=原 著=

酸性次亜塩素酸水の食品への応用と作用機構の解析 —強酸性電解水との比較—

浦上 弘^{*1,†}・幸野 武志^{*2}・島名 沙知^{*1}

吉崎 大介^{*1}・小長谷幸史^{*1}・田中 信正^{*1}

(^{*1} 新潟薬科大学応用生命科学部食品微生物食品安全学研究室, ^{*2} 薬学部微生物学研究室)

(受付: 平成 17 年 12 月 28 日)

(受理: 平成 18 年 3 月 15 日)

Application of Acidic Hypochlorite to Food Protection and Analysis of the Disinfection Mechanism in Comparison with Electrolyzed Acidic Water

Hiroshi URAKAMI^{*1,†}, Takeshi KONO^{*2}, Sachi SHIMANA^{*1},

Daisuke YOSHIZAKI^{*1}, Yukifumi KONAGAYA^{*1}

and Nobumasa TANAKA^{*1}

(^{*1} Laboratory of Food Safety, College of Applied Life Sciences; [†] Corresponding author)

(^{*2} Laboratory of Microbiology, College of Pharmacy, Niigata University of Pharmacy
and Applied Life Sciences (NUPALS), Higashijima, Niigata-shi 956-8603)

Acidic hypochlorite (prepared by addition of NaOCl and HCl to water) and electrolyzed acidic water (prepared by electrolysis of 0.1% NaCl, recognized as a food additive) were compared with regard to their disinfectant activities against food-borne pathogens and their mechanisms of disinfectant activities were examined. The both disinfectants reduced colony forming units of vegetative cells by more than 6 log units in 10 seconds. Spores of *Clostridium botulinum* and *Bacillus subtilis* were reduced by 5.0 and 1.8 log units, respectively, in 10 minute treatments by these disinfectants. The extents of reductions were significantly more than that by sodium hypochlorite at a same free chlorine concentration. Normal flora in bean sprout was reduced by either of the acidic hypochlorite and electrolyzed acidic water more effectively than sodium hypochlorite. Electron microscopic observations revealed that numerous structures that appeared like membrane vesicles formed on the surface of gram negative rods exposed to the two disinfectants. The exposed bacteria did not show the plasmolysis when subjected to hypotonic treatment. Propidium iodide which does not penetrate through the intact cytoplasmic membrane invaded into the cytoplasm of the disinfectant exposed bacterial cells. These observations suggested that the disinfectants killed bacteria by destruction of their cell wall and cytoplasmic membrane. No difference was found between the two disinfectants, indicating that acidic hypochlorite, which is prepared quite inexpensively by just an addition of HCl to sodium hypochlorite solution, is as effective, and has the same mechanism of action, as electrolyzed acidic water.

Key words: disinfectant, acidic hypochlorite, electrolyzed acidic water, food-borne pathogens

[†] 連絡先

^{*1,2} ☎956-8603 新潟県新潟市東島 265-1

緒 言

強酸性電解水（電解水）は、pH 2.7 以下、有効塩素濃度 20 から 60 ppm の物性を有する溶液で、食塩水、希塩酸を電気分解して得ることができる。食品衛生法⁶⁾で定義された「次亜塩素酸水」のうち、「強酸性次亜塩素酸水」がこれに当たる。電解水はその殺菌効果の高さから、医療分野では、創傷面、手指の消毒などの人体への使用のほか、医療器具や環境の消毒にも用いられてきた。食品産業分野では、2002 年に食品添加物に指定され、食材の消毒などに利用が広がっている。次亜塩素酸は酸性領域で殺菌力が增強されることが知られており、電解水の殺菌力は電気分解により生じた残留塩素と酸の相乗効果によるものと考えられている^{2,3,10)}。次亜塩素酸水溶液（次亜水）に塩酸を加えることで調製する酸性次亜塩素酸水（酸性次亜水）は、物性、消毒力、細胞毒性、保存性、金属腐食性などあらゆる点で電解水と同等であることをわれわれは示してきた^{10,11)}。そして実用面においても、消化器内視鏡の消毒に用いて *Helicobacter pylori* の院内感染を防止することに成功した¹²⁾。

酸性次亜水の消毒効果についてはいくつかの報告^{4,5,10,11)}があるが、同一条件で電解水と酸性次亜水を比較した研究は少ない。今回われわれは酸性次亜水が食品添加物である電解水と同等であることを示すことを目的に、食中毒菌などに対する消毒力を検証するとともに、ほとんど解明されていない酸性次亜水、電解水の殺菌機構を電子顕微鏡とフローサイトメーターを用いて解析した。

材料および方法

1. 消毒剤

電解水は、SUPER OXSEED LABO (AMANO) で 0.1% NaCl 水溶液を電気分解して調製した。酸性次亜水は、蒸留水 100 ml に 12 M HCl 58 μ l、食品添加物次亜塩素酸ナトリウム（和光）50 μ l を加えて作製した。以上 2 種の消毒剤の物性値は、pH 2.4 から 2.6、ヨウ素滴定法⁹⁾による残留塩素濃度は 40 から 50 ppm、酸化還元電位は +1,165 から +1,175 mV であった。次亜水は蒸留水 100 ml に食品添加物次亜塩素酸ナトリウム 50 μ l を加えてつくり、残留塩素濃度は 45 から 50 ppm、pH は 9.6 から 9.7 であった。

2. 供試細菌と消毒剤耐性の測定

Staphylococcus aureus ATCC 6538P, *S. aureus* No. 9 (新潟県厚生連村上病院で分離された MRSA¹³⁾), *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, *Bacillus subtilis* ATCC 6051, *Clostridium botulinum* 36A, *Escherichia coli* O157:H7 Sakai, *E. coli* ATCC 11775, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Salmonella* Enteritidis IID 604 を用いた。*B. subtilis* と *C. botulinum* を除いた

菌は、tripticase soy broth (TSB, Becton Dickinson BBL) で 35°C 一夜培養した後 0.9% NaCl で洗浄して実験に使用した。*B. subtilis* は同培地で 2 週間 35°C で培養した後、*C. botulinum* は嫌気性卵黄寒天培地¹³⁾で 10 日間 35°C で嫌気培養した後、芽胞懸濁液を調製し¹⁵⁾、冷蔵保存したものを用いた。どちらの芽胞懸濁液も使用直前に 80°C で 10 分間加熱処理を施した。

菌懸濁液、芽胞懸濁液は、0.9% NaCl 中で 10^8 colony forming units/ml とし、その 10 μ l を 96 穴マルチプレート¹⁶⁾の各 well に入れ、200 μ l の消毒剤を加えた。10 秒、1 分、10 分後に、5 倍濃度の TSB 50 μ l を加えて反応を停止し、そのまま 30°C で 24 時間培養して菌の増殖の有無を確認した。対照には、菌液および芽胞液に 5 倍濃度の TSB を加えた後で消毒剤を加えた。

芽胞生残数の定量は、上記と同様の方法で各消毒剤および対照の蒸留水で 10 分間処理を 5 well ずつ行った。処理後各 well の試料を 10 倍段階希釈し、*B. subtilis* では希釈液 100 μ l ずつを標準寒天培地（日水製薬）に塗抹し、*C. botulinum* では 1 ml ずつをクロストリジア測定用培地（日水製薬）に混釈した。35°C で 24~48 時間培養後、計数したコロニー数を Excel (Microsoft) に入力し、統計処理を行った。

3. 野菜付着菌の消毒

モヤシ、レタスは市販品を用い、モヤシは袋から出してそのまま 10 g ずつ、レタスは水洗して土を落としてから 5 cm 角に切り、各処理ごとに 10 g ずつ 5 本の滅菌瓶に入れた。これに 3 種の消毒剤、2 mM HCl (pH 2.7) もしくは滅菌蒸留水を 200 ml 加え、30 分室温に放置したのち、90 ml の TSB を加えて反応を止めた。反応停止後直ちに瓶の内容物をストマッカー¹⁷⁾にかけた後しばらく静置した上清を 10 段階希釈し、各希釈液を 100 μ l ずつ 2 枚の標準寒天培地に接種して 30°C、24 時間培養して菌数を測定し、上記の方法で統計処理を行った。

4. 電子顕微鏡による観察

菌体はグルタルアルデヒドおよびオスミウム酸による二重固定後、エタノール脱水を経て、エポキシ樹脂に包埋して超薄切片とした。走査型電子顕微鏡による観察は、poly-L-lysine 処理を施した thermanox (Nunc) に菌体を付着させ、上と同様の固定、脱水後、臨界点乾燥を行い、金をコーティングして観察を行った¹⁷⁾。

5. フローサイトメーターによる解析

菌を 10^7 /ml に調整し 10 倍量の消毒剤、もしくは対照として蒸留水を加えた。0.05 M チオ硫酸ナトリウムを 1/10 量加えて消毒作用を停止し、10 μ g/ml propidium iodide (PI), 50 μ g/ml 6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA), 0.5 mM EDTA, 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 8.5) で 5 分間二重染色し、FACS Calibur (BD Biosciences)

で分析した。

結 果

1. *In Vitro* での消毒力の比較

S. aureus 2 株, *L. monocytogenes*, *E. coli* 2 株, *S. Enteritidis*, および *P. aeruginosa* は, 酸性次亜水, 電解水, 次亜水のいずれによっても, 10 秒の処理で 6 log 以上の菌数の低下が見られた (Table 1). これらの菌液に TSB を加えた後で各消毒剤で処理した対照では, 菌と消毒剤のすべての組み合わせで菌の増殖が見られた. 一方, *C. botulinum* および *B. subtilis* の芽胞は 10 分の処理によっても死滅させることはできなかった.

芽胞生残数の定量を行った結果, *B. subtilis* は, 次亜水 10 分の処理では対照の蒸留水で処理した菌液に比べ

Fig. 1. Disinfection of spores of *Bacillus subtilis* and *Clostridium botulinum*.

Spores were treated for 10 min by sodium hypochlorite solution (diluted NaOCl, 48 mM free chlorite, pH 9.6), acidic hypochlorite (made by addition of NaOCl and HCl to water, 48 mM free chlorine, pH 2.5), and electrolyzed acidic water (made by electrolysis of 0.1% NaCl, 45 mM free chlorine, pH 2.6). Reduction of colony-forming units is expressed by ratios of the number of colonies in treated samples to that in controls treated with water. Error bars indicate 95% confidential intervals of five replicated experiments.

て生残数にほとんど変化がなかったのに対し, 酸性次亜水, 電解水処理では 1.7 log 前後低下した (Fig. 1). 一方, *C. botulinum* は次亜水でも 4.0 log, 酸性次亜水, 電解水では約 5.0 log の低下を見た. 以上の結果は, 芽胞形成菌を含む細菌に対して酸性次亜水と電解水は同等の消毒力を持ち, 芽胞に対しては同濃度の残留塩素を含む次亜水より優れた効果を持つことを示している.

2. 野菜付着菌に対する消毒力の比較

市販のもやし, レタスを 30 分間処理したところ, 酸性次亜水, 電解水のどちらによっても滅菌蒸留水処理と比較して付着菌数を 1/80 から 1/60 に低下させることができた (Fig. 2). もやしでの生残率は, 次亜水, 同 pH の塩酸での生残率に比べ有意に低かったが, レタスでは

Fig. 2. Aerobic colony counts after disinfectant treatment.

Bean sprout and lettuce were immersed in either of the following liquids for 30 min, stomached and plated onto plate count agar. Distilled water, acidic hypochlorite, electrolyzed acidic water, sodium hypochlorite solution and 2.5 mM HCl (pH 2.5). Error bars indicate 95% confidential intervals of five replicated experiments.

Table 1. Comparison of hypochlorous disinfectants^{a)}

Reaction time	Acidic hypochlorite ^{b)}			Electrolyzed acidic water ^{b)}			Hypochlorite ^{c)}		
	10 sec	1 min	10 min	10 sec	1 min	10 min	10 sec	1 min	10 min
<i>S. aureus</i> (MSSA)	—	—	ND ^{e)}	—	—	ND	—	—	ND
<i>S. aureus</i> (MRSA)	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND
<i>L. monocytogenes</i>	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND
<i>E. coli</i> ATCC 1175	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND
<i>E. coli</i> O157	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND
<i>P. aeruginosa</i>	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND
<i>S. Enteritidis</i>	—	—	ND	—	—	ND	—	—	ND
<i>B. subtilis</i> (spore)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. botulinum</i> (spore)	+	+	+	+	+	+	+	+	+

a): 10^6 colony-forming units of bacteria were treated with disinfectants, and results are expressed by + and — which indicate presence and absence of growth after cultivation, respectively.

b): 40–50 ppm free chlorine, pH 2.4–2.6.

c): 40–50 ppm free chlorine, pH 9.9–9.7.

ND: not done.

その差は有意でなかった。なお、消毒剤の残留塩素濃度は30分間の処理で低下したものの、30から75%が残存していた。これは、付着菌の生残が野菜からの有機物などによる消毒能の低下によるものではないことを示している。

3. 電子顕微鏡観察による殺菌機構の解析

酸性次亜水、電解水で1分間処理した *E. coli* ATCC 11775 を走査顕微鏡で観察したところ、ほとんどの菌体の表面に20~300 nmの小胞状の構造を多数認めた (Fig. 3b, c). *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa* でも同様の

Fig. 3. Morphological changes of *E. coli* ATCC 11775 upon individual treatment by acidic hypochlorite electrolyzed acidic water or sodium hypochlorite.

a, control. b and c, *E. coli* treated with acidic hypochlorite and electrolyzed acidic water, respectively. Round vesicles appear on the surface of bacteria. Some of the vesicles are detached from bacterial cells (arrow). d, *E. coli* treated with hypochlorite solution. Bacteria are deformed with a dimple. Note that surface texture is much rougher than the control bacteria. Few vesicles are found. Bar = 0.5 μm .

Fig. 4. Ultrathin sections of *E. coli* ATCC 11775 treated with acidic hypochlorite.

a, Vesicles with various size are seen on the bacterial surface. Bar = 0.5 μm . b, A vesicle shows a typical structure of the unit membrane. The surface structure of bacterium appears to be detached from the cells (arrows). Bar = 0.1 μm .

Fig. 5. Morphological changes by hypotonic treatment of *E. coli* ATCC 11775 and *B. subtilis* with or without treatment by acidic hypochlorite.

a, Untreated *E. coli* shows severe plasmolysis when immersed in 5% NaCl. b, Plasmolysis does not occur in *E. coli* after treatment by acidic hypochlorite. Arrows indicate the vesicles formed by disinfection. Bars = 0.5 μm . c, Plasmolysis is prominent in control *B. subtilis* by treatment with 5% NaCl. d, No plasmolysis occurs in *B. subtilis* treated with acidic hypochlorite. No vesicle is found on the surface of disinfected bacteria. Bars = 0.5 μm .

小胞を認めた。一方、次亜水処理では菌体表面構造から滑らかさが失われて粗くなる変化が見られ、約半数に菌体にへこみなどの変形が見られた (Fig. 3d)。小胞はごく少数の菌体に見られるのみであった。超薄切片で観察すると、小胞は単位膜で構成され内部は無構造であったが、電子密度の低い内容物を含むこともあった。また、菌体の表面構造がはく離しているように見え、細胞壁外膜が損傷を受けているものと考えられた (Fig. 4)。一方 *B. subtilis*, *S. aureus* では、酸性次亜水、電解水で処理したときには、菌体表面がげば立っていることが透過型電子顕微鏡で観察され、細胞壁が損傷を受けていることが示唆された。しかし、この変化は顕著ではなく、小胞構造は全く見られなかった (結果は示さない)。

E. coli, *B. subtilis* を5% NaCl水溶液で処理すると、消毒剤で処理しない菌体では原形質分離が起こり、細胞壁と細胞膜の間に大きな空間が生じる (Fig. 5a, c)。これに対し、3種いずれの消毒剤による処理でも原形質分離が全く認められず (Fig. 5b, d)、細胞膜の半透性が傷害されていることが示唆された。

4. フローサイトメーターによる解析

消毒剤による細胞膜の損傷が示唆されたので、これを検証するためにフローサイトメーターによる分析を行った (Fig. 6)。生細胞に取り込まれて細胞質内のエステラーゼで代謝されて蛍光を発する6CFDAと細胞質膜が損傷した細胞に浸透してDNAに結合することで発色するPIの2種の蛍光色素を用いた。その結果、未消毒

Fig. 6. Flow cytometric analysis of *E. coli* ATCC 17755 exposed to acidic hypochlorite. By 10 second treatment with acidic hypochlorite *E. coli* change from 6-carboxy-fluorescein diacetate (6CFDA) positive and propidium iodide (PI) negative (a) to 6CFDA negative and PI positive (b).

の場合には *E. coli* ATCC 11775 の 90% 以上が 6CFDA により染色され、PI では染まらなかった。しかし、1 分の酸性次亜水処理によって、細胞は 6CFDA 陰性、PI 陽性となり、エステラーゼが活性を失うと同時に細胞膜が損傷を受けていることが示された。*E. coli* O157:H7 でも同様であり、電解水、次亜水による処理でも、同様の結果が得られた。

考 察

電解水は、食塩水もしくは希塩酸を隔壁で分離しながら電気分解して作製するもので、特別な装置を必要とする。われわれは、次亜塩素酸溶液に塩酸を加えて酸性にするだけで電解水と同等の消毒剤がつくれることを示し^{10,11)}、内視鏡の消毒に応用し成果を上げてきた¹²⁾。次亜塩素酸はアルカリ水溶液中では主に ClO^- を生じ、酸性にすると解離していない HClO が増加する。次亜塩素酸の殺菌力は ClO^- よりも、 HClO に大きく依存しており、これが酸性次亜水が強い殺菌力を持つ理由とされている¹⁶⁾。

今回用いたものはおよそ pH 2.5、残留塩素 50 ppm であったが、酸性次亜水は pH 2.6 から 3.5、残留塩素濃度が 5 ppm でも有効な殺菌力を示すという報告がある^{3~5)}。このように酸性次亜水は広範囲な濃度にわたって十分な殺菌力を有するので、作製に厳密な計量を必要としない。今回われわれは酸性次亜水と電解水の消毒力、消毒機構が同一であることを示すこと、および食品分野に応用することを目的に、食中毒菌に対する消毒力を検証した。また、実際の野菜の消毒でも、もやしでは次亜水よりも高い効果が確認できた。一方、レタスでは水洗に比べ菌数が減少したものの、酸性次亜水、電解水および次亜水の殺菌力に有意な差がなかった。Koseki ら⁷⁾ もレタスの殺菌では電解水と次亜水の殺菌力に差を認めず、気孔などに侵入した菌や biofilm 中の菌が生残したと考察している。芽胞の殺菌で示されたように酸性次亜水と電解水は同濃度の残留塩素を含む次亜水より消毒力が高く、特に、*C. botulinum* に対する消毒力は 5 log

と実用性を有するものであった。

次亜塩素酸による殺菌機構は、細胞壁および細胞膜の破壊、蛋白質の酸化、膜酵素の不活化、糖およびアミノ酸輸送の阻害など、さまざまな考察がなされている¹⁾。今回の電子顕微鏡観察では、酸性次亜水、電解水処理によって大きな変化が見られ、*E. coli*, *P. aeruginosa* の表面全体に多数の小胞構造が生じた。酸性化していない次亜水ではこのような構造はごく少数の菌体に認めるのみであった。これは、次亜塩素酸の殺菌機構が pH によって変化することを示すものかもしれない。

電解水が細菌に与える損傷としては、岩沢と中村⁴⁾ が *E. coli* O157 の表面に菌膜のはく離が生じることを超薄切片で観察している。走査電顕^{2,4)} による観察も行っているが、われわれが観察したような小胞は形成されていない。グラム陰性菌では、抗生物質などの処理により、細胞壁外膜が小胞を形成したり⁸⁾、細胞壁の損傷により細胞膜が菌体表面に突出する¹⁴⁾ ことが報告されている。今回われわれが観察した小胞は典型的な単位膜構造を有しており、細胞壁外膜、細胞膜のいずれかであると思われるが、どちらであるかを特定するには至らなかった。小胞の膜が細胞膜である場合でも細胞壁の損傷がなければ菌体表面に突出することはない。酸性次亜水、電解水がグラム陰性菌の細胞壁を傷害するのは確かなことと思われる。実際に菌体表面の損傷が、超薄切片の観察では認められた。グラム陽性菌で見られた菌体表面のけば立った構造は形態的には顕著なものではなかったが、細胞壁の損傷を示すものと思われるので、さらなる検討が必要である。

消毒剤処理により、高張処理したときの原形質分離が見られなくなった。これは細胞膜が損傷を受け、半透性が失われたためと考えられる。細胞膜の透過性の変化はフローサイトメーターでも示され、3 種いずれの消毒剤によってもエステラーゼ活性の消失と同時に膜透過性のない PI が菌細胞質内に侵入するようになった。

以上の電子顕微鏡、フローサイトメーターでの観察には酸性次亜水、電解水で全く違いがなかった。どちらの消毒剤も細菌の細胞壁、および細胞膜を傷害することが強く示唆され、これがこれら消毒剤の作用機作の一つであると考えられた。

これまでのわれわれの研究^{10,11)}と同様に、今回の研究でも、酸性次亜水と電解水とに違いを見いだすことはできず、この 2 種の消毒剤が同一であることを検証することができたと考える。電解水の作製には、10 万から数百万円の装置が必要で、作製量、作製時間はその装置の規模に依存する。酸性次亜水は混合するだけで作製できるので、量、時間に制限を受けることがない。また、われわれが行った消化器内視鏡の消毒への実用実験¹²⁾では、計量を簡便にするために耐酸性のある分注器を購入したのみで、導入にかかるコストはわずかであった。薬品のコストも、試薬級のものをいっても 1 L 当たり 1 円程度

であった。したがって、次亜水より殺菌力が強く電解水に代わりうる酸性次亜水は、殺菌効果だけでなく、経済的な利点も大きいものと思われる。

要 約

食中毒菌に対する消毒効果を、残留塩素濃度が約 50 ppm の酸性次亜塩素酸水（酸性次亜水、次亜塩素酸水に塩酸を添加）、強酸性電解水（電解水、食品添加物）について比較した。どちらの消毒剤も栄養菌体の生残を 10 秒で 6 log 以上、ボツリヌス菌、枯草菌の芽胞を 10 分間でそれぞれ 5.0, 1.8 log 低下させた。もやしに付着する菌の殺菌でも、両消毒剤は次亜塩素酸水より効果的であった。酸性次亜水、電解水で処理した大腸菌、緑膿菌の電子顕微鏡観察では菌体表面に多数の小胞が認められ、細胞壁が損傷を受けていることが示された。高張処理、フローサイトメーターによる分析では、細胞膜の損傷が認められた。これらより、細胞壁および細胞膜の傷害が両消毒剤の作用機作であることが示唆された。行ったすべての実験で酸性次亜水、電解水に差はなく、機器を必要とせず安価に作製できる酸性次亜水は、電解水と同等に使用できることが示された。

謝 辞

E. coli O157:H7 Sakai を分与してくださった宮崎大学の林 哲也博士に深謝いたします。

文 献

- 1) Barrette, W. C. Jr., Hannum, D. M., Wheeler, W. D. and Hurst, J. K.: General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry*, **28**, 9172-9178 (1989).
- 2) 岩沢篤郎, 中村良子: 強酸性電解水の抗微生物効果 (III) 電子顕微鏡的観察. *環境感染*, **10**, 53-57 (1995).
- 3) 岩沢篤郎, 中村良子: 酸性電解水と擬似的酸性水との殺菌効果の比較検討. *感染症誌*, **70**, 915-922 (1996).
- 4) 岩沢篤郎, 中村良子: 酸性電解水の腸管出血性大腸菌 O157:H7 に対する殺菌効果. *環境感染*, **13**, 118-123 (1998).
- 5) 岩沢篤郎, 中村良子, 丹羽友和, 西本右子: 強酸性電解水の殺菌効果に対する pH の影響. *防菌防黴*, **30**, 635-643 (2002).
- 6) 厚生労働省医薬品局食品保健部長: 食品衛生法施行規則の一部を改正する省令及び食品, 添加物等の規格基準の一部を改正する件について. 平成 14 年 6 月 10 日, 食発第 0610003 号 (2002).
- 7) Koseki, S., Yoshida, K., Isobe, S. and Itoh, K.: Decontamination of lettuce using acidic electrolyzed water. *J. Food Prot.*, **64**, 652-658 (2001).
- 8) Lounatmaa, K., Helena, P. Makela, and Sarvas, M.: Effect of Polymyxin on the Ultrastructure of the Outer Membrane of Wild-Type and Polymyxin-Rof *Salmonella*. *J. Bacteriol.*, **127**, 1400-1407 (1976).
- 9) 西村哲治, 中室克彦: 水質試験法—残留塩素. 衛生試験法注解. 日本薬学会編, p. 870-871. 金原出版, 東京 (2005).
- 10) 大久保耕嗣, 浦上 弘, 多村 憲: 強酸性水と酸性次亜塩素酸水の殺菌効果の比較. *環境感染*, **13**, 184-188 (1998).
- 11) Okubo, K., Urakami, H. and Tamura, A.: Cytotoxicity and microbicidal activity of electrolyzed strong acid water and acidic hypochlorite solution under isotonic conditions. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.*, **73**, 1025-1031 (1999).
- 12) 大久保耕嗣, 浦上 弘, 多村 憲: 酸性次亜塩素酸水の消化器内視鏡消毒への応用 (強酸性水との比較) *H. pylori* に対する殺菌効果と金属腐食性および安定性. *環境感染*, **15**, 247-251 (2000).
- 13) Rhodhamel, E. J.: *Media. Bacteriological Analytical Manual* 7th ed., p. 456-457, FDA, USA (1992).
- 14) Schmid E. N.: Ultrastructure and viability of *K. pneumoniae* treated with fosfomycin. *Zbl. Bakt. Hyg.*, **247**, 339-346 (1980).
- 15) 柴田洋文, 壺井基夫, 渡部一仁: スポア調整法. スポア実験マニュアル. 近藤雅臣, 渡部一仁編, p. 19-36, 技報堂出版, 東京 (1995).
- 16) Trueman, J. R.: The halogens. Inhibition and distraction of the microbial cell. Hugo, W. B. ed., p. 137-183, Academic Press, London (1971).
- 17) Urakami, H., Tsuruhara, T. and Tamura, A.: Electron microscopic studies on intracellular multiplication of *Rickettsia tsutsugamushi* in L cells. *Microbiol. Immunol.*, **28**, 1191-1201 (1984).