濾紙 BPB 染色法による疲労尿蛋白測定法に関する研究

Studies on the Quantitative Method of Protein in Fatigued Urine by means of Staining Urine Spot on the Filter Paper with Brom-phenol-blue

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任 大田原一祥教授)

緒 方 正 名

Masana Ogata

Department of Public Health, School of Medicine, Okayama University

(Director: Prof. K. Ohtahara)

緒 言

尿による疲労判定法として疲労尿中に現われる蛋白質を定量する方法は古くからおこなわれている。緒方教授、大田原教授、岡村氏¹⁾らは疲労尿を稀釈し抗人血清家兎血清と重層することにより尿中に排泄される蛋白質を定量し、疲労度を測定する方法を発表した。また石川氏²⁾らは Sulfosalicyl 酸液や Spiegler 氏試薬による疲労尿蛋白の定量法を発表している。

一方、濾紙電気泳動法において Kunkel, Tiselius³⁾らは泳動後の Albumin, α -, β -, γ -Globulin 分屑を定量する目的で泳動後の濾紙を BPB 酢酸、昇汞溶液で染色したのち、2%酢酸で非結合色素を除去する方法を考案した。

外塚⁴⁾は各種疾患による蛋白尿の定量に濾紙法を応用している。

著者は濾紙 BPB 染色法を用いて疲労尿蛋白質の定量に成功したのでここに報告する。

実験方法

1) 疲労尿の採取

サッカー試合前後尿を採取し実験に使用した。

2) 濾紙染色法

東洋濾紙 No. 50に上記疲労尿の0.02mlを滴下し、自然乾燥する。急ぐ場合は電熱器上で乾燥する。ついで BPB 染色液 (BPB 0.05 g, 昇汞 1 g, 酢酸 2 ml を蒸溜水に溶解し 1 l としたもの) 中で 60 分間染色後、2% 酢酸溶液で数回洗滌して蛋白に結合していない色素を除

去し自然乾燥する。脱色後の spot の薄い場合は、アンモニアガス上に濾紙を置くと濾紙がアルカリ性となるために BPB が青変し、spot がさらに明確に現われる。

3) 濾紙尿蛋白定量法

a) 肉眼による測定

日立製蛋白計または Folin の Tyrosine 法⁵⁾であらかじめ人血清の蛋白濃度を測定し、稀釈して 4%液を作成して原液とする。ついで原液を倍数稀釈してその各液 0.02 ml を濾紙上に滴下し前述の方法で染色固定したものを標準色度系列 (第 3 図 A) とする。尿の spot は標準系列と比較してこれと等しい spot の標準系列の濃度を尿蛋白濃度とする。

b) 濾紙光度計による測定

標準系列の spot を有する濾紙を流動パラフィンで半透明としたのちに濾紙光電光度計で一定の濾紙幅ごとに吸光度を求める。第 1 図 A はこのようにして求めた吸光度曲線である。この吸光度曲線の面積を面積計を用いて定量すると峯の面積が蛋白濃度に比例する。すなわち第 2 図に示されるごとく 4%以下の範囲では蛋白濃度と吸光度面積との関係は直線で表示される。被検尿は吸光度曲線の面積値を第 2 図の検量直線に挿入して尿蛋白濃度を算出する。

4) Kingsbury-Clark 法⁶⁾

試験管に尿 1 ml を入れ、これに 3% Sulfosalicyl 酸 3 ml を加える。標準系列として既知濃度血清系列 1 ml に 3% Sulfosalicyl 酸 3 ml を加えた液をつくり、両者の混濁を肉眼で比較し尿蛋白濃度を決定する。

第1図 濾紙法による疲労尿蛋白濃度測定法

5) Exton 法⁷⁾

尿 1.0ml に水 4.0ml, 2%アラビヤゴム 1.0ml, Exton 試薬 5.0ml を添加し10分後分光光度計 (波長 660 μ) で測定する。検量曲線は上述の原尿 1.0ml の代りに 既知血清稀釈系列 1.0ml を加えた系を用いて吸光度を測定して作製する。

6) 尿微量蛋白測定法

緒方-大田原氏法¹⁾ に準じておこなった。

実験結果

第3図Aは標準色度系列, Bは各ポジションにおけるサッカー選手試合前後尿の染色像であり, 一見して試合

第2図 人血清標準濃度曲線 (濾紙法)

BPB 染色, 0.02cc, 東洋濾紙 No. 50

第1表 各種蛋白測定法による運動

疲労尿測定値 (サッカー)

位置		濾紙法		Exton 法	Kingsbury-Clark 法	緒方法 抗原価
		肉眼 (%)	面積測定	(%)	(%)	
LF	前	0.125	0.062	0.01	0.016	66
	後	2.0	1.53	2.1	1.0	128
CF	前	0.0625	0.025	0.062	0.03	16
	後	0.125	0.145	0.50	0.06	32
RF	前	0.0625	0.025	0.50	0.06	16
	後	0.5	0.46	0.80	0.50	32
LH	前	0.0625	0.10	0.30	0.008	4
	後	0.75	0.74	0.70	0.50	64
LI	前	0.03125	0.005	0	0.06	32
	後	1.0	0.88	1.04	1.0	64
HC	前	0.0625	0.031	0	0.12	4
	後	0.25	0.25	0.34	0.25	32
RH	前	0.03125	0.005	0	0.031	8
	後	3.0	1.96	3.20	2.0	128
RI	前	0.0625	0.16	—	0.03	16
	後	1.0	1.23	1.50	1.0	256
RW	前	0.125	0.75	0.50	0.03	16
	後	1.0	0.80	0.42	0.50	256
LW	前	0.03125	0.02	0.70	0.016	4
	後	0.125	0.17	1.14	0.06	32

第3図 (A) 血清標準系列

(B) 運動疲労尿 (サッカー)

後尿は前尿に比して spot の増大と染色性の増加のあることが認められる。疲労尿染色像を標準色度系列と比較して測定した価は第1表第2行「濾紙法肉眼 (%) の項」に記載されている。第1図AおよびBは標準色度系列の spot と疲労尿の spot を濾紙光度計を用いて測定した吸光度曲線を示す。また面積測定法による測定値は第1表第3行「濾紙法面積測定の項」に記載されている。また第4行に同時におこなった Exton 法による尿蛋白量を, さらに第5行には Kingsbury-Clark 法による尿蛋白量を, 第6行には尿微量蛋白測定法¹⁾ による尿蛋白量を示している。

第4図の白点はサッカー試合後尿の尿蛋白の定量において横軸に Exton 法、縦軸に面積測定による測定値を記入した蛋白定量値の比較図であり、両法で測定した値はよい一致を示す。第4図の黒点は横軸に Kingsbury-Clark 法、縦軸に肉眼比色法を用いた場合の蛋白定量値を比較したものであつて、両法の測定値はほとんど一致するが、肉眼比色法による BPB 染色法の方が Kingsbury-Clark 法より多少高く現われる傾向を有する。濾紙法の測定値と尿微量蛋白測定法の測定値とはまたほぼ比例法の関係を示している。

第4図 Exton 法と濾紙法光度計定量値および Kingsbury-Clark 法と濾紙法肉眼定量値の比較

考 按

1) BPB 法の感度

本法の感度は人血清の約 1 : 1,000 (0.07%) まで検出できる。アンモニアガスを通じて増感処理をおこなえば約 1 : 10,000 (0.007 %) まで検出できる。

この方法は抗人血清家兎血清を用いた緒方-大田原氏尿微量蛋白測定法⁹⁾の感度、人血清稀釈 1 : 100,000 には及ばないが、アンモニアガス処理の場合は Sulfosalicyl 酸法の感度 1 : 5,000 とほとんど同等またはそれ以上であり、正常尿(疲労前尿)のほとんどがアンモニア増感処理をおこなえば定量可能である。

2) BPB 法の正確度

a. 肉眼による判定

被検尿の蛋白濃度が低い場合には光電光度計を使用した場合より判定しやすい。またその測定結果は光電光度計による測定成績と大体一致する。倍数稀釈標準色度系列との比較法では尿蛋白の濃度比が $1/2$ 以上となつた場合の測定はきわめて容易である。

b. 濾紙光電光度計による判定

蛋白量 4 %より 0.0625 %の範囲では蛋白濃度と吸光度曲線の囲む面積とはほぼ直線関係を示し、疲労前後尿の濃度の範囲ではほとんどの蛋白量の範囲に含まれるが、尿蛋白質がさらにこれを超える場合には稀釈した試料を濾紙上に滴下し測定した濃度値に稀釈度を乗じて蛋白量を算出すればよい。上述の濃度の範囲では濾紙光電光度計を用いた方が肉眼比色法より正確な測定結果を得ることができる。

3) BPB 法の本体

Anderson 氏法⁹⁾を用い精製したムコ蛋白 A_1 , A_2 および本田のタルク吸着法^{9),10)}による Donaggio 陽性物質 1 mg/ml 液を 0.02 ml 濾紙上に滴下し BPB 染色液で染色した場合にはこれらのムコ蛋白は染色されるが昇求に溶解するために濾紙上に固定されない。それ故に本反応陽性物質はほとんど尿ムコ蛋白を含まない尿蛋白質に限局されるようである。Sulfosalicyl 酸法では尿蛋白のほかアルブミンがわずかに反応しアルブミンは反応後加熱によつて消失するといわれているが、その量はきわめて少量であり、大部は尿蛋白質によるといわれている。尿微量蛋白測定法においても抗人血清家兎血清と沈降反応を生ずる物質はほとんど大部は血清蛋白質で一部血清ムコ蛋白質および尿ムコ蛋白(例えば Tamm 氏ムコ蛋白)などを含むようである。それ故 BPB 法と Sulfosalicyl 酸法(Kingsbury-Clark 法および Exton 法)および尿微量蛋白測定法の測定値が比例する事実はこの点からも明らかな事実である。また著者らの研究では Donaggio 反応値と Sulfosalicyl 酸法による定量値および尿微量蛋白測定値は有意な相関を示すので、BPB 定量値もまた Donaggio 反応値と併行して変動するのではないかと推定される。なお Donaggio 反応陽性物質と血清蛋白質との関係については著者らの研究¹²⁻¹⁵⁾がある。

4) BPB 法の利点

Kingsbury-Clark 法では測定ごとに血清の標準系列をつくらねばならぬ不便があるが、本法における標準色度系列は保存が可能であるから尿の spot のみで定量することが可能である。また測定には濾紙を用いるために試験管を必要としない。試料の運搬に便利であり、かつ大

量の試料を一時に染色し測定できるために産業疲労、スポーツ疲労などのように多数の試料の測定を一時におこなうに適している方法と思われる。

結 論

1) 著者はサッカー試合前後の尿蛋白測定法として濾紙 BPB 染色法を用い、疲労尿蛋白測定法として本法が有効であることを認めた。

2) BPB 染色法の反応物質は尿中に排泄される血清蛋白質であり、尿ムコ蛋白中タルク吸着法で分離した Donaggio 反応陽性物質および Anderson 法により分離した尿ムコ蛋白は染色液中に溶出されるため固定されず本染色反応は陰性を示した。

3) 濾紙法による尿蛋白の定量成績は抗人血清家兎血清による尿微量蛋白測定法、Sulfosalicyl 酸法 (Exton 法, Kingsbury-Clark 法) の定量結果とほとんど等しい成績を得ることができた。

4) 本法は㊸試料がきわめて少量である点、㊹標準色度系列の保存が可能である点、㊺多量の試料を一時に処理できる点、㊻試料の運搬および保存が可能である点などにおいて尿蛋白測定法による疲労判定法として優れた方法であると思われる。

終りに臨み本論文の御校閲を賜わった恩師大田原一祥教授に謹んで感謝の意を表す。

本論文の要旨は昭和 32 年 7 月第 27 回日本衛生学会総会¹¹⁾において発表した。

文 献

- 1) 緒方益雄・大田原一祥・岡村岩男：疲労判定法，p. 61，学術研究会議疲労研究会編。
- 2) 石川知福：疲労判定法，p. 72，学術研究会議疲労研究会編。
- 3) Kunkel, H. G. & Tiselius, A.: J. Gen. Physiol., 35, 89, 1951.
- 4) 外塚岩太郎・神村瑞夫：日本医事新報，No. 627～656, 1929.
- 5) Kingsbury-Clark: J. Lab. Clin. Med., 11, 981, 1926.
- 6) Exton: J. Lab. Clin. Med., 10, 722, 1925.
- 7) Anderson, A. J. & MacLagan, N. F.: Biochem. J., 59 (4): 638, 1955.
- 8) 本田良行：十全医学会雑誌，56(1): 16, 1954.
- 9) 本田良行：体力科学，1, 161, 1951.
- 10) 緒方正名：日本衛生学雑誌，Vol. 12, No. 2, p. 166, 1957.
- 11) 緒方正名・望月義夫：日本衛生学雑誌，Vol. 13, No. 2, p. 181, 1958.
- 12) 緒方正名・望月義夫：日本衛生学雑誌，Vol. 13, No. 2, p. 188, 1958.
- 13) 緒方正名・望月義夫：日本衛生学雑誌，Vol. 13, No. 2, p. 194, 1958.
- 14) 緒方正名・望月義夫・那須昭三：体力科学，印刷中。

(受付：1958 年 8 月 1 日)