

【報文】

pH 調整次亜塩素酸ナトリウム水溶液の超音波霧化
による固体表面上の A 型インフルエンザ
ウイルスの不活化

福崎 智司^{1*}, 中山 幹男², 浦野 博水¹

Inactivation of Influenza A Virus on Solid Surfaces by
Ultrasonic Fogging with pH-Controlled Sodium
Hypochlorite Solutions

Satoshi FUKUZAKI^{1*}, Mikio NAKAYAMA², and Hiromi URANO¹

¹*Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, 5301 Haga, Kita-ku, Okayama 701-1296, Japan*

²*Biomedical Science Association, NPO Corporation, 1-28-3 Takadanobaba, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0075, Japan*

I S S N 2187-431X

日 本 防 菌 防 黴 学 会 誌

JOURNAL OF ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

【報文】

pH 調整次亜塩素酸ナトリウム水溶液の超音波霧化による固体表面上の A 型インフルエンザウイルスの不活化

福崎 智司^{1*}, 中山 幹男², 浦野 博水¹

Inactivation of Influenza A Virus on Solid Surfaces by
Ultrasonic Fogging with pH-Controlled Sodium
Hypochlorite Solutions

Satoshi FUKUZAKI^{1*}, Mikio NAKAYAMA², and Hiromi URANO¹¹Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, 5301 Haga, Kita-ku, Okayama 701-1296, Japan²Biomedical Science Association, NPO Corporation, 1-28-3 Takadanobaba, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0075, Japan

The virucidal efficacy of ultrasonic fogging with pH-controlled sodium hypochlorite (NaOCl) solutions was studied against influenza A (H1N1) virus (Flu V) in a wet or pseudo-dry state. The NaOCl solutions of pH 6 and 10 containing free available chlorine (FAC) of 50 to 1,000 mg/l were fogged at a rate of 2 ml/min, and very fine fog droplets with a median diameter of 4.7 μm were discharged from the fogger at a flow rate of 0.05 m³/min. When the NaOCl solution of pH 10 was fogged, relatively small variations in FAC concentration and pH of the droplets were observed compared with variations at pH 6. For Flu V in large droplets on a petri dish, the relative logarithmic reduction of virus infectivity depended on the FAC concentration in the fogged droplets and treatment time, and the fogging treatment of 64 mg · min/m³ at pH 6 and of 122 mg · min/m³ at pH 10 was required to achieve more than 3-log reductions. For pseudo-dry Flu V on nonwoven rayon fabric, direct contact with the fogged droplets of NaOCl solutions of pHs 6 and 10 resulted in more than a 5-log reduction of virus infectivity within 10 min, corresponding to the fogging treatment of 1.2 to 2.4 mg · min/m³. These results indicate that fogging treatment with NaOCl is effective in inactivating Flu V attached to solid surfaces, particularly dried surfaces. (Accepted 4 September 2012)

Key words : Influenza A virus (A 型インフルエンザウイルス)/Hypochlorite solution (次亜塩素酸水溶液)/Ultrasonic fogging (超音波霧化)/Inactivation of virus infectivity (ウイルス感染性の不活化).

緒 言

近年、インフルエンザウイルス (Flu V) による感染症が、世界的な規模で流行している。Flu V は、抗原性の差により A, B, C 型の 3 種類に分けられる。このうち、A 型 Flu V は、世界中で高い疾病率や死亡率の原因となる医学的にも重要なウイルス病原体である¹⁾。新型インフルエンザおよび高病原性鳥インフルエンザは、いずれも A 型 Flu V による感染症である。

Flu V の主な感染経路は、飛沫感染と接触感染であるとされているが、空気感染の可能性も示唆されている²⁻⁵⁾。一般的な予防策として、マスクの着用や手洗い、うがいなどの防衛的な処置が行われているが、感染者の分泌物が付着した固体表面 (媒介物) を経由する感染に対しては対応が不十分な現状にある⁶⁾。特に、人が活動する各種施設の室内においては、感染の危険性が高まるため、固体表面に存在する Flu V を安全かつ効果

的に不活化する技術の開発が急務となっている。固体表面の消毒には、殺菌剤の噴霧や塗布がもっとも有効であるが、殺菌剤や噴霧方法の選定にあたっては、人体への毒性や、衣類、床、壁などの濡れによる汚れの再付着など、実際に使用する現場や環境への適用性を考慮する必要がある。

弱酸性 (pH 5.0~6.5) に pH 調整された次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) 水溶液は、広い殺菌スペクトルを示す消毒剤であり、人の皮膚や粘膜を刺激することなく低い遊離有効塩素 (Free available chlorine: FAC) 濃度で速効性の高い殺菌効果を得ることができる⁷⁾。我々は、弱酸性および弱アルカリ性に調整した低濃度 (2~4 mg FAC/l) の NaOCl 水溶液を超音波振動方式により微細な霧状にして噴霧することで、固体表面を必要以上に濡らすことなく *Escherichia coli* を効果的に殺菌できること、そして殺菌効果は霧化微細粒子の到達地点での非解離型次亜塩素酸 (HOCl) の濃度に依存すること

¹岡山県工業技術センター 〒701-1296 岡山市北区芳賀5301 ☎086-286-9600²NPO 法人 バイオメディカルサイエンス研究会 〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1-28-3 ☎03-3200-6752

2187-431X/2013/0110-0011 \$02.00/0© 2013 Soc. Antbact. Antifung. Agents, Jpn

を報告した⁸⁾。Parkら⁹⁾は、比較的高濃度(180~200 mg FAC/l)の微酸性電解水を霧状噴霧することにより、固体表面上のノロウイルスを不活化できることを報告している。これらの研究の霧化処理では、固体表面上の細菌細胞やウイルスはいずれも大気に接した状態で次亜塩素酸水溶液の微細粒子と接触する系で評価された結果である。ここで、Flu Vに対する実際的なNaOCl水溶液の霧化処理の有効性を評価するためには、大気に露出した状態および飛沫液滴中に存在する状態を想定して不活化効果を検討する必要がある。

本研究では、疑似乾燥状態および飛沫液滴として固体表面上に存在するFlu Vに対して、弱酸性および弱アルカリ性に調整したNaOCl水溶液を用いて霧化処理したときの不活化効果を比較した。市販の超音波霧化器を用いて、一定の空間内において噴霧されたNaOCl水溶液の霧化微細粒子の粒径分布、pHとFAC濃度の変化を測定し、Flu Vの不活化効果に及ぼす霧化微細粒子の到達地点でのFAC濃度と噴霧時間の影響を評価した。ここでは、NaOCl水溶液の霧化処理は、pHにかかわらず、特に乾燥した固体表面上に存在するFlu Vの不活化に有効であることを示す。

実験方法

1. ウイルスと培養

インフルエンザウイルス(Flu V) A/thiba/2/09 (PdmH1N1)を用いた(-80℃凍結保存)。Flu Vの培養には、イヌ腎臓細胞(Madin-Darby canine kidney cell: MDCK細胞)を含む組織培養液(MEM培地; 日本製薬^(株))を用い、37℃で42時間培養した。この培養液から遠心分離(1,500×g, 30 min)によりウイルスを含む上清を回収し、さらにこの上清を遠心濃縮(76,000×g, 60 min)にかけ、ウイルスを含む遠心沈渣を得た。この遠心沈渣を5 mlの10 mMリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate-buffered saline: PBS)に懸濁した後、20~50%ショ糖密度勾配遠心法(76,000×g, 60 min)によりウイルスを適宜濃縮した。得られたウイルス濃縮液を約1 ml採取し、5 mlのPBSを添加して上述のように遠心濃縮する操作を2回繰り返した。得られたウイルス沈渣を5 mlのPBSに再懸濁してウイルス精製液とし、以下の不活化実験に使用した。

2. ウイルス感染価の測定

ウイルス感染価は、MDCK細胞への感染性で評価した。まず、MDCK細胞を6穴プレートの各ウェル(30 mm φ×6)内で、10%ウシ胎児血清(Fetal calf serum; FCS)を含むMEM培地3 mlを用いて37℃、5% CO₂ インキュベーター内で3日間培養した。培養後、10%

FCS含有MEM培地をピペットで取り除き、各穴プレート底部に付着したMDCK細胞を得た。各ウェルのMDCK細胞を、3 mlのMEM培地で2回洗浄した。次に、ウイルス液の10倍希釈系列(3本/希釈)を調製し、この各希釈液0.1 mlを各ウェルに接種し、1時間静置してウイルスをMDCK細胞に吸着させた。1時間の静置後、0.7%寒天、1% DEAE デキストラン、1 μg/ml トリプシンを含むMEM培地をMDCK細胞上に重層した。寒天が固化後、6穴プレートを反転し、34℃で5% CO₂ インキュベーター内で42時間培養した。培養終了後、各ウェルの寒天上に10%ホルマリンを添加してMDCK細胞を固定化した。次に、寒天MEM培地を取り除き、メチレンブルー染色を行った。ここで、ウイルス感染したMDCK細胞はメチレンブルーに染色されず、白色の斑点(ブラック)が形成される。各希釈系列3ウェルにおけるブラック数と希釈倍率からウイルス感染価(平均値)を算出した(Plaque-forming unit: PFU)。

3. 霧化による不活化実験

3.1 NaOCl水溶液の調製

次亜塩素酸ナトリウム(6% FAC含有)の試薬(Lot DWF2416; 和光純薬工業^(株))を原液として用い、イオン交換水でFAC濃度を50~1,200 mg/lとなるように希釈した後、HClおよびNaOHを用いてpH 6および10に調整した。FAC濃度はDPD試薬を用いて測定した¹⁰⁾。

3.2 霧化器

NaOCl水溶液の霧化は、市販の超音波振動式の霧化器(CS-P101; ^(株)シージーアイ)を用いた。霧化器の超音波振動子の共振周波数は2.4 MHz、霧化速度は2.0 ml/min、送風量は0.05 m³/minに設定した。

霧状になったNaOCl水溶液のFAC濃度は、ガス濃度のように、噴霧気流の単位体積あたりに換算した濃度(C'_{FAC})で表した。たとえば、FAC濃度50 mg/lに調製したNaOCl水溶液を本実験の霧化条件で1分間霧化して気流として排出したとき、FACの消失がないと仮定すると、噴霧気流の単位体積あたりのFAC濃度は2.0 mg FAC/m³となる。

3.3 Flu V付着固体表面の作製

固体担体として、滅菌処理済みのポリエチレン(PE)製のシャーレ(80 mm φ)およびレーヨン製の不織布(60 mm×60 mm; 繊維径12~18 μm)の2種類を用いた。Flu Vの塗布には、鼻腔内薬品噴霧用の飛沫作製器(アーンシュット; ^(株)キートロン)を用い、0.2 mlのFlu V液をPEシャーレおよびレーヨン不織布に飛沫噴

霧した。

PE シャーレは、ウイルス液の噴霧液が液滴または液膜を形成している状態を設定する目的で使用した。レーヨン不織布は、空隙に微量の水分を保持することで乾燥によるFlu Vの不活化を防ぎながら、不織布表面にFlu Vを存在させて大気に接触（疑似乾燥）させる目的で使用した。Flu Vを付着させた不織布は、PE シャーレ内に置いて取り扱った。Flu V付着シャーレおよび不織布は、使用するまで4℃の保冷庫で60分間保管した。

3.4 不活化実験

NaOCl水溶液の超音波霧化によるFlu V不活化実験は、安全キャビネット(1,300×820×570 mm)内で行った。まず、霧化器を安全キャビネット内の中央付近に設置し、霧化微細粒子の気流の流れを確認した。次に、Flu Vを付着させたシャーレまたは不織布を、霧化微細粒子の気流と直接接触する位置（霧化器噴霧口から約400 mm、高さ320 mm）に置き、霧化噴霧を開始した。処理時間は、5～30分とした。霧化処理中は、安全キャビネットの前面のガラス戸は閉め、ファンは停止した。所定の処理時間後、2%ペプトンを含む0.01M Na₂S₂O₃溶液3 mlをシャーレまたは不織布に入れて酸化反応を停止した。その後、シャーレまたは不織布にMEM培地1.8 mlを加え、Flu Vを洗い出した。この洗出液を、MEM培地を用いて10倍希釈系列を調製した後、各希釈液0.1 mlをブラック法によるウイルス感染価の測定に供した。

4. 霧化微細粒子の特性評価

霧化不活化実験における微細粒子の特性評価のため、Flu V付着シャーレと同じ位置にプラスチックセル(12.5×12.5×45 mm)を置き、噴霧気流中の微細粒子をセル内に接触させた。一定の小空間での連続噴霧では、微細粒子の付着によりセル内に結露水を生じるため、この結露水を捕集して微細粒子の到達量（質量）とpHを測定した。

一方、微細粒子のFAC濃度(mg/l)に関しては、結露水の捕集中に揮発することが予測される。そこで、活性酸素検出用蛍光試薬であるAminophenyl Fluorescein (APF; 積水メディカル^株)¹⁰⁾を用いて、セル内に到達した微細粒子と直ちに反応させる方法を用いた。0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)を用いて調製した1 μM APF溶液1 mlを上記プラスチックセルに入れておき、セル内に捕集された微細粒子中の次亜塩素酸とAPFの反応を行わせた。所定の時間後、分光蛍光光度計(Hitachi F2000; ^株日立製作所)を用いてセル内の溶液の蛍光強度(励起波長490 nm; 蛍光波長515 nm)を測定してFAC濃度を算出した。霧化後にシャーレに到

達した時点でのFACの残存率は、霧化器に供給したNaOCl水溶液の初期FAC濃度に対する霧化後に捕集した結露水中のFAC濃度の比率(百分率)として算出した。

微細粒子の粒径分布は、レーザ回折式粒子径分布測定装置(HELOS-KR; SYMPATEC)を用いて測定した。

結果および考察

1. 霧化微細粒子の粒径分布

Fig. 1に、超音波霧化器から噴霧されたNaOCl水溶液(pH 6, 50 mg/l)の微細粒子の粒径分布を示す。霧化粒子の粒径の頻度分布は、粒径の対数値に対して正規分布でほぼ近似できる形を示した。累積50%粒子径(メディアン径)は4.7 μm、ザウター平均粒径(SMD)は4.0 μmであり、分布幅の狭い微細粒子が噴霧されていた。この粒径は、超音波振動子の共振周波数と平均粒径の関係図から得られる数値(約2～7 μm)とよく一致していた¹¹⁾。

一般に、広い空間に漂う10 μm以下の微細な液体粒子は、固体表面に付着しても表面を濡らさないことが経験的に知られており、ドライな施設環境での空間噴霧に適した粒径といえる。ただし、霧化粒子が微細化するほど、液滴の全表面積が著しく増加し、気液接触面積がきわめて大きくなるため、次亜塩素酸分子の揮発除去ならびに大気中のCO₂の溶解が促進されると予測される。そのため、微細粒子中のFAC濃度とpHの変化を正しく把握する必要がある。

2. 超音波霧化によるpHとFAC濃度の変化

NaOCl水溶液のpHを6および10に調整し、FAC濃度を50～1,200 mg/lの範囲で種々設定して超音波霧化

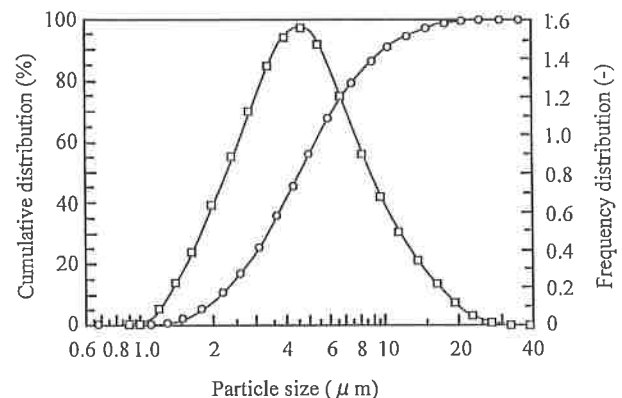


Fig.1. Particle distribution of fine droplets of NaOCl solution of pH6, generated by ultrasonic fogging. Droplets were generated at a fogging rate of 2.0 ml/min and discharged at a flow rate of 0.05 m³/min. Symbols: ○, cumulative distribution; □, frequency distribution.

Table 1. Variations in pH and FAC concentration of pH-controlled NaOCl solutions before and after ultrasonic fogging.

Initial pH	Before fogging		After fogging		FAC remaining (%)
	FAC (mg/l)	pH	FAC (mg/l)	pH	
6.0	52.5	4.7	3.10	5.90	
	186	5.8	25.2	13.5	
	495	6.5	89.5	18.1	
	1,160	7.2	242	20.9	
10.0	46.0	8.2	5.50	12.0	
	210	8.7	54.0	25.7	
	535	9.1	188	35.1	
	1,070	9.4	342	32.0	

Droplets were generated at a fogging rate of 2.0 ml/min and discharged at a flow rate of 0.05 m³/min.

噴霧を行った。Table 1に、Flu V 付着シャーレおよび不織布の設置場所に到達した時点での霧化微細粒子のpHとFAC濃度の変化を示す。霧化後のFAC残存率は、初期pH6で5.9~20.9%、pH10で12.0~35.1%となり、超音波霧化によってNaOCl水溶液中のFAC濃度が著しく減少していることがわかった。FAC残存率は、NaOCl水溶液の初期FAC濃度が高いほど増加する傾向が見られた。また、同じ濃度域の初期FAC濃度と比較したとき、pH10の方がFACの残存率が大きかった。これは、pH6では電気的に中性なHOCl (pK_a=7.53)がFAC濃度の97.1%を占め、微細粒子から飛散しやすいのに対して、pH10では99.7%が次亜塩素酸イオン(OCl⁻)として微細粒子中に比較的安定に存在するためであることが考えられる⁸⁾。

pHの変化では、初期pH6の場合、FAC濃度が200 mg/l以下ではpHは減少傾向、500 mg/l以上では増加傾向を示した。初期pH10の場合、いずれのFAC濃度においてもpHは減少傾向を示したが、FAC濃度の残存率が低いほどpH変化量も大きかった。このような変動は、各pHにおける次亜塩素酸の酸(acid)としての消失およびpH緩衝作用、ならびに微細粒子へのCO₂の溶解などの影響の総和によって決まるものと考えられる^{8,9)}。

3. NaOCl水溶液を用いた霧化不活化

3.1 シャーレ上の液滴状Flu V

飛沫噴霧した液滴中に存在するFlu Vを不活化するためには、霧化微細粒子中の次亜塩素酸分子が液滴中に溶解・拡散してFlu Vに作用する必要がある。そこで、NaOCl水溶液のFAC濃度を200, 500, 1000 mg/lと比較的高濃度に設定して霧化处理を行った。

Table 2に、液滴状Flu Vに対してNaOCl水溶液の霧化微細粒子を5~30分間噴霧したときのウイルス感染価を示す。霧化噴霧する前の未処理シャーレの初期ウイルス感染価は6.82 log₁₀ PFU/0.1 mlであった。蒸留水を5~30分間霧化したとき、ウイルス感染価の対数

Table 2. Inactivation of influenza A (H1N1) virus existing in large droplets on a petri dish by ultrasonic fogging with pH-controlled NaOCl solutions.

Solution	pH	FAC conc. (mg/l)	Virus titer (log ₁₀ PFU/0.1ml)			
			5 min	10min	20min	30min
Distilled water	6	-	6.49	6.46	6.11	6.00
NaOCl soln.	6	200	6.38	6.17	5.65	5.23
		500	5.69	4.89	3.08	< 1
		1,000	3.00	< 1	< 1	< 1
		200	6.43	6.28	4.83	3.00
	10	500	5.54	5.06	3.04	1.00
		1,000	4.08	2.30	< 1	< 1

Initial virus titer was 6.82 log₁₀ PFU/0.1ml.

For fogging conditions, see the legend for Table 1.

減少値は0.33~0.82の範囲で時間に依存してわずかに減少した。これらの数値を、各処理時間におけるコントロールとした。

pH6のNaOCl水溶液の霧化の場合、200 mg/lでの噴霧では30分後においてもウイルス感染価の対数減少は軽微(0.77)であったが、500 mg/lでは経時的にウイルス感染価の有意な減少が確認され、30分後にはウイルス感染価は検出されなくなった。さらに、1,000 mg/lでは10分間の処理でウイルス感染価は不検出となった。

pH10のNaOCl水溶液の霧化の場合、200, 500 mg/lでの処理では、pH6の結果と同等もしくはそれを上回るウイルス感染価の減少が得られた。1,000 mg/lでは、pH6よりも不活化効果は減少し、20分間の噴霧でウイルス感染価は検出されなくなった。このように、液滴状のFlu Vに対する不活化効果は、FAC濃度の初期設定値および処理時間に依存していた。

以上の結果を基に、Flu Vの霧化不活化におけるNaOCl水溶液のpHの影響を評価するためには、シャーレに到達した時点での霧化微細粒子のFAC濃度(Table 1)で議論する必要がある。そこで、噴霧気流の単位体積あたりの到達FAC濃度(C_{FAC})と処理時間(T)の濃度時間積(C_{FAC}T)を関数としてTable 2のウイルス感染価の減少を解析した。

$$\log_{10} (I/I_0) = -k C_{FAC} T \quad (1)$$

ここで、I₀は蒸留水の霧化处理時間Tにおけるウイルス感染価、IはNaOCl水溶液の霧化处理時間Tにおけるウイルス感染価、kは一次不活化速度定数である。

Fig. 2に、C_{FAC}Tを関数とするウイルス感染価の対数減少率を示す(感染価<1のデータは除く)。初期pH6の場合、ウイルス感染価は一定の割合で減少しており、(1)式の擬似一次反応に従う直線的な対数減少曲線が得られた。図中の実線は、線形最小二乗法を用いて(1)式を適合させて得られた結果である。このグラフの傾きから、k値は0.0468 (mg・min/m³)⁻¹と算出され

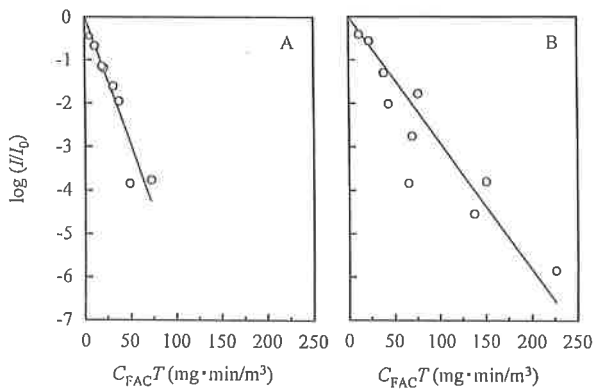


Fig.2. Inactivation of influenza A (H1N1) virus existing in large droplets on a PE petri dish by ultrasonic fogging with NaOCl solutions of pH6 (A) and 10 (B) as a function of $C_{FAC}T$. For fogging conditions, see the legend for Fig. 1.

た。一方、初期 pH10の場合も同様に、ウイルス感染価は擬似一次反応に従い一定の速度で減少する傾向を示した。線形最小二乗法を用いて(1)式を適合させた結果、 k 値は $0.0246 \text{ (mg} \cdot \text{min} / \text{m}^3)^{-1}$ と算出された。このように、初期 pH 6 の NaOCl 水溶液を用いれば、pH10と比較して1.9倍の速度で Flu V を不活化することができることになる。Fig. 2の結果から、液滴状の Flu V に対して99.9%以上 ($> 3 \log_{10}$) のウイルス感染価の減少を達成するためには、 $C_{FAC}T$ 値として pH 6 で約 $64 \text{ mg} \cdot \text{min} / \text{m}^3$ 、pH10で $122 \text{ mg} \cdot \text{min} / \text{m}^3$ の霧化処理が必要であることが示された。

3.2 不織布に付着した疑似乾燥 Flu V

疑似乾燥状態を設定するための固体担体として、比表面積が大きく微量の水分を保持できるレーヨン不織布を用い、ウイルス感染価の保持における有効性を検討した。Table 3に、不織布に飛沫噴霧した Flu V を 4°C の無菌冷蔵庫に60分間保管したときのウイルス感染価の変化を示す。比較として、PEシャーレに Flu V 液を飛沫噴霧した後に冷風乾燥して保管に供した結果も示してある。PEシャーレの場合、時間経過に伴うウイルス感染価の自然減衰は大きく、60分後には不検出となった。これは、乾燥による不活化によるものか、固着による回収率の低下によるものかは明言できないが、いずれにしても実験評価系には適していない。一方、不織布の場合、ウイルス感染価の対数減少値は30分後で0.40、60分後で0.87と軽微であった。したがって、霧化不活化実験に用いるまでの保管時間 (4°C) を60分間以内にすれば、

Table 3. Effect of storage time on the virus titer of influenza A (H1N1) virus existing on carrier surfaces at 4°C .

Carrier	Dry/Wet	Virus titer (\log_{10} PFU/0.1ml)		
		0 min	30min	60min
PE petri dish	Dry	5.78	3.17	< 1
Nonwoven rayon fabric	Wet (Pseudo-dry)	6.36	5.96	5.39

不織布付着 Flu V を疑似乾燥ウイルス試料として使用できると判断した。

Table 4に、不織布付着 Flu V に対して pH 6 および 10に調整した NaOCl 水溶液 (50, 200, 500 mg FAC/l) の霧化微細粒子を10~30分間噴霧したときのウイルス感染価を示す。霧化噴霧処理していない不織布の初期ウイルス感染価は $6.38 \log_{10}$ PFU/0.1 mlであった。蒸留水を10~30分間霧化した場合、ウイルス感染価の対数減少値は1.18~2.13であった。これらの数値を、各噴霧時間におけるコントロールとした。

pH 6 および10に調整した50 mg/l の NaOCl 水溶液の霧化の場合、いずれも10分間の噴霧でウイルス感染価は不検出となった。当然のことながら、初期 FAC 濃度が200, 500 mg FAC/l と高濃度の場合も、わずか10分間の噴霧でウイルス感染価は検出されなかった。ここでの霧化処理条件では、pH による不活化効果の相違は認められなかった。

初期 pH 6 および10に調整した50 mg/l の NaOCl 水溶液の霧化では、FAC 濃度は各々3.1および 5.5 mg/l に減少していたことから (Table 1), 不織布に到達した時点での噴霧気流の単位体積あたりの FAC 濃度は (C_{FAC}) は各々0.12および 0.22 mg FAC/ m^3 となる。10分間の噴霧での濃度時間積を考えると、少なくとも $C_{FAC}T$ として $1.2\sim 2.4 \text{ mg} \cdot \text{min} / \text{m}^3$ の霧化処理でウイルス感染価 $5.21 \log_{10}$ PFU/0.1 ml の Flu V を検出限界以下まで不活化させたことになる。我々のこれまでの研究では、pH 6 と10の NaOCl 水溶液 (50 mg/l) をそのまま水溶液として使用すれば、いずれも Flu V のウイルス感染価を30秒以内で $5.6\sim 5.8 \log_{10}$ PFU/0.1 ml も減少させることができることを確認している^{1,4)}。霧化処理では、噴霧気流中の単位体積あたりの液体密度はきわめて小さいため、水溶液処理ほどの速効性はない。しかし、NaOCl 水溶液の霧化微細粒子は、物理的形狀の異なる水溶液であり、Flu V が霧化微細粒子に接触する環境であれば、継続的に噴霧し Flu V との接触機会を多くすることによって、容易に不活化できると考えられ

Table 4. Inactivation of influenza A (H1N1) virus existing on nonwoven rayon fabric by ultrasonic fogging with pH-controlled NaOCl solutions.

Solution	pH	FAC conc. (mg/l)	Virus titer (\log_{10} PFU/0.1ml)		
			10min	20min	30min
Distilled water	6	-	5.21	4.69	4.25
NaOCl soln.	6	50	< 1	< 1	< 1
		200	< 1	< 1	< 1
		500	< 1	< 1	< 1
	10	50	< 1	< 1	< 1
		200	< 1	< 1	< 1
		500	< 1	< 1	< 1

Initial virus titer was $6.38 \log_{10}$ PFU/0.1ml.

For fogging conditions, see the legend for Table 1.

る。

4. ウイルスに対する不活化作用

Flu V は、エンベロープと呼ばれる脂質二重層膜を持つ一本鎖 RNA ウイルスである。そして、A 型 Flu V のエンベロープ表面には、ヘマグルチニン (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、イオンチャンネル (M2) の3種類のタンパク質の突起がある。HA はヒトの上気道の上皮細胞への吸着に寄与する抗原決定基であり、NA は細胞と HA を切り離す働きを担うなど、いずれも重要な感染因子である。Flu V の感染性の減少は、エンベロープやウイルス RNA および関連酵素の損傷、ならびに HA や NA の作用の阻害によって起こる¹²⁾。

非解離型である HOCl は、細菌やウイルスに対する主たる不活化因子であると認識されている。HOCl は、電気的に中性な分子であることから、細菌の形質膜 (リン脂質二重層) を透過し、細胞内の酵素や核酸に損傷を与えることで不活化する⁷⁾。HOCl の膜透過性はウイルスのエンベロープにおいても同様であり、HOCl の存在比率に依存して A 型 Flu V の不活化もより速効的に達成される^{13,14)}。PCR 法による検出では、次亜塩素酸 (HOCl/OCl⁻) によるウイルスの不活化作用は、ウイルス RNA への損傷に及んでいることが知られている^{9,15)}。一方、ウイルス感染の第一段階である HA の吸着能あるいは最終段階の NA 活性が不活化されれば、ウイルス感染価は減少する^{16,17)}。次亜塩素酸イオン (OCl⁻) は、強力な洗浄効果およびタンパク質分解作用を持つことから^{18,19)}、Flu V の HA に損傷を与え赤血球凝集反応 (HA 価) を阻害することができる¹⁴⁾。

初期 pH 6 および 10 に調整した NaOCl 水溶液の超音波霧化では、シャーレ到達時点での最終 pH は各々 4.7~7.2 (HOCl: 68.1~99.9%) および 8.2~9.4 (HOCl: 1.3~17.6%) の範囲で変動した (Table 1)。液滴中の Flu V の霧化による不活化に対して得られた k 値は、初期 pH 6 の方が pH 10 よりも 1.9 倍大きかった。これは、HOCl の強力な不活化作用に起因すると考えられるが、HOCl の存在比率の差を反映するほどの明確な相違ではなかった。さらに、疑似乾燥 Flu V に対しては、初期 pH 6 および 10 の NaOCl 水溶液の霧化処理により、10 分以内で 5 桁以上のウイルス感染価の減少をもたらした。これらの事実は、HOCl ばかりでなく OCl⁻ も Flu V の不活化に関与していることを示している。pH 調整 NaOCl 水溶液の霧化処理による Flu V のウイルス感染価の減少は、HOCl によるウイルス RNA や酵素の損傷ならびに OCl⁻ による HA 吸着能の消失に起因しているのではないと思われる。

以上の結果から、乾燥状態で固体表面に存在する Flu V に対しては、pH 6 および 10 に調整した NaOCl 水溶

液の霧化微細粒子が直接接触すれば、到達 FAC 濃度は低くても効果的な不活化処理が行えることが示された。霧化処理の実際の適用を想定すると、対象物表面の過剰な濡れを回避できるという利点があることから、排水設備のない施設、人の手が接触する機器類、室内の壁面や天井、吸水性のある繊維類などの表面処理に有効であることが期待できる。一方、湿潤状態の Flu V に対しては、霧化微細粒子中の次亜塩素酸分子の溶解・拡散が律速となるため、Flu V の有効な不活化のためには FAC 濃度を高め、噴霧時間を大幅に延長する必要があることが示された。

引用文献

- 1) Kilbourne, E. D. (2006) Influenza pandemic of the 20th century. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 9-14.
- 2) Brankston, G., Gitterman, L., Hirji, Z., Lemieux, C., Gardam, M. (2007) Transmission of influenza A in human beings. *Lancet. Infect. Dis.*, 7, 257-265.
- 3) Garner, J. S. (1996) Guideline for isolation precautions in hospitals. *Am. J. Infect. Control*, 24, 24-52.
- 4) Nicas, M., Nazaroff, W. W., Hubbard, A. (2005) Towards understanding the risk of secondary airborne infection; emission of respirable pathogens. *J. Occ. Env. Hyg.*, 2, 143-154.
- 5) Tellier, R. (2006) Review of aerosol transmission of influenza A virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 12, 1657-1662.
- 6) Weber, T. P., and Stilianakis, N. I. (2008) Inactivation of influenza A virus in the environment and modes of transmission: a critical review. *J. Infect.*, 57, 361-373.
- 7) Fukuzaki, S.: Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfecting processes. *Biocontrol Sci.*, 11, 147-157 (2006).
- 8) 浦野博水, 福崎智司 (2010) 固体表面上の *Escherichia coli* に対する次亜塩素酸水溶液の超音波霧化の殺菌効果, 防菌防黴, 38, 573-580.
- 9) Park, G. W., Boston, D. M., Kase, J. A., Sampson, M. N., Sobsey, M. D. (2007) Evaluation of liquid- and fog-based application of Sterilox hypochlorous acid solution for surface inactivation of human Norovirus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 4463-4468.
- 10) Urano, H., Ishikawa, H., and Fukuzaki, S. (2006) Involvement of radical species in inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in saline solutions by direct-current electric treatment. *J. Biosci. Bioeng.*, 102, 457-463.
- 11) 千葉 近 (1990) 超音波噴霧, pp. 207-210, 山海堂.
- 12) Weber, T. P., and Stilianakis, N. I.: Inactivation of influenza A virus in the environment and modes of transmission: a critical review. *J. Infect.*, 57, 361-373 (2008).
- 13) Rice, E. W., Adcock, N. J., Sivaganesan, M., Brown, J. D., Stallknecht, D. E., and Swayne, D. E.: Chlorine inactivation of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1568-1570 (2007).

- 14) 福崎智司, 中山幹男, 浦野博水 (2012) 次亜塩素酸水溶液による A 型インフルエンザウイルスの感染性および赤血球凝集活性の不活化, *J. Environ. Control Tech.*, 30, 91–96 (2012).
- 15) Suarez, D. L., Spackman, E., Senne, D. A., Bulaga, L., Welsch, A. C., Froberg, K. (2003) The effect of various disinfectants on detection of avian influenza virus by real time RT-PCR. *Avian Dis.*, 47, 1091–1095.
- 16) Ogata, N., and Shibata, T. (2008) Protective effect of low-concentration chlorine dioxide gas against influenza A virus infection. *J. Gen. Virol.*, 89, 60–67.
- 17) Oxford, J S., Potter, C. W., McLaren, C., and Hardy, W. (1971) Inactivation of influenza and other viruses by a mixture of virucidal compounds. *Appl. Microbiol.*, 21, 606–610.
- 18) Fukuzaki, S., Urano, H., and Yamada, S. (2007) Effect of pH on the efficacy of sodium hypochlorite solution as cleaning and bactericidal agents. *J. Surface Finish. Soc. Jpn.*, 58, 465–469.
- 19) Urano, H., and Fukuzaki, S. (2005) The mode of action of sodium hypochlorite in the cleaning process. *Biocontrol Sci.*, 10, 21–29.