

強酸性水と酸性次亜塩素酸水の殺菌効果の比較

大久保耕嗣¹⁻³⁾・浦上 弘³⁾・多村 憲³⁾

Comparison of Bacteriocidal Activities of Acidic Electrolyzed Water and Acidic Sodium Hypochlorite

Koji OKUBO¹⁻³⁾, Hiroshi URAKAMI³⁾ and Akira TAMURA³⁾

¹⁾Department of Pharmacy, Koseiren Murakami General Hospital;

²⁾Chuetsu Research Project Team of Disinfectant;

³⁾Department of Microbiology, Niigata College of Pharmacy, Niigata

要 旨

食塩水の電気分解で調製した強酸性水、および塩酸と次亜塩素酸ナトリウムで調製した酸性次亜塩素酸水の、各種菌株に対する殺菌効果を *in vitro* で比較検討した。強酸性水、酸性次亜塩素酸水ともに 10 秒以内に芽胞を形成する菌以外は死滅させた。また強酸性水または酸性次亜塩素酸水の原液、およびこれを注射用蒸留水で段階的に希釈した両液の殺菌能と pH, ORP, 残留塩素濃度の変化を調べたところ、強酸性水と酸性次亜塩素酸水との間に差異が認められなかった。

また塩酸水に次亜塩素酸ナトリウムを種々の濃度に添加し、残留塩素濃度を段階的に変化させた場合の pH, ORP を測定した。その結果、強酸性水が殺菌作用を示すのに必要な条件として提唱されている pH2.7 以下、ORP+1100 mV 以上という性状は、塩酸と次亜塩素酸ナトリウムで容易に作り出せることがわかった。この酸性次亜塩素酸水は調製が非常に簡単で、調製に必要な費用も強酸性水に比べてきわめて安価であり、今後の利用価値は高いと考えられた。

Key words : 強酸性水, 酸性次亜塩素酸水, 比較検討

序 文

近年、院内感染予防の重要性が再認識され、病院において患者の病室前に消毒剤を設置する等の行為が、保険点数に加算¹⁾することができるようになった。この場合、強酸性水はまだ保険対象の消毒剤とは認められていないが、消毒効果のある機能水²⁻⁶⁾として多くの病院等で手指の消毒、病室や器具の消毒のみならず、手術の際の生体内の洗浄、腹腔内の灌流などに用いられている。強酸性水は、食塩水を電気分解して得られる水素イオン濃度 (pH)2.7 以下、酸化還元電位 (ORP)+1100 mV 以上で、残留塩素 (濃度は製造機種によっても異なるが 10-50 ppm 含有) および溶存酸素等を含むものが消毒効果を現わすといわれている²⁾。そして、その主たる殺菌効果は残留塩素によるものであると考えられている²⁻⁴⁾。

我々は強酸性水の保存性、殺菌効果、褥創治療等の臨

床面への利用の有効性などについて報告してきた⁷⁻⁹⁾。また数種の菌を用いた *in vitro* での殺菌効果を検討した結果、その効果は主に残留塩素であることを確認してきた⁸⁾。しかし、塩酸で酸性にした次亜塩素酸ナトリウム水 (酸性次亜塩素酸水) が強酸性水とほぼ同等の効果を現わすことを見出した⁸⁾。酸性次亜塩素酸水は強酸性水に比べてきわめて簡単に、かつ安価に調製することができるので、この酸性次亜塩素酸水が強酸性水と同様に使用可能であれば、利用価値は高いと考えられる。

そこで今回、強酸性水と酸性次亜塩素酸水の殺菌効果を、より詳細に比較するとともに、酸性次亜塩素酸水の残留塩素濃度の変動と pH, ORP の変化との関係を調べたので報告する。

材料と方法

材 料

1) 強酸性水 : 強酸性水は注射用蒸留水を用いて作成した 0.017 mol/l 塩化ナトリウム水溶液を、サントロン

¹⁾厚生連村上総合病院薬剤部

²⁾新潟県中越消毒剤研究会

³⁾新潟薬科大学微生物学教室

MWB-2(コーシン社製)小型強酸性水生成器を用いて電気分解することにより調製した。得られた強酸性水はpH 2.22, ORP+1152 mV, 残留塩素濃度 11.72 ppm で調製後、直ちに実験に供した。

pH, ORP はカスターニー pH メーター D-13(堀場製作所)を用いて測定した。ORP 電極には同社製 #6861-10C 電極を用いた。残留塩素濃度の測定には当初、水質試験器(オルトトリジン法)(東洋製作所)と高濃度用比色板を使用した。予想される残留塩素濃度の範囲を越える測定値が得られることがあった。そのため今回の実験では、すべてヨウ素滴定法¹⁰⁾により残留塩素濃度を算出した。

2) 酸性次亜塩素酸水：注射用蒸留水 100 ml に、11.6 規定塩酸 [特級試薬(和光純薬)] 35 μ l, 1.1 w/v% 次亜塩素酸ナトリウム(ミルトン; P & G 社製) 125 μ l を添加して調製した。得られた溶液は pH 2.24, ORP+1150 mV, 残留塩素濃度 13.82 ppm であった。

3) 使用菌株と培地：被検菌として *Escherichia coli* ATCC23216, *Staphylococcus aureus* ATCC12600, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145, メチシリン耐性 *Staphylococcus aureus* (MRSA) 当院臨床分離株, *Bacillus subtilis* ATCC6051, *Candida albicans* NCTC8143 を使用した。

C. albicans はサブローブドウ糖液体培地(Sabouraud dextrose broth; Difco)で¹¹⁾ 3日間培養し、他の細菌類はハートインフュージョン液体培地(Heart infusion broth; 栄研)を用いて2日間培養して実験に供した。なお *B. subtilis* は4~5日間培養後、これをPBS (Phosphate buffered saline)中で65°C, 30分間加熱処理した菌体を芽胞浮遊液として使用した。

被検菌液は生理食塩液でMcFarland比濁法のNo. 1濃度に調整した。この被検菌液中の生菌数は、*C. albicans* の場合はサブローブドウ糖寒天培地(和光純薬)、他の菌種の場合はハートインフュージョン寒天培地(栄研KK)を用いて、コロニー計数法^{12,13)}により測定した。

4) 中和剤入り液体培地：強酸性水あるいは酸性次亜塩素酸水に接触後の菌の培養には、これら消毒水の中和剤としてチオ硫酸ナトリウムを終濃度3%になるように添加したSabouraud dextrose broth, あるいはHeart infusion brothを使用した。なお、中和剤を添加した培地中でも、中和剤の入っていない培地と同様に菌は増殖することをあらかじめ確かめた。

実験方法

1) 強酸性水および酸性次亜塩素酸水での処理時間を変えた場合の殺菌効果の比較実験：生理食塩液で調整した各菌液 10 μ l を96穴マルチプレートの各穴に注入し、これに強酸性水、または酸性次亜塩素酸水 200 μ l を加

えて混合した(混合時の温度は22~25°Cの室温)。その混合液から10, 30, 60, 180, 600秒後の各時間に20 μ l を採取して、これを中和剤入りの液体培地 100 μ l に注入し攪拌して反応を停止させた。各使用菌の間に時間差が生じないように菌液の採取には12連のマルチピペットを用いた。これを35°C, 24時間培養(*C. albicans* は25°C, 72時間)後、菌増殖の有無を肉眼で確認した。この実験は2回繰り返し行った。

2) 系列希釈法による被検水の殺菌効果の比較実験：強酸性水、酸性次亜塩素酸水の原液、および注射用蒸留水で2, 4, 8, 16, 32倍に希釈した希釈液 100 μ l を、96穴マルチプレート上の各穴に注入し、これに菌液 10 μ l を加えた。5分間菌液を被検水と室温(22~25°C)で反応させた後、これに中和剤の入った2倍濃度の液体培地 100 μ l を加え反応を停止させた。35°C, 24時間培養し(*C. albicans* は25°C, 72時間)、肉眼で濁度の増加を観察することにより菌の増殖の有無を判定した。この実験も繰り返し2回行った。また系列希釈した直後の各希釈液のpH, ORP, 残留塩素濃度の変化も別途測定した。

3) 添加する次亜塩素酸ナトリウムの濃度変化によるpH, ORP値の変動の測定：注射用蒸留水 100 ml に11.6規定塩酸を加え、pHを強酸性水と同じ2.22に調整後、これに次亜塩素酸ナトリウムを種々の濃度に添加した場合の残留塩素濃度と、その際のpHとORPの変化を測定した。

成績

1. 強酸性水と酸性次亜塩素酸水の有効処理時間の比較

実験に使用した各菌液 10 μ l 中の生菌数を表1に示す。いずれも $3.5\sim 58.8\times 10^5$ CFU/10 μ l の範囲にある。これらの菌液 10 μ l に強酸性水または酸性次亜塩素酸水の原液を200 μ l 添加した。この混合液から10~600秒間に経時的に検液 20 μ l を採取し、チオ硫酸ナトリウムを添加した培地 100 μ l 中に加え培養後、菌の増殖の有無を観察した。結果は表2に示すように、芽胞を形成した *B. subtilis* の場合を除くすべての菌種が、10秒間の被検液との接触により死滅することが判明した。しかしこの方法では強酸性水と酸性次亜塩素酸水との間の殺菌

表1 試験菌 10 μ l 中の菌数

	菌数($\times 10^5$)
<i>E. coli</i> ATCC23216	58.8
<i>S. aureus</i> ATCC12600	11.6
<i>P. aeruginosa</i> ATCC10145	13.5
MRSA(当院分離株)	6.1
<i>B. subtilis</i> ATCC6051	8.2
<i>C. albicans</i> NCTC8143	3.5

表2 強酸性水と酸性次亜塩素酸水の接触時間による効果の比較

	強酸性水(sec)						酸性次亜塩素酸水(sec)					
	10	30	60	180	600	cont	10	30	60	180	600	cont
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
MRSA	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

+ : 菌の増殖を認める
 - : 菌の増殖を認めない
 接触時温度 : 室温
 cont : 注射用蒸留水の場合

表3 強酸性水と酸性次亜塩素酸水の希釈系列による効果の比較

	強酸性水 希釈倍数							酸性次亜塩素酸水 希釈倍数						
	原液	2	4	8	16	32	cont	原液	2	4	8	16	32	cont
<i>E. coli</i>	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
MRSA	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+

+ : 菌の増殖を認める
 - : 菌の増殖を認めない
 接触時間 : 5分間
 接触時温度 : 室温
 cont : 注射用蒸留水の場合

表4 強酸性水と酸性次亜塩素酸水の希釈による性状の変動

	原液	2	4	8	16	32倍	蒸留水
強酸性水 pH	2.22	2.54	2.85	3.12	3.43	3.73	5.26
ORP (mV)	1152	1108	1053	997	944	894	704
残留塩素 (ppm)	11.72	5.68	2.95	N.T.	N.T.	0.37	0.00
酸性次亜塩素酸水 pH	2.24	2.58	2.88	3.19	3.31	3.68	5.47
ORP (mV)	1150	1098	1036	995	943	845	678
残留塩素 (ppm)	13.82	6.76	3.52	N.T.	N.T.	0.42	0.00

測定時温度 : 室温
 N.T. : not tested

効果の強弱を比較することはできなかった。

2. 段階希釈系列法による有効濃度の測定と両消毒水の殺菌効果の比較

次に蒸留水で2倍段階希釈した強酸性水、および酸性次亜塩素酸水 100 μl を各菌液 10 μl に添加し、5分間室温で保持した。これにチオ硫酸ナトリウムの入った培地 100 μl を添加して、培養後の各菌の増殖の有無を観察した。その結果、*E. coli* は2倍希釈まで、*P. aeruginosa*、*C. albicans* は4倍希釈まで殺菌効果を示したが、*S. aureus* とMRSA に対しては原液のみ有効で、2倍希

釈液では殺菌効果を現わさなかった。しかしこの測定値は強酸性水、酸性次亜塩素酸水いずれにおいても全く同じであり、両者の間に差異は認められなかった(表3)。

表4は強酸性水および酸性次亜塩素酸水を蒸留水で2倍段階希釈した場合のpH、ORPおよび残留塩素濃度を比較したものである。両消毒水間にほとんど差はなく、希釈により両者はきわめて類似した変動を示した。強酸性水が殺菌効果を示すのはpH 2.7以下、ORP+1100 mV以上が基準値²⁾とされている。希釈によりこの基準値内の値を示すのは強酸性水の場合は2

倍希釈までで、4倍以上の希釈ではpH, ORPとも基準値をはずれる。酸性次亜塩素酸水は原液ではこの基準値に適合するが、2倍希釈ではORP値が基準値より若干低くなる。しかし表3で*P. aeruginosa*に対しては、強酸性水および酸性次亜塩素酸水いずれも4倍希釈しても殺菌効果を示しているの、菌種によっては4倍希釈程度までは殺菌効果を示すものと思われる。

3. 次亜塩素酸の添加濃度による酸性次亜塩素酸水の性状の変化

上述の実験にはpHを2.22に調整した塩酸水溶液100 mlに、次亜塩素酸ナトリウム(ミルトン)125 μ lを添加した溶液(次亜塩素酸ナトリウムの終濃度0.000185 mol/l)を使用した。これは強酸性水の有効基準値とされるpH 2.7以下, ORP+1100 mV以上, 残留塩素濃度10-50 ppmの範囲に入る溶液を作成することを目的として作成したものである。しかし、添加する次亜塩素酸ナトリウムの濃度を変化させた場合、pH, ORP値がどのように変化するかを調べておくことは、今後の酸性次亜塩素酸水の調製とその殺菌効果の検討、さらには手指の消毒、器具の消毒、あるいは手術時の洗浄などに、濃度を変えて使い分ける際に参考になると考えられる。そこで塩酸でpHを2.22に調整した塩酸水溶液に、種々の濃度に次亜塩素酸ナトリウムを添加してpH, ORPの変動を調べた。結果を表5に示す。

1.1 w/v%次亜塩素酸ナトリウムは11000 ppmに相当するから、その91 μ lを100 mlの蒸留水に添加した場合の濃度は10 ppmと計算される。この時の実際に測定した残留塩素濃度は10.67 ppmで理論値とよく一致し、

ヨウ素法による測定値の正当性が裏付けされた。またこのことは、次亜塩素酸ナトリウムを910 μ lおよび1820 μ lを添加した場合の実測値(理論値はそれぞれ100, 200 ppm)でも確認された。よって455 μ l加えれば強酸性水の有効基準値の上限50 ppmとなることが推測された。ORPについて、次亜塩素酸ナトリウム無添加の場合には+700 mVであったが、1 ppmに相当する次亜塩素酸ナトリウム(9.1 μ l)を添加した場合、+1082 mVと急激に上昇した。しかし添加量を70 ppm(637 μ l)以上に上げてもORPの上昇は微弱であり、大きな変動は見られず、100 ppm(910 μ l)以上の濃度では逆に若干の減少傾向が認められた。pHは次亜塩素酸ナトリウムの添加量とともに少しずつ上昇し、200 ppm(1820 μ l)の次亜塩素酸ナトリウムの添加ではpH 2.98であった。

したがって強酸性水の有効基準濃度(pH 2.7以下, ORP+1100 mV以上, 残留塩素濃度10-50 ppm)を満足する酸性次亜塩素酸水は、pH 2.22水溶液100 mlに1.1 w/v%次亜塩素酸ナトリウム91~455 μ lを添加した場合に得られることが判明した。表2の実験および表3, 4で示した酸性次亜塩素酸水の原液は、100 mlのpH 2.22水溶液に1.1 w/v%次亜塩素酸ナトリウム125 μ lを添加したものであり、上記の有効基準濃度に適合するものである。

考 察

近年、食塩水を電気分解して得られる強酸性水の殺菌効果が知られるようになり、この強酸性水を各種の消毒に用いる試みが多数報告されるようになった。

表5 次亜塩素酸ナトリウム添加量による残留塩素濃度, pH, ORPの変動

pH 2.22塩酸水溶液100 mlへの1.1%NaClO添加量(μ l)	ヨウ素滴定法による残留塩素濃度(ppm)	pH	ORP(mV)
0.0	0.0	2.22	700
9.1	N.T.	2.20	1082
27.3	N.T.	2.23	1117
45.5	N.T.	2.22	1131
63.7	N.T.	2.22	1139
91.0	10.67	2.22	1147
182.0	N.T.	2.23	1156
273.0	N.T.	2.25	1163
455.0	N.T.	2.28	1169
637.0	N.T.	2.34	1171
910.0	95.01	2.45	1170
1001.0	N.T.	2.46	1169
1092.0	N.T.	2.54	1168
1183.0	N.T.	2.55	1168
1365.0	N.T.	2.63	1166
1820.0	193.56	2.98	1155

測定時温度：室温

N.T. : not tested

我々はこの強酸性水の殺菌効果が pH, ORP および残留塩素濃度に関係するという点に着目し、塩酸溶液に次亜塩素酸ナトリウムを溶解して調製した酸性次亜塩素酸水について、その殺菌効果を測定した。その結果、0.004 mol/l 塩酸、0.000185 mol/l 次亜塩素酸ナトリウムの水溶液が、0.017 mol/l 塩化ナトリウム水溶液を電気分解することにより得られた強酸性水と同等の pH 2.24, ORP +1150 mV, 残留塩素濃度 13.82 ppm を示すこと、および強酸性水と比べて、全く同等の殺菌効果を示すことを明らかにした。すなわち各種菌株に対する殺菌効果の比較で、強酸性水、酸性次亜塩素酸水とも、*B. subtilis* の芽胞には全く無効であったが、*E. coli*, *P. aeruginosa* などのグラム陰性菌や、*C. albicans* には原液の 2~4 倍希釈液まで殺菌力が認められ、その殺菌作用はきわめて即効的であった。グラム陽性菌である *S. aureus* (MRSA を含む) に対しては原液でのみ有効であり、グラム陰性菌より多少抵抗性が高いと思われた。これはグラム陽性菌と陰性菌の差によるのか、あるいは *S. aureus* に特徴的なことかについては今後検討する必要がある。この酸性次亜塩素酸水は、滅菌蒸留水に一定量の塩酸と次亜塩素酸ナトリウムを溶解するだけで、非常に簡単に用時に際しいつでも調製できる上、電気分解といった特殊な装置を必要とせず、どこでも、だれでも安価に調製可能であるという特長を有するので、今後の利用価値は大きいものと考えられる。

当院では 1996 年導入当初から強酸性水を生体のみ(褥創処置、生体内灌流、開腹手術の洗浄、アトピー性皮膚炎など)に使用している。褥創処置、アトピー性皮膚炎では、サントロン MWB-2(コーシン社製)小型強酸性水生成器を用い、水道水で調製している。しかし、他の生体内への使用は完全に無菌状態である必要がある。注射用蒸留水を用いて製造した強酸性水を無菌濾過後、高圧蒸気滅菌を行い、開腹手術時の洗浄消毒剤として使用すべきであるという報告¹⁴⁾がある。当院では生体内の洗浄に無菌充填が可能なペーハーキオン®(原沢製薬工業)を使用している。

酸性次亜塩素酸水は、滅菌蒸留水の使用や無菌操作法により容易に無菌的なものが調製できるので、この点も利点の一つと考えられる。しかし人体への応用については、今後安全性等について詳細な検討がなされなければ

ならない。

謝 辞：今回実験に協力いただいた当薬剤部 渡辺貴子氏、ならびに検査科 渡辺直樹氏、実験にご理解いただいた厚生連刈羽郡総合病院薬剤部長 渡辺七朗先生、および *C. albicans* を分与下さった山梨医科大学 宮川洋三先生に感謝します。

文 献

- 1) 厚生省保険局医療課, 厚生省老人保健福祉局老人保健課(監修): 医科点数表の解釈. 東京; 社会保険研究所, 1997, p1158
- 2) 大久保憲, 新太喜治, 小林寛伊, 大々瀬浩史, 奥住捷子, 加見谷将人, 草地信也, 白石 正, 三宅寿美, 矢野久子: 電解酸性水に関する調査報告. 手術医学 15: 508-520, 1994
- 3) 大久保憲, 犬塚和久, 河合浩樹: 電解酸性水の新しい知見. 感染と消毒 2: 66-71, 1995
- 4) 岩沢篤郎, 中村良子: 酸性電解水の殺菌効果と使用法の検討. 環境感染 11; 193-202, 1996
- 5) 鎗田響子, 宇野 潤, 赤尾三太郎: 酸性電解水(アクア酸化水)および市販消毒薬の真菌に対する殺菌効果の比較. 病院薬学 23; 348-357, 1997
- 6) 岩沢篤郎, 中村良子, 水野徳次: 臨床分離株に対するアクア酸化水の効果. 環境感染 8(2); 11-16, 1993
- 7) 南波乾次, 川上宏昭, 内山一史, 大久保耕嗣, 三浦香織: 強酸性水の臨床利用について(第 1 報). 新潟県病院薬剤師会会誌 90: 31-33, 1994
- 8) 南波乾次, 三浦香織, 川上宏昭, 内山一史, 大久保耕嗣: 強酸性水の臨床利用について(第 2 報). 新潟県病院薬剤師会会誌 91: 55-57, 1995
- 9) 岡村正夫, 小名英利, 樋熊金治, 小林和代, 南波乾次: 強酸性水の臨床利用について(第 3 報). 新潟県病院薬剤師会会誌 91: 59-62, 1995
- 10) 日本薬学会(編): 衛生試験法・注解, 東京; 金原出版, 1980, pp839-840
- 11) 宇野 潤: 病原真菌. 宮治 誠, 西村和子, 宇野 潤(編): 同定法と感受性試験. 東京; 広川書店, 1992, pp205-228
- 12) 日本薬学会(編): 衛生試験法・注解, 東京; 金原出版, 1980, pp102-138
- 13) 大西克成: 培地および生化学的検査法. 天児和暢, 南嶋洋一(編): 戸田新細菌学. 東京; 南山堂, 1997, pp955-986
- 14) 星野伸夫, 芝田信人, 山路 昭, 谷 徹, 田畑貴久, 小玉正智: アクア酸化水の滅菌時および保存時における安定性と臨床適用. 日病薬誌 32; 295-298, 1996

〔連絡先: 〒950-0854 新潟県村上市田端町 2-17
厚生連村上総合病院薬剤部 大久保耕嗣〕