

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

谷 道子*・森田 みゆき**

1. はじめに

小・中・高等学校家庭科の被服分野（衣生活分野）において、洗浄は「衣服の手入れ」として、必須の項目である。被服の管理の流れ、洗剤の働き、洗濯洗剤の表示や衣服の手入れ方法取扱いなどの学習の中で、洗浄実験は湿式人工汚染布の事例が出ている。

天然汚染布に付着した污垢成分は、油脂とたんぱく質であるが、無色であるので教材に取り上げるのが難しい。従って、一般に、被服分野においては洗剤や漂白の評価のために、湿式人工汚染布などの有色の汚染布を用いて浴比や温度の影響など様々な条件下で洗浄力試験が行われる。その際の評価は、洗浄前後の汚染布の表面反射率や色差、目視、電子顕微鏡による観察などにより行われている^{1)~6)}。この場合、表面反射率の測定や電子顕微鏡による観察などは、特殊な装置が必要となり、授業で実践するのは難しい。また、目視による判定では、汚れ成分自体が有色である必要があり、油汚れやたんぱく質汚れのように無色の汚れ成分の検出は困難である。

我々は、汚れ成分の簡便な分析が可能となれば、小学校家庭科の「洗濯」においてたんぱく質汚れの洗浄性を提示したり、中学校および高等学校家庭科の「衣生活」に洗浄試験を取り入れたりすることにより、授業の中で洗浄効果を実感し、衣生活分野により興味をもって取り組むことができるのではないかと考えた。これまでに簡便なたんぱく質分析の家庭科教育への応用⁷⁾ および基質としてろ紙を用いたBCA法（ろ紙BCA法）によるたんぱく質の可視的評価を検討してきた（谷道子，森田みゆき（投稿中））。その結果，BCA法による基質上でのたんぱく質の検出は可能であることが分かった。しかし，可視的評価と光学的諸計測値の関連についての詳細な検討は行っておらず，得られた可視的評価が単に官能的なものなのか，科学的に立証できるものなのか明らかになっていない。本研究では，ろ紙BCA法によるたんぱく質の可視的評価と光学的解析による諸計測値との関係について検討した。

2. 実験

(1) 装置

表面反射率の測定には、日本電色工業株式会社製簡易型分光色差計NF333を使用した。

(2) 試薬

ビシンコニン酸（BCA）はThermo Science製，アルブミン（牛血清由来，結晶品）は和光純薬製（生化学用）をそのまま使用した。その他の試薬は和光純薬製の試薬特級を用いた。水はイオン交換水を蒸留したのち，超純水処理したものを使用した。ろ紙はADVANTEC製定性ろ紙（No. 2）を使用した。

* 元藤女子大学人間生活学部非常勤講師

** 北海道教育大学 札幌校

(3) 操作

1) BCA試薬の調製

BCA試薬の各液は以下の通り調製した。ビスコニン酸ナトリウム1.0g, 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, 50%水酸化ナトリウムでpH11.25に調製した (A液)。硫酸銅五水和物0.4gを水9.6mLに溶解した (B液)。A液 : B液 = 50 : 1で混合し (C液), 調製後2時間以内に使用した。

2) ろ紙BCA法

シャーレ内にろ紙 (25mm×25mm) を置き, 試料30 μ Lを滴下して室温で5分間放置した。ここにBCA-C液0.1mLを滴下して蓋をし, 室温または25°Cで30分反応させた後, 目視による観察および560nmにおける表面反射率測定を行った。

3. 結果および考察

1) BCA法による基質表面のたんぱく質の発色

アルブミン濃度0 μ g (ブランク), 30 μ g, 150 μ gの3濃度について, ろ紙BCA法による30分後の色の変化を観察した。その結果, 図1に示すように目視でアルブミン濃度に依存してろ紙が濃色に変化するのが分かった。ブランク (BL) でもわずかに発色したが, 可視的に評価するのに問題はなかった。BLでわずかに発色したのは, ろ紙に含まれるアルデヒド残基に還元性があるためと考えられる⁸⁾⁹⁾。

以上のように, ろ紙BCA法で目視によるたんぱく質の検出が可能であり, たんぱく質濃度と顕色状態の関係を表したスケールを用いることで, より簡便かつ正確に評価できると考えられる。

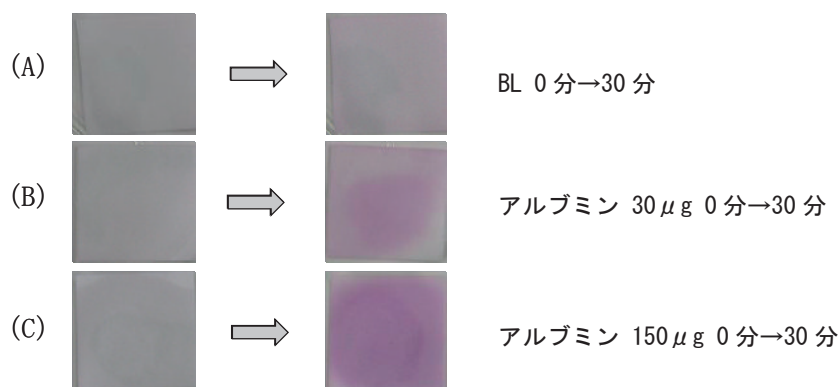


図1 ろ紙BCA法における発色変化

サンプル 30 μ L, アルブミン濃度 (A) 0 μ g (BL), (B) 30 μ g, (C) 150 μ g,
反応温度 室温, 反応時間 0分→30分

2) 可視的評価と諸計測値との関係

ろ紙を基質とするたんぱく質の可視的評価において、目視での官能的な評価と色差やK/Sなどの計測値による解析値との関連を明らかにすることにより、可視的評価法の確立と布帛への応用を行う際の指標にできると考えられる。このことから、可視的評価法と諸計測値による解析との関係を調査した。

① 表面反射率，色差 (ΔE^*ab) およびK/Sによる解析

2つの色の違いを数値で表したものが色差である。色差には、CIE表色，CIELUV表色などいくつかの表し方があるが、本研究ではCIELAB表色系による色差 (ΔE^*ab) を用いた。一方、K/Sは不透明色の濃度評価法として一般に用いられており¹⁰⁾、 $K/S = (1-R)^2/2R$ で表される。ただし、Kは物質の吸収係数、Sは物質の散乱係数、Rは表面反射率を指している。アルブミン濃度 (0~600 μg) と表面反射率、 ΔE^*ab およびK/S値の関係を図2に示す。表面反射率、 ΔE^*ab 、K/Sいずれの場合も、アルブミン濃度に依存して非直線的に値が変化した。アルブミン濃度を対数にした場合の各値との関係を図3に示す。表面反射率と ΔE^*ab は、それぞれ $y = -13.65 \log x + 64.05$ ($R^2 = 0.976$)、 $y = 12.66 \log x + 5.09$ ($R^2 = 0.981$)の比較的良好な直線関係であった (yは表面反射率または ΔE^*ab 、xはアルブミン濃度)。しかし、目視ではアルブミン300 μg と600 μg の色の違いは判別できなかったが、表面反射率と色差はアルブミン0 μg ~600 μg (対数表示) で一定の変化を示したことから、表面反射率と色差による解析は可視的評価とは完全には一致しないことが分かった。

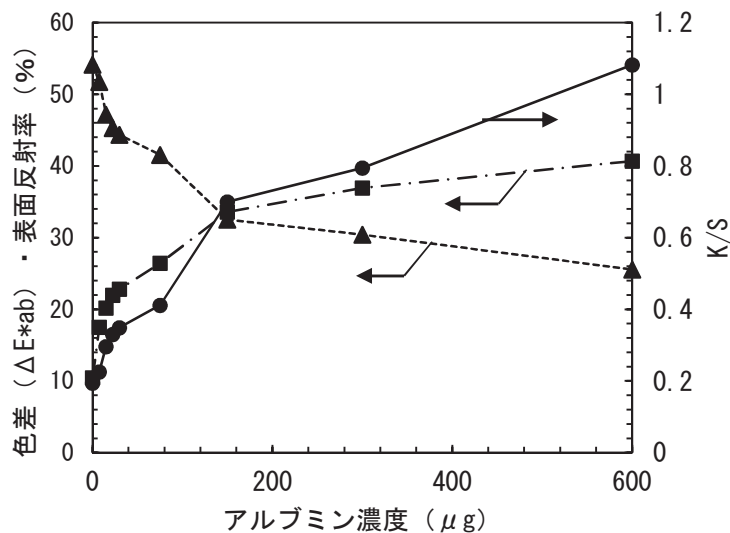


図2 表面反射率，色差，K/S に及ぼすアルブミン濃度の影響

サンプル 30 μL ，反応温度 25°C，反応時間 30 分，表面反射率測定波長 560nm

—●— 表面反射率，- -■- - 色差，.....◆..... K/S

一方、K/Sはアルブミン濃度75 μg を境に2段階の直線性を示した。また、その数値は検討した濃度範囲内において上昇し続け、表面反射率および色差と同様に、K/Sによる解析も可視的評価とは一致しなかった。表面反射率とそれを利用した値であるK/Sによる解析が

可視的評価と一致しなかったのは、ろ紙上でのBCA反応が進行するに従い、着色が表面だけではなく布の厚さ方向にも進行し、目視で観測できる色の変化以上に光を吸収して反射率が低下するためと考えられる。一方、色差は色と輝度を考慮した値である。BCA反応の初期の着色が薄いとき、もしくは反応が進行し着色が濃くなったとき、その輝度の違いを目視で判別しにくくなるため解析値と可視的評価が一致しなかったと考えられる。このことから、K/Sはろ紙BCA法による基質上での反応を表す数値であるが、可視的評価を表す数値とはならないと考えられる。

以上のように、表面反射率、色差、K/Sによる解析は可視的評価とは一致しなかった。しかし、アルブミン濃度を対数にとった場合、表面反射率と色差は広範囲のアルブミン濃度で直線関係にあり、ろ紙BCA法におけるたんぱく質濃度の決定法として利用できる。また、K/S値は、不透明色における濃度評価法として一般的で、ろ紙BCA法の顕色における光の吸収の指標であることから、反応条件の検討やメカニズム解明のための評価法として有効と考えられる。

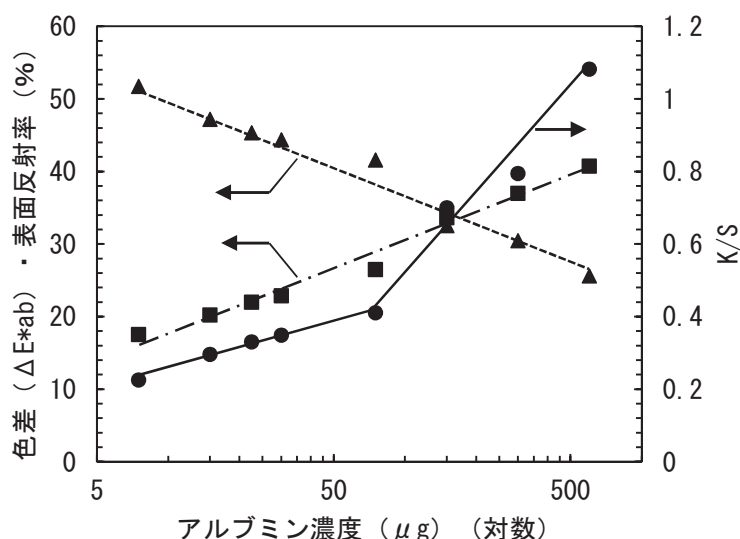


図3 表面反射率、色差、K/S に及ぼすアルブミン濃度の影響 (対数表示)

サンプル 30 μL, 反応温度 25°C, 反応時間 30 分, 表面反射率測定波長 560nm

—●— 表面反射率, - -■- - 色差,◆..... K/S

② L*a*b*による解析

L*は輝度（明るさ）を表している。a*は原点からプラスに変化すると赤色，マイナスに変化すると緑色の度合いが増す。b*は原点からプラスに変化すると黄色，マイナスに変化すると青色の度合いが増すことを示している。アルブミン濃度0~600 μgにおけるL*, a*, b*の変化を図4に示す。L*は、アルブミン濃度0-30 μgで急激に低下し、その後、徐々に低下した。これは、基質表面の輝度すなわち白さが失われることであり、見た目の輝度低下とほぼ一致している。しかし、アルブミン濃度300 μgと600 μgの色の違いは目視で判別す

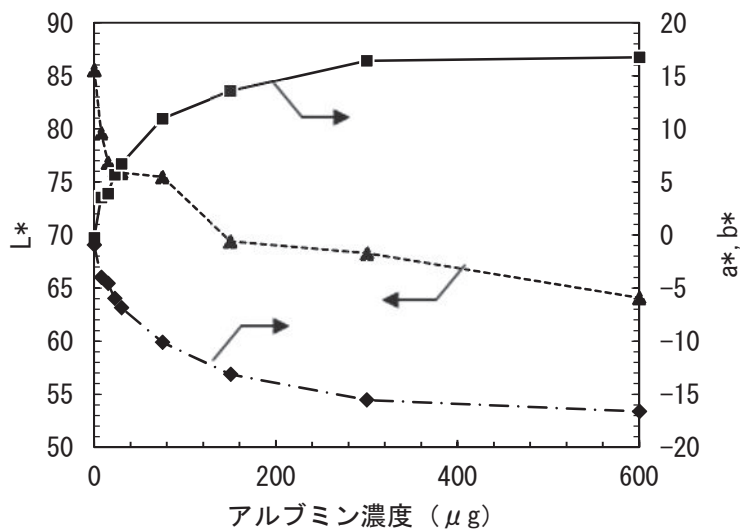


図4 L*a*b*に及ぼすアルブミン濃度の影響

サンプル 30 μL, 反応温度 25°C, 反応時間 30 分, 表面反射率測定波長 560nm

.....▲..... L*, —■— a*, - -◆- - b*

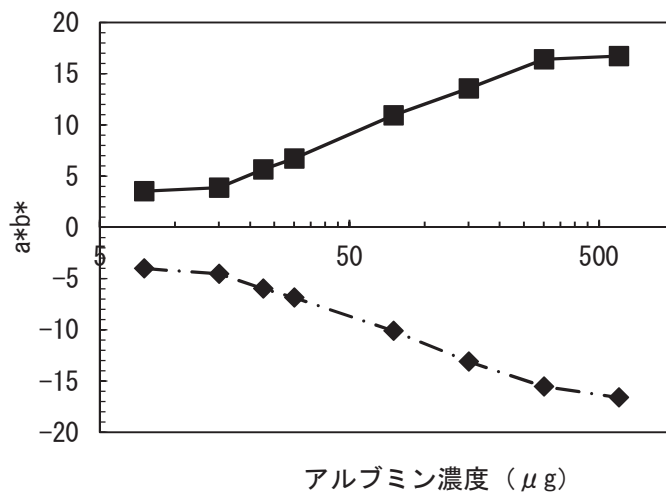


図5 L*a*b*に及ぼすアルブミン濃度の影響 (対数表示)

サンプル 30 μL, 反応温度 25°C, 反応時間 30 分, 表面反射率測定波長 560nm

—■— a*, - -◆- - b*

ることが難しかったが、L*では数値の違いとして表れていることから、目視での評価と完全には一致しないことが分かった。一方、a*はアルブミン濃度に依存して曲線的に増大、b*はアルブミン濃度に依存して曲線的に減少し、どちらも300 μg と600 μg ではほとんど変わらなかった。アルブミン濃度を対数にした場合のa*b*との関係を図5に示す。すると、アルブミン濃度15 μg から300 μg の場合の変化に比べて、7.5 μg から15 μg 、300 μg から600 μg での変化は小さかった。これは、アルブミン濃度15 μg 以下、600 μg 以上において色の違いを目視で判別することが困難な現象と一致している。

また、横軸と縦軸にa*値、b*値をとってアルブミン濃度の影響を表したところ、図6に示すように、プロットはアルブミン濃度の増大とともに右下に移動し、赤色と青色が濃くなっていくことがわかる。このことから、a*b*のグラフを用いることで、色の変化を感覚的にとらえることができるとともに、a*b*の数値からおおよそのアルブミン濃度を決定することができる。

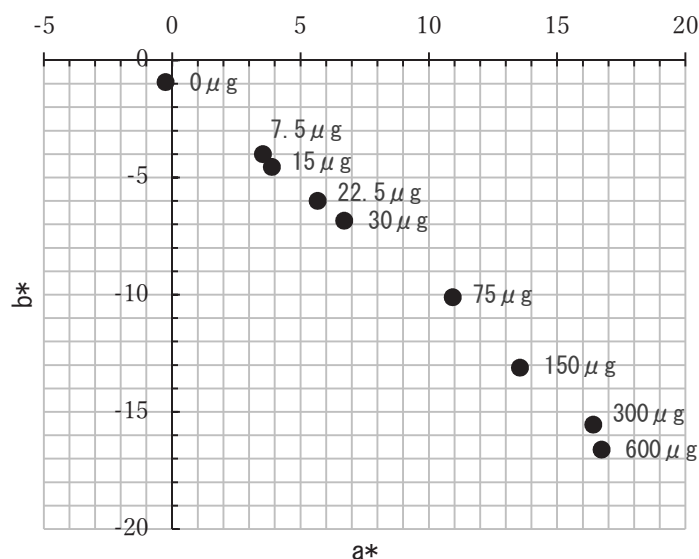


図6 アルブミン濃度の違いによる色の変化

サンプル 30 μL ，反応温度 25°C，反応時間 30 分，表面反射率測定波長 560nm

以上のことから、L*a*b*を測定することにより、目視で観測される輝度の低下や色の変化を数値化することが可能と考えられる。特に、a*b*は、目視で確認できる色の変化とほぼ一致した傾向を示した。また、a*b*をグラフに表すことにより、おおよそのアルブミン濃度を感覚的に決定できることが分かった。今後、たんぱく質の可視的評価（スケール作成）法を確立するための有効な評価法であるとともに、感覚的な評価に有効であると考えられる。

4. 結論

本研究では、ろ紙BCA法によるたんぱく質の可視的評価と色差計での各種測定値による解析方法との関係を検討した。評価方法は、表面反射率、色差 (ΔE^*ab)、K/S、 $L^*a^*b^*$ について検討した。

表面反射率、色差 (ΔE^*ab) およびK/Sによる解析値は、可視的評価の結果と一致しなかった。しかし、表面反射率と ΔE^*ab は、たんぱく質濃度を対数に取った場合、 $7.5 \mu\text{g}$ - $600 \mu\text{g}$ の広い濃度範囲で直線関係となり、それぞれの近似直線は

$y = -13.65 \log x + 64.05$ ($R^2 = 0.976$) (表面反射率), $y = 12.66 \log x + 5.09$ ($R^2 = 0.981$) (ΔE^*ab) であった (y は表面反射率または ΔE^*ab , x はアルブミン濃度) ことから、ろ紙BCA法におけるたんぱく質濃度の決定に利用することができる。また、K/Sは、一定のたんぱく質濃度範囲において直線関係を有していた。K/Sは、ろ紙BCA法における顕色の光の吸収量を示していることから、反応条件の検討やメカニズム解明に有効な評価法と考えられる。

一方、 $L^*a^*b^*$ は、輝度や色の変化を数値で表す指標である。本研究においては、 $L^*a^*b^*$ 、特に a^*b^* の変化は、目視で確認できる色の変化と一致した。また、 a^*b^* をグラフの横軸と縦軸にして色とアルブミン濃度の関係を表すと、色が濃くなっていくことが感覚的にわかった。このことから、 $L^*a^*b^*$ は、目視で得られる情報を数値化し、たんぱく質の可視的評価 (スケール作成) 法を確立するための客観的判断基準となるとともに、 a^*b^* のグラフを用いることでおおよそのアルブミン濃度を感覚的に決定できると考えられる。

今回の検討によりわかった表面反射率、色差、K/S、 L^*ab による解析値と可視的評価の関係を用いて基質種やたんぱく質種の検討などを行い、無色であるたんぱく質汚れの可視的評価法を確立し、教育現場への応用を実現したいと考える。

引用文献

- 1) 一般財団法人日本規格協会「家庭用合成洗剤試験方法」『日本工業規格 JIS K 3362』
- 2) 酒井豊子, 柳許子, 岡村幸子, 渡辺紀子「汚れと洗浄試験」『被服科学実験』三共出版, 1999, 72-79 項。
- 3) 森田みゆき, 小松恵美子, 上館民夫, 渡辺寛人「ペルオキシダーゼー過酸化水素漂白系を用いたオレンジIIの色移り防止」『繊維学会誌』53, 1997, 289-293 項。
- 4) 山口庸子, 小林有紀子, 永山升三「各種ポリエステル布の汚染・洗浄特性と洗浄力評価法」『日本家政学会誌』48, 1997, 329-337 項。
- 5) 尾畑納子「洗浄性能の評価法」『繊維学会誌 (繊維と工業)』61, 2005, 237-239 項。
- 6) 佐々木麻紀子, 角田薫, 藤居真理子「洗濯用洗剤の洗浄性—洗浄時間の影響—」『東京家政学院大学紀要』54, 2014, 41-47 項。
- 7) 細川朝子, 谷道子, 森田みゆき, 増渕哲子「中学校の家庭科教材におけるたんぱく質の可視化の試み」『北海道教育大学紀要』印刷中。
- 8) Hoon-sik Shin; Yang-seob Moon; Seiji Tokino; Mitsuo Ueda「Pattern Formation Using Metal Silver Staining on Cellulosic Substrate by Patterned Ultraviolet Light Irradiation」『SEN' I GAKKAISHI』53, 1997, 164-166 項。
- 9) 梶本晴彦, 野口道子, 梶本光代「薬物吸着に配慮した脱脂綿製造工程中における漂白剤の選定」『病院薬学』25, 1999, 614-620 項。
- 10) 浦畑育生「濃度の測定」『測色による色彩管理の知識』関西衣生活研究会, 1987, 50-52 項。