報 文

ブロモクロロフェノールブルーとメンブランフィルターを用いる 尿中タンパク質の簡易目視定量

吉本敬太郎^{®*}, 金子恵美子^{*,**}, 四ツ柳隆夫^{*,***}

Visual determination of protein in urine using Bromochlorophenol Blue and a membrane filter

Keitaro YOSHIMOTO, Emiko KANEKO and Takao YOTSUYANAGI^{*}

^{*}Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8579

(Received 14 January 2000, Accepted 10 April 2000)

A visual method has been established for the determination of the urinary protein concentration with Bromochlorophenol Blue (BCPB) and a membrane filter (MF). The acid-dissociation constant of HBCPB⁻ is pK_a (OH) = 4.2. At pH 3.0, ternary association occurs between HBCPB⁻, BCPB²⁻ and protein in solution. After the associate is extracted onto a MF, HBCPB⁻ in the associate undergoes a significant color change from yellow to blue upon drying. Free HBCPB⁻ is not extracted onto a MF. The high extractability of the ternary associate and the significant color change provide a sensitive visual method for protein detection. This method can be used to detect human serum albumin in urine visually at concentrations as low as 40 mg/l. There was good agreement between the results obtained for urinary protein by this method and those obtained by the conventional Coomassie Brilliant Blue spectrophotometry. The method reported here can be used as a screening test for low, but increased, protein in urine.

Keywords : protein; urine; visual determination; Bromochlorophenol Blue; membrane filter.

1 緒 言

尿は採取する際に患者の肉体的苦痛を伴わない非侵襲性の試料であり、医療分野において、特定成分の高感度簡易分析法の開発が強く望まれている。疾病の診断及び病状変化のモニタリングのために有用な情報を与える尿中の測定成分としては、ブドウ糖、タンパク質、ビタミンをはじめ、各種の酵素などがある。このうち尿中のタンパク質含有量は、慢性じん（腎）炎やネフローゼ症候群などの腎疾患、泌尿器系の疾患、及び糖尿病の早期発見のために重要な指

針となるため、その測定意義は大きい。集団検診等の場で尿中タンパク質のスクリーニングテストに用いられている試験紙法は、機器を用いずに簡単な操作で迅速に測定できるという大きな利点を有するが、その検出感度は100～200 mg/lと低く、再現性、精度も不足している。したがって、医療現場で指摘されているとおり¹⁾、試験紙による尿タンパク質増加の早期発見は不可能である。現在最もはん用されている尿中タンパク質定量法としては、クマシーブリリアントブルー（CBB）法²⁾³⁾、及びピロガロールレッド-モリブデン錯体法⁴⁾がある。これら二つの方法は共に、色素とタンパク質との会合体形成を利用する吸光度法であり、いわゆるタンパク誤差⁵⁾に基づく色素の変色によって尿中の総タンパク質を定量する方法として確立されている。その操作も比較的簡便で、高感度であるという特徴を持つが、測定機器を必要とするために集団検診等にお

^{*} 東北大学大学院工学研究科応用化学専攻分子システム化学講座応用計測化学分野: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

^{**} 現在: 北見工業大学工学部化学システム工学科: 090-8507 北海道北見市公園町 165

^{***} 現在: 宮城工業高等専門学校: 981-1239 宮城県名取市愛島塩手字野田山 48

ける迅速なスクリーニングには適用不可能である。しかし、試験紙法の dip and read 方式に見られるように、物質を簡便・迅速に測定できるシステムの開発は、十分な感度と選択性を付与できるならば、臨床検査分野への貢献度は極めて大きい。

近年、田口らによって開発されたメンブランフィルター(MF)を用いる固相濃縮法⁶⁾⁷⁾が、微量分析のために広く用いられている。MFを用いる捕集は、疎水性のイオン会合体に対して高い親和性を持ち、その固相抽出機構は、膜による物質の吸着が主たる役割を担っており、機械的な捕そくは二次的なものである。色素結合タンパク質を MF に捕集する試みも既に幾つか報告されており、MF へ色素を捕集した後、溶出して吸光度を測定する方法⁸⁾や、MF ごと溶解して測定する吸光度法⁹⁾、MF を直接測定する固相蛍光光度法¹⁰⁾がある。本研究では、MF 捕集後、測定には機器を用いず、MF の色調を目視して定量する方法の開発を目的とした。

著者らはこれまで、わずかな色調変化にも鋭敏な人間の目の高い性能に着目し、これを利用する簡易目視定量法を開発してきた。例として、アルミニウムのイオン対フィルム比色¹¹⁾、リング濃縮目視蛍光定量¹²⁾、井戸ボーリング現場における岩石中の鉄含有量テスト¹³⁾、全血中ヘモグロビン濃度の貧血-正常境界値の目視蛍光判定¹⁴⁾などがある。また、タンパク質に関しては既報において、MF へ捕集したプロモクロロフェノールブルー (BCPB) とタンパク質との会合体が乾燥によって鮮明な青色に変化する現象を見だし、タンパク質の高感度目視検出法としての可能性を速報した¹⁵⁾。本報では、この変色現象が、タンパク質に会合している色素のプロトン解離によることを解明し、乾燥並びにアンモニアを用いる発色操作によって、尿中タンパク質のスクリーニングテストに適用可能な実用分析法としての確立を行った。

2 実験

2.1 試薬及び装置

タンパク質溶液: タンパク質として Sigma 製のヒト血清アルブミン (HSA) 500 mg を水に溶解して 500 ml とし、これを適宜希釈して用いた。

BCPB 溶液: 東京化成製 BCPB を水に溶解し、 1.0×10^{-3} M 溶液を調製し、これを適宜希釈して用いた。

pH 緩衝液: 0.5 及び 0.2 M のモノクロロ酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 3.0) を調製した。

MF: Advantec 製 MF (ミックスドセルローズ製、孔径 0.2 μ m, 直径 25 mm) を用いた。

フィルターホルダー: Advantec 製のプラスチックホルダーを用いた。

汎用シリンジ: トップ製プラスチックシリンジ (容量

Fig. 1 Structure of BCPB²⁻

20 ml) を用いた。

総タンパク測定キット: Bio Rad 製の Protein Assay (CBB 法)、標準タンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) を使用した。

反射吸光度計: 島津製作所製 CS-9300PC 型二波長フライングスポットスキヤニングデンストメーターを固相の反射吸光度測定に用いた。測定条件は、ビームサイズ 1.0×10.0 mm, 測定波長 590 nm で MF をエリアスキャンした。

2.2 定量操作

試験管に 5.0×10^{-4} M BCPB 溶液を 3 ml, 0.5 M pH 緩衝溶液を 4 ml 加え、次いで 10 倍希釈した尿試料を 3 ml 加えた後、汎用シリンジへ移す。MF をセットしたフィルターホルダーをこのシリンジの先に取り付けて、全量 10 ml を汎用する。MF を取り出して、60℃ の乾燥機中で 5~10 分間乾燥する。次いで、シャーレ中の 1 M アンモニア水上に約 10 秒間かざして、黄色から青色への変色を完結させる。この MF の発色を、あらかじめタンパク質水溶液を用いて作製しておいた標準色列と目視で比較し、タンパク質濃度を判定する。なお、定量条件の最適化及び発色機構の研究のため、デンストメーターによる測定も併せて行った。

3 結果と考察

3.1 水溶液中でのタンパク質による BCPB の変色

BCPB (Fig. 1) はスルホフタレイン系の二塩基性色素で $pK_{a2}(\text{OH}) = 4.3$ ¹⁶⁾ を持ち、酸性側、塩基性側でそれぞれ、HBCPB⁻ (黄色: 吸収極大波長 435 nm) 及び BCPB²⁻ (青色: 吸収極大波長 590 nm) として存在する。pH 3 付近の酸性条件下でタンパク質を添加すると、色素溶液の色は黄色から BCPB²⁻ の青色へと変化する (Fig. 2)。これは、HBCPB⁻ がタンパク質と反応して脱プロトン化が促進され、BCPB²⁻ とタンパク質との会合体が生成するためである。タンパク質と色素との結合機構は複雑で未解明な点が多いが、藤田ら¹⁷⁾は、一次的にはタンパク質の正

Fig. 2 Color change of BCPB with protein in solution

[BCPB]: 7.0×10^{-5} M; pH: 3.0; Sample volume: 5 ml

Fig. 3 Color change of MF by drying

[HSA]: 5 mg/l; [BCPB]: 7.0×10^{-5} M; pH: 3.0; Sample volume: 5 ml; (a): wet; (b): during drying; (c): after drying

荷電部位と酸性色素との静電相互作用であり、加えて、van't Hoff プロットを用いて熱力学的に検討し、色素とタンパク質の疎水性相互作用が生じることを推察している。鈴木¹⁸⁾は、タンパク質による色素の深色・濃色効果の発現は、タンパク質正荷電部位のうち特に高親和性結合サイトとの相互作用が重要な役割を担っているとしている。また、Murakami¹⁹⁾は、BSA に関して、この高親和性結合サイトの数は全色素結合サイト数に比べて著しく少なく、色素の陰イオン電価数が増加するにつれて特異的結合（高親

和性）様式をとることを、分光学的手法によって平衡論的に明らかにしている。これらの機構を考慮すると、水溶液中のタンパク質による BCPB の変色は、HBCPB⁻の一部がタンパク質の高親和性正荷電部位との相互作用によって BCPB²⁻に変化したことによるものであると推察することができる。

3・2 三元会合体の MF への捕集とその変色

pH 3 付近の酸性水溶液中で生成した青色の BCPB-タンパク質会合体に、MF 捕集を適用した。HBCPB⁻（黄色）、BCPB²⁻（青色）の両化学種は、単独では MF へほとんど捕集されない。MF 上に捕集された会合体の色は、汙過直後には黄色がかった青色を呈しており [Fig. 3(a)]、3・1 に述べた色素-タンパク質の結合機構に基づく BCPB²⁻の結合とは異なるサイトに、HBCPB⁻もまた変色することなく会合していることは容易に推察できる。この黄色い成分を含む MF を乾燥させると、鮮明な青色に変色する。乾燥に伴う変色の過程を Fig. 3(b), (c) に示した。この青色に発色した乾燥 MF を 1 M 塩酸溶液上にかざすと色素はすべて黄色に変化し、またアンモニア水上にかざすと再び青色に変化する。この結果から、MF の乾燥による青色への変色は、タンパク質に会合している HBCPB⁻からのプロトンの脱離が要因であることが判明した。

Fig. 4 はタンパク質水溶液を用いた場合の乾燥 MF の標準色列である。実験条件下において、タンパク質濃度 25 mg/l までの範囲では、タンパク質濃度の増加に伴い青色が濃くなるのが分かる。しかし、25 mg/l を超えると、青色が著しく低下し青白色となる。この結果は、タンパク質低濃度側と高濃度側において、MF への分配能が大きく異なる色素-タンパク質会合体が形成されることを示唆している。Fig. 5 は、色素濃度を变化させた場合の、乾燥 MF の反射吸光度を測定した結果である。Fig. 4 において青白色が出現するタンパク質高濃度域でも、色素添加量の増加によって濃い青色が得られる。これらの結果から、色素過剰下では、BCPB²⁻に加えて HBCPB⁻もタンパク質と会合し、MF への分配能の高い HBCPB⁻-BCPB²⁻-タンパク質の三元会合体が生成することが分かる。前述した汉過直後の MF の黄色味を帯びた発色はこのためである [Fig.

Fig. 4 Color transition with relation to protein concentration at low dye concentration

[BCPB]: 7.0×10^{-5} M; pH: 3.0; Sample volume: 5 ml

3(a)}. 一方, タンパク質過剰下では, 色素量が不足し, MF への分配能の低い会合体が生成し, その結果, 青白色の MF が得られる.

以上のことから, 三元会合体 HBCPB^- - BCPB^{2-} -タンバ

Fig. 5 Effect of protein and BCPB concentration on reflective absorbance

[BCPB]_T: ● 5.5×10^{-5} M, □ 7.0×10^{-5} M, △ 8.0×10^{-5} M; pH: 3.0; Sample volume: 5 ml

* Reflective absorbance was measured as peak area at 590 nm with densitometer (Shimadzu CS-9300PC).

Table 1 Effect of foreign substances

Substance	Added/ mg l ⁻¹	Protein found/ mg l ⁻¹	Recovery, %
NaCl	6.15×10^3	86.2	95.8
Na ₂ SO ₄	1.45×10^3	81.9	91.0
KH ₂ PO ₄	2.81×10^3	82.5	91.7
Glycine	7.77×10^3	94.5	105.0
Glucose	3.64×10^3	94.0	104.4
Creatinine	2.35×10^3	99.4	99.4
Urea	6.07×10^3	89.5	107.3
Oxalic acid	2.01×10^2	92.4	102.7
Citric acid	1.93×10^3	95.4	106.0
Tartaric acid	3.06×10^3	95.5	106.1
Ascorbic acid	1.81×10^3	93.4	103.8
Uric acid	8.41×10^2	96.8	107.5
Hippuric acid	1.80×10^3	98.7	109.7

HSA taken: 90 mg/l

ク質の生成によって HBCPB^- が多量に会合している場合は, 会合体の MF への親和性が高く, MF への色素捕集量が増加することが分かる. また, この会合体中の HBCPB^- が, 乾燥によって BCPB^{2-} に変換されるために, 溶液中で生じる青色 (Fig. 2) と比較して著しく濃い MF 発色 (Fig. 3(c)) を得ることができる. これは会合体の MF への濃縮効果をはるかに上回るものである. つまり, この会合体を固相へ持ち込むことによって, 溶液吸光度法では発現し得ない黄色い化学種 HBCPB^- の機能が, 最大限に活用された結果であると言える.

3.3 検量線及び感度

市販の CBB 法のキットでは, 検量線作成時の標準タンパク質として BSA が用いられ, 日常分析には用いられている. 本法においてもこのはん用法に準じて, BSA を標準タンパク質として検量線を作成した. MF の反射吸光度を用いて作成した検量線は, BSA 濃度 30 mg/l まで良好な直線となった. また, HSA を用いた場合にも同様に, 30 mg/l まで良好な直線となることを確認した. 本法の目視による検出下限は, 2.2 の操作において 3 ml 分取する

Fig. 6 Correlation between the results for urinary protein obtained by CBB method and the proposed method

$n = 17, r = 0.9304$

Table 2 Analytical results of urinary protein

Sample	Proposed method		CBB method/mg l ⁻¹
	Visual determination/mg l ⁻¹	Densitometry/mg l ⁻¹	
1	70	76.8	80.9
2	100	109	96.4
3	150	153	126
4	70	89.1	76.3
5	70	68.5	68.4
6	50	55.4	64.9

際の試料溶液中の濃度として 4 mg/l であり, デンシトメトリーにおいても, 空試験値の変動の 3 倍で定義される検出限界は 4 mg/l である. すなわち, 尿中タンパク質濃度としては 40 mg/l である. また, 定量可能な上限は尿中濃度として 300 mg/l である.

3.4 共存物質の影響

共存物質の影響をデンシトメトリーを用いて検討した結果を Table 1 に示す. いずれも尿中濃度レベルで顕著な影響を与えない.

3.5 ヒト尿中タンパク質への応用

健常人の尿 17 例を対象として, 2.2 の操作に従い, タンパク質の測定を行った. なお, 尿試料では, 乾燥だけでは変色が完結しない場合が見られた. これは尿中に存在する高濃度の共存成分が, 乾燥前後の pH を緩衝するためと考えられる. この問題を, アンモニア水上にかざすという操作を加えて解決した. 本法の目視による結果は, タンパク質濃度 100 mg/l 以下の濃度領域においても, CBB 法と良好な一致を示した (Table 2). また, 本法のデンシトメーターによる結果は, CBB 法と相関係数 $r = 0.9304$ ($n = 17$) の良好な一致を示した (Fig. 6).

本法では, 機器を用いずに肉眼で CBB 吸光光度法と同等の感度が得られ, 試験紙法では不可能であった 100 mg/l 以下の尿中タンパク質を簡便・迅速に測定できる.

本研究に関して有益なご助言をいただきました佐藤 誠博士

(シノテスト株式会社) に深く感謝申し上げます.

(1998 年 5 月, 第 56 回分析
化学討論会にて一部発表)

文 献

- 1) 下瀬雅士: 医学検査, **46**, 1762 (1997).
- 2) M. M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 3) B.-M. Löffler, H. Kunze: *Anal. Biochem.*, **177**, 100 (1989).
- 4) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano: *Bunseki Kagaku*, **32**, E 379 (1983).
- 5) I. M. Klotz: *Chem. Rev.*, **41**, 373 (1947).
- 6) 田口 茂, 後藤克巳: ふんせき (*Bunseki*), **1989**, 524.
- 7) 田口 茂, 笠原一世, 波多宣子: 分析化学 (*Bunseki kagaku*), **44**, 505 (1995).
- 8) H. Kihara, H. Kuno: *Anal. Biochem.*, **24**, 96 (1968).
- 9) 藤田芳一, 森 逸男, 松尾敏子: 分析化学 (*Bunseki kagaku*), **44**, 733 (1995).
- 10) 木下俊夫, 飯沼文夫, 辻 章夫: 分析化学 (*Bunseki kagaku*), **23**, 1543 (1974).
- 11) E. Kaneko, H. Tanno, T. Yotsuyanagi: *Mikrochim. Acta*, **1988** III, 333.
- 12) A. Ishida, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1999**, 217.
- 13) A. Ishida, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1999**, 351.
- 14) E. Kaneko, K. Yoshimoto, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **1999**, 751.
- 15) K. Yoshimoto, E. Kaneko, T. Yotsuyanagi: *Chem. Lett.*, **2000**, 6.
- 16) K. Yamamoto: *Anal. Sci.*, **8**, 299 (1992).
- 17) 藤田芳一: ふんせき (*Bunseki*), **1997**, 436.
- 18) 鈴木優治: 分析化学 (*Bunseki kagaku*), **42**, 497 (1993).
- 19) K. Murakami: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 2808 (1993).

要 旨

pH 3.0 において, プロモクロロフェノールブルー (BCPB) とタンパク質との会合体がメンブランフィルター (MF) に捕集され, これを乾燥させると黄色から青色に変化するという現象に基づき, 尿中タンパク質の簡易目視定量法を開発した. 目視での検出限界は尿中タンパク質濃度として 40 mg/l であり, この高感度性の要因は, 水溶液中で生成する三元会合体, $\text{HBCPB}^- - \text{BCPB}^{2-} - \text{タンパク質}$, 中の黄色い色素化学種 HBCPB^- の機能に依存するところが大い. すなわち, HBCPB^- はタンパク質-色素会合体の MF への吸着性を増加させ, 更に黄色から青色へ変色することで肉眼による検出感度を著しく向上させる. 尿試料を用いて, 現在はん用されているクマシープリリアントブルー吸光光度法との比較を行った結果, 良好な相関が得られた ($r = 0.9304$; $n = 17$). 本法は特別な機器を要さず, 初期腎疾患発見のためのスクリーニング法として十分な簡便性と感度を有している.