

最近の技術

次亜塩素酸ナトリウムを用いた 洗浄・殺菌操作の理論と実際

福 崎 智 司*

1. はじめに

現在、食品の製造現場では次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) を用いた洗浄・殺菌操作が頻繁に行われている。次亜塩素酸ナトリウムは、酸化作用を有するアルカリ性の溶液であり、1950年に殺菌料として食品添加物に指定されたことから、食品（原材料、製品）への適用が可能である。また、設備や機器に対しては、有効範囲内では制限無く使用することができる薬剤である。（図1）に、次亜塩素酸ナトリウムの長所と短所をまとめた。次亜塩素酸ナトリウムの利便性は、理想的な殺菌剤の要件を数多く満たしていることに加えて、洗浄、漂白、脱臭作用を

有していることである。洗浄剤としての使用では、次亜塩素酸ナトリウムは、他のアルカリ剤、界面活性剤、イオン封鎖剤等の洗浄力要素との組み合わせが容易なことも汎用される理由である。一方、次亜塩素酸ナトリウムは強力な洗浄・殺菌作用を有するがゆえに不利益を与える事項も有している。しかし、これらの留意点を十分に認識して使用しさえすれば、次亜塩素酸ナトリウムの長所を有効に活用することができる。

実際の製造現場では、次亜塩素酸ナトリウムを利用して有機物汚れの除去（洗浄）と微生物制御（殺菌）を単一の工程で実施する場合も少なくない。しかし、次亜塩素酸ナトリウムによる洗浄と殺菌の作用機序は本来異なるものであり、個々のメカニズムを正しく理解していなければ、不適当な使用がなされたり、過剰な効果を期待されたりする危険性がある。昨今では、希薄な食塩水や塩酸を電気分解して製造する次亜塩素酸水（強酸性・微酸性電解水）や電解次亜水、そして次亜塩素酸ナトリウムと酸性溶液を水道水に混合希釈して製造する弱酸性の次亜塩素酸水溶液（弱酸性次亜水）の使用が普及し始めている。これらの次亜塩素酸含有水溶液の主たる洗浄因子または殺菌因子はいずれも次亜

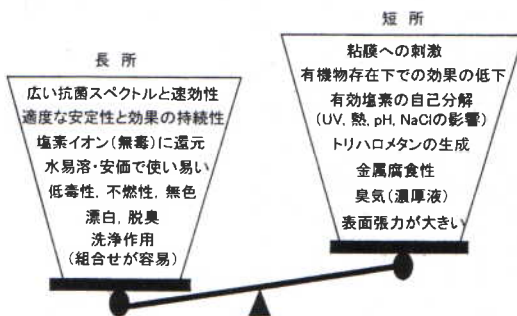


図1 殺菌剤としての次亜塩素酸ナトリウムの長所と短所

*Satoshi Fukuzaki：岡山県工業技術センター 研究開発部化学・新素材グループ長，〒701-1296 岡山市北区芳賀5301，TEL 086 (286) 9612

塩素酸である。単純に考えれば、作用因子となる化学種とその濃度が同一であれば洗浄・殺菌作用も同等となるはずである。ところが、実際には各水溶液のpHの違いにより洗浄と殺菌の効力は大きく異なる。それゆえ、次亜塩素酸ナトリウムの化学的性質と洗浄・殺菌機序を十分に理解していなければ本来の洗浄・殺菌作用を有効に引き出すことはできない。

本稿では、次亜塩素酸ナトリウムの主成分である次亜塩素酸 (HOCl) と水酸化ナトリウム (NaOH) を基盤とする洗浄メカニズムおよび殺菌メカニズムの理論について解説するとともに、次亜塩素酸水ならびに弱酸性次亜水の有効な利用方法について触れてみたい。

2. 次亜塩素酸ナトリウムの製造方法と主成分

次亜塩素酸ナトリウムは、工業的には水酸化ナトリウム溶液に塩素ガスを吸収させる連続発熱反応方式 (工業用次亜塩素酸ナトリウム) または冷却反応方式 (精製次亜塩素酸ナトリウム) により製造されている。



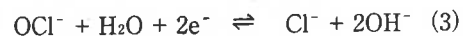
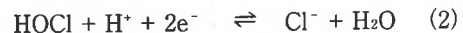
一般に、市販品の次亜塩素酸ナトリウム液は、遊離有効塩素 (Free available chlorine: FAC) 濃度 5~12%, pH12.5~13.5の強アルカリ性溶液である。次亜塩素酸ナトリウム溶液の主成分は、次亜塩素酸と水酸化ナトリウムであり、いずれも解離型 (イオン型) として存在する。医薬品や食品添加物に使用される次亜塩素酸ナトリウムは、(1) 式で副生するNaClや微量の不純物を除去した後に、商品化されている。青果物や食器・調理器具類の消毒には、FAC濃度が50~200ppm (pH 8~10) となるように希釈された次亜塩素酸ナトリウム液が使用されている。遊離有効塩素は、紫外線や温度により自己

分解が促進されるため、冷暗所での保管が必要である。

3. 次亜塩素酸の化学的特性

3.1 酸化作用

次亜塩素酸 (HOCl) の第一の特性は、酸化作用を示すことである。次亜塩素酸は、水分子 (HOH) の1つの水素 (H) が塩素 (Cl) に置換された物質である。HOCl分子中の塩素原子の酸化数は+1であり、 Cl^+ として強い求電子種として作用する^{1,2)}。すなわち、 Cl^+ はC=C, C=N, C-N (ペプチド結合を含む), $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ 等の電子密度の高い結合部位 (δ^-) を選択的に攻撃することになる。その結果、 Cl^+ は他の物質から2個の電子 ($2e^-$) を奪い、自ら Cl^- となる過程で殺菌、洗浄、漂白、脱臭などの作用を示す (図2)。この電子を引き抜く反応が酸化であり、その強さがいわゆる酸化力と呼ばれるものである。HOClと OCl^- の標準還元電位 (E_0) は、各々1.48V (2式) と0.81V (3式) である³⁾。



HOClと OCl^- の求電子性は、オゾン等の酸化剤の特性と同じである。オゾンともっとも異なる点は、HOClと OCl^- 分子は相対的に安定であるため、反応種としての持続性に優れることである。

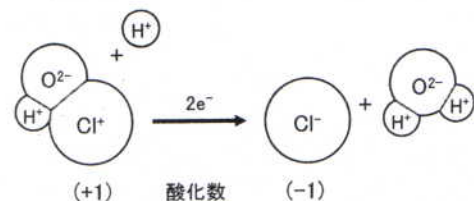


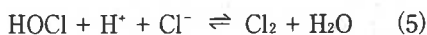
図2 次亜塩素酸分子の酸化反応における塩素の酸化数

3.2 解離特性

次亜塩素酸の第二の特性は、弱酸であり（解離定数 $pK_a = 7.5$, 25°C ）⁴⁾、溶液のpHに依存して OCl^- と H^+ に解離することである。



(図3)に、非解離型次亜塩素酸 (HOCl) の存在比率と溶液のpHの関係を示す。たとえば、通常の使用濃度に希釈された次亜塩素酸ナトリウム溶液は弱アルカリ性 ($\text{pH}8\sim10$) であるため、次亜塩素酸は主として OCl^- として存在する。pHがアルカリ性から酸性側に傾くと、 OCl^- は徐々にプロトン化して非解離型となる。次亜塩素酸の pK_a は7.5であることからpH7.5において HOCl と OCl^- の比率は1:1となる。弱酸性領域 ($\text{pH}4\sim6$) では、非解離型の HOCl が高比率で存在する。さらにpHが酸性側に傾くと、 HOCl の一部は溶存塩素 (Cl_2) に変化する。



HOCl の解離平衡成分である HOCl , OCl^- , Cl_2 はいずれも殺菌効力を有しており、これらを総称して遊離有効塩素 (FAC) という。これに対して、遊離有効塩素がアンモニアや有機アミンと反応して生成したモノクロラミン (NH_2Cl) のように、酸化力を有する塩素化窒素化合物を総称して結合有効塩素 (あるいは結合残留塩素) という。FAC成分のうち、 Cl_2 は

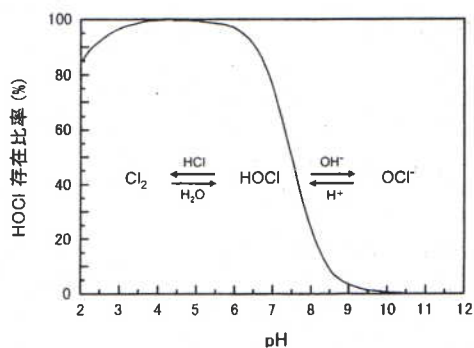


図3 遊離有効塩素の化学平衡とpHの関係

飛散して消失する速度が速く不安定なため、洗浄・殺菌操作は HOCl と OCl^- が主体となるpH領域で実施されている。このpHに依存した HOCl と OCl^- の存在比率が、洗浄および殺菌効果を支配している²⁾。

4. 次亜塩素酸ナトリウムの殺菌特性

4.1 膜透過性と殺菌活性

次亜塩素酸ナトリウムの希薄水溶液 ($\text{pH}7.5\sim10$) および弱酸性水溶液 ($\text{pH}5\sim6.5$) の殺菌効果は、全遊離有効塩素濃度ではなく非解離型 HOCl の濃度に強く依存する⁵⁻⁷⁾。これは、微生物細胞内部への HOCl の透過性と密接に関係している。

(図4)に、細菌(原核細胞)における HOCl の膜透過性と殺菌機構のモデル図を示す²⁾。一般に、細胞の最外部の周囲には細胞壁があり、その内側に形質膜と呼ばれる生体膜がある。細胞壁は厚く丈夫な構造体であるが、イオンや低分子量の親水性分子を容易に透過させる。一方、形質膜はリン脂質二重層(内部に脂肪酸の疎水性層を形成)を基本構造としており、イオンや低分子量分子の透過を妨げる。そのため、イオン化した OCl^- はこの形質膜にある脂質二重層を透過することができない。 OCl^- は、細胞

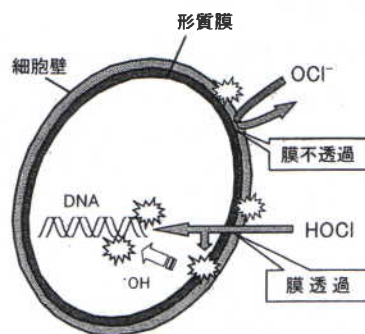


図4 HOCl の膜透過性と殺菌機構の概念図 (文献2を一部改変)

壁や形質膜の外側から酸化作用を及ぼし損傷を与えることになる。また、結核菌のように細胞壁内に長鎖脂肪酸（ミコール酸）を有する種属は、細胞壁も OCl^- の進入を妨げるため次亜塩素酸に対して耐性を示す。一方、非解離型の HOCl は、小さい分子サイズと電気的中性の性質から、受動拡散により容易に細胞壁と形質膜を透過する。細胞の内部に進入した HOCl は、形質膜での膜輸送系をはじめ、細胞質（解糖、TCAサイクル）および形質膜（電子伝達系）に存在する酵素系、核酸（DNA, RNA）などの必須組織に対して酸化作用を及ぼすことになる。その結果、 OCl^- と比較して、 HOCl による生細胞および芽胞の殺菌速度および効果は著しく大きくなる。

また、 HOCl の細胞内への透過（受動拡散）は細胞質内での解離による H^+ 濃度の増加（pHの低下）をもたらす。細菌細胞は、細胞質内外の ΔpH を維持するため、ATPの加水分解を伴って H^+ を細胞外へ排出するが、これにより細胞の生育や代謝に必要なATPが浪費される。その結果、弱酸である HOCl は ΔpH や酸化的リン酸化のアンカプラーとして働き、増殖阻害（静菌効果）を示す作用も予測されている²⁾。

4.2 殺菌活性の指標

一般に、消毒剤による微生物の不活化においては、消毒剤の濃度と作用時間が不活化効率を決める主要な変数となる。不活化過程を速度論的に解析するためのモデルとして、Chick-Watsonの法則^{8, 9)}が最も一般的に用いられている：

$$\log(N/N_0) = -kCT \quad (6)$$

ここで、 N_0 は微生物の初発生菌数、 N は時間 T における生菌数、 C は消毒剤の濃度、 k は一次不活化速度定数である。消毒剤の濃度の項(C)

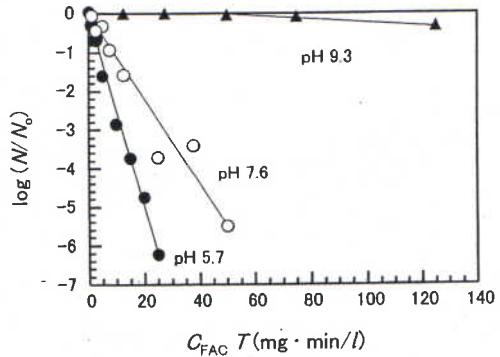


図5 次亜塩素酸ナトリウムによる*P. fluorescens*の殺菌に及ぼすpHの影響 (C_{FAC} : 全FAC濃度)

は、適合パラメータを用いて C^0 と表されることがあるが、実験室レベルの殺菌試験では $n=1$ となることが多く、 $\log(N/N_0)$ vs CT のグラフは直線関係（疑似一次反応）で表されることが多い。この図から、初発生菌数を一定割合（99～99.99%）減少させるのに必要な CT 値や k 値を求めることができる。これらの CT 値や k 値の概念は、殺菌効力の指標として用いられている。

（図5）に、*Pseudomonas fluorescens*をFAC濃度2.5ppm、pH 5.7, 7.6, 9.3に調整した次亜塩素酸ナトリウム水溶液で処理したときの $\log(N/N_0)$ vs $C_{\text{FAC}} T$ の関係を示す⁷⁾。ここで、 C_{FAC} は、全遊離有効塩素濃度である。いずれのpHに対しても、(6)式に従って直線的な生残曲線が得られており、pHが弱アルカリ性から弱酸性に低下するほど、不活化速度が大きいことがわかる。この図から、pH 7.6において生菌数を3桁（3 log）減少させるのに必要な CT 値は、pH 5.6の場合の CT 値の約2.2倍大きい値となる。

（図6）は、（図5）の各pHにおける非解離型 HOCl 濃度(C_{HOCl})を算出し、生残率を $C_{\text{HOCl}} T$ の関数として整理し直した結果である⁷⁾。面白いことに、異なるpHで得られた生残率は、一本

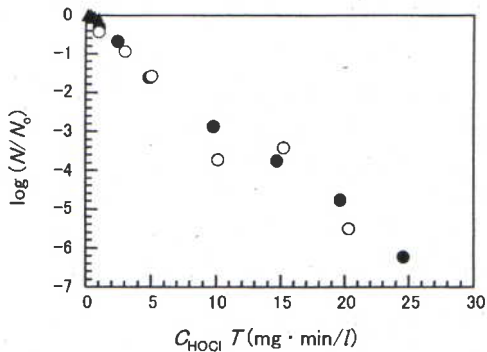


図6 *P. fluorescens*の殺菌におけるHOCl濃度依存性
(C_{HOC} : 非解離HOCl濃度)

の直線上に載ることがわかる。すなわち、殺菌作用に及ぼすpHの影響は、HOClの存在比率に及ぼすpHの影響と等価であることを示している。同様な結果は*Bacillus*属の芽胞に対しても得られている^{5, 10)}。

HOClの殺菌効果は、温度の上昇とともに著しく増加する。(図7)に、pH5.7に調整した次亜塩素酸ナトリウム水溶液(FAC濃度: 2.5 ppm)を用いて15~40°Cで*P. fluorescens*を殺菌処理した時の生残曲線を示す。いずれの温度においても、(6)式で表される擬似一次反応に従って直線的な生残曲線が得られている。また、温度が増加するとともに不活化速度は顕著に大

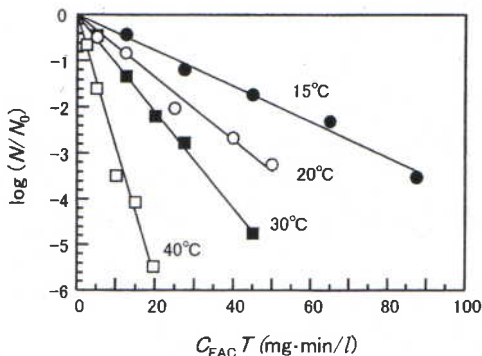


図7 次亜塩素酸ナトリウム (pH 5.7) による
*P. fluorescens*の殺菌における温度の影響
(C_{HOC} : 非解離HOCl濃度)

きくなることがわかる。各温度で得られた一次不活化速度定数 k 値はArrhenius型の温度依存性を示し、見掛けの活性化エネルギー(E_a)は約60 kJ/mol、殺菌温度が10°C上昇する毎に k 値は約2.2倍増加すると概算される¹¹⁾。*Mycobacterium* spp. (pH 7)¹²⁾や*Bacillus subtilis* spore (pH 6, 11)^{13, 14)}に対する k 値もArrhenius型の温度依存性に従うことが知られており、得られた E_a 値(45~80 kJ/mol)は、おおよそ化学反応の熱依存性に相当する値である。このことから、HOClの細胞内への透過(拡散過程)は、相対的に速やかに起こり、その後の細胞内での酸化反応による損傷過程が殺菌機構の律速となっているものと推測される。おそらくは、細胞内での抗酸化性物質による防御作用の存在が、HOClによる致死効果を遅らせていると考えられる。

4.3 次亜塩素酸による損傷

細胞内では、求核性部位を有する分子であるポルフィリン、ヘム、フェレドキシン様の鉄-硫黄中心、プリンおよびピリミジンの塩基、アミン、アミノ基、スルフヒドリル(-SH)基等がHOClや OCl^- の求電子(酸化)攻撃を受けやすい¹⁵⁾。例えば、大腸菌に対するHOClの酸化ストレスにおいては、-SH酵素の触媒活性の低下やグルタチオンのような抗酸化性物質の減少が殺菌作用の結果として起こる¹⁵⁻¹⁷⁾。-SH基は、タンパク質のシステイン残基に存在し、タンパク質構造の維持、酸化還元電位の調節、酵素活性等の役割を担っている。呼吸系酵素群には-SH酵素が多いため、細胞内に進入したHOClは-SH基を酸化して酵素活性を失活させる。HOClによる阻害は、酸化的リン酸化¹⁸⁾、ATP生成/利用が関与する代謝経路¹⁹⁾、その他の膜関連機能²⁰⁾において起こる。また、HOCl

はヌクレオチド塩基の塩素化誘導体を生成してDNAの損傷を引き起こす^{16, 21)}。以上の阻害機構を総合すると、HOClの主要な殺菌作用は、①必須酵素や抗酸化物質の-SH基の酸化と、②DNA合成における致命的損傷が単独あるいは複合して起こる結果であると要約される。

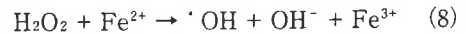
4.4 活性酸素種の寄与

HOClによる酸化ストレスにおいて、細胞内で発生する過酸化水素や(H₂O₂)やヒドロキシラジカル(・OH)が殺菌メカニズムに関与していることが示唆されている^{16, 22)}。たとえば、電子伝達系による酸化的リン酸化では、O₂が1電子還元を受ける過程で種々の活性酸素種が生成する。

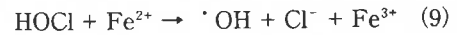


(7)式の反応は、原核細胞では形質膜で行われる(真核細胞ではミトコンドリア内膜)。生成したO₂⁻は、スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)によりH₂O₂に変換され、さらにH₂O₂はカタラーゼあるいはペルオキシダーゼによりH₂Oに変換される。(7)式ではH₂O₂がH₂Oに変換される過程で・OHが生成することになっているが、通常はカタラーゼとペルオキシダーゼの触媒作用により・OHの蓄積を抑制している。しかし、これらの抗酸化酵素の活性がHOClにより阻害を受けると、O₂⁻とH₂O₂が蓄積することになる。O₂⁻は生体膜の透過性はほとんどないと言われているが、H₂O₂は形質膜を容易に通過するため、蓄積したH₂O₂は細胞質にも放出される。一方、HOClは膜内在の電子伝達体である鉄含有ヘム・非ヘムタンパク質を攻撃し、Fe²⁺の遊離をもたらし²³⁾。遊離したFe²⁺はH₂O₂と反応して反応性の高い・OHを生じる(8式:Fenton反応)。この・OHが、DNAや酵素、その他の細胞組織を直接攻撃す

る(図4参照)。



また、好中球では非解離HOClがFe²⁺と反応して・OHを生じる反応も報告されている²⁴⁾。



(8)式と(9)式で生成したFe³⁺は、O₂⁻により再びFe²⁺に還元される(Haber-Weiss反応)ことが真核細胞で見出されている。このように、HOClの殺菌作用は、HOClの酸化反応(一次損傷)に加え、副生成する・OHの酸化反応(二次損傷)にも起因すると推定されている²⁾。

4.5 濃厚溶液の殺菌作用

次亜塩素酸ナトリウムの濃厚液(pH>12.5)では、OH⁻とOCl⁻の相加・相乗作用により殺菌作用を示す(このpH領域では、FAC濃度>10,000ppm)。高濃度のOH⁻は、細胞壁や形質膜を構成する物質、例えばムコ多糖、タンパク質、リン脂質、不飽和脂肪酸等を局所的に分解し、細胞構造に変化を与える。そして、細胞内に進入しやすくなったOCl⁻は、必須酵素のSH基やアミノ基を酸化して触媒機能を阻害するものと考えられる²⁵⁾。また、水酸化ナトリウム(1.5~4%)と次亜塩素酸ナトリウム(200ppm)の併用による芽胞の殺菌処理では、OH⁻がタンパク質で構成される芽胞コートを溶解することにより、OCl⁻の透過を促進させ、また自己分解を誘発させるなど、各薬品の単独使用時よりも速やかな殺菌効果を得ることができる²⁶⁾。

5. 次亜塩素酸ナトリウムの洗浄特性

次亜塩素酸ナトリウムの濃厚溶液(pH>12)の洗浄作用は、共存する水酸化物イオン(OH⁻)の溶解力に依存するところが大きい。一方、OH⁻の洗浄効果が期待できない希薄水溶液(pH7.5~10)の洗浄作用は、解離型OCl⁻の濃

度に強く依存する²⁷⁾。

5.1 水酸化物イオンの洗浄効果

固液界面での洗剤の役割は、洗剤成分が、汚れおよび固体表面に吸着して汚れ-固体間の吸着力を最小にすることであり、洗剤成分が汚れと置き換わって固体表面に吸着する置換反応が主要な洗浄メカニズムの一つであると考えられている²⁸⁾。次亜塩素酸ナトリウムに含まれる水酸化物イオン(OH⁻)は、タンパク質、多糖類、油脂類等の広範囲の有機性汚れに対して優れた溶解力を示すこと、さらに付着物質ならびにステンレス鋼表面に吸着して大きな負電荷を帯電させ吸着相互作用を減少させることから、次亜塩素酸ナトリウムの基本的な洗浄力となっている²⁾。

(図8)に、水洗浄後にステンレス鋼表面に残存した種々のタンパク質を対象に一定時間アルカリ洗浄を行ったときの、洗浄液のpHと除去率の関係(平衡論)を示す^{2, 29)}。いずれのタンパク質に対しても、pHと除去率の関係は同様な傾向を示しており、アルカリ性のpH領域、特にpH11~pH13.5の範囲においてpHの増加(OH⁻濃度の増加)とともに洗浄性は著しく向上する。一方、強酸性溶液ではpHの減少と

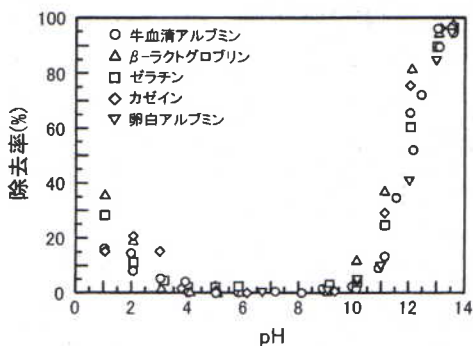


図8 ステンレス鋼に不可逆吸着したタンパク質の除去に及ぼす洗浄液のpHの影響(40℃)

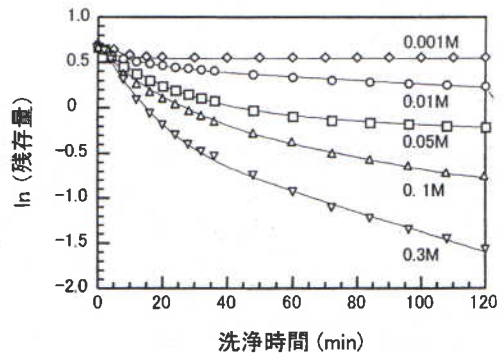


図9 ステンレス鋼からのタンパク質の離脱速度に及ぼす水酸化ナトリウム濃度の影響(40℃)

ともに除去率はわずかに増加する傾向を示すが、OH⁻の効果と比較すると洗浄効率は低い。また、強酸性溶液(pH1)での洗浄では、タンパク質の変性・凝集が起こり除去しにくい状態に変化する場合がある。

(図9)に、タンパク質(牛血清アルブミン:BSA)が不可逆吸着したステンレス鋼を種々の濃度のNaOH溶液で洗浄(40℃)したときの離脱曲線(速度論)を示す³⁰⁾。OH⁻濃度の増加とともに、洗浄速度ならびに洗浄効率は著しく増加する。たとえば、NaOH濃度が0.01Mから0.3Mに増加すると、洗浄初期におけるBSAの離脱速度は約2倍増加し、洗浄後期においては約8倍増加すると概算される。

水酸化物イオンと熱の併用は、汚れ層の膨潤・溶解と加水分解を促進させて相乗的に洗浄速度を高める。(図10)に、BSAが不可逆吸着したステンレス鋼のアルカリ洗浄(0.1M NaOH)に及ぼす温度の影響(速度論)を示す³¹⁾。温度の増加とともに、BSAの離脱速度は著しく増加し、より短時間で平衡残存量に達していることがわかる。タンパク質汚れが吸着したステンレス鋼を対象とした実験室規模のアルカリ洗浄実験で得られた一次離脱速度定数は、Arrhenius型の温度依存性を示すことが知られており、洗