

〈特集：検査技術の新たな展望（3）〉

尿蛋白測定試薬 シグナスオートU-TPの高感度技術

日暮 麻美、芳村 一

Cygnus Auto U-TP: A new sensitive kit to detect urinary protein

Asami Higurashi and Hajime Yoshimura

Summary The detection of protein in urine is useful for the early diagnosis of chronic kidney disease. In our previous work, we developed a rapid yet sensitive method for the measurement of urinary protein using Erythrosin B and an automated analyzer. A buffer agent (pH 2.3), surfactants, and Erythrosin B are added to a urine sample. Spectrophotometric measurements of the dye-bound protein are made at 546 nm with a HITACHI 7170S automated analyzer. Our method is applicable in the range from 4 mg/L up to 2,000 mg/L, and the results are not compromised by co-existing substances in urine. The results of our method correlate well with those of the Pyrogallol Red method ($y=1.15x-8.4$, $r=0.995$). A comparison was made between our method, turbidimetric immunoassay, and size exclusion chromatography. The highly sensitive, rapid, accurate and cost-effective mass screening of urinary protein was shown to be possible with the use of our new Cygnus Auto U-TP kit.

Key words: Erythrosin B, Urinary protein, Chronic kidney disease, Mass screening, High sensitivity

I. 緒言

尿蛋白は、古くから腎障害の指標として測定されてきた長い歴史のある検査項目であり、さらに近年では、2002年に米国腎臓財団より提唱された慢性腎臓病という新しい腎臓病の概念のもとに、それを鋭敏に捉えるためのマーカーとして再び注目を集めている¹⁾。

慢性腎臓病は緩慢に経過する腎臓病のことを指し、原疾患によらず、『糸球体濾過量 (GFR) で表される腎機能の低下 (60 mL/min /1.73 m²以

下)』か、『尿異常、画像診断、血液、病理で腎障害の存在が明らか。特に、0.15 g/g・CRE以上の蛋白尿 (30 mg/g・CRE以上のアルブミン尿) の存在が重要』のいずれか、あるいは両方が3ヶ月以上持続することで診断される^{1,2)}。慢性腎臓病では、ゆるやかな進行と自覚症状の乏しさに加え、早期発見のための検査が一般的に行われていないことが発見を遅れがちにし、透析導入患者数の増加に拍車をかけている。我が国における透析患者数は毎年数千人単位で増加しており、2012年には31万人を突破した³⁾。また、透

株式会社シノテスト 研究開発部
〒252-0331 神奈川県相模原市南区大野台2-29-14

Shino-Test Corporation
2-29-14 Oonodai, Minami-ku, Sagami-hara, Kanagawa
252-0331, Japan

析の原疾患では、生活習慣病に伴う糖尿病性腎症と腎硬化症の割合が増加しており、今後も透析患者数が増加することは予想に難くない。

慢性腎臓病のうち、特に糖尿病性腎症に代表される糸球体疾患では、尿中に漏出するアルブミンを捉えることが早期発見につながるとされている⁴⁾。尿蛋白の検出に関わる既存の検査は、免疫比濁法を主流とする尿アルブミン検査と、色素法を主流とする尿蛋白検査（アルブミンを含めた総蛋白）に分かれており、健康診断などでスクリーニングとして広く用いられるのは尿蛋白検査である。尿蛋白検査は色素法を原理とすることで、尿蛋白試験紙のように簡便かつリーズナブルな検査を提供できることが特徴であるが、測定感度の悪さから疾患の早期発見は難しい。さらに試験紙法の運用についても、簡易な反面、尿の濃淡や環境および人による差を受けやすい為、判定の精度を確保するために検査条件の管理が重要となる⁵⁾。

これと対極的な検査が、抗原抗体反応を原理とする尿アルブミン検査である。こちらは高感度且つ特異的にアルブミンを検出できる為、疾患早期の、ごく低濃度のアルブミン尿から鋭敏に捉えることが可能である。しかし、抗原抗体反応を用いるが故のコストの問題があり、検査対象は糖尿病患者であり合併症の腎症が疑われる場合のみに限定されるのが現状である。

本検討では、現在の尿蛋白と尿アルブミン検査との間に生まれた、『高感度・安価な検査』というニーズにこたえる製品開発を目的とし、これを達成する測定法として色素エリスロシンBと蛋白の結合反応（以下エリスロシンB法）を選択した。エリスロシンB法は1994年にSoedjak⁶⁾により原法が報告されて以降、東北大学の金子ら⁷⁾により測定感度の大幅な向上と実用上の問題点を解決した改良法が考案され、尿蛋白測定への適用が現実的なものとなった。我々はエリスロシンB法を測定原理とした、臨床化学自動分析装置（以下、自動分析装置）へ適用可能な尿蛋白検査キット『シグナスオートU-TP』を開発することで、これまでになかった尿蛋白検査の提供を目指した。

本報告では、シグナスオートU-TP（以下、本製品）の高感度化に関わる技術を中心に、開発から得られた知見および試薬の基礎的なデータ、

また、既存法とのクロスチェックについて報告する。

Ⅱ. 方法と材料

1. 試薬

本製品は、緩衝液および界面活性剤からなる第1試薬と、色素溶液からなる第2試薬により構成される。

第1試薬：国産化学（株）製のクエン酸一水塩42.03 gと、ナカライテスク（株）製のTritonX-100を0.25 g、それぞれ分取したものを純水に溶解し、4規定の水酸化ナトリウムを滴下してpH 2.3に調整後、純水で全量1 Lとした。

第2試薬：和光純薬工業（株）製のErythrosin Bを0.1759 gと、MP Biomedicals製のTris-[hydroxymethyl] aminomethane (TRIS) 0.6057gを水に溶解し、1規定の塩酸を用いてpH 7.5に調整後、純水で全量1 Lとした。調製後の試液は、それぞれ遮光ボトルにて冷蔵保管した。

クロスチェックでは、和光純薬工業（株）製の、ピロガロールレッド-Mo錯体法（以下ピロガロールレッド法）を測定原理とするマイクロTPテストワコー、および、抗ヒトアルブミン抗体による免疫比濁法を原理とするオートワコーマイクロアルブミン（以下、免疫比濁法）を用いた。尿蛋白試験紙および尿アルブミン定性キットには、和光純薬工業（株）製のプレテスト3all、栄研化学（株）製のウロペーパーⅢA、SIEMENS製のアルブスティックおよびクリニテックマイクロアルブ・クレアチニンテスト、（株）三和化学研究所製のスマイテスト [アルブミン] スティック、ロシュ ダイアグノスティックス（株）製のBMテスト MAU II を使い、判定は各々目視で行った。

各蛋白の反応性評価には、和光純薬工業(株)製のヒト血清アルブミン (Fraction V)、Sigma-Aldrich製の γ -グロブリン (ヒト血液由来)、 β 2-ミクログロブリン (ヒト尿由来)、レチノール結合蛋白 (ヒト尿由来)、 α 1-酸性糖蛋白 (ヒト血漿由来)、 α 1-アンチトリプシン (ヒト血漿由来)、トランスフェリン (ヒト由来)、AbD Serotec製の α 1-ミクログロブリン (ヒト由来)、Nordic Immunological Labs製のベンスジョーンズ蛋白 (λ , κ) (from human)、Harbor Bio製

のTamm-Horsfall 蛋白（ヒト由来）を用いた。凍結乾燥品については生理食塩水を用いて溶解し、それぞれ100 mg/Lとなるように調製した。尿試料は、インフォームドコンセントにより同意を得た155例を使用した。

2. 装置

尿蛋白の連続自動測定には、7170S形日立自動分析装置（日立ハイテクノロジーズ社製、処理テスト能力800テスト/時）を使用した。測定波長は主波長546 nm、副波長700 nmの2波長分析で行った。また、吸収スペクトルの測定にはV-650紫外可視分光光度計（日本分光製）を使用した。

HPLCシステムは、日本分光製のガリバーシリーズを用いた。装置の構成は、オートサンプラーAS950、ポンプPU980、オンライン脱気装置DG-980-50、カラム恒温槽CO965及び可視UV検出装置UV 970である。カラムはクロマニックテクノロジーズ社製のSunSec Diol（300mm×4.6 mm i.d.）を2本直列に繋いで600 mmとして用いた。

3. 方法

自動分析装置による測定では、37℃条件下、尿サンプル9 μ Lに、R-Iを225 μ L混合して5分

後にR-IIを45 μ L添加し、5分間発色反応を行った。なお、試料中の蛋白と色素の反応は混合後数秒で完了する。演算には、反応終了後の吸光度からR-IIが添加される前の終点の吸光度を差し引いた吸光度を用いた（2ポイントエンド法）。検量法は、生理食塩水と5濃度のアルブミン溶液の吸光度を用いたスプライン検量を採用した。

Ⅲ. 結果

1. 吸収スペクトル

本製品では、試薬の主成分であるエリスロシンBが試料中の蛋白と鋭敏に反応し、546 nmに極大吸収をもつスペクトルを描く。図1に、4濃度の試料を用いた場合の本製品の吸収スペクトルを示す。一般的な色素結合法では、ブラッドフォード法⁹⁾のように色素のみの色調（赤紫色）から色素-蛋白結合体が示す色調（青）にピークがシフトする反応を利用するが、本製品はピークシフトを伴わないことに加え、反応液そのものの吸光度（試薬ブランク）が極めて小さいことが特徴である。また、蛋白によって生じる吸光度の増加は顕著であり、図1に示した赤色の呈色は目視によっても十分に判別が可能である。

2. 界面活性剤の効果

図2に、2種類の界面活性剤の添加効果につ

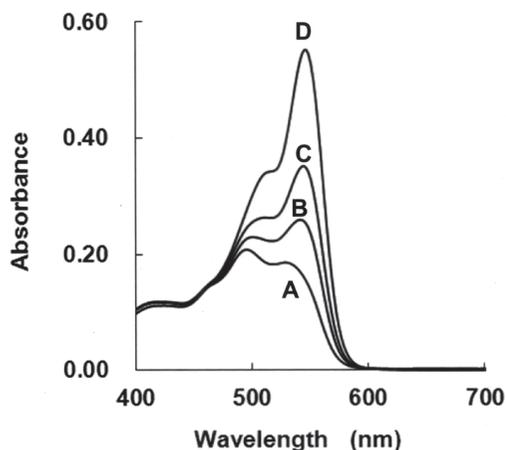


図1 吸収スペクトル（A：試薬ブランク、B：50 mg/Lアルブミン溶液、C：100 mg/Lアルブミン溶液、D：200 mg/Lアルブミン溶液）

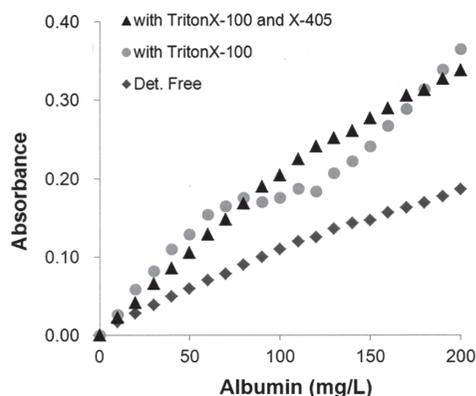


図2 2種類の界面活性剤の添加効果

いて示す。エリスロシンB法はそれ自体が高感度な蛋白検出法であるが、本製品では、2種類のTriton-Xによりさらなる高感度化を達成しており、特にTritonX-100は独創的な効果を有している⁷⁾。反応主成分であるエリスロシンBは、pH 4以下の酸性条件で溶解度が著しく低下し析出する性質を持つ。そのため、反応pHが酸性である本反応系では、界面活性剤等を用いて色素の溶解度を保つ必要がある。しかし一方で、エリスロシンB法における高感度な蛋白検出には、色素との疎水的な結合もメカニズムに含まれることが基礎検討から示唆されており、色素を完全に可溶化してしまうと、蛋白との結合反応が進行しない。そこで本製品では、TritonX-100の処方濃度を臨界ミセル濃度以下で添加することで、エリスロシンB自体の溶解と発色を抑えたまま、感度を約2倍にまで向上させることが可能となった。

次にTritonX-405の効果について述べる。上述のTritonX-100の技術により、反応液自体の発色を気にすることなく直線性向上のための色素増量が可能となった。しかし、実際に色素を増量してみると、ある蛋白濃度を越えたときに反応液中に濁りが生じ、高濃度側で定量性を確保出来ないことが判明した。さらに、この濁りはTritonX-100と蛋白によって生じることが検討結果より推察された。この問題を解決する為に、TritonX-100の効果を維持したまま濁りのみを解

消する方法を求めて、各種の界面活性剤やポリマーについて様々な濃度でスクリーニングを実施したところ、TritonX-405を0.04%という低濃度で添加することで濁り現象は解消され、試料濃度に応じた定量的な測定が可能となった。

3. 尿中物質との反応性

1) 各蛋白との反応性

本製品は色素法であり、様々な蛋白との反応性を有することが考えられた。そこで、尿へ出現する可能性のある各蛋白⁹⁾について、精製品を用いて反応性を検証した。各蛋白の精製品について、それぞれ100 mg/Lとなるように生理食塩水を用いて試料を作製し、自動分析装置による測定から得られた吸光度を、アルブミン100 mg/Lの吸光度と比較することで各蛋白の反応性とした。また、同様の検討をピロガロールレッド法でも実施し、各色素法による蛋白との反応性の差を比較した。

結果を図3に示す。本製品ではトランスフェリン、レチノール結合蛋白についてアルブミンと同程度の強度で反応するほか、ヘモグロビンではアルブミンの1.3倍、グロブリン類とはアルブミンの30~50%程度で反応することが示された。

また、ピロガロールレッド法ではトランスフェリンやレチノール結合性蛋白がアルブミンよりも強く反応するほか、グロブリン類について

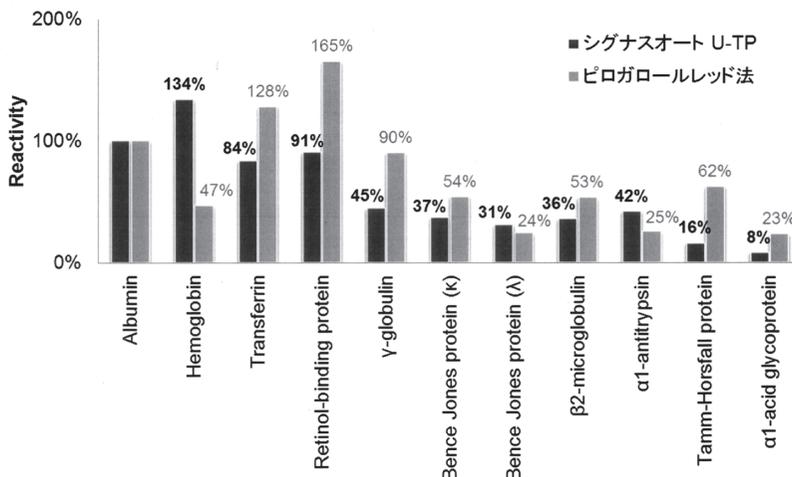


図3 各蛋白の反応性

も比較的反応性が高かった。比較検討の結果から、各色素と蛋白の親和性により反応性が異なることが確認された。

本製品について注目すべき点は、Tamm-Horsfall蛋白との反応性である。Tamm-Horsfall蛋白は尿細管に存在する糖蛋白であり、健常人尿中にも50 mg/L程度存在することが知られている^{9,10)}。そのため、これとの反応性が高いことは、それだけ偽陽性判定につながる可能性があると言える。図3の結果より、本製品の利点として、Tamm-Horsfall蛋白との反応性が低いことが示されており、より腎疾患に対する特異度の高い判定が可能であることが期待できる。

2) 共存塩類の影響

尿中の主な共存塩類による影響については、アスコルビン酸、尿素、アンモニア、リン酸、ナトリウム、カリウム、カルシウム、グリシン、クレアチニン、グルコース、クレアチンで確認し、一般的な尿中濃度において影響を認めなかった¹¹⁾。

4. 検量線

図4に、本製品とピロガロールレッド法の検量線を示す。本法はピロガロールレッド法の約10倍の感度を有しており、尿蛋白が低濃度である健常人尿についても正確な測定が可能である。しかし一方で、高濃度領域では吸光度変化量が頭打ちとなる傾向があり、直線的な検量では顕性蛋白

尿レベルの試料に対応できなかった。この解決法として、吸光度変化のカーブにフィッティングするスプライン検量法を採用することで上限2,000 mg/Lまでの定量性を確保し、極低濃度から顕性蛋白尿までカバーする測定が十分可能となった。

5. 再現性の比較

図5に、免疫比濁法、ピロガロールレッド法および本製品について、空試験および尿試料を15重測定した際の同時再現性の成績を示す。本製品は免疫比濁法と誤差範囲が同等であり、精密な測定が可能であることが示された。

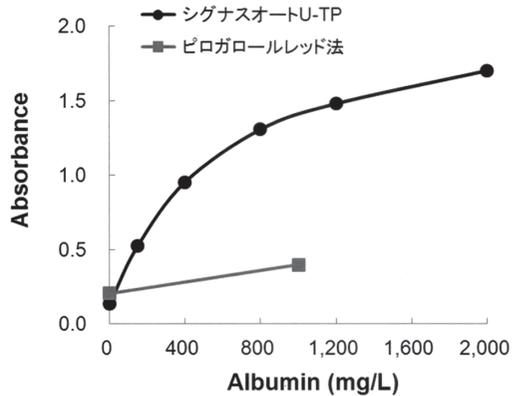


図4 キャリブレーションカーブ

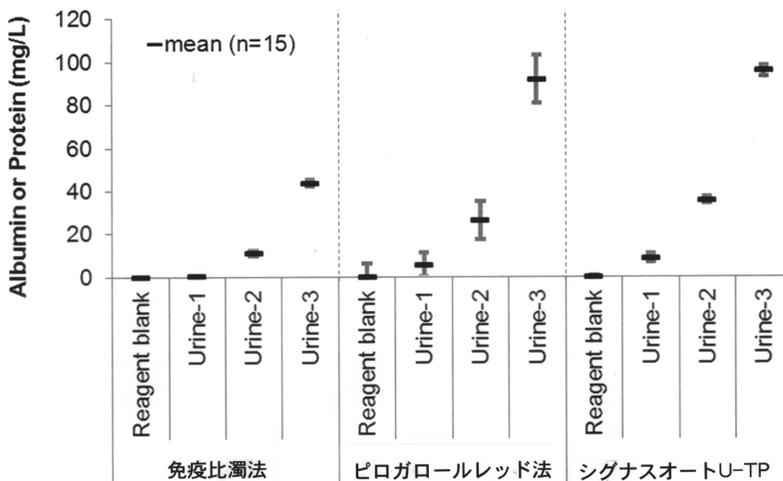


図5 同時再現性の比較 (error bar: 3S.D.)

6. クロスチェック

1) ピロガロールレッド法による尿蛋白定量値との相関

本製品とピロガロールレッド法による尿蛋白定量値の比較を図6-aに示す。155例中4例の乖離を認めているが、解析の結果、ベンスジョーンズ蛋白尿1例、蛋白の同定には至らなかったもののSDS-PAGEの結果から明らかに通常の試料と異なる泳動パターンを有するものが3例であった。これより、乖離の原因は本製品とピロガロールレッド法における各蛋白の反応性の差が関連していると考えられた。極端に乖離した4例を除外した相関は、回帰式 $y=1.15x-8.4$ 、相関係数 $r=0.995$ と良好であった。

2) 免疫比濁法によるアルブミン定量値との相関

免疫比濁法によるアルブミン定量値との相関を図6-bに示す。155例のうち大幅に乖離した1例はベンスジョーンズ蛋白尿であり、これを除外した相関は回帰式 $y=1.56x+21.9$ 、相関係数 $r=0.983$ であった。相関係数が良好ながら傾きと切片を生じる結果となった原因について、本製品では尿中のアルブミンと同様の挙動を示す蛋白も含めて反応しているためと考えられ、例えばトランスフェリン等の、糸球体疾患によって漏出する蛋白や、免疫比濁法で捕捉することができない変性アルブミンがその候補として挙げられる。

3) サイズ排除クロマトグラフィー法によるアルブミン定量値との相関

サイズ排除クロマトグラフィー法は、高速液体クロマトグラフィーにより尿試料を分子サイズ毎に分離し、紫外波長による分離ピークの検出を原理とした尿アルブミン定量法である。原法はComperらにより報告されており^{12,13)}、新たな尿アルブミン定量法として注目を集めている。

サイズ排除クロマトグラフィー法によるアルブミン定量値との相関を図6-cに示す。127例における相関の回帰式は $y=0.69x+30.0$ 、相関係数 $r=0.959$ であった。傾きと切片が生じてはいるが、相関は良好に一致した。尚、試料の中には図6-a, bで乖離例として確認されたベンスジョーンズ蛋白尿が含まれているが、図6-cでは乖離は見られなかった。

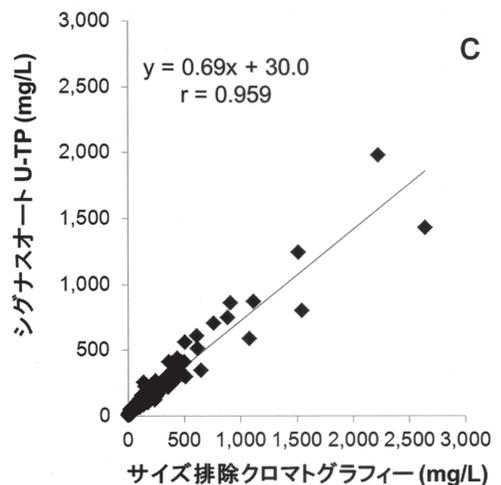
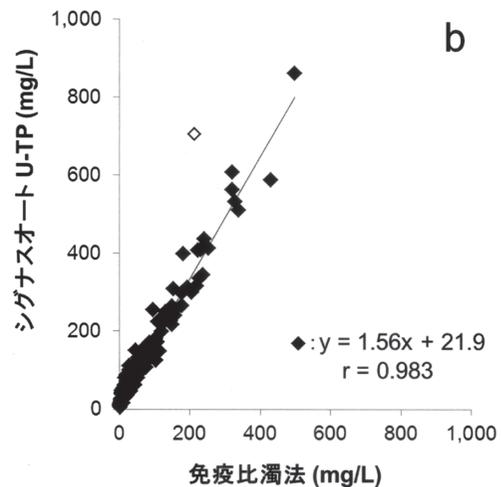
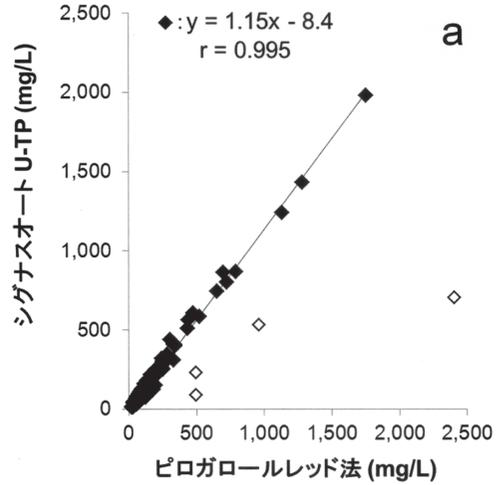


図6 クロスチェック (a: ピロガロールレッド法、b: 免疫比濁法、c: サイズ排除クロマトグラフィー法)

表1 アルブミン尿検出率の比較 (尿41例)

		有病正診率	偽陰性	無病正診率	偽陽性
尿蛋白定性キット	A社	19%	81%	100%	0%
	B社	33%	67%	100%	0%
	C社	37%	63%	100%	0%
尿アルブミン定性キット	A社	85%	15%	93%	7%
	B社	85%	15%	57%	43%
	C社	96%	4%	45%	55%
尿蛋白定量キット	ピロガロールレッド法	96%	4%	91%	9%
	シグナスオートU-TP	100%	0%	93%	7%

7. アルブミン尿スクリーニング法としての比較

本製品について、慢性腎臓病の早期スクリーニング検査法としての有用性を追求する為、尿41例を用いてアルブミン尿検出の有病および無病正診率を既存検査法と比較した。有病の定義は、クレアチニン補正後の免疫比濁法による尿アルブミン値が30 mg/g・CRE以上であることとし、本製品およびピロガロールレッド法のカットオフ値は、ROC解析の結果から60 mg/g・CREとした。

各検査法のアルブミン尿検出の有病および無病正診率を表1に示す。早期腎症の指標となるアルブミン尿の検出率は、それに必要となる感度を有していない尿蛋白試験紙では非常に低率(19~37%)であった。また、尿アルブミン定性キットは85%以上の感度を有していたが、クレアチニン補正ができないキットについては偽陰性率、偽陽性率がやや高い傾向が見られた。一方、ピロガロールレッド法と本製品では、自動分析装置による定量を行うことからクレアチニン補正が容易に得られるため、尿の濃淡の影響を受けず、有病および無病正診率について優れた結果となった。さらに本製品は、ピロガロールレッド法より約10倍の感度を有するため、最も良好な正診率が得られた。

Ⅳ. 考察

我々は、エリスロシンBを用いた色素法を原理とし、自動分析装置へ適用できる高感度な尿蛋白検出キットを開発した。本製品の最終目的は、健康診断などの大規模スクリーニングに対

応できる高感度かつ正確な尿蛋白検査の提供であり、特に健常から早期腎症における尿蛋白濃度範囲10~100 mg/Lの定量に対するニーズに応える成果である。

本製品は、尿アルブミンの測定に用いられる免疫比濁法と同等の感度を有し、アルブミン濃度4~2,000 mg/Lの広範囲で定量が可能であった。本製品における色素結合反応は非常に速やかであり、試液混合から37℃ 5分間の反応で、自動分析装置による迅速な定量に適用できた。また、尿中の共存物質の影響を受けることなく実検体の定量が可能であった。

尿中に出現する可能性のある各蛋白との反応性について、アルブミンと比較して10-134%の範囲であった。健常人の尿中には、尿細管より分泌されるTamm-Horsfall蛋白以外の蛋白は僅かであるため、蛋白の増加は何かしらの疾患を意味する。それらと反応性を有することは、尿へ漏出する蛋白がアルブミンを主体とする糸球体疾患だけでなく、低分子蛋白(例えばレチノール結合蛋白やβ2ミクログロブリン)が出現する尿細管疾患や、血中での過剰生産におけるオーバーフローで出現するベンスジョーンズ蛋白なども検出が可能であることを意味しており、蛋白尿を生じる疾患全般を検出できる新しい尿蛋白スクリーニング検査法となり得ることを示唆している。また、本法ではTamm-Horsfall蛋白との反応性が低く、健常人検体においてTamm-Horsfall蛋白由来の偽陽性が起こりにくいことも利点としてあげられる。

また、既存の検査法との相関から、本法の特異性について有用な知見が得られた。既存の尿

蛋白定量法として広く使用されるピロガロールレッド法とは、いくつかの乖離検体を認めるものの関係はよく一致した。乖離例については各蛋白の反応性の差で説明できる。また、ピロガロールレッド法と本製品では、各色素と蛋白との反応性に差があることが示されたが、実際には乖離の頻度は高くないことが確認された。

尿アルブミン値を測定する免疫比濁法との相関では、傾きと切片を生じる関係ではあるが相関係数は非常に良好であった。反応特異性の異なる免疫比濁法と本製品との関係性については、後述に続くサイズ排除クロマトグラフィー法との結果と合わせて、非常に興味深いものであった。

本製品とサイズ排除クロマトグラフィーとは、他の2法と比較するとややばらつきを生じるものの良好に相関した。サイズ排除クロマトグラフィー法は、尿中の蛋白を分子サイズ毎に分離した検出ピークからアルブミン定量を行う。Brinkmanらの報告¹⁴⁾では、サイズ排除クロマトグラフィー法が抗原性をもたない変性アルブミン(免疫非反応アルブミン)も含めて検出するため、免疫比濁法と比較し高値となることが示されており、本研究においてもそれを支持する結果が得られた。尿アルブミンの抗原性については近年研究が進んでおり、アルブミンの酸化状態の解析等から、免疫非反応アルブミンの詳細が解明されつつある¹⁵⁾。また一方では、サイズ排除クロマトグラフィー法のアルブミンピークには他の蛋白が含まれているとの報告もあり¹⁶⁾、尿アルブミン測定の高値については議論が分かれるところである。

本製品でサイズ排除クロマトグラフィー法と良好に相関したことは、本製品が免疫非反応アルブミンも含めて定量しているか、アルブミン以外の蛋白をサイズ排除クロマトグラフィー法と同じ割合で検出しているかのどちらかを示すものであり、サイズ排除クロマトグラフィー法研究および免疫非反応アルブミンの研究について、今後の進展に注目したい。また、既存検査法との関係については、今後、検査の標準化が進むことでより向上する可能性が考えられる。

アルブミン尿の検出では、本法は既存の尿蛋白検査法と比較し診断正確度、コストのいずれにおいても非常に優れていると言える。試験紙

に代表される既存の定性試験法は用手法がベースであり、操作性や機器が不要である点では使い勝手の良い方法であるが、しかし反面、検査時の手技によるばらつきや、試験部の色調を読み取る個人差、クレアチニン補正の有無による尿の濃淡による影響など課題が多い。特に尿は脱水や飲水により濃淡が左右される試料であり、尿成分の正確な測定値を得るためには、ほぼ一定量が排泄されるクレアチニンを指標物質とする補正が必須である。本製品は自動分析装置による定量に適用させることにより、測定の手技差を解消し、さらに尿クレアチニン値の迅速同時定量により正確な尿蛋白値を得ることを可能とした。

本製品は、慢性腎臓病の早期におけるごく低濃度の蛋白尿を検出する為に必要な感度を有し、さらに自動分析装置へ適用することでクレアチニン補正も含めた正確かつ迅速な尿蛋白検査を実現し、適切な検査法が求められていた慢性腎臓病の早期スクリーニング法として、健康診断など大規模な検査へ使用されることで、慢性腎臓病の早期発見ならびに透析導入抑制への貢献が期待される。

謝辞

本研究の遂行に際してご指導、ご助言を頂きました順天堂大学富野康日己教授ならびに堀越哲准教授に心より感謝申し上げます。なお、本研究は、独立行政法人科学技術振興機構「独創的シーズ展開事業 委託開発」の助成によって行われました。

文献

- 1) National Kidney Foundation: K/DOQI Clinical Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification, and Stratification. Am J Kidney Dis, 39: 1-266, 2002.
- 2) 日本腎臓学会編: CKD診療ガイド2012. 日本腎臓学会誌, 54: 1031-1191, 2012.
- 3) 日本透析医学会統計調査委員会: わが国の慢性透析療法の現況(2012年12月31日現在). 日本透析医学会雑誌, 47:1-56, 2014.
- 4) Mogensen CE: Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. N Engl J Med, 310: 356-360, 1984.
- 5) 日本腎臓学会腎機能(GFR)・尿蛋白測定委員会: 日

- 本腎臓学会腎機能 (GFR)・尿蛋白測定委員会報告書. 日本腎臓学会誌, 43: 1-19, 2001.
- 6) Soedjak HS: Colorimetric micromethod for protein determination with Erythrosin B. *Anal Biochem*, 220: 142-148, 1994.
 - 7) Isoe J and Kaneko E: A new spectrophotometric method for determination of urinary protein using Erythrosin B. *Chem Lett*, 35: 922-923, 2006.
 - 8) Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-254, 1976.
 - 9) 伊藤機一、加島準子: 尿定性・半定量検査プラクティス 各論(I) 1. 蛋白 A. 基礎. *臨床病理*, 100: 35-42, 1995.
 - 10) Tamm I and Horsfall FL, Jr: Characterization and Separation of an Inhibitor of Viral Hemagglutination Present in Urine. *Proc Soc Exp Biol Med*. 74: 108-114, 1950.
 - 11) Horikoshi S, Higurashi A, Kaneko E, Yoshimura H, Ohsawa I, Suzuki Y, Hamada C and Tomino Y: A new screening method for proteinuria using Erythrosin B and an automated analyzer-Rapid, sensitive and inexpensive determination. *Chim Chim Acta*, 413: 1087-1091, 2012.
 - 12) Comper WD, Osicka TM and Jerums G: High prevalence of immunoreactive intact albumin in urine of diabetic patients. *Am J Kidney Dis*, 41: 336-342, 2003.
 - 13) Osicka TM and Comper WD: Characterization of immuno-chemically nonreactive urinary albumin. *Clin Chem*, 50: 2286-2291, 2004.
 - 14) Brinkman JW, Bakker SJ, Gansevoort RT, Hillege HL, Kema IP, Gans RO, de Jong PE and de Zeeuw D: Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephrometry with HPLC. *Kidney Int*, 66: 69-75, 2004.
 - 15) 中山亜紀: 尿中アルブミン分子多様性の解析. *生物試料分析*, 34: 120-125, 2011.
 - 16) Sviridov D, Meilinger B, Drake SK, Hoehn GT and Hortin GL: Coelution of other proteins with albumin during size-exclusion HPLC: Implications for analysis of urinary albumin. *Clin Chem*, 52: 389-397, 2006.