



新渡戸文化短期大学
学術雑誌

第 15 号

新渡戸文化短期大学
2025年

原 著

節水を目的とした手指洗淨方法の工夫

荒木葉子、笹原麻希、石井敦子、三神彩子、久米村秀明

(受付 2024 年 9 月 30 日 / 受理 2024 年 11 月 18 日)

P.1- 7

無機リン測定における初学者向け反応曲線作成の検討

西澤美穂子、伊藤昭三、蜂谷敦子

(受付 2024 年 9 月 30 日 / 受理 2024 年 11 月 18 日)

P.9-16

節水を目的とした手指洗浄方法の工夫

(受付 2024年9月30日 / 受理 2024年11月18日)

荒木葉子*1,2、笹原麻希*1、石井敦子*1、三神彩子*3、久米村秀明*3

要旨：世界的には水不足が問題視されており、衛生的な生活用水の確保が難しい国が多く、災害時などには水の供給不足となるケースが想定される。これまでの研究では食器洗浄時の節水手法として「流水洗い」と「ため水洗い」の2つの方法に着目してきた。そこで本研究では、後者における手法を手指の洗浄に応用して洗浄効果と節水効果の確認を行った。まず、流水で5秒間手指を洗い、液体石けんでこすり洗いした後に、「流水洗い」では一定の流速の水で30秒間すすいだ。一方、「ため水洗い」では、ボウルにためた1Lの水で15秒間すすいであら上と同じ流速の水で15秒間の洗浄を行った。洗浄効果については、洗浄前後の手指表面に残存する汚れや細菌に由来するATP量に注目し、ATP依存性ルシフェラーゼ活性を測定して評価した。その結果、「流水洗い」の平均測定値は、水洗い後1599RLU、石けん洗い後422RLUとなり、「ため水洗い」では、水洗い後1369RLU、石けん洗い後418RLUとなったため、両手法においてほぼ同等の洗浄効果が認められた。また、水の平均使用量は、「ため水洗い」で「流水洗い」の6割程度となり、手指洗浄でも食器洗浄と同様の節水効果が確認できた。以上のことから「ため水洗い」は、少量の水で洗浄効果に優れた洗浄方法であることが確認できた。

キーワード：衛生、手指洗浄、ATP法、節水効果、ため水

1. 緒言

国土交通省の統計によると、日本では1日に1人あたり286L近くの水が使われている¹⁾。しかしながら、水資源が豊富とされる日本でも過去に何度も渇水の問題が発生し、近年節水の呼びかけが各地で行われている²⁾。

世界ではさらに水不足が深刻化しており、清潔な水が十分に確保できない地域が少なくない。世界総人口78億7500万人の40%以上が水不足に悩まされており、今後さらに上昇すると見られている³⁾。この状況が続けば、2050年には約97億人になるとされる世界人口の約半数が水不足にさらされ、4人に1人は慢性的な水不足の影響を受けると考えられる。また、日本のように浄水処理の設備が整っていない地域も多く、ユニセフによると、世界の約22億人が安全に管理された飲み水の供給を受けられずにいると報告されている⁴⁾。

国際衛生年の2008年に、ユニセフ(国連連合児童基金)などが、毎年10月15日を「世界手洗いの日(Global Handwashing Day)」と定めた⁵⁾。

日本ユニセフ協会でも、日本の子どもたちに、正しい手洗いの大切さを楽しく伝え、世界の子どもたちが直面する保健や衛生の問題を知ってもらうために、「手をあらおう。手をつなごう。」の合言葉のもと、「世界手洗いダンス」を制作し、子どもたちに楽しく手洗いの習慣を身につけてもらうための活動を行っている⁶⁾。

著者らは、これまでに食器洗浄時に水を大切に、上手に使うことを目的に、「流水洗い」と「ため水洗い」の比較実験を行い、後者による節水効果を検証してきた⁷⁾。

また、「ため水洗い」を含め、効果的な食器洗浄方法を推奨するポスターを作成し、小学校、中学校、高等学校および大学調理担当教員に対して紹介してきた。そのポスターを図1に示した。

今回、この考え方を応用し、手洗いについても食器洗浄と同様の効果が得られるかどうかに着目し、節水および洗浄効果について検討することとした。手指洗浄に関しては、水と石けんを使うのが一般的であり、通常は流水ですすぐ。食器洗浄の場合、ため水を使用することで節水が可能とな

*1 新渡戸文化短期大学 食物栄養学科 *2 東京海洋大学 客員研究員 *3 東京ガス 都市生活研究所



【図1】 食器洗剤ポスター

ることが明らかとなっていたことから、手洗いに関しても流水の前にため水ですすぐことで同様の効果が得られるかどうかを調べた。

測定方法として、ATP 法を選択した。手指洗浄に関する測定法として栄養士の現場での対策を確認したところ、食中毒菌の測定はいろいろな方法がある中、日清医療食品株式会社では ATP 拭き取り検査を活用した調理厨房の衛生管理を行っており⁸⁾、東海食膳協業組合ではコロニー検査を廃止して、ATP 拭き取り検査を導入している⁹⁾。他にも文京区¹⁰⁾、練馬区の食品衛生監視指導計画書¹¹⁾内に実施した旨の記載があった。また、京都府中商業技術センター¹²⁾、江南厚生病院¹³⁾でも有効とされており、ATP 法は全国的に展開している実験法であると考えた。これは ATP 法の機材が比較的安価で入手しやすく、測定時間がわずか 1~2 分であることも理由であると考えられる¹⁴⁾。測定方法には、ATP 測定法、光学的測定法、培養法がある。すなわち、ATP は、アデノシン 5'-二リン酸の末端のリン酸を解離させる反応を触媒する酵素で、種々の細胞膜、ミトコンドリア、およびミオシンとの関係のある横紋筋節の A 帯において、細胞化学的に検出される¹⁵⁾。

従来は、ATP 法の検査機器が高価だという難点が存在したが、欧米で ATP 法を拭き取り検査に応用し、衛生検査や HACCP の工程管理に用いられるようになった。需要が拡大したことにより、試薬、機器類が比較的安価になっている¹⁶⁾。そして、ATP 法の最大のメリットは、測定が 1~2 分で、測定操作が簡便であることである¹⁷⁾。

そこで、手洗い条件として流水洗いおよびため水洗いで比較し、その水使用量の削減率を比較し

た。また手洗い後、それぞれに ATP 拭き取り検査を行った。

2. 実験方法

2.1 被験者

被験者は新渡戸文化短期大学食物栄養学科の 20 歳の 2 年生の女子学生 11 名で、授業科目「食品化学実験」において手洗いの練習を実施している実験的研究である。11 名で流水洗いおよびため水洗いの両方を行った。手洗い方法は、ユニセフ協会の方法に従った⁶⁾。なお、本研究は新渡戸文化短期大学倫理審査委員会承認された。(承認番号 23-06)

2.2 水洗い手順

2.2.1 流水洗い

水道水を用いた流水洗いの様子を図 2 に示した。



【図2】 流水洗いの様子

手指洗浄手順

- ① 駒込ピペットで滅菌水 5 mL を吸い取り、手のひらに垂らし、こすり合わせ (5 回) 均一化した。ATP 検査を行い、これを手洗い前とした。
- ② 流水 5 秒で手を洗った後、水気を良く切って再度 ATP 検査を行ったものを水洗いとした。水の出し方として 1.5 cm 口径、5 cm 下、口径 1 cm 流量 (約 5 L/分) とした。手洗い中は水を止め、被験者はカラン等に直接触れないようにした。
- ③ 流水で 3 秒間手をぬらした。
- ④ 液体石けん (アース製薬社製薬用せっけんミ

ューズ・主成分サリチル酸)をワンプッシュ(1 mL)使用し、手のひら、手背(左右)、指間、つめの間(左右)、手関節部(左右)に石けんをつけながら、合計30秒かけて各部位を5回ずつこすった。

- ⑤ 約30秒間、流水でよくすすいだ。
- ⑥ 水気をよく切り、その状態を「石けん洗い後」とした。

2.2.2 ため水洗い

ため水洗いの様子を図3に示した。



【図3】 ため水洗いの様子

手指洗浄手順

- ① 実験前に駒込ピペットで滅菌水5 mLを吸い取り、手のひらに垂らし、こすり合わせ(5回)均一化した。ATP検査を行い、手洗い前とした。
- ② 2.2.1 流水洗いの②と同様な方法で行った。
- ③ 直径24 cmのボウルにためた1 Lの水に3秒間手を漬けた。
- ④ 液体石けんを使用し、手のひら、手背(左右)、指間、つめの間(左右)、手関節部(左右)各カ所5回ずつ30秒間かけて洗った。
- ⑤ ③のため水1 L中で15秒間よくすすぎ、その後流水で15秒すすぐ。
- ⑥ 水気をよく切った。

2.3 水の使用量の測定

「流水洗い」の場合、流量を一定にして洗浄時間を規定するとともに、手洗いの開始から終了までに使用した水量の測定は愛知時計電機(株)製瞬時・積算流量計(NW-10-DTN)を用いて測定した。「ため水洗い」の場合は、上記と同様に流量計

で測定した手洗い開始から終了までの水量と、ボウルにためた1 Lを合計して水の使用量とした。

2.4 手指の汚れの検出・測定

手指の汚れの程度を調べることを目的として、前述の通りATP法を用いた。ATPは、アデノシン三リン酸のことであり、動物、植物、微生物(細菌)などには、必ずATPが含まれている。このATPを測定することにより、食品残渣や微生物を検査・測定することができる¹⁸⁾。測定値に関しては、文部科学省「調理場における洗浄・消毒マニュアル PartII」に参考値として記載されている。ATPふき取り検査における検査箇所手指の合格管理規準値1500 Relative Light Unit (RLU)以下とした。RLUは発生した光の量(=発光量)を示す単位であり、RLU値が大きいほど、ATP量が多い(=汚れが多い)と判断する¹⁹⁾。

蛍の発光のメカニズムは、ルシフェリンにルシフェラーゼ(酵素)が作用することによって、ATPを消費して光を放出するというものである。ATP法は、この蛍の発光原理を応用して、ルシフェリン・ルシフェラーゼを含む発光試薬にATPを加えた時の発光量を計測し、汚染の程度を測定した¹⁸⁾。

2.5 ATP法の測定手順

測定器は、Neogen Corporation社製ATP測定器)を使用した。使用したATP測定器を図4に示した。



【図4】 ATP測定器

- ① 測定対象は左手とし、水気をよく切ってから測定に供した。ATPの拭き取りの様子を

図5に示した。拭き取りサンプラーで5本の指すべての内側全体を3回繰り返しこすった。

- ② 指間を3回拭き取った。
- ③ 手背を指の方向に8回、直角に8回拭き取った。サンプラーをカートリッジに戻してから2回振ってすばやく測定機に入れた。
- ④ 測定値を読み取った。



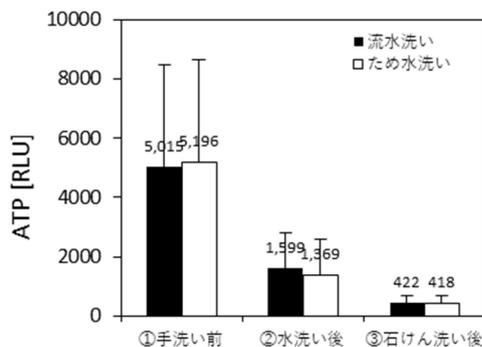
【図5】 ATP 検出の様子

2.6 統計解析

統計解析は、Microsoft Excel 2016 を用いて、Wilcoxon の符号順位和検定を行い、有意水準を5%未満とした。得られたデータは平均値±標準偏差 (means±SD) で示した。

3. 結果および考察

11名によるそれぞれ1回ずつ測定した手洗い実験の結果として、流水洗いとため水洗いのそれぞれについて、手洗い前、手洗い後および石けん洗い後のATP値[RLU]の平均値と標準偏差を図

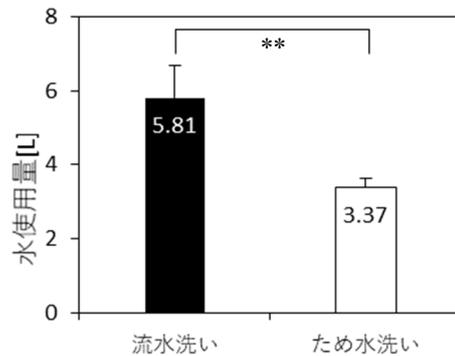


【図6】 「流水洗い」および「ため水洗い」のATP量変化 n=11

6に示した。

手洗い前から水洗い後のATP値の変化は流水洗いで5015 RLU→1599 RLU、ため水洗いで5196 RLU→1369 RLUとなり、衛生的に十分なレベルとは言えないものの、水洗いのみによって大きく低減することがわかった。石けん洗後は流水すすぎで422 RLU、ため水洗いで、418 RLUと同等のATP値が得られた。両者間に有意差は得られなかったが、いずれの洗浄方法でも手洗いの推奨基準値である1500 RLUを下回るとともに、90%以上のATP値低減が認められ、石けんを使用した手指洗浄によって十分な衛生性が確保できることが示された。

続いて、被験者11人による流水洗いによる「流水洗い」と「ため水洗い」の水量の比較を図7に示した。



【図7】 水使用量の比較 n=11、** : $p < .01$

「流水洗い」および「ため水洗い」の手洗いによるATP低減率(%)は差がみられなかったが、水使用量は、「流水洗い」の平均が5.8 Lに対し、「ため水洗い」の平均は3.4 L (ため水1 L含む)と2.4 L節水できることを確認し、有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

既往研究と比較すると、ハンドソープを用いた短時間のもみ洗いでは洗い残しが発生するとして、30秒以上の手洗いが必要と指摘している²⁰⁾。この結果と比較しても、「ため水洗い」は少量の水で洗浄効果のある方法と考える。

一方、ため水の多人数、繰り返し手洗い使用で衛生的な状態の維持は困難であり、病原体の伝播リスクとなることが考えられることから、今後検討したい。

4. 結語

節水に資する手指洗浄の手法として「流水洗い」と「ため水洗い」に関し、ATP 削減率および節水率を明らかにした。石けん洗浄までは同じ洗い方（手を水で濡らし、石けんを泡立ててこすりあわせる。手背と指間、手関節部を洗い、水で石けんを洗い流す。清潔なタオルで拭く）とした場合に、「流水洗い」でも「ため水洗い」でも汚れを落とす意味での手洗いの効果は ATP 値の測定から同等であることを確認した。

石けんが汚れを含んだ状態で手指の各部位の表面に付着しているとして、手の全体を水に浸漬し各部位を同時にまんべんなく水に接触させてすぐ方が、流水で各部位に順に水を接触させながらすすぐよりも、石けんと汚れの希釈に水を効率よく使用できていると考えられる。

節水効果に関しては、約 40 %の削減効果を得た。以上の結果から、今回提示した「ため水洗い」手指洗浄方法は通常の洗い方と同程度の洗浄効果があり、水の使用量は削減できることが示唆された。節水に配慮した「ため水洗い」は「流水洗い」と同程度の洗浄効果があり、水の使用量は大幅に削減できることが明らかとなった。

5. 謝 辞

本研究を遂行するにあたり新渡戸文化短期大学平成 23 年度卒業生の岡田奈々氏、川上実郷氏、小峯麻衣氏、齋藤由香氏、被験者として本学学生 11 名のご協力により行われたものであり、ここに謝意を表します。

<引用文献>

- 1) 国土交通省 令和 4 年版 日本の水資源の現況 第 2 章 水資源の利用状況
<https://www.mlit.go.jp/mizukokudo/mizsei/content/001521359.pdf>
 (2024 年 9 月 19 日閲覧)
- 2) 限られた水資源を有効に活用するため、節水等への協力を呼びかけています。河川、国土交通省 関東地方整備局
<https://www.ktr.mlit.go.jp/river/bousai/>

[river_bousai00000117.html](https://www.ktr.mlit.go.jp/river/bousai/river_bousai00000117.html)

(2024 年 9 月 19 日閲覧)

- 3) UN-Water. Summary progress update 2021: SDG 6 –Water and sanitation for all.
https://www.unwater.org/sites/default/files/app/uploads/2021/12/SDG-6-Summary-Progress-Update-2021_Version-July-2021a.pdf (2025 年 1 月 8 日閲覧)
- 4) 水と衛生、ユニセフの主な活動分野、日本ユニセフ協会
https://www.unicef.or.jp/about_unicef/about_act01_03.html
 (2024 年 9 月 19 日閲覧)
- 5) 世界手洗いの日、日本ユニセフ協会
<https://handwashing.jp/sp/>
 (2024 年 9 月 19 日閲覧)
- 6) 日本ユニセフ協会、「世界手洗いの日」プロジェクト
<https://handwashing.jp/>
 (2024 年 9 月 19 日閲覧)
- 7) 荒木葉子、笹原 麻希、三神 彩子、長尾 慶子 (2014)、食器洗浄時の節水行動を通じた省エネ行動変容の可能性、日本家庭科教育学会大会第 57 回大会
- 8) 事例一覧、キッコーマンバイオケミファ ATP ふき取り検査を活用した調理厨房の衛生管理 ～施設の「現状」をベースにした ATP 基準値の設定について～
 日清医療食品(株)衛生管理室 衛生管理課 蒲生 健一郎 氏
 第 85 回ルミテスターセミナー
https://biochemifa.kikkoman.co.jp/files/casestudy/jirei/pk_007_1y160801.pdf
 (2025 年 1 月 17 日閲覧)
- 9) 事例一覧、キッコーマンバイオケミファ 学校給食センター運営の要は衛生管理 ～衛生状態の「数値化」「見える化」を ATP ふき取り検査で実現！～
 東海食膳協業組合 理事 今川 将宏 氏
 第 100 回ルミテスターセミナー
https://biochemifa.kikkoman.co.jp/files/casestudy/jirei/pk_026_1y150901.pdf
 (2025 年 1 月 17 日閲覧)
- 10) 文京区 令和 5 年度文京区食品衛生監視指導

- 計画 (本文)
<https://www.city.bunkyo.lg.jp/documents/2848/2023322154633.pdf>
(2024年9月19日閲覧)
- 11) 令和4年度練馬区食品衛生監視指導計画の実施結果について：練馬区公式ホームページ
https://www.city.nerima.tokyo.jp/kusei/keikaku/shisaku/kenko/foodplan/foodplan_kekka.files/R04_kekka.pdf
(2024年9月19日閲覧)
- 12) 余座敏和、上野義栄、植村亮太 (2014)
ATP ふき取り検査法を用いた清浄度検査技術の普及のための調査研究、京都府中小企業技術センター技報 / 京都府中小企業技術センター 編 42、61-64
(2024年9月1日閲覧)
- 13) 山田千夏、朱宮哲明、深見沙織、尾崎隆男 (2009)、ATP ふき取り検査と手洗いチェッカーを用いた衛生教育の有効性、日本農村医学会雑誌 58 (1)、46-49
- 14) AccuPoint・Neogen社・、ARB-LS エア・ブラウンライフサイエンス
<https://arb-ls.com/products/accupoint/>
(2024年9月19日閲覧)
- 15) 宮本 敬久 (2000)、食品衛生細菌の簡易迅速検出法、日本食品科学工学会誌 47 (3)、173-180
- 16) 大沢 一爽、星 猛 (1978)、ATP photometerとホテル発光物質の測光条件、化学と生物 Vol.16、No.6
- 17) 杉山章、山田久美子、浅野梨沙 (2005)、細菌数の指標としてATP検査を用いた場合の手洗い技法上達に関する教育効果、名古屋女子大学紀要、51、p. 53-58
- 18) 宮本 敬久 (2000)、食品衛生細菌の簡易迅速検出法、日本食品科学工学会誌 47 (3)、173-180
- 19) 文部科学省 (2010)、調理場における洗浄・消毒マニュアル Part2,p.41-42
https://www.mext.go.jp/component/a_menu/education/detail/_icsFiles/afieldfile/2010/05/25/1292018_08.pdf
(2024年9月19日閲覧)
- 20) 徳原志穂美、山本奈緒子 (2021)、手指衛生と感染予防、オレオサイエンス、21 (3)、11-18

Hand washing methods designed to save water

Yoko ARAKI^{*1,2}, Maki SASAHARA^{*1}, Atsuko ISHII^{*1},
Ayako MIKAMI^{*3}, Hideaki KUMEMURA^{*3}

Water shortages have become a global problem. Many countries have difficulty in obtaining sanitary water for daily use, and water supply shortages are expected to occur during disasters. Previous studies have focused on two methods of washing dishes “washing under running water” and “washing with stored water”. In this study, we applied these two methods to the hand washing process and investigated the effects of cleaning hands and saving water. The hands were washed under running water for 5 seconds before using liquid soap. After scrubbing with soap, the hands were rinsed for 30 seconds with water at a constant flow rate in the “running water washing” method. On the other hand, in the “stored water washing” method, the hands were rinsed for 15 seconds with 1L of water stored in a bowl, and then rinsed with running water for another 15 seconds. The cleaning effect was evaluated by measuring the amount of ATP derived from dirt and bacteria remaining on the surface of the hands before and after washing using ATP-dependent luciferase activity. As a result, the average ATP values for “washing under running water” were 1599 RLU after washing with water only and 422 RLU after the final rinse, while the values for “washing with stored water” were 1369 RLU and 418 RLU, respectively, showing that both methods have the same cleaning effect. The amount of water used in “washing with stored water” was about 60% of that used in “washing under running water,” so the same water-saving effect as with dishwashing was observed in hand washing. These results confirm that “washing with stored water” is an excellent method for keeping hands hygienic using less water.

Key Words: sanitary ; water-saving; hand washing ; ATP test ; collected water

*1 Department of Food and Nutrition, Nitobe Bunka College

*2 Tokyo University of Marine Science and Technology

*3 Urban Life Research Institute, Tokyo Gas Co.,Ltd

無機リン測定における初学者向け反応曲線作成の検討

(受付 2024年9月30日/受理 2024年11月18日)

西澤美穂子*1、伊藤昭三*2、蜂谷敦子*1

要旨：本学臨床検査学科にて第1学年生後期に実施される生化学実習では、Fiske-Sabbarow法を用いて厳密な測定時間に沿った吸光度測定による反応曲線を作成している。しかしこの方法では生成反応速度が極端に速く、初学者である学生の手技では正しく捉えることができず、反応曲線作成において学生の理解に困難が生じていた。本研究は初学者に適した緩やかなモリブデンブルーの生成過程を観察する方法を確立することを目的とし、還元剤とリン標準液の濃度を検討した。まず還元剤(0.25%ANS)を20倍に希釈すると、反応速度が遅くなり(標準法： 2.32×10^{-1} vs. 20倍希釈： 1.51×10^{-1} Δ OD/5min)、60分後ほぼ定常状態に達した。しかし還元剤の希釈は生成物の減少をもたらし、吸光度が著しく低値(0.217、60分後)を示した。次にリン標準液の至適濃度を検討した。30 μ g/mLリン標準液(標準法の3倍量)では、初回測定時から60分後の測定終了まで一貫して吸光度の上昇(0.643、60分後)が認められ、相対誤差が小さいとされる吸光度範囲内に収まった。これらの結果より、還元剤濃度とリン標準液の濃度を調整して測定法を改変することによって、初学者でも限られた実習時間内で吸光度変化の観察と反応曲線作成が可能になることが示唆された。実習目的に適した測定法への改変は、反応曲線の作成方法、データの可視化といった臨床検査の基盤を学ぶことができ、学生にとってさらなる知識の定着と技術の修得が深まることが期待される。

キーワード：無機リン、反応曲線、Fiske-Sabbarow法

1. はじめに

本学では、第1学年生後期の生化学実習において血清中無機リンの定量で知られる「Fiske-Sabbarow法」¹⁾を用い、「モリブデンブルーの反応曲線を作成する実習」を実施している。

無機リンの定量法はこれまでに数多くの方法が報告されており、大別してモリブデンブルーによる化学法とリン酸分解酵素を用いた酵素法がある。そのうちモリブデンブルーを用いた化学法にはFiske-Sabbarow法¹⁾、Allen法^{2,3)}、Lowey & Lopez法⁴⁾、Hurst法⁵⁾やBoltz & Mellon法⁶⁾などがあり、これらは用いる還元剤(1, 2, 4-アミノナフトールスルホン酸、硫酸ヒドラジン、塩化錫、アスコルビン酸)の違いによって還元力、呈色の安定性、共存物質の影響が異なっている。そのうち、Fiske-Sabbarow法は最も古典的かつ一般的な方法である。その原理は、酸性下において過剰のモ

リブデン酸アンモニウムを加えると、6価のリンモリブデン酸塩(黄色)となり、これを還元すると青色物質である3価のモリブデンブルーを形成する。このモリブデンブルーの吸光度を測定し無機リンを定量する方法である¹⁾。また、この方法の特徴は、呈色が時間とともに変化するため反応開始後の測定時間を一定にする必要があり、正確に15分と定められている。

第1学年生を対象とした生化学実習の目的は、無機リンの定量ではなく、吸光度の測定時間を厳密(正確)に守り、測定した吸光度から反応曲線を作成することである。その際、モリブデンブルーによる呈色の変化や安定性の観察も併せて行う。ところが、この方法は還元剤添加後にモリブデンブルーの還元生成が急速に進行するため、反応初期の吸光度変化が極めて大きい。無機リンの定量法としては、短時間に還元反応を終了させ、定常状態時の吸光度変化を最小限に抑えること

*1. 新渡戸文化短期大学 臨床検査学科 *2. 日本医療科学大学 臨床検査学科

が理想である。しかし反応曲線の作成が目的となる実習では、急速に進行するモリブデンブルーの生成を初学者である学生の手技では捉えることができず、グラフ上での反応曲線が曲線でなく、直線を描くことになる。このような背景から、本学の生化学実習において、この方法を用いた反応曲線作成について学生の理解に困難が生じていた。

本研究では、Fiske-Sabbarow 法¹⁾で用いる還元剤とリン標準液の濃度を検討し、モリブデンブルーの生成を緩やかに進行させることで、初学者でも吸光度変化の観察と適切な反応曲線の作成が可能となる様、測定系の検討を行うことを目的とした。

2. 対象および方法

2.1 試薬

- 1) 10 $\mu\text{g/mL}$ リン標準液
 KH_2PO_4 (富士フィルム和光純薬株式会社) 0.432 g を純水 100 mL で溶解し、そのうち 10 mL を純水で 1,000 mL とした。
- 2) 3N 硫酸
 純水 1,900 mL に硫酸 (富士フィルム和光純薬株式会社) 167 mL を加えた。
- 3) 2.5 g/dL モリブデン酸アンモニウム溶液
 モリブデン酸アンモニウム (富士フィルム和光純薬株式会社) 2.5 g を純水 100 mL で溶解した。
- 4) 還元剤
 15%重亜硫酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社) 1,950 mL で、1, 2, 4-アミノナフトールスルホン酸 (和光純薬工業株式会社) 5 g を溶解した。その後 20%亜硫酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社) 50 mL を加え、加温溶解し、0.25% 1, 2, 4-アミノナフトールスルホン酸溶液 (以下、0.25% ANS) を作製した。暗色瓶にて冷蔵保存し、使用時には濾過した。

2.2 使用機器

分光光度計 (UVIDEC-50, JASCO)

2.3 操作

表 1 の試薬を順に試験管に入れ、その都度混和した (標準法)¹⁾。

還元剤添加後、還元生成物 ($\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 10\text{MoO}_3 \cdot \text{Mo}_2\text{O}_5$) が生成される。そこで「直後、1、2、3、4、5、10、15、20、40、60 分」における吸光度を 660 nm で測定した。ただし試薬盲検を対照とした。測定はそれぞれ 3 回行い、結果には平均値を示した。

2.4 検討内容

1) 還元剤の至適濃度の検討

標準法の還元剤濃度は 0.25% ANS であるが、これを純水で希釈し、含有する 1, 2, 4-アミノナフトールスルホン酸を 0.025%、0.0125% とした。これらの希釈した還元剤を用いて各時間の吸光度を測定し、反応曲線を作成した。得られた反応曲線を標準法と比較した。

2) リン標準液の濃度の検討

標準法のリン標準液は 10 $\mu\text{g/mL}$ であるが、20 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ のリン標準液を作製し、それぞれを用いて各時間の吸光度を測定し、反応曲線を作成した。得られた反応曲線を標準法と比較した。

3. 結果

3.1 標準法の問題点について

0.25% ANS を加えた直後より、10 $\mu\text{g/mL}$ リン標準液との反応を経時的 (直後、1、2、3、4、5、10、15、20、40、60 分) に比色測定し、その吸光度の変化に基づき反応曲線を作成した (図 1)。還元剤を加えた直後 (反応開始) から 1 分後までの吸光度変化が極めて大きく、反応速度は 5.1×10^{-2} ($\Delta\text{OD}/\text{min}$) であった。しかしそこから 60 分後 (測定終了) までの吸光度変化はほとんど観察されず、反応速度は $1.67 \times 10^{-3} \sim 2.00 \times 10^{-4}$ ($\Delta\text{OD}/\text{min}$) を推移した。そのため反応曲線は 1 分後からほぼ直線を示した (表 2, 図 1)。

【表1】無機リン測定試薬と添加量

	試薬盲検 (mL)	検体 (mL)
純水	10	
10 µg/mL リン標準液		10
3N 硫酸	10	10
2.5 g/dL モリブデン酸アンモニウム溶液	10	10
純水	16	16
還元剤 (0.25%ANS)	4	4

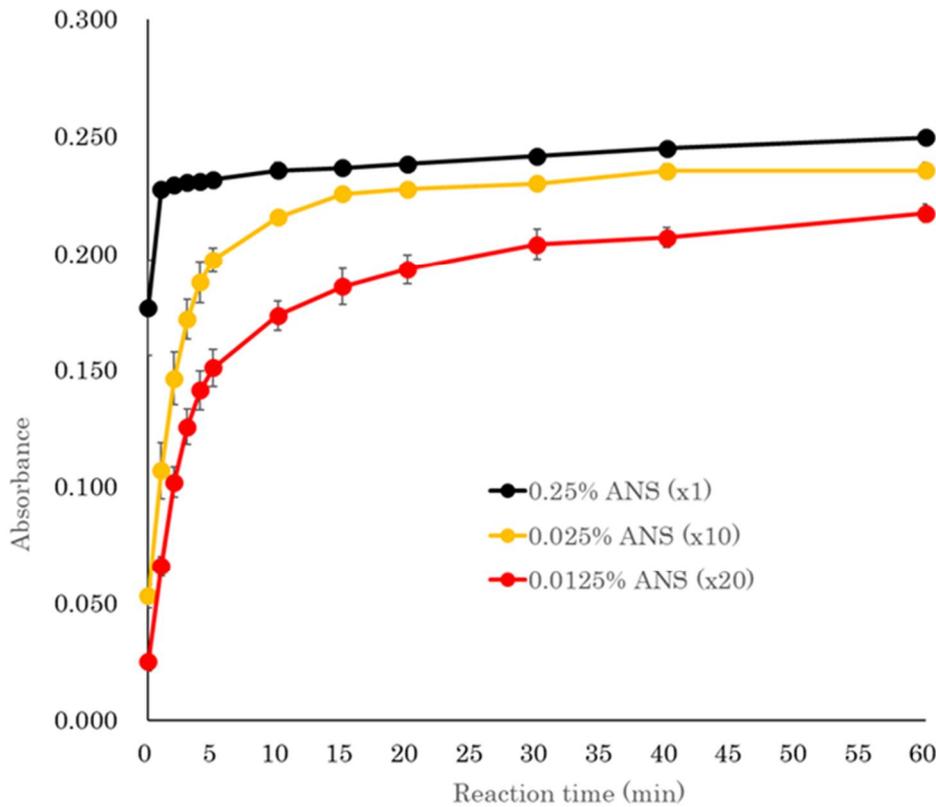
【表 2】還元剤濃度の違いによる吸光度と反応速度の変化

反応時間 (min)	0.25% ANS (× 1)		0.025% ANS (× 10)		0.0125% ANS (× 20)	
	吸光度	反応速度 (OD/min)	吸光度	反応速度 (OD/min)	吸光度	反応速度 (OD/min)
0	0.177		0.053		0.025	
1	0.228	5.10×10^{-2}	0.107	5.40×10^{-2}	0.066	4.10×10^{-2}
2	0.229	1.67×10^{-3}	0.146	3.93×10^{-2}	0.102	3.60×10^{-2}
3	0.231	1.33×10^{-3}	0.172	2.53×10^{-2}	0.126	2.37×10^{-2}
4	0.231	3.33×10^{-4}	0.188	1.60×10^{-2}	0.141	1.57×10^{-2}
5	0.232	6.67×10^{-4}	0.197	9.67×10^{-3}	0.151	9.67×10^{-3}
10	0.236	8.00×10^{-4}	0.216	3.67×10^{-3}	0.173	4.47×10^{-3}
15	0.237	2.00×10^{-4}	0.226	2.00×10^{-3}	0.186	2.47×10^{-3}
20	0.238	3.33×10^{-4}	0.228	4.00×10^{-4}	0.193	1.53×10^{-3}
30	0.242	3.33×10^{-4}	0.230	2.33×10^{-4}	0.204	1.07×10^{-3}
40	0.245	3.33×10^{-4}	0.235	5.33×10^{-4}	0.207	3.00×10^{-4}
60	0.250	2.33×10^{-4}	0.236	1.67×10^{-5}	0.217	5.17×10^{-4}

3.2 還元剤の濃度の検討

還元剤の濃度について検討するため、還元剤を純水で希釈し、0.025% ANS、0.0125% ANS を用いて、標準法と同様に反応曲線を作成した(図 1)。反応開始から 5 分後までを比較すると還元剤の希釈倍数が高いほど反応速度が遅かった。5 分後までの反応速度を比較すると、0.25% ANS (標準試薬) は $2.32 \times 10^{-1} \Delta OD/5min$ 、0.025% ANS (10 倍希釈) は $1.97 \times 10^{-1} \Delta OD/5min$ 、0.0125% ANS (20 倍希釈) は $1.51 \times 10^{-1} \Delta OD/5min$ であった。0.025% ANS (10 倍希釈) を用いた測定では、5~10 分後の間で反応速度の著しい低下 (9.67×10^{-3} から $3.67 \times 10^{-3} \Delta OD/min$) が認められ、その後、

吸光度が 0.216 から 0.236 (15~60 分後、 Δ 値 0.02) と変化に乏しく、反応曲線はほぼ直線を示した(表 2)。一方、0.0125% ANS (20 倍希釈) を用いた測定では、吸光度が 0.186 から 0.217 (15~60 分後、 Δ 値 0.031) へと変化し、その反応速度は 2.47×10^{-3} から $5.17 \times 10^{-4} \Delta OD/min$ を維持しながら、還元反応が緩慢になることが認められた(表 2)。還元剤を 20 倍希釈したことにより、反応開始 40 分を過ぎたところから反応速度が $3.00 \times 10^{-4} \Delta OD/min$ と遅くなり、緩やかな進行はみられるもののほぼ定常状態に達した。



【図1】還元剤濃度の違いによる吸光度の変化

3.3 リン標準液の濃度の検討

還元剤を希釈したことにより、還元力が弱まりモリブデンブルーの生成量も減少し、定常状態時の吸光度が 0.217 (vs. 原液 0.250) と低値を示した。分光光度計による吸光度の測定値は、高値、低値ともに相対誤差の影響を大きく受けることになることが知られている。モリブデンブルーの生成を増加させ、相対誤差の少ないとされる吸光度を 0.3~0.7 に維持できるように、測定対象となるリン標準液の濃度を高くする検討を行った。

本検討では、0.0125% ANS (20 倍希釈) の還元剤を用いた。反応開始後 60 分における 10 $\mu\text{g/mL}$ リン標準液 (原液) を用いた吸光度は 0.217 であるのに対し、20 $\mu\text{g/mL}$ リン標準液 (2 倍量) では 0.414、30 $\mu\text{g/mL}$ リン標準液 (3 倍量) では 0.643 であった。反応開始前 (0 分) から 60 分後までの吸光度変化 (Δ 値) は、0.192、0.381、0.609 (それぞれ 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ リン標準液) であった (表 3, 図 2)。

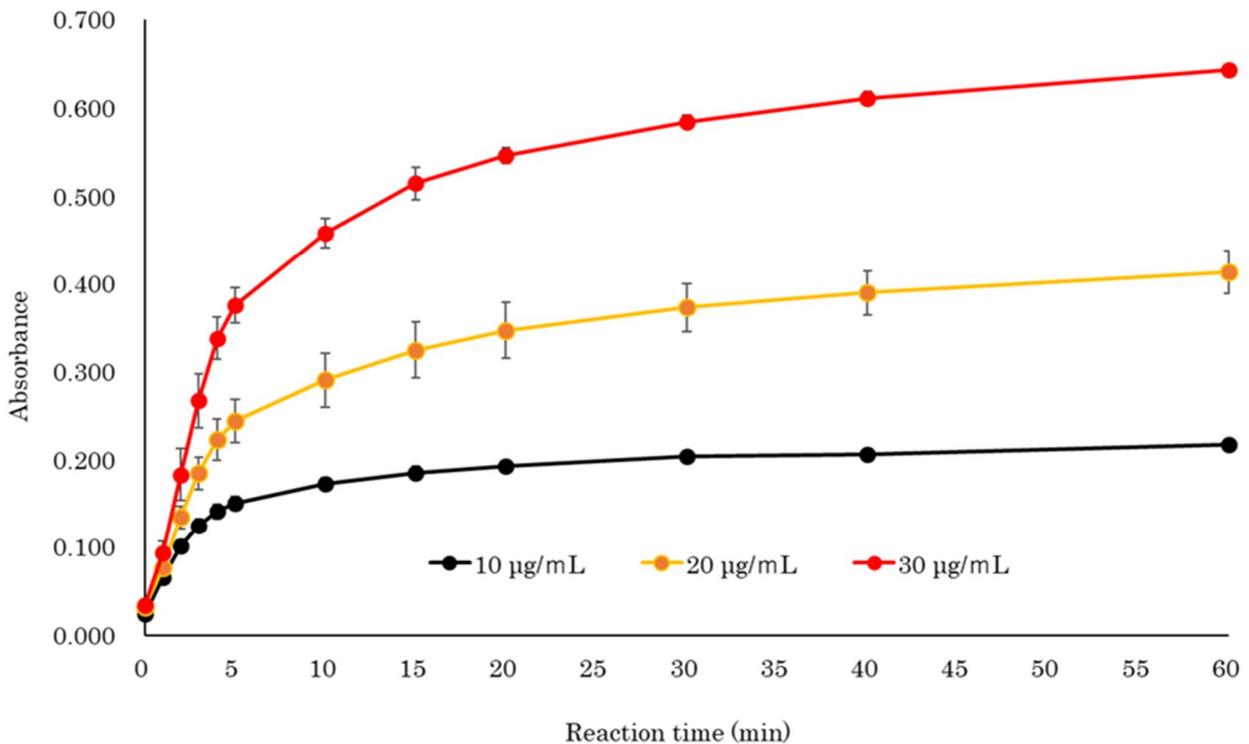
4. 考察

無機リンは酸性下でモリブデン酸アンモニウムを加えると、6 価のリンモリブデン酸となる。これを 1, 2, 4-アミノナフトールスルホン酸で還元すると、青色物質である 3 価のモリブデンブルーを生成する²⁾。この青色の吸光度を 660 nm の波長で測定することにより無機リンを定量することができるが、標準法の還元剤濃度 (0.25% ANS) では反応速度が速いため、反応開始 1 分後にはほぼ定常状態に達し反応曲線が直線を示す。初学者である学生は試料を添加してから分光光度計で吸光度を測定するまでに時間を要し、1 分後の測定を逃すことも多い。そのうえ還元生成反応は急速に進行するため、1 分を過ぎるとほぼ定常状態となり、学生の作成する反応曲線が直線を示すという問題点が生じていた。

つまり標準法を用いた場合、わずか 1 分で急速に反応が進み、初学者の学生はモリブデンブルーの生成による急速な経時変化を観察することが難しい。そこで本研究において、還元剤とリン標

【表3】 0.0125%ANSにおけるリン標準液濃度の違いによる吸光度の変化

反応時間 (min)	吸光度		
	10 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{g/mL}$	30 $\mu\text{g/mL}$
0	0.025	0.033	0.034
1	0.066	0.077	0.094
2	0.102	0.135	0.183
3	0.126	0.185	0.267
4	0.141	0.223	0.339
5	0.151	0.244	0.376
10	0.173	0.291	0.459
15	0.186	0.325	0.515
20	0.193	0.347	0.547
30	0.204	0.373	0.585
40	0.207	0.390	0.611
60	0.217	0.414	0.643



【図2】 0.0125%ANSにおけるリン標準液濃度の違いによる吸光度の変化

準液の濃度を検討し、緩やかにモリブデンブルーの生成が得られる反応系を構築し、本学の実習時間中に経時変化を学生が観察でき、反応曲線が作成できる最適な濃度を検討した。

まず、還元剤を20倍に希釈して濃度を低くし、還元力を弱め、反応速度を低下させた。その結果、

緩やかに反応が進み、そのモリブデンブルーの生成がもたらす吸光度の変化を容易に観察することが可能となった。学内実習では測定時間が実質60分間に限られるが、いずれの還元剤の濃度においても、モリブデンブルーの反応曲線の吸光度変化から定常状態になるまでを観察することが可

能であった。これによって初学者である学生でも生成過程となる呈色反応を観察することが可能となった。しかし、還元剤の濃度を 0.25% から 0.0125% へ低下させたことにより、還元されたモリブデンブルーの生成量も減少し、定常状態における吸光度が 0.250 から 0.217 と低値を示した。吸光度は 0.3~0.7 付近で相対誤差が小さくなる⁴⁾ことから、定常状態となったときの吸光度がこの範囲内に収まるようさらに検討を重ねた。本測定法の吸光度の波長は 660 nm であるが、780 nm で測定すると吸光度が大きくなる。しかしながらリンの定量という再現性から 660 nm が推奨されているため⁵⁾、今回の検討では測定波長は変えず、リン標準液の濃度についてのみ検討を行った。30 µg/mL リン標準液では、反応開始から 60 分後の測定終了まで緩やかな吸光度の上昇が認められ定常状態に達しなかったが、60 分後の吸光度は 0.643 まで上昇した。30 µg/mL リン標準液を用いることで、モリブデンブルーの生成量が増加し、吸光度変化をとらえやすくなった。そして得られた吸光度は、相対誤差が小さいとされる測定の範囲内となった。もともと Fiske-Sabbarow 法¹⁾で用いられる還元剤と酸試薬の組合せでは、呈色が時間とともに変化し、反応が完全に平衡に達しないことが知られている。そのため定量では、還元剤添加後から測定するまでの時間を一定にする必要がある^{6,7)}。Fiske-Sabbarow 法¹⁾は 1925 年に開発されて以降、さまざまな改良法が報告されている。強酸性下でモリブデンブルーを生成させるために、Fiske-Sabbarow 法¹⁾は硫酸を用いているが、改良法では過塩素酸^{2,8)}、塩酸⁹⁾、三塩化酢酸¹⁰⁾などが使用されている。また還元剤においては、1, 2, 4-アミノナフトールスルホン酸だけでなく、硫酸鉄¹¹⁾を使用した方法も報告されている。これらの報告では、測定時間の終了は 60 分以上であると同様に、本検討でも、実際の実習では測定時間が 60 分に限られているため、モリブデンブルーの反応曲線の吸光度変化の全容を観察することが実習時間内にできない。これは Fiske-Sabbarow 法の特徴であり、本検討においても 30 µg/mL リン標準液では、60 分後の測定終了までに反応が定常状態にならなかった。今後は Fiske-Sabbarow 法の変法として報告された条件下でさらなる検討を行い、実習で観察できる反応曲線を

最適化することを課題としたい。

5. 結語

本研究から、還元剤濃度を 0.0125% ANS とし、リン標準液濃度を 30 µg/mL に調整して測定法を改変することによって、初学者でも限られた実習時間内で無機リン測定における吸光度変化の観察と適切な反応曲線を作成することが可能になることが示唆された。

6. 謝辞

本研究をおこなうにあたり、多大な支援とご助言を賜りました本学の先生方に深く感謝申し上げます。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

<引用文献>

- 1) Fiske, C.H. and Subbarow Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. chem.*, 66: 375-400.
- 2) 大西英文ほか (2008) 臨床化学検査学実習書. 医歯薬出版, 東京.
- 3) Allen, R. J. (1940) The estimation of phosphorus. *Biochem J.*, 34(6): 858-865.
- 4) 戸塚実ほか (2022) 臨床化学検査学第 2 版. 医歯薬出版, 東京.
- 5) 奥石一郎, 今成登志男 (1985) オルトリン酸の定量に用いる各種モリブデンブルー法の評価. 技術報告 34 (9): 128-132.
- 6) 中村道徳 (1965) リン酸の比色定量法 I. 化学と生物 3 (1): 39-46.
- 7) 北村元仕ほか (1994) 実践臨床化学. 医歯薬出版, 東京.
- 8) King, E. J. (1932) The colorimetric determination of phosphorus. *Biochem J.*, 26: 292-297.
- 9) Woods J.T., Mellon, M.G. (1941) The molybdenum blue reaction. A spectrophotometric study. *Ind. Eng. Chem.*,

An. Ed.,13, 760-764.

- 10) Taussky H.H, Shorr Ephraim. (1952) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus., *J.Biol.chem.*, 202: 675-685.
- 11) Sumner J.B. (1944) A method for the colorimetric determination of phosphorus *Science*, 100, 413.

Examination on creation of reaction curves for beginners in the measurement of inorganic phosphorus

Mihoko NISHIZAWA*¹, Shozo ITOH*², Atsuko HACHIYA*¹

In our biochemistry practical training (first year second semester), we use the Fiske-Sabbarow method to create a reaction curve for molybdenum blue (product) following to a strict measurement time. However, under this method, the reaction rate of production is extremely fast, and beginner students cannot capture it by hand, which has caused difficulties in training them how to create a reaction curve. The purpose of this study was to establish a method for observing the gradual production of molybdenum blue suitable for beginners, and we examined the concentrations of the reducing agent and phosphorus standard solution. First, when the reducing agent (0.25% 1-Amino-2-naphthol-4-sulfonic Acid) was diluted 20 times, the reaction rate slowed down (standard method: 2.32×10^{-1} vs. 20-fold dilution: $1.51 \times 10^{-1} \Delta OD/5min$), and after 60 minutes it reached a nearly steady state. However, dilution of the reducing agent caused a decrease in the product, and the absorbance was significantly lower (0.217, after 60 minutes). Next, we examined the optimal concentration of the phosphorus standard solution. For the 30 $\mu g/mL$ phosphorus standard solution (three times the amount used in the standard method), a consistent increase in absorbance (0.643 after 60 minutes) was observed from the first measurement to the end of the measurement 60 minutes later, falling within the absorbance range considered to have a small relative error. These results suggest that by modifying the measurement method by adjusting the concentration of the reducing agent and the concentration of the phosphorus standard solution, it is possible for beginners to create a reaction curve of inorganic phosphorus within a limited amount of time. Modifying the measurement method to suit the purposes of the training enabled students to learn the fundamentals of clinical testing, such as how to create reaction curves and visualize data, and is expected to further solidify knowledge and deepen their acquisition of skills.

Key Words: Inorganic phosphorus; reaction curve; Fiske-Sabbarow method

*¹ Faculty of Clinical Laboratory Sciences, Nitobe Bunka College

*² Department of Clinical Laboratory Science, Nihon Institute of Medical Science

編集後記

2024年はMLBで大谷翔平選手が歴史的な活躍を見せました。打者に専念し、本塁打王と打点王の2冠、そして前人未踏の50-50（50本塁打-50盗塁）を達成し、自身3度目のMVPを獲得しました。チームのワールドチャンピオン獲得にも大きく貢献し、日本人には印象に残る年となったのではないのでしょうか。

一方で被災した能登半島が豪雨に見舞われるという悲劇もありました。何十年に一度というような豪雨は、今後毎年のように国内外のどこかで起こると予想されます。水の大切さは本雑誌でも取り上げられておりますが、我々は日々備えておかなければいけなくなるでしょう。

皆様のご健康と本学園のますますの発展を祈念するとともに、次号以降も学術雑誌として更なる質の向上を目指してまいりたいと思います。

最後になりましたが、論文投稿や査読をご担当してくださった先生方、そして本雑誌掲載に至るまでご尽力いただいた編集委員の先生方に深謝申し上げます。

雑誌編集委員長
食物栄養学科 田地 陽一

査 読 者 一 覧

川 上 保 子
大 島 利 夫

宮 地 勇 人
朴 鍾 赫

編 集 委 員

委 員 長 田 地 陽 一

委 員 山 内 好 江

赤 羽 智 子

朴 鍾 赫

森 本 みぎわ

2025年2月10日 印 刷

2025年2月28日 発 行

新渡戸文化短期大学学術雑誌 第15号

発 行 人 宮 地 勇 人

東京都中野区本町 6-38-1

電 話 03 (3381) 0196

FAX 03 (3381) 7866

<http://www.nitobebunka.jp/>