

## 短報

新規アルカリ性電解ミネラル水によるインフルエンザ A の不活性化

中島 隆二<sup>1</sup>、河本 将臣<sup>1</sup>、宮崎 茂<sup>1</sup>、太西 るみ子<sup>2</sup>、古崎 孝一<sup>2</sup>、小野  
寺 節<sup>3</sup>

<sup>1</sup>一般財団法人生物科学安全研究所（神奈川県相模原市緑区）、<sup>2</sup>株式会社サンタミネラル  
／一般社団法人ミネラル活性化技術研究所（熊本県玉名市）、<sup>3</sup>東京大学大学院農学生命  
科学研究科食の安全研究センター（東京都文京区弥生）

## 抄録

我々は、炭酸水素カルシウム含有ミネラル水に電場を連続的にかけ、新規のアルカリ性電解水（マイクロクラスター（microcluster: MC）ウォーター、pH 12.39）を得た。ヒトから単離した低病原性インフルエンザウイルス（A/Aichi/2/68、H3N2）〔OFL\_ISL\_236〕または豚から単離した低病原性インフルエンザウイルス（A/swine/Wadayama/5/69、H3N2）〔OFL\_ISL\_8147〕を Madin-Darby イヌ腎臓細胞中で繁殖させ、この新規アルカリ性電解水で処理後のウイルス力価の減少を試験した。全てのウイルス粒子が 15 分以内に破壊されたことから、この新規アルカリ性水はインフルエンザウイルスによる環境汚染制御に有用であると考えられる。MC ウォーターは、ヒトまたは動物の皮膚に接触すると加速された放電が起こるため、中性となり安全である。この新規アルカリ性電解水の pH は、ヒトの皮膚上でのアトマイゼーション後 1 分以内に 8.84 に変化する。この技術を広く公共衛生において応用するために、他のウイルス、バクテリアおよび微生物へのアルカリ性電解水の影響を調べる必要がある。水素貯蔵金属の理論を用いてこの新規アルカリ性電解ミネラル水の生成を説明した。

キーワード：電解水、インフルエンザウイルス、公共衛生

## 連絡先

小野寺 節

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1、東京大学食の安全研究センター  
電話・ファックス：+81-3-5841-8182、email：takashi.onodera@riken.jp

## 略語リスト

AIV: avian influenza viruses (トリインフルエンザウイルス)  
EPA: U.S. Environmental Protection Agency (米国環境保護庁)  
FIR: far-infrared ray (遠赤外線)  
HBV: human hepatitis B virus (ヒト B 型肝炎)  
NI: neutralization index (中和指数)  
MDCK cells: Madin-Darby canine kidney cells (Madin-Darby イヌ腎臓細胞)  
MC water: microcluster water (マイクロクラスターウォーター)  
TCID50: 50% tissue culture infective dose (50%組織培養感染量)

インフルエンザウイルスはオルトミクソウイルス科に属する。ヒトインフルエンザウイルスとして A、B および C のタイプが確認されており、この分類は型特異的核タンパク質およびマトリックスタンパク抗原に基づく。A 型インフルエンザウイルスは、さらに、ウイルス表面に発現する赤血球凝集素とノイラミダーゼ糖たんぱく質の抗原特性によってサブタイプに分類される。

インフルエンザウイルスは分割型ゲノムを持ち、その再集合は、種間伝搬や抗原シフトを通じた宿主の免疫応答からの回避を促進する遺伝的多様性を作り出す強力な方法である。再集合は、2 種のウイルスが同じ細胞に感染したときに起こり、また、ヒト集団において世界的流行（パンデミック）が起こる重要なメカニズムである。1957 年および 1968 年のインフルエンザパンデミックを起こしたウイルス株は、共に、トリウイルスと一般的なヒトインフルエンザ株の間における遺伝子再集合から発生したものである(1)。

次亜塩素酸塩、アルカリ、酸化剤、アルコールおよびアルデヒドなどの不活性化剤の全てが、比較的短時間の接触時間で、トリインフルエンザウイルス（avian influenza viruses : AIV）に対して有効である(2)。しかしながら、液体中または使用場所に有機材料が存在すると、不活性化剤の威力が弱まる(3, 4)。トリインフルエンザは、接触伝染性が高いため、その制御は非常に困難である。これらの感染と戦う最善の方法は、バイオセキュリティを高めることであるが、野生の渡り鳥や、様々な AIV サブタイプの抗原性が不安定であることが、家禽予防接種の問題点である(5-7)。

この報告では、新規アルカリ性電解水を用いて培養液中のウイルスを殺菌した。この新規アルカリ性電解水の生成を説明するのに水素貯蔵金属の理論が用いられた(8)。全てのウイルス粒子が 15 分以内に破壊されたことから、この新規アルカリ性水はインフルエンザウイルスによる環境汚染制御に有用である可能性がある。動物またはヒトの皮膚表面でアトマイゼーションすると、この新規アルカリ性電解水の pH は中性になった。

ヒトから単離した低病原性インフルエンザウイルス（A/Aichi/2/68、H3N2）〔OFL\_ISL\_236〕または豚から単離した低病原性インフルエンザウイルス（A/swine/Wadayama/5/69、H3N2）〔OFL\_ISL\_8147〕を Madin-Darby イヌ腎臓細胞中で繁殖させたものを回収し、740 × g で 15 分間遠心分離後に小分けしたものを、使用または力価測定するまで -80°C で保存した。細胞培養中の処理前後のウイルスの力価をそれぞれ決定した。ウイルスは、2.5 μg/mL トリプシン（最終濃度、ウシ膵臓トリプシン 180 TAME ユニット/mg タンパク質、MP Biomedicals、サンタアナ、カリフォルニア州、USA）を含む培養液で希釈し、MDCK 細胞に対する力価を調べた。TCID<sub>50</sub>/mL は Behrens-Kaber 法(9)により決定した。

炭酸水素カルシウム含有ミネラル水に電場を連続的にかけ、新規のアルカリ性電解水（マイクロクラスター（microcluster: MC）ウォーター、CAC-717）を得た。テフロン絶縁体をコーティングした静電場電極（N-800N、ミネラル活性化技術研究所、熊本、日本）を用いて電場を生成し、2 × 10<sup>4</sup> V で 48 時間電圧をかけた（日本国特許 No. 5864010 出願中）。このアルカリ性水（日本国特許 No. 5778328）の pH は 12.39 ± 0.03 であり、メソスコピック構造を持つ、カルシウムと炭素の複合体マイクロ粒子（50-500 nm）を含有する。高電圧は水分子を電解し、水素イオンに電子を供給することにより水素イオンを水素原子に変換する。メソスコピックマイクロ粒子（100 mL 中 0.3 W）からは遠赤外線（far-infrared ray : FIR）が放射される。マイクロ粒子は水素原子をメソスコピック構造の中に蓄積及び固定化し、周囲を強アルカリ性の状態にする。さらに、MC ウォーターは、ヒト及び動物の皮膚と接触すると電子放出を加速し、その後中性で安全な物質となる。動物またはヒトの体

の表面でアトマイゼーションすると、MC ウォーターの pH は 9.0 未満となる。

ヒトの皮膚の pH は、Skin-pH-Meter pH905 (Courage Khazaka GmbH、ケルン、ドイツ) を用いて測定した(10)。各測定の前に、pH 標準溶液 (pH 4.01 及び pH 7.00) を用いて機器のキャリブレーションを行った。MC ウォーターの pH は、ペトリディッシュ中で測定した。皮膚上での pH 測定は、MC ウォーターを手の上ののせて測定した。

MC ウォーターを、臨界点乾燥機中で脱水し、プラチナ薄膜で覆った。調製した試料を走査型電子顕微鏡 (JEOL、JSM-7500) で調べた(11)。

MC ウォーターをストック溶液中で使用した。各ウイルスサンプルを 9 倍容量の殺菌剤と混合した。混合物を室温で 1~15 分間インキュベートし、その後直ちに試料を細胞培養液で希釈し、ウイルス力価を定量した。ウイルス試料を 9 倍容量の蒸留水と混合したものをネガティブコントロールとして用いた。既報の数値法を用いて薬剤のウイルス不活性化能を表した(12)。ウイルス不活性化の中和指数 (neutralization index : NI) を用いて薬剤の効果を評価した。ウイルス不活性化の NI は、ポジティブコントロールの力価を log10 指数に変換したものから (tpc)、MC ウォーター処理した試料から回収したウイルスの力価を同様に換したもの (ta) を減算したもの、すなわち、 $NI = tpc - ta$  の式を用いて求めた。NI が 3 を超える場合を、ウイルス不活性化の効果有りと定義した(12)。

炭酸水素カルシウム試料を走査型電子顕微鏡で調べたところ、回転楕円体のメソスコピック構造が明らかになった (図 1 A 及び B)。微小構造が MC ウォーターの乾燥残滓中に観察されたが、非電解の炭酸水素カルシウム水溶液中にはこれらの構造は観察されなかった。

MC ウォーターは、アルカリ性の環境において抗微生物作用の亢進を示す。MC ウォーターの元来の pH は  $12.39 \pm 0.03$  である (n = 10)。ヒトの手の皮膚に MC ウォーターを数滴 (0.5 mL) 落としたものを広げて 1 分後、皮膚表面の pH を Skin-pH-Meter pH905 を用いて測定した。皮膚上の pH 測定値は、アトマイゼーションにより  $8.84 \pm 1.17$  に変化した (n = 10) (表 1)。皮膚表面の測定値は 1 分間の間に有意に減少した (P < 0.005)。

表 1. MC ウォーターのペトリディッシュ中で測定した本来の pH またはヒト皮膚上で測定した pH

MC ウォーター	インキュベーション時間	
	0 分	1 分
CA717	12.39 ±0.03*	8.84 ±1.07

\*: 平均の標準偏差。ヒトの手の皮膚の異なる部位でそれぞれ 10 試料を試験した。

ウィルスの感染力の減少を調べるため、ウィルス懸濁液とアルカリ性電解ミネラル水の混合物の TCID50 を測定した。インフルエンザウィルスの感染力は、アルカリ性電解ミネラル水を含む混合物中においても、非電解水道水を含む混合物中においても、経時的に減少した（表 2）。減少度は、アルカリ性電解ミネラル水を含む混合物中の方が非電解水道水を含む混合物中よりも有意であった。電解溶液は、15 分以内にウィルスの感染力を完全に無効にした。

**Table 2. アルカリ性電解ミネラル水処理後の試料のウィルス力価**

インフルエンザウィルス	インキュベーション時間		
	1 分	5 分	コントロール
A/Aichi/2/68 strain	5.92*	3.58	<1.58
A/Swine/Wadayama/5/69 strain	5.92	2.75	<1.50

\*: log10 力価。検出系の検出限度は <1.50。

本報告では、カメラまたは他の周辺装置の洗浄及び消毒のための、内視鏡及び内視鏡的方法の例を報告する。アルカリ性電解水は様々な病原体の洗浄及び消毒に有用である(13)。本報告は、アルカリ性ミネラル水の消毒潜在能を示す。電解 NaCl 溶液の消毒潜在能はイムノアッセイ及びバイオアッセイで研究されている(13)。ヒト B 型肝炎 (hepatitis B virus : HBV) 用の *in vitro* バイオアッセイは入手できないため、HBV ウィルスコートタンパク質の抗原性に対する電解溶液の活性を検討した。電解溶液は、濃度依存的に、ヒト血清から精製された HBV 表面タンパク質の抗原性に影響を及ぼした。電解溶液には遊離の塩素や次亜塩素酸塩が含まれ、それらが HBV の感染力を無効にしたのではないかと結論づけられた。

世界保健機構は、1:100 の塩素水 (Chlorox 及び Eau-de-Javel と一般的には知られている) で表面を拭くことでインフルエンザウィルスを除去することができると奨励している(14)。そのため、全ての吸収剤は丈夫なゴミ袋に入れて焼却する必要がある。消毒後、表面は清潔な浄水ですすがなければいけない。手の消毒の主な方法は、水と石けんを使った洗浄である。もし入手可能であれば、市販のアルコール、クロルヘキシジンまたはポビドンヨード含有の手指消毒剤を使用すべきである(14)。威力の強い塩素水 (1:100 塩素水など) は危険なため、避けるべきである。検死解剖に使用された器具は、1:100 塩素水または 70%エタノールで消毒するべきである(14)。

U.S.環境保護局 (Environmental Protection Agency : EPA) に登録された消毒剤の使用も奨励されている。登録された全ての消毒剤は、EPA のウェブサイトで見ることが出来る(15)。製品ラベルにヒトインフルエンザ A 及び/または B に有効であると記載された、約 400 種の登録済み消毒剤が存在する。製造元の指示に従って使用した場合、その全てがインフルエンザウィルスを不活性化する。

本報告は、電解して間もない電解水には、炭酸水素カルシウムイオン、電子、酸素ラジカル種、及び水素カルシウム粒子が含まれるであろうことを示すものである。消毒効果の大部分が炭酸水素カルシウムイオンのアルカリ性の影響であることを説明するのは難しい。その効果は、おそらく、遊離のアルカリ性イオンと、FIR などの電解溶液に存在する他のいくつかの因子にも因るであろう。FIR イメージングカメラでの観察より、メソスコピック粒子上での FIR 上昇が検出されている (Furusaki, K. et al.: 未発表の観察結果)。FIR は多くの微生物の核酸を破壊することが知られている(16)。進行中の実験では、MC ウォーターがインフルエンザウイルス RNA を破損することが、リアルタイム PCR より検出されている (Kirisawa, R. et al: 未発表の観察結果)。電解液は新規に発見された消毒剤ではないものの、その活性を臨床的及び環境的背景から再度評価することは重要である。

洗浄及び消毒計画は、インフルエンザウイルスの発生中、ウイルスができる限り広まらないようにする重要な部分である。効果的な計画においては、除菌処理の対象、処理の回数、材料と方法、清掃スタッフのトレーニングの概要が明記されていなければならない。適切なミネラルの使用、技術及び明確な洗浄計画は、施設におけるパンデミックへの対応を支援するものとなるだろう。

広範囲に、アルカリ性電解水技術を応用するためには、アルカリ性電解水が、他のウイルス、バクテリア及び微生物に及ぼす効果も検討する必要がある。

## 謝辞

本研究の一部における、ナカムラ ヒカル氏、ハリタニ マコト博士の援助に感謝する。

## 利益相反

全ての著者には利益相反がないことを宣言する。

## REFERENCES

1. Scholtissek, C. Rohde W., Von Hoyningen V. and Rott R. (1978) On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87: 13-19.
2. Maillard, J.Y. and Russell, A.D. (1997) Viricidal activity and mechanism action on biocides. *Sci. Prog.* 80: 287-315.
3. Quinn, P.J. and Markey, B.K. (1992) Disinfection and disease prevention in veterinary medicine. pp. 1069-1104. In: *Disinfection, Sterilization, and Preservation*. 5th we. (Block, S.S. ed.) Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
4. Sattar, A.S. and Springthorpe, S. (1999) Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents. pp. 109-138. In: *Principles and Practice of Disinfection, Preservation, and Sterilization*, 3rd ed. (Russell, A.D., Hugo, W.B. and Ayliffe, G.A.J. edss.), Blackwell Science, Oxford.
5. Gilbert, M., Xiao, X., Domenech, J., Lubroth, J., Martin, V. and Slingenbergh, J. (2006) Anatidae migration in the western Palearctic and spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Emerg. Infect. Dis.* 12: 1650-1656.
6. Stalknecht, D.E. and Shane, S.M. (1988) Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet. Res. Commun.* 12: 125-141.
7. Suarez, D.L. (2012) DIVA vaccination strategies for avian influenza virus. *Avian Dis.* 56 Suppl: 836-844.
8. Shimada, M. (2013) Preparation of New Magnesium Hydride-Based Composites and Their Hydrogen Absorption Desorption Properties, [Osaka Prefecture University Doctoral Thesis](#)
9. Matumoto, M. (1949) A note on some points of calculation method of LD50 by Reed and Muench. *Jpn. J. Exp. Med.* 20: 175-179.
10. Ehlers, C., Ivens, U.I., Moller, M.L., Senderovitz, T. and Serup, J. (2001) Comparison of two pH meters used for skin surface of pH measurement : the pH meter 'pH900' from Courage & Khazaka versus the pH meter '1140' from Mettler Toledo. *Skin Res. Technol.* 7: 84-89.
11. Sueyoshi, M. and Nakazawa, M. (1994) Experimental infection of young chicks with attaching and effacing *Escherichia coli*. *Indect. Immu.* 62: 4066-4071.
12. Lombardi, M.E., Ladman, B.S., Alphin, R.L. and Benson, E. (2008) Inactivation of avian

- influenza virus using common detergents and chemicals. *Avian Dis.* 52: 118-123.
13. Morita, C., Sano, K., Morimatsu, S., Kiura, H., Goto, T., Kohno, T., Hong, W., Miyoshi, H., Iwasawa, A., Nakamura, Y., Tagawa, M., Yokosuka, O., Saisho, H., Maeda, T., and Katsuoka, Y. (2000) Disinfection potential of electrolyzed solutions containing sodium chloride at low concentrations. *J. Virol. Meth.* 85: 163-174.
  14. WHO. (2006) <http://www.who.int/csr/resource/publication/surveillance/Annex7.pdf>
  15. US CDC, Interim Guidance on Environmental Management of Pandemic Influenza Virus: Web. Web accessed 08 January (2013)  
<http://www.pandemicflu.gov/professional/hospital/influenzaguidance.html>
  16. Kawagoe, N., Oyokota, S., Kikuchi, Y., and Takesato, K. (1998) Sterilizer, US5714119A, <http://www.google.com/patents/US5714119>.



## 図の説明

**Fig. 1A.** 炭酸水素カルシウムの中スケール構造の走査電子顕微鏡画像。回転だ円形構造が、水溶液の高電圧処理後に形成される。図中のスケールバーは 100 nm を示す。

**Fig. 1B.** 炭酸水素カルシウムの中スケール構造のより高倍率での走査電子顕微鏡画像。図中のスケールバーは 10 nm を示す。



