

バイオクリーンルームにおける微生物対策予測 —一次亜塩素酸水の検証を中心に—

山口 一^{1*}・山田 容子¹

The Prediction of Anti-Microbe Measurement in Biological Cleanroom —Examination of Sterilizing Efficacy of Hypochlorite—

Makoto YAMAGUCHI^{1*} and Yoko YAMADA¹

Received 28 December 2015

Accepted 29 February 2016

Abstract In pharmaceutical or food production facilities, a high standard of internal environment of the facility is required, including countermeasures against microorganisms. These countermeasures from the facility point of view include partitioning of work zones (zoning), and cleaning the air using HEPA filters. However, when workers/researchers are working within a facility, dispersion of dust or adhering microbe brought in with clothes, etc., cause pollution of the air. In this report, the sterilization performance of weak acid hypochlorous solution used as the chemical substance was verified. In addition, the sterilization performance in an actual space varied not only with the chemical substance used, but also with the condition of the room, the air conditioning system, the method of spraying, etc. Therefore, from the above sterilization performance tests using chemical substances, the raw data required for a computational fluid mechanics (CFD) model were derived. A method which is capable of predicting the effect of the chemical substance under various conditions was investigated, and the results are reported.

Keywords : Microbe, Hypochlorite, Slightly Acidic Electrolyzed Water, Sterilization, CFD, Indoor Air Quality.

1. はじめに

医薬品や食品の生産施設では、微生物対策を含めた高い水準の施設内環境が求められている。施設面からの微生物対策として、作業区分の区画（ゾーニング）化や HEPA フィルターを用いた空気清浄化などが一般的である¹⁾。しかし、施設内で作業員が作業する場合は、衣類や持込まれる機器などからの塵埃や付着菌の飛散が空気汚染の原因となる場合がある。そのため、施設面のみの対策だけでは、微生物の制御は不十分で

あり、何らかの直接的な殺菌技術が必要となる。

空中浮遊菌や付着菌の殺菌には、薬剤の空中噴霧がもっとも有効である。薬剤の選定にあたっては、殺菌効果ばかりでなく、人体への毒性や実際に使用する現場や環境への適用性を考慮する必要がある²⁾。従来、医薬品工場の無菌製剤クリーンルームなどでは、ホルマリンガスを用いた燻蒸処理が一般的であったが、発癌性の問題から、過酸化水素を用いた除染システムなどに置き換わってきた。われわれはすでに、過酸化水素による除染システムの効果をバイオリジカルクリーンルーム（以下、BCR）にて検証した³⁾。しかし、過酸化水素による除染は、35%（w/w）と高濃度の溶液を使用するため、病院や食品工場などの施設では、より汎用性の高い薬剤使用が望まれる。

次亜塩素酸ナトリウム（NaOCl）は、広い殺菌スペクトルと速効性をもった殺菌剤であり、食品工場を

¹ 清水建設株式会社社会技術研究所
〒135-8530 東京都江東区越中島 3-4-17)

¹ Shimizu Corporation, Institute of Technology
Etcujima 3-4-17, Koto-ku, Tokyo 135-8530, Japan

* Corresponding Author.

E-mail: makoto.yamaguchi@shimz.co.jp (M. Yamaguchi)

じめ医療、保健介護施設において長年使用されてきた^{4,5)}。しかし、アルカリ性のNaOCl水溶液は、発癌性物質であるトリハロメタン類が副生することが知られていた⁶⁾。一方、近年では、電気分解で製造する微酸性の次亜塩素酸水が普及している⁷⁾。これらの弱酸性(pH 5.0～6.5)の水溶液は、主たる殺菌因子である非解離型HOClを高比率で含有している。解離型の次亜塩素酸イオン(CIO⁻)を主成分とする次亜塩素酸ナトリウムと比較して、微生物細胞膜への浸透性が高く、低濃度、短時間で殺菌が可能である⁷⁾。また、アルカリ性であるNaOCl水溶液と異なり、弱酸性域ではトリハロメタン類の生成量が抑えられることが報告されている⁸⁾。

弱酸性のNaOCl水溶液を霧化し、空間に噴霧することで、細菌の殺菌やウイルスの不活化を効果的に実施した研究例が報告されている^{9,10)}。しかし、対象はクリーンベンチなどの小空間が主で、実大の室空間での薬剤効果の検証や薬剤効果を予測した研究は皆無であった。室内空間における微生物対策の効果は、使用する薬剤や対象の微生物ばかりでなく、対象室の状況、空調条件や薬剤の散布条件などによって異なると考えられる。したがって本報では、代表的な条件で霧化試験を実施し、気流解析モデル(CFD)に必要なデータ(原単位)を導き出し、さまざまな条件下での薬剤効果を予測できる手法を検討したので報告する。

2. 製造区域での環境モニタリング法

まず最初に、もっとも維持・管理された区域の一つである、無菌医薬品の製造区域での環境モニタリング

を紹介する¹¹⁾。製造区域とは、培養、抽出・精製、容器などの洗浄・乾燥、原料秤量、薬剤の調製、滅菌、充填、閉塞、包装表示などの作業を行う場所、および更衣を行う場所である。無菌医薬品の製造区域は、取り扱う容器、原料および中間製品が微生物および微粒子に汚染されることを防止する必要がある。

医薬品製造環境の空中浮遊微粒子は、空調システムの稼動状況を把握する重要な指標の一つとなる。物理的には製品に混入して不溶性微粒子の原因の一つになり、また生物学的には微生物の担体となり得る。そこで医薬品製造環境中では微生物数と同様に空中浮遊微粒子数についても一定の基準以下に制御されていることを保証しなければならない。そのために、風量、気流パターン、換気回数、人・物の動線などを適切に設計することにより、空中浮遊微粒子を効果的に排出することが必須となる。製造区域ごとに要求される空気清浄度および環境微生物の許容基準を**Table 1**および**Table 2**に示す。微粒子測定基準に応じたそれぞれのグレード分類をISO 14644-1のクラス分類と比較するとグレードAの作業時(In operation)の基準はISO5、グレードBの作業時の基準はISO7、グレードCの作業時の基準はISO8にはほぼ等しい。ただし、製品の種類、大きさ、製造装置の仕組み、自動化レベル、容器や栓の滞留時間、空調装置など環境設備により無菌製品への汚染リスクは異なるため、必要性に応じた適切なモニタリングプログラムを確立し、運用することが重要である。

このように、いろいろの条件の適した環境モニタリングを構築するためにも、対象とする空間シミュレー

Table 1 Clean room and clean device classification

Clean air classification	Maximum permitted number of particles per m ³ equal to or greater than the tabulated size			
	At rest		In operation	
	≥ 0.5 μm	≥ 5.0 μm	≥ 0.5 μm	≥ 5.0 μm
Grade A (ISO 5)	3,520	20	3,520	20
Grade B (ISO 7)	3,520	29	352,000	2,900
Grade C (ISO 8)	352,000	2,900	3,520,000	29,000
Grade D	3,520,000	29,000	Not defined	Not defined

Table 2 Recommended limits for microbiological monitoring of clean areas during opration

Grade	Recommended limits for microbial contamination ¹⁾			
	Air sample (CFU/m ²)	Settle plates ²⁾ (CFU/plate)	Contact plate	Glove print
			(CFU/24～30 m ²)	(CFU/5 fingers)
A	< 1	< 1	< 1	< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	—
D	200	100	50	—

¹⁾ These are average values.

²⁾ Individual settle plates may be exposed for less than 4 hours.

ションが確立できれば有用なツールとなろう。次に、気流解析モデル（CFD）を活用した具体的な空間シミュレーションの事例を紹介する。

3. 微生物対策予測の確立

3.1 BCR での実大試験

1) 試験条件

試験は、室容積約 51 m³ (W 2.7 m × D 7.0 m × H 2.7 m)、非一方向流型で ISO6 の BCR にて行った (Photo 1, Fig. 1)。今回は、次亜塩素酸水を用いたミスト噴霧を例にとる。次亜塩素酸水は、次亜塩素酸ナトリウムを

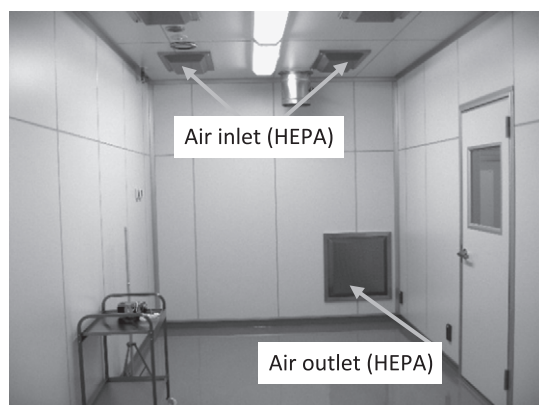


Photo 1 BCR (The shaft space side).

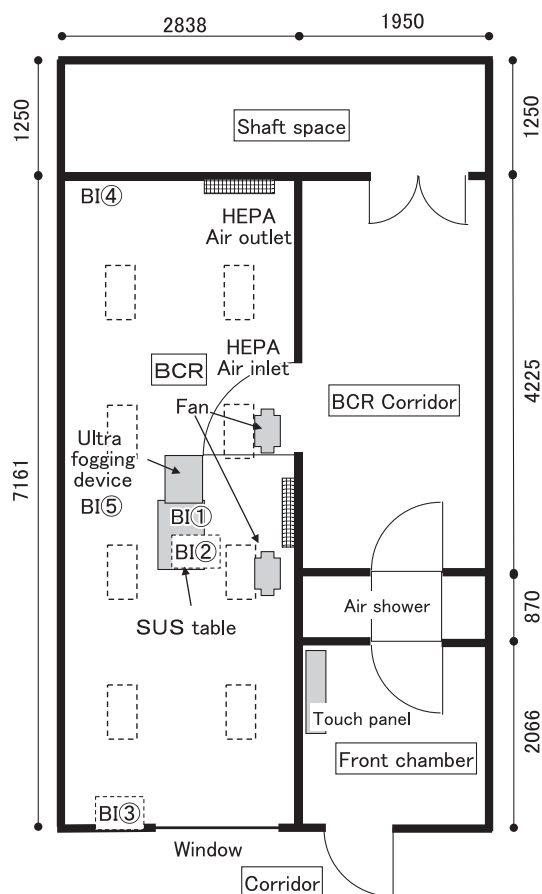
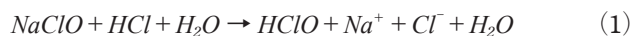


Fig. 1 Plan view of BCR.

塩酸と水を混合し、所定の濃度に調整した弱酸性の液体である (pH 5.5~pH 6.5)⁷⁾。試験前に、pH と残留塩素濃度を pH 計 (サンテックス, TS-1) とクロラインメータ (バイオニクス機器㈱, RC-50T) でおおの測定し、試験薬剤の安定性を確認した。



試験菌は、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌とグラム陰性菌の大腸菌を用いた。試験菌の選定には、外膜を有するグラム陰性菌と外膜のないグラム陽性菌では抗菌性の作用時間が異なることを考慮した。試験には、滅菌保証の基準とされている ISO11138-1 などの規格に準拠し¹²⁾、TSA (Trypase Soy Agar; Difco) で前培養した 10⁶ 個の菌数を、親水性ポリエステル布 (20 mm 角) に滴下した (以下、BI; バイオインジケータと呼ぶ)^{*1}。試験前に BI を、BCR 内のテーブル上 (BI ①)、テーブル下 (BI ②)、窓側隅角部床 (BI ③)、壁側隅角部床 (BI ④) および壁面 (BI ⑤)^{*2} の 5 か所に設置した。超音波噴霧装置 1 台 (UD-2000HTi, 本多電子) を BCR 中央に設置し (Photo 2, Fig. 1), BCR 内に次亜塩素酸水を、所定の濃度で超音波噴霧装置により、1 時間で約 1 L を 0.2 m³/min の風量で噴霧し、保持 1.5 時間、その後 1 時間で白金触媒による分解処理を行った (Table 3)³⁾。その際、室内の床に設置した 2 台のエアファン (6.5 m³/min・台) にて気中の薬剤を攪拌した。また、BI 試験前の BCR の温湿度は、25℃で RH 50% に調整した。

試験後、室内の BI を回収し、残存する薬剤の影響を除去するため、チオ硫酸ナトリウム含有の SCDLP 液体培地で薬剤の反応を停止後、遠心管で液体培養か TSA 培地で培養した。薬剤効果の BI 判定は、培養後の液体培地が透明の場合は菌が死滅あるいは増殖せず (陰性; -) と判定し、液体培地が濁った場合は増殖菌あり (陽性; +) と判定した。寒天培地の場合は、生菌数 (コロニー数; cfu) で評価した (Fig. 2)。

2) 薬剤効果の検証

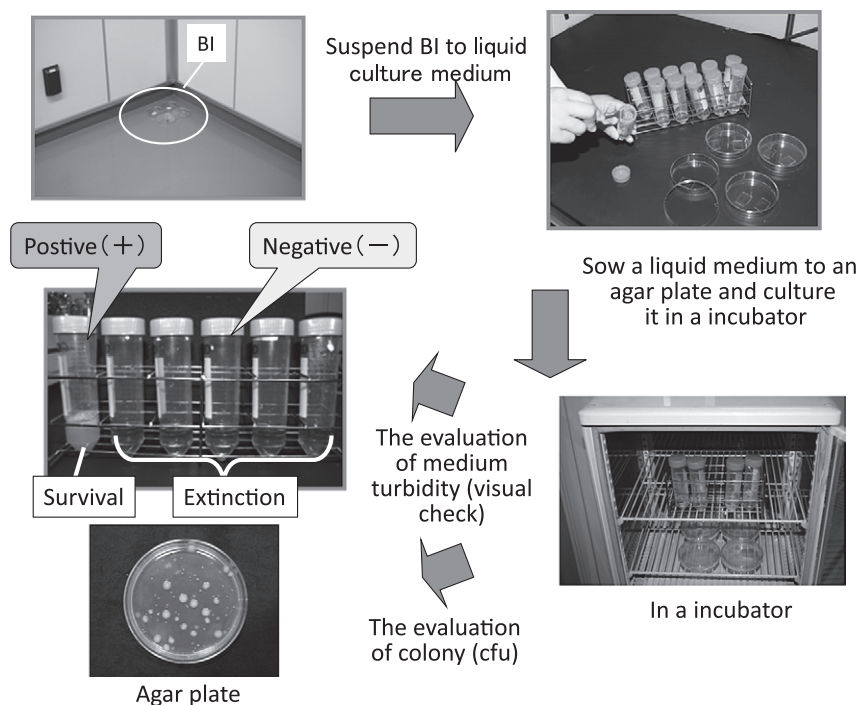
BCR にて次亜塩素酸水を、200 ppmw, 100 ppmw,



Photo 2 Ultrasonic fogging device.

Table 3 Condition of operation in BCR

Device \ Condition	Fogging (1 hr)	Keeping (1.5 hrs)	Degradation (1 hr)
Ultrasonic fogging device	ON	OFF	
Fan for indoor pneumatic agitation	ON		OFF
Fan for air circulation duct	OFF		ON

**Fig. 2** Evaluation method of BI.**Table 4** The Ultrasonic Fogging Condition

Condition	Planned effective chlorine concentration [ppmw]	Real effective chlorine concentration [ppmw]	pH	Chemical input [L]	Chemical input [mg]	Chemical input rate [mg/h]
Case 1	200.0	203.3	6.60	1.075	218.5	218.5
Case 2	100.0	98.8	6.30	0.987	97.5	97.5
Case 3	50.0	50.2	6.25	1.001	50.3	50.3
Case 4	25.0	24.3	6.25	1.022	24.8	24.8
Case 5	12.5	12.6	6.19	1.012	12.8	12.8
Case 6	5.0	5.1	6.10	1.012	5.2	5.2

50 ppmw, 25 ppmw, 12.5 ppmw および 5 ppmw の 6 段階の薬剤濃度に調整し、供試菌 (BI) に対する薬剤効果試験を行った。本試験で実施した薬剤の噴霧条件を **Table 4** に示す。本試験 3.5 時間後、BI の生存率を調査した。ISO による濁度判定だけでなく¹²⁾、コロニー数を測定した。次亜塩素酸水の場合、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) と大腸菌 (*Escherichia coli*) の両菌ともに、200 ppmw (Case 1) から 50 ppmw (Case 3) では、濁度判定「-」で、コロニー数も 0 個であり、菌の完全な増殖抑制効果を確認した。また、黄色ブドウ球菌で 25 ppmw (Case 4) の場合は、濁度判定ではすべて「+」と明確な差は確認できなかったが、コロ

ニー判定ではコントロールと比較し、出現したコロニー数は減少しており、完全ではないが若干の薬剤効果が確認できた。しかし、12.5 ppmw (Case 5) および 5 ppmw (Case 6) では、濁度判定はすべて「+」で、コロニー数はコントロールと同様に増殖し、薬剤の効果は確認できなかった (**Table 5**)。大腸菌では、200 ppmw (Case 1) から 25 ppmw (Case 4) まで完全に薬剤効果が認められ、12.5 ppmw (Case 5) では黄色ブドウ球菌の 25 ppmw の場合と同様に若干の抑制効果が確認でき 5 ppmw (Case 6) で薬剤効果は確認できなかった (**Table 5**)。今回の次亜塩素酸水の噴霧処理では、黄色ブドウ球菌では 50 ppmw、大腸菌では 25 ppmw で、

Table 5 Test result of BI

Strain	Condition	The evaluation of colony (cfu)					
		BI ①	BI ②	BI ③	BI ④	BI ⑤	Control
		On the table	Under the table	Floor on the window side	Floor on the wall side	Wall	
<i>S. aureus</i>	Case 1	0	0	0	0	0	7.4×10^6
	Case 2	0	0	0	0	0	7.4×10^6
	Case 3	0	0	0	0	0	7.0×10^6
	Case 4	1.3×10^3	4.0×10^3	9.2×10^2	7.0×10^2	4.4×10^2	8.7×10^6
	Case 5	6.7×10^5	6.0×10^5	6.1×10^5	5.3×10^5	5.8×10^5	7.3×10^6
	Case 6	4.2×10^6	3.5×10^6	4.8×10^6	6.0×10^6	3.4×10^6	7.5×10^6
<i>E. coli</i>	Case 1	0	0	0	0	0	9.8×10^6
	Case 2	0	0	0	0	0	8.2×10^6
	Case 3	0	0	0	0	0	8.7×10^6
	Case 4	0	0	0	0	0	1.0×10^7
	Case 5	1.1×10^4	1.8×10^4	5.6×10^3	6.6×10^3	1.7×10^4	1.0×10^7
	Case 6	8.3×10^6	6.0×10^6	5.1×10^6	8.6×10^6	7.8×10^6	7.0×10^6

Strain	Condition	The evaluation of culture medium turbidity (visual check)					
		BI ①	BI ②	BI ③	BI ④	BI ⑤	Control
		On the table	Under the table	Floor on the window side	Floor on the wall side	Wall	
<i>S. aureus</i>	Case 1	—	—	—	—	—	+
	Case 2	—	—	—	—	—	+
	Case 3	—	—	—	—	—	+
	Case 4	+	+	+	+	+	+
	Case 5	+	+	+	+	+	+
	Case 6	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	Case 1	—	—	—	—	—	+
	Case 2	—	—	—	—	—	+
	Case 3	—	—	—	—	—	+
	Case 4	—	—	—	—	—	+
	Case 5	+	+	+	+	+	+
	Case 6	+	+	+	+	+	+

菌の増殖を完全に抑制することが判明した。また、ISOが実施している濁度判定のみでなく¹²⁾、コロニー判定を実施することにより、より精確に薬剤効果を把握することができると思われる。

3.2 薬剤拡散のCFD解析

1) 解析条件

今回のBCRにおける薬剤噴霧試験のCFD解析には、流体解析ソフトウェアのFlowDesigner12を使用した^{13,14)}。乱流モデルには、高レイノルズ数型k-εモデルを用い、壁表面の境界条件には、一般化対数則を用いた^{※2)}。初期の温湿度は、25℃、50%RHとした。一つの粒子が噴霧されて蒸散するまでの時間は短いため、今回の実験で噴霧した粒径3μmは、噴霧直後にガス化し、反応熱は無視できると仮定した。噴霧装置の吹出口と吸込口の風速、BCR空調吹出口および吸込口の風量、および室内空気攪拌用のエアファンの風速は、BCRでの実測値を与えた。薬剤投入速度は、次亜塩素酸水での実測値を用いた（Table 4）。また、噴霧条件は、「3.1. 1）試験条件」に記載した通り、所定濃度の薬液を1時間で1L噴霧とし、すべての試験では、すべて有効塩素

濃度（ppmw）による殺菌効果として検証したので、本解析では噴霧した薬剤の物性^{※2)}は塩素分子（Cl₂）とした¹⁵⁾。FlowDesignerでの気中の薬剤（塩素）濃度の解析結果は、実験時のppmwと異なりppmv表示となる。

2) 室内薬剤濃度と各BIのCT値

Fig. 3に、BCR内の濃度分布の一例として、有効塩素濃度200ppmw時の薬剤噴霧20分後の結果を示す。中心から向かって、噴霧装置と反対側で若干の濃度ムラが観察されたが、室内のほとんどの濃度は0.2から0.25ppmvとなり、噴霧終了時にはBCR内で粗一様拡散した結果となった。次に、菌に対する薬剤の抑制指標として用いられてきたChick-Watsonの法則を基に、薬剤噴霧から分解までの各経過時間（Table 3）でのCT値（濃度の時間積分値）^{16,17)}について、BI①からBI⑤が設置されている場所の値を求めた。この場合、Table 5で試験した親水性ポリエステル布（20mm角）のBI上での値（ppmv・sec/BI）とした。Fig. 4に、次亜塩素酸水で、黄色ブドウ球菌に効果があった最低濃度50ppmw（Table 4, Case 3）の条件の結果を示す。「噴霧」時から1時間後の噴霧終了時までCT値（あるいは、気中

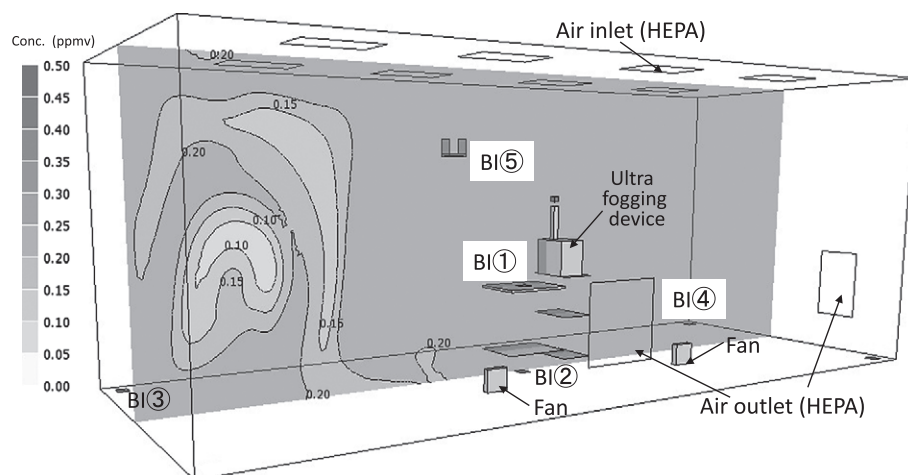


Fig. 3 Distribution map of chemical concentration in BCR (at 20 min after fogging).

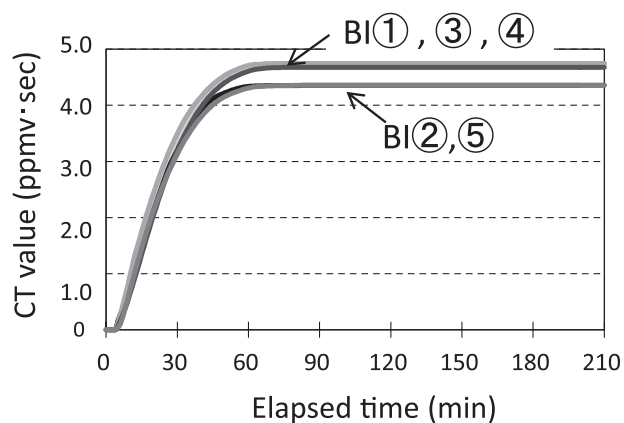


Fig. 4 CT value of each BI in Case 3 (ppmv · s/BI).

濃度)は上昇したが、「保持」時の1.5時間(噴霧開始時から2.5時間)の間でCT値の上昇は停止し、「分解」終了後の3.5時間後までCT値は一定値を示した。この現象は、「保持」時に気中のガス化した薬剤が、室内の2台の攪拌用エアファンの風量も大きく(下述)、すべて室内床面に吸着したと考えられる^{*2}。また、ほかのCaseにおいてもCase3と同様に、室内薬剤濃度の上昇と減衰による経時変化を確認した。

今回のCFD解析では、BI①③④に比べ、BI②⑤のCT値は若干低値となった。この結果は、噴霧装置、室内攪拌用ファンおよび各BIの配置と気流の影響が考えられる(Fig.1)。噴霧装置より噴霧された薬剤は、床面に設置した2台の攪拌用エアファンにより、床面から壁面、天井面へと風速3~4 m/sの強い軸流によって室内に拡散され、最終的に室内濃度は粗均一となる(Fig.5)。噴霧装置の近傍に位置したBI②がBI④より

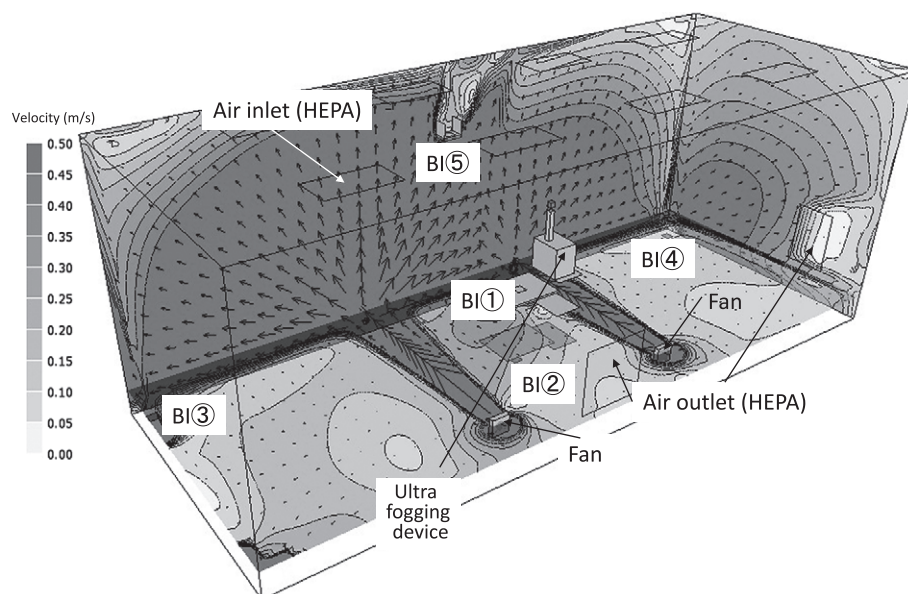


Fig. 5 Scalar distribution chart (at 100 min after fogging).

Table 6 CT value of each case (ultrasonic fogging condition)

(ppmw・s/BI)

Ultrasonic Fogging Condition	BI ①	BI ②	BI ③	BI ④	BI ⑤
	On the table	Under the table	On the floor (window side)	On the floor (wall side)	On the wall
Case 1	62.2	57.0	62.2	61.2	57.0
Case 2	30.2	27.7	30.2	29.7	27.7
Case 3	15.4	14.1	15.4	15.1	14.1
Case 4	7.4	6.8	7.4	7.3	6.8
Case 5	3.9	3.5	3.9	3.8	3.5
Case 6	1.6	1.4	1.6	1.5	1.4

低値であったのは、SUS テーブル天板による気流阻害の可能性が高いと考えられる。また、噴霧装置の近傍に位置する BI ⑤も BI ①③④より低値であったのは、BI ⑤を設置するための棚^{※3}による影響の可能性が高いと考えられる。BI ①から BI ⑤の CT 値について、BI が死滅（あるいは菌の増殖を 100%抑制）する必要最低値（以下、殺菌最低値という）を、Table 5 の結果を基に検討した。黄色ブドウ球菌では 50 ppmw、大腸菌では 25 ppmw であると考え、次亜塩素酸水の結果から殺菌最低値を求めた^{※4}。Table 6 に、FlowDesigner で求めた薬剤噴霧、保持から分解後 3.5 時間での Case 1 から Case 6 (Table 4) の BI ①から BI ⑤における CT (ppmw・s) に塩素分子の密度を乗じた CT 値 (ppmw・s) を示した。黄色ブドウ球菌では、殺菌最低値は、50 ppmw (Case 3) の中で、もっとも低い 14.1 ppmw・s (Case 3 BI ②⑤) と考えられる。さらに、Case 4 ではコントロールと比較し、増殖抑制が確認される（コロニー数が 10^2 から 10^3 オーダー）ことから、6.8 ppmw・s (Case 4 BI ②⑤) から 7.4 ppmw・s 間が殺菌成否の閾値と推論できる。一方、大腸菌の BI の場合では、殺菌最低値は 6.8 ppmw・s (Case 4 BI ②⑤) となり、Case 5 ではコントロールと比較し、増殖抑制が若干確認される（コロニー数が 10^3 から 10^4 オーダー）ことから、3.5 ppmw・s (Case 5 BI ②⑤) から 3.9 ppmw・s 間が殺菌成否の閾値と考えられる。

4. おわりに

CFD 解析を活用して算出した BI への CT 値を指標とする殺菌性能評価法を検討した。本論文で検討した条件では、黄色ブドウ球菌で殺菌最低値は、20 mm 角の BI において 14.1 ppmw・s、大腸菌での殺菌最低値は 6.8 ppmw・s と試算した^{※5}。

微生物は、生息する環境条件によって、その増殖度や形態が大きく変化する場合があります、試験条件によって結果が異なるケースも考えられる。ラボ試験ばかりでなく、実際の建物を想定した実大試験を行うことが重要である。より精度の高い微生物対策の予測技術を確立するため、実大試験によるコロニー数の判定結果を基に、対象とする薬剤の種類を増やし、薬剤効果の共通項と特異性を明らかにしたい。

本報は、実空間である BCR での薬剤噴霧の効果を詳細に測定・分析し、CFD 解析によって薬剤噴霧の効果を予測した点に独自性があると考ええる。今回の手法を用いれば、BI の菌種、薬剤の種類、散布方法、空間の形状・大きさ、空間内の機器の配置など、いろいろの条件に対応できる。今後は、いろいろの条件でのデータを蓄積させ、BI 近傍の薬剤濃度をより精度高く解析するなど、シミュレーションの精度を向上させ^{※6}、微生物対策予測技術の更なる実用化を図っていきたい。

注

- ※1 本報では、浮遊菌でなく付着菌を対象に試験を実施した。
- ※2 今回の CFD 解析では、Flow Designer 12（カスタマイズ版）で改良 Simple-C 法の計算アルゴリズムで、メッシュは約 100 万に分割し、二次精度風上差分（Quick）の差分スキームを用いた。塩素分子の物性値（0°C, 1 atm）は、密度 3.214 g/L、拡散係数 0.124 cm²/s とした¹⁵⁾。今回の解析では、BCR の天井面と壁 4 面の付着は考慮せず、床面のみ付着確率を 1 と仮定した。なお、そのほかの境界条件は、BCR での実測値を用いた。
- ※3 BI ⑤は、壁面に設置するため、棚板の面積が 100 mm×200 mm、両端に 2 辺が 100 mm の側板がついた台上に載せた。この台は、床面から 1,900 mm で、台の中央が窓ガラス面から 3,300 mm の位置にある。
- ※4 必要があれば、室内に散布する薬液濃度条件を詳細化することによって、より精度の高い殺菌最低値や殺菌成否の閾値を見出せる余地があると考ええる。
- ※5 この CT 値は、今回の試験条件で得られた値である。薬剤の異なる処理条件や菌の生息条件などによって、CT 値も同一でない可能性を留意する必要がある。
- ※6 今回の解析では高 Re 数型の k-ε モデルを用いたため、吸着評価に対しても乱流拡散を見積もるためには、壁面第一セルを対数領域に設定する必要がある。今回は、Reaction Probability の評価

ポイントとして、この第一セルを参照点としたが、この参照点の妥当性の検証は課題である。今後は、壁面近傍のメッシュを細かく切るなど、粘性低層における物質伝達率を精度よく解析していきたい。

References

- 1) NASA: Contamination Control Handbook, 361, Washington D.C. (1969)
- 2) Russell, A. D., Hugo, W. B. and Ayliffe, G. A. J.: Disinfection, Preservation and Sterilization, 3rd ed., Blackwell Science, Osney Mead, Oxford, United Kingdom, (1999)
- 3) Isawa, K., Tanaka, S., Yamaguchi, M., Shibuya, K., Ono, T. and Matsuo, T.: Research on the Sterilization System Integrating Vapor Phase Hydrogen Peroxide into the Cleanroom Air Conditioning, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **37**, 795–802 (2009) (in Japanese)
- 4) Parish, M. E., Beuchat, L. R., Suslow, T. V., Harris, L. J., Garrett, E. H., Farber, J. N. and Busta, F. F.: Methods to Reduce/eliminate Pathogens from Fresh and Fresh-cut Produce, *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety*, 2(Supplement), 161–173 (2003)
- 5) Douglas, L., Mayers: Antimicrobial Drug Resistance, Clinical and epidemiological aspects, Vol. 2, Humana Press, 2009
- 6) Kubota, H., Sato, K., Sasaki, N., Kawamura, Y., Ozaki, Y. and Akiyama, H.: Formation of Volatile Halogenated Compounds in Freshcut Cabbage Treated with Sodium Hypochlorite, *Jpn. J. Food Chem. Safty*, **19**, 95–103 (2012)
- 7) Fukuzaki, S.: Mechanisms of Actions of Sodium Hypochlorite in Cleaning and Disinfection Processes, *Biocontrol Sci.*, **11**, 147–157 (2006)
- 8) Ono, T., Yamashita, K. and Sato, T.: Application of Weak Acid Hypochlorous Solution to Disinfect Chinese Cabbage, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **42**, 289–293 (2014) (in Japanese)
- 9) Clark, J., Barret, P., Rogers, M. and Stapleton, R.: Efficacy of Super-oxidized Water Fogging in Environmental Decontamination, *J. J. Hosp. Infect.*, **64**, 386–390 (2006)
- 10) Park, G. W., Boston, D. M., Kase, J. A., Sampson, M., N. and Subsey, M. D.: Evaluation of Liquid- and Fog-based Application of Sterilox Hypochlorous Acid Solution for Surface Inactivation of Human Norovirus, *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 4463–4468 (2007)
- 11) European Commission, Enterprise and Industry Directorate-General: Eu Guidelines to Good Manufacturing Practice Medicinal Products for Human and Veterinary Use (Volume 4), Manufacture of Sterile Medicinal Products (Annex 1) (2008)
- 12) ISO 11138-1: Sterilization of Health Care Products, Biological Indicators, Part 1, General Requirement (2006)
- 13) Advanced Knowledge Laboratory, Inc.: <http://www.akl.co.jp/> (2015)
- 14) Launder, B. E. and Spalding, D. B.: The Numerical Computation of Turbulent Flows, *Comp. Meth. Appl. Mech. Eng.*, **3**, 269–289 (1974)
- 15) Ohe, S.: Vapor-Liquid Equilibrium Data, Elsevier (1990)
- 16) Chick, H.: An Investigation of the Laws of Disinfection, *J. Hygiene*, **8**, 92–157 (1908)
- 17) Watson, H. E.: A Note on the Variation of the Rate of Disinfection with Change in the Concentration of the Disinfectant, *J. Hygiene*, **8**, 536–542 (1908)