

〈原著〉

逆性石鹼とCoomassie Brilliant Blue G-250との反応： 尿検査への応用

鈴木 優治

Reaction between cationic detergent and Coomassie Brilliant Blue G-250: application to urinalysis

Yuji Suzuki

Summary In the qualitative test for urine protein by a test strip, a false-positive reaction due to a cationic detergent is well known. A method which can discriminate a false-positive reaction was studied, using CBB G-250 reagent and benzalkonium chloride. At pH 11, benzalkonium chloride gave a pink color with an absorption maximum at 540 nm, but HSA did not produce any colored product by the CBB G-250 reagent. It is found that the difference in this color development by the CBB G-250 reagent can be used to discriminate a false-positive reaction due to cationic detergent.

Key words: Discrimination, Urine protein, False-positive reaction, Benzalkonium chloride, Coomassie brilliant blue G-250

I. 緒言

pH指示薬の蛋白誤差を利用した試験紙法による尿蛋白質定性検査では、さまざまな物質が誤差発生に関与する^{1,2)}。消毒薬の逆性石鹼の成分である陽イオン性界面活性剤による偽陽性反応はその一つである^{3,4)}。前報において、逆性石鹼の成分である塩化ベンザルコニウムとpH指示薬のプロムフェノールブルー（BPB）が結合し生成する青色発色体の分光学的な特性⁵⁾およびその知見に基づく塩化ベンザルコニウムに起因する偽陽性反応のBPBによる識別方法⁶⁾について報告した。この物質による偽陽性反応を確実に識別

することは尿蛋白質定性検査成績の信頼性を高めることにつながるものと考えられる。

Coomassie Brilliant Blue G-250（CBB G-250）は尿蛋白質定量¹⁰⁾や蛋白質の電気泳動染色¹¹⁾に用いられているが、陽イオン性界面活性剤とも反応し発色体を生成する。生成する発色体の分光学的特性は、低pH領域ではヒト血清アルブミンの発色体と類似しているが、高pH領域では著しく異なることが確認された。そこで、本論文では試験紙上の発色が塩化ベンザルコニウムに起因する偽陽性反応であるかどうかの識別にCBB G-250が有用であることを報告する。

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25年5月21日

受理日 平成25年6月11日

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

II. 実験方法

1. 試薬

測定試薬は和光純薬から購入した製品を用いて調製した。

緩衝溶液 (pH 5.2、pH 11.0、pH 12.0) : pH 5.2の緩衝溶液は0.1 mol/Lクエン酸溶液と0.2 mol/Lリン酸水素二ナトリウム溶液を混合して調製した。pH 11.0および12.0の緩衝溶液は0.1 mol/Lグリシン溶液 (NaClを0.1 mol/Lの濃度で含む) と0.1 mol/L NaOH溶液を混合して調製した。pH 1.0は塩酸溶液により、pH 13.5および14.2は水酸化ナトリウム溶液により調整した。pHは東亜化学工業HM-30pHメータにより測定した。

0.2 mmol/L CBB G-250溶液: CBB G-250を0.171 gとり精製水に溶解し全量を1000 mLとした。

CBB G-250試薬: 緩衝溶液20 mLに0.2 mmol/L CBB G-250溶液10 mLを加え精製水で全量を100 mLとした。

1 g/L陽イオン性界面活性剤溶液: 塩化ベンザルコニウムを1 gとり精製水に溶解して1000 mLとした。

2 g/Lヒト血清アルブミン溶液: ヒト血清アル

ブミン (HSA) 200 mgを精製水に溶解して100 mLとした。

2. 測定操作

精製水1.0 mLまたはHSA溶液1.0 mLまたは塩化ベンザルコニウム溶液1.0 mLにCBB G-250試薬4.0 mLを加えよく混合し、25℃で10分間反応させた後に、精製水を対照として吸収スペクトルを日立臨床検査用分光光度計7012により測定した。

III. 結果

1. HSAおよび塩化ベンザルコニウムの発色

臨床応用されているCBB G-250による蛋白質測定は、低pH条件下において発色試薬が蛋白質により赤色から青色へ変化することを利用して、Fig. 1~Fig. 5はpH 1.0~pH 14.2におけるHSAおよび塩化ベンザルコニウムとCBB G-250との反応溶液の吸収スペクトルを示している。pH 1.0ではFig. 1のようにHSAと塩化ベンザルコニウムは600 nm付近に吸収極大波長を有する、類似する吸収スペクトルを示す発色体を生成した。pH 5.2ではFig. 2のように両物質の反応溶液

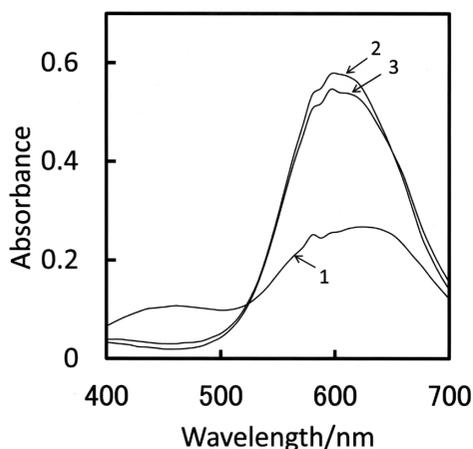


Fig. 1 Color development of human serum albumin and benzalkonium chloride at pH1.0.
The absorption spectra were measured against water.
1: reagent blank, 2: 1 g/L human serum albumin, 3: 0.3 g/L benzalkonium chloride

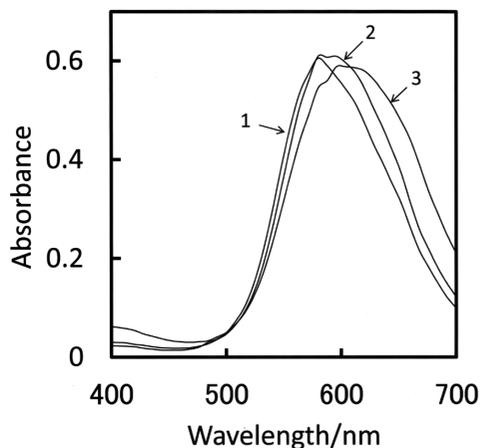


Fig. 2 Color development of human serum albumin and benzalkonium chloride at pH5.2.
The absorption spectra were measured against water.
1: reagent blank, 2: 1g/L human serum albumin, 3: 0.3 g/L benzalkonium chloride

と試薬盲検の吸収スペクトルは類似しており、色調に著しい違いはなかった。しかし、pH 11.0ではFig. 3のように両物質の反応には著しい違いが認められた。HSAでは青色のCBB G-250試薬

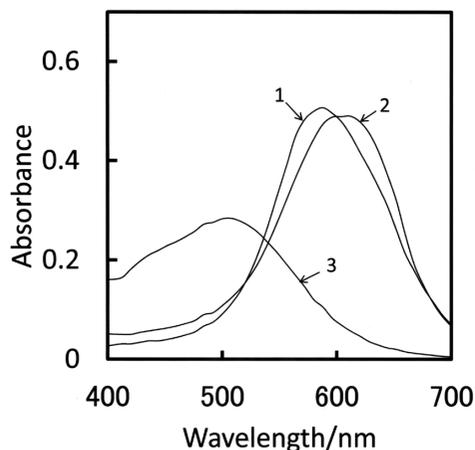


Fig. 3 Color development of human serum albumin and benzalkonium chloride at pH11.0. The absorption spectra were measured against water. 1: reagent blank, 2: 1 g/L human serum albumin, 3: 0.3 g/L benzalkonium chloride

は色調変化をほとんど起こさなかったが、塩化ベンザルコニウムでは510 nm付近に吸収極大波長を有する紅色の発色体が生成した。同様な反応はpH 12.0においても認められた。一方、pHが13.5~14.2に上昇すると、Fig. 4~5のように試薬盲検、HSAおよび塩化ベンザルコニウムの反応溶液のすべてが510 nm付近に吸収極大波長を示す紅色に変化した。

2. 発色の安定性

CBB G-250と塩化ベンザルコニウムとの反応で生成した紅色発色体は反応後にわずかに濁りを生じたが、24時間後においても退色は認められなかった。

3. 共存成分の発色

尿中成分であるクレアチニン、尿素、馬尿酸ナトリウム、クエン酸3ナトリウム、塩化ナトリウムとCBB G-250との反応について検討した。これらの物質は、Fig. 6のようにpH 11.0においては塩化ベンザルコニウムとは異なりCBB G-250試薬の色調を変化させることはなかった。

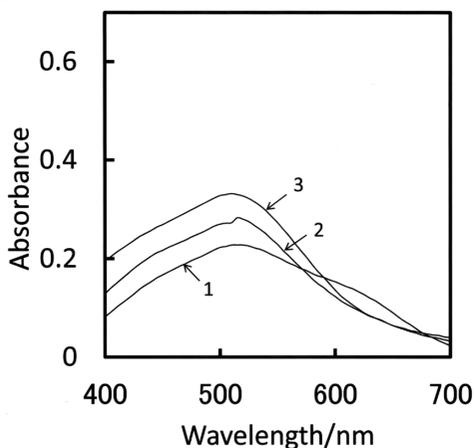


Fig. 4 Color development of human serum albumin and benzalkonium chloride at pH13.5. The absorption spectra were measured against water. 1: reagent blank, 2: 1 g/L human serum albumin, 3: 0.3 g/L benzalkonium chloride

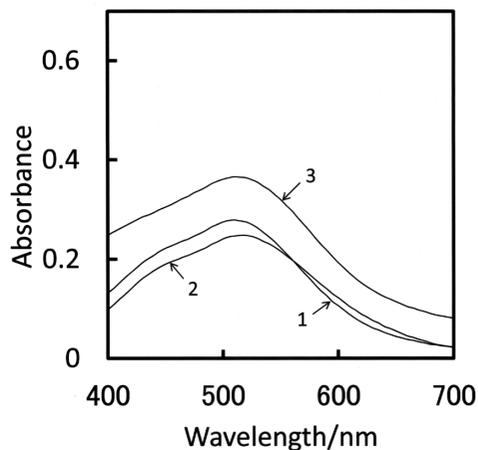


Fig. 5 Color development of human serum albumin and benzalkonium chloride at pH14.2. The absorption spectra were measured against water. 1: reagent blank, 2: 1 g/L human serum albumin, 3: 0.3 g/L benzalkonium chloride

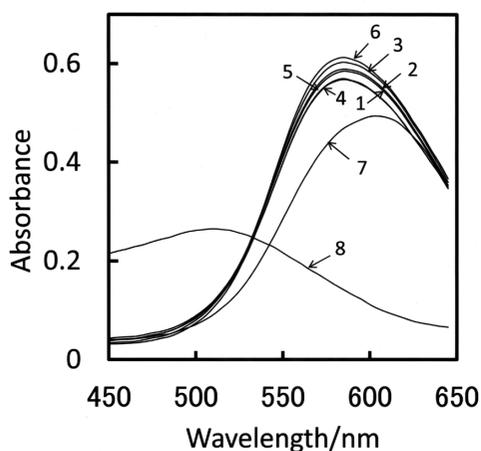


Fig. 6 Color development of the coexisting substances in urine at pH11.0.

The absorption spectra were measured against water.

1: reagent blank, 2: 0.1 mol/L urea, 3: 0.1 mol/L creatinin, 4: 0.1 mol/L sodium chloride, 5: 0.1 mol/L trisodium citrate, 6: 0.1 mol/L sodium hyppurate, 7: 2 g/L human serum albumin, 8: 0.1 g/L benzalkonium chloride

4. 検出限界濃度

試料中濃度を塩化ベンザルコニウムが0.01~0.1 g/L、HSAが0.1~5 g/Lとして検出限界濃度について検討した。目視による検出限界濃度は塩化ベンザルコニウムが0.03~0.04 g/Lであったが、HSAは5 g/Lでも塩化ベンザルコニウムとは異なり紅色に変化することはなかった。

IV. 考察

市販の逆性石鹼は塩化ベンザルコニウムを10~50%含み、0.01~0.02%溶液として使用される。適用対象は多岐に亘り、尿もこの物質により汚染される可能性がある。使用時の濃度でも市販試験紙は明らかに偽陽性反応を示す。したがって、この物質による偽陽性反応を識別する方法が必要である。

試験紙法における塩化ベンザルコニウムの発色はHSAの発色と極めて類似性が高く、両者を肉眼的に識別することは難しい。先に報告した

BPBを用いる方法は、①発色後の混濁の生成の有無、②NaClによる発色の低下度の相違、③pH 12.9における発色体生成の有無から識別する。①~③の反応特性における分光学的変化はHSAと塩化ベンザルコニウムの発色の吸収極大波長に著しい相違がないため、色調変化は肉眼だけでなく分光光度計による確認も必要である。

一方、pH 11.0のCBB G-250試薬による反応では、試験溶液の吸収極大波長はHSAが600 nmであるのに対して塩化ベンザルコニウムが510 nmである。塩化ベンザルコニウムによる発色試薬の青色から紅色への変化は0.03-0.04 g/Lの濃度まで肉眼的に一目で容易に識別できる特異性の高い反応である。以上の結果から、pH 11.0のCBB G-250試薬と塩化ベンザルコニウムとの反応は、試験紙法による尿蛋白質定性検査における塩化ベンザルコニウムによる偽陽性反応を確実に識別するための方法として応用できる。

V. 結語

pH11.0においてCBB G-250は塩化ベンザルコニウムと結合し紅色に変化するが、HSAとの反応では色調変化を起こさない。このCBB G-250の青色から紅色への色調変化は試験紙法における塩化ベンザルコニウムによる偽陽性反応であるかどうかの識別に有用である。

(本論文の一部は2013年5月、第62回日本医学検査学会において発表した)

文献

- 1) 金井正光: "臨床検査法提要" 32版, p.169 (2005), (金原出版)
- 2) 伊藤機一: 簡易検査法 (特に尿試験紙によるテスト) - なにを使って、なにを測るか. その測定原理-. 日本臨床, 40(秋季臨時増刊号): 1096-1112, 1982.
- 3) 青木哲雄, 下の園一郎: 尿試験紙法に及ぼす薬剤の影響. 衛生検査, 26: 1117-1124, 1977.
- 4) 岩瀬正子: 尿タンパク1. Medical Technology, 8: 1343-1349, 1980.
- 5) 富田 仁: 試験紙法による尿蛋白測定. 検査と技術, 10: 721-725, 1982.
- 6) 鈴木優治: 試験紙法による尿蛋白質定性検査におけるpH変化による測定誤差. 分析化学, 57: 755-762.

- 2008.
- 7) 鈴木優治: 試験紙法による尿蛋白質定性検査における検出系pHの変動成分およびその発色への影響. 医学検査, 57: 1239-1246, 2008.
- 8) 鈴木優治: 尿蛋白質定性試験紙法における逆性石鹼による偽陽性反応の特性に関する分光学的研究. 医学検査, 61: 857-864, 2012.
- 9) 鈴木優治: 試験紙法による尿蛋白質定性検査における逆性石鹼による偽陽性の確認方法. 医学検査, 62: 426-429, 2013.
- 10) 金森きよ子, 佐野紀代子: Coomassie Brilliant Blue G250による蛋白定量-基礎的検討と髄液蛋白定量. 臨床病理, 28: 235-238, 1980.
- 11) 佐野紀代子, 金森きよ子, 中尾 真, 中嶋克行, 小平 司: 尿中スルホサリチル酸可溶性ムコ蛋白の簡便な定量法. 臨床病理, 31: 741-744, 1983.