

〈原著〉

尿中微量蛋白定量の新しい色素法の開発

笹野 善愛、外園 栄作、大澤 進

Development of a new dye method for measuring urinary protein

Yoshie Sasano, Eisaku Hokazono and Susumu Osawa

Summary Measurement of trace urinary albumin by the immunological method is used for the early detection of microalbuminuria in diabetic patients. We report here our newly-developed, less expensive, simple, and highly sensitive dye method for measuring urinary protein.

This method's linearity ranges up to 1000 mg/L, with a minimum detectable sensibility of 2 mg/L. The correlation of the immunological method and the dye method was $y=1.82x-2.43$, and the correlation coefficient (r) was 0.88.

The Acid Red 94 that we used in this method was able to detect an abundance of protein in urine as well as trace protein in urine with high sensitivity and precision while excluding heavy metal and deadly poison. We believe this new method is readily applicable as an automated analyzer in a clinical laboratory because of its superior characteristics in quantitative analysis. This useful method can serve as a screening test for the early detection of total protein in diabetic nephropathy patients.

Key words: Urinary albumin, Microalbuminuria, Total protein, Dye method, Acid Red 94

I. 諸言

糖尿病性腎症の病気分類第2期に微量アルブミン尿が出現^{1),2)}する。この病期に厳格な血糖コントロールを開始することによって腎症の進行が抑えられる。

正確に微量アルブミンを測定する方法には、抗原抗体反応を測定原理とする免疫比濁法

(TIA)が汎用³⁾されている。しかし、Osickaらは、サイズ排除クロマトグラフィー法を原理とするHPLC法(ALB-HPLC法)を用いて、尿中に存在する微量アルブミンには免疫応答性アルブミンと免疫非応答性アルブミンが存在すると指摘した。彼らはTIAよりもALB-HPLC法の測定値が糖尿病性腎症の早期発見に有用であることを報告^{4),7)}した。

九州大学 大学院 医学系学府 保健学専攻

検査技術科学分野 生体情報学講座

〒812-8582 福岡市東区馬出3丁目1-1

受領日 平成20年10月8日

受理日 平成20年11月8日

Division of Biological Science and Technology
Department of Health Science, Graduate School of
Medicine, Kyushu University,

3-1-1 Maidashi, Higashi-ku, Fukuoka 812-8582, Japan

一方でSiviridovらは、ALB-HPLC法がアルブミンに特異的な方法ではなく、トランスフェリンや α_1 -酸性糖タンパクなどの低分子蛋白も同時に測定していることを指摘⁹⁾した。

ALB-HPLC法による測定値は、糖尿病性腎症の早期発見に有用であるが、一度に多くの検体を測定することは出来ず、日常検査には不向きである。したがって、尿中微量蛋白を、安価で簡便に、より高感度に測定できる方法を確認すれば、糖尿病性腎症の迅速なスクリーニング検査が可能になる。したがって、このスクリーニング検査で異常が見つければ、各成分を免疫学的に定量、または電気泳動法や液体クロマトグラフィー法で蛋白を分離分析し、病態を解析することができる。

著者らは、自動分析装置に適用可能な尿中微量蛋白定量用の新規色素法の開発を試み、キサンテン系色素Acid Red 94の蛋白による呈色増強反応を原理とする色素法の諸条件を設定したので報告する。

II. 方法と材料

1. 原理

この色素法の測定原理は、ハロゲン化キサンテン系色素であるAcid Red 94 (図1) と蛋白の反応による色素の色調増加を利用している。検体中の微量蛋白は、酸性条件下 (pH 2.8) で陽性荷電となり、Acid Red 94の陰性荷電した各種置換基とイオン結合して共鳴構造を生成すると考えられる。この時に増強した桃色の呈色を570

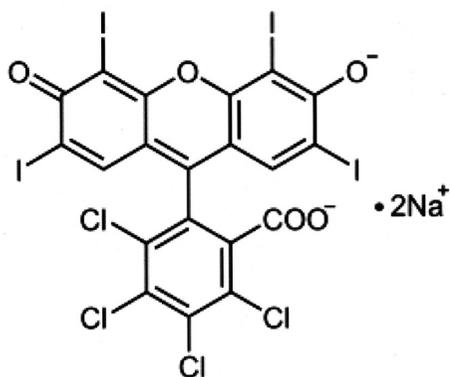


図1 Acid Red 94の構造式

nmの測定波長で測定する。

2. 測定装置

自動分析装置は、日立7170形自動分析装置および日立分光光度計U-2810 (日立ハイテクノロジーズ) を用いた。pHメーターは、ガラス電極式水素イオン濃度指示計 (岩城硝子) を用いた。

尿中総蛋白測定法⁹⁾ (TP-HPLC) に用いたHPLC装置は、ELITE LaChrome システム (日立ハイテクノロジーズ)、ポンプ: L-2420、カラムオープン: L-2300、検出器: L-2420、総蛋白定量用分離カラム: Asahipak GS-220H (7.6 mmID×250 mmL、旭化成工業) を用いた。

3. 試薬

本法の測定試薬は緩衝液と色素液から構成される。緩衝液 (R-1) は、pH 2.8 (25℃) 50 mmol/Lりんご酸緩衝液に22.5 mmol/L硝酸カリウムを加えた。

色素液 (R-2) は、pH 2.8 (25℃) 50 mmol/Lりんご酸緩衝液に0.9% Triton X-100と0.03%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、900 μ mol/L Acid Red 94 (和光純薬) を加えた。なお、Acid Red 94は、予め極少量の0.2 mol/L水酸化ナトリウム溶液で溶解させた後に用いた。

比較対照法では、免疫比濁法の尿中アルブミン測定試薬として、オートワコー マイクロアルブミン (和光純薬)、また、尿中総蛋白測定のためのHPLC法 (TP-HPLC法) の溶離液はpH 7.0、0.13 mol/Lりんご酸緩衝液を用いた⁹⁾。

各種蛋白質の色素との反応性評価に用いた試料は、 α ・ β -グロブリン、 γ -グロブリン、 β_2 -ミクログロブリン、レチノール結合蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白、 α_1 -アンチトリプシン、ヘモグロビン、トランスフェリン (SIGMA、St.Louis、USA)、 α_1 -ミクログロブリン (Biogenesis、Oxford、UK)、ベンスジョーンズ蛋白 (Nordic、Tilburg、The Netherlands)、タムホースフォール糖蛋白 (Harbor Bio、USA) であり、精製水でそれぞれ300 mg/Lに調製した。

分子量標準蛋白にはProtein Molecular Weight Standards (SERVA Heidelberg、Germany) を用い、精製水で200 mg/Lに調製した。患者尿はインフォームドコンセントにより同意を得た九州大学病院外来患者の尿を用いた。

Ⅲ. 方法

本法の自動分析装置での反応温度は37℃で行った。試料5 μLに緩衝液を200 μL加えて5分後、色素液を100 μL加え、その5分後に主波長570 nm、副波長660 nmの2ポイントエンド法にて比色定量を行った。TIAはメーカー指定の測定パラメータを用い、日立7170形自動分析装置で測定した。標準物質はメーカー指定のキャリブレーションを用いた。尿中総蛋白定量の比較対照法はIwataのTP-HPLC法⁹⁾に従った。本法とTP-HPLC法の標準物質には、300 mg/Lヒトアルブミン標準液(純度98%、単量体、Sysmex)を精製水で溶解し300 mg/Lに調製したものを使用した。冷蔵保存で1か月安定である。

最小検出感度はKottegodaらの報告¹⁰⁾に従って計算した。相関性の検討では線形関係式^{11,12)}により求めた。

Ⅳ. 結果

測定条件の設定

測定条件の検討には試料として、アルブミンとα・β-グロブリン、γ-グロブリンの300 mg/L水

溶液を作製し、色素との反応性の評価を行った。

1. 緩衝液のpH

pH 2.0、2.5、2.8の50 mmol/Lりんご酸緩衝液でのアルブミンのモル吸光係数(ε)を調べたところ、それぞれ1.11、1.49、1.82×10⁵ L/mol・mmであり、εはpH2.8が最大であった。アルブミンの呈色を100%とした時の各蛋白質の反応比率(%)を表1に示した。グロブリンの反応性はpH 2.0が最大であった。

2. 緩衝液の種類

pH 2.8、50 mmol/Lのグリシン、酢酸、酒石酸、りんご酸の各緩衝液におけるアルブミンのεはそれぞれ1.84、1.64、0.47、1.73×10⁵ L/mol・mmであった。アルブミンの呈色を100%とした各蛋白質の反応比率(%)を表2に示した。

グロブリンの反応性はグリシン緩衝液の反応性が高く39.3%であった。

また、表2の各緩衝液に、試料として強アルカリ尿(pH 7.91)を添加した後の混合液のpH変化量を調べた。緩衝液の濃度が高濃度になるほどεや蛋白質の反応性が低下した。50 mmol/L緩衝液濃度で緩衝能力の高い緩衝液はりんご酸緩衝液であった。

表1 pHの違いによる各蛋白質の反応比率

緩衝液pH	相対反応性 (%)		
	pH 2.0	pH 2.5	pH 2.8
アルブミン	100	100	100
α・β-グロブリン	37.5	34.1	31.8
γ-グロブリン	41.4	26.9	21.6
グロブリン平均	39.5	30.5	26.7

表2 緩衝液の違いによる各蛋白質の反応比率

緩衝液 (50 mmol/L)	相対反応性 (%)			
	酢酸	りんご酸	酒石酸	グリシン
アルブミン	100	100	100	100
α・β-グロブリン	43.8	34.5	35.8	47.1
γ-グロブリン	21.2	25.3	23.2	31.5
グロブリン平均	32.5	29.9	29.5	39.3

3. Acid Red 94の濃度

50 mmol/Lりんご酸緩衝液に試薬盲検とアルブミンを加えたときの吸収曲線を図2に示した。蛋白添加により570 nmでの吸光度が増加した。また、Acid Red 94濃度は高濃度であるほど感度は向上したが、試薬盲検の吸光度の上昇が認められた。色素濃度は900 μ mol/Lが良く、それより高濃度になると色素が沈殿した。

4. 界面活性剤の種類

pH 2.8、50mmol/Lりんご酸緩衝液を用い、界面活性剤としてR-2にそれぞれ0.9%のTriton X-100、Tween 20、Brij 35、Brij 58を添加し、アルブミン測定時の ϵ と各蛋白質の反応比率(%)を比較した。Triton X-100を使用したときに $\epsilon = 2.02 \times 10^4$ L/mol \cdot mmで他の界面活性剤の2倍程度の値を示した。各グロブリンの反応性は、どの界面活性剤を使用した場合にも反応比率は30%程度であった。Triton X-100は濃度が低いほど ϵ 、蛋白質の反応性が向上するが、0.9%より低いと色素が沈殿した。

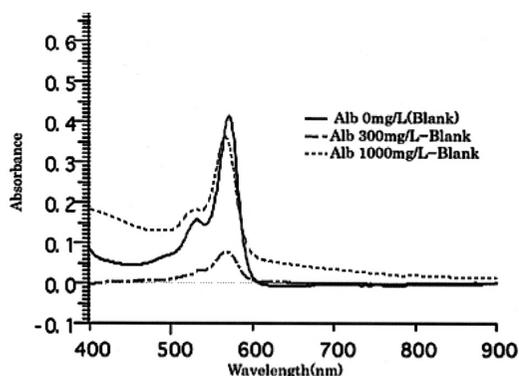


図2 試薬にアルブミン標準物質を添加した時の吸収曲線

表3 硝酸カリウム添加前後の尿中共存物質の影響

尿中共存物質	影響抑制上限値 (mol/L)
尿素	0.040
アンモニア	0.940
尿酸	0.035
クレアチン	0.084
ブドウ糖	0.022
グリシン	0.054
ビリルビン	0.003
塩化ナトリウム	4.160
塩化カリウム	0.174
塩化カルシウム	0.099
リン酸二水素ナトリウム	0.125
クレアチニン	0.088
アスコルビン酸	0.017

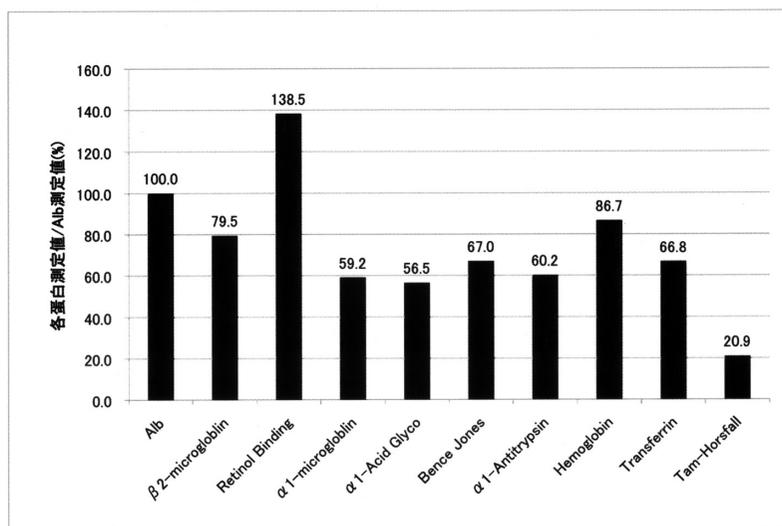


図3 各種尿中蛋白質の反応性

また、R-2に0.03%のSDSを添加したところ、アルブミンの $\epsilon = 1.26 \times 10^5 \text{ L/mol}\cdot\text{mm}$ に低下するが、各 $\alpha \cdot \beta$ -グロブリンの反応性は93.7%、 γ -グロブリンの反応性は69.9%と上昇した。

5. 共存物質の影響

患者尿に尿中の各共存物質を添加して対照尿との干渉比率（添加尿/対照尿 $\times 100\%$ ）を求め、測定系に及ぼす影響の評価を行った。13種の尿中共存物質の干渉試験を行い、その干渉が5%以下の各物質の濃度を表3に示した。

6. 自動分析装置での定量特性

測定条件の各種検討から試薬の最終組成は測

定条件に記述した試薬を用いて日立7170形自動分析装置に適用して以下の評価を行った。

アルブミン水溶液を用いて直線性を調べたところ、3,000 mg/Lまで原点を通る直線性が得られた。最小検出感度は2 mg/Lであった。

300 mg/Lと1,000 mg/Lのアルブミン溶液を用い、20回同時再現性を行ったところ、変動係数はそれぞれ1.68%、0.69%であった。また、同濃度のアルブミン溶液を用いて20日間、各日2重測定を行った日差再現性は300 mg/Lの変動係数は1.8%、1,000 mg/Lの変動係数は0.78%であった。

不確かさの評価用試料には、アルブミン標準水溶液（300 mg/L、1,000 mg/L）を用い、20日

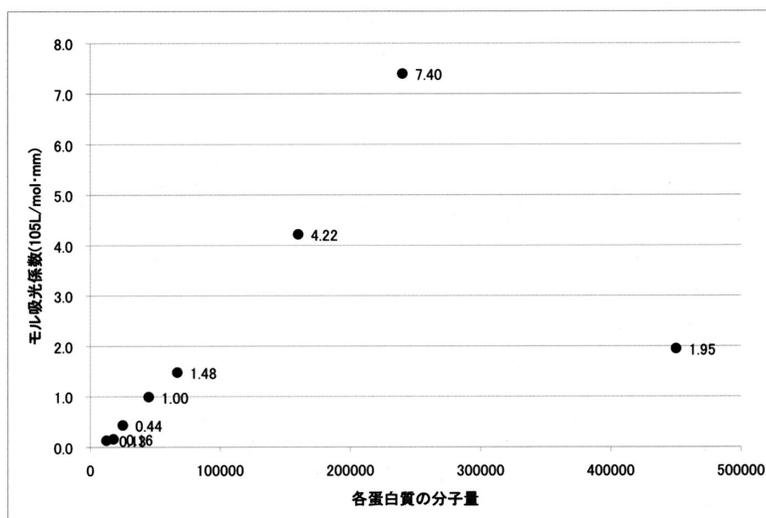


図4 各分子量蛋白の ϵ

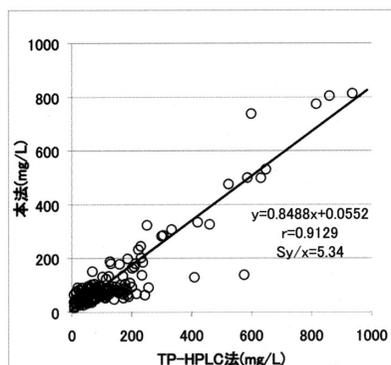


図5-(a) 本法とTP-HPLC法

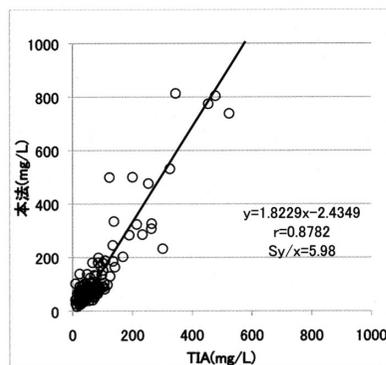


図5-(b) TIAとの相関

間2重測定した日差再現性評価における値を用いた。それぞれの拡張不確かさの大きさ(2SD)は、 300 ± 11.708 mg/L (4.7%)、 $1,000 \pm 20.567$ mg/L (2.1%)であった。

患者尿(15 mg/L)に1,000 mg/Lと500 mg/Lのアルブミンを添加して求めた回収率(n=3)は、それぞれ98.9%、98.1%であった。

10種類の同一濃度(300 mg/L)蛋白溶液について反応性を調べ、アルブミンの反応性を100%として各種蛋白の反応比率(%)を図3に示した。アルブミンと比較しレチノール結合蛋白が138%と高く、タムホースフォール蛋白が20.8%と低い反応性を示し、その他の蛋白は56.5~86.6%の反応性であった。

ヒトアルブミン(分子量67,000)、チトクローム(12,400)、ミオグロビン(17,800)、キモトリプシンA(25,000)、卵白アルブミン(45,000)、ウシアルブミン(67,000)、アルドラーゼ(160,000)、カタラーゼ(240,000)、フェリチン(450,000)、10種類の同一濃度蛋白を用いて、分子量の違いによる反応性の違いを調べた。

分子量が大きくなるほど反応性は向上する傾向が認められたが、評価した蛋白中、最大分子量450,000のフェリチンの反応性は最も低かった。

図4には、各分子量の蛋白質を測定したときの ϵ を示した。フェリチンを除き、分子量と感度の間に比例関係が認められた。

176例の九州大学病院外来患者尿を用いて基準範囲を求めた結果、基準範囲は22.6~108.4 mg/L(平均6.5 mg/L)であった。また、性差は認められなかった。

九州大学病院外来患者尿176例を用いて、TP-HPLC法、TIAとの相関性試験を行った。本法とTP-HPLC法における線形関係式は $y = 0.85x + 0.06$ 、相関係数 $r = 0.91$ であった。本法とTIAにおける線形関係式は $y = 1.82x - 2.43$ 、相関係数 $r = 0.88$ であった(図5a, b)。

V. 考 察

今回我々は、糖尿病腎症における微量蛋白測定を目的として、安価、迅速、高感度に尿中微量蛋白を測定可能な化学的方法の開発を試みた。本法は自動分析装置に容易に応用可能であり、

日常検査に利用することができる。

本法の検討に用いた色素は、スクリーニング検査で用いる微量アルブミン試験紙で使用されているAcid Red 94(4,5,7-テトラクロロ-2',4',5',7'-テトラヨードフルオレセイン2ナトリウム塩)を定量用試薬とした¹³⁾。Acid Red 94はアルブミンと親和性が高い色素であり、アルブミン以外の蛋白とも親和性が高くなるように緩衝液の条件を検討した。

本色素結合法は酸性下で反応を行うが、この反応条件下では蛋白質色素複合体は沈殿しやすくなる。色素法では蛋白質色素複合体の沈殿を防ぐためにBrij 35やTriton X-100などの非イオン性界面活性剤を添加する必要があった^{14), 15)}。本法でも、界面活性剤としてTriton X-100を添加した結果、その界面活性効果により蛋白質とAcid Red 94複合体の沈殿が抑制されているものと考えられる。一方、SDSの添加でグロブリンの反応性が向上したが、溶解性の低いグロブリンの溶解性が向上し、色素と反応しやすい状態になったと考えられる。また、界面活性剤の添加は発色の増加、試薬盲検の吸光度の低下、検量線の直線性の向上にも寄与している。

干渉試験において、代表的な尿成分の1つである食塩は本法の発色を低下させた。本反応における色素蛋白結合反応への影響は、緩衝液の陰イオンと色素陰イオンが競争的に蛋白質と結合するときの化学平衡論に基づき説明される¹⁶⁾。この塩による干渉は陰イオン(Cl⁻)が色素蛋白質複合体の生成量を減少させることを意味する。尿中の共存陰イオンは、解離型色素陰イオンが本来結合する蛋白質の正荷電部分に結合し色素蛋白質複合体の生成を減少させるため、発色を低下させたものと考えられる。この問題点の改善には、緩衝液に予め塩を添加することでその影響を少なくすることができた。検討した塩の中でも硝酸カリウムが共存物質の影響を相対的に低くする効果が高かった。

また、本法と蛋白質との反応性には、各蛋白質の糖鎖含有率、そして、各蛋白質の分子量との関連が考えられる。アルブミン(ヒト、ウシ、卵白)や β_2 -ミクログロブリンなど糖鎖含有率0%の蛋白質との反応性は80%以上と良好な値を示した。また、ヘモグロビンの分子量は64,500で、アルブミンの分子量67,000と類似して

いるが、糖鎖を6%含有しているため、その反応性は86.66%であった。このように他の蛋白質より糖鎖含有率が多く、20%含有する α_1 -ミクログロブリン、30%含有するタムホースフォール蛋白、40%含有する α_1 -酸性糖蛋白は、本法における反応性が60%以下で他蛋白に比して低い反応性を示した。また、他の蛋白質の等電点が4.4~7.0であるのに対し、タムホースフォール蛋白は3.2~3.5、 α_1 -酸性糖蛋白は1.8~2.7で比較的低い等電点をもっており、これらの反応性が60%以下であることの原因として等電点と糖鎖の関与も考えられる。

分子量標準蛋白を用いた分子量の違いによる反応性の評価では、分子量240,000のカタラーゼまで、分子量が大きくなるほどその反応性が向上する傾向が認められたが、分子量450,000のフェリチンの反応性は6.0%と低かった。また、単分子量が約100,000のタムホースフォール蛋白も、塩濃度や尿の酸性化など様々な因子で容易に凝集し、分子量28,000,000の高分子にもなる¹⁷⁾。その反応性が20.8%と低かったのもこのことが一因と考えられる。

TP-HPLC法で用いているカラムは分子量1万以上の高分子がサイズ排除作用により最初に溶出するため、尿中の総蛋白を測定できる。また、検出波長は220 nmであるため、蛋白のペプチド鎖由来の吸収で検出し、蛋白種による差が少ない総蛋白定量の基準となる方法¹⁸⁾である。本法とTP-HPLC法との相関性試験では、線形関係式が $y=0.85x+0.06$ であり、特に100 mg/L以下の低濃度域で本法の測定値がより低い傾向が認められた。本色素法における15%の負の比例系統誤差は糖鎖蛋白の反応性が低いためと考えられた。一方、TIAによるアルブミン測定値との相関では、線形関係式が $y=1.82x-2.43$ であり本法はアルブミン以外の蛋白を測定しているため、糖尿病性腎症の微量蛋白を早期に検出できると考えられた。

また、ALB-HPLC法と免疫比濁法の線形関係式は $y=1.80x+2.4$ であると報告¹⁸⁾されており、本法とTIAの線形関係式 $y=1.82x-2.43$ は非常に類似した結果を示した。免疫比濁法よりも糖尿病性腎症の早期発見に有用であることを報告されたOsickaらのALB-HPLC法と本法ではほぼ同様な蛋白を測定していることが推定される。

VI. 結語

本法で用いたキサンテン系色素Acid Red 94は、多くの蛋白質と高い親和性を持ち、重金属や、毒劇物を試薬組成に含まなくても蛋白質を高感度に定量出来る方法である。また容易に生化学自動分析装置に適用できることから、糖尿病性腎症の尿中微量蛋白のスクリーニング検査として有用である。

文献

- 1) Rosenstock J, Raskin P: Early diabetic nephropathy: Assessment and potential therapeutic interventions. *Diabetic Care*, 9: 529-545, 1986
- 2) Mogensen CE: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *New Engl. J. Med.*, 310: 356-360, 1984
- 3) Brinkman JW, Bakker SJL, Gsevoort RT, et al.: Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephrometry with HPLC. *Kidney Int.*, 66: 69-75, 2004
- 4) Osicka TM, Comper WD: Characterization of Immunochemically Nonreactive Urinary Albumin. *Clin. Chem.*, 50: 2286-2291, 2004
- 5) Comper WD, Osicka TM, Jermis G: High prevalence of immunounreactive intact albumin in the urin of diabetic patients. *Am. J. Kidney Dis.*, 41: 336-342, 2003
- 6) Comper WD, Jerums G, Osicka TM: Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clin. Biochem.*, 37: 105-111, 2004
- 7) Comper WD, Osicka TM, Clark M, MacIsaac RJ, Jermis G: Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. *Kidney Int.*, 65: 1850-1855, 2004
- 8) Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT, Hortin G: Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: implications for analysis of urinary albumin. *Clin. Chem.*, 52: 389-397, 2006
- 9) Iwata S: Recommended method of the Japanese Association of Medical Technologists for the determination of protein in urine by HPLC. *Clin. Chem. Acta*, 303: 95-104, 2001
- 10) Kottogoda NT, Rosso R: Probability, Statistics, and Reliability for Civil and Environmental Engineers. Milan: McGraw-Hill Companies, USA, (1997)
- 11) Robert F: General Deming regression for estimating systematic bias and its confidence interval in method-

- comparison studies. Clin. Chem., 46: 100-104, 2000
- 12) Kristian L: Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. Clin. Chem., 39: 424-432, 1993
- 13) 辻川仁美, 町井涼子, 平塚信夫, 他: 新しいアルブミン、クレアチニン測定用尿試験紙の検討. 臨床病理, 53: 111-117, 2005
- 14) Dumas BT et al.: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin. Chem. Acta, 31: 87-89, 1971
- 15) Suzuki Y: Protein error pH indicators in the presence of detergents. Analytical Sciences, 23: 733-738, 2007
- 16) Suzuki Y: Theoretical analysis concerning the characteristics of a dye-binding method for determining serum protein based on protein error of a pH indicator. Anal. Sci., 21: 83-88, 2005
- 17) Tamm I, Horsfall FL Jr.: Characterization and separation of an inhibitor of viral hemagglutination present in urine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 74: 108-114, 1950
- 18) William EO, William LR: Performance characteristics of an HPLC assay for urinary albumin. Clin. Chem., 124: 219-225, 2005