

次亜塩素酸水溶液の超音波霧化による施設環境の殺菌

福崎 智司

(岡山県工業技術センター)

はじめに

近年、集団食中毒や院内感染の発生、そして新型インフルエンザの流行に見られるような大型感染症の流行が社会問題となっている。施設環境の微生物制御法としては、作業区分を区画化するゾーニングや無菌フィルターを用いた空気の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、塵埃や表面付着菌の飛散が起こるため、遮断技術だけでは空間中の微生物制御は不十分である。また、インフルエンザの主な感染経路は、飛沫感染と接触感染である。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である。これらの対策として、施設環境(設備、機器、空間)に存在する有害微生物ならびにウイルスを安全かつ効果的に不活化する技術の開発が求められている。

固体表面の消毒には、殺菌剤の空中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。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、過酢酸などの液体剤剤のスプレー噴霧が実施されてきたが¹⁻⁴⁾、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のいずれかに短所を有していた。一方、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。

また、殺菌剤溶液の噴霧方法に求められる条件としては、表面を殺菌剤溶液で濡らさない、空気対流を起こさない(微生物を移動させない)、空間環境中へ均一に拡散させる、装置が安価であることが挙げられる。

ここでは、弱酸性のNaOCl水溶液を超音波霧化し、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実験例⁵⁻⁸⁾について紹介する。

1. 超音波による霧化微細粒子の発生原理と粒子径

超音波霧化は、振動子の振動面にある厚さの液体を置き、液体の底部から液面に向けて超音波を照射すると、音としての性質(圧力)の振動が伝搬し、局所的に圧力の増加と減少が繰り返し起こる。その結果、液面では液中表面波(キャピラリー波)やキャピテーション気泡が生成し、噴水の発生と表面張力の低下が起こることにより、液体が微細粒子化されて霧状に浮遊する。この現象を、超音波霧化と呼んでいる。

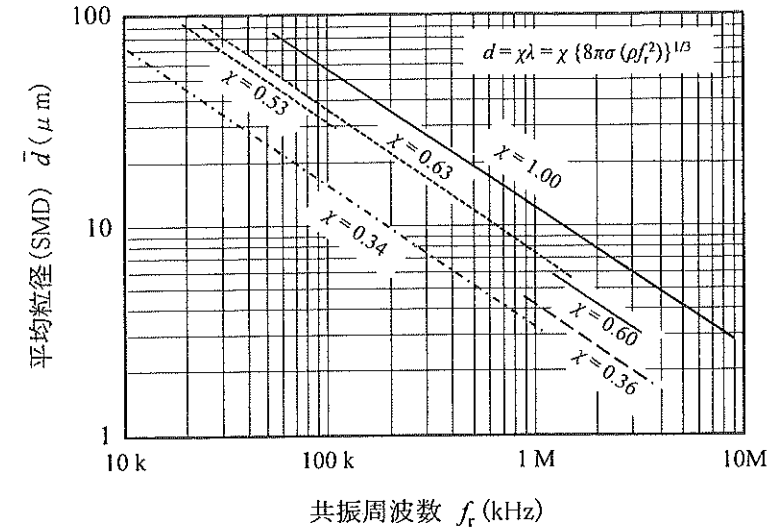


図1. 平均粒径と共振周波数の関係¹⁰⁾

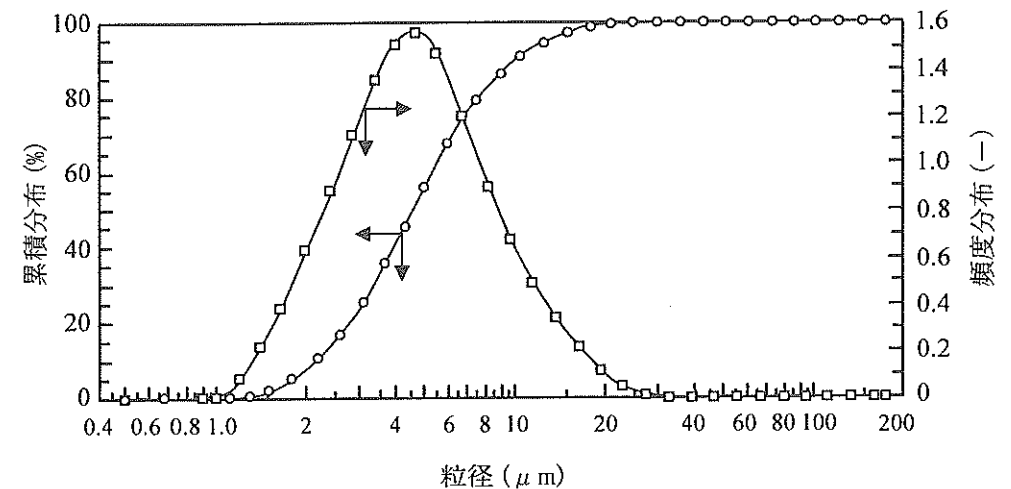


図2. 超音波霧化により発生したNaOCl水溶液の微細粒子の粒径分布⁸⁾
(霧化速度: 2.0 ml/min; 送風量: 0.05 m³/min)

霧化微細粒子のザウター平均粒径(SMD: \bar{d})は、キャピラリー波の波長 λ (cm)に比例すると考えると、次式が成り立つ⁹⁾。

$$\bar{d} = \chi \lambda = \chi \{8\pi\sigma / (\rho f^2)\}^{1/3} \quad (1)$$

ここで、 σ は表面張力(mN/m)、 ρ は液体の密度(g/cm³)、 f は共振周波数(kHz)、 χ は定数である。(1)式から、 \bar{d} は液体の物性値と f の関数であり、霧化する液体が同一であれば、 f が大きくなるほど \bar{d} は小さくなる。

図1に、常温の水を対象とする高周波超音波霧化の実験において得られた超音波振動子の共振周波数(f)とザウター平均粒径(\bar{d})の関係を示す¹⁰⁾。全対数グラフにまとめると、 \bar{d} は f の一次関数として整理することができ、 f を調整することにより、希望する \bar{d} を制御することが可能であることがわかる。

図2は、 f を2.4 MHzに設定した市販の超音波霧化器(CS-P101; 株式会社シージーアイ)から

噴霧された NaOCl 水溶液 (pH 6.5, 50 ppm) の微細粒子の粒径分布を測定した結果である⁸⁾。霧化速度は約 2 ml/min、送風量は 0.05 m³/min である。霧化粒子の粒径分布は、粒径の対数値 (横軸) に対して正規分布でほぼ近似できる形を示している。累積 50% 粒子径 (メディア径) 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ることがわかる。これは、図 1 から読みとれる数値 (約 2~7 μm) とよく一致している。一般に、広い空間に漂う 2~10 μm の微細な粒子は、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殺菌用途に適した粒径といえる。

2. 超音波霧化による液性の変化

液体を微細粒子化すると、水溶液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、蒸発、拡散、溶解などの物質移動の反応速度が促進される。NaOCl 水溶液の霧化噴霧の場合、FAC 成分の飛散と CO₂ の溶解が促進されるため、pH と FAC 濃度が大きく変化する。FAC の変化量は、NaOCl 水溶液の初期設定値と霧化・噴霧条件、移動距離や時間に大きく影響される。著者らの研究では^{7,8)}、pH を 6 および 10 に調整した NaOCl 水溶液の超音波霧化 (f: 2.4 MHz; 2~3 ml/min×0.01~0.05 m³/min) において、FAC の消失率は pH 6 で 25~95%、pH 10 で 10~90% と幅広く変化する。FAC 濃度の消失に関しては、FAC 成分の安定性の序列 (OCl⁻ > HOCl) に従い、電氣的に中性な HOCl が微細粒子から飛散しやすいのに対して、OCl⁻ は微細粒子中に比較的安定に存在する傾向がある。また、pH の変動は、pH 6 で -1.5 ~ +1.0 unit、pH 10 で -0.5 ~ -3.0 unit の範囲にある。pH は、微細粒子への CO₂ の溶解と酸としての次亜塩素酸の消失によって決まると考えられる。

水溶液の微細粒子は、あくまで形態が異なる

「液体」である。したがって、NaOCl 水溶液の殺菌効果は FAC 濃度と pH、すなわち HOCl 濃度に依存することには変わりはない。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、霧化微細粒子の噴霧気流に含まれる HOCl 濃度により殺菌効果が左右される。超音波霧化による HOCl 濃度の変化を予測し、適用する現場に応じた噴霧条件の最適化が必要となる。

3. 大腸菌の殺菌

弱酸性 NaOCl 水溶液の霧化微細粒子の噴霧気流が直接接触する条件であれば、固体表面の微生物に対して効果的な殺菌が行える。たとえば、一定の狭い実験ブース内 (0.1 m³) において、メンブレンフィルター上の大腸菌 (*Escherichia coli*) (10⁴ CFU) に対して、弱酸性 NaOCl 水溶液の FAC 濃度を 20, 50, 80, 200 ppm の範囲 (最終 pH は 6.0 に調整) で種々設定して超音波霧化を行うと、FAC 濃度が 20 ppm であっても 10⁴ CFU オーダーの *E. coli* は 2 分間以上の曝露によりすべて死滅する。

NaOCl 水溶液の霧化微細粒子による大腸菌の死滅挙動は、基本的には水溶液系と同様に (2) 式の疑似一次反応式に従う。

$$\log(N/N_0) = -k C_{\text{FAC}} T \quad (2)$$

ここで、 C_{FAC} は噴霧気流の単位体積あたりに換算した見掛けの FAC 濃度である。たとえば、FAC 濃度 2 ppm に調整した NaOCl 水溶液を霧化速度 3 ml/min、噴霧気流 0.01 m³ で排出したとき、FAC の消失がないと仮定したときの見掛けの C_{FAC} は 0.6 mg FAC/m³ となる。ただし、殺菌効果を正確に解析するためには、気流が殺菌対象物に到達したときの pH 値と FAC 濃度を測定して、殺菌データを整理する必要がある⁷⁾。

(2) 式に従う死滅過程を実験的に再現しようとするならば、弱酸性 NaOCl 水溶液の FAC 濃度を低く設定する必要がある。図 3 に、pH 6.0,

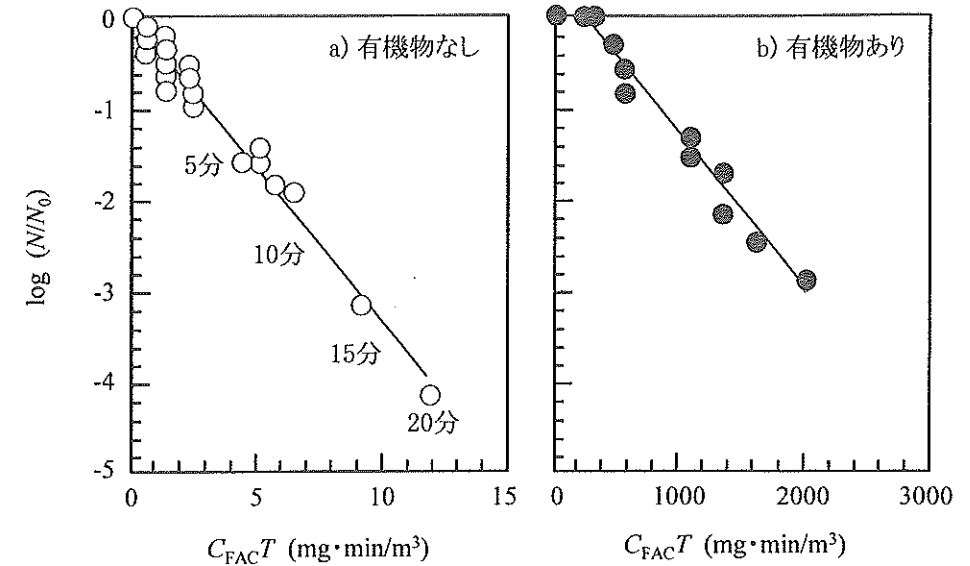


図 3. 弱酸性 NaOCl 水溶液の超音波霧化による固体表面上の大腸菌の殺菌⁷⁾ (C_{FAC} : 霧化気流中の見掛けの FAC 濃度)

FAC 濃度 2~4 ppm に調整した弱酸性 NaOCl 水溶液の超音波霧化 (f: 2.4 MHz; 3 ml/min×0.01 m³/min) による大腸菌の殺菌効果を示す⁷⁾。図の横軸は、噴霧気流中の見掛けの FAC 濃度と曝露時間の濃度時間積 ($C_{\text{FAC}}T$)、縦軸は生残率の対数値である。固体表面に有機物が存在しない表面の場合 (図 3a)、生残率の対数減少は、(2) 式に従って濃度時間積に比例して直線性を示す。生菌数は、9 mg·min/m³ (15 分曝露) で約 3 桁 (3 log) 減少、12 mg·min/m³ (20 分曝露) で約 4 桁 (4 log) 減少している。このように、弱酸性 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、希薄な水溶液の霧化噴霧でも効果的な殺菌が行えることがわかる。殺菌効果は濃度時間積に依存することから、FAC 濃度および噴霧時間を調節することによって、最適な殺菌条件を設定することができる。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微細粒子に変わっても、殺菌活性を発現することが実証されている。

一方、固体表面に次亜塩素酸と反応する有機物が存在する場合、低濃度水溶液 (2~4 ppm) では HOCl が有機物成分と反応して直ちに消失するため、20 分間の曝露では生菌数の変化は全く見られない。清浄な表面で得られる殺菌効果と同等の結果を得るためには、たとえば FAC 濃度を 400 ppm に増加させて霧化殺菌を行う必要がある (図 3b)。図からも分かるように、一定の殺菌効果 (3~4 log) を得るために必要な濃度時間積は、約 200 倍も高くなる。このように、固体表面の霧化殺菌の場合は、噴霧気流が直接接触する固体表面であっても、表面が汚染されていれば期待した効果は得られない。各種洗浄操作により、表面の有機物汚れを十分に除去しておく必要がある。

4. インフルエンザウイルスの不活化

4.1 NaOCl 水溶液による不活化

表 1 に、pH 6 および pH 10 に調整した

表 1. pH 調整 NaOCl 水溶液によるインフルエンザウイルスの不活化と共存有機物の影響¹⁾

水溶液	pH	FAC濃度 (ppm)	ペプトン (ppm)	ウイルス感染価 (\log_{10} PFU/0.1 ml)		
				10秒	30秒	5分
NaOCl	6	50	—	<1	<1	<1
	10	50	—	2.50	<1	<1
蒸留水	6	—	—	5.80	5.66	5.63
NaOCl	6	50	1,000	5.17	5.17	5.00
	10	50	1,000	5.77	5.54	4.69
蒸留水	6	—	1,000	5.72	5.76	5.54

初期ウイルス感染価: $6.82 \log_{10}$ PFU/0.1 ml

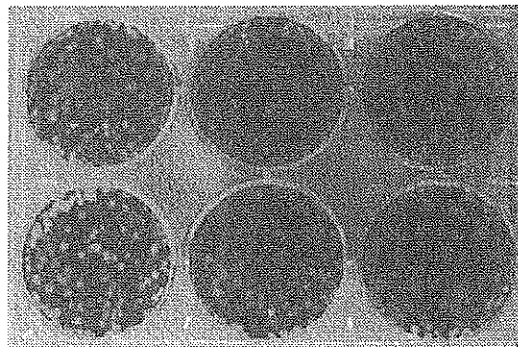


図 4. MDCK細胞へのインフルエンザウイルスの感染を示すブラック¹⁾

NaOCl 水溶液 (50 ppm) 中に A 型インフルエンザウイルス (H1N1) を一定時間浮遊させたときのウイルス感染価の減少を示す⁸⁾。Flu V のウイルス感染価は、イヌ腎臓細胞 (MDCK 細胞) への感染性をブラック形成単位 (Plaque-forming unit: PFU) で評価している (図 4)。pH 6 の場合、感染価はわずか 10 秒間の接触で検出されなくなる ($< 1 \log_{10}$ PFU/0.1 ml)。pH 10 の場合、感染価は 10 秒後では 2.5

\log_{10} PFU/0.1 ml であるが、30 秒後には検出されていない ($< 1 \log_{10}$ PFU/0.1 ml)。一方、蒸留水では 5 分間の接触時間内では感染価の減少は見られていない。

pH 6 の NaOCl 水溶液の方がより強力な不活化力を示したのは、HOCl の有効塩素中の存在比率が大きいためである。電気的に中性である HOCl は、細菌の栄養細胞や芽胞の形質膜を透過し、核酸 (DNA, RNA) や酵素に損傷を与えて不活化する。同様に、HOCl は Flu V の周囲を覆う膜 (エンベロープ) を透過し、RNA や酵素を不活化する。一方、有効塩素のほぼ 100% が OCl⁻として存在する pH 10 の NaOCl 水溶液も、pH 6 の水溶液には劣るものの、優れた不活化効果を持つことがわかる。

次に、上記の不活化実験系において、インフルエンザウイルスと同時にペプトン (最終濃度 1,000 ppm) を各溶液に添加して感染価を測定すると、pH 6 および pH 10 の NaOCl 水溶液は、蒸留水での感染価よりも低いものの、5 分間の接触時間内では顕著な感染価の減少を示さない。これは、FAC (HOCl + OCl⁻) がペプトンと

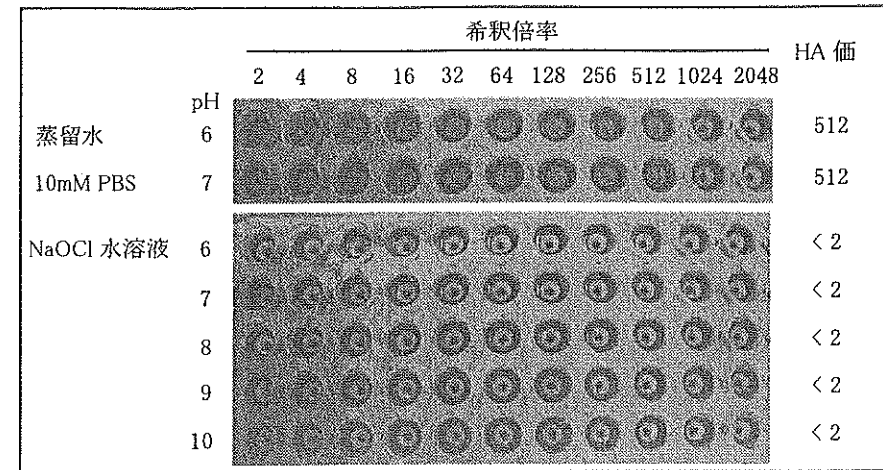


図 5. pH 調整 NaOCl 水溶液処理 (50 ppm, 60 秒) によるインフルエンザウイルスの HA 価の減少¹⁾

の反応に消費されるためである。

4.2 赤血球凝集活性の不活化

インフルエンザウイルスの感染は、ヘマグルチニン (Hemagglutinin; HA) と呼ばれる突起タンパク質が感染細胞の特定部位 (シアル酸) に吸着することによって始まる。この吸着能は、実験的には赤血球に対する凝集能で評価することができ、HA 価 (Hemagglutination activity) と呼ばれる。

図 5 に、pH 調整 NaOCl 水溶液 (50 mg/l)、蒸留水 (pH 6.0) および 10 mM リン酸緩衝 (PBS; pH 7.0) で 60 秒間処理した A 型インフルエンザウイルス (H3N2) の赤血球凝集反応の様子を示す。赤血球がウェル底部に一樣に沈下すると、インフルエンザウイルスが凝集活性を喪失していることを示し、懸濁状態で沈下しないものは凝集活性を維持していることを示す。

蒸留水 (pH 6) および 10 mM PBS (pH 7) で処理した場合、インフルエンザウイルスの凝集能により赤血球が分散した状態を示す最大希釈倍率は一致しており、HA 価は 512 である。一方、pH 6~10 の NaOCl 水溶液で処理したインフルエンザウイルスは、pH に関係なくすべ

ての希釈倍率において凝集能は観察されず、HA 価は < 2 である。すなわち、各水溶液中の HOCl および OCl⁻ が HA の赤血球吸着セグメント (ヘマグルチニン: HA) を酸化分解することで、赤血球表面 (シアル酸) への吸着能を消失させたことを意味する。その結果、ウイルス感染価は大きく低減することになる。

これまでに、次亜塩素酸によるタンパク質の酸化反応について、反応率は pH 8.5~10 の範囲で最大になること¹²⁾、そしてタンパク質分子鎖のアミノ酸残基 (-NH₃⁺) と OCl⁻ の反応が酸化分解の開始に寄与していることが報告されている¹³⁾。このような結果から、エンベロープ表面に突起した HA に対する OCl⁻ の酸化反応が感染価の減少をもたらす原因の一つではないかと推測された。すなわち、弱アルカリ性水溶液 (OCl⁻) は、弱酸性水溶液 (HOCl) とは異なるメカニズムでインフルエンザウイルスを不活化したのではないかと推測される。

4.3 NaOCl 水溶液の超音波霧化による不活化

表 2 に、固体表面上の A 型インフルエンザウイルス (H1N1) に対して pH 6 および 10 に調

表 2. pH 調整 NaOCl 水溶液の超音波霧化によるインフルエンザウイルスの不活化^{*)}

水溶液	pH	FAC濃度 (ppm)	ウイルス感染価 (\log_{10} PFU/0.1 ml)		
			10分	20分	30分
NaOCl	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
蒸留水	6	—	5.21	4.69	4.25

初期ウイルス感染価: $6.38 \log_{10}$ PFU/0.1 ml

整した NaOCl 水溶液 (50 ppm) の超音波霧化粒子 ($f: 2.4 \text{ MHz}; 2 \text{ ml/min} \times 0.05 \text{ m}^3/\text{min}$) を 10~30 分間曝露したときの感染価を示す。霧化噴霧処理していない初期ウイルス感染価は $6.82 \log_{10}$ PFU/0.1 ml である。蒸留水を 10~30 分間霧化した場合、感染価対数減少値は 1.18~2.13 である。一方、NaOCl 水溶液の霧化の場合、pH 6 および 10 とともにすべての系において感染価は検出されておらず、わずか 10 分以内の曝露で感染価対数減少値 5 以上の不活化効果が得られている。NaOCl 水溶液による Flu V 感染価の減少は、水溶液中での処理と同様に、ウイルス内部の RNA や酵素の損傷のみならず、HA の吸着能の消失にも起因すると思われる。

おわりに

弱酸性 NaOCl 水溶液の霧化微細粒子の噴霧気流が直接接触する条件であれば、固体表面の汚染菌に対して効果的な殺菌・不活化処理を行うことができる。NaOCl 水溶液の霧化殺菌法は、殺菌因子である初期 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、種々の施設環境で効果的な微生物制御法の一つになりうると期待される。一方、霧化微細粒子が接触していない箇所での殺菌効果に

関する研究例はほとんど報告されていない。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飛散した HOCl 分子の殺菌作用の有無、さらには飛散 HOCl の金属腐食性についても明らかにする必要があり、今後の研究の進展が期待される。

参考文献

- 1) Bodey, G. P., and Gewertz, B.: *Arch. Environ. Health.*, **19**, 798-805 (1969).
- 2) Masaoka, T., Kubota, Y., Namiuchi, S., Takubo, T., Ueda, T., Shibata, H., Nakamura, H., Yoshitake, J., Yamayoshi, T., Doi, H., and Kamiki, T.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 509-513 (1982).
- 3) McDonnell, G., and Russell, A. D.: *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 147-179 (1999).
- 4) Swartz, S. A., and Perry, S.: *J. Am. Med. Assoc.*, **197**, 623-627 (1966).
- 5) 小野朋子, 三宅真名, 山下光治: 防菌防黴, **34**, 465-469 (2006).
- 6) Park, G. W., Boston, D. M., Kase, J. A., Sampson, M. N., Sobsey, M. D.: *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4463-4468 (2007).

- 7) 浦野博水, 福崎智司: 防菌防黴, **38**, 573-580 (2010).
- 8) Fukuzaki, S., Nakayama, M., and Urano, H.: 防菌防黴, **41**, No. 1 (2010) in press.
- 9) Lang, R. L.: *J. Acoust. Soc. Am.*, **36**, 6-8 (1962).
- 10) 千葉 近: 超音波噴霧, pp. 207- 210, 山海堂 (1990).
- 11) 福崎智司, 中山幹男, 浦野博水: *J. Environ. Control Tech.*, **30**, 91-96 (2012).
- 12) Fukuzaki, S.: Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfecting processes. *Biocontrol Sci.*, **11**, 147-157 (2006).
- 13) Urano, H., and Fukuzaki, S. (2005) The mode of action of sodium hypochlorite in the cleaning process. *Biocontrol Sci.*, **10**, 21-29.

☆☆☆☆☆☆

Journal of Environmental Control Technique

環境管理技術

 **microbe · pestology**

vol.30
no. 6

Z16-1320

雑誌

30(6)=176:2012.12



1 2 0 1 2 0 1 9 1 4 6 8 6

