

新規塩素系消毒薬「亜塩素酸水」の 抗微生物効果に関する研究

Investigation of the microbicidal activity of chlorous acid water,
a novel chlorine-based disinfectant

日本獣医生命科学大学大学院 獣医生命科学研究科
合田 学剛

研究の背景

各種消毒薬の抗微生物スペクトル

○有効、△効果不十分、X無効

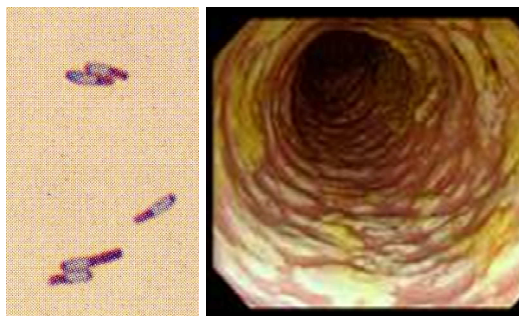
現在、日本で使用されている 代表的な衛生管理用の消毒薬	一般細菌	真菌		ウイルス		細菌 芽胞
		酵母	糸状菌	エンベロープ	非エンベロープ	
① グルタルアルデヒド※ ¹⁾	○	○	○	○	○	○
② 次亜塩素酸ナトリウム	○	○	○	○	○	○
③ アルコール※ ²⁾	○	○	○	○	△	X
④ 塩化ベンザルコニウム※ ²⁾ (第四級アンモニウム塩)	○	○	△	△	X	X

※¹⁾ ①は抗微生物スペクトルが広く細菌芽胞の不活化も可能。しかし、人体への刺激性が強く一般的な環境消毒薬としては適していない。

※²⁾ そこで、③や④が、環境や手指用の消毒薬として広く利用されている。

但し、医療機関や介護・福祉施設等で
しばしばアウトブレイクを引き起こす微生物である

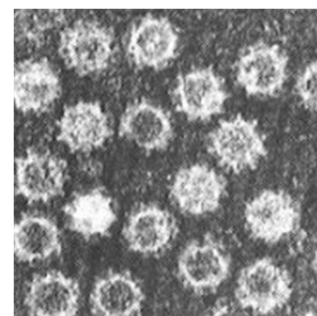
芽胞形成菌：*Clostridium difficile*



- ・ 抗生物質投与後に大腸内で過増殖。
- ・ 毒素により激しい下痢を起こす。
- ・ 芽胞で環境を汚染する。

消毒薬に対する感受性が低い微生物で
脂質二重膜を持たない

ノン(非)エンベロープウイルス：Human norovirus



- ・ 食中毒患者数1位（10,000人前後/年）
- ・ 便中のウイルス数が多い。
(10^8 - 10^{11} /g)
- ・ 感染力が強い。
(10-100個で感染成立)

③アルコールや④塩化ベンザルコニウムに耐性を示し、
不活化する為には塩素系の消毒薬が必要且つ重要になる。

医療現場では、★次亜塩素酸ナトリウムが、一部の食品加工工場では亜塩素酸ナトリウムに有機酸もしくは無機酸を加えて pH2.3から2.9までの酸性域に調製した★酸性化亜塩素酸ナトリウムが感染症対策に利用されている。

★これらいずれの塩素系消毒薬も共に優れた抗微生物スペクトルを示す。

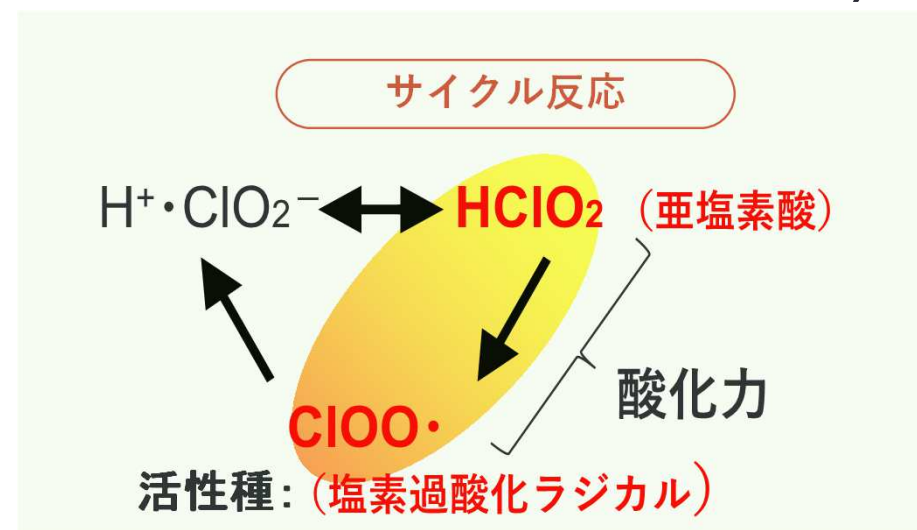
薬剤名 ★次亜塩素酸ナトリウム ★酸性化亜塩素酸ナトリウム

主たる有効成分 OCl^- , HClO ClO_2^- , HClO_2

長所 ・抗菌スペクトルが広い。
・抗菌スペクトルが広い。
・有機物の影響を受けにくい。

短所 ・有機物との接触により、その効果が急速に失活する。
・効果の持続力が短い。
・必要な時、その都度調製しなければならない。

亜塩素酸水 (Chlorous acid water)



☆そこで、図に示すサイクル反応を利用することによって消毒効果の有効成分となる「亜塩素酸」(HClO_2)を弱酸性溶液中($\text{pH}5.5 \pm 1.0$)に長期間安定させることに成功した物質、それこそが「亜塩素酸水」でありこの物質は有機物存在下でも安定した消毒効果を発揮する。

又、この「亜塩素酸水」の希釈液は一定期間その品質が安定していることから、必要な時その都度調整しなくてもあらかじめ用意(準備)しておくことができる。

尚、この「亜塩素酸水」は第9版食品添加物公定書内で以下のように定義付けされている。

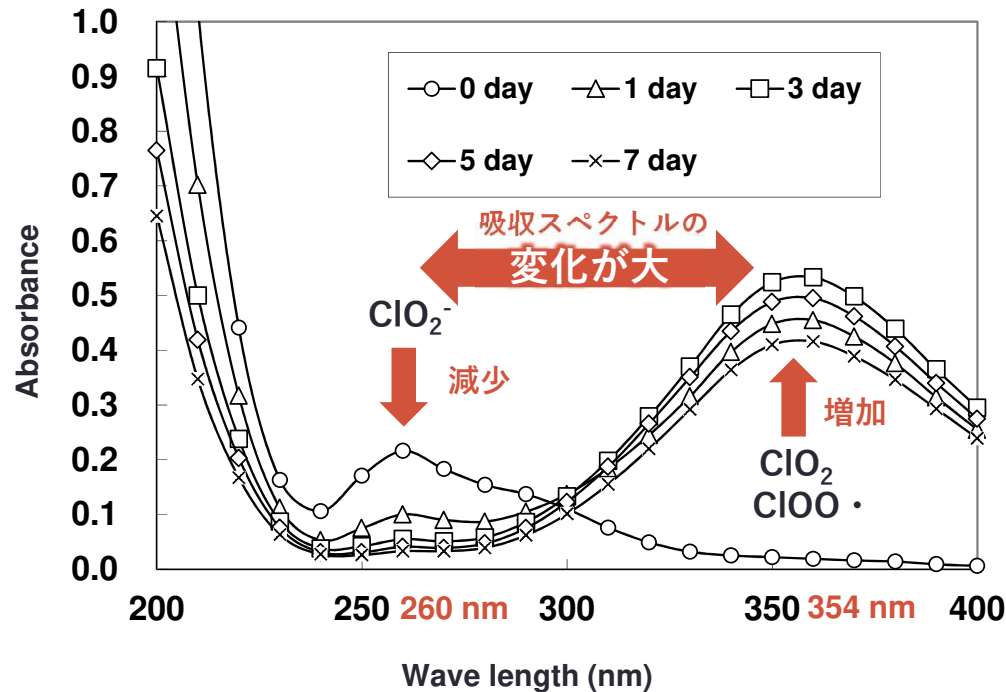


※1) 亜塩素酸水とはこの亜塩素酸(HClO_2)を含む水溶液のことを指す。

※2) 最近の研究では、この亜塩素酸水の主たる有効成分である亜塩素酸の活性種は、塩素過酸化ラジカル($\text{ClOO} \cdot$)であるという事が分って来た。

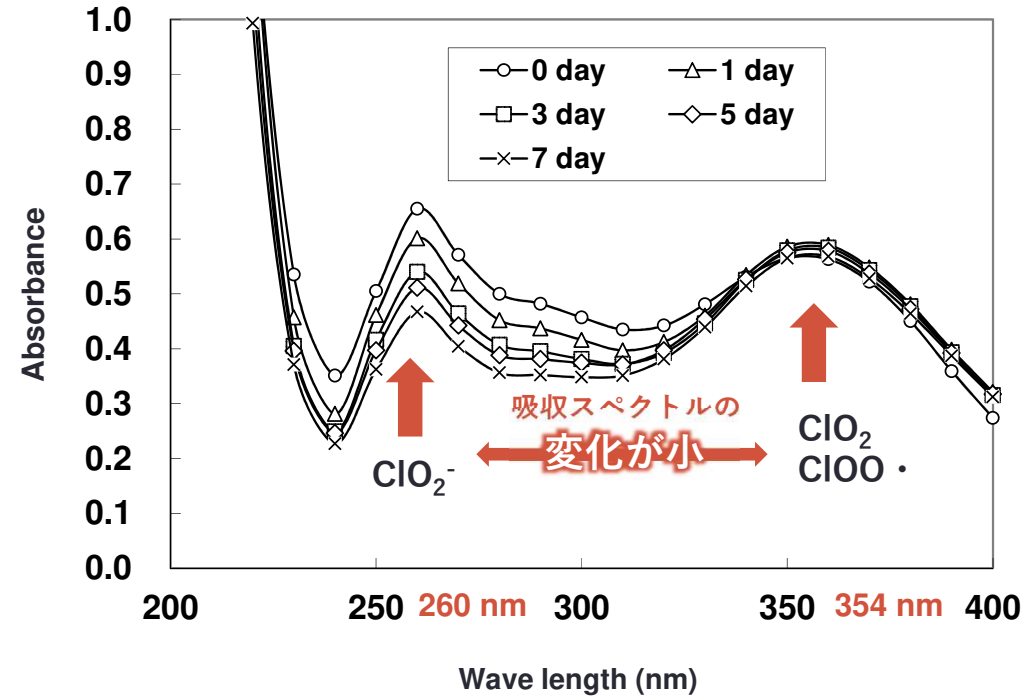
亜塩素酸水と酸性化亜塩素酸ナトリウムの 吸収スペクトルの変化を調整後7日間確認

酸性化亜塩素酸ナトリウム



⇒ 酸性化亜塩素酸ナトリウムは、調整後1日で
亜塩素酸イオン (ClO_2^-) の最大吸収部である **260 nm付近** の吸収が減少し、
二酸化塩素 (ClO_2) や、亜塩素酸 (HClO_2) の活性種である
塩素過酸化ラジカル ($\text{ClOO}\cdot$) の最大吸収部である **354 nm付近** の
吸収が増加。
結果として 吸収スペクトルの変化が非常に大きいことがわかった。

亜塩素酸水



⇒ 一方で、亜塩素酸水は 7日後でも
吸収スペクトルの変化は少なく 高い安定性を示した。

このことは 亜塩素酸水が、酸性化亜塩素酸ナトリウムよりも
溶液中の化学組成が安定であることを示しているのだと考えている。

1報目 高タンパク質負荷条件下における亜塩素酸水のネコカリシウイルス および*Clostridium difficile*の芽胞に対する不活化効果に関する検討

消毒薬に対する感受性が低く 脂質二重膜を持たないノンエンベロープウイルスであるヒトノロウイルス（HuNoV）の代替ウイルス：ネコカリシウイルス（FCV）や 各種 医療・介護・福祉施設等で しばしばアウトブレイクを引き起こしている *Clostridium difficile* の芽胞（CD芽胞）に対する亜塩素酸水の不活化効果を確認

- 対象微生物： ネコカリシウイルス（FCV）≡ヒトノロウイルス（HuNoV）の代替ウイルス
クロストリジウム・ディフィシル（*Clostridium difficile*）芽胞（CD芽胞）
- 試験条件：非有機物負荷および有機物負荷（BSA（ウシ血清アルブミン）、ポリペプトン、肉エキス、ラット盲腸内容物）
- 生残微生物数測定方法：FCV（プラークアッセイ）、CD芽胞（標準平板寒天法）
- 総塩素濃度測定方法（≡含量、≡有効塩素濃度）：ヨウ素還元滴定法：KI法／遊離塩素濃度測定方法：DPD法（比色法）

(Goda H, et al., PLoS One, 2017)

2報目 亜塩素酸水のウイルス不活化機構に関する検討

構造や疫学背景が異なる幅広いウイルス種に対する亜塩素酸水の不活化効果の検証と
共存タンパク質や亜塩素酸水の調製に用いている溶媒の差異が、不活化効果に与える影響を確認

- HEp-2細胞に対する傷害性を比較（使用薬剤：亜塩素酸水、次亜塩素酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム）
- 対象微生物： エンベロープウイルス：A型インフルエンザウイルス、単純ヘルペスウイルス
非エンベロープウイルス：ポリオウイルスI型、FCV、コクサッキーB群ウイルス、ライノウイルス
- 使用溶媒：リン酸緩衝生理食塩水（PBS, pH7.4）、クエン酸緩衝液（pH5.5）、McIlvaine（マッキルベイン）緩衝液（pH5.5）
- 総塩素濃度測定方法（≡含量、≡有効塩素濃度）：ヨウ素還元滴定法：KI法
- 生残微生物測定方法：プラークアッセイ、TCID₅₀
- 有機物負荷条件：BSA（ウシ血清アルブミン）

(Goda H, et al., Jpn J Infect Dis, 2018)

3報目 大規模食中毒予防への亜塩素酸水の応用の可能性に関する検討

実際の患者より単離したヒトノロウイルス（HuNoV）に対する亜塩素酸水の不活化効果をリアルタイムPCR法を用いて確認

- 使用ノロウイルス株：GII.2、GII.4の2株
- 有機物負荷条件：BSA（ウシ血清アルブミン）、BSA（ウシ血清アルブミン）＋ヒツジ赤血球、ポリペプトン、肉エキス
- 遊離塩素濃度測定方法：DPD法（比色法）
- 不活化効果測定方法：RNase処理後の残存コピー数をリアルタイムPCR法にて測定

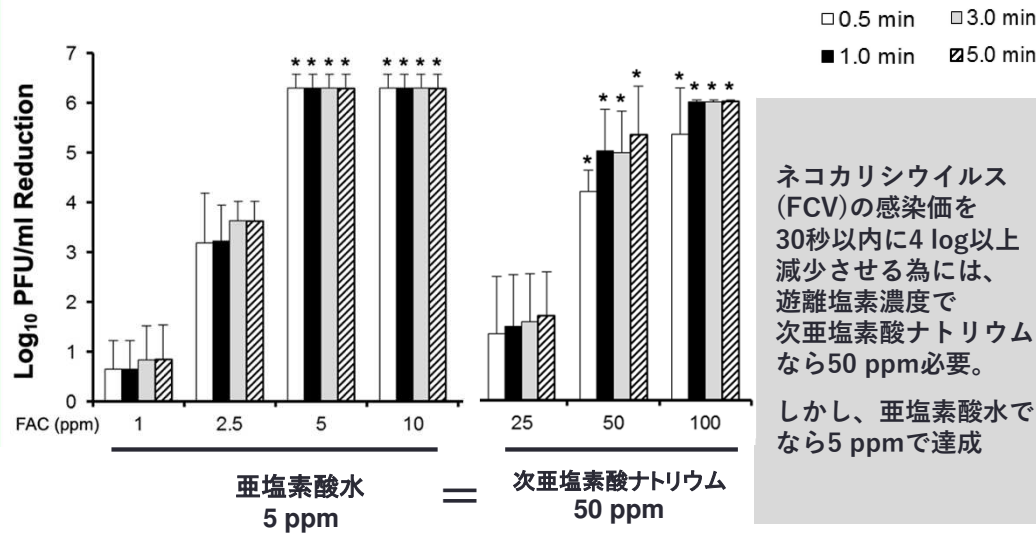
(Goda H, et al., J Infect Chemother, 2022)

高タンパク質負荷条件下における 亜塩素酸水のネコカリシウイルスおよび *Clostridium difficile* の芽胞に対する 不活化効果に関する検討

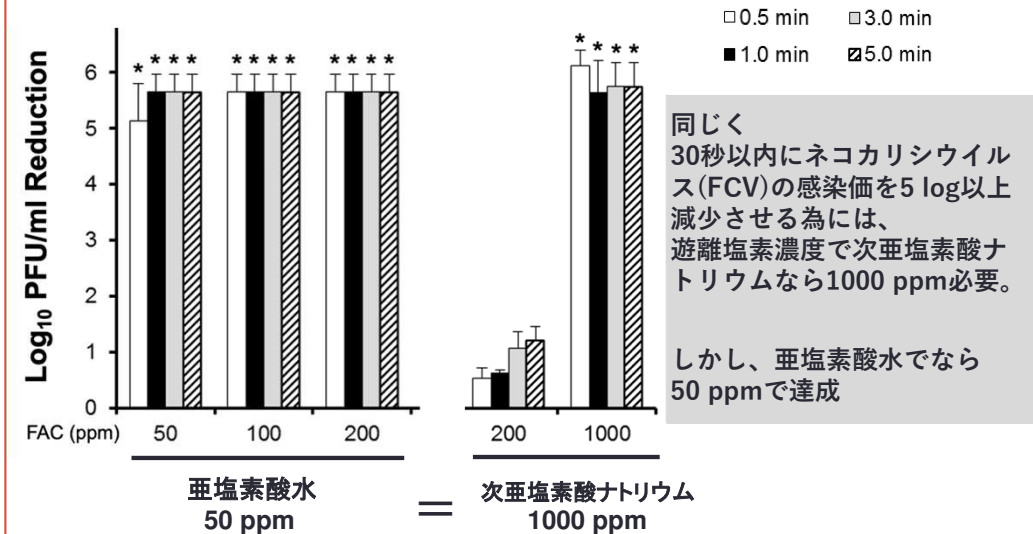
1報目では、消毒薬に対する感受性が低く 脂質二重膜を持たないノンエンベロープウイルスである
ヒトノロウイルス（HuNoV）の代替ウイルス：ネコカリシウイルス（FCV）や
各種 医療・介護・福祉施設等でしばしばアウトブレイクを引き起こしている
Clostridium difficile の芽胞（CD芽胞）に対する亜塩素酸水の不活化効果を確認

亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムのネコカリシウイルス（FCV）に対する不活化効果にウシ血清アルブミン（BSA）が与える影響をプラークアッセイ法を用いて確認

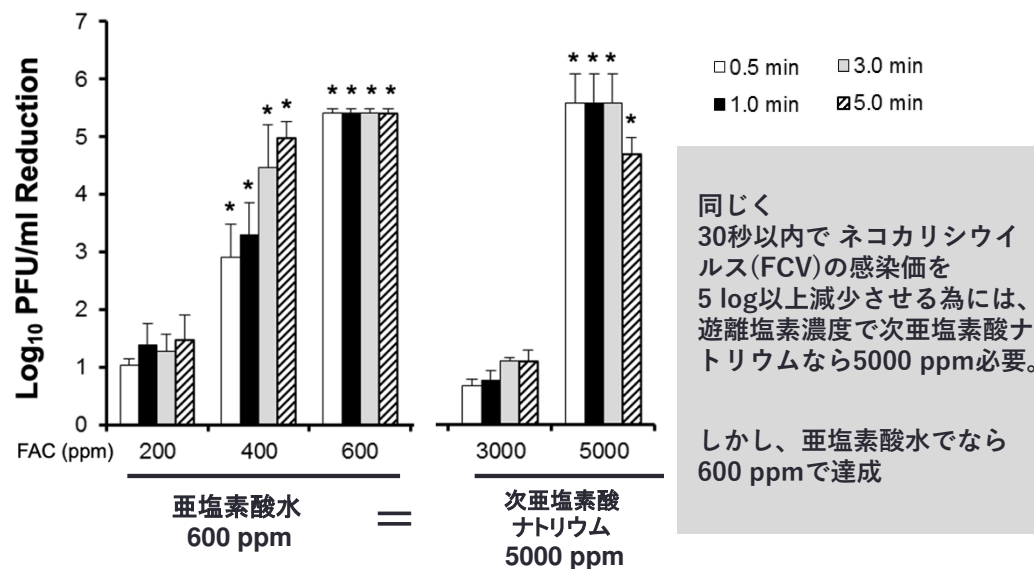
有機物非存在条件下区



有機物負荷としてBSA 0.5% 存在条件下区



有機物高負荷としてBSA 5.0%存在条件下区



以上の結果から

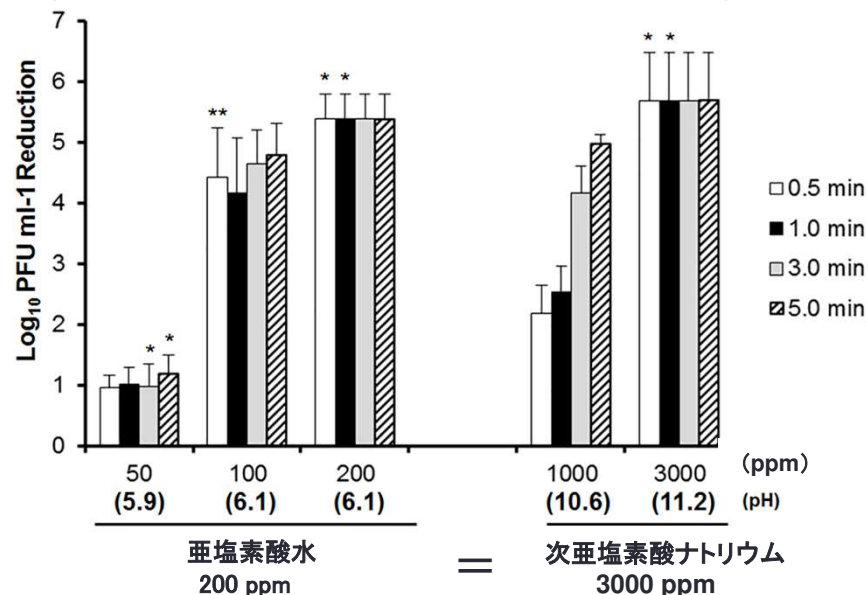
有機物負荷条件下においては、次亜塩素酸ナトリウムよりも亜塩素酸水の方がその効果は安定的であり、よって、より高い不活化効果を期待できる薬剤だと考える。

亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムのネコカリシウイルス（FCV）に対する不活化効果に
嘔吐物の代替：ポリペプトンと 糞便の代替：肉エキスが与える影響をブランクアッセイ法を用いて確認

結果として

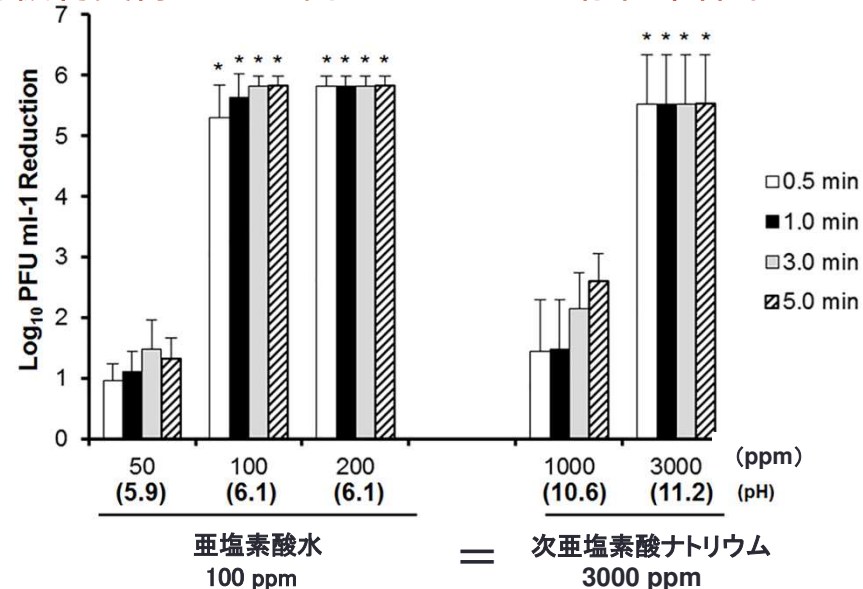
有機物負荷としては、塩素系消毒薬である次亜塩素酸ナトリウムや
亜塩素酸水のネコカリシウイルス（FCV）に対する不活化効果は、
BSAよりもポリペプトンや肉エキスの方がより強く阻害することがわかった。

有機物負荷としてポリペプトン 0.5% 存在条件下



ネコカリシウイルス(FCV)の感染価を30秒以内に
5 log以上減少させる為に必要となる遊離塩素濃度は
亜塩素酸水なら200 ppm
次亜塩素酸ナトリウムなら3000 ppm であった

有機物負荷として肉エキス 0.5% 存在条件下



同じくネコカリシウイルス(FCV)の感染価を30秒以内に
5 log以上減少させる為に必要となる遊離塩素濃度は
次亜塩素酸ナトリウムなら3000 ppm
亜塩素酸水でならわずに100 ppm であった

この結果により、次亜塩素酸ナトリウムによるウイルス不活化阻害作用は、**肉エキス**の方が強く

肉エキス > ポリペプトン

逆に、亜塩素酸水によるウイルス不活化阻害作用は、**ポリペプトン**の方が強いという傾向がみられた。

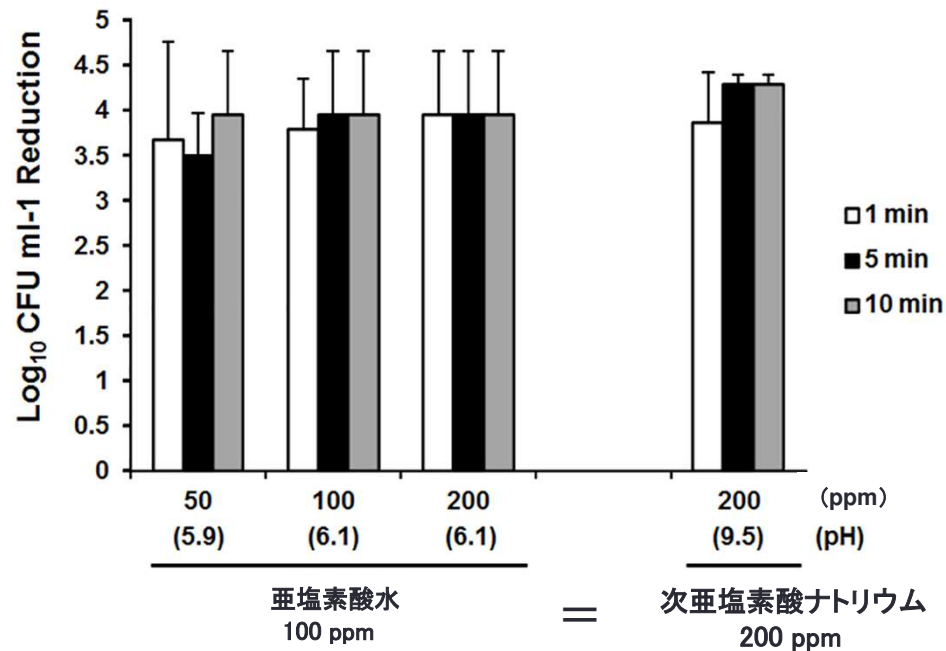
肉エキス < ポリペプトン

このことは 両者の反応機構の違いによるものではないかと考えています。

次亜塩素酸ナトリウムと亜塩素酸水の *Clostridium difficile*の芽胞※（CD芽胞）に対する不活化効果を標準寒天平板法にて確認

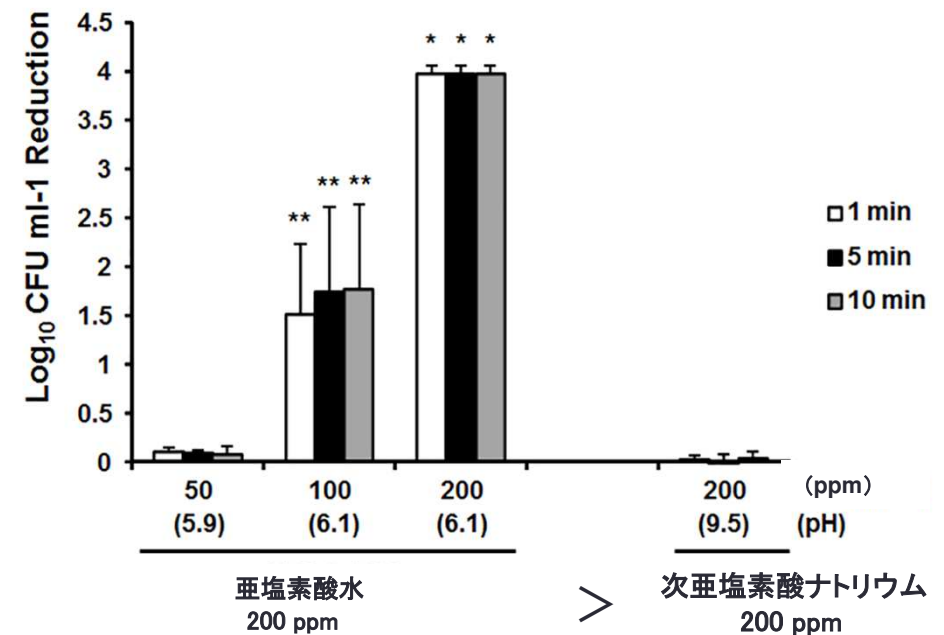
※なお この時のCD芽胞には630株を使用した。

<有機物負荷がない条件下>



1分以内にCD芽胞の生残数を3.5 log以上減少させる為には
亜塩素酸水なら遊離塩素濃度100 ppmで十分、
そして、これで遊離塩素濃度 200 ppmの次亜塩素酸ナトリウム
と同等の効果が得られることがわかった。

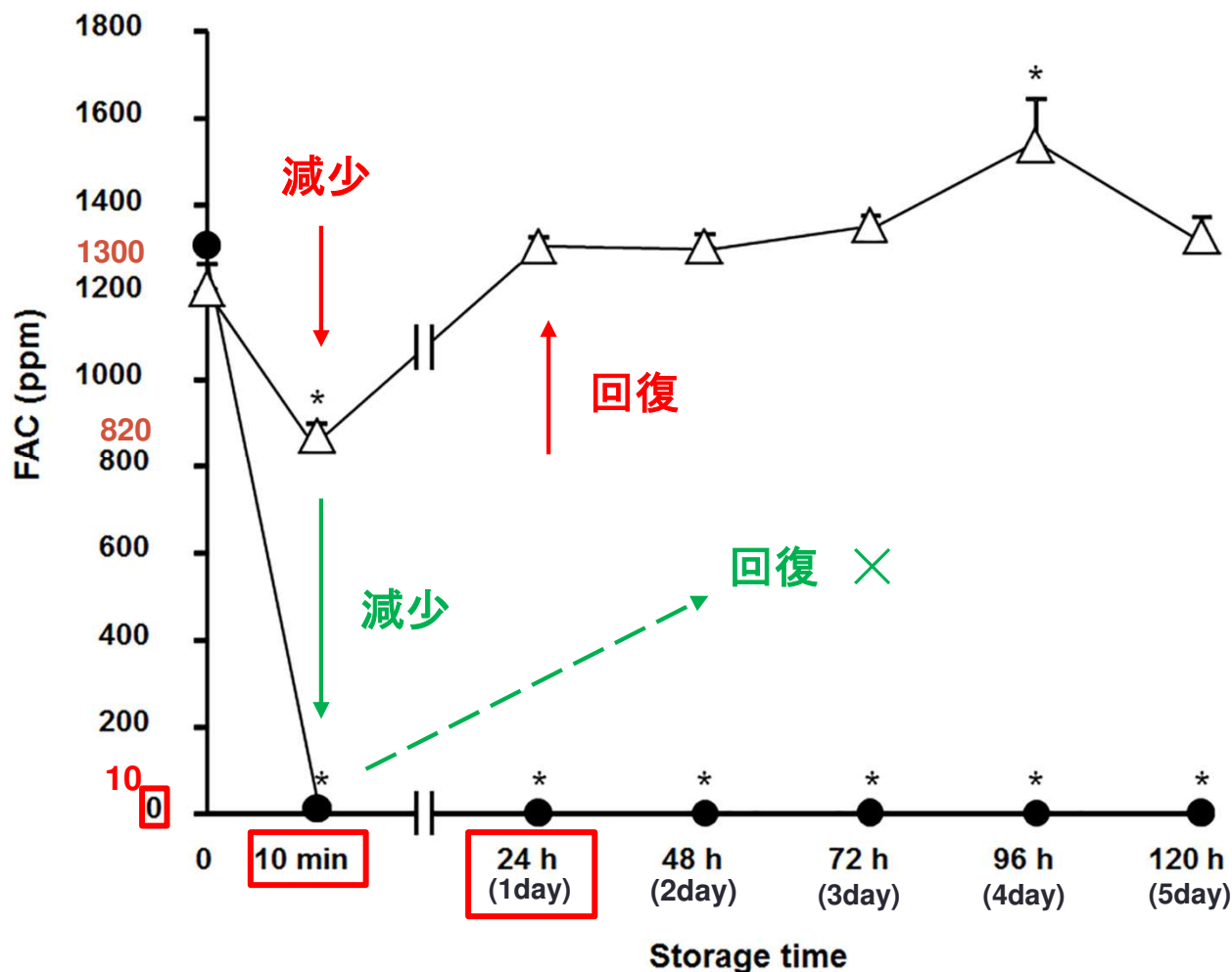
<有機物負荷としてポリペプトン 0.5%存在条件下>



同じく1分以内にCD芽胞の生残数を3.5 log以上減少させる為には
亜塩素酸水なら遊離塩素濃度200 ppmで十分、
しかし、同じ200 ppmの次亜塩素酸ナトリウムでは
CD芽胞に対する不活化効果は認められなかった。

そこで、亜塩素酸水が有機物存在下でも微生物不活化作用を維持できる理由を追究する為に

遊離塩素濃度 1,300 ppmの次亜塩素酸ナトリウムと亜塩素酸水を
50%中和できる量の 0.1 M チオ硫酸ナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) を
それぞれに添加し、その後の遊離塩素濃度の推移を5日間確認



結果として

△ 1,300 ppmの亜塩素酸水は、
0.1 Mのチオ硫酸ナトリウムで
中和した直後に
遊離塩素濃度が820 ppm へと減少

しかし、24時間後には
中和前の遊離塩素濃度である1,300 ppm
にまで回復

● 一方、1,300 ppmの次亜塩素酸ナトリウムは
同じく、0.1 Mのチオ硫酸ナトリウムで
中和した直後に
10 ppm にまで減少し
10分後には検出限界未満となり
その後の回復はみられなかった

この現象は 亜塩素酸水の主たる有効成分である亜塩素酸 (HClO_2) の活性種
塩素過酸化ラジカル ($\text{ClOO}\cdot$) は 一度消費されても 解離状態の亜塩素酸イオン (ClO_2^-) から
再び新しく生成されることを示唆しているのではないかと考えています。

亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムが、有機物（BSA）と接触した後の総塩素量（TC）と遊離塩素濃度（FAC）と結合塩素量（CMC）の変化を確認。

亜塩素酸水は、総塩素量のうち、亜塩素酸イオン（ ClO_2^- ）が占める割合が多い為、多くの塩素原子が結合塩素量として検出されます。

一方、次亜塩素酸ナトリウムの場合、塩素原子の全てが、求核反応を持つため、反応性の高い遊離塩素濃度として検出されます。

そこで、総塩素量が2,000ppm及び4,000ppmの亜塩素酸水もしくは次亜塩素酸ナトリウムを、有機物負荷として0.5% BSA存在条件下において10分間反応させたあとの、総塩素量と、遊離塩素濃度と、結合塩素量を測定してみることにしました。

Sanitizers (setting TC)		TC		FAC		CMC	
		Before	After	Before	After	Before	After
亜塩素酸水	(2,000ppm TC)	1921.2±48.4	1677.9±80.8	108.11±1.8	0.7±0.2	1813.1±47.0	1677.2±80.6
亜塩素酸水	(4,000ppm TC)	3671.1±12.1	3215.5±93.7	228.68±12.1	20.6±2.6	3442.5±12.1	3194.9±93.7
次亜塩素酸 ナトリウム	(2,000ppm TC)	2002.0±20.7	1088.7±88.2	2091.67±108.2	13.6±0.8	<0.00	1075.0±88.3
次亜塩素酸 ナトリウム	(4,000ppm TC)	3913.9±50.5	1507.1±126.2	4391.08±99.5	24.3±0.7	<0.00	1482.8±126.2

総塩素量（TC：Total chlorine） 遊離塩素濃度（FAC：Free available chlorine） 結合塩素量（CMC：Combined chlorine）

結果として

次亜塩素酸ナトリウムの総塩素量は、46～61%にまで低下していますが、亜塩素酸水の総塩素量は、87～88%のまま維持していました。

又、次亜塩素酸ナトリウムは、有機物（BSA）と反応したあと、結合塩素量が顕著に増加していました。しかし、亜塩素酸水は、結合塩素量の増加はみられず維持していました。

これは、亜塩素酸水が、標的分子を塩素化しないことを示しており、一方、次亜塩素酸ナトリウムは、有機物との接触で、大量の塩素化合物（クロラミン等）を生成することに結びついているのではないかと考えています。

このことは、両薬剤の対微生物不活化機構が、大きく異なるのだと考えている。

亜塩素酸水の ウイルス不活化機構に関する検討

2 報目では、亜塩素酸水のウイルス不活化機構に関する知見を深めるために
構造や疫学的背景が異なる幅広いウイルス種に対する不活化効果 及び
不活化効果に与える共存タンパク質の影響や反応に用いる溶媒の影響を解析

pH5.5のマッキルベイン緩衝液中における
エンベローブウイルスと、
ノンエンベロープウイルスに対する亜塩素酸水の
不活化効果を確認。

なお、この実験ではウイルス原液を希釈せずに
試験反応液に加えたため 反応液中のタンパク質の終濃度は
実測値で1 ml中 30~60 μg (マイクログラム) の範囲で
あった。

結果として

この範囲のタンパク質負荷条件下であれば
図のように ウイルスによって感受性こそ異なるが、
亜塩素酸水には全てのウイルスに対する
明確な不活化効果が認められた。

個別にみていくと・・・

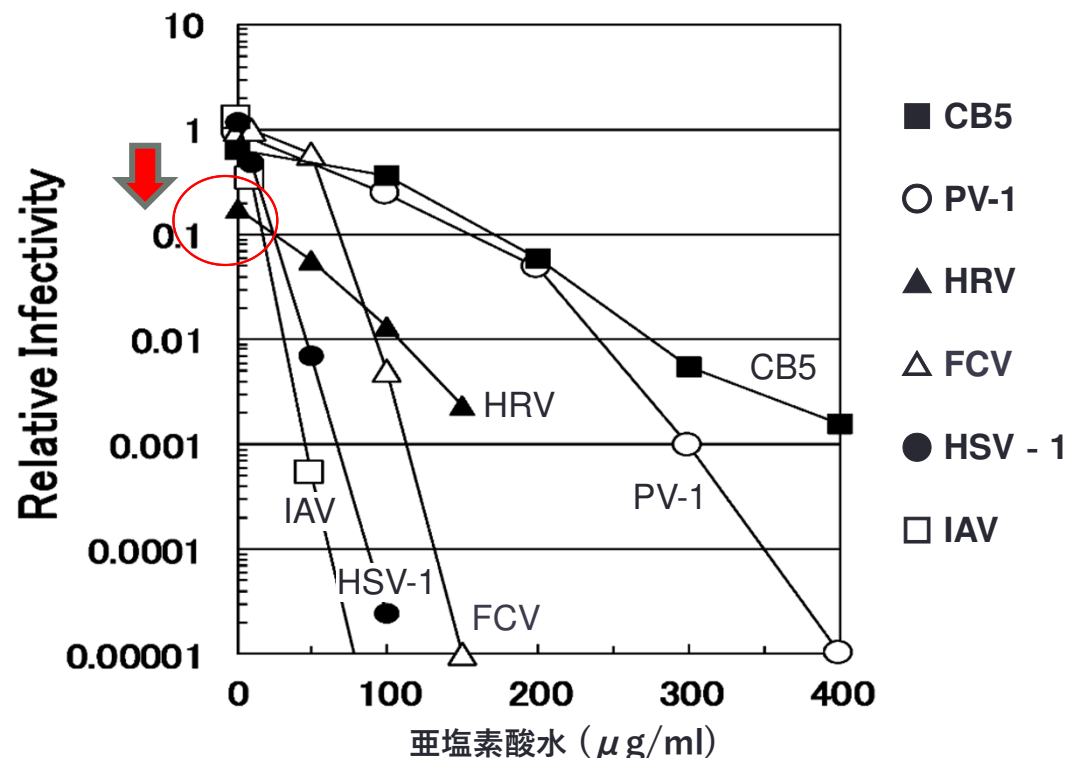
- Influenza A virus (IAV)
＜呼吸器感染ウイルス＞
エンベローブウイルスであるA型インフルエンザウイルスの感染価は 遊離塩素濃度100 ppmの亜塩素酸水で10のマイナス5乗以下にまで低下。

- Herpes simplex virus type I (HSV-1)
＜接触感染ウイルス＞
エンベローブウイルスである単純ヘルペスウイルスの感染価は 同じ100 ppmの亜塩素酸水で10のマイナス4乗以下にまで低下した。

- Poliovirus type I (PV-1)
＜消化器感染ウイルス＞
ノンエンベローブウイルスであるポリオウイルスの感染価は 遊離塩素濃度100 ppmの亜塩素酸水では10分の1にも減少できなかった。しかし、400 ppmにまで引き上げるとその感染価は10のマイナス5乗にまで低下できた。

- Coxsackie B virus type 5 (CB5)
＜消化器感染ウイルス＞
ノンエンベローブウイルスであるコクサッキーBウイルスの感染価は 遊離塩素濃度100 ppmの亜塩素酸水では同じく10分の1にも減少しなかった。しかし、400 ppmにまで引き上げると10のマイナス3乗程度の感染価の低下を認めた。

＜ウイルス原液を希釈せずに用いた＞



- △ Feline calicivirus (FCV)
＜呼吸器感染ウイルス＞
ノンエンベローブウイルスであるネコカリシウイルスの感染価は 遊離塩素濃度100 ppmの亜塩素酸水で100分の1以下にまで減少した。

- ▲ Human rhinovirus (HRV)
＜呼吸器感染ウイルス＞
ノンエンベローブウイルスであるヒトライノウイルスの感染価は 遊離塩素濃度100 ppmの亜塩素酸水では100分の1程度に減少した。但し、このヒトライノウイルスの場合 酸感受性が高く pH5.5という弱酸性pH単独でも有意な不活化効果が見られていた。

種々のウイルス間での亜塩素酸水に対する感受性の違いが、ウイルスの性状に起因するのかそれとも反応系に共存する有機物の影響によるものなのかを検証した。

※ なお、この試験では用いるウイルスの原液を pH7.4 のリン酸緩衝塩類溶液 (PBS) で 100 分の 1 に希釈して反応液中の共存タンパク質の濃度を 1 ml 中 1 μ g (マイクログラム) 未満に調製した反応液中で亜塩素酸水のウイルス不活化効果を確認した。

結果は、図に示すように

□ Influenza A virus (IAV)

<呼吸器感染ウイルス>

エンベロープウイルスである A 型インフルエンザウイルスの感染価は 遊離塩素濃度 3 ppm の亜塩素酸水で検出限界である 10 のマイナス 3 乗以下にまで低下。

● Herpes simplex virus type I (HSV-1)

<接触感染ウイルス>

同じエンベロープウイルスである単純ヘルペスウイルスの感染価も 3 ppm の亜塩素酸水で検出限界である 10 のマイナス 3 乗以下にまで低下した。

△ Feline calicivirus (FCV)

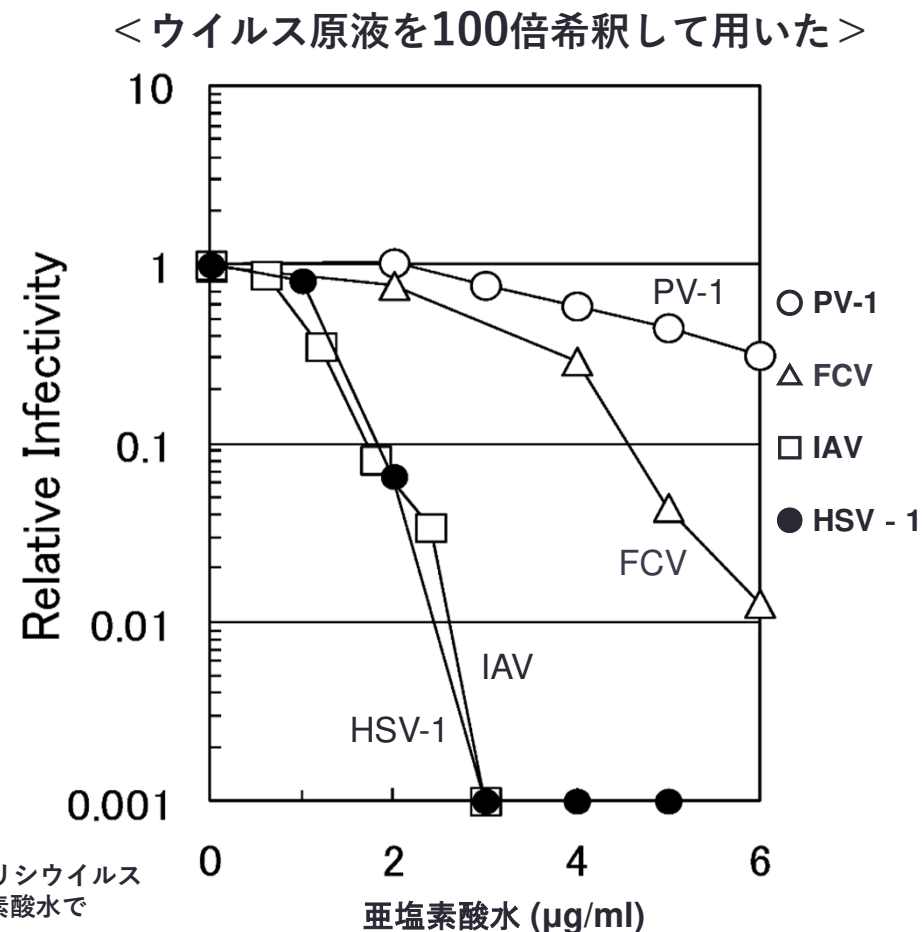
<呼吸器感染ウイルス>

ノンエンベロープウイルスであるネコカリシウイルスの感染価は 遊離塩素濃度 6 ppm の亜塩素酸水で 10 のマイナス 2 乗にまで低下した。

○ Poliovirus type I (PV-1)

<消化器感染ウイルス>

同じノンエンベロープウイルスであるポリオウイルスの感染価は 6 ppm の亜塩素酸水では 10 のマイナス 0.4 乗に留まった。



以上のことから、亜塩素酸水の対ウイルス不活化効果は、①ウイルス種によって異なること。

②ノンエンベロープウイルス間でもネコカリシウイルス (FCV) のような呼吸器感染ウイルスは比較的高い感受性をもつこと。そして、③共存タンパク質の影響は受けるもののタンパク質負荷が少ない条件下でなら低濃度の亜塩素酸水でも優れたウイルス不活化効果が得られることがわかった。

緩衝液（溶媒）が、亜塩素酸水のウイルス不活化効果に与える影響について、以下の3種類の緩衝液を用いて解析

この時使用した緩衝液は・・・

○ Phosphate-buffered saline
pH7.4のPBS（リン酸緩衝塩類溶液）

△ 10 mM Sodium citrate buffer
pH5.5の10 mM クエン酸緩衝液

□ McIlvaine's buffer
pH5.5のマッキルベイン緩衝液

そして、それぞれの緩衝液で調製した亜塩素酸水の水溶液にウイルス液を添加し 25℃で30分間作用させた後 残存していた各ウイルスの感染価を調べた。

結果として

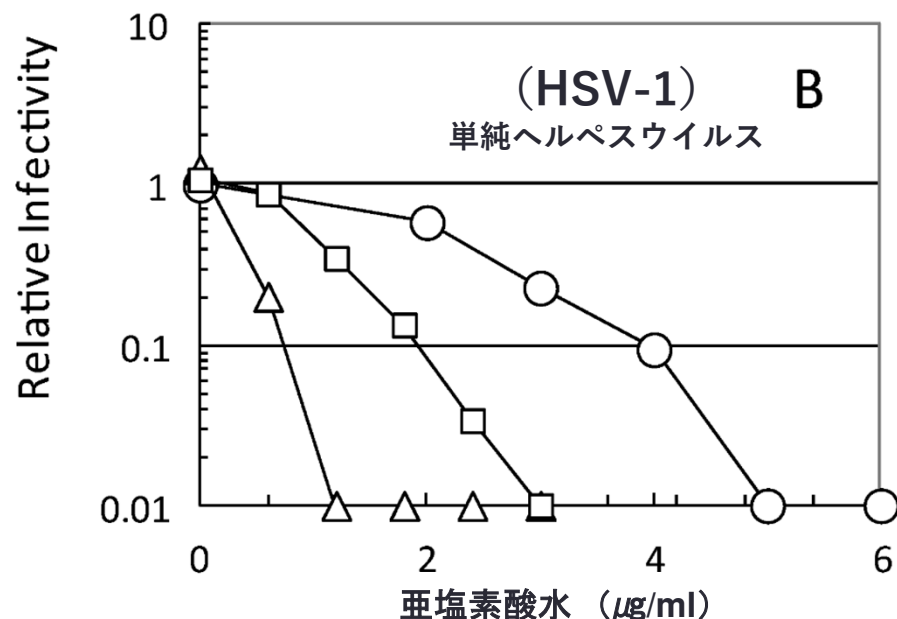
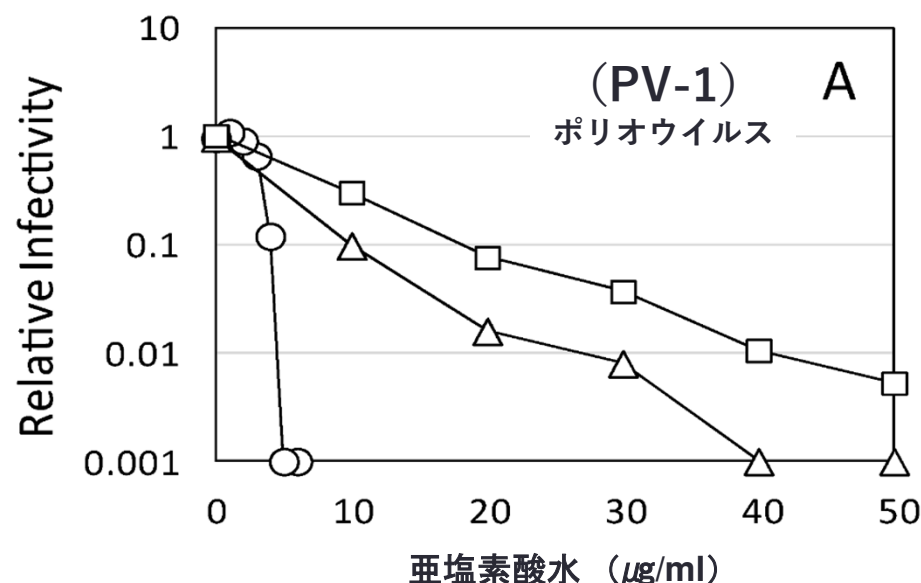
ポリオウイルスは、ウイルス類の中でも最も不活化されにくいグループに属するのにも関わらず、その感染価は上段の図に示すようにいずれの緩衝液中でも不活化され、殊に、pH7.4のPBS中では5 ppmという遊離塩素濃度の亜塩素酸水処理で 検出限界である 10^{-3} のマイナス3乗以下にまで低下した。

無論、pH5.5のクエン酸緩衝液や pH5.5のマッキルベイン緩衝液中でも不活化はされた。しかし、不活化活性は クエン酸緩衝液中の方がより顕著であった。このことにより緩衝液の種類によってウイルス不活化効果に差がみられることが解った。

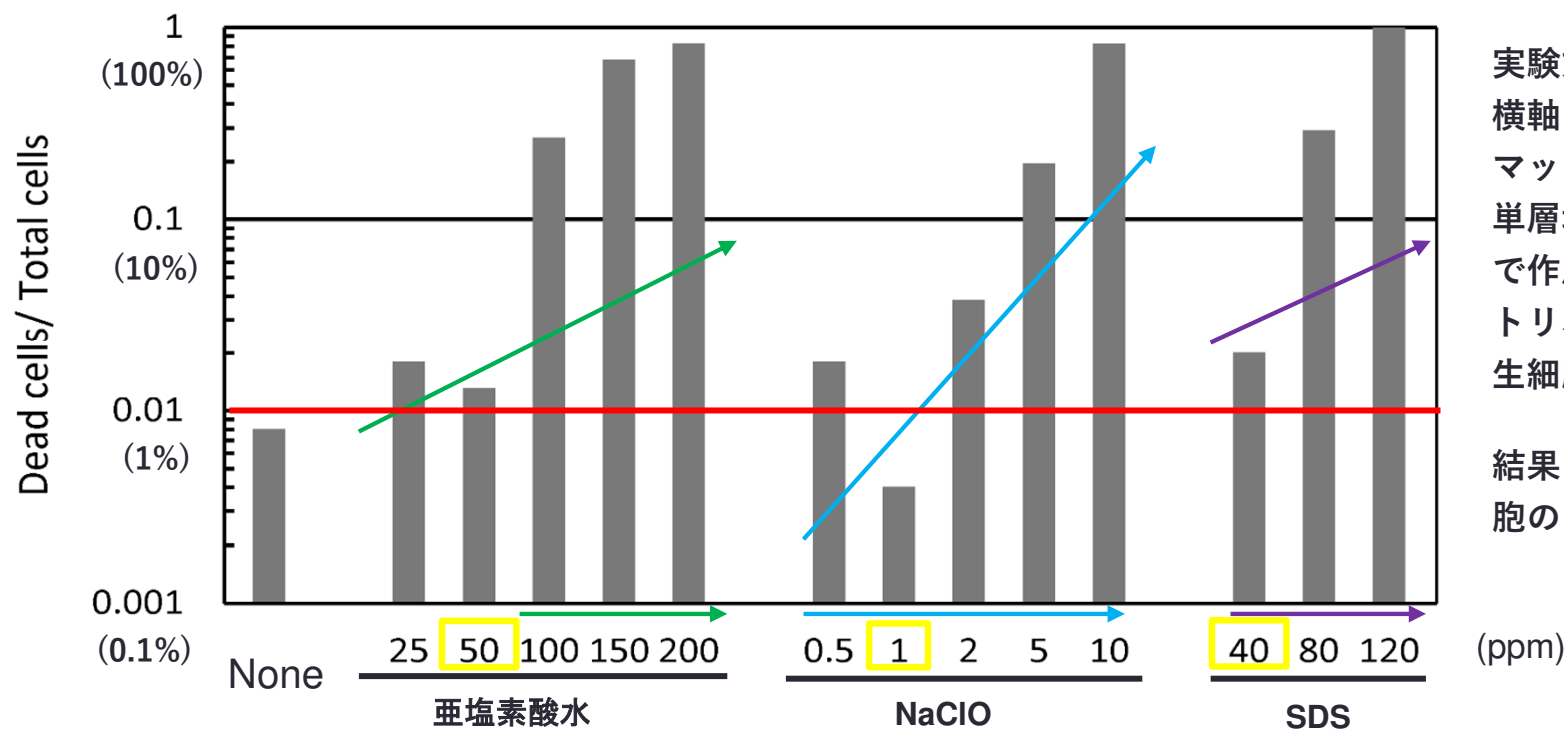
但し、下段の図に示すように、単純ヘルペスウイルスに対する不活化効果は pH5.5のクエン酸緩衝液中で最も高く次いで pH5.5のマッキルベイン緩衝液中であり

pH7.4 の PBSを用いた場合が最も低くなった。

以上の結果は 緩衝液の種類が亜塩素酸水の
不活化活性に影響することを明確に示している。



亜塩素酸水の細胞毒性を検討するためHeLa細胞に由来することが知られているHEp-2細胞を用いて
亜塩素酸水(Chlorous acid) と、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)
およびドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の細胞傷害作用を確認し、比較した。



実験方法としては：

横軸に示す各濃度の試薬を含むpH5.5の
マッギルバイン緩衝液をシャーレ上に
単層培養したHEp-2細胞に加え 20分間氷上
で作用させたのち トリプシンで細胞を分散し
トリパンブルーで細胞染色し
生細胞数と死細胞数の出現率を定量した。

結果として、何も試薬を加えない場合の死細胞
の出現率は、1% (0.01) 以下であった。

結果は、図に示しているように…

亜塩素酸水

50 ppm以下の亜塩素酸水では
死細胞の出現はわずかに認められるのみであった。
しかし、亜塩素酸水の遊離塩素濃度を 100 ppm、
150 ppm、200 ppmへと増加させると、死細胞の
割合は 27%、70%、80%へと増加した。

NaClO (次亜塩素酸ナトリウム)

同じ条件下での次亜塩素酸ナトリウムの場合は
遊離塩素濃度 1 ppm以下の死細胞の出現は
わずかし確認できないのにも関わらず、遊離塩
素濃度が 2 ppmで 4%、5 ppmでは 20%、わずか
10 ppmで 80%と、死細胞の割合が急激に増加して
おり、強い細胞傷害性が認められた。

SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)

ドデシル硫酸ナトリウムは、安全性が高い殺菌成分
としてシャンプーや歯磨き粉の中に
2.5% 以下の濃度で添加され利用されている。
そこでこのドデシル硫酸ナトリウムを同じ条件下で
調べてみると、40 ppmでは 2%、80 ppmでは 29%、
120 ppmでは 100%と 死細胞の割合が増加しており
有意な細胞傷害性が認められた。

以上の結果から 亜塩素酸水は次亜塩素酸Naに比べて細胞に対する毒性が低く
ドデシル硫酸Naと同程度の人体にとって安全性が高い薬剤であると考えられる。

大規模食中毒予防への 亜塩素酸水の応用の可能性に関する検討

3報目では、大規模食中毒予防への亜塩素酸水の応用の可能性を検討する為に
実際の患者より単離したヒトノロウイルス（HuNoV）に対する
亜塩素酸水の不活化効果をリアルタイムPCR法を用いて確認

注）なお、本研究は 香川大学研究倫理審査委員会の許可を得て実施しています。

本研究では、ノロウイルス感染性胃腸炎と診断された2名の患者から便検体を採取しこれらをポリエチレングリコールを用いた遠心法によりヒトノロウイルス（HuNoV）を精製した。

この精製したヒトノロウイルス（HuNoV）からRNAを抽出し既報（Chhabra et al., 2019）に従い遺伝子タイピングを行った。

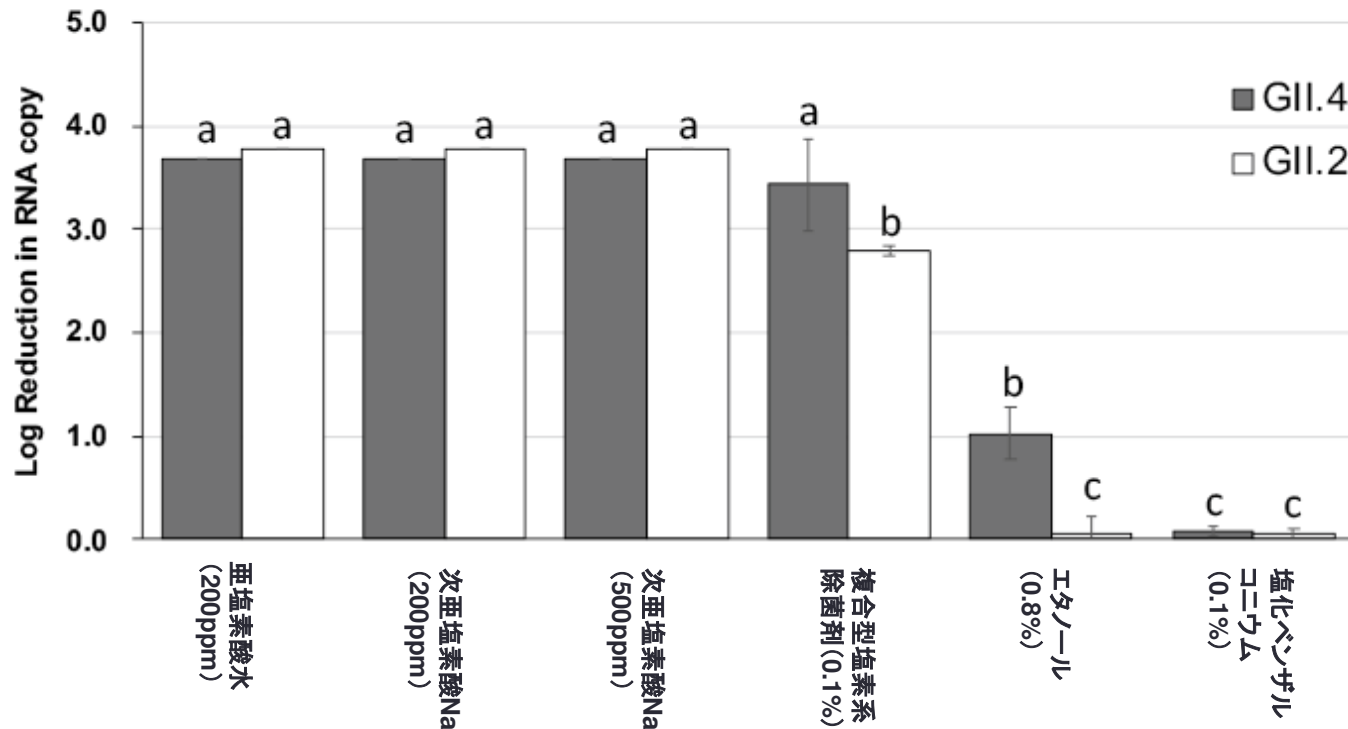
その結果、採取したヒトノロウイルス（HuNoV）はそれぞれGII.2およびGII.4の遺伝子グループに属するウイルス株であることがわかった。

そこで、この2つのウイルス株を用いて国内の医療関連施設で使用されている代表的な殺菌消毒薬 4 種と亜塩素酸水でヒトノロウイルス（HuNoV）に対する不活化効果確認試験を実施。

尚、この時の不活化効果は薬剤処理後のウイルス粒子から遊離したウイルスゲノムをRNA分解酵素（RNase）で除去しその残存コピー数をリアルタイムPCRで定量し評価した。

結果として

有機物非存在条件下において、ヒトノロウイルス（HuNoV）のゲノムRNAを検出限界である3 log以上減少できた薬剤は塩素系の殺菌消毒薬である亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムのみであった。



亜塩素酸水

※ 1)
次亜塩素酸ナトリウム

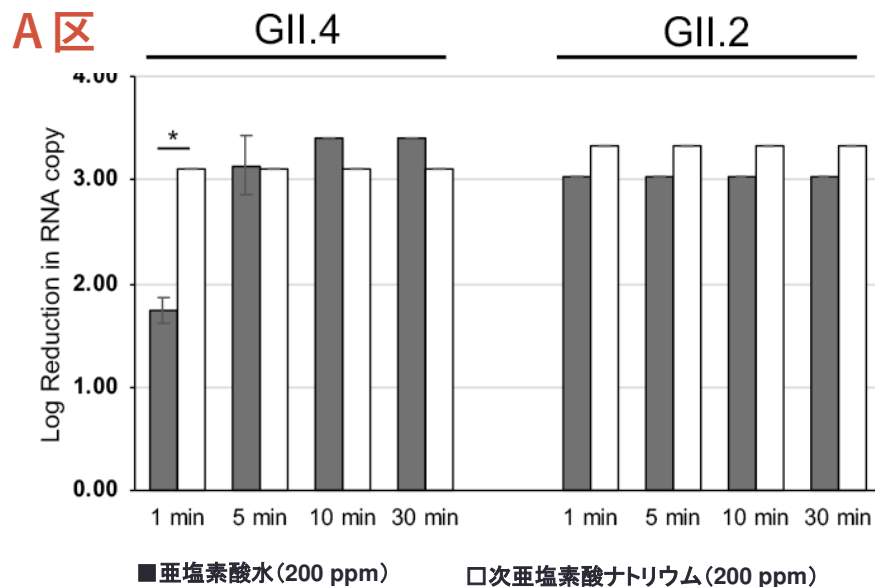
※ 1)
複合型塩素系除菌剤

※ 1)
塩化ベンザルコニウム

※ 1) 国内医療機関で使われている
代表的な殺菌消毒薬

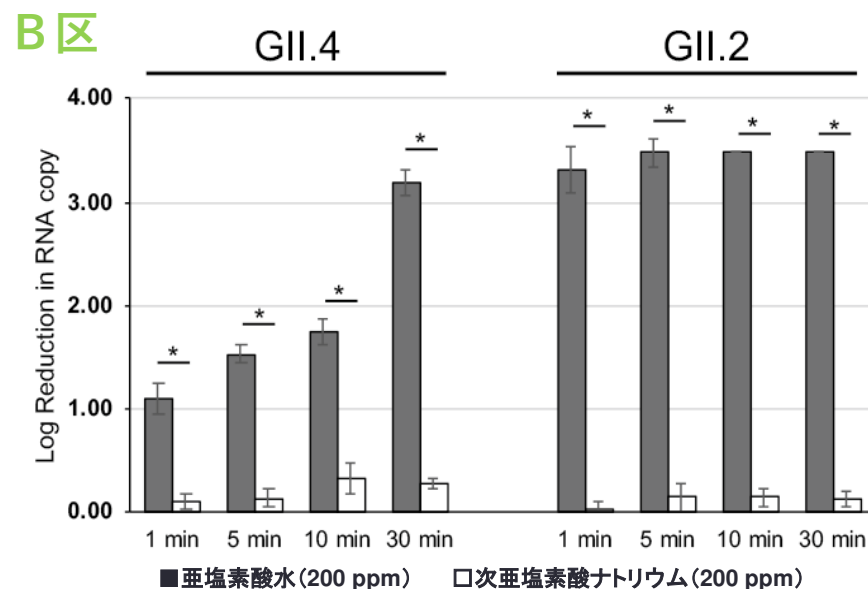
※異なるアルファベットでラベルした試験区間では
統計学的な有意差あり ($p < 0.05$)

遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水と次亜塩素酸ナトリウムが
ヒトノロウイルス（HuNoV）のRNAコピー数を3 log以上減少させるのに要する時間を検証。



A区：有機物非存在条件下であれば 遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水でも 同じ200 ppmの次亜塩素酸ナトリウムでも5分以内の接触時間で GII.4 およびGII.2 いずれのウイルス株のRNAコピー数も3 log以上減少させた。

* $p < 0.05$



B区：有機物負荷としてBSAが0.3%存在する条件下においても 同じく遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水は接触時間1分以内で GII.2ウイルス株のRNAコピー数を3 log以上減少させた。但し、GII.4ウイルス株のRNAコピー数を3 log以上減少させるためには30分以上の接触時間が必要になった。

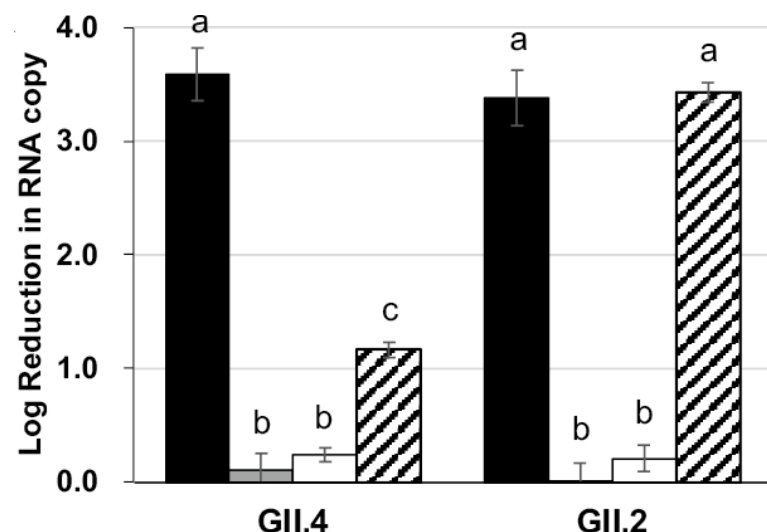
* $p < 0.05$

尚、その一方で 遊離塩素濃度200 ppmの次亜塩素酸ナトリウムは 同条件下において30分間処理しても、GII.2 およびGII.4 いずれのウイルス株に対しても不活化効果が認められず90%以上のウイルス粒子が損傷せず残存していた。

以上のことから 亜塩素酸水は 有機物存在条件下においても長時間ウイルスに対する不活化効果を維持できる薬剤であることが明らかとなった。

亜塩素酸水のヒトノロウイルス (HuNoV) に対する不活化効果に
嘔吐物の代替としてのポリペプトン (A区) と
糞便の代替としての肉エキス (B区) が及ぼす影響を検証。

A区：ポリペプトン 0.3%



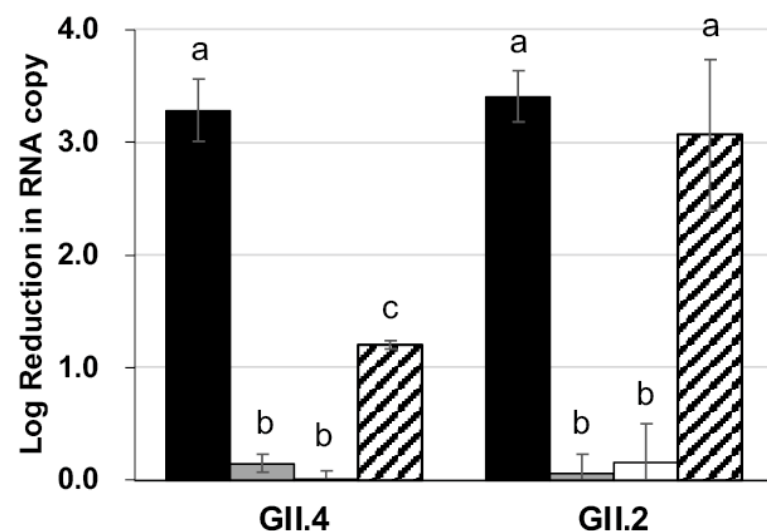
A区：→ 有機物負荷としてポリペプトン 0.3%存在条件下において遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水は GII.4 及び GII.2 いずれのウイルス株のRNAコピー数も30分以内に 3 log以上減少させた。

又、次亜塩素酸ナトリウムでも 1,000 ppm という遊離塩素濃度で処理すれば、この有機物存在条件下においても GII.2株に対する不活化効果は認められた。

しかし、GII.4株に対する効果は30分間という接触時間でも限定的であった。

※異なるアルファベットでラベルした試験区間では統計学的な有意差あり ($p < 0.05$)

B区：肉エキス 0.3%



B区：→ 有機物負荷として肉エキス 0.3%存在条件下においても遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水は、GII.4及び GII.2いずれのウイルス株のRNAコピー数も30分以内に 3 log以上減少させた。

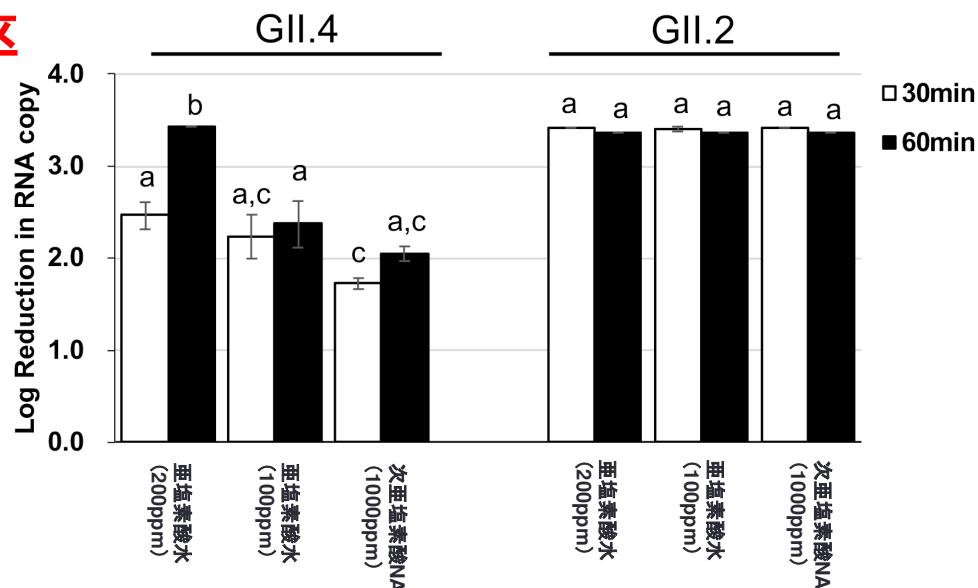
又、次亜塩素酸ナトリウムでも 1,000 ppmの遊離塩素濃度で処理すれば、この有機物存在条件下においても GII.2株に対する不活化効果は認められた。

しかし、同様に GII.4株への効果は30分間という接触時間でも限定的であった。

※異なるアルファベットでラベルした試験区間では統計学的な有意差あり ($p < 0.05$)

高度汚染環境を模擬した条件下における亜塩素酸水のヒトノロウイルス(HuNoV)に対する不活化効果を検証。

A区



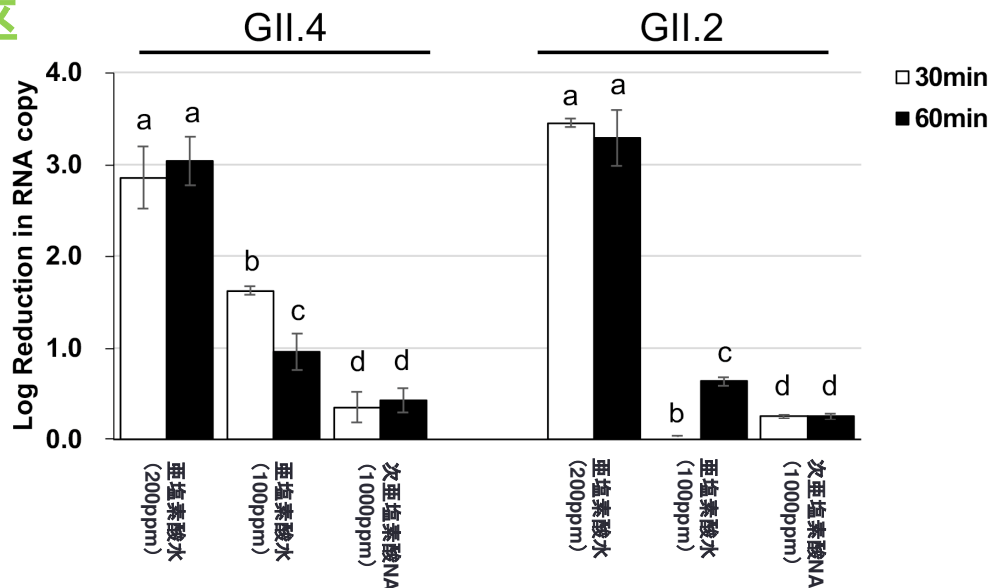
結果として…

A区の下においても
遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水は
60分以内に GII.4およびGII.2いずれの
ウイルス株のRNAコピー数も
3 log以上減少させた。

一方、遊離塩素濃度1,000 ppmの次亜
塩素酸ナトリウムであれば
GII.2ウイルス株には 亜塩素酸水と
同等の効果が得られた。
しかし、GII.4ウイルス株に対する効果
は限定的であった。

※異なるアルファベットでラベルした試験区間
では統計学的な有意差あり ($p < 0.05$)

B区



B区の下においては
遊離塩素濃度200 ppmの亜塩素酸水なら
30分という接触時間でGII.4およびGII.2
いずれのウイルス株も3 log以上減少した。

しかし、次亜塩素酸ナトリウムは、
遊離塩素濃度1,000 ppmでも
その効果は限定的であった。

※異なるアルファベットでラベルした試験区間
では統計学的な有意差あり ($p < 0.05$)

以上のことから 200 ppmの亜塩素酸水のヒトノロウイルス (HuNoV) に対する不活化効果は
有機物存在条件下において比較的安定しており、
次亜塩素酸ナトリウムよりも優れた不活化効果を発揮できる薬剤であると考える。

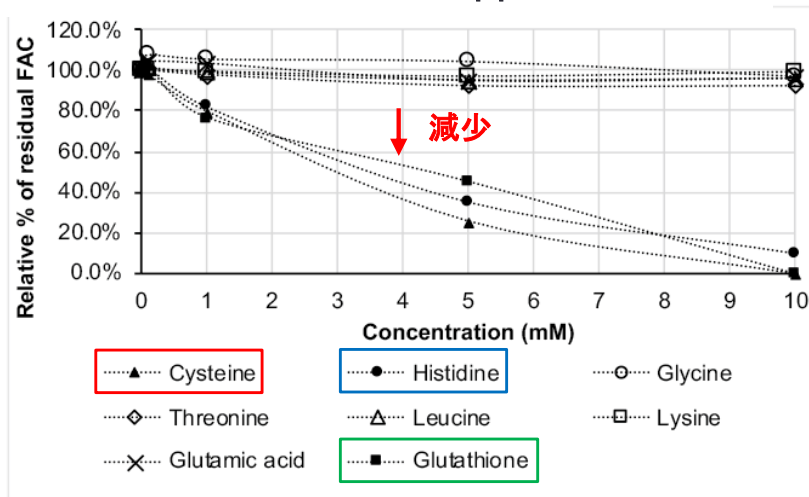
※なお、日本環境感染学会公表の
『環境消毒薬の評価指針』によ
ると、高度汚染環境を模擬する条件
としてウシ血清アルブミン (BSA)
とヒツジ赤血球をそれぞれ
0.3%ずつ添加した条件下に
おける試験が推奨されている。
このことから、
A区では有機物負荷として、
BSA0.3% + ヒツジ赤血球0.3%
存在条件下で確認

※又、日本食品衛生協会指針に
よると、ヒト排泄物を模擬する
条件として ポリペプトン0.5%
で試験し評価するべきであると
記されている。
このことから、
B区では有機物負荷として、
ポリペプトン0.5%存在条件下
で確認

亜塩素酸水が有機物中でも安定して微生物不活化効果を示す理由を明らかにするべく
アミノ酸とグルタチオンに対する反応性を検証。

まず、遊離塩素濃度100 ppmの亜塩素酸水と同じく 100 ppmの次亜塩素酸ナトリウムを
各種アミノ酸とグルタチオンに10分間接触させた後 残存している遊離塩素濃度を測定。

A区 <亜塩素酸水> 100 ppm



結果として

A区：亜塩素酸水については

シスチン

ヒスチジン

グルタチオン の3つに反応し 遊離塩素濃度が減少。

しかし、

グリシン

スレオニン

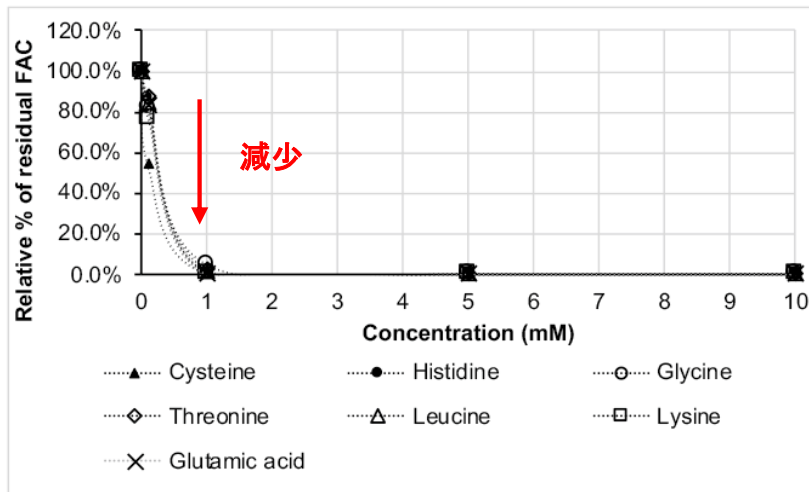
ロイシン

リジン

グルタミン酸には反応せず

遊離塩素濃度の減少は認められなかった。

B区 <次亜塩素酸ナトリウム> 100 ppm



一方でB区：次亜塩素酸ナトリウムは
試験に用いたすべてのアミノ酸と反応し
遊離塩素濃度は速やかに検出限界以下にまで減少。

以上の結果から 次亜塩素酸ナトリウムは 非特異的にすべてのアミノ酸と反応し
亜塩素酸水は 特定のアミノ酸と選択的に反応することが示唆された。

結論（まとめ）

1. 亜塩素酸水は、有機物存在下においても消毒薬に抵抗性を示すノンエンベロープウイルスや細菌芽胞に対してすぐれた不活化効果を示し、その効果は次亜塩素酸ナトリウムと同等もしくはそれ以上であった。
2. 亜塩素酸水は、有機物との接触により遊離塩素濃度が一過性に低下するが、サイクル反応によって亜塩素酸イオンからその主たる有効成分である亜塩素酸の活性種：塩素過酸化ラジカルを新たに生成できる機能を持つと考えている。
3. 亜塩素酸水の微生物不活化効果に及ぼす要因として、薬剤調製に用いる溶媒や共存タンパク質は特に重要であることが明らかとなった。
4. 亜塩素酸水は、有機物存在下においても大規模食中毒の原因ウイルスであるヒトノロウイルスを効率的に不活化できることが明らかとなった。尚、この安定性は微生物構成成分に対する選択的な反応性に起因すると考えている。

今後の展望として

亜塩素酸水の持続的酸化力や選択的反応性は、ヒト排泄物で汚染された環境の消毒に有利であるというだけでなく、塩素による遺伝毒性をも低減できるのではないかと考えられ、今後、この亜塩素酸水をベースとする薬剤は医療現場や介護・福祉施設等における感染予防対策として、又、大規模食中毒の予防にも大いに貢献できる薬剤になり得ると期待している。

補足事項

これら3報の論文を根拠資料として、厚生労働省がHPで公開し、啓蒙している

『ノロウイルスに関するQ&A』に、また各省庁における感染症対策のマニュアルやガイドラインにも、この亜塩素酸水が掲載されました。

亜塩素酸水が、令和3年11月19日付けで厚生労働省発表の「ノロウイルスに関するQ&A」に追記されました。

亜塩素酸水使用方法（「ノロウイルスに関するQ&A」より抜粋）

	使用方法
調理台・調理器具の殺菌	亜塩素酸水（遊離塩素濃度25 ppm（含量 亜塩素酸として500 ppm以上））で浸漬又は浸すように拭く。
患者のふん便・吐ぶつ	ふん便、吐ぶつをペーパータオル等で拭き取り後、亜塩素酸水（遊離塩素濃度 25 ppm（含量 亜塩素酸として500 ppm 以上））で浸すように床を拭き取り、その後水拭き。 拭き取りに使用したペーパータオル等は、ビニール袋に密閉して廃棄。（この際、ビニール袋に廃棄物が充分に浸る量の亜塩素酸水（遊離塩素濃度 100 ppm（含量 亜塩素酸として2,000 ppm 以上））を入れる。）
汚染された布団・リネン	熱水洗濯が行える洗濯機がない場合には、亜塩素酸水の消毒が有効。また、下洗い場所を亜塩素酸水（遊離塩素濃度 25 ppm（含量 亜塩素酸として500 ppm 以上））で消毒後、洗剤を使って掃除をする。
感染者の使用した食器類	可能であれば食器等は、厨房に戻す前、食後すぐに亜塩素酸水に十分浸し、消毒する。また、食器等の下洗いや嘔吐後にうがいをした場所等も亜塩素酸水（遊離塩素濃度 25 ppm（含量 亜塩素酸として500 ppm 以上））で消毒後、洗剤を使って掃除。
環境の消毒	環境（ドアノブ、カーテン、リネン類、日用品など）からもウイルスが検出されます。亜塩素酸水などの使用が有効。 ステンレス以外の金属製品に付着するとサビや変色を起こすこともあります。

<https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20120402449>

亜塩素酸水掲載ガイドライン等一覧

	所管	文書名
新型コロナウイルス	厚生労働省 新型コロナウイルス感染症対策推進本部	新型コロナウイルス感染症に関するQ&A 新型コロナウイルスに関するQ&A(一般の方向け) 新型コロナウイルス感染症に関するQ&A 新型コロナウイルスに関するQ&A(医療機関・検査機関の方向け) 新型コロナウイルス感染症への対応について(在宅介護家族の皆さまへ) 在宅介護家庭の皆さま向けQ&A
	厚生労働省/経済産業省/消費者庁	新型コロナウイルスの消毒・除菌方法について(厚生労働省・経済産業省・消費者庁特設ページ)
	内閣府政策統括官(防災担当)付参事官(避難生活担当) 消防庁国民保護・防災部防災課長 厚生労働省健康局結核感染症課長 観光庁観光産業課長	避難所における新型コロナウイルス感染症への対応に関するQ&A(第3版)について
	厚生労働省 健康局 結核感染症課 医薬・生活衛生局 生活衛生課 経済産業省	新型コロナウイルス感染症により亡くなられた方及びその疑いがある方の処置、搬送、葬儀、火葬等に関するガイドライン
	厚生労働省 老健局	介護現場における感染対策の手引き(第2版)
	厚生労働省 子ども家庭局 保育課	保育所における感染症対策ガイドライン(2018年改訂版)(2021(令和3)年8月一部改訂)
	防衛省 統合幕僚監部	新型コロナウイルスから皆さんの安全を守るために
	環境省 環境再生・資源循環局 廃棄物適正処理推進課・廃棄物規制課	廃棄物処理における新型コロナウイルス感染症対策に関するQ&A(廃棄物処理を行う方向け)
	環境省 環境再生・資源循環局	廃棄物に関する新型コロナウイルス感染症対策ガイドライン
	農林水産省	食品産業事業者に新型コロナウイルス感染者が発生した時の対応及び事業継続に関する基本的なガイドライン(PR版)
		農業者に新型コロナウイルス感染者が発生した時の対応及び事業継続に関する基本的なガイドライン(PR版)
		畜産事業者に新型コロナウイルス感染者が発生した時の対応及び事業継続に関する基本的なガイドライン(PR版)
		木材産業事業者に新型コロナウイルス感染者が発生した時の対応及び事業継続に関する基本的なガイドライン(PR版)
		林業経営体に新型コロナウイルス感染者が発生した時の対応及び事業継続に関する基本的なガイドライン(PR版)
		漁業者に新型コロナウイルス感染者が発生した時の対応及び事業継続に関する基本的なガイドライン(PR版)
	農林水産省 北海道農政事務所 北海道現地対策本部	新型コロナウイルス感染症発生時の対応に係る農漁業、卸売市場関係者向けガイドライン(北海道版)について
	国立感染症研究所 国立国際医療研究センター 国際感染症センター	新型コロナウイルス感染症に対する感染管理(2021年8月6日改訂版)
	国土交通省 土地・建設産業局 建設業課	建設業における新型コロナウイルス感染予防対策ガイドライン(令和2年5月14日(令和3年5月12日改訂版))
	文部科学省 初等中等教育局 健康教育・食育課	学校における新型コロナウイルス感染症に関する衛生管理マニュアル ～「学校の新しい生活様式」～(2021.11.22 Ver.7)
	法務省 出入国在留管理庁	「入管施設における新型コロナウイルス感染症対策マニュアル【第4版】」
ノロウイルス	厚生労働省 医薬・生活衛生局 食品監視安全課 健康局 結核感染症課	ノロウイルスに関するQ&A
	厚生労働省 子ども家庭局 保育課	保育所における感染症対策ガイドライン(2018年改訂版)(2021(令和3)年8月一部改訂)
	文部科学省 初等中等教育局 健康教育・食育課 学校給食係	調理場における洗浄・消毒マニュアルPart1
		調理場における洗浄・消毒マニュアルPart2
腸管出血性大腸菌	厚生労働省 健康局 結核感染症課 医薬・生活衛生局 水道課/生活衛生課/審査管理課/食品監視安全課	腸管出血性大腸菌 Q&A

参 考 論 文

第 1 報 : Microbicidal effects of weakly acidified chlorous acid water against feline calicivirus and *Clostridium difficile* spores under protein-rich conditions.

PloS ONE. 12(5), e0176718 平成29年5月4日 公表

Hisataka Goda¹, Hitoshi Yamaoka^{1,2}, Haruyuki Nakayama-Imaohji², Hiroyuki Kawata¹, Isanori Horiuchi¹, Yatsuka Fujita¹, Tamiko Nagao³, Ayano Tada², Atsushi Terada⁴, Tomomi Kuwahara²

¹ Honbu Sankei Co. Ltd., 2-2-53 Shiromi, Chuou-ku, Osaka, Japan, ² Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kagawa University, 1750-1 Miki, Kagawa, Japan, ³ Faculty of Nursing, Shikoku University, Furukawa, Ojin-cho, Tokushima, Japan, ⁴ Department of Veterinary Medicine, Nihon University, Kameino, Fujisawa, Japan

第 2 報 : Characterization of virucidal activities of chlorous acid.

Jpn. J. Infect. Dis. 71(5), 333-337 平成30年4月27日 公表

Hisataka Goda¹, Keiko Ikeda², Mitsunori Nishide³, Tamiko Nagao⁴, and A. Hajime Koyama⁵

¹Honbu Sankei Co. Ltd., Osaka 540-0001; ²School of Health and Nursing Science, Wakayama Medical University, Wakayama 641-0011;

³Wakayama Shin-Ai Women's College, Wakayama 640-0341; ⁴Faculty of Nursing, Shikoku University, Tokushima 771-1192; and

⁵Department of Biology, Wakayama Medical University Graduate School of Medicine, Wakayama 641-0011, Japan

第 3 報 : Inactivation of human norovirus by chlorous acid water, a novel chlorine-based disinfectant.

J. Infect. Chemother. 28(1), 67-72. 令和3年10月9日 公表

Hisataka Goda^{1,2}, Haruyuki Nakayama-Imaohji³, Hitoshi Yamaoka^{1,3}, Ayano Tada³, Tamiko Nagao⁴, Tomohiko Fujisawa², A. Hajime Koyama³, Tomomi Kuwahara³

¹ Sankei Co. Ltd., 2-2-53 Shiromi, Chuou-ku, Osaka, Japan

² Laboratory of Food Hygiene, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University, 1-7-1, Kyonancho, Musashino-shi, Tokyo, 180-8602, Japan

³ Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Kagawa University, 1750-1, Miki, Kagawa, 761-0793, Japan

⁴ Department of Science for Human Health Welfare Care Major, Shikoku University Junior College