報 文

テトラブロモフェノールブルーを用いる尿タンパク質の 吸光光度定量及び目視定量

橋本 雅和¹, 手嶋 紀雄¹, 酒井 忠雄^{®1}, 加藤 周二²

Colorimetric and Visual Methods for Urinary Protein Determination with Tetrabromophenol Blue

Masakazu HASHIMOTO¹, Norio TESHIMA¹, Tadao SAKAI¹ and Shuji KATO²

¹ Department of Applied Chemistry, Aichi Institute of Technology, 1247, Yachigusa, Yakusa-cho, Toyota-shi, Aichi 470-0392

² Murakami Memorial hospital, Asahi University, 3-23, Hashimoto-cho, Gifu-shi, Gifu 500-8523

(Received 14 April 2005, Accepted 29 June 2005)

Tetrabromophenol Blue (HTBPB⁻) reacted with bovine serum albumin (BSA) to form a blue ion associate at pH 3.2 in the presence of Triton X-100 (TX-100). BSA could be determined in the range of 0~20 ppm by measuring the absorbance at 625 nm. The LOD (3 σ) was 0.16 ppm BSA. The relative standard deviations ($n = 4$) were 0.91% and 0.11% for 5 ppm and 10 ppm BSA, respectively. Moreover, a visual method based on the color changes was developed after the collection of TBPB-binding BSA on the membrane filter (MF) in the absence of TX-100. In this visual method, the standard color calibration chart on a series of MF could be made in the range of 0~9 ppm BSA for each 1 ppm. The proposed colorimetric and visual methods using TBPB could be applied to the determination of urinary protein from kidney disease patients.

Keywords : tetrabromophenol blue ; bovine serum albumin ; Triton X-100 ; colorimetry ; visual method.

1 緒 言

尿は、我々の健康状態の把握あるいは病気の診断や病態の変化をチェックできる豊富な情報を含んでいる。1991年に尿タンパク質の検査薬が市販されるようになり、非侵襲で得られる尿は、臨床検査の分野において最も簡便な病態把握に適した試料となっている¹⁾。

健康者の尿は尿タンパク質定性試験ではほとんど陰性であるが、1日に50~150 mg程度のタンパク質が排泄されている²⁾。尿中の主要タンパク質であるアルブミンの検出は、腎炎や泌尿器系疾患及び糖尿病の早期診断のために重

要な検査項目であり³⁾、血管障害の初期兆候とも関連することが指摘されている。

尿タンパク質の定量法の一つ、Kingsbury Clark 法⁴⁾が約30年前までは広く用いられてきたが、最近はこの方法の採用が減少している。その理由として、(1) タンパク種による反応性の大きな相違により濁度に差が見られること、(2) 酸可溶性タンパク質を測定できない、(3) 自動分析器に対応できない、(4) 各研究機関により測定値が大きく異なるなどの問題が指摘されている⁵⁾。これに対し、色素結合法⁶⁾⁷⁾はタンパク種による反応性の差がなく、簡便性やコスト面で優れていることから、繁用性の高い方法として推奨されている。藤田ら⁸⁾は、ピロカテコールバイオレット (PV) -スズ(IV) 錯体を用い、非イオン界面活性剤 (アラビアゴムと Triton X-405 の併用) を共存させ、タンパク質 - PV -スズ(IV) 会合体の水溶性化、安定化、

¹ 愛知工業大学工学部応用化学科: 470-0392 愛知県豊田市八草町八千草 1247

² 朝日大学付属村上記念病院: 500-8523 岐阜県岐阜市橋本町3-23

定量感度の向上を図った。しかし、この方法は試薬空試験液と錯体の極大吸収波長の差が小さく、大きな試薬空試験値を与える。また、プロモフェノールブルー (BPB)、フェノールレッド (PR)、クレゾールレッド (CR) 及びチモールブルー (TB) などの二塩基酸染料が、血清アルブミンと結合し著しい吸収スペクトル変化を伴う色調変化を示すことを利用し、アルブミン定量に応用する試みがなされている。例えば、鈴木⁹⁾は pK_{a2} が 7.0 以上の種々の pH 指示薬を用いて、中性～塩基性領域においてタンパク質濃度の増加に伴う吸光度の低下を測定する定量法を確立した。しかし、その試薬空試験値は大きい。

テトラプロモフェノールブルー (TBPB) を含浸させた尿タンパク質検査試験紙が、簡便で安価な臨床検査スクリーニング法として広く使われている。医療現場でその場分析ができる試験紙検出法は、機器を用いずに簡単な操作で迅速に測定できるが、0～約 10000 ppm のタンパク質濃度を 6 段階 (－, ±, +, ++ など) に分ける半定量法であり、およそその濃度範囲を知るものであり、精度は不十分である¹⁰⁾。

本研究では、HTBPB[－]とウシ血清アルブミン (BSA) のイオン会合反応を Triton X-100 (TX-100) 共存下で生成する方法を検討したところ、試薬空試験値が著しく低く、BSA の検量線の直線性が向上した。一方、HTBPB[－]とメンブランフィルター (MF) を用いる目視法では、TX-100 非共存下で黄～青緑色の目視色別が容易な標準色列を作成することができ、吸光光度定量法及び MF 目視法による尿タンパク質の定量に応用できることが分かったので報告する。

2 実 験

2.1 試薬及び装置

BSA 水溶液: 尿タンパク質代表物質としてウシ血清アルブミン (BSA, 98%, 和光純薬製) を用い、0.1 g を蒸留水に溶解して 100 ml とし、1000 ppm 水溶液を調製した。これを適宜水で希釈して用いた。

TBPB 溶液: 市販のテトラプロモフェノールブルー (TBPB, 片山化学製) の 0.0493 g をエタノールに溶解して 100 ml とし、 5.0×10^{-4} M 溶液を調製した。これを適宜水で希釈して用いた。

非イオン界面活性剤溶液: Triton X-100 (TX-100, シグマ製) の 1 g を熱水で溶解し、放冷して 100 ml とし、1% 水溶液を調製した。

緩衝液: 吸光光度定量法では、0.5 M の酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 3.2) を調製した。また、MF 目視法では、0.5 M のモノクロロ酢酸ナトリウム-塩酸緩衝液 (pH 3.2) を調製した。

MF: メンブランフィルター (MF, MIXED CELLU-

LOSE ESTER, 孔径 0.2 μ m, 直径 25 mm, Advantec 製) を用いた。

フィルターホルダー: Advantec 製プラスチックホルダーを用いた。

汙過用シリンジ: プラスチックシリンジ (容量 10 ml) を用いた。

分光光度計: 日本分光製 V-550 を使用した。

遠心機: コクサン製 H-103N を使用した。

尿検査試験紙: Bayer Medical 尿検査試験紙を用いた。

2.2 標準操作

2.2.1 吸光光度定量法 25 ml のメスフラスコに 5.0×10^{-5} M TBPB 溶液を 5 ml, 1% TX-100 溶液を 1 ml, 0.5 M 緩衝液 (pH 3.2) を 5 ml, 100 ppm に調製した BSA を 0.13～5 ml 加え、水で定容した。BSA を添加してから 1 分後の $\lambda_{\max}$ (625 nm) における吸光度を測定した。

2.2.2 MF 目視法 20 ml 試験管に 2.5×10^{-5} M TBPB 溶液を 2 ml, 0.5 M 緩衝液 (pH 3.2) を 2 ml, 20 ppm に調製した BSA を 0.5～4.5 ml 加え、全量が 10 ml となるように水を加えた後、汉過用シリンジへ移した。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、汉過し、この直後の BSA 濃度に基づいた MF 標準色列を作成した。

2.2.3 尿試料 尿試料は 10 分間遠心分離し、適宜希釈後、2.2.1 あるいは 2.2.2 の操作に従って分析した。

3 結果と考察

3.1 発色機構

分子型の H_2TBPB の構造を Fig. 1 に示す。この染料の pK_{a1} の文献値はないが、類似構造をもつプロモフェノールブルーの pK_{a1} が -0.95 以下¹¹⁾であることから、同程度かあるいは更に低い pK_{a1} 値を持つことが予想される。また pK_{a2} は 3.8¹²⁾であり、 H_2TBPB は水溶液中で

の化学種を与える。pH 3.2 において TX-100 の臨界ミセル濃度以上 (0.015%)¹³⁾では、HTBPB[－]がミセル内に溶解する。BSA の等電点 pI が 4.7¹⁴⁾であることから、pH 3.2 ではカチオン性の部位が多く存在し、HTBPB[－]が会合してメタクロマジーを発現するものと考えられる。以下に反応式を示す。

Fig. 1 Structure of H₂TBPB

Fig. 2 Continuous variation plots for ion-associate of BSA with TBPB²⁻

Triton X-100 (%): (1) 0, (2) 0.016, (3) 0.04, (4) 0.1; 0.5~9 ml of 5.0×10^{-5} M BSA and 9.5~1 ml of 5.0×10^{-5} M; TBPB were put into a 25 ml volumetric flask. pH 3.2; λ 625 nm

m はミセルを意味し, x は HTBPB⁻ 1 mol を取り込む TX-100 のモル数, y は BSA 1 mol と反応する HTBPB⁻ のモル数とする。

連続変化法により, TX-100 の濃度変化に伴う BSA と HTBPB⁻ の組成の変化について検討した結果を Fig. 2 に示す。BSA と HTBPB⁻ の結合比を 1 : y とすれば, y は TX-100 濃度により変化することが分かった。3・2・1 で述べる TX-100 の最適濃度である 0.04% では, y が 2.7 となり, TX-100 が共存しないと y が 4.6 となった。

細井ら¹⁵⁾は, TX-100 を使用すると一塩基酸染料である テトラプロモフェノールフタレインエチルエステル (TBPE) の水への溶解性が增大することを報告している。また, ミセルに溶解することにより TBPE の pK_{a2} が大きくなることも報告しており, TX-100 を添加すると, イオン会合反応に対する pH の影響が小さい。これより, TX-

Fig. 3 Absorption spectra of BSA-TBPB associates
[BSA] (ppm): (1) 0, (2) 5, (3) 10, (4) 15, (5) 20;
Other conditions: [TBPB], 1.0×10^{-5} M; Triton X-100, 0.04%; pH 3.2

100 濃度による y の変化は, TBPB の pK_{a2} の相違が大きく関係していると考えられる。TX-100 濃度が 0.04% のときと, 共存しないときで TBPB の pK_{a2} を求めたところ, それぞれ 4.5 と 3.8 であった。すなわち, TX-100 が共存すると, 式(3)の左辺の $(\text{HTBPB}^- \cdot x\text{TX-100})_m$ 中での HTBPB⁻ の存在割合が増加すると考える。よって, TX-100 が共存するほうが BSA 1 mol に対する HTBPB⁻ の結合比は小さくなる。

MF 目視法において TX-100 濃度を 0~0.005% まで変化させたところ, 共存下の色調変化の幅は黄緑~青緑と小さくなり, 目視色別での定量が困難となったため, TX-100 は使用しなかった。

3・2 定量条件の最適化

3・2・1 吸光光度定量法 TX-100 濃度を 0.0063~0.100% の範囲で変化させ, その濃度の影響を調べた。0.025% 以下では吸収スペクトルに等吸収点が見られなかったが, 0.025% 以上では Fig. 3 に示すように等吸収点が見られ, イオン会合反応が化学量論的に起こっていると思われる。また, TX-100 濃度の増加により試薬空試験値は著しく減少した (Fig. 4)。BSA 濃度と吸光度差の関係をみると, TX-100 が存在しないときは, 5 ppm BSA に対する吸光度よりも試薬空試験値のほうが高くなっており, 定量に適さないことが分かる。しかし, TX-100 濃度が増加していくと, 相関関係が改善された。これより, TX-100 濃度を 0.04% とした。

HTBPB⁻濃度を $0.5 \sim 2.5 \times 10^{-5}$ M の範囲で変化させたところ, その増加に伴い試薬空試験値及び BSA を含む溶液の吸光度がいずれも増加した。本研究では試薬空試験値の低い 1.0×10^{-5} M を選択した。

pH の影響を Fig. 5 に示す。pH を 2.8~4.1 まで変化さ

Fig. 4 Effects of Triton X-100 concentration
[BSA] (ppm): (1) 0, (2) 5, (3) 10, (4) 15, (5) 20;
Other conditions as in Fig. 3; λ 625 nm

Fig. 5 Effects of pH
[BSA] (ppm): (1) 0, (2) 10, (3) 20; Other conditions
as in Fig. 3; λ 625 nm

せたところ、pHが高くなるにつれ吸光度の上昇が見られた。本研究では試薬空試験値の低いpH 3.2を選択した。

3・2・2 MF 目視法 HTBPB⁻濃度を $0.5 \sim 2.5 \times 10^{-5}$ M, pHを2.8～4.1の範囲で変化させた。HTBPB⁻濃度及びpHが高くなるにつれ試薬空試験色の青色が増し、BSAを添加したときの色調との色別が困難となった。MF標準色列を作成する際、BSA濃度が1～9 ppmの範囲内で膜捕集後の目視色別が容易な条件を求めたところ、HTBPB⁻濃度は 0.5×10^{-5} M, 測定pHは3.2が最適となった。

3・3 検量線

3・3・1 吸光度定量法 3・2・1で決定した最適条件下でBSAの検量線を作成したところ、0～20 ppmの範囲で相関係数が0.999の良好な直線が得られた。BSA濃度5 ppm及び10 ppmの4回の繰り返し測定に基づく相対標準偏差はそれぞれ0.91%及び0.11%と再現性も良好であった。また、3 σ と定義した検出限界は0.16 ppmであった。

3・3・2 MF 目視法 3・2・2で決定した最適条件下でBSAの標準色列を作成した。吸光度法ではHTBPB⁻の可溶化とpK_{a2}のシフトのため、TX-100の添加を行ったが、ここでは静電的色素結合タンパク質を形成させる目的でTX-100を添加しないことにした。吉本ら³⁾は、色素結合タンパク質を捕集したMFを乾燥後に1 Mアンモニア水溶液上にかざし、黄色から青色への変色を完結させたものを標準色列としているが {Fig. 6 (a)}、本研究では、判別のしやすさ、測定時間を考慮し、汙過直後のMFを用いて標準色列を作成した {Fig. 6 (b)}。この条件では、0～9 ppmのBSA濃度範囲では、黄色から青緑色へと変化した。BSA低濃度域ではHTBPB⁻・BSA会合体が生成され、BSA濃度が増加していくとTBPB²⁻・BSA会合体の生

成が進行し、青色会合体の生成が顕著になると考える。一方、Fig. 6 (b)に示すが、10 ppm以上では白味を帯びた色になり、濃度の増加に伴う色調の変化は確認できなくなった。この理由は明らかではない。

3・4 共存物質の影響

吸光度定量法及びMF目視法における共存物質の影響を調べた。吸光度定量法では20 ppm, MF目視法では5 ppmのBSAを用いた。吸光度定量法 (カッコ内はMF目視法を示す) では、L-グルタミンを73 ppm (18 ppm), L-グリシンを100 ppm (25 ppm), L-アラニン24 ppm (6.0 ppm), L-トリプトファン10 ppm (2.6 ppm), L-リシン97 ppm (24 ppm), L-ヒスチジン155 ppm (39 ppm), L-セリン35 ppm (8.8 ppm), クレアチニン500 ppm (125 ppm), 尿素10000 ppm (2500 ppm), NaCl 5000 ppm (1250 ppm), KCl 830 ppm (210 ppm) 含んでも定量に際して妨害を与えなかった。

3・5 尿への応用

腎疾患を発症している患者の尿試料について吸光度定量法, MF目視法, 市販試験紙法で測定し, 3法の比較を行った。吸光度定量法では、尿試料0.4 mlを25 mlのメスフラスコに加え、2・2・1の操作に従って測定した。MF目視法ではFig. 6 (c)に示すように、A～Eの検体は50倍希釈、F及びGに関しては青白い色調を示したため、Fは100倍希釈、Gは200倍希釈して定量を行った。Table 1に示すように、3法による結果はいずれもよい一致を示した。MF目視法は、市販試験紙法よりも細かな濃度幅で濃度決定することができ、特に±から+, +から++, ++から+++の境界領域の判定には有用である。

Fig. 6 Color changes with standard BSA and urinary protein

(a) Standard color calibration chart. These MFs were exposed to NH_3 gas after drying. (b) Standard color calibration chart proposed in this study. Coloration after collection onto MF. (c) Coloration with urinary protein from kidney disease patients. These colors were compared with the color chart (b). Other conditions: $[\text{TBPB}]$, $0.5 \times 10^{-5} \text{ M}$; pH 3.2

Table 1 Comparison of commercial test paper, colorimetric and visual methods

Sample	Commercial test paper	Colorimetric method/ppm	Visible method/ppm
A	+	266 ± 14	250
B	+	276 ± 10	250
C	+ ~ + +	379 ± 12	350
D	+ ~ + +	371 ± 6	350
E	+ ~ + +	461 ± 24	425
F	+ ~ + +	585 ± 13	550
G	+ + ~ + + +	1066 ± 14	900

Samples determined were diluted 62.5 times. Test paper: —, <150 ppm; ±, 150 ~ 300 ppm; +, 300 ppm; + +, 1000 ppm; + + +, 3000 ppm

4 結 言

本研究では, TX-100 共存下の HTBPB⁻ とタンパク質とのイオン会合反応に基づく吸光光度定量法, また, MF による目視法の有用性を検討した. 吸光光度定量法は試薬空

試験値が小さく, BSA の高感度な定量を可能にし, MF 目視法では分解能が 25 ppm ごとの BSA の定量を可能とした. 両法とも尿中の共存物質による影響は顕著に見られなかったため, 腎機能障害を持つ患者の尿タンパク質の定量へ応用した. その結果, 市販試験紙法の結果とよく一致

し、精度的にも優れた方法として有用であることが分かった。

本研究の一部は日本学術振興会科学研究費補助金 (No. 17550087) によるものである。また、金子恵美子先生 (東北大院工) には貴重なアドバイスをいただいた。ここに記して感謝する。

文 献

- 1) 藤田芳一: ぶんせき (*Bunseki*), **1997**, 486.
- 2) <http://www.hamt.or.jp/KENSA/VISITOR/TEST/U&S/top>.
- 3) 吉本敬太郎, 金子恵美子, 四ッ柳隆夫: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 363 (2000).
- 4) 金井 泉, 金井正光: “臨床検査法提要”, 第 31 版, p. 154 (1998), (金原出版).
- 5) Y. Fujita: *ICMR Annals.*, **20**, 81 (2000).
- 6) M. M. Bradford: *Anal. Biochem.*, **72**, 248 (1976).
- 7) Y. Fujita, I. Mori, S. Kitano: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **32**, E379 (1983).
- 8) 藤田芳一, 森 逸男, 松尾敬子: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **44**, 733 (1995).
- 9) 鈴木優治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 691 (2004).
- 10) 下瀬雅士: 医学検査, **46**, 1762 (1997).
- 11) V. D. Gupta, J. B. Reed, Jr.: *J. Pharm. Sci.*, **59**, 1683 (1970).
- 12) 酒井忠雄: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **49**, 745 (2000).
- 13) 北原文雄, 玉井康勝, 早野茂夫, 原 一郎: “界面活性剤”, p. 486 (1996), (講談社).
- 14) 日本化学会編: “化学便覧”, 改訂 4 版, p. 1438 (1993), (丸善).
- 15) 細井康宏, 本水昌二: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **38**, 205 (1989).

要 旨

ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液にテトラプロモフェノールブルー (HTBPB⁻) を添加すると, pH 3.2 において青色のイオン会合体を形成するが, Triton X-100 (TX-100) を併用すると試薬空試験値が著しく低下し, かつ pH のずれによる影響が少なくなる。そこで, TX-100 共存下で HTBPB⁻ を用い, 尿タンパク質の吸光光度定量法の最適条件を検討した。極大吸収波長は 625 nm に存在し, BSA が 0~20 ppm の濃度範囲で良好な直線関係を得た。検出限界は, 試薬空試験値の 3 σ とした場合 0.16 ppm で, BSA 濃度 5 ppm 及び 10 ppm をそれぞれ 4 回繰り返し測定した際の相対標準偏差は 0.91% 及び 0.11% であった。また, TX-100 非共存下における TBPB 結合 BSA をメンブランフィルター (MF) に捕集後, その色調変化に基づく目視定量法の検討を行った。MF を用いる目視法において, BSA が 0~9 ppm の濃度範囲で 1 ppm ごとの標準色列を作成することができた。HTBPB⁻ を用いる吸光光度定量法及び MF 目視法を腎機能障害患者の尿タンパク質の定量に応用した。その結果, 両法とも市販試験紙法による結果とよい一致を示した。