

BCA 法を用いた布帛上の
タンパク質の直接定量に関する研究

Study on the Direct Determination of Protein
on the fabric by the BCA method

2023 年 10 月

文化学園大学大学院

生活環境学研究科

塚崎 舞

Mai Tsukazaki

Study on the Direct Determination of Protein on the fabric by the BCA method

Abstract

The typical classification of soil adhering to clothes includes water-soluble, greasy soil, particle dirt and protein soil. Protein soil includes colored colorless, and especially colorless soil. There is a recommended posed by the visual determination of the extent of adherence of types of soil to the fabric. Storing clothes with residual protein soils causes problems such as the formation of colored stains and malodor because of microorganisms which attach to the fabric as a nutrient source, and the process of oxidation. For such protein-rich soils, quantitative analysis methods are widely used to determine the amount of protein which adhere to fabric in the study of apparel cleaning. Additionally, it is necessary to separate and extract the protein from the fabric, use them as liquid samples for measurement, which is a time-consuming and complex technique. Furthermore, the extraction process has a disadvantage in that the results tend to vary by depending on the experimenter. For example, the following two methods have been investigated as simple protein determination methods: one is to prepare a contaminated cloth using hemoglobin, a colored protein, and quantify the protein in units of mass and washing efficiency by measuring reflectance; the other method is to directly react a color reaction reagent using bicinchoninic acid (BCA) on protein-contaminated filter paper and quantify it by measuring reflectance. To date, no study has reported quantitative methods for colorless proteins using fabric as a substrate.

This study aimed to develop a novel method for directly determining proteins adhering to fabric by measuring the reflectance of the BCA method color reaction. It also, investigated the effect of the type of protein and fabric used as the substrate as possible factors influencing this determination method. Additionally, for application to cleaning research, it examined the effect of surfactants and enzymes contained in laundry detergents and fatty acids compounded as sebum soil which coexist in this determination method.

The results are as follows:

(1) The protein soil direct determination method was developed by measuring the reflectance on fabric using the BCA method. Bovine serum albumin was used as the protein, and white cotton fabric was used as the test swatch. The actual protein soil condition was assumed. The protein solution was added to the fabric and the effects of aging time, air contact of reaction (conditions container method and sheet method), amount of reagents liquid, reaction time, and temperature were examined. When the aging time exceeded about 10 days, the protein

solution reflectance was slightly affected. It was determined that the protein reagent was added at the time of the experiment. The sheet method showed no effect of air contact on the BCA reaction, and the protein amount was expressed in terms of the reflectance with high sensitivity. The calibration curve of the sheet method for albumin with K/S values calculated from reflectance had a high correlation coefficient in the range 0.96 to 14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ($R^2=0.9974$), and the slope was higher to that of the container method. It was discovered that the sheet method is suitable for the direct determination of proteins. The experimental condition of the sheet method with high quantitative performance was determined as follows: 50 μL water for moisture, 30 μL protein reagent and 0.1mL reagent C for BCA method, added onto 2.5cm \times 2.5cm test swatch, and the reaction observed at 25 $^\circ\text{C}$ for 30 minutes.

(2) The effect of the protein type adhering to the fabric on the reflectance and quantitative performance was investigated. For the protein-containing soil which adhered to clothes, casein, gelatin, and keratin were selected in addition to bovine serum albumin, and the protein reagent was prepared as a solution or dispersion. The relationship between the protein amount and reflectance or K/S value by BCA color reaction using the sheet method was examined. It was observed that the amino acid composition of the protein, albumin, and keratin with cysteine and cystine groups that are susceptible to the BCA reaction had lower reflectance compared with other proteins with simultaneous, high quantitative performance. In contrast, gelatin showed a slightly bluish color compared to other proteins, and because of the absence of amino acid groups such as cysteine, its reflectance became relatively high while quantitative performance was low. These results agreed with the original publication on the BCA reaction. Therefore, it was determined that the type of amino acid in the protein had an impact on the determination method.

(3) The effect of weave and fiber material of the fabric that was used to adhere protein on reflectance and quantitative performance was investigated. Cotton canequim was used as the reference fabric. Six types of cotton fabric, with different weaves and thickness (plain weave of two types, percale, twill, and satin) and eight different fiber materials (linen, cuprammonium rayon, diacetate, polyester, nylon, T/C, wool, and silk) of plain weave were used as the test swatches. To determine the optical characteristics of the test swatch in the moistened state, the reflectance was measured using a dripped purple dye solution. It was found that the reflectance only increased by a small degree, but no significant effect was observed on the surface structure. In contrast, wool and silk, protein fiber, and cuprammonium rayon suspected to have residual copper ions, were reacted with reagent C in the BCA method. Those fabrics were not suitable for this determination method. In addition,

one type of plain cotton weave presented a significant decrease in reflectance owing to the attached fiber processing agents, and quantitative performance observed to decrease. Cotton fiber fabrics and blended fabrics were found to be highly quantitative while, the other fabrics showed good quantitative performance, although their reflectance was lower than that of cotton. It was discovered that the degree of wetting or bleeding of the reagent solution, that is, the retention of the reagent on the fabric, was a factor affecting the quantitative performance. As a result of the effects of the fabric properties, it was also found that the determination method required the preparation of a calibration curve using the same fabric as the test swatch.

(4) For the application of the determination method to cleaning research and clarify the effect of the coexistence of surfactants and enzymes contained in detergent components on the white cotton fabric, the effect on reagent C and quantitative performance were examined by adding coexisting substance reagent similar to water in the standard method. Three types of anionic surfactants, one nonionic surfactant, six sodium fatty acids were selected, and protease was used as the enzyme. To determine the concentrations of coexisting substance reagents, the condition was assumed to be a washing environment with a 1:15 bath ratio followed by a single rinse. Therefore, the concentrations of the 10 surfactants were determined to be 1/16th of the critical micelle concentration of each other, and the concentrations of protease used were 0.001%, 0.01%, 0.1%, and 1% (v/v), and coexisted with the BCA reaction. It was found that the surfactant had no effect on reagent C at the concentrations of the coexisting substance reagents, and protease had no difficulty when the adhesion amount was less than 0.93 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. The reflectance of albumin, in the presence of six surfactant reagents or 0.01% (v/v) protease, was measured, and relative values were calculated based on the reflectance of the albumin reagent alone as standard value 1.00. It was revealed that the results were dependent on the type of coexisting substance. Sodium dodecyl sulfate (SDS), blanching dodecyl benzenesulfonate (ABS) and sodium linear dodecyl benzenesulfonate (LAS), showed higher reflectance than albumin alone, resulting in higher relative values. SDS is known to adsorb metal ions strongly and it is considered that these anionic surfactants bind copper (II) ions in reagent C and bind specifically to albumin through ionic or hydrophobic interactions. This inhibits the formation of BCA-Cu complexes. In the case of sodium fatty acids, the relative value for sodium oleate was slightly lower than 1.00, and sodium laurate increased with higher albumin concentration. K/S values were calculated from these reflectance and the quantitative performance of the protein was examined. It was found that quantification was close to that of the absence of coexisting substances in the range of albumin concentration below 19.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, except for SDS and sodium laurate.

(5) Focusing on sebum soil that coexists with proteins in actual soil, the effect of the coexistence of fatty acids contained in sebum, palmitic acid, oleic acid, and sebum oil, which is a mixed soil of oily components, was also investigated. The effect of sebum soil on reagent C was examined; palmitic acid showed no effect, while oleic acid and sebum oil decreased the reflectance and had an impact on liquid C at an adhesion of $80 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ or more. It was suggested that the double-bond portion present in the molecular structure of oleic acid may react with reagent C, affecting the formation of the BCA-Cu complex. Next, the quantitative performance was investigated using the determination method on the test swatch, which was contaminated with oleic acid, washed with anionic surfactant, and an albumin reagent was added. For fabrics with $200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ oleic acid, the reflectance increased in contrast to the amount of albumin adhered, and it was found that coexisting oleic acid may prevent the BCA reaction from occurring. In contrast, it was revealed that high quantitative performance was shown when oleic acid coexisted at $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ or less, and the determination method was applicable in this range of oleic acid adhesion amounts.

Based on the findings of this study, an advanced method to determine the protein adherence to fabric using the BCA method was established. Although the quantitative performance is impacted by the type of protein, such as specific amino acid groups, retention of the reagents on the fabric, fiber molecules, and adhering materials such as fiber processing agents, it was found that this method was highly versatile. The effects of residual surfactants and enzymes on the fabric after washing were observed for SDS and sodium laurate. It was also noted that the quantitative performance was maintained even when other surfactants and proteases coexisted. Furthermore, it was found that the coexistence of oleic acid as a fatty acid did not affect the method, with amounts to less than $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

要旨

被服に付着する汚れには、水溶性汚れ、粒子汚れ、油性汚れ、タンパク質汚れが挙げられる。タンパク質汚れにはヘモグロビン等の有色のもの、無色のものが存在し、特に無色のものは、布にどの程度付着しているかを目視で確認することは非常に困難である。タンパク質汚れが残留したままの被服を保管してしまうことで、それを栄養源とする微生物や酸化の影響により、布の黄ばみといった着色汚れ、悪臭等の問題が生じる。このようなタンパク質汚れを対象とし、被服整理分野では、布に付着しているタンパク質の量を明らかにする定量分析の手法が多く用いられている。しかし、そのためには布からタンパク質を分離抽出し、液体試料として測定に用いる必要があり、長時間、複雑な手順が要求される。さらに、抽出過程において実験者により結果に差が生じやすいという難点がある。これまで、タンパク質の簡便な定量法を検討した例として、有色タンパク質であるヘモグロビンを用いて汚染布を作成し、反射率の測定によって質量単位でタンパク質を定量および洗浄効率を求める方法、ビスニコニン酸 (BCA) による呈色反応試薬をタンパク質汚染ろ紙上で直接反応させ、反射率を測定して定量する方法が挙げられる。しかし、布を基質として、無色のタンパク質を対象とした定量法に関する研究は報告されていない。

本研究では、布に付着したタンパク質を、BCA 法によって呈色させ反射率の測定により直接定量する方法を確立することを目的とし、この定量法の影響要因として考え得る、タンパク質の種類、付着基質となる布の種類による影響の検討を行った。さらに、洗浄研究への適用のために、洗濯洗剤に含有される界面活性剤と酵素、皮脂汚れとしてタンパク質と複合する脂肪酸が共存するときの本定量法への影響を検討した。その結果、以下の点が明らかとなった。

(1) BCA 法を布上に用いて表面反射率の測定により定量を行う、タンパク質直接定量法の確立を試みた。タンパク質にウシ血清アルブミンを、試験布に綿金巾布を用いた。溶液試料を用いる BCA 法を布上に適用するにあたり、反応を行う環境としてシャーレ内とする容器法、透明シートに挟みこむシート法を用いて、空気接触の影響を調べるとともに、実際のタンパク質汚れを想定し、タンパク質の水溶液を布上に滴下して付着させ、その後のエイジング時間による影響、試薬量、反応時間および温度の条件について検討を行った。その結果、エイジング時間が 13 日を過ぎた場合に若干の影響が見られたことから、タンパク質試薬は実験時に滴下することとした。また、シート法は空気接触による BCA 反応への影響が見られず、感度良くタンパク質量が反射率に表れた。反射率から求める K/S 値とアルブミンの検量線は、 $0.96\sim 14\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲で相関係数が高く ($R^2=0.9974$)、容器法よりも傾きが大きくなり、タンパク質直接定量法として適することが明らかになった。このシート法の実験条件として、 $2.5\text{cm}\times 2.5\text{cm}$ の試験布に、湿潤水 $50\mu\text{L}$ 、タンパク質試薬 $30\mu\text{L}$ 、BCA 法の反応試薬である C 液を 0.1mL 滴下し、 25°C で 30 分間反応させることで、良好な定量性を有

する方法を得ることができた。

(2) 綿白布に付着させるタンパク質の種類による反射率への影響およびタンパク質の定量性について検討した。ウシ血清アルブミンの他に、被服に付着するタンパク質汚れに含まれる、カゼイン、ゼラチン、ケラチンを選定し、水溶液または水分散液としてタンパク質試薬とし、第3章で得られた実験方法を用いてBCA反応を行い、反射率とK/S値を求め、タンパク質量との関係を検討した。その結果、タンパク質のアミノ酸組成による影響に注目すると、BCA反応が起こりやすいとされる、システインやシスチン基等が比較的多く含まれるアルブミンおよびケラチンは他のタンパク質よりも反射率が低くなり、定量性が高くなった。一方、ゼラチンは他のタンパク質よりも呈色の色相がやや青みがかっている特徴が見られ、また、システイン等のアミノ酸基を含まないことから反射率は比較的高く、定量性が低くなった。これらの結果はBCA法の原著論文で報告されていることと共通するものであった。したがって、タンパク質中のアミノ酸基の種類が本定量法に影響を与えることがわかった。

(3) タンパク質を付着させる布帛について、織り組織や繊維種による反射率への影響およびタンパク質の定量性について検討した。綿金巾布を基準とし、織りと厚みが異なる綿白布5種（平織2種、パーケール、ツイル、サテン）、綿以外の繊維種8種（麻、銅アンモニアレーヨン、ジアセテート、ポリエステル、ナイロン、T/C布、羊毛、絹）の平織布を試験布として選定した。試験布がぬれた状態の光学的な特徴を把握するため、紫色染料水溶液を滴下して反射率を測定したところ、表面構造により反射率がわずかに上昇したが、大きな影響はないことがわかった。一方で、タンパク質繊維である羊毛と絹、銅イオンの残留が推測される銅アンモニアレーヨンの3種は、繊維分子がC液と反応して呈色することがわかり、本法は適さない布帛であることがわかった。また、綿平織布の一種では、繊維加工剤等の付着物と考えられる影響により呈色して反射率が大きく低下し、定量性が低くなることがわかった。その他の試験布については、綿繊維布および混紡布は定量性が高く、それ以外の布帛では綿より反射率は低くなるものの定量性は良好であることがわかった。これにより、布帛の試薬の保持性すなわち試薬液のぬれや滲出の程度も、定量性に影響を与える要因であることが明らかになった。こうした布帛性状の影響があることから、本定量法は被試験物と同一の布帛で検量線を作成することが必要であることがわかった。

(4) 本法の洗浄研究への適用に向け、洗剤成分に含まれる界面活性剤と酵素が、本定量法で用いる綿白布上に共存する場合の影響を明らかにするため、本定量法の湿潤水と同様に、共存物質試薬として滴下し、C液に対する影響とタンパク質の定量性を検討した。用いた界面活性剤は、陰イオン界面活性剤3種、非イオン界面活性剤1種、脂肪酸ナトリウム6種であり、酵素はプロテアーゼを選定した。洗濯後に残留する量は浴比1:15、すすぎ1回の洗

濯条件から想定して、界面活性剤の試薬濃度は臨界ミセル濃度の 1/16 とし、プロテアーゼは 0.001~1% (v/v) 濃度として用いた。その結果、本実験で用いた共存物質試薬の濃度において、界面活性剤は C 液に対して影響を及ぼさず、プロテアーゼも付着量が $0.93\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下であれば問題がないことがわかった。次に、アルブミンのみの反射率を基準値 1.00 とし、界面活性剤 6 種または 0.01%(v/v)プロテアーゼ試薬が共存するアルブミンの反射率を比較し相対値を求めたところ、共存物質の種類によって異なる結果が得られた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、分鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS)、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) は相対値が高く、すなわちアルブミンのみの場合と比較して反射率が高くなった。特に SDS は二価金属イオンとの結合性が強いことが知られており、これら陰イオン界面活性剤は C 液中の銅(II)イオンと結合するとともに、アルブミンに対してもイオン性または疎水相互作用により特異的に結合し、BCA-Cu 錯体の形成を阻害していることが考えられた。脂肪酸ナトリウムの場合、オレイン酸ナトリウムは相対値が 1.00 よりわずかに低くなり、ラウリン酸ナトリウムはアルブミン濃度が高い程に相対値も高くなった。これらの反射率から K/S 値を求めタンパク質の定量性を検討した結果、SDS とラウリン酸ナトリウムを除きアルブミン濃度 $19.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下の範囲で共存物質がない条件と近い定量性が確認でき、第 3 章で得た検量線の範囲に大きな影響はないことが明らかになった。

(5) 実際の汚れでタンパク質と共存している皮脂汚れに着目し、皮脂に含まれる脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸、および人工皮脂油であるセバム油を用い、これらが共存する場合の影響を検討した。脂肪酸とセバム油による C 液への影響について、パルミチン酸は C 液への影響が見られなかったが、オレイン酸およびセバム油は付着量が $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上において反射率が低下し、影響が見られた。このことは、オレイン酸の分子構造に存在する二重結合部分が C 液と何らかの反応を起こし、BCA-Cu 錯体形成に影響を与えている可能性が示唆された。次に、オレイン酸で汚染した試験布を、陰イオン界面活性剤を用いて洗浄し乾燥させてからアルブミンを付着させ、本定量法によりタンパク質の定量性を検討した。オレイン酸の付着量が $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の布では、反射率がアルブミンの付着量に反して高くなり、オレイン酸が共存するとタンパク質量に相関した BCA 反応が起こりにくくなることがわかった。一方、オレイン酸の付着量が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下では第 3 章で得た検量線と非常に近似した高い定量性が示され、この範囲の付着量であればオレイン酸が共存する場合でも本法は適用可能であることが明らかとなった。

本研究から、布帛に付着したタンパク質を、BCA 法を用いて直接定量する方法を確立したとともに、その定量性は、タンパク質の種類すなわち特定のアミノ酸基、布帛の試薬の保持性および繊維分子や繊維加工剤等の付着物によってある程度影響を受けるものの、汎用性が高いことがわかった。また、洗浄後の布帛に残留する界面活性剤および酵素の影響は、

SDS とラウリン酸ナトリウムで影響が見られたが、その他の界面活性剤やプロテアーゼが共存する場合でも定量性が保持されることが明らかになった。さらに、脂肪酸であるオレイン酸とタンパク質が共存する場合、オレイン酸の付着量が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下ならば影響はないことがわかった。

目次

第1章 序論	
1.1 研究背景および目的	1
引用文献	3
第2章 被服に付着する汚れとタンパク質定量法	
2.1 被服に付着する汚れ	5
2.2 被服に付着した汚れに対する洗浄評価法	5
2.2.1 汚染布の種類	
2.2.2 表面反射率による評価	
2.2.3 抽出定量による評価	
2.3 タンパク質汚れ	9
2.3.1 タンパク質とは	
2.3.2 人体由来のタンパク質汚れ	
2.3.3 外部環境由来のタンパク質汚れ	
2.3.4 タンパク質汚れの除去における問題	
2.4 タンパク質の定量法	13
2.4.1 光学的性質を利用した分析	
2.4.2 化学反応による発色を利用した分析	
2.5 先行研究	16
2.5.1 ニンヒドリン反応によるタンパク質汚れの可視化	
2.5.2 ヘモグロビンを用いたタンパク質汚染布	
2.5.3 ATR-赤外分光法を用いた汚れ成分の洗浄度の直接定量分析	
2.5.4 ビシンコニン酸 (BCA) を用いたタンパク質汚れの簡易評価	
引用文献	19
第3章 実験方法の検討	
3.1 目的	22
3.2 実験	22
3.2.1 試薬	
3.2.2 試験布の作製	
3.2.3 反射率の測定	
3.2.4 試験布上での BCA 呈色反応	
3.3 結果および考察	24
3.3.1 容器法とシート法の反応環境による BCA 反応への影響	

3.3.2	タンパク質試薬のエイジングによる反射率の変化	
3.3.3	シート法における湿潤水と C 液量の検討	
3.3.4	反応温度と時間	
3.3.5	容器法およびシート法によるタンパク質の検量線	
3.4	結論	30
	参考文献	31
第4章 タンパク質の種類による影響		
4.1	目的	32
4.2	実験	32
4.2.1	試薬	
4.2.2	方法	
4.3	結果	33
4.3.1	タンパク質の種類による BCA 反応への影響	
4.3.2	K/S 値とアルブミン濃度との相関	
4.4	考察	36
4.5	結論	37
	参考文献	38
第5章 布帛の種類による影響		
5.1	目的	39
5.2	実験	39
5.2.1	試薬および試験布	
5.2.2	方法	
5.3	結果	42
5.3.1	反射率に及ぼす各試験布の織りおよび繊維種の影響	
5.3.2	BCA 反応における各試験布の影響	
5.3.3	K/S 値とアルブミン濃度との相関	
5.4	考察	46
5.5	結論	48
	参考文献	49
第6章 界面活性剤と酵素の共存による影響		
6.1	目的	50
6.2	実験	50
6.2.1	試薬	

6.2.2	方法	
6.3	結果	53
6.3.1	界面活性剤と酵素試薬による BCA 法 C 液への影響	
6.3.2	界面活性剤と酵素がタンパク質に共存する場合の BCA 反応への影響	
6.4	考察	56
6.5	結論	57
	引用文献	59
第7章 脂肪酸および油性成分の共存による影響		
7.1	目的	60
7.2	実験	60
7.2.1	試薬および試験布	
7.2.2	方法	
7.3	結果	63
7.3.1	脂肪酸とセバム油による BCA 法 C 液への影響	
7.3.2	オレイン酸汚染布の洗浄試験およびタンパク質定量への影響	
7.4	考察	66
7.5	結論	67
	引用文献	68
第8章 結論		
8.1	結論	69

謝辞

第 1 章

序論

第1章 序論

1.1 研究背景および目的

被服に付着する汚れには、皮脂汚れ等の人体由来のものと、食べこぼしや泥等の外部環境由来のものが存在する。このような汚れを成分として大別すると、水溶性汚れ、粒子汚れ、油性汚れ、タンパク質汚れが挙げられる¹⁾。タンパク質汚れとなる原因は、表皮から脱落した角質、血液、食品、化粧品等、人間の生命活動と日常生活に密接に関わるものであり、被服に付着する汚れの全体の7~20%を占めるとされる^{1,2)}。このタンパク質汚れには、ヘモグロビン等の有色のもの、無色のものが存在し、特に無色のものは布にどの程度付着しているかを目視で確認することは非常に困難である。そのため、洗濯によって洗い落とすことができたかどうかを判断することができず、タンパク質汚れが残留したままの被服を保管してしまうことで、それを栄養源とする微生物や酸化の影響により、布の黄ばみといった着色汚れ、悪臭等の問題が生じる^{3,4)}。

これまで、タンパク質汚れを研究対象とし、被服整理、洗浄分野でさまざまな検討が進められており、布に付着しているタンパク質の量を明らかにする定量分析の手法が多く用いられている。しかし、そのためには布からタンパク質を分離抽出し、液体試料として測定に用いる必要があり、長時間、複雑な手順が要求される。さらに、布からの抽出過程では、実験者により結果に差が生じやすいため再現性が低いという難点がある^{5,6)}。一方で、人工汚染布の表面反射率を測定し、汚染前と汚染後、さらに洗浄後の測定値から相対的に汚れ量を評価する手法もある^{7,8)}。しかし、これはカーボンブラック等の有色汚れの反射率が反映されて初めて定量できる方法であり、無色のタンパク質汚れの定量には適さないこと、質量単位で汚れ量を求めることができないという欠点がある⁹⁾。以上のことから、布上に付着したタンパク質を質量単位として、短時間で、精度よく簡便に定量できる方法が求められている。

これまで、肌着に付着した皮脂汚れ中のタンパク質を、ニンヒドリン反応を利用して紫色に呈色させ可視化し、その付着量を色の濃淡で判別する方法が報告されているが、実験的な手法ではなく、あくまで教材としての提案がなされている^{10,11)}。このニンヒドリン反応はアミノ酸を反応対象とするため、タンパク質へ適用するには検討が必要であると考えられる。また、有色タンパク質であるヘモグロビンを用いて汚染布を作製し、反射率を測定することで求められる洗浄効率と、抽出定量すなわち質量として求められる洗浄効率が等しくなるよう、作製方法を検討した例もある^{12,13)}。汚染布の反射率測定によってタンパク質の定量が可能である点は非常に画期的であるが、ヘモグロビンの色素が漂白剤によって分解された場合、反射率に反映されないため本来の付着量と相関しないことがわかっている。そのため、無色のタンパク質は対象とされていない。この課題に対して、谷らはセルロース繊維モデルとして定性ろ紙を基質とし、無色のタンパク質のアルブミンを付着させ、ビスンコニン酸(BCA)を用いたBCA反応による呈色の反射率を測定し定量する方法を報告している^{14,15)}。BCA反応は、溶液分光法のタンパク質定量法であり、検量線の精度が高く、さらに他の定

量法と比較してタンパク質の種類による呈色の差が小さく、界面活性剤の影響を受けにくいとされている^{16,17)}。この BCA 法の反応試薬を、直接タンパク質汚染ろ紙上に滴下して呈色反応させていることから、抽出工程を必要とせず、簡便で再現性が高いタンパク質の定量法であると考えられる。しかし一方で、あくまでこの報告は、ろ紙を汚染基質としており、布帛を検討した例は報告されていない。布の特徴である繊維の撚りや糸の織といった構造的特徴はもとより、被服材料となる繊維とは官能基等の化学的特徴も異なるだろう¹⁸⁾。また、BCA 法は還元反応であるため、反応基質と空気との接触面についても検討することが重要である。以上のことから、布上で直接タンパク質を呈色させ、付着しているタンパク質量と呈色度合いが相関する条件が把握できれば、反射率の測定により、布から抽出することなく質量としてタンパク質を直接定量する方法の開発につながると考えた。

本論文では、布に付着したタンパク質を、BCA 法によって呈色させ反射率の測定により直接定量する方法を確立することを目的とし、この定量法の影響要因として考え得る、タンパク質の種類、付着基質となる布の種類による影響を検討する。さらに、洗浄研究への適用を検討するため、洗濯洗剤に含有される界面活性剤と酵素、皮脂汚れとして複合する脂肪酸が共存するときの本定量法への影響を明らかにする。本検討により得られる知見は、実験者の技量や、複雑で時間を要する機器・手順を必要とせず、数多くの試料を扱うことが容易となり、例えば、タンパク質汚れに特化した新規洗浄剤や防汚素材の開発を目指す幅広い分野の研究者に対し、スピーディで精度の良い定量分析を行う手段として貢献できると考える。

引用文献

- 1) 中西茂子, 岩崎芳枝, 齊藤昌子, 阿部幸子, 増子富美, 被服整理学, 朝倉書店, 2007年6月第17刷
- 2) 奥村統, 徳山清孝, 阪谷武信, 鶴田康生, 新しい人工汚こう布に関する研究(第1報), 油化学., 30(7), 432-441 (1981)
- 3) 皆川基, たん白質汚れの洗浄, 繊維誌. (繊維と工業), 40(10), 603-611 (1984)
- 4) ライオン株式会社, 衣類用中性洗剤アクロン「衣替えの虫食い・黄ばみを防ぐには?」 (<https://acron.lion.co.jp/tips/change/>) 2022/11/20 参照
- 5) 皆川基, たん白質汚れの洗浄に関する研究—銅-Folin 試薬によるたん白質の定量について—, 大阪市立大学家政学部紀要, 20, 89-99 (1973)
- 6) 皆川基, 岡本幾子, 重田美智子, たん白質汚れの洗浄に関する研究(第8報)—頸部綿汚染布に付着する表皮角質層汚れの洗浄について—, 繊維消誌., 19(11), 420-430 (1978)
- 7) 蓼沼裕彦, 衣料用洗剤の洗浄性能-洗浄力評価法および新しい洗剤機能に関して-, オレオサイエンス, 8(11), 487-493 (2008)
- 8) 後藤景子, 中谷博美, 人工汚染布を用いた節水型洗浄の洗浄性能評価, 家政誌., 62(3), 173-178 (2011)
- 9) 増子富美, 齊藤昌子, 牛腸ヒロミ, 米山雄二, 小林政司, 藤居真理子, 後藤純子, 梅澤典子, 生野晴美, 被服管理学, 朝倉書店, 2015年8月第4刷
- 10) 高橋類子, 木村節子, 呈色反応による人体汚れの視覚化教材(第1報), 新潟大学教育学部附属教育実践研究指導センター研究紀要, 5, 61-72 (1986)
- 11) 高橋類子, 津野敏江, 岸本洋子, 木村節子, 呈色反応による人体汚れの視覚化教材(第2報)—義務教育における授業実践—, 新潟大学教育学部附属教育実践研究指導センター兼究紀要, 6, 61-71 (1987)
- 12) 大矢勝, 大島紀子, 理論的洗浄研究のための親水性固体粒子汚染布, 疎水性固体粒子汚染布, 及びたん白質汚染布の作製法, 家政誌., 61, 483-491 (2010)
- 13) 黒野理枝, 大矢勝, 改良型ヘモグロビン汚染布の漂白試験への適合性, 繊維消誌., 54, 750-757 (2013)
- 14) 谷道子, 森田みゆき, ビシンコニン酸を用いたたんぱく質汚れの簡易評価, 家政誌., 69, 238-242 (2018)
- 15) 谷道子, 森田みゆき, 被服教材のためのビシンコニン酸を用いたたんぱく質汚れの可視的評価における解析法の検討, 家庭科・家政教育研究, 12, 11-17 (2017)
- 16) 鈴木祥夫, 総タンパク質の定量法, ぶんせき, 517, 2-9 (2018)
- 17) ThermoFisher SCIENTIFIC web サイト「BCA 法、Bradford 法、Lowry 法など、“総”タンパク質定量法の原理まとめ (<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/protein-basic4/>) 2022/11/6 参照

- 18) 辻本直彦, 固有の際立った優位性を有する製紙産業, 日本画像学会誌, 56(5), 519-524 (2017)

第2章

被服に付着する汚れと タンパク質定量法

第2章 被服に付着する汚れとタンパク質定量法

2.1 被服に付着する汚れ

汚れとは、本来あるべきでない場所に付着した物質である。被服への汚れの付着機構は複雑であり、大別して、次の付着の仕方が考えられる。糸の織り編み等の複雑な基質表面と人体の動きが関与し、摩擦によって入り込む物理的付着、汚れと繊維表面の表面電位による静電的な吸着といった化学的な付着である¹⁾。したがって、被服に付着した汚れを洗い落とすためには、汚れと被服、相互の性質をふまえる必要がある。

被服に付着するこうした汚れには、その由来別に、皮脂等の人体由来のものと、食べこぼし等の外部環境由来のものが存在する。性質として分類すると、水溶性、油性（疎水性）、固形または粒子汚れに大別でき、代表的な成分として、糖・塩類、色素、油脂、泥、そして、タンパク質が挙げられる。

2.2 被服に付着した汚れに対する洗浄評価方法

汚れに対する洗浄効果を評価することは、洗浄研究において重要である。評価の対象は、試験に使用した洗浄剤、または機器（洗濯機）の汚れに対する洗浄効果である。

最も実生活に近い試験方法はバンドルテストであり、アメリカの ASTM(American Society for Testing & Materials) で提唱され標準化された方法である。複数組の世帯が実際に被服を着用し、家庭用洗濯機で洗浄を繰り返し、最終的に目視で汚れ具合を判定する官能評価を行う。一方、この方法には多くの家庭の協力と莫大な労力と費用が必要であり、多くのサンプル数と繰り返しによる信頼性の向上が望まれる²⁾。

そのため、あらかじめ一定の汚れを布に付着させた「汚染布」を使用したモデル実験での評価が一般的である。評価の方法には、目視で判定する官能評価、または、数値として測定・算出し判定する定量評価がなされる³⁾。

定量評価には、さらに、表面反射率の測定により色彩の濃淡として比色定量し、相対的な付着量を求めるものと、成分を布から抽出し溶液試料として、タンパク質定量法を用い絶対的な質量を定量する方法がある^{4,5)}。しかしながら、成分を抽出定量する方法は、反射率の測定と比較してかなりの時間と注意を要するため、汚染布の評価は反射率の測定により行われるのが通例である。以下に、代表的な汚染布についてまとめ、洗浄研究における反射率による評価ならびに抽出定量による評価について述べる。

2.2.1 汚染布の種類

(1) 天然汚染布（天然污垢布）

試験布へ顔垢、衿垢、靴下汚れ等を付着したものであり、実生活の汚れと洗浄性能を対応させて評価する際に有効である。衣料用合成洗剤の洗浄力試験 JIS K 3371 では、用いる汚染布として襟垢布が指定されており、JIS L 0803 に規定された染色堅牢度試験用綿添付白布（金巾3号）を試布とする¹⁾。多くの場合、汚染布は灰～クリーム色に皮脂汚れが付着して

いる様子が観察される。汚染布の作製が非常に難しく、個人差による結果のバラつきを抑えるために多くのサンプル数を要する。具体的には、左右同程度に汚れており、かつ、汚れの程度が強いもの、中程度のもの、弱いものの3段階を用意する必要がある。洗浄試験後、シェッフエの一対比較法により目視で5段階判定を行うと規定されており²⁾、理論的な定量評価には適さない側面を有する。目的により、反射率の測定による相対的な評価、抽出処理による付着物質の定量が別途必要とする場合もある。

(2) 人工汚染布

一定のモデル汚れ成分を付着させた汚染布である。天然汚垢布と異なり、質、量ともに均一に、一度に多量に作製でき、再現性が高く洗浄効果の因子を解析するのに適していると言える。一方、製造ロット、汚れの種類によって同一の洗浄剤であっても結果が大きく異なることや、人工汚染布で得られた評価と実生活の使用評価が異なる場合があり、平等な評価を行うことが困難である⁶⁻⁸⁾。そのため、人工汚染布を用いた評価方法は指標洗剤との比較実験を行うことが基本となっており、評価対象は、洗浄剤ではなく洗浄機器すなわち洗濯機の性能試験として JIS C 9609 に規定されている。国内では、水分散媒たんぱく質配合湿式人工汚染布（湿式人工汚染布）と呼ばれる汚染布が作製され、JIS C 9606 電気洗濯機に関する洗浄試験方法で使用が規定されている¹⁾。これは、天然汚垢布とほぼ同様の成分と、洗浄剤に含有される酵素の効果を評価するためにタンパク質としてゼラチンを使用したものである。成分を以下の表へ示す。

Table 2-1 Soil components of wet-artificially soiled fabric.

Components		Composition / %	
Organic components	Oily soil components	Oleic acid	28.3
		Triolein	15.6
		Cholesterol oleate	12.2
		Liquid paraffin	2.5
		Squalene	2.5
		Cholesterol	1.6
	Protein component	Gelatin	7.0
Inorganic components		Inorganic dirt (clay)	29.8
		Carbon black	0.5

海外では、Swissatest(旧 EMPA、スイス)、Testfabrics (アメリカ)、wfk (ドイツ) といったメーカー製品が有力である。各社における独自の混合汚染布の他、酸化鉄等の粒子汚れ、ロウ、油脂、血液汚れ、ココアや赤ワインといった食物の汚れに特化したものも存在する²⁾。皮脂汚れ (Sebum) 汚染布も存在するが、やはり有色汚れが共存しタンパク質のみという汚

染布は現時点で製造が確認できず、国内外ともに、タンパク質のみの汚染布は作製されていないと推測される。この理由は、タンパク質は基本的に無色であり、反射率による評価が主である人工汚染布の作製には適さないと解釈されているためと考えられる。

2.2.2 表面反射率による評価

(1) 表面反射率とは

表面反射率は、液体等のように光を透過しない試料を対象とした評価に適した数値である。JIS Z 8722 に反射物体の照射および受光の幾何条件が規定されている通り、一定の光源から対象に光を照射し、その反射光を受けて照射光を 100 としたときの割合を演算するという原理は共通するが、特に反射光の受光条件や、測定可能な波長範囲は測定機器により異なっている⁹⁾。

例として、本研究で使用した色差計は、ハンディ型で、分光測色方法であり LED を光源とした集光式 0/45 光学系と呼ばれる方式である。JIS Z 8722 の反射及び受光の幾何条件 b に該当する。一般的に可視光線である 380~720nm 程度の範囲で測定される。当然のことながら、測定時には入射光以外の外部の光が受光器に及ばないように、測定部を対象に密着させる必要がある。布を対象とする場合は、布の嵩高さによって糸同士の隙間から外部の光が侵入する可能性があることを十分に注意し、かつ、対象を押し付けることによって厚さが大きく変化しないよう、一定の力で密着させることが非常に重要であると言える。

測定した分光反射率を元に、光の三原色に対する三刺激値 X、Y、Z、およびその他の表色系の演算が行われる。表色系のうち、L*a*b*色空間は、あらゆる分野で最も用いられている表色系であり、JIS Z 8781-4 において採用されている。L*は明度、色度を a*、b*で表し(単位なし)、a*の値が正ならば赤色、負ならば緑色方向を示し、b*の値が正ならば黄色、負ならば青色方向を示している¹⁰⁾。a*、b*値が大きい程に彩度が高く、色が鮮やかであると言える。

(2) 洗浄効果の評価方法

汚染布を用いた反射率による洗浄効果の評価は広く行われており、洗浄効率 (D%) で表される評価指標を求める。JIS C 9606(2007)において洗浄度を求める計算式として採用されている Harris の式(1)では、特定の波長の反射率(ただし値は小数表記)や Y 値 (Yxy 表色系における明度%) を比 (100%=1) として代入する³⁾。

$$D (\%) = (R_w - R_s) / (R_0 - R_s) \times 100 \quad \text{--- (1)}$$

R_s : 汚染(soiled)布の反射率、R_w : 洗浄(washed)後の反射率、R₀ : 原白布の反射率

しかし、これらは表面上の凹凸により測定時に発生する反射光の散乱、すなわち、拡散反射光の影響が加味されていない。拡散反射光は、光を照射した際に一部の光が正反射光以外

の方向に屈折し、あるいは試料内部に屈折侵入、拡散していくことである^{11,12)}。この場合、反射率の高低を正しく測定することが困難である。特に粉体を対象として扱われる要素であるが、糸や単繊維自体の凹凸が粒子における光の挙動と近似するという捉えのもと、布帛に対しても拡散反射光の考え方が適用されている。このことから、布帛の反射率による評価には、その値に Kubelka-Munk の式(2)が用いられる。

$$K/S = (1-R)^2/2R \quad \text{— (2)}$$

K:吸光係数 S:散乱係数 R:反射率 (小数表記)

この式は、拡散粒子、吸光粒子を含む透明媒質に拡散光束を照射した際の反射を表すものである。繊維束における独特な光沢感、偏光性という観点からは、この式には表面の反射をほとんど無視しているという課題は存在するものの、経験的に大きな問題にはなっていないことから被服科学研究の現場で広く受け入れられている^{1,13)}。染色布における染料の染着量すなわち色の濃さの評価にも用いられている式であり、汚れ量の残留程度の評価としても適している¹⁾。ただし、この式を用いた洗浄力評価においても、特に粒子状汚れに対し欠点が存在する。粒子の大きさが小さい程、測定表面の被覆面積が広がるため、反射率は低下し¹⁾、見かけ上汚染が広がったように評価されてしまう。すなわち、拡散反射光の影響が非常に大きくなる。そのため、粒子汚れを含む汚染布の反射率による評価を行う際には、この点に注意が必要である。

以上のように、現在のところ一般的に、被服に付着した実際のタンパク質汚れを評価する場合は、有色物質を共存させたモデルタンパク質汚れを付着させた人工汚染布を反射率測定により評価する方法がとられていると言える。しかし、この方法はあくまで相対的な評価に留まり、質量としての定量は、次に述べる抽出による評価を行う必要がある。

2.2.3 抽出定量による評価

布上の無色の汚れは反射率から評価することはできないため、他の方法を選択する必要がある。タンパク質の場合、布とともに硫酸で灰化して窒素原子 (N) として定量、タンパク質量に換算する方法¹⁾もあるが、強アルカリ (水酸化ナトリウム) 水溶液中で布からタンパク質を抽出し、分光法で総タンパク質量を定量する方法を用いた報告例が多く、洗浄研究において広く受け入れられていると考えられる。

今日でも用いられている、皆川らの報告例では、具体的に次の手順で行う。タンパク質汚染布を、pH10~11 で緩衝作用の強い 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液中で 120 分間、90°C で加熱してタンパク質を変性させて抽出し、抽出液を、銅-Folin 試薬すなわち Lowry 法を用いて比色定量し、検量線からタンパク質の質量を求めている。この条件は、フェノール試薬とタンパク質の反応は強アルカリ性で生成した発色物が不安定となるため、安定 pH の 10~11 としており、さらに熱処理時間すなわちタンパク質の変性度合いによって吸光度にや

や変化が生じるため、多くのタンパク質が変性し吸光度が安定する 120 分という条件としている¹⁴⁻¹⁹⁾。

この方法では、汚染布を用いた場合とは異なり、相対的な評価ではなく、質量としてタンパク質汚れを評価することができる。その一方、布帛に付着したタンパク質を変性させて溶液中に移行させる処理を行うため、この工程で繊維間隙や糸同士の間隙にタンパク質が残留し、実験結果に影響を与える場合も十分に考えられる。すなわち、実験ごとの数値の差が大きくなり、再現性が低くなる可能性が考えられる。そのため、信頼性のあるデータを得るために多くの回数をこなす必要があるだろう。また、反射率を用いた方法より、一度の実験における手順が煩雑であり、多くの時間を要することも留意すべきである。

このように、無色のタンパク質汚れはその特性から、従来の表面反射率、抽出を利用した方法を用いた精度の良い測定が困難であり、タンパク質汚れに対する洗浄研究方法として、これらの方法は適していないと考えられる。

2.3 タンパク質汚れ

ここで、改めてタンパク質汚れについて性質や由来をまとめ、これらが被服整理においてもたらず問題について述べる。さらに主なタンパク質定量法についてその特徴をまとめる。

被服に付着する多様な汚れの中で、タンパク質は人体汚れにも外部環境由来にも含まれる汚れであり、全汚れ量の 7~20% を占めるとされる^{1,20)}。さらに、タンパク質は複雑な性質を持つ高分子であり、布に付着して変性すると洗い落としにくく、上述してきたように無色のものは目視による付着の判別が困難である。したがって、洗浄研究においてタンパク質汚れは重要な研究対象であると言える。

2.3.1 タンパク質とは

タンパク質は、約 20 種類のアミノ酸がペプチド結合(アミノ酸同士のアミド結合-CONH-)により重合した、高分子物質である。自然界にはアミノ酸配列、重合度の異なる無限数に近いタンパク質が固有の構造と特有の機能を持ち、生物の体を構成し、生命活動を支えている。

一般に、アミノ酸が約 50~2,000 個つながったものをタンパク質と呼び、50 個以下のはペプチドと呼ばれる。アミノ酸は一つの分子内にアミノ基(-NH₂)とカルボキシ基(-COOH)、スルホン酸基(-SO₃H)、リン酸基(-PO₃H₂)を持つ分子である。

タンパク質には特徴的な構造があり、アミノ酸配列による「一次構造」、ペプチド主鎖の規則的な立体構造による「二次構造」、側鎖を含めた全体の立体構造である「三次構造」を形成し、さらに「四次構造」と呼ばれる会合体を形成するものもある。なお、全体の形状により、球状タンパク質、繊維状タンパク質に大きく分類される^{21,22)}。

2.3.2 人体由来のタンパク質汚れ

被服に付着する人体の分泌物として、皮脂、垢、汗、血液、人乳、膿汁、尿や糞便が挙げ

られる^{1,2)}。以下の Table 2-2 に、汚れとして扱われる代表的なものについて、さらに Fig. 2-1 へ皮膚構造の詳細をまとめる。

Table 2-2 Types and components of protein soils from human body.

Types of protein soils	Components
Keratinocyte debris	Keratin
Perspiration	Dermcidin
Blood, Pus	Albumin, Hemoglobin, etc.
Milk (mammal)	Albumin
Excrement	Food and Cell-derived complex

(1) 皮脂

ヒトの皮膚表面は薄い脂質膜「皮表脂質」で覆われている。脂腺で生成、排せつされた「皮脂」と表皮細胞由来の「脂質」は厳密には異なるが、本研究ではこれらをまとめて「皮脂」と表す。組成は身体の部位により著しい変化は見られないが、脂質量は脂腺の単位面積あたりの密度に関連して異なることがわかっており、最も多いのは前額部、少ないのは下肢である。なお、脂質は、脂肪酸、グリセロ脂質、スフィンゴ脂質、ワックス、ステロールに大分類される。脂質は水溶性のものも存在する。トリグリセリド、ワックスエステル、スクワレン（6つの不飽和結合、炭素鎖 30 の構造）、遊離脂肪酸（ミリスチン酸、パルミチン酸）等が挙げられる。皮膚常在細菌がこれらに関与することで変質することがわかっており、例えば、ざそう桿菌はリパーゼ活性がありトリグリセリドを分解し遊離脂肪酸とグリセリンにしている²³⁾。

脂肪酸を多く含む油性の汚れは、繊維表面だけでなく、綿繊維の中空構造内部に蓄積し、不飽和度の高いものほど酸化、重合しやすく黄色化することがわかっている。また、皮脂と汗は、皮膚表面に存在する脂腺（毛穴）、汗腺から分泌されるため、被服の大半の部分に付着する。特にそうした分泌器官の開口部が集中している背や胸部をはじめ、被服と人体の摩擦により、分泌物だけでなくいわゆる垢と呼ばれるタンパク質（ケラチン）の角質細胞が脱落したのも付着する²⁴⁾。一般に皮脂汚れと称されるものは、こうした皮脂、汗、表皮角化細胞等が混合した汚れである。

(2) 表皮角化細胞

表皮の構成は、表皮角化細胞が全体の 90%以上存在し、さらに、外層から、角層、顆粒層、有棘層、基底層に大別でき、メラニン色素を作るメラノサイト、免疫応答に関与するランゲルハンス細胞、神経細胞等も存在する。表皮と真皮の境界に基底膜があり、コラーゲン等のタンパク質で構成される。この基底膜に接する基底層において細胞分裂した細胞が分化し、最外層へ向かって移動、角化して角化細胞となり、最終的に体外へ脱落する、という

ターンオーバーを繰り返す²⁵⁾。

角質細胞は、細胞としては死んでいるが代謝は継続されており、水分を固定する役割を担う。軟質（ソフト）ケラチンと呼ばれる線維性タンパク質が主要である。デスモグレイン、コルネオデスモシン等のタンパク質同士が架橋し、不溶化して構成される膜状の成分で相互に接着している。ケラチンは角層のタンパク質の約 80% を占め、角層を丈夫にしている。分子量約 40,000~60,000 のタンパク質であり、20 種類以上の分子種が知られている。酸性と塩基性に大別され、有棘層以降ではケラチン 1 と 10 が発現する。これら 2 種の分子が二量体を形成し会合することで中間径フィラメントと呼ばれる直径約 10nm の線維を形成する。角層ではフィラメントがさらに会合、凝集し不溶性の極めて強固な構造となるが、最外層ではタンパク質分解酵素プロテアーゼの働きにより分解されはがれやすくなる。汚れとして被服に付着するのは、この脱落した角質細胞であり、水不溶性の硬タンパク質である²⁵⁾。

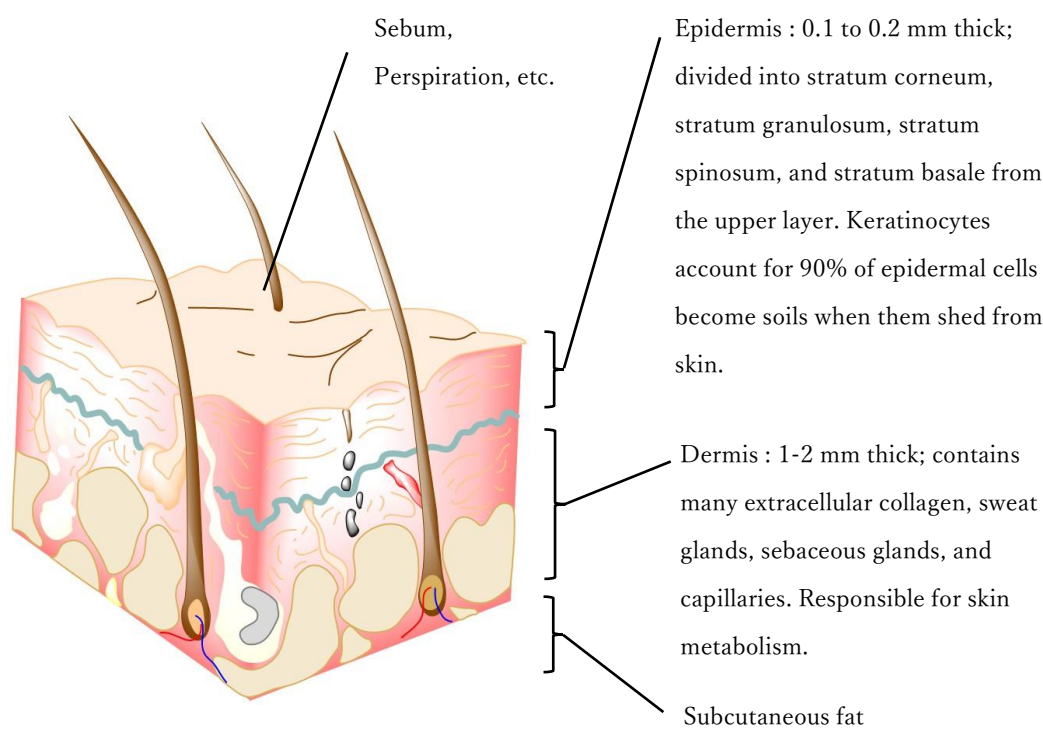


Fig. 2-1 Schematic diagram of skin structure, components and soil of the skin surface.

(3) 汗

汗腺はエクリン腺とアポクリン腺に大別され、エクリン腺は全身に分布し水を大半、無機塩類、有機酸、尿素、微量成分としてタンパク質を含む。汗中の乳酸、皮表脂質膜は pH が弱酸性であり酸外套とも言われ、緩衝作用をもつ。一方、アポクリン腺は脇や外陰部に限局して分布し皮脂腺と同様に毛包に開口部がある。エクリン腺の分泌物と比較しタンパク質等を多く含むためやや粘濁である。毛穴、表皮の常在微生物により分解され、悪臭の原因となる²⁾。

(4) 血液

血液中にもタンパク質が含まれており、有色のものは赤血球である。この赤褐色の色彩は輸送タンパク質のヘモグロビンに含まれる鉄イオンと酸素の結合によりもたらされる¹⁹⁾。アルブミンは血液中の輸送タンパク質として存在し、試薬タンパク質として生化学分野で広く知られているもののひとつである²⁶⁾。

2.3.3 外部環境由来のタンパク質汚れ

生活環境からの汚れには、由来から大別して、食物、化粧品、生活用品（塗料、機械油等の色材や油脂を用いたもの）、大気中の粒子、微生物（細菌、カビ）、雨中の水溶性物質といった自然界からのものが挙げられる^{1,2)}。以下の一覧に、汚れとして扱われる代表的なものについて詳細をまとめる。特に、生活環境に左右されず付着するものは食物由来の汚れが多いだろう。被服の外側に付着することが多く、有色であれば気が付くが、目視による判別が付きにくい場合、洗濯で除去できたかどうかの確認が困難である。そのため、経時によって変色が起こる原因となってしまう。

Table 2-3 Types and components of protein soils from external environment.

Types of protein stains	Components
Foods (meat, egg yolks, beans, lactic products, seasonings, etc.)	Casein, Gelatin, Non-protein complexes with lipids, Sugars, etc.
Albumen	Water, Protein only
Cosmetics	Ex.) Lanolin, Silk-derived protein
Microorganism (bacteria, mold, etc.)	Biogenic protein
Enzymes	Biogenic protein

2.3.4 タンパク質汚れの除去による問題

水溶性のタンパク質の場合、汚れとして付着しても短時間であれば、高温を避けて洗浄すれば除去されやすい。しかし、長時間の放置による酸化や、熱（特に湿熱）、酸およびアルカリ、有機溶剤の影響により、タンパク質中のペプチド鎖の結合が一部切断され、新しく分子内または分子間に結合を生じて大きな会合物となり、水に対する溶解度が低下する^{18,27)}。すなわち、変性により、水溶性のタンパク質汚れも不溶性のタンパク質汚れへ変化することとなり、水による洗浄では落ちにくくなってしまう。

特に日本においては四季を通じた気温と湿度の変化が大きく、夏場は高温多湿の環境により繊維害虫だけでなく微生物にとって好条件となる。そのため、タンパク質汚れが残留していた場合、繁殖した微生物とその分泌物により、着色汚れや悪臭の発生、繊維の損傷につながり、被服の外観の悪化や傷みの原因となってしまう²⁸⁾。

したがって、このような被服に付着したタンパク質汚れの付着量を定量することは、タンパク質汚れの的確な洗浄方法を研究する上で重要である。

2.4 タンパク質の定量法

タンパク質の定量法は、生化学や食品化学において扱われることが多く、窒素量や特定のアミノ酸量をタンパク質として測定する方法、電気泳動法、蛍光法、吸光光度法等、複数の方法が存在する。家政学、特に被服科学では、比較的手順が簡便な吸光光度法が用いられることが多いため、ここではその場合の代表的な方法を取り上げる。

吸光光度法では、タンパク質の種類を区別して定量することはできないため、複数種のタンパク質を含む試料の場合は、総タンパク質量として求めることになる。この時、定量結果を標準となるタンパク質として換算することが通例である。タンパク質混合試料から各種のタンパク質の定量を目的とする場合は、クロマトグラフィー、電気泳動等の分離処理を行う必要がある。

なお、2.3.1(4)でも述べたように、生化学研究実験における標準タンパク質として、入手が安定していること、糖鎖や補酵素等を含まないことから、精製されたウシ血清由来アルブミン (Bovine serum albumin, BSA) がよく扱われる²⁶⁾。このタンパク質の一次構造は、17個のジスルフィド結合(S-S)、1個のシステイン基、18個の α -ヘリックス構造を有する。高次構造では、疎水性ポケット(空孔)と呼ばれる部位が形成され、脂肪酸、金属イオンと結合する。精製によって元来結合している脂肪酸を除去した結晶品が試薬として用いられる。アルブミンは球状タンパク質であり、血液中タンパク質で最も濃度が高い^{22,29)}。

2.4.1 光学的性質を利用した分析

(1) 紫外吸光光度法

タンパク質を構成するアミノ酸のうち、芳香族基を持つトリプトファン、チロシン、フェニルアラニンの吸収波長である 280nm における吸光度 (Abs) を測定する。これらを含まないタンパク質の場合はペプチド結合に由来する 205~215nm を測定することも可能であるが、この波長領域に吸収をもつほかの物質も多く、共存物質がある可能性がある場合は測定波長領域が限定される。また、色素を含む場合は可視光領域で測定する場合もある。特別な色素を含まないタンパク質は 350nm の Abs は 0 であるため、ここに大きな吸光が見られる場合、会合体や凝集物といった光の散乱の影響が考えられる。

試薬を必要とせず非常に単純な方法であり、測定した試料をそのまま他の実験に用いることができる大きな利点がある。一方で、測定試料の純度が高いことが前提であり、共存物質が存在するものの測定には不向きである。また、タンパク質の種類によって Abs の差があり、感度が他の方法と比較して低く 50~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とされている³⁰⁾。

2.4.2 化学反応による発色を利用した分析

(1) Bradford (ブラッドフォード) 法

トリフェニルメタン系色素である Coomassie Brilliant Blue G-250(CBB G-250)を、酸性条件下でタンパク質溶液中に添加して Abs を測定し、あらかじめ作製した検量線に当てはめて定量する方法である。酸性浴とすることで、CCB とタンパク質中の塩基性アミノ酸残基であるアルギニン、リジン、ヒスチジンおよび窒素末端アミノ酸が、静電的、疎水性相互作用によって結合する。これにより CCB の最大吸収波長が赤茶色の 465nm から青色の 610nm に変化することを利用し、この時の Abs 差が最大となる 595nm の Abs を測定する。対象が低分子の場合は、CCB は結合しない。試薬を添加して混合した後、室温で 2 分ほど静置するだけで測定可能であり、色素タンパク質複合体は、約 1 時間は溶液中に安定に分散するため、測定が簡便である。また、呈色反応に対する還元剤やキレート剤の影響がなく、定量範囲が 10~2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ³⁰⁾と低濃度範囲で幅がある。その一方、色素を用いており、界面活性剤の影響を強く受けることから、界面活性剤の共存が考えられる試料の測定には適さない。色素がガラス器具へ吸着しやすいという実験環境の難点もある。また、検量線の直線性が低いこと、タンパク質によって発色差があることが知られている³⁰⁻³⁴⁾。

(2) WST 法

還元発色剤である水溶性テトラゾリウム塩を用いた方法であり、WST はこの塩の英語名称の頭文字をとった略称である。生化学や食品化学分野で見られることが多い。この試薬はタンパク質によって容易に還元されてホルマゼン体を生成し、アルカリ水溶液中で最大吸収波長 650nm の青色に呈色する。定量範囲は 50~5000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ³⁰⁾であり、試薬添加後に室温で 1 分静置するだけで測定可能となる利点がある。その一方で、タンパク質の種類による発色の差があり、還元剤による影響が大きい^{30,35)}。

(3) Biuret (ビウレット) 法

Biuret は尿素の二量化構造をもつ有機物である。アミノ酸が 3 つ以上つながったトリペプチド以上のもの、またはタンパク質も、この有機物と似たような反応をするため、この名称で呼ばれている。タンパク質を銅 (II) イオン溶液へアルカリ条件下で混合すると、ポリペプチド結合が解離し窒素原子がプロトンを失うことで、銅 (II) イオンに配位結合して銅ペプチド錯体を形成する。反応には約 30 分を要する。これにより、ペプチド結合の数に応じて溶液の色が赤紫に呈色し、540nm の Abs を測定しあらかじめ作製した検量線に当てはめることで定量が可能となる。タンパク質の単位質量あたりのペプチド結合数は種類に寄らずほぼ一定であり、タンパク質種による呈色への影響は小さいという利点がある。しかし、高濃度のトリス緩衝液、アミノ酸、スクロース、アンモニウムイオン (NH_4^+) 等が共存する場合は正しく測定できない。また、感度はそれほど高くなく、定量範囲は 5~160 mg/mL ³⁰⁾であり低濃度の試料には適さない。そのほか、カゼインなどの複合タンパク質、コラーゲンのような特異なアミノ酸組成のタンパク質はやや低めの値となるとされる³⁰⁾。

(4) Lowry (ローリー) 法

上述の Biuret 法を改良し、タンパク質中の芳香族基を持つトリプトファン、チロシン、システイン、ヒスチジン、アスパラギンの還元力を応用したもので、検出感度は前述の方法の 100 倍とされる。生化学分野で微量タンパク質定量法として広く用いられている。まず、酒石酸塩を含むアルカリ条件下で Biuret 試薬をタンパク質溶液に添加して銅 (II) ペプチド錯体を形成し、次に Folin-Ciocalteu 試薬 (リンモリブデン酸とリンタングステン酸を酸性溶液に溶解したもの) を添加することで、タンパク質中の芳香族基を持つアミノ酸によりこの試薬を還元し、650~750nm に最大吸収波長を持つ青色を強く呈する。これらの反応には約 40 分を要する。この方法は 1~1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ³⁰⁾と感度が高く、得られる検量線も良好で、低濃度の範囲で幅がある。しかし、操作が煩雑で、妨害物質が多く、界面活性剤をはじめ緩衝液やキレート試薬、還元物質により沈殿物を生じることが難点である。また、試薬の安定保管には冷蔵保管が望ましく、使用前に室温に戻す必要がある^{30-34,36)}。

(5) BCA 法

上述の Lowry 法をさらに改良し、銅 (I) に特異的な呈色試薬である Bicinchoninic Acid (ビシンコニン酸、BCA) を用いた比較的新しい方法である^{37,38)}。近年、さらに精度を高める研究報告がなされている。原理は Biuret 法、Lowry 法と同様に、アルカリ条件下でタンパク質が銅 (II) 錯体を形成し、システイン、シスチン、チロシン、トリプトファンによって、タンパク質量に応じ銅 (I) に還元される。この還元量は、タンパク質濃度の関数であり、次に、銅 (I) と BCA 2 分子が錯体を形成することで 562nm に最大吸収波長を持つ紫色に呈色する。

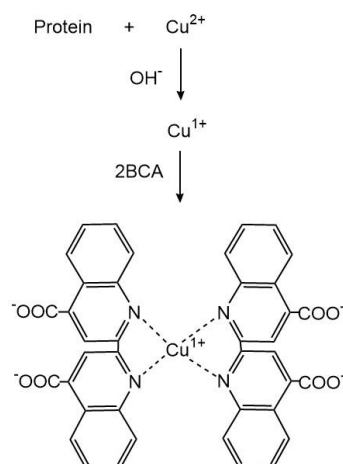


Fig. 2-2 Reaction scheme of the BCA method.

特に、システインにより強く呈色する特徴がある。この Abs を測定し、あらかじめ作製した検量線に当てはめることで定量が可能である。この方法は、操作が簡便で、界面活性剤、尿素、水酸化ナトリウム等のタンパク質変性剤、一部のキレート試薬の影響を受けにくく、

タンパク質の種類による呈色の差が小さいという利点がある。さらに、定量範囲は 1～2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ³⁰⁾と広く、感度も良好で検量線の直線性が高い ($R^2>0.95$) とされる³¹⁾。その反面、Lowry 法と同様、銅錯体形成による呈色反応であることから、銅イオンに対するキレート試薬、還元物質等による影響を受けるため、これらの共存には注意が必要である。

この定量法は、温度により反応に要する時間が異なり、標準条件は 37°C30 分間であり、室温の場合は 2 時間、60°Cの場合は 30 分間とされる。反応温度により反応速度をコントロールすることが可能であり、用途により適したものを選択する。室温であっても反応は進行することを留意する必要がある³⁰⁻³⁴⁾。

2.5 先行研究

布帛に付着したタンパク質汚れを簡便に可視化、または定量する先行研究として、以下の研究が挙げられる。

2.5.1 ニンヒドリン反応によるタンパク質汚れの可視化^{39,40)}

高橋らは、着用肌着に付着する汗、アミノ酸、脂肪を対象とし、定性的ながら客観的に見える呈色反応を利用して、大学生を対象とした汚れを視覚的に捉える実践を試みている。さらに、これを発展させ、小・中学校の児童・生徒を対象とした教育現場での視覚教材化を目的とした授業実践を行っている。複数種の汚れのうち、タンパク質汚れに対してニンヒドリン反応を用いている。ニンヒドリン ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$) はアミノ酸と反応して紫色を呈する特徴があり、アミノ酸分析に用いられる方法である。特徴的な臭気があり、空気中で酸化されやすいため、扱いに注意が必要である。

前者の大学生を対象とした実践では、試験布として、同一の小学校高学年児童が 1 日あたり 8 時間着用した肌シャツで、1 日間、4 日間のものを用意し、背、腹、胸、腰部、腋窩の各部位を 10cm \times 6.5cm に切り分けたものをさらに三等分して実験に用いている。この試験布に、1%ニンヒドリン水溶液を吹き付け、アイロンまたはドライヤーで乾燥させ目視で評価を行った。その結果、骨格や着用シワが筋状に観察されるとともに、着用日数が増すと呈色も濃くなり、特に、腋窩の縫目部分において顕著であったとされる。

これをふまえ、小・中学校を対象に行われた授業実践では、児童・生徒らにアンケートを行い、汚染布採集、試薬の扱い、教材としての有用性を評価している。

人体汚れの視覚教材化として非常に意義のある研究である一方で、ニンヒドリン反応はあくまでアミノ酸を対象としているため、タンパク質と関連した呈色であるか疑問が残る。さらに、視覚教材を目的とした定性的な実験であり、定量分析までは発展していない。

2.5.2 ヘモグロビンをを用いたタンパク質汚染布^{18,19,41)}

大矢らは、成分が比較的単純であり、表面反射率から質量として汚れを定量し、洗浄率に換算可能な汚染布の作製を行い、その洗浄率の算出、化学定量との比較、汚染布としての評

価を試みている。汚れの種類として、固体粒子とタンパク質に注目し、タンパク質汚れモデルとして有色ヘモグロビンをを用いた。汚染基質は綿白布、ヘモグロビンは0.1N アンモニア水溶液に溶解した汚染液として付着させ、乾熱、蒸熱処理によって変性させて容易に除去されないようにしている。反射率の測定は、5枚の同系色の汚染布を重ねて測定し、K/S値から洗浄効率を求めた。化学定量法として、汚染布を0.1N水酸化ナトリウム水溶液中で高温振とう抽出を行い、銅-Folin法すなわちLowry法を用いて呈色しその吸光度を測定、検量線によってタンパク質量および洗浄効率を求めた。

この結果、汚染液の滴下方法や熱処理過程を工夫することで、反射率による洗浄率と化学定量による洗浄率に非常に高い相関を持たせることに成功した。しかし、ヘモグロビンは有色タンパク質であるゆえに、洗濯に使用される漂白剤成分、特に過酸化水素に大きく影響を受けることがわかり、脱色されてしまうことで、反射率で測定した場合に実際の付着量よりも少ない量として評価されることがわかった。このように、有色のタンパク質汚れを反射率測定という簡便な方法で定量する研究が試みられているものの、あくまで有色であるヘモグロビンを対象としているため、皮脂汚れに含まれるタンパク質や、ゼラチン等の無色のタンパク質の定量には不適であると言える。

2.5.3 ATR-赤外分光法を用いた汚れ成分の洗浄度の直接定量分析⁴²⁾

井坂らは、油性汚れ、タンパク質汚れを直接的かつ定量的に分析するための新規洗浄評価方法の開発を目的とし、洗浄前後の湿式人工汚染布表面のATR-FT/IRスペクトルを測定する方法を検討している。フーリエ変換赤外分光光度計により観測し、800~4000 cm^{-1} の波数範囲の測定を行い、油性汚れ成分由来の吸収帯とタンパク質汚れ由来の吸収帯(アミノIバンド)について面積強度から相対強度、洗浄率を求めている。複合汚れであっても簡便に判別できる利点があり、呈色反応等を利用しないため、試料に影響を与えず定量可能である一方、目視では付着の度合いは確認できない。また、油性汚れ、タンパク質汚れが布上に均一に付着していることを前提としており、付着の程度による誤差や、タンパク質種および布の繊維種による吸収帯および面積強度への影響等、今後検討されるべき要素が多く存在する。

2.5.4 ビシンコニン酸(BCA)を用いたタンパク質汚れの簡易評価⁴³⁻⁴⁵⁾

谷らは、無色タンパク質を対象とし、汚れモデルとしてアルブミン(ウシ血清由来)を使用して、BCA法で用いる試薬を汚染ろ紙上に滴下し、呈色反応の反射率を測定することで、タンパク質の直接定量を試みている。さらに、目視によるタンパク質量の判別、評価を目的として、呈色度合いの指標となるスケールの作製も行っている。無色のタンパク質を対象とし、呈色により付着箇所や程度の判別ができ、反射率による定量が可能である。また、抽出処理を行わないため再現性が高い方法であると考えられる。

ここで注目したいのは、汚染基質をろ紙としている点、そして、試薬を滴下した後の試料を静置する反応環境として、ガラスシャーレを用いている点の2つである。まず、基質とし

て用いたろ紙について、綿布等のセルロース繊維を簡潔にモデル化したものと捉えることが可能である一方、主に木材パルプを原料として処理され繊維方向は均一でなく、被服材料に用いられる繊維とは形状および製造処理が大きく異なる。そのため、ろ紙を用いた検討は、布とは物理的、化学的に性質の異なるものであり、そのまま綿布等の被服材料に適用することは困難であると考えられる。次に、シャーレ内で反応を進行していることは、反応中の試料観察ができる点で有用であるが、反射率の測定時にはシャーレからぬれた試料を取り出して、測定土台の透明フィルム上に移動させる必要がある。さらに、試料に直接測定部を付けて反射率を測定するため、反応液が過度にしみ出す恐れも考えられる。

最も注意すべきなのは、BCA 法は、前節で述べた通り還元反応が大きく関与していることである。すなわち、本来の測定方法である溶液系の反応であれば、吸光度測定セルの上部、溶液と空気との界面で酸化の影響が考えられるが、平面的な基質上では全面で酸化の影響が起り得るということになる。谷らの研究で行われている、シャーレ内の反応環境は、完全な開放状態ではないものの、空気中の酸素と触れる面積は明らかに大きいと言える。このことから、シャーレを用いた方法では空気中の酸素による一定の反応阻害が起り、反射率とタンパク質の付着量の相関性に影響を与えている可能性が考えられる。

以上のことから、従来の、布に付着したタンパク質を定量する方法には課題が多く、抽出操作を必要としない簡便な手順で、精度よく定量が可能な、新たな方法の開発が求められる。

本研究では、布帛上に付着した無色のタンパク質を、BCA 法を適用して直接、簡便に定量可能な方法を確認し、その影響要因を明らかにすることを目的とする。BCA 法は先述の通り、タンパク質との還元反応によって錯体形成が起り呈色する反応である。タンパク質の種類による呈色度合いへの影響や、界面活性剤等の共存物質による影響が比較的小さく、感度が良いことが特徴として挙げられる。布帛上のタンパク質を、BCA 法を用いて呈色させて表面反射率を測定することから、この定量法への影響要因として、反応の際の空気接触、タンパク質の種類、汚染基質となる布帛の種類への影響を論じる必要がある。さらに、洗浄研究に応用することを視野に入れ、洗浄剤に含まれる界面活性剤や酵素、皮脂等に含まれる脂肪酸汚れとの共存条件における、タンパク質の定量性についても検討する必要がある。

ここで、本研究で述べる「反応性」とは、布帛に付着させたタンパク質と C 液が反応し、発現した呈色度合いすなわち反射率および K/S と、タンパク質の付着量の相関関係の特徴を指す。わずかな付着量の差であっても反射率および K/S の数値の変化としてよく反映されることを、反応性が高い、良好な反応性を示す、と表す。また、実験方法の違いによる反射率および K/S とタンパク質付着量の相関関係を比較する場合は、実験方法による反応性の比較、と称する。

これらをふまえ、基本となる実験条件を決定した後、各要因について検討を行い、本研究の新たなタンパク質定量法としての有用性を明らかにした。

引用文献

- 1) 中西茂子, 岩崎芳枝, 齊藤昌子, 阿部幸子, 増子富美, 被服整理学, 朝倉書店, 2007年6月第17刷
- 2) 増子富美, 齊藤昌子, 牛腸ヒロミ, 米山雄二, 小林政司, 藤居真理子, 後藤純子, 梅澤典子, 生野晴美, 被服管理学, 朝倉書店, 2015年8月第4刷
- 3) 林雅子, 被服管理学および実験, 文化学園大学テキスタイル研究室, 2011年2月第5版
- 4) 皆川基, 重田美智子, 所康子, 奥山春彦, 藤居富美子, たん白質汚れの洗浄に関する研究(第2報)—卵白アルブミン汚染布の洗浄について—, 織消誌., 10(2), 66-74 (1969)
- 5) Murata. M.; Hoshino. E.; Suzuki. A., Some Facts on Residual Soils on Home-Laundared Dress Shirt Collars From a Home Laundry Test in Japan, J. Jpn. Oil Chem. Soc., 42(1), 2-9 (199) 3
- 6) 蓼沼裕彦, 衣料用洗剤の洗浄性能—洗浄力評価法および新しい洗剤機能に関して—, オレオサイエンス, 8(11), 487-493 (2008)
- 7) 後藤景子, 各種液体中における市販人工汚染布の洗浄性, 家政誌., 60(1), 11-18 (2009)
- 8) 大矢勝, 大島紀子, 理論的洗浄研究のための親水性固体粒子汚染布, 疎水性固体粒子汚染布, 及びたん白質汚染布の作製法, 家政誌., 61(8), 483-491 (2010)
- 9) 日本電色工業株式会社 Web サイト「色と光の知識」
(<https://nippondenshoku.co.jp/web/japanese/color>) 2022/11/29 参照
- 10) コニカミノルタ Web サイト「楽しく学べる知恵袋」色々雑学
(<https://www.konicaminolta.jp/instruments/knowledge/index.html>) 2022/11/29 参照
- 11) 品田空, Kubelka-Munk 理論とその応用, 色材協会誌, 42(10), 470-476 (1969)
- 12) 島津製作所 Web サイト サービス&サポート「FTIR 分析の基礎 拡散反射法」
(<https://www.an.shimadzu.co.jp/ftir/support/lib/ftirtalk/letter16/dr-iroha.htm>)
2022/11/29 参照
- 13) 中村妙子, 吉川清兵衛, 佐藤哲也, 寺主一成, 汚染評価法に関する一考察, 家政学雑誌, 37(4), 263-268 (1986)
- 14) 皆川基, 重田美智子, 所康子, 奥山春彦, たんぱく質汚れの洗浄に関する研究(第5報)—牛乳カゼイン汚染布の洗浄について—, 織消誌., 13(12), 519-529 (1972)
- 15) 皆川基, たん白質汚れの洗浄に関する研究—銅-Folin 試薬によるたん白質の定量について—, 大阪市立大学家政学部紀要, 20, 89-99 (1973)
- 16) 皆川基, 岡本幾子, 重田美智子, たん白質汚れの洗浄に関する研究(第8報)—頸部綿汚染布に付着する表皮角質層汚れの洗浄について—, 織消誌., 19, 420-430 (1978)
- 17) 杉原黎子, 藤谷健, 油脂・タンパク質共存汚染布のエイジングに伴う洗浄性の変化, 家政誌, 47, 243-246 (1996)
- 18) 大矢勝, 大島紀子. 理論的洗浄研究のための親水性固体粒子汚染布, 疎水性固体粒子汚

- 染布, 及びたん白質汚染布の作製法. 家政誌. 2010, Vol.61, 483-491
- 19) 黒野理枝, 大矢勝, 改良型ヘモグロビン汚染布の漂白試験への適合性, 織消誌., 54(8), 750-757 (2013)
 - 20) 奥村統, 徳山清孝, 阪谷武信, 鶴田康生, 新しい人工汚こう布に関する研究 (第1報), 油化学., 30(7), 432-441 (1981)
 - 21) 老川典夫, 大島敏久, 保川清, 三原久明, 宮原郁子, エッセンシャルタンパク質工学, 講談社, 2018年2月第1刷
 - 22) 猪飼篤, 伏見譲, 卜部格, 上野川修一, 中村春木, 浜窪隆雄, タンパク質の事典, 朝倉書店, 2008年7月初版
 - 22) 松尾聿朗, 犬飼則子, 皮表脂質の生理的役割, 油化学, 37(10), 827-831 (1988)
 - 24) 蓼沼裕彦, 皮脂汚れと漂白剤の働き(1), 洗濯の科学, 51(3), 2-6(2006)
 - 25) 坂本一民, 山下裕司編, 『化粧品科学へのいざない』シリーズ第3巻 肌/皮膚、毛髪と化粧品科学, 薬事日報社, 2018年4月第1刷
 - 26) MERCK web サイト 製品 細胞培養・細胞解析「アルブミン・輸送タンパク質」
(<https://www.sigmaaldrich.com/JP/ja/products/cell-culture-and-analysis/cell-culture-supplements-and-reagents/albumins-and-transport-proteins>) 2022/11/29 参照
 - 27) 皆川基, たん白質汚れの洗浄, 繊維誌. (繊維と工業), 40(10), 603-611 (1984)
 - 28) ライオン株式会社, 衣類用中性洗剤アクロン「衣替えの虫食い・黄ばみを防ぐには？」
(<https://acron.lion.co.jp/tips/change/>) 2022/11/20 参照
 - 29) 児玉美智子, 竹林新二, 城所俊一, 上平初穂, 有脂及び脱脂牛血清アルブミン (BSA) の熱構造転移と安定性, 熱測定, 19(4), 163-169 (1992)
 - 30) 鈴木祥夫, 総タンパク質の定量法, ふんせき, 517, 2-9 (2018)
 - 31) ThermoFisher SCIENTIFIC web サイト「BCA 法、Bradford 法、Lowry 法など、“総”タンパク質定量法の原理まとめ (<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/protein-basic4/>) 2022/11/6 参照
 - 32) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 72, 248-254 (1976)
 - 33) Waterborg, J.H.; Matthews, H.R.; Walker, J.M.; Kruger, N.J. “The Lowry Method for Protein Quantitation, The Bichinchoninic Acid(BCA) Assay for Protein Quantitation, The Bradford Method for Protein Quantitation” Basic Protein and Peptide Protocols. Methods in Molecular Biology Volume 32. J.M.Walker, Hatfield. Humana Press, 1-15 (1994)
 - 34) Olson, B. J. S. C.; Markwell, J. "Assays for Determination of Protein Concentration." Current Protocols in Protein Science. Hoboken. John Wiley & Sons, Inc., 1-29 (2007)
 - 35) 同仁化学研究所 web サイト 技術情報「プロトコル集」タンパク質を定量したい

(<https://www.dojindo.co.jp/technical/protocol.html>) 2022/11/29 参照

- 36) Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275 (1951)
- 37) Smith, P. K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A.K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N. M.; Olson, B.J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150, 76-85 (1985)
- 38) Reichelt, W.N.; Waldschitz, D.; Herwig, C.; Neutsch, L. Bioprocess monitoring: minimizing sample matrix effects for total protein quantification with bicinchoninic acid assay. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 1271-1280 (2016)
- 39) 高橋類子, 木村節子, 呈色反応による人体汚れの視覚化教材 (第1報), 新潟大学教育学部附属教育実践研究指導センター研究紀要, 5, 61-72 (1986)
- 40) 高橋類子, 津野敏江, 岸本洋子, 木村節子, 呈色反応による人体汚れの視覚化教材 (第2報) —義務教育における授業実践—, 新潟大学教育学部附属教育実践研究指導センター研究紀要, 6, 61-71 (1987)
- 41) Kurono. R.; Nishino. N.; Oya. M. Derivation of Quantitative Removal Efficiency of Protein Stain from K/S Value of Washing Test Fabric Soiled with Hemoglobin, *J. Oleo Sci.*, 62(4), 223-229(2013)
- 42) 井坂歩美, 大橋貴子, 小泉文佳, 藤原瑛右, 安藤慎治, 葛原垂起夫, ATR-赤外分光法を用いた汚れ成分の洗浄度の直接定量解析, *J. Fiber Sci. Technol.*, 77(6), 174-181(2021)
- 43) 谷道子, 森田みゆき, 被服教材のためのビシンコニン酸を用いたたんぱく質汚れの可視的評価における解析法の検討, *家庭科・家政教育研究*, 12, 11-17 (2017)
- 44) 細川朝子, 谷道子, 森田みゆき, 増淵哲子, 中学校の家庭科教材におけるたんぱく質可視化の試み, *北海道教育大学紀要 (教育科学編)*, 68(2), 387-396 (2018)
- 45) 谷道子, 森田みゆき, ビシンコニン酸を用いたたんぱく質汚れの簡易評価, *家政誌.*, 69, 238-242 (2018)

第3章

実験方法の検討

第3章 実験方法の検討

3.1 目的

第2章で述べたように、基本的に無色の、布帛に付着した状態であるタンパク質を定量評価するためには、布からタンパク質を抽出し、抽出液を分光分析し定量する方法が用いられる。しかし、この方法では時間を要し、測定誤差が生じやすいため、繰り返し数が要求される洗浄研究には適していない。本研究は、ビスコニン酸を用いたタンパク質定量法（BCA法）に着目し、この方法を布帛に付着したタンパク質に適用することで呈色反応させ、その呈色度合いを表面反射率測定によって数値化することで、布帛上のタンパク質を直接定量することを試みた。BCA法を布帛上のタンパク質定量に適用する際に考えられる影響因子として、反応を進行させる際の反応環境中における空気接触、布帛上に付着したタンパク質の経時変化、試薬量、反応時間および温度が挙げられる。そこで、本章ではこれらの影響因子について検討し、その上で布帛上に付着したタンパク質をBCA法で直接定量する際の実験条件について検討した。

3.2 実験

3.2.1 試薬

タンパク質には、溶液系タンパク質の研究で多用されているウシ血清アルブミン（富士フィルム和光純薬製、結晶品、生化学用、分子量約66,000）を用い、0.02~0.50%（w/v）の水溶液を調製した。水は、蒸留水を超純水装置（Simplicity UV、メルク製）で処理したものを使用した。水溶液のpHは5.8~5.9であった。

BCA反応に用いる試薬は、ビスコニン酸ナトリウム（Thermo Science製）1g、炭酸ナトリウム1.71g、酒石酸ナトリウム二水和物0.16g、水酸化ナトリウム0.4g、炭酸水素ナトリウム0.95gを水95mLに溶解し、最後に50%水酸化ナトリウム水溶液を添加してpH11.25とし、これをA液とした。硫酸銅五水和物0.4gを水9.6mLに溶解し、これをB液とした。実験当日にこれらA液とB液を50:1（v/v）に混合してC液を調製して用いた。なお、試薬は特に明記していないものは、富士フィルム和光純薬製の特級を用いた。

3.2.2 試験布の作製

タンパク質を付着させる基質にはJIS染色堅牢度試験用の綿布（綿カナキン3号、糸密度タテ29本/cm、ヨコ26本/cm、厚さ0.23mm、日本規格協会）を使用した。綿布は、エタノールと水=1:1（v/v）の混合液に浸漬し、軽く攪拌後、食品保存用フィルム（以下、ラップ）で密閉し、室温で12時間以上静置した後、自然乾燥して精練を行った。この綿布を2.5cm×2.5cmに裁断し、実験に用いた。

3.2.3 反射率の測定

試験布がBCA反応により呈色した度合いは、ハンディ型分光色差計（NF555、日本電色

工業製) および専用ソフト (ColorMate Pro、同社製) を使用し、反射率を測定した。測定条件は光源 D65、視野 10°、ジオメトリ 0:45C、測定波長 560nm とした。この測定波長は BCA-Cu 錯体の最大吸収波長 562nm に準じたものである。反射率は白厚紙 (560nm における反射率 82.5~83.4%) の上に試験布を置き、色差計の測定部の先端を試験布に垂直に密着させ、試験布 1 枚につき 4 か所を測定し、その平均値を求めた。

3.2.4 試験布上での BCA 反応

谷ら¹⁾の研究方法を参考にシャーレを用いた方法 (容器法) および空気の影響を考慮し、シートを用いた方法 (シート法) を以下のように行った。

(1) 容器法

直径 8cm、高さ 2cm のシャーレ内にラップ (ポリエチレン (PE) 製、宇部フィルム) を敷いて試験布を置き、その上に所定濃度のウシ血清アルブミン溶液をマイクロシリンジで 4.8 μ L/cm² 滴下した。シャーレの蓋を閉めて 5 分静置後、この試験布に C 液を 24 μ L/cm² 滴下してすぐにシャーレの蓋をし、25°C の低温恒温槽 (IN604N、ヤマト科学製) 内に所定時間静置して反応させた。測定は、試験布をラップごと白厚紙の上に移動し、試験布の上方から直接測定部を試験布に当てて行い、反射率を求めた (Fig. 3-1)。

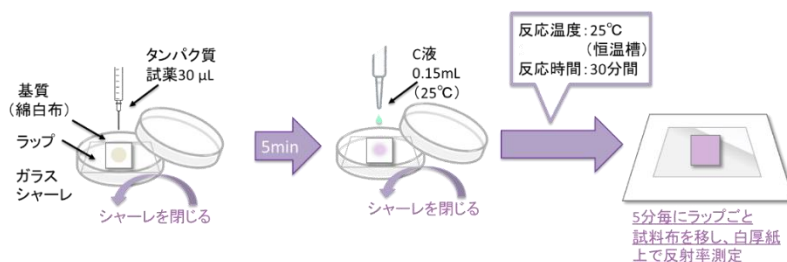


Fig. 3-1 Flowchart of container method experiment.

(2) シート法

二つに折りたたまれた透明シート (4cm \times 5.5cm、厚さ 0.04mm、PE 製、日本生産社製) を開いて、片側に試験布を置き、湿潤用の水を 8.0 μ L/cm²、および所定濃度のウシ血清アルブミン溶液をマイクロシリンジで 4.8 μ L/cm² 滴下した。直ぐにシートを折り、試験布を挟み 5 分静置後、シートを開いて C 液を 24 μ L/cm² 滴下し、再びシートを閉じて 25°C の低温恒温槽に静置して反応させた。シートに挟まれた試験布を白厚紙上に置き、シートの上から直接反射率を測定した (Fig. 3-2)。

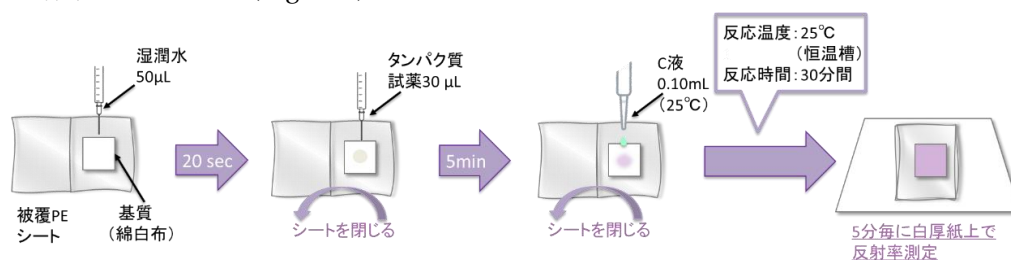


Fig. 3-2 Flowchart of sheet method experiment.

(3) タンパク質試薬のエージングの影響

被服に付着する実際のタンパク質汚れを考える時、多くは付着後時間が経過し、乾燥状態である。これをふまえ、アルブミン量 $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ を布帛に付着させ、室温 ($27\pm 2^\circ\text{C}$) にて自然乾燥し、実験当日から最長 31 日間保存した。エージングを行った試験布を用いてシート法により BCA 反応を行い、反射率測定を行って、呈色に及ぼすエージング時間の影響を評価し、本研究の実験方法として適する条件を検討した。なお、測定時に滴下する試薬量は、エージングによる水分率に干渉しないよう、C 液のみが十分に試験布へ浸透することを考慮し 0.15mL とした。

(4) シート法における湿潤水および C 液量の検討

シート法は容器法よりも密閉度が高く、試薬の水分率は低下しにくく、試薬液が浸透しやすい環境であると考えられる。試験布にアルブミン溶液が均一に浸透するための湿潤水の量を 8.0 、 16 、 $24\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、および BCA 反応の C 液量を 8.0 、 16 、 24 、 $32\mu\text{L}/\text{cm}^2$ と変化させて、呈色反応に適する湿潤水量および C 液量を検討した。

(5) シート法における反応温度および反応時間の検討

(4) の検討で得られた最適な湿潤水量および試薬量において、反応温度を 5 、 15 、 25 、 37°C 、および反応時間 $0\sim 40$ 分の範囲で変化させ、反応温度および反応時間による呈色反応への影響を検討した。

3.3 結果および考察

3.3.1 容器法とシート法の反応環境による BCA 反応への影響

容器法とシート法における反射率の測定結果を比較するにあたり、測定の基本的な条件が異なっていることから、まず、両法における反射率測定時の影響を検討した。容器法は、ぬれている試験布をシャーレから取り出し、直接測定部を接触させて反射率測定を行っている。一方、シート法では透明シートで試験布を挟みその上から測定している、という点が異なっている。

アルブミン試薬を添加しない綿白布に C 液を滴下し、直後の反射率を測定した結果、容器法では 75% に対して、シート法では 70% であり、シート法は反射率が 5% 低下し、用いているポリエチレンシートが反射光を減少させていることがわかった。

次に、試験布にアルブミン量 4.8 と $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ を付着させ、両法を用いて 25°C で 40 分間反応させたときの反射率を測定した。その結果を Fig. 3-3 に示す。

容器法とシート法の反射率は反応時間とともに反射率は低下し、 30 分以上で鈍化する傾向にあった。しかし、 4.8 と $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のいずれのアルブミン量でも、容器法よりもシート法の場合には、反応時間とともに 5% 以上の差が広がった。これは、シート自体による光反射の影響だけでなく、容器法の場合には空気酸化の影響を受けて、呈色反応がシート法より

も阻害されたためと考えられる (Fig. 3-4)。

以上より、容器法は空気による一定の影響を受けて呈色反応の進行に遅れが生じた一方で、シート法は空気との接触を最小限にすることで、従来の容器法より高い反応性が得られることがわかった。また、反応時間は容器法と同様 30 分で良いことがわかった。

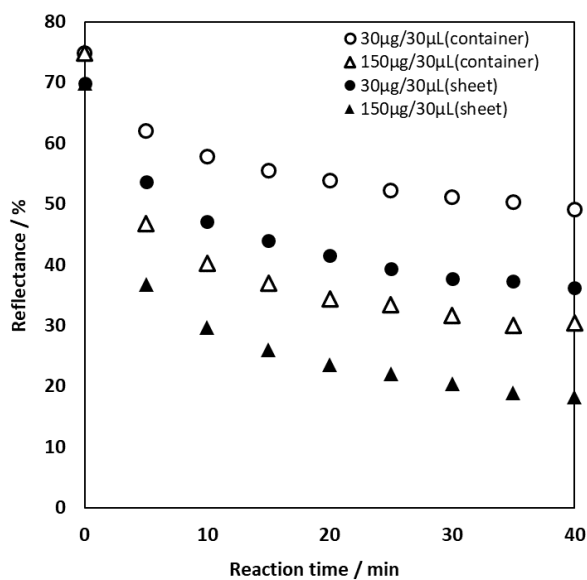


Fig. 3-3 Reflectance for each reaction time by the container method and the sheet method. ($N \geq 4$)

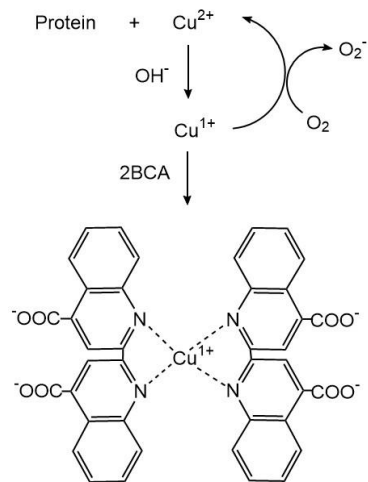


Fig. 3-4 BCA reduction reaction cycle and the effect of oxygen in the air.

3.3.2 タンパク質試薬のエージングによる反射率の変化

シート法において、タンパク質試薬滴下後からのエージング日数が及ぼす反射率への影響を検討した。エージング日数による反射率への影響を、Fig. 3-5 に示す。

エージングが0～13日の間では、反射率20～22%であり、エージング0日の値とほぼ変わらなかった。エージングが17日以降では、反射率24～26%と若干増加を示した。これは乾燥時間が長い程エージングすなわちアルブミンの変性が進行するとともに試料中の水分率が低下し、乾燥時間が短い程エージングの影響は小さく、水分率が多くなるためと考えられる。

以上の結果から、タンパク質を布に付着してからのエージングによる反射率への影響はわずかにみられるものの、タンパク質試薬滴下からおおよそ10日間以内ならば、タンパク変性による大きな影響はないことがわかった。また、シート法は付着後時間が経過した乾燥タンパク質に対しても適用可能であることが示された。

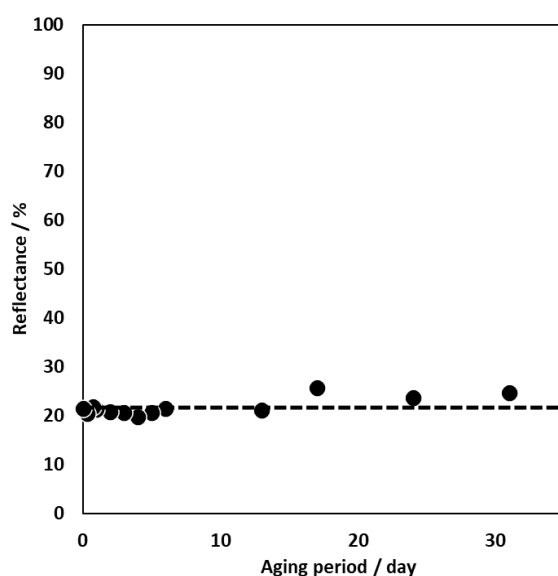


Fig. 3-5 Reflectance for each aging period after albumin adhesion.
(N≧4)(Reflectance of white cardboard : 75.7%)

3.3.3 シート法における湿潤水とC液量の検討

(1) 湿潤水量の検討

シート法は容器法より密閉度が高いため、水分は蒸発しにくい環境である。そこで、試験布に対してウシ血清アルブミン溶液が均一に浸透するための湿潤水の量、およびBCA反応のC液量を改めて検討した。アルブミン量を3.8および24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ として、湿潤水量を0～24 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ と変えてBCA反応を行った時の結果をFig. 3-6に示す。図中のエラーバーは、1枚の試験布中における4か所の反射率のバラつきを示す標準偏差である。

湿潤水量が0 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ ではタンパク質溶液浸透が均一でなく、全体として白っぽく、明ら

かにムラが見られた。16 および 24 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ では、反射率に 1.7~2.9%の変動が見られ呈色が均一でないことがわかる。また、試薬が試験布から多量にしみ出してしまうために、本来の色相より反射率の数値として淡色に表れたと考える。一方、湿潤水量 8.0 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の場合、アルブミン量 4.8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ および 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のいずれにおいても標準偏差が 0.1~0.3 であり、均一な呈色を示すことがわかった。

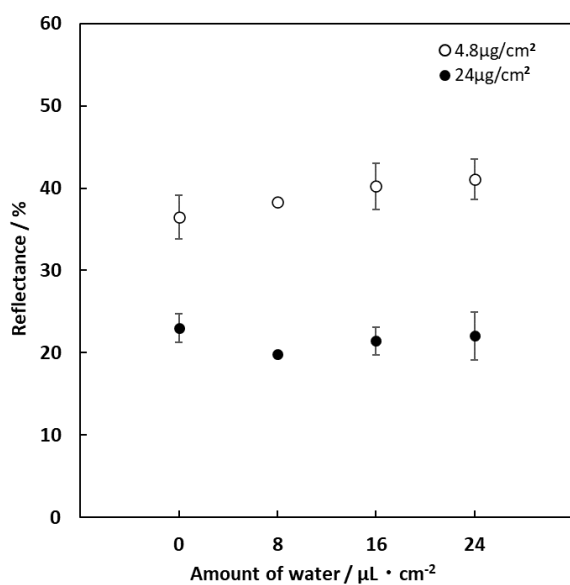


Fig. 3-6 Effect of amount of moist water on reflectance. ($N \geq 4$)

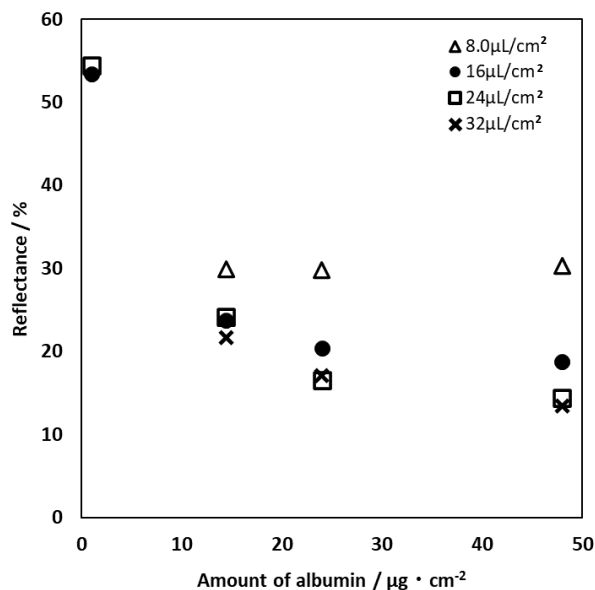


Fig. 3-7 Effect of amount of reagent C on reflectance. ($N \geq 4$)

(2) C液量の検討

C液量はタンパク質分子の量に応じて BCA-Cu 錯体が形成され呈色を示すよう、タンパク質量に対して充分量とする条件が必要である。ただし、3.3.3(1)で述べた湿潤水の影響からわかったように、シートからしみ出さないことが望ましい。そこで、アルブミン量 14、19、24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、および C液量 8.0、16、24、32 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ とした場合の呈色による反射率を測定した。その結果を Fig. 3-7 へ示す。

容器法では C液量を 24 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ が最適としていた¹⁾が、シート法では、アルブミン量に関わらず、24 および 32 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の場合でほぼ同じ反射率を示した。しかし、24 および 32 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ では反射率の測定時にシートから試薬がしみ出る様子が見られ、シート法では過剰量であることがわかった。一方、C液が 16 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ の場合、しみ出しも無く、試験布に均一に浸透している様子が確認できた。アルブミン量が 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上において反射率の変動は大きくないものの、アルブミン量に応じた値の低下が確認でき、アルブミンとの反応は過不足ない量であることが明らかとなった。

なお、C液が 8.0 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ と少ない場合では、均一に試験布に行き渡らず滴下した部分のみで反応が進行してムラが発生してしまい、条件として適していなかった。

以上の結果より、シート法では湿潤水 8.0 μ L/cm²、C液 16 μ L/cm²が最適であることがわかった。

3.3.4 反応温度と時間

以上の検討により明らかとなったシート法の良い条件において、アルブミン量を変化させ、反応温度を 5~37 $^{\circ}$ Cとして反応時間 30 分時点の反射率を測定した。その結果を、Fig. 3-8 に示す。

いずれのタンパク質量においても、反応温度が高くなるほど反射率が低下し、呈色が濃くなった。温度の低い 5 $^{\circ}$ Cと 15 $^{\circ}$ Cの場合は反射率の低下は小さくなり、一方、25 $^{\circ}$ Cと 37 $^{\circ}$ Cの反応温度ではアルブミン量の増加に従って反射率の低下が著しく、24 μ g/cm²以上で反射率の下げ止まりが見られた。これは、温度上昇により BCA 反応サイクルが活性化し、錯体形成が促進されて呈色が進むため、一定の錯体形成が進むと、未反応のタンパク質と銅 (II) イオン量が少なくなり、反射率がほぼ一定になったと考える。

温度によって反応速度をコントロールできる点は、高濃度のタンパク質濃度範囲では、反応温度を低く設定することで反応を緩やかにして、濃度差を表すことができると考えられる。また、低濃度のタンパク質濃度範囲では反応温度を 25 $^{\circ}$ C以上に設定することで、感度良く濃度差を表すことができることが示唆された。すなわち、タンパク質の定量範囲を広げる可能性を示すものであり、また室温に近い 25 $^{\circ}$ Cで十分な呈色反応が進むことは、本方法の特徴と考える。簡便な操作性を得ることを考慮し、反応温度は 25 $^{\circ}$ Cとし 30 分間の条件が適すると判断した。

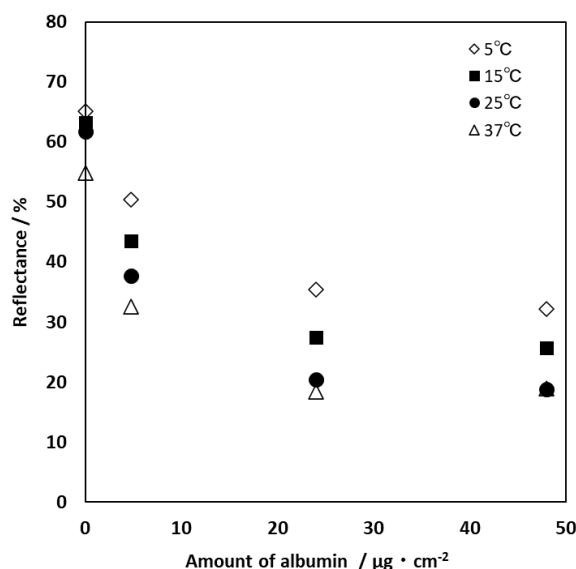


Fig. 3-8 Effect of albumin concentration at each reaction temperature on reflectance. (N \geq 4)

3.3.5 容器法およびシート法によるタンパク質の検量線

染色分野において布に吸着した染料の量は、染色布の反射率から求められる K/S 値と相関することがわかっている²⁾。そこで、容器法およびシート法を用いたアルブミン量 0.96～24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲における反射率を用いて K/S 値を求め、アルブミン量との関係を整理した。反射率とアルブミン量との関係を求めた結果を Fig. 3-9、さらに、反射率から K/S 値を算出し、K/S 値とアルブミン量との関係を求めた結果を Fig. 3-10 に示す。なお、アルブミン量が 0 のとき、綿白布自体は C 液滴下後 30 分間の反応で淡く呈色し、反射率は平均して 61.3%を示した。これは、綿白布に含有されるタンパク質またはセルロース分子上の一部の官能基との反応に由来すると考えられるが、タンパク質の定量性には影響がないと考える。

容器法の検量線は全体として良好な直線性を示しているが、傾きがシート法よりも小さく、K/S 値のわずかな変化でもタンパク質濃度が大きく変わってしまうため、精度的にあまり好ましくないことがわかった。一方、シート法では空気の接触が避けられることから還元反応が進行し、アルブミン量に対し K/S 値が高くなり、14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上では反射率の増加は緩やかになるため、K/S 値もアルブミン量が増加するに従い曲線を描いた。しかしながら、0.96～14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲において、容器法よりも検量線の傾きが大きく、良好な直線性を示した。この検量線の相関式は下記のようになり、相関係数 (R2) は 0.9974 と良好な相関を示した。

$$y=0.0784x + 0.1326 \quad (R2=0.9974)$$

以上より、シート法は低濃度のタンパク質であっても感度良く呈色することから、従来よりも精度が高く、アルブミン量 0.96～14 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の定量方法として適することがわかった。

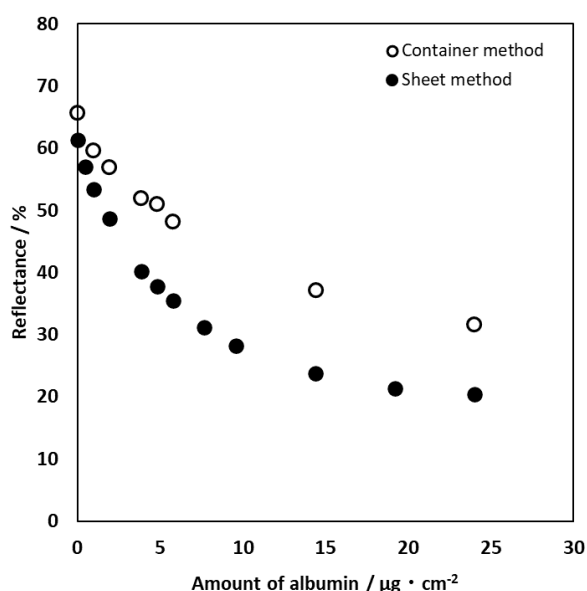


Fig. 3-9 Reflectance for each albumin amount by the container method and the sheet method. (N \geq 4)

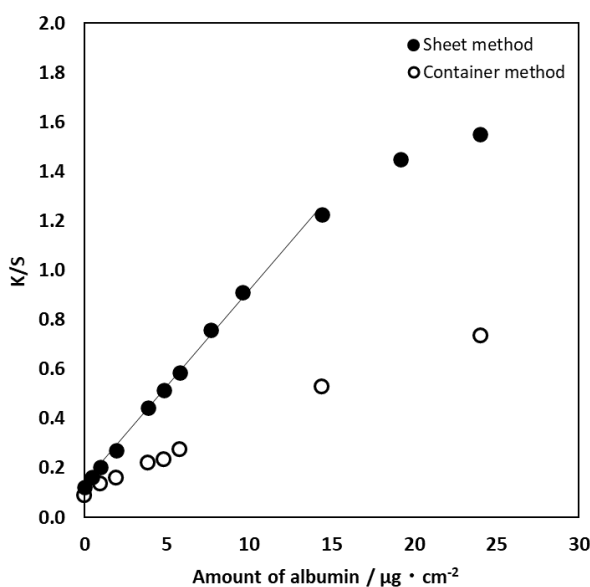


Fig. 3-10 Calibration curve for albumin amount and K/S value.

3.4 結論

本研究の基礎となる、BCA 反応を利用した布帛上のタンパク質を定量する実験手順を決定するため、容器法およびシート法の反応環境の比較、シート法におけるタンパク質試薬のエイジング時間による影響、試薬量および反応温度と時間の検討を行ったところ、以下の点が明らかになった。

容器法ではシャーレ内の空気接触の影響で反射率が高くなることが明らかとなり、試験布表面を透明シートで被覆するシート法が、本研究の方法として適することがわかり、今後の検討で用いることとした。

実際のタンパク質汚れを想定し、アルブミンを試験布に付着させてからのエイジングによる呈色反応への影響は、エイジングが約 10 日以内では、BCA 反応への影響が見られず、それ以上ではわずかに反射率が増加し呈色は薄くなった。これより、タンパク質を付着させた布は、エイジングを考慮し、早めに実験に使用するのが良いことがわかった。したがって、本論文の以下の章では実験時にタンパク質を付着させて実験に用いることとした。

また、シート法は、反射率から求められる K/S 値とタンパク質量との関係が良好な検量線 ($0.96 \sim 14 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲で $R^2=0.9974$) が得られ、容器法よりも精度が高く定量可能であることがわかった。このシート法の実験条件としては、 $2.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ の綿白布を試験布として、湿潤水 $8.0 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、タンパク質試薬 $4.8 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、C 液 $16 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ を、反応温度 25°C 、反応時間を 30 分とする条件が良好であることがわかった。

引用文献

- 1) Tani, M.; Amemiya, T.; Tsukazaki, M.; Matsuda, M.; Morita, M. Direct Determination of Protein Soil on the Fabric by the Reduction of Bicinchoninic Acid, Nihon Kasei Gakkaishi (J. Home Econ.Jpn.), 71, 464-469(2020)
- 2) 中西茂子, 岩崎芳枝, 齊藤昌子, 阿部幸子, 増子富美, 被服整理学, 朝倉書店, 2007年6月第17刷

第4章

タンパク質の種類による影響

第4章 タンパク質の種類による影響

4.1 目的

BCA 法はタンパク質を構成するアミノ酸のシステイン、シスチン、チロシン、トリプトファン基と反応し、タンパク質種の違いによる影響が他の定量方法よりも比較的少ないといわれている。しかし、実際の被服に付着するタンパク質汚れは、人体由来、食品等の外部環境由来のものがあり、その種類は多岐にわたる。第3章において、タンパク質にウシ血清アルブミンを用い、布帛上に付着したタンパク質を BCA 反応により定量する方法を確立したが、本法を洗浄研究に用いるには、先述のように汚れとして想定される多種類のタンパク質に対する適用可能性について検討する必要がある。

そこで本章では、被服に付着するタンパク質汚れとして、乳製品由来のカゼイン、食品増粘剤に用いられるゼラチン、皮膚の角質細胞由来であるケラチンを取り上げ、第3章で用いたウシ血清アルブミンと比較し、反応性の違いを検討した。

4.2 実験

4.2.1 試薬

(1) タンパク質試薬

カゼイン（乳由来、化学用、富士フィルム和光純薬製）、ゼラチン（和光一級、富士フィルム和光純薬製、以降ゼラチン w とする）、および低エンドトキシゲンゼラチン（製品名「メディゼラチン（HMG-BP）」）、豚皮由来、分子量約 100,000、以降ゼラチン N とする）、ケラチン（羊毛由来、純度表記なし、東京化成工業製）を用いた。それぞれのタンパク質は以下のように溶液調製し、冷蔵保管をして実験に用いた。

カゼイン溶液： カゼイン 2.000g に、25% (w/v) NaOH 水溶液 0.4mL と水 10mL の混合液を加えて 5 分以上攪拌した後、約 20mL の水を加えて振り交ぜ、室温暗所 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) に 3 時間静置した。カゼインが溶解したことを確認し、100ml メスフラスコでメスアップして 2.00%(w/v)濃度の母液とし、希釈して用いた。

ゼラチン溶液： 2 種類のゼラチンはいずれも 2.000g を 50mL 程度の水で膨潤させて 60°C の恒温水槽で 45 分保温し、さらに 2 時間室温で時々攪拌して溶解、放冷させ、100mL メスアップして 2.00%(w/v)濃度として母液とした。このように調製した 2 種類のゼラチン母液は、調製当日中に母液を希釈して実験に用いた。

ケラチン分散液： ケラチンは水不溶性の粉末状であるため、1.00%(w/v)分散液を調製し、これを母液とした。母液は使用する前に超音波を用いて粒子を十分に分散し、分取・希釈して用いた。

(2) BCA 試薬

第3章と同様に、ピシニコニン酸ナトリウムを用いて A 液を、硫酸銅 (II) 五水和物を用いて B 液を調製し、実験当日に A 液 : B 液を 50 : 1 (v/v) に混合して C 液を調製した。

4.2.2 方法

第3章で述べたシート法を用いた。シートの半分の部分に 2.5cm×2.5cm の試験布 (JIS 染色堅牢度試験用綿布を精練処理したもの) を置き、マイクロシリンジで水 8.0 μ L/cm²、さらに各濃度のタンパク質溶液を 4.8 μ L/cm² を滴下した。直ぐに、シートを中央部分で二つ折りにして試験布を挟み、5 分静置した後、シートを開いてマイクロピペットで C 液を 24 μ L/cm² 滴下した。再びシートを閉じて、25°C の低温恒温器 (IN604N、ヤマト科学製) に静置して反応させ、30 分後の反射率を測定した。

反射率測定の際には、シートに挟まれた試験布を白色厚紙 (反射率 83%) の上に置いた。ハンディ型分光色差計 (NF555、日本電色工業製) および専用ソフト (ColorMate Pro、同社製) を使い、シートの上から測定した。反射率は試験布 1 枚につき 4 か所を測定し、その平均値を用いた。

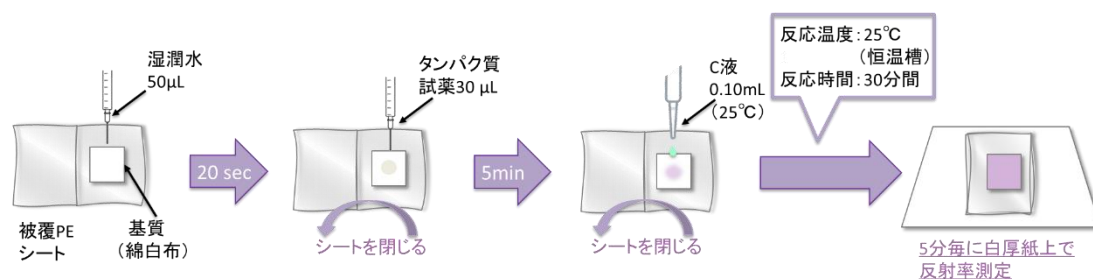


Fig. 4-1 Flowchart of protein types experiment.

4.3 結果

4.3.1 タンパク質の種類による BCA 反応への影響

各タンパク質について、24 μ g/cm² 附着させ、BCA 反応を行った試験布の測定波長に対する反射率曲線を Fig. 4-2 へ示す。いずれのタンパク質も 560nm において極小値をとり、480、680nm で極大値をとる緩やかな曲線となった。ゼラチン 2 種以外のタンパク質では反射率曲線の特徴的な変形は見られなかったが、ゼラチン 2 種は、540nm と 560nm の反射率が非常に近くなった。全体として、反射率が高い順に、ゼラチン (w、N とともに)、間を空けてカゼイン、ケラチン、アルブミンとなり、後者 2 種は値が近接するが、アルブミンが最も低い値を示した。

また、呈色の色彩について表色系 a*b* を測定し、その関係を Fig. 4-3 に示す。カゼイン、ケラチン、アルブミンは、a* が正、b* 値が負に、15~20 の同程度の値をとり、グラフ上で一直線上にプロットされていることから、これらは赤み青みのバランスの取れた紫色に呈色し、これらのタンパク質の種類による色彩の大きな変化はないことがわかる。一方、ゼラチン 2 種は、前者のタンパク質 3 種と比較すると、b* 値よりも a* 値がわずかに低く、相対的に青みのある、彩度が低い紫であり、グラフの直線上からわずかに外れた。この結果は、目視による観察結果と一致する。

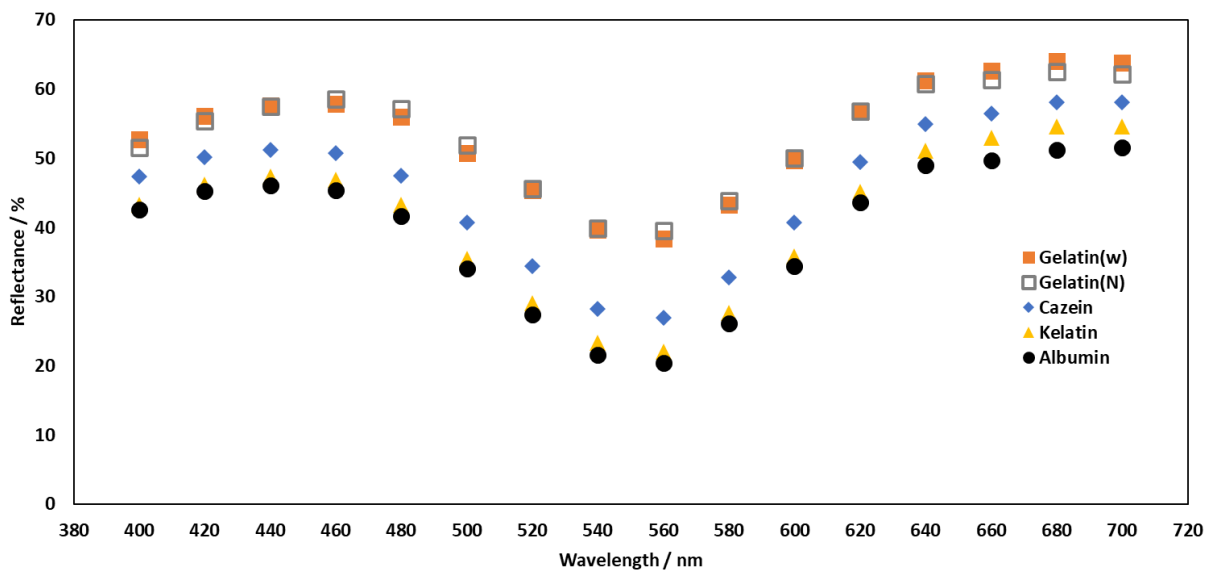


Fig.4-2 Spectral curves for different protein types at $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ adhesion.
(albumin $N \geq 4$, other proteins $N=8$)

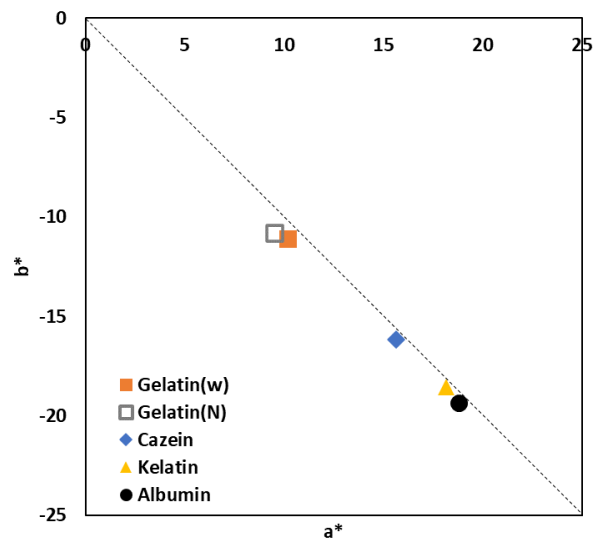


Fig.4-3 Scatter plot of a^*b^* values for different protein types
at $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ adhesion. (albumin $N \geq 4$, other proteins $N=8$)

各タンパク質量が $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の場合における、反応時間による反射率の変化を Fig. 4-4 に示す。ゼラチン 2 種は、経時による反射率が低下する幅が小さく、30 分時点で他のタンパク質よりも呈色が淡いことがわかる。次に、カゼインに注目すると、反応開始後 5 分で、アルブミンと同様に反射率が急速に低下しているが、これ以降は反射率の低下幅が小さくなり、ゼラチンに次いで反射率は高くなっている。最後に、ケラチンは反応 5 分から 25 分の間で、他のタンパク質とは異なり反射率の低下幅が大きく、30 分時点の反射率はアルブミンと近似した低い値となっている。

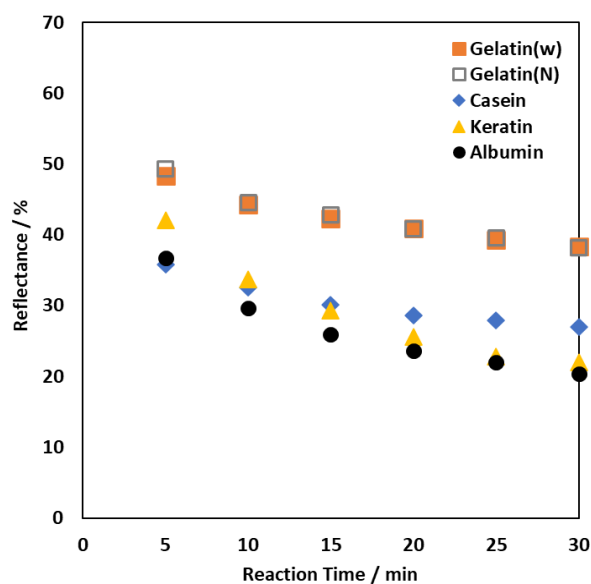


Fig. 4-4 Reflectance of protein types for each reaction time at $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ adhesion. (albumin $N \geq 4$, other proteins $N=8$)

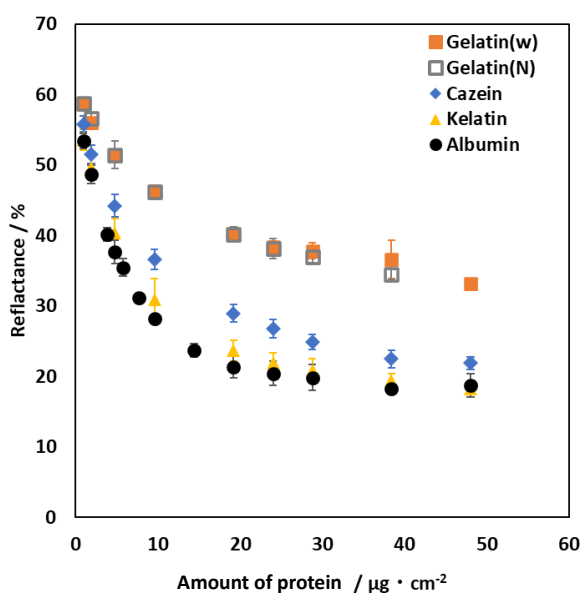


Fig. 4-5 Reflectance of protein types for each protein concentration. (albumin $N \geq 4$, other proteins $N=8$)

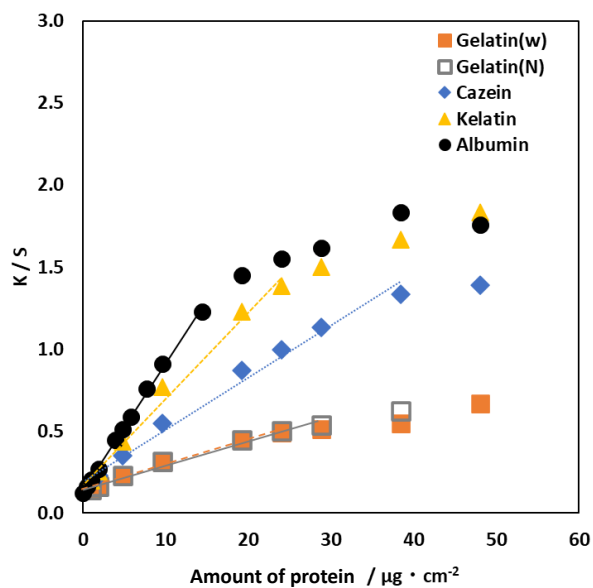


Fig. 4-6 K/S value of protein types for each protein concentration.

各タンパク質における付着量と反射率の関係を Fig. 4-5 に示す。ゼラチン 2 種は、最も付着量が少ない $0.48\mu\text{g}/\text{cm}^2$ から最も多い $48\mu\text{g}/\text{cm}^2$ にかけて、59%から 33%までの範囲で反射率が低下しており、他のタンパク質と比較し反射率が高くなった。カゼイン、ケラチン、アルブミンの 3 種は付着量の増加に従い、反射率が 57%から約 20%へ大きく低下し、特にケラチン、アルブミンは非常に近似した値を示した。 $38.4\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以降の付着量では値に大きな変化がなく、ほぼ平衡となった。

4.3.2 K/S 値とアルブミン濃度との相関

反射率から K/S 値を算出し、タンパク質付着量との相関を示した図を Fig. 4-6 に示す。各タンパク質において、第 3 章で求めたアルブミンの検量線と同様に、相関関係が良好、すなわち相関係数 $R^2 \geq 0.99$ を満たす付着量範囲の検量線式と R^2 値を求めた。その結果、検量線の傾きは、アルブミン、ケラチン、カゼイン、ゼラチンの順に小さくなった。最も傾きの大きいアルブミンは 0.07 であるのに対し、最も小さいゼラチン (w) は 0.14 と、傾きの値に 5 倍近い差が見られた。また、タンパク質の種類によって R^2 値の基準を満たす付着量の範囲は異なり、アルブミン、ケラチン、ゼラチン 2 種、カゼインの順に範囲は広がった。最も付着量の範囲が広いタンパク質はカゼインであり、最大で $38.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となった。

4.4 考察

第 2 章で述べた通り、BCA 法は他の定量法と比較してタンパク質の種類による呈色の差が小さいとされているが、本章の結果では反応性に相違が見られた。BCA 法はタンパク質の特定のアミノ酸、システイン、シスチン、チロシン、トリプトファンによって銅イオンの還元を利用している²⁻⁴⁾ことをふまえると、本法における各タンパク質の反応性の違いは末端アミノ基の影響を大きく反映していると考えられる。

次に、タンパク質のアミノ酸組成をふまえ、この反応性の相違について考察する。

ウシ血清アルブミンの場合は、一次構造中に 1 個のシステイン基を有し、高次構造では、疎水性ポケットと呼ばれる部位 (空孔) で種々のイオン及び分子種に結合する、輸送タンパク質としての性質を持つ⁵⁾。分子量は約 66,000 であり⁶⁾、1 分子中に、BCA 法で強く呈色するとされるシステイン基を多く持つと言えることから、呈色は他タンパク質と比較して濃く、反射率が低くなったことが考えられる。

乳由来カゼインは 20 種以上の構造が確認されており、そのうち、代表的な一次構造がいくつか存在する。同一タンパク質中に様々な構造が混在するため、分子量は約 19,000~25,000 と幅がある。分子量の大きさがアルブミンより小さく、画一的なアミノ酸配列ではない点から、アルブミンよりも呈色は薄くなったと考えられる。なお、カゼインはカルシウムイオン (Ca^{2+}) が大量に結合したものが凝集体を形成する⁸⁾とされるため、同価の C 液中に含まれる銅 (II) イオンへの影響が予想されたが、結果として反射率へ顕著な影響はないことがわかった。

ゼラチンは、コラーゲンを多量に含む動物の結合組織を、酸またはアルカリで前処理した後、熱水 (50~80°C) で抽出して生成するタンパク質である。末端アミノ酸にチロシン基は存在するが、システイン、シスチン、トリプトファン基は含まれないことがわかっている^{9、10)}。そのため、他のタンパク質と比較し呈色が最も薄く、反射率が高くなったと考えられる。この点について、BCA 法を発表した Piece らによると、溶液吸光光度法でもゼラチンはウシ血清アルブミンの吸光度より約 70% 低く、呈色が淡いことが示され、その理由としてシステインをはじめとする特定のアミノ酸の影響を挙げている¹¹⁾。これは本研究の結果を裏

付けるものであると考えられる。

ケラチンは、モノマーがジスルフィド結合 (S-S) により三次元的に架橋している重合体である。還元反応によって結合が切れ、2 個のシステイン基を生じる。全アミノ酸組成のうち、システイン基が 13% と最も多く、トリプトファン基が 2% 存在する^{12,13)}。そのため、アルブミン同様に BCA 法で強く呈色するアミノ酸配列をもつことから、アルブミンと同様の反応性を示したと考えられる。今回使用した試薬は分散液であるため、微細粒子として綿繊維上に付着している状態であったと推測される。しかし、分散液を滴下した表面のみで呈色しているのではなく、他のタンパク質同様に試験布全体が呈色していたことから、ケラチン分散液は試験布全体へ均一に浸透できているものと推察できる。

以上より、本法において、定量対象とするタンパク質の種類によって反応性に違いが見られ、検量線の傾き、精度が保持される濃度範囲が異なることがわかった。そのため、定量対象とするタンパク質の種類が明らかになっている場合、あらかじめ検量線を作製した上で測定を行うことで、精度の高い定量が可能になると考える。

4.5 結論

第 3 章で決定した布帛上のタンパク質直接定量法を基に、外部環境および人体から被服に付着するタンパク質汚れとして、カゼイン、ゼラチン、ケラチンの 3 種のタンパク質を用い、標準タンパク質として用いてきたウシ血清アルブミンと反射率を比較し、反応性の違いを検討した。その結果、対象とするタンパク質のアミノ酸組成において、BCA 法が反応するシステイン、シスチン、チロシン、トリプトファン基が多く存在することより、反応性が高くなることが明らかになった。アルブミンが最も反応性が高く、次いでケラチン、カゼインが良好な反応性を示した。対照的に、これらのアミノ酸がほとんど存在しないゼラチンは反射率が高く、色相はわずかに青みがかっているという特徴が見られ、反応性は低くなった。したがって、本法は吸光光度法の BCA 法と同様の特徴を有するとともに、アルブミン以外のタンパク質定量も可能である汎用性が明らかとなった。タンパク質の種類によってあらかじめ検量線を作製した上で測定を行うことで、精度の高い定量が可能になることがわかった。

引用文献

- 1) 株式会社ニッピ web サイト「製品情報」ゼラチン製品, 低エンドトキシンゼラチン (<https://www.nippi-inc.co.jp/product/chemistry/tabid/196/Default.aspx>)
2022/11/6 参照
- 2) 鈴木祥夫, 総タンパク質の定量法, ぶんせき, 517, 2-9 (2018)
- 3) ThermoFisher SCIENTIFIC web サイト「BCA 法、Bradford 法、Lowry 法など、“総”タンパク質定量法の原理まとめ (<https://www.thermofisher.com/blog/learning-at-the-bench/protein-basic4/>) 2022/11/6 参照
- 4) (公財) 日本分析化学会編, タンパク質分析, 丸善出版, p.13-14, 平成 24 年 11 月
- 5) 猪飼篤, 伏見譲, 卜部格, 上野川修一, 中村春木, 浜窪隆雄, タンパク質の事典, 朝倉書店, 2008 年 7 月初版
- 6) 児玉美智子, 竹林新二, 城所俊一, 上平初穂, 有脂及び脱脂牛血清アルブミン (BSA) の熱構造転移と安定性, 熱測定, 19(4), 163-169 (1992)
- 7) 仁木良哉, 有馬俊六郎, 牛乳カゼイン その構造的特徴を中心として, 化学と生物, 22(4), 219-227 (1984)
- 8) 老川典夫, 大島敏久, 保川清, 三原久明, 宮原郁子, エッセンシャルタンパク質工学, 講談社, 2018 年 2 月第 1 刷
- 9) 新田ゼラチン web サイト「web 研究所」ゼラチン研究室 (https://www.nitta-gelatin.co.jp/ja/labo/gelatin/05.html#:~:text=%E3%82%BC%E3%83%A9%E3%83%81%E3%83%B3%E3%81%AF%E8%84%82%E8%82%AA%E5%88%86%E3%81%AA%E3%81%A9,%E7%B5%84%E6%88%90%E3%81%AB%E3%81%AA%E3%81%A3%E3%81%A6%E3%81%84%E3%81%BE%E3%81%99%E3%80%82))
2022/11/6 参照
- 10) 入江春雄, ゼラチン, 高分子, 11(12), 1291-1299, 1283 (1962)
- 11) Smith, P. K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A.K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E.K.; Goetze, N. M.; Olson, B.J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. Analytical Biochemistry, 150, 76-85(1985)
- 12) 山内清, ケラチンの化学と利用—現在の課題—, 高分子, 50(4), 240-243 (2001)
- 13) 奥正巳, 羊毛の化学 (I), 高分子, 2(11), 491-496 (1953)

第5章

布帛の種類による影響

第5章 布帛の種類による影響

5.1 目的

第3章で述べたように、本法で用いる布帛は綿金巾布を基準としている。綿繊維は主要な被服材料の一つであり、金巾布は単純な一重組織で、経糸緯糸ともに同密度の織組織である特徴があり、実験的に扱う基質として標準的な要素が整っていると布と言える。これに対し、実際の被服は、平織以外にもさまざまな織り編み組織や、厚みの違い、綿以外にも多様な繊維種が用いられている。本研究ではBCA法によって呈色した布帛の反射率を測定していることから、布帛自体の光反射性や、試薬液の吸水性により、反射率へ影響が及ぼされることが考えられる²⁻⁴⁾。さらに、BCA法は還元反応であり、繊維自体の官能基等による影響も考えられる。したがって、織り組織、厚みによる影響、繊維種による影響を明らかにすることは、本法の適用可能性を広げ、より実際の洗濯環境に近い条件での検討を可能とするものである。

本章では、上記をふまえ、第3章で用いた綿金巾布を基準とし、綿繊維の織り組織、厚みの異なる平織、朱子織（サテン）、斜文織（ツイル）を用い、さらに、8種の異なる繊維種の平織布を用いて本定量法の反射率への影響を検討し、タンパク質の定量性を明らかにした。

5.2 実験

5.2.1 試薬および試験布

(1) 試薬

第3章と同様、タンパク質にウシ血清アルブミンを用い、2.00%(w/v)水溶液を調製して母液とした。これを希釈して、0.10、0.50%(w/v)を調製した。

BCA試薬も第3章と同様に、ピシニコニン酸ナトリウムを用いてA液を、硫酸銅(II)五水和物を用いてB液を調製し、これらA液:B液を実験当日に50:1(v/v)に混合してC液を調製した。

(2) 試験布

試験布は、JIS染色堅牢度試験用綿布（綿カナキン3号、平織）を基準布とし、織りまたは厚さが異なる綿布を計6種選定した。また、平織で繊維種の異なる布帛を8種選定した。これら14種の試験布の諸元についてTable 5-1に示し、布表面の画像をFig. 5-1に示す。試験布はエタノール:水=1:1(v/v)の混合溶液に一晩(12時間)以上浸漬して精練し、2.5cm×2.5cmに裁断して実験に用いた。

なお、ポリエステルは、高分子鎖の中にエステル結合を含む合成高分子の総称であり、本研究ではポリエチレンテレフタレートを用いている。以降、これをポリエステルと称する。また、ナイロンは、ポリエステル同様に複数の化合物が存在するが、ナイロン66とナイロン6が代表的なものであり¹⁾、本研究ではナイロン6を用いている。以降、これをナイロンと称する。

羊毛については、繊維表面のロウ質で試薬が浸透しにくいことから、ロウ質除去のため直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム 0.05% (w/v) 溶液で洗浄してよくすすぎ、精練したものを用いた。

Table 5-1 Details of fabrics for test swatch.

		Distributor	Weight g · cm ⁻²	Thickness mm	Yarn Density number of yarns / cm ²	
					warp	weft
Cotton	Canequim	Japanese Standards Association	0.010	0.23	29	26
	Plain weave(1)	Sentak Kagaku Association	0.015	0.35	25	23
	Plain weave(2)	Swissatest	0.019	0.32	24	24
	Parcale	Swissatest	0.010	0.16	46	45
	Twill	Swissatest	0.020	0.36	40	21
	Satin	Shikisensha	0.013	0.26	31	56
Linen		Shikisensha	0.013	0.26	21	21
Cuprammonium rayon	Plain weave	Japanese Standards Association	0.007	0.10	53	37
Diacetate		Shikisensha	0.007	0.10	39	26
Polyester		Japanese Standards Association	0.006	0.08	41	37
Nylon(6)	Plain weave	Shikisensha	0.006	0.10	43	34
T/C(65/35)		Shikisensha	0.011	0.21	54	28
Wool	Plain weave	Japanese Standards Association	0.011	0.28	25	23
Silk		Shikisensha	0.006	0.12	51	37

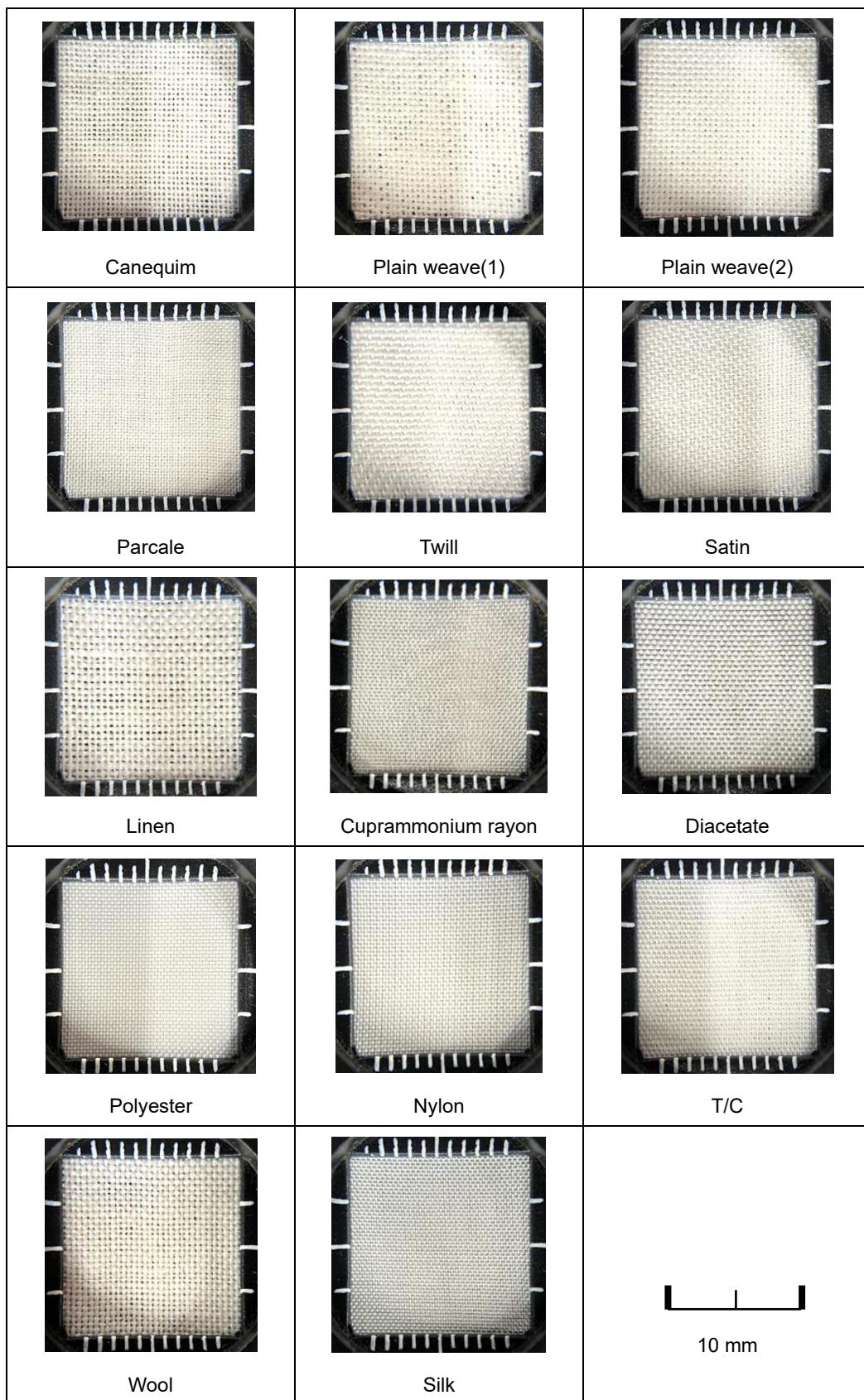


Fig. 5-1 Picture of surface of fabric for test swatch.

5.2.2 方法

(1) 反射率に及ぼす各試験布の織りおよび繊維種の影響

紫色の水溶性染料カヤシオンバイオレット P-3R を 0.01% (w/v) の水溶液として BCA 反応のモデル溶液として用い、第 3 章で述べたシート法で用いる試薬液の総量と同量の $28.8\mu\text{L}/\text{cm}^2$ を各試験布に滴下し、室温で 5 分静置後に 560nm における反射率をハンディ型分光色差計 (NF555、日本電色工業製) で測定した (Fig. 5-2)。シートで被覆した染料液を添加する前の各試験布の反射率も同様に測定し、試験布の織り、繊維種による反射率への影響を評価した。反射率測定の際には、白色厚紙 (反射率 83%) の上に試料を置き、1 枚につき 4 か所を測定して平均値を求めた。

なお、銅アンモニアレーヨン、ジアセテート、ポリエステル、ナイロンの 4 種は試験布の厚さが、基準とする綿金巾の半分以下であることから、他の布と厚さの差を抑えるため、2 枚重ねにして実験に用いた。

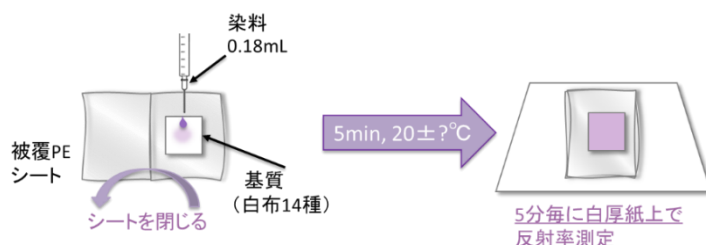


Fig. 5-2 Flowchart of experiment using purple dye solution.

(2) BCA 反応における各試験布の影響

BCA 法の C 液に対する各試験布の呈色反応とタンパク質の定量性を検討するため、シート法を用い、水 $8.0\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、アルブミン試薬 0、4.8、 $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の量を各試験布に滴下して 5 分静置した後、C 液を $24\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 添加して 25°C の恒温器内で反応させ、30 分後の反射率を測定した (Fig. 5-3)。反射率の測定は、5.2.2 の(1)の通りに行った。

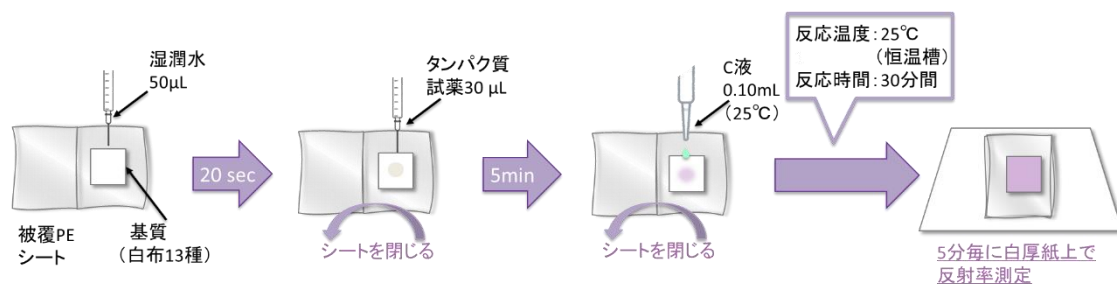


Fig. 5-3 Flowchart of experiment for effect of test swatch types to BCA reaction.

5.3 結果

5.3.1 反射率に及ぼす各試験布の織りおよび繊維種の影響

綿繊維の織り、厚さの異なる試験布へ染料を滴下し、反射率を測定した結果を Fig. 5-4 に示す。測定箇所による値の変動を表すため標準偏差をエラーバーとして付した。綿白布 6 種

について、染料滴下前、乾燥状態の反射率は76~80%であり、染料滴下後の反射率は37~40%となった。パーケール、ツイル、サテンの3種は、染料滴下後の反射率が基準布と比較して、2~3%高い値となったが、測定箇所による反射率の差は小さくなった。パーケールについては、Table 5-1 に示すように試験布の厚さが基準布の約70%と薄いため、染料液が試験布から滲出する様子が確認された。

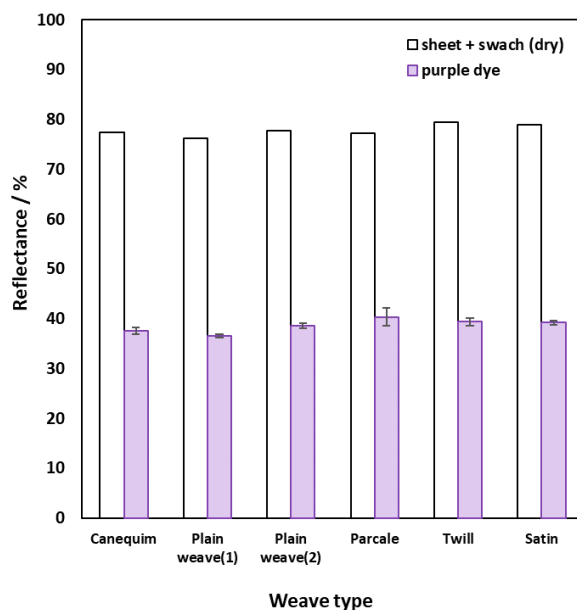


Fig. 5-4 Reflectance of Cotton swatch and purple dye dropped swatch. (N ≧ 4)

繊維種の異なる8種の反射率を Fig. 5-5 に示す。ここには、基準布の反射率も併記した。乾燥状態における8種の布の反射率は72~81%、であり、染料滴下後の反射率は37~49%となった。このように、繊維種の異なる試験布では数値に差が生じた。麻、T/C布は、セルロース繊維を含んでおり、厚さが近いことが共通する。羊毛は、白布の反射率はやや低いが、染料滴下後の値は基準布に近似している。銅アンモニアレーヨン、ジアセテート、ポリエステル、ナイロン、絹の各布は、染料滴下後の反射率が基準布より高くなった。また、これらの布は綿パーケールと同様に厚さが薄く、染料液が反射率測定時に流動する様子が確認され、エラーバーが大きくなった。特に、ポリエステルは繊維自体が疎水性であるため液が流動しやすく、他試験布と比較して反射率が高くなったと推測される。

以上、綿繊維の織りおよび厚さの影響、繊維種による反射率の影響を検討した結果、綿繊維である場合は、平織よりもサテン、ツイルはわずかに反射率が高くなる傾向が見られたが、総じて大きな差ではなかった。すなわち、綿繊維の場合は試薬液の滲出や流動が多くなければ、反射率は近似した値となることがわかった。一方、繊維種が異なる場合には、繊維の親水性・疎水性および布の厚さが試薬液の保持性に影響し、反射率が異なってくることがわかった。

これらの特性をふまえ、各種布帛を基質として用い、BCA 反応を行った場合の反射率への影響を検討した。

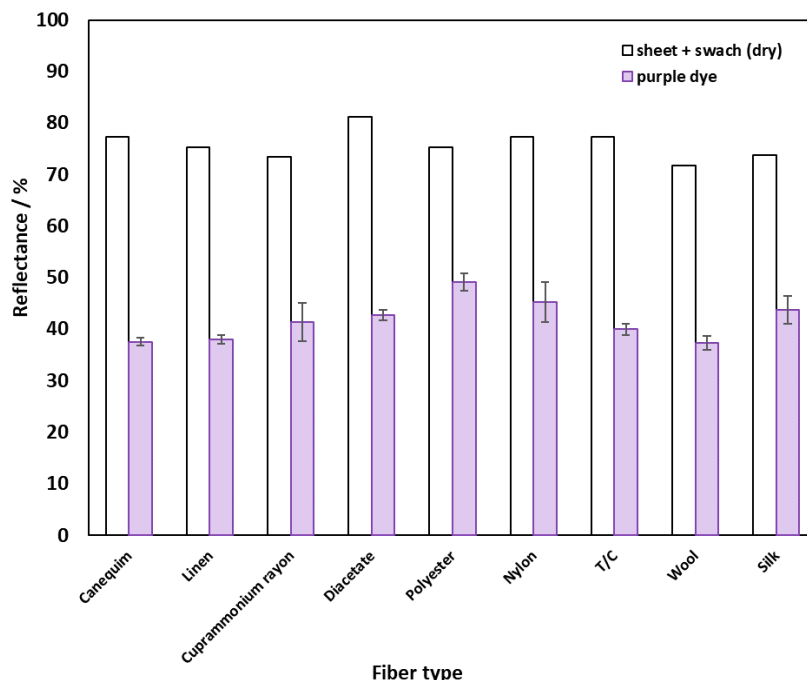


Fig. 5-5 Reflectance of different fiber types swatch and purple dye dropped swatch. (N \geq 4)

5.3.2 BCA 反応における各試験布の影響

5種の綿布に0、4.8、24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 量となる濃度のアルブミン溶液を滴下し、これらにBCA反応させ、反射率を測定した結果と、第3章で得られた基準布の値をFig. 5-6へ示す。アルブミン濃度が0の場合、5.3.1で述べた反射率の近似は見られず、BCA溶液では平織(1)、平織(2)、ツイルで反射率は7~15%基準布より低くなった。なお、綿繊維はC液とわずかに反応して呈色するが、タンパク質定量に影響を与えない程度であることは、第3章にて把握している。

さらに、これら5種の綿布はアルブミン量が増加するに従い、反射率が基準布に近い値となり、24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のとき、試験布による値の差は5%以内となった。すなわち、綿繊維の場合は、タンパク質を付着させた場合、少量では試験布の特徴が反射率に影響を与えるが、比較的多いタンパク質量の場合はその影響は小さくなった。

繊維種の異なる8種の試験布を基質に用い、綿布と同様、BCA呈色による反射率を測定した結果をFig. 5-7へ示す。

羊毛および絹布は、アルブミン量が0であってもそれぞれの反射率は22%、5%であり非常に濃い呈色を示した。これらはタンパク質繊維であり、繊維自体がBCA反応を起こしてしまうことから、羊毛、絹布ではBCA反応を利用して布上に付着したタンパク質汚れを定

量することできないことが判明した。

銅アンモニアレーヨンの場合、アルブミン量が0の時、同じくセルロース系半合成繊維であるジアセテートと比較すると、20%近く低い値を示している。さらに、アルブミン濃度の増加による呈色反応は、他の繊維種と比較して鈍化していることがわかった。

麻、ジアセテート、およびT/C布は、アルブミン量の増加に従って、基準布と近似した反応性を示した。しかし、アルブミン量0のときには、繊維自体とC液の反応性は小さかった。

ポリエステルは、疎水性で厚さも薄く、C液の保持量が少ないため、全体として高い反射率を示すが、アルブミン量の増加に従って反射率の減少が見られ、基準布と同様の曲線を示した。ナイロンは、ポリエステルよりも反射率が低くなり、ナイロン繊維中のアミド結合によるC液との反応が起こった可能性、または吸水性によるC液の保持性が影響したと考えられた。

以上、麻、ジアセテート、T/C布、ポリエステル、ナイロンの5種に関しては、各繊維で値の差はあるものの、アルブミン量に応じた明確な反射率の低下が確認された。一方、羊毛、絹および銅アンモニアレーヨンはC液との反応が起き、BCA反応によるタンパク質定量には適さないことがわかった。

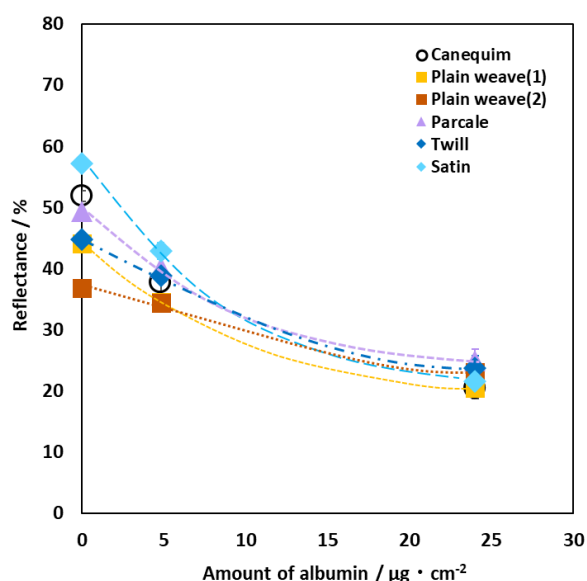


Fig. 5-6 Effect of albumin concentration on reflectance at cotton swatch. (N \geq 4)

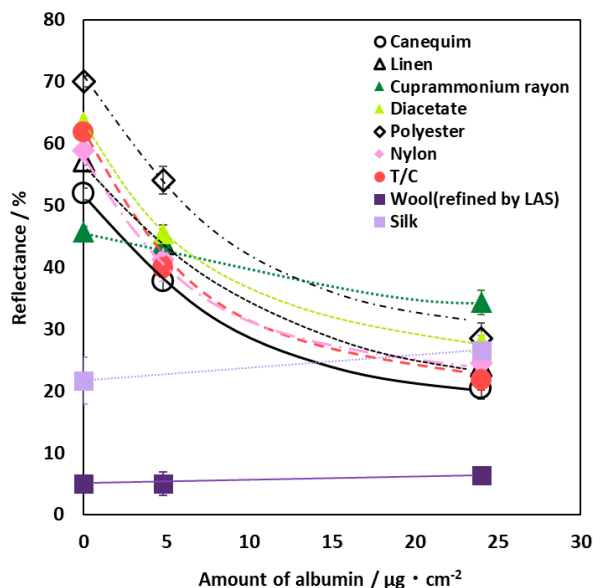


Fig. 5-7 Effect of albumin concentration on reflectance at swatch of different fiber types. (N \geq 4)

5.3.3 K/S 値とアルブミン濃度との相関

第3章と同様に、各試験布のK/S値を求め、5種の綿布についての結果をFig. 5-8、繊維種の異なる5種の試験布についての結果をFig. 5-9に示す。アルブミン量の範囲0~24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で検量線を求め、その直線の傾きから定量性を評価した。ここで、先のFig. 5-7

において明らかに定量性が見られなかった羊毛、絹および銅アンモニアレーヨンの 3 種は除外した。

Fig. 5-8 において、綿布の平織(1)とサテンは基準布の直線と非常に近い傾きを示した。また、パーケールとツイルは基準布より傾きがやや小さい直線を示したものの、アルブミンの定量性としては良好であった。Fig. 5-9 の繊維種については、T/C 布は綿布と同様に基準布と近似した直線が得られることがわかった。麻とナイロン、およびジアセテートとポリエステルについては、ほぼ同じ直線を示し、傾きは基準布より小さくなった。

以上より、各試験布の K/S 値を用いてアルブミン濃度との相関性を検討した結果、綿平織(1)、綿サテン、T/C 布は高い定量性を示し、次いで、麻、ナイロン、綿パーケール、綿ツイルの直線の傾きが大きく、ジアセテート、ポリエステルの順に良好な直線性が見られた。

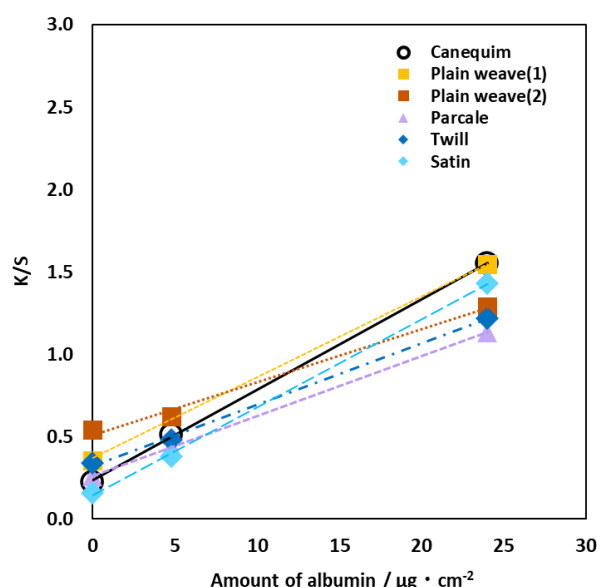


Fig. 5-8 Correlation between K/S value and albumin concentration at cotton swatch.

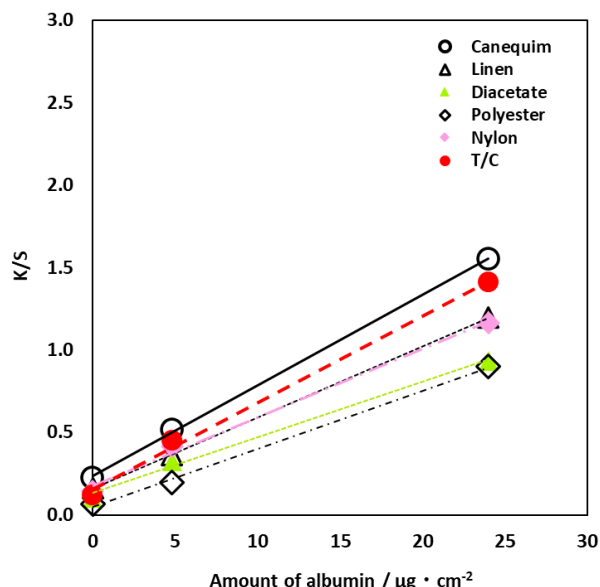


Fig. 5-9 Correlation between K/S value and albumin concentration at swatch of different fiber types.

5.4 考察

試験布の構造および繊維種による、反射率への影響を検討するため、染料液を滴下して反射率を測定した結果を考察する。綿繊維の試験布において、パーケールの場合、厚みが他の綿布と比較し薄く、反射率測定時に染料液のムラとしてエラーバーの大きさに現れたと考える。ツイル、サテンの2種では、平織よりも糸の浮きが長く表面の糸面積が大きくなるため^{5,6)}、光の反射量が増加したことが反射率へ影響したと推測された。

繊維種の異なる試験布の場合、羊毛は精練によってセルロース繊維同等の吸水性をもつようになり、さらに厚さも近似していることから、麻、T/C 布と近い値となったと考えられる。銅アンモニアレーヨン、ジアセテート、ポリエステル、ナイロン、絹はフィラメント糸であるため、染料のぬれにより反射光が基準布と比較し大きくなったと推測される。また、

これらフィラメント糸には、紡糸時に収縮によって表面上に筋が生じるものもあるが、これによる反射率への明らかな影響はないと考えられる。以上より、これらの綿繊維試験布の場合、反射率測定への大きな影響はなく、繊維種が異なる試験布は、その吸水性が反射率へ影響を与えることがわかり、次に述べる BCA 反応の測定結果を考察する背景とした。

これをふまえ、各試験布へアルブミン溶液を滴下し、BCA 法への影響について考察する。綿繊維の場合、セルロース分子上の OH 基、二重結合構造と BCA 分子との関連、または製品としての布帛上に残留する繊維処理剤のものと考えられる影響が見られた。具体的に、平織(1)、ツイルは、この綿繊維との呈色反応が厚さや構造の関係により、反射率の低さとして表れたと推測できる。一方、平織(2)は、基準布より明らかに濃い呈色を示していることから、C 液と反応性をもつ何らかの物質、例えば酵素を用いた繊維処理剤⁷⁻⁹⁾等が付着し、呈色反応が促進されたことが考えられる。サテン、パーケールは、それぞれ表面上の糸面積の影響、試薬の流動による影響で反射率が基準布より高くなったが、付着物等の影響はないと考えられた。

繊維種の異なる試験布の場合、銅アンモニアレーヨンはその製造過程において、コットンリンターを原料として高純度のセルロースを銅アンモニア液によって溶解し、凝固液中に紡糸するため、その銅イオンが残留し¹⁰⁾、BCA 反応に影響したと考えられる。また、麻、ジアセテート、T/C 布が、アルブミン濃度が 0 のとき、基準布である綿金巾よりも C 液との反応性が小さかったことについては、次のように考察できる。麻は、セルロース分子の結晶領域が綿よりも多く、ジアセテートはセルロース分子のヒドロキシ基を疎水性の酢酸エステル基 (-O-COCH₃、アセテート基) に置換され、約 7 割以上が酢酸化されていることから、C 液と反応しにくいと考えられる^{5,6)}。T/C 布の場合は、綿の吸水性により試薬液が保持されたため、基準布のように呈色反応が起こるが、繊維の 65% を占めるポリエステルは、化学反応性が低い繊維であるため C 液への反応が起こりにくく、基準布よりも反射率が高くなったと考える。

ナイロンは、タンパク質繊維と同様に、分子中に親水性のアミノ基 (-NH)、カルボキシ基を含み、主鎖中に多くのアミド結合を持つが、羊毛および絹のような過剰な呈色は見られなかったことから、これらの要素は BCA 法に影響を与えないと考えられる。なお、羊毛の場合、界面活性剤で精練を行ったことで表面のスケール (キューティクル) 間の細胞間物質やコルテックスに C 液が浸透し、繊維を構成し、シスチンを含むタンパク質であるケラチンと反応したと考えられる。絹はシスチンをまったく含まないため、BCA 法と反応しやすい他のタンパク質が多く存在すると考えられる^{5,6)}。以上から、麻、ジアセテート、T/C 布、ポリエステル、ナイロンの 5 種に関しては BCA 反応を用いたタンパク質定量が可能であることが明らかとなった。

このことから、布帛上のタンパク質量を、BCA 反応を用いて定量する場合、高い定量性を確保するためには、繊維種が同一のものである場合も布帛の構造や厚さ、すなわち表面状態の反射率への影響がわずかに表れることや、繊維加工剤等の付着物の影響が表れるため、

対象とする布帛で検量線を作製しておくことが必要であると考える。

5.5 結論

綿繊維の織り、厚みの異なる6種の布帛、異なる繊維種の平織布8種を用い、布帛種による、タンパク質直接定量法への影響を検討した。その結果、綿布帛の織りおよび厚さの影響は、布帛表面の反射光の変化によって反射率がわずかに上昇することが確認された。また、繊維の種類による影響として、タンパク質繊維は繊維分子とBCA法C液との反応が起きて呈色に影響し、タンパク質定量に適さない繊維があることがわかった。さらに、BCA反応に影響する要因として、布帛の試薬の保持性すなわち試薬液のぬれや滲出の程度、繊維加工剤等の付着物の有無の可能性が確認された。これらにより、BCA反応が基準布よりも進行し、反射率が低下する傾向や、試薬の保持性が低い場合には反射率が高くなる現象があることがわかった。したがって、本法の精度を保証するためには、布帛ごとに検量線を作成することが必要である。

以上をふまえ、綿繊維布およびT/C布は、BCA法によるタンパク質の定量性が高く、ポリエステル等の他の繊維種の布4種では綿布より若干呈色反応が低くなるものの定量性は良好であることがわかり、布帛上のタンパク質を、BCA法を用いて定量する本法は、適用範囲が広く、汎用性のあることが示された。

今後、布帛の吸水性といった特性に応じ試薬液量の調整等の工夫を進めることで、さらに高精度の定量が可能になると期待できる。

引用文献

- 1) 信州大学繊維学部, はじめて学ぶ繊維, 日刊工業新聞, 2016年8月初版8刷
- 2) 坂上ちえ子, 須永正治, マイクロスコープと偏光フィルタによる画像測定に基づく布反射特性の解析, 家政誌., 65(7), 347-359 (2014)
- 3) 稲垣勝彦, 織物の光沢測定, 繊維と工業, 3(10), 774-781 (1970)
- 4) 山口新司, 繊維の表面構造による高濃度と発色化, 光学, 27(1), 31-32 (1998)
- 5) 竹松茂, 改訂版実用織編物の基礎知識, 色染社, 2011年10月第2冊
- 6) 業界マイスターに学ぶせんいの基礎講座 繊維社企画出版 2019年3月第4版
- 7) 谷田治, 酵素の繊維工業への応用, 織消誌., 37(3), 397-404 (1996)
- 8) 坂井拓夫, 綿繊維の酵素加工の最近の動向—プロトペクチナーゼによる精練を中心に—, 繊維工学, 52(19), 397-404 (1999)
- 9) 雨宮敏子, 橋本朋子, 佐野奈緒子, XPS測定による試験用白布表面の夾雑物分析—精練処理に関する検討—, J. Fiber Sci. Technol., 74(9), 196-201(2018)
- 10) 通産省横浜繊維製品検査所, 繊維機器分析資料(6), 織消誌., 23(8), 334-337 (1982)

第6章

界面活性剤と酵素の 共存による影響

第6章 界面活性剤と酵素の共存による影響

6.1 目的

第4章、第5章において、定量対象となるタンパク質とその付着基質となる布帛の種類による影響を明らかにした。これらの検討結果を受け、本研究を洗浄分野の研究へ適用するためには、洗浄試験に用いる洗剤成分による影響を明らかにする必要がある。洗浄後の布帛には、水によるすすぎでは除去することができなかった、希釈された洗剤成分の残留が懸念される^{1,2)}。そこで本章では、一般的な洗濯洗剤に含まれる成分である、界面活性剤と酵素の代表的な種類について、綿布帛のすすぎ後に残留する量を想定し、BCA法の呈色試薬であるC液に対する影響を調べるとともに、タンパク質と共存した場合の定量性を検討した。

6.2 実験

6.2.1 試薬

(1) 界面活性剤および酵素試薬

界面活性剤は、洗濯洗剤に汎用されている合成界面活性剤の中から代表的な直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) と分鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS)、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、ポリオキシエチレンアルキルエーテル (POE) を用い、また石けんとして炭素数の異なる脂肪酸塩を用いた。酵素には、液体洗剤に用いられているタンパク質分解酵素(プロテアーゼ)を用いた。これらの性状を Table 6-1 に示す。なお、ABS は生分解性が悪く、現在の市販洗剤では使用されていないものであるが、今回は比較のため試験に用いた。

布上でのこれらの残留濃度については、以下のように推定した。洗濯は最近の節水型条件を参考に、洗濯物 1kg に対して水 15L (浴比 1:15)、すすぎ 1 回を想定した³⁾。洗浄力を発揮するには洗剤溶液の界面活性剤は臨界ミセル濃度 (CMC) 付近で使用される。洗濯・脱水後、洗濯物の含水率は一般的に 100%と知られており、洗濯には液 1kg がすすぎ液 15L に持ち込まれる。したがって、すすぎ液の界面活性剤濃度は CMC の 1/16 となる。

一方、酵素は一般的に 1%程度、洗剤に配合されている。多くの市販洗濯洗剤は、洗濯物 1kg (水 15L) に 25g 使用されるので、洗濯液中の洗剤濃度は 0.1666% (w/v) となる。したがって、酵素濃度はその 1/100 となり、0.001666%と推定される。すすぎ 1 回で 1/16 になるので、プロテアーゼは 0.0001% (w/v) の濃度のすすぎ残液となり、脱水後の布に残留すると考えられる。この量は微量で取り扱いが難しく、実験精度の点から酵素濃度は 10 倍の 0.001%を基点とした。

次に、すすぎ後の脱水による含水率について、タテ型およびドラム式洗濯機を用いた確認実験を行ったところ、脱水後綿金巾布の含水率は約 84%であった。この確認実験の結果について表 6-2 にまとめる。したがって、2.5cm×2.5cm の綿試験布 0.6g には、0.5g すなわち 50 μ L の水が含まれることとなる。

以上より、界面活性剤濃度は CMC の 1/16、酵素濃度は 0.001% (w/v) 以上の濃度とし、試験布への添加量は、これまでの検討における湿潤水と同量の 50 μ L が適当であると考えた。

(2) タンパク質は第 3 章と同様に、ウシ血清アルブミンを用い、2.00% (w/v) 水溶液を母液とし、希釈によって 0.50、0.10% (w/v) を調製した。

(3) BCA 試薬の A 液および B 液は、第 3 章と同様に調製し、これら A 液 : B 液を実験当日に 50 : 1 (v/v) に混合して C 液を調製した。

Table 6-1 Details of surfactants and enzymes used in the coexistence substance reagents.

Surfactant	Distributor	Grade	Molecular Weight g / mol	CMC mol / L	Concentration % (w/v)
Sodium dodecylbenzene sulfonate (hard type)	KANTO KAGAKU	Extra Pure	348.48	1.2×10^{-3}	3.3×10^{-3}
Sodium dodecylbenzene sulfonate (soft type)	Kao Corporation	—	348.48	1.2×10^{-3}	5.0×10^{-3}
Sodium dodecyl sulfate	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Extra Pure	288.38	8.0×10^{-3}	1.8×10^{-2}
Polyoxyethylene (6) lauryl ether	Kao Corporation	—	450.59	0.11×10^{-3}	3.9×10^{-4}
Sodium decanoate	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY	>99%	194.25	98×10^{-3}	1.5×10^{-1}
Sodium laurate	FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation	Chemical Pure	222.30	25×10^{-3}	4.4×10^{-2}
Sodium myristate	Wako Pure Chemical Corporation	Chemical Pure (min.50%)	250.35	5.2×10^{-3}	1.0×10^{-2}
Sodium palmitate	TOKYO CHEMICAL INDUSTRY	>97%	278.41	1.4×10^{-3}	3.1×10^{-3}
Sodium oleate	YONEYAMA YAKUHIN KOGYO	Chemical Pure	304.44	3.0 (g / L)	2.3×10^{-2}
Sodium stearate	Wako Pure Chemical Corporation	Chemical Pure (including C16 30%)	306.46	0.34×10^{-3}	8.1×10^{-4}
Protease (Savinase)	Novozymes	—	—	—	$1.0, 1.0 \times 10^{-1}, 1.0 \times 10^{-2}, 1.0 \times 10^{-3}$ (v/v)

Table 6-2 Moisture content of cotton fabric by dehydration method.

Mechanical action	Course label	Wash machine type	Dehydrating time / min	Mass of water included / g	Mass of water to dry cloth mass	
					/% (w/w)	Average / % (w/w)
Normal	"standard"	vertical	5	24.3	74.1	84.4
	"personal course"		4	28.0	85.3	
	"standard"	drum	8.5	24.8	75.1	
Reduced	"gentle wash"	vertical	2	28.6	84.6	
	"dry clean"	drum	5	34.3	102.9	

6.2.2 方法

(1) 界面活性剤と酵素単独による BCA 反応への影響

界面活性剤と酵素の試薬そのものが、BCA 反応に及ぼす影響を調べた。第 3 章のシート法に従い、2.5cm×2.5cm の試験布 (JIS 染色堅牢度試験用綿布を精練処理したもの) に界面活性剤または酵素試薬 8.0 μ L/cm² を滴下して 5 分静置した後、C 液を 24 μ L/cm² 添加して、25 $^{\circ}$ C 恒温器内で反応させ、30 分後の反射率を測定した (Fig. 6-1)。反射率測定機器および条件は、これまでと同様とした。

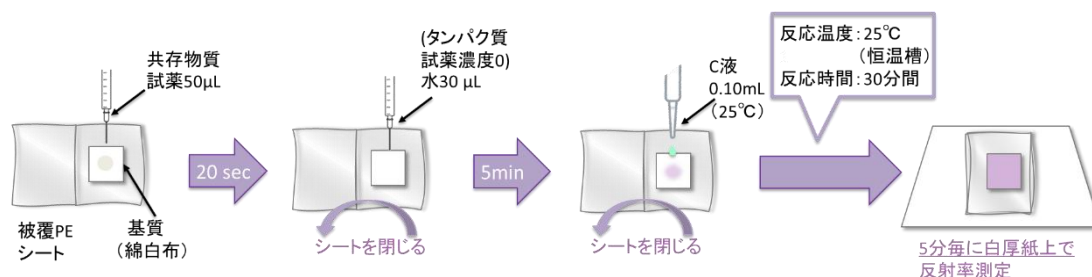


Fig. 6-1 Experimental flowchart of the effect of coexisting substances on reagent C.

(2) 界面活性剤と酵素がタンパク質に共存する場合の BCA 反応への影響

Fig. 6-2 に示すようにシート法に従い、2.5cm×2.5cm の綿試験布に界面活性剤または酵素試薬を 8.0 μ L/cm²、さらに各濃度のアルブミン試薬 4.8 μ L/cm² を滴下し、両者が共存させた状態で 5 分静置後、C 液を 24 μ L/cm² 添加して 25 $^{\circ}$ C 恒温器内で反応させ、30 分後の反射率を測定した。アルブミン試薬は、0.04、0.1、0.4、0.5%(w/v) の 4 つの濃度を用いた。界面活性剤試薬として、洗濯洗剤の成分として代表的な LAS、SDS、POE、ラウリル酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウムの 6 種、プロテアーゼ試薬は、0.01%(w/v) 濃度を用いた。

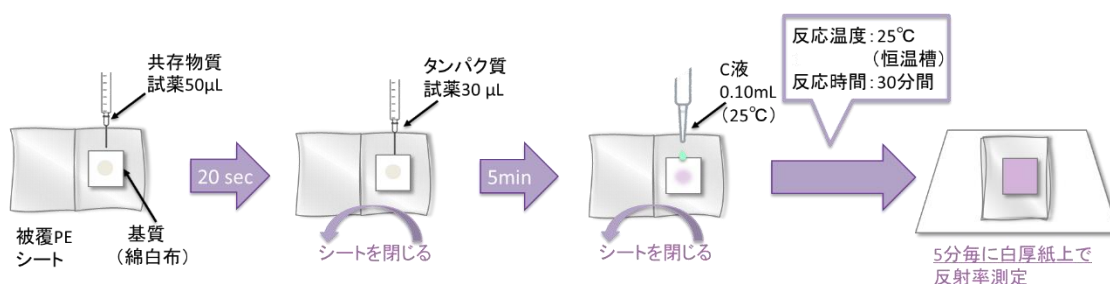


Fig. 6-2 Experimental flowchart of the effect of coexisting substances on protein determination.

第 3 章で得られた、界面活性剤と酵素が共存しない (アルブミン試薬のみの) 場合と、本章で得られた共存する場合のそれぞれの反射率から、下式に示す相対値を算出し、共存物質による反射率への影響の程度を評価した。

$$\text{相対値} = \text{共存物質試薬とアルブミン試薬の反射率(\%)} / \text{アルブミン試薬の反射率(\%)}$$

6.3 結果

6.3.1 界面活性剤と酵素試薬による BCA 法 C 液への影響

界面活性剤試薬と C 液による反射率を測定した結果を、Fig.6-3 と Fig.6-4 に示す。

所定濃度の LAS および ABS、SDS、POAE、そして、すべての脂肪酸ナトリウムがそれぞれ単独で布上に存在した場合、C 液による呈色後の反射率は 30 分後において 61.3～62.6%であった。

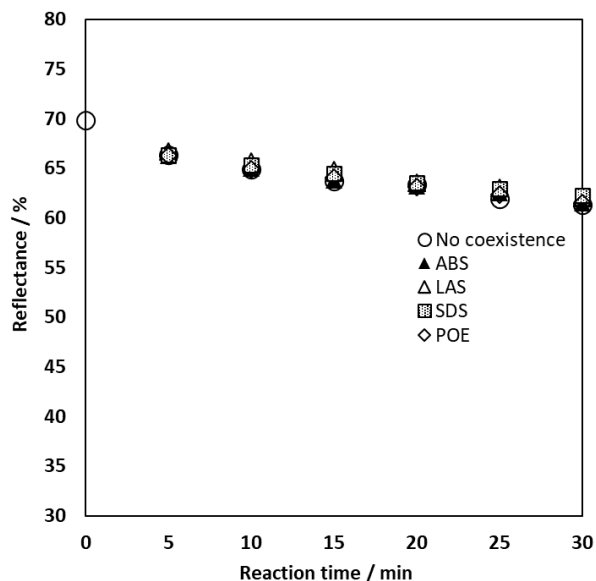


Fig. 6-3 Reflectance of the synthetic surfactants for each reaction time. (N \geq 4)

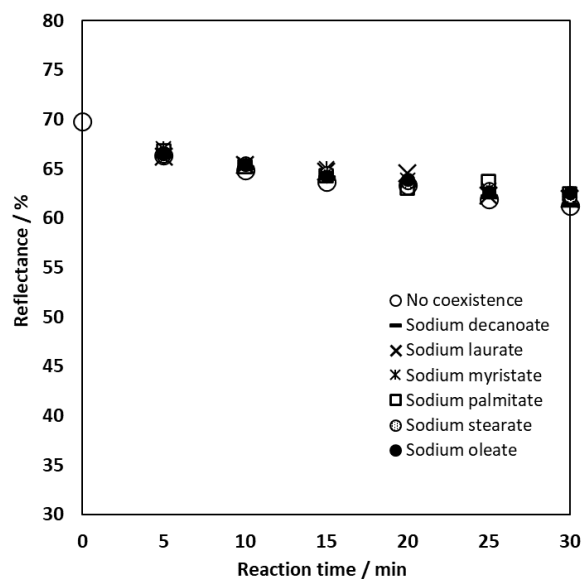


Fig. 6-4 Reflectance of the sodium fatty acids for each reaction time. (N \geq 4)

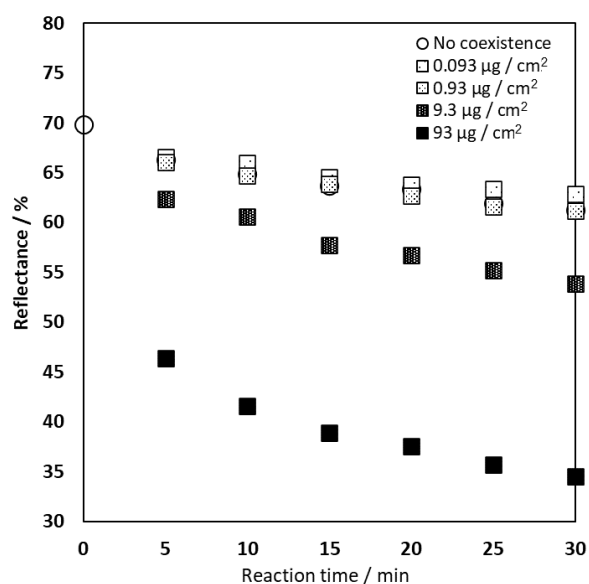


Fig. 6-5 Reflectance of the protease for each reaction time. (N \geq 4)

なお、界面活性剤または酵素試薬の濃度を 0 としたブランク（共存物質なし）の場合、計 12.8 μ L/cm² の水と C 液のみを滴下した綿白布自体の反射率は、第 3 章の結果より反応後 30 分で 61.3% である。この値と比較すると、これら界面活性剤による反射率の差は確認されなかった。

次に、酵素試薬と C 液による呈色反応を測定した結果を Fig. 6-5 に示す。布上の酵素量が比較的少量の 0.093 および 0.93 μ g/cm² の場合、30 分後の反射率は 62.9~61.2% であった。先述の界面活性剤と同様、この濃度範囲の酵素では、BCA 法への影響はないと言える。しかし、9.3 および 93 μ g/cm² の場合、反応後 5 分から大きく反射率が低下し、30 分時点ではそれぞれ 53.9% と 34.5% であった。

6.3.2 界面活性剤と酵素がタンパク質に共存する場合の BCA 反応への影響

界面活性剤または酵素試薬とアルブミンを共存させて BCA 反応させ、反射率を測定して、第 3 章で得られた共存物質が存在しないアルブミンのみの反射率との相対値を計算した。その結果を、Fig. 6-6、Fig. 6-7 と Fig. 6-8 に示す。ここで、プロットが相対値 1.00 に近い程、アルブミン試薬のみの場合の反射率に近いことを示し、界面活性剤またはプロテアーゼによる影響が少ないと解釈できる。また、相対値が 1.00 より大きければ、共存物質がある場合の反射率が相対的に高くなり、呈色が薄くなったことを示す。

2 種の脂肪酸ナトリウム以外の界面活性剤とプロテアーゼが共存する場合、アルブミン濃度が 4.8 μ g/cm² 以上で、相対値は 1.00~1.15 の間を示しやや高い値となった。すなわち、アルブミンのみの場合よりも反射率が高くなったことがわかる。さらに、アルブミン濃度が最も高いとき、全ての共存物質の場合で相対値は 1.00 に近くなり、アルブミン濃度が低いときと高いときに影響が小さくなることがわかった。

脂肪酸ナトリウム 2 種の場合、SDS 等と同様に陰イオン界面活性剤であるものの、他の共存物質とは挙動が異なることがわかった。オレイン酸ナトリウムは全体としてやや相対値が低くなる傾向が見られた一方で、ラウリン酸ナトリウムはアルブミン濃度が高くなるにつれて、相対値が高くなった。全体の相対値が高くなった順に、SDS、ABS、LAS、プロテアーゼ、POE またはラウリン酸ナトリウムの順であった。

これらの結果で得られた反射率から K/S 値を算出し、合成界面活性剤と酵素について Fig. 6-9 に、脂肪酸ナトリウムについて Fig. 6-10 に示す。それぞれの図中に、共存させた同一アルブミンの値も併せて示した。ABS、LAS、POE、プロテアーゼがアルブミンと共存する場合は K/S 値がわずかに低下するが、共存物質が存在しないアルブミンのみの場合と非常に近い傾向を示した。また、オレイン酸ナトリウムが共存する場合、アルブミン濃度 19.2 μ g/cm² のときに K/S 値が高くなったが、それ以外ではアルブミンのみの場合と K/S 値の差はなかった。一方、反射率の相対値が高くなった SDS、ラウリン酸ナトリウムが共存する場合、アルブミン濃度 19.2 μ g/cm² 以上で、K/S 値の低下が他の界面活性剤および酵素よりも大きくなった。

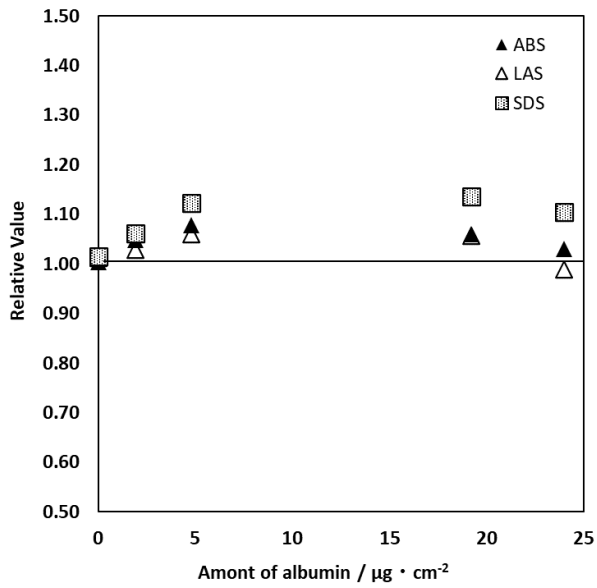


Fig. 6-6 Relative values of each albumin concentration coexisting with the surfactants. (N=8)

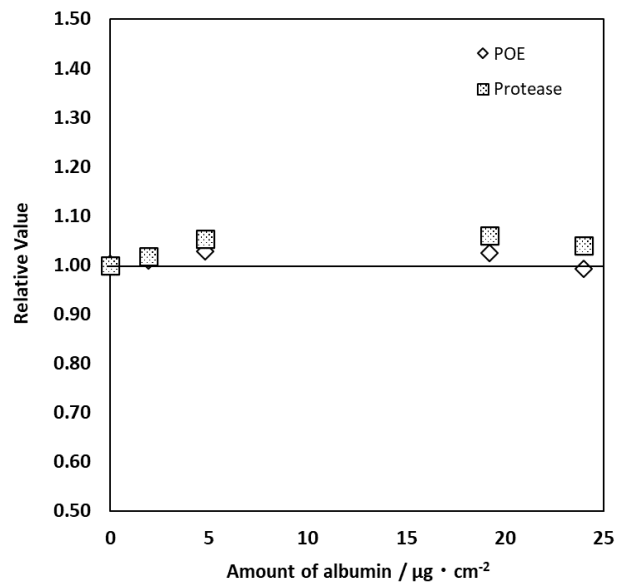


Fig. 6-7 Relative values of each albumin concentration coexisting with the surfactant and protease. (N=8)

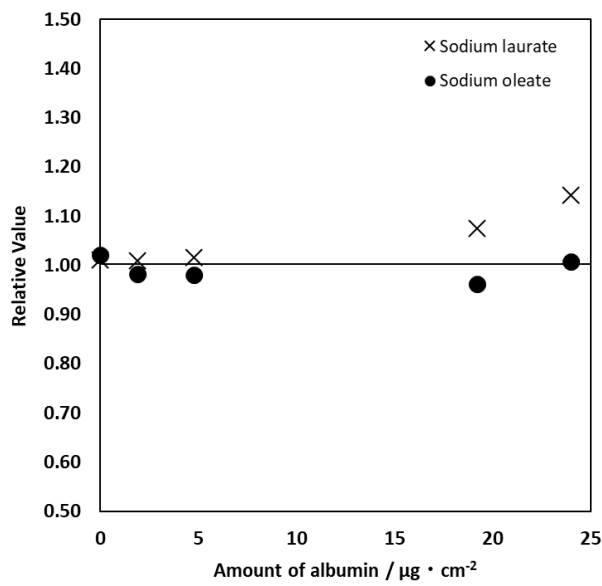


Fig. 6-8 Relative values of each albumin concentration coexisting with the sodium fatty acids. (N=8)

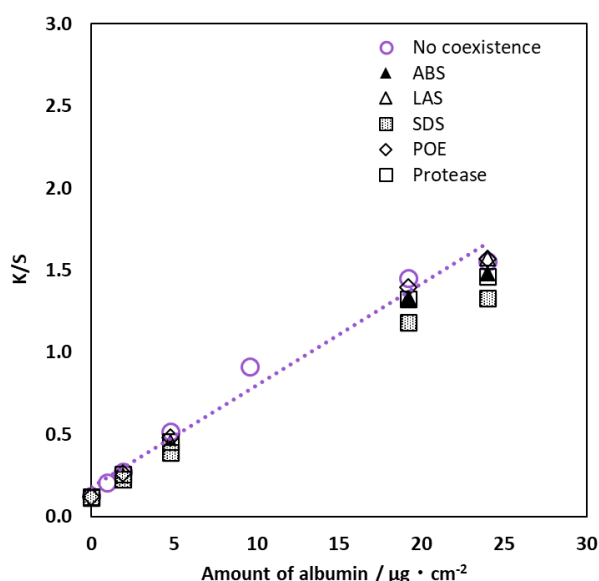


Fig. 6-9 K/S values of each albumin concentration coexisting with the synthetic surfactants and protease.

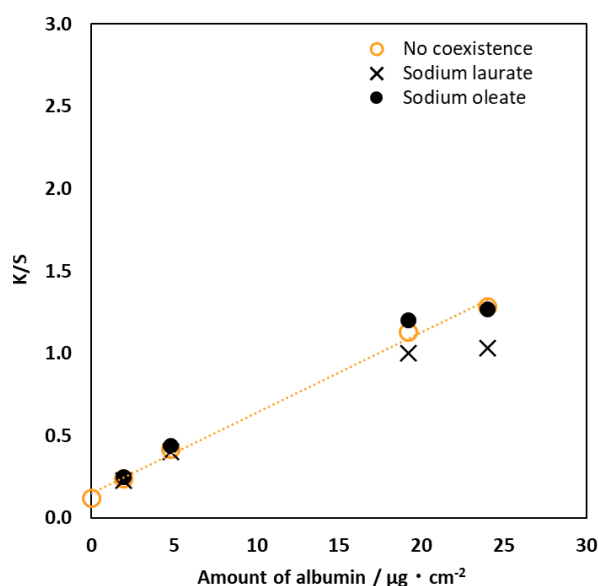


Fig. 6-10 K/S values of each albumin concentration coexisting with the sodium fatty acid.

6.4 考察

洗浄試験後の綿布に残留する濃度を想定した界面活性剤および酵素試薬が及ぼす C 液へ影響を検討したところ、すべての界面活性剤と付着量 $0.093\sim 0.93\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のプロテアーゼは綿白布の反射率と同様の値となり、BCA 反応に影響を与えないことがわかった。しかし、 $9.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上のプロテアーゼは呈色し、タンパク質として反応したと考えられる。

このタンパク質量として評価するため、得られた反射率を第 3 章で求めた検量線式 ($y=0.0728x+0.1444$) に当てはめてアルブミン付着量に換算した。その結果、 $9.3\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の酵素付着量は、アルブミン換算では $0.72\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、そして、 $93\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の酵素は $6.6\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のアルブミンとして算出された。したがって、用いた酵素試薬には 8~9%のタンパク質が含まれることがわかった。このように、酵素は BCA 反応に大きく影響するが、実際の洗濯で布上に残留する酵素量は実験 6.2.1 の (1) で述べたように、Fig. 6-5 の一番低い濃度 0.093%の更に 1/10 の低い濃度であることから、酵素の影響は無いと言える。

次に、アルブミンとの共存条件における反射率の相対値について、各共存物質を分類し、性質ごとに考察する。2 種の脂肪酸ナトリウムを除き、SDS、ABS、LAS、プロテアーゼ、POE の順で全体の相対値は高くなった。これは、共存物質の濃度が一定であることに対し、アルブミン付着量が増加したことで、共存物質の影響が相対的に小さくなったことに由来すると考えられる。

SDS と ABS、LAS は陰イオン界面活性剤であり、高濃度でタンパク質に結合するとその立体構造のアンフォールディング、すなわち変性を引き起こす。低濃度であっても、アルブミンに対しイオン性、疎水性相互作用により特異的に結合するとされる⁴⁾。また、二価金属

イオンに対する結合は SDS の方が高いことが報告されている⁵⁾。このことから、SDS、ABS、LAS の順に相対値が高くなった理由は、タンパク質への影響だけでなく、銅イオンへの結合と BCA-Cu 錯体の形成を阻害している可能性が高いと考えられる。

非イオン界面活性剤である POE は、金属イオンとの静電的要素による結合は陰イオン界面活性剤よりも少ない可能性が考えられ、ABS、LAS、SDS よりも相対値は少し小さく、銅イオンへの結合が少なかったと考えられる。

タンパク質分解酵素のプロテアーゼは、アルブミンと共存する場合、水素結合等により相互作用を起こし、BCA-Cu 錯体の形成にわずかに影響していると考えられる。プロテアーゼがアルブミンを変性させ、銅イオンの還元が起こらなかった可能性については、さらなる研究が求められる。

一方、Fig. 6-8 において、脂肪酸ナトリウムは陰イオン界面活性剤であるが、相対値の挙動は合成界面活性剤とは異なった。この理由として、ラウリン酸ナトリウムが C 液の銅イオンと反応して金属石けんを生成し、銅イオンの減少によって BCA 反応が阻害されて相対値が高くなったと推測する。オレイン酸ナトリウムは金属イオンと反応してもラウリン酸ナトリウムよりも水溶解性を有するため、相対値はラウリン酸ナトリウムほど高くならなかったと考える。

これらの反射率から得られた K/S 値より、各共存物質のタンパク質定量性を評価すると、アルブミン量 $19.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上で K/S 値が低くなった SDS、ラウリン酸ナトリウムが共存する場合は定量性が低くなった。しかし、その他の界面活性剤および付着量 $0.93\mu\text{g}/\text{cm}^2$ プロテアーゼ試薬が共存しても、定量性に大きく影響を与えないと考えられた。したがって、アルブミン量 $19.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 未満の範囲ならば、界面活性剤および酵素が共存する影響は小さいことがわかった。なお、第 3 章より、本法で得られる精度の高い検量線の範囲はアルブミン量 $14\mu\text{g}/\text{cm}^2$ としており、これまでの検討内容と適する範囲と考える。

洗浄試験に本法を適用する場合、洗浄後にすすぎを行った残留濃度であれば、タンパク質の定量性に大きな影響はないことが明らかとなったが、特に SDS、ラウリン酸ナトリウムは、定量する布帛上に共存する可能性がある場合、布をよく水ですすぐことで影響を抑制することが可能になると考える。

6.5 結論

界面活性剤および酵素が布帛上に存在した場合に、BCA 法を利用したタンパク質直接定量法に与える影響について、実際の洗濯条件から残留量の想定濃度を求めて検討した。

界面活性剤は、単独では BCA 法へ直接影響を与えないが、アルブミンと共存したとき、合成界面活性剤は反射率が相対的に少し高くなった。脂肪酸ナトリウムのうちラウリン酸ナトリウムは、共存するアルブミン濃度が高い場合に、反射率が相対的に高くなる傾向が見られた。酵素は、高濃度のとき、酵素自体がタンパク質であるため BCA 法により呈色するが、実際に想定される残留量では反射率への影響は見られなかった。また、アルブミンと共

存したとき、非イオン界面活性剤と同様に反射率がわずかに高くなることがわかった。

総合して、本法は想定した残留濃度において、界面活性剤または酵素がタンパク質と共存する場合でも、第3章で得た K/S 値をもとにしたタンパク質の定量範囲には大きな影響はないことが明らかとなった。ただし、本法を広く洗浄研究に応用するには、洗剤の残留物が BCA 反応に影響するのを最小限に抑制するため、洗浄試験においてすすぎを十分に行うことを推奨する。

今後、本章の結果において界面活性剤と酵素の残留量が増加した場合には、BCA 反応に影響することから、着用と洗濯の繰り返し試験を行い、洗剤成分の残留量の増加と BCA 反応へ影響を把握することが必要と考える。

引用文献

- 1) 蓼沼裕彦, 皮脂汚れと漂白剤の働き(1), 洗濯の科学, 51(3), 2-6(2006)
- 2) 中谷博美, 後藤景子, ドラム型洗浄試験機を用いた節水洗濯の実験的評価, 家政誌., 64(10), 637-643(2013)
- 3) 山口庸子, 齊藤昌子, 後藤純子, 永山升三, 家庭洗濯の浴比低下に伴う洗剤使用量の最適化, 油化学., 46(9), 991-997(1997)
- 4) Tadenuma, H.; Yamada, K.; Tamura, T., Analysis of Protein-Mixed Surfactant System Interactions; The BSA-SDS and Polyoxyethylenealkylether System, *J.Jpn. Oil Chem. Soc.*, 48(3), 207-213(1999)
- 5) 佐藤昌子, 田村知佳子, 皆川基, アニオン界面活性剤, および, 金属イオン補足助剤とカルシウムイオンとの相互作用に及ぼす温度の影響, 大阪市立大学生活科学部紀要, 30, 113-121(1982)

第7章

脂肪酸および油性成分の 共存による影響

第7章 脂肪酸および油性成分の共存による影響

7.1 目的

第6章において、本法は布帛上のタンパク質を定量する方法として、洗濯に使用する洗剤成分が布上に残留し、界面活性剤または酵素がタンパク質と共存する場合でも、K/S値をもとにしたタンパク質の定量には大きな影響はないことが明らかとなった。しかし、界面活性剤のうち脂肪酸ナトリウムでは濃度によっては、定量性が低くなり、K/S値による検量線の直線性に影響することが見られた。界面活性剤と同様、洗浄後の布に付着している、人体の皮脂汚れには、脂肪酸が多く含まれること¹⁻⁴⁾、さらに、BCA法の原著論文において共存物質としての影響は検討されていないことから⁵⁾、布に付着する脂肪酸が本定量法に及ぼす影響を調べる必要がある。

本章では、綿布帛に付着した皮脂汚れを想定して、脂肪酸および人工皮脂油がBCA法の呈色試薬であるC液に対する影響を調べるとともに、タンパク質と共存した場合の定量性を検討した。

7.2 実験

7.2.1 試薬および試験布

(1) 脂肪酸および人工皮脂油

脂肪酸として、ヒトの皮脂内に多く含まれる⁶⁾、パルミチン酸 ($C_{16}H_{32}O_2$ 、富士フィルム和光純薬製特級)、オレイン酸 ($C_{18}H_{34}O_2$ 、富士フィルム和光純薬製、特級)を用いた。これらの分子構造は以下の図に示す通りである。また、皮脂汚れの油性成分として、調製した人工皮脂油(以下、セバム油)を用いた。この調製には、オレイン酸45%、トリオレイン24.9%、コレステロールオレート19.5%、流動パラフィン4.0%、スクアレン4.0%、コレステロール2.6%(以上すべてw/v)について化学用試薬を用いて、溶融混合した⁷⁾。

本研究に用いるにあたり、これらは水不溶性であるため、オレイン酸とセバム油はヘキサン(C_6H_{14} 、富士フィルム和光純薬製、特級)を用いて希釈し、パルミチン酸はベンゼン(C_6H_6 、富士フィルム和光純薬製、特級)を用いて希釈した。各脂肪酸、セバム油を0.50g精秤し、適量の有機溶媒で溶かしながら50mLメスアップして1%(w/v)母液とし、これをさらに希釈して、濃度を1、0.75、0.5、0.25、0.1、0.01%(w/v)に希釈して汚染液とした。これらの溶液はパラフィルムで厳重に密閉して、冷蔵保管した。実験前に室内に静置して、室温に戻してから実験に用いた。

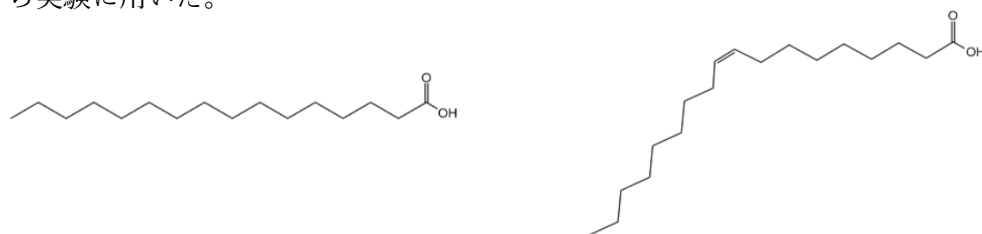


Fig. 7-1 Chemical structures of palmitic acid (left) and oleic acid (right).

(2) タンパク質は第3章と同様にウシ血清アルブミンを用い、2.00%(w/v)水溶液を母液とし、希釈によって0.04、0.10、0.40、0.50% (w/v) 溶液を調製した。

(3) BCA 試薬の A 液および B 液は、それぞれピシニコニン酸ナトリウムおよび硫酸銅五水和物を用いて調製し、これら A 液 : B 液を実験当日に 50 : 1 (v/v) に混合して C 液を調製した。

(4) 試験布には、JIS 染色堅牢度試験綿布 (綿カナキン 3 号)、と、第 5 章と同様の T/C 白布 (ポリエステル 65%、綿 35%混紡、色染社製)、ポリエステル白布 (色染社製) を用いた。これら布はエタノール : 水 1 : 1 (v/v) の混合溶液に 12 時間以上浸漬して精練し、2.5cm×2.5cm または 5cm×5cm に裁断して試験に用いた。

7.2.2 方法

(1) 脂肪酸とセバム油単独による BCA 反応への影響

脂肪酸およびセバム油そのものが及ぼす BCA 反応への影響を調べた。Fig. 7-1 に示すように、撥水性のフッ素樹脂シート (ナフロンシート) 上に 2.5cm×2.5cm 試験布を置き、中央部分へマイクロシリンジで汚染液を 200 μ L を滴下して浸透させ、一晩(12 時間)以上静置して自然乾燥した。この汚染布に水 8.0 μ L/cm²、さらにタンパク質試薬の濃度 0 として水を 4.8 μ L/cm² 滴下し 5 分静置した後、C 液を 24 μ L/cm² 添加して 25 $^{\circ}$ C 恒温器内で反応させ、30 分後の反射率を測定した。反射率測定機器および条件は、これまでと同様である。

なお、第 5 章で述べた通り、ポリエステルは厚みが薄いため 2 枚を重ねて用いた。

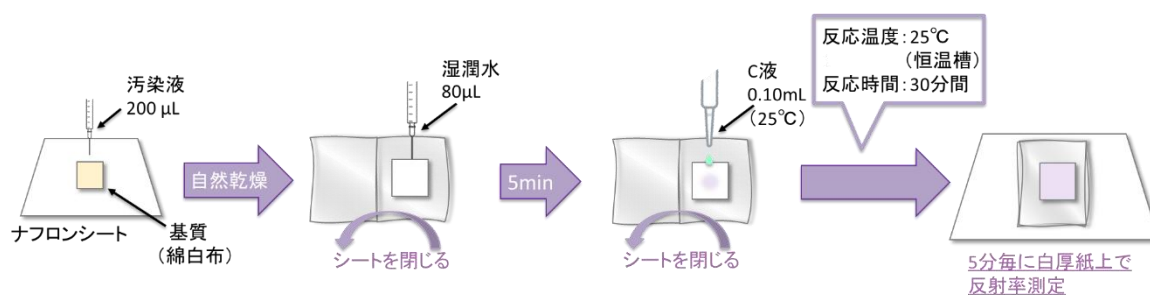


Fig. 7-2 Experimental flowchart about the effect of fatty acids and oily components contaminant on reagent C.

(2) オレイン酸汚染布の洗浄試験およびタンパク質定量性への影響

実際の洗濯環境を想定し、オレイン酸汚染液による汚染布を洗浄し、乾燥させた上でさらにアルブミンを共存させ、呈色反応の反射率を測定してタンパク質定量への影響を検討した。オレイン酸汚染液の濃度は、0.01、0.1、1% (w/v) とした。

Fig. 7-3 の上段に示す通り、ナフロンシート上に汚染基質となる 5cm×5cm の綿試験布を

置き、中央部分へマイクロシリンジで汚染液を 500 μ L 滴下して浸透させ、一晚（12 時間）以上静置して自然乾燥させて汚染布とした。

同一条件の汚染布を 5 枚（約 1.2g）と綿の洗浄補助布を併せて 33.3g となるように調整し、1L の洗浄液との浴比を、一般的な洗浄試験で用いられる 1 : 30 とした。ターゲットメーター（TM-4、大栄科学精器製作所）の試験瓶に洗浄液 1L、すすぎに用いる同量の水 1L を 2 回分用意し、計 3 瓶を 30 $^{\circ}$ C に設定した後、回転数 120rpm で、10 分洗浄し、すすぎ 3 分を 2 回行った。ここでの洗浄液は、直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム（LAS、関東化学、鹿一級）を 0.05%（w/v）水溶液を用いた。ここで、使用した水はすべて超純水を用いた。洗浄後、試験瓶から汚染布および補助布を取り出して、ニトリル手袋を付けた両手で強く絞り、脱水して次の工程に移った。最後のすすぎが完了した後、汚染布 5 枚をキムタオルの上で広げ、自然乾燥させた。洗浄後の汚染布の中央部分 2.5cm \times 2.5cm を切り取り、BCA 反応の試験布に用いた。

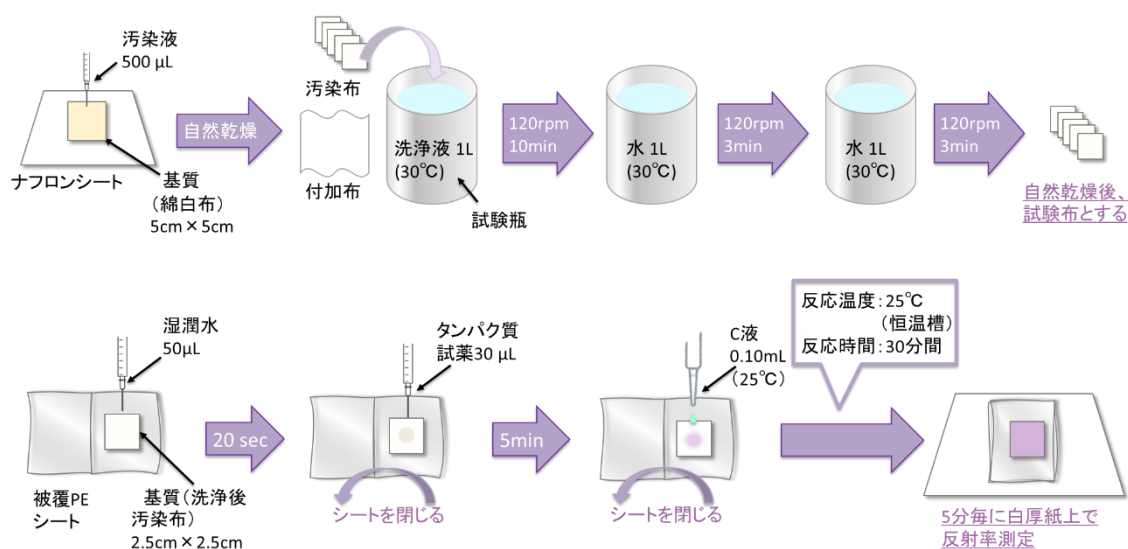


Fig. 7-3 Flowchart of contaminated test swatch washing and protein determination experiment.

Fig. 7-3 の下段に示すようにシート法に従い、水を 8.0 μ L/cm²、各濃度のアルブミン試薬を 4.8 μ L/cm² 滴下して 5 分静置した後、C 液を 24 μ L/cm² 添加し 25 $^{\circ}$ C 恒温器内で反応させ、30 分後の反射率を測定した。反射率測定機器および条件は、これまでと同様である。

7.3 結果

7.3.1 脂肪酸とセバム油による BCA 法 C 液への影響

綿白布 (2.5cm×2.5cm) にパルミチン酸、オレイン酸、セバム油汚染液をそれぞれ 3.2~320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 付着させ、C 液による呈色を測定した結果を Fig. 7-4 に示す。なお、脂肪酸およびセバム油を共存させずに C 液のみを滴下したブランク綿白布の反射率は、第 3 章の結果より、61.3%である。

このことから、パルミチン酸の反射率に注目すると、汚染液濃度が 3.2~320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ にわたって 61~62%を示し、濃度による反射率の変化は見られなかった。また、汚染液 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の付着量では C 液滴下時に汚染布表面に液体が少し留まり、浸透しにくい状況が観察されたが、反応後 20 分時点では均一に呈色しムラのない状態となっていた。次に、オレイン酸およびセバム油の反射率は、どちらも 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の付着量で反射率が 60%から低下し、付着量が 320 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ へ増加するに従い反射率は 55%まで低下した。このように、オレイン酸およびセバム油の付着量と反射率の低下に相関性が確認された。なお、C 液を滴下し反応開始後すぐに、試験布の四辺の端がやや濃色に呈色する様子が確認され、付着量が増加するに従って試験布全体が呈色するため目立たなくなる様子が観察された。さらに、測定時に試薬液が通常の場合と比較して非常に広がりやすく、試験布からしみ出しやすくなっている様子が見られた。

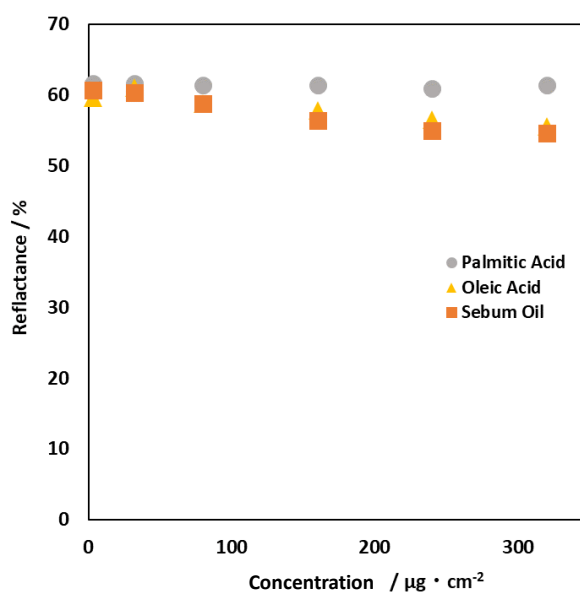


Fig. 7-4 Reflectance of the fatty acid and sebum oil for each concentration. (N=8)

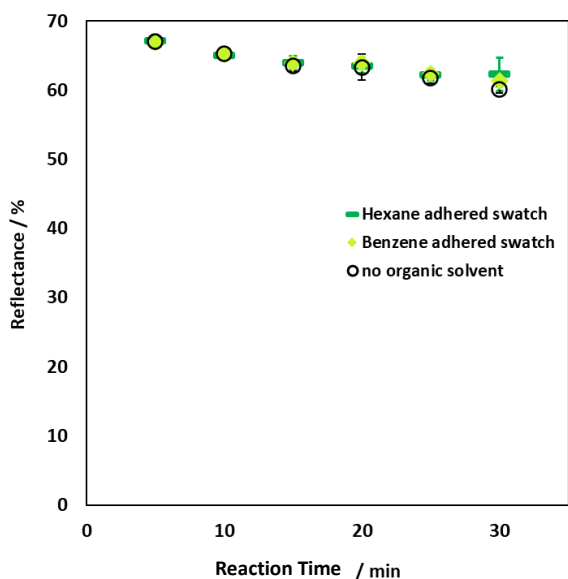


Fig. 7-5 Reflectance of the organic solvent adhered swatch for each reaction time. (N=8)

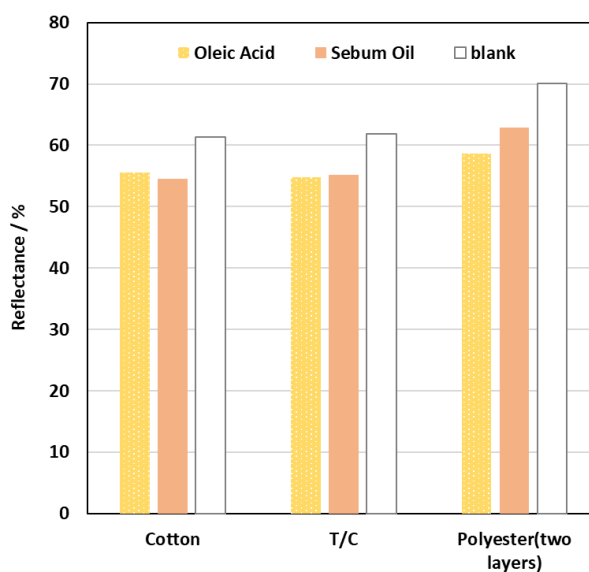


Fig. 7-6 Reflectance of the contaminated swatch for each fiber type. (N \geq 4)

以上のオレイン酸およびセバム油の結果から、これらの汚染液の溶媒として用いたヘキサン、ベンゼンによる BCA 反応への影響について検討した。ヘキサンまたはベンゼンのみをブランク汚染液として滴下し、自然乾燥させた汚染布の呈色反応を測定した結果を Fig. 7-5 に示す。いずれの有機溶媒を用いた場合でも、有機溶媒を滴下していない綿白布の反射率と変化は見られなかった。

次に、綿繊維とオレイン酸およびセバム油間の相互作用による BCA 反応への影響を確認するため、綿白布の対照として、T/C 白布、ポリエステル白布にオレイン酸またはセバム油 320 μ g/cm²を滴下した。また、綿と同様に、T/C、ポリエステルについても汚染液を付着させない場合のブランク白布反射率を測定した。この結果を Fig. 7-6 に示す。いずれの繊維種でもオレイン酸、セバム油汚染布の反射率が同程度低下しており、繊維種に依存しないことがわかった。

7.3.2 オレイン酸汚染布の洗浄試験およびタンパク定量への影響

0.01、0.1、1% (w/v) オレイン酸溶液を付着させた試験布を洗浄した後、各濃度のアルブミン、またはアルブミン濃度 0 のブランクとして水を滴下した共存条件における反射率を Fig. 7-7 に示す。また、汚染液を滴下していないブランク白布を同様に洗浄し、各濃度のアルブミンを滴下した場合の反射率の測定結果も併せて示した。この条件について、以降ブランク洗浄条件と称する。

オレイン酸溶液濃度が 0.01、0.1% (w/v)、すなわちオレイン酸付着量が 2、20 μ g/cm² の場合、共存するアルブミン量の増加に従い、反射率はおおよそ 60% から 20% にかけて低下した。オレイン酸の付着がないブランク白布の反射率挙動と非常に近く、それよりもわずか

に低い値を示した。その一方で、オレイン酸溶液 1%すなわちオレイン酸付着量が $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の場合に注目すると、反射率は 53% から 36% にかけて変化したものの、他の条件と比較して最も反射率が高くなった。これは、前節 7.3.1 で得られた、オレイン酸の付着量と呈色の濃さすなわち反射率の低さに相関するという結果と異なるものであり、アルブミンがオレイン酸と複合することで、何らかの影響をもたらしているものと推察される。また、アルブミン量が 0 のとき、反射率が他の条件よりも低いことから、洗浄によりオレイン酸が除去されておらず、C 液と反応した可能性が示された。

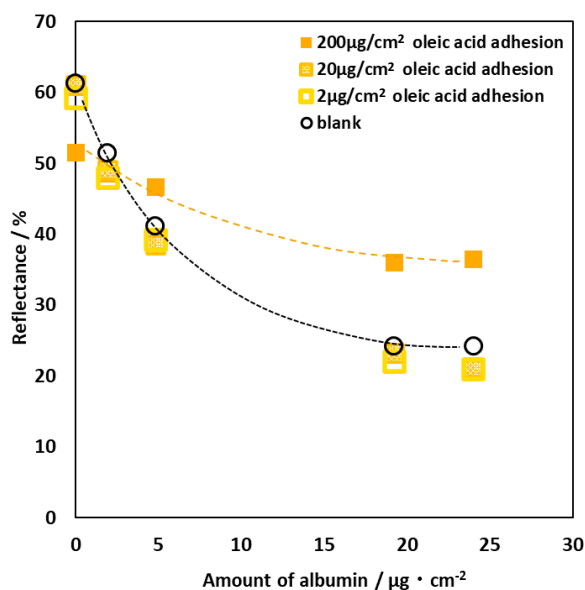


Fig. 7-7 Reflectance of the washed oleic acid contaminated swatch for each albumin concentration. (N=8)

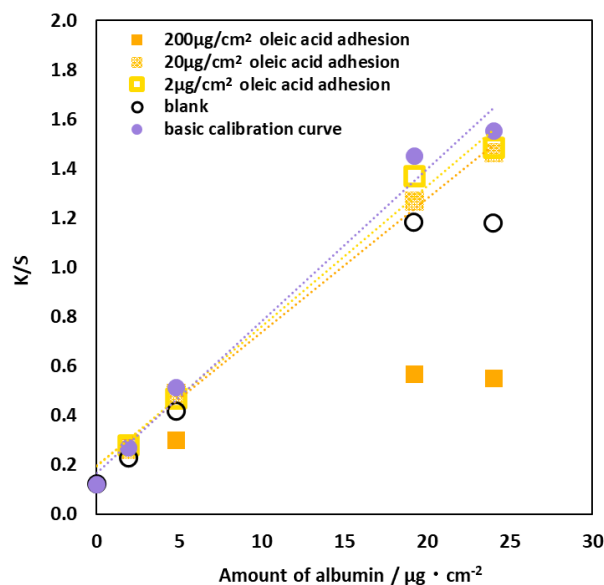


Fig. 7-8 K/S value of the washed oleic acid contaminated swatch for each albumin concentration.

また、得られた反射率から各条件における K/S 値を算出し、アルブミン濃度との関係を Fig. 7-9 に示す。また、併せて第 3 章で得られた、共存物質が存在せず洗浄試験も行っていない、アルブミンのみの場合における検量線（以下、基本検量線と称する）の値も、アルブミン量 $24\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲として加えた。

ここで、基本検量線とブランク洗浄条件の検量線を比較すると、ブランク洗浄条件はわずかに傾きが低くなった。また、オレイン酸付着量が 2、 $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の場合、アルブミン濃度が増加する程、基本検量線と比較して K/S 値がやや低くなったが、オレイン酸付着量が少ない程傾きが非常に近似し、タンパク質定量性高いが確認された。オレイン酸付着量が最も多い $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の場合は、直線の傾きが非常に低くなり、定量性は非常に低いことがわかった。

7.4 考察

パルミチン酸、オレイン酸、セバム油の汚染液が及ぼす C 液への影響を検討した結果、オレイン酸およびそれを多く含むセバム油は、 $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上の付着量で呈色することがわかった。その一方で、パルミチン酸ではその影響が見られなかったことから、これらの脂肪酸の分子構造の特徴が、C 液との反応に関与している可能性が考えられた。Fig. 7-1 に示した通り、パルミチン酸とオレイン酸の大きな相違点として二重結合の存在があり、この点が BCA-Cu 錯体の形成に影響したと推測される。また、オレイン酸またはセバム油汚染布に C 液を滴下して反射率を測定する際に、試薬液が通常の場合と比較してぬれ広がりやすくなったことから、オレイン酸が C 液のアルカリと反応し界面活性剤であるオレイン酸ナトリウムを生じた可能性が考えられた。しかし、第 6 章で用いた界面活性剤の濃度では影響は見られないことがわかっている。このことから、オレイン酸による呈色反応への影響へ、二重結合の存在や界面活性剤の生成等の複合的な因子が働いていることが考えられる。

以上をふまえ、2、20、 $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のオレイン酸汚染布を洗浄した上でアルブミンを添加し、タンパク質の定量性を検討した。その結果、付着量が最も多い $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ では定量性が非常に低くなることがわかった。これは、第 2 章で述べた、アルブミンの脂肪酸と結合しやすいという特性に由来すると推察された。すなわち、布帛上に付着した多量なオレイン酸へ、アルブミンが吸着して飽和状態となり、オレイン酸単独の呈色が示された、または BCA 反応が起こりにくくなったことで、反射率が高くなった可能性が考えられる。

その一方で、オレイン酸の付着量が 2、 $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の場合では基本検量線と非常に近い傾向を示した。アルブミン濃度が $19.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上では、ブランク条件よりわずかに反射率が低くなり、K/S 値として表すと、ブランク条件よりも値が高くなった。これは、C 液のアルカリと反応し、脂肪酸塩が生成して反応液がぬれ広がりやすくなったことで、反射率に影響を与え、基本検量線に近似した K/S 値の傾向が得られたと考えられる。 $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下のオレイン酸とアルブミンが共存する場合、アルブミンと C 液が反応しタンパク質量に応じた呈色が得られていることから、この量のオレイン酸ではアルブミンは飽和状態とならず C 液による銅イオン還元が起こる余地があると考えられる。

以上より、皮脂に含まれるオレイン酸汚染布を洗浄し、タンパク質を共存させた場合、オレイン酸量が多量であれば本法は不適である一方、オレイン酸が少量であれば本法の適用が十分に可能であることがわかった。実際の皮脂汚れに含まれるオレイン酸量については、多様な研究報告¹⁻⁴⁾がなされているものの、個人差が大きく、また、洗浄による除去や蓄積といった複雑な要因を考慮する必要がある。今後、より実際の洗濯環境に近い、ケラチンを用いた検討や、皮脂に含まれる油性汚れとタンパク質の複合条件、定量性が良好となる条件についてさらなる検討を行うことで、本法の適用可能性をさらに広め、より精度の良い定量が可能になると考える。

7.5 結論

第6章に引き続き、BCA法を利用したタンパク質直接定量法を洗浄試験へ適用するため、布に付着する皮脂汚れに含まれる脂肪酸等の油性成分の影響を検討した。皮脂汚れに多く含まれる、脂肪酸のパルミチン酸、オレイン酸と人工皮脂油であるセバム油を使用して、綿布上でのBCA反応に対する影響を調べるとともに、オレイン酸汚染布を洗浄し、アルブミンを付着させてタンパク質の定量性への影響を検討した。

その結果、オレイン酸およびそれを含むセバム油がC液と反応し、付着量が $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上増加すると呈色することがわかった。これは、オレイン酸の分子構造上、二重結合部分がBCA-Cu錯体形成に何らかの影響を与えているものと推測される。

さらに、洗浄後のオレイン酸汚染布におけるタンパク質の定量性は、オレインの付着量が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下のとき、第3章で得られた検量線と非常に近似した結果となり定量性が高いことが明らかとなった。その一方で、 $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のオレイン酸汚染布にアルブミンを付着させた場合、反射率が大きく増加し、アルブミンがオレイン酸と複合することでBCA反応が起こりにくくなる可能性が示唆された。今後、さらに複合的な条件で定量性を検討し、本定量法への影響因子を明らかにすることで、洗浄研究への応用が期待される。

引用文献

- 1) 見城勝, 大倉さゆり, 任田美穂, 金子智佳子, 太田尚子, 皮脂組成の季節変動と肌状態・肌質の関係, 日本化粧品技術者会誌, 34(4), 365-373 (2000)
- 2) 平尾あや, 皮脂の肌着への吸収およびその除去に関する研究 (第 7 報), 家政学雑誌, 13(4), 257-261 (1962)
- 3) 平尾あや, 皮脂の肌着への吸収およびその除去に関する研究 (第 11 報), 家政学雑誌, 17(4), 222-226 (1966)
- 4) 蓼沼裕彦, 皮脂汚れと漂白剤の働き(2), 洗濯の科学, 51(4), 2-6(2006)
- 5) Smith, P. K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A.K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E.K.; Goetze, N. M.; Olson, B.J.; Klenk, D. C., Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, Analytical Biochemistry, 150, 76-85 (1985)
- 6) 日本化粧品技術者会 Web サイト, 「皮脂」
(https://www.sccj-ifsc.com/library/glossary_detail/1364) 2022/11/15 参照
- 7) 奥村統, 徳山清孝, 阪谷武信, 鶴田康生, 新しい人工汚こう布に関する研究 (第 1 報), 油化学., 30(7), 432-441 (1981)

第 8 章

結論

第8章 結論

8.1 結論

被服に付着する汚れには、水溶性汚れ、粒子汚れ、油性汚れ、タンパク質汚れが挙げられる。タンパク質汚れにはヘモグロビン等の有色のもの、無色のものが存在し、特に無色のものは、布にどの程度付着しているかを目視で確認することは非常に困難である。タンパク質汚れが残留したままの被服を保管してしまうことで、それを栄養源とする微生物や酸化の影響により、布の黄ばみといった着色汚れ、悪臭等の問題が生じる。このようなタンパク質汚れを対象とし、被服整理分野では、布に付着しているタンパク質の量を明らかにする定量分析の手法が多く用いられている。しかし、そのためには布からタンパク質を分離抽出し、液体試料として測定に用いる必要があり、長時間、複雑な手順が要求される。さらに、抽出過程において実験者により結果に差が生じやすいという難点がある。これまで、タンパク質の簡便な定量法を検討した例として、有色タンパク質であるヘモグロビンを用いて汚染布を作製し、反射率の測定によって質量単位でタンパク質を定量および洗浄効率を求める方法、ビシンコニン酸 (BCA) による呈色反応試薬をタンパク質汚染ろ紙上で直接反応させ、反射率を測定して定量する方法が挙げられる。しかし、布を基質として、無色のタンパク質を対象とした定量法に関する研究は報告されていない。

本論文では、布に付着したタンパク質を、BCA 法によって呈色させ反射率の測定により直接定量する方法を確立することを目的とし、この定量法の影響要因として考え得る、タンパク質の種類、付着基質となる布の種類による影響の検討を行った。さらに、洗浄研究への適用を検討するため、洗濯洗剤に含有される界面活性剤と酵素、皮脂汚れとしてタンパク質と複合する脂肪酸が共存するときの本定量法への影響を明らかにした。

第1章「序論」では、被服に汚れとして付着し黄ばみや悪臭の原因となるタンパク質を対象とし、被服整理分野の研究で用いられる洗浄評価方法とその特徴について述べた。現在、主に用いられているタンパク質の溶液抽出定量法の問題点と、それに対する従来の研究で明らかになっていない点について示すとともに、布からの抽出を必要とせず、簡便で、精度の良い、新たなタンパク質定量法を確立することの意義を提起した。

第2章「被服に付着する汚れとタンパク質定量法」では、被服に付着する汚れの分類と、それに対する洗浄評価方法として広く用いられている汚染布について述べ、表面反射率による評価の利便性と欠点について示すとともに、もう一つの評価法として用いられている抽出定量法の特徴を示した。その上で、被服に付着するタンパク質汚れの特徴と分類、被服整理分野の研究で用いられている抽出と呈色反応を利用したタンパク質定量法について示すとともに、布上の無色のタンパク質を可視化または定量することを目的とした先行研究および課題について述べた。

第3章「実験方法の検討」では、BCA法を布上に用いて表面反射率の測定により定量を行う、タンパク質直接定量法の確立を試みた。タンパク質にウシ血清アルブミンを、試験布に綿金巾布を用いた。溶液試料を用いるBCA法を布上に適用するにあたり、反応環境をシャーレ内とする容器法、透明シートに挟むシート法を用いて空気接触の影響を調べるとともに、実際のタンパク質汚れを想定し、タンパク質の水溶液を布上に滴下して付着させ、その後のエイジング時間による影響、試薬量、反応時間および温度の条件について検討を行った。

その結果、エイジング時間がおよそ10日以上でわずかに影響が見られたことから、タンパク質試薬は実験時に滴下することとした。また、シート法は空気接触によるBCA反応への影響が見られず、感度良くタンパク質量が反射率に表れた。反射率から求めるK/S値とアルブミンの検量線は、 $0.96\sim 14\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲で相関係数が高く ($R^2=0.9974$)、容器法よりも傾きが大きくなり、タンパク質直接定量法として適することが明らかになった。このシート法の実験条件として、 $2.5\text{cm}\times 2.5\text{cm}$ の試験布に、湿潤水 $50\mu\text{L}$ 、タンパク質試薬 $30\mu\text{L}$ 、BCA法の反応試薬であるC液を 0.1mL 滴下し、 25°C で30分間反応させることで、良好な定量性を有する方法を得ることができた。

第4章「タンパク質の種類による影響」では、綿白布に付着させるタンパク質の種類による反射率への影響およびタンパク質の定量性について検討した。ウシ血清アルブミンの他に、被服に付着するタンパク質汚れに含まれる、カゼイン、ゼラチン、ケラチンを選定し、水溶液または水分散液としてタンパク質試薬とし、第3章で得られた実験方法を用いてBCA反応を行い、反射率とK/S値を求め、タンパク質量との関係を検討した。

その結果、タンパク質のアミノ酸組成による影響に注目すると、BCA反応が起こりやすいとされる、システインやシスチン基等が比較的多く含まれるアルブミンおよびケラチンは他のタンパク質よりも反射率が低くなり、定量性が高くなった。一方、ゼラチンは他のタンパク質よりも呈色の色相がやや青みがかっている特徴が見られ、また、システイン等のアミノ酸基を含まないことから反射率は比較的高く、定量性が低くなった。これらの結果はBCA法の原著論文で報告されていることと共通するものであった。したがって、タンパク質中のアミノ酸基の種類が本定量法に影響を与えることが明らかになり、タンパク質の種類に応じてあらかじめ検量線を作製した上で測定を行うことが望ましいことがわかった。

第5章「布帛の種類による影響」では、タンパク質を付着させる布帛について、織り組織や繊維種による反射率への影響およびタンパク質の定量性について検討した。第3章で用いた綿金巾布を基準とし、織りと厚みが異なる綿白布5種（平織2種、パーケール、ツイル、サテン）、綿以外の繊維種8種（麻、銅アンモニアレーヨン、ジアセテート、ポリエステル、ナイロン、T/C布、羊毛、絹）を試験布として選定した。

試験布がぬれた状態の光学的な特徴を把握するため、紫色染料水溶液を滴下して反射率を測定したところ、表面構造により反射率がわずかに上昇したが、大きな影響はないことが

わかった。一方で、タンパク質繊維である羊毛と絹、銅イオンの残留が推測される銅アンモニアレーヨンの 3 種は、繊維分子が C 液と反応して呈色することがわかり、本法が適さない布帛であることがわかった。また、綿平織布の一種では、付着している繊維加工剤等が呈色して反射率が大きく低下し、定量性が低くなることがわかった。その他の試験布については、綿繊維布および混紡布は定量性が高く、それ以外の布帛では綿より反射率は低くなるものの定量性は良好であることがわかった。また、布帛の試薬の保持性すなわち試薬液のぬれや滲出の程度も、定量性に影響を与える要因のひとつであることが明らかになった。こうした布帛性状の影響があることから、本定量法は被試験物と同一の布帛で検量線を作製することが必要であることがわかった。

第 6 章「界面活性剤と酵素の共存による影響」では、本定量法の洗浄研究への適用に向け、洗剤成分に含まれる界面活性剤と酵素が、本定量法で用いる綿白布上に共存する場合の影響を明らかにするため、本定量法の湿潤水と同様に、共存物質試薬として滴下し、C 液に対する影響とタンパク質の定量性を検討した。用いた界面活性剤は、陰イオン界面活性剤 3 種、非イオン界面活性剤 1 種、脂肪酸ナトリウム 6 種であり、酵素はプロテアーゼを選定した。洗濯後に残留する量は浴比 1 : 15、すすぎ 1 回の洗濯条件から想定し、界面活性剤の試薬濃度は臨界ミセル濃度の 1/16 とし、プロテアーゼは 0.001~1% (v/v) 濃度とし、BCA 反応に共存させた。その結果、本実験で用いた共存物質試薬の濃度において、界面活性剤は C 液に対して影響を及ぼさず、プロテアーゼも付着量が $0.93\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下であれば問題がないことがわかった。

次に、アルブミンのみの反射率を基準値 1.00 とし、界面活性剤 6 種または 0.001%(v/v) プロテアーゼ試薬が共存するアルブミンの反射率を比較し相対値を求めたところ、共存物質の種類によって異なる結果が得られた。ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、分鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (ABS) と直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウム (LAS) は、アルブミンのみの場合と比較して反射率が高く、すなわち相対値が高くなった。特に SDS は二価金属イオンへの結合性が強いことが知られており、これら陰イオン界面活性剤は C 液中の銅(II)イオンと結合するとともに、アルブミンに対してもイオン性または疎水相互作用により特異的に結合し、BCA-Cu 錯体の形成を阻害していることが考えられた。ポリオキシエチレンアルキルエーテル (POE) は陰イオン界面活性剤よりも相対値はやや低くなり、非イオン性の界面活性剤であるため、銅(II)イオンまたはアルブミンに対する静電的な結合が相対的に少なくなったことによると考えられた。プロテアーゼは POE と同等の相対値を示したが、プロテアーゼ自体がタンパク質であるため、上述の界面活性剤とは異なり、アルブミンをわずかに変性させる等の影響で相対値が低くなったと考えられた。脂肪酸ナトリウムの場合、オレイン酸ナトリウムは相対値が 1.00 よりわずかに低くなり、ラウリン酸ナトリウムはアルブミン濃度が高い程に相対値も高くなった。これらの反射率から K/S 値を求めタンパク質の定量性を検討した結果、SDS とラウリン酸ナトリウムを除きア

アルブミン濃度 $19.2\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下の範囲で共存物質がない条件と近い定量性が確認できた。本章の結果より、洗浄後にすすぎを行うことを想定した濃度の界面活性剤と酵素が共存する場合、SDS とラウリン酸ナトリウム以外の界面活性剤およびプロテアーゼは、直接定量法への影響はないことがわかった。

第 7 章「脂肪酸および油性成分の共存による影響」では、第 6 章と同様に本定量法の洗浄研究への適用を進めるために、実際の汚れでタンパク質と共存している皮脂汚れに着目した。試験には、皮脂汚れに含まれる脂肪酸であるパルミチン酸とオレイン酸、および油性成分の混合汚れであるセバム油を用い、これらが共存する場合の影響を検討した。

はじめに、皮脂汚れによる C 液への影響を検討したところ、パルミチン酸は C 液への影響が見られなかったが、オレイン酸およびセバム油は付着量が $80\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上において反射率が低下し、影響が見られた。このことは、オレイン酸とアルカリによる脂肪酸塩の生成や、オレイン酸の分子構造に存在する二重結合部分が C 液と反応することで、BCA-Cu 錯体形成に影響を与え呈色している可能性が示唆された。

そこで次に、オレイン酸で汚染した試験布を、陰イオン界面活性剤を用いて洗浄し乾燥させてからアルブミンを付着させ、本定量法によりタンパク質の定量性を検討した。オレイン酸の付着量が $200\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の場合では、反射率がアルブミンの付着量に反して高くなり、オレイン酸が共存すると BCA 反応が起こりにくくなることがわかった。一方、オレイン酸の付着量が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下では、第 3 章で得られたアルブミン検量線と非常に近似した K/S 値をとり、定量性は高くなることが明らかとなった。

本研究から、布帛に付着したタンパク質を、BCA 法を用いて直接定量する方法を確立したとともに、その定量性は、タンパク質の種類すなわち特定のアミノ酸基、布帛の試薬の保持性および繊維分子や繊維加工剤等の付着物によってある程度影響を受けるものの、汎用性が高いことがわかった。また、洗浄後の布帛に残留する界面活性剤および酵素の影響は、SDS とラウリン酸ナトリウムで影響が見られたが、その他の界面活性剤やプロテアーゼが共存する場合でも定量性が保持されることが明らかになった。さらに、脂肪酸であるオレイン酸とタンパク質が共存する場合、オレイン酸の付着量が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以下ならば影響はないことがわかり、本研究のタンパク質直接定量法への基本的な影響因子および洗浄研究への適用に向けた基礎的な知見を得ることができた。

今後、より実際の洗濯環境に近い複合的な条件における検討を進め、本法の適用可能性と各条件に適した方法を明らかにすることで、例えば、タンパク質汚れに特化した新規洗浄剤、防汚素材の開発を目指す、幅広い分野の研究者にとって、スピーディで精度の良い定量分析を行う手段として貢献できると考える。また、本法のタンパク質を呈色により可視化する定量法という強みを生かしながら、簡易的にタンパク質量を判定するスケール化等の活用も可能になると考えられる。

本論文に使用した研究論文目録

第3章

塚崎舞、森田みゆき、米山雄二、透明シート被覆による布帛上タンパク質直接定量法の高感度化、日本家政学会誌、**73** (4)、199-205 (2022)

第5章

塚崎舞、森田みゆき、米山雄二、布上でのタンパク質直接定量に及ぼす布帛種の影響、材料技術、40(3)、23-30 (2022)

第6章

Tsukazaki. M. Morita. M.; Yoneyama. Y. “Effects of surfactants and enzymes on the direct determination of protein on fabric using the BCA reaction,” Tenside Surefactants Detergents, 60(4), 387-393(2023)

本論文と関係した研究論文

Tani, M.; Amemiya, T.; Tsukazaki, M.; Matsuda, M.; Morita, M. Direct Determination of Protein Soil on the Fabric by the Reduction of Bicinchoninic Acid. Nihon Kasei Gakkaishi (J. Home Econ.Jpn.), **71**, 464-469 (2020)

謝辞

本論文は、文化学園大学大学院 生活環境学研究科 博士後期課程 被服環境学専攻において在学中の令和2年度4月からの3年間に亘る研究成果をまとめたものです。

本研究を推進し、論文をまとめるにあたり、終始あたたかい激励とご指導、ご鞭撻をいただきました文化学園大学大学院 生活環境学研究科 米山雄二教授に、心より感謝と御礼を申し上げます。また、本研究の推進にあたり、懇切なご助言、多大なご支援をいただきました、東京学芸大学 生活科学講座 森田みゆき特任教授に、心より御礼申し上げます。そして、他大学に勤めながら授業を履修し、研究を進める私にあたたかく接していただき、ご助言をいただきました文化学園大学 テキスタイル研究室の諸先生方へも深く感謝申し上げます。文化学園大学大学院 生活環境学研究科の大学院生の皆さまにも、世代の離れた私と分け隔てなく接していただき感謝しております。

最後に、勤めながらの私に博士課程への進学を後押ししてくださり、研究活動をあたたかく見守って下さいました、実践女子大学 生活科学部 生活環境学科の諸先生方、応援してくださった関係者の皆さまに、深く感謝の意を申し上げます。