

新しいタイプの次亜塩素酸水に関する研究：空間噴霧による殺菌・ファージ不活化効果と安全性、および SARS-CoV-2 不活化効果

*川村尚久、更田宏史、齋藤隆、新開規弘、三橋真、塩山忠雄¹、須藤良庸、谷口昌弘、佐野嘉彦

ニプロ株式会社、¹ヘルスサポートサンリ株式会社

2020.9.1 受付/2020.11.24 受理

キーワード： 次亜塩素酸水、空間噴霧、殺菌効果、ファージ・ウイルス不活化効果、安全性

要旨： 当社で開発した、従来の次亜塩素酸水と比較してイオン濃度と導電率が著しく低い新しいタイプの次亜塩素酸水 (pH6.1、有効塩素濃度 30mg/L または 1,000mg/L、総イオン濃度<25mg/L、導電率<10 μ S/cm) を用いて以下の試験を行った。①25m³ チャンバーでの空間噴霧による浮遊黄色ブドウ球菌と浮遊大腸菌ファージに対する有効性、②ラットに対する 28 日間吸入暴露 (5000mg/m³ 以下の噴霧量) の影響、および③SARS-CoV-2 不活化活性 (次亜塩素酸水と 1 : 19 の比率で混合後、Vero 細胞に対する細胞障害効果)。その結果、①空間浮遊の黄色ブドウ球菌および大腸菌ファージは 99.9% 以上減少し、②ラットに対して吸入暴露による明確な異常は認められなかった。また、③SARS-CoV-2 に対して 99.9% 以上の不活化効果を示した。以上のように、新タイプの次亜塩素酸水の効果と安全性が認められた。

1. 緒言

2020 年 8 月時点での全世界の新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) 感染者数は 2,000 万人、死者数は 70 万人を超え¹⁾、拡大傾向が続いている。新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的大流行の背景には、ウイルスの感染力の高さがある。SARS-CoV-2 は、エアロゾル表面で 3 時間、銅製品上で 4 時間、厚紙上で 24 時間、プラスチックやステンレス上で 3 日間検出されることが報告されている^{2,3)}。また、院内感染による感染拡大も深刻であり、ICU (集中治療室) の床やコンピューターマウス、ゴミ箱、病床の手すり、患者のマスク、手袋などの防護具のあらゆる

サンプル表面から SARS-CoV-2 は検出されている。更に、感染患者の 4m 以内の空間でも検出されており⁴⁾、WHO は大気中の微粒子 (エアロゾル) を介して SARS-CoV-2 が感染拡大している可能性を認めている⁵⁾。

COVID-19 のように治療法が確立されていないウイルス感染症に対しては、予防対策が重要である。既に、消毒用エタノールや次亜塩素酸ナトリウムを用いて物品に対する表面消毒は、標準化されつつある。しかしながら、人体への影響に対する懸念から、これら消毒剤を空間噴霧して使用することは推奨されていない⁶⁾。塩化ナトリウム水を専用生成装置で電解することにより生成する酸性電解水である次亜塩素酸水は、高い安全性に基づき食品添加物殺菌料に指定⁷⁾ されており、広域抗微生物スペクトルと次亜塩素酸ナトリウム溶液の 25 倍とも言われる殺菌活性を有し⁸⁾、SARS-CoV-2 に対しても有効であることが公的に証明されている⁹⁾。こうした中、当社では従来の次亜塩素酸水に比べてイオン濃度と導電率が著しく低い次亜塩素酸水を独自に開発した。本報では、この次亜塩素酸水を用いて、空間浮遊の細菌とファージに対する効果、動物を用いての安全性、SARS-Cov-2 に対する効果について試験した結果について速報する。

2. 実験材料と方法

2.1. 次亜塩素酸水

二隔膜三室型電解水生成装置 (ニプロ社製) を用いて塩化ナトリウム水溶液を電気分解し精製工程を

*kawamura-naohisa@nipro.co.jp 〒344-0057 埼玉県春日部市南栄町 14-1

経ることにより、NaCl 含量 10mg/L 以下（精製前 70～80mg/L）かつ NaCl 以外のイオン総量 15mg/L 以下となるよう製造した。この電解精製水（以後、次亜塩素酸水）は、電解主生成物としてほぼ次亜塩素酸のみを含み、pH は 5.0～6.5、導電率は $<10\mu\text{S}/\text{cm}$ の物性を示す。本研究には、有効塩素濃度 30mg/L または 1,000mg/L のものを作製して用いた。

2.2. 試験方法

2.2.1. 空間浮遊菌およびファージに対する試験

試験は一般財団法人北里環境科学センターで実施した。試験装置は、 25m^3 試験チャンバー（ $2.7\times 3.8\times 2.4\text{m}$ ）を用い、側面に菌液噴霧口と浮遊菌捕集口を設け、菌液噴霧器（Collison nebulizer, CH Technologies）および浮遊菌捕集器具（ガラス製インピンジャー）を接続している。 $10^9\text{CFU}/\text{mL}$ に調製した黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus* NBRC 12732）あるいは $2\times 10^9\text{PFU}/\text{mL}$ に調製した大腸菌（*Escherichia coli*）ファージ MS2（NBRC 102619）をチャンバー内の攪拌ファンを作動させながらチャンバー内に噴霧し、停止後、30mg/L の次亜塩素酸水の噴霧を開始した。浮遊菌およびウイルスの捕集は、次亜塩素酸水噴霧の開始前および開始後、30 分、60 分、120 分、180 分、240 分、300 分に行い、菌数およびファージ数を計測した。比較対照として、滅菌精製水を用いて同様の試験を行った。

2.2.2. ラット反復吸入試験

試験は、OECD GLP 認証施設である Vivotecnia (Spain) において 1,000mg/L の次亜塩素酸水を用いて実施した。Sprague Dawley 系ラット（6～7 週齢）の雌雄各 20 匹を空気吸入群（陰性対照群）、次亜塩素酸水 $500\text{mg}/\text{m}^3$ 吸入群（低用量群、理論空間濃度 $0.4\mu\text{g}/\text{g}$ ）、 $1000\text{mg}/\text{m}^3$ 吸入群（中用量群、理論空間濃度 $0.8\mu\text{g}/\text{g}$ ）および $5000\text{mg}/\text{m}^3$ 吸入群（高用量群、理論空間濃度 $4\mu\text{g}/\text{g}$ ）の 4 群に割りつけた。試験は、OECD ガイドライン 412¹⁰⁾ に準じて、1 日 6 時間、週 5 日の頻度で、28 日間の鼻部吸入曝露を実施した。評価項目として、一般状態、体重、摂餌量、眼科学的検査、血液検査、血液学的検査、血液化学的検査、器官重量、尿検査、肺胞洗浄液（BALF）検査および病理解剖学的検査を実施した。

2.2.3 SARS-CoV-2 不活化試験

試験は、30mg/L の次亜塩素酸水を用いて Vibiosphen 社 (France) で実施した。次亜塩素酸水と SARS-CoV-2 懸濁液を 19 : 1(v/v) の比率で混合・静置

（20 秒、1 分、5 分、30 分間）した後、次亜塩素酸水不活化溶液で反応を停止してから、0.01 の MOI (Multiplicity of Infection) で Vero 細胞（前日、96 穴プレートに 10,000 cells/well 播種）に添加した。72 時間インキュベート後、CPE（細胞障害効果）を判定した。

3. 結果

3.1. 空間浮遊菌およびファージに対する効果

精製水の噴霧は、大気中の細菌数およびファージ数に時間とともに若干の低下が認められた。一方、40 分間、大気中に噴霧された 30mg/L の次亜塩素酸水は、大気中の浮遊菌および浮遊ウイルスを顕著（99.9%以上）に減少させた（Fig.1 および Fig.2）。

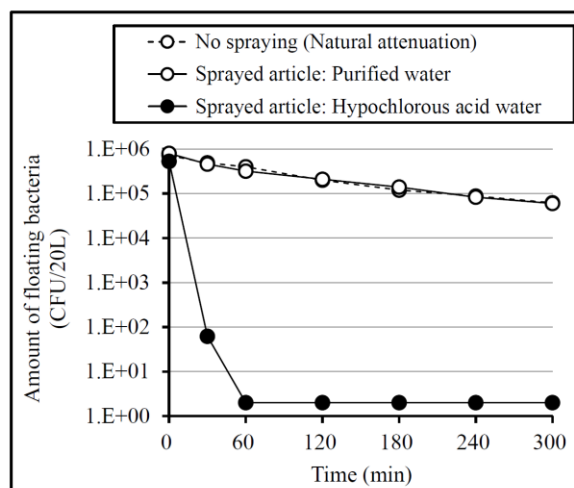


Fig.1. Inactivating effect of aerial-spraying of hypochlorous acid (HOCl) solution on air-floating *Staphylococcus aureus*. HOCl water was aerielly sprayed for 40min after aerial spraying of the bacterial suspension.

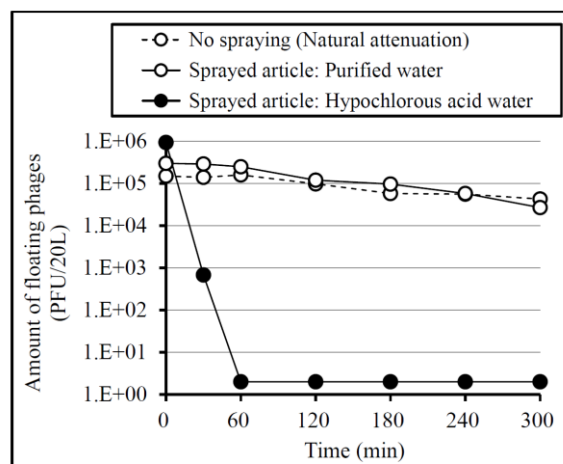


Fig.2. Inactivating effect of aerial-spraying of hypochlorous acid (HOCl) solution on air-floating coliphage MS2. HOCl water was aerielly sprayed for 40min after aerial spraying of the phage suspension.

3.2. ラット反復吸入試験

1000mg/L の次亜塩素酸水をラットに 28 日間反復吸入させた際の毒性試験成績を Table 1 に示した。一般所見、体重、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、肺胞洗浄液(BALF)検査および病理解剖学的検査において、次亜塩素酸水の吸入暴露群で対照群に比して、有意な変化は観察されなかった。観察された変化は、何れも変動幅が少なく、本動物種を用いた吸入毒性試験における施設背景データの変動予測範囲内であり、用量依存的な変化も示さなかったことから毒性学的な意義は無いと判断された。このことから本次亜塩素酸水の無毒性レベル(NOAEL)は理論空間濃度として 4 µg/g と結論づけた。

Table 1. 28-day repeated dose inhalation toxicity of hypochlorous acid solution in rats.

Test items	Theoretical spatial conc.: 4 µg/g* (High dose:5000 mg/m ³)
Clinical Signs	Dirty fur around the nose (M,F), lachrymation (M,F), salivation (M,F)
Body weight	—
Ophthalmology	—
Haematology	Increase in MCH (F), MCHC (F), MPV (F), APTT (M) and PT (M) Decrease in RBC (F) and HCT (F)
Biochemistry	Increase in total protein (M), albumin (M) and ALP (M,F) Decrease in total bilirubin (M) and phosphorus (M)
Organ weight	—
Urinalysis	—
BALF analysis	Increase in macrophage (M) Decrease in neutrophil (M)
Histopathology	Minimal acute inflammation of nasopharynx (M)

—: No changes were observed.

*: Theoretical spatial conc.

=Mist conc./Air wt.×Test substance conc./1000

Mist conc.: 5000 mg/m³, Air wt.: 1.2 g/L,

Test substance conc.: 1000 mg/L

Abbreviations

MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin, MCHC: Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration, MPV: Mean Platelet Volume, RBC: Red Blood Cell, GGT: Gamma glutamyltransferase, ALP: Alkaline Phosphatase, APTT: Activated Partial Thromboplastin Time, PT: Prothrombin Time, M: Male, F: Female.

3.3. SARS-CoV-2 不活化

30mg/L の次亜塩素酸水は、SARS-CoV-2 に対し、20 秒、1 分、5 分あるいは 30 分間作用させた際に、99.9%以上のウイルス不活化率を示した。

4. 考察

本研究で用いた次亜塩素酸水 (pH6.1、有効塩素濃度 30mg/L) は、空中噴霧試験で黄色ブドウ球菌および大腸菌ファージを効果的に減少させること、また高濃度 (1,000mg/L) 次亜塩素酸水を用いた噴霧試験で十分な安全性が認められた。

本研究結果は、次亜塩素酸水の噴霧が、大気中の細菌やウイルスの感染拡大を抑制するための簡便で安全かつ有用なオプションとなる可能性を示唆している。世界中で流行している新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) は大気中の微粒子 (エアロゾル) を介して拡大している可能性が指摘されている⁵⁾ことから、SARS-CoV-2 に対して顕著な不活化効果を示すことが明らかとなった本次亜塩素酸水は有効性のある対策になり得ると思われる。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、有益な助言を頂いた公益財団法人 ルイ・パストゥール医学研究センターの吉川敏一先生および、一般財団法人機能水研究振興財団の堀田国元先生に心よりお礼申し上げます。

6. 参考文献

- 1) COVID-19 dashboard by the center for systems science and engineering (CSSE) at Johns Hopkins University. <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6> (2020年8月閲覧).
- 2) van Doremalen N, Morris DH, Holbrook MG *et al.*: Aerosol and surface stability of HCoV-19 (SARS-CoV-2) compared to SARS-CoV-1. *N. Engl. J. Med.* **382**: 1564, 2020.
- 3) Michael SB, Brian GR: Hypochlorous acid: a review. *J. Oral Maxillofac. Surg.* Jun 25, 2020.
- 4) Hirota K: Air contamination with SARS-CoV-2 in the operating room. *J. Anaesth.* Jun 19, 2020.
- 5) BBC News Services. <https://www.bbc.com/news/world-53329946> (2020年8月閲覧).
- 6) Schulster L, Chinn RY; CDC; HICPAC. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities. Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC) MMWR Recomm. Rep. 2003 Jun 6; 52(RR-10):1-42.

- 7) 厚生労働省・消費者庁：第9版食品添加物公定書「次亜塩素酸水」：pp.634-635, 2018.
- 8) 千草尚、大川猛、横田昌広、二階堂勝、松村有里子、岩澤篤郎：次亜塩素酸水の pH および有効塩素濃度が及ぼす殺菌効果と腐食性への影響。防菌防黴 45: 585-593 (2017)
- 9) 独立行政法人製品評価技術基盤機構新型コロナウイルスに対する代替消毒方法の有効性評価に関する検討委員会：新型コロナウイルスに対する代替消毒方法の有効性評価（最終報告）。令和2年6月。 <https://www.nite.go.jp/data/000111315.pdf> (2020年8月閲覧)
- 10) 28-Day (Subacute) Inhalation Toxicity Study (OECD TG 412). <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264304741-30-en.pdf?expires=1597924280&id=id&accname=guest&checksum=3A0C498DBD7FD8A9C79753313741FB0C> (2020年8月閲覧).

Characterization of a New Type of Hypochlorous Acid Water: Effect on Aerially-sprayed Bacteria and Phage, Aerial-spraying Safety and Effect on SARS-CoV-2

*Naohisa KAWAMURA, Hiroshi FUKETA, Takashi SAITOH, Norihiro SHINKAI, Makoto MITSUHASHI, Tadao SHIOYAMA¹, Yoshinaga SUDO, Masahiro TANIGUCHI and Yoshihiko SANO

NIPRO Corporation and ¹Health Support SANRI Corporation

*Corresponding author: kawamura-naohisa@nipro.co.jp

We developed a novel hypochlorous acid (HOCl) water with the following physico-chemical properties: pH5.0-6.5, extremely low levels of total ions (<25mg/L) including Na⁺ and electroconductivity(<10μs/cm) and examined for the following: 1) Inactivating effects of its aerial spraying on aerially-floating *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* phage MS2, 2) safety of its aerial spraying, and 3) *in vitro* inactivating effect on SARS-CoV-2. Results showed that 1) over 99.9% of aerial floating *S. aureus* and the phage MS2 phage were killed and inactivated respectively, 2) no marked toxic effect on rats was observed in inhalation of 5000 mg/m³ and 3) over 99.9% of SARS-Cov-2 were inactivated.