

〈原著〉

色素結合法におけるヒト、ウシおよびタマゴアルブミンの反応性とヒト血清アルブミン定量の検量物質に関する検討

鈴木 優治

Consideration of reactivity of human, bovine and egg albumins in the dye-binding method and a standard material for determining the human serum albumin

Yuji Suzuki

Summary A protein error of three sulfonephthalein pH indicators, bromophenol blue (BPB), bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) by human, bovine and egg albumins (HSA, BSA, EGA) was investigated in order to find a reaction condition under which the reactivities of BSA and EGA coincide with that of HSA. If such a reaction condition exists, BSA and EGA can also be used as a standard material. The reactivity of BSA agreed with that of HSA in the case of BPB and BCG at a restricted pH region.

However, in the case of BCP, the reactivity of BSA did not agree with that of HSA at all pH regions. The reaction condition where the reactivities of HSA and BSA become equal was affected by the pH and dye and buffer concentrations in the color reagent. As for BPB and BCG, several favorable recipes were investigated for the color reagent by which the color development of HSA and BSA was equal.

Key words: Dye-binding method, Standard material, Sulphonephthalein dye, Bovine serum albumin, Chicken egg albumin

I. 緒言

pH指示薬であるブロムフェノールブルー (BPB)¹⁾、ブロムクレゾールグリーン (BCG)²⁾、ブロムクレゾールパープル (BCP)^{3)~4)}などが示す蛋白誤差を測定原理とする色素結合法は、ヒト血清アルブミン (HSA) 定量に広く臨床応用さ

れている。これらの色素の蛋白質に対する特異性は色素ごとに異なる^{5)~6)}。色素結合法によるHSA定量での検量物質は本来、HSAであるが、BCG法ではウシアルブミン (BSA) も使用されている。しかし、市販のBCG試薬では、HSAとBSAには無視できない発色差が存在することが指摘されている^{7)~8)}。ヒト以外の生物種に由来す

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

受領日 平成24年2月9日

受理日 平成24年2月14日

Department of Health Sciences, School of Health and Social Services, Saitama Prefectural University,
820 Sannomiya, Koshigaya, Saitama 343-8540, Japan

るアルブミンは、安価で入手しやすく、その発色がHSAの発色と等しくなる反応条件が存在すれば、色素結合法によるHSA定量の代用検量物質として利用することができる。HSAの代用検量物質の検討に際しては、蛋白誤差による発色がpH、色素濃度、緩衝溶液の種類および緩衝溶液濃度¹¹⁻¹³⁾によって変化するため、これらの因子と発色との関係について検討し、HSAと他生物種アルブミンの発色が等しくなる反応条件を見出す必要がある。本論文ではHSA定量に应用されている色素であるBPB、BCGおよびBCPとBSAおよびトリタマゴアルブミン (EGA) との発色反応について検討し、これらのアルブミンがHSAの代用検量物質として利用できるかどうかと、利用するための試薬処方について検討した結果を報告する。

II. 実験方法

1. 試薬

測定試薬は和光純薬工業から購入したのから調製した。

緩衝溶液：緩衝溶液はpH 1.04~1.94が0.1 mol/l塩酸溶液と0.1 mol/lグリシン溶液 (NaClを0.1 mol/lの濃度で含む) で、pH 2.20~7.80が0.1 mol/lクエン酸溶液と0.2 mol/lリン酸水素2ナトリウム溶液で、pH 8.53~12.90が0.1 mol/l水酸化ナトリウム溶液と0.1 mol/lグリシン溶液 (NaClを0.1 mol/lの濃度で含む) で調製した。

1 mmol/l色素溶液:BPB 0.670 g、BCG 0.698 gおよびBCP 0.540 gのそれぞれにエタノール10 mlを加え、よく溶解後、精製水を加え1,000 mlとした。

発色試薬：緩衝溶液10~90 mlに色素溶液2.0~10.0 mlを加え、精製水で全量を100 mlとした。

2 g/l蛋白質溶液：ヒト血清アルブミン (Albumin from Human Serum, HSA)、ウシ血清アルブミン (Albumin from Bovine Serum, BSA) およびトリタマゴアルブミン (Albumin, Chicken Egg 5X Crystalline, EGA) を200 mgずつとり、それぞれを精製水に溶解し、100 mlとした。

2. 測定操作

試験溶液は蛋白質溶液0.5 mlに発色試薬2.0 mlを加え25℃、10分間反応させ、試薬盲検を対照

にBPB 600 nm、BCG 620 nmおよびBCP 590 nmで吸光度を測定した。試薬盲検は精製水0.5 mlに発色試薬2.0 mlを加え調製した。吸光度は日立臨床検査用分光光度計7011で測定した。

III. 実験結果

1. 発色と反応溶液pHとの関係

Fig. 1~3はpH1.04~12.90における各色素によるHSA、BSAおよびEGAを含む試験溶液の発色の吸光度を示している。いずれの色素においても発色の吸光度はpHに依存し、正值のみをとるBPBとEGAとの反応を別とすれば、酸性側pH領域で正值、アルカリ性側pH領域で負値となった。

Table 1 The pH where the absorbance reached a maximum value in the reactions of the three dyes with the HSA, BSA and EGA

Protein	pH		
	BPB	BCG	BCP
HSA	3.0	3.6	5.2
BSA	3.0	3.6	4.0
EGA	2.4	3.6	4.0

The absorbance was measured at 600 nm for BPB, 620 nm for BCG and 590 nm for BCP against a reagent blank.

Table 2 The apparent molar absorptivity of the colored product at the pH where the apparent absorbance reached a maximum value

Protein	Molar absorptivity		
	BPB	BCG	BCP
HSA	1.43×10^5	5.54×10^4	2.54×10^4
BSA	1.52×10^5	5.78×10^4	6.56×10^3
EGA	5.61×10^4	1.04×10^4	8.45×10^3

Molar absorptivity: $l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$

Table 3 The absorption maximum of the colored product formed in the reaction of the three dyes with the three different albumins

Protein	Absorption maximum/nm		
	BPB	BCG	BCP
HSA	605	630	605
BSA	605	630	610
EGA	610	635	590

た。各蛋白質の反応の特性はTable 1~3にまとめた。Table 1は各蛋白質の発色が最大に達するpH (pH_{max})を示している。BPBの pH_{max} はBSAとHSAでは $pH3.0$ で一致していたが、EGAでは $pH2.4$ と異なっていた。BCGの pH_{max} はアルブミンの生物種によらず $pH3.6$ であった。BCPの pH_{max} はBSAとEGAでは $pH4.0$ でHSAの $pH5.2$ とは異なっていた。Table 2は pH_{max} における各蛋白質の発色のモル吸光係数を示している。BPBおよびBCGではBSAのモル吸光係数はHSAに近似し、EGAに比べ著しく高値であった。一方、BCPではBSAおよびEGAのモル吸光係数はHSAに比べ著しく低値であった。また、Table 3は各蛋白質の発色の吸収極大波長を示している。BPBおよびBCGではHSAとBSAは 600 nm で一致していたが、EGAは 605 nm でやや長波長であった。BCPではHSAが 605 nm 、BSAが 610 nm 、EGAが 590 nm であり、生物種により異なっていた。

2. 発色が等しくなるpH

BPBおよびBCGでは、BSAの pH_{max} はHSAと一致していたが、このpHにおける発色のモル吸光係数にはわずかな違いがあった。しかし、吸光度が正值であるpH領域では、Fig. 1~2で示した

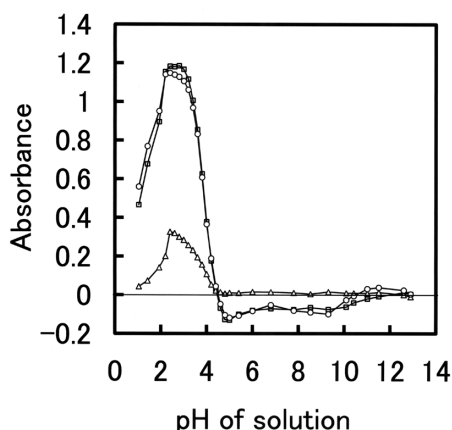


Fig. 1 Absorption spectra of the colored products formed in the reaction of BPB with the three kinds of albumins. The absorbance was recorded at 600 nm against a reagent blank. \circ : 2.0 g/l HSA, \square : 2.0 g/l BSA, \triangle : 2.0 g/l EGA.

ようにBPBにおいては $pH2.3$ 、BCGにおいては $pH2.8$ および 4.1 でBSAの発色はHSAと等しくなった。しかし、BCPではBSAとHSAの発色には著しい生物種差があり、Fig. 3のように発色が等

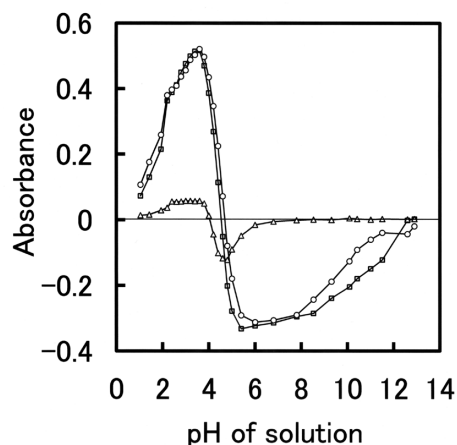


Fig. 2 Absorption spectra of the colored products formed in the reaction of BCG with the three kinds of albumins. The absorbance was recorded at 620 nm against a reagent blank. \circ : 2.0 g/l HSA, \square : 2.0 g/l BSA, \triangle : 2.0 g/l EGA.

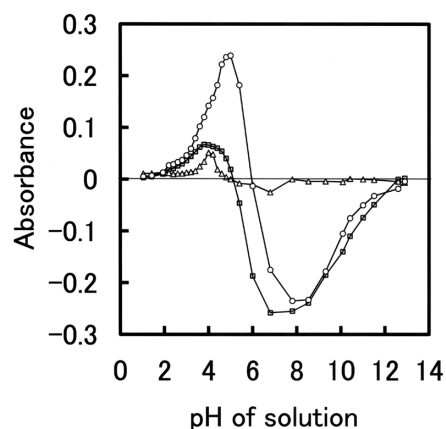


Fig. 3 Absorption spectra of the colored products formed in the reaction of BCP with the three kinds of albumins. The absorbance was recorded at 590 nm against a reagent blank. \circ : 2.0 g/l HSA, \square : 2.0 g/l BSA, \triangle : 2.0 g/l EGA.

しくなるpHは存在しなかった。一方、EGAにはHSAの発色が等しくなるpHはいずれの色素にも存在しなかった。これらの結果から、BSAはBCPによる測定で、EGAはいずれの色素による測定でもHSAの代用検量物質として使用できないことがわかった。

3. BSAとHSAの発色差の特性

BSAの発色がHSAと等しくなるpHが存在するBCGおよびBPBを対象にHSAとBSAの発色差と発色試薬処方（pH、色素濃度および緩衝溶液濃度）との関係についてさらに検討した。

Fig. 4はBCG試薬中の緩衝溶液濃度を20 v/v%、pHを2.8、3.0、3.2としたときのHSAとBSAとの発色差（ $\Delta E = E_{HSA} - E_{BSA}$ ）と色素濃度との関係を示している。両蛋白質の発色差は色素濃度およびpHにより変化した。発色はいずれのpHでも色素濃度の低い領域においてはHSA > BSAであったが、色素濃度の高い領域においてはHSA < BSAとなり、色素濃度の増加により両蛋白質の発色の大きさは逆転した。両蛋白質の発色が等しくなる発色試薬中の色素濃度はpH2.8で0.040

mmol/l、pH3.0で0.037 mmol/l、pH3.2で0.040 mmol/lであった。

Fig. 5はpH2.8、3.0、3.2においてHSAとBSAの発色が等しくなるBCG試薬中の色素濃度と緩衝溶液濃度との関係を示している。両蛋白質の発色が等しくなる色素濃度は緩衝溶液濃度が高くなるほど大きくなり、緩衝溶液濃度が40 v/v%の場合、pH2.8で0.091 mmol/l、pH3.0で0.050 mmol/l、pH3.2で0.055 mmol/l、緩衝溶液濃度が60 v/v%の場合、pH2.8で0.150 mmol/l、pH3.0で0.072 mmol/l、pH3.2で0.063 mmol/l、緩衝溶液濃度が80 v/v%の場合、pH2.8では両蛋白質の発色が等しくなる色素濃度は存在せず、pH3.0で0.090 mmol/l、pH3.2で0.074 mmol/lであった。

Fig. 6はBPB試薬中の緩衝溶液濃度を20 v/v%、pHを2.2、2.4、2.6としたときのHSAとBSAとの発色差（ $\Delta E = E_{HSA} - E_{BSA}$ ）と色素濃度との関係を示している。両蛋白質の発色差は色素濃度およびpHにより変化した。発色は、色素濃度が0.02 mmol/lでpH2.2-2.4の反応を別にする、色素濃度の低い領域においてはHSA < BSAであったが、色素濃度の高い領域においてはHSA > BSAとな

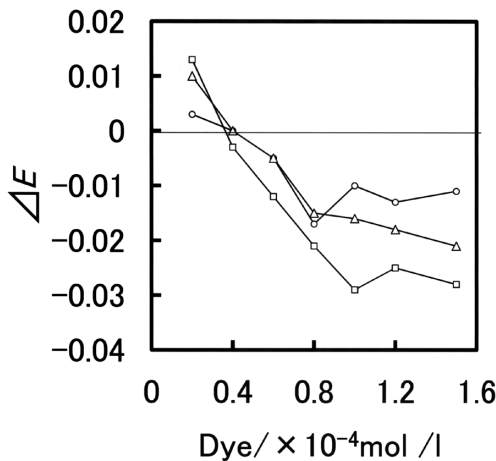


Fig. 4 Relationship between the absorbance difference and the BCG concentration in the color reagent. The absorbance was recorded at 620 nm against a reagent blank. E_{HSA} , E_{BSA} and ΔE indicate the absorbance of HSA, the absorbance of BSA and the absorbance difference ($\Delta E = E_{HSA} - E_{BSA}$), respectively. The buffer volume in the color reagent was 20 v/v%. ○: pH 2.8, □: pH 3.0, △: pH 3.2.

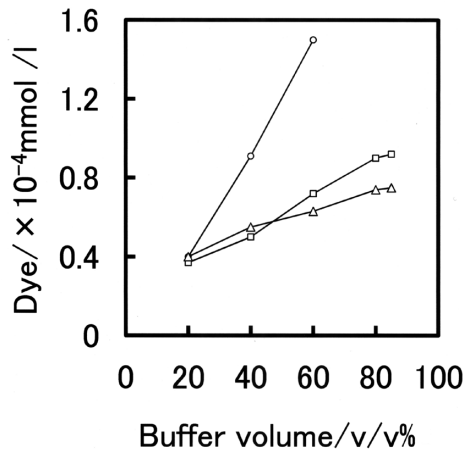


Fig. 5 Relationship between the dye and buffer concentrations in the BCG color reagent at which the color development of HSA and BSA was equal. The absorbance was recorded at 620 nm against a reagent blank. ○: pH 2.8, □: pH 3.0, △: pH 3.2.

り、色素濃度の増加により両蛋白質の発色の大きさは逆転した。両蛋白質の発色が等しくなる色素濃度はpH2.2で0.081 mmol/l、pH2.4で0.075 mmol/l、pH2.6で0.077 mmol/lであった。BPBの場合、緩衝溶液濃度が40 v/v%以上になると、両蛋白質の発色は色素濃度によらずHSA>BSAとなり、両蛋白質の発色が等しくなる色素濃度はいずれのpHにおいても存在しなかった。

4. 発色が等しくなる試薬処方

HSAとBSAの発色が等しくなるBCG試薬 (pH3.2、色素濃度0.055 mmol/l、緩衝溶液濃度40 v/v%) およびBPB試薬 (pH2.6、色素濃度0.077 mmol/l、緩衝溶液濃度20 v/v%) を調製し、発色と蛋白質濃度との関係を検討し、Fig. 7にその結果を示した。両蛋白質の発色と蛋白質濃度との関係は選定した条件下においてほぼ一致し、BSAはBPBおよびBCGにおけるHSAの代用検量物質として利用できる特性を有している。

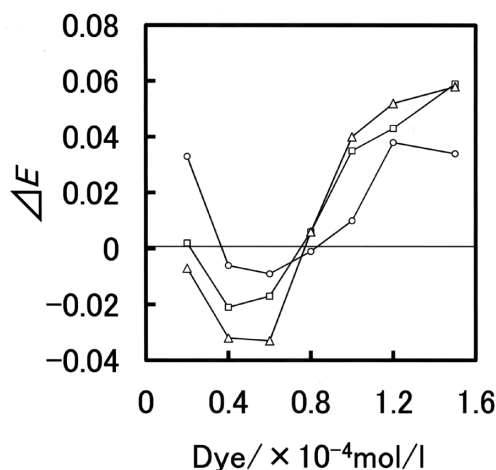


Fig. 6 Relationship between the absorbance difference and the BPB concentration in the color reagent. The absorbance was recorded at 600 nm against a reagent blank. E_{HSA} , E_{BSA} and ΔE indicate the absorbance of HSA, the absorbance of BSA and the absorbance difference ($\Delta E = E_{HSA} - E_{BSA}$), respectively. The buffer volume in the color reagent was 20v/v%. ○: pH2.2, □: pH 2.4, △: pH 2.6.

Ⅳ. 考察

3種類のスルホンフタレイン系pH指示薬とHSA、BSAおよびEGAとの反応において、発色体を含む試験溶液の吸光度は、BPBとEGAの反応を除くすべての反応でpHの上昇とともに正值から負値になる共通の特性を示した。吸光度が負値になることは、測定波長における試験溶液の吸光度が試薬盲検のそれよりも低くなることを示している。pHの上昇とともに発色の吸光度が正值から負値に変化するかどうかは、反応で生成する発色体の色素蛋白質複合体と解離型色素陰イオンの測定波長におけるモル吸光係数の大小関係に依存することが示されている⁹⁻¹⁰⁾。それによると、モル吸光係数の大きさは吸光度が負値を示す反応では色素蛋白質複合体<解離型色素陰イオン、吸光度が負値を示さない反応では色素蛋白質複合体≧解離型色素陰イオンであ

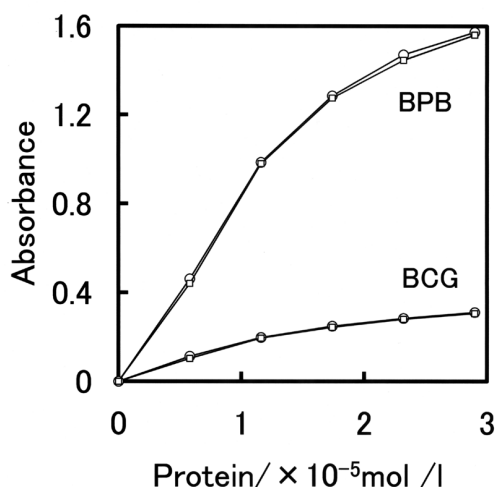


Fig. 7 Calibration curve when the color reagents whose reactivity with HSA and BSA is equal are used. The BCG reagent was prepared by mixing 40 ml of the buffer (pH3.2) and 5.5 ml of the BCG solution (1mmol/l), and then diluting this to 100 ml with water. The BPB reagent was prepared by mixing 20 ml of the buffer (pH2.6) and 7.7 ml of the BPB solution (1mmol/l), and then diluting this to 100 ml with water. ○: HSA, □: BSA

る。実験で示したBPBとEGAとの反応は、吸光度が負値を示さない唯一の例であり、モル吸光係数が色素蛋白質複合体 \geq 解離型色素陰イオンの反応と判断される。

他生物種のアルブミンをHSAの代用検量物質として用いる際には、HSAと他生物種のアルブミンの発色が等しくなる反応条件について精査する必要がある。反応条件が適切に選定されていない場合には、実験結果からも明らかなようにHSAとBSAには発色差が生じるはずである。村本は、HSAとBSAの発色が等しくなる反応条件が選定されていないことを窺わせる現象を市販BCG試薬に見出している⁹⁾。それによると市販BCG試薬には発色がHSA>BSAになるものと、HSA<BSAになるものがあるという。このようなBSAの発色がHSAの発色よりも高くなる現象や低くなる現象は、Fig. 4~6から明らかなように発色試薬のpH、色素濃度および緩衝溶液濃度の選定如何で起こることが理解される。このような同一色素であってもHSAとBSAの発色が発色試薬のpH、色素濃度および緩衝溶液濃度の選定如何により違ってくることが、反応の平衡定数や生成する色素蛋白質複合体のモル吸光係数のわずかな違いにより生じることが化学平衡に基づく解析からも明らかにされている^{13,14)}。このように村本が指摘した市販BCG試薬に見られるHSAとBSAの発色差に関する現象は、pH、色素濃度、緩衝溶液濃度の異なる試薬処方条件下でHSAとBSAが示すと予想される当然の結果の一部と推定され、その理由は今回の実験結果から十分に説明される。

実験で示したように、BPBおよびBCGではHSAとBSAの発色が等しくなる反応条件が存在していたが、色素濃度の増加に対するHSAとBSAの発色の大小関係の変化はBPBとBCGでは異なっていた。発色強度は低色素濃度領域ではBPBがHSA<BSA、BCGがHSA>BSA、一方、高色素濃度領域ではBPBがHSA>BSA、BCGがHSA<BSAであり、BPBとBCGの反応性の変化はまったく逆であった。このような変化は、BCGについては反応の平衡定数や発色体のモル吸光係数の違い、すなわち平衡定数についてはHSA>BSA、モル吸光定数についてはHSA<BSAと仮定することにより説明できることが既に報告されている¹⁴⁾。しかし、生物種の異なる

アルブミンの発色が等しくなる試薬処方が存在する必要条件については提示されていない。この点については今後さらに化学平衡に基づく解析を進め報告する予定である。

V. 結語

色素結合法 (BPB、BCG、BCP) におけるHSA、BSAおよびEGAの発色およびHSAの代用検量物質としての適用性について検討した。BPBおよびBCGでは、BSAがHSAと等しい発色を示す試薬処方が存在し、BSAはHSAの代用検量物質として使用できる。一方、EGAではいずれの色素においてもHSAの発色と等しくなる試薬処方は見出せなかった。

(本論文の一部は2003年5月、第64回分析化学討論会、2005年9月、日本分析化学会第54年会および2006年5月、第55回日本医学検査学会において発表した)

文献

- 1) Scheurlen PG: Untersuchungen Über Eine Quantitative Eiweissbestimmung. Clin Chim Acta, 4: 760-766, 1959.
- 2) Doumas BT, Watson WA and Biggs HG: Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. Clin Chim Acta, 31: 87-96, 1971.
- 3) 岡村研太郎: ブロムクレゾールパープルを用いる血清アルブミンの定量. 臨床検査, 18: 646~650, 1974.
- 4) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 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.
- 5) 水田 亘, 熊川 至, 福田勝宏, 山道 宏: セルロースアセテート膜電気泳動法のスクリーニングとしての血清アルブミンの色素定量法. 臨床病理, 23: 884-888, 1975.
- 6) 吉田真理子, 浅井正樹, 中根清司: ブロムクレゾールパープルによる血清アルブミンの定量法. 衛生検査, 27: 1059-1064, 1978.
- 7) 吉本 茂, 伊折一美, 栢森裕三, 片山善章: 血清アルブミン測定の現状と問題点. 生物試料分析, 24: 537-544, 2001.
- 8) 村本良三: 血清アルブミン定量法. 臨床検査, 48: 105-112, 2001.
- 9) Suzuki Y: Chemical equilibrium of protein error of pH indicators: analysis of its spectral characteristics by spectrophotometry. J Anal Bio-Sci, 24: 150-158, 2001.

- 10) 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*, 17: 1263-1268, 2001.
- 11) Suzuki Y: Effects of dye and protein concentrations on the pH at which color intensity reaches maximum in a dye-binding method for determining serum protein: theoretical analysis based on the chemical equilibrium of protein error. *J Anal Bio-Sci*, 26: 441-446, 2003.
- 12) Suzuki Y: Theoretical analysis concerning the characteristics of a dye-binding method for determining serum protein based on protein error of pH indicator: effect of buffer concentration of the color reagent on the color development. *Anal Sci*, 21: 83-88, 2005.
- 13) 鈴木優治: ブロムクレゾールパープルの蛋白誤差の化学特性に関する検討-蛋白誤差の化学平衡から見たヒトアルブミンとウシアルブミン間に著しい反応差を引き起こす要因. *医学検査*, 52: 1255-1260, 2003.
- 14) 鈴木優治: 市販ブロムクレゾールグリーン試薬におけるヒトアルブミンとウシアルブミンの発色比に関する化学平衡論的解析. *医学検査*, 54: 961-968, 2005.