

〈原 著〉

亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの有機物存在下における 殺菌効果およびウイルス不活化効果

小林 由佳*・吉澤 重克・金子 誠二・清水 敏克

Bactericidal and Virucidal Effects of Chlorous Acid Water and Sodium Hypochlorite in a Suspension Containing Organic Substances

Yuka KOBAYASHI*, Shigekatsu YOSIZAWA, Seiji KANEKO and Toshikatsu SHIMIZU

NPO Biomedical Science Association

(*Present address; IKARI SHODOKU CO., LTD.)

(2015年11月19日 受付・2016年2月21日 受理)

要 旨

現在、消毒剤として広く使用されている次亜塩素酸ナトリウムに比して、人体への影響が少なく、有機物存在下でも殺菌効果が期待できる亜塩素酸水について、*Escherichia coli* (*E. coli*)の殺菌効果とネコカリチウイルス(feline calicivirus: FCV)の不活化効果およびその濃度と効果との関係を検証した。

亜塩素酸水は有機物としてのウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)存在下でも、殺菌・不活化効果があり、この時の遊離塩素濃度と殺菌・不活化効果に高い相関性が認められた。

さらに、亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムを、有機物としてのBSAと接触させ、接触前後の遊離塩素濃度の推移並びに溶液に対する*E. coli*の殺菌効果およびFCVの不活化効果を検討した。

亜塩素酸水のBSA接触後の遊離塩素濃度は、30分以上の接触時間でほぼ一定となり、残存遊離塩素は40~70%であった。高濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液でもBSAと30分間接触後の遊離塩素は激減した。

亜塩素酸水はBSA接触後、*E. coli*およびFCVに対する有効な殺菌効果およびウイルス不活化効果が確認されたが、次亜塩素酸ナトリウムではそれらが認められなかった。

亜塩素酸水は次亜塩素酸ナトリウムと比較して有機物との共存下における遊離塩素濃度が高く、有機物存在下でも消毒効果が期待できる薬剤であると考えられた。

Key words : 亜塩素酸水, 次亜塩素酸ナトリウム, *Escherichia coli*, ネコカリチウイルス, ウシ血清アルブミン

はじめに

21世紀を境に、我々の生活衛生環境は著しく向上したが、食中毒や感染症の脅威がなくなったわけではない。毎年厚生労働省から公表される食中毒発生状況によると、食中毒病原体にはノロウイルス、ウェルシュ菌、カンピロバクター・ジェジュニ/コリ、ブドウ球菌、腸

管出血性大腸菌、サルモネラ属菌等が挙げられている¹⁾。特に、腸管出血性大腸菌やノロウイルスは、食品を介してヒトに感染して食中毒症状を引き起こすのみならず、ヒトの糞便や嘔吐物を介してヒトからヒトへ感染を引き起こすことが知られている。集団生活を行っている保育所、学校、高齢者介護施設、そしてこれらの施設に食事を提供する施設等では、ヒトからヒトへの感染を引き起こす食中毒病原体に対しては、注意を払わなければならない。

特定非営利活動法人バイオメディカルサイエンス研究会(*現イカリ消毒株式会社)

保育施設、高齢者介護施設および調理施設等の衛生環境の整備および維持管理は、厚生労働省が定めた各施設におけるガイドラインやマニュアルにより、使用すべき消毒剤およびその使用方法が定められている²⁻⁴⁾。感染症発症後の糞便や嘔吐物の処理には次亜塩素酸ナトリウム、処理後の手洗いには逆性石けんあるいは消毒用アルコールの使用が推奨されている。アルコールは細菌を原因の食中毒菌に対しては効果があるが、ノロウイルスに対しては効果が期待できない。また、効果があるとされる次亜塩素酸ナトリウムは、高濃度での使用、金属腐食性、塩素ガスの発生、漂白作用(衣服の消毒には適さない)、皮膚への刺激性等、使用方法に注意が必要であること等の問題がある。さらに、次亜塩素酸ナトリウムを含めた各種消毒剤は、有機物存在下では消毒効果が著しく減弱するなど、使用される環境の状況により消毒効果が大きく影響を受けることが指摘されている。

我々は次亜塩素酸ナトリウムの問題点を解決する消毒剤として、2013年厚生労働省から食品添加物の殺菌料として認可された亜塩素酸水に注目した。亜塩素酸水は、飽和塩化ナトリウム溶液に塩酸を加え、酸性条件下で、無隔膜電解槽(隔膜で隔てられていない陽極および陰極で構成されたものをいう)内で電気分解して得られる水溶液に、硫酸を加えて強酸性とし、生成する塩素酸に過酸化水素水を加えて反応させて得られた水溶液である⁵⁾。

本研究では、亜塩素酸水の微生物(細菌・ウイルス)に対する有機物存在下での有効性および次亜塩素酸ナトリウムとの有効性における相違について検討した。初めに、亜塩素酸水のウシ血清アルブミン(bovine serum albumin: BSA)存在下での *Escherichia coli* (*E. coli*) の殺菌効果およびノロウイルスの代替としてのネコカリチウイルス(feline calicivirus: FCV) のウイルス不活化効果における遊離塩素濃度と有効性の相関を検証した。次に、亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムを BSA と接触させ、接触前後での遊離塩素濃度の推移並びに接触後溶液に対する *E. coli* の殺菌効果および FCV の不活化効果を検証した。

材料と方法

1. 使用した消毒剤

消毒剤は本部三慶(株)の亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムを用い、これらの不活化剤としてチオ硫酸ナトリウム、汚染有機物として BSA を用いた。なお、遊離塩素濃度は亜塩素酸水の消毒効果に関する検討においてはジエチル-p-フェニレンジアミン(DPD)法、亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果に関する比較検討においては Tetra Methyl Benzidine (TMB)法⁶⁾によりそれぞれ測定した。

2. 使用した菌株およびウイルス

細菌は亜塩素酸水の消毒効果に関する検討では *E. coli* JCM20375 と *E. coli* O157:H7 RIMD05091896、亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果に関する比較検討では *E. coli* JCM20375、ウイルスは両検討ともに FCV F9 株 ATCC VR-782 を用いた。

3. BSA との接触および抗菌・抗ウイルス活性の測定

1) 亜塩素酸水の消毒効果に関する検討

① 細菌試験

E. coli および *E. coli* O157 を標準寒天培地平板に塗抹後、37°C で 24 時間培養し、発育した集落を掻き取り生理食塩水に $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/mL になるように浮遊して接種菌液とした。BSA 濃度が 0.5% と 5% である生理食塩水溶液を作製し、これら BSA 溶液と生理食塩水に接種菌液を加え試験菌液とした。

試験管に遊離塩素濃度が 0~18 mg/mL に調製した亜塩素酸水 9 mL と試験菌液 1 mL を混合し、室温(25°C)で 10 分間反応させた。このときの BSA 濃度は 0.05% および 0.5% となる。反応後、その 1 mL を 9 mL の 10 mM チオ硫酸ナトリウム溶液を分注した試験管に移し亜塩素酸水の反応を停止させた。反応停止後の菌数は、生理食塩水で 10 倍階段希釈し、各希釈菌液の 0.1 mL を標準寒天平板培地に塗抹して 37°C、24 時間培養した後、出現したコロニーを計測し、残存菌数を算出した。なお、対照として生理食塩水を用いた。

② ウイルス試験

FCV F9 株をネコ腎臓由来株化細胞(CRFK 細胞)に接種し、ウシ胎児血清フリーの Minimum Essential Medium Eagle with Earle's salts(MEM フリー)で、34°C、48 時間培養した後、750 g、15 分間遠心分離を行い、その上清のウイルス感染価が $10^6 \sim 10^7$ PFU/mL であることを確認し接種ウイルス液とした。細菌試験と同様に BSA 濃度が 0.5% と 5% であるリン酸緩衝食塩水溶液を作製し、これら BSA 溶液とリン酸緩衝食塩水に接種ウイルス液を加え試験ウイルス液とした。

試験管に遊離塩素濃度が 0~35 mg/mL に調製した亜塩素酸水 0.9 mL と試験ウイルス液 0.1 mL を混合し、室温(25°C)で 10 分間反応させた。このときの BSA 濃度は 0.05% および 0.5% となる。反応後、試験液に 0.1 M チオ硫酸ナトリウム溶液 0.1 mL を加えて亜塩素酸水の反応を停止させた。反応停止後のウイルス液は、MEM フリーで 10 倍階段希釈し、Behrens-Kaerber 法により感染価(TCID₅₀)を算出した⁷⁾。なお、対照としてリン酸緩衝食塩水を用いた。

2) 亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果に関する比較検討

① BSA との接触

亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムの遊離塩素濃

度は、*E. coli* では 100 mg/L および 400 mg/L, FCV F9 株では 400 mg/L, 800 mg/L および 1,500 mg/L となるように蒸留水で調整し試験液とした。BSA 溶液は生理食塩水で 0.5% と 5% 溶液を作成した。

各試験液 9 容に対して各 BSA 溶液 1 容を混合し室温 (25°C), 暗所で, 0.5 時間, 3 時間および 18 時間静置し, 設定時間経過後直ちに BSA 接触後の各試験液の遊離塩素濃度を測定した。

② BSA 接触後液の抗菌活性

E. coli を標準寒天培地平板に塗沫後, 37°C, 24 時間培養し, 発育した集落を掻き取り, 生理食塩水に 10⁷~10⁸ CFU/mL となるように浮遊させ試験菌液とした。設定時間経過後の BSA 接触後液は遊離塩素濃度が 0.5 mg/L, 1 mg/L および 3 mg/L となるように蒸留水で調整して菌接種試験液とした。

各菌接種試験液と試験菌液を混合し, 室温 (25°C), 暗所で 10 分間反応させた。その後, 10 mM チオ硫酸ナトリウムで亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムの反応を停止させた。反応停止後, 生理食塩水で 10 倍階段希釈し, 各希釈液を標準寒天平板培地に塗沫し, 37°C, 24 時間培養後に出現したコロニーを残留菌数として測定した。なお, 対照として生理食塩水を用いた。

③ BSA 接触後液の抗ウイルス活性

FCV F9 株を CRFK 細胞に接種し, MEM フリーで 34°C, 48 時間培養し, 750 g, 15 分間の遠心分離を行い, その上清のウイルス感染価が 10⁶~10⁷ PFU/mL であることを確認したものを試験ウイルス液とした。設定時間経過後の BSA 接触後液の遊離塩素濃度が 1 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L および 40 mg/L となるように蒸留水で調整して試験液とした。

各試験液と試験ウイルス液を混合し, 室温 (25°C), 暗所で 10 分間反応させた。その後, 0.1 M チオ硫酸ナトリウムで亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムの反応を停止させた。反応停止後の試験ウイルス液は, MEM フリーで 10 倍階段希釈し, 下記のブラック法によりウイルス感染価を測定した。なお, 対照としてリン酸緩衝食塩水を用いた。

ブラック法: 6 穴プラスチックプレートに CRFK 細胞を蒔き, 37°C の CO₂ インキュベータで 3~5 日間培養を行った後, 細胞の培養液を除去し, 10 倍階段希釈した試験ウイルス液を 1 希釈当たり 2 穴に 0.1 mL ずつ接種した。これを CO₂ インキュベータで 34°C, 1 時間細胞に吸着させ, 各穴に 3 mL ずつ 0.75% 寒天を含む MEM 培地を入れ, 34°C, 3 日間培養した。培養後, 各穴に 3% ホルマリンを 2 mL ずつ加え細胞を固定させた後, ホルマリンを除去し, 流水で寒天培地を取り去り, 0.038% メチレンブルー液で染色した。水洗したのち, 出現したブラックを数え, ウイルス感染価を算出した。

4. 倫理的な配慮

本研究は特定非営利活動法人バイオメディカルサイエンス研究会の承認(承認番号: 26-0101)を受けて実施したものである。

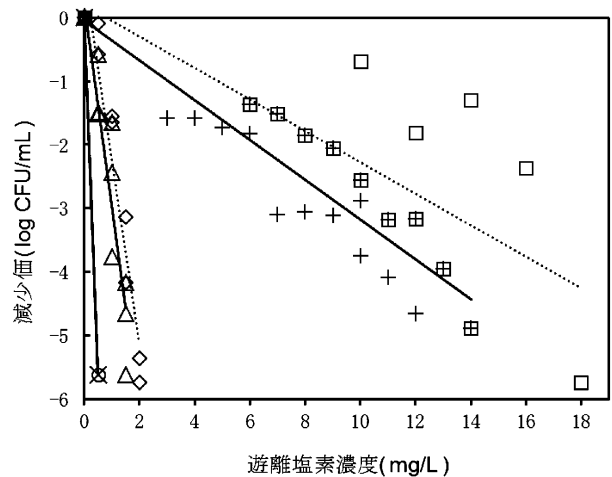
結 果

消毒剤の有効性評価は, 3.0 log から 4.0 log 以上の菌数減少あるいはウイルス感染価減少である場合を有効と評価する米国環境保護庁(United States Environmental Protection Agency)の基準に準拠して行った⁸⁾。

1. 亜塩素酸水の消毒効果に関する検討

細菌試験の結果として, 亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度と BSA 存在下の *E. coli* および *E. coli* O157 の減少価との相関を図 1 に示した。*E. coli* は, 殺菌効果が有効であると判断されたのは初期調整時の遊離塩素濃度が, BSA 非存在下では 0.4 mg/L 以上, 0.05% BSA では 1.3 mg/L 以上, 0.5% BSA では 12.6 mg/L 以上の場合であった。このときの遊離塩素濃度と *E. coli* の減少価の相関係数は, 0.05% BSA では 0.94, 0.5% BSA では 0.93 であった。また, *E. coli* O157 は, BSA 非存在下では 0.4 mg/L 以上, 0.05% BSA では 1.6 mg/L 以上, 0.5% BSA では 17.0 mg/L 以上の場合であった。このときの遊離塩素濃度と *E. coli* O157 の減少価との相関係数は, 0.05% BSA では 0.96, 0.5% BSA では 0.77 であった。

ウイルス試験の結果として, 亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度と BSA 存在下の FCV F9 株との減少価の相関を図 2 に示した。ウイルス感染価の減少が有効である



×*E. coli* BSA0%, $y=-11.24x$
 Δ*E. coli* BSA0.05%, $y=-3.1733x+0.225$ ($r=0.94$)
 +*E. coli* BSA0.5%, $y=-0.3135x-0.0428$ ($r=0.93$)
 ○*E. coli* O157 BSA0%, $y=11.24x$
 ◇*E. coli* O157 BSA0.05%, $y=-2.881x+0.655$ ($r=0.96$)
 □*E. coli* O157 BSA0.5%, $y=-0.2473x+0.1978$ ($r=0.77$)

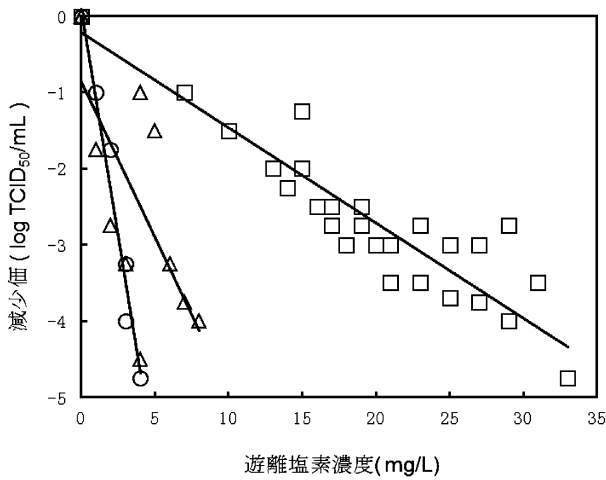
図 1 BSA 存在下における遊離塩素濃度と *E. coli* と *E. coli* O157 の減少価の相関

と判断されたのは初期調整時の遊離塩素濃度が、BSA非存在下では3.4 mg/L以上、0.05%BSAでは7.8 mg/L以上、0.5%BSAでは30.2 mg/L以上の場合であった。このときの遊離塩素濃度とFCV F9株の減少価との相関係数はBSA非存在下では0.99、0.05%BSAでは0.71、0.5%BSAでは0.94であった。

2. 亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果に関する比較検討

1) BSA接触後の亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムの濃度

BSA接触後の亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウ



○FCV F9株 BSA0%, $y = -1.2021x + 0.1251$ ($r = 0.99$)
 △FCV F9株 BSA0.05%, $y = -0.4107x - 0.8476$ ($r = 0.71$)
 □FCV F9株 BSA0.5%, $y = -0.1252x - 0.2143$ ($r = 0.94$)

図2 BSA存在下における遊離塩素濃度とFCV F9株の減少価の相関

ムの遊離塩素濃度を表1と表2に示した。亜塩素酸水のBSA接触後の遊離塩素濃度は、全ての接触時間(0.5時間, 3時間および18時間)で、0.05%BSAではBSA接触前遊離塩素濃度が100 mg/Lで62.2~69.9 mg/L, 400 mg/Lで149~374 mg/Lであり、0.5%BSAでは400 mg/Lで103~222 mg/L, 800 mg/Lで359~471 mg/L, 1,500 mg/Lで509~598 mg/Lであった。これに対して、次亜塩素酸ナトリウムのBSA接触後の遊離塩素濃度は、全ての条件下で0.0~2.7 mg/Lであった。

BSA接触後の亜塩素酸水の遊離塩素濃度は、BSAの濃度に関係なく接触時間が0.5時間以上でほぼ一定となり、各濃度で一定量の遊離塩素が認められたが、次亜塩素酸ナトリウムは接触時間0.5時間で全ての濃度で遊離塩素が僅かしか認められなかった。

2) BSA接触後の亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果およびウイルス不活化効果

① E. coliに対する殺菌効果

表1に示したように、亜塩素酸水はE. coli接触前の遊離塩素濃度が0.5 mg/L, 1 mg/Lおよび3 mg/Lの全てで残存菌数が2.0未満log CFU/mL(対照: 6.4 log CFU/mL)となり殺菌効果が認められた。一方、次亜塩素酸ナトリウムはE. coli接触前の遊離塩素濃度が0.0~0.4 mg/Lで残存菌数が4.9~6.2 log CFU/mL(対照: 6.5 log CFU/mL)となり殺菌効果が認められなかった。

亜塩素酸水はBSA接触後に遊離塩素濃度が0.5 mg/L以上であれば4.0 log CFU/mL以上の菌数減少が認められたが、次亜塩素酸ナトリウムはBSA接触後に遊離塩素濃度が0.0~0.4 mg/Lとなったため、菌数減少が認められなかった。

即ち、E. coliに対して、亜塩素酸水はBSA接触前の

表1 亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムのBSA存在下におけるE. coliに対する殺菌効果

BSA濃度 (%)	BSA接触前遊離塩素濃度 (mg/L)	BSA接触時間 (時間)	亜塩素酸水			次亜塩素酸ナトリウム		
			遊離塩素濃度 (mg/L)		残存菌数 ^{b)} (logCFU/mL)	遊離塩素濃度 (mg/L)		残存菌数 ^{c)} (logCFU/mL)
			BSA接触後	E. coli接触前 ^{a)}		BSA接触後	E. coli接触前	
0.05	100	0.5	67	0.5, 1, 3	<2.0	0.4	0.4	6.0
		3	70	0.5, 1, 3	<2.0	0.0	0.0	6.2
		18	62	0.5, 1, 3	<2.0	0.0	0.0	6.0
0.5	400	0.5	222	0.5, 1, 3	<2.0	0.1	0.1	5.8
		3	172	0.5, 1, 3	<2.0	0.4	0.4	4.9
		18	173	0.5, 1, 3	<2.0	0.0	0.0	6.1

注) 全てのデータはn=1である。

a) BSA接触後の溶液を希釈してE. coliに接触させた。その時の遊離塩素濃度は0.5, 1, 3 mg/Lの3濃度であり、3濃度とも残存菌数は<2.0 logCFU/mLを示したのでまとめて記載している。

b) 対照: 6.4 logCFU/mL

c) 対照: 6.5 logCFU/mL

表2 亜塩素酸水および次亜塩素酸ナトリウムのBSA存在下におけるFCVに対する不活化効果

BSA濃度 (%)	BSA接触前遊離塩素濃度 (mg/L)	BSA接触時間 (時間)	亜塩素酸水			次亜塩素酸ナトリウム		
			遊離塩素濃度 (mg/L)		感染価 ^{d)**} (logPFU/mL)	遊離塩素濃度 (mg/L)		感染価 ^{e)} (logPFU/mL)
			BSA接触後	FCV接触前 ^{a)}		BSA接触後	FCV接触前	
0.05	400	0.5	357	10 ^{b)}	<2.0	— ^{f)}	— ^{f)}	— ^{f)}
		3	374	10 ^{b)}	<2.0	1.5	1.5	5.5
		18	149	5 ^{b)}	<2.0	0.1	0.1	5.7
0.5	400	0.5	182 ^{a)}	20 ^{c)}	<2.0	1.7	1.7	3.5
		3	124 ^{a)}	20 ^{c)}	<2.0	0.2	0.2	3.4
		18	103	10 ^{b)}	2.3	0.0	0.0	≥6.0
	800	0.5	471 ^{a)}	20 ^{c)}	<2.0	1.2	1.2	2.0
		3	445 ^{a)}	20 ^{c)}	<2.0	0.1	0.1	2.3
		18	359	10 ^{b)}	<2.0	0.0	0.0	≥6.0
	1500	0.5	509	5 ^{b)}	<2.0	2.7	2.7	3.3
		3	553	5 ^{b)}	<2.0	0.6	0.6	3.5
		18	598	5 ^{b)}	<2.0	0.1	0.1	5.9

*^{a)} FCVに接触させた亜塩素酸水が最小の感染価を示した時の遊離塩素濃度である。

**^{b)} FCVに接触させた亜塩素酸水の感染価の最小値である。

^{a)} データはn=3の平均値(その他のBSA接触後はn=1)である。

^{b)} BSA接触後の溶液を希釈してFCVに接触させた。その時の遊離塩素濃度は1, 5, 10 mg/Lの3濃度である。

^{c)} BSA接触後の溶液を希釈してFCVに接触させた。その時の遊離塩素濃度は1, 5, 10, 20, 40 mg/Lの5濃度である。

^{d)} 対照: BSA濃度0.05%の場合5.6 logPFU/mL, 0.5%の場合遊離塩素濃度400, 800 mg/Lの時5.3 logPFU/mL, 1,500 mg/Lの時5.7 logPFU/mL

^{e)} 対照: 5.7 logPFU/mL

^{f)} —: 未実施

遊離塩素濃度が100 mg/L以上であれば0.5%BSA, 接触時間18時間でも4.0 log CFU/mL以上の菌数減少が認められたが, 次亜塩素酸ナトリウムではBSA接触前の遊離塩素濃度が400 mg/Lと高く接触BSA濃度が0.05%と低く, 接触時間も0.5時間と短くても菌数減少が認められなかった。

② FCVに対する不活化効果

表2に示したように, 亜塩素酸水はFCV F9株接触前の遊離塩素濃度が5 mg/L, 10 mg/Lおよび20 mg/Lのいずれかの濃度で感染価がほとんど2.0未満log PFU/mL(対照: 5.3~5.7 log PFU/mL)であった。一方, 次亜塩素酸ナトリウムはFCV F9株接触前の遊離塩素濃度が0.0~2.7 mg/Lで感染価が2.0~6.0以上log PFU/mL(対照: 5.7 log PFU/mL)であった。

この結果, 亜塩素酸水はBSA接触後に遊離塩素濃度が20 mg/L以上あれば3.0 log PFU/mL以上の感染価の減少が認められたが, 次亜塩素酸ナトリウムではBSA接触後に遊離塩素濃度が0.0~2.7 mg/Lとなり, 殆どの場合感染価の減少が認められなかった。

即ち, FCV F9株に対して, 亜塩素酸水はBSA接触前の遊離塩素濃度が400 mg/L以上であれば0.5%

BSA, 接触時間18時間でも3.0 log PFU/mL以上の感染価の減少が認められたが, 次亜塩素酸ナトリウムではBSA接触前の遊離塩素濃度が1,500 mg/Lと高く接触BSA濃度が0.05%と低く, 接触時間も0.5時間と短くても感染価の減少が認められなかった。

考 察

亜塩素酸水の消毒効果に関する検討では, *E. coli*の殺菌効果が認められたのは亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度が, BSA非存在下では0.4 mg/L, 0.05%BSAでは1.3 mg/L, 0.5%BSAでは12.6 mg/L以上の場合であった。そして菌数の減少価と亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度との相関は0.9以上と高かった。*E. coli* O157でも*E. coli*と同じような殺菌効果が得られ, 菌数の減少価と亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度との相関は約0.8以上であった。

FCV F9株の不活化効果が認められたのは亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度が, BSA非存在下では3.4 mg/L, 0.05%BSAでは7.8 mg/L, 0.5%BSAでは30.2 mg/L以上の場合であった。大腸菌と同様に, ウイルス感染価の減少価と亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度と

の相関は高かった。データ量が少ないため結果には示さなかったが、FCV 2280 株 ATCC VR-2057 について不活化効果を検討したところ、FCV F9 株と同様に不活化効果が確認された。このときの亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度は FCV F9 株より低い値であり、遊離塩素濃度と FCV 2280 株の減少価との相関係数は BSA 非存在下では 0.97, 0.05% BSA では 0.94, 0.5% BSA では 0.99 で、FCV F9 株と同様にその相関は高かった。

亜塩素酸水は有機物の存在に関係なく遊離塩素濃度と細菌数およびウイルス感染価の減少に高い相関性が認められたことから、効果をより簡単に比較できると判断された。

Horiuchi らは、亜塩素酸水は BSA 非存在下での *E. coli* や *E. coli* O157 の殺菌効果および 0.05% BSA 存在下での FCV F9 株の不活化効果があると報告し、今回我々も同様の結論を確認した⁹⁾。

山本らは、次亜塩素酸ナトリウムは、0.05% BSA 存在下では 1,000 ppm, 5% BSA 存在下では 5,000 ppm で FCV に対して不活化効果(4.0 log 以上の減少)を示したと報告した¹⁰⁾。

今回我々が行った試験では、0.05% BSA 存在下で FCV F9 株を不活化できる亜塩素酸水の遊離塩素濃度は約 8 mg/L, また 0.5% BSA 存在下では約 30 mg/L であった。さらにデータ量が少ないため結果には示さなかったが、3% BSA 存在下における亜塩素酸水の *E. coli* の殺菌効果および FCV F9 株の不活化効果を検討したところ、亜塩素酸水に含まれる遊離塩素濃度はいずれも約 200 mg/L で有効であると判断された。これらのことから、亜塩素酸水は特に有機物存在下において次亜塩素酸ナトリウムより低濃度で *E. coli* や *E. coli* O157 の殺菌効果および FCV F9 株の不活化効果が期待できると考えられた。

亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムの消毒効果に関する比較検討では、亜塩素酸水では BSA 接触後も遊離塩素が確認され、これらの効果が認められた。しかし、次亜塩素酸ナトリウムでは BSA 接触後速やかに遊離塩素が消失し、これらの効果が確認できなかった。

現在一般に広く使用されている消毒剤は、有機物存在下では殺菌効果やウイルス不活化効果が減衰することが指摘されている。山本らの報告のように、ノロウイルス感染症発生時の嘔吐物や排泄物の処理に使用が推奨されている次亜塩素酸ナトリウムも、有機物存在下ではその効果が減衰することが知られている。この様な高濃度での次亜塩素酸ナトリウムの使用は、細菌やウイルスを安全に殺菌あるいは不活化することができるが、本剤の有する漂白作用、皮膚傷害作用および金属腐食作用等の弊害も知られている。

この様な背景の下、有機物存在下においても安全で使

い易く、次亜塩素酸ナトリウムと同程度の効果を示す消毒剤が求められている。塩素系薬剤の亜塩素酸水は食品添加物の殺菌料として 2013 年に新たに認可され、有機物存在下でも微生物に対する殺菌効果およびウイルス不活化効果を示すといわれている。今回我々は、亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムを同じ条件下で、有機物モデルである BSA と接触させ、接触後の遊離塩素濃度と抗菌活性および抗ウイルス活性の変化を比較し、どの条件下でも亜塩素酸水が優れていることを明らかにした。

亜塩素酸水は BSA 接触後でも次亜塩素酸ナトリウムと異なり有効性を発揮する十分な量が残存していることが明らかになった。亜塩素酸水が殺菌料として認可された時の厚生労働省の審議資料によると、「亜塩素酸水には塩素系化合物として亜塩素酸(HClO₂)のほか亜塩素酸イオン(ClO₂⁻)、二酸化塩素(ClO₂ · in water phase)が混在しうる。HClO₂ は、解離状態の H⁺ · ClO₂⁻ と非解離状態の HClO₂ が平衡状態になった状態を示し、pH 2.3~6.9 の範囲内で安定的に存在する。」とされている⁵⁾。このことから、亜塩素酸水は BSA により ClO₂⁻ が消費されても非解離状態の HClO₂ や ClO₂ · in water phase から ClO₂⁻ が供給されることにより有効性が維持できると推測された。今後これを検証する研究の推進が望まれる。

本研究は基礎的な試験で有機物存在下での亜塩素酸水並びに次亜塩素酸ナトリウムの殺菌効果およびウイルス不活化効果を確認したものである。

利益相反自己申告：著者が所属する特定非営利活動法人バイオメディカルサイエンス研究会は本部三菱株式会社およびイカリ消毒株式会社から資金援助を受けている。

文 献

- 1) 厚生労働省：食中毒統計資料：http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryoku/shokuhin/syokuchu/04.html：2015年11月19日現在
- 2) 厚生労働省：保育所における感染症対策ガイドライン(2012年改訂版)：http://www.mhlw.go.jp/bunya/kodomo/pdf/hoiku02.pdf：2015年11月19日現在
- 3) 厚生労働省：平成24年度老人保健健康増進等事業「介護施設の重度化に対応したケアのあり方に関する研究事業」(高齢者介護施設における感染対策マニュアル(平成25年3月))：http://www.mhlw.go.jp/topics/kaigo/osirase/tp0628-1/dl/130313-01.pdf：2015年11月19日現在
- 4) 厚生労働省：食品等事業者の衛生管理に関する情報(大量調理施設衛生管理マニュアル)：http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/iyaku/syokuanzen/gyousei/dl/131106_02.pdf：2015年11月19日現在
- 5) 厚生労働省：亜塩素酸水の食品添加物の指定に関する添加物部会報告書(案)(資料3-2)：http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000001c3qh-att/2r9852000001c7et.pdf：2015年11月19日現在
- 6) Serrat FB: Colorimetric method for determination of

- chlorine with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. *Talanta* 1994; 41: 2091-4.
- 7) Kaerber G: Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Arch Exp Path Pharm* 1931; 162: 480-3.
- 8) U.S. Environmental protection agency: Confirmatory virucidal effectiveness test using feline calicivirus as surrogate for norovirus.: http://www.epa.gov/op-pad001/pdf_files/confirmatory_virucidal_test.pdf : 2015年11月19日現在
- 9) Horiuchi I, Kawata H, Nagao T, Imaohji H, Murakami K, Kino Y, *et al.*: Antimicrobial activity and stability of weakly acidified chlorous acid water. *Biocontrol Science* 2015; 20: 43-51.
- 10) 山本茂貴, 野田 衛: 国立医薬品食品衛生研究所 平成 21 年度ノロウイルスの不活化条件に関する調査報告書 : http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/kanren/yobou/pdf/houkokusyo_110613_03.pdf : 2015年11月19日現在

〔連絡先 : 〒141-0021 東京都品川区上大崎 2-20-8 日本感染症医薬品協会ビル 3 階
特定非営利活動法人バイオメディカルサイエンス研究会
清水敏克 E-mail: shimizu@npo-bmsa.org〕

Bactericidal and Virucidal Effects of Chlorous Acid Water and Sodium Hypochlorite in a Suspension Containing Organic Substances

Yuka KOBAYASHI*, Shigekatsu YOSIZAWA, Seiji KANEKO and Toshikatsu SHIMIZU

NPO Biomedical Science Association

(*Present address; IKARI SHODOKU CO., LTD.)

Abstract

Sodium hypochlorite has been widely used as an effective disinfectant, but involves possible hazards to health. Chlorous acid water is considered less hazardous compared with sodium hypochlorite. The bactericidal and virucidal effects of chlorous acid water were evaluated using suspensions of *Escherichia coli* (*E.coli*) and feline calicivirus (FCV). In general, the activities of disinfectants might be affected by the presence of organic substances such as bovine serum albumin (BSA). Higher BSA concentration requires greater free available chlorine ion concentration for inactivating *E.coli* and FCV, but chlorous acid water clearly inactivated both *E.coli* and FCV. Consequently, chlorous acid water is an effective disinfectant even in the presence of organic substances. Furthermore, the presence of organic substances could reduce the effectiveness of sodium hypochlorite. The bactericidal and virucidal activities of sodium hypochlorite and chlorous acid water were evaluated in the presence of bovine serum albumin (BSA). When sodium hypochlorite was added to BSA, the concentration of free available chlorine ion declined sharply. In contrast, when chlorous acid water was added to BSA, free available chlorine ion was detected as rapidly as within 30 min and 40~70% of free available chlorine ion was retained. The bactericidal and virucidal effects of chlorous acid water and sodium hypochlorite were correlated with the concentrations of the residual free available chlorine ions. Therefore, chlorous acid water is far more effective than sodium hypochlorite as a disinfectant.

Key words : chlorous acid water, sodium hypochlorite, *Escherichia coli*, feline calicivirus, bovine serum albumin