

布上でのタンパク質直接定量に及ぼす布帛種の影響

塚崎 舞¹⁾, 森田 みゆき²⁾, 米山 雄二³⁾

¹⁾ 実践女子大学 生活科学部 (〒191-8510 東京都日野市大坂上 4-1-1)

²⁾ 東京学芸大学 教育学部 (〒184-8501 東京都小金井市貫井北町 4-1-1)

³⁾ 文化学園大学 服装学部 (〒151-8523 東京都渋谷区代々木 3-22-1)

Effect of Fabric Types on Direct Determination of Protein on Fabrics

Mai Tsukazaki^{1,*}, Miyuki Morita², Yuji Yoneyama³

Abstract

The influence of the weave, thickness, and fiber material of the fabric on the direct determination of the protein in the fabric by the bicinchoninic acid (BCA) method was investigated in this paper. Six kinds of cotton fabrics, with different weaves and thicknesses, and eight kinds of plain-weave fabrics with different fiber materials were used as the test swatches. The K/S value was calculated from the reflectance, based on the color reaction of the BCA method, and the quantitation was evaluated based on the relationship between the K/S value and the protein concentration. Based on the results, it was determined that the influence of the weave and thickness was not significant, and the quantitation was good. Contrastingly, it was found that protein fibers (wool and silk) and the cuprammonium rayon, in which copper ions remained, which react with the C solution of the BCA method, are not suitable for this method.

Keywords : Fiber, Fabric, Determination of Protein, Reflectance, Bicinchoninic Acid

Received July 3, 2022; accepted August 8, 2022

¹⁾ Department of Human Environmental Sciences, Jissen Women's University, 4-1-1 Osakaue, Hino-shi Tokyo, 191-8510, Japan

²⁾ Faculty of Education, Tokyo Gakugei University, 4-1-1 Nukuikita-machi, Koganei-shi Tokyo, 184-8501, Japan

³⁾ Faculty of Fashion Science, Bunka Gakuen University, 3-22-1 Yoyogi, Shibuya-ku Tokyo, 151-8523, Japan

* Corresponding author: Mai Tsukazaki, E-mail: tsukazaki-mai@jissen.ac.jp

1. 緒言

皮脂に含まれるタンパク質や油脂は無色であり、繊維に付着した汚れを目視で確認し除去することは困難である^{1,2)}。洗浄によりタンパク質汚れがどの程度除去されたのかを評価するために、繊維に付着したタンパク質を定量する方法が必要となるが、一般的に、強アルカリ条件での長時間抽出^{3~5)}、必要に応じ抽出物の分離処理を行い、Bradfor 法、Lowr 法、ビスニコニン酸 (BCA) 法といった呈色反応を利用したタンパク質定量法で、溶液の吸光度測定を行う定量方法が用いられている^{6~9)}。これらの方法は時間を要し、さらに抽出過程で誤差を抑制するためには熟達した技術を必要とされる。そのため、短時間で簡潔な手順の定量方法が求められており、様々な視点から研究がなされている^{10~12)}。

BCA 法は Fig.1 に示したように銅 (II) イオンがタンパク質によって還元され、ビスニコニン酸と BCA-Cu 錯体を形成する。この錯体は最大吸収波長 562 nm の呈色を示し、吸光度測定によりタンパク質量を定量する。

また、他の定量法よりタンパク質の種類による影響、および界面活性剤の共存による影響が少ないとされており^{13,14)}、繊維基質に付着したタンパク質定量に適する方法であると考えられる。

著者らはこれまで、綿巾中白布を反応基質とし、モデルタンパク質としてウシ血清アルブミンを付着させ、BCA 法による呈色反応を利用した直接定量法を検討し、表面反射率とアルブミン濃度に高い相関性があり、検量

線による定量が可能であることを報告した¹⁵⁾。また、BCA 法において銅 (I) イオンは空气中の酸素の影響で酸化が促進されることが考えられ、透明ポリエチレンシートを用いて酸素との接触を避ける操作方法を検討し、K/S 値によるタンパク質濃度の高感度な評価が可能であることを明らかにした¹⁶⁾。

本定量法は、タンパク質汚れを抽出処理する必要がなく、呈色反応と反射率測定によってタンパク質を簡便かつ迅速に定量することが可能である。この特徴は、既知量のタンパク質を付着させた汚染布を用いた洗浄試験において、タンパク質の除去率を容易に把握することに活用でき、これによりタンパク質汚れの除去に効果的な新洗浄基材や防汚加工等の繊維材料開発に寄与できると考える。

実際のタンパク質汚れが付着する基質は被服であり、それには多様な繊維素材が用いられている。また、繊維の集合体である布帛においても織りや厚さの違いがある。本研究では織りや厚さが異なる綿白布、および繊維種の異なる平織り布を試験布に用い、前報と同様の BCA 呈色反応を行った時の布帛の種類による影響を検討した。

2. 実験

2.1 試薬および装置

タンパク質は前報と同様にウシ血清アルブミン (生化学用, 結晶品, 富士フィルム和光純薬製) を用い、0.5~0.04 % (w/v) 水溶液とした。BCA 法にはビスニコニン酸ナトリウム (Thermo Science 製) を用いた。その他の試薬は富士フィルム和光純薬製の試薬特級を実験に供した。

水はイオン交換水を蒸留した後、超純水装置 Simplicity UV (MERCK 製) で処理したものを使用した。ビスニコニン酸ナトリウム 1 g, 炭酸ナトリウム 1.71 g, 酒石酸ナトリウム二水和物 0.16 g, 水酸化ナトリウム 0.4 g, 炭酸水素ナトリウム 0.95 g を水 95 mL に溶解し、50 %水酸化ナトリウム水溶液で pH 11.25 に調製し、これを BCA 法の A 液とした。BCA 法の B 液は、硫酸銅五水和物 0.4 g

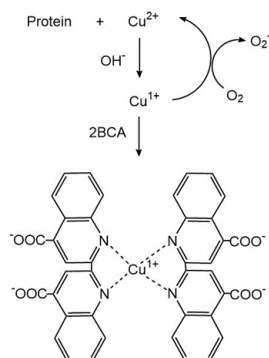


Fig 1. BCA reduction reaction cycle and Oxidation by oxygen in the air.

を水 9.6 mL に溶解して調製した。試験当日に A 液と B 液を 50 : 1 (v/v) に混合して C 液とし、反応に用いた。

2.2 試験布の種類

試験布は、日本規格協会が提供している JIS 染色堅牢度試験用の綿カナキン 3 号を基準布（綿繊維、平織布）として、織りまたは厚さが異なる綿布を Fig. 2 に示す通り合計 6 種選定した。さらに、平織りで繊維種の異なる布帛を 8 種選定し、試験布に用いた。これら 14 種の試験布について Table 1 に示す。

試験布はエタノール : 水 = 1 : 1 (v/v) の混合溶液に一晩浸漬して精練し、2.5 cm × 2.5 cm に裁断して試験に用いた。羊毛は、

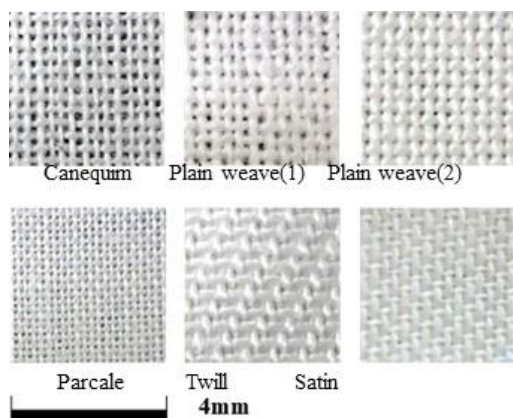


Fig 2. Images of six types cotton swatch

予備実験で繊維表面のロウ質で試薬がぬれ広がりにくいことがわかっており、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) 溶液で精練したものを用了。

2.3 試験布の構造および繊維種の反射率への影響

試験布の織りや厚さの違いは表面上に特徴的な凹凸構造を生じ、試薬の浸透状態ならびに反射率の測定に影響を与えることが予想される^{17,18)}。同様に、繊維種の違いにより色相や表面状態がわずかに異なることが推測される。これらの影響を検討するため、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、BCA 法で滴下する試薬液総量と同量を各試験布へ滴下し、反射率を測定した。染料滴下前後の値を比較することで、試験布の織り、繊維種による反射率への影響を評価した。

実験手順は次の通りに行った。透明ポリエチレンシート（厚さ 0.04 mm, 以下 PE シート）の半分の部分に試験布を置き、マイクロシリンジで 28.8 μL/cm² 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、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、560

Table 1 Distributor and basic physical characteristics of swatch fabrics

	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)	Sentaku 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	

nm の表面反射率を測定した。測定は、歪みが生じないようにシートの上から垂直に押し当て、試験布 1 枚につき 4 か所の反射率を測定し、その平均値を用いた。なお、試験布 1 枚の厚さが、基準とする綿金巾の半分以下である、銅アンモニアレーヨン、ジアセテート、ポリエステル、ナイロンの 4 種は、他種との厚さの差を抑えるため、2 枚を重ねて試験布として用いた。

2.4 BCA 反応における各試験布の影響

BCA 法 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、0, 4.8, 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 濃度のアルブミン溶液を、各試験布に滴下した上で C 液を反応させ、反射率を測定した。実験手順は、PE シートの半分に試験布を置き、マイクロシリンジで水 8 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 、アルブミン溶液 4.8 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ を滴下してシートを閉じ、5 分静置した後、シートを開いて C 液を 24 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ 滴下して再びシートを閉じ、25 $^{\circ}\text{C}$ の低温恒温槽に静置して反応させた。試験布の呈色は、先述の 2.3 の通りに反射率の測定を行った。

3. 結果および考察

3.1 試験布の構造および繊維種の反射率への影響

織り、厚さの異なる綿繊維の試験布へ染料

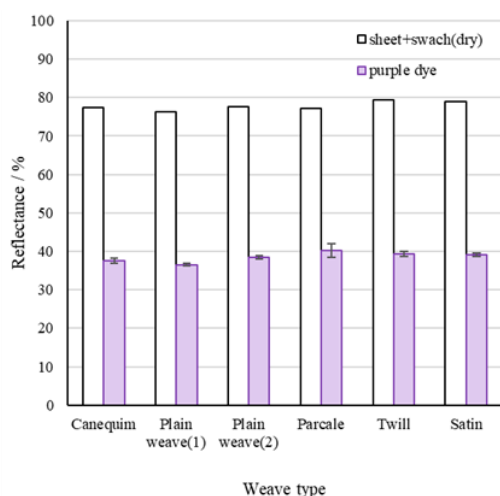


Fig. 3. Reflectance of Cotton swatch and purple dye dropped swatch (N=4)

を滴下し、反射率を測定した結果を Fig. 3 に示す。染料滴下後の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、シートで被覆した時の反射率は 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、測定への大きな影響はないと考えられる。パーケールについては、Table 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、これがムラとしてエラーバーに現れたと考える。また、ツイル、サテンの 2 種では、表面の糸面積が平織りよりも大きくなり、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 8 種の反射率を Fig. 4 に示す。ここには、基準布の反射率も併記した。シートで被覆した 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。

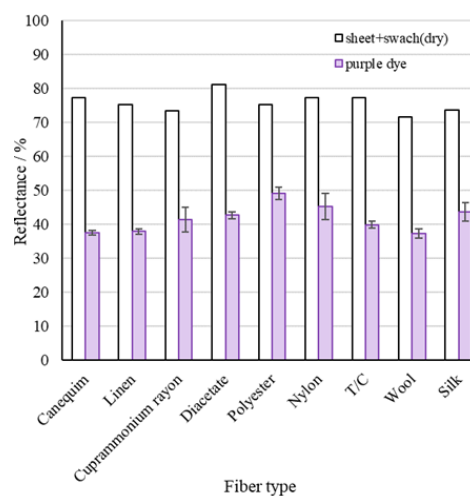


Fig. 4. Reflectance of different fiber types swatch and purple dye dropped swatch (N=4)

羊毛は、白布の反射率はやや低いですが、染料滴下後の値は基準布に近似している。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、絹の各布は、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考えられる。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測定時に流動する様子が確認され、標準偏差値が大きくなった。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、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。

これらの特性を踏まえ、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。

3.2 BCA 反応における綿布の織りおよび厚さの影響

0, 4.8, 24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 濃度のアルブミン溶液を、5 種の綿布へ滴下し、BCA 呈色による反射率を測定した結果を Fig. 5 に示す。

アルブミン濃度が 0 の場合、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前報にて把握している¹⁶⁾。今回の結果は、綿

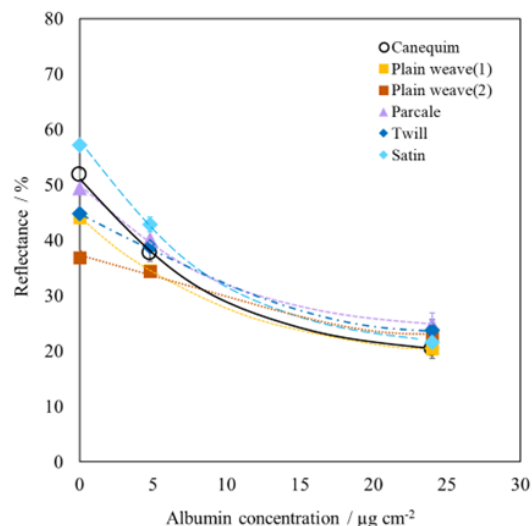


Fig 5. Effect of albumin concentration on reflectance at cotton swatch ($N \geq 4$)

繊維の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影響とも考えられる。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¹⁹⁾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。

さらに、これら 5 種の綿布はアルブミン濃度が増加するに従い、反射率値は基準布に近い値となり、24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 濃度の場合、試験布による値の差は 5% 以内に収束している。すなわち、綿繊維の場合は、タンパク質を共存させた場合、低濃度では試験布の特徴が反射率に影響を与えるが、比較的高いタンパク質濃度の場合はその影響は小さいことが明らかとなった。

3.3 BCA 反応における繊維種の影響

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

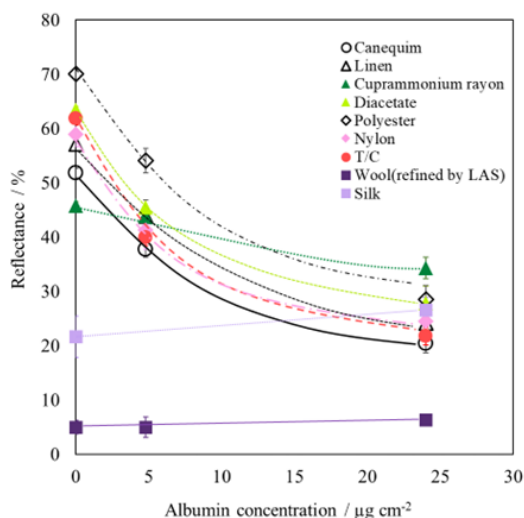


Fig 6. Effect of albumin concentration on reflectance at swatch of different fiber types ($N \geq 4$)

した結果を Fig. 6 へ示す。

羊毛および絹布は、アルブミン濃度が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呈色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ができないことが判明した。

銅アンモニアレーヨンの場合、アルブミン濃度が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。これは、銅アンモニアレーヨンはその製造過程において銅イオンを用いるため、その銅イオンが残留²⁰⁾し、BCA呈色反応に影響したと考えられる。

麻、ジアセテート、およびT/C布は、アルブミン濃度にしたがって、基準布と近似した反応性を示した。しかし、アルブミン濃度0のときには、繊維自体とC液の反応性は小さかった。この理由は、麻の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、

官能基の大半が酢酸化されていることから、C液と反応しにくいためと考えられる。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。

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、アルブミン濃度にしたがって反射率の減少が見られ、その曲線は基準布と同様であった。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液との反応または吸水性によるC液の保持性が影響したものと考えられる。

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、アルブミン濃度に応じた明確な反射率の低下が確認され、BCA呈色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。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。

3. 4 各試験布のタンパク質定量性

反射率の値を小数としたものを R とし、Kubelka-Munkの式($K/S = (1 - R)^2/2R$)を用いて各試験布の K/S 値を求め、5種の綿布におけるアルブミン濃度との関係をFig. 7、繊維種の異なる5種の試験布におけるアルブミン濃度との関係をFig. 8に示す。アルブミンの濃度範囲0~24 $\mu\text{g/cm}^2$ で近似直線を求め、その直線の傾きから定量性を評価した。なお、明らかに定量性が確認されなかった羊毛、絹および銅アンモニアレーヨンは図から除外した。

Figure 8において、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

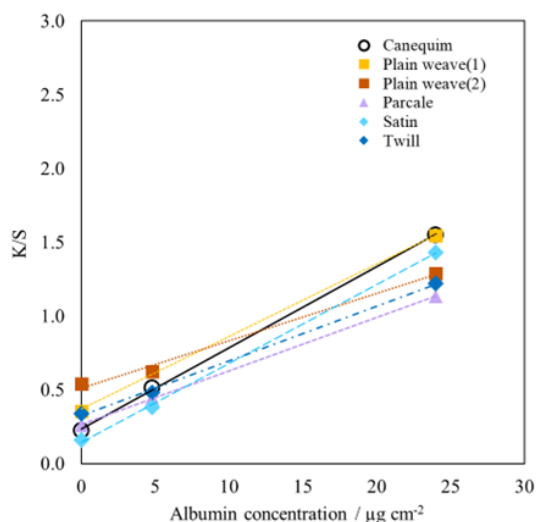


Fig 7. Correlation between K / S value and albumin concentration at cotton swatch

量性としては良好であった。Figure 8 より、T/C 布も綿繊維の試験布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が、それぞれ非常に近似した直線を示し、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 値を用いてタンパク質の定量性を検討した結果、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定量性は良好であった。

このことから、布帛上のタンパク質量を、BCA 呈色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成しておくことが必要である。

4. 結論

試験布の織りと厚さ、および繊維種による、布帛上タンパク質直接定量法への影響を検討した。結果として、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り反射率がわずかに上昇することが確認された。さら

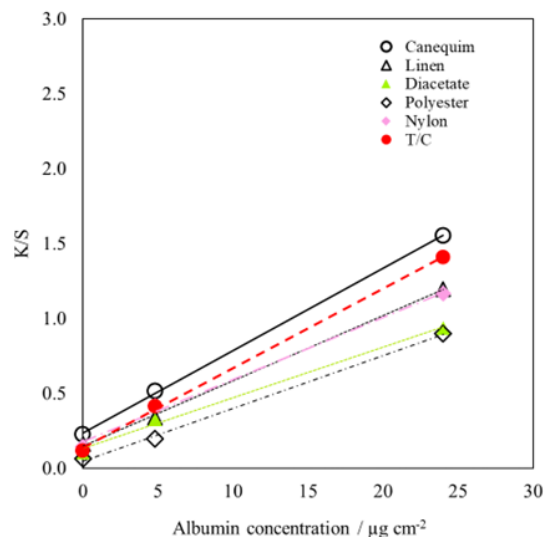


Fig 8. Correlation between K / S value and albumin concentration at swatch of different fiber types.

に、繊維の種類に由来する影響として、繊維分子と BCA 法 C 液との反応の有無が挙げられた。次に、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、さらに、繊維加工剤等の付着物の影響が確認された。これらにより、総じて BCA 呈色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傾向が見られた。

C 液との反応が確認された羊毛および絹のタンパク質繊維布、銅アンモニアレーヨンを除き、綿繊維布および混紡布は定量性が高く、それ以外は綿より低くなるが定量性は良好であった。

以上から、本定量法を適用する布帛は、検量線の作成が必要であることがわかった。今後、吸水性を主として、布帛の特性に応じ試薬液量の調整等、工夫を進めることで、さらに高精度の定量条件を見出すことが期待される。

謝辞：本研究は科研費 JSPS KAKENHI Grant Number JP20K13808 の助成を受けて行いました。

参考文献

1) 蓼沼裕彦, 洗濯の科学, 2006, 51, 2-7.

- 2) 蓼沼裕彦, *洗濯の科学*, **2006**, 51, 2-7.
- 3) 皆川基, 岡本幾子, *大阪市立大学生活科学部紀要*, **1982**, 30, 67-80.
- 4) 杉原黎子, 藤谷健, *家政誌*, **1996**, 47, 243-246.
- 5) 大矢勝, 大島紀子, *家政誌*, **2010**, 61, 483-491.
- 6) J. M. Walker, "Basic Protein and Peptide Protocols." Humana Press, Methods in Molecular Biology Volume 32, p.1-15 (1994)
- 7) B. J. S. C. Olson, J. Markwell, "Assays for Determination of Protein Concentration." Current Protocols in Protein Science. John Wiley & Sons, Inc., Unit 3.4, p.1-29 (2007)
- 8) M. M. Bradford, *Analytical Biochemistry*. **1976**, 72, 248-254.
- 9) O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, R. J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **1951**, 193, 265-275.
- 10) R. Kurono, N. Nishino, M. Oya, *Journal of Oleo Science*, **2013**, 62, 223-229.
- 11) 谷道子, 森田みゆき, *家政誌*, **2018**, 69, 238-242.
- 12) 高橋類子, 津野敏江, 岸本洋子, 木村節子, *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*, **1987**, 6, 61-71.
- 13) P. K. Smith, R. I. Krohn, G. T. Hermanson, A. K. Mallia, F. H. Gartner, M. D. Provenzano, E. K. Fujimoto, N. M. Goeke, B. J. Olson, D. C. Klenk, *Analytical Biochemistry*, **1985**, 150, 76-85.
- 14) W. N. Reichelt, D. Waldschitz, C. Herwig, L. Neutsch, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **2016**, 43, 1271-1280.
- 15) M. Tani, T. Amemiya, M. Tsukazaki, M. Matsuda, M. Morita, *Nihon Kasei Gakkaishi (J. Home Econ. Jpn.)*, **2020**, 71, 464-469.
- 16) 塚崎舞, 森田みゆき, 米山雄二, *家政誌*, **2022**, 73, 199-205.
- 17) 坂上ちえ子, 須永正治, *家政誌*, **2014**, 65, 347-359.
- 18) 稲垣勝彦, *繊維と工業*, **1970**, 3, 774-781.
- 19) 谷田治, *繊維消誌*, **1996**, 3, 397-404.
- 20) 通産省横浜繊維製品検査所, *繊維消誌*, **1982**, 23, 334-337.