原 著

酵素洗剤中プロテアーゼ活性の保存安定性および 洗浄時温度と洗浄力の関係に関する研究

伏見 了* 野口 悟司* 船越 文男*
高階 雅紀* 中田 精三* 田野 保雄*

Studies on Stability of Protease during Storage and on the
Relationship between Temperatures and Washing Ability of
the Detergents for Operation Apparatus

Ryo Fushimi, Satoshi Noguchi*, Fumio Funakoshi*,
Masaki Takashina*, Seizou Nakata* and Yasuo Tano**
*Surgical Center, Osaka University Hospital

Abstract

Detergents contained enzymes that claim stronger washing ability and less damages are used widely for washing out blood or minute tissues adhered to various operation apparatus. It is known that enzyme protein shows maximum activity at 40°C and is more stable when stored at the lower temperature. However, detergents contained enzymes are stored at room temperature in the most of operation theaters, and furthermore they are transported from manufacturers to any of distribution route in nonrefrigerated condition. When we measured Protease activities at 4°C and 40°C during 161 days storage period, the activity at 4°C was stable but at 40°C decreased 38.0% in average. In comparison of Protease activities at 20°C and 40°C, the latter showed twice higher activity. When we studied the correlation between temperatures and the washing ability of detergents contained enzymes using Adenosine triphosphate as the marker, the washing ability at 40°C was stronger than that at 20°C.

1. 目 的

手術に使用した各種器械には血液や微細組織片などが付着している^{1,2)}。これら器械の洗浄は感染予防や円滑な作動の維持などにおいて非常に重要であり、洗浄効果を向上させる目的で超音波洗浄などの前に器械をプロテアーゼなど

を含む酵素洗剤に浸漬する方法が広く実施されている³⁾。酵素は触媒機能を有する蛋白質であり、約40°Cにおいて最大活性を示す一方で、この温度では時間とともに失活することも知られている。ほとんどの手術部や材料部では酵素洗剤を室温にて保存し、浸漬洗浄時も洗剤液の加温などをしていない。さらに、製造元からの流通経路においても酵素洗剤を保冷するなどの処置がなされていない。

* 大阪大学医学部附属病院 手術部

われわれは、製造直後の酵素洗剤（4種類）を4℃および40℃に161日間保存し、その期間中のプロテアーゼ活性を測定した。また、プロテアーゼ活性測定時の反応温度を20℃から40℃まで変化させて活性値を比較した。さらに、アデノシン三リン酸を指標として浸漬洗浄時の温度（20℃および40℃）と洗浄力の関係について実験を行った。

2. 材料および方法

1) 実験に用いた酵素洗剤

アルベスト BF（発売元：アルボース）、エンドフレッシュ A（発売元：オリンパス販売）、ステリザイム（発売元：丸石製薬）、メディボール EX-1（発売元：乾商事）以上4種類、いずれも発売元のご好意により製造直後の洗剤を入手し実験に用いた。

2) プロテアーゼ活性測定法^{4~6)}

精製水にて1.0%に希釈した各酵素洗剤を試料として、40℃にて2.0%ミルカゼイン（pH 7.0）を基質とし、生成したアミノ酸をフェノール試薬で定量してプロテアーゼ活性を求めた。1分間に1μg チロシンに相当する呈色をプロテアーゼ活性1.0U/Lとした。

4種類の製造直後の酵素洗剤原液を4℃および40℃にて161日間保存し、その期間中において1日目、30日目、78日目、104日目、133日目および161日目に各社酵素洗剤を精製水にて1.0%に希釈したものを試料としてプロテアーゼ活性を測定した。

また、1.0%アルベスト BFを試料とし、活性測定時の反応温度を20℃から40℃まで5℃間

隔に変化させてプロテアーゼ活性を測定した。

3) アデノシン三リン酸（以下、ATP）濃度測定法^{2, 7~8)}

ATP がルシフェリンと酸素の存在下でルシフェラーゼの触媒により発光する原理に基づく方法にて測定した。試薬としてルシフェライト、測定装置にルミテスタ K-210を使用した（試薬、装置ともに日水製薬）。

4) 洗浄時の温度と洗浄力確認実験

30本のハサミを用意し、6本を1セットとした。1.0%のアルベスト BF、エンドフレッシュ A、ステリザイムおよびメディボール EX-1を20℃、40℃に保温した。水道水を同様に保温したものを対照とした。すべてのハサミに血液1.0mlを塗布し室温にて2時間放置した。ハサミの一方の刃部分でATP濃度を測定した後に各3本を20℃、40℃の洗剤液および対照である水道水に5分間浸漬した。水道水にて10分間すすいだ後に室温にて乾燥させ、他方の刃部分のATP濃度を測定した。

3. 成 績

4種類の製造直後の酵素洗剤を4℃および40℃に161日間保存し、それぞれにおいてプロテアーゼ活性を測定した成績を表1に示す。4種類ともに4℃保存では安定した活性を示したが、40℃保存ではエンドフレッシュ Aが30日目に77,000、133日目では41,000 U/L、同様にアルベスト BFが66,000、47,000 U/L、メディボール EX-1が30,000、17,000 U/Lと活性が大きく低下した。しかし、ステリザイムでは41,000、37,000 U/Lと活性がかなり保たれていた。

表1 4℃および40℃保存における酵素含有洗剤中のプロテアーゼ活性値の変化
(洗剤を原液で保存し、測定時に精製水にて1.0%に希釈)

酵素洗剤名	保存温度 (℃)	プロテアーゼ活性値 (U/L)					
		保存日数					
		1 日目	30 日目	78 日目	104 日目	133 日目	161 日目
エンドフレッシュ A	4	78000	80000	76000	75000	76000	75000
アルベスト BF		66000	67000	63000	60000	62000	61000
メディボール EX-1		33000	35000	31000	30000	29000	28000
ステリザイム		44000	47000	46000	43000	43000	41000
エンドフレッシュ A	40		77000	55000	45000	41000	35000
アルベスト BF			66000	49000	51000	47000	46000
メディボール EX-1			30000	24000	20000	17000	17000
ステリザイム			41000	40000	36000	37000	36000

(8) 医 器 学 Vol. 70, No. 12 (2000)

なお、プロテアーゼ活性測定における分析精度は $n=7$, $\text{mean}=21,429 \text{ U/L}$, $\text{SD}=1,134$, $\text{CV}(\%)=5.3$ および $n=7$, $\text{mean}=70,714 \text{ U/L}$, $\text{SD}=2,430$, $\text{CV}(\%)=3.4$ と良好であった。

精製水にて1.0%に希釈したアルベスト BF を試料とし、反応温度を20℃から40℃まで5℃間隔に変化させてプロテアーゼ活性を測定した成績を図1に示す。プロテアーゼ活性が40℃で62,700 U/L, 35℃で48,100 U/L, 30℃で39,000 U/L, 25℃で30,500 U/L, そして20℃では22,700 U/Lを示した。

20℃および40℃に保温した4種類の1.0%酵素洗剤液に血液を塗布したハサミを浸漬し、水洗、乾燥の後に付着しているATP濃度を測定した成績を表2に示す。洗浄前には 1.09×10^{-10} から $2.25 \times 10^{-8} \text{ mol/ml}$ のATPがハサミ表面に付着していたが20℃、5分間の浸漬洗浄により 1.66×10^{-13} から $2.88 \times 10^{-12} \text{ mol/ml}$ まで減少した。さらに、40℃の洗剤による洗浄ではATPが 2.02×10^{-14} から $2.72 \times 10^{-13} \text{ mol/ml}$ まで減少した。一方、対照である水道水では40℃でも付着ATPが 6.34×10^{-13} から $2.03 \times 10^{-12} \text{ mol/ml}$ と20℃とほぼ同様な成績であった。

4. 考 察

酵素洗剤はpHが中性域のため器械に対する損傷が少なく、より効果的な器械洗浄方法の構築を目指すわれわれにとって非常に有効な武器である。しかし、酵素は蛋白質であるため水溶液状態で、かつ高温環境下では失活しやすいことも良く知られている。

このようなことから、医薬および診断薬として使用されている酵素製剤は凍結乾燥され、しかも保冷状態で供給されて使用直前に溶解、調製することが基本仕様となっている。

ほぼ全ての医療器具洗浄用酵素洗剤は水溶液の状態で商品として製造され、流通および保管時においても保冷などの処置は取られていない。そこで、製造直後の4種類の酵素洗剤原液を4℃および40℃に161日間保存し、その期間中においてそのつど精製水にて1.0%に希釈したものを試料としてプロテアーゼ活性を測定した。その結果、4℃保存では安定であるが、40℃で

は1日目に比較して保存161日目では18.2から55.1% (平均38.0%) 活性が低下した(表1)。ただし、ステリザイムは比較的安定であった。この原因として酵素の由来の違いや酵素安定化剤の工夫などが考えられる。

保存時には低温なほどプロテアーゼ活性は安定なことが判明したが、酵素の触媒活性は一般的に40℃前後で最大を示す。1.0%アルベストBFを試料として20, 25, 30, 35, 40℃にてプロテアーゼ活性を測定した結果、40℃のプロテアーゼ活性を100%とすると30℃では62%, 20℃では36%の活性であった(図1)。つまり、分解酵素としてのプロテアーゼの能力を引き出し、効果的な洗浄を行うためには洗浄時に洗剤液を40℃に加温することが重要である。

図1 プロテアーゼ活性測定時の反応温度と活性値の関係

このことを確認するため、洗浄効果判定用汚染モデルとして血液を塗布したハサミを20℃および40℃の1.0%酵素洗剤液に浸漬して残存している血液由来ATP濃度を測定した(表2)。浸漬前に 10^{-9} mol/ml オーダで付着していたATPが20℃、5分間の浸漬で 10^{-13} mol/ml オーダまで減少した。つまり、付着ATP量が約1万分の1となった。そして、40℃、5分間の浸漬では 10^{-14} mol/ml オーダと約10万分の1となった。つまり、40℃のほうが20℃よりも洗浄力が10倍向上したことを示している。さらに、

表2の成績からは対照である水道水でも20℃、5分間の浸漬で付着ATP量が酵素洗剤と同様に 10^{-13} mol/mlオーダまで減少した。つまり、20℃では水道水でも酵素洗剤でも洗浄力に変化がなかった。その一方で、水道水では40℃でも20℃とほぼ同様な洗浄効果しか得られなかった。

表2 ATP濃度を指標とした洗浄時温度と洗浄力の関係

酵素洗剤名	A T P (mol/ml)		
	洗 浄 前 (平均値)	洗 浄 後	
		20℃ (平均値)	40℃ (平均値)
エンドフレッシュA	3.33×10^{-9}	2.43×10^{-13}	2.29×10^{-13}
	4.02×10^{-9}	2.25×10^{-13}	2.02×10^{-14}
	5.51×10^{-9}	6.24×10^{-13}	7.33×10^{-14}
	(4.29×10^{-9})	(3.64×10^{-13})	(7.21×10^{-14})
アルベストBF	1.09×10^{-8}	4.05×10^{-13}	1.28×10^{-13}
	3.87×10^{-9}	4.49×10^{-13}	1.16×10^{-13}
	2.66×10^{-9}	1.02×10^{-12}	3.78×10^{-14}
	(5.87×10^{-9})	(6.52×10^{-13})	(8.74×10^{-14})
メディボールEX-1	2.02×10^{-9}	2.02×10^{-13}	2.72×10^{-13}
	2.86×10^{-9}	1.66×10^{-13}	6.30×10^{-14}
	1.09×10^{-10}	1.68×10^{-13}	6.99×10^{-14}
	(1.66×10^{-9})	(1.79×10^{-13})	(8.67×10^{-14})
ステリザイム	6.63×10^{-9}	1.79×10^{-13}	1.02×10^{-13}
	6.93×10^{-9}	2.88×10^{-12}	2.08×10^{-14}
	6.06×10^{-9}	4.03×10^{-13}	1.18×10^{-13}
	(6.54×10^{-9})	(6.23×10^{-13})	(8.09×10^{-14})
水道水 (対照)	3.35×10^{-9}	1.71×10^{-12}	1.06×10^{-12}
	2.25×10^{-8}	5.72×10^{-13}	2.03×10^{-12}
	2.59×10^{-9}	1.02×10^{-12}	6.34×10^{-13}
	(6.06×10^{-9})	(9.48×10^{-13})	(9.81×10^{-13})

5. ま と め

- ① 製造直後の4種類の酵素洗剤原液を4℃および40℃に保存して1.0%液中のプロテアーゼ活性を測定すると4℃保存では安定であるが、40℃保存では161日目に活性が平均38.0%減少した。
- ② 反応温度40℃でのプロテアーゼ活性を100%とすると30℃では62%、20℃では36%の活性であった。
- ③ 付着ATP濃度を指標として20℃および40℃における酵素洗剤の洗浄力を比較すると

40℃が10倍優れていた。

- ④ 酵素洗剤の能力を十分に引き出し、効果的な器械洗浄を行うためには製造後からの保管を4℃に保ち、洗浄時には40℃にて行うことが重要である。

文 献

- 1) Rutara WA, Gergen MF, Jones JF, et al: Levels of microbial contamination on surgical instruments. Am J Infect Control, 26: 143-5, 1998.
- 2) 伏見 了, 野口悟司, 船越文男, 他: 生物学的発光法による手術器械に付着した血液成分の分析. 日本手術医学会誌, 20: 338-43, 1999.
- 3) 野口悟司, 中谷 博, 池端信孝, 他: 手術器械コンテナ自動回収洗浄システムにおける酵素洗浄剤の有効性. 医器学, 65: 30-1, 1995.
- 4) Kunitz G: Crystalline soybean trypsin inhibitor. J Gen Physiol, 30: 291-310, 1947.
- 5) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193: 265-75, 1951.
- 6) Ishiura S, Murofushi H, Suzuki K, et al: Studies of a Calcium-activated Neutral protease from Chicken skeletal muscle. J Biochem, 84: 225-30, 1978.
- 7) Beutler E, Baluda MC: Simplified determination of blood Adenosine Triphosphate using the Firefly system. Blood, 23: 688-96, 1964.
- 8) Chappelle EW, Levin GV: Use of Firefly Bioluminescent reaction for rapid detection and counting of Bacteria. Biochem Med, 2: 41-52, 1968.