

酸化カルシウムを主成分とする 焼成ホタテ貝殻粉末の細菌芽胞に対する抗菌特性

Key Words：芽胞 ■ 殺菌 ■ 抗菌活性 ■ ホタテ貝殻 ■ 酸化カルシウム ■ 枯草菌

澤井 淳*

はじめに

我が国の平成16年度における貝類の水揚げ量は、約86.3万tである。その約6割をホタテが占めている¹⁾。貝の可食部、いわゆる“身”の重量は約2割で、残りが貝殻となる。アサリやシジミと異なり、ホタテの大部分は生産地で身と貝殻に分けられ、「むき身」として流通する。その結果、出てくるホタテの貝殻は年間約40万tにも及ぶ。現在、ホタテ貝殻の一部は食品添加物などに再利用されているが、大部分は産業廃棄物として処理されている。産地では放置された貝殻からの悪臭、および内臓に含まれている重金属（特にカドミウム）による土壤汚染、さらには地下水汚染が大きな公害問題となっている^{2,3)}。

著者らは、これまで無機系の抗菌材料、特に金属酸化物についての抗菌活性について検討を行ってきた⁴⁻¹⁰⁾。金属酸化物を中心にスクリーニングを行ったところ、酸化カルシウム(CaO)、

酸化マグネシウム(MgO)、酸化亜鉛(ZnO)などにおいて非常に興味深い抗菌活性が認められている⁴⁾。ホタテを含めて貝殻の主成分は炭酸カルシウム(CaCO₃)であり、貝殻を高温で焼成することにより、CaCO₃は抗菌活性を有するCaOとなることに気づく。焼成貝殻粉末を食品などに利用すれば、ミネラル（主にCa）の補給だけでなく、保存性の向上が期待できる。また、廃棄物であるホタテ貝殻を有効な資源として利用できるため、公害問題の低減にも寄与できる。これまで検討した結果、1000℃で焼成したホタテ貝殻粉末はCaOとほぼ等しい効果を持っており¹¹⁾、カット野菜（キャベツ）に存在する細菌を有効に殺菌できることが分かった¹²⁾。さらに、高い休眠性、および熱や薬剤に対する高い抵抗性を有する細菌芽胞に対しても、焼成ホタテ貝殻粉末は殺菌が可能であった¹³⁻¹⁵⁾。*Bacillus*属および*Clostridium*属を含む幾つかの細菌は、安定期において芽胞を形成する¹⁶⁾。芽胞の殺菌は食品加工プロセスにおいて極めて重要な課題である。実際、これまで細

* SAWAI Jun 神奈川工科大学工学部応用バイオ科学科

菌芽胞により深刻な損害および食中毒が引き起こされている¹⁷⁻²⁰⁾。本稿では、焼成ホタテ貝殻粉末の細菌芽胞（枯草菌）に対する効果について、検討したこれまでの研究内容について概説する。

1. 細菌の栄養細胞に対する抗菌活性¹¹⁾

まず耐熱性芽胞の前に、細菌の栄養細胞に対する焼成ホタテ貝殻粉末の抗菌活性について、説明する。焼成ホタテ貝殻粉末の成分を分析した結果、Ca含有量は約70.8%で、Mgは約0.16%含まれていた。そのほかの元素は微量であったが、P, Na, Feがこの順で含まれていた¹¹⁾。AgおよびCuは、金属として強い抗菌活性を有するが²¹⁾、焼成ホタテ貝殻中には検出限界（0.01 ppm）以下であった。今回使用したホタテ貝殻中のCaCO₃が、加熱処理により全てCaOになると仮定すると、CaOとしての含有量は99%となる。

未焼成のホタテ貝殻においては、CaはCaCO₃の形で存在している。このホタテ貝殻

を700～800℃以上で焼成すると、X線回折スペクトルにはCaOのピークが認められるようになる。そして焼成温度が高くなるに従い、CaOのピークが顕著になる。つまり、ホタテ貝殻の主成分であるCaCO₃が焼成処理により、CaCO₃ → CaO + CO₂のように変化していることが認められる。実際、700℃以上の温度で焼成した粉末に殺菌効果が認められた。そして1000℃で焼成した粉末については、CaO粉末スラリーとほぼ等しくなり、生成したCaOが細菌に作用しているといえる。

図1に、1000℃で1時間焼成処理したホタテ貝殻粉末による各種細菌の生菌数の経時変化を示す。縦軸は任意の時間での生菌数 N (CFU/ml)と初期菌数 N_0 (CFU/ml)の比であり、生存率を示している。焼成ホタテ貝殻粉末スラリーは、各細菌に対して殺菌効果を示した。CaOはグラム陽性菌、陰性菌⁴⁾および真菌類⁹⁾に対しても抗菌活性を示し、幅広い抗菌スペクトルを有している。焼成ホタテ貝殻粉末もCaO同様、幅広い抗菌スペクトルを有していると考えられる。焼成ホタテ貝殻粉末スラリー濃度の増加に伴い、殺菌効果は増大した。焼成ホタテ貝殻粉末はスラリー状にすると、主成分のCaOが

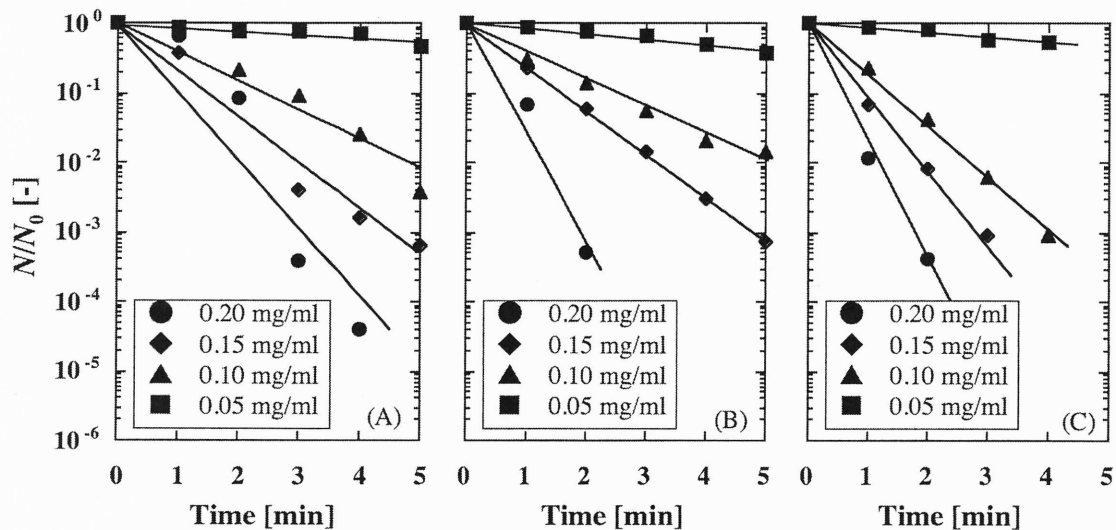


図1 焼成ホタテ貝殻粉末の各細菌に対する殺菌効果 (37℃)
(A) 大腸菌, (B) サルモネラ菌, (C) 枯草菌¹¹⁾

Ca(OH)₂となり溶解するため、アルカリ性を示す。焼成ホタテ貝殻粉末スラリーのpHは10.9～11.3(0.05～0.2 mg/ml)であった。37℃におけるCa(OH)₂の溶解度は1.4 mg/mlである。図1の結果を見ると、スラリーのpHの上昇に伴い、殺菌効果は増大している。また、図1に見られるように、縦軸に生存率の対数、横軸に時間tをとると、各細菌はほぼ直線的に減少した。したがって、焼成ホタテ貝殻粉末スラリーによる細菌(栄養細胞)の死滅過程は、一次反応速度式により表わすことができる。

同様にカキ貝殻やホッキ貝殻についても、焼成することにより抗菌活性が発現することが報告されている^{22, 23)}。著者らの実験においては、貝殻の種類による抗菌活性の差異は殆ど認められなかった。

2. 枯草菌芽胞に対する抗菌活性^{14, 15)}

図2に37℃における焼成ホタテ貝殻粉末の枯草菌芽胞に対する殺菌効果を示す。37℃において、ホタテ貝殻粉末スラリーは、枯草菌芽胞の生存率を減少させた。つまり、高い耐久性をもつ枯草菌芽胞に対しても殺菌効果を示した。その殺菌効果には、栄養細胞とは異なる傾向が認められた。低濃度においては、焼成貝殻の殺菌効果はスラリー濃度の増加に伴い増大したが、10 mg/ml以上では粉末濃度が高くなっても殺菌効果は殆ど変化せず、濃度依存性が認められなくなった。また、死滅曲線は上に凸のカーブとなった。図1に示すように、焼成ホタテ貝殻粉末およびCaOによる細菌の栄養細胞の死滅プロセスは、一次反応(対数死滅)にほぼ従った。つまり生存率の対数と処理時間の間には直線関係がみとめられた¹¹⁾。しかしながら、芽胞の死滅曲線は栄養細胞の場合と異なり、shoulderが認められた。温度を60℃にすると殺

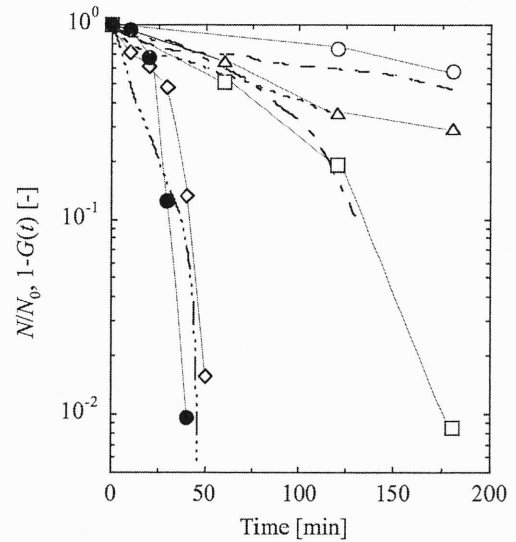


図2 焼成ホタテ貝殻粉末の枯草菌芽胞に対する殺菌効果(37℃)

●: 100 mg/ml, ◇: 10 mg/ml, □: 7.5 mg/ml, △: 5 mg/ml, ○: 1.4 mg/ml. 点線: Hachisukaの式より計算した1-G(t)の値¹⁵⁾

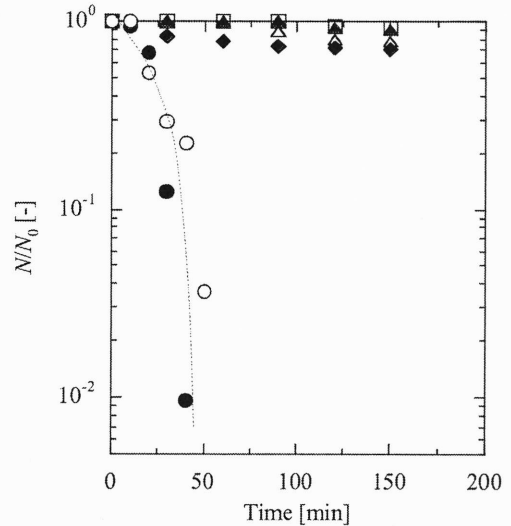


図3 枯草菌芽胞に対する焼成ホタテ貝殻粉末の溶出成分の影響(37℃)

●: 焼成ホタテ粉末スラリー(100 mg/ml), ○: 100 mg/mlの粉末スラリーから調製した上澄み液, □: NaOH (pH 12), ▲: KOH (pH 12), △: CaCl₂水溶液(5.0 × 10⁻³ mol/l), ◆: pH 12に調製したCaCl₂水溶液(5.0 × 10⁻³ mol/l)¹⁵⁾

菌効果は著しく増大した。しかし、上に凸の死滅曲線は同じであった。

CaOを主成分として含む焼成貝殻粉末スラリーの殺菌機構について検討するため、スラリーの溶出成分の影響について検討した。焼成ホタテ貝殻粉末スラリーの溶出成分を考えると、Ca²⁺とOH⁻が主成分である。まずはアル

カリ性、つまり pH の影響を検討した。飽和状態の粉末スラリーと同じ pH12 の NaOH および KOH 水溶液では、芽胞の生菌数に全く影響を及ぼさなかった (図 3)。そこで、pH を飽和スラリーと同じに調整した NaOH 水溶液に、CaO の溶解度における Ca^{2+} を CaCl_2 ($8.8 \times 10^{-1} \text{ g/l} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}$) として添加し実験を行った。この条件でも、殆ど殺菌効果は認められず、スラリーには遠く及ばなかった。一方、濃度 100 mg/ml の粉末スラリーの上澄み液は、粉末スラリーとはほぼ同等の殺菌効果を示した。これは他の濃度、そして 60°C でもほぼ同様な結果が得られた。また、pure な CaO 粉末を用いた場合でも同様な結果が得られた。以上の結果より、焼成ホタテ貝殻粉末スラリーの殺菌効果は、直接的に pH および Ca^{2+} だけが作用するのではなく、他にも要因が考えられる。アルカリ処理による芽胞の殺菌機構については、Setlow ら²⁴⁾ による研究があるが、その詳細はよく分かっていない。一方、金属イオンの芽胞の抵抗性に及ぼす影響については、おびただしい数の論文があり、ホタテ貝殻の成分として含まれているカルシウムやマグネシウムについても報告がある^{16, 25-27)}。

筆者たちは、CaO 粉末スラリーにおいて活性酸素種 (主にスーパーオキシド: O_2^-) の発生を確認している⁶⁾。CaO や MgO のようなアルカリ土類金属酸化物から活性酸素種が発生する機構は明らかになっていないが、近年 Hayashi ら²⁸⁾ は、アルミナと CaO の固溶体から大量の活性酸素が発生することを、ESR で測定し報告している。CaO 粉末スラリー処理およびアルカリ処理により引き起こされる大腸菌の損傷について、抗生物質に対する感受性の変化を基に比較検討した結果、これらの感受性変化の傾向は異なっていた⁷⁾。CaO 表面近傍に濃厚な OH^- 層が存在するとの報告があるが²⁹⁾、CaO 粉末および焼成ホタテ粉末スラリーの作用機構

は、アルカリ以外にも要因が存在すると考えられる。さらに O_2^- による大腸菌の感受性変化の傾向は、CaO 粉末スラリーによるものとはほぼ一致しており、活性酸素種が要因の一つでもあることが考えられる³⁰⁾。Hewitt ら³¹⁾ も CaO の殺菌効果について検討し、我々の結果を支持する報告を行っている。また活性酸素消去酵素であるカタラーゼおよび SOD を加えることにより、粉末スラリー上澄み液の殺菌効果は低下した。したがって、焼成ホタテ貝殻粉末スラリーの枯草菌芽胞に対する殺菌効果には、pH、カルシウムイオンの他にも、活性酸素種が関与している可能性が示唆された。活性酸素種については、過酸化水素の芽胞に対する殺菌効果が研究されている³²⁻³⁵⁾。栄養細胞の死滅機構は DNA の損傷であるが、芽胞の場合は DNA 損傷でなく、現在でもよく分かっていない。焼成ホタテ貝殻粉末スラリーのような、アルカリ、金属 (カルシウム)、活性酸素さらに粉末を組み合わせた系での検討はなく、比較は出来ない。さらに、微量な不純物の影響などもやはり考えられるため、慎重に検討を進めていく必要がある。

芽胞は発芽することにより、以下のようなプロセスでストレスに対する抵抗性を失うと考えられる¹⁶⁾。ジピコリン酸 (DPA) がキレート相手のカルシウムとともに放出される。DPA は細菌芽胞中でカルシウム塩として存在する成分であって、乾燥重量の 10-15% にも達する場合があります。耐熱性に大きく寄与している物質とされている⁶⁾。つづいて、様々な化学物質に対して透過障壁となっているコルテックスの成分であるペプチドグリカンが、芽胞の酵素の働きで加水分解され、分子量が 10,000 以下になった断片が分泌される。さらに、透過障壁であり細胞内部の脱水状態を支えているコルテックスが分解される結果、芽胞内部に水が侵入し、芽胞の比重は軽くなり、光に対する屈折率も低下する。その結果、芽胞懸濁液の濁度が減少することが

分かっている³⁶⁾。したがって、芽胞懸濁液の濁度変化を測定することで、発芽および芽胞の透過障壁の状態を把握することができる。

そこで、焼成貝殻粉末スラリーとその上澄み液の殺菌効果がほぼ等しかったこと、および粉末スラリーはそれ自体の濁度により濁度変化が測定できないことから、上澄み液の芽胞懸濁液の濁度に及ぼす影響について検討した。測定した吸光度から Hachisuka の式³⁷⁾を用いて発芽率 $G(t)$ を求め、発芽せずに残存している割合 $1-G(t)$ 、つまり透過障壁機能を有している芽胞の割合を算出した。求めた $1-G(t)$ の変化を図 2 に点線で示し、芽胞の生存率変化 (N/N_0) と比較した。 $1-G(t)$ の変化と芽胞の生存率の減少はほぼ一致した。透過障壁機能を保持している芽胞細胞の減少率が、生存率の減少と一致したことになる。図 1 (b) のように、焼成ホタテ貝殻粉末スラリーによる枯草菌の栄養細胞の死滅過程は一次反応で記述できた¹¹⁾。このときの濃度範囲は 0.05-0.20 mg/ml である。枯草菌芽胞での実験濃度範囲は 1.4 mg/ml 以上なので (図 2)、図 1 のグラフの傾きから求められる栄養細胞の死滅速度定数 k から、芽胞に対する粉末スラリーの範囲 (1.4 mg/ml 以上) における k 値を推算した。その結果、1.4 mg/ml 以上の粉末スラリー濃度の場合、枯草菌の栄養細胞の生存率は 15 秒以内で $1/10^7$ まで減少する。つまり菌数が 10^5 cfu/ml であっても、10 秒以内でほぼ全滅することを意味している。発芽あるいは透過障壁機能が損傷を受けた芽胞細胞の抵抗性が、栄養細胞と等しいとすると、ひとたび耐性を失った芽胞細胞は、焼成ホタテ粉末スラリーによりただちに死滅する。したがって、図 2 において芽胞生存率と $1-G(t)$ の変化がほぼ一致したことは矛盾しない。発芽に関与する酵素を焼成ホタテ貝殻粉末が活性化させるのか、半ば強制的に透過障壁であるコレキス層を破壊するのか、現段階では定か

ではない。しかしながら、焼成ホタテ貝殻粉末スラリー処理は、枯草菌芽胞の透過障壁を失わせ、耐性を失った芽胞を死滅させている可能性が示唆された。

おわりに

以上、焼成ホタテ貝殻粉末スラリーの細菌の栄養細胞および芽胞に対する抗菌活性について概説した。近年、調理の省力化、食の外中食化が進み、調理済みの加工食品の消費が増加している。また、食品の低塩化、低糖化傾向により、薄味で傷みやすい食品が増えてきた。このような状況の中で、食品の微生物制御の重要性はますます高まってきている。

また、日本において社会の高齢化が加速的に進むことは、必然的に免疫学的な弱者が増えることも意味している。全く抗菌処理が不必要なもの、無駄・無意味なものは、科学的な根拠を元に排除してゆかねばならない。しかしながら、本当の意味で抗菌処理・抗菌加工製品を必要とする人が、これから増えてくるのである。ではその時、どのような抗菌加工技術が求められるかといえば、当たり前のことであるが、人間にはもちろん、環境に対する影響を考慮したものである。現在、抗生物質をはじめとした有機系抗菌剤が、世界各地の河川で検出されており、生態系に及ぼす影響が懸念されてはじめている^{38,39)}。焼成ホタテ貝殻の成分である CaO は、環境中に排出されても空気中の CO₂ を吸収し、もとの CaCO₃ に戻る。そもそも貝殻は、海の成分が濃縮したものである。海の成分からできたものを、食品や環境に使用し、河川等を通して最終的に再び海に戻るのである (図 4)。また、CaO について安全性の一つの指標である変異原性を調べたところ、エームス試験では変異原性は認められなかった^{23,28)}。むしろ、変異原

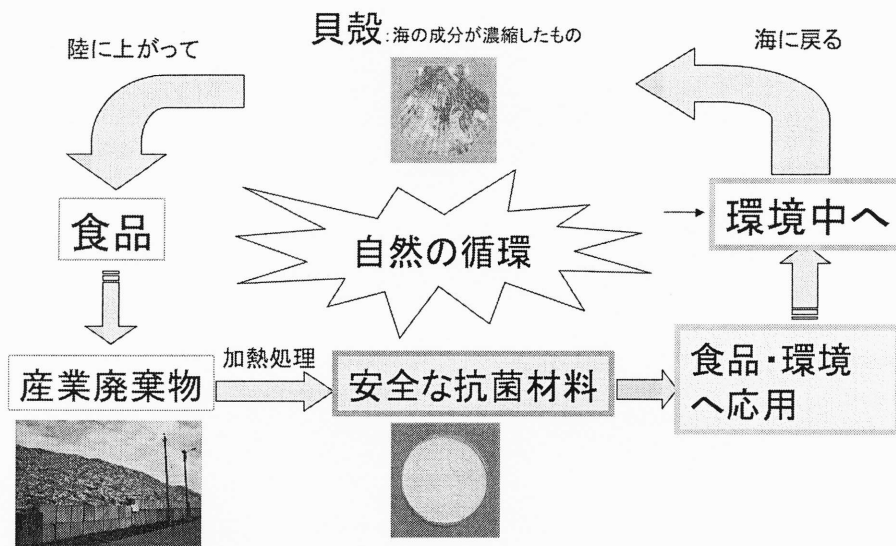


図4 環境の循環に適応した微生物制御技術（焼成ホタテ貝殻粉末）

性物質の変異原性を低下させる抗変異原性を有するというユニークな性質が認められた^{40,41)}。したがってCaOを主成分とする焼成貝殻粉末を食品にうまく応用できれば、①保存性の向上（抗菌活性）、②ミネラル分の補給、さらに③機能性の向上（抗変異原性）などにおいて役立つ

のではないかと考えられる。食品分野だけでなく、他の様々な分野においても微生物による劣化・腐敗は大きな問題となっている。これらの材料は、食品プロセスだけでなく、環境保全プロセスを含めた多くの分野への応用が展開できる可能性がある。

..... 文 献

- 1) 「農林水産省平成16年度海面漁業・養殖業生産量（概数）」 (<http://www.maff.go.jp/www/info/bun08.html>) .
- 2) 菊地慎太郎：水産廃棄物の資源化—特に廃棄組織の微生物的カドミウム除去と飼料化— . 資源処理技術 , 45, 44-48 (1998) .
- 3) Marcus, J. M., Williams, A. D. and Heizer, D. D.: Polynuclear aromatic hydrocarbon and heavy metal concentrations in sediments at coastal South Carolina marinas. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 17, 103-113 (1988) .
- 4) Sawai, J., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Evaluation of growth inhibitory effect of ceramics powder slurry on bacteria by conductance method. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 28, 288-293 (1995) .
- 5) Sawai, J., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M: Effect of particle size and heating temperature of ceramic powders on antibacterial activity of their slurries. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 29, 251-256 (1996) .
- 6) Sawai, J., Kawada, E., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Detection of active oxygen generated from ceramic powders having antibacterial activity. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 29, 627-633 (1996) .
- 7) Sawai, J., Kojima, H., Igarashi, H., Hashimoto, A., Shoji, S., Takehara, A., Sawaki, T., Kokugan, T. and Shimizu, M.: *Escherichia coli* damage by ceramic powder slurries. *J. Chem. Eng. Jpn.*, 30, 1034 -1039 (1997) .
- 8) Sawai, J., Kojima, H., Igarashi, H., Hashimoto, A., Shoji, S., Sawaki, T., Hakoda, A., Kawada, E., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Antibacterial characteristics of magnesium oxide powder. *W. J.*

- Microbiol. Biotechnol.*, **16**, 187-194 (2000) .
- 9) Sawai, J., and Yoshikawa, T.: Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO, CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay. *J. Appl. Microbiol.*, **96** , 803-809 (2004) .
 - 10) Sawai, J., Himizu, K. and Yamamoto, O.: Kinetics of bacterial death by heated dolomite powder slurry. *Soil Biol. Biochem.*, **37**, 1484-1489 (2005) .
 - 11) Sawai, J., Shiga, H. and Kojima, H.: Kinetic analysis of the bactericidal action of heated scallop-shell powder. *Int. J. Food Microbiol.*, **71**, 211-218 (2001) .
 - 12) Sawai, J., Satoh, M., Horikawa, M., Shiga, H. and Kojima, H.: Heated scallop-shell powder slurry treatment of shredded cabbage. *J. Food Prot.*, **64**, 1579-1583 (2001) .
 - 13) Sawai, J., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Effect of ceramic powder slurry on spores of *Bacillus subtilis*. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **28**, 556-561 (1995) .
 - 14) Sawai, J., Miyoshi, H. and Kojima, H.: Sporicidal kinetics of *Bacillus subtilis* spores by heated scallop shell powder. *J. Food Prot.*, **66**, 1482-1485 (2003) .
 - 15) 澤井淳, 大橋沙由, 三好啓之, 四日洋和: 酸化カルシウムを主成分とする焼成ホタテ貝殻粉による枯草菌芽胞の殺菌・防菌防黴, **35** (2007)
 - 16) 蜂須賀養悦: 芽胞学. pp. 203-237, 東京大学出版, 東京 (1988) .
 - 17) Kennedy, G.: An analysis of recent food poisoning outbreaks involving chilled foods. *Food. Aust.*, **56**, 271-275 (2004) .
 - 18) 古瀬昭夫, 牛嶋正, 鶴田元子, 又吉由紀子, 大塚博史: セレウス菌による集団食中毒・小児感染免疫, **16**, 151-155 (2004) .
 - 19) Welt, B.A., Berger, K.L. and Sage, D.S.: Performance specification of time-temperature integrators designed to protect against botulism in refrigerated fresh foods. *J. Food Sci.*, **68**, 2-9 (2003) .
 - 20) Kasai, Y., Kimura, B., Kawasaki, S., Fujii, T., Fukaya, T. and Sakuma, K.: Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in steamed rice aseptically packed under modified atmosphere. *J. Food Prot.*, **68**, 1005-1011 (2005) .
 - 21) Woodward, R. L.: Review of the bactericidal effectiveness of silver. *J. Am. Water Works Assn.*, **55**, 881-886 (1963) .
 - 22) 浅田隆志, 若林宏行, 松田潤治, 木村智子, 秋葉容子, 山口マリ子, 大道正義, 及川紀久雄: ホッキ貝焼成カルシウムの食品化学領域における殺菌・保存料としての有用性・環境トキシコロジーシンポジウム講演要旨集, **25**, 32 (1999) .
 - 23) 一色賢司, 栖原浩, 水内健二, 徳岡敬子: カルシウム製剤による微生物制御の可能性について. *日食科工誌*, **41**, 135-140 (1994) .
 - 24) Setlow, B., Loshon, C.A., Genes, P.C., Cowan, A.E., Setlow, C. and Setlow, P.: Mechanisms of killing spores of *Bacillus subtilis* by acid, alkali and ethanol. *J. Appl. Microbiol.*, **92**, 362-375 (2002) .
 - 25) Alderton, G. and Snell N.: Base exchange and heat resistance in bacterial spores, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **10**, 139-143 (1963) .
 - 26) Gould, G.W. and Dring, G.J.: Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. *Nature*, **258**, 402-407 (1975) .
 - 27) Rode, L.J. and Foster, J.W.: Ionic and non-ionic compounds in the germination of spores of *Bacillus megaterium* Texas. *Arch. Mikrobiol.*, **43**, 201-21 (1962) .
 - 28) Hayashi, K., Hirano, M., Matsuishi, S. and Hosono, H.: Microporous crystal $12\text{CaO} \cdot 7\text{Al}_2\text{O}_3$ encaging abundant O- radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 738-739 (2002) .
 - 29) Sugiyama, K., Suzuki, T. and Satoh, T.: Bactericidal activity of silicate-containing hydroxyapatite. *J. Antibact. Antifung. Agents*, **23**, 67-71 (1995) .

- 30) Sawai, J., Kojima, H., Igarashi, H., Hashimoto, A. and Shimizu, M.: Bactericidal action of calcium oxide powder. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.*, **24**, 667-670 (1999) .
- 31) Hewitt, C. J., Bellara, S. R., Andreani, A., Nebe-von-Caron, G. and McFarlane, C. M.: An evaluation of the anti-bacterial action of ceramic powder slurry using multi-parameter flow cytometry. *Biotechnol. Lett.*, **23**, 667-675 (2001) .
- 32) King, W.L. and Gould, G.W.: Lysis of bacterial spores with hydrogen peroxide. *J. Appl. Bacteriol.*, **32**, 481-490 (1969) .
- 33) Palop, A., Rutherford, G.C. and Marquis, R.E.: Inactivation of enzymes within spores of *Bacillus megaterium* ATCC 19213 by hydroperoxides. *Can. J. Microbiol.*, **44**, 465-470 (1998).
- 34) Melly, E., Cowan, A.E. and Setlow, P.: Studies on the mechanism of killing of *Bacillus subtilis* spores by hydrogen peroxide. *J. Appl. Microbiol.*, **93**, 316-325 (2002) .
- 35) 川崎近太郎, 永納秀男, 飯尾利弘, 近藤雅臣: 過酸化水素の殺菌機構について, 食衛誌, **11**, 155-160 (1970) .
- 36) 入江良三郎: 畜産と芽胞菌 (4) IV, 発芽とそのメカニズム, 畜産の研究, **48**, 399-347 (1994) .
- 37) Hachisuka, Y., Asano, N., Kato, N., Okajima, M., Kitaori, M. and Kuno, T.: Studies on spore germination. I. Effect of nitrogen sources on spore germination. *J. Bacteriol.*, **69**, 399-406 (1955) .
- 38) Kümmerer, K.: Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources. *Chemosphere*, **45**, 957 (2001) .
- 39) C.G. Daughton, C.G. and Ternes, T.A.: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle changes ? *Environ. Health Perspect.*, **107**, 907 (1999) .
- 40) Sawai, J., Saito, I., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Mutagenicity test of ceramic powders which have growth inhibitory effect on bacteria. *J. Chem. Eng. Jpn.*, **28**, 352-354 (1995) .
- 41) Sawai, J., Kojima, H., Kanou, F., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kawada, E., Kokugan, T. and Shimizu, M.: Ames assay with *Salmonella typhimurium* TA102 for mutagenicity and antimutagenicity of metallic oxide powders having antibacterial activities. *W. J. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 773-775 (1998) .