酵素に対する塩素剤の作用 (第1報)

アルコールデヒドロゲナーゼ, ウレアーゼ, トリプシンに対する作用

澤村良二, 吉田京子

日本大学理工学部薬学科¹⁾

Enzyme Inactivation by Chlorine Preparations. I. Inactivation of Alcohol Dehydrogenase, Urease, and Trypsin

RYOJI SAWAMURA and KYOKO YOSHIDA

Department of Pharmacy, College of Science

and Technology Nihon University¹⁾

(Received June 7, 1976)

In order to evaluate the chlorinating effectiveness, inactivation of crystalline enzyme preparations was measured at various concentrations of hypochlorite, hypochlorite-isocyanuric acid mixture, and chloramine. Urease inactivation occurred at the same rate by the three different chlorine preparations. Trypsin was inactivated similarly by hypochlorite and hypochlorite-isocyanuric acid mixture, but not by chloramine. In the case of alcohol dehydrogenase, chloramine reacted more effectively than hypochlorite, and hypochlorite-isocyanuric acid mixture was more effective than the other two. In the present work, added chlorine was consumed entirely by the enzyme solution within 1 min. Therefore it is apparent that the difference in the degree of enzyme inactivation among these chlorine preparations cannot be due merely to the difference in the amount of chlorine actually reacting with each enzyme. This fact implies that the mode of reaction between chlorine and the active site of each enzyme differs among these chlorine preparations.

ま え が き

水道水中の残留塩素が生体にどのように影響するのかという研究の一環として、和久ら²⁾は結晶酵素を用いて実験した結果を報告している。これによると、有効塩素量 0.1 ppm から種々の酵素の活性阻害が起り始め、同じ量の塩素を作用させても酵素によって活性の減少率が異なっている。著者ら³⁾も唾液アミラーゼとペプシンに対する塩素の作用を調べ、作用塩素量と塩素消費量と酵素活性低下との関係が酵素の種類によって違うことを見出している。この違いは酵素活性に影響を与えている各酵素の活性部位の相違によって塩素の作用が異なるため

あろうと推察している。

一般的に遊離塩素と結合塩素を比較した場合、遊離塩素の方が結合塩素より作用が強いと言われているが、酵素に対する遊離塩素と結合塩素の作用を比べた場合にも単純に結合塩素の方が弱いと言えるのかどうかを活性部位の異なる結晶酵素を用いて比較検討してみた。

一方で塩素安定剤として用いられているイソシアヌル酸が塩素の作用にどのような影響を与えるかということについて試験細菌を用い、イソシアヌル酸を加えた場合の殺菌力を調べた報告がいくつかなされている。⁴⁾ これらのうちには試験細菌以外の物質を用いて塩素に対する

1) Location: 1-8, Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo (千代田区神田駿河台1-8)。

2) 和久敬蔵, 伊藤弘子, 中沢泰男, 衛生化学, **18**, 333 (1972)。

3) 澤村良二, 馬場厚子, 赤木順子, 日本薬学会第92年会, 大阪, 1972年4月。

4) a) F.W. Gilcreas, G.B. Morgan, *Swimming Pool Age*, **37**, 30 (1963); b) L.S. Stuart, L.F. Ortenzio, *Soap and Chemical Specialties*, **40**, 79 (1964); c) J.R. Andersen, *Am. J. Public Health*, **55**, 1629 (1965); d) G.B. Morgan, F.W. Gilcreas, P.P. Gubbins, *Swimming Pool Age*, **40**, 31 (1966); e) E.D. Robinton, E.W. Mood, *Am. J. Public Health*, **57**, 301 (1967); f) F.E. Swatek, H. Raj, G.E. Kalbus, *Swimming Pool Age*, **41**, 52 (1967); g) G.P. Fitzgerald, M.E. DerVartanian, *Appl. Microbiol.*, **15**, 504 (1967); h) G.P. Fitzgerald, M.E. DerVartanian, *Appl. Microbiol.*, **17**, 415 (1969); i) 小瀬洋喜, 森崎信夫, 日本公衛誌, **18**, 731 (1971)。

イソシアヌル酸の作用の評価⁴⁾をしたものもある。また、前報にイソシアヌル酸を加えた場合の塩素の作用が塩素単独のものや結合塩素の作用と比較してどのような違いがあるのかを大腸菌について試験し、報告した。

これらの知見にもとづいて著者らは、次亜塩素酸およびこれにイソシアヌル酸を加えたものとクロラミンとについて、結晶酵素に対する作用の違いを検討してみた。なお、ここに用いた酵素は活性部位に SH 基をもつアルコールデヒドロゲナーゼとウレアーゼ、および活性に関係のある SS 基をもったトリプシンを選んだ。

実験の部

1. 試薬 1) 次亜塩素酸溶液——有効塩素約11%の次亜塩素酸ナトリウム液（和光純薬製）を用時希釈した。

2) イソシアヌル酸（以下 ICA と略す）——四国化成 K. K.

3) カゼイン——Nach Hammarsten, Merck 製。

4) NAD——Sigma Chemicals 製。

ここに記した以外の試薬はすべて和光純薬の特級品を用いた。

2. 酵素液の調製 結晶 Yeast Alcohol Dehydrogenase (Boehringer 製) 0.6 μ g を 0.1% アルブミンを含む 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 1 ml にとかす。結晶 Jack bean Urease (P-L 製) 0.204 mg をリン酸溶液 (pH 7.0) 1 ml にとかす。結晶 Trypsin 1:250 (Difco 製) 0.12 mg を 0.0025 N 塩酸 1 ml にとかす。

3. 酵素の活性測定 アルコールデヒドロゲナーゼ (ADH)——E. Racker⁵⁾ の方法により測定を行なった。吸光度測定用のセル中に 0.6 M エタノールを 0.5 ml, 0.06 M ピロリン酸ナトリウム溶液 (pH 8.5) を 0.5 ml, 0.003 M NAD 水溶液を 0.5 ml 加え、酵素液を 1 ml 加えてすばやく混和して全量を 2.5 ml とし、124形ダブルビーム分光光度計（日立製）を用いて OD₃₄₀ nm の増加を自動記録計で測定した。盲検には酵素液の代りに水を用いて測定した。

ウレアーゼ——James B. Sumner⁶⁾ の方法により測定を行なった。

尿素——リン酸溶液（尿素 3 g, K₂HPO₄ 5.4 g, KH₂PO₄ 4.25 g を精製水 100 ml にとかす）1 ml を共栓試験管に入れ、恒温槽中で 20° に達した後、酵素液を 1 ml すばやく加えて混合する。5 分後 1 N 塩酸 1 ml を加え、

試験管中の反応液を 100 ml のメスフラスコに移し水で希釈する。この 10 ml にネスラー試薬 0.2 ml を加えて、10 分後にスペクトロニック 20（島津製）を用いて OD₄₁₅ nm を測定した。盲検には酵素液の代りにリン酸溶液を用いて測定した。

トリプシン——M. Kunitz⁷⁾ の方法により測定を行なった。カゼイン溶液（カゼイン 1 g をリン酸緩衝液 100 ml に懸濁させ 15 分加熱し、放冷後 10% 水酸化ナトリウム溶液で pH 7.6 に調整する）2 ml をとり、35° に 4.5 分温め、リン酸緩衝液 (KH₂PO₄ 1.57 g, Na₂HPO₄ 12.56 g を精製水 1 liter に溶かし、pH 7.6 に調整する) 1 ml, 酵素液 1 ml を加えて 35° で反応させる。20 分後に 15% トリクロル酢酸溶液 (TCA) 1 ml を加え 35° で 1 hr 放置し、東洋ろ紙 No. 5C でろ過する。このろ液の OD₂₈₀ nm を 124 形ダブルビーム分光光度計（日立製）を用いて測定した。盲検には温めたカゼイン溶液に、あらかじめ TCA を加えてから同様の方法で測定した。

4. 酵素に対する塩素剤の反応 次亜塩素酸溶液、ICA を含む次亜塩素酸溶液、またはクロラミン B 溶液 2 ml に酵素液 1 ml を加えて 1 分間反応させたのち、その 1 ml をとって酵素活性を測定した。同時に酵素液を 3 倍に希釈したものについても酵素活性を測定し、この値を 100 として各反応液の酵素活性百分率をもとめた。有効塩素の測定はヨウ素滴定法により、塩素溶液と酵素液とを混合する直前、および混合した後の試料について測定し、前者を作用塩素、後者を残存塩素とした。滴定には 0.001 N チオ硫酸ナトリウム ($f=1.006$) を用いた。塩素剤と酵素との反応液中の作用塩素濃度は約 0.1—1.8 ppm, ICA 濃度は 30 ppm であり、また、次亜塩素酸に ICA を作用させた実験では、両者を混合して 1 分、60 分、または 22 時間作用後に酵素液と反応させた。

実験結果

次亜塩素酸と ICA を混合した後の作用時間を変えることによって、酵素に対する次亜塩素酸の影響に変化があるか否かを検討し、結果を Fig. 1 に示した。この実験では次亜塩素酸単独の場合も ICA と混合してから所定の作用時間を経過した後でも有効塩素量にはほとんど変化がなく、すべて酵素に対する作用塩素濃度は約 0.5 ppm であった。また酵素と作用させた後には塩素はまったく残存しなかった。ウレアーゼとトリプシンについては次亜塩素酸単独の場合にくらべて、ICA を加えた次

5) E. Racker, "Method in Enzymology," Vol. 1, ed. by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, Academic Press Inc., New York, N. Y., 1955, p. 500.

6) J. B. Sumner, *J. Biol. Chem.*, **69**, 435 (1926).

7) M. Kunitz, *J. Gen. Physiol.*, **30**, 291 (1947).

Fig. 1. Inactivation of Enzyme by the Mixtures of Hypochlorite and Isocyanuric Acid

Initial concentrations

○ : urease 0.068 mg/ml ● : trypsin 0.04 mg/ml

□ : ADH 0.2 μg/ml

hypochlorite as available chlorine 0.5 ppm

isocyanuric acid 30 ppm

$$\text{enzyme activity \%} = \frac{\text{residual activity}}{\text{initial activity}} \times 100$$

Residual activity was measured after 1 min. contact of chlorine solutions and enzymes.

Measurement of residual activity and calculation of enzyme activity in Fig. 2, 3, 4 are the same as in Fig. 1.

亜塩素酸の方が残存酵素活性が高くなり、ICAと次亜塩素酸の作用時間が1分と60分とでは酵素活性に差がないが、作用時間を22時間にしたものは、さらに残存酵素活性が高くなった。ADHでは次亜塩素酸単独では活性がわずかに残存していたが、ICAと作用させた後の次亜塩素酸によって活性が完全に消失し、ICAと次亜塩素酸の作用時間を22時間としたものの場合には残存酵素活性はわずかにあった。

Fig. 2は塩素剤の濃度および種類の違いによる残存ADH活性の変化を見たものである。いずれの塩素濃度の実験でも酵素と反応した後の残存塩素量はほとんどなかった。次亜塩素酸、次亜塩素酸にICAを加えたもの、クロラミンBのいずれを用いた場合にも、作用させる有効塩素濃度を高めるに従って残存酵素活性が減少した。また、いずれの塩素濃度においてもクロラミンBの方が次亜塩素酸単独の場合より阻害度は大きく、次亜塩素酸にICAを加えたものでは、さらに阻害が強くおこり、有効塩素約0.2 ppmですでにほとんど活性がなくなっていた。Fig. 1に示したように塩素濃度約0.5 ppmではICA作用時間が60分でも22時間でも大差が見られなかったけれども、有効塩素約0.1—0.3 ppmでは明らかに22時間作用したものの方が残存酵素活性が高くなっていた。なお、ICA単独ではADH活性に全く影響しなかった。また、次亜塩素酸にモル比2倍の塩化アンモニ

Fig. 2. Effect of Chlorine Concentration of the Inactivation of ADH

○ : hypochlorite

□ : hypochlorite+ICA (30 ppm)

(reaction time □ 1 hr, ■ 22 hr, see Fig. 1)

× : chloramine B

Initial concentration of ADH : 0.2 μg/ml

Fig. 3. Effect of Chlorine Concentration on the Inactivation of Urease

○ : hypochlorite

□ : hypochlorite+ICA (30 ppm)

(reaction time □ 1 hr, ■ 22 hr)

× : chloramine B

initial concentration of urease : 0.068 mg/ml

regression line

— : hypochlorite

$$Y = -53.38 X + 85.46$$

--- : hypochlorite+ICA (1 hr)

$$Y = -58.2 X + 96.25$$

..... : chloramine B

$$Y = -57.8 X + 100.73$$

ウムを加えて有効塩素が約0.3—0.5 ppmになるようにクロラミンをつくらせたものについても実験を行なってみた。結果はクロラミンBと同様であった。

Fig. 3は塩素剤の濃度および種類の違いによる残存ウレアーゼ活性の変化を見たものである。加えた塩素と酵素との反応で消費される塩素量は約0.4—0.5 ppmであり、したがって、加えた塩素の濃度が0.5 ppm以下では残存塩素はほとんど消失しているが、それ以上では、

Fig. 4. Effect of Chlorine Concentration on the Inactivation of Trypsin

○: hypochlorite
 □ ■: hypochlorite+ICA (30 ppm)
 (reaction time □ 1 hr, ■ 22 hr)
 ×: chloramine B
 initial concentration of trypsin 0.04 mg/ml
 Regression line
 —: hypochlorite $Y=121.46 X+103.17$
 —: hypochlorite+ICA (1 hr) $Y=88.9 X+101.32$
: chloramine B $Y=3.9 X+100.27$

加えた塩素量に応じて塩素が残っている状態で酵素活性を測定した。いずれの塩素剤を用いても ADH の場合と同じように、有効塩素濃度を高めるに従って、残存酵素活性が減少した。3 者の阻害の強さは、次亜塩素酸 > 次亜塩素酸+ICA (1 hr) > 次亜塩素酸+ICA (22 hr) > クロラミン B の順であるが、その差は小さい。

Fig. 4 は塩素剤の濃度および種類の違いによる残存トリプシン活性の変化を見たものである。酵素と反応した後の残存塩素はほとんど消失していた。次亜塩素酸に ICA を加えたものの方が次亜塩素酸単独よりも、やや残存酵素活性が高いが、その差はきわめてわずかであり、両者とも有効塩素濃度を高めるに従い、順次、残存酵素活性が減少していく傾向は同じであった。クロラミン B は、これら 2 者とはまったく違い、ここに示した有効塩素濃度の範囲では活性低下がまったくおこらなかった。

考 察

以上の実験結果から、作用塩素量と酵素失活の程度との関係は酵素によって異なり、また、塩素剤の種類と酵素失活の程度との関係も異なっている。

たとえば、ウレアーゼの場合には、いずれの塩素剤についても塩素量と失活の程度との間にはほぼ比例関係が成立つものと考えられ、回帰直線をもとめたところ、Fig. 3 に示したようになった。したがって、ウレアーゼは塩

Fig. 5. Regression Line of Data in Fig. 2

—: hypochlorite $Y=-58.95 X+42.56$
 - - : hypochlorite+ICA (1 hr) $Y=-28.27 X+10.3$
: hypochlorite+ICA (22 hr) $Y=-51.41 X+30.02$
 - · - · : chloramine B $Y=-66.5 X+28.23$

素量と比例して活性が低下し、しかも、その失活は塩素剤の種類の違いによってほとんど差がないことが明らかである。

トリプシンの場合には、次亜塩素酸単独と次亜塩素酸に ICA を加えたものについては、ウレアーゼ同様に塩素量に比例して活性が低下し、Fig. 4 の回帰直線に見るように、ICA の影響を全く受けていない。ところが、クロラミン B では他の塩素剤と同じ量の塩素消費がおこっているにもかかわらず、酵素活性低下が全く見られなかったため、実験した濃度範囲での塩素の作用は活性に影響しない部位に限定されていたと考えられる。

以上 2 種類の酵素と比較すると、ADH 活性に対する塩素剤の影響は全く異なっている。まず、いずれの塩素剤を見ても、塩素量と失活の程度との間に比例関係がなく、たとえば、次亜塩素酸単独の場合には、塩素濃度 0.1 ppm で活性が 40% に低下するが、塩素量をふやして 0.5 ppm としても、なお約 10% の活性が残存する。また ADH の場合、特に興味ある現象は、クロラミンの方が次亜塩素酸単独の場合よりも失活の程度が大きいことである。そこで、Fig. 2 の作用塩素量 0.1—0.6 ppm のものについて回帰直線を求めて Fig. 5 に示した。

この実験では、塩素と酵素とを作用させた後の残存塩素はすべて消失していたので、塩素剤の種類にかかわらず反応した塩素量は同じである。しかし、ADH 活性に対する影響が異なり、失活の程度は次亜塩素酸+ICA (1 hr) > クロラミン > 次亜塩素酸+ICA (22 hr) > 次亜塩素酸の順である。この順序は、明らかに他の酵素の場合と異なっており、しかも、クロラミンの方が次亜塩素酸より作用が強いという結果は、通常の結合塩素に関する

概念とは相反するものである。

また、次亜塩素酸の作用に対する ICA の影響を見ると、ウレアーゼおよびトリプシンの場合、次亜塩素酸単独と変りがないが、ADH の場合には ICA の存在によって次亜塩素酸の作用がきわめて強くなるという結果を得た。ICA と次亜塩素酸との作用時間に関しては、時間が長くなるにつれて残存酵素活性が高くなる傾向にあり、このことは3種類の酵素について共通の現象であった。

上記の実験では塩素剤と酵素との反応時間がわずか1分であり、この時間内に加えた塩素がほとんど消失していたので、塩素剤の種類の違いによる酵素失活速度の大小を比較することはできない。しかし、一定量の塩素の反応によっておこる酵素の失活が塩素剤によって異なることが明らかになったので、酵素の活性部位の構造と塩素の作用機構との関係を検討することがこれからの研究課題になると考えられる。

ま と め

次亜塩素酸およびこれに ICA を加えたものとクロラミンとについて、ADH, ウレアーゼ, トリプシンに対する作用の違いを検討した。その結果、クロラミンと次亜塩素酸とを比較すると、ADH についてはクロラミンの方が強く阻害し、ウレアーゼはほぼ同じ程度に阻害され、トリプシンの場合はクロラミンによる阻害はほとんどなかった。結合塩素の方が殺菌作用が弱い、このように酵素に対する結合塩素の作用は、一概に遊離塩素よりも弱いとは言えない。したがって、試験細菌以外の物質を用いて塩素の作用を評価しても、これによって殺菌作用を判断することは誤りである。また、ICA を加えた際の塩素の酵素阻害は、ADH では非常に強くなり、ウレアーゼやトリプシンではほとんど影響をうけていなかった。