

尿中タン白の新しい比色定量法の基礎的検討

松 田 好 道*

後 藤 素 子**

はじめに

尿中タン白の定量法はビュレット法^{2,11)}、色素結合法³⁾、沈殿タン白容積法(エスバツハ法、末吉法など)^{1,10)}、比濁法^{1,2,7)}などに分けられる。これらの方法については、次のような問題点があげられる。

(1)用いる試薬の種類⁵⁾によって、感度や正確度に違いがあったり、(2)尿の pH, 温度、試薬の添加速度および混合方法の違いによって、測定値が影響を受けたり、(3)尿中の沈殿物や溶存物質が測定値の誤差原因となることなどである。さらに標準物質^{4,9,10)}に用いるタン白についても (1)正常人血清、(2)市販コントロール血清、(3)人あるいは牛の血清アルブミンなどがあり、使用するタン白により測定値に差が生ずる。このような問題点を取り除くために工夫や改良を加えた方法⁶⁾が報告されている。しかし未だに定量法の標準化がなされていない現状である。

最近 Yatzidis⁸⁾ (1977) は従来の比色法のようにタン白沈殿剤および発色源として別々の試薬を使用するのではなく、タンニン酸を用いてタン白を沈殿させ、その沈殿剤であるタンニン酸を再び発色源とするという原理的に注目すべき方法を報告している。

筆者らはこの方法の長所、短所を知るため、まずその方法を紹介し、次いで試薬濃度、その他操作上の各段階について、基礎的検討を行って考察を加えたので報告する。

測定原理

尿中タン白をタンニン酸で沈殿させ、過剰のタンニン酸を食塩水で洗浄除去し、沈殿したタン白に、塩化第二鉄のトリエタノールアミン溶液(以下 FeCl_3^- 溶液と記す)を加え、タン白を溶解すると共に遊離するタンニン酸と FeCl_3^- 溶液から生ずる、赤紫色の発色を 510nm で比色定量する方法である。

実験方法

I 装置および試薬

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科

** 諏訪湖畔病院

1) 機 器

比色計は日立 100—50 型分光光度計，遠心機は久保田 KN-70B (回転半径157mm)，混合機はサーモミキサーを使用した。

2) 試 薬

- a) 牛血清アルブミンの乾燥粉末 (和光)
- b) NaCl (和光特級)
- c) タンニン酸 (Merck, M. W=1700)
- d) $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (和光特級)
- e) トリエタノールアミン (和光特級)
- f) 安定剤, NaN_3 , 安息香酸 (和光特級)
- g) 標準タン白溶液は(a)を乾燥して 6 g/l (6 mg/ml) を作り，必要に応じて希釈して用いた。タン白濃度は 280nm で，1 mg/ml の吸光度は 0.655 であった。(タン白溶液 1 mg/ml の吸光度は 280nm で 0.65~0.67 の範囲である)
- h) トリエタノールアミンは水で 2 倍に希釈して使用，この溶液の pH は約 9 であった。

II 操 作 法

- (1) 遠心用試験管に，(1)タン白溶液，(2)1.5Mの NaCl 溶液，(3)1.0mM タンニン酸溶液を各々 0.5ml 宛順次攪拌しながら加え，最後にミキサーで十分混和し，5分間静置する。
- (2) 次いで 3000 r. p. m ($Z=1580G$) 10分間遠沈し，沈殿を分離する。
- (3) ディカンテーション後，遠心管を濾紙上に倒立させ，上澄み液を十分に除去する。
- (4) 沈殿に 1.5M-NaCl 溶液を 5 ml 加え，ミキサーで沈殿が均一な懸濁液になるまで混和する。次いで 3000 r. p. m 10分間遠沈し，前記のように上澄み液を十分に除去する。(洗浄操作)
- (5) 前記洗浄操作を 3 回繰り返す。
- (6) 沈殿に水を 2 ml 加え，ミキサーで均一な懸濁液になるまで混和する。
- (7) さらに，10mM. FeCl_3 溶液 0.5ml 加え，ミキサーで溶液が完全に透明になるまで十分に混和する。溶液は呈色する。
- (8) 5分間静置後，水 2 ml に FeCl_3 溶液 0.5ml を加えたものを盲検として，510nm における吸光度を測定する。

III 実 験 項 目

- (1) 呈色溶液の吸収曲線について
- (2) 発色後の吸光度変化について
- (3) 洗浄条件について
 - (a) ミキサーと転倒混和による攪拌条件の比較
 - (b) 洗浄回数
 - (c) 沈殿分離のための遠沈時間

- (d) 洗浄用 NaCl 溶液の濃度
- (4) 呈色試薬の FeCl_3 濃度について
- (5) タンニン酸の濃度について
- (6) 反応温度の条件について
- (7) 標準曲線について
 - (a) 直線性について
 - (b) 検出限界 (感度)
- (8) 再現性
- (9) 回収試験

IV 実験および結果

(1) 呈色液の吸収曲線

0.4g/lの牛血清アルブミン標準液(以下 Alb-液と略)を用いて、前述の操作法に従い波長400~640nmまでの吸光度を測定した。呈色液の吸収曲線は図1のように510nmに最大吸収点をもつ緩やかな曲線であった。従って以後吸光度は510nmにより測定した。(図1)

(2) 呈色後の吸光度変化

0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4 g/lの各濃度の Alb-溶液を用いて、前述の操作法に従い、発色後2時間まで吸光度を測定した。発色の吸光度は図2のように発色後2時間まで安定した結果を得た。(図2)

(3) 洗浄条件 (ミキサーと転倒混和の相違)

0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0g/lの各濃度の Alb-溶液を用いて、ミキサーと転倒混和について、他の条件を一定にし(操作法に従う)吸光度を測定した。図3のようにミキサー使用では原法と一致した値となり、直線性を示した。転倒混和ではミキサー法に比べて0.4g/l以上の Alb-溶液で濃度と共に吸光度が高くなった。(図3)

(4) 洗浄条件 (洗浄回数の相違)

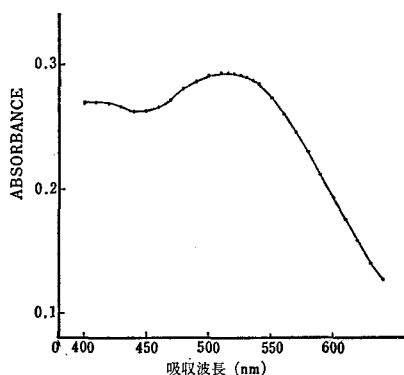


図1 吸収曲線

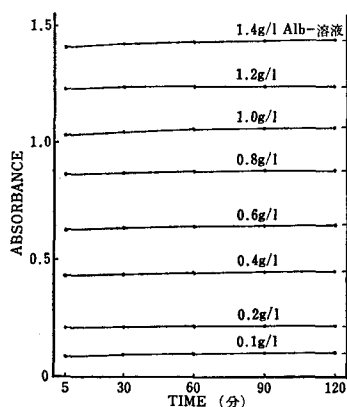


図2 発色後の吸光度変化

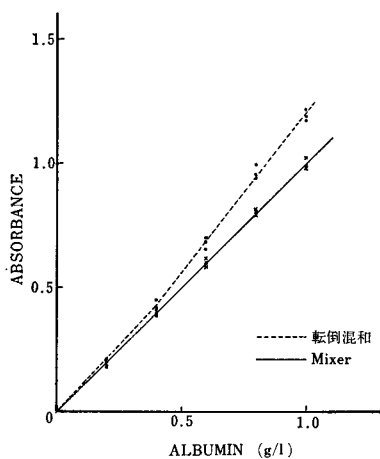


図3 洗浄条件 Mixer と転倒混和

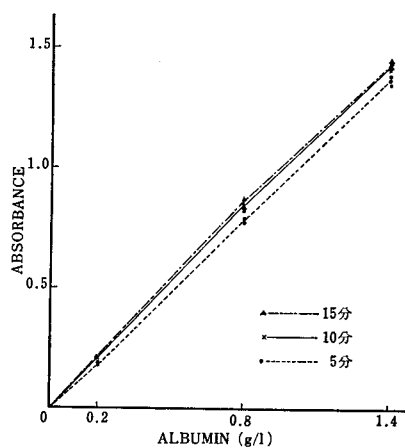


図4 洗浄条件 遠沈時間の検討

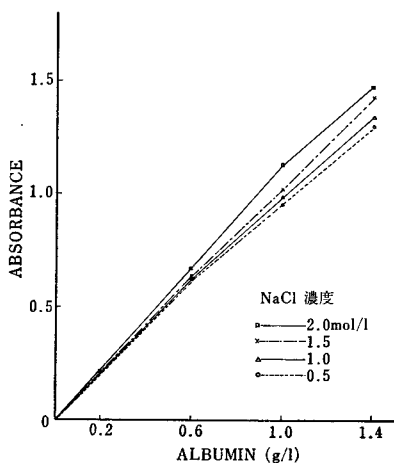
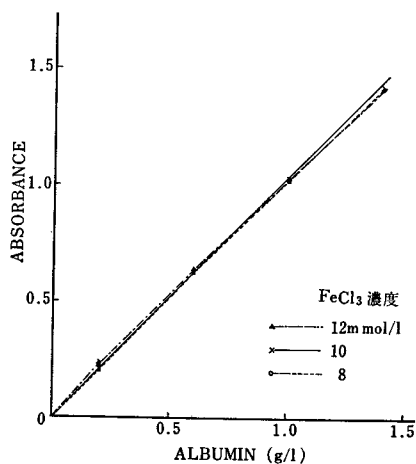


図5 NaCl 濃度の検討

図6 FeCl₃ 濃度の検討

洗浄回数を1, 2, 3回と変えて, 他の条件を一定にし, 吸光度を測定した。1回洗浄では原法より高値となり, 2, 3回洗浄ではほぼ同じ吸光度が得られた。

(5) 洗浄条件 (遠沈時間の相違)

0.2, 0.8, 1.4g/lの各濃度のAlb-溶液について, 遠沈時間を, 5, 10, 15分と変えて他の条件を一定にし, 吸光度を測定した。図4のように遠沈時間5分では, 10, 15分の遠沈時間の吸光度より低値を示した。(図4)

(6) 洗浄条件 (NaCl濃度の相違)

0.2, 0.6, 1.0, 1.4g/lの各濃度のAlb-溶液を用いて, NaCl溶液の0.5, 1.0, 1.5, 2.0Mの各濃度について, 他の条件を一定にし, 吸光度を測定した。図5のようにNaCl濃度が1.5Mで原法と一致した吸光度と直線性を示し, 1.0, 0.5Mでは低値を示し, 2.0Mでは高値を示した。(図5)

(7) 塩化第二鉄の濃度

0.2, 0.6, 1.0, 1.4g/lの各濃度の Alb-溶液を用いて, 塩化第二鉄の 8, 10, 12mMの各濃度について, 他の条件を一定にし, 吸光度を測定した。図6のように塩化第二鉄の 8, 10, 12mMの濃度による各タン白溶液の吸光度に変化はなかった。(図6)

(8) タンニン酸の濃度

0.2, 0.6, 1.0, 1.4g/lの各濃度の Alb-溶液を用いて, タンニン酸の 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4mMの各濃度について, 他の条件を一定にし, 吸光度を測定した。図7のように 1.0mM タンニン酸溶液は原法と一致した吸光度および直線性を示した。タンニン酸の 0.6mM ではタン白 0.6g/l 以上で, 0.8mM ではタン白 1.0g/l 以上でそれぞれ吸光度が原法より低値を示し, 直線性もよくない。また 1.2, 1.4mM のタンニン酸では, タン白 0.6, 0.2g/l 以上で吸光度は原法より高値を示した。(図7)

(9) 反応温度の条件

0.1, 0.2, 0.6, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5g/lの各濃度の Alb- 溶液を用いて 10, 20, 30°C の温度の下で, 他の条件を一定にして吸光度を測定した。図8のように反応温度の変化による各タン白溶液の吸光度は各濃度とも差はなかった。(図8)

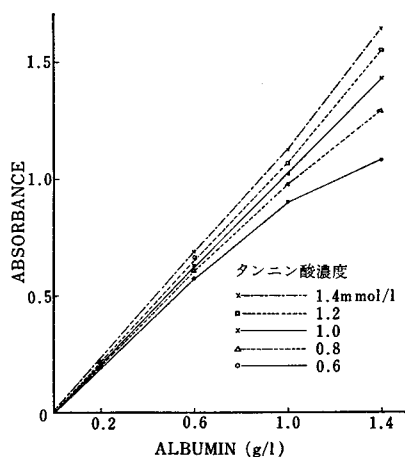


図7 タンニン酸濃度の検討

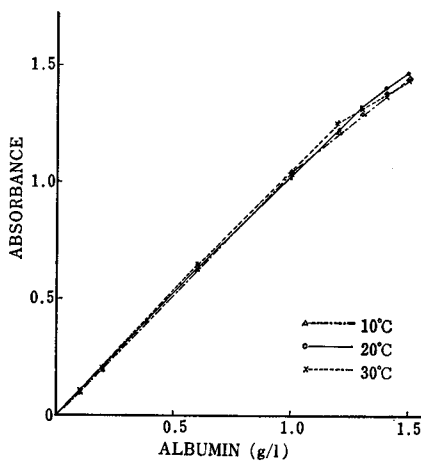


図8 温度条件

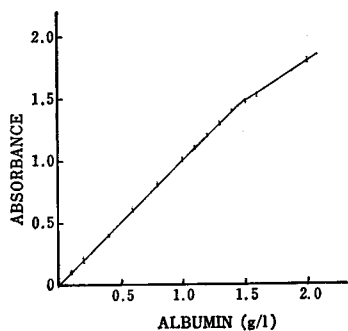


図9 ウシ血清アルブミンによる標準曲線

(10) 牛血清アルブミン使用による標準曲線

0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 2.0 g/lの濃度の Alb- 溶液を用いて, 操作法に従い, 吸光度を測定した。図9のように Alb- 溶液の濃度, 0.1~1.4g/l まで, 吸光度, 直線性とも原法に一致し, 1.5g/l では原法の直線上よりやや低値になり, 1.6g/l 以上では, 吸光度はさらに低下した。(図9)

(11) 検出限界, タン白濃度 0.02~0.1g/l までの吸光度測定で, 検出限界 (感度) は 0.04g/l であった。

- (12) 同時再現性, タン白濃度0.1, 0.6, 1.0, 1.4g/l の各20回計測で, C. V. が0.1g/lでは6.2%, 後は1.3~2.5%であった。
- (13) 日差再現性 タン白濃度0.1~1.4g/l, 検体数10~40から求めた結果0.1, 0.2g/l タン白濃度のC. V. は5%, 0.4g/l以上のC. V. は1.6~2.8%であった。
- (14) 回収試験, 同一尿に0.2, 0.4, 0.8g/l の Alb- 溶液を添加した回収試験による回収率はそれぞれ96.2, 99.3, 92.9% (平均96.1%) であった。

考 察

前述のように試薬濃度の条件は, タンニン酸は1mM, NaClは1.5M, FeCl₃濃度は10mMが原法同様に適当な濃度であることを確認した。タンニン酸が1mMより薄いとタン白量が多くなるに従って吸光度は低値となる。これはタン白に対してタンニン酸量の不足と考えられ, また1mMより濃くなると過剰タンニン酸の洗浄除去が十分できないため吸光度は高くなる。食塩水は1.5Mより濃くなるとタンニン酸の洗浄除去が不十分となり吸光度は高くなる。1.5Mより薄いと吸光度が低値となる。これは洗浄によるタンニン酸の溶出が多くなるためと考えられる。FeCl₃濃度は10mM±2mMの範囲内では吸光度に影響がなかった。また反応温度も10~30°Cにおいては測定値に影響を与えない。以上の結果より原法の操作に従えば目的の結果が得られることが分った。本法で一番注意を要する点は (1)沈殿生成時の混和, (2)沈殿の洗浄時の混和, (3)沈殿溶解時の混和である。

(1)の操作でタン白の沈殿粒子が小さく均一な懸濁液になるようにミキサーで十分混和する。この時粒子が大きいと洗浄の際過剰のタンニン酸の除去が不完全になり吸光度が高くなる。

(2)の操作では上澄み液を十分に除去することが大切である。転倒混和による洗浄では過剰のタンニン酸を完全に除去できないので, ミキサーを用いて混和洗浄する必要がある。但し0.4g/l以下のタン白液に対してミキサーをかけ過ぎるとタンニン酸の溶出により吸光度が低値になるので注意する必要がある。原法のように1回の洗浄では高濃度のタン白溶液は勿論のこと過剰のタンニン酸を完全に除去できないので洗浄は2回以上行う必要がある。さらに洗浄中にタン白粒子を小さく均一なものにすることは最後の溶解発色を促進し, 溶液を透明にするために必要である。

(3)の操作で沈殿を溶解する前に水2mlを加えるが, この時ミキサーで十分均一な懸濁液にしてから, FeCl₃-溶液を加えてミキサー混和を行なうと透明な発色液が得られる。タンニン酸鉄塩の沈殿が浮遊したままでは吸光度が高めとなり測定値の大きな誤差原因となるので十分な注意が必要である。

以上のように混和は測定値の大きな誤差原因であることに留意する必要がある。

本法は従来の比色法に比べ, (1)タン白沈殿剤がそのまま発色剤の働きをするので操作が一段階少ない。(2)沈殿生成の完了時間が短く, 他法は10分以上静置するのに対して本法は5分である。(3)使用試薬が室温で2ヶ月以上安定である。(4)沈殿溶解と発色の反応が速や

かである。(5)呈色が少くとも2時間安定している。(6)検出感度がよい。(7)精密度, 正確度が高い。(8)反応機構よりみて正常尿中の物質の影響を受けにくいなどの優れた点があげられる。

一方比濁法に比べ, 沈殿生成—洗浄—溶解発色と操作が二段階多いため検体処理に長い時間がかかるが, 感度, 精度がよく, 反応終了後の安定時間が長い点などが優れている。

結 語

Yatzidis の方法について検討した結果沈殿したタン白を完全に集めるため, 遠沈は10分以上行い, 洗浄その他混和を必要とする時は前述の注意を守り, 操作を原法通り実施することにより本法は十分定量法として利用できることを確めた。

文 献

- 1) 金井 泉・金井正光:「臨床検査提要」 27: II, 13~14
- 2) 斉藤正行・鈴木 明: *Medical Technology* 4(12), 887~890 (1976)
- 3) 鈴木優治他: 衛生検査, 26(9), 946~852 (1977)
- 4) 斉藤正行・鈴木 明: *Medical Technology* 6(10), 819~823 (1978)
- 5) 岩瀬正子・緑川和子: 衛生検査 23(2), 166~167 (1974)
- 6) 島津泰子他: 衛生検査, 27(9), 1097~1100 (1978)
- 7) 垣上美恵子他: 衛生検査, 22(3), 309 (1973)
- 8) Hippocrates Yatzidis: *Clin. Chem.* 23(5), 811~812 (1977)
- 9) 埴 勇至: 神奈川県衛生検査技師会一般検査研究班, 45, 95~96 (1975)
- 10) 真島文子: 検査と技術 2(7), 70~71 (1974)
- 11) 河合 忠:「血漿蛋白その基礎と臨床」 44~46 (1974)

(1978年12月2日 受付)