

〈原著〉

BCG発色試薬において両性および陽イオン性 界面活性剤が示すアルブミン様の反応性

新井 智子¹⁾、塚田 敏彦²⁾

Albumin-like reactivity of amphoteric and cationic surfactants toward BCG color reagents

Tomoko Arai¹⁾ and Toshihiko Tsukada²⁾

Summary Bromocresol Green (BCG) dyes exist as an equal mixture of undissociated (λ max 450 nm) and dissociated (λ max 620 nm) dye forms in acid solutions.

In BCG color reagents for measuring serum albumin, color development of the dissociated dye is suppressed by added nonionic surfactants. Therefore, the BCG color reagents exhibit low absorbance levels of around 620 nm.

The effects of different types of surfactants (SDS: anionic, Amphitol 24B: amphoteric, and Quartamin 24P: cationic) on the color development of BCG were investigated in this study. Our results revealed that absorbance levels of around 620 nm of the BCG color reagents were elevated by the addition of surfactants, especially those in amphoteric and cationic surfactants. These results indicated that amphoteric and cationic surfactants show albumin-like reactivity toward BCG color reagents.

Key words: Surfactants, pH indicator, Bromocresol Green (BCG), Color development, Serum albumin

I. 緒言

pH指示薬は、有機化合物の弱酸もしくは弱塩基であり、溶液中では「非解離型」・電離した「イオン型」の2つの存在様式をとり、その濃度比は溶液のpHに応じて変化する。両者は可視光線の吸収スペクトルが異なるため、眼で見た

場合に色の違いとして認識でき、それらの濃度比の変化を溶液の色調変化として捕えることができる。

アルブミンを加えた溶液中では、溶液のpH変化がなくとも指示薬が色調の変化を示すことが知られている。この現象は「蛋白誤差」と呼ばれており、酸性溶液中で負の電荷をもつイオン

¹⁾埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科
〒343-8540 埼玉県越谷市三野宮820番地

²⁾東京電子専門学校
〒170-8418 東京都豊島区東池袋3-6-1
受領日 平成23年4月18日
受理日 平成23年4月22日

¹⁾Department of Health Sciences, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University, 820 Sannomiya, Koshigaya-shi, Saitama 343-8450, Japan

²⁾Department of Clinical Laboratory Medicine, Tokyo Electronics College, 3-6-1 Higashi-ikebukuro, Toshima-ku, Tokyo 170-8418, Japan

型色素が、正の電荷をもつアルブミンと結合して「色素蛋白複合体」を形成することによって吸収スペクトルが変化することに起因すると考えられている¹⁾。現在アルブミン測定に広く利用されている「色素結合法」はこの蛋白誤差を利用した分析法である。色素結合法によるアルブミン測定試薬には、Brij 35やTriton X-100などの非イオン性界面活性剤が添加されており^{2),3)}、蛋白質の沈殿抑制、発色の増加、試薬ブランクの吸光度低下、検量線の直線性向上などの効果が報告されている^{2),4)}。

界面活性剤は、極性基（親水基）と疎水基（親油基）の両方を有する両親媒性の分子であり、極性基の性質に基づき、陰イオン性・陽イオン性・非イオン性・両性の各種界面活性剤に分類される⁵⁾。著者らは、過去にICG（インドシアニンググリーン）測定用の管理物質の検討をしていた際、ICG水溶液に界面活性剤を添加すると、溶液の吸収極大波長が長波長側にシフトし、かつそのシフト幅が界面活性剤の種類によって異なることを経験した⁶⁾。一方、pH指示薬に、pH変動に因らない発色誤差を起させる可能性としては、蛋白誤差以外にも「アルコール誤差」「温度誤差」「塩誤差」「アルカロイド誤差」など多くの要因が知られていることから、界面活性剤も同様の発色誤差作用を有する可能性が考えられる。もしそうであれば、アルブミン測定試薬はアルブミンによるpH指示薬に対する発色誤差作用（蛋白誤差）を測定原理としているにもかかわらず、その試薬中にも同様の作用を有する界面活性剤を使用していることになり、その性質を把握しておくことは分析を行う上でも非常に重要と思われる。

これまでに、色素結合法によるアルブミン測定法に関して、アルブミン存在下で非イオン性界面活性剤が非解離型色素および正荷電蛋白質との相互作用を介して発色に影響を及ぼす可能性があることが報告されている⁷⁾。しかし、界面活性剤の種類毎に界面活性剤単独のpH指示薬に及ぼす作用について検討した報告はない。そこでまず、色素結合法測定試薬として現在最も普及率の高いBCG（ブロムクレゾールグリーン）法において、界面活性剤無添加の発色試薬を作製し、界面活性剤がBCGの発色に及ぼす影響について検討を行った。次いで、規定どおりに界

面活性剤を添加して発色試薬を作製し、これに極性基の異なる界面活性剤を試料として添加した場合の反応性について調べた。その結果、特に両性および陽イオン性の界面活性剤にはBCGの発色に誤差を及ぼす作用があること、BCG法においてアルブミンと類似した反応性を示すことを見出したので報告する。

II. 方法

1. 界面活性剤

本検討には以下の4種類の界面活性剤を使用した。①陰イオン性界面活性剤：ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDS）（和光純薬）、②非イオン性界面活性剤：ポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテル（以下Brij 35）（和光純薬）、③両性界面活性剤：Amphitol 24B（花王）、④陽イオン性界面活性剤：Quartamin 24P（花王）。

2. BCG法発色試薬

BCG法発色試薬は北村らの方法に従い、以下のように作製した⁸⁾。

- 1) クエン酸緩衝液：0.2Mクエン酸ナトリウム溶液5容と0.2Mクエン酸溶液6容を混合してpH4.2に調整した。
- 2) BCG保存液：BCG（関東化学）0.7gを0.1N水酸化ナトリウム水溶液10～20mLに溶かして精製水で100mLとし、一昼夜保存後濾紙で濾過して使用した。
- 3) 10%Brij 35水溶液：Brij 35 10gを60℃前後の温水で溶解し、室温まで冷却後、精製水で100mLとした。
- 4) 発色試薬：試薬1) 500mL、試薬2) 15mL、試薬3) 12mLを混合し、精製水で1000mLとした（以下、Brij 35含有発色試薬）。なお、この発色試薬におけるBrij 35の終濃度は0.12%である。

3. 界面活性剤がBCGの発色に及ぼす影響の検討

界面活性剤Brij 35を加えないBCG発色試薬[2の試薬1) 500mLと試薬2) 15mLを混合後、精製水で1000mLとしたもの]（以下、界面活性剤無添加発色試薬）に、1の各種界面活性剤を各々0～10 μ L添加後、発色試薬の吸収曲線を日立自記分光光度計U2000で測定した。

4. Brij 35含有発色試薬における界面活性剤の反応性の検討

北村らの方法に準拠したBCG法の発色試薬には既に非イオン性界面活性剤Brij 35が使用されているため、Brij 35含有発色試薬に、非イオン性界面活性剤以外のSDS・Amphitol 24B・Quartamin 24Pの各界面活性剤を試料として添加し、その反応性を調べた。具体的には、試料として添加する界面活性剤の量を0.3~10 μ Lまで変化させて発色試薬3.0mLと混合後、室温30分反応させた反応液の吸収曲線を日立自記分光光度計U2000で測定した。なお、北村らの方法では、発色試薬6 mLに試料20 μ Lを添加している。比較対照として、4.1g/dLアルブミン標準液（日東紡）を試料として添加した場合の吸収曲線についても同様に調べた。

Ⅲ. 結果

1. 界面活性剤がBCGの発色に及ぼす影響

界面活性剤無添加発色試薬に各種界面活性剤を添加した場合の吸収曲線をFig. 1 (A)~(C)に示した。

界面活性剤が共存しない場合、BCG発色試薬は450 nmと620 nmに吸収極大をもつ2峰性の吸収曲線を示し、両極大部の吸光度はほぼ同程度であった。この試薬に陰イオン性界面活性剤SDS、非イオン性界面活性剤Brij 35、両性界面活性剤Amphitol 24Bを添加した場合には、450 nm付近では、SDSを除き吸収極大が10~20 nm程度短波長側にシフトするものの、3種全ての界面活性剤で吸収極大の吸光度に大きな変化は認められなかった。しかし、620 nm付近では界面活性剤の添加量に比例して発色試薬の吸光度が低下する傾向が認められ、その作用はBrij 35において最も顕著であった。Amphitol 24Bについては、添加量0.3~3 μ Lでは添加量に比例して620nmの吸光度が減少したが、10 μ L添加では1 μ L添加時と3 μ L添加時の中間程度の吸光度を示し、添加量依存的な吸光度低下にはならなかった。さらに、Amphitol 24Bでは添加量が増加すると620 nmの吸収極大がわずかに長波長側にシフトしていた。

陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pを添加した場合には、濁りが生じてしまい測定不能であ

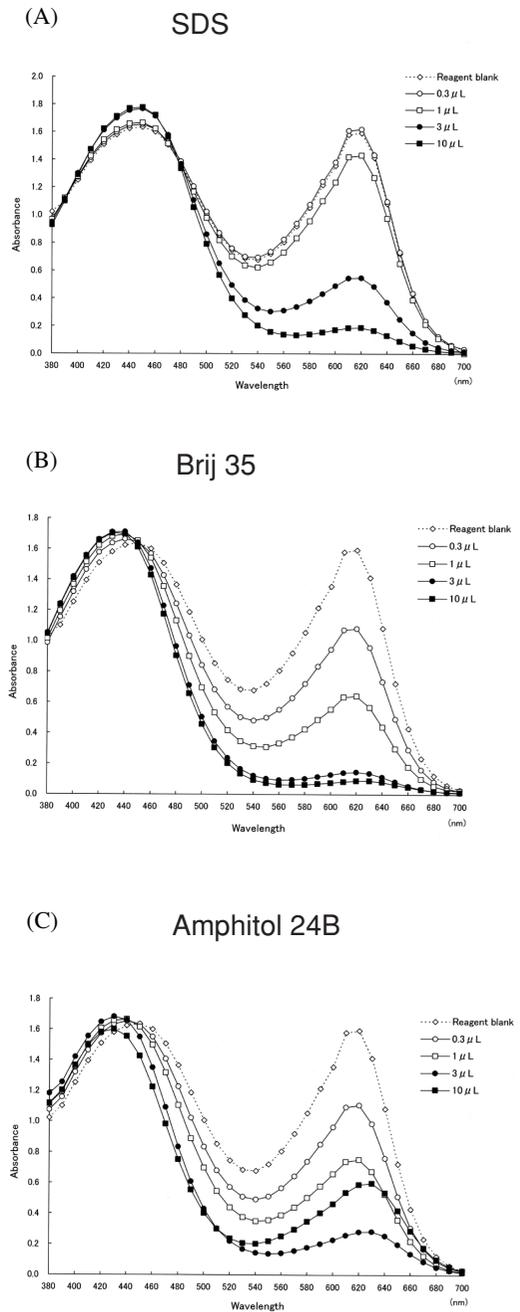


Fig. 1 Effect of different types of surfactants on color development of BCG.

BCG reagents were prepared without any surfactant. SDS (A), Brij 35 (B), Amphitol 24B (C), and Quartamin 24P were respectively added to 3 mL of the BCG reagents, Absorption curve of the reaction mixture was investigated after reaction for 30 minutes.

った。

2. Brij 35含有発色試薬における界面活性剤の反応性

Brij 35含有発色試薬に、各種界面活性剤とアルブミン標準液を各々試料として添加した場合の反応液の吸収曲線をFig. 2 (A)~(D)に示した。

Brij 35含有発色試薬（試薬ブランク）の吸収曲線は、界面活性剤無添加発色試薬に比べ、Brij 35添加によって、BCGの2つの吸収極大のうち620 nm付近の吸光度が低く抑えられており、440 nmに大きな吸収ピークを示していた。

比較対照であるアルブミン標準液を添加した場合の反応液の吸収曲線を見ると、吸収極大440 nm付近の吸光度は添加量の増加に伴って若干低

下したのみであったのに対し、620 nm付近の吸光度は添加量に比例して大きく上昇し、添加濃度が10倍になると吸光度は5倍に上昇した (Fig. 2 A)。BCG法によるアルブミン測定はこの吸光度上昇をとらえる分析法である。

界面活性剤を試料として添加した場合には、いずれの界面活性剤であっても440 nm付近の吸光度は大きな変化を示しておらず、この点においては界面活性剤無添加発色試薬への添加の場合と同様であった。

陰イオン性界面活性剤SDSを添加した場合には、620 nm付近の吸光度が試薬ブランクよりも上昇したものの、その上昇率は低く、3 μ L添加で吸光度が0.2上昇したのみであり、10 μ L添加では1 μ Lおよび3 μ L添加時よりも低い吸光

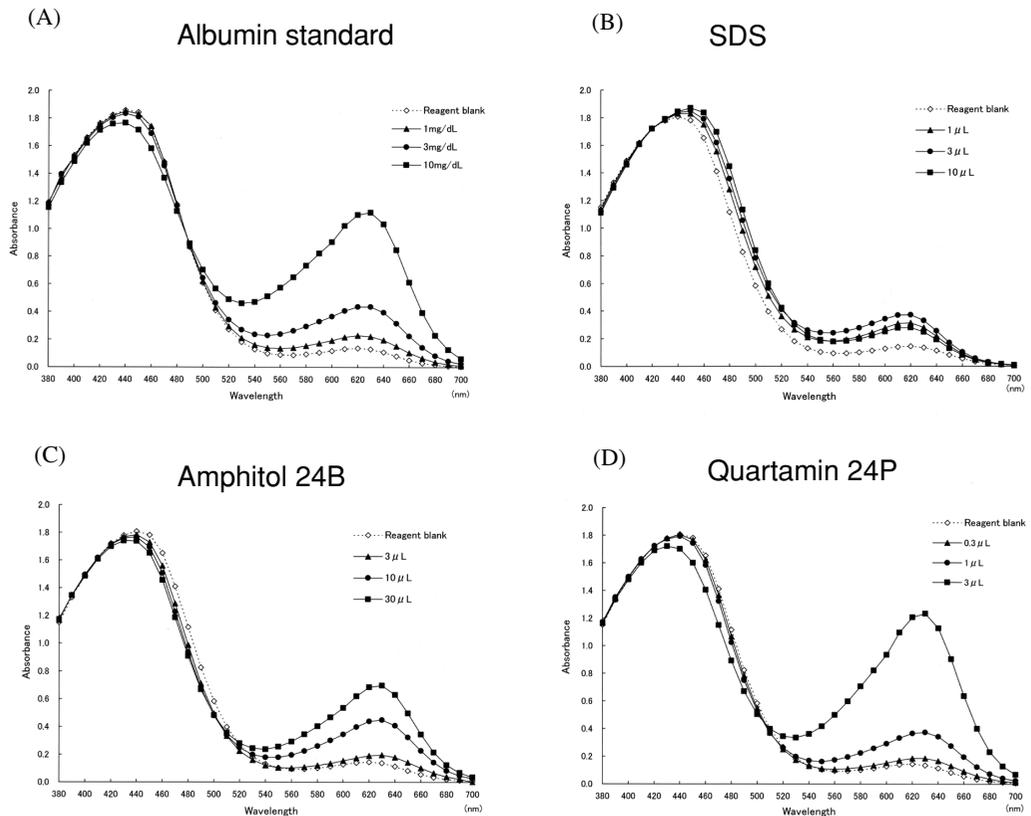


Fig. 2 Reactivity of different types of surfactants toward BCG color reagents with Brij 35. BCG color reagents were prepared with Brij 35 according to the method by Kitamura et al. Albumin standard (A), SDS (B), Amphitol 24B (C), and Quartamin 24P (D) were respectively added to 3 mL of the BCG color reagents. Absorption curve of the reaction mixture was investigated after reaction for 30 minutes.

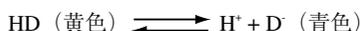
度を示した (Fig. 2 B)。

両性界面活性剤Amphitol 24Bを添加した場合には、添加量依存的に620 nm付近の吸光度が上昇し、添加量が10倍になると吸光度は3.6倍に上昇した (Fig. 2 C)。

陽イオン性界面活性剤Quartamin 24Pを添加した場合にも、添加量に比例して620 nm付近の吸光度が上昇したが、その上昇率は添加量を10倍にしたとき8.5倍とAmphitol 24Bの場合よりも顕著であった (Fig. 2 D)。

IV. 考察

一般にBCGのようなpH指示薬は、水溶液中では非解離型 (HD) とイオン型 (D) の2つの存在様式をとり、溶液中の H^+ イオン濃度に応じた平衡を保っている⁹⁾。非解離型色素から水素イオン (H^+) が外れると、ベンゼン環上の電子構造が変化するために光の吸収波長が変化し、それが色の違いとなって現れる。BCGでは非解離型は440 nm付近に吸収をもつ黄色、イオン型は610 nm付近に吸収をもつ青色を呈する。



BCGの変色域はpH 3.8 (黄色) ~5.4 (青色) で、本検討に用いたBCG発色試薬のpH 4.2では、非解離型とイオン型の両者が存在する緑色を呈しており、これは界面活性剤無添加発色試薬の吸収曲線 (Fig. 1のReagent blank) 上にも450 nmと620 nmを極大とする2つの吸収ピークとして確認できる。

界面活性剤無添加発色試薬に界面活性剤を添加すると、濁りを生じる陽イオン性界面活性剤を除き、他の界面活性剤では620 nm付近の吸光度が低下した (青色の発色が減弱する) が、450 nm付近の吸光度には大きな変化は認められなかった。この結果は、界面活性剤添加による発色試薬の吸光度変化が、非解離型とイオン型との間の平衡移動によらない色調変化であることを示しており、界面活性剤がBCGに対して固有の発色誤差を起こさせる作用を有することを裏付ける結果と考えられる。

アルブミン測定に用いられているBCG発色試薬では、非イオン性界面活性剤Brij 35が添加されているため、Brij 35のBCGに対する発色誤差作用によって620 nm付近の吸光度は予め低く抑

えられている。この状態に他の界面活性剤を添加すると、いずれの界面活性剤においても450 nm付近の吸光度には大きな変化はなかったが、620 nm付近の吸光度が上昇する (青色の発色が増強する) 傾向を示していた。換言すれば、界面活性剤のもつBCGに対する発色誤差作用は青色 (イオン型色素) の発色にのみ影響を与え、Brij 35非共存下では発色減弱作用、Brij 35共存下では発色増強作用を示すことができる。界面活性剤がBCG発色試薬において示すこうした発色誤差作用がどのようなメカニズムによって生じているかについて以下に考察する。

まず界面活性剤無添加発色試薬系では、発色に関与する因子は、非解離型色素 (HD) ・イオン型色素 (D) ・界面活性剤の3つしか存在しない。界面活性剤は、一般に水中では固体表面に吸着してミセルを形成する性質をもつことが知られている^{5,10)}。BCG発色試薬においても、界面活性剤が試薬中の色素に吸着してミセルを形成することにより、色素の発色に影響を及ぼす可能性が考えられる。また、陽イオンを有する界面活性剤では、陰イオンをもつイオン型色素 (D) と結合して界面活性剤・色素複合体を形成することによって色素の発色を変化させることも考えられる。本検討で得られた結果は、具体的には以下の2つの仮説によって説明できる。仮説①：界面活性剤によるイオン型色素周囲でのミセル形成によって色素の青色発色がマスクされて吸光度が低下する。この仮説はSDS・Brij 35・Amphitol 24Bのいずれも概ね620 nmの吸光度を減少させたことの説明となる。仮説②：一定濃度以上でAmphitol 24Bとイオン型色素が結合して複合体を形成することによって青色発色が増強される (モル吸光係数が大きくなる)。この仮説はAmphitol 24Bについて、添加量が増加するとむしろ620 nmにおける吸光度が上昇したことを説明できる。

これら2つの仮説に立脚して、Brij 35含有発色試薬での発色メカニズムについて考える。既に試薬中でBrij 35がイオン型色素に吸着してミセルを形成しているため、青色発色が検出されにくい状態にあり、そこに陽イオンを有する界面活性剤 (Quartamin 24PやAmphitol 24B) が添加されると、負電荷を有するイオン型色素と結合して界面活性剤・色素複合体を生じ、モル吸

光係数が大きくなって青色発色が増強する。pH 4.2では正に荷電しているアルブミンについても同様の反応を示すものと考えられる⁹⁾。陰イオン性界面活性剤を添加した場合には、イオン型色素(D)との結合は起こらず、ミセル形成に干渉するのみであると考えれば、Brij 35含有発色試薬における発色誤差作用(620 nm吸光度の上昇)に関して、Quartamin 24P>Amphitol 24B>SDSの関係が認められたのも、イオン型色素との結合のしやすさを反映したものと解釈でき、上述の仮説と矛盾しない。しかし、これはあくまで結果から考えられる解釈であり、実際にそのようなメカニズムによるのかは本検討結果のみからは定かではない。

本検討の結果、両性および陽イオン性の界面活性剤は、BCGに対してアルブミンと同様の発色誤差作用を有していることが明らかとなった。界面活性剤を含有する色素結合法によるアルブミン測定は、既に界面活性剤によってpH指示薬に発色誤差が生じており、その状態をベースとして、試料としてアルブミンが添加されることによってさらに別の発色誤差が生じ、その発色誤差に基づく吸光度変化を検出するもので、微妙なバランスの上に成り立っている測定系といえる。色素結合法によるアルブミン測定を行う際には、こうした試薬の反応メカニズムを念頭に置いて分析を行うことが有用と思われる。

文献

- 1) Suzuki Y: Guidance for selecting the measurement conditions in the dye-binding method for determining serum protein; theoretical analysis based on the chemical equilibrium of protein error. *Anal Sci*, 24: 1263-1268, 2001.
- 2) Dumas BT et al.: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chem Acta*, 31: 87-96, 1971.
- 3) 村本良三ほか: 正確度を改善したブロムクレゾールパープル法による血清アルブミン定量法の開発. *臨床化学*, 26: 38-43, 1997.
- 4) 鈴木優治: pH指示薬の蛋白誤差に基づく色素結合法における界面活性剤添加の意義. *医学検査*, 54: 1491-1496, 2005.
- 5) 界面活性剤ガイドブック(第3版), 3-9, メルク株式会社, 東京, (2006)
- 6) 塚田敏彦: ICG測定に向く精度管理法. *臨床検査*, 27: 1069-1071, 1983.
- 7) 鈴木優治: 蛋白誤差による発色反応を用いる色素結合法の界面活性剤存在下における反応様式. *医学検査*, 57: 240-247, 2008.
- 8) 北村元仕, 仁科甫啓 編: 実践臨床化学(増補版), 217-219, 医歯薬出版, 東京, (1982)
- 9) 鈴木優治: 色素結合法における蛋白誤差への共存イオンの関与に関する研究—化学平衡論と実験による解析—. *医学検査*, 55: 827-834, 2006.
- 10) 阿部正彦他: トコトンやさしい界面活性剤の本, 52-55, 日刊工業新聞社, 東京, (2010)