

高い即効性と持続性を有する 抗鳥インフルエンザウイルス素材の開発

所属：鳥取大学大学院工学研究科機械宇宙工学専攻

助成対象者：陳 中春

共同研究者：音田哲彦

概要

本研究では、酸化カルシウムの抗ウイルス効果の耐久性向上のため、微量の酸化ジルコニウムを添加し、メカニカルアロイング(MA)を行い、抗ウイルス効果の耐久性評価を行った。その結果、酸化カルシウムに酸化ジルコニウムを添加して MA 処理後、水和処理を行った試料は 1mass% 添加では MA 処理 8 時間以内では抗ウイルス性の耐久性向上は見られなかったが、MA 処理時間とともに pH 値は上昇した。一方、5mass% 添加試料では 1 時間以上 MA 処理された試料で、10mass% 添加試料では 0.5 時間以上 MA 処理された試料で抗ウイルスの耐久性が見られた。したがって、酸化ジルコニウムの添加によって酸化カルシウム水和物の抗ウイルス性の耐久性が向上することが明らかとなった。

abstract

Calcium oxide and small amounts of zirconia powders were mechanically alloyed (MAed) in a planetary ball milling system in order to refine the sizes of the powders and promote the reactions between the raw powders. The obtained powders were hydrated and then subjected to an accelerated degradation test in CO₂/H₂O atmosphere. The antiviral activity was evaluated by using an avian influenza virus strain (H5N3). Although the CaO samples with 1% ZrO₂ addition did not show durability of antiviral activity when they were MAed for less than 8h, their pH values gradually rose with increasing MA time. The CaO samples with 5% ZrO₂ and 10% ZrO₂ showed good durability of antiviral activity when they were MAed for more than 1h and 0.5h, respectively. Therefore, the incorporation of small amounts

of ZrO_2 significantly improved the durability of antiviral activities of MAed and hydrated CaO.

・研究背景

2003 年後半から高病原性鳥インフルエンザがアジア各地で発生し、2004 年 1 月に 79 年ぶりに日本国内の発生が確認された。本年(2016 年)も 11 月から各地で高病原性鳥インフルエンザが発生し、多くの家畜の処分が起きている。鳥インフルエンザは通常人には感染しないが、2016 年 11 月 21 日までに、世界保健機構(WHO)に報告された鳥インフルエンザ A(H5N1) 確定症例の累計数は 856 人となっており、そのうち 452 人が死亡している(致死率は 53%)。また、鳥インフルエンザウイルスが遺伝子の変異によりヒトからヒトへ効率よく感染する能力を獲得すれば、新型インフルエンザとなってヒトの世界で大流行(パンデミック)することが危惧されている。インフルエンザ対策として、ワクチンの製造の他にタミフルなどの抗インフルエンザウイルス薬などが販売されているが、抗インフルエンザ薬に対して耐性を持ったウイルスの出現などの問題もある。

一方、水酸化カルシウム($Ca(OH)_2$)や酸化カルシウム(CaO)を水和処理したものは即効性があり高い抗ウイルス性を示すが、抗ウイルス効果の持続性はほとんどない。そのため、インフルエンザの蔓延を防止する対策として、優れた耐久性を有する新たな抗インフルエンザウイルス素材の開発が必要不可欠である。

・研究目的

われわれは、酸化カルシウム CaO に数%アルミナ(Al_2O_3)を添加し、高温焼結・水和した粉末および粉末合金化プロセスであるメカニカルアロイング(MA)で処理された粉末が鳥インフルエンザウイルスに対して強力な抗ウイルス効果を示すだけでなく、抗ウイルス性が長く持続できることを見出した[1]。その際、 Al_2O_3 無添加試料においても抗ウイルス効果の耐久性が得られたが、その粉末中に MA メディアである酸化ジルコニウム(ZrO_2)の混入が見られた。そのため MA 処理条件を見直す必要が生じたが、耐久性向上のための添加材として酸化ジルコニウムの可能性も示唆された。そのため、本研究では、優れた耐久性を有する新たな抗ウイルス粉体素材の開発を目指し、ほとんど酸化ジルコニウムの混入のない条件で CaO に MA 処理を行い、抗ウイルス効果の耐久性を評価した。一方、微量の ZrO_2 を添加した CaO 粉末の MA 処理試料も作製して抗ウイルス効果の耐久性を調べた。あわせて耐久

性向上のメカニズムについても検討を行い、提案している抗ウイルス素材の MA プロセスを確立することを研究の目的とする。

・実験方法

出発原料として市販の CaO と ZrO₂ 粉末を用いた。CaO 粉末に ZrO₂ 粉末を 0~10mass% 添加しエタノール中で混合した。得られた混合試料を乾燥させ、さらに遊星型ボールミルを用いてメカニカルアロイング処理 (0.5h~8h) を施した。これまではジルコニアボールと粉末を 50:1 で MA 処理を行っていたものを 20:1 に変更することで MA メディアの ZrO₂ の混入はほとんどなくなることを確認した。その後、水和処理を行い目的の試料を作製した。試料の耐久性を評価、検討するために人間の呼気を模した CO₂ と水蒸気の過飽和雰囲気において 40℃ で 24 時間強制劣化させた。

得られた試料に XRD 測定による相同定、FE-SEM、TEM による組織観察を行った。また、pH 測定および野生のコハクチョウの糞便から分離した鳥インフルエンザウイルス H5N3 亜型株を用い抗ウイルス試験を行い、ウイルスの 50% 発育鶏卵感染力価 (EID₅₀) を求め、抗ウイルス効果を評価した。

・実験結果と考察

CaO は水和により Ca(OH)₂ となり、pH 値が 12 を越える強いアルカリ性を示し、このアルカリ性により抗ウイルス効果が発現していると考えられている。これに対し呼気等の CO₂ との反応によって Ca(OH)₂ は炭酸化して CaCO₃ になり、pH 値は 8 程度となり、抗ウイルス効果を完全に失う。そのため、CaO および CaO-1~10mass%ZrO₂ 粉末試料に対して MA 処理および水和処理を施した。さらに CO₂ と水蒸気の過飽和雰囲気において強制劣化処理を行い、炭酸化が抑制されるかを調べるため、XRD 測定を行った。図 1 は劣化処理後の CaO(a) および CaO-10mass% ZrO₂ 添加試料(b)の XRD 測定結果である。観察された主な回折ピークは炭酸化による CaCO₃ であった。MA 未処理の試料(0h)ではほとんど Ca(OH)₂ のピークが観察されないが、MA 時間が増えるほど Ca(OH)₂ のピークが強くなっており、MA 処理 8h 試料には明確な Ca(OH)₂ のピークが観察された。これより CaO に MA 処理を行うことで耐久性の向上が得られるということがわかった。1mass% および 5mass%ZrO₂ 添加試料も 10mass% ZrO₂ 添加試料と同様の結果となった。したがって、MA 処理後水和、劣化処理された粉末の XRD 測定から抗ウイルス効果の耐久性の可能性が示された。また、劣化処理後にも残留した

Ca(OH)₂ の量は、CaCO₃ と比較すると、ZrO₂ を添加した (b) の方が明らかに高いことがわかる。これは、ZrO₂ の添加により、Ca(OH)₂ の炭酸化を遅らせる効果があることも示唆された。

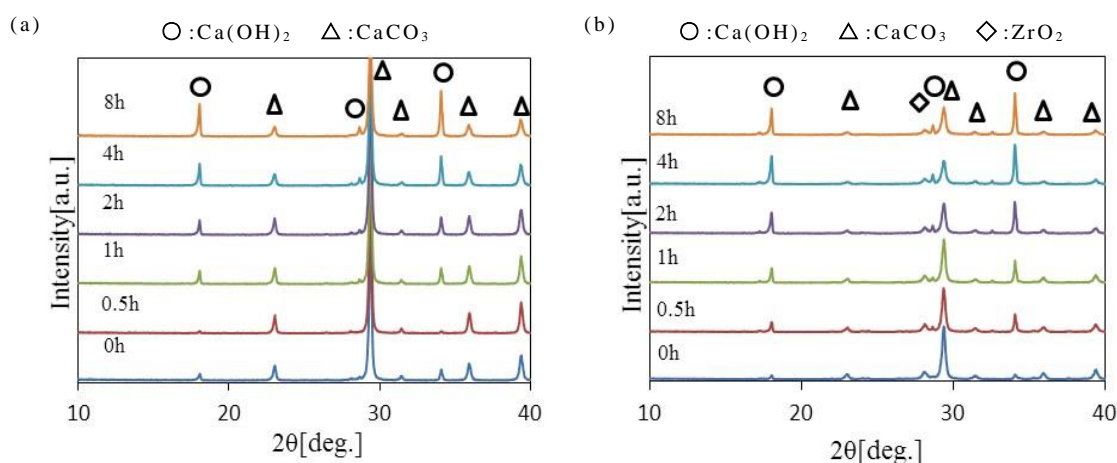


図 1 異なる時間で MA した粉末の劣化処理後の XRD 測定結果。(a)CaO, (b)CaO-10%ZrO₂

MA による抗ウイルス効果を確認するために pH 測定、抗ウイルス試験を行った。図 2(a) に pH 測定結果を示す。CaO 試料は MA 時間の増加に伴い pH 値が上昇している。しかし、抗ウイルス効果を示す pH 値の目安は 12 であり、MA 処理を 8h した試料でも pH は 12 を越えていない。したがって、CaO 試料では抗ウイルス効果は見られないと予想されるが、さらに MA 処理時間を延長すれば pH が 12 を越え、抗ウイルス効果の耐久性向上が得られる可能性はあると考えられる。一方、ZrO₂ 添加試料では、10mass% 添加では MA 処理 0.5h 以上の試料で、5mass% 添加では MA 処理 1h 以上の試料で pH が 12 を越えていた。図 2(b) に劣化試験後の抗ウイルス試験結果を示す。この感染力価の数値が小さいほど抗ウイルス性能は高いことを意味している。図 2(b) に示すように無添加および 1mass% ZrO₂ 添加試料からは抗

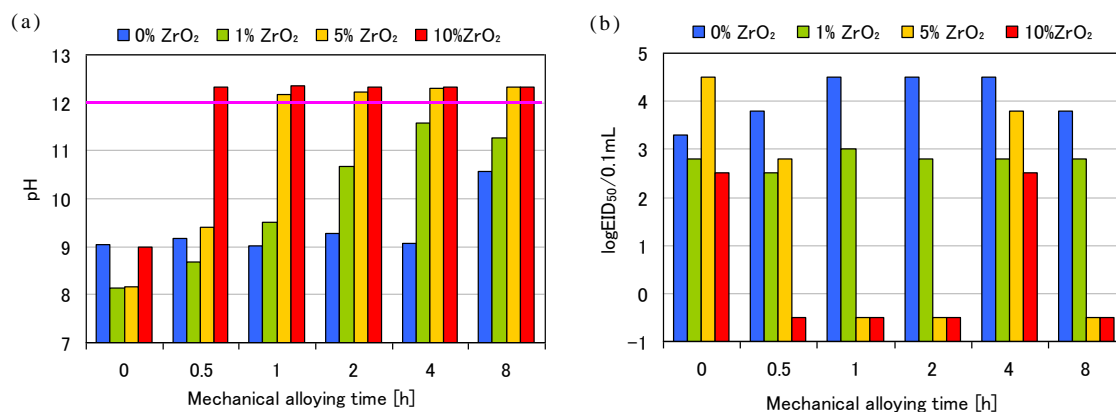


図 2 劣化処理後の ZrO₂ 添加 CaO 粉末の (a) pH 値と (b) 感染力価

ウイルス効果の耐久性は見られなかった。しかし、5mass% ZrO₂ 添加試料の MA 処理 1h、2h、8h、10mass% ZrO₂ 添加試料の MA 処理 0.5h、1h、2h、8h の試料ではウイルスの検出限界以下の高い抗ウイルス性を示した。これによってある程度の量以上の ZrO₂ を添加して、ある程度の時間以上の MA 処理をすることによって CaO の抗ウイルス性の耐久性が向上できることが分かった。

水和後の各試料を SEM で観察した結果、ZrO₂ の添加の有無に拘わらず、MA 処理後の粉末粒子径が大きくなっていて、MA 処理により結晶子径は小さくなっている。MA 処理により凝集が生じたと考えられる。MA 処理により凝集が起こり、試料の炭酸ガスとの接触面積が小さくなったことで、劣化が抑制される可能性が示唆される。各試料の TEM 観察を行うとともに組成分析を行った。図 3 に組織の一例を、図 3 中の視野 (A~E) に対応する EDS 分析結果を表 1 に示す。これより粉末は数十~数百ナノメートルの凝集粒からなっていることが分かった。上部に見られる粒子の A, B, C の領域からは Zr 元素は検出されなかったが、下方の E, D の領域からはわずかであるが Zr 元素が検出された。したがって、粉末には ZrO₂ の固溶した粉末と固溶していない粉末があり、ZrO₂ 添加試料の耐久性が向上した理由は、CaO に ZrO₂ が固溶したためであると考えられる。

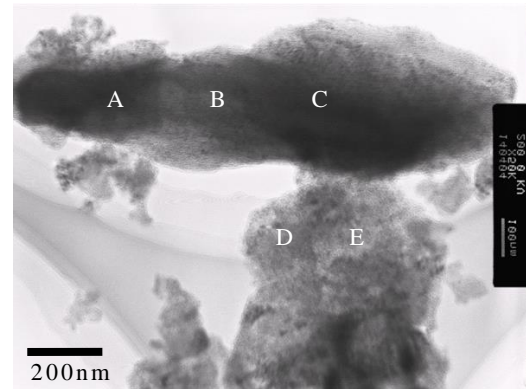


図 3 CaO-5mass%ZrO₂ 劣化処理後の粉末の TEM 組織

表 1 EDS 分析結果 (at%)

	A	B	C	D	E
CaO	100	100	100	97.9	98.1
ZrO ₂	0	0	0	2.1	1.9

・ 今後

MA 処理および ZrO₂ の添加による抗ウイルス効果の耐久性向上メカニズムはまだ不明な点が多いのでさらなる検討が必要である。また、これまでに CaO に対して、微量の Al₂O₃ や ZrO₂ の添加が抗ウイルス効果の耐久性向上に有効であることが明らかとなったが、このほかの元素の添加でも耐久性向上に効果があるのか調べる。さらに、これらの抗ウイルス素材の実用化も目指す。

引用文献

[1] Z.-C. Chen, Y. Miyauchi, K. Motoike, T. Onda, T. Akao, M. Nagashima: “Effect of Alumina on Antiviral Activities of Calcium Oxide”, Proceedings of 2012 Powder Metallurgy World Congress and Exhibition, (2012) 17F-T12-1.

本助成に関わる成果

[論文発表]

Tetsuhiko Onda, Yusuke Yoneda, Takahiro Akao, Koichi Motoike, Hiroshi Ito, Toshihiro Ito and Zhong-Chun Chen, “Preparation of a Novel Antiviral Material by Mechanical Milling”, Journal of the Japan Society of Powder and Powder Metallurgy, Vol. 63 (2016) pp. 668-674.

[口頭発表]

(1) 音田哲彦、米田祐介、赤尾尚洋、本池紘一、伊藤啓史、伊藤壽啓、陳中春、「メカニカルミリングを利用した新規抗ウイルス材料創製のための基礎研究」、日本金属学会春季講演大会 2015 年春季大会、2015 年 3 月 18 日～21 日、東京大学（東京都）

(2) 松本賢樹、酒井颯太、赤尾尚洋、音田哲彦、陳中春、「抗ウイルス性粉体材料の耐久に及ぼすメカニカルミリングとジルコニア添加の影響」、平成 27 年度日本鉄鋼協会・日本金属学会中国四国支部講演大会、2015 年 8 月 19 日～20 日、広島工業大学（広島市）

(3) Tetsuhiko Onda, Yusuke Yoneda, Takahiro Akao, Koichi Motoike, Hiroshi Ito, Toshihiro Ito and Zhong-Chun Chen, “Preparation of a Novel Antiviral Material by Mechanical Milling”, The 3rd International Conference on Powder Metallurgy in Asia (APMA2015), 2015 年 11 月 8 日～10 日京都大学（京都市）