

タンパク質汚れに対する次亜塩素酸イオンの洗浄力

浦野博水・福崎智司

Hiromi URANO and Satoshi FUKUZAKI

キーワード 次亜塩素酸ナトリウム / 洗浄 / 次亜塩素酸イオン / タンパク質の除去
KEY WORDS Sodium hypochlorite / Cleaning / Hypochlorite ion / Removal of protein

要 旨

アルミナ微粒子に吸着した牛血清アルブミン(BSA)の、次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)溶液による洗浄除去特性を、pHを変数として検討した。NaOCl溶液による洗浄を実施しその洗浄効果を検討したところ、酸・アルカリのみではBSAが除去されないpH領域(pH 3~10)において、付着BSAの除去量および除去速度は、有効塩素濃度およびpHの増加に伴い増加した。このBSAの除去特性は、非解離型次亜塩素酸(HOCl)ではなく、解離型次亜塩素酸(OCl^- ; 次亜塩素酸イオン)の濃度に依存して増加した。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果から、吸着BSAは次亜塩素酸(HOCl/OCl^-)により部分的に分解された結果、除去されたと考えられた。

1 はじめに

次亜塩素酸ナトリウム(NaOCl)は強力な酸化作用を有していることから、医療・食品業界で殺菌剤として最も一般的に使用されている^{1),2)}。次亜塩素酸(HOCl)は弱酸($\text{p}K_a=7.5$)³⁾であることから、その解離平衡に従い、pHに依存して形態と存在割合が変化する。すなわち、pH4~6の領域では非解離型次亜塩素酸(HOCl)が、pH9以上では解離型次亜塩素酸イオン(OCl^-)が高比率で存在する(図1)。殺菌力は HOCl/OCl^- の解離状態に強く依存し、HOCl比率の高い微酸性領域で最も高いことが知られている。一方で、洗浄力に関する報告はあまり無く、十分に理解されていない。

本研究では、セラミックス表面に吸着したタンパ

ク質汚れを対象として、NaOCl溶液による洗浄を実施し、酸(H^+)およびアルカリ(OH^-)のみでは汚れを洗浄除去できないpH領域(pH 3~10)において、HOClおよび OCl^- の洗浄力について検討した。

2 実験方法

タンパク質汚れとして牛血清アルブミン(BSA F-V; ナカライテスク(株)製)を、セラミックスのモデル基材として $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ (Sumicorundum AA-5; 住友化学(株)製)の微粒子(平均粒径4.6 μm 、比表面積0.5 m^2/g)を用いた。洗浄液として、pHと有効塩素(AC)濃度を調整したNaOCl溶液、およびpHを調整した 10^{-3} M KNO_3 溶液を用いた。NaOCl溶液は、市販NaOCl溶液(和光純薬(株)製)をイオン交換水にて200~1100 mg/l に希釈したものを用いた。pHはHClおよびNaOHにより1.5~12.7の範囲に調整した。HOCl濃度はAC濃度としてヨウ素滴定法で測定した。HOClおよび OCl^- の濃度比率(存在比率)は、HOClの解離定数 $\text{p}K_a=7.53$ を用いAC濃度とpHから算出した。

アルミナ粒子へのBSAの吸着は、以下の手順で行なった。50ml容のポリプロピレン製チューブに、BSA溶液(3 g/l 、 10^{-3} M KNO_3 、pH 5.2) 25 mlとアルミナ微粒子を5 g 入れ、ウォーターバス中で恒温振とう(40℃、140rpm、2時間)した。振とう後、遠心分離(2,300 $\times g$ 、10分)を行い、ピペットを用いて未吸着BSAを含む上清を取り除いた。引き続き 10^{-3} M KNO_3 溶液25 mlによるすすぎを2回繰り返し行い、未吸

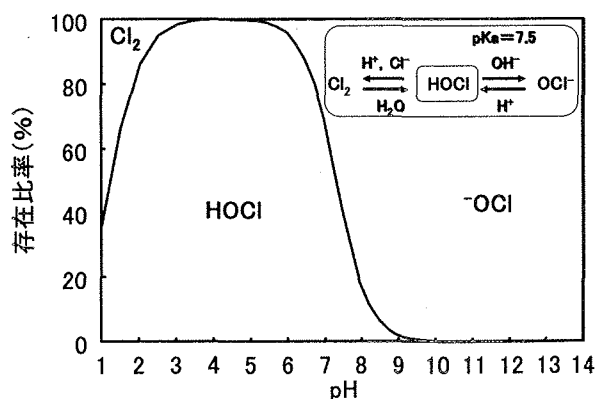


図1 HOCl/ OCl^- 存在比率とpHの関係

着BSAを充分に取り除いた後、40℃で16時間乾燥し、BSA吸着アルミナ粒子(BSA初期吸着量4.2 mg/m²)を得た。

回分洗浄実験は、BSA吸着アルミナ粒子1gと洗浄液(pH 1.5~12.7)5 mlを25 ml容のガラス製バイアル瓶に入れて密栓後、ウォーターバス内で恒温振とう(40℃、140 rpm、2時間)した。振とう後、遠心分離(2,300×g、10分)を行い、ピペットで除去BSAを含む上清を取り除き、引き続き10⁻³ M KNO₃溶液25 mlによりすすぎを2回繰り返した後、40℃で16時間乾燥した。上清中および洗浄後のアルミナに残存したBSA量をそれぞれ除去量、残存量とした。

連続洗浄実験は、BSA吸着アルミナ粒子1gをステンレス鋼製カラム(内径4 mm×長さ50 mm)に充填した後、カラムオープン(40℃)内に鉛直方向に設置し、HPLC用定流量ポンプによりカラム底部から洗浄液を流速0.25 ml/分で送液して行った(空間時間=1.5分)。まずリンス工程として10⁻³ M KNO₃溶液(pH 5.2)を120分間送液した。続いて洗浄工程として、洗浄溶液(pH 5.2~10.3)を150分間供給して、カラム出口から排出される洗浄液を経時的に分取し、各分画中のBSA量を除去量とした。洗浄終了後、カラムからアルミナ粒子を抜き取り、残存量を測定した。

洗浄工程中の残存量は式(1)により算出した。

$$S = S_f + \sum_{i=n}^N S_i C_i V_i \quad \dots (1)$$

ここでS: t分後の残存量、S_f: 洗浄終了時(t=120)の残存量、i: 分画番号、C_i: i番目の分画中の除去量、V_i: i番目の分画の洗浄液量、t: n番目の分画の開始時間、N: 分画の総数である。

BSAの吸着量、除去量は全有機炭素分析計(TOC-5000A: 島津製作所)で測定した。除去BSAの分子サイズはゲル濾過クロマトグラフィー(GFC)で測定した。

3 速度論的解析

吸着BSAの除去速度定数は以下の方法で算出した。Jennings(1959)らは「汚れは、汚れ量に対して一次反動的に除去される」という洗浄モデルを提唱したが、ここではJenningsらの洗浄速度論に基づき解析することとした。さらに、次亜塩素酸ナトリウム溶液における洗浄過程が、溶液のpH(OH⁻)による効果および次亜塩素酸による効果の二つの反応で構成されており、なおかつ、この二つの反応は独立して進行すると仮定した。

OH⁻および次亜塩素酸による洗浄過程はそれぞれ式(2)、(3)で記述される。

$$\ln G^{OH} = \ln G_0^{OH} - k^{OH}t \quad \dots (2)$$

$$\ln G^{OCl} = \ln G_0^{OCl} - k^{OCl}t \quad \dots (3)$$

ここで、k^{OH}、k^{OCl}はOH⁻、HOCl/OCl⁻によるBSAの除去速度定数、G^{OH}、G^{OCl}はOH⁻、HOCl/OCl⁻による洗浄過程での任意の時間tにアルミナ微粒子上に残存しているそれぞれのBSA量、G₀^{OH}、G₀^{OCl}はOH⁻、HOCl/OCl⁻による洗浄過程での、それぞれの疑似の初期BSA吸着量を意味する。

また全体の吸着量は式(4)で記述される。

$$G = G^{OH} + G^{OCl} \quad \dots (4)$$

式(2)、(3)を式(4)に代入すると式(5)が得られる。

$$\ln G = \ln \{ \exp(\ln G_0^{OH} - k^{OH}t) + \exp(\ln G_0^{OCl} - k^{OCl}t) \} \quad \dots (5)$$

式(5)を、洗浄除去データに対し適合させることにより、除去速度定数k^{OH}およびk^{OCl}の算出を試みた。

4 結果

4.1 回分洗浄結果

図2に回分洗浄を実施した場合の各pHにおけるBSA除去率を示す。KNO₃溶液による洗浄では、酸性~中性領域ではBSAは殆ど除去されないが、高アルカリ性領域(pH 11~13)ではpHの増加と共に除去率は著しく増加した(OH⁻の効果)。一方、NaOCl溶液による洗浄では、比較的低いpH領域(pH 7~)で、pHおよびAC濃度の増加にともない除去率は増加した。

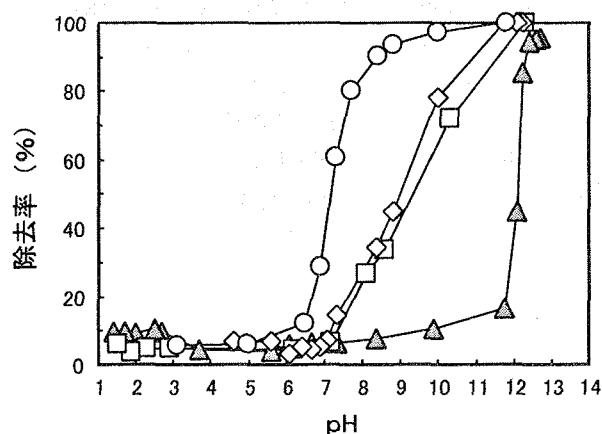


図2 BSA除去率とNaOCl濃度およびpHの関係
(シンボル: ○, 1100 mg AC/l; ◇, 250 mg AC/l; □, 200 mg AC/l; ▲, 0 mg AC/l)

次に、OCl⁻濃度の影響を検討するため、酸・アルカリのみでは除去しないpH領域(pH 2~10)におけるBSA除去率をOCl⁻濃度の関数として再プロットした(図3)。種々のpHおよびAC濃度条件で得られた除去率はOCl⁻濃度に対して一本の曲線に収束した。すなわち、OCl⁻濃度が約60 mg/l以下では除去されないが、60 mg/l以上で除去効果が発現し、OCl⁻濃度の増加に伴い増加した。これは、NaOCl溶液の洗浄力がOCl⁻の濃度に強く依存することを示している。

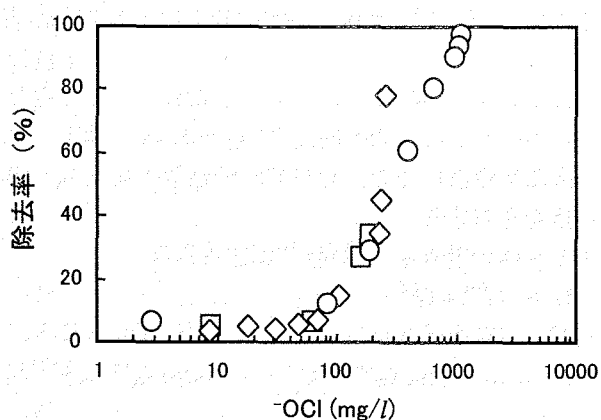


図3 BSA 除去率に及ぼす OCl^- 濃度の影響 (シンボル; $\circ$, 1100 mg AC/l; $\diamond$, 250 mg AC/l; $\square$, 200 mg AC/l)

4.2 連続洗浄結果

KNO_3 溶液、 NaOCl 溶液による連続洗浄の結果を、洗浄時間に対して残存量の対数値をプロットした除去曲線として、それぞれ図 4A、4B に示す。

KNO_3 溶液による洗浄においては、pH 5.2~10.3 の範囲で BSA はほとんど除去されなかった(図 4A)。グラフのプロットに対して式(2)を適合したところ、pH 5.2、7.2、10.3 における k^{OH} はそれぞれ、0.00043、0.00039、0.00047 min^{-1} となり、いずれも極めて低い値となった(図 4A の実線部分は計算値)。

一方、 NaOCl 溶液による洗浄においては、pH 5.2 では KNO_3 溶液による洗浄と同様の結果が得られたが、pH の増加と共に、洗浄初期に見られるタイムラグが短くなり、その後の BSA 除去過程での除去量が著しく増加した(図 4B)。ここで図 4B の各除去曲線に対

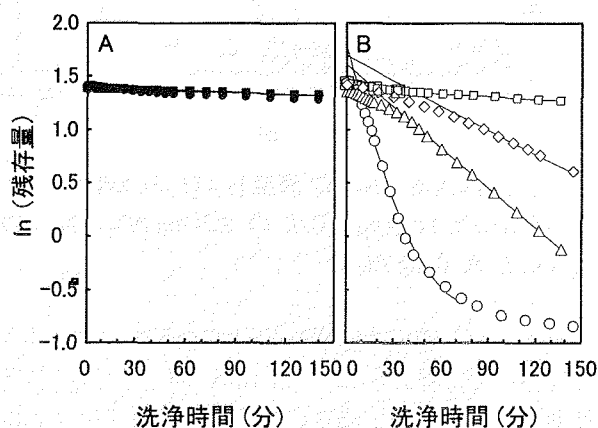


図4 KNO_3 溶液(A)および NaOCl 溶液(B)洗浄における BSA 除去曲線 (シンボル: $\blacksquare$, pH 5.2; $\blacklozenge$, pH 7.2; $\bullet$, pH 10.3, $\square$, 1030 mg AC/l, pH 5.2; $\diamond$, 640 mg AC/l, pH 7.2; $\triangle$, 890 mg AC/l, pH 7.5; $\circ$, 1020 mg AC/l, pH 10.3)

して式(5)を適合して k^{OCl} の算出を試みた。タイムラグは洗浄液が BSA 吸着層に対して十分に拡散浸透するのに必要な時間と考えられ、この間は一次反応的な脱着現象は起こっていないと考えられるので、ラグ期間中のデータはフィッティングデータから除外した。また各 pH に対応する k^{OH} は、図 4A で算出した k^{OH} を適用し、値のない pH 7.5 については k^{OH} の平均値である 0.00043 min^{-1} を代入することとした。その結果、pH 5.2、7.2、7.5、10.3 における k^{OCl} はそれぞれ 0.0030、0.0069、0.0131、0.0493 min^{-1} と算出された(図 4B の実線部分は計算値)。

算出した k^{OCl} と OCl^- 濃度の関係を図 5 に示す。このように、 k^{OCl} は OCl^- 濃度に対して指数的に増加する結果となった。

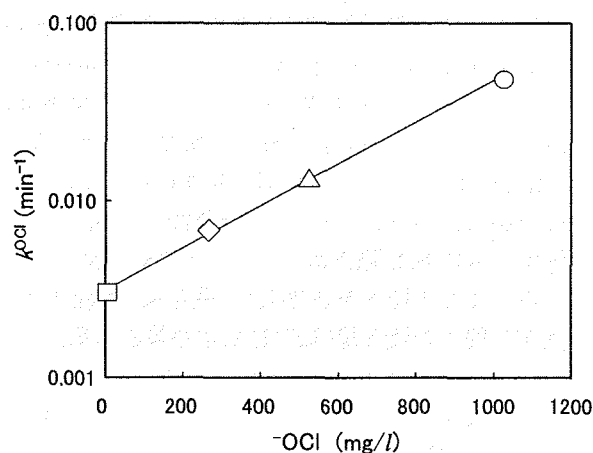


図5 k^{OCl} に及ぼす OCl^- 濃度の影響 (シンボル; $\square$, 1030 mg AC/l pH 5.2; $\diamond$, 640 mg AC/l, pH 7.2; $\triangle$, 890 mg AC/l, pH 7.5; $\circ$, 1020 mg AC/l, pH 10.3)

図 6 に、 NaOCl 溶液により除去された BSA の分子サイズを GFC で分析した結果を示す。

pH 12.6 (OH $^-$ 単独) で除去された BSA (図 6A) では、シャープな単一ピークが認められ、その溶出時間は未変性 BSA と同一であった(図 6 中点線)。一方、弱アルカリ性の NaOCl 溶液 (pH 10.3、 OCl^- 濃度 1100 mg/l) で除去された BSA (図 6B) では、シャープな単一ピークが消失し、溶出時間が長い方向に新たな二つのピークが現れた(図 6B 矢印部分)。中間に現れるブロードな複数のピークは NaOCl 由来(図 6C)のものと考えられる。ここでは示していないが、弱酸性の NaOCl 溶液 (pH 5.3、 OCl^- 濃度 1130 mg/l) で処理後、pH 12.5 (OH $^-$ 単独) で除去された BSA でも、図 6B 矢印部と同様の二つのピークが観察された。この二つのピークは、本来の BSA よりもより低分子側の断片の存在を示しており、すなわち溶出 BSA が HOCl/OCl^- により低分子化されていることを示している。

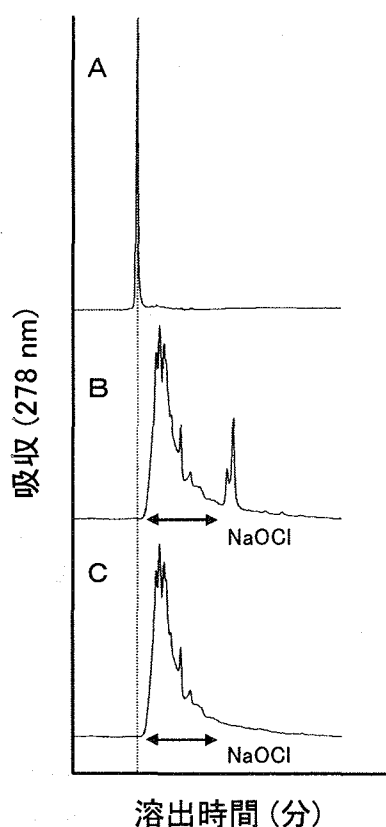


図6 溶出 BSA の GFC チャート (A)pH 12.6 で溶出した BSA、(B)NaOCl 溶液 (pH 10.3, OCl^- 濃度 1100 mg/l) で溶出した BSA、(C)NaOCl 溶液 (pH 10.3, OCl^- 濃度 1100 mg/l)

5 考察

吸着 BSA の NaOCl 溶液による洗浄除去において、洗浄効率および洗浄速度定数は、pH 6-10 の範囲で OCl^- 濃度に依存して増加した。その場合、除去の有無に係わらず BSA の低分子化が観察された。

HOCl の塩素 (Cl^+) は強い求電子性を有し、電子密度の高い部位との強い反応性を有する⁴⁾ ため、タンパク質分子内のペプチド結合や炭素二重結合⁵⁾、システイン残基⁶⁾等と反応することや、リシン残基のアミノ基との反応から、タンパク質骨格の切断を誘導する $-\text{NH}_2^+$ 、 $-\text{NH}$ などのラジカル種が生成する^{7,8)} ことなどが報告されている。NaOCl 溶液による洗浄過程において、吸着 BSA はこれら Cl^+ の関与する反応を経て、高次構造変化や低分子化された結果、除去し易い形態に変化したと考えられる。

これらの反応が効率的に進行するためには、十分な量の HOCl/ OCl^- が BSA 分子内に容易かつ迅速に供給されることが必要である。高い OH⁻ 濃度 (アルカリ性) の場合、まず BSA 分子内の官能基の脱プロトン化が起こり、これに起因する静電的反発が分子内、分子間で生じ、その結果分子は膨潤し、分子内部への HOCl/ OCl^- の到達が容易になると考えられる。一方

で、HOCl/ OCl^- の吸着 BSA 分子内部への移動現象は濃度勾配に基づく受動拡散で、その移動速度は溶液中の HOCl/ OCl^- 濃度に依存すると考えられる。連続洗浄初期のタイムラグは、HOCl/ OCl^- の吸着 BSA 分子内部への移動現象を反映していると考えられる。

さらに、低分子化されていても pH 6 以下では除去されないことから、除去には一定量以上の OH⁻ が必要であると考えられる。

以上のことから、 OCl^- の存在比率が増加しはじめる中性以上の pH 領域 (pH 6-10) では、OH⁻ の作用により吸着 BSA が膨潤し、HOCl/ OCl^- の BSA 分子内部への拡散が容易となり、HOCl/ OCl^- と構成アミノ酸 (ペプチド結合) との反応性が向上することにより BSA の酸化分解が促進された結果、pH 単独と較べて著しい除去効果が得られた、と考えられた。

6 まとめ

NaOCl 溶液で洗浄した場合、 OCl^- 濃度に依存して、吸着 BSA の除去率および洗浄除去速度が増加した。本研究により、NaOCl 溶液の洗浄力は OCl^- の濃度に強く依存することが明らかとなった。洗浄剤として OCl^- を効果的に利用することで、洗浄に必要な OH⁻ 濃度 (例えば水酸化ナトリウム濃度) を 1/100 ~ 1/1000 程度に削減することができる。

参考文献

- 1) Clegg, L. F. L.; In *milk Hygiene*. (F.A.O./W.H.O.), pp. 195-220, World Health Organization, Geneva. (1962).
- 2) Rutala, W. A., and Weber, D. J.; *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 597-610. (1997).
- 3) Morris, J. C.; *J. Phys. Chem.*, **70**, 3798-3805. (1966).
- 4) Wojtowicz, J. A.; In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, vol 5, 3rd ed. (Mark, H. F., Othmer, D. F., Overberger, C. G., Seaborg, G. T., and Gayson, M. eds.), pp580-611, John Wiley & Sons, New York (1997).
- 5) Nightingale, Z. D., Lancha, Jr., A. H., Handelman, S. K., Dolinkowski, G. G., Busse, S. C., Dratz, E. A., Blumberg, J. B., and Handelman, G. J.; *Free. Radic. Biol. Med.*, **29**, 425-433. (2000)
- 6) Winterbourn, C. C., and Brennan, S. O.; *Biochem. J.*, **326**, 87-92. (1997)
- 7) Hawkins, C. L., and Davies, M. J.; *Biochem. J.*, **332**, 617-625 (1998).
- 8) Hawkins, C. L., and Davies, M. J.; *Biochem. J.*, **340**, 539-548 (1999).