

【報文】

塩酸を原料にして製造した微酸性電解水による 大腸菌の殺菌メカニズムについて

鈴木 潔^{1*}, 中村 悌一², 鴨志田真弓²,
浅野 祐三², 冨田 守²

The Bactericidal Mechanism of Slightly Acidic Electrolyzed Water Prepared with Hydrochloric Acid as a Raw Material against *Escherichia coli*

Kiyoshi SUZUKI^{1*}, Teiichi NAKAMURA², Mayumi KAMOSHIDA²,
Yuzou ASANO², and Mamoru TOMITA²

¹SUZUKI Microbiological Quality Control of Food Office, 846-15 Oba-tyou Aoba-ku
Yokohama-city, Kanagawa 225-0023, Japan

²Food Science Section, Food Research & Development Laboratory, 1-83,
5-Chome Higashihara, Zama-city, Kanagawa 228-8583, Japan

When *E. coli* was mixed with Slightly Acidic Electrolyzed Water (SIAEW), the available chlorine concentration (av.Cl) decreased linearly with time (eccentricity); 65% of the reduction of av.Cl occurred in the first 10 seconds and 75% of the reduction of av.Cl occurred in the first 20 seconds. Most *E. coli* died in the first second. In the subsequent 10 seconds there was no significant difference in the number of *E. coli* counts ($p < 0.05$). Lipopolysaccharides were stable against SIAEW. SIAEW inactivated almost all ATP-ase rapidly while it did not inactivate ATP. After *E. coli* was treated with SIAEW for 1 minute, it was observed that the amount of ATP released was about the same as that from a sample of *E. coli* treated with ATP extract reagent. Signals of the spin adduct of DMPO-OH in SIAEW with an additional *E. coli* suspension and those from SIAEW alone were equal. It was considered that SIAEW killed *E. coli* by the following mechanism. The SIAEW changes the porin-proteins and channels-proteins of the outer and inner membrane, causing them to open and to remain open. The ATP is then immediately ejected into the *E. coli* suspension by the inner pressure. Next, the HOCl enters into the *E. coli* cell through the channel-holes as a result of the molecular concentration gradient. The HOCl neutralizes the ATP-ase and other enzymes, causing complete destruction of the *E. coli*.

(Accepted 31 July 2006)

Key words : Slightly Acidic Electrolyzed Water (微酸性電解水)/Bactericidal mechanism (殺菌メカニズム)/Chlorine (塩素)/*E. coli* (大腸菌)/ATP (アデノシントリホスフェイト).

緒 言

次亜塩素酸塩の殺菌効果については古くからよく知られており、強酸性電解水の殺菌効果につい

ては岩沢ら¹⁻³⁾の報告が有る。塩酸を原料にして製造した微酸性電解水の殺菌効果については筆者ら⁴⁾、中山ら⁵⁾、岡本ら⁶⁾の報告がある。強酸性電解水の殺菌の主体は次亜塩素酸であると堀田⁷⁾

¹鈴木食品微生物研究所 〒225-0023 横浜市青葉区大場町846-15 ☎045-971-1375

²森永乳業㈱食品総合研究所, 基盤研究室 〒228-8583 神奈川県座間市東原5-1-83 ☎046-252-3029

は報告している。次亜塩素酸の殺菌機構については、Dukan¹²⁾らは、細胞に入った次亜塩素酸は、スーパーオキシドジスムターゼ、やグルコース6ホスフェイトデヒドロゲナーゼの活性を阻害し、フェントン反応により生成したOHラジカルがDNAを破壊し、細胞を死に至らしめる、と報告した。その他、グルコース酸化系酵素の阻害説¹³⁾、呼吸酵素のSH基阻害説¹⁴⁾、ヒドロキシルラジカル説¹⁵⁾、などがあるが、各説はそのメカニズムを十分説明しているとはいえない。

先に報告^{8, 9)}したように塩酸を原料にして製造した微酸性電解水は、オゾン、過酸化水素および次亜塩素酸以外の塩素酸化物を含まず、殺菌効果のある化学物質としては、次亜塩素酸だけである。筆者らは、菌の活動エネルギーであるATPとATP-aseに注目し、微酸性電解水が、非常に短時間で大腸菌を殺す新たなメカニズムを提唱し、実験で検証したので報告する。

実験方法

1. *E.coli* 懸濁液の調製

Escherichia coli O-111 (血清型O-111, 森永乳業(株)保存株)をトリプトソイブイオン培地(日水製薬, 東京)で35℃, 18時間振とう培養後, トリプトソイ寒天培地(日水製薬)平板に塗抹し, 35℃, 18時間培養後、滅菌白金耳でかきとり、滅菌生理食塩水に懸濁して使用した。

2. 培養方法と計測方法

処理した菌懸濁液を滅菌生理食塩水で段階希釈し、標準寒天培地(栄研化学, 東京)を用いて35℃, 48時間培養し、出現したコロニー数を仮計測し、さらに25℃, 24時間培養後計測して最終コロニー数とした。

3. *E.coli* を用いた残留塩素濃度消費試験

RO水を原料水にして製造した微酸性電解水は、トーワテクノ社(広島市)製のピュアスターMp-240を用いて製造した。使用にあたりピュアスターは、時間当たりの電解水の製造能力と塩酸供給量を可変できるように、一部改造した。微酸

性電解水(av. Cl 31.5ppm, pH 5.95) 72mlを100ml容ビーカーにとり8mlの菌懸濁液(5.6×10^8 CFU/ml)を加え攪拌しながら次亜塩素酸発色試薬(笠原理化工業, 埼玉県)をあらかじめ入れたスピッツ管(栄研器材, 東京)に5mlづつ経時的にサンプリングした。直ちに混合溶解し200rpmで10分間遠沈し、上澄液を塩素計のキュベットに移し、デジタル塩素濃度計(RC-2Z型, 笠原理化工業)で残留塩素濃度を測定し、換算式(1)を用いてチオ硫酸滴定残留塩素濃度に換算して表した。 $Y=0.8468X-0.5733$ ………(1)(但し、Y:チオ硫酸滴定残留塩素濃度, X:笠原塩素濃度計の読み) 0時間は微酸性電解水4.5mlをとり発色後菌懸濁液0.5mlを加え同様にして測定した。反応は20℃で行なった。

4. *E.coli* を用いた短時間殺菌効果の測定

微酸性電解水(原料水を記載しない場合は水道水を原料水とした, 以下同じ)の温度が低いほど(1℃以上)殺菌効果が緩やかであることが予備試験で解った。通常の微酸性電解水使用温度は10℃以上で使用するようにメーカーは勧めているので、この実験は中間を取って5℃でおこなった。各計画した時間について菌懸濁液0.2mlを管壁に菌を付けないように注意してスピッツ管10本に分注し、1.8mlの微酸性電解水(10ppm, pH 6.0)を*E. coli*懸濁液に添加し、試験管ミキサーで攪拌し、所定時間後に、40mMチオ硫酸ナトリウム20μlを加え反応を停止し、細菌試験に供した。この試験を3回繰り返して各時間について30個のデータを得た。最高最低の値を除いた28個のデータを対数変換し(但しlog(<1(0))は0として計算した)、幾何平均値と標準偏差を求めた。

5. エンドトキシンを用いた残留塩素濃度消費試験

Limulus HS-J Test(和光純薬, 東京)のコントロールスタンダードエンドトキシン試薬を用いて1,000EU/mlのエンドトキシン溶液を作成した。エンドトキシン溶液0.1mlをエッペンドルフチューブにとり、微酸性電解水(av. Cl 10.7

ppm, pH 5.85 および av. Cl 30.8ppm, pH 5.90) を0.9ml 加え攪拌して所定時間経過後、笠原の発色試薬0.1gを加えて反応を止めた。この発色液全量を笠原塩素濃度計のキューベットに移し、目盛り(5 ml)まで精製水を加えて残留塩素濃度を測定した。反応は20℃で行なった。結果はこの試験を3回繰り返して平均値を求め、換算式(1)を用いてチオ硫酸滴定残留塩素濃度に換算して表した。

6. ATP と ATP-ase の微酸性電解水に対する安定性

ルシフェール HS キット(キッコーマン、千葉県)を使用し測定した。①ATP, 微酸性電解水および ATP-ase(ATP 消去試薬)を混合後、室温(約25℃)で30分間反応させ、チオ硫酸ナトリウムを加えて反応を停止後、その100 μ l をとり、発光試薬100 μ l を加え Lumitester C-100(キッコーマン)にて発光量を測定した。②ATP, 微酸性電解水, チオ硫酸ナトリウムおよび ATP-ase を混合後室温で30分間反応させ、その100 μ l をとり、発光試薬100 μ l を加え Lumitester C-100 にて測定した。③ATP, 精製水, チオ硫酸ナトリウムおよび ATP-ase を混合し、直ちにその100 μ l をとり、発光試薬100 μ l を加え Lumitester C-100 にて測定した。各試薬の添加量を Table 2 に示す。

7. ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を用いた微酸性電解水の殺菌効果の測定

10ml容スピッツ管に微酸性電解水を3.6mlとり、菌懸濁液0.4mlを加え、試験管ミキサーで混合後、所定の時間恒温水槽で反応させ、滅菌チオ硫酸ナトリウム液(40mM) 0.01mlを加えて反応を止め、ATP 量と菌数を測定した。0分は微酸性電解水にチオ硫酸ナトリウム液を加えた後、菌懸濁液を添加した。実験は20℃で行なった。

ATP 量の測定: ルシフェール HS キットを用いた。測定は発光試薬(ルシフェリン・ルシフェラーゼ)単独使用と ATP 抽出試薬(界面活性剤)+発光試薬併用の二方法でメーカーの取扱説明書により測定した。

8. 微酸性電解水によるOHラジカルの生成

Milli-Q 水と試薬特級の NaCl を用いて作製した滅菌生理食塩水を用いて *E. coli* を2回洗浄し、*E. coli* 懸濁液とした。原料水に RO 水を用いて製造した微酸性電解水(av. Cl 31.0ppm, pH 6.03 および av. Cl 30.0ppm, pH 5.99)を用い *E. coli* 懸濁液0.03ml, 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO) 0.03ml, 微酸性電解水0.34 mlの順に混合して電子スピン共鳴装置(JESFR-30, 日本電子、東京)を用いてヒドロキシル(OH)ラジカルを測定した。コントロールは、*E. coli* 懸濁液の代わりに RO 水を用い同様に操作した。ESR の測定条件は前報⁹⁾と同じ。RO 水を用いて製造した微酸性電解水が鉄イオンと接触すると OH ラジカルを生成することを証明するために微酸性電解水(av. Cl 30.0ppm, pH 5.99) 0.34ml, DMPO 0.03ml, FeSO₄ (0.1mM) 0.03 mlの順に混合して OH ラジカルを測定した。

結果と考察

1. *E. coli* を用いた残留塩素濃度消費試験

微酸性電解水と *E. coli* の反応速度を調べるためにこの実験を行なった。測定結果を Fig. 1 に示す。残留塩素濃度と時間の関係は、時間を対数に変換した時、式(2)で表される直線関係であった。 $y = -0.9826t + 11.555 \dots \dots \dots$ (2), ($R^2 = 0.9661$), 式(2)において y : 残留塩素濃度(ppm), t : 時間(分)の自然対数とする。30分間で消費された残留塩素濃度の65%は最初の10秒間で消費され、20秒間では75%が消費された。以後の消費は穏やかであった。この結果から微酸性電解水(HOCl)と *E. coli* の反応は非常に早く、あたかも化学の1分子反応であるように考えられた。

2. *E. coli* を用いた短時間殺菌効果の測定

微酸性電解水の *E. coli* 殺菌時間を測定する目的でこの試験を行なった。測定結果を Fig. 2 に示す。*E. coli* と微酸性電解水を混合した直後に菌は減少し、1秒間処理から10秒間処理まで生残菌数に有意差は無かった($P < 0.05$)。また、

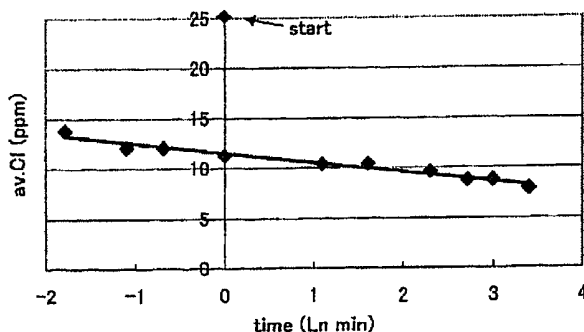


Fig. 1. The reduction of available chlorine in SIAEW mixed with *E. coli*.

SIAEW : Slightly Acidic Electrolyzed Water, av. Cl : available chlorine concentration. (These abbreviations apply in all figures and tables.) SIAEW : av. Cl 32.5 ppm, pH 6.00, at 20°C. Av. Cl was measured by the colorimetric method and the data were changed to titration method equivalents by expression (1) ($Y = 0.8468X - 0.5733 \dots$ (1) Y: titration method, and X: colorimetric method). The relationship of av.Cl and time was expressed by (2). $y = -0.983t + 11.55 \dots$ (2), ($R^2 = 0.966$), y : av. Cl (ppm), t : Ln (minute).

E. coli 懸濁液を血球計算盤に100 μ lのせ、カバーガラスをかけて位相差顕微鏡下で微酸性電解水100 μ lを菌懸濁液に注入すると、鞭毛運動は瞬時にブラウン運動に変わった。

3. エンドトキシンを用いた残留塩素濃度消費試験

微酸性電解水が *E. coli* の外膜の糖脂質 (エンドトキシン) を短時間で破壊するか調べるためにこの実験を行なった。結果を、Table 1に示す。外膜の主成分である糖脂質は微酸性電解水を消費しなかったことから、微酸性電解水は短時間 (1分間) では糖脂質を破壊しないと考えられた。

大腸菌の細胞膜は、一番外に外膜、次いでペリプラズム、内側に内膜の3重構造になっている。外膜は脂質二重層を基本とした膜構造を有し、この膜は糖脂質と蛋白質を含んでいる。外膜は細胞内を保護する役割を持っているので、細胞に有害な物質は通過できないが、栄養物を取り込むための蛋白質の溝 (channel) や穴 (porin) が準備されている¹⁴⁾。

実験3より HOCl は、エンドトキシン (糖脂質) とほとんど反応しなかった。表には示さなかったが、5 mM のマンニトールを20ppmの微酸性

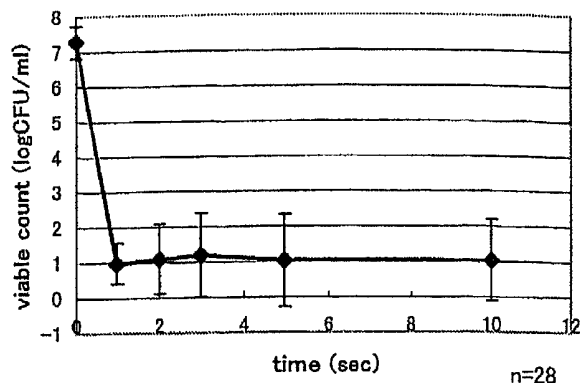


Fig. 2. The bactericidal effect of SIAEW on *E. coli*.

SIAEW : av.Cl 10.3-11.6ppm, pH 5.90-6.05, at 5°C. The *E. coli* suspension was added to SIAEW in glass beakers with stirrer sticks. The figure shows average $\pm$ SD.

Table 1. The reduction of available chlorine in SIAEW mixed with Lipopolysaccharides (LPS, endotoxins).

time (sec)	Av. Cl of SIAEW (ppm)	
	A	B
0	7.01	22.54
10	7.01	23.95
30	8.42	23.95
60	7.01	25.36

A : SIAEW was at av.Cl 10.7ppm, pH 5.85 and B : SIAEW was at av.Cl 30.8ppm, pH 5.90. 0.1ml of the endotoxins (Endotoxin standard *E. coli* UKT-8, Wako, Japan, 1,000EU solution) was added to 0.9ml of SIAEW at 20 °C. Av.Cl was measured by colorimetric method and the data were changed to titration method equivalents by expression (1). The table shows the average of 3 measurements.

電解水で10分間処理したとき、マンニトールの濃度に変化が無かったことと、この結果は矛盾しなかった。即ち糖とHOClは急激な反応をしないと考えられる。よって、Fig. 1で示した急速な残留塩素の消費は、蛋白質であるポーリンやチャンネルの蛋白質とHOClが反応したと考えられる。

4. ATP と ATP-ase の微酸性電解水に対する安定性の測定

各試薬の添加量と発光量を Table 2 に示す。

①は③と同程度の発光が有ったことからATPがほとんど残っていた。即ち、ATPは次亜塩素酸に安定であったが、ATP-aseは失活した。②は発光がほとんど無かったことから、ATPはほと

Table 2. The stability of ATP and ATP-ase in the presence of SIAEW.

	ATP soln.	SIAEW	STS	ATP-ase	water	biolumi	RLU
①	10	100	10	10	—	100	3285
②	10	100	10	10	—	100	1
③	10	—	10	10	100	100	2454

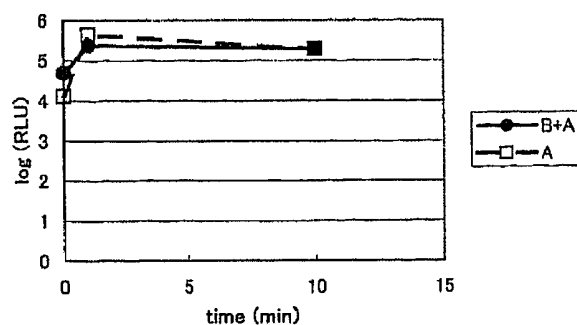
volume unit : μ l, ATP soln : ATP solution (10^{-1} M), SIAEW : av.Cl 30.5ppm, pH5.90, STS : sodium thiosulfate (40 mM), ATP-ase : ATP-eliminating enzyme in the kit, biolumi : luciferin-luciferase solution in the kit, RLU : relative light units. The relationship of ATP (M) and RLU was expressed by (3). $y = 0.9881x - 12.417 \dots (3)$, ($R^2 = 0.999$). $y : \log \text{ATP (M)}$, $x : \log \text{RLU}$. This test used Lucifer HS kit (Kikkoman, Japan).

①ATP soln, SIAEW and ATP-ase were mixed well and set to stand for 30 minutes at room temperature (about 25°C) then STS was added, and everything was mixed well. 100 μ l of the mixture was mixed with 100 μ l biolumi, then the emitted light was measured with a Lumitester C-100 (Kikkoman, Japan). ②ATP soln, SIAEW, ATP-ase and STS were mixed well and set to stand for 30 minutes at room temperature. The emitted light was measured with a Lumitester C-100. ③ATP soln, water, ATP-ase and STS were mixed well and 100 μ l of the mixture was mixed with the same volume of biolumi immediately, then the emitted light was measured with a Lumitester C-100.

んど残っていなかった。即ち、微酸性電解水の次亜塩素酸がチオ硫酸ナトリウムで中和され、ATP-ase が ATP を分解したために発光しなかったと考えられる。

5. ルシフェリン・ルシフェラーゼ反応を用いた微酸性電解水の殺菌効果の検討

微酸性電解水が非常に短時間で大腸菌を殺すメカニズムを探るためにこの実験を行なった。測定結果を Fig. 3 に示す。図では見かけ上、ATP 抽出液+発光液併用の1分間処理値は、発光液単独の1分間処理値より ATP が少ないように見えるが、予備試験において、発光量を対数変換して計算すると、ATP 濃度 $10^{-8} \sim 10^{-10}$ M の範囲で、ATP 抽出液+発光液は発光液単独の場合の93~96%の発光量であったことから、この程度（発光液単独の値の95%）の差では差があるといえない。よって、微酸性電解水 (HOCl) 処理で1分間処理することにより、ATP 抽出液で処理した試料とほぼ同等量の ATP が菌懸濁液中に遊離してきたと考えられる。ATP 量と RLU の関係は、式 (3) で表された。 $y = 0.9881x - 12.417 \dots$

Fig. 3. The amount of ATP in the *E. coli* suspension treated with SIAEW.

A : bioluminescence reagent, B : ATP extractant reagent. *E. coli* suspensions (100 μ l) were mixed with the A (100 μ l) or B+A reagent (each 100 μ l), then the emitted light was measured with a Lumitester C-100 at room temperature.

$\dots (3)$, ($R^2 = 0.999$), $y : \log \text{ATP (M)}$, $x : \log \text{RLU}$.

E. coli を微酸性電解水により1分間処理することにより、ATP 抽出液で処理したとほぼ同等量の ATP が懸濁液中に遊離してきたことは、原形質に存在した ATP が、細胞の内外膜を通過して急速に外に出てきたことを示している。上述 (実験3.) したように HOCl が、外膜のチャンネルやポーリンの蛋白質と反応し、それらを開いた状態に変え、内膜のチャンネルと反応して細胞膜に穴があいた状態にすると推定される。つづいて、*E. coli* の原形質内にあった ATP (MW. 507) は、細胞内圧 (約5気圧)¹⁴⁾により、これらの穴を通して処理液中に放出されたと考えられる。細胞内外膜のこれらの穴が開いた状態になるという他の証拠としては、プロピディウムイオダイド (PI, MW. 668) で菌を染色すると、次亜塩素酸処理前は核が染色されないが、次亜塩素酸処理後は核が染色されるようになるという報告がある^{15, 16)}。

6. 微酸性電解水による OH ラジカルの生成

Fig. 4 に微酸性電解水の OH ラジカル発生状況と微酸性電解水に *E. coli* を添加した時の OH ラジカル発生状況を示す。微酸性電解水の OH ラジカルは *E. coli* 懸濁液添加により増大しなかった。微酸性電解水は、鉄イオンにより過酸化水素

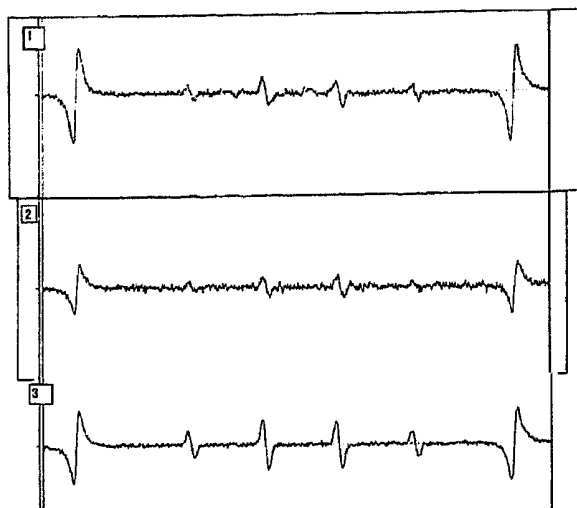


Fig. 4. OH radicals of SIAEW

No.1. The mixture contained the following agents in a final volume of 0.4 ml : DMPO (1ml DMPO diluted to 10 ml with H_2O) 0.03 ml and SIAEW (prepared with reverse-osmosis-water as a raw material (RO water), av.Cl 31.0ppm, pH 6.03) 0.37ml. After incubation in the open air at room temperature in a dark environment for 1 minute, electron spin resonance (ESR) spectra were recorded with a JES-FR30 spectrometer (JEOL, Tokyo). The operation conditions for the ESR spectrometer were as follows : microwave power, 4 mW; modulation amplitude, 0.1 mT; time constant, 0.03sec; scanning time, 1min.; and magnetic field, ± 5 mT. Signal intensity of the spin adduct of DMPO-OH was evaluated from the ratio peak height of the first signal of the quartet to MnO peak.

No.2. The mixture contained the following agents in a final volume of 0.4 ml : DMPO (1ml DMPO diluted to 10ml with H_2O) 0.03ml and *E. coli* suspension (10^9 CFU/ml) 0.01ml, SIAEW (prepared with RO water, av.Cl 30.0ppm, pH 5.99) 0.36ml. After incubation in open air at room temperature in a dark environment for 1 minute, ESR was recorded. The ESR conditions were the same as 1.

No.3. The mixture contained the following agents in a final volume of 0.4 ml : DMPO (1ml DMPO diluted to 10ml with H_2O) 0.03ml and $FeSO_4$ solution (0.1mM) 0.03ml, SIAEW (prepared with RO water, av.Cl 30.0ppm, pH 5.99) 0.34ml. After incubation in the open air at room temperature in a dark environment for 25 minutes, ESR was recorded. The ESR conditions were the same as 1.

が無い環境でも OH ラジカルを発生することを Fig. 4 に示す。

分子濃度勾配の差により HOCl は、開いたチャンネルやポーリンの穴から内圧の下がった菌体の原形質に入ると推定される。原形質に入った HOCl は、Dukanら¹²⁾が報告したようにグルコース 6 ホスフェイトデヒドロゲナーゼ (G6PD) や

スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を失活させ、Greenら¹⁰⁾が報告したようにグルコース酸化系酵素を阻害すると推定される。Venkobacharら¹¹⁾も呼吸系酵素を阻害すると報告している。さらに、Fig. 4 で示したように HOCl は、細胞内の鉄イオンと反応して OH ラジカルを発生し、OH ラジカルにより DNA や酵素類を破壊し、菌を死に至らしめるものと推定される。微酸性電解水に *E. coli* を添加しても OH ラジカルの増加は検出されなかったので (実験 6), Rosenら¹⁷⁾が報告しているように OH ラジカルは、菌体内部に入った HOCl が鉄イオンなどと反応して生成すると考えられる。また、岩沢ら²⁰⁾は、*Staphyrococcus aureus* および *Pseudomonas aeruginosa* を強酸性電解水 (主体は HOCl) で処理した電子顕微鏡写真で、菌表面全体に多数の小突起を観察したと報告したが、この小突起はポーリンやチャンネルの立体構造が変化した姿とも考えられる。

E. coli 体表層部は、マイナスに帯電しており¹⁸⁾、次亜塩素酸イオンは、電気的な反発により次亜塩素酸より菌に近づき難いことが、次亜塩素酸イオンが次亜塩素酸より殺菌効果が劣っている¹⁹⁾原因と考えられる。また、同一懸濁液中の大腸菌の中でも、死滅に時間差が出来るのは、菌が互いに接触して菌体と次亜塩素酸が直接接触しない場合と、他の菌体から放出された低分子化合物により菌体が保護されている場合と考えられる。菌種間の次亜塩素酸に対する耐性の差は、グラム陽性菌と陰性菌の細胞膜構造の差、菌の結合形態、チャンネルやポーリンの穴の大きさ、チャンネル蛋白のアミノ酸組成、1 菌体あたりのチャンネル数の差などが考えられる。これらの問題は、今後の課題としたい。

結 論

E. coli は、微酸性電解水 (HOCl) により内外膜のチャンネルやポーリン蛋白質の立体構造を変えられ ATP を放出する。ATP の放出に続いて起こる ATP-ase などの酵素類の失活や DNA の分解が、*E. coli* を短時間で完全な死に至らしめ

ると考えられる。

文 献

- 1) 岩沢篤郎, 中村良子, 水野徳次, (1993), 臨床分離株に対するアクア酸化水の効果, 日環感, 8, (2), 11-16.
- 2) 岩沢篤郎, 中村良子, (1996), 酸性電解水の殺菌効果と使用法の検討, 日環感, 11, (3), 193-202.
- 3) 岩沢篤郎, 中村良子, (1999), 強酸性電解水の抗菌活性と安全性, 防菌防黴, 27, (7), 449-462.
- 4) 中村悌一, 鈴木 潔, 土井豊彦, 加藤 良, 富田 守, (1999), 塩酸を原料とした電解塩素水の特性について(第2報 殺菌特性), 日本防菌防黴学会第26回年次大会要旨集, p121.
- 5) 中山素一, 藤本章人, 樋口 彰, 渡辺 誠, 飯尾雅嘉, 宮本敬久, (2003), 微酸性次亜塩素酸水の *Bacillus* 属細菌芽胞および乳酸球菌に対する効果と特性, 防菌防黴, 31, (8), 421-425.
- 6) 岡本公彰, 駒形安子, 奥田舜治, 西本右子, 鴨志田真弓, 中村悌一, 小宮山寛機, (2006), 塩酸を原料にした微酸性電解水の殺菌効果とその特性, 防菌防黴, 34, (1), 3-10.
- 7) 堀田国元, (1998), 電解水の殺菌力と殺菌機構, 月刊フードケミカル, 14, (5), 25-30.
- 8) 鈴木 潔, 中村悌一, 小久保貞之, 富田 守, (2005), 塩酸を原料にした微酸性電解水の物理学的性質, 防菌防黴, 33, (2), 55-62.
- 9) 鈴木 潔, 中村悌一, 小久保貞之, 富田 守, (2005), 塩酸を原料にした微酸性電解水の化学的性質, 防菌防黴, 33, (2), 63-71.
- 10) Green D. E., and Stumpf P. K., (1946), The mode of action of chlorine, *J. A. W. W. A.* 38, 1301-1305.
- 11) Venkobachar C., et al, (諏訪通法訳), (1975), 塩素消毒の生化学的メカニズム, 水道協会雑誌, (490), 87.
- 12) Dukan S., Belkin S., and Touati D., (1999), Reactive oxygen species are partially involved in the bactericidal action of hypochlorous acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367, 311-316.
- 13) 河野雅弘, (1996), 強酸性電解水の殺菌要因と次世代強酸性電解水の展望 フリーラジカルの視点から見た強酸性電解水, 機能水シンポジウム'96, p12.
- 14) 山西弘一, 平松啓一編, (2002), 標準微生物学(第8版), pp66-82, 医学書院, 東京.
- 15) Virto R., Manas P., Alvarez I., Condon S. and Raso J., (2005), Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate, *Appl. Envi. Microbiology*, 71, (9), 5022-5028.
- 16) Morris C. E., Monier J. M. and Jacques M. A., (1997), Method for Observing Microbial Biofilms Directly on Leaf Surfaces and Recovering Them for Isolation of Culturable Microorganisms, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, (4), 1570-1576.
- 17) Rosen H. and Klebanoff S. J., (1982), Oxidation of *Escherichia coli* Iron Centers by the Myeloperoxidase-mediated Microbicidal System. *J. Biol. Chem.*, 257, (22), 13731-13735.
- 18) 森崎久雄, (2001), 微生物の付着とその機構, 防菌防黴, 29, (6), 389-396.
- 19) 日本薬学会編, (1990), 衛生試験法注解, p946, 金原出版, 東京.
- 20) 岩沢篤郎, 中村良子, (1995), 強酸性電解水の抗微生物効果(Ⅲ) 電子顕微鏡観察, 日環感, 10, (3), 53-57.