

【原著論文】

室内空間における霧化次亜塩素酸ナトリウム 水溶液の遊離有効塩素量の測定

浦野 博水^{1*}, 福崎 智司²Measurement of Free Available Chlorine in an Actual Room Space Fogged
by Sodium Hypochlorite SolutionHiromi URANO^{1*} and Satoshi FUKUZAKI²¹Industrial Technology Center of Okayama Prefecture, 5301 Haga, Kita-ku, Okayama 701-1296, Japan²Graduate School of Bioresources, Mie University, 1577 Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Sodium hypochlorite (NaOCl) solution of 50 mg/l was ultrasonically fogged at a rate of 2 ml/min, and fine fog droplets were discharged at a flow rate of 0.05 m³/min in a 107 m³ room space for 60 min. The cumulative amount of free available chlorine (FAC) in the fog settling on the floor was measured as the function of the distance away from the fogger. Prior to fogging, cuvettes containing the fluorescence probe reagent, aminophenyl fluorescein (APF), to detect FAC, and petri dishes containing *Escherichia coli* attached on membrane filters were placed on the floor, respectively, at an interval of 0.5 m from the fogger. Although the floor surface was not made wet by the fogged droplets, FAC settling could be successfully trapped in the APF solution. Within a distance of 5.5 m, the amount of FAC was approximately inversely proportional to the distance. The relative *E. coli* survival increased with the increasing of the distance from the fogger, and it depended on the amount of FAC settling on the floor. These results indicated that APF could be available not only to measure FAC in a room fogged by NaOCl solution, but also to predict the efficacy of the fogging disinfection. (Accepted 8 April 2013)

Key words : Fogging with sodium Hypochlorite (次亜塩素酸ナトリウムの霧化)/Free available chlorine (遊離有効塩素)/Fluorescence probe reagent (蛍光プローブ試薬)/Efficacy of fogging disinfection (霧化殺菌の効果).

緒 言

近年、室内環境中に存在する付着細菌やウイルスの不活化を目的として、次亜塩素酸を含有する水溶液を用いた霧化殺菌の研究が進められている¹⁻⁵⁾。これらの研究では、皮膚や粘膜を刺激することなく⁶⁾高い不活化効果を得るために、電気分解で製造した微酸性次亜塩素酸水や弱酸性にpH調整した次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)水溶液が原液として用いられている。しかし、次亜塩素酸含有水溶液を微細粒子状に霧化した場合、液滴の全表面積が著しく増加し気液接触面積が増加するため、原液のpHや遊離有効塩素(FAC)濃度に顕著な変化が起り、期待した殺菌効果が得られないことがある。著者ら^{2,3)}は、限定空間内(0.1~0.6m³)においてNaOCl水溶液を超音波霧化し、目視可能な霧化粒子の噴霧気流が直接接触する固体表面上でのpHとFAC濃度の変化ならびに殺菌効果を検討した結果、霧化による

殺菌効果は微細粒子が固体表面に到達するときのFAC濃度と時間に依存することを報告した。この場合、固体表面上で微細粒子を液滴として回収することができる系であったため、pHとFAC濃度を測定することが可能であった。一方、実際の室内空間に漂う目視不能な微細粒子が床面に降下する場合の殺菌効果については検討していなかった。また、床面を濡らさない霧化粒子は液滴としての回収は難しいことから、実際に降下した微量のFACを定量的に測定した報告例はない。

次亜塩素酸(HOCl/OCl⁻)を測定する方法の一つに、活性酸素検出用の蛍光プローブ試薬を用いる方法がある。蛍光プローブ試薬は、水溶液中や大気中で発生する活性酸素種の検出に幅広く用いられている。これらの蛍光試薬のうち、Aminophenyl fluorescein (APF)は次亜塩素酸に対して高い反応性を持ち、酸化により生成する蛍光化合物は120分間以上の蛍光安定性を示す試薬である⁷⁾。一方、一般的なFAC測定法であるDPD法は

¹岡山県工業技術センター 〒701-1296 岡山市北区芳賀5301 ☎086-286-9600²三重大学大学院生物資源学研究所 〒514-8507 三重県津市栗真町屋町1577 ☎059-231-9566

FACとの反応後の時間経過(分オーダー)により呈色が変化するため、長時間のFAC累積量を測定することはできない。そこで、APF水溶液を入れた容器を床面の種々の場所に置き、空間中から飛来する微細粒子を捕集して次亜塩素酸と直ちに反応させれば、一定時間内に降下した微量のFAC累積量を測定できる可能性がある。また、微生物付着担体をFAC測定点に置いて生存率を測定すれば、FAC累積量と殺菌効果の関係を求めることができる。

本研究では、APF試薬を用いることにより、実際の室内空間に霧化噴霧したNaOCl水溶液の、床面に降下するFACの累積量の測定を試みた。また、FAC累積量と殺菌効果の関係性を検討した。

実験方法

1. NaOCl水溶液の調製

NaOCl原液は、約6%のFACを含有する試薬(Lot DWF2416; 和光純薬工業(株))を用いた。NaOCl原液は、イオン交換水でFAC濃度50mg/lに希釈して霧化に用いた(pH 8.5)。NaOCl水溶液のFAC濃度は、DPD試薬を用いて測定した⁸⁾。

2. FACの蛍光分析

FACの蛍光分析は、APF試薬(Lot E86606B; 積水メディカル(株))を用いて行った。APF試薬は、*N,N*-dimethylformamide (DMF) 溶液に5mMとなるように2-[6-(4'-amino)henoxy-3H-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acidを溶解させた試薬である。APF試薬は、0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.4)を用いて5 μ Mに希釈した。このAPF希釈溶液1mlをキュベット(10 \times 10 \times 45mm)に入れ、霧化粒子の捕集に用いた。APFは中性水溶液中でほとんど蛍光を示さないが、次亜塩素酸(HOCl/OCl⁻)と反応すると、強蛍光性化合物であるフルオレセインが生成する(Fig. 1)。FAC含有および非含有試料における蛍光強度の増加(ΔF)は、分光蛍光光度計(FP-6500; 日本分光(株))を用いて測定した(励

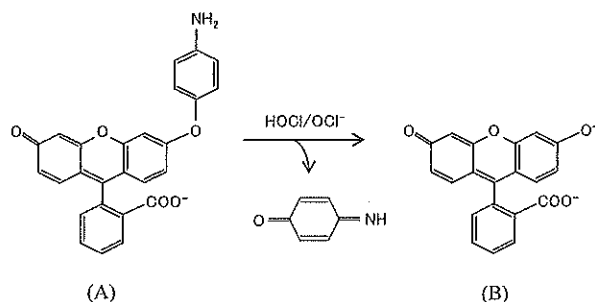


Fig.1. Scheme of conversion of APF (A) to strongly fluorescent fluorescein (B) by HOCl/OCl⁻.

起波長490nm; 蛍光波長515nm)。

FAC濃度(DPD試薬)とAPF蛍光強度の関係(検量線)を求めため、APF希釈溶液1mlを入れたキュベットに0.1mg/lのNaOCl水溶液10~150 μ lを入れ、2分間攪拌した後に蛍光強度を測定した。

3. 供試菌と培養

供試菌として*Escherichia coli* NBRC3972を用い、LB培地(pH 7.0)を用いて37 $^{\circ}$ Cで培養した²⁾。*E. coli*の生菌数は、寒天平板培養法において形成されたコロニー数(Colony Forming Unit: CFU)から算出した²⁾。試験用菌原液中の生菌数は、 1.0×10^9 CFU/mlであった。

4. 固体表面付着*E. coli*の調製

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))を用いた。試験用菌原液を試験管内で適宜希釈して、メンブレンフィルター上に $10^2 \sim 10^5$ CFU/filterとなるように吸引ろ過させながら均一に捕集させた。生理食塩水4mlの吸引ろ過により菌体をすすいだ後、このフィルターを22 $^{\circ}$ C、相対湿度39%で1分間風乾させることにより余剰の水を除去した²⁾。霧化による不殺菌試験では、乾燥による*E. coli*の死滅を防ぐため、生理食塩水で調製した寒天を入れたシャーレ上に載せて試験に供した。

5. 霧化実験

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2.4mHz、霧化速度は2.0ml/min、送風量は0.05m³/minに設定した。霧化器の噴霧口は、床から高さ430mmの位置にあり、霧化粒子は垂直面から15 $^{\circ}$ の傾斜をもって上方に向けて噴霧される構

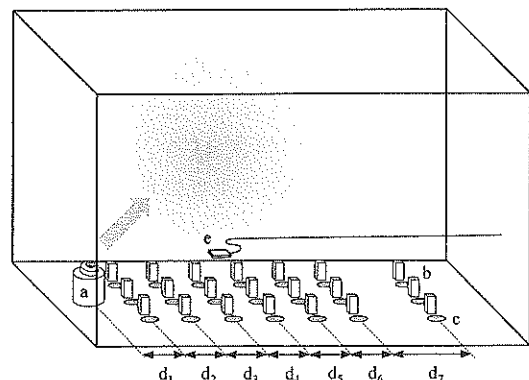


Fig.2. Locations of the fogger, cuvettes containing APF solution, and *E. coli*-attached membrane filters in the fogging experiment room (107m³). a, fogger; b, cuvette; c, membrane filters; d₁-d₆, 0.5m; d₇, 2.5m; e, hygro-thermometer.

造となっている。

Fig. 2に、霧化実験に使用した会議室内(107m³)における霧化器と測定点の配置を示す。室内は、扉と窓を閉めて室内灯と空調を切り、ブラインドで遮光した。霧化器は、壁際の中央部の床面に設置し、APF希釈溶液を入れたキュベットおよび*E. coli*付着フィルターは、霧化器からの直線距離で0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 5.5mの位置に各々3個ずつ置いた。また、床面近くの温度と相対湿度を測定するため、噴霧器から2mの位置に温湿度計(おんどとり Jr. RTR-53A; ㈱ティアドデイ)を設置した。NaOCl水溶液(FAC: 50mg/l, pH8.5)の霧化噴霧は、室内中央に向けて60分間行った。60分間の噴霧後、キュベットを回収して内容液を2分間攪拌した後、蛍光強度を測定した。また、フィルターは、直ちに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㈱)の上に乗せ換え、シャーレ内に移して培養(37℃, 48時間)し、形成されたコロニー数から生菌数(*N*)を計測した。生残率は、生菌数*N*を霧化処理前の初発菌数(*N*₀)で除して算出した。霧化実験は3回実施し、各々のデータの平均値をとった(*n*=9)。

結果および考察

1. 室内空間への霧化噴霧

霧化粒子は、霧化器の噴霧口から高さ約0.5mの位置まで吹き上げられ、その後下降気流となり、床面に到達するまでは目視できない状態になった。60分間の霧化噴霧の間、床面や壁面が霧化粒子で濡れる現象は見られず、いわゆるドライな環境が維持されていた。本実験の霧化条件では、60分間に120mlのNaOCl水溶液が107m³の室内空間に噴霧されたことになる。実験中は、室温は22~25℃、相対湿度は33~35%でほぼ一定に保たれていた。霧化器から噴霧される霧化粒子の累積50%粒子径(メディアン径)は4.7μmときわめて微細であり³⁾、乾燥した室内空間では霧化粒子の蒸発が促進される環境であったと考えられる。

以下の実験では、床面や壁面を濡らさない霧化粒子のFAC量の測定と殺菌効果を検討した。

2. APFによるFACの測定

Fig. 3に、キュベット内のFAC累積量とAPF試薬の蛍光強度の増加(ΔF)の関係を示す。FAC累積量が0~17ngの範囲において、FAC累積量と ΔF の間に良好な直線性が見られた。図中の実線は、一次近似曲線である。

$$\Delta F = 27.8 \times [\text{FAC 累積量}] \quad (R = 0.992) \quad (1)$$

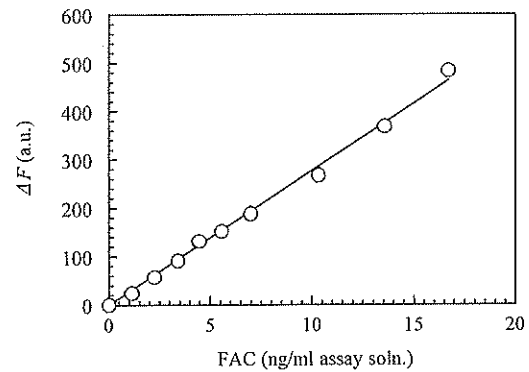


Fig.3. Relationship between the amount of FAC and ΔF . The ΔF was determined at 515nm with excitation at 490nm in 1ml of the APF assay solution.

これは、APF試薬が極微量のFAC累積量に依存して蛍光化合物であるフルオレセインに変換されたことを示している。このことから、NaOCl水溶液の目視できない霧化微細粒子のわずかなFAC累積量も ΔF として検出できる可能性が示された。霧化試験における各測定点のFAC累積量は ΔF から(1)式を利用して算出した。

3. 霧化粒子の降下によるFAC累積量

Fig. 4に、霧化器の噴霧口からの距離と60分間にキュベット(底面積100mm²)内に降下したFAC累積量の関係を示す。FAC量は、噴霧口からもっとも近い0.5mの位置では11.4ngであったが、距離(*d*)が増加するとともに減少し、5.5mの位置では1.1ngであった。図中の実線は、累乗近似曲線である。

$$[\text{FAC 累積量}] = 7.18d^{-0.98} \quad (R = 0.975) \quad (2)$$

この結果から、噴霧口から5.5mまでの距離内において、FAC累積量はおおよそ距離に反比例して減少することがわかった。

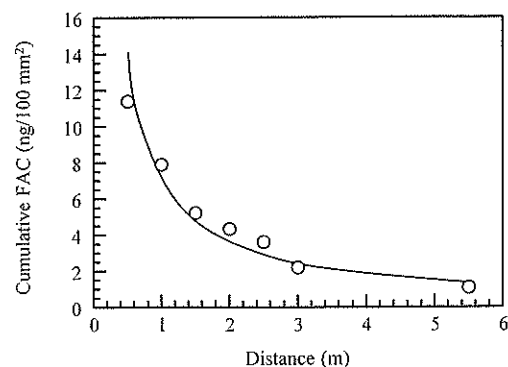


Fig.4. Cumulative amount of FAC in the fog settling on the floor for 60-min fogging with NaOCl solution as a function of distance away from the fogger. The NaOCl solution of 50mg/l (pH8.5) was fogged at a rate of 2ml/min, and discharged at a flow rate of 0.05m³/min in the room space (107m³).

4. *E. coli* の生残率

Fig. 5に、霧化器の噴霧口からの距離と *E. coli* の生残率（対数値）の関係を示す。NaOCl水溶液の霧化により噴霧口から1.0mでは4 log以上の対数減少値が得られたが、1.0~3.0mまでは生残率は距離に対してほぼ直線的に増加した。3.0m以上では生残率の対数減少値は0.1以下でほぼ一定となった。これは、イオン交換水を霧化噴霧した場合と同等であり、殺菌効果はないと判断された。Fig. 4の結果から、2.2ng/100mm²以下のFAC累積量では殺菌効果が見られなかったことになる。

Fig. 6に、各測定距離でのFAC累積量と生残率（対数値）の関係を示す。生残率の対数減少値は、FAC累積量2.2~7.9ng/100mm²の範囲においてFAC累積量に依存してほぼ直線的に増加することがわかった。図中の実線は、この範囲のデータに対する一次近似曲線である。

$$\ln(N/N_0) = -1.51 \times [\text{FAC 累積量}] + 2.64 \quad (R = 0.939) \quad (3)$$

この結果は、*E. coli*に対する殺菌効果がFAC累積量に擬一次反動的に依存していることを明確に示している。また、本実験系では0.5~1.5mの範囲での初発菌数を10⁵CFU/filterに設定したが、7.9ng/100mm²以上の

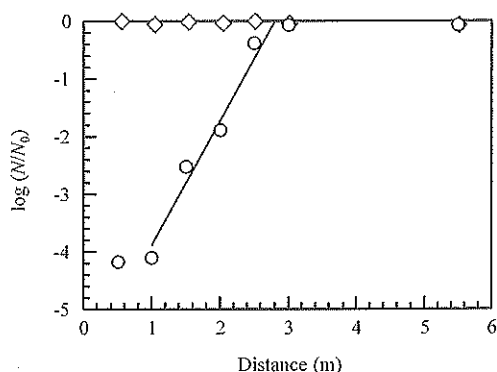


Fig. 5. Logarithmic relative *E. coli* survival as a function of distance away from the fogger. For fogging conditions, see the legend to Fig. 4.

Symbols (the fogging solution) : \diamond , ion exchanged water; \circ , 50 mg/l of NaOCl solution.

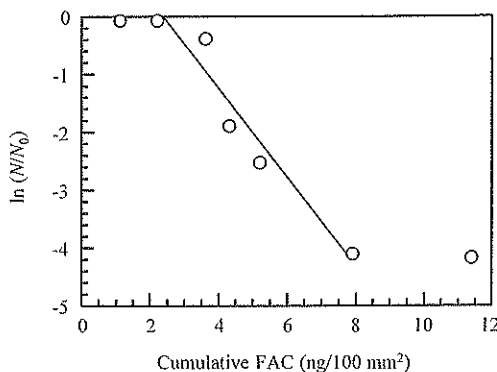


Fig. 6. Relationship between the amount of FAC settling and the logarithmic relative *E. coli* survival. For fogging conditions, see the legend to Fig. 4.

FAC累積量（噴霧口から1m以内）では、FAC累積量に対して初発菌数が少なすぎたために適正なデータが得られず差異が認められなかったものと思われる。

これまでの研究で、NaOCl水溶液の霧化噴霧気流が直接接触する条件では、*E. coli*の生存率は霧化粒子中の非解離型HOCl濃度に依存することがわかっている²⁾。本研究では、APFを用いて次亜塩素酸の解離成分(HOCl/OCl⁻)を区別することなくFACとして検出している。したがって、FAC累積量と生残率の対数減少値に直線関係がある領域（噴霧口から1~3m）では、霧化粒子中のHOClの比率はほぼ一定の状態で降下していたのではないかと考えられる。

本研究の霧化条件では、NaOCl水溶液（50ppm）の霧化器噴霧口から少なくとも3m以内の範囲において、殺菌作用を維持していることが確認された。さらに、APF試薬を用いて、NaOCl水溶液を室内空間に霧化噴霧した場合の床面に降下するFACの累積量について測定し、このFAC累積量に対して大腸菌の生残率が擬一次反動的に減少する相関性があることを確認した。実空間では、温度、湿度、風、光などがFACの到達状況の変動因子となるため、霧化条件（NaOCl水溶液の性状や霧化器の運転条件）の設定のみでは殺菌効果の確保は困難である。以上の結果は、APF試薬を利用して実空間での霧化NaOCl水溶液のFACを測定することにより、測定点での殺菌効果を予測できる可能性を示すものである。

引用文献

- 1) 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, 防菌防霉, 34, 465-469.
- 2) 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, 防菌防霉, 38, 573-580.
- 3) 福崎智司, 中山幹男, 浦野博水 (2013) 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, 防菌防霉, 41, 13-17.
- 4) Clark, J., Barrett, S. P., Rogers, M., and Stapleton, R. (2006) Efficacy of super-oxidized water fogging in environmental decontamination. *J. Hosp. Infect.*, 64: 386-390.
- 5) 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.
- 6) 三宅真名, 那須玄明, 山下光治 (2003) ラットにおける噴霧弱酸性次亜塩素酸水吸入による血液及び生化学値に及ぼす影響, 実験動物と環境, 21, 42-47.
- 7) Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H.J.,

Nagano T. (2003) Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J. Biol. Chem.*, 278, 3170–3175.

8) 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.

日本防菌防黴学会誌

VOL.41

NO.8 2013

Z18-1164

総関

41(8)=474:2013.8



日本防菌防黴学会創立40周年記念事業 第40回年次大会プログラム掲載号

原著論文	室内空間における霧化次亜塩素酸ナトリウム水溶液の遊離有効塩素量の測定 浦野 博水ほか	415
技術論文	殺ウイルス性アルコール系手指消毒剤の有効性評価 松村 玲子ほか	421
ノート	鉄処理陽性荷電炭化物による下水処理施設放流水中のノロウイルス除去に関する研究 高橋 知子ほか	427
解説	フェントン反応ならびにハーバーワイス反応を用いて生成されたOHラジカルに拠る水中の滅菌、殺菌ならびに有機物分解について 新谷 英晴	433
講座	医薬品製造現場から医療現場までの水の微生物管理⑥ 透析の安全性とその舞台裏の脆弱性 大藪 英一	439
講座	医薬品製造現場から医療現場までの水の微生物管理⑧ 透析液供給配管内に形成されるBiofilmの問題と対策 檜村 友隆	447
講座	医薬品製造現場から医療現場までの水の微生物管理⑩ 膜ろ過による制御 一次側と二次側の菌叢の相違 本田 和美	453
講座	医薬品製造現場から医療現場までの水の微生物管理⑪ 透析機器に用いられる洗浄・消毒剤の再考 濱本 統久ほか	459
	Biocontrol Science 掲載論文抄録 (Vol.18, No.2, 2013) 465/ 海外文献抄録 446/ 図書紹介 452・464/ 会員の声-培養- 467/ 会報・新入会員紹介 468/ カレンダー 和文目次裏	

日本防菌防黴学会

The Society for Antibacterial and Antifungal Agents, JAPAN

<http://saaaj.jp/>