原 著

機能水研究 Vol. 2(2), p. 75-80, 2004.

酸性電解水の殺菌基盤としての化学的要因の分析

土屋 桂[*1]・堀田国元[*2]

[*1] 拓殖大学工学部・[*2] 国立感染症研究所生物活性物質部

(2004年2月2日受付, 2004年2月13日受理)

NaCl水溶液の隔膜電解で生成させた強酸性電解水と, NaCl, HCl, NaClOを純水に溶解混合して調製した強酸性電解水模擬液［いずれも有効塩素濃度41.0 mg/L, pH 2.8, 酸化還元電位(ORP) 1.36 V *vs.* SHE］, および両液を原液として有効塩素濃度(ACC)とpHを変えて調製した液を試験液として, 物性変化の把握と殺菌試験(4×10^6 cfuを含む枯草菌液25 μLを5 mLの試験液に5分間混合)を行って酸性電解水の殺菌基盤について検討した結果, 以下のように整理ができた. 1) 試験液は, 倍数希釈によってACCを1/10まで低下させてもORPはわずかしか変化せず, 菌液の混合ではACC, pH, ORPのいずれも実質的に変化しなかった. 2) 殺菌活性は, HClO態有効塩素濃度と相関し, 酸性電解水と模擬液との間で殺菌特性の基本的違いはなかった. これらのことから, 3) 主な殺菌基盤はHClO態の有効塩素である. 4) pHは, 有効塩素中のHClO態の存在割合を決める形で間接的に影響し, 直接的影響は小さい. 5) ORPは, 直接的殺菌要因にはならない. 6) ヒドロキシルラジカルは, HClOや過酸化水素から生成し, 殺菌機構的には直接的殺菌因子として作用しうると考えられるが, 起点における支配因子ではないと判断される.

キーワード: 酸性電解水, 殺菌要因, 有効塩素濃度, pH, 酸化還元電位

1. 緒 言

酸性電解水は望ましい特性をいろいろ有する塩素系の殺菌消毒剤である. 塩素水などの一般的な塩素系消毒剤では, 主要な殺菌因子は遊離の次亜塩素酸(HClO, HOCl)だとされている[1]. 酸性電解水に関しては, 次亜塩素酸のほか, pH(水素イオン指数)や酸化還元電位(ORP), 過酸化水素(H_2O_2)あるいはヒドロキシルラジカル(・OH)が殺菌要因としていろいろな研究者により検討されてきた[2]が, 主要な殺菌基盤は遊離の次亜塩素酸であることがほぼ確定している[2),3)]. また, ・OHは次亜塩素酸や過酸化水素から生成し, 微生物の生命維持にとって必須の核酸やタンパク質などを損傷・分解することが示されており, pHは有効塩素分中の次亜塩素酸の存在割合に影響し, そしてORPは溶存酸素からの過酸化水素の生成に関係するといわれている.

酸性電解水を適切に使うには, その物性を正確に把握・評価して, 必要な基準を明瞭に示すことが必要である. そこで土屋らは, 各要因の重要度や相互の関係を確認すべく, 強酸性電解水の模擬液を用いて, 有効塩素分の存在形態, pH, 酸化還元電位が枯草菌(*Bacillus subtilis*)殺菌に及ぼす影響を調べ, その結果を報告した[4]. 今回の報告は, 強酸性電解水とその模擬液の両方を試験液として, 物性変化と殺菌効果における異同の評価に基づいて強酸性電解水の殺菌基盤を確認しようとしたものである.

2 実験材料と方法

強酸性電解水および模擬液を調製し, さらにこれらを原液として所定のpHに調整した液と, 原液を希釈後pH調整して所定の有効塩素濃度とpHにした液を準備して, これらの液に枯草菌液を添加して一定時間作用させた後に平板培養し, コロニー数計測により殺菌力を評価した.

2.1 試験液の調整

強酸性電解水の生成には, バッチ式の小型生成装置「スーパーウォーターミニ™ JED-007型」(ジャニックス(株)-(株)アルテック製)を用いた. 塩化ナトリウム(純度99.98%; マナック 容量分析用標準試薬)と純水(日本ミリポア社Milli-Q Labo ZDQ 2 100 10型で調製; 電気伝導率18.3 MΩ cm(25℃))で調製した0.025質量%NaCl水溶液(両極室合計で1.4 L)を15分間直流電解した後, アノード(陽極)室液を分取した. 初回電解分は廃棄し, 続く4回分を十分混合した後, 2 L褐色瓶に上部に空間を残さないように充填して密栓し, 一晩静置したものを強酸性電解水の試料原液とした. 強酸性電解水(原液)の有効塩素濃度は41.0 mg/L, pHは2.8, 酸化還元電位(ORP)は1.36 V *vs.* SHEであった. 強酸性電解水模擬液は, 1 Lメスフラスコを用いて塩化ナトリウム141.2 mg, 3 mol/L塩酸(塩酸 純度35～37%; 関東化学試薬 特級 を純水で希釈して調製)0.8 mLを約950 mLの純水に溶解混合した後, 調製後の有効塩素濃度が41.0 mg/Lとなるように, あらかじめ有効塩素濃度を定量した次亜塩素酸ナトリウム溶液(有効塩素6.12%; 関東化学 試薬一級)を加え(約0.7 mL), そこに純水を加えて定容にし, これを褐色瓶中で一晩密栓保存したものを原液とした. 強酸性電解水および模擬液は, 原液のまま, あるいはpH調整, あるいは希釈後pH調整して, 有効塩素濃度とpHを変化させ

表1　菌液混合による試験液の成分・物性値の変化

チェック項目		試験液の pH 調整値			
		2.8	5.5	8.0	11.0
pH					
無希釈液	菌液混合前の値	2.8	5.5	8.0	11.0
	混合による変化	0.0	0.0	0.0	0.0
2倍希釈液	菌液混合前の値	2.8	5.5	8.0	11.0
	混合による変化	0.0	0.0	−0.1	0.0
4倍希釈液	菌液混合前の値	2.8	5.5	8.0	11.0
	混合による変化	0.0	0.0	0.0	0.0
10倍希釈液	菌液混合前の値	2.8	5.5	8.0	11.0
	混合による変化	0.0	−0.1	0.0	0.0
酸化還元電位/V *vs.* SHE					
無希釈液	菌液混合前の値	1.368	1.181	1.024	0.721
	混合による変化	−0.008	−0.002	+0.010	+0.008
2倍希釈液	菌液混合前の値	1.359	1.171	1.017	0.697
	混合による変化	−0.010	−0.004	+0.002	+0.010
4倍希釈液	菌液混合前の値	1.335	1.151	1.000	0.652
	混合による変化	−0.002	−0.013	+0.007	+0.010
10倍希釈液	菌液混合前の値	1.319	1.117	0.999	0.646
	混合による変化	−0.020	+0.019	−0.010	−0.002
有効塩素濃度/mg L^{-1}					
無希釈液	菌液混合前の値	39.5	42.4	41.8	42.4
	混合による変化	−0.9	−0.6	0.0	0.0
2倍希釈液	菌液混合前の値	19.3	21.1	21.0	21.0
	混合による変化	−0.3	−0.3	−0.3	0.0
4倍希釈液	菌液混合前の値	9.7	10.8	10.2	10.4
	混合による変化	−0.2	−0.2	0.0	0.0
10倍希釈液	菌液混合前の値	3.8	4.3	4.0	4.3
	混合による変化	0.0	−0.2	−0.1	−0.1

*混合による変化：試験溶液と菌液を混合（接触）後，5分間における変化

たものを試験液として，分析，物性測定および殺菌試験に供した．なお，希釈には純水を用い，pH調整には0.15 mol/L水酸化ナトリウム溶液（水酸化ナトリウム；純度>96%　和光純薬製試薬　を純水で希釈して調製）を用いた．

2.2　溶液の化学分析方法および物性測定方法

有効塩素濃度は，JIS K 0101-1991工業用水試験方法のよう素滴定法により測定した．pHは，東亜電波工業製HM-16S型pHメーターと同GST-5211C型pH測定用センサーを用いて測定した．酸化還元電位は，東亜電波工業製HM-5S型pHメーター（エレクトロメーター兼用）と同PTS-5011C型ORP測定用センサーを用いて測定した．

2.3　試験液の殺菌力試験方法

35℃，7日間継代培養した枯草菌 *Bacillus subtilis* ATCC 6633の約1.6×10^8 cfu/mLの菌液を調製し，試験液とした．殺菌試験液5.00 mLが入った容器にそれぞれ菌液0.025 mLを注入し，20秒間振とう混合し静置した（すなわち，200:1の混合比で，混合後の菌液濃度は0.8×10^6 cfu/mLである）．振とう開始後5分間経過した時点で，25%チオ硫酸ナトリウム水溶液を0.04 mL加えて殺菌試験液の活性を停止させた後，0.1 mLを採って10倍希釈系列をつくり，それぞれの0.1 mLを滅菌シャーレに注入後，70℃に保温した溶解寒天培地10 mLを加え，十分混合後固化させた．これを37℃で1昼夜培養して，コロニーを計数した．寒天培地は，パールコアハートインフュージョン寒天培地（栄研化学）を使用した．

3.　結　　果

3.1　殺菌試験液の物性に対する菌液混合および希釈の影響

殺菌試験に先立って，各試験液を菌液と混合（200:1の容積比）させることによる各成分・物性値（pH, ORP, 有効塩素濃度）の変化の有無をチェックした（表1）．各pHの試験液に使用した強酸性電解水原液が同一ではないため，pH間で絶対値の比較を行うことはできないが，混合前後の変化値の比較はでき，pH 2.8とpH 5.5の無希釈原液における有効塩素濃度のわずかな変化以外は，特別な変化は認められなかった．すなわち，いずれの物性も変化はほとんどなく，殺菌試験への影響は考慮する必要がないことが確認された．

一方，各希釈殺菌試験液の物性についてみると，当然のことながら有効塩素濃度が希釈倍数に反比例して低下して

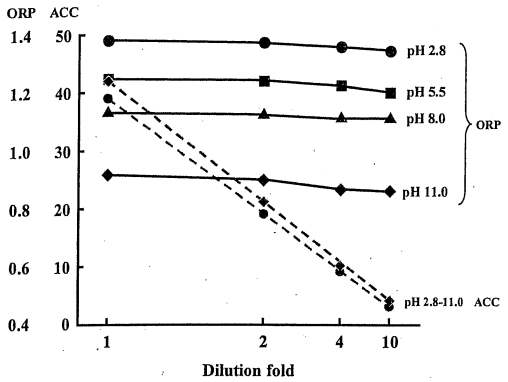

Fig. 1 Dilution effect on the available chlorine concentration and oxidation-reduction potential of bactericidal test solutions.
ORP (Oxidation-Reduction Potential)/V *vs.* SHE,
ACC (Available Chlorine Concentration)/mg L^{-1}

図1 殺菌試験液の有効塩素濃度と酸化還元電位に対する希釈の影響
ORP（酸化還元電位）/V *vs.* SHE,
ACC（有効塩素濃度）/mg L^{-1}

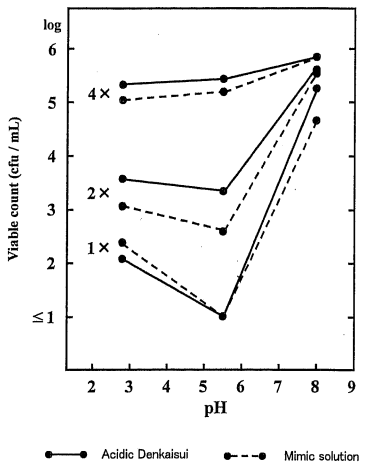

Fig. 2 Comparison of *B. subtilis* killing activity of acidic Denkaisui and its chemically mimic solution.
0.8×10^6 cfu·mL^{-1} suspensions were subject to the tests.

図2 酸性電解水と模擬液の枯草菌殺菌特性の比較

いるのに対して，ORP の変動はほとんど認められなかった（表1，図1）.

3.2 強酸性電解水とその模擬液の殺菌特性比較試験

強酸性電解水とその模擬液の殺菌特性の比較をするために，pH を変えて枯草菌殺菌試験を行った．試験した pH は，2.8（強酸性電解水原液），5.5（微酸性域で有効塩素分の 99%が遊離の次亜塩素酸の形で存在すると考えられる），および 8.0（有効塩素分の 76%が次亜塩素酸イオン，24%が次亜塩素酸の形で存在すると考えられる微アルカリ性域）の 3 点である．

図 2 は，強酸性電解水と模擬液について pH と有効塩素濃度を変化させて殺菌試験を行ったときの結果を示している．2 倍希釈液と 4 倍希釈液において強酸性電解水の方が若干強い殺菌傾向が認められたが，基本的にはすべての希釈において強酸性電解水と模擬液は同じような殺菌傾向を示しており，両試験液の間で殺菌特性の実質的相違は認められなかった．なお，原液と 2 倍希釈液において，pH 5.5 の場合の方が pH 2.8 の場合よりも殺菌力が高い傾向が認められた．同じ試験を繰り返し行ったところ，両者同じ殺菌結果を示す場合もあるものの，概して pH 5.5 の試験液の殺菌力が若干高く出る傾向が認められた．同様な結果は，前報[3]で報告した強酸性電解水模擬液（調合酸化水）の殺菌特性確認試験と同様の試験（pH 2.8, 5.5, 8.0, 11.0 の 4 点）を行った場合にも得られた．これは，無希釈液で pH 2.8 の菌生存率が pH 5.5 より高かった点を除いて，前報と基本的に同じであった（データ省略）.

3.3 酸性電解水の殺菌特性の確認

前報[4]において強酸性電解水模擬液（前報では調合酸化水）の殺菌特性確認試験を行ったが，それと同様の試験を pH 11.0（有効塩素のほぼすべてが次亜塩素酸イオンの形で存在すると考えられる）を加えた 4 点の pH で行った結果を図 3 に示す．酸性電解水は，前報における模擬液の場合と同じ殺菌特性を示すことが確認できた.

4. 考　　察

酸性電解水の殺菌力に影響を与えている要因とその度合いや要因間の関係について，図 3 をもとに考察する.

図 3A は，pH と有効塩素濃度をパラメーターにして ORP と菌生存率の関係を表しており，以下のことを引き出すことができる．1) 殺菌力は，アルカリ性（pH 8.0 と 11.0）よりも酸性（pH 2.8 と 5.5）において顕著に高く，有効塩素濃度と相関する．2) 有効塩素濃度 41.0 mg/L の pH 8.0 試験液の殺菌力と有効塩素濃度 10.3 mg/L の pH 5.5 と 2.8 の試験液の殺菌力が同じレベルであるが，このことは，pH 8.0 における HClO 態有効塩素比率が 24%であることを考慮すると，有効塩素濃度 41 mg/L は 9.8 mg/L の HClO 態有効塩素を含むことになり，pH 5.5 の有効塩素濃度 10.3 mg/L の場合と同等であることを意味している．すなわち，殺菌力は HClO 濃度に依存すると判断される．3) 酸化還元電位 (ORP) は，pH が低いほど高くなるが，同じ pH では有効塩素濃度が 1/10 に減少してもあまり低下せず，高 ORP でも有効塩素濃度が低いと殺菌力が低くなる（表 1 と図 1 参照）．このことから，ORP 単独で殺菌力を規定することはできない，すなわち，ORP は直接的に殺菌と相関しないと判断される.

図 3B からは，殺菌力と HClO 態の有効塩素濃度との強い相関が読みとれ，また，pH 2.8 と pH 5.5 の試験液の殺菌力は 20 mg/L を境に低濃度では pH 2.8 の方が，高濃度では pH 5.5 の方が高いことが認められる（同じ実験を繰り返しても同様な結果が得られることが多い）．このこと

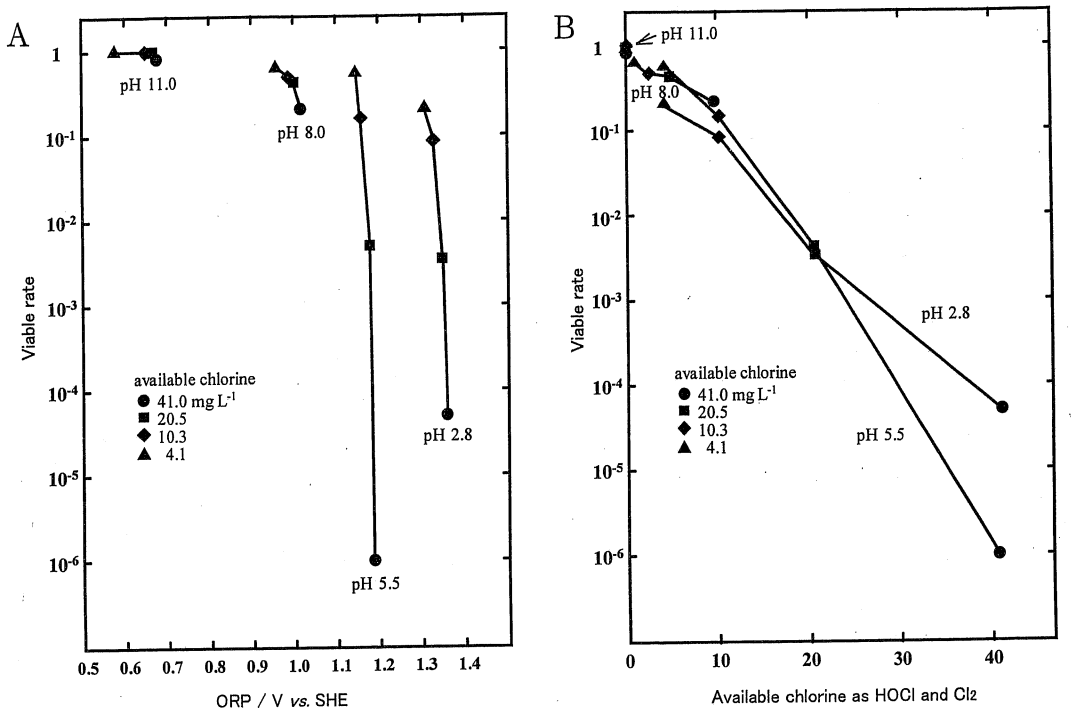

Fig. 3 *B. subtilis* killing activity of acidic Denkaisui as the function of ORP level (A) and available chlorine concentration as HOCl and Cl_2 (B) at different pH.
Viable rate 1 (control)$=0.8\times10^6$ cfu·mL^{-1}

図3 酸性電解水の酸化還元電位・有効塩素濃度と枯草菌生存率の関係(A)および酸性電解水中の次亜塩素酸態および塩素態有効塩素と枯草菌生存率の関係(B)

に関して可能性ある理由としては，pH 2.8 では ORP レベルが溶存酸素から過酸化水素の生成を可能とするレベルである[5]ために，過酸化水素が低い有効塩素レベルを補強していることが考えられる．そして，可能性として，高有効塩素レベルではこの影響は大きくなく，そのために pH 5.5 の HClO 態が多いことの方が効いてくることを反映していると考えることができる．このことは，強酸性電解水と模擬液の殺菌活性を調べた際に，有効塩素濃度が低いときに強酸性電解水の方が強い殺菌傾向にあることと関連していると思われる．なぜなら，陽極では電解により水から酸素が生ずるために強酸性電解水の方が模擬液よりも溶存酸素レベルが顕著に高くなり[6]，高 ORP で過酸化水素の生成量も多くなると予想され，それが殺菌力に加味されると考えられるからである．ただし，これらの考え方の妥当性については，今後，厳密な実験を行って検証する必要がある．

以上のように，強酸性電解水の主殺菌基盤は HClO 態の有効塩素であることがわかり，強酸性次亜塩素酸水（厚生労働省）と呼称することの妥当性も明確となったが，それに付随しての疑問は次亜塩素酸がどのような機構により殺菌するのかということである．このことに関連して，強酸性電解水においては OH ラジカルの生成が認められており[7]，また，OH ラジカルによる殺菌に関する報告[8]もある．したがって，強酸性電解水の殺菌機構における OH ラジカルの関与についても考察が必要である．消毒分野では，次亜塩素酸はその酸化力によって酵素などのタンパク質やヌクレオチドを変化させることにより殺菌力を発揮すると推定されている[9]．一方，免疫学の分野では，生体の防御機構において重要な役割を果たす好中球の殺菌機構として，ミエロペルオキシダーゼ (Myeloperoxydase; MPO) によって HClO が生成し，それから生成する OH ラジカルが最終的殺菌因子として作用する図が示されている[10]．OH ラジカルの寿命が極めて短いことを考慮すると，好中球における図式を想定することによって酸性電解水の殺菌機構における OH ラジカルの関与を矛盾なく説明することができると思われる．OH ラジカルが関与するとすれば，DNA などの核酸やタンパク質などの分解・損傷が起きることが予想されるが，実際に，そうしたことが起きることを堀田らは確かめている[11), 12]．ただし，OH ラジカルが殺菌作用の起点となることはないと判断される．なぜなら，もし起点（殺菌基盤）となっているとすると，強酸性電解水生成直後の殺菌力が強いはずなので，本研究のように，生成してから 12 時間以上経過したものを用いたときはもはや殺菌力は消滅するか著減するはずであるが，高い殺菌活性が維持されるからである．

使用する白金電極の種類によっては，電解後数分間だけは通常より殺菌力が高く，数分間経過すると通常の殺菌力のレベルに低下する酸性電解水を生成させることができるという報告[13]がある．この殺菌力低下もラジカルなど活性種の存在を想定すると説明できると思われるが，酸性電解

水の殺菌作用におけるラジカルの役割についてはさらに実証的な検討が必要である.

なお，強酸性電解水による殺菌における遊離塩素の役割についても今後の解析が必要である.

5. 結　　論

酸性電解水とその模擬液の枯草菌殺菌特性を実験的に検討し，酸性電解水の殺菌要因について以下のように整理することができた.

1) 酸性電解水の殺菌力を決める第一の要因は遊離次亜塩素酸の濃度であり，有効塩素が次亜塩素酸の形で存在する割合を決めているのは pH で，pH は間接的な要因として作用している.

2) ORP は，直接的殺菌要因にはならない.

3) ヒドロキシルラジカルは，HClO や過酸化水素から生成し，直接的殺菌因子として作用しうると考えられるが，殺菌作用の起点因子ではないと判断される.

謝　　辞

微生物試験法に関してご指導いただいた東邦大学医学部 辻 明良教授，ならびに実験協力者の拓殖大学工学部 井上光生実験助手に感謝いたします.

引用文献

1) White G C : The handbook of chlorination and alternative disinfectants, 3rd ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1992.
2) (財)機能水研究振興財団学術選考委員会編:「電解水ガイド 2001」第 2 部各論 2　強酸性電解水，pp. 32–60, (財)機能水研究振興財団，東京，2001.
3) Nakagawara S, Goto T, Nara M, Ozawa Y, *et al.*: Spectroscopic characterization and the pH dependence of bactericidal activity of the aqueous chlorine solution. Anal. Sci., **14**: 691–698, 1998.
4) 土屋　桂，仁木輝緒，井上光生，　他: 電解酸化水の殺菌活性因子に関する検討（第 1 報）調合酸化水の枯草菌芽胞殺菌における作用因子の分析.　拓殖大学理工学研究報告，**7**: 65–72, 1999.
5) 河野雅弘: 生成された強酸性電解水中で起きる反応. ウォーター研究会編「強酸性電解水の基礎知識」 pp. 48–50, オーム社，東京，1997.
6) Hotta K, Kawaguchi K, Saitoh F *et al.*: Antimicrobial activity of electrolyzed NaCl solutions: Effect on the growth of *Streptomyces* spp. Actinomycetologica **8**: 51–56, 1994.
7) 米森重明，滝本康幸，関　庚薫，実桐幸男，下平哲司，三宅晴久: 強酸性電解水溶液中のヒドロキシルラジカルの電子スピン共鳴法による解析. 日本化学会誌　1997, No.7: 497–501, 1997.
8) 橋爪英城，木村　功，冨田　敬，他: ヒドロキシラジカルによる *Streptococcus* 属菌の殺菌効果について.　日本歯科保存学雑誌　**37**: 1254–1260, 1994.
9) 小林寛伊編:「[増補] 消毒と滅菌のガイドライン」 p. 81, ヘルス出版，東京，2002.
10) Heinzelmann M, Mercer-Jones M A and Passmore J C: Physiology and cell biology update Neutrophils and renal failure. Ame. J. Kidney Diseases **34**: 384–399, 1999.
11) 堀田国元: 強酸性電解水の有機物・アミノ酸に対する影響. 平成 11 年度厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業)「我が国における施設内感染等のあり方に関する研究（主任研究者　堀田国元)」 研究報告書，pp. 39–42, 2000.
12) 土崎尚史，宮木洋一，斎藤文子，他: 酸性電解水処理による菌体内 DNA の損傷.　機能水研究　**1**: 65, 2002.
13) 井関正博，高岡大造，近藤康人，他: 電解技術を使った水の殺菌・浄化システム（口頭発表）. 第 26 回ウォーター研究会セミナー（日本機能水学会講演会 2002-1)，2002.

Characterization of Chemical Factors as the Bactericidal Basis of Acidic DENKAISUI

Katsura TSUCHIYA*[1] and Kunimoto HOTTA*[2]

*[1] *Faculty of Engineering, Takushoku University, Hachioji-shi, Tokyo, Japan*
*[2] *Department of Bioactive Molecules, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan*

Strongly acidic Denkaisui [electrolyzed water with pH 2.8, available chlorine concentration (ACC) 41.0 mg L^{-1}, and oxidation reduction potential (ORP) 1.36 V *vs.* SHE], its chemically mimic solution and their derivative solutions with different ACC and pH were examined for the chemical species as the bactericidal basis of the Denkaisui by checking the change in the physicochemical properties and the bactericidal activity against *Bacillus subtilis* (4×10^6 cfu containing 0.025 mL bacterial suspensions were exposed to 5 mL of the solutions for 5 minutes). The following were obtainable. 1) In terms of levels of pH, ORP and ACC, serial dilution resulted in the specific change in ACC, whereas no substantial change occurred by mixing with the bacterial suspension. 2) The bactericidal activity correlated with ACC and was not substantially different between the Denkaisui and the mimic solution. Based on these, the following should be pointed out. 3) Major chemical basis for the bactericidal activity is ACC as the HOCl form. 4) pH shows the indirect effect that controls the ratio of HOCl in ACC in spite of no obviously direct bactericidal effect. 5) ORP plays no substantial role as the direct bactericidal factor. 6) Hydroxyl radical, a direct bactericidal factor, may be formed from HOCl as well as hydrogen peroxide, but not be contributive as the original basis for the bactericidal effect of the Denkaisui.

Key words: Acidic Denakisui (electrolyzed water), Bactericidal factor, Available chlorine, pH, Oxidation-reduction potential