報 文

p-ニトロベンズアルデヒドを発色試薬とする光依存性発色 反応による血清総グロブリン濃度の定量

鈴木 優 治*

Determining the serum total-globulin concentration by a light-dependent
color reaction using *p*-nitrobenzaldehyde

Yuji SUZUKI*

*Saitama Prefectural University Junior College, 820, Sannomiya, Koshigaya-shi, Saitama 343-8540

(Received 5 June 2001, Accepted 13 September 2001)

Aromatic aldehyde has been known to react with serum globulin, and *p*-dimethylaminbenzaldehyde was applied to the determination of the serum globulin concentration. However, the color reaction of this aldehyde with serum globulin was slow. Thus, the author examined the color reaction of eight aromatic aldehydes with serum globulin in order to select an aromatic aldehyde suitable for application to a laboratory examination which requires rapidity. Of the eight aromatic aldehydes, *p*-nitrobenzaldehyde (*p*-NITBA) exhibited an excellent property, and in the presence of light gave a colored product with an absorption maximum at about 600 nm in its reaction with serum protein other than serum albumin. The reaction rate increased with increases in the intensity of light and in the concentration of hydrochloric acid; the color reaction was almost completed within 20 min in the presence of light of 3000 luxes when a color reagent containing 2 g of *p*-NITBA in 1000 ml of a 8.4 mol/l of hydrochloric acid solution was used. The apparent molar absorptivity of serum γ -globulin was $2.15 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$, and the rate constant at 37°C was 0.202 min^{-1} for γ -globulin and 0.201 min^{-1} for serum, which was two-times as large as that of *p*-dimethylaminbenzaldehyde. The measured values obtained by the proposed method correlated well with those by a method of Goldenberg et al ($r = 0.990$) and by a method that combines the biuret method and the dye-binding method ($r = 0.967$).

Keywords : serum total globulin assay; spectrophotometry; *p*-nitrobenzaldehyde; light-dependent color reaction.

1 緒 言

血清タンパク質の生体内変動は様々な疾患と関連づけられることから、極めて存在量の少ない微量タンパク質から血清総タンパク質まで多くのタンパク質が測定され、臨床応用されている。アルブミンとグロブリンの測定は、血清タンパク質の質的変動を把握する最も簡単な方法の一つであり、個々のタンパク質が免疫学的方法で測定できるようになった今日においても、スクリーニング検査として重要である。血清アルブミンは、プロモクレゾールグリーン

法などの色素結合法¹⁾²⁾により簡便に測定できるようになった。しかし、血清総グロブリン測定法には比濁法^{3)~5)}や比色法⁶⁾⁷⁾はあるが、測定操作は煩雑である。臨床的には、血清総グロブリンは血清総タンパク質濃度から血清アルブミン濃度を差し引く間接的な方法も行われている。統計学的には、このような二つの定量法の組合せ法では誤差が加算され、測定値のばらつきは直接測定法で測定する場合に比べ大きくなる。

著者は、血清総グロブリンの直接測定法の設定を試み、既にスルホサリチル酸-Triton X-100 試薬を用いる比濁法を設定し報告した⁸⁾。また、光照射下における芳香族アルデヒドと血清グロブリンとの発色反応が、血清総グロブリン

* 埼玉県立大学短期大学部衛生技術学科: 343-8540 埼玉県越谷市三野宮 820

ンの定量に応用できることを、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド (*p*-DMABA) を用いた検討により示した⁹⁾。*p*-DMABA を発色試薬とした場合、反応時間は 45 分と長い。本論文では、反応時間を短縮した実用性の高い測定法の設定を目的として、8 種類の芳香族アルデヒドを用いて反応特性が優れた発色試薬の選択を行い、更に反応速度が *p*-DMABA に比べ速い、*p*-ニトロベンズアルデヒド (*p*-NITBA) を用いて、血清総グロブリン測定法を設定した結果について報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

実験には和光純薬製の試薬を用いた。

8.4 mol/l 塩酸溶液: 市販濃塩酸 700 ml を精製水で希釈し、全量を 1000 ml とした。

芳香族アルデヒド試薬: 芳香族アルデヒド 13.2 mmol に 8.4 mol/l 塩酸溶液 1000 ml を加え、マグネチックスターラーで 1 時間かくはんした。未溶解分は汙過により除去した。

1.0 g/l タンパク質溶液: γ -グロブリン 100 mg、ヒトアルブミン 100 mg 及び α -グロブリン (Human fraction IV) 100 mg を採り、別々に精製水に溶解し、100 ml とした。

p-NITBA 試薬: *p*-NITBA 2.0 g に 8.4 mol/l 塩酸溶液 1000 ml を加え、マグネチックスターラーで 1 時間かくはんした。未溶解分は汉過により除去した。

2.2 反応速度の測定

芳香族アルデヒドの発色反応の反応速度は、1.0 g/l γ -グロブリン溶液 2.0 ml に精製水 0.04 ml 及び芳香族アルデヒド試薬 8.0 ml を加え、よく混和し、37°C において 3000 ルクスの蛍光灯を照射しながら、5 分ごとに反応溶液の一部を抜き取り、試薬空試験溶液を対照として発色体の吸収極大波長において吸光度を測定した。反応溶液には、タンパク質に比べ芳香族アルデヒドが過剰に存在することから {反応溶液中の濃度: 芳香族アルデヒド 1.06×10^{-2} mol/l, γ -グロブリン濃度 1.21×10^{-5} mol/l (分子量を 165 kDa とし計算)}、この発色反応の吸光度変化と時間との関係に 1 次反応式を適用して、反応速度定数を求めた。

2.3 血清総グロブリンの測定操作

血清 0.01 ml に精製水 0.5 ml 及び 37°C に加温した *p*-NITBA 試薬 2.0 ml を加え、よく混和し、3000 ルクスの蛍光灯照射下で 20 分間反応させた。吸光度は、精製水 0.51 ml に *p*-NITBA 試薬 2.0 ml を加えて調製した試薬空試験液を対照として 600 nm で測定した。検量線は 1.0 g/l γ -グロブリン溶液を 5 本の試験管に 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 ml ずつ採り、これらに精製水を加え全量を 0.51 ml と

し、以下血清の場合と同様に操作した。

また、従来法との相関関係の検討では、上記の測定操作による測定のほか、次のように測定操作を簡便化した測定も実施した。血清 0.01 ml に 37°C に加温した *p*-NITBA 試薬 2.0 ml を加え、よく混和し、3000 ルクスの蛍光灯照射下で 20 分間反応させた。吸光度は、精製水 0.01 ml に *p*-NITBA 試薬 2.0 ml を加えて調製した試薬空試験液を対照として 600 nm で測定した。検量はキット添付標準血清 0.01 ml を血清の場合と同様に操作した。この簡便法での発色試薬は、*p*-NITBA 2.0 g に 6.7 mol/l 塩酸溶液 (市販濃塩酸 560 ml を精製水で希釈し、全量を 1000 ml とした) 1000 ml を加え、約 1 時間かくはんし、未溶解分を汉過により除去し調製した。

吸光度は日立臨床検査用分光光度計 7011 により測定した。また、光強度は ANA-313 Lux Meter (東京光電製) により測定した。

2.4 血清総タンパク質及び血清アルブミンの測定

血清総タンパク質はビウレット法、血清アルブミンはブロモクレゾールグリーン (BCG) 法により測定した。両物質の測定試薬は、体外診断用医薬品として市販されている A/G B-テストワコー (和光純薬製) を用いた。

3 実験結果

3.1 発色反応に関する検討

3.1.1 各種芳香族アルデヒドの反応及び選定 芳香族アルデヒドとタンパク質との発色反応には、光照射に加えて高濃度の水素イオンが必須である。また、後述するように芳香族アルデヒドはタンパク質と同様の反応条件下で芳香族アミノ酸であるトリプトファンとも反応し、タンパク質から生成した発色体と極めて類似する発色体を生成した。このことから、この発色反応では水素イオンが芳香族アルデヒドのアルデヒド基に付加し、生成した陽イオンがタンパク質のトリプトファン残基と求電子的に反応し、発色体を生成するものと推定される。陽イオンの反応性はアルデヒド基の荷電性に依存し、この荷電量は芳香族アルデヒドのベンゼン環に結合した置換基の電気的性質に影響されるものと考えられる。すなわち、置換基の電気的性質は、芳香族アルデヒドとタンパク質との反応速度や、生成する発色体の分光学的特性に影響を及ぼすものと推測される。そこで、電気的性質の異なる置換基を持つ *p*-DMABA、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド (*p*-HYDBA)、*p*-メトキシベンズアルデヒド (*p*-MTXBA)、*p*-メチルベンズアルデヒド (*p*-MTYBA)、*m*-メトキシベンズアルデヒド (*m*-MTXBA)、*p*-クロロベンズアルデヒド (*p*-CHLBA)、*m*-ニトロベンズアルデヒド (*m*-NITBA) 及び *p*-NITBA を、8.4 mol/l 塩酸溶液で溶解した 1.32×10^{-2} mol/l 溶液を調製し、これら

Fig. 1 Absorption spectra of the colored products formed from the color reaction between the eight kinds of the aromatic aldehydes and γ -globulin

Reaction conditions: irradiation intensity, 3000 luxes; irradiation time, 20 ~ 180 min; concentration of hydrochloric acid in the color reagent, 8.4 mol/l. Each curve indicates the colored product of 1, *p*-dimethylaminobenzaldehyde (*p*-DMABA); 2, *p*-hydroxybenzaldehyde (*p*-HYDBA); 3, *p*-methoxybenzaldehyde (*p*-MTXBA); 4, *p*-methylbenzaldehyde (*p*-MTYBA); 5, *m*-methoxybenzaldehyde (*m*-MTXBA); 6, *p*-chlorobenzaldehyde (*p*-CHLBA); 7, *m*-nitrobenzaldehyde (*m*-NITBA); 8, *p*-nitrobenzaldehyde (*p*-NITBA). Each absorption spectrum was measured after the color reaction was completed.

のアルデヒド試薬と γ -グロブリンとの反応における反応速度定数、及び生成する発色体の分光学的性質と求電子的置換基定数 (σ^+)¹⁰⁾ との関係について検討した。これらの芳香族アルデヒドは光照射下のみで γ -グロブリンと反応し、Fig. 1 のように吸収スペクトルの異なる 520 ~ 635 nm に吸収極大波長を示す、桃色 ~ 青色の発色体を生成した。Fig. 2 は反応で生成した発色体の、吸収極大波長と σ^+ との関係を示している。吸収極大波長は求電子的置換基定数が最も小さい *p*-DMABA が最長値を示し、 $\sigma^+ = -0.8$ 付近で最小値の 520 nm となり、 $\sigma^+ = -0.3 \sim 0.8$ の領域ではほぼ 600 nm の一定値となった。また、反応率が 100% と見なし計算した発色体の見掛けの分子吸光係数は、*p*-DMABA が最大値を示し、 $\sigma^+ = 0$ 付近で最小値になり、それよりも σ^+ が大きい領域で増加し、 $\sigma^+ = 0.6 \sim 0.8$ で一定傾向を示した。Fig. 3 は 3000 ルクスの光照射下における発色反応のタイムコースを示しており、反応速度は用いるアルデヒドの種類により著しく異なっていた。Fig. 4 は反応速度定数と σ^+ との関係を示している。反応速度定数は $\sigma^+ = -0.5$ 付近で最小になり、これよりも置換基の

Fig. 2 Relationship between the absorption maximum of the colored product and the substituent constant (σ^+) of the substituent of each aromatic aldehyde

1, *p*-DMABA; 2, *p*-HYDBA; 3, *p*-MTXBA; 4, *p*-MTYBA; 5, *m*-MTXBA; 6, *p*-CHLBA; 7, *m*-NITBA; 8, *p*-NITBA

Fig. 3 Time course of the color reaction between the eight aromatic aldehydes and γ -globulin

Reaction conditions: irradiation intensity, 3000 luxes; concentration of hydrochloric acid in the color reagent, 8.4 mol/l. Each curve indicates the color reaction of 1, *p*-DMABA; 2, *p*-HYDBA; 3, *p*-MTXBA; 4, *p*-MTYBA; 5, *m*-MTXBA; 6, *p*-CHLBA; 7, *m*-NITBA; 8, *p*-NITBA.

電子吸引性が高い領域及び小さい領域で増加し、ニトロ基を置換基に持つ *p*-NITBA で最大となった。Table 1 は前述の結果をまとめたものである。*p*-DMABA は吸収極大波長が最長で見掛けの分子吸光係数が最も大きい発色体を

生成したが、反応速度定数は最大値を示した *p*-NITBA のおおよそ 1/2 であった。血清総グロブリン濃度の基準範囲はおおよそ 25~31 (平均 28.0) g/l であり、これがすべて γ -グロブリン (分子量 165 kDa) から成るとすれば、そのモル濃度は 152~188 (平均 170) $\mu\text{mol/l}$ になる。芳香族アルデヒドと γ -グロブリンとの反応で生成する発色体の見掛けの分子吸光係数が $1.0 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$ と仮定すると、実験方法で述べた測定操作に従い発色させた血清グロブリンの吸光度は、基準範囲の下限値の血清で 0.061、基準範囲の上限値の血清で 0.075 になる。8 種類の芳香族アルデヒドにより生成した発色体の見掛けの分子吸光係数は $1.21 \times 10^8 \sim 3.93 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$ であることから、この計算結果は見掛けの分子吸光係数の点からは検討した芳香族アルデヒドのすべてが、血清総グロブリンの測定に応

用可能な感度を有することを示すものと考えられた。 σ^+ は種々の置換基について求められており、*p*-NO₂ は電子吸引性が最も大きいものの一つであり、*p*-N(CH₃)₂ は電子吸引性が最も小さいものの一つである。したがって、Fig. 4 の結果からベンズアルデヒドの一置換体の中に、*p*-NITBA の反応速度を超える化合物を見いだせる可能性は少ないと考えられた。そこで、反応速度定数が先に報告した *p*-DMABA⁹⁾ よりも約 2 倍大きく、反応時間の短縮に最も効果的であると考えられた *p*-NITBA を発色試薬に選定し、以後の検討を行った。

3・1・2 光照射強度と発色反応 *p*-NITBA とタンパク質との反応では、Fig. 5 のように 600 nm 付近及び 415 nm 付近に吸収極大波長を示す青色発色体が生成した。各タンパク質の発色強度は γ -グロブリン > α -グロブリン >> アル

Fig. 4 Relationship between the rate constant of the color reaction and the substituent constant (σ^+) of the substituent of each aromatic aldehyde

1, *p*-DMABA; 2, *p*-HYDBA; 3, *p*-MTXBA; 4, *p*-MTYBA; 5, *m*-MTXBA; 6, *p*-CHLBA; 7, *m*-NITBA; 8, *p*-NITBA

Fig. 5 Absorption spectra of the colored products formed from the reaction of *p*-NITBA with various protein samples

Each curve indicates the colored products of 1, γ -globulin; 2, α -globulin; 3, albumin; 4, serum A; 5, serum B

Table 1 The characteristics of the colored product and the color reaction when eight kinds of aromatic aldehydes with different substituent constants are used as a color reagent

Aromatic aldehyde	Absorption maximum/nm	Apparent molar absorptivity/ $\text{mol}^{-1} \text{ cm}^2$	Rate constant/ min^{-1}	Substituent constant (σ^+) ¹⁰⁾
<i>p</i> -DMABA	635	3.93×10^8	4.46×10^{-2}	-1.7 (<i>p</i> -N(CH ₃) ₂)
<i>p</i> -HYDBA	520	3.35×10^8	1.34×10^{-2}	-0.92 (<i>p</i> -OH)
<i>p</i> -MTXBA	520	3.02×10^8	6.88×10^{-3}	-0.778 (<i>p</i> -OCH ₃)
<i>p</i> -MTYBA	600	1.93×10^8	9.70×10^{-3}	-0.311 (<i>p</i> -CH ₃)
<i>m</i> -MTXBA	600	1.21×10^8	2.45×10^{-2}	0.047 (<i>m</i> -OCH ₃)
<i>p</i> -CHLBA	595	1.80×10^8	4.77×10^{-2}	0.114 (<i>p</i> -Cl)
<i>m</i> -NITBA	600	2.39×10^8	1.42×10^{-1}	0.674 (<i>m</i> -NO ₂)
<i>p</i> -NITBA	605	2.15×10^8	1.57×10^{-1}	0.790 (<i>p</i> -NO ₂)

The color reaction was performed, using a 1.0 g/l γ -globulin solution.

The apparent molar absorptivity of the colored product of γ -globulin was calculated on the assumption that its molecular weight is 165 kDa.

Fig. 6 Effect of the irradiation intensity with a fluorescent lamp on the color reaction of *p*-NITBA with various protein samples

Reaction conditions: irradiation time, 20 min; concentration of hydrochloric acid in the color reagent, 8.4 mol/l. Each curve indicates the color reaction of 1, γ -globulin; 2, α -globulin; 3, albumin; 4, serum

Fig. 7 Effect of the hydrochloric acid concentration on the color reaction of *p*-NITBA with various protein samples

Reaction conditions: irradiation time, 20 min; irradiation intensity, 3000 luxes. Each curve indicates the color reaction of 1, γ -globulin; 2, α -globulin; 3, albumin; 4, serum

ブミンの順であり、アルブミンの発色強度は著しく小さかった。Fig. 6は光照射強度を0～3000ルクスまで変化させたときの、4種類のタンパク質の反応20分後における吸光度を示している。吸光度はいずれのタンパク質も光照射強度が大きいくほど高くなった。この結果から光照射強度は3000ルクスを選定した。

3・1・3 塩酸濃度と発色強度 *p*-NITBA試薬とタンパク質との反応は酸性下で進行する。Fig. 7は発色試薬中の塩酸濃度を、0～9.4 mol/lの範囲で変化させたときの発色強度を示している。この発色反応は塩酸濃度がおよそ4 mol/l以下ではほとんど進行しなかった。発色強度は塩酸濃度が高いほど大きくなったが、発色試薬中の塩酸濃度は8.4 mol/lを選定した。

3・1・4 光照射時間と発色強度 Fig. 8は3000ルクス下での発色反応の経時変化を測定した結果である。発色体の吸光度はほぼ20分後には一定値に達し、反応は完了した。この反応の光照射時間と吸光度との関係は1次反応式に従い、反応速度定数は γ -グロブリン 0.202 min^{-1} 、患者血清 0.201 min^{-1} であった。この結果から、光照射時間は20分間を選定した。

Fig. 8 Time course of the color reaction

The reaction conditions are as follows. Irradiation intensity, 3000 luxes; concentration of hydrochloric acid in the color reagent, 8.4 mol/l. Each curve indicates the color reaction of 1, γ -globulin; 2, α -globulin; 3, albumin; 4, serum

3・2 血清総グロブリン定量への応用

これまでの検討結果を踏まえ、*p*-NITBA試薬を調製し、これが血清総グロブリン濃度の測定に応用できるかどうかを3000ルクス、20分間の光照射条件下で検討した。

3・2・1 発色体の安定性 光照射後の発色体の安定性について、 γ -グロブリン、 α -グロブリン及び血清を用いて検討した。発色体の吸光度は光照射停止後30分間で2～4%の低下を示した。

Fig. 9 Proportionality of the color intensity

The reaction conditions are as follows. Irradiation intensity, 3000 luxes; irradiation time, 20 min; concentration of hydrochloric acid in the color reagent, 8.4 mol/l. Each curve indicates the color reaction of 1, γ -globulin; 2, α -globulin; 3, albumin.

3・2・2 再現性及び回収率 血清総グロブリン濃度が 24.7～40.4 g/l の 5 種類の患者血清における同時再現性 ($n=10$) は $RSD=2.3\%$ 以内であった。血清総グロブリン濃度が 25.1～36.3 g/l の 6 種類の患者血清に、 γ -グロブリンを 25.0 g/l 添加したときの回収率は平均 84.3% (範囲 78.3～94%) であった。

3・2・3 直線性 Fig. 9 はタンパク質濃度を 0～50 g/l の範囲で変化させたときの、タンパク質濃度と発色強度との関係を示している。タンパク質濃度と吸光度には直線関係が認められ、アルブミン (分子量 69 kDa) と γ -グロブリン (165 kDa と仮定した) の見掛けの分子吸光係数は、それぞれ 8.28×10^5 及び $2.15 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$ であり、前者は後者のおおよそ 1/260 であった。

3・2・4 共存物質の反応 尿素、尿酸、クレアチニン、グルコース、ビリルビン、トリプトファン、フェニルアラニン、チロシン及びアルブミンの反応について検討した。トリプトファン及びアルブミンが発色体を生成した。トリプトワンの発色体は 600 nm に吸収極大波長を示し、その見掛けの分子吸光係数は $6.43 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$ であった。また、10 g/l アルブミンは 0.14 g/l γ -グロブリンに相当する吸光度を示した。

3・2・5 試薬の安定性 p -NITBA 試薬はわずかに黄色を帯び、水を対照とした吸収極大波長は 305 nm に測定された。この吸収特性を利用し、室温及び 4℃ 保存下で 390 nm の吸光度を経日的に測定し、試薬の安定性を調べた。4℃ 保存下では 6 か月間にわたり測定した吸光度は 0.560～

Fig. 10 Correlation of the serum total globulin concentrations obtained by the present method (y) with those obtained by the method (x) combining the biuret method and the dye (bromocresol green)-binding method

Fig. 11 Correlation of the serum total globulin concentrations obtained by the present method (y) with those obtained by the method of Goldenberg and Drewes

0.549 の範囲にあり、その平均値 $\pm$ 標準偏差及び RSD は 0.557 ± 0.008 , 1.44% であった。

3・2・6 従来法との相関 ビウレット法¹¹⁾と BCG 法¹⁾の組合せ法 (BB 法)、及び Goldenberg らの方法 (GD 法)⁷⁾との相関関係を、患者血清 100 例を用いて検討した。検量物質は本法が γ -グロブリン、ビウレット法及び BCG 法がキット添付標準血清、GD 法が管理血清 (コントロール血清ワコー) とした。Fig. 10 及び 11 のように、BB 法

Table 2 Effect of the albumin/globulin (A/G) ratio in the patients' sera on the measurement value

A/G ratio	Serum total globulin			Measurement value ratio		N
	①	②	③	①/②	①/③	
$\sim \leq 0.8$	48.2	40.9	42.7	1.179	1.129	5
$0.8 < \sim \leq 1.0$	37.3	30.1	33.1	1.239	1.129	3
$1.0 < \sim \leq 1.2$	36.1	29.4	32.5	1.228	1.110	11
$1.2 < \sim \leq 1.4$	33.1	27.3	30.2	1.215	1.097	17
$1.4 < \sim \leq 1.6$	32.2	26.8	29.6	1.201	1.088	21
$1.6 < \sim \leq 1.8$	29.1	23.6	27.1	1.236	1.076	13
$1.8 < \sim$	24.1	20.5	23.2	1.178	1.040	30

The A/G ratio in the patients' sera was measured by the method combining the biuret method and the dye-binding method using Bromocresol Green.

① The present method (g/l), ② The conventional method combining the biuret method and the dye-binding method using Bromocresol Green (g/l), ③ The conventional method of Goldenberg et al. using glyoxylic acid (g/l)

及び GD 法 (x) と本法 (y) との相関関係は $r = 0.967$ 及び $r = 0.990$ であり、測定平均値は本法 30.9 g/l, BB 法 25.7 g/l 及び GD 法 28.5 g/l であった。また、回帰式の回りの標準偏差 S_x は本法-BB 法 1.88 g/l, 本法-GD 法 1.04 g/l であり、前者のほうが大きかった。本法 (y) の測定操作を簡便化した場合の BB 法及び GD 法 (x) との相関関係 (3 法とも標準物質にキット添付標準血清を用いた) は、 $r = 0.954$ ($y = 1.094x + 1.64$, $S_x = 2.05$ g/l) 及び $r = 0.978$ ($y = 1.353x - 3.05$, $S_x = 1.42$ g/l) であり、測定平均値は本法 29.7 g/l, BB 法 25.7 g/l 及び GD 法 24.2 g/l であった。

3・2・7 共存アルブミンの測定値に及ぼす影響 BB 法で求めた血清アルブミン/グロブリン比 (A/G 比) により患者血清を層別し、各階級に属する患者血清の測定平均値、及び本法と BB 法及び GD 法の測定値の比を求め、患者血清の A/G 比と測定値との関係から、本法における共存アルブミンの測定値に及ぼす影響について検討した。本法と BB 法の測定値の比は Table 2 のように血清 A/G が変化しても、おおそ一定値を示した。このことから本法においてはアルブミンの影響は少ないものと判断された。なお、BCG 法で測定した患者血清 558 例のアルブミン濃度は $M \pm 2 SD = 43 \pm 6$ g/l であり、50 g/l を超えるものはわずかであった。

4 考 察

血清総グロブリンの測定法には、比濁法、ビウレット法と BCG 法、あるいはセルロースアセテート膜電気泳動法との組合せ法、無機塩類などをグロブリンの沈殿剤に用い、アルブミンと分離後に発色させる方法、及びグリオキザル酸を用いた Goldenberg らの方法や、p-DMABA を用いた方法などの比色法がある。先に報告した p-DMABA は検討した 8 種類の芳香族アルデヒドの中では溶解性が高く、試薬調製はほかの芳香族アルデヒドに比べ容易であったが、反応速度定数は小さかった。Fig. 4 に示した反応速

度定数と σ^+ との関係、及び報告されている σ^+ の値から、p-NITBA は種々の置換基を有するベンズアルデヒドの一置換体の中では、反応速度が最も大きい物質に属すると考えられた。この物質を発色試薬に用いた場合、生成する発色体の見掛けの分子吸光係数は p-DMABA の約 1/2 であったが、反応時間は p-DMABA を用いたときに必要な 45 分間から 20 分間に短縮できた。

p-NITBA 試薬で得られた測定値は、BB 法との相関から血清総グロブリン濃度を表していると思なすことができる。しかし、2 種類の測定法の組合せ法である BB 法との相関では、回帰式の回りの標準偏差 (S_{yx}) は GD 法との相関に比べ大きかった。これは GD 法が直接測定法であるのに対し、BB 法が総タンパク質濃度からアルブミン濃度を差し引き総グロブリン濃度を求める間接測定法であるために、測定誤差の加算が起きたことによると考えられた。また、臨床応用されているビウレット法と BCG 法には、乳び、ビリルビン、血色素などの誤差要因が報告されており¹²⁾、今回の実験で用いた血清でも、これらの物質が反応に関与し、測定誤差を発生させた可能性は否定できない。一方、本法ではグロブリンに加えアルブミンもわずかに反応し、10 g/l アルブミンは 0.14 g/l γ -グロブリンに相当する吸光度を示した。しかし、患者血清アルブミン濃度は 50 g/l を超えるものがわずかであることから、アルブミンによる測定誤差は 0.7 g/l 以内に収まるものと考えられた。また、トリプトファンは血清グロブリンと極めて類似した色調の発色体を生成したが、その見掛けの分子吸光係数が γ -グロブリンの約 1/330 であること、及び血清中濃度 (基準範囲 36~62 $\mu\text{mol/l}$) が γ -グロブリンの 1/3 以下であることから、この物質による測定誤差は 0.1% 程度と考えられた。血清総グロブリン濃度の基準範囲は 25~31 g/l であり、この物質の生体内変動を識別するために許容される誤差許容限界は、Tonks¹³⁾ によれば 1.50 g/l になる。したがって、p-NITBA とアルブミン及びトリプトファンの反応による正誤差は、本法の臨床応用に際しての問題には

ならないと考えられた。

前述のように *p*-NITBA とグロブリンから生成した発色体と、*p*-NITBA とトリプトファンから生成した発色体は、極めて類似する吸収スペクトルを示したことから、この光依存性発色反応は、タンパク質分子内のトリプトファン残基と *p*-NITBA の反応に基づくものと推測される。*p*-NITBA とタンパク質との反応は光照射下のみでしか進行しない。光照射はタンパク質分子内のトリプトファン残基、及び *p*-NITBA の分子軌道間に反応を可能にする対称許容をもたらしものと推測される¹⁴⁾。すなわち、水素イオンが付加した芳香族アルデヒド陽イオンの最低空軌道 (LUMO) と、光照射により最高被占軌道 (HOMO) から励起した電子で満たされたトリプトファン残基の LUMO との、分子軌道間の重なりにより反応が起こるものと考えられる。

本法及び Goldenberg らの方法は前者が光照射、後者が 100℃ の加熱を必要とする。光照射は加熱に比べ制御しやすく、この点が本法の利点と考えられ、本法の測定精度はいかに均一な光照射を行うかに依存している。実験では、測定操作を簡便化した測定による結果も示した。この測定では、グロブリン組成及び濃度が一定したものが得にくい管理血清を検量物質に使用することになるが、 γ -グロブリン溶液を検量物質に用いた場合、標準試験溶液と血清試験溶液の最終容積を一致させるために必要になる、血清への水の添加が省略でき、吸光度が約 25% 高められることに加え、発色試薬中の塩酸濃度を低くできる利点がある。試薬組成に関しては、Goldenberg らの方法ではグリオキサール酸など 4 種類の物質が必要であるが、本法では塩酸及び *p*-NITBA の 2 種類のみであり、その調製は簡単である。

この試薬は分子吸光係数の大きい発色体を生成するため、本法は血清 10 μ l の微量検体により RSD = 2% 前後の精密度で測定を行うことができる。以上に述べた点と調製後の試薬が少なくとも 6 か月間は安定であることから、本法は血清総グロブリン定量法として応用できると考えられる。

(2001 年 6 月, 第 62 回分)
析化学討論会で一部発表

文 献

- 1) B. T. Doumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971).
- 2) Y. Muramoto, M. Matsushita, T. Irino: *Clin. Chim. Acta*, **289**, 69 (1999).
- 3) H. B. Salt: *J. Lab. Clin. Med.*, **35**, 976 (1950).
- 4) J. C. Aull, W. M. McCord, S. C. Charlston: *J. Lab. Clin. Med.*, **46**, 476 (1955).
- 5) A. Saifer, S. Gerstenfeld, F. Vecsler: *Clin. Chem.*, **7**, 626 (1961).
- 6) J. F. Goodwin, S. Y. Choi: *Clin. Chem.*, **16**, 24 (1970).
- 7) H. Goldenberg, P. A. Drewes: *Clin. Chem.*, **17**, 358 (1971).
- 8) Y. Suzuki: *J. Anal. Bio-Sci.*, **22**, 439 (1999).
- 9) Y. Suzuki: *Anal. Sci.*, **16**, 145 (2000).
- 10) 井本 稔, 仲矢忠雄: “有機反応論 (上)”, p. 408 (1985), (東京化学同人).
- 11) A. G. Gornal, C. J. Bardawill, M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).
- 12) 北村元仕, 仁科甫啓編著: “実践臨床化学 (増補版)”, p. 191 (1994), (医歯薬出版).
- 13) D. B. Tonks: *Clin. Chem.*, **9**, 217 (1963).
- 14) R. B. Woodward, R. Hoffmann: “軌道対称性の保存—ウッドワード・ホフマン則”, 伊東 徹, 遠藤勝也訳, p. 66 (1971), (廣川書店).

要 旨

芳香族アルデヒドは光照射下で血清グロブリンと反応し、発色体を生成する。この反応は *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドを用いた血清総グロブリン濃度の測定法として応用されているが、反応時間は 45 分と長い。そこで、反応時間を短縮したより実用的な測定法を設定するため、8 種類の芳香族アルデヒドと血清グロブリンとの反応について検討し、このタンパク質の測定に適する発色試薬の選定を行った。反応速度、生成する発色体の吸収極大波長及び見掛けの分子吸光係数はベンズアルデヒドに結合した置換基 (*p*-NO₂, *m*-NO₂, *p*-OCH₃, *m*-OCH₃, *p*-CH₃, *p*-Cl, *p*-N(CH₃)₂, *p*-OH) の求電子的置換基定数と関係があった。反応速度は置換基に *m*-NO₂ や *p*-NO₂ を有する芳香族アルデヒドで最も大きく、*p*-ニトロベンズアルデヒド (*p*-NITBA) と血清グロブリンとの反応は 3000 ルクスの光照射条件下では、約 20 分間で完了した。*p*-NITBA 試薬と γ -グロブリンの反応で生成した発色体は 600 nm 付近に吸収極大波長を示し、見掛けの分子吸光係数は $2.15 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^2$ であった。*p*-NITBA 試薬で得られた患者血清の測定値 ($n = 100$) はビウレット法とブロムクレゾールグリーン法の組合せ法及び Goldenberg らの方法で得られた血清総グロブリン濃度と $r = 0.967$ 及び $r = 0.990$ の相関を示し、この試薬が血清総グロブリン濃度の測定に応用できることが分かった。本法は 10 μ l の微量血清で実施でき、同時再現性 ($n = 10$) は RSD = 2.3% 以内であった。