

# 北海道工業技術研究所報告

REPORTS OF THE HOKKAIDO NATIONAL  
INDUSTRIAL RESEARCH INSTITUTE

第61号 平成6年3月

---

## 目次

- Computer Simulations of Heat Transfer in Soil for  
Ground-Source Heat Pumps .....(1)  
Munehiro Yamaguchi, Sogo Sayama, Hirokazu Yoneda  
Svein Grandum, Per Arne Schiefloe, Marit Sandbakk  
and Per-Erling Frivik
- オゾンによる殺菌機構 .....(15)  
神力就子
- 

工業技術院

北海道工業技術研究所

# Computer Simulations of Heat Transfer in Soil for Ground-Source Heat Pumps

Munehiro Yamaguchi, Sogo Sayama, Hirokazu Yoneda\*  
Svein Grandum\*\*, Per Arne Schiefloe\*\*, Marit Sandbakk\*\*  
and Per-Erling Frivik\*\*

\* MYCOM Co., Ltd., Ibaragi, Japan,

\*\*NTH-SINTEF Refrigeration Engineering, Trondheim, Norway

## Abstract

In order to design a ground-source heat pump, the temperature profile and the ice formation and melting during heat extraction and recovery in the ground must be documented. Computer simulations were used for investigations with a direct expansion heat pump on evaluations of heat extraction levels, various heat pump operations, and the fill material of vertical heat exchange tubes. Actual operational data were recorded at the Hokkaido National Industrial Research Institute (HNIRI).

It became clear from simulations that the tube diameter has little effect on the heat extraction rate and that the effect of the tube length is nearly proportional to the heat extraction rate.

These results are of usefull applicability to heat extraction from the ground in static water-saturated condition. When heat extraction rate levels are too high, they act to decrease initial soil temperature from the start of one year to the next; therefore it is necessary to inject heat artificially during the heat recovery period.

Nighttime operation combined with a heat storage system, when electricity rates are low, reduces energy costs while generating a small increase in investment costs.

## 1. Introduction

Compared to air-source heat pumps, ground-source heat pumps (GSHP) have the advantage that the heat extraction rate is not dependent on outdoor temperature and that the frost formation problem can be avoided. When GSHPs are used for floor heating, they generate a low condensation temperature while increasing the coefficient of performance (COP).

Worldwide, there are thousands of heat pump units installed of both ground-coupled type and direct-expansion type. Several research projects related to these have been carried out. There are many factors which can affect this type of heat pump. Results produced in one country may not be valid in another because of different climates, ground conditions, energy prices and other costs.

Hokkaido National Industrial Research Institute (HNIRI) has developed a test plant for investigating the effect of soil conditions close to the heat extraction surface and the efficiency of the heat pump installation. This paper reports the investigation of the characteristics of GSHP using computer simulations of heat transfer from the soil to the heat exchanger.

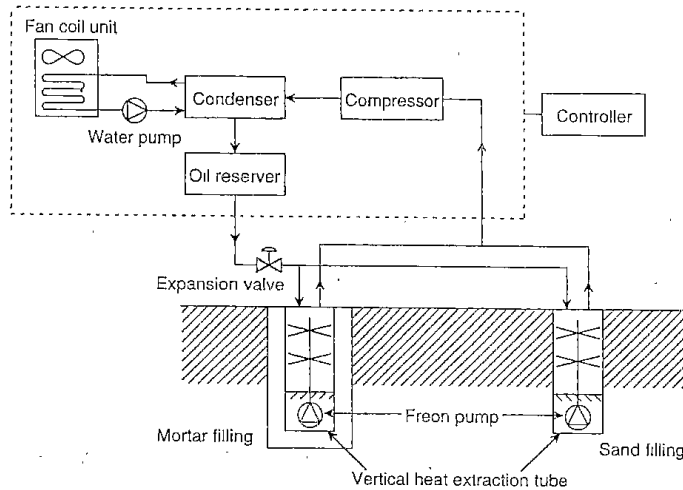


Figure 1. Direct expansion heat pump system.

## 2. Heat pump system

From 1985 to 1986, Hokkaido Electric Power Co. in Sapporo performed work on direct-expansion systems<sup>1)</sup>. Heat was extracted using 7 vertical tubes (60.5mm o.d., 20m). The results showed that the heat extraction rate for volcanic ash was approximately 23-29 W/m and that COP was 2.3-2.8.

The system at HNIRI consists of two 20-m-deep wells (30 m distance between the wells) and a heat pump unit as shown in Fig. 1. It is a direct-expansion system. The heat pump was from Maekawa Co. (MYCOM) and the refrigerant was R22. The low temperature refrigerant gas is transported from the evaporators installed in the ground to the compressor which is an open reciprocating type with a rated power output of 1.5 kW and displacement of 5.4 m<sup>3</sup>/h. The temperature out of the compressor is 33 °C. The hot gas condenses in a shell and finned tube condenser where water is heated to 30 °C. The warmed water is supposed to be used for floor heating.

The hot liquid refrigerant expands in the expansion valve, and a mixture of gas and liquid flows into the evaporators (heat collection tubes).

## 3. Two-dimensional computer program

To investigate the temperature changes in soil during heat extraction and heat recovery, a simulation program called NRAD, was used.

### 3.1 Description of the program

The Norwegian Institute of Technology - The Foundation for Industrial and Scientific Research (NTH-SINTEF) Refrigeration Engineering has developed a computer program, NRAD, for simulation of two-dimensional non-linear heat conduction. This program can also be used for three-dimensional problems in cases of axisymmetric geometry, such as for the test plant at HNIRI.

NRAD is a "finite element method" program using Galerkins method for solving the temperature distribution. The differential equation in the model is:

$$\left( \lambda_x \frac{\partial^2 T}{\partial x^2} + \lambda_y \frac{\partial^2 T}{\partial y^2} \right) + q_G''' = \rho c \frac{\partial T}{\partial t}$$

For axisymmetric cases, it is:

$$\frac{\lambda_r}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left( r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \lambda_z \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} + q_G''' = \rho c \frac{\partial T}{\partial t}$$

Material properties dependent on temperature

are defined in Tables 1 and 2. The latent heat of ice is included in the values. The geometry can be defined by specifying nodes or points building up a group of four-sided elements.

Temperature, heat flux, convection and radiation boundary conditions can be defined in groups of nodes. Initial temperatures can be given in the specified data set. The exactness of the simulation results depend on the accuracy of the input data.

### 3.2 Simulation model of heat transfer

The simulation geometry for the soil around the tube was defined to give results as close to the real situation as possible, but at the same time was defined to reduce the amount of

nodes, due to limitations of computation and computer calculation time. The distances between the points were chosen smaller near the heat extraction surface where the temperature conditions changes rapidly. The defined geometry is shown in Fig. 2.

During the measurements of the water content in soil of the test plant, it was found that a small layer 4 m below the surface was not saturated, while the rest was saturated. To simplify the model, it was assumed that the soil was saturated at all layers. Shift of water was not considered. Both thermal conductivity and volumetric heat capacity are higher in the saturated condition. The soil consisted of different layers of materials, but the uppermost

Table 1. Volumetric heat capacity and thermal conductivity for soil saturated by water.

Temperature range °C	Volumetric heat capacity J/m <sup>3</sup> K	Thermal conductivity W/mK
-30.00 - -10.00	$1.86 \times 10^6$	2.6619
-10.00 - -1.00	$2.14 \times 10^6$	2.6495
-1.00 - -0.10	$1.36 \times 10^7$	2.6247
-0.10 - -0.01	$6.79 \times 10^8$	2.5378
-0.01 - 0.00	$7.61 \times 10^9$	2.0414
0.00 - 20.00	$2.82 \times 10^6$	1.4209

Table 2. Volumetric heat capacity and thermal conductivity for sand saturated by water.

Temperature range °C	Volumetric heat capacity J/m <sup>3</sup> K	Thermal conductivity W/mK
-30.00 - -1.00	$2.04 \times 10^6$	2.5867
-1.00 - -0.10	$1.46 \times 10^7$	2.5811
-0.10 - -0.01	$7.22 \times 10^8$	2.5511
-0.01 - 0.00	$8.18 \times 10^9$	2.4328
0.00 - 20.00	$2.83 \times 10^6$	1.1288

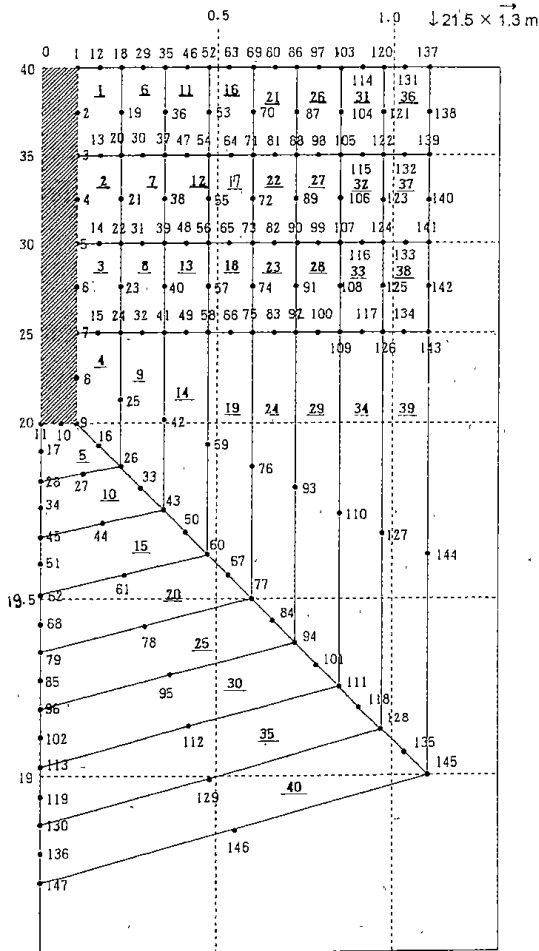


Figure 2. Defined geometry for the simulation model.  
(numeric means point number, numeric with under line means node number)

11 m was volcanic ash. Specification of all the layers in the simulation was not practical, and therefore it was assumed that a homogenous soil of volcanic ash existed in all the layers.

Radiation from the sun and the surroundings and convective heat transfer were not included.

Also, heat transfer caused by rainwater infiltration into the soil was not considered. All of these factors are important, but would make the simulation model too complex. During the winter, the layer of snow acts as insulation, and the influence of these factors are of less importance. In the summer, the heat recovery also will depend on these factors. Thus, the result is a conservative approximation of the real temperature distribution of the soil.

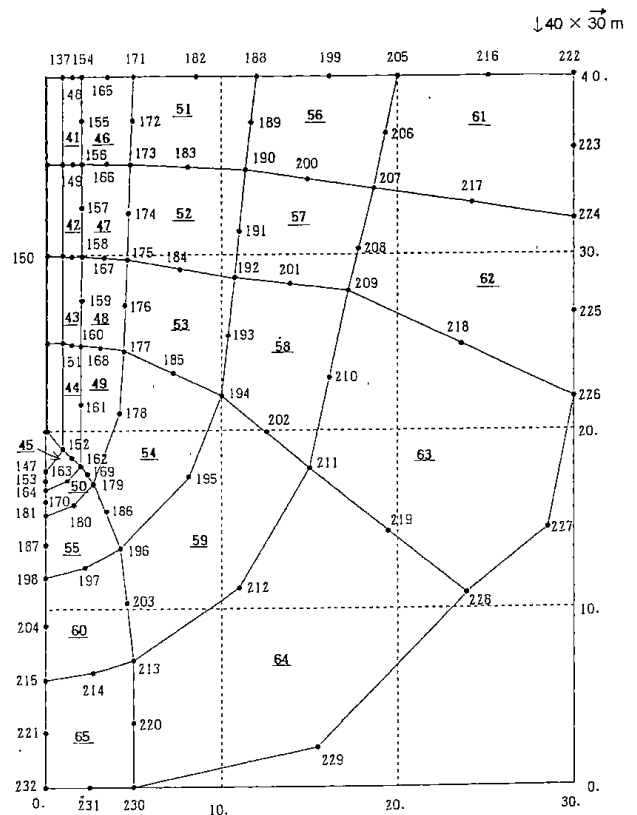


Figure 2. Cont.

### 3.3 Input data for simulations

Knowledge of the thermal properties of actual materials is important for calculation of heat transfer during cooling and freezing. In general, water content is one of the most significant factors. In addition, the soil composition, especially the particle size and quartz content, affects the heat transfer.

Thermal conductivity variation is a complicated phenomenon, and various empirical methods have been developed. For simulations, the model introduced by Kersten<sup>2)</sup> and improved by Johansen and Frivik<sup>3)</sup> was used.

$$\lambda = \lambda^0 + (\lambda^1 - \lambda^0) K_e(S) \quad \text{main equation}$$

Sub equations

$\lambda^0 = a n^{-\beta}$	Conductivity in dry state
$\lambda^1 = \lambda_w^n \lambda_s^{(1-n)}$	Conductivity in saturated state
$\lambda_s = \lambda_q^q \lambda_r^{(1-q)}$	Conductivity of particle
$K_e = S_r$	Frozen state
$K_e = a \log S_r + 1$	Unfrozen state

Variables

$n = 1 - \rho_d / \rho_s$	Porosity
$S_r = \frac{W \rho_d}{n \rho_w}$	Saturation
q	Quartz content

Parameters†

$a = 0.034, \beta = 2.1$	Depending on the nature of the soil and sand‡
$a = 0.68$ and $0.94$	

Conductivity

Water	0.57 W/mK	
Ice	2.3 W/mK	
Quartz	7.7 W/mK	
"Rest"	2.0/3.0 W/mK	Depending on the nature of the parent rock*

†Based on Kersten's experimental data<sup>2)</sup>

‡Smaller case: coarse-grain, upper case: fine-grain of clay fraction greater than 2 %

\*Smaller case: granitic origin

To find the thermal conductivity when both frozen and unfrozen soil exists within the same volume, the following interpolation was used:

$$\lambda = \lambda_f + (\lambda_u + \lambda_f) v$$

where  $v$  is the ratio of unfrozen water content

to total water content.

To estimate the content of unfrozen water in soil depending on the temperature, an approximation had to be done using values for silt<sup>3)</sup> because no other data was available. These values are shown in Fig. 3. The values for sand were also taken from this figure.

Volumetric heat capacity of soil and sand for the various temperatures depends on volume ratios of dry soil or sand, unfrozen water, freezing water and ice. The volumetric content of water in soil or sand was examined by measurement. For specific heat capacity of dry soil, values from Kasubuchi<sup>4)</sup> were used, while the values for sand had been given by the Norwegian manufacturer. Both values for soil and sand as fill material around heat exchange tubes were calculated using the above methods.

The values are respectively shown in Tables 1 and 2.

In all of the simulations, the initial temperature of fill material was chosen to be 7 °C in the total geometry, according to test measurements done at the time.

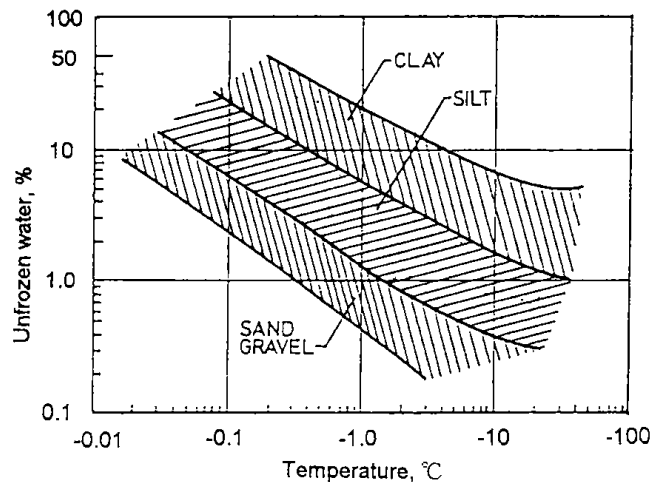


Figure 3. Unfrozen water content as function of temperature<sup>3)</sup>.

### 3.4 Examined physical and operational conditions

An evaluation of sand as fill material around the heat exchange tubes was executed. Because of different heat transfer properties, the conditions in the ground will be different. As for the rest of the soil, the sand will be saturated by water. Soil temperature distribution during constant heat extraction rate was examined. To know the lowest wall temperature and therefore the necessary evaporation temperature will be of importance for determining the dimension of the heat pump system and for evaluating energy consumption. Examination of the heat recovery situation during the summer also will provide valuable information for determining necessary heat injection into the ground. Simulations considering constant evaporation temperature were executed and the variation in the heat extraction rate could be visualized.

In Japan, electricity rates are considerably higher in daytime than at night. Accumulation of the heat produced by running the heat pump at night could reduce the energy costs of operation. In cyclic operation, e.g. 8 hours running and 16 hours resting, the heat extraction rate should be 3 times that of continuous operation to obtain the same energy.

A simulation has been executed to evaluate the temperature distribution in the ground compared to continuous operation. The lowest temperature that occurs after 6 months of heat extraction indicates the dimensioning situation for the compressor. An estimation of compressor volume and resulting power consumption were executed to evaluate the overall economy of cyclic operation.

## 4. Results

### 4.1 Results of continuous heat pump

### operation

#### 4.1.1 Test pipe design

An outdoor heat pump plant was built for full scale tests. A rough estimation of the pipe size may be deduced from simulation data. To maintain a constant heat extraction rate from a well under steady state conditions, three parameters — depth of well, pipe diameter and surface temperature — should be determined. In general, the procedure of optimization of the well is complicated, since the ground conditions, heating and cooling demand and costs all will matter.

In this non-commercial case, the costs will not be taken heavily into consideration. The cooling capacity was set at 1 kW under steady state conditions and the surface temperature was desired to be approximately  $-8^{\circ}\text{C}$ . Then it remains to calculate the pipe diameter and depth. From the simulation results, the heat extraction rates for  $d=100, 200, 300$  and  $400$  mm are plotted in Fig. 4. The pipe is 20 m long.

As seen in Fig. 4, when the diameter is doubled from 200 to 400 mm, a 25% increase in the heat extraction rate results. Reducing the diameter to 100 mm causes a 16% reduction in heat extraction rate.

In general, the smallest diameter would probably be chosen to reduce the cost of drilling and materials. To compensate for the reduced cooling capacity, the pipe would be lengthened.

From Fig. 4, it can easily be understood that the cooled or frozen soil itself rapidly becomes the major hindrance to efficient heat transfer.

As mentioned, optimization of the pipe requires the implementation of several parameters, both physical and economical. This simplified estimation indicates that a 100 mm pipe should be preferred rather than one with a 200 mm diameter. The length should be 23.2 m

if a heat extraction rate of 43.1 W/m is used. A reduced diameter will increase the refrigerant velocity by a factor of 4, and the pressure drop will increase. However, due to the very low initial velocity, the temperature loss caused by the pressure drop will be of negligible significance.

In average, the heat extraction rate was 1 kW from the 20 m long and 100 mm diameter pipes during 6 months of -8°C surface temperature.

At the end of the period, almost steady state conditions occurred, and the heat extraction rate declined to 0.84 kW or 16% less than desired.

The smaller surface of the 100 mm tube requires less liquid refrigerant to be kept wet, hence the recirculation ratio of refrigerant can be reduced. A deeper well results in a larger soil volume as heat source. In this case, a small refrigerant pump is to be placed at the lower part of the well. A sufficiently small pump should be chosen to meet the small well diameter.

An important point is the freezing of the soil.

Some problems may occur when the soil freezes and thaws several times. To avoid these problems, it is often recommended that freezing of the soil should not be allowed. A sufficiently large area of the pipe is then required. There may be several optimal sizes depending on the usage of the heat source.

#### 4.1.2 Distance between two wells

The distance between the two wells should be kept as small as possible without permitting any significant temperature interference. A great distance between wells results in long suction pipes in this direct-expansion heat pump system. This leads to high pressure drops and high degrees of superheating of the refrigerant gas.

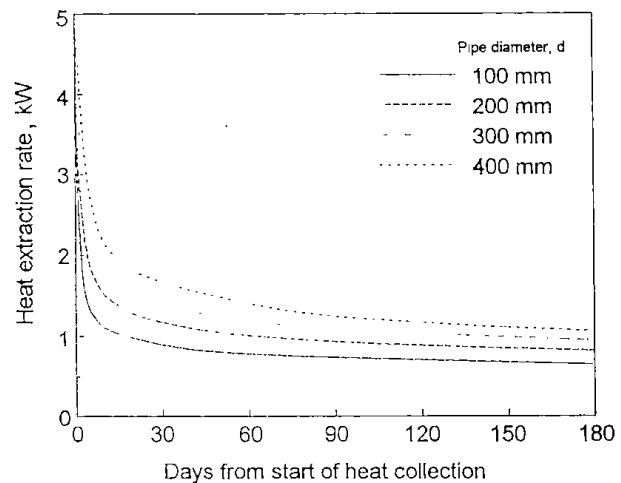


Figure 4. Variation of heat extraction rate as function of pipe diameter at constant temperature -8°C.

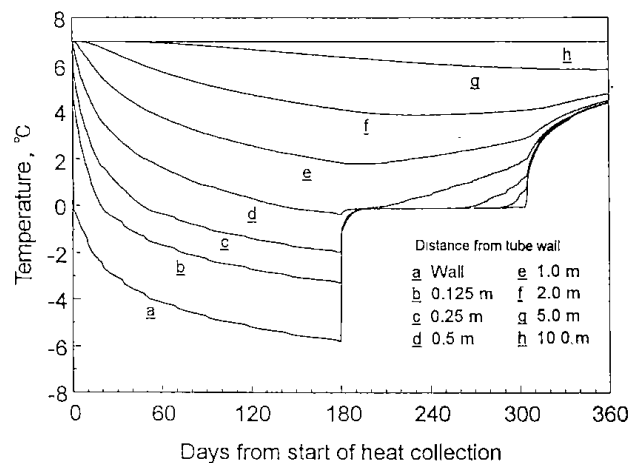


Figure 5. Temperature distribution in the case of constant 1.00 kW heat extraction.

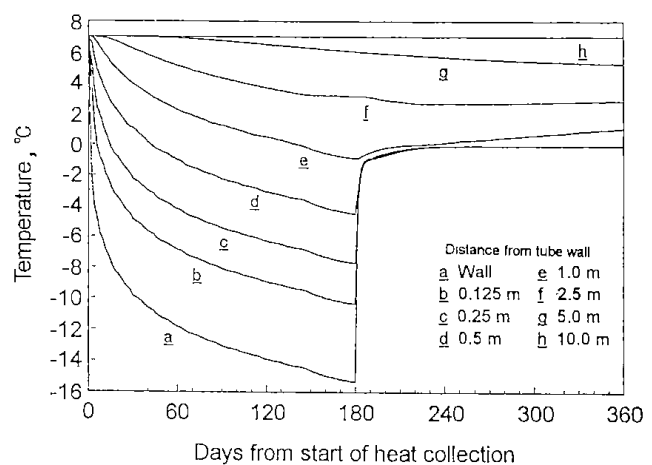


Figure 6. Temperature distribution in the case of constant 2.00 kW heat extraction.



From the simulation results, Figs. 5 and 6, it seems that the temperature of the soil is almost unchanged at 10 m from the well and shows only a small change (0.85 K) 5 m from the well after 6 months of heat extraction. The temperature continues to decrease after the heat pump is turned off. After another 6 months without heat extraction, the temperature decreases to 5.75°C from the original soil temperature of 7°C at a point 5 m from the well, and to 6.56°C at 8 m. The effect of sunshine is not added, but it may have a significant influence in the upper part of the soil volume. A distance of 15-20 m should be enough to avoid temperature interference. The frozen zone has a thickness of about 0.55 m after the 6-month period.

#### 4.1.3 Constant heat extraction rate

Examinations of 1.00 kW and 2.00kW constant heat extraction rates were executed for a period of one year, e.g. 6 months with heat extraction and 6 months without. Sand was used as fill material. Figures 5 and 6 show the temperature development for different distances from the tube for these cases. The temperatures represent values at the depth of 5 m beneath the surface. In the case of 1.00 kW, the lowest temperature was -5.7°C after 6 months. The frozen zone around the tube was about 0.55 m.

After the stop of the heat removal, the temperature in the frozen zone rose to the melting level rapidly because of high thermal conductivity and low volumetric heat capacity.

During ice melting, the temperature remained roughly constant. The period for the ice melting in this case was about 125 days. After 6 months of heat recovery, the temperature did not reach the same level as before the heat extraction. The soil temperature therefore will be lower and

lower every year if no heat is injected.

Radiation from the sun, heat convection and conduction, and rainwater infiltration of course influence the upper part of the ground.

This 12-month period of simulation started with undisturbed ground conditions, therefore poorer conditions must be expected, even if heat recovery from the ground surface is added.

To achieve equal start conditions in every year, heat must be artificially injected into the well.

In the case of 2.00 kW heat extraction, the situation becomes worse. The ice doesn't melt during the heat recovery. The temperature level in the ground — and therefore the evaporating temperature — is much lower during heat extraction. The lowest temperature is calculated to be -15°C. Compared to the 1.00 kW case, this lower temperature will result in higher energy consumption for heat pump operation.

#### 4.1.4 Constant evaporating temperature

Figure 7 shows the heat extraction rate for various evaporating temperatures with sand as fill material. If the heat pump is operated to maintain a constant evaporating temperature, the heat extraction rate must decrease due to smaller and smaller differences between evaporating and soil temperatures. The soil reaches a steady state condition after 20 to 40 days and the heat extraction rate then begins to stabilize. Figure 8 shows how the level of evaporating temperature influences the soil temperature for the various distances during the first 14 days.

### 4.2 Cyclic heat pump operation

#### 4.2.1 Simulation model and input data

Continuous heat extraction of 1.00 kW was

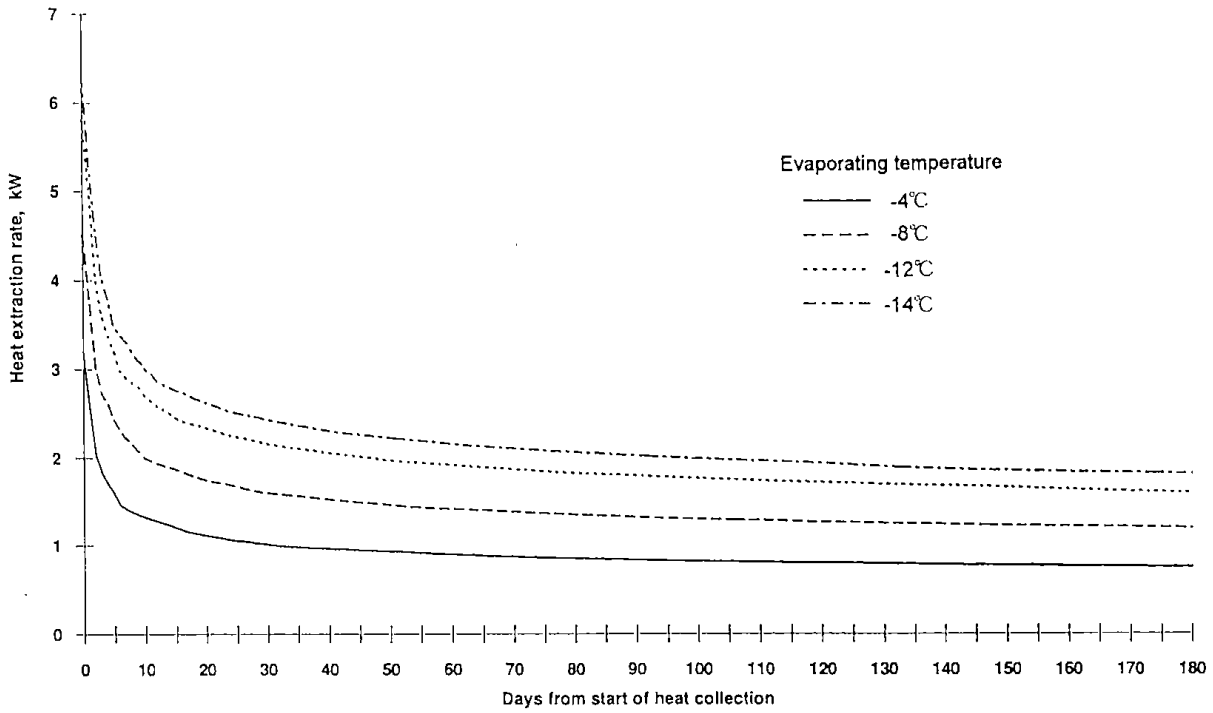


Figure 7. Variation of heat extraction rate in the case of constant evaporating temperature.

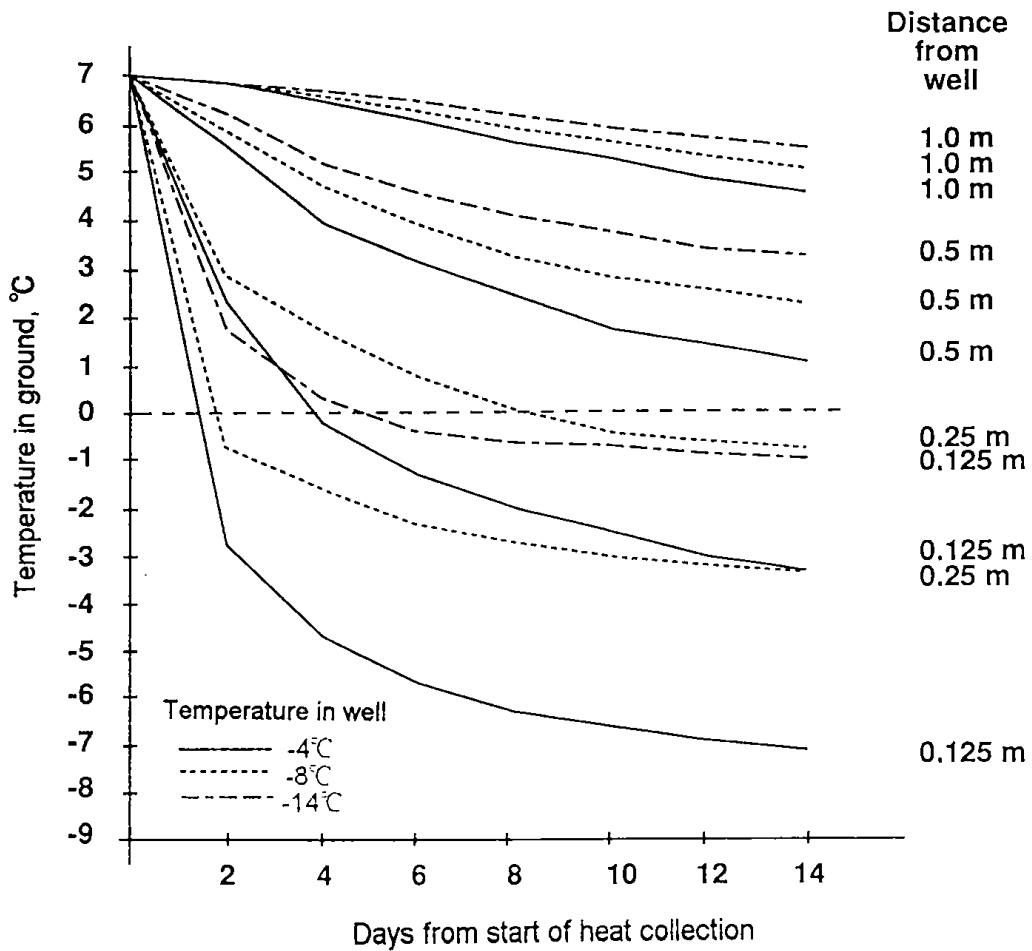


Figure 8. Temperature for various distances and evaporating temperature.

chosen to compare continuous and cyclic heat pump operation. Sand was used as fill material.

In order to collect the same amount of energy during 8 hours of operation, a heat flux resulting in 3.00 kW of heat extraction is necessary for cyclic operation. Such a fluctuating boundary condition was too complex for the simulation program. In periods where the average temperature changes rapidly, like the first heat extraction day, the numerical errors in the calculations would be too large.

But when the temperature is stabilized, as in the last 24 days of the 6-month heat extraction period, the accuracy of the simulation would be reasonable. Because the same amount of energy is collected in both operations, the results from continuous operation simulation after the first 156 days were used as a basis for input to the simulation of cyclic operation for the last 24 days. Before making a cyclic operation simulation, the initial soil temperatures for such an operation had to be examined. Values resulting from simulation of continuous operation were used directly in the 24 days preliminary simulation. The following was observed in this test:

- \* A phase displacement exists in the temperature fluctuations comparing maximum values for two different distances from the well (points 1 and 2 in Fig. 9).
- \* The temperature amplitude decreases with increasing distance from the well and is negligible at about 0.50m.
- \* The temperature amplitude remains almost constant for the same node within this 24-day period.
- \* During the 16 hours resting, consumption of

heat for melting ice makes the rise in temperature smaller nearby 0°C.

When starting the 3.00 kW heat extraction, there were 16 hours of resting in advance. The soil temperatures at the beginning of the 8 hours of operation will be higher than that of continuous operation. Thus the initial temperature was adjusted. The adjustment was done for the nodes where temperature differences between continuous operation simulation and the test simulation were shown, based on the above observations. Except for the start temperature and heat extraction value, the input data was the same as for continuous operation. The results are shown in Fig. 9.

#### 4.2.2 Cyclic operation for 24 days

The temperature fluctuations for the last 4 days of heat extraction are shown in Fig. 9 for different distances from the well. The values for the 5 m depth are plotted. The influence of latent heat can be seen in Fig. 9 in the increasing part of the temperature profile. The phase displacement of the maximum and minimum values can be seen when comparing the temperatures for different distances at the same time. The lowest temperature was calculated to be -12.4°C. The frozen zone is the same as for continuous operation, i.e. around 0.55m from the tube. Figure 10 shows the temperature profile in the ground for various moments of heat extraction and resting. The temperature fluctuations easily can be visualized for the various distances. There are no fluctuations around 0.50 m.

Figure 11 shows the temperature differences between continuous and cyclic operation for two different distances over the last 10 days of heat extraction. The average value for cyclic

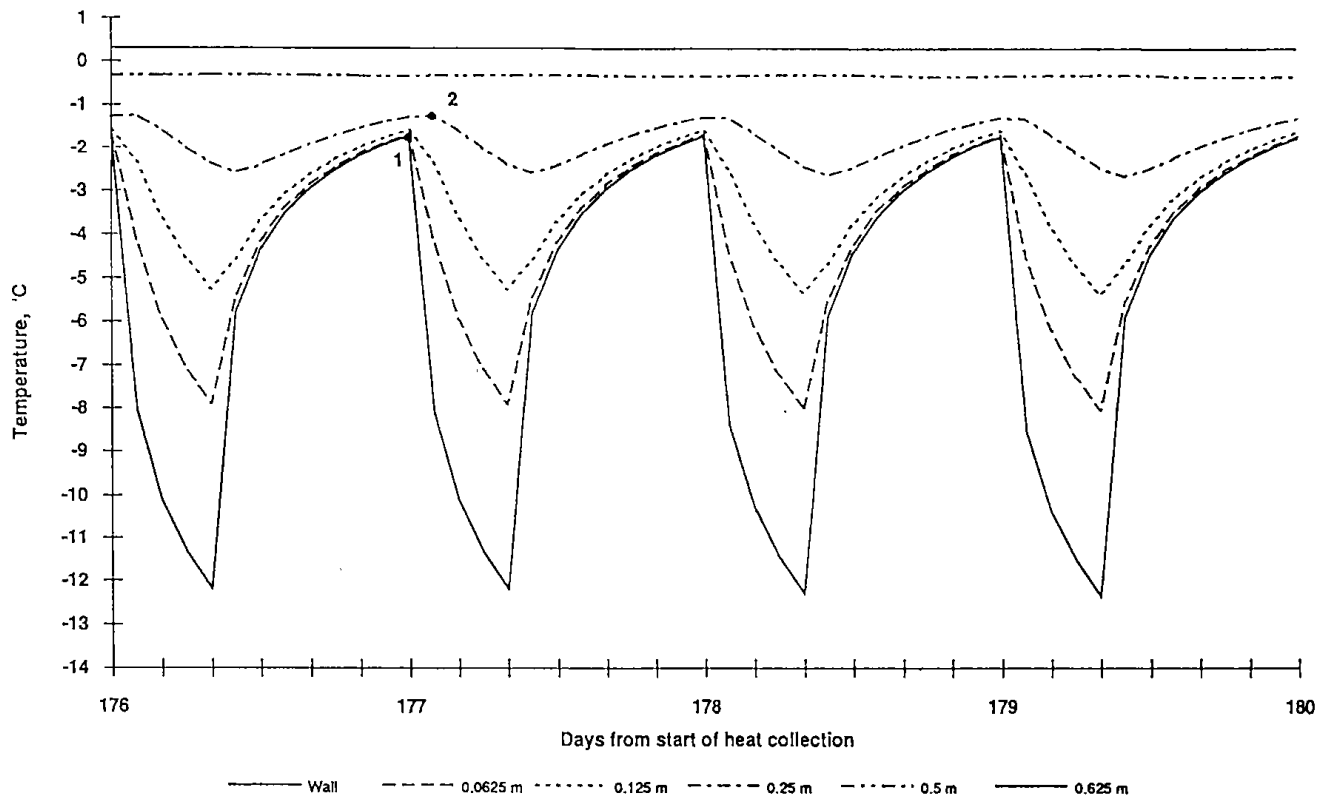


Figure 9. Temperature fluctuation in cyclic operation.

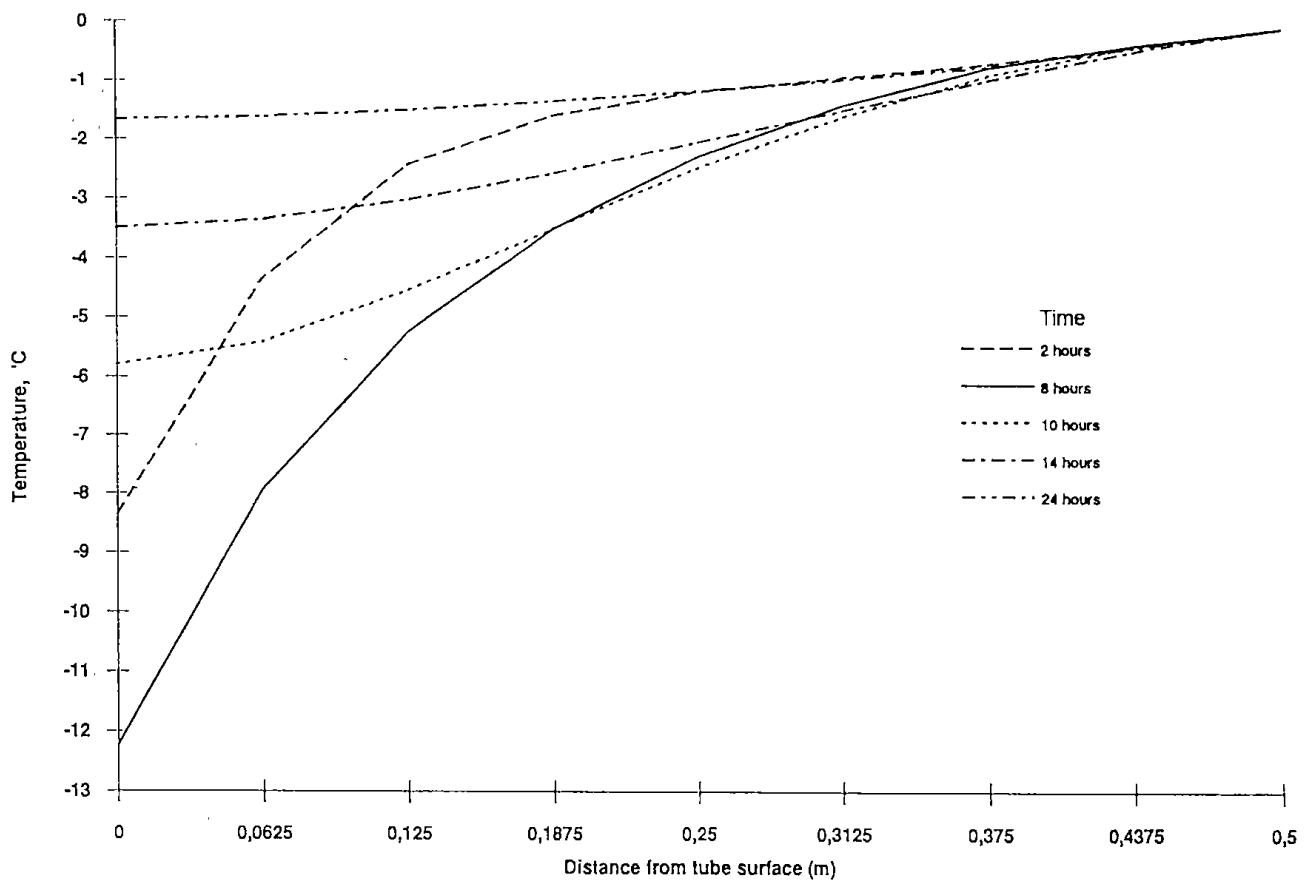


Figure 10. Temperature distribution in soil for various moments.

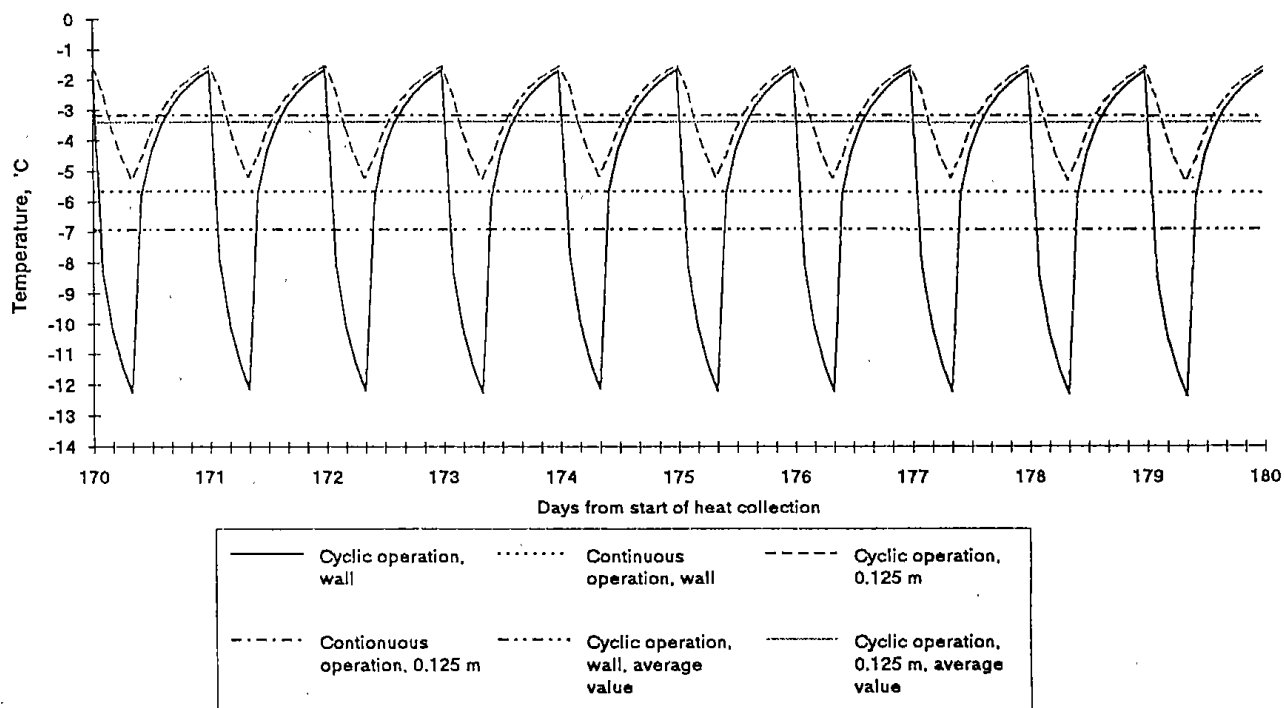


Figure 11. Temperature differences between cyclic and continuous operation.

operation seems not to be equal to the value for continuous operation. The latent heat is dominant in the rise of temperature close to 0°C, and therefore the rate of increase becomes small. This difference decrease as the distance from the well increase. The reason should be that more of the total temperature fluctuation, in this case, is within the latent heat dominant area.

The temperature distribution for cyclic operation during heat recovery is shown to be the same as for continuous operation. The same amount of energy is collected in both cases.

During actual cyclic heat pump operation of this plant, the heat extraction rate did not reach 3.00 kW because the compressor capacity was too small. Therefore, the compressor must be changed to a one large enough to extract 3.00 kW at -12.4°C. To estimate the size of the new compressor, a calculation was made using a process dimensioning computer program developed at NTH-SINTEF Refrigeration

Engineering. A rough estimation shows that the compressor volume must be increased 35 %.

Since the average temperature level is lower (Fig. 11), the average COP of cyclic operation will be lower than for continuous operation. In addition, there are inverter losses running on partial load. But the total energy costs for cyclic operation will be lower for the following reasons:

- \* The nighttime electricity rate (11PM - 7AM) is 7 Yen/kWh and the daytime is 21 Yen/kWh.
- \* Power consumption is 1.55 kW in cyclic operation, which actually only occurs in the condition of lowest evaporation temperature, while the power consumption is 0.44 kW in continuous operation using the smaller compressor.
- \* Energy costs of cyclic operation will be even lower, since 1.55 kW is the maximum power consumption.

## 5. Conclusions

The simulation of the ground heat source system, together with measurements during operation, give important information on physical phenomena about heat transfer in the soil under various operating conditions.

- 1) The extraction rate from the soil keeping the evaporating temperature constant reaches a steady state condition after a certain period of time.
- 2) The constant heat extraction of 1.00 kW level shows a change in initial ground temperature from +7°C in the beginning of operation to +4.7°C before starting operation the next year. Without any artificial heat injection during the summer, the initial temperature will decrease each year, until a steady state condition occurs, even when radiation from the sun and heat conduction and convection are included. A constant 2.00 kW heat extraction rate results in even lower temperatures in the beginning of the next year, therefore such a high level rate is not recommended for operation. Since the evaporating temperature will become much lower during operation, the COP for the heat pump also will be lower.
- 3) To avoid a decreasing tendency in soil temperature from one year to the next, heat should be artificially injected into the ground. If the heat pump can be used for air-conditioning during the summer, heat can be recovered. The temperature of the ground as a heat sink will be relatively low, which can increase considerably the COP of an air conditioner compared to outdoor air-based units.
- 4) In the case of constant 1.00kW heat extraction rate, the thickness of the ice layer is about 0.55 m after 6 months of heat pump operation. Around 10 m from the well, there seems to be no temperature change. This is important to know if more than one well is considered. When energy from the sun is included, a distance between two wells of 10-15m should be enough to avoid temperature interference.
- 5) Comparison of cyclic and continuous heat pump operation, collecting the same amount of energy from the ground, shows lower energy costs for cyclic operation, because of lower nighttime electricity rates. Even though the average temperature level and the COP of heat pump are lower, only about one third of the energy cost is needed. Additional costs for a necessary heat accumulation system and increased investment costs caused by a larger compressor should be compared to energy savings in order to determine if such an operation is recommended. The physical difference in soil in the case of cyclic operation is only local and can be visualized only about 0.50m from the tube surface.

## Nomenclature

$c$  = specific heat capacity, J/m<sup>3</sup>K

$T$  = temperature, K

$t$  = time, h

$\lambda_{x,y}$  = thermal conductivity in x respective y direction, W/mK

$\lambda_{r,z}$  = thermal conductivity in r respective z direction, W/mK

$q_G'''$  = internal heat generation rate, kW

$\rho$  = density, kg/m<sup>3</sup>

$K_e$  = Kersten number

$\lambda$  = thermal conductivity, W/mK

$\lambda^i$  = thermal conductivity, saturated state, W/mK

$\lambda^0$  = thermal conductivity, dry state, W/mK

$\lambda_f$  = thermal conductivity, frozen state, W/mK

$\lambda_u$  = thermal conductivity, unfrozen state, W/mK

$\rho_d$  = density, dry state, kg/m<sup>3</sup>

$\rho_s$  = specific gravity

#### Subscripts:

r "rest"

s "solid"

w "water", "ice"

q "quartz"

#### References

- 1) Nishioka, J.: Operating Experience with Ground-Source Heat Pump System, Proc. 3rd Int. IEA Heat Pump Conf., p.297 (1990).
- 2) Kersten, M.S.: Thermal properties of soils, University of Minnesota, Eng. Experiment Station, Bull., 28 (1949).
- 3) Johansen, O., Frivik, P.E.: Thermal properties of soils and rock materials, The 2nd International Symposium on Ground Freezing, The Norwegian Institute of Technology, June 24-26, 1980.
- 4) Kasubuchi, T.: The effect of soil moisture on thermal properties in some typical Japanese upland soils, Soil Sci. Plant Nutr., 21 (2), p.109 (1975).

## オゾンによる殺菌機構

神力就子

### 1. 核酸とオゾンの反応

#### 1.1. はじめに

オゾンによる殺菌機構はかなり複雑である。それはオゾン反応性が複雑であることを反映しているからである。すなわちオゾンの反応性にはオゾンと化合物との反応速度に応じて特定の基質に対し優先性が生じる。例えば反応の場いくつかの基質がある時、まずその中のオゾンとの反応性の最も高いものがオゾンと反応し、それがほぼ消失して始めて次の反応性のものとオゾンは反応していく。反応性の低い基質のオゾンによる分解はかなり遅れてくるが、もし、この基質しかなければ、これが真っ先に反応する。核酸やタンパク質など高次構造体の場合には、構成単位の単体も持っている反応速度以外に位置特異性(表面か、中側か、束縛されているか、自由かなど)も加味されて反応の優先性が決まってくる。その決定にはオゾンの濃度も1つの因子である。低濃度オゾンの作用で見えていた優先性は高濃度では瞬時の反応の中に埋没して、何が決め手であったかを見損なうことが多い。また、オゾンが作用する系のpHも重要である。pHがアルカリ性では生成OHラジカルの寄与が高くなる。中性、酸性域では基質の中の分極しやすい不飽和二重結合などへオゾンがイオン反応的に攻撃する。ここでは生体物質とオゾンの反応なので中性域の反応を念頭において解説する。また殺菌機構の解説としては、オゾンが第一義的に細胞膜と接触するのであるから膜構成成分とオゾンの反応をまず取り

上げるのが順序であろうが、筆者らが行った核酸とオゾンの反応性の研究はオゾンの反応性の優先性や位置特異性を紹介するのに適しているので、オゾン反応の基礎を知る目的で最初にとりあげた。筆者らは数年前に「オゾンによるバイオハザード防御の研究」を行った。当時、核酸等とオゾンの反応に関する報文は殆どないという状況であったので核酸塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドのオゾン反応性の検討から始めた。ついでRNA、DNA、プラスミドDNAのオゾン分解、さらには大腸菌、タバコモザイクウイルスなどの殺菌、不活性化等を検討した。これらを紹介することによって全体として殺菌機構がイメージされれば幸いである。具体的な研究内容等は文献1)、2)を参照されたい。

#### 1.2. 核酸塩基などとオゾンの反応

核酸構成成分のオゾン反応性を検討したもものとしては古くは Christensen ら(1954)<sup>3)</sup>のオゾンによるUV吸収の減少の報告がある。しかしその20年後においも大村ら<sup>4)</sup>、Scott<sup>5)</sup>の報告はオゾンによる核酸物質のUV吸収の変化、その構成成分である糖量の変化などの追跡であった。筆者らはその反応性を高速液体クロマトグラフィ(HPLC)で検討した。結論的にはUV吸収の減少は核酸塩基の分解であって、ヌクレオシドもヌクレオチドもそれぞれの構成塩基の反応速度と同程度の速度で分解した。例をデオキシリボヌクレオチド(図1)にしぼって図2に示す<sup>6)</sup>。反応速度定数は、デオキシグアニル

受理日 6.3.18



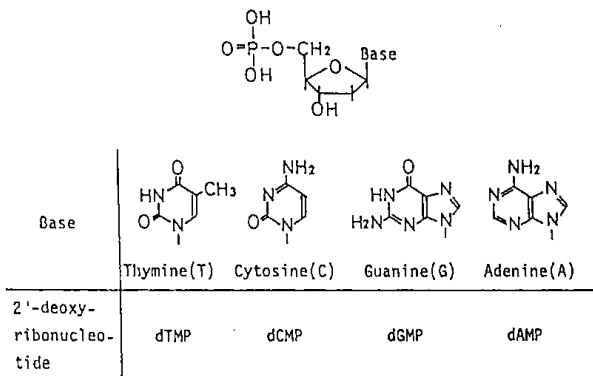


図1. デオキシリボヌクレオチドの構造

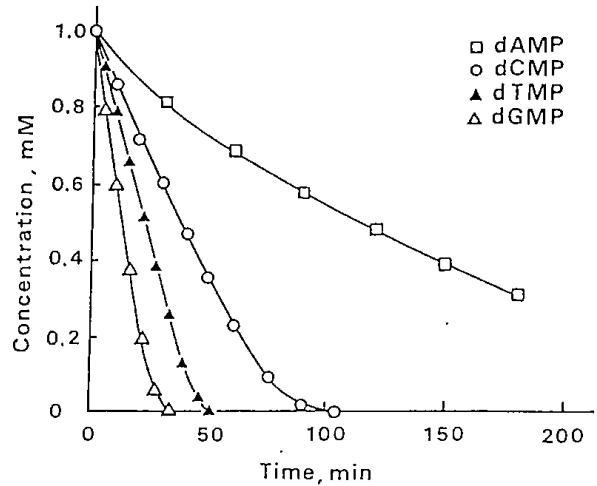


図2. デオキシリボヌクレオチドのオゾン分解  
試料濃度, 各 1 mM (pH 7.8); オゾン濃度, 2 mg/l; 流速, 330 ml/min

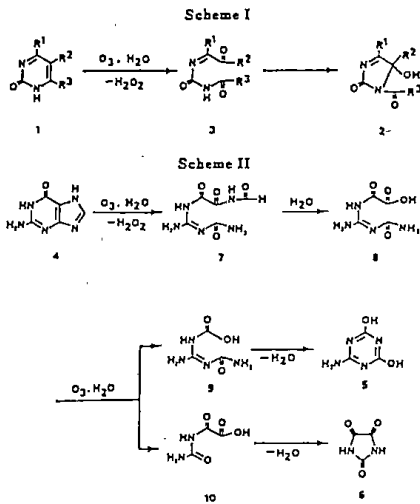


図3. グアニン及びシトシン類のオゾン反応<sup>9)</sup>

酸(dGMP)、デオキシチミジル酸(dTMP)、デオキシシチジル酸(dCMP)、デオキシアデニル酸(dAMP)でそれぞれ15°Cで  $5 \times 10^4$ 、 $1.6 \times 10^4$ 、 $1.4 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^2 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。 $10^4$ オーダーは反応がきわめて速いことを示している<sup>6)</sup>。dAMPのオゾン反応性が低いことは、塩基アデニンが安定な構造をとっているためである。核酸塩基のオゾン分解位置は、Kolonkoら(1979)<sup>7)</sup>によるカフェインなどのオゾン分解結果で示唆されたが<sup>3)</sup>、最近 Matsuiら(1991)<sup>8)</sup>がシトシ

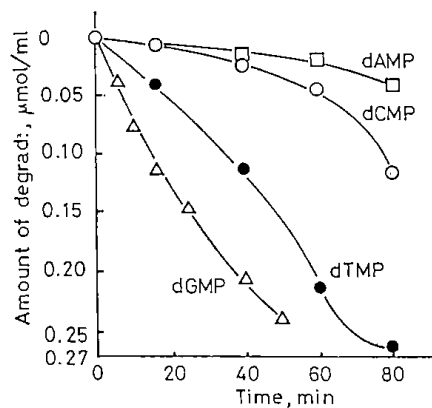


図4. デオキシリボヌクレオチド混合物のオゾン分解  
試料初濃度, 1 mM (dGMP, 0.24; dCMP, 0.24; dAMP, 0.26; dTMP, 0.26 mM; pH 7.8); オゾン濃度, 2 mg/l; 流速, 330 ml/min

ンやグアニンのオゾン分解反応機構を報告したので図3にこれを示す。dAMPのオゾン分解ではアデニンの二重結合に対するオゾン反応性が低い一方で、オゾンから派生するOHラジカルによる糖部分の分解が始まり、つづいて起こるN-グリコシル結合の切断が主反応であった<sup>9)</sup>。オゾン反応の優先性を4種のデオキシリボヌクレオチド混合物を用いて図4に示した。これらの分解が各々の反応速度の順にもとづいていることが<sup>3)</sup>分かる。

### 1.3. RNAとオゾンの反応

かつて(1950年代)オゾンは radiomimetic gas といわれた。すなわち、X線照射でDNA鎖が切断される(現在、これはガンの放射線治療に発展している)ように、オゾンでもDNA鎖の切断が見いだされたからである。しかし、これは筆者らの研究によって明らかにされたように塩基の破壊に基づいて二次的に切断されるのであって<sup>10)</sup>、X線照射により組織内の水から発生するOHラジカルによる鎖切断とは異なる。モデルとしてトランスファーRNA (tRNA)で結果を示してみよう。tRNAは細胞の中であってアミノ酸をタンパク質合成の場へ運ぶ役割を担っている。<sup>32</sup>Pを標識したプロリントランスファーRNA (tRNA<sup>Pro</sup>)とイソロイシントランスファーRNA (tRNA<sup>Ile</sup>)を用いてオゾンによる鎖切断の有無を検討した。電気泳動を行った結果(図5)は16分間オゾンと接触させても鎖切断は生じなかったことを示している。一方、サンガー法で塩基の破壊箇所を検索した(図6)<sup>11)</sup>。

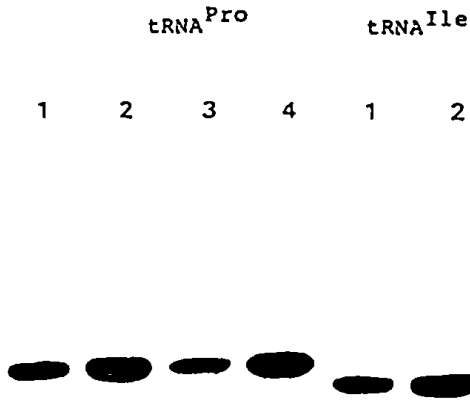


図5. オゾン処理プロリンtRNAおよびイソロイシンtRNAの12%ポリアクリルアミドゲル電気泳動パターン  
試料量, 200  $\mu$ g (2 ml, 0.15 M NaCl); オゾン濃度, 0.1 mg/l; 流速, 70 ml/min; 2 $^{\circ}$ C.  
tRNA<sup>Pro</sup> 1), 未処理; 2), 2分間; 3), 8分間; 4), 16分間  
tRNA<sup>Ile</sup> 1), 未処理; 2), 8分間

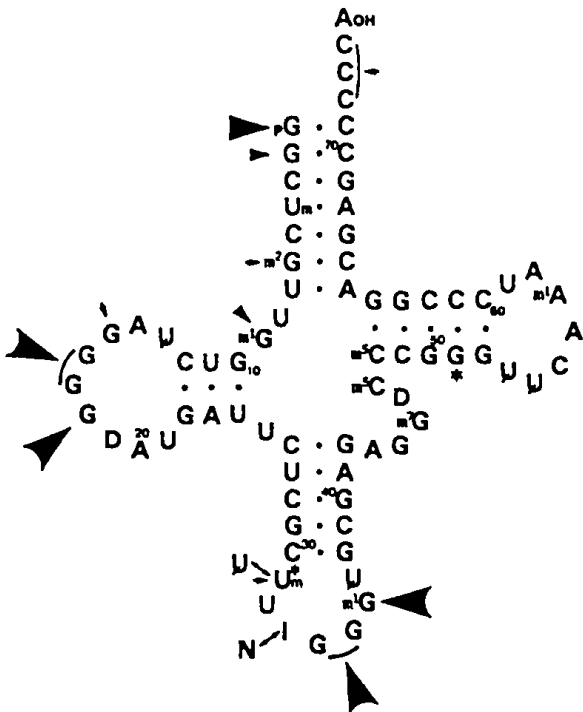


図6. プロリンtRNAのオゾン分解様式  
分解程度 :  $\blacktriangleright$ , ~100% ;  $\blacktriangle$ , ~70% ;  
 $\blacktriangleright$ , ~20~30% ;  $\blacktriangle$ , ~ca.10%

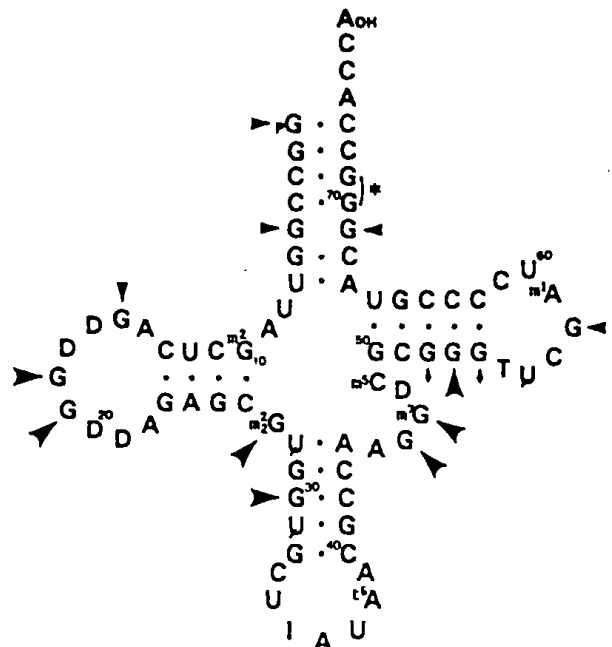


図7. イソロイシンtRNAのオゾン分解様式  
分解程度 :  $\blacktriangleright$ , ~60% ;  $\blacktriangle$ , ~20~30% ;  
 $\blacktriangle$ , ~ca.10%

試料の30,000cpm/ml溶液 2 ml (イーストtRNA 100  $\mu$ g/ml, 10mM Mg<sup>2+</sup>, 0.15M NaClを含む)にオゾン濃度0.1mg/lの酸素ガスを2 $^{\circ}$ Cにおいて流速70ml/minで16分通じた。\* 分解したか否か不明。

すでにグアニン塩基のオゾンとの反応速度が高いことを紹介したが、生体高分子においてもグアニン塩基のみが優先的にオゾンと反応していることが分かる。tRNAの高次構造では一本鎖のループ部分は表面に位置しているため、この部分のグアニン残基の破壊は100%に近い。特にtRNAのアミノ酸認識の根幹であるアンチコドンを含むアンチコドンループの3つのグアニン残基は、100%破壊されていた<sup>10)</sup>。しかし、このような強い破壊状態でも鎖切断は生じていなかった。すなわちオゾン易反応性物質がある間は、糖部分へのオゾンの攻撃は優先されないからである。このようなオゾンの二重結合性への反応の高さと、脂肪族性単結合への反応の低さが殺菌機構、ウイルス不活性化機構を考える上で重要となる。tRNA<sup>leu</sup>ではループ領域にグアニン残基が少ないため、オゾンが内部まで浸透していきステム領域(2本鎖の部分)のグアニン残基が反応しはじめている(図7)。なお、オゾン処理tRNAをアニリン-酢酸溶液で処理すると強く分解しているグアニン残基位置で鎖切断が生じる<sup>10)</sup>。すなわち条件により破壊グアニン位置で二次的な鎖切断がおこるが、これはプラスミドDNAの項で参考となるのでここで述べた。

オゾンによる活性の変化をフェニルアラニンtRNAについて検討した。破壊されたグアニン残基の位置は確認していないが、1.1個のグアニン残基が分解されたときにすでにアミノ酸受容活性は45%に低下し、2.2個のグアニン残基の破壊で受容活性は8.3%に低下した<sup>12)</sup>。すなわち、このことは遺伝子等の活性の喪失はほんの数個の塩基の変化で生じることを示唆している。さらに高分子のRNAではどうか。タバコモザイクウイルスのRNA(TMV-RNA)はおおよそ6000個の塩基が連なっており、これは当然、裸のRNAのままでもタバコ葉に感染する。そこでオゾンをTMV-RNAに作用させ、その塩基量の変化と感染性の相関をみた。結果は図8のとおりである<sup>12)</sup>。感染性が失われ

た30分において高速液体クロマトグラフィー(HPLC)では変化はみえないが、時間を延長するとグアニン残基の減少がはっきりしている。TMV-RNAを構成するおおよそ1590個のグアニン残基のうちHPLC法の精度から最大15個が破壊されている可能性があり、tRNAの結果と合わせてTMV-RNA不活性化のメカニズムとしてグアニン部分のオゾンによる優先的破壊を考えると可能である。

#### 1.4. プラスミドDNAとオゾンの反応

DNAは二重らせん構造をとって安定しているが、この中のグアニン残基とチミン残基の両方にオゾンが優先的に反応することが判明した(図9)<sup>13)</sup>。熱変性させた一本鎖のDNAではオゾンはチミン残基と特異的に反応し、この反応速度はアデニン-チミンが対を形成している2本鎖の時のチミン残基のそれより速い。二重らせん構造をとっている場合はこれら塩基部分が保護された形となるからであろう。一本鎖のチミン残基の反応性の高さは後で述べるが、細胞内DNAのオゾンによる損傷を考える上で重要である。2本鎖DNAにおいてオゾンにより破壊されたグアニン残基、チミン残基はそれぞれ対となるシトシン残基、アデニン残基との水素結合が不確実になり、ついには二重らせん構造は弛緩した状態となって一本鎖部分が広がっていく。オゾンがさらに作用すればついには鎖切断が生ずる。

染色体DNAは超高次構造をとっている。これは複雑すぎるため、モデルとして同じく超高次構造をとるプラスミドDNA(closed circular DNA, ccDNA)をとりあげた。このccDNAを水と生理食塩水の2種の液相でオゾンと反応させると直ちに鎖切断が生じ開環状DNA(open circular DNA, ocDNA)になることが電気泳動で確かめられた(図10)<sup>14)</sup>。水中での反応はオゾン処理10分間でccDNAは消失しており、塩存在下より反応が速く生じている。これはccDNAが水中では弛緩した構造であることを意味し

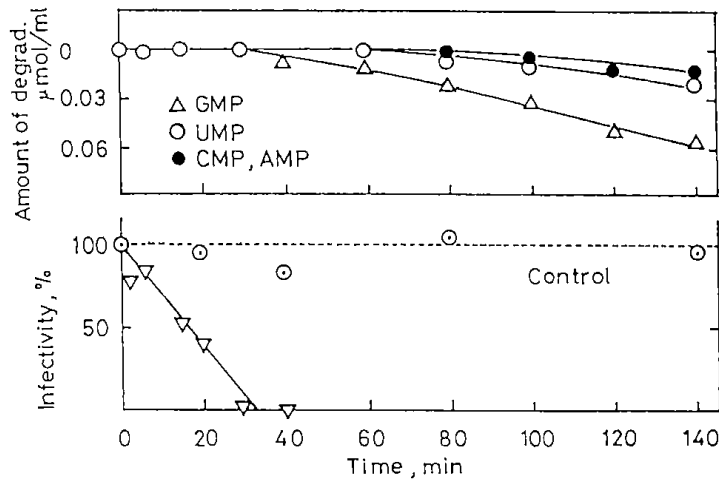


図8. タバコモザイクウイルスRNAのオゾンによる不活性化  
 試料量, 10 mg(40ml, pH 6.9); オゾン濃度, 0.1 mg/l; 流速, 70 ml/min; 2℃

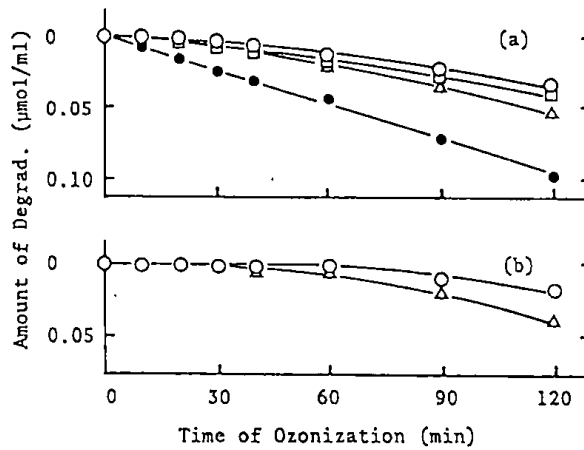


図9. 仔牛胸腺DNAのオゾン分解  
 試料量, 10.8 mg(20 ml, pH 6.9); オゾン濃度, 0.1 mg/l; 流速, 70 ml/min; 2℃  
 (a) 熱変性DNA: ○-○, dCMP; □-□, dAMP;  
 △-△, dGMP; ●-●, dTMP.  
 (b) 未変性DNA: ○-○, dCMP, dAMP; △-△, dGMP, dTMP

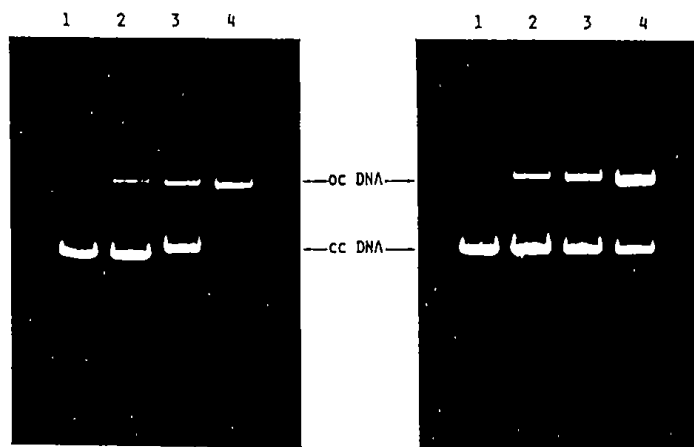


図10. オゾン処理プラスミド pBR322 ccDNAの1%アガロースゲル電気泳動パターン  
 試料量, 50 μg(1 ml, a) 水, b) 0.15 M NaCl);  
 オゾン濃度, 0.05 mg/l; 流速, 70 ml/min; 2℃.  
 反応時間: 1), 0分; 2), 2分; 3), 5分; 4), 10分

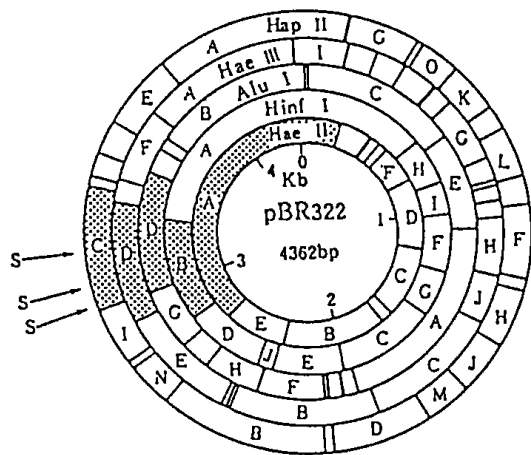


図11. プラスミド pBR322 DNAの制限酵素地図

ているが、このものについて制限酵素地図(図11)を作成した。消失したフラグメントは点を入れて示してある<sup>14)</sup>。共通にみられるのはS印の近傍の3000~3300bpの間であり、その塩基配列を分析した結果、損傷を受けたものの殆どがチミン及びグアニン残基であった。図12に示すようにこの範囲の集中的な損傷でccDNAはocDNAに開環したと考えられる<sup>15)</sup>。その極めて速い鎖切断は、塩基部の分解によってその近辺の二重らせん構造の不安定化が起こったときccDNAがもつ捻れのストレスがそれに加わって、そのストレスを解消するべく分解塩基部位のリン酸ジエステル結合に開裂が引き起こされていると推定される。

さて、生理食塩水中のccDNAには何が起きているであろうか。塩の存在はccDNAの構造を堅牢にする。高次構造のどの様な部位にオゾンは作用したのであろうか。例を図13に示す<sup>15)</sup>。すなわち、ループ構造をとりうる逆方向反復塩基配列のチミン残基、グアニン残基がオゾンと反応していた。このことはすでに述べた一本鎖部分のチミン、グアニン残基のオゾン反応性が高いことと良く一致する。鎖切断はこの他の逆方向反復塩基配列やATGおよびTTG配列のT、すなわちチミン残基位置でも生じていた<sup>15)</sup>。このようなプラスミドの超高

次構造へのオゾンの作用は、細胞内に入って来たオゾンが染色体DNAとも同じ様に反応することを示唆するものであろう。殺菌時にオゾンガスがどれくらい細胞内に入っているのか興味があるが、これについては3で述べる。

## 2. 不飽和脂肪酸、タンパク質とオゾンの反応

### 2.1. はじめに

ここでは細胞膜成分とオゾンの反応をみてみよう。細菌の膜構造はグラム陽性菌と陰性菌で違いがあるが、おおまかにいってペプチドグリカンやリポ多糖、リポタンパク質などからなる細胞壁がある。その内側に細胞質膜が存在し、これを構成するリン脂質二重層(30~40%)の中には能動輸送、呼吸、生合成などに極めて重要な働きを担う種々の酵素系すなわちタンパク質(60~70%)が存在する。リン脂質の脂肪酸不飽和度は菌によって異なる。オゾンがこの不飽和二重結合に容易に反応することはすでに「核酸とオゾンの反応」の項で述べたが、殺菌機構を知る上で細胞壁や細胞質膜構成成分の中でも大別して不飽和脂肪酸とタンパク質のオゾン反応性を知ることは重要である。

### 2.2. 不飽和脂肪酸とオゾンの反応

オゾンと生体物質との反応の研究は1950年代に始まり、この時期に不飽和脂肪酸の二重結合の開裂反応が Criegee 機構(1957)として提唱された<sup>16)</sup>。ここでは Mudd らの描く反応機構図を図14に示す<sup>17)</sup>。しかし、反応機構は反応条件にもよるし特に生体関連では複雑であるので議論は現在も続いている。例えば、Goldstein(1968)らはリノレン酸を直接オゾン酸化後、一定時間をへてフリーラジカルが生成したことをE.S.R.で確認した<sup>18)</sup>。脂質のオゾン酸化では直接的なオゾンのイオン反応によって、あるいは他のオゾン反応物から誘導されたフ

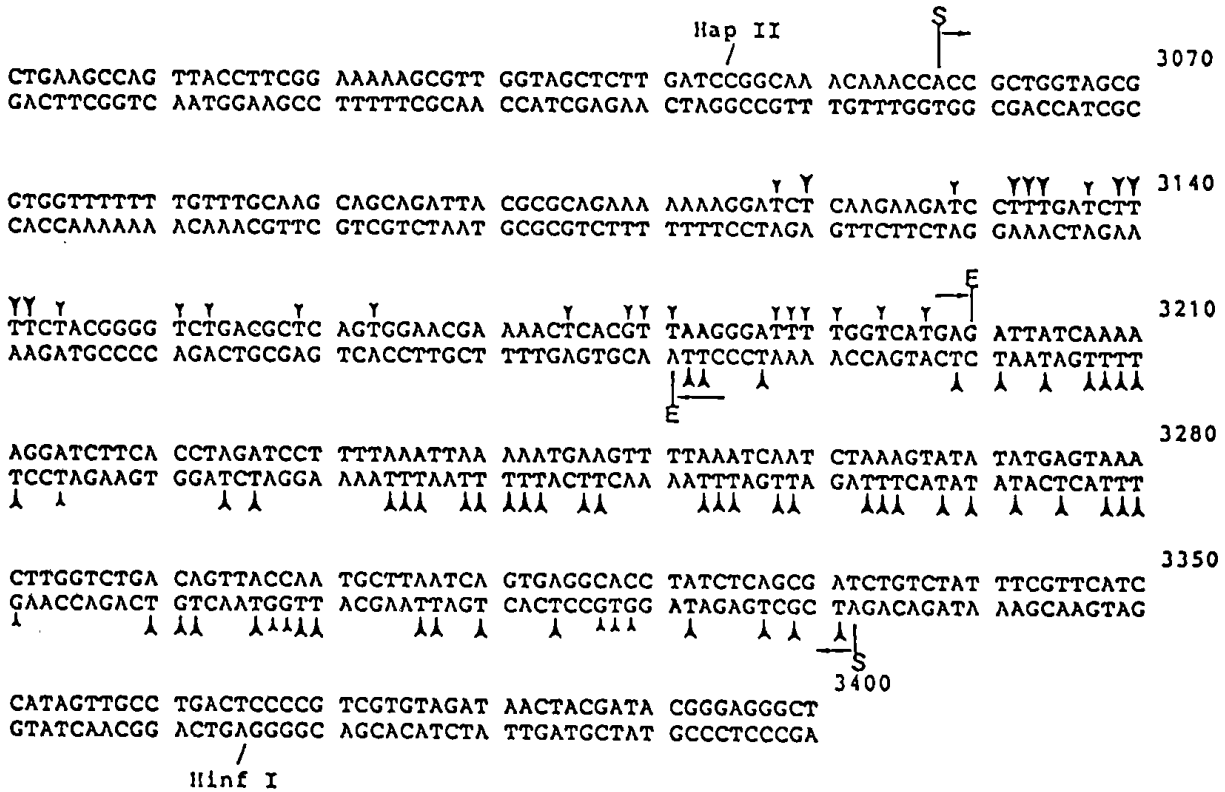


図12. プラスミド pBR322 ccDNAの水中オゾン処理で生成した ccDNAの分解塩基  
 矢印はチミンおよびグアニン残基の分解とその程度を示す。



図13. オゾンによるプラスミド pBR322 ccDNAの鎖切断の例  
 逆方向反復塩基配列の十字形構造と分解された下流側(3107~3139, 3203~ 3238bp)の塩基配列分析結果(NaCl 存在下); 矢印は分解位置とその程度を示す。

リーラジカルによって不飽和脂肪酸が破壊され、フリーラジカル生成が始まるとし、さらに連鎖反応が始まり、他の細胞組成の損傷、たとえばタンパク質との交差結合などが生ずると述べている<sup>19)</sup>。Mudd(1977)<sup>17)</sup>は脂質のオゾン反応はオゾンの直接反応であって、これが過酸化と混同されるのはマロンアルデヒドが両者の反応から共通にできるからとしている。マロンアルデヒド生成の際には過酸化水素ができるためこれが脂質の過酸化をおこすが、これは副次反応と述べている。Teige(1976)ら<sup>20)</sup>はモデルのリン脂質の二重層膜で検討し、すべての不飽和脂肪酸は酸化され対応する量の過酸化水素の生成を見出した。すなわち、オゾンでリン脂質の過酸化はおこらず、主反応が二重結合へのオゾン反応であることを示した。Pryorら(1982)<sup>21)</sup>のまとめを借用すれば、不飽和脂肪酸にオゾンを加えた時オゾンのイオン反応とその反応物から生成したフリーラジカルに端を発する自己酸化の2つの過程がおこるが、詳しくは分からないとしている。さらに細胞溶解の原因となる物質がどのようなものなのか、また、オゾンが細胞膜を侵入できる程度やオゾンが脂質の中の不飽和脂肪酸と反応できる程度は分かっていないと述べている。

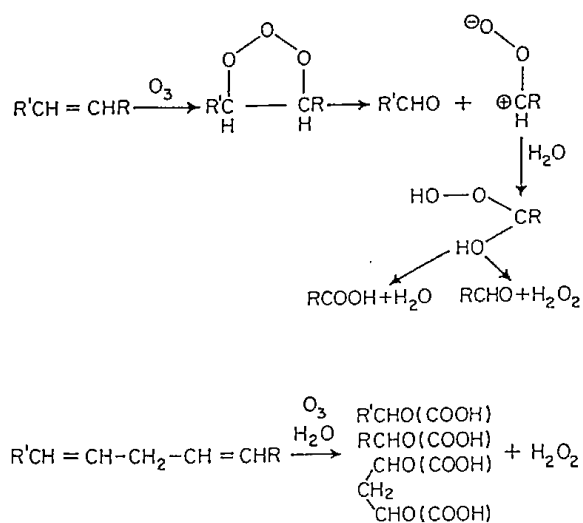


図14. 不飽和脂肪酸とオゾンの反応<sup>17)</sup>

## 2.3. タンパク質とオゾンの反応

タンパク質のオゾン反応性に関する初期の報告としてGieseら(1952)、Previeroら(1963)のものがある<sup>21)</sup>。タンパク質はアミノ酸を構成成分としているのでタンパク質とオゾンの反応という時、具体的にはその中のオゾンと易反応性のアミノ酸残基との反応を意味する。オゾンの反応様式は中性、ないしは酸性の水溶液中においてはすでに述べたようにオゾンのイオン反応性が優先するため、アミノ酸とオゾンの反応では二重結合を有する芳香族性アミノ酸や、-S-基を有するアミノ酸など、例えば、システイン、トリプトファン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、シスチンなどが高い反応速度を有している<sup>22)</sup>。図15に主たる反応生成物を、また表1に二木らがまとめたこれら化合物の反応速度定数をかかげた<sup>23)</sup>。

筆者らはタバコモザイクウイルス(TMV)のオゾンによる不活性化の研究にあたり、まず、外被タンパク質のアミノ酸組成比と同じアミノ酸混合液を作りオゾン反応性を検討した。図16に示したようにトリプトファン、チロシン、システインが優先的に分解された<sup>24)</sup>。このようなオゾン反応の優先性は「核酸とオゾンの反応」の項でも述べた。なお生体内の反応で重要な役割を果たすグルタチオン(GSH)やニ

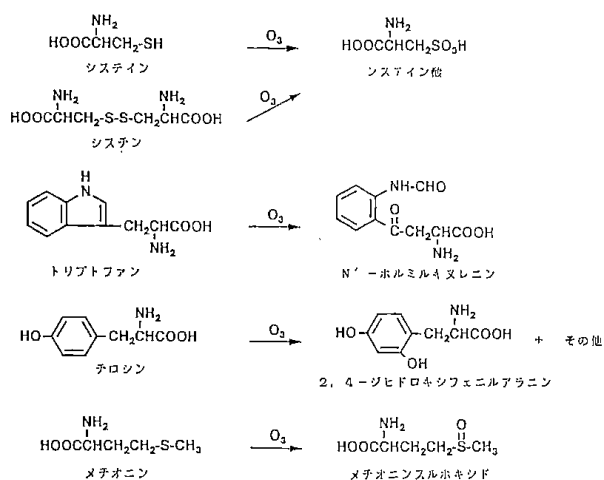


図15. アミノ酸のオゾン反応生成物

表1. オゾンと生体内物質の反応速度定数<sup>23)</sup>  
水溶液中, pH 7.0

	$k, \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$	文献
【糖】 Sucrose	0.0003	23)
【アミノ酸及びペプチド】		23)
Alanine	0.008	23)
Leucine	0.01	23)
Isoleucine	0.01	23)
Valine	0.01	23)
Glycine	0.04	23)
Threonine	0.04	23)
Serine	0.08	23)
Phenylalanine	0.27	23)
Histidine	220	23)
Methionine	400	23)
Tryptophan	700	23)
Cysteine	> 100,000	23)
Glutathione	> 100,000	23)
【オレフィン及びPUFA】		
3-Hexenoic acid	190	23)
Linoleic acid	100	24)
Methyl linoleate	110	24)
【その他】		
Ascorbic acid	6,000	3b)
$\alpha$ -Tocopherol	75	3b)
Uric acid	140	24)

表2. 大腸菌細胞質膜の酵素(系)<sup>24)</sup>

脱水素酵素	コハク酸デヒドロゲナーゼ, NADHデヒドロゲナーゼ, D-乳酸デヒドロゲナーゼ, キ酸デヒドロゲナーゼ, L- $\alpha$ -グリセロリン酸デヒドロゲナーゼ, グリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ
電子伝達系	チトクロム $b_{L, a_2, 0}$ , ユビキノン, メナキノン
エネルギー転換系	$Mg^{2+} \cdot Ca^{2+} \cdot ATPase$ ( $F_1$ -ATPase NAD-NADPH トランスヒドロゲナーゼ)
物質輸送系	各種アミノ酸キャリア, $\beta$ -ガラクトシドキャリア, Enzyme II (ホスホエノールピルビン酸ホスホトランスフェラーゼ系), $Ca^{2+}$ 輸送系, $K^+$ 輸送系, $Na^+/H^+$ antiporter.
リン脂質合成系	アシルトランスフェラーゼ, CTP:PA トランスフェラーゼ, PG 合成酵素, CL 合成酵素, PS デカルボキシラーゼ
その他	O-抗原合成酵素, UDP-グルコースヒドロラーゼ, 細胞壁合成酵素系

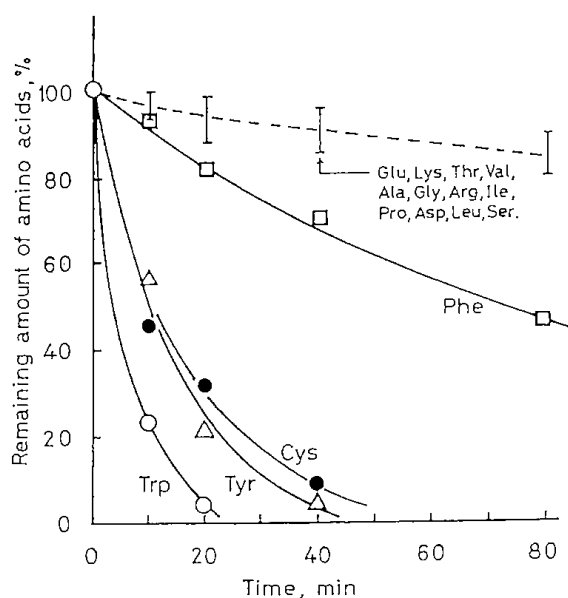


図16. アミノ酸混合物のオゾン分解  
試料濃度, 36.8 mM(pH 6.9, TMV 5 mg/ml の時のタンパク質アミノ酸量); オゾン濃度 40 mg/l のオゾン-酸素混合ガスを流速 330 ml/min で液面に吹きつけた; 2°C

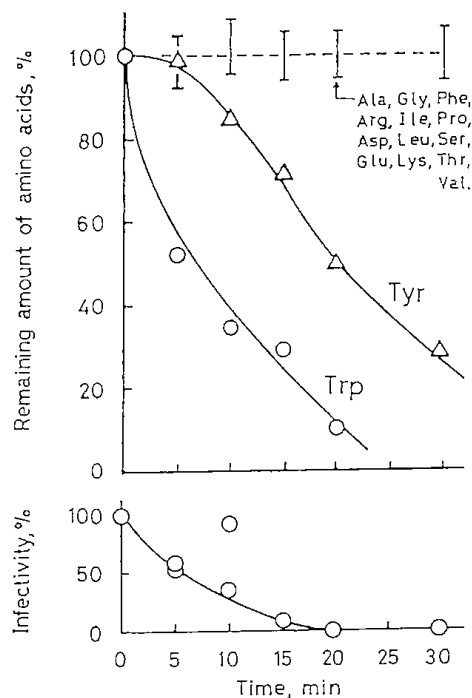


図17. タバコモザイクウイルス不活性化と外被タンパク質の分解  
試料濃度, 2.04 mg/ml (7 ml, pH 6.9); オゾン濃度 20 mg/l のオゾン-酸素混合ガスを流速 670 ml/min で液面に吹きつけた; 2°C



コチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型(NADH)についても紹介する。すなわち、NADHとトリプトファンあるいはNADHとメチオニンを混合してオゾン反応を行わせるとNADHが優先的に酸化される<sup>25)</sup>。しかし、GSHとNADHを混合するとGSHが優先されNADHがオゾンから保護されるようであるが、GSHの量が少ない場合はNADHが完全に酸化されるまでGSHのオゾン酸化はおこらない<sup>25)</sup>。オゾン反応の複雑さである。

次にTMVそのものをオゾン処理した結果を図17に示す<sup>24,26)</sup>。ここではウイルスが不活性化される時点でトリプトファン残基がほとんど消失しチロシン残基が半分になっていることが分かる。システイン残基はアミノ酸分析のためのタンパク質分解の際に失われてしまうのでこの減衰は図に示されないが、図16からみてオゾンと反応している可能性は高い。一方、他のアミノ酸は全く損傷を受けなかったことが分かる。核白内障水晶体のクリスタリンのオゾン処理ではトリプトファン残基が最も速く失われ、ついでシステイン残基が失われた。その後チロシンとヒスチジンが分解された。メチオニンの分解はこれより遅れる<sup>27)</sup>。このようにタンパク質のオゾンによる破壊は単に反応性アミノ酸の反応速度によるだけでなく、タンパク質の高次構造やその存在状態によっても異なってくる。タンパク質をオゾン分解すると反応したアミノ酸の種類によっては架橋反応が生じて高分子化する。例えば、インシュリン、グルカゴンやリボヌクレアーゼがオゾン処理で高分子化したのが、これはチロシン残基の間で0,0'-ジチロシン結合が生じたことによる<sup>28)</sup>。酵素についてはSH基を含む酵素、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GPDH)などがオゾンに最も反応しやすいとの報告がある<sup>29)</sup>。GPDHはその活性点-SH基が酸化されて活性が失われるとついで付随的に末梢の-SH基、トリプトファン残基、メチオニン残基、ヒスチジン残基の酸化が生

じた<sup>30)</sup>。さらに構造との関連の検討もすすみ、卵白リゾチームのオゾンによる不活性化はいくつかのトリプトファン残基の中、62位のトリプトファン残基がN'-ホルミルキヌレニンに酸化されることが原因と報告された<sup>31,32)</sup>。リボヌクレアーゼT<sub>1</sub>の場合も1個のトリプトファン残基がN'-ホルミルキヌレニンに変化し、この際2つの誘導酵素が生じたが、もとのリボヌクレアーゼT<sub>1</sub>そのものの活性は失われた<sup>33)</sup>。ここで注目したいことは1個の残基の破壊で活性を喪失していることである。以上、引用した例だけからでもオゾンとタンパク質の反応において、活性点SH基あるいはトリプトファン残基などの反応性が高いこと、これらの酸化の結果、活性が失われたりタンパク質の構造が変化することが分かる。殺菌においては細菌の膜が第一義的にオゾンに曝されるわけであるから、細菌の膜表面や膜中に存在する種々の役割を担った酵素などとのオゾンの反応性は殺菌機構において何らかの役割を有していると考えることができる。ちなみに細胞質膜にはどれくらいの酵素系が存在しているのかを水島らのまとめたもので表2に示す<sup>34)</sup>。

### 3. ウイルスの不活性化機構、殺菌機構

#### 3.1. はじめに

殺菌やウイルス不活性化とはもはや生存が不能となり増殖に転化できない状態であるが、それでは細菌はどのような事態で生存不能となるのであろうか。次の4つのことがあげられる<sup>35)</sup>。

1. 酵素の変性 - 菌体の代謝・合成が不可能となる
2. 細胞膜の損傷 - 細胞膜透過性の変化で細胞内よりCa<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>、RNAなどが漏洩する。
3. RNAやリボゾームの分解
4. 染色体またはその構成物質DNAの損傷

一方、ウイルスはDNAあるいはRNAとこれを包む外被(コート)タンパク質からできているが、宿主細胞への吸着、それにつづくDNAあ

るいはRNAの宿主細胞への侵入が阻害されるなら増殖は阻害される。そこで、ウイルス不活性化の要因として

1. コートタンパク質の吸着点の破壊
2. コートタンパク質の変性(脱コート不能になる)または破壊
3. DNA、RNAの損傷

などがあげられる。

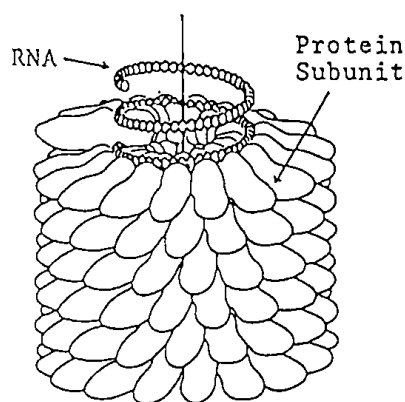
すでに遺伝子情報を担う核酸とオゾンの反応、細胞質膜を構成する不飽和脂肪酸、タンパク質とオゾンの反応を1および2で紹介してきたので、これらを念頭に置きながらウイルスの不活性化機構、殺菌機構を考えてみよう。

### 3.2. オゾンによるウイルス不活性化機構

オゾンによるウイルス不活性化の速度論的研究は比較的多く見られるようになってきたが、不活性化機構に関する研究は少ない。ウイルスの構造はDNAあるいはRNAを芯として規則正しい構造を持つタンパク質の外殻(コート)から成り立っている。コートタンパク質は一種類か、多くても二、三種類のタンパク質分子から成るサブユニットでできている。ウイルスが増殖していく過程にはいくつかの段階があり、不活性化機構の解明には、(a)タンパク質コートのオゾンによる損傷と内部の核酸との相互作用や、(b)ゲノムDNA又はRNAのオゾンによる損傷、の検討が必要となる。いずれにしてもオゾンによる不活性化機構はオゾンのタンパク質との反応、核酸との反応しかない。

筆者らはタバコモザイクウイルス(TMV)の不活性化機構を検討したのでこれについて少し詳しく述べよう。TMVは長さ300nm、直径16nmの棒状ウイルスで、中心に直径8nmの中空がある。RNAはこの中空の内壁にそって存在しておりウイルスの95%(w/w)がタンパク質である(図18)。すでに裸のTMV-RNAの失活がグアニン残基の優先的破壊に基づくことを

「核酸とオゾンの反応」の項で明らかにした<sup>12, 24)</sup>。一方、「不飽和脂肪酸、タンパク質とオゾンの反応」の項でTMV不活性化の時点ではコートタンパク質はサブユニット当たり3個のトリプトファン、4個のチロシンの5割、1個のシステインの5割が破壊されていることを述べた。同じくTMVが不活性化された時点で確率的にみて中のRNAのグアニン残基が数個破壊されていることが示唆された(図19)<sup>24)</sup>。オゾンが反応したアミノ酸残基の位置をBloomerらの示す解析図(図20)<sup>30)</sup>からみていただきたい。これらはRNAの位置から遠いコートの表面部分に位置しており、これらが不活性化に関係しているのかどうかは不明であった。またタンパク質コートに保護されたRNAがどのようにオゾンによって変成するかということも別途検討する必要がある。そこでTMVからRNAを取り出し、両端をトリチウム標識し、この標識RNAとTMVタンパク質とを再構



TMV Protein Coat

Ala	14	Lys	2
Arg	11	Phe	8
Asp	18	Pro	8
Cys	1	Ser	16
Glu	16	Thr	16
Gly	6	Tyr	4
Ile	9	Trp	3
Leu	12	Val	14
Total 158			

図18. タバコモザイクウイルスのタンパク質外被とそのサブユニットのアミノ酸組成

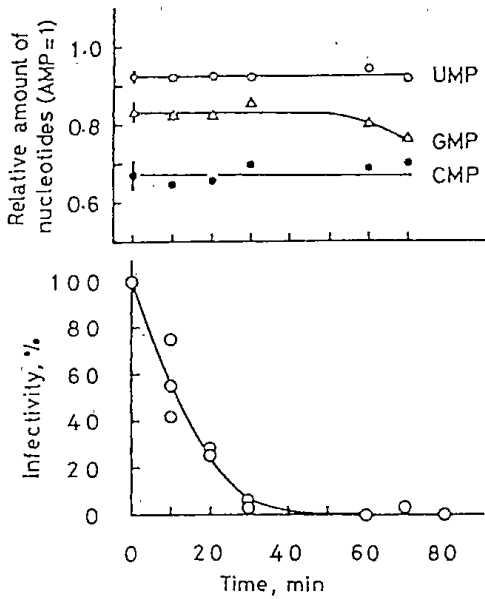


図19. タバコモザイクウイルスの不活性化と内部RNAの損傷  
 試料濃度, 10.2 mg/l(6ml, pH 6.9); 2℃; オゾン濃度40mg/lのオゾン-酸素混合ガスを流速330ml/minで液面に吹きつけた。核酸は除蛋白操作後、モノヌクレオチドとし高速液体クロマトグラフィーで定量した。

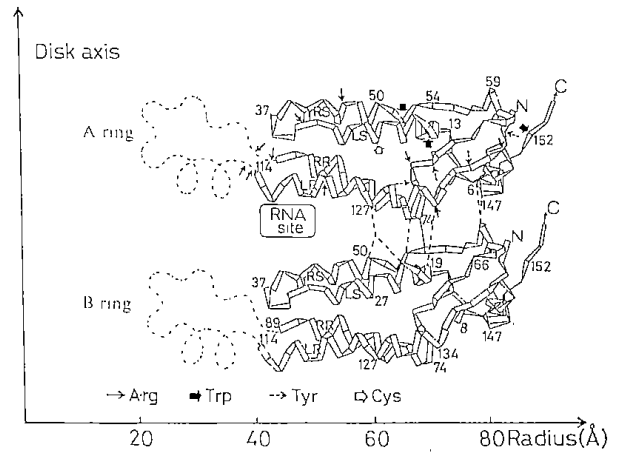


図20. タバコモザイクウイルスのタンパク質外被サブユニットの構造<sup>36)</sup>

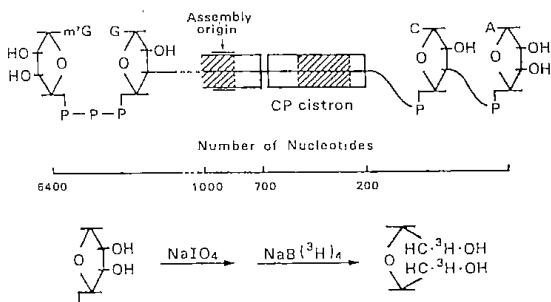


図21. タバコモザイクウイルスRNAの構造と末端のトリチウム標識

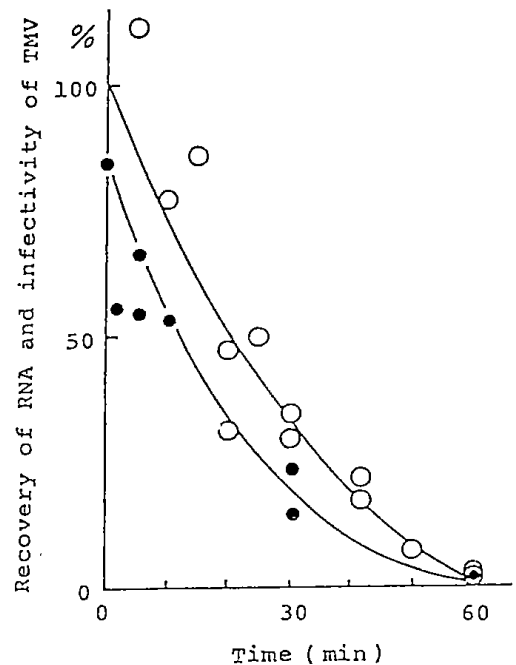


図22. オゾン処理によるタバコモザイクウイルス(TMV)の不活性化とオゾン処理されたトリチウム標識TMVからの標識RNAの抽出  
 試料量, 1 mg(0.1ml, pH 7.0); 2℃; オゾン濃度40mg/lのオゾン-酸素混合ガスを流速330 ml/minで液面に吹きつけた。  
 ○TMVの感染性; ●トリチウム標識RNAの抽出率

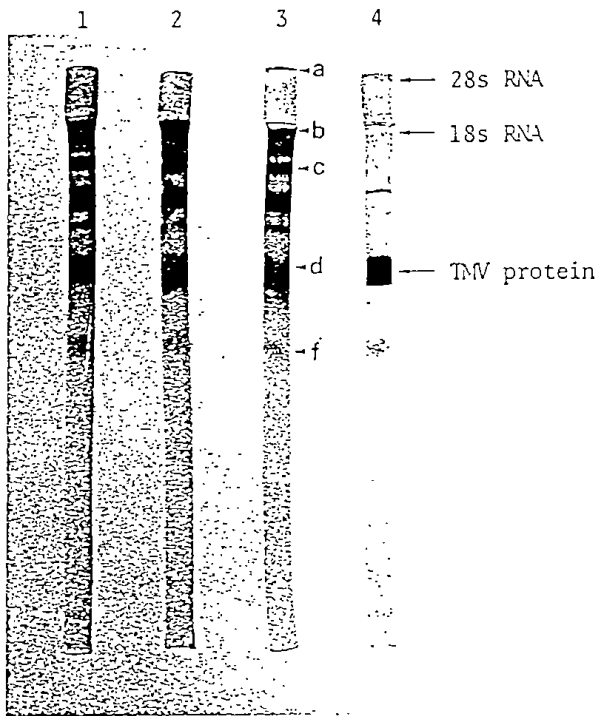


図23. オゾン処理トリチウム標識TMVのフェノール処理で得られたタンパク質の10%ポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動  
条件は図22に同じ  
1), 5分; 2), 10分; 3), 20分; 4), 標準物質

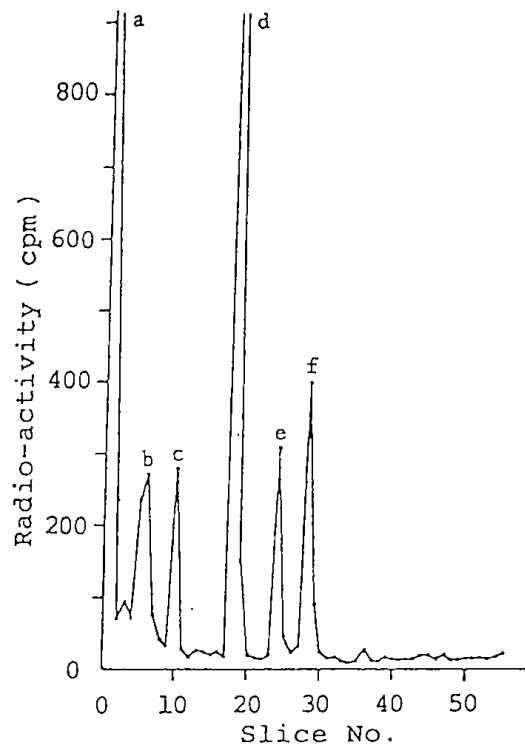


図24. 図23のディスクゲルNo.3の放射活性

成してトリチウム標識TMV(標識TMV)を作り(図21)、これを用いてオゾンによるTMVの不活性化機構の検討を行った<sup>37,38)</sup>。図22にTMVのオゾン処理による感染性の低下とオゾン処理した標識TMVからの標識RNAの抽出量(回収率)を示した。明らかに両者の間に相関性がある。一方、RNA抽出の際、除去されたコートタンパク質を含むフェノール処理廃液も明らかな放射活性を示した。変性したタンパク質をポリアクリルアミドディスクゲル電気泳動にかけたが(図23)、試料1)、2)はすべて1% SDS溶液に溶解し、これをゲルにのせている。試料3)は1% SDS溶液に半量程度溶けたが、これをゲルに載せている。この試料3)のディスクゲルをスライスし、その放射活性を測定した結果を図24に示した。放射活性を示すサブユニットタンパク質の他に、これより大きい分子量のタ

ンパク質もいくつか放射活性をしめしている。すでにサブユニットのアミノ酸が数個破壊されていたことを述べたが、破壊されたアミノ酸もまた周辺のアミノ酸と交差結合をするので<sup>39,40)</sup>、検出された放射活性のある数種のタンパク質はサブユニット同志の結合、それに破壊されたグアニン残基との交差によるトリチウム標識RNAの断片が加わって生じたものと考えられる。一方、これら破壊されたアミノ酸はコート厚さの中ほどから表面にかけて位置すること<sup>36)</sup>、さらにチロシンなどについてはなお半分は未破壊で残っていること、などからオゾンがタンパク質コートを突き抜けてRNAに達しているとは考えられない。そこで以上を総合するとTMVは、オゾンがタンパク質コートを通り抜けるより速くTMVの両端の穴から侵入するオゾンによってRNAの両端部

分のグアニン残基から損傷を受けると考えられ、このことによりRNAそのものが失活する。さらにこの損傷したグアニン残基がタンパク質アミノ酸と交差結合し、また、サブユニット同志が結合することによりタンパク質コートの脱離がしにくくなるのがTMVの不活性化機構と考えられる。

以上は筆者らの仕事であるが以下にすでにこれまでにその不活性化機構が報告されているウイルスについて簡単にふれる。

バクテリオファージ $\phi\times 174$ は主としてコートタンパク質の損傷により脱コートが不能となることが不活性化の原因であった<sup>41)</sup>。

バクテリオファージf2では、オゾン処理の進行とともにコートタンパク質がサブユニットに分解されていき、宿主への吸着が減じRNAの放出量が増大した。不活性化はコートタンパク質の損傷による宿主への吸着不能と内部のRNAの部分的な不活性化による<sup>42,43)</sup>。

T4ファージではオゾンによる分解過程が電子顕微鏡を用いて検討された。まず、尾の鞘が縮まり、頭部と尾をつなぐ結合がゆるみ、頭部がはなれ、頭部が部分的に破壊された。放出されたDNAはオゾンにより失活するがその速度はファージそのものの失活速度と同一であった。すなわち、コートタンパク質の損傷とDNAの放出が原因とされている<sup>43)</sup>。

ポリオウイルスII型のカプシドタンパク質は4種のポリペプチド鎖からなるが、 $10^{-7}$ 生存率の時にはこの各々が分解、消失した。RNAについては検討していないが、カプシドの損傷で宿主細胞への吸着が不可能となることが不活性化の原因としている<sup>44)</sup>。

オゾンにより不活性化されたポリオウイルスI型は蔗糖密度勾配法で元のウイルスと同じ密度位置に存在し、その完全さを損なわれておらずRNAの漏出はなかった。カプシドを構成する4つのペプチド鎖のうちウイルスの宿主細胞への吸着点ではない2つのペプチドが損傷していることが判明した。このことは

吸着力が目立つほど減じていなかったことを裏づけた。不活性化されたウイルスから取り出されたRNAは鎖切断が生じており主としてRNAの損傷が不活性化の原因とされている<sup>45)</sup>。

ウイルスの不活性化はすでに述べたようにタンパク質とオゾンの反応、内部に入りこんだオゾンと核酸の反応によるものであった。すでにシステイン、トリプトファン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、チミン、グアニンの反応性が高いことを紹介したが、このことが他の薬剤に耐性のウイルスでもオゾンで容易に不活性化される理由である。

### 3.3. オゾンによる殺菌機構

これまでいくつかの殺菌に関する成書<sup>46,47)</sup>やテキスト等ではオゾン殺菌機構は細胞壁、膜の酸化ひいては溶菌が主な原因であるとしている。大腸菌等の殺菌機構そのものを検討した報告はさほど多くはないが、すでにオゾン殺菌機構の考察に連がる研究の流れについては筆者なりにまとめたので<sup>2)</sup>、それを参照していただくことにして、ここでは2つの点にしばって話してみたい。1つはオゾンガスは菌体内に侵入しているのか。2つ目はオゾンで最初に破壊される所は細胞膜の不飽和脂肪酸かタンパク質かということである。

まず第1の問題であるが、筆者らはプラスミドpBR322DNAを保有する *E. coli* HB101をオゾン処理しこれからプラスミドを抽出し、閉環状プラスミド(ccDNA)が開環状プラスミド(ocDNA)になる状況をオゾン負荷量を変えて観測した<sup>48,49)</sup>。すでにオゾンによってccDNAが直ちにocDNAになることを明らかにした<sup>14)</sup>ので、これを指標にしたわけである。その機構はオゾンによるチミン、グアニン塩基の分解にもとづく二次的鎖切断であることはすでに1で述べている<sup>15)</sup>。図25にオゾン処理前と40分間オゾン処理後の大腸菌の状態を示した。40分のオゾン処理では菌は一部凝集しており99.9%が死滅していた。しかし、この時点でもプラス

(a)



(b)



図25. オゾン処理による *E. coli* HB101 の形態変化( $\times 250$ )  
 試料濃度,  $2 \times 10^8$ 個/ml(100ml, M9 培地);  $2^\circ\text{C}$ ; オゾン濃度 10mg/lのオゾン-酸素混合ガスを流速 670ml/min で液面に吹きつけた。  
 a) 未処理; b) 40分間処理

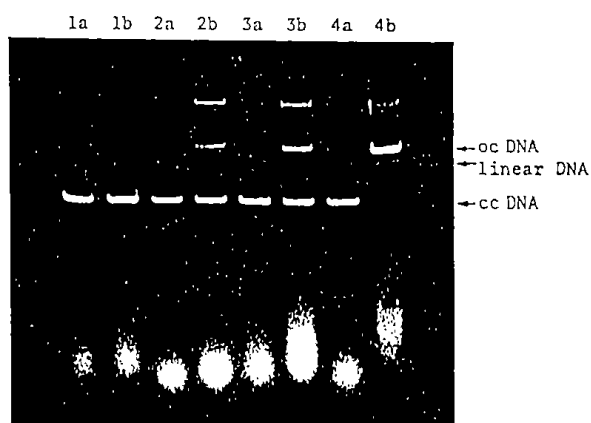


図26. *E. coli* HB101 のオゾン処理によるプラスミドpBR322 ccDNAの *in situ* 変化  
 条件は図25に同じ。粗プラスミドの1%アガロース電気泳動  
 a) コントロール  
 b) オゾン処理: 1), 10分; 2), 20分; 3), 30分; 4), 40分

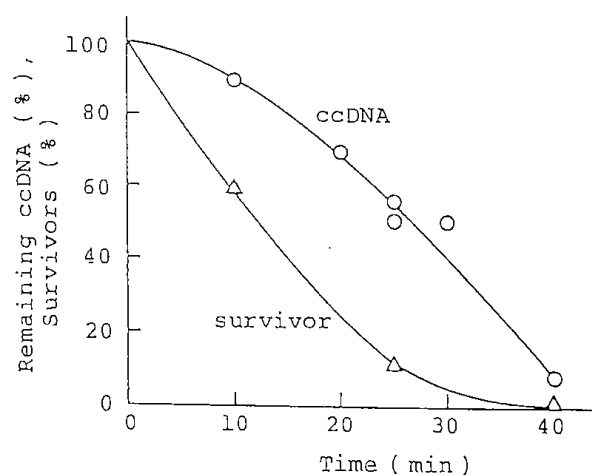


図27. オゾンによる *E. coli* HB101 の殺菌と内在プラスミド pBR322 ccDNAの消失  
 条件は図25に同じ

ミドの抽出操作は未処理の大腸菌からの抽出と全く同じ状況で行うことが出来たので、細胞壁、膜には溶菌にいたるような損傷はないと考えられる。抽出された粗プラスミドの1%アガロース電気泳動の結果を図26に示す。オゾン未処理、処理のa、bは必ず同一培養バルクから得た大腸菌を用いた。1~4はオゾン処理時間が10、20、30、40分のものである。aとbの比較でオゾン処理時間の増加でccDNAからocDNAへの転化量が増加していることが分かる。また直線状DNAも増加している。オゾン処理40分ではccDNAのバンドはかすかになり、ocDNAが主バンドになっている。またocDNAよりゆっくり移動するバンドもオゾン処理時間とともに増加しスミアーになっていくことが見いだされる。これら粗プラスミドを TOYOPEARL HW75 S を用いるカラムクロマトグラフィーで分離精製を行い、ccDNAおよびocDNAなどの各々のピーク面積よりccDNAのocDNAなどへの転化率を求めた。図27にccDNAの残存率と大腸菌の生残率を示した。大腸菌のほとんどが殺菌された40分の時点でのccDNAの開環率は91.5%に達していた。しかし、ccDNAの転化は大腸菌の殺菌より時間的に遅れを生じていた。この原因としてオゾン浸透に対する細胞膜の抵抗や、オゾンと反応しやすい細胞質によるオゾンの消費が挙げられよう。しかしプラスミドDNAが細胞内に浸透してくるオゾンによって損傷を受け時間とともに損傷プラスミドが増加していく事実から、プラスミドよりはるかに大きく、かつ菌体の大部分を占める染色体DNAのオゾンによる損傷が当然考えられる。

次に膜を構成している脂質やタンパク質のオゾンによる変化を検討した研究を紹介する。これらは主として赤血球について行われた実験であるが、オゾンの作用で脂質の各種過酸化物が作り出され<sup>40,50,51</sup>、膜タンパク質のトリプトファンが反応し、タンパク質分子間でクロスリンクが生じ<sup>40,52,53</sup>、 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPアーゼ<sup>54,55</sup>や

アセチルコリンエステラーゼ<sup>56</sup>、アルカリ性フォスファターゼ<sup>53</sup>、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ<sup>56,57</sup>などの酵素活性が低下することが明らかにされた。酵素の活性低下については、酵素そのものの破壊による場合と膜環境の変化による分子間相互作用の変化で活性構造がとれなくなる場合とが考えられる。これまでの歴史的経過で報文相互の矛盾点は生体膜の最初にオゾンの攻撃をうける所がタンパク質なのか脂質なのかということであるとKonev(1982)は指摘した<sup>40</sup>。Konevは酵母 *Candida utilis* と細菌 *Erwinia carotovora* の細胞質膜をオゾン処理して膜の脂質の過酸化物とマロンジアルデヒドの蓄積速度を検討し、両者が異なる出発物質から得られたもので独立の反応過程の結果と推定している。また、タンパク質の高分子化が脂質の酸化の進行状況と相関することも見出した。結局、上記に述べた命題の解明には及ばなかった<sup>40</sup>。さらにKonevは次のことも報告している。菌を致死させるオゾン量で推定した *Erw. carotovora* のオゾン耐性は *C. utilis* のそれに比し2.5倍であったが、事実、同じオゾン量の処理で得られる *Erw. carotovora* の細胞質膜のチオバルビツール酸と反応する生成物の量は *C. utilis* のその50分の1、同じく生成過酸化水素量は2分の1というように *Erw. carotovora* の膜のオゾンによる酸化過程のおくれと耐性の相対的強さとが一致していた<sup>40</sup>。さて、Konev(1989)はオゾンの最初の攻撃がタンパク質か脂質かの命題を解決するに当り、実験系において完全無傷細胞をそのまま膜構造の損傷の検討に用いたか、単離した細胞質膜を用いたかによっても結果は著しく異なることを見出した。すなわち、後者においては膜の構造や抗酸化防御系が前者より著しく異なってくるからである<sup>58</sup>。以下に最近のKonevの研究を紹介する。図28は *E. coli* k-12B 細胞のプロトプラストにオゾンを作用させ、膜の種々のパラメーターについて対称群との比を縦軸に、

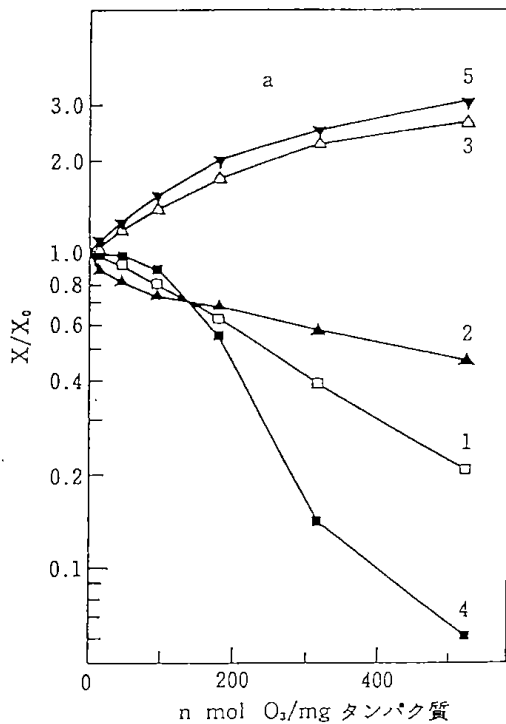


図28. *E. coli* K-12Bのプロトプラストのオゾンによる変化<sup>59)</sup>  
 1), トリプトファン; 2), SH基; 3), 脂質の蛍光性酸化物; 4), 呼吸活性; 5), 界面活性剤安定性

横軸に  $n \text{ mol O}_3 / \text{タンパク質 } 1 \text{ mg}$  (プロトプラスト懸濁液中のタンパク質濃度は  $3.8 \text{ mg/ml}$ ) の値をとったものである。図から、トリプトファンの減少(1)、SH基の減少(2)、脂質の蛍光性酸化物の増加(3)、呼吸機能の減少(4)、界面活性剤に対する安定性すなわち膜変性の増加(5)、が明らかである。脂質の酸化カーブの傾斜がゆるやかになるのに対し、トリプトファン、SH基は減少をたどり、呼吸活性も減少することから、確たる証拠ではないがとしつつも細胞死の原因は主としてオゾンと膜タンパク質との反応ではないかと述べている<sup>59)</sup>。さらに、*Candida utilis* について完全細胞(1)、そのプロトプラスト(2)、単離細胞質膜(3)、単離細胞質膜にミトコンドリアを加えたもの(4)、についてオゾン処理を行った(図29)。負荷オゾン量は  $2 \mu \text{ mol/min}$  である。左図はチオバルビツール酸反応活性物質質量、右図は呼吸活性を示したものである。脂質の酸化は単離した膜では著しく高い。一方、細胞やそのプロトプラストでは酸化量は低いにもかかわらず、これらの呼吸活性は10分で殆ど喪失していた。こ

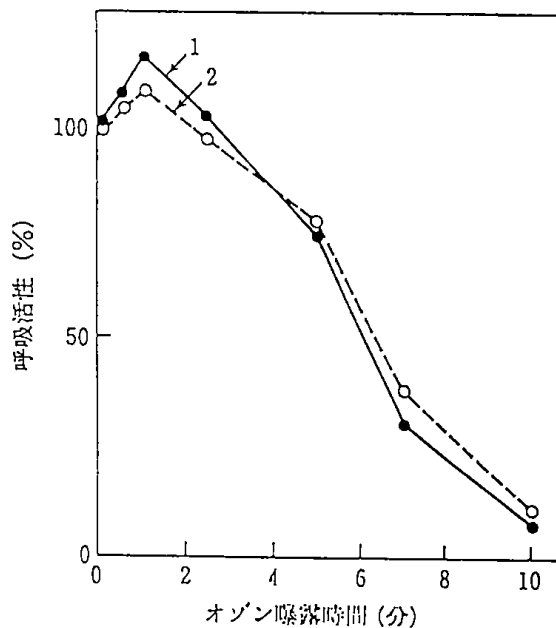
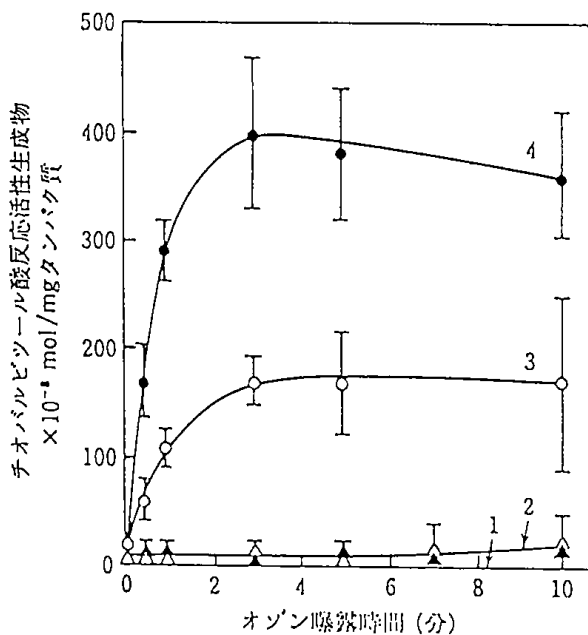


図29. *Candida utilis* 細胞のオゾンによる損傷<sup>59)</sup>  
 オゾン濃度,  $2 \mu \text{ mol/min}$   
 1), *C. utilis* 完全細胞; 2), そのプロトプラスト; 3), 単離細胞質膜; 4), 3 + ミトコンドリア



の論文では、結論として

1. 細胞機能の破壊は脂質の過酸化が重要なプロセスではなく
2. 細胞膜系の抗酸化防御系の喪失
3. 細胞質膜のイオン運搬特異的タンパク質錯体の選択的不活性化

によると述べている<sup>58)</sup>。

以上、オゾンによる殺菌機構についておおよその輪郭を紹介した。しかし、微生物はそれぞれが特徴ある膜構成物質を有しそれにより外界に対し特徴ある感受性を有しているわけであるから、オゾンとの反応1つをとってみても一律に論じることが出来ない。オゾンが細胞と接触して最初に反応する物質は膜物質であることは事実であるが、膜の損傷のみで殺菌が完了するとは断定できない。オゾンはオゾンと易反応性の官能基を求めて表面から中へと侵入していく過程で細菌を死にいたらしめる。反応速度の速さから見ればKonevの示すようにまずタンパク質のオゾン易反応性の特定の残基への攻撃であるということは理解できる。薬剤殺菌は生体の持つ多数の機能の中の特定の機能の阻害であり、必要以上の薬剤量は殺菌にとっては何の有効性もない。一方、オゾン殺菌機構はマルチポイントの攻撃であり、過剰に投じられたオゾンは死んでしまった菌体をなおも破壊しつづける。したがってオゾン殺菌は死に至る機能破壊とそれに上乗せされた破壊との混在であろう。

## 謝辞

本稿において筆者らの研究としていくつか論文を引用させて戴いたが、これらは主として当所池畑昭氏(故)、石崎紘三氏、また、北海道大学薬学部(当時)上田亨氏(故)、三浦一伸氏、澤田石一之氏との共同研究として行われたものです。ここに深謝の意を表します。

## 参考文献

- 1) 神力就子, 石崎紘三, 横田裕司, 池畑昭: オゾンによる核酸の分解に関する研究, 北海道工業開発試験所報告, 第40号(1986).
- 2) 神力就子: 「オゾンによる細菌、ウイルスの不活性化機構」, 新版オゾン利用の新技术, 三秀書房, 東京, 1993, pp.91-109.
- 3) Christensen E. and Giese A.C.: Changes in Absorption spectra of nucleic acids and their derivatives following to ozone and ultraviolet radiations, *Arch. Biochem. Biophys.*, **51**, 208-216 (1954).
- 4) 大村浩久, 堤 将和, 有吉浩一, 石北隆一, 諸岡正敏: オゾン処理による塩基、ヌクレオシド及びヌクレオチドの吸収スペクトルの変動, 九大農芸誌, **27**, 211-220 (1973).
- 5) Scott D.B.M.: The effect of ozone on nucleic acids and thier derivatives, "Aquatic Applications of Ozone" ed. by Blogoslawski W.I. and Rice R.G., International Ozone Institute, New York, 1975, pp.1-15.
- 6) Ishizaki K., Shinriki N. and Ueda T.: Degradation of nucleic acids with ozone. V. Mechanism of action of ozone on deoxyribonucleoside 5'-monophosphates, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3601-3606 (1984).
- 7) Kolonko K.J., Shapiro R.H., Barkley R.M. and Sivers R.E.: Ozonation of caffeine in aqueous solution, *J. Org. Chem.*, **44**, 3769-3778 (1979).
- 8) Matsui M., Shibata K. and Muramatsu H.: Ozonolyses of cytosines and guanine, *J. Org. Chem.*, **56**, 4987-4990 (1991).
- 9) Ishizaki K., Shinriki N., Ikehata A. and Ueda T.: Degradation of nucleic acids with ozone. I. Degradation of nucleobases, ribonucleosides and ribonucleoside 5'-

- monophosphates, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 868-872 (1981).
- 10) Miura K., Ueda T., Shinriki N., Ishizaki K. and Harada F. : Degradation of nucleic acids with ozone. IV. Specific internucleotidic bond-cleavage of ozone-treated transfer ribonucleic acids with aniline-acetate, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 651-657 (1984).
  - 11) Shinriki N., Ishizaki K., Miura K., Ueda T. and Harada F. : Degradation of nucleic acids with ozone. III. Mode of ozone-degradation of mouse proline transfer ribonucleic acids(tRNA) and isoleucine tRNA, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3601-3608 (1983).
  - 12) Shinriki N., Ishizaki K., Ikehata A., Yoshizaki T., Nomura A., Miura K. and Mizuno Y. : Degradation of nucleic acids with ozone. II. Degradation of yeast RNA, yeast phenylalanine tRNA and tobacco mosaic virus RNA, *Biochem. Biophys. Acta*, **655**, 323-328 (1981).
  - 13) Shinriki N., Ishizaki K., Sato S., Miura K., Sawadaishi K. and Ueda T. : Degradation of nucleic acids with ozone. VI. Labilization of the double-helical structure of calfthymus deoxyribonucleic acid, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 3636-3640 (1984).
  - 14) Sawadaishi K., Miura K., Ohtsuka E., Ueda T., Ishizaki K. and Shinriki N. : Ozonolysis of supercoiled pBR322 DNA resulting in strand scission to open circular DNA, *Nucleic Acids Res.*, **13**, 7183-7194 (1985).
  - 15) idem : Structure- and sequence-specificity of ozone degradation of supercoiled plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, **14**, 1159-1169 (1986).
  - 16) Baily P.S. : Organic groupings reactive toward ozone — Mechanism in aqueous media, "Ozone in Water and Wastewater Treatment", ed. by Evans III F.L., Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1972, p.32.
  - 17) Mudd J.B. and Freeman A. : Reaction of ozone with biological membranes, "Biochemical Effect of Environmental Pollutants", Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, 1977, pp.97-133.
  - 18) Goldstein B.D., Balchum O.J., Demopoulos H.B. and Duke P.S. : Electron paramagnetic resonance spectroscopy — Free radical signals associated with ozonization of linoleic acid, *Arch. Environ. Health*, **17**, 46-49 (1968).
  - 19) Goldstein B.D., Lodi C., Collinson C. and Balchum O.J. : Ozone and lipid peroxidation, *Arch. Environ. Health*, **18**, 631-635 (1969).
  - 20) Teige B., McManus T.T. and Mudd J.B. : Reaction of ozone with phosphatidylcholine liposomes and the lytic effect of products on red blood cells, *Chem. Phys. Lipids*, **12**, 153-171 (1976).
  - 21) Pryor W.A., Dooley M.M. and Church D.F. : Mechanisms for the reaction of ozone with biological molecule, "Adv. Mod. Environ. Toxicol." ed. by Mustafa M.G. and Mehlman M.A., Ann Arbor Press, Ann Arbor, 1982, pp.7-19.
  - 22) Mudd J.B., Leavitt R., Ongun A. and McManus T.T. : Reaction of ozone with amino acids and proteins, *Atomos. Environ.*, **3**, 669-682 (1969).
  - 23) 二木鋭雄, 大戸範雄 : オゾンによる酸化反応, 「オゾン利用の理論と実際」、リアライズ社, 東京, 1989, pp.271-292.
  - 24) 神力就子, 石崎紘三, 池畑昭 : オゾンによるウイルスの不活性化, 北海道工業開発試験所報告, 第29号, 92-101 (1983).
  - 25) Mudd J.B., Leh F. and McManus T.T. : Reaction of ozone with nicotinamide and its

- derivatives, *Arch. Biochem. Biophys.*, **161**, 408-419 (1974).
- 26) Shinriki N., Ishizaki K., Yoshizaki T., Miura K. and Ueda T.: Mechanism of inactivation of tobacco mosaic virus with ozone, *Wat. Res.*, **22**, 933-938 (1989)
- 27) 横澤泉, 兼久呈子, 松田久美子, 渡辺真理子, 木村正巳: 核白内水晶体におよぼすオゾンの影響 - クリスタリンを構成するアミノ酸残基の被酸化性について, *日眼会誌*, **89**, 354-357 (1985).
- 28) Verweij H., Christianse K. and Van Steveninck J.: Ozone-induced formation of 0,0'-dityrosine cross-links in proteins, *Biochem. Biophys. Acta*, **701**, 180-184 (1982).
- 29) Menzel D.B.: Oxidation of biologically active reducing substances by ozone, *Arch. Environ. Health*, **23**, 149-153 (1971).
- 30) Knight K.L. and Mudd J.B.: The reaction of ozone with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **229**, 259-269 (1984).
- 31) Kuroda M., Sakiyama F. and Narita K.: Oxidation of tryptophan in lysozyme by ozone in aqueous solution, *J. Biochem.*, **78**, 641-651 (1975).
- 32) Sakiyama F. and Natsuki R.: Identification of tryptophan 62 as an ozonization-sensitive residue in hen egg-white lysozyme, *J. Biochem.*, **79**, 225-228 (1976).
- 33) Tamaoki H., Sakiyama F. and Narita K.: Chemical modification of ribonuclease T<sub>1</sub> with ozone, *J. Biochem.*, **83**, 771-781 (1978).
- 34) 水島昭二, 三浦謹一郎編「細菌の解剖」, 講談社, 東京, 1989, p.42.
- 35) 米虫節夫: 滅菌・消毒に関連する微生物とその生と死の考え方, “滅菌法・消毒法第I集” 第2版, 日本医科器械学会監修, 綿貫喆, 実川佐太郎, 榊原欣作編集, 文光堂, 東京, 1981, pp.45-66.
- 36) Bloomer A.C., Champness J.N., Bricogne G., Staden R. and Klug A.: Protein disk of tobacco mosaic virus at 2.8 resolution showing the interactions within and between subunits, *Nature*, **276**, 362-368 (1978).
- 37) Shinriki N., Ishizaki K., Miura K., Ueda T., Harada F. and Yoshizaki T.: Mode of ozone-degradation of tRNAs and inactivation of tobacco mosaic virus with ozone, *Proceedings of Symposium "Ozone and Biology"*, International Ozone Association, Rennes, April, 1984.
- 38) Shinriki N., Ishizaki K., Yoshizaki T., Miura K. and Ueda T.: Mechanism of inactivation of tobacco mosaic virus with ozone, *Wat. Res.*, **22**, 933-938 (1988).
- 39) Verweij H., Christianse K. and Van Steveninck J.: Ozone-induced formation of 0,0'-dityrosine cross-links in proteins, *Biochem. Biophys. Acta*, **701**, 180-184 (1982).
- 40) Konev S.V., Kaler R.V., Matus V.K. and Yakubouski S.M.: Peroxidative oxidation of lipids and the intermolecular crosslinking in yeast and bacterial membranes in the presence of ozone, *Vesti Akad. Navuk BSSR, Ser. Biyal. Navuk*, 1982 (2), 54-58.
- 41) De Mik G. and De Groot I.: Mechanisms of inactivation of bacteriophage  $\phi$  x174 and its DNA in aerosols by ozone and ozonized cyclohexene, *J. Hyg., Camb.*, **78**, 199-211 (1977).
- 42) Kim C.K., Gentile D.M. and Sproul O.J.: Mechanism of ozone inactivation of bacteriophage f2, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 210-218 (1980).
- 43) Sproul O.J., Pfister R.M. and Kim C.K.: The mechanism of ozone inactivation of water borne viruses, *Wat. Sci. Tech.*, **14**, 303-314 (1982).

- 44) Riesser V.W., Perrich J.R., Silver B.B. and McCammon J.R. : Possible mechanisms of poliovirus inactivation by ozone, "Forum on Ozone Disinfection " ed. by Fochtman E.G., Rice R.G. and Browing M.E., International Ozone Institute, New York, 1977, pp.186-192.
- 45) Roy D., Wong P.K.Y., Engelbrecht R.S. and Chian E.S.K. : Mechanism of enteroviral inactivation by ozone, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 718-723 (1981).
- 46) 芝崎勲 : 薬剤による殺菌, "滅菌法・消毒法第 I 集" 第 2 版, 日本医科器械学会監修, 綿貫詰, 実川佐太郎, 榊原欣作編集, 文光堂, 東京, 1981, p.182.
- 47) 大垣真一郎, 関谷毅史 : オゾンによる消毒効果, 水質汚濁研究, **13**, p.802 (1990).
- 48) Shinriki N., Ishizaki K., Takahashi Y., Sawadaishi K. and Miura K. : Sterilization of *Escherichia coli* and degradation of its plasmid DNA with ozone, *Proceedings of 7th Ozone World Congress*, International Ozone Association, Tokyo, September, 1985, pp.218-223.
- 49) Ishizaki K., Sawadaishi K., Miura K. and Shinriki N. : Effect of ozone on plasmid DNA of *Escherichia coli* in situ, *Wat. Res.*, **21**, 823-827 (1987).
- 50) Goldstein B.D., Lodi C., Collinson C. and Balchum O.J. : Ozone and lipid peroxidation, *Arch. Environ. Health*, **18**, 631-635 (1969).
- 51) Goldstein B.D. and Balchum O.S. : Effect of ozone on lipid peroxidation in the red blood cell, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**, 356-358 (1967)
- 52) Verweij H. and Van Steveninck J. : Effect of ozone on erythrocyte membrane proteins, *Chemosphere*, **8**, 443-448 (1979).
- 53) Matus V.K., Mel'nikova A.M., Okun I.M., Slobozhanina I.M. and Konev S.V. : Structure-modifying action of ozone on plasmatic membranes, *Vesti Akad. Navuk BSSR, Ser. Biyal. Navuk*, 1980 (1), 125-128.
- 54) Chan P.H., Kindya R.J. and Kesner L. : Studies on the mechanism of ozone inactivation of erythrocyte membrane (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-activated ATPase, *J. Biol. Chem.*, **252**, 8537-8541 (1977).
- 55) Kesner L., Kindya R.J. and Chan P.C. : Inhibition of erythrocyte membrane (Na<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-activated ATPase by ozone, *J. Biol. Chem.*, **254**, 2705-2709 (1979).
- 56) Freeman B.A., Miller B.E. and Mudd J.B. : Reaction of ozone with human erythrocytes, Chapter 9 in "Assessing Toxic Effects of Environmental Pollutants", ed. Lee S.D. and Mudd J.B., Ann Arbor Science Publishers, 1979, pp.151-171.
- 57) Verweij H. and Van Steveninck J. : Effects of semicarbazide on oxidative processes in human red blood cell membranes, *Biochem. Biophys. Acta*, **602**, 591-599 (1980).
- 58) Matus V.K., Martynova M.A., Mel'nikova A.M. and Konev S.V. : Absence of direct relation between damage to *Candida utilis* cells and the peroxidation of lipids under the effect of ozone, *Dokl. Akad. Navuk BSSR*, **33**, 277-279 (1989).
- 59) Matus V.K., Kaler G.V., Mel'nikova A.M. and Konev S.V. : Protein damage under ozone treatment of protoplasts and isolated membranes of *E.coli*, *Biophysica (Moscow)*, **32**, 477-481 (1987).

## Disinfection Mechanism with Ozone

Nariko Shinriki

The inactivation mechanism of bacteria and viruses with ozone was discussed by reviewing 59 references. The guanine moiety of RNA and the thymine moiety of DNA were first attacked by ozone, and ozonolysis of only a few bases caused RNA or DNA to lose their functions. In the case of proteins, any amino acid moiety such as cysteine, tryptophan, methionine, tyrosine, histidine and cystine was preferentially degraded by ozone according to the structure of the protein molecule, resulting in the loss of its function. The reaction rates with ozone were usually in the order of cysteine, glutathione, NADH > tryptophan, methionine, histidine > olefine, PUFA, guanine and thymine. As a result, viruses are inactivated by ozone attack on the reactive amino acids of capsids and/ or on the guanine or thymine moieties of RNA or DNA. The inactivation of bacteria is supposed to be caused first of all by the selective inactivation of specialized protein complexes in the cell membrane.

※5.10.1 所名変更

---

北海道工業技術研究所報告

第 61 号

平成6年3月31日 印刷

平成6年3月31日 発行

発 行 所 工業技術院北海道工業技術研究所  
札幌市豊平区月寒東2条17丁目2番1号

電 話 011 (857) 8400

印 刷 所 東 日 本 印 刷 株 式 会 社  
札幌市中央区南6条西17丁目

電 話 011 (551) 1120

---

**REPORTS OF  
HOKKAIDO NATIONAL INDUSTRIAL  
RESEARCH INSTITUTE**

No61 March 1994

---

**Contents**

- Computer Simulations of Heat Transfer in Soil for  
Ground-Source Heat Pumps .....(1)**  
Munehiro Yamaguchi, Sogo Sayama, Hirokazu Yoneda  
Svein Grandum, Per Arne Schiefloe, Marit Sandbakk  
and Per-Erling Frivik
- Disinfection Mechanism with Ozone .....(15)**  
Nariko Shimriki

---

Published by

Hokkaido National Industrial Research Institute  
2-17 Tsukisamu-Higasi, Toyohira-ku, Sapporo 062, Japan