

*Original article***Antibacterial efficacy of stable sodium hypochlorite**

Kyle Haasbroek, Masayuki Yagi, Yoshikazu Yonei

Anti-Aging Medical Research Center and Glycative Stress Research Center,
Faculty of Life and Medical Sciences, Doshisha University, Kyoto, Japan

Glycative Stress Research 2022; 9 (2): 93-96
(c) Society for Glycative Stress Research

(原著論文：日本語翻訳版)

安定型次亜塩素酸ナトリウムの抗菌効果

ハースブルック・カイル、八木雅之、米井嘉一

同志社大学生命医科学部アンチエイジングリサーチセンター／糖化ストレス研究センター

抄録

安定型次亜塩素酸ナトリウム (s-SH, AirRish) の殺菌効果を黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) および表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) の浮遊菌液に対する *in vitro* 試験で評価した。5分間の暴露後、100 ppmと200 ppmのs-SHで両種のコロニー形成数が検出限界以下になり、6 log₁₀以上減少した ($p < 0.001$)。さらに、s-SHの抗菌効果は、手の除菌用途でも検討された。60秒間の手指消毒では、200 ppm s-SHは手のCFUを96%減少させ、典型的なアルコール消毒剤と同様の効果を示した ($p = 0.28$)。S-SHは試験濃度において、十分な殺菌効果を維持した。

KEY WORDS: 安定型次亜塩素酸ナトリウム、抗菌、除菌、黄色ブドウ球菌

はじめに

手洗いを頻繁に行うことは、病気の予防や伝染病の蔓延を防ぐために極めて重要である。しかし、洗剤による頻繁な手洗いは、角質層の保護蛋白質を損傷し、皮膚から有益な脂質を除去し、接触皮膚炎を引き起こす可能性がある¹⁾。繰り返しの手洗いによる刺激と乾燥は、皮膚にひびや割れを生じ、衛生的な習慣にもかかわらず、最終的には感染に対してより脆弱である。日常的に繰り返し使用する手指の消毒には、刺激が少なく効果的な方法として、除菌用アルコール系の手拭き紙²⁾、アルコール系の除菌液は、病原菌の除去効果は高いが、エモリエント剤を加えないと乾燥が著しいという欠点がある³⁾。また、イソプロパノールやn-プロパノールなどのアルコール類は、刺激性があり、角化細胞の機能を障害する可能性がある⁴⁾。エタノールは通常、皮膚刺激性はないが、アルデヒド脱水素酵素は過敏な人に紅斑を惹起することがある⁵⁾。さらに、現在進行中のSARS-CoV-2パンデミックの初期に発生したように、手洗い需要の高い時期には、製造およびサプライチェーンが除菌剤の高い需要に対応するのに苦労することがある。安全で刺激が少なく、効果的な手指消毒剤の供給が様々な施設で求められている。

次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) は、幅広い抗菌活性を持つ化合物で、病院や食品加工、家庭での洗浄や消臭に使用されている。また、水の除菌や歯内療法などの歯科治療など、様々な場面で使用されている。

NaClOは、高温、紫外線、酸素、有機汚染物質との接触で急速に劣化する。このため、NaClOの長期保存や実用化は困難であった。しかし、安定型次亜塩素酸ナトリウム (s-SH) 溶液は、冷暗所に保管することで劣化を抑え、保存期間を延ばすことができる、新規に開発された製剤である。s-SHは、工業用表面殺菌剤として1,000 ppmと2,000 ppmの濃度で使用され、その抗菌効果は十分に確立されている。

また、100 ppmと200 ppmの製剤は、個人の手指や皮膚の除菌、非工業的な表面の除菌に使用するために開発された。最近、我々は200 ppm s-SHの皮膚安全性を24時間のクローズドパス試験⁶⁾で評価し、s-SHの皮膚接触による副作用は観察されなかったことを報告した。これらの低濃度製剤の除菌効果については確認が必要である。本研究では、100および200 ppmのs-SHの殺菌効果を評価した。

方法

試験材料

100 ppmおよび200 ppmのS-SHは、エアリッシュ株式会社 (大阪) から提供された。陽性対照として、63.5 % エタノールと10.5 % イソプロパノールからなるアルコール溶液 (山善、大阪) を用いた。

In vitro 殺菌試験

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) (ATCC 12600) および表皮ブドウ球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) (ATCC 14990) の一晩ストックを Tryptic Soy Broth (Becton, Dickinson, and Company; MD, USA) 中で調製し、37°Cで250 rpmにて振盪のもと24時間培養した。100 ppm s-SH、200 ppm s-SH、アルコール、またはコントロールとして0.1 Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) の9.9 mLに、細菌ストックの100 μ Lアリコートを植菌した。溶液をボルテックスにて攪拌し、室温 (~25°C) で5分間インキュベートした後、中和し、0.1 Mリン酸バッファで連続希釈を行った。希釈液の100 μ L アリコートを Tryptic Soy Agar (Becton, Dickinson, and Company; MD, USA) に3連で播種し、37°Cで72時間培養後にコロニーカウントを実施した。

皮膚消毒試験

皮膚細菌叢の検体は、スワビングにより手指の皮膚から採取した。無菌綿製のサンプル採取用綿棒を抽出用緩衝液 (0.15 M NaCl および 0.01 % Tween 20) に浸し、掌の4 cm²の部分に10回しっかりとブラッシングし、直ちに播種した。除菌手指消毒は、欧州規格⁷⁾の修正プロトコルに基づき実施した。おおよそ3 mLの除菌液を手塗布し、60秒間手洗いの要領で皮膚に擦り込んだ。除菌後、前記のように追加の検体スワブを採取した。コロニー数計測を行う前に、プレートを37°Cで24時間インキュベートした。さらに48時間培養し、成長の遅いコロニーを観察した。コントロールの綿棒は、播種の前に抽出緩衝液に浸し、試験環境の空気に馴化した。

成果

試験管内殺菌効果

すべての試験液は、浮遊性の *S. aureus* と *S. epidermidis* に対して強い殺菌活性を示した (Fig. 1)。初期濃度約 4×10^8 CFU/mL (*S. aureus*) および約 6×10^8 CFU/mL (*S. epidermidis*) の細菌ストックは、除菌溶液に暴露後、生存細菌が完全に消失した。どの希釈率でもコロニーは観察されず、最小検出レベルは100 CFU/mLで、コントロールと比較して少なくとも6 log₁₀の減少に相当した。5分間の暴露で、s-SHは100 ppmと200 ppmの両濃度で、アルコールラブレックスと同等のin vitro殺菌効果を示した。

皮膚の除菌

手指消毒の直前、サンプリングした皮膚には 178.4 ± 127.3 CFUの平均微生物数が見られた。塗布と洗浄の後、すべての溶液で皮膚のコロニー形成単位が大幅に減少することが示された (Fig. 2)。100 ppm s-SH hand rubは81%

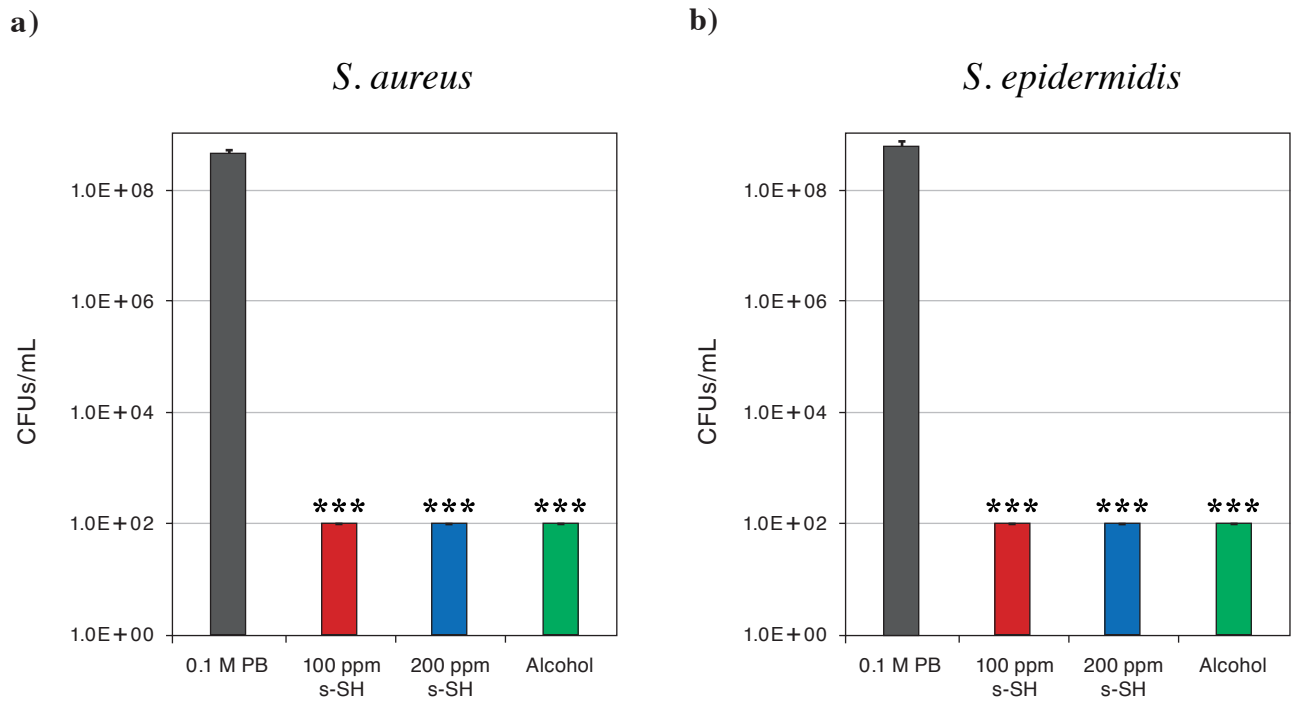


Fig. 1. In vitro bactericidal efficacy.

Cell viability of *S. aureus* (a) and *S. epidermidis* (b) after 5-minute exposure to sanitizing solutions. 1.0E+02 CFUs/mL (100 CFU/mL) is the theoretical minimum detection limit, although no viable colonies were observed. n = 3, mean ± SD. Statistical difference calculated by Student's t-test, *** p < 0.001. CFUs, colony forming unit; SD, standard deviation.

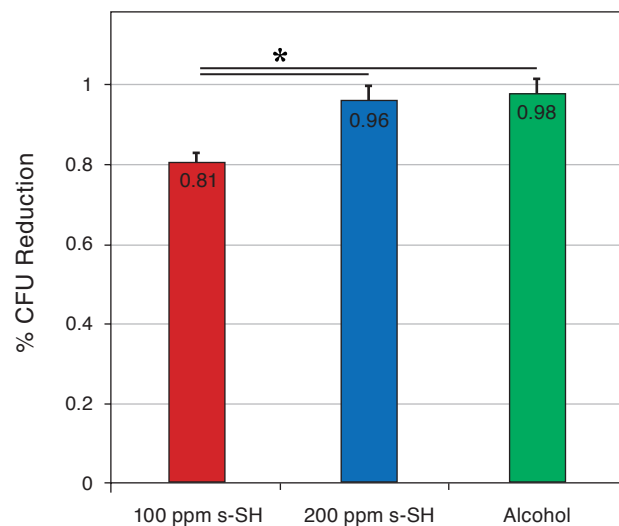


Fig. 2. Reduction of CFUs after sanitizing hand rub.

Percent reduction in colony forming units after 60-second hand rub with 3 mL of sanitizing solution. n = 3, mean ± SD. Statistical difference calculated by Student's t-test, * p < 0.01. CFUs, colony forming units; SD, standard deviation.

のCFU減少を示し、200 ppm s-SHの96%とアルコール溶液の98%に比べ有意に少なかった(それぞれ $p < 0.01$)。200 ppm s-SHとアルコール溶液の効果に有意差はなかった($p = 0.28$)

考察

殺微生物作用のメカニズム

NaClOは洗浄剤、殺菌剤として長い歴史がある。殺微生物作用は十分に確立されているが、そのメカニズムは近年まで不明な点が多かった。NaClOは脂質、DNAを損傷し、必須酵素の活性を阻害する⁸⁾。溶液中のNaClOは、pHに依存して濃度の異なる次亜塩素酸(HClO)を形成、これが主要な殺微生物剤となる。HClOは細菌膜に浸透し、細菌の必須な蛋白質を変性させ、細胞内に凝集体を形成する⁹⁾。

皮膚の除菌実験

試験前の皮膚の常在細菌数は試験ごとに大きく異なり、除菌液の抗菌効果は、微生物量の多い皮膚に対してより顕著に現れ、CFUの減少をより大きいことが示された。試験時の基準菌量が少ない皮膚では、最終的なCFU数が少ないにもかかわらず、CFUの減少率が少なくなる(例えば、洗浄後に3 CFUが1まで減少する)。そのため、試験前の基準CFUが極端に低い(10以下)検体は、分析から除外した。

現在進行中のSARS-CoV-2感染症の流行のため、通常よりも厳しい衛生基準と手指消毒が順守されており、これが消毒前の皮膚のCFU数が通常よりも低いことの原因と

して説明できる。同じ理由で、乾燥性アルコールベースの手指消毒剤の繰り返し使用と頻繁な手洗いにより、乾燥肌と骨折肌の発生率が増加している¹⁰⁾。そのため、手の皮膚の開放創を介した感染の危険性から、除菌前に細菌ブロスで手を直接汚染すること(より高い細菌濃度に対する有効性を示すことができる試験)は避けることにした。したがって、今回は、除菌効果は手指の常在菌に対する試験のみ施行した。

結論

100 ppmおよび200 ppm濃度の安定型次亜塩素酸ナトリウムは、皮膚に安全に使用でき、強い抗菌活性を示した。細菌液中のs-SHに暴露すると、接触時間5分以内に*S. aureus* および*S. epidermis*ともに生存細菌が完全に消失した。皮膚の除菌用途では、s-SHは手の皮膚上のコロニー形成単位を有意に減少させ、その効果は200 ppmの濃度でアルコールベースの溶液と有意な差はなかった。本試験品はアルコール製品と同等の滅菌作用を有する消毒薬である可能性が示唆された。

利益相反申告

本研究を施行するにあたりエアリッシュ株式会社より支援を受けた。

参考文献

- 1) Rundle CW, Presley CL, Militello M, et al. Hand hygiene during COVID-19: Recommendations from the American Contact Dermatitis Society. *J Am Acad Dermatol*. 2020; 83: 1730-1737.
- 2) Pedersen LK, Held E, Johansen JD, et al. Less skin irritation from alcohol-based disinfectant than from detergent used for hand disinfection. *Br J Dermatol*. 2005; 153: 1142-1146.
- 3) Löffler H, Kampf G, Schermund D, et al. How irritant is alcohol? *Br J Dermatol*. 2007; 157: 74-81.
- 4) Cartner T, Brand N, Tian K, et al. Effect of different alcohols on stratum corneum kallikrein 5 and phospholipase A2 together with epidermal keratinocytes and skin irritation. *Int J Cosmet Sci*. 2017; 39: 188-196.
- 5) Okazawa H, Aihara M, Nagatani T, et al. Allergic contact dermatitis due to ethyl alcohol. *Contact Dermatitis*. 1998; 38: 233.
- 6) Haasbroek K, Hashimoto M, Yokota S, et al. Safety verification of stable sodium hypochlorite by 24-hour closed patch test method. *Glycative Stress Res*. 2021; 8: 110-114.
- 7) Rotter ML. European norms in hand hygiene. *J Hosp Infect*. 2004; 56(Suppl 2): S6-9.
- 8) Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci*. 2006; 11: 147-157.
- 9) Winter J, Ilbert M, Graf PC, et al. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell*. 2008; 135: 691-701.
- 10) Darlenski R, Tsankov N. COVID-19 pandemic and the skin: What should dermatologists know? *Clin Dermatol*. 2020; 38: 785-787.