

ノ ー ト

***p*-ニトロベンズアルデヒド法とブロモクレゾールグリーン法
を組み合わせた血清アルブミン/グロブリン比の測定法に関
する検討**

鈴木 優 治*

Studies on the measurement method of the serum albumin/
globulin ratio by combining the *p*-nitrobenzaldehyde
method and the Bromocresol Green method

Yuji SUZUKI*

*Saitama Prefectural University Junior College, 820, Sannomiya, Koshigaya-shi, Saitama 343-8540

(Received 25 December 2001, Accepted 3 June 2002)

The determination method (NB method) for the serum albumin/globulin ratio by combining the Bromocresol Green (BCG) method for the serum albumin and the *p*-nitrobenzaldehyde (*p*-NITBA) method for the serum total globulin was compared with the conventional methods. The measurement values by the NB method correlated well with those by the BB method by combining the biuret method for the serum total protein and the BCG method ($r = 0.969$, $y = 0.977x - 0.151$, $S_x = 0.095$, $n = 100$) and with those by the GB method combining the method of Goldenberg et al and the BCG method ($r = 0.984$, $y = 0.898x - 0.166$, $S_x = 0.069$, $n = 100$). The mean value (1.31) of the NB method was lower than those of the BB method (1.49) and the GB method (1.64). The sum of the serum albumin and the serum total globulin obtained by the NB method correlated well with the serum total protein by the biuret method ($r = 0.970$, $y = 1.036x + 1.87$, $S_x = 2.19\text{g/l}$, $n = 100$). From these results, it is thought that the NB method can be used to measure the serum albumin/globulin ratio.

Keywords : serum albumin/globulin ratio; spectrophotometry; *p*-nitrobenzaldehyde; Bromocresol Green.

血清タンパク質の生体内変動は様々な疾患と関連づけられることから、種々のタンパク質が測定され、臨床応用されている。血清タンパク質はアルブミンとグロブリンから成り、両タンパク質の比である血清アルブミン/グロブリン比 (A/G 比) は、タンパク質代謝の質的变化を把握するための指標の一つとして測定されている。血清 A/G 比の測定には、血清アルブミン及び血清総グロブリンを測定する必要があり、前者の測定法にはブロモクレゾールグリーン (BCG) 法などの色素結合法¹⁾²⁾がある。後者の測定法には、比濁測定法^{3)~5)}、ビウレット法⁶⁾と BCG 法¹⁾ある

いは電気泳動法⁷⁾との組み合わせ法、無機塩類などのグロブリンの沈殿剤によりアルブミンを分離し発色させる比色法^{8)~10)}、及びグリオキサール酸を用いた Goldenberg らの直接比色測定法¹¹⁾等があるが、測定操作は必ずしも簡便であるとは言えない。著者は先に芳香族アルデヒドである *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド¹²⁾及び *p*-ニトロベンズアルデヒド¹³⁾と血清グロブリンとの光依存発色反応を測定原理とする血清総グロブリン定量法を設定し報告した。本論文では、発色試薬に *p*-ニトロベンズアルデヒドを用いた血清総グロブリン定量法 (*p*-NITBA 法) と、血清アルブミン定量法の BCG 法を組み合わせた血清 A/G 比の測定法について、従来法と比較した結果を報告する。

* 埼玉県立大学短期大学部衛生技術学科: 343-8540 埼玉県越谷市三野宮 820

1 実験方法

1.1 試薬

実験には和光純薬製試薬を用いた。

8.4 mol/l 塩酸溶液: 市販濃塩酸 700 ml に精製水 300 ml を加え, 調製した。

グロブリン試液¹¹⁾: 1000 ml のメスフラスコに精製水 90 ml に溶解した硫酸銅五水和物 4.0 g, 氷酢酸 400 ml, グリオキサール酸一水和物 1.0 g を採り, 速やかに混和し, 濃硫酸 60 ml を加えながらゆっくりと混和した。室温まで冷却後, 氷酢酸を加え, 全量を 1000 ml とした。

p-ニトロベンズアルデヒド (*p*-NITBA) 試液¹³⁾: *p*-NITBA 2.0 g に 8.4 mol/l 塩酸溶液 1000 ml を加え, マグネチックスターラーで約 1 時間かくはんし, 汙過した。調製した試液は褐色瓶に入れ, 冷蔵保存した。

1.0 g/l γ -グロブリン溶液: γ -グロブリン 100 mg を精製水に溶解し, 100 ml とした。

1.2 血清 A/G 比の測定

血清総タンパク質はビウレット法により, 血清アルブミンは BCG 法により測定した。血清総グロブリンは *p*-NITBA 法及び Goldenberg-Drewes の方法 (GD 法) での直接測定によるほか, 血清総タンパク質から血清アルブミンを差し引く間接測定により求めた。これらの測定値から血清アルブミンと血清総グロブリンの濃度比 (血清アルブミン/血清総グロブリン = 血清 A/G 比) を算出した。

血清総タンパク質及び血清アルブミンの測定法: 血清総タンパク質及び血清アルブミンはビウレット法及び BCG 法を測定原理とする市販キットの A/G B-テストワコー (和光純薬製) で測定した。検量はキット添付標準血清で行った。

p-NITBA 法: 血清 0.01 ml に精製水 0.5 ml 及び *p*-NITBA 試液 2.0 ml を加え, 転倒混和し, 37°C, 3000 ルクスの蛍光灯照射下で 20 分間反応させ, 試薬盲検を対照に生成した青色発色体の吸光度を 600 nm で測定した。検量線は 1 g/dl γ -グロブリンを 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 ml 採り, 精製水を加え全量を 0.51 ml とし, これらに *p*-NITBA 試液 2.0 ml を加え, 以後血清を測定する場合と同様に操作した。これらの γ -グロブリン溶液は 10, 20, 30, 40 及び 50 g/l の血清 γ -グロブリン濃度に相当する。吸光度は日立臨床検査用分光光度計 7011 により測定した。

GD 法: 血清 0.02 ml にグロブリン試液 4.0 ml を加えよく混和後, 沸騰水浴中で 4 分間加熱し, 直ちに流水中で冷却した。生成した紅色発色体の吸光度をグロブリン試液を対照として 550 nm において測定した。検量は管理血清 (コントロール血清 I ワコー) 0.02 ml を血清と同様に操作して行った。

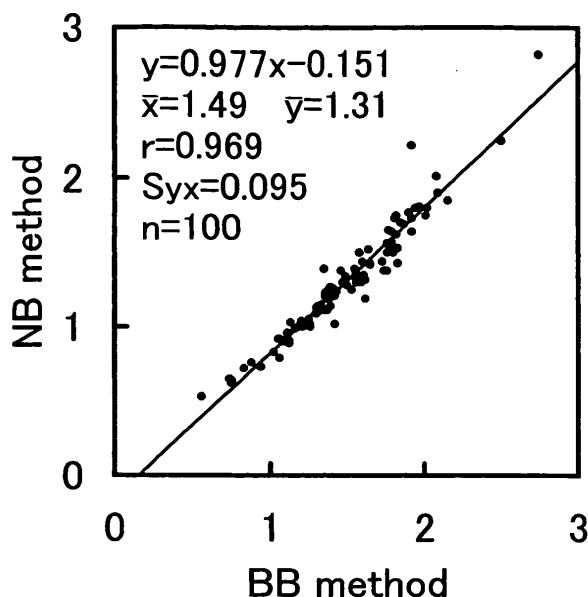


Fig. 1 Correlation of A/G ratio obtained by the BB method combining the biuret method and the BCG method with that obtained by the NB method combining the BCG method and the *p*-NITBA method

2 結果

2.1 比較実験の検討

p-NITBA 法と BCG 法の組み合わせ法 (NB 法), ビウレット法と BCG 法の組み合わせ法 (BB 法), 及び GD 法と BCG 法の組み合わせ法 (GB 法) により患者血清 100 例の血清 A/G 比の測定を行い, NB 法と BB 法及び NB と GB 法との相関関係について検討した。NB 法は血清総グロブリンを間接的に求める BB 法とは Fig. 1 のように $r = 0.969$, $y = 0.977x - 0.151$ の相関を示し, 血清総グロブリンを直接的に求める GB 法とは Fig. 2 のように $r = 0.984$, $y = 0.898x - 0.166$ の相関を示した。測定平均値は NB 法 1.31, BB 法 1.49 及び GB 法 1.64 であり, 有意差 ($p < 0.05$) が認められた。回帰式の回りの標準偏差 (S_{yx}) は NB 法と BB 法との相関で 0.095, NB 法と GB 法との相関で 0.069 となり, BB 法と NB 法の相関のほうが有意 ($p < 0.05$) に大きかった。

2.2 測定値差の分布

Fig. 3 は NB 法と BB 法間の測定値差と BB 法値との相関を示し, Fig. 4 は NB 法と GB 法間の測定値差と GB 法値との相関を示す。NB 法と BB 法間の測定値差は BB 法値と相関しなかったが ($r = 0.092$), NB 法と GB 法間の測定値差は GB 法値と相関し ($r = 0.533$), GB 法値の増加とともに増加傾向を示した。測定値差の平均値は NB 法と BB 法間差 0.19, NB 法と GB 法間差 0.33 であり, 有意差

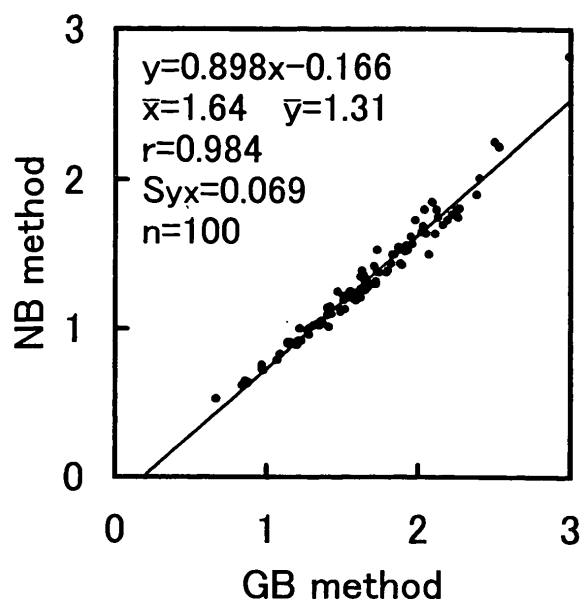


Fig. 2 Correlation of A/G ratio obtained by the GB method combining the BCG method and the method of Goldenberg et al. with that obtained by the NB method

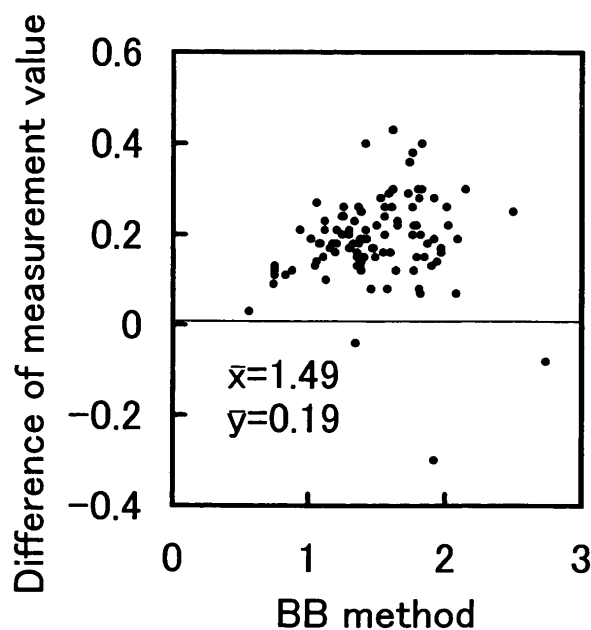


Fig. 3 Correlation of the A/G ratio obtained by the BB method and the difference in the measurement value between the BB method and the NB method

Difference in the measurement value = $x - y$. x : the measurement values of the BB method. y : the measurement values of the NB method.

($p < 0.01$) が認められた。また、その標準偏差は NB 法と BB 法間差 0.095, NB 法と GB 法間差 0.080 であり、両者に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

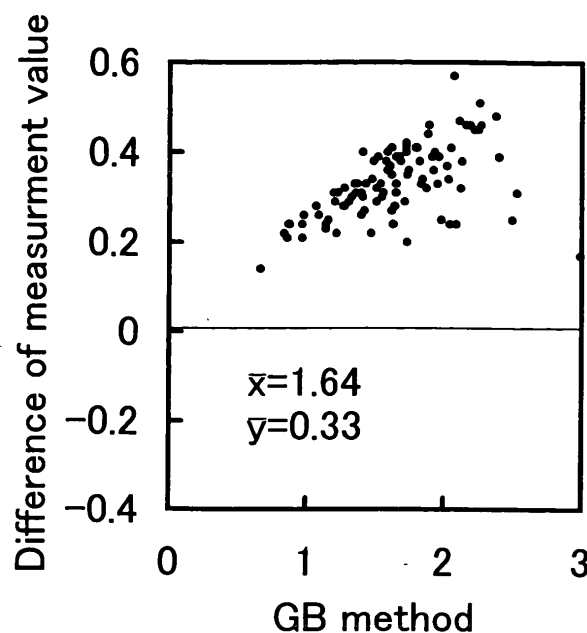


Fig. 4 Correlation of the A/G ratio obtained by the GB method and the difference in the measurement value between the GB method and the NB method

Difference of the measurement value = $x - y$. x : the measurement values of the GB method. y : the measurement values of the NB method.

2.3 層別検体群の測定値の比較

血清総タンパク質濃度で患者血清を層別し、各階級に属する各測定法の患者血清 A/G 比の測定平均値、及び NB 法と BB 法の測定平均値比 (NB 法/BB 法)、及び NB 法と GB 法の測定平均値比 (NB 法/GB 法) を求め、血清総タンパク質濃度が異なる条件下における測定値の特性について検討した。Table 1 のように、各階級内の血清 A/G 比の測定平均値はすべての階級で NB 法 < BB 法 < GB 法の関係にあった。NB 法/BB 法比は血清総タンパク質濃度が増加してもほぼ一定であったが、NB 法/GB 法比は血清総タンパク質濃度が増加するに従って低下した。

2.4 血清総タンパク質濃度の測定への応用

血清総タンパク質はグロブリンとアルブミンから成る。そこで、NB 法の実施で得た血清総グロブリンと血清アルブミンの加算値を求め、ビウレット法で測定した血清総タンパク質濃度と比較した。Fig. 5 のように両タンパク質の加算値は血清総タンパク質濃度と $r = 0.970$, $y = 1.036 + 1.87$, $S_{yx} = 2.19$ g/l の相関を示し、測定平均値はビウレット法 64.8 g/l, 加算値 69.0 g/l であった。このように加算値は血清総タンパク質濃度を示すものと判断された。

3 考 察

p-NITBA 法と BCG 法の組み合わせ法である NB 法は、

Table 1 The mean value of the A/G ratio in the patients' sera grouped by their serum total protein concentration and the ratio of the mean value of the A/G ratio measured by the three methods

Total protein/ g l ⁻¹	Mean value of A/G ratio			NB/BB	NB/GB	N
	BB	GB	NB			
40 ≤ ~ < 50	1.34	1.45	1.18	0.881	0.814	4
50 ≤ ~ < 60	1.62	1.71	1.41	0.870	0.825	26
60 ≤ ~ < 70	1.50	1.65	1.31	0.873	0.794	42
70 ≤ ~	1.38	1.59	1.22	0.884	0.767	28

N indicates the number of the sample grouped. BB: the method combining the biuret method and the BCG method. GB: the method combining the method of Goldenberg et al. and the BCG method. NB: the method combining the *p*-NITBA method and the BCG method.

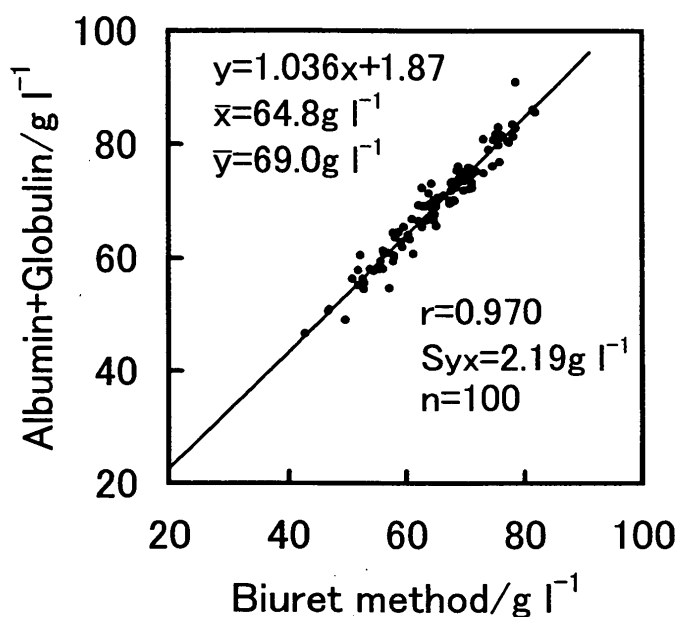


Fig. 5 Correlation of the serum total protein obtained by the biuret method with the sum of the serum albumin measured by the BCG method and the serum total globulin measured by the *p*-NITBA method

BB 法及び GB 法と測定平均値に違いを示した。この差異は、主にビウレット法、BCG 法、GD 法及び *p*-NITBA 法におけるアルブミン及びグロブリンに対する反応特性が異なることに由来するものと考えられる²⁾⁶⁾¹¹⁾¹³⁾。また、血清の測定値の算出にあたっては、各測定法の検量物質にはキット添付標準血清、管理血清及び γ -グロブリン溶液を用いたが、キット添付標準血清及び γ -グロブリン溶液は管理血清表示値を基準としてビウレット法による測定で濃度補正して用いた。したがって、このような検量条件下においても各測定法の測定平均値に差が生じたことは、用いた検量物質と患者血清に存在すると考えられる反応差が測定法により異なることを示唆するものと考えられる。

比較実験においては、回帰式の回りの標準偏差 S_{yx} は NB 法と BB 法との相関のほうが、NB 法と GB 法との相関

に比べ 1.4 倍だけ大きかった。このように、NB 法と BB 法との相関で S_{yx} が大きくなった理由は、BB 法では血清総タンパク質濃度から血清アルブミン濃度を差し引き血清総グロブリン濃度を求めるため、血清総タンパク質と血清アルブミンの測定で生じるばらつきが加算されたことによると考えられる。すなわち、血清を用いた同時再現性実験で得られた標準偏差は、ビウレット法 $\sigma_A = 0.268$ g/l、BCG 法 $\sigma_B = 0.385$ g/l、*p*-NITBA 法 $\sigma_C = 0.378$ g/l、GD 法 $\sigma_D = 0.10$ g/l であり、血清総タンパク質から血清アルブミンを差し引き血清総グロブリンを求めると、その標準偏差 $\{\sigma = (\sigma_A^2 + \sigma_B^2)^{1/2} = (0.072 + 0.148)^{1/2} = 0.469\}$ は *p*-NITBA 法及び GD 法で直接測定したときの標準偏差 σ_C 、 σ_D よりも大きくなった。このように測定値のばらつきの点からは、血清 A/G の測定は血清総グロブリンの直接測定法と BCG 法の組み合わせで実施するほうが、間接的に求めた血清総グロブリンを用いる BB 法よりも有利であると判断される。

血清 A/G 比の測定において、血清総タンパク質濃度は測定値に影響を及ぼす可能性があるが、この点については、血清総タンパク質濃度で層別した患者血清の各階級に属する NB 法と BB 法の測定平均値比 (NB 法/BB 法)、及び NB 法と GB 法の測定平均値比 (NB 法/GB 法) を求め、検討した。その結果、NB 法/BB 法比は血清総タンパク質濃度が変化してもほぼ一定であったが、NB 法/GB 法比は血清総タンパク質濃度が増加するに従って低下することが分かった。血清 A/G 比の算出において、血清アルブミン濃度はいずれの測定法においても BCG 法による測定値を用いたので、この結果は、*p*-NITBA 法及び BB 法の血清総グロブリン測定値は血清総タンパク質濃度に影響されないが、GD 法の血清総グロブリン測定値は血清総タンパク質濃度が増加するに従い、*p*-NITBA 法及び BB 法よりも低値に測定されるためと考えられる。

本実験では血清総グロブリンの直接測定は GD 法と *p*-NITBA 法により行った。GD 法は発色に 100℃ の加熱が必要であり、操作は煩雑である。*p*-NITBA 法は発色に照射を必要とするが、照射は加熱に比べて制御しやすく、

測定は容易である。以上の点から、p-NITBA法とBCG法を組み合わせたNB法は、血清A/G比測定法として応用できると考えられる。また、NB法の実施で得られた血清アルブミン値と血清総グロブリン値の加算値は、ビウレット法で得た血清総タンパク質値と近似することから、NB法の実施により血清A/G比だけでなく、血清総タンパク質濃度の推定にも利用可能である。

(2001年5月、第62回分析化学
学討論会において一部発表)

文 献

- 1) B. T. Doumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971).
- 2) 岡村研太郎: 臨床検査, **18**, 646 (1974).
- 3) H. B. Salt: *J. Lab. Clin. Med.*, **35**, 976 (1950).
- 4) J. C. Aull, M. McCord, S. C. Charlston: *J. Lab. Clin. Med.*, **46**, 476 (1955).
- 5) Y. Suzuki: *J. Anal. Bio-Sc.*, **22**, 439 (1999).
- 6) A. G. Gornal, C. J. Bardawill, M. M. David: *J. Biol. Chem.*, **177**, 751 (1949).
- 7) J. Kohn: *Clin. Chim. Acta*, **2**, 297 (1957).
- 8) A. Saifer, S. Gerstenfeld, F. Vecsler: *Clin. Chem.*, **6**, 626 (1961).
- 9) A. Fernandez, C. Sobel, H. Goldenberg: *Clin. Chem.*, **12**, 194 (1966).
- 10) J. F. Goodwin, S. Y. Choi: *Clin. Chem.*, **16**, 24 (1970).
- 11) H. Goldenberg, P. A. Drewes: *Clin. Chem.*, **17**, 358 (1971).
- 12) Y. Suzuki: *Anal. Sci.*, **16**, 145 (2000).
- 13) 鈴木優治: 分析化学 (Bunseki Kagaku), **50**, 695 (2001).