

ATP 測定法を用いたマイクロ・ナノバブルの洗浄力評価

山口庸子, 中村弥生

Evaluating the detergency effects of micro/nanobubble
by the ATP testing method

Yoko YAMAGUCHI and Yayoi NAKAMURA

In recent years, microbubble and nanobubble technologies using ozone or carbon dioxide have been applied effectively to clean semiconductors and food materials. Although micro/nanobubble technologies have also been applied to the laundering of clothing, its detergency performance remains uncertain. We propose a method for evaluating the detergency effects of micro/nanobubbles that uses adenosine triphosphate (ATP) as an index. We also examined a procedure for generating soiled materials (e. g., soiled fabrics) by selecting the model contaminant needed to verify the detergency effects of micro/nanobubbles. The quantity of ATP was measured as a relative light unit (RLU); the larger the RLU, the larger the quantity of ATP.

We found plain gelatin, milk gelatin, and green tea gelatin, used to model protein contamination, to be suitable model contaminants when measuring the quantity of ATP alone or in combination with adenosine monophosphate (AMP) for ATP testing method. For evaluations of the detergency of soiled materials such as slide glasses, cotton fabric, and polyester fabric, we found that micro/nanobubble water alone and micro/nanobubble water containing a surfactant both increased the RLU that reflects the quantity of ATP in the residual liquid, indicating the detergency effects of micro/nanobubble water. Although the RLU of materials soiled with plain gelatin was lower than that of materials soiled with green tea or milk gelatin, we found the RLU of materials soiled with plain gelatin useful in evaluating the detergency effects of micro/nanobubble water.

キーワード: microbubble マイクロバブル, nanobubble ナノバブル, washing 洗浄,
adenosine triphosphate アデノシン三リン酸, ATP measuring method ATP 測定法

I. はじめに

近年, マイクロバブルやナノバブルなど微小気泡 (以下, マイクロ・ナノバブル) の実用化を目指す試みが盛んに行われており, オゾンや二酸化炭素などを用いたマイクロ・ナノバブル

は半導体や食品などの洗浄分野において実用化を進める動きが活発している^{1),2)}。このような状況にあって, 現在, 日本が国際幹事国として国際標準化 (ISO TC281 2013. 6設置) を進めている³⁾。これによって, マイクロバブルは「ファインバブル」, ナノバブルは「ウルト

ラファインバブルへ」と改められ、国内では新旧の呼称が入り乱れて使われている状況にある。近々、国際的な用語に統一されるものと思われるが、本研究では認知度が高い用語としてマイクロバブル、ナノバブルを使用した。

一方、衣類洗浄へのマイクロ・ナノバブルの利用も見られるが、その洗浄性は明確にされていない。これまで、湿式人工汚染布を用いた洗浄力評価に加えて⁴⁾、FT-IR（フーリエ変換赤外分光光度計）や水晶振動子法による洗浄評価が検討されている^{5),6)}。しかし、マイクロ・ナノバブルの洗浄性に関する詳細を明確にするには、多彩な手法による検討が必要不可欠である。

タンパク質汚れの除去を評価する方法としてATP測定法が挙げられる。ATP測定法は、アデノシン三リン酸（ATP）およびアデノシン一リン酸（AMP）を指標として、一般的に食品を取り扱う機器や環境の洗浄度を評価する判定に広く利用されており、「ATPふき取り検査法」として厚生労働省食品衛生検査指針の微生物編2004（厚生労働省監修）に記載されている。従来の微生物検査に代わる容易な検査法としてATP測定用キットが販売されており、固体表面のATPのふき取りを行う測定用キットに加えて、水などの液体中のATPを測定するキットも状況に合わせて選択することができる。

そこで、本研究では、マイクロ・ナノバブルの水系洗浄への導入に向けて、タンパク質のモ

デル汚れとしてゼラチンを用い、ATPを指標とした洗浄力評価法の提案とこれに適したモデル汚れの選定から汚染試料（汚染布）の作製を検討した。さらに、この方法を用いてマイクロ・ナノバブルの洗浄効果や界面活性剤との併用による影響を実験的に検証した。

II. 実験方法

1. モデル汚れの選定と汚染試料の作製

ATPの実測値や文献値⁷⁾を基に、ATPを指標とした洗浄力評価用のモデル汚れ⁸⁾の選定と汚染試料の作製を行った。被洗物（以下、基質とする）は、表面構造や水流の影響を考慮して比較することのできる資料としてスライドガラスを基準試料とし、比較試料に平織りの綿布とポリエステル布を用いた。詳細を以下に示した。
〈基質〉

- ・スライドガラス（2.5×7.5cm, AS ONE 製）
- ・綿布（5×5cm, JIS 添付白布カナキン3号）
- ・ポリエステル（5×5cm, JIS 添付白布）

汚染試料の作製は、湿式人工汚染に準じて⁹⁾、いずれの汚染液にもゼラチンを固着剤として使用した。マイクロピペットを用いて基質の片面に均一に付着させ、十分に風乾させてから恒温乾燥機（ヤマト・DX400）を用いて熱処理を行った。汚染液のゼラチン濃度と熱処理温度および時間は、5～20%溶液、40～110℃、5min～2hrと段階を設け、汚れと基質に適した処理条

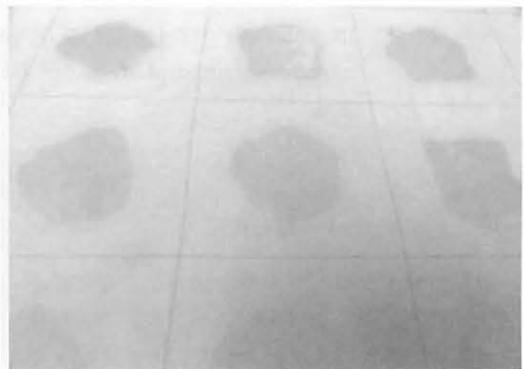
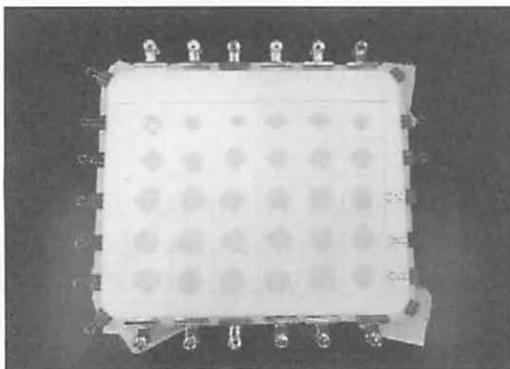


図1 綿およびポリエステル汚染布の作製方法

件を検討した。

綿布およびポリエステル布の汚染処理は図1に示したように、5cm 角に線描きした試料布 25×30cm (5×6枚) に約10cm 程度の淵を設けてバットに固定し、表側から3~4cm 程度の円を描くように汚染液を9滴程度に分けてマイクロピペットにて塗布した。綿布では、汚染液が浸透してはみだし易く落下し易いため汚染液の温度を30℃前後に下げて塗布した。ポリエステル布では、汚染液が容易に浸透しないため汚染液の温度を35~40℃まで上げて、ディスボスティックニードルで刷り込みながら塗布した。完全に風乾した後、加熱処理を行い、5×5cm に切り離して洗浄実験に使用した。なお、作製した試料は常温のデシケータ内で保管した。

2. 洗浄方法

洗浄装置は、図2に示したようにスターラーを用いて洗浄した。ディスボカップ(200ml, PP製)に、25℃のマイクロ・ナノバブル水200mlを入れて、スライドガラスの汚れの付着面を下側に固定した状態で1枚を加えて、攪拌子が接触しない状態で10分間攪拌した。マイクロ・ナノバブル水は、洗浄の直前に微細気泡発生装置(MA3型, アスブ社製)を用いて、500mlのイオン交換水中に空気を加えて、マイ

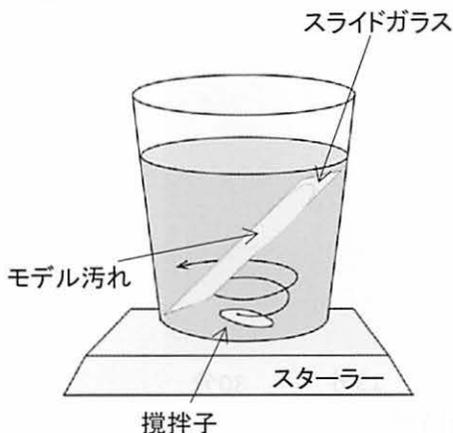


図2 スターラーを用いた洗浄装置

クロ・ナノバブルを約10分間発生(曝気)させたものを使用した。比較としてイオン交換水のための洗浄と界面活性剤 AE および LAS との併用による洗浄を行った。界面活性剤の使用濃度は臨界ミセル濃度(c.m.c)付近を中心に最も洗浄効果の高い濃度とした。同様に、綿汚染布およびポリエステル汚染布の洗浄を行った。ただし、いずれの汚染布も固定しない状態で洗浄した。洗浄力は、洗浄後の残液中の ATP の測定より評価した。

3. ATP の測定

ATP の測定は、ATP と酵素であるルシフェラーゼを反応させることによって生じる発光量(Relative Light Unit: RLU 値)の測定から ATP 量を測定した。ATP 量が多いものほど RLU 値は高い値を示す。さらに、AMP から ATP を直接作り出す酵素(PPKD)を用いて、ATP と AMP を同時に測定する方法を比較に用いた。

ATP を指標とした洗浄力評価では、クリーントレース(3M社, 水中 ATP 測定用試薬 AQT200)を用いて、洗浄後の残液の RLU 値をユニライト NG(バイオトレース社製)にて測定した。さらに、ATP と AMP(以後、ATP+AMP)を指標とした洗浄力評価では、ルシバック Pen(キッコーマンバイオケミファ株式会社, 拭き取り)を用いて、洗浄後の残液の RLU 値を測定した。なお、液体の RLU 値の測定には、通常ルシバック Pen-AQUA(約 0.15ml 採取)を使用するが、ここではマイクロピペットを用いて採取した残液 0.1ml をルシバック Pen の拭き取用の綿棒に滴下して RLU 値を測定する方法を用いた。

Ⅲ. 結果及び考察

1. ATP 測定に適した汚染試料の作製

主な汚れの ATP と ATP+AMP の RLU 値の測定結果を表1に示した。これらの実測値や文献値⁷⁾を基に、RLU が高い値を示しかつ恒

常的な供給も可能なモデル汚れとして牛乳、血液（ヘモグロビン）、緑茶の3つを選定した。さらに、バインダーとしての機能を持ち、品質の確保や入手の容易なタンパク質のモデル汚れとしてゼラチンを使用した。

〈モデル汚れ〉

- ・ゼラチン（MP Biomedicals 社製）
- ・牛乳（市販牛乳、成分無調整）
- ・ヘモグロビン（牛血由来、和光純薬）
- ・緑茶（市販飲料）

基質ごとにモデル汚れに適した処理条件を評価した結果、均一な汚染処理を行うことができ

たゼラチンの濃度と使用量、熱処理温度および時間の詳細を以下に示した。

〈スライドガラス〉

1ml の汚れを片面に塗布後、風乾、熱処理

- ・ゼラチン（7%ゼラチン）、105℃で1時間
- ・牛乳（牛乳+7%ゼラチン）、105℃で10分
- ・緑茶（緑茶+7%ゼラチン）、105℃で1時間

〈綿布およびポリエステル布〉

0.7ml の汚れを塗布後、風乾、熱処理

- ・ゼラチン（20%ゼラチン）、105℃で1時間
- ・牛乳（牛乳+10%ゼラチン）、105℃で10分
- ・緑茶（緑茶+10%ゼラチン）、105℃で1時間

表1 主な汚れの ATP と ATP + AMP の RLU 実測値

主な汚れ	クリーントレース(ATP)		ルシパックPen(ATP+AMP)	
	拭き取り UXL100	水中 AQT200	拭き取り	水中 AQUA
人工汚染布				
湿式人工汚染布	34		499	
血液 CFT CS-1	2,005		917,114	
赤ワイン CFT CS-3	152		324	
ミルクココア CFT CS-2	120		6,420	
ココア EMPA112	95		5,311	
カーボン、鉱物油 EMPA106	29		42	
牛乳(市販牛乳、成分無調整)		10,313		2,718
ウーロン茶(市販飲料)		295		36,554
紅茶(市販飲料、無糖)		14,379		41,148
緑茶(市販飲料)		142,806	402,688	273,975
ゼラチン(7%水溶液、30℃)		8,706	47,106	65,369

単位:RLU値

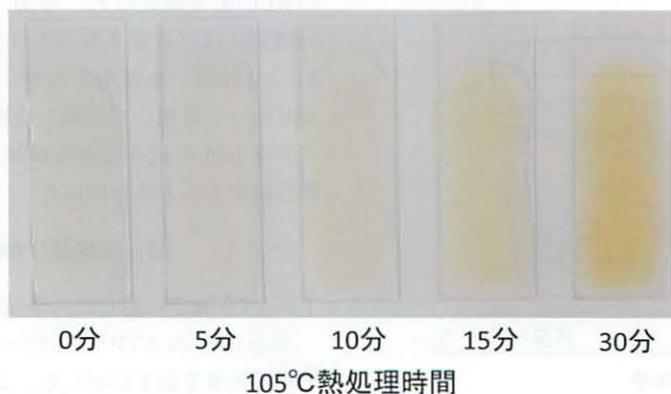


図3 牛乳7%ゼラチンを用いたスライドガラス汚染試料の熱処理による変色

ATP測定法を用いたマイクロ・ナノバブルの洗浄力評価

(但し、20%ゼラチンでは0.35mlを塗布した)

なお、牛乳に7%ゼラチンを加えた汚染試料では、図3に示したように熱処理による変色が大きいことから105℃で10分間の熱処理とした。また、ヘモグロビン2gを0.1Nアンモニア水100mlに溶解し、これにゼラチン7%を加えた汚染液を用いて作製した血液をモデル汚れとした汚染試料は、熱処の有無に関わらずRLU値が50前後と著しく低下したことから洗浄力評価に使用できなかった。

2. マイクロ・ナノバブルの洗浄効果

ゼラチン溶液の濃度とRLU値の関係を3M社のクリーントレース AQT200を用いて測定した結果を図4に示した。ゼラチン濃度と

RLU値は比例関係を示し、残液中のATPを指標とした洗浄力評価では定量的な分析が行えるものと推察できる。さらに、ゼラチン汚染スライドガラスを濃度の異なる界面活性剤溶液(AE:0.055, 0.11, 0.165, 0.22mmol, LAS:0.25, 0.5, 0.75, 1.0mmol)で洗浄した洗浄残液のRLU値を測定した結果を図5に示した。RLU値はc.m.c.濃度付近でピーク値を示し、マイクロ・ナノバブルとの併用に使用する界面活性剤の最適使用量は、AEでは0.11mmol, LASでは0.5mmolであった。なお、クリーントレース AQT200を用いて測定したイオン交換水および蒸留水のRLU値は4, AE溶液のRLU値は6, LAS溶液のRLU値は6であった。また、市販洗剤を用いた洗浄後

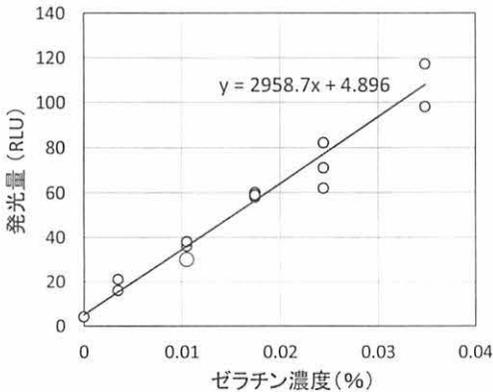


図4 ゼラチン濃度とRLU値の関係

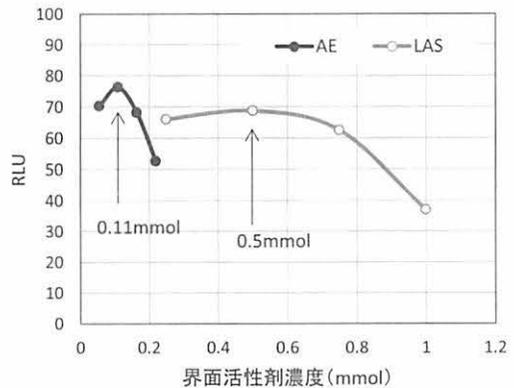


図5 界面活性剤濃度と洗浄残液のRLU値の関係

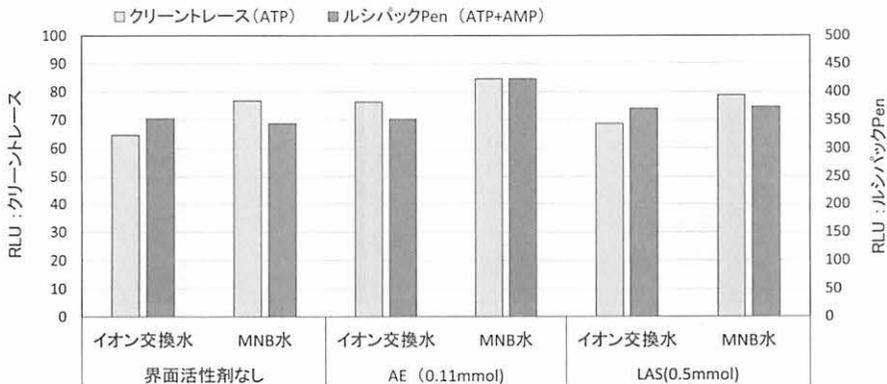


図6 7%ゼラチンを用いたスライドガラス汚染試料の洗浄残液のRLU値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

の残液のRLU値は95と最も高い値を示すなど、ATPを指標とした洗浄力評価の妥当性がある程度確認できた。そこでATP測定法を用いてマイクロ・ナノバブルの洗浄性を評価した。

スライドガラスを基質として、7%ゼラチンをモデル汚れに用いた汚染試料の洗浄残液のRLU値を測定した結果を図6に示した。イオン交換水とマイクロ・ナノバブル水(図中ではMNBと省略)、AEを併用したイオン交換水とマイクロ・ナノバブル水、同様にLASを併用したイオン交換水とマイクロ・ナノバブル水のRLU値を比較すると、ATPを指標としたクリーントレースAQT200の測定では、いずれもマイクロ・ナノバブルによる洗浄効果が認められた。これに対して、ATP+AMPを指標とし

たルシバックPenの測定では、AEを併用した場合のみマイクロ・ナノバブルによる洗浄効果が認められた。

牛乳ゼラチンおよび緑茶ゼラチンをモデル汚れとしたスライドガラス汚染試料の洗浄残液のRLU値を図7および図8に示した。牛乳ゼラチン、緑茶ゼラチンいずれの場合も、マイクロ・ナノバブル水の洗浄残液のRLU値は、イオン交換水よりも高い値を示し、マイクロ・ナノバブルの洗浄効果を確認することができた。しかし、AEを併用した洗浄残液のRLU値は、牛乳、緑茶ゼラチンいずれの汚染試料の場合も低下し、マイクロ・ナノバブルとAEとの併用の可否を明らかにすることはできなかった。

次に、綿布を基質として、20%のゼラチン

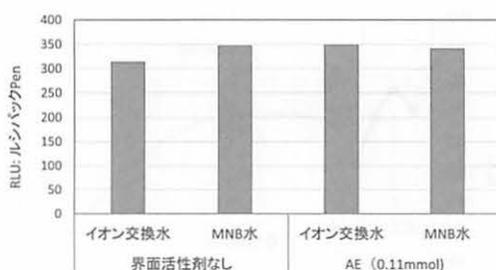


図7 牛乳・7%ゼラチンを用いたスライドガラス汚染試料の洗浄残液のRLU値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

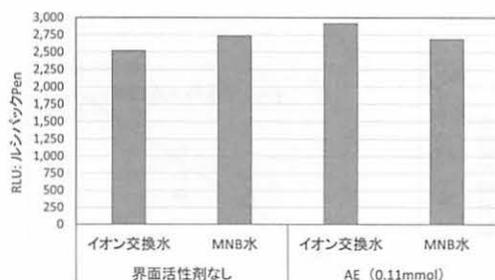


図8 緑茶・7%ゼラチンを用いたスライドガラス汚染試料の洗浄残液のRLU値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

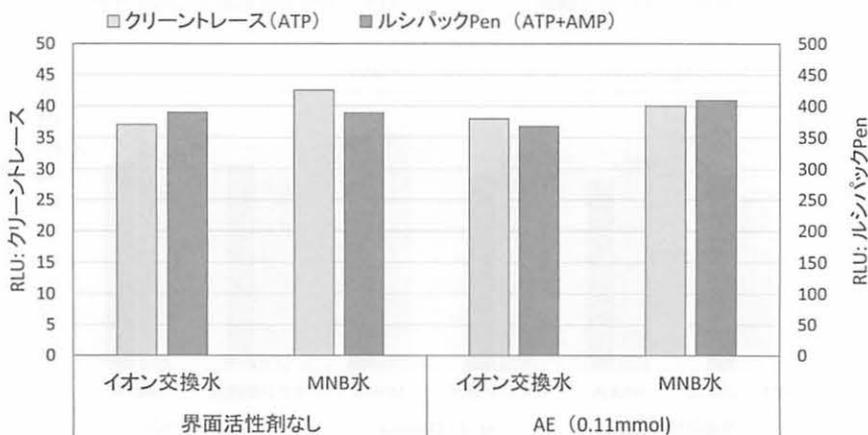


図9 20%ゼラチンを用いた綿汚染布の洗浄残液のRLU値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

ATP 測定法を用いたマイクロ・ナノバブルの洗浄力評価

をモデル汚れとした汚染布の洗浄残液の RLU 値を図 9 に示した。図 6 に示したスライドガラスの汚染試料と同様に、クリーントレース AQT200 の測定では、AE の併用系を含めていずれの場合もマイクロ・ナノバブルによる洗浄効果が認められた。これに対して、ルシパック Pen の測定では、AE を併用した場合のみマイクロ・ナノバブルによる洗浄効果が認められた。

同様に、牛乳・10%ゼラチンおよび緑茶・10%ゼラチンを用いた綿汚染布の洗浄残液の RLU 値を図10および図11に示した。牛乳ゼラチン、緑茶ゼラチン綿汚染布いずれの場合も AE 併用系では、マイクロ・ナノバブル水の洗浄残液の RLU 値は、AE のみよりも高い値を示した。このことから、AE 併用系においても

マイクロ・ナノバブル水の洗浄効果を確認することができた。さらに、緑茶ゼラチン綿汚染布では、マイクロ・ナノバブル水の洗浄残液の RLU 値は、イオン交換水よりも明らかに高い値を示した。しかし、牛乳ゼラチン綿汚染布では、マイクロ・ナノバブル水の RLU 値は、イオン交換水よりも低い値を示したことからマイクロ・ナノバブルの洗浄効果を明示することはできなかった。

最後に、ポリエステルを基質として、20%ゼラチンをモデル汚れとした汚染布の洗浄残液の RLU 値を図12に示した。図 6、図 9 に示したスライドガラス、綿布の汚染試料と同様の傾向を示し、ルシパック Pen の測定では、AE の併用系を含めていずれの場合もマイクロ・ナノ

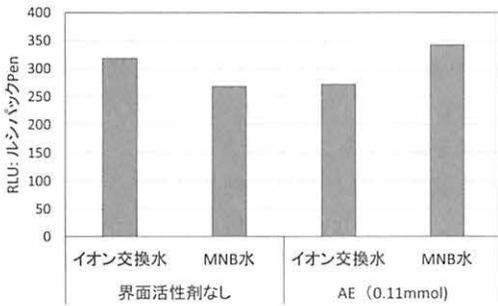


図 10 牛乳・10%ゼラチンを用いた綿汚染布の洗浄残液の RLU 値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

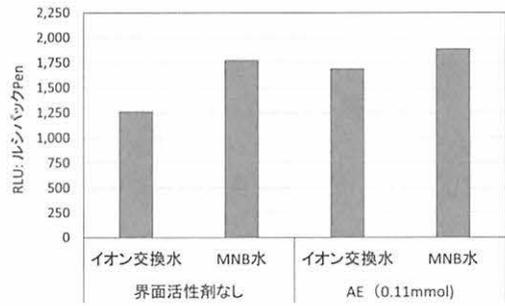


図 11 緑茶・10%ゼラチンを用いた綿汚染布の洗浄残液の RLU 値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

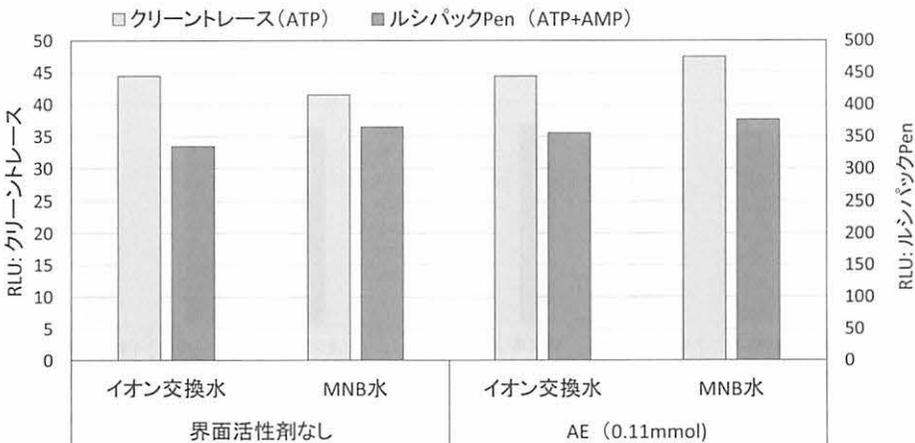


図 12 20%ゼラチンを用いたポリエステル汚染布の洗浄残液の RLU 値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

バブルによる洗浄効果が認められた。これに対して、クリーントレース AQT200の測定では、AEを併用した場合のみマイクロ・ナノバブルによる洗浄効果が認められた。ゼラチンをモデル汚れに、スライドガラス、綿布、ポリエステル布を基質とした汚染試料の洗浄力評価から、バラツキは見られたがクリーントレース (ATP) およびルシバック Pen (ATP+AMP) を用いたRLU値の測定から、ある程度のマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果を確認することができた。

同様に、牛乳・10%ゼラチンおよび緑茶・10%ゼラチンを用いたポリエステル汚染布の洗浄残液のRLU値を図13および図14に示した。牛乳ゼラチン、緑茶ゼラチンのポリエステル汚染布いずれの場合もAE併用系では、マイクロ・ナノバブル水の洗浄残液のRLU値は、AEのみの場合よりも明らかに高い値を示した。さらに、イオン交換水のみでも牛乳ゼラチン汚染布では、マイクロ・ナノバブル水の洗浄残液のRLU値は、イオン交換水のみよりも明らかに高い値を示した。牛乳ゼラチン、緑茶ゼラチンをモデル汚れに、スライドガラス、綿布、ポリエステル布を基質とした汚染試料の洗浄力評価から、多少のバラツキは見られるもののルシバック Penを用いたRLU値の測定から、ゼラチン汚染布と同様にある程度のマイクロ・ナノバブルの洗浄効果を確認することができた。

IV. まとめ

マイクロバブルやナノバブルの衣類洗浄などの水系洗浄への導入に向けて、ATPを指標とした洗浄力評価の検討とこれに適したモデル汚れの選定から汚染試料の作製を検討した。さらに、この方法を用いてマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果を検証した。

その結果、ATP測定法に適したモデル汚れは、残液中のATP量およびATP+AMP量を測定するいずれの方法においても、タンパク質のモデル汚れとして用いたゼラチン、牛乳ゼラチン、緑茶ゼラチンであることが分かった。さらに、スライドガラス、綿布、ポリエステル布を用いた汚染試料の洗浄力評価から、マイクロ・ナノバブル水、界面活性剤を加えたマイクロ・ナノバブル水いずれにおいても、残液中のATP量を示すRLU値は上昇する傾向が見られたことから、マイクロ・ナノバブル水の洗浄効果を確認することができた。特に、ゼラチン汚染試料のRLU値は、緑茶ゼラチンや牛乳ゼラチンよりも低いRLU値を示したが、マイクロ・ナノバブル水の洗浄効果の評価には問題なく使用できることが分かった。

謝辞

本研究の実施に当たり使用した界面活性剤 (AE) は、ライオン株式会社 の提供による

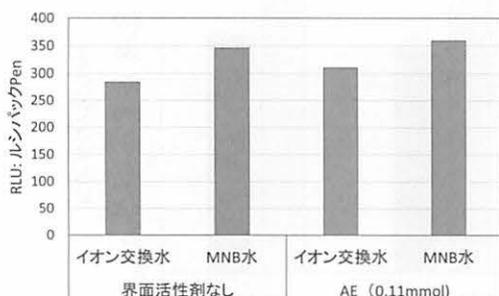


図 13 牛乳・10%ゼラチンを用いたポリエステル汚染布の洗浄残液のRLU値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

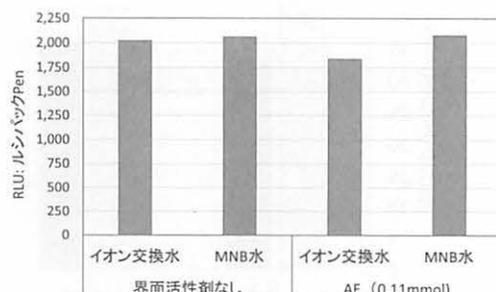


図 14 緑茶・10%ゼラチンを用いたポリエステル汚染布の洗浄残液のRLU値とマイクロ・ナノバブル水の洗浄効果

ものであり、本研究は科学研究費基盤（B）（24300249 代表者山口庸子）の助成を受けたものである。ここに記して謝意を表す。

参考文献

- 1) 高橋正好：マイクロバブルおよびナノバブルに関する研究, p.23-24, 産業技術総合研究所ホームページ, 入手先 (<https://unit.aist.go.jp/emtech-ri/26env-fluid/pdf/takahashi.pdf>) (参照2014. 11. 17)
- 2) 早田保義, 小林史幸：浦上財団研究報告書, 16, 150-159 (2008)
- 3) 寺坂宏一：化学工学, 78(9), 580-584 (2014)
- 4) 山口庸子, 中村弥生：共立女子短期大学紀要, 57, 15-21 (2014)
- 5) 下村久美子：日本家政学会第66回大会研究発表要旨集, p81 (2014)
- 6) 木村美智子：日本家政学会第66回大会研究発表要旨集, p82 (2014)
- 7) 本間茂：月刊 HACCP, 3月号, 44-56 (2014)
- 8) 黒野理枝, 大矢勝：織消誌, 54(8), 750-757 (3013)
- 9) 山口庸子, 永山升三：共立女子短期大学紀要, 35, 157-162 (2013)