないことに加え、創傷感染以外の目的で全身的には使用される抗生物質の外用はアレルギーのリスクと薬剤耐性の可能性が高まるため、推奨されていない^{1,2)}。ポビドンヨードや弱酸性次亜塩素酸 (HClO; pH 6.5) 溶液などの一般的な防腐剤や非抗生物質の抗菌薬は、細胞成分に対して細胞毒性があり、高濃度の使用は創傷治癒を遅延させることが認められている^{1,3,30)}。したがって、創傷治癒プロセスを阻害することなく慢性創傷における細菌の生体負荷を減少させることができる局所殺菌薬が、治療上必要とされている^{2,9,30)}。

HClO 溶液 (200 ppm) による12日間の毎日の感染創傷洗浄は、*db/db* 糖尿病マウスの感染した創傷の緑膿菌数を減少させたが、創傷治癒が遅延した³¹⁾。HClO 溶液とキチンナノファイバーシート固定化銀ナノ粒子 (CNFS/Ag NP) の両方を使用した消毒処理を3日間に制限すると、創傷治癒に対するそれらの悪影響が抑制される事が示された³²⁾。他方、ヘアレスラットを用いて緑膿菌に感染した創傷を BiSCaO 懸濁液 (0.2 wt%, pH 12.3) で、3日間に限定しながら1日1回洗浄し、さらに創傷を CNFS で覆った結果、創傷内での緑膿菌数が大幅に減少し、治癒が促進されることが示された³³⁾。以上の結果から、慢性創傷部の感染予防・治療などの臨床場面では、BiSCaO 処理による消毒を3日間に限定することが適切であることが示唆された。

白色ワセリン (健栄製薬株, 大阪) に BiSCaO 粉末を均一分散させた BiSCaO 軟膏³⁴⁾ は *P. aeruginosa* の

消毒に加えて創傷収縮を誘導する可能性があることから、BiSCaO の創傷収縮および/または上皮化に対する効果についての検討を行った (図4)。BiSCaO 軟膏を3日間投与しても、9日目に採取した創傷皮膚の組織学的解析で確認されたように、合併症の兆候は見られなかった。これらの結果から、BiSCaO による消毒を3日間に制限することは、治療障害者の慢性創傷の感染予防や治療などの臨床場面では適切であることが示唆された。費用対効果と安全性の観点から、0.2 wt% の BiSCaO 軟膏が最適であることが示唆されている³⁴⁾。

3. おわりに

COVID-19の流行は世界的な危機である。エタノールやNaClOのようないくつかの殺菌・消毒剤は、広範な殺菌・抗ウイルス活性を示し、とりわけSARS-CoV-2に対する活性はウイルスエンベロップの破壊に起因するものである。しかしながら、このような殺菌・消毒剤は生体に有害であり、消毒活性を得るためには高濃度を必要とする。さらに、塩素由来の消毒剤は、有機化合物の存在下では効果がなく、環境や生体組織に有害な化合物を生成する可能性がある。したがって、有害な副作用や環境破壊を起こすことなく、汚染細菌・ウイルス数を減少させることができる新規の消毒剤が、環境衛生や公衆衛生のために強く望まれている。

BiSCaO Water は、無色透明で pH > 12.7 である¹⁶⁾。BiSCaO Water は、*in vitro* アッセイで15分以内にほと

んどすべてのウイルス、菌、真菌を含んだ多種・多様な病原微生物を検出限界以下まで減少させた。さらに、エタノール、BiSCaO および BiSCa(OH)₂懸濁液、ポビドンヨード、NaClO と比較して、汚染物に対して高い消臭効果と殺菌効果を示した。BiSCaO Water は強アルカリ性であるため、生体に適用した場合の安全性が懸念されていたものの、様々な表面や手指の皮膚に塗布した場合、無害の CaCO₃ を生成しながら pH が急速に低下することが示された¹⁷⁾。以上から、BiSCaO Water は、病原微生物に対して、潜在的には COVID-19 対策としても、安全で優れた消毒活動に適用できると期待される¹⁶⁾。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 安江 任, 遠山岳史 (2001) 廃棄物からの資源化による循環型社会への挑戦. *J. Soc. Inorg. Mater., Japan*, 8, 58-68.
- 2) Wiercinski, F. J. (1989) Calcium, An overview-1989. *Biol. Bull.*, 176, 195-217.
- 3) 安江 任, 小嶋芳行, 荒井康夫 (1994) 石灰の研究動向. *Inorg. Mater.*, 1, (242), 68-79.
- 4) 安江 任, 荒井康夫 (1995) 石灰の形態制御. *Inorg. Mater.*, 2, (258), 356-364.
- 5) Liu, F. J., Chou, K. S., and Huang, Y. K. (2006) A novel method to make regenerable core-shell calcium-based sorbants. *J. Environ. Manage.*, 79, 51-56.
- 6) Sawai, J. (2011) Antimicrobial characteristics of heated scallop shell powder and its application. *Biocontrol Sci.*, 16, (3), 95-102.
- 7) Sato, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Fukuda, K., Kuwabara, M., Takayama, T., Hiruma, S., Murakami, K., Fujita, M., and Yokoe, H. (2019) Comparison of various disinfectants on bactericidal activity under organic matter contaminated environments. *Biocontrol Sci.*, 24, (2), 103-108.
- 8) Fukuda, K., Sato, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Takayama, T., Murakami, K., Fujita, M., and Yokoe, H. (2020) Skin cleansing technique with disinfectant using improved high-velocity steam-air micromist jet spray. *Biocontrol Sci.* 25, (1), 35-39.
- 9) Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., and Steinmann, E. (2020) Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J. Hosp. Infect.*, 104, 246-251.
- 10) Hirschmann, M. T., Hart, A., Henckel, J., Sadoghi, P., Seil, R., and Mouton, C. (2020) COVID-19 coronavirus : recommended personal protective equipment for the orthopaedic and trauma surgeon. *Knee Surg. Sports Traumatol. Anthrosc.*, 28, 1690-1698.
- 11) Geller, C., Varbanov, M., and Duval, R. E. (2012) Human coronavirus : insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies. *Viruses*, 4, (11), 3044-3068.
- 12) Wilson, J. P., Mills, J. G., Prather, I. D., and Dimitrijevich, S. D. (2005) A toxicity index of skin and wound cleaners used on in vitro fibroblasts and keratinocytes. *Adv. Skin. Wound Care*, 18, 373-378.
- 13) McCauley, R. L., Linares, H. A., Herndon, D. N., Robson, M. C., and Heggors, J. P. (1989) In vitro toxicity of topical antimicrobial agents to human fibroblasts. *J. Surg. Res.*, 45, (3), 267-274.
- 14) Sato, Y., Ishihara, M., Nakamura, S., Fukuda, K., Takayama, T., Hiruma, S., Murakami, K., Fujita, M., and Yokoe, H. (2019) Preparation and application of bioshell calcium oxide (BiSCaO) nanoparticle-dispersions with bactericidal activity. *Molecules*, 24, 3415.
- 15) Sato, Y., Ohata, H., Inoue, A., Ishihara, M., Nakamura, S., Fukuda, K., Takayama, T., Murakami, K., Hiruma, S., and Yokoe, H. (2019) Application of colloidal dispersions of bioshell calcium oxide (BiSCaO) for disinfection. *Polymers*, 1, (12), 1991.
- 16) Nakamura, S., Ishihara, M., Sato, Y., Takayama, T., Hiruma, S., Ando, N., Fukuda, K., Murakami, K., and Yokoe, H. (2020) Concentrated bioshell calcium oxide (BiSCaO) water kills pathogenic microbes : characterization and activity. *Molecules*, 25, 3001.
- 17) Ishihara, M., Hata, Y., Hiruma, S., Takayama, T., Nakamura, S., Sato, Y., Ando, N., Fukuda, K., Murakami, K., and Yokoe, H. (2020) Safety of concentrated bioshell calcium oxide water application for surface and skin disinfections against pathogenic microbes. *Molecules*, 25, 4502.
- 18) Sawai, J., Shiga, H., and Kojima, H. (2001) Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder. *Int. J. Food Microbiol.*, 71 (2-3), 211-218.
- 19) 細田英雄, 下川勝義, 高橋芳恵, 吉田 豊, 恒川昌美, 平間利昌 (1996) ホタテ貝殻の流動層による連続焼成. 廃棄物学会論文誌, 7, (3), 142-151.
- 20) Ferraz, E., Gamelas, J. A. F., Coroado, J., Monteiro, C., and Rocha, F. (2019) Recycling waste seashells to produce calcitic lime : Characterization and wet slaking reactivity. *Waste Biomass Valorization*, 10, (8), 2397-2414.
- 21) Watanabe, T., Fujimoto, R., Sawai, J., Kikuchi, M., Yahata, S., and Satoh, S. (2014) Antibacterial characteristics of heated scallop-shell nano-particles. *Biocontrol Sci.*, 19, (2), 93-97.
- 22) Thammakarn, G., Satoh, K., Suguro, A., Hakim, H., Ruenphet, S., and Talehara, 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.
- 23) Sawai, J., Miyoshi, H., and Kojima, H. (2003) Sporicidal kinetics of *Bacillus subtilis* spores by heated scallop shell powder. *J. Food Prot.*, 66, (8), 1482-1485.
- 24) Xing, R., Qin, Y., Guan, X., Liu, S., Yu, H., and Li, P. (2013)

- Comparison of antifungal activities of scallop shell, oyster shell and their pyrolyzed products. *Egypt. J. Aqua. Res.*, 39, 83–90.
- 25) Sawai, J., Nagasawa, K., and Kikuchi, M. (2013) Ability of heated scallop-shell powder to disinfect *Staphylococcus aureus* biofilm. *Food Sci. Technol. Res.*, 19, (4), 561–568.
- 26) Shimamura, N., Irie, F., Yamakawa, T., Kikuchi, M., and Sawai, J. (2015) Heated scallop-shell powder treatment for deactivation and removal of *Listeria* sp. biofilm formed at a low temperature. *Biocontrol. Sci.*, 20, (2), 153–157.
- 27) Kubo, M., Ohshima, Y., Irie, F., Kikuchi, M., and Sawai, J. (2013) Disinfection treatment of heated scallop-shell powder on biofilm of *Escherichia coli* ATCC 25922 surrogated for *E. coli* O157 : H7. *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, 4, 10–19.
- 28) Hiruma, S., Ishihara, M., Nakamura, S., Sato, Y., Asahina, H., Fukuda, K., Takayama, T., Murakami, K., and Yokoe H. (2020) Bioshell calcium oxide-containing liquids as a sanitizer for the reduction of histamine production in raw Japanese Pilchard, Japanese Horse Mackerel, and Chub Mackerel. *Foods*, 9, 964.
- 29) Van Delden, C., and Iglewski, B. H. (1988) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 4, (4), 551–560.
- 30) Kinoda, J., Ishihara, M., Hattori, H., Nakamura, S., Fukuda, K., and Yokoe, H. (2016) Cytotoxicity of silver nanoparticle and chitin–nanofiber sheet composites caused by oxidative stress. *Nanomaterials*, 6, (10), 189.
- 31) Kuwabara, M., Ishihara, M., Fukuda, K., Nakamura, S., Murakami, K., Sato, Y., Yokoe, H., Kiyosawa, T. (2018) Disinfection of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in diabetic db/db mice by weakly acidic hypochlorous acid. *Wound Med.*, 23, 1–5.
- 32) Kuwabara, M., Sato, Y., Ishihara, M., Takayama, T., Nakamura, S., Fukuda, K., Murakami, K., Yokoe, H., and Kiyosawa T. (2020) Healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in diabetic db/db mice by weakly acidic hypochlorous acid cleansing and silver nanoparticle/chitin- nanofiber sheet covering. *Wound med.*, 28, 100183.
- 33) Takayama, T., Ishihara, M., Sato, Y., Nakamura, S., Fukuda, K., Murakami, K., and Yokoe, H. (2020A) Bioshell calcium oxide (BiSCaO) for cleansing and healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in hairless rats. *Bio-Med. Mater. Engineer.*, 31, 95–105.
- 34) Takayama, T., Ishihara, M., Nakamura, S., Sato, Y., Hiruma, S., Fukuda, K., Murakami, K., and Yokoe, H. (2020B) Bioshell calcium oxide (BiSCaO) ointment for the disinfection and healing of *Pseudomonas aeruginosa*-infected wounds in hairless rats., *Int. J. Mol. Sci.*, 21, (11), 4176.

