

原文

弱酸性化亜塩素酸水の抗菌活性と安定性

堀内功典^{1,2}、川田宏之²、長尾多美子¹、今大路治之¹、
村上和也¹、木納康博¹、山崎尚³、小山一^{3,4}、藤田八束²、
合田学剛²および桑原知巳^{1*}

¹ 香川大学医学部分子微生物学教室

〒761-0793 香川県木田郡三木町池戸1750-1

² 本部三慶株式会社 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見2-2-53

³ 和歌山県立医科大学大学院ウィルス学部分子細胞医学科

〒641-8509 和歌山市

⁴ 和歌山信愛女子短期大学 〒640-0341 和歌山市

2014年3月12日受領／2014年9月20日受理

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、非病原性大腸菌 (*Escherichia coli*)、腸管出血性大腸菌 (EHEC O157:H7)、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) および芽胞形成性の桿菌 (*Bacillus*) 並びにパエニバチルス (*Paenibacillus*) 種に対する弱酸性塩素酸水 (WACAW) の抗菌活性を生体外で評価した。また、ネコカリシウイルス (FCV) を用いて抗ウイルス活性も調べた。希釈した WACAW (>100 ppm) は、5分以内に非芽胞形成性細菌の数を効果的に減少させた (>4 log₁₀ CFU の減少)。この消毒剤 400 ppm で30分間処理したところ、桿菌 (*Bacillus*) およびパエニバチルス (*Paenibacillus*) の芽胞形成種で 5 log₁₀ CFU 以上の減少を達成したのに対し、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) の同等濃度ではそれぞれ 0.98 および 2.72 log₁₀ CFU の減少にとどまった。この殺菌剤の FCV に対する効果は、NaClO と同等であった。WACAW (400 ppm) に浸漬することで、人工的に汚染させたプロイラーカーカスのカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) および EHEC をそれぞれ 4 および 2.26 log₁₀ CFU 以上減少させることができた。最後に、この消毒剤の抗菌活性は、不織布 (綿 100%) に接触させた場合、少なくとも 28 日間維持されることが示された。本研究では、亜塩素酸の pH 制御がその抗菌活性と安定性を調整すると期待されることを示した。WACAW は、食品加工やヘルスケア業界など、さまざまな場面での応用が期待されている。

キーワード: 亜塩素酸水/弱酸性化/ブロイラーカーカス/布地での安定性

序論

塩素は長年にわたり、飲料水の処理や、食品加工機器や環境表面の殺菌に使用されてきた (Beuchat, 1998; Wei 他, 1985)。塩素系消毒剤は幅広い抗菌活性範囲を示し、細菌の内生孢子や、ポリオウイルスやヒトノロウイルス (HNoV) などのアルコール耐性のある非エンベロープウイルスを不活性化することができる。塩素系除菌剤の中でも、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) は強い酸化力を示し、効率的な抗菌作用と低コストにより、健康管理目的や食品加工現場での除染など、さまざまな場面での殺菌に広く利用されている。臨床現場では、クロストリジウム・ディフィシル (*Clostridium difficile*) の芽胞や HNoV など、他の消毒剤では不活性化が難しい病原体に対して、高濃度 ($\geq 1,000$ ppm) の NaClO を使用することが一般的に推奨されている (Cohen ら, 2013; MacCannell ら, 2011)。

現在、NaClO は、体液の流出や環境表面を介した感染病原体の相互感染を防ぐための公衆衛生用途の主要な消毒剤の一つである。しかし、NaClO の抗菌活性は、処理液の pH に大きく影響されることが知られており、有機物と接触すると急速に低下する可能性がある (Wei ら, 1985)。いくつかの研究では、種子や生鮮食品などの商品に NaClO を適用した場合、効率が比較的悪いことが示唆されている (Beuchat ら, 2004; Nthenge ら, 2007)。さらに、高濃度の NaClO (例えば 10,000 ppm) は、体液の流出物、特に血液中の微生物の数を減らすには不十分であると報告されている (Chitnis ら, 2004; Coates, 1988)。NaClO に関するもう 1 つの懸念は、有機物との反応に起因する発がん性物質の生成に関するいくつかの報告があることである (Richardson, 1998a; Richardson, 1998b)。そのため、生体物質が豊富な環境を殺菌するために、有機物に比較的耐性のある代替の塩素系殺菌剤の開発が望まれている。

亜塩素酸ナトリウム (NaClO₂) をベースにした別の形態の塩素も、食品や環境表面の殺菌に適用されてきた。この消毒剤「酸性亜塩素酸ナトリウム」(ASC; エコラボ社 (Ecolab Inc.)、ミネソタ州、米国) は、アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration) により、鶏肉、赤身肉、魚介類、生の農産物への使用が承認されている (匿名, 1998; 連邦公報, 1999)。ASC は幅広いスペクトルの防腐剤 (Castillo ら, 1999; Hajmeer ら, 2004) で、NaClO₂ 溶液をクエン酸やリン酸塩など一般的に安全性が認められている有機酸と混ぜることで簡単に調製できる。NaClO₂ 単独では、中性またはアルカリ性条件では弱い抗菌活性しか示さないが、強い酸性化により抗菌性亜塩素酸塩 (HClO₂) が生成される (Kobayashi ら, 1989)。HClO₂ は、溶液中でのみ見られる強い酸化力を持つ酸で、細菌の細胞壁に浸透してタンパク質合成を阻害することができると考えられている。ASC

では、 HClO_2 は酸性条件下で亜塩素酸イオンが酸の形に変換されて生成されると考えられているが、強酸性の pH 下では、 HClO_2 は急速に二酸化塩素 ClO_2 に変換される (Gordon ら, 1972)。したがって、ASC の抗菌性は主に ClO_2 に起因していそうである。ASC は強力で即効性のある消毒剤であるが、短命な防腐剤であるため、使用時に準備する必要がある。

2013 年、日本の厚生労働省は亜塩素酸水を食品添加物として認可した。この認可を受けて、亜塩素酸塩系の消毒剤が開発され、販売された。この消毒剤は、主な抗菌成分として亜塩素酸水を含み、リン酸塩とクエン酸塩で弱酸性 (pH6.0) に緩衝されている。ASC とは異なり、弱酸性条件の周辺での pH コントロールにより、 ClO_2 生成量を減少させ、 HClO_2 レベルを長期間安定させることができると考えられる。本研究では、この弱酸性化塩素酸水 (WACAW) の抗菌効果と有機物との接触における安定性を評価した。この結果は、WACAW が健康管理および食品加工用途の環境衛生に適していることを示している。

材料と方法

微生物および培養条件

本研究で使用した細菌株は、*Staphylococcus aureus* IFO12732、*Escherichia coli* IFO3927、腸管出血性大腸菌 (*enterohemorrhagic E. coli*) (EHEC) O157:H7 堺株および *Campylobacter jejuni* JCM2013 である。代表的な酵母菌株としてカンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) NBRC1594 を使用した。脳心臓浸出物 (BHI、栄研化学株式会社、東京、黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*)、*C. jejuni* および *C. albicans* の場合) または LB 培地 (LB、*E. coli* の場合) で、これらの細菌株を 37°C で一晩液体培養したものを遠心分離し、生理食塩水で洗浄し、最後に生理食塩水に懸濁して、 $10^7 \sim 10^8$ コロニー形成単位 (CFU) / ml を生成する細胞数にした。これらの懸濁液を試験消毒剤の抗菌活性を評価するための接種材料として使用した。

香川大学の動物施設の汚染されたビニール製アイソレーターから分離された芽胞形成性のバチルス (*Bacillus*) とパエニバチルス (*Paenibacillus*) (それぞれ KU1 株と KU2 株) の 2 種もまた含まれている。それらはそれぞれの 16S rDNA 配列を解析することにより、属レベルで同定された。芽胞接種材料は、バチルス (*Bacillus*) およびパエニバチルス (*Paenibacillus*) 分離株を LB 寒天プレート上で数日間培養し、得られたコロニーを滅菌ループで採取して生理食塩水に懸濁することによって調製した。芽胞形成能力はマラカイトグリーンで染色することにより確認した。次に、懸濁液を遠心分離し、ペレットを生理食塩水で 2 回洗浄した後、芽胞が 10^7 CFU/ml になるよう懸濁して芽胞接種材料として使用した。

ネコカリシウイルス (FCV) F4 株およびクランデルリースネコ腎臓 (CRFK) 細胞株

は、片山博士（国立感染症研究所）からの寄贈品である。90mm ディッシュに 5%ウシ胎児血清（FBS）を添加した最小必須培地（MEM）で培養したコンフルエントな CRFK 細胞単層膜に、ほとんどの細胞がプレートから剥離するまで FCV を感染させた。収集した培養培地を遠心分離して細胞破片を除去し、上清をアリコートに分けて、ウイルス接種物として使用するまで-80°Cで保存した。

試験試薬の調製

次亜塩素酸ナトリウム溶液（NaClO₂ ; 6%）は、南海化学株式会社（大阪、日本）から購入した。WACAW の試験溶液は、オウトロックスーパー[®]（HClO₂として > 1.0%、本部三慶株式会社、大阪、日本）を脱イオン水で希釈して調製した。この消毒剤の塩素レベルは、ヨウ素滴定に基づく前述の方法を使用して、NaClO₂として測定された（Ingram ら, 2004）。殺菌剤の原液は 4°Cの暗所で保管した。試験試薬は試験直前に希釈した。

生体外殺菌試験

各細菌または酵母の-80°Cに保たれたグリセロールストックを、BHI または LB（大腸菌の場合）寒天プレートに接種した。各菌株の単一コロニーを、BHI または LB（大腸菌の場合）ブロスで 37°Cで一晩培養した。その後、培養培地を遠心分離し、生理食塩水で 1 回洗浄した後、生理食塩水に再懸濁し、細胞密度を 10⁷~10⁸ CFU/mL にした。各細胞懸濁液（1 mL）を 8 mL の蒸留水、1 mL の 10×消毒剤または蒸留水（コントロール）と混合し、25°Cでインキュベートした。各混合物の 1ml を定期的にサンプリングし、中和のために 9mL の 0.5M チオ硫酸ナトリウム溶液に移した。中和されたサンプルは、適切な量の生理食塩水でさらに希釈された。各希釈液の 1ml を直径 90mm の滅菌プラスチックディッシュに移し、20~25mL の滅菌培地 [大腸菌はデソキシコール酸塩寒天（日水製薬株式会社、東京）、黄色ブドウ球菌はマンニトール塩寒天（日水製薬株式会社）、*C.albicans*、*Paenibacillus*、*Bacillus* 属は BHI（栄研化学株式会社）] を流し込み、軽く混ぜて固め、37°Cで 48 時間培養し、生存している試験微生物を計数した。

FCV の不活性化に対する WACAW の有効性

FCV に対する試験消毒剤の抗ウイルス活性は、標準的なプラークアッセイによって評価した。ストック FCV のウイルス力価は 2×10⁶ プラーク形成単位（PFU）/mL であった。FCV 溶液（0.5 mL）を 4.0mL の蒸留水および 0.5mL の 10×消毒剤（最終濃度：200 ppm、400 ppm または 1,000 ppm）と混合した。除菌剤の抗ウイルス活性に対する有機物の影響を評価する試験では、ウシ血清アルブミン（和光純薬工業株式会社、東京）を最終濃度 0.05%になるように添加した。これらの混合物を 25°Cのウォーターバスでインキュベートした。定期的（処理後 5 分および 10 分）に試料（0.3mL）を採取し、2.7mL の 0.5M チオ硫酸ナトリウムで中和した。中和した溶液（各 0.5mL）を CRFK の

コンフルエントな培養単層 [MEM+5%FBS、100U/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む 6 ウェルプレートで培養し、処理前にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄したもの] に注ぎ、室温で 1 時間揺らした。ウイルス溶液を除去した後、細胞を MEM 中の 0.5%メチルセルロースと 0.5%FBS で覆った。処理した細胞は、5%CO₂ 雰囲気下、37°Cの CO₂ インキュベーターで培養した。20~24 時間後、細胞を固定し、10%ホルムアルデヒド溶液中の 0.05%クリスタルバイオレットで 4 時間染色した。その後、細胞を水道水で激しく洗浄した。透明なプラークを数え、生き残った FCV の PFU/mL を計算した。

ブロイラーカーカスの表面から食品由来の病原菌を除去する効果

ブロイラーカーカスは香川県高松市の地元の市場から購入した。ブロイラーカーカス (100~200g) をストマッカー袋に入れ、EHEC O157:H7 (10⁸ CFU/mL) 菌懸濁液または *C. jejuni* (10⁸ CFU/mL) 菌懸濁液を 3ml 均一に噴霧した。クリーンベンチで乾燥させた後、カーカスを 10 容量 (v/w) の消毒剤 (100、200、300 または 400 ppm) に 30 分間浸漬し、その後、1,000ml の蒸留脱イオン水に移して試験用消毒剤を除去した。次に、試験片を水から取り出し、ステンレスネット上に置いて残留水分を除去した。サンプル (5~10 g) を 2 箇所からランダムに切り出し、ストマッカーバッグに移し、10 容量(v/w) の生理食塩水を加えた。サンプルは実験用ストマッカー (アズワン株式会社、大阪、日本) で最大速度で 5 分間均質化した。均質化したサンプルを生理食塩水で適切に希釈し、EHEC O157 : H7 の場合はマッコンキー寒天培地 (日水製薬株式会社)、*C. jejuni* の場合は CCDA 寒天培地 (Merck、ドイツ) を使用して生存細菌細胞を数えた。37°Cで 48 時間培養した後、プレート上に増殖した EHEC コロニーを数えた。*C. jejuni* については、ガスパックシステム (三菱ガス化学株式会社、東京) を用いて微好気条件 (5% CO₂) で 42°Cで 48 時間培養した後、菌数を測定した。

不織布での安定性試験

不織布での NaClO と WACAW の安定性を調べるために、これらの消毒剤で湿らせたワイプから回収した溶液の抗菌活性を確認した。不織布 (350g、30cm×40cm、株式会社橋本クロス、滋賀県) を 4 倍量 (v/w) の試験消毒剤 (NaClO および WACAW それぞれ 1,000 および 6,000 ppm) で湿らせ、しっかりと密封されたプラスチック容器に保存した。試験溶液を 5 枚のワイプから定期的に (湿らせてから 0、3、7、14、21、28 日目) 絞り出し、回収した消毒剤の殺菌活性を、非病原性大腸菌と黄色ブドウ球菌を用いて上記のように評価した。

統計的分析

定量的な微生物学的測定値は、分析を行う前に log₁₀ に変換した。すべての実験は少

なくとも3回行った。データは、分散分析 (ANOVA) およびテューキーの検定 (StatFlex Ver.6、株式会社アーテック、東京) によって分析され、有意性が評価された。p 値が 0.05 以下の場合は有意とした。

結果

細菌および酵母に対する WACAW の抗菌活性

選択した細菌および酵母に対する殺傷試験の結果を表 1 に示す。テストしたすべての濃度 (50、100 および 400 ppm) の NaClO と 100 ppm 以上の WACAW は、すべての非芽胞形成細菌 (黄色ブドウ球菌 IFO12732、大腸菌 IFO3927 および EHEC O157 : H7 塚) と酵母 (カンジダ・アルビカンス NBRC1594) で 5 分以内に $> 4 \log_{10}$ の減少を達成した。より低い濃度 (50 ppm) では、黄色ブドウ球菌およびカンジダ・アルビカンスに対する WACAW の殺傷活性は、短い接触時間では NaClO の殺傷活性よりも弱いように思われた。芽胞形成菌については、400ppm の NaClO は、30 分間接触後にパエニバチルス種およびバチルス種をそれぞれ 2.72 ± 0.84 および $0.98 \pm 0.36 \log_{10}$ CFU/mL 減少させた (表 2)。対照的に、WACAW は 400 ppm で 30 分間処理した後、パエニバチルス種およびバチルス種で $> 5 \log_{10}$ の減少を達成した。NaClO と比較して、200 ppm を超える WACAW は、30 分間の曝露でパエニバチルスおよびバチルスの芽胞を減少させる優れた能力を示した。

表 1. 細菌および酵母に対する WACAW と NaClO の殺傷活性の比較

処理	減少数 (\log_{10} CFU/mL) *			
	黄色ブドウ球菌	大腸菌	EHECO157 : H7	C. アルビカンス
WACAW				
50 ppm	3.84 ± 0.27^a	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	3.84 ± 0.27^a
100 ppm	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$
200 ppm	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$
NaClO				
50 ppm	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^b$
100 ppm	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^b$
200 ppm	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^a$	$> 4.00^b$

*試験混合物中の各菌株の初期細胞密度は 106CFU/mL であった。減少数は、各処理後の生菌数を脱イオン水処理 (コントロール) 後の生菌数から差し引くことで算出した。同一列内で、平均値±標準偏差の後に異なる文字が続く場合は有意に異なる ($p < 0.05$)。データは \log_{10} CFU/mL として報告されている。

表 2. 芽胞形成細菌に対する WACAW と NaClO の殺傷活性の比較

処理	減少数 (log ₁₀ CFU/mL) *					
	パエニバチルス種			バチルス種		
	5分	10分	30分	5分	10分	30分
NaClO						
100 ppm	0.90±0.23 ^a	1.28±0.64 ^a	1.16±0.64 ^a	0.11±0.10 ^a	0.58±0.14 ^a	0.47±0.43 ^a
200 ppm	0.86±0.16 ^a	1.30±0.71 ^a	2.52±0.58 ^a	0.50±0.46 ^a	0.80±0.20 ^a	1.14±0.12 ^a
400 ppm	2.08±0.31 ^b	2.12±0.19 ^{a,b}	2.72±0.84 ^a	1.05±0.29 ^{a,b}	0.82±0.42 ^a	0.98±0.36 ^a
WACAW						
100 ppm	0.83±0.29 ^a	0.96±0.18 ^a	1.40±0.35 ^a	1.31±0.08 ^b	0.90±0.60 ^a	1.00±0.44 ^a
200 ppm	1.51±0.65 ^a	2.24±0.94 ^{a,b}	4.68±1.00 ^b	1.98±0.84 ^{b,c}	3.01±2.02 ^{a,b}	3.98±1.43 ^b
400 ppm	2.16±0.58 ^b	3.75±1.71 ^b	5.26±0.00 ^b	2.85±0.27 ^c	4.56±1.35 ^b	5.41±0.00 ^b

*試験混合物中の各孢子形成単離株の初期細胞密度は 10⁶CFU/mL であった。減少数は、各処理後の生菌数を脱イオン水処理（コントロール）後の生菌数から差し引くことで算出した。同一列内で、平均値±標準偏差の後に異なる文字が続く場合は有意に異なる（p < 0.05）。データは log₁₀CFU/mL として報告されている。

表 3. ネコカリシウイルスに対する WACAW と NaClO の殺傷活性の比較

処理	減少数 (log ₁₀ CFU/mL) *			
	BSA (-)		BSA (+)	
	5分	10分	5分	10分
WACAW				
200 ppm	3.16±0.36 ^a	3.14±0.36 ^a	0.82±0.12 ^a	2.20±0.49 ^a
400 ppm	> 4.00 ^b	> 4.00 ^b	2.95±0.38 ^{b,c}	3.04±0.57 ^{a,b}
1,000 ppm	> 4.00 ^b	> 4.00 ^b	> 4.00 ^{c,d}	> 4.00 ^b
NaClO				
200 ppm	> 4.00 ^b	> 4.00 ^b	1.49±0.71 ^{a,e}	0.43±0.45 ^c
400 ppm	> 4.00 ^b	> 4.00 ^b	2.55±0.60 ^{b,e}	2.91±0.41 ^a
1,000 ppm	> 4.00 ^b	> 4.00 ^b	> 4.00 ^{c,d}	> 4.00 ^b

*試験混合物の初期 FCV 数は 2×10⁵PFU / mL であった。減少数は、各処理後のプラーク数を脱イオン水処理（コントロール）後のプラーク数から差し引くことで算出した。同一列内で、平均値±標準偏差の後に異なる文字が続く場合は有意に異なる（p < 0.05）。データは log₁₀CFU/mL として報告されている。BSA (-) および BSA (+) は、最終濃度の試験混合物に、それぞれ 0.05% ウシ血清アルブミンを含まない場合と含む場合の試験を示す。

WACAW の抗ウイルス活性

生体外での HNoV 不活性化に対する WACAW の有効性を評価するために、HNoV サロゲートである FCV に対するこの消毒剤の抗ウイルス活性を標準的なプラークアッセイを用いて調査した。また、有機物が試験消毒剤の抗ウイルス活性に及ぼす影響を調べるために、0.05%のウシ血清アルブミン (BSA) を含む試験液も用意した。表 3 に示すように、WACAW は BSA の非存在下で、試験したすべての濃度 (200、400 および 1,000 ppm) で $> 3 \log_{10}$ PFU/mL 以上の減少を達成した。BSA は NaClO と WACAW の両方の抗ウイルス効果に影響を及ぼしたが、これらの消毒剤は、1,000 ppm の濃度を適用した場合、BSA の存在下でも FCV 数を十分に減少させた ($> 4 \log_{10}$ PFU/mL)。全体として、FCV に対する NaClO と WACAW の抗ウイルス活性は同様であった。

ブロイラーカーカス中の食品媒介病原体に対する WACAW の有効性

次に、食品表面の除染に対する WACAW の有効性を調べた。*C. jejuni* または EHEC O157:H7 に人為的に汚染させたブロイラーカーカスを WACAW または NaClO に 30 分間浸漬した後、これらの食中毒菌の残存数を測定した。表 4 に示すように、WACAW は 300 ppm および 400 ppm の濃度で *C. jejuni* の $3 > \log_{10}$ CFU/mL の減少を達成した。EHEC O157:H7 については、200~400 ppm の WACAW で $> 2 \log_{10}$ CFU/mL の減少が得られた。対照的に、400 ppm NaClO は、両病原体について $< 1 \log_{10}$ CFU/mL の減少であった (*C. jejuni* では 0.81 ± 0.26 、EHEC O157:H7 では 0.91 ± 0.08)。これらのデータは、WACAW は十分な接触時間があれば、食品除染目的の効果的な消毒剤であることを示している。

表 4. ブロイラーカーカスからカンピロバクターまたは EHEC O157:H7 を除去する WACAW の有効性

処理	減少数 (\log_{10} CFU/mL) *	
	<i>C. jejuni</i>	EHECO157:H7
WACAW		
100 ppm	1.42 ± 0.06^a	1.18 ± 0.49^a
200 ppm	2.66 ± 0.01^b	2.13 ± 0.08^b
300 ppm	3.77 ± 0.34^c	2.13 ± 0.08^b
400 ppm	3.98 ± 0.68^c	2.33 ± 0.17^b
NaClO		
400 ppm	0.81 ± 0.26^d	0.91 ± 0.08^a

*ブロイラーカーカス 100~200 g に、*C. jejuni* JCM2013 または EHEC O157:H7 塚の細菌懸濁液 3 ml (各 10^8 CFU/mL) を

均一に噴霧した。乾燥後、カーカス片を指示された濃度の WACAW または NaClO に 30 分間浸漬した。蒸留水 1,000mL に浸して洗浄した後、5~10g のサンプルを切り出して均質化した。生き残った菌は、平板培養法によって数えた。同一列内で、平均値±標準偏差の後に異なる文字が続く場合は有意に異なる (p < 0.05)。データは log₁₀CFU/mL として報告されている。

表 5. 布地上での WACAW の安定性

処理	減少数 (log ₁₀ CFU/mL) *			
	BSA (-)		BSA (+)	
	5 分	10 分	5 分	10 分
NaClO (1,000 ppm)				
0	7.18±0.00 ^{a,b}	7.18±0.00 ^a	6.98±0.00 ^a	6.99±0.10 ^a
1	6.79±0.00 ^{a,b}	6.79±0.00 ^b	6.32±0.00 ^{a,b}	6.14±0.00 ^b
3	6.58±0.32 ^b	6.47±0.00 ^c	6.47±0.00 ^{a,b}	6.47±0.00 ^{a,b}
7	0.00±0.09 ^d	0.42±0.16 ^f	0.23±0.08 ^{d,e}	0.14±0.19 ^d
14	0.05±0.08 ^d	0.06±0.01 ^g	0.10±0.01 ^{d,e}	0.61±0.11 ^d
21	0.34±0.04 ^d	0.66±0.04 ^{e,f}	0.01±0.05 ^e	0.01±0.03 ^d
28	0.09±0.04 ^d	0.11±0.02 ^g	2.22±0.00 ^c	0.70±1.29 ^{c,d}
WACAW (1,000 ppm)				
0	7.18±0.00 ^{a,b}	7.18±0.00 ^a	6.98±0.00 ^a	6.99±0.00 ^a
1	6.79±0.00 ^{a,b}	6.79±0.00 ^b	6.32±0.00 ^{a,b}	5.98±0.28 ^b
3	6.69±0.45 ^{a,b}	6.47±0.00 ^c	6.47±0.00 ^{a,b}	6.47±0.00 ^{a,b}
7	5.67±0.00 ^c	6.67±0.00 ^{b,c}	6.52±0.00 ^{a,b}	6.53±0.00 ^{a,b}
14	0.31±0.03 ^d	0.60±0.08 ^{e,f}	0.04±0.04 ^{d,e}	0.49±0.06 ^d
21	0.00±0.15 ^d	0.25±0.13 ^{f,g}	0.00±0.05 ^e	0.12±0.20 ^d
28	0.12±0.01 ^d	0.11±0.02 ^g	0.81±1.23 ^d	0.00±0.02 ^d
NaClO (6,000 ppm)				
0	5.92±0.70 ^{b,c}	6.71±0.70 ^{b,c}	5.95±0.00 ^b	6.05±0.00 ^b
1	5.18±0.72 ^c	5.22±0.22 ^d	6.32±0.00 ^{a,b}	6.14±0.00 ^b
3	6.76±0.00 ^{a,b}	6.83±0.00 ^a	6.52±0.00 ^{a,b}	6.60±0.00 ^{a,b}
7	0.48±0.11 ^d	0.50±0.07 ^e	0.06±0.02 ^c	0.19±0.21 ^d
14	0.00±0.02 ^d	0.00±0.00 ^{f,g}	0.00±0.20 ^c	0.00±0.01 ^d
21	0.36±0.10 ^d	0.39±0.14 ^{f,g}	0.33±0.02 ^c	1.53±0.27 ^c
28	0.00±0.01 ^d	0.04±0.05 ^g	0.26±0.05 ^c	0.31±0.05 ^d

WACAW (6,000 ppm)				
0	6.57±0.28 ^b	6.71±0.00 ^{b,c}	5.95±0.00 ^b	6.05±0.00 ^b
1	6.79±0.00 ^{a,b}	6.79±0.00 ^b	6.32±0.00 ^{a,b}	6.14±0.00 ^b
3	7.34±0.00 ^a	7.34±0.00 ^a	7.10±0.28 ^a	7.13±0.00 ^a
7	7.18±0.00 ^{a,b}	7.28±0.00 ^a	6.98±0.00 ^a	6.99±0.00 ^a
14	7.18±0.00 ^{a,b}	6.77±0.00 ^b	6.52±0.00 ^{a,b}	6.53±0.00 ^{a,b}
21	7.18±0.00 ^{a,b}	6.77±0.00 ^b	6.34±0.00 ^{a,b}	6.30±0.00 ^{a,b}
28	6.51±0.00 ^b	6.51±0.00 ^{b,c}	6.41±0.00 ^{a,b}	6.46±0.00 ^{a,b}

*試験混合物の初期 FCV 数は 2×10^5 PFU / mL であった。同一列内で、平均値±標準偏差の後に異なる文字が続く場合は有意に異なる ($p < 0.05$)。データは \log_{10} CFU/mL として報告されている。

塩素系による環境衛生のための WACAW で湿らせたワイプの可能性

以上のデータから、WACAW は抗菌成分 (HClO_2) を徐々に放出し、有機物と接触しても抗菌作用を維持するようである。この特性を利用して、現在使用されているアルコールワイプと同じように、この殺菌剤をウェットワイプの形で保存できないか評価することとなった。WACAW で湿らせたワイプの医療現場での衛生ツールとしての有効性を評価するため、不織布中に含ませた NaClO 溶液と WACAW の抗菌活性を 28 日間比較した。NaClO と WACAW の総塩素レベルは最初に 1,000 ppm または 6,000 ppm に調整された。1,000 ppm NaClO の総塩素レベルは、ワイプで 3 日間保存した後、50 ppm に減少したが、6,000 ppm WACAW の総塩素レベルは 28 日間 6,000 ppm で維持された (データは示していない)。これに符合して、1,000 ppm および 6,000 ppm の NaClO は、調製後 7 日間で抗菌性を完全に失った (表 5)。一方、1,000 ppm の WACAW は、調製後 7 日まで大腸菌と黄色ブドウ球菌で $> 5 \log_{10}$ CFU の減少を示した。6,000 ppm WACAW の場合、黄色ブドウ球菌および大腸菌に対する殺菌活性は、布地で少なくとも 28 日間維持された。6,000 ppm の WACAW で湿らせた布地から回収された溶液は、全て大腸菌を 5 分以内に検出限界以下に減らし、黄色ブドウ球菌の十分な減少を達成した (5 分以内に 5.95 ~ 7.10 \log_{10} CFU の減少、10 分間の曝露で検出限界以下)。これらのデータは、WACAW が NaClO よりも布地で安定していることを示している。

議論

院内感染や食品由来の病原体の感染発生リスクを減らすためには、消毒剤を適切に選択することが非常に重要である。塩素は強力な酸化剤であり、高濃度で使用すると幅広い抗菌スペクトルと殺芽胞活性を示す。そのため、病院や食品加工施設の環境表面の微生物負荷を低減するためには、一般的に塩素系消毒剤が推奨されている。NaClO ($> 1,000$ ppm) は、医療

現場において、芽胞 (*C. difficile* など) や非エンベロープウイルス (HNoV など) を不活性化するための主要な消毒剤として使用されているが、これらのウイルスは、汚染された環境表面に接触した後に人に感染してアウトブレイクを引き起こすことがよくある (Cohen ら, 2013 年、Doultree ら, 1999 年、Duizer ら, 2004 年、Girard ら, 2010 年、Park ら, 2007 年)。

亜塩素酸ナトリウム (NaClO_2) も酸化剤であるが、 NaClO に比べて抗菌活性は弱い (Kobayashi ら, 1989)。しかし、ASC と呼ばれるその強酸性形態 (pH2.3~2.9) は、迅速かつ強力な抗菌活性を示し、この化合物は、さまざまな種類の農産物や食肉の衛生管理に適用されている (Olaimat and Holley, 2012)。800 ppm の ASC を使用した場合、アルファルファ種子に付着したサルモネラ菌を $4.0 \log_{10} \text{CFU/g}$ 減少させることができたことが報告されており、これは 20,000 ppm の $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ を使用した場合よりも $1.2 \log_{10}$ 単位高い値であった (Liao, 2009)。このように、pH 制御は NaClO_2 の抗菌活性を高めるための一つの戦略である。 NaClO_2 溶液を酸性化すると亜塩素酸 (HClO_2) が生成され、この酸が細菌の膜を透過して細胞内のタンパク質の機能に影響を与えることで殺菌効果を発揮する (Kemp ら, 2000)。ただし、 HClO_2 は ASC と同様に強酸性条件下で二酸化塩素 (ClO_2) に速やかに変換されるため (Gordon ら, 1972)、 ClO_2 は ASC で観察された強い抗菌活性の主成分であると考えられる。 ClO_2 は空气中に放出されやすいため、ASC の抗菌性は調製後比較的早く低下する。そのため、ASC は使用直前に NaClO_2 溶液とクエン酸塩、リン酸塩、乳酸塩などの「一般に安全と認められた (GRAS)」有機酸を混合して調製する必要がある。

最近、Germin-8-or[®] と呼ばれる安定化したオキシクロロ系消毒剤がスプラウトの衛生管理に有用であることが報告されている (Hora ら, 2007; Kumer ら, 2006)。この NaClO_2 系の消毒剤の pH を 7.2 に調整すると、緑豆の種子に付着したサルモネラ菌を効率的に減少させることができた ($> 4 \log_{10} \text{CFU/g}$) ; 一方、20,000 ppm $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ では限定的な減少 ($1.2 \log_{10}$ の減少) しか得られなかった (Hora ら, 2007)。Germin-8-or[®] は、汚染された細菌を効率的に除去するためには長い処理時間を必要とするようであり、人工的に汚染させた種子の病原菌除去を達成するためには 8~19 時間の処理が必要であると報告されている (Hora ら, 2007)。このように作用が遅いのは、中性の pH では亜塩素酸イオンからの HClO_2 の発生が少ないためと思われる。しかし、これまでに「弱酸性」の亜塩素酸溶液の抗菌活性や安定性を調べた報告はほとんどない。

本研究では、近年日本で発売された新規の塩素酸系消毒剤 WACAW (オウトウロックスーパー[®]、本部三慶株式会社、大阪) の抗菌活性と安定性を評価した。これは、ASC や Germin-8-or[®] のように、有機物が多い環境での抗菌活性や安定性を高めることを目的に pH を弱酸性領域 (pH6.0) に調整した初の市販塩素酸系消毒剤である。WACAW の生体外抗菌試験では、細菌性病原体、酵母、バチルス属芽胞の不活性化において、 NaClO と同等またはそれ以上の効果が認められた。また、この消毒剤を 400 ppm 以上で 5 分間

処理すると、BSA が存在しない場合で FCV の不活性化に効果があった。NaClO や ClO₂ などの塩素系消毒剤は、芽胞のコートタンパク質が除去されていない限り、芽胞の除去には効果がないと以前に報告されている (Young および Setlow, 2003)。現時点では、WACAW が芽胞に有効である理由は不明だが、一つの説明として、HClO₂ が枯草菌に見られるようなジスルフィド結合を多く含む芽胞のコートタンパク質と優先的に反応して芽胞のコートを不安定にし、酸の芽胞への浸透を促進するのではないかと考えられている (Driks, 1999)。

表 3 および表 4 に示した結果から、WACAW は有機物と接触しても NaClO ほど早く抗菌性を失うことはないと考えられ、亜塩素酸塩と次亜塩素酸塩の殺傷メカニズムの違いを示している。この消毒剤の食品表面の除染への適用性を評価するために、*C. jejuni* または EHEC O157:H7 に人為的に汚染させたブロイラーカーカス片を用意した。WACAW は、これらのカーカスを 200~400 ppm の本消毒剤に 25°C で 30 分間浸漬した場合、食中毒菌の減少に有効 (> 2 log₁₀ CFU/mL の減少) であることが示されたが、NaClO は 400 ppm でも効果がなかった。これらの結果は、過去の研究と一致しており、その研究では NaClO が 1~1.3 log₁₀CFU/g しか削減できなかった生鮮コリアンダーにおいて、酸性化した NaClO₂ が EHEC O157:H7 を効果的に削減したことを示していた (Allende ら, 2009)。

脂質膜に対する作用は、NaClO と NaClO₂ とで異なることが以前に報告されているが、NaClO は膜のリン脂質と急速に反応し、求電子攻撃によって大量のクロロヒドリンを生成するのに対し、NaClO₂ はクロロヒドリンを生成せず、代わりに過酸化物を生成し、酸素ラジカルを介して細菌に酸化ストレスを与えることが報告されている (Ingram ら, 2003)。Kumer ら (2007) は、この作用機序は安定化した NaClO₂、Germin-8-or[®] の遅い反応に起因すると彼らの報告で結論付けている。NaClO₂ はグルタチオンと優先的に反応することが知られており、この薬剤の殺微生物活性は、対象となる微生物に存在するジスルフィド結合を多く含むタンパク質の不活性化に由来することが示されている。Kumar ら (2007) はまた、Germin-8-or[®] によってグルタチオン濃度が低下することや、ジスルフィド結合を 2 つ持つアルカリホスファターゼが、ジスルフィド結合を 1 つ持つ他のタンパク質よりも亜塩素酸塩の影響を受けやすいことを示した。Ingram ら (2003) はさらに、黄色ブドウ球菌に対する NaClO₂ の殺菌効果が大腸菌よりも低いことを報告し、黄色ブドウ球菌の相対的な亜塩素酸耐性は、この生物にグルタチオンが存在しないことに起因するとしている。同様に、WACAW は大腸菌よりも黄色ブドウ球菌に対して効果が低かった (表 1)。したがって、WACAW の作用機序は、NaClO₂ や Germin-8-or[®] の作用機序と類似していると考えられる。発芽した種子に付着したサルモネラ菌に対して Germin-8-or[®] が必要とした除去時間は 19 時間であったと報告されている (Hora ら, 2007)。WACAW (pH6.0) と Germin-8-or[®] (pH7.2) の単純な比較は困難であるが、WACAW に見られるような HClO₂ の弱酸性化は、この消毒剤の微生物タンパク質への反応性を

高めることに成功していると思われる。光や高温への暴露、特に有機物質との接触は、塩素の消毒活性を著しく低下させる。したがって、NaClO は病院や介護施設の環境衛生の主要な消毒剤であるが、アルコールと同じようにワイプ内の NaClO の消毒能力を維持することは困難である。消毒剤の開発には、殺菌活性に加えて、安定性や安全性も重要な要素である。この点で、WACAW は布地（綿 100%）上で少なくとも 28 日間殺菌効果を維持することが示されたが、NaClO は急速に抗菌活性を失い、1,000 ppm の NaClO の塩素レベルはわずか 3 日後に 1,000 ppm から 50 ppm に低下した（データは表示されていない）。前述の NaClO と NaClO₂ の作用の違いは、NaClO と WACAW の布地上での安定性の違いに起因していると考えられる。HClO はセルロース繊維の電子密度の高い水酸基を徐々に攻撃する可能性があるが、HClO₂ は比較的反応しないようである。WACAW の布地での安定性は、これまで塩素系消毒剤の布地での不安定さのために困難であった、アルコール系と同様の塩素系消毒ワイプへの応用を可能にするかもしれない。また、汚染された布地やカーペットは、HNoV の感染源となることが報告されている（Dalling, 2004）。汚染された布地の消毒の有効性に関する研究はほとんどないため、将来の研究では、カーテン、タオル、その他の布製品などの布地から HNoV 汚染を排除する上での WACAW の有効性を評価することが重要である。

結論として、本研究では、新規の塩素酸系消毒剤（WACAW）を評価した。この消毒剤は、酵母や芽胞形成細菌を含む広範囲の微生物に対して殺菌作用を示した。WACAW は、ブローラーカーカスや布地（綿 100%）などの有機物が豊富な物体との接触後も効果がある。この特性は、ヘルスケアや食品加工の現場でこの消毒剤使用する価値を証明するであろう。NaClO₂ を強く酸性化すると、殺菌能力は著しく高まるが、安定性が低下するため、抗菌力が急速に失われる。本研究で示された弱酸性化は、HClO₂ の抗菌力と安定性の双方を維持するのに役立つと考えられるが、HClO₂ の利点を最大限に引き出すためには、最適な酸性範囲を正確に決定する必要がある。

謝辞

FCV F4 株および CRFK 細胞をご寄贈いただいた片山博士（国立感染症研究所）に感謝する。また、田中氏の技術協力にも感謝する。本研究は、本部三慶株式会社との共同研究として実施され、同社からの資金援助を受けている。