

【報文】

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

浦野 博水, 福崎 智司*

Bactericidal Efficacy of Ultrasonic Fogging with Hypochlorite
Solutions against *Escherichia coli* on Solid Surfaces

Hiromi URANO, and Satoshi FUKUZAKI*

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

I S S N 0385-5201

防 菌 防 黴 誌

Bokin Bobai

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

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

1900

THE SOCIETY FOR ANTIQUARIES AND THE HISTORY OF THE COUNTRY

THE SOCIETY FOR ANTIQUARIES AND THE HISTORY OF THE COUNTRY

【報文】

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

浦野 博水, 福崎 智司*

Bactericidal Efficacy of Ultrasonic Fogging with Hypochlorite Solutions against *Escherichia coli* on Solid Surfaces

Hiromi URANO, and Satoshi FUKUZAKI*

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

The bactericidal efficacy of ultrasonic fogging with pH-controlled sodium hypochlorite (NaOCl) solutions was studied against *Escherichia coli* on membrane filter and agar nutrient medium in a confined space. The NaOCl solutions of pH 6.0 and 10.2 containing free available chlorine (FAC) of 2 to 4 mg/l were fogged at a rate of 3 ml/min, and fine fogged droplets were discharged by filtrated-compressed air at a rate of 0.01 m³/min. As a result of direct contact with the fogged droplets of NaOCl solutions, the ratio of *E. coli* survival on the filter decreased depending on the product of the FAC concentration in the fogged droplets and the exposure time. Although significant variations in FAC concentration and pH of the droplets were observed at the filter surface, the rate of killing was found to depend on the concentration of the undissociated form (HOCl) at the final pH. More than a 3-log reduction could be achieved within 15 min of fogging. To achieve a killing efficiency against *E. coli* on the agar medium comparable to that against cells on the filter, it was necessary to raise FAC to 440 to 520 mg/l because FAC was exhausted by the organic components in the medium. These results indicate that fogging with HOCl-containing solution is effective in disinfecting a solid surface, particularly one that is not soiled with organic matter. (Accepted 17 May 2010)

Key words : Fogging disinfection (霧化殺菌)/Hypochlorite solution (次亜塩素酸水溶液)/Killing of *E. coli* (*E. coli* の殺菌)/Ultrasonic fogger (超音波霧化器).

緒 言

高い清浄度が要求される施設環境では、空中浮遊菌の落下による汚染の防止対策が重要な課題である。施設環境の微生物制御法としては、基本的には作業区分を区画化するゾーニングや無菌(HEPA)フィルターを用いた空気清浄化などの遮断技術が有効である。しかし、作業者が活動する空間では、衣類や壁面から塵埃や付着菌の飛散が起こり空気汚染の原因となる。そのため、遮断技術だけでは空中浮遊菌の制御は不十分であり、何らかの直接的な殺菌技術を必要とする。

空中浮遊菌や付着菌の殺菌には、殺菌剤の空中噴霧が最も有効である。殺菌剤の選定にあたっては、殺菌効果ばかりでなく、人体への毒性や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¹⁾。従来、ホルマリンやオゾンガスを用いた薫蒸処理や、陽イオン界面活性剤や過酸化水素、過酢酸などの液体製剤のスプレー噴霧が実施されてきたが²⁻⁶⁾、人体への毒性や残留性、作業者の吸引、臭気、床・壁の濡れによる汚れの発生、部材の腐食性、低い抗ウイルス活性等のいずれかに短所を有していた。

次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) は、広い殺

菌スペクトルと速効性をもつ殺菌剤であり、食品産業をはじめ医療、保健介護施設において長年汎用されてきた^{7, 8)}。しかし、水で希釈したアルカリ性の NaOCl 水溶液は pH によっては皮膚や粘膜への刺激性を有することから、有人下での空間噴霧の使用は普及していなかった。一方、近年では、電気分解で製造する微酸性の次亜塩素酸水や NaOCl と塩酸を水に希釈混合して製造する弱酸性の NaOCl 水溶液が普及し始めている⁹⁾。これらの弱酸性 (pH 5.0-6.5) の水溶液は、主たる殺菌因子である非解離型 HOCl を高比率で含有するため、人の皮膚や粘膜を刺激することなく低濃度で高い殺菌効果を得ることができるという長所をもつ^{10, 11)}。最近になり、弱酸性の NaOCl 水溶液を霧化し、空間に噴霧することで、硬質表面に付着した細菌の殺菌やウイルスの不活化を効果的に実施した研究例も報告されている^{12, 13)}。我々は、細菌細胞に対する NaOCl 水溶液の洗浄および殺菌作用機序の解明を進めてきたが¹⁴⁻¹⁶⁾、微細粒子状に霧化された NaOCl 水溶液の性質変化や殺菌効果に及ぼす pH の影響については十分な理解を得るに至っていない。

本研究では、一定の空間内において弱酸性および弱アルカリ性に調整した NaOCl 水溶液を霧化したときの、pH と遊離有効塩素 (FAC) 濃度の変化ならびに固体表面上の *Escherichia coli* に対する殺菌効果を検討した。NaOCl と反応する有機物の影響を調べるために、固体表面にはメンブレンフィルター (非存在下) と寒天培地 (存在下) を選定した。NaOCl 水溶液を超音波振動方式で霧化し、除菌圧縮空気により一定空間内に噴霧した。その結果、NaOCl 水溶液の霧化微細粒子と直接接触させることにより、*E. coli* の生残率の対数減少は噴霧空気中の FAC 濃度と接触時間の濃度時間積に依存して直線的に減少した。そして、不活化速度は非解離型である HOCl の濃度に依存することが確認された。

実験方法

1. 材料と試薬

NaOCl は、6% の FAC を含有する試薬 (Lot

DWF2416; 和光純薬工業株) を用いた。NaOCl は、イオン交換水を用いて FAC 濃度 2-520mg/l に希釈した。希釈した NaOCl 水溶液の pH は、HCl および NaOH を用いて pH 6 および pH 10 に調整した。FAC の濃度は DPD 試薬を用いて測定した¹⁷⁾。非解離 HOCl 濃度は、pH、FAC 濃度、解離定数 ($pK_a=7.53$)¹⁸⁾ から算出した。

2. 供試菌と培養

供試菌として *Escherichia coli* NBRC3972 を用いた。*E. coli* の培養には、Luria-Bertani (LB; Difco Laboratories, Detroit) 培地 (pH7.0) を用いた。試験管内の寒天斜面培地で保存した菌株から前培養用の液体培地 40ml に一白金耳移植し、温度 37°C で 16 時間培養した。この前培養液 0.5ml を本培養用の液体培地 40ml に接種し、温度 37°C で 16 時間培養して試験用菌原液とした。*E. coli* の生菌数は、生理食塩水を用いた 10 倍希釈系列で希釈調製した後、ここから各 0.1ml を寒天平板培養法に供して 37°C で 48 時間培養し、形成されたコロニー数 (Colony Forming Unit: CFU) から算出した¹⁷⁾。試験用菌原液中の生菌数は、 1.0×10^9 CFU/ml であった。

3. 固体表面付着 *E. coli* の調製

固体表面への *E. coli* の付着操作および付着菌の移動は、各々クリーンベンチおよび無菌箱内で行った。

固体担体として、滅菌処理済みセルロース混合エステルメンブレンフィルター (細孔径: 0.45 μ m; 直径 47mm ϕ ; アドバンテック東洋株) とシャーレ内で調製したオートクレーブ処理 (120°C, 15min) 済み LB 寒天培地 (直径: 90mm ϕ) を用いた。

試験用菌原液を試験管内で適宜希釈して $10^2 \sim 10^6$ CFU/ml オーダーの希釈懸濁液を調製した。フィルターの場合、この希釈懸濁液 0.1ml と生理食塩水 4ml を試験管内で混合した後、ピペットを用いて吸引ろ過させながらフィルター上に均一に捕集させた。培地成分を除去するため、引き続き生理食塩水 4ml の吸引ろ過によるすすぎを行っ

た。このフィルターを温度22℃、湿度39%で1分間風乾させることにより余剰の水を除去した後、ステンレス鋼製平金網(17mmメッシュ)に載せて殺菌試験に供した。寒天培地の場合、希釈懸濁液0.1mlをコンラージ棒により寒天培地上に均一に塗布し、十分に吸水させた後に殺菌試験に供した。

4. 霧化による殺菌実験

NaOCl水溶液の霧化は、超音波振動子(共振周波数2.4MHz)を用いた霧化部(CM-20; シージーアイ(株))とフィルター除菌圧縮空気による噴霧部からなる霧化器を用いて行った。霧化殺菌は、420×420×530mmの亚克力製容器内(25℃)に霧化器を設置し、以下の手順で行った。まず、*E. coli*を付着(10~10⁴CFUオーダー)させたフィルター(平金網上)3枚または寒天培地3枚を、霧化微粒子の気流と直接接触する床面(霧化器から約30cm)に置いた。次に、霧化速度3ml/min、送風量0.01m³/minでpH6.0またはpH10.2に調整したNaOCl水溶液(2, 4, 180, 200, 440, 520mg FAC/l)の霧化噴霧を開始した。霧化微粒子の気流は、容器底部の排気口から外部に排出される。NaOClの霧化微細粒子への曝露時間は、0.5~20分とした。所定の曝露時間後、フィルターはシャーレ内に入れたLB培地2mlを含浸させた滅菌済みセルロースマット(直径47mmφ; アドバンテック東洋(株))の上に載せ換え蓋をし、寒天培地はそのまま蓋を閉めた。各々のシャーレを37℃で48時間培養し、形成されたコロニー数から生菌数を計測した。結果は、各々3枚の平均値とした。

*E. coli*の死滅挙動は、疑似一次反応式を用いて解析した¹⁴⁾：

$$\log(N/N_0) = -kC_{FAC}T \quad (1)$$

ここで、 N_0 は初発生菌数(乾燥処理実施後)、 N は曝露時間 T における生菌数、 k は一次不活化速度定数、 C_{FAC} は噴霧気流の単位体積あたりに換算したFAC濃度である。たとえば、FAC濃度2mg/lに調整したNaOCl水溶液を本実験条件で1分間霧化(3ml)して噴霧気流(0.01m³)として排出したとき、FACの消失がないと

仮定したときの見掛けの濃度(C'_{FAC})は0.6mg FAC/m³となる。

霧化微細粒子のpHおよびFAC濃度の変化を調べるために、結露の促進を目的として底部を氷冷した状態のガラスシャーレを気流中に置き、シャーレ表面に結露した水滴を採取して測定した。

結 果

1. 超音波霧化によるpHとFAC濃度の変化

NaOCl水溶液のpHを6.0および10.2に調整し、FAC濃度を2~520ppmの範囲で種々設定して超音波霧化噴霧を行った。Table 1に、霧化噴霧に伴う微細粒子のpHとFAC濃度の変化を示す。初期pH6.0のNaOCl水溶液の場合、FAC濃度を2.0および4.0mg/lと低く設定すると、pHはともに5.2に減少し、FAC消失率は各々91%、77%と非常に大きかった。FAC濃度を180および440mg/lと比較的高濃度に設定すると、pHはともに6.8に増加する方向に転じ、FAC消失率も22~25%と大幅に減少した。このように、FACを高濃度に設定することにより、NaOCl水溶液のpHおよびFACの挙動に変化が見られた。

一方、pH10.2のNaOCl水溶液の場合、FAC濃度が2.0および4.0mg/lと低いとき、pHはともに7.3~7.4に減少し、FAC消失率は60~66%と比較的小さかった。FAC濃度を200および520mg/lに増加させると、pHの減少はともに8.0にとどまり、FAC消失率も11~15%と著しく減少した。pH6.0のNaOCl水溶液の霧化噴霧と比較すると、pH10.2の水溶液におけるpHとFAC

Table 1. Variations in pH and FAC concentration of hypochlorite solutions before and after ultrasonic fogging.

Initial pH	Before fogging	After fogging	
	FAC (mg/l)	pH	FAC (mg/l)
6.0	2.0	5.2	0.18
	4.0	5.2	0.91
	180	6.8	140
	440	6.8	330
10.2	2.0	7.3	0.68
	4.0	7.4	1.6
	200	8.1	170
	520	8.0	460

濃度の変動は比較的小さかった。このように、霧化微細粒子の実際の pH および FAC 濃度は、NaOCl 水溶液の初期設定値に依存して大きく変化することがわかった。

2. 有機物非存在下における霧化殺菌

メンブレンフィルター上の *E. coli* ($10 \sim 10^4$ CFU) に対して、pH6.0 および 10.2 に調整した NaOCl 水溶液 (2, 4 mg FAC/l) の霧化微細粒子を曝露した。種々の初発菌数で得られた生菌数の経時変化は、生残率 (N/N_0) として一つのグラフ上に整理した。

Fig. 1 に、NaOCl 水溶液の初期 FAC から算出した噴霧空気中の見掛けの FAC 濃度と曝露時間の濃度時間積 ($C'_{FAC}T$) を関数とする生残曲線を示す。初期 pH6.0 の場合 (Fig. 1A), 2 および 4 mg FAC/l で得られた生残率は、いずれも一定かつ同等の速度で減少しており、(1) 式の擬似一次反応に従う直線的な生残曲線が得られ

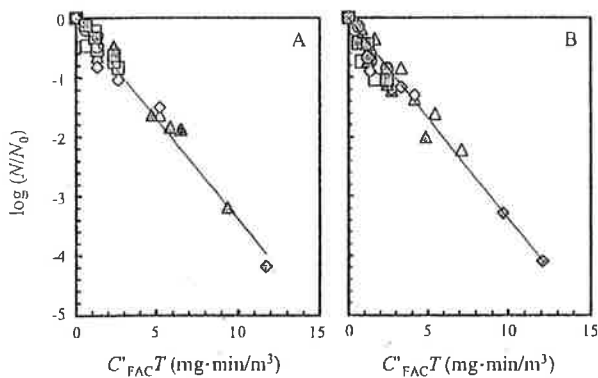


Fig.1. Inactivation of *E. coli* on the membrane filter by ultrasonic fogging with NaOCl solutions of pH 6.0 (A) and 10.2 (B) as a function of $C'_{FAC}T$. Open and closed symbols denote data at 2 and 4 mg FAC/l, respectively. Symbols (the initial cell number on filter; CFU): \circ and \bullet , 10^1 ; \square and \blacksquare , 10^2 ; \triangle and \blacktriangle , 10^3 ; \diamond and \blacklozenge , 10^4 .

た。図中の実線は、2 および 4 mg FAC/l で得られた全データに対して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 値は各々 $0.34 (\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3)^{-1}$ と算出された (Table 2)。一方、pH10.2 の場合も同様に、いずれの FAC 濃度においても擬似一次反応に従い、一定かつ同等の速度で減少する傾向を示した (Fig. 1B)。全データに対して線形最小二乗法を用いて (1) 式を適合させた結果 k 値は、各々 $0.33 (\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3)^{-1}$ と算出された。このように、pH6.0 と 10.2 では主たる殺菌因子である HOCl の存在比率が異なるにもかかわらず k 値はほぼ一致しており、同等の速度で生残率が減少する結果となった。Fig. 1 の結果から、pH6.0 および 10.2 において、 $C'_{FAC}T$ を関数とすると約 $9 \text{ mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3$ の霧化噴霧 (曝露時間: 15分) により、99.9%以上の生菌数の減少 ($>3 \log$) が達成できることが示された。

次に、フィルター表面に到達した時点での霧化微細粒子の最終 FAC 濃度から噴霧気流中の FAC 濃度 (C_{FAC}) を算出し、Fig. 1 のデータを $C_{FAC}T$ に対してプロットした (Fig. 2)。その結果、初期 pH6.0 および 10.2 における k 値は、各々 $1.50, 0.89 (\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3)^{-1}$ と算出された (Table 2)。すなわち、実際の作用濃度あたりの殺菌速度は、pH6.0 の方が約 1.7 倍大きいことがわかった。

さらに、霧化微細粒子の最終 pH と FAC 濃度から噴霧空気中の非解離 HOCl 濃度 (C_{HOCl}) を算出し、Fig. 1 のデータを $C_{HOCl}T$ に対してプロットした (Fig. 3)。その結果、初期 pH6.0 および 10.2 における k 値は、各々 $1.51, 1.48 (\text{mg HOCl} \cdot \text{min}/\text{m}^3)^{-1}$ となり、同等の k 値が得られた (Table 2)。 C_{HOCl} を基準とすると、99.9%以上

Table 2. The k values obtained for inactivating *E. coli* by ultrasonic fogging with hypochlorite solutions of pH 6.0 and pH 10.2, based on various CT .

Solid surface	Initial		k ($[\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3]^{-1}$) as a function of		
	pH	FAC (mg/l)	$C'_{FAC}T$	$C_{FAC}T$	$C_{HOCl}T$
Membrane filter	6.0	2.0, 4.0	0.34	1.50	1.51
	10.2	2.0, 4.0	0.33	0.89	1.48
Agar medium	6.0	440	1.7×10^{-2}	2.3×10^{-2}	2.9×10^{-2}
	10.2	520	1.7×10^{-2}	2.0×10^{-2}	2.5×10^{-2}

* Values calculated assuming the final pH of 7.0.

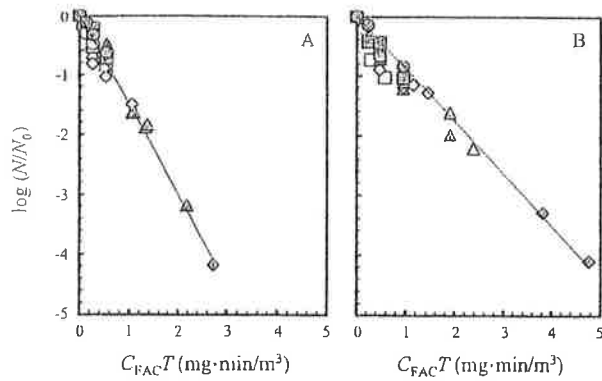


Fig.2. Inactivation of *E. coli* on the membrane filter by ultrasonic fogging with NaOCl solutions of pH 6.0 (A) and 10.2 (B) as a function of $C_{FAC}T$. Symbols are the same as those in the legend to Fig. 1.

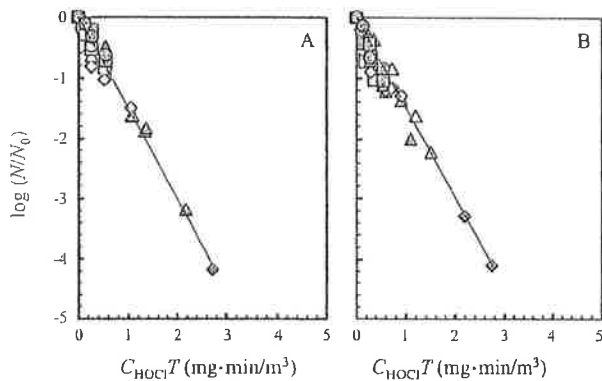


Fig.3. Inactivation of *E. coli* on the membrane filter by ultrasonic fogging with NaOCl solutions of pH 6.0 (A) and 10.2 (B) as a function of $C_{HOCl}T$. Symbols are the same as those in the legend to Fig. 1.

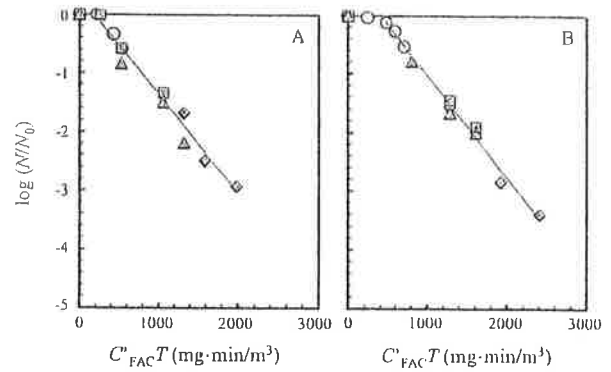


Fig.4. Inactivation of *E. coli* on agar nutrient medium by ultrasonic fogging with NaOCl solutions of pH 6.0 (A) and 10.2 (B) as a function of $C'_{FAC}T$. Symbols are the same as those in the legend to Fig. 1.

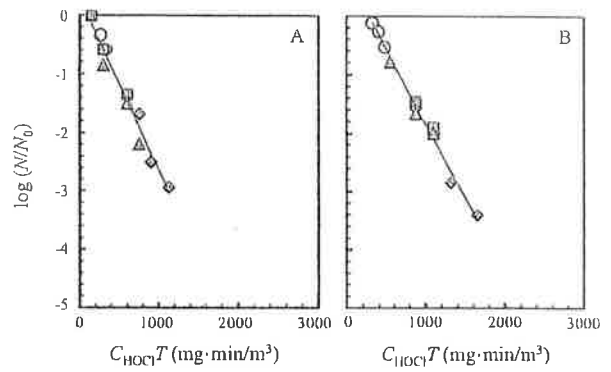


Fig.5. Inactivation of *E. coli* on agar nutrient medium by ultrasonic fogging with NaOCl solutions of pH 6.0 (A) and 10.2 (B) as a function of $C_{HOCl}T$. Symbols are the same as those in the legend to Fig. 1.

の生菌数の減少 (>3 log) は濃度時間積にして約 $2 \text{ mg HOCl} \cdot \text{min}/\text{m}^3$ の霧化噴霧 (曝露時間: 15分) により達成できたことになる。

3. 有機物存在下における霧化殺菌

Fig. 1 と同様の条件で、寒天培地上の *E. coli* ($10 \sim 10^4 \text{ CFU}$) に対して NaOCl 水溶液 (pH6.0, 10.2; 2, 4 mg FAC/l) の霧化微細粒子を曝露した結果、0.5~20分間の曝露では生菌数の変化は全く見られなかった。これは、FACが培地の有機成分と反応して直ちに消失したことが原因であると考えられた。そこで、FAC濃度を増加させて霧化殺菌実験を行った。

Fig. 4に、寒天培地上の *E. coli* ($10 \sim 10^4 \text{ CFU}$) に対して pH6.0 (440mg FAC/l) および pH10.2 (520mg FAC/l) に調整した NaOCl 水

溶液の霧化微細粒子を曝露したときの $C'_{FAC}T$ を関数とする生残曲線を示す。いずれの pH においても、 $C'_{FAC}T$ 値が低い領域において、死滅が起き始めるまでの時間的遅れが現れたが、その後は擬似一次反応に従う直線的な生残曲線が得られた (Table 2)。遅延時間後のデータに対して (1) 式と線形最小二乗法を用いて適合 (図中の実線) した結果、pH6.0 および10.2で得られた k 値は、いずれも $1.7 \times 10^{-3} (\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3)^{-1}$ と算出された。この結果から、99.9%以上の生菌数の減少 (>3 log) を達成するためには、pH6.0 および10.2において各々約1,900および2,200 $\text{mg} \cdot \text{min}/\text{m}^3$ の霧化噴霧 (曝露時間: 約13分) が必要であることが示された。

Table 1 に示すように、pH6.0 (440mg FAC/l) および pH10.2 (520mg FAC/l) の NaOCl

水溶液を霧化噴霧したときの微細粒子の pH は各々 6.8 および 8.0 である。ただし、寒天培地に付着した微細粒子の pH は、直ちに寒天培地の pH (7.0) に移行すると考えられる。そこで、寒天培地に到達した時点での霧化微細粒子の pH を 7.0 とし、最終 FAC 濃度から噴霧空気中の C_{HOCl} を算出し、Fig. 4 のデータを $C_{HOCl}T$ に対してプロットした (Fig. 5)。その結果、初期 pH6.0 および 10.2 における k 値は、各々 2.9×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} ($\text{mg HOCl} \cdot \text{min}/\text{m}^3$) $^{-1}$ とほぼ同等の数値となり、HOCl 濃度に依存した殺菌機序が作用していることが確かめられた。

考 察

pH6.0 および 10.2 に調整した低濃度 NaOCl 水溶液 (2~4 mg FAC/l) の霧化微細粒子は、反応性有機物が存在しないフィルター上の *E. coli* に対して効果的な殺菌作用を示した (Fig. 1)。*E. coli* の生菌数の対数減少は、濃度時間積に依存して直線的に減少し、約 9 mg FAC \cdot min/m³ の霧化噴霧で生菌数の減少は 99.9% 以上 (>3 log) に達した。これは、曝露時間にして 15 分に相当する。小野ら¹²⁾は、ガラスシャーレ上に塗布した *Staphylococcus aureus* を対象に弱酸性次亜塩素酸水溶液 (pH6.0~6.5; 200 mg FAC/l) を霧化噴霧した類似の実験系において、擬似一次反応に従う死滅挙動が起こることを報告している。本霧化条件では、噴霧気流中の C_{FAC} は 0.054~0.27 mg FAC/m³ と低濃度であり、環境に対する影響も極めて小さい濃度である。このように、NaOCl 水溶液の物理的性状が変わっても、殺菌活性を発現することが実証された。

フィルター上の *E. coli* に対する霧化殺菌において、 $C_{FAC}T$ を関数とする生残曲線には NaOCl 水溶液の初期 pH の影響は見られなかった (Fig. 1)。これは、超音波霧化および圧縮空気による噴霧工程において、霧化微細粒子の pH と FAC 濃度が大きく変化していることに起因していた (Table 1)。超音波は、水溶液中で局所的な圧力の増減を繰り返す機械的作用であり、液面において噴水の発生と表面張力の低下を起こすことによ

て液体を微細粒子化させる。微細粒子の粒径は、超音波振動子の共振周波数に依存する¹⁹⁾。本実験に用いた超音波振動子の共振周波数は 2.4 MHz であることから、霧化微細粒子の粒径は約 4~10 μm と推測される¹⁹⁾。高度の微細化により、微粒子の付着による固体表面の濡れを低減または回避することができる反面、液体粒子の比表面積の増加は次亜塩素酸分子の液相から気相中への物質移動 (揮発) を促進させ、FAC 濃度の減少をもたらす。さらに、環境との緩衝作用も著しく低下する。2~4 mg FAC/l の低濃度 NaOCl 水溶液の霧化噴霧の場合、FAC の消失率は初期 pH6.0 のとき 77~91% (最終 pH5.2)、初期 pH10.2 のとき 60~66% (最終 pH7.3, 7.4) であった。FAC 濃度の消失に関しては、pH 調整 NaOCl 水溶液における FAC 成分の安定性の序列 ($\text{OCl}^- > \text{HOCl} > \text{Cl}_2$) と一致していた^{20, 21)}。これは、pH6.0 では電氣的に中性な HOCl が FAC 濃度の約 97% を占め、HOCl が微細粒子から揮発しやすいのに対して、pH10.2 では 99.8% がイオン型である 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。また、pH の低下に関しては、FAC 濃度が低い (2~4 mg/l) 場合は、酸としての次亜塩素酸 (HOCl) の消失による pH の上昇よりも、微細粒子への CO_2 の溶解に起因する pH の低下が上回るためではないかと考えられる。 CO_2 の溶解は、アルカリ性溶液において顕著な現象である。一方、NaOCl 水溶液の FAC 濃度を 180~520 mg/l に増加させることにより、霧化微細粒子の pH 値は初期 pH6.0 および 10.2 で各々 1.6 および 0.6~0.7 (pH 単位) ほど低濃度 FAC (2, 4 mg/l) のときよりも高い値であった。その結果、FAC の消失率は著しく減少した。おそらくは、pH 変化に対する影響において、次亜塩素酸の消失絶対量の増加が CO_2 の溶解を上回るため最終 pH が高い値となり、微細粒子中の OCl^- の比率が高まったことが FAC 消失率の減少の要因となったのではないかと推測される。

噴霧気流中の微細粒子がフィルター表面に到達した時点での実際の FAC 濃度に基づいて $C_{FAC}T$ の関数で生残率を整理すると、 k 値は初期 pH6.0

の方が約1.7倍大きくなった (Fig. 2)。さらに、 $C_{HOCl}T$ で整理すると初期 pH に依存することなく同等の死滅速度 (k 値) となった (Fig. 3)。以上の結果から、*E. coli* に対する NaOCl 水溶液の霧化微細粒子の殺菌力は、全 FAC 濃度ではなく HOCl 濃度に依存するという既知の殺菌機序⁹⁾に従うことが確認された。効率的かつ有効な霧化殺菌操作を実施するためには、NaOCl 水溶液の超音波霧化による微細粒子中の C_{HOCl} の変化を正しく予測することが重要である。

NaOCl 水溶液の殺菌効果は、反応性有機物の存在によって低下する。これは、FAC 成分が有機物との反応で消費されるためである。Bloomfield ら²²⁾は、250mg FAC/l の NaOCl 水溶液に0.5および1.0% (w/v) のアルブミンを添加することにより、6 log 以上の細菌の死滅が各々 0.3-1.9 log および 0.5-1.4 log に低下することを報告している。寒天培地上の *E. coli* に対して 2 mg FAC/l の NaOCl 水溶液の霧化噴霧では、殺菌効果は全く見られなかった。しかし、NaOCl 水溶液の初期 FAC 濃度を440~520mg/l に増加することにより、フィルター表面と同等の曝露時間 (約13分) で殺菌効果を得ることができた (Fig. 4)。ただし、殺菌効果が現れるまでに、一定の遅延が起こることがわかった。遅延時間は、pH10.2 で長くなる傾向が見られた。これは、有機物に対する OCl の高い反応性に起因していると思われる⁹⁾。寒天培地の場合、99.9%以上 (>3 log) の死滅を達成するためには、フィルターと比較して、 $C_{FAC}T$ として220倍、 $C_{HOCl}T$ として550~740倍の濃度時間積が必要であった。このように、有機物が存在する固体表面の霧化殺菌の場合、殺菌効果の著しい低下と効果発現までの遅延が起こることが示された。

以上の結果から、NaOCl 水溶液の霧化微細粒子の噴霧気流が直接接触する固体表面であれば、希薄 NaOCl 水溶液の霧化噴霧でも効果的な殺菌が行えることが示された。運転条件として初期 pH, FAC 濃度、微細粒子の平均粒径、噴霧速度を適切に制御することにより、NaOCl 水溶液の霧化殺菌は新たな空間殺菌手法の一つとして種々の施設環境で適用可能であると期待される。一方、

本研究では霧化微細粒子が接触していない箇所での殺菌効果については未検討である。霧化殺菌法を広い環境空間の微生物制御に適用するためには、霧化微細粒子から空間中に蒸発した HOCl 分子の殺菌作用の有効性についても明らかにする必要があり、現在研究を進めているところである。

参 考 文 献

- 1) Russell, A. D., Hugo, W. B., and Ayliffe, G. A. J. (1999) Disinfection, preservation, and sterilization, 3rd ed. Blackwell Science, Osney Mead, Oxford, United Kingdom.
- 2) Bodey, G. P., and Gewertz, B. (1969) Microbiological studies of a laminar air flow unit for patients. *Arch. Environ. Health.*, 19, 798-805.
- 3) Masaoka, T., Kubota, Y., Namiuchi, S., Takubo, T., Ueda, T., Shibata, H., Nakamura, H., Yoshitake, J., Yamayoshi, T., Doi, H., and Kamiki, T. (1982) Ozone decontamination of bioclean rooms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, 509-513.
- 4) McDonnell, G., and Russell, A. D. (1999) Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 12, 147-179.
- 5) Swartz, S. A., and Perry, S. (1966) Patient protection in cancer chemotherapy. *J. Am. Med. Assoc.*, 197, 623-627.
- 6) Doultree, J. C., Druce, J. D., Birch, C. J., Bowden, D. S., Marshall, J. A. (1999) Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *J. Hosp. Infect.*, 41, 51-57.
- 7) Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N., and Busta, F. F. (2003) Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2, 161-173.
- 8) Rutala, W. A., and Weber, D. J. (1997) Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health-care facilities. *Clin. Microbiol. Rev.*, 10, 597-610.
- 9) Fukuzaki, S. (2006) Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and

- disinfecting processes. *Biocontrol Sci.*, 11, 147-157.
- 10) Izumi, H. (1999) Electrolyzed water as a disinfectant for fresh-cut vegetables. *J. Food Sci.*, 64, 536-539.
 - 11) Len, S.-V., Hung, Y.-C., Erickson, M., and Kim, C. (2000) Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *J. Food Prot.*, 63, 1534-1537.
 - 12) 小野朋子, 三宅真名, 山下光治 (2006) 弱酸性次亜塩素酸水の噴霧による種卵消毒における研究, 防菌防黴, 34, 465-469.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) Urano, H., and Fukuzaki, S. (2005) The mode of action of sodium hypochlorite in the cleaning process. *Biocontrol Sci.*, 10, 21-29.
 - 16) 福崎智司, 浦野博水, 高橋和宏, 山田貞子, 高木明彦 (2009) 次亜塩素酸ナトリウムの洗浄および殺菌作用に及ぼす温度の影響の速度論的研究, 防菌防黴, 37, 253-262.
 - 17) 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.
 - 18) Morris, J. C. (1966a) The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *J. Phys. Chem.*, 70, 3798-3805.
 - 19) 千葉 近 (1990) 超音波噴霧, pp. 207-210, 山海堂.
 - 20) Siqueira, E. L. (2000) Chemical stability of 0.5% sodium hypochlorite solutions. *ECLER Endod.*, 2, 1-39. Sao Paulo.
 - 21) 西本右子, 井上 啓 (2004) 電解水の安定性に対する pH 及び温度の影響, 機能水研究, 2, 71-74.
 - 22) Bloomfield, S. F., Arthur, M., Looney, E., Begum, K., and Patel, H. (1991) Comparative testing of disinfectant and antiseptic products using proposed European suspension testing methods. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 233-237.