

## ノ ー ト

界面活性剤を含まないブロムクレゾールグリーン溶液及び  
ブロムクレゾールパープル溶液を発色試薬として用いる  
血清アルブミン定量法鈴木 優治<sup>1</sup>Determination method of serum albumin using a Bromocresol Green  
solution and a Bromocresol Purple solution containing  
no detergent as a color reagentYuji SUZUKI<sup>1</sup><sup>1</sup> Department of Medical Technology, Junior College, Saitama Prefectural University, 820, Sannomiya,  
Koshigaya-shi, Saitama 343-5840

(Received 3 July 2002, Accepted 14 February 2003)

Various detergents have been used in the dye-binding method for the determination of human serum albumin to prevent precipitation of the serum protein. However, there is problem that some detergents contained in the color reagent cause water pollution. Thus, the author studied the dye-binding method for determining human serum albumin using a Bromocresol Green (BCG) solution and a Bromocresol Purple (BCP) solution containing no detergent as a color reagent. The precipitation of serum protein occurred in the pH range of 3.8 to 4.2 for BCG, and 4.2 to 4.6 for BCP. Thus, pH 3.4 and pH 5.2 were selected for the pH of the BCG and BCP color reagents, respectively. In measuring a number of patients' sera, the precipitation of serum protein was not observed at all in both BCG and BCP color reagents containing no detergent. The measurement values obtained by the proposed BCG method correlated very well with those by the conventional BCG method ( $r = 0.997$ ,  $y = 0.983x - 0.807$ ,  $n = 90$ ) and the conventional BCP method ( $r = 0.984$ ,  $y = 0.849x + 5.57$ ,  $n = 90$ ). The measurement values obtained by the proposed BCP method correlated well with those by the conventional BCP method ( $r = 0.961$ ,  $y = 0.809x + 7.55$ ,  $n = 90$ ) and the conventional BCG method ( $r = 0.948$ ,  $y = 0.913x + 2.39$ ,  $n = 90$ ). The mean values of the proposed BCG and BCP methods and the conventional BCG and BCP methods were 36.6, 37.2, 38.1 and 36.6 g/l, respectively.

**Keywords** : dye-binding method; serum albumin determination; Bromocresol Green; Bromocresol Purple; prevention of water pollution.

## 1 緒 言

pH 指示薬のタンパク誤差を測定原理とする色素結合法は、生体試料中のタンパク質の測定に広く用いられている<sup>1)</sup>。この測定法での反応は酸性領域下で行われることが多く、例えば尿タンパク質測定法であるブロムフェノール

ブルー (BPB) 法では pH 2.4<sup>2)</sup>、血清アルブミン測定法であるブロムクレゾールグリーン (BCG) 法では pH 4.2<sup>3)</sup>、4.0<sup>4)</sup>、ブロムクレゾールパープル (BCP) 法では pH 5.5<sup>5)6)</sup> である。このような酸性領域下の反応ではタンパク質が沈殿しやすく、発色試薬にはポリオキシエチレンラウリルエーテル (Brij 35) やポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル (Triton X-100) などのタンパク質溶解能や、測定セル内壁の付着色素の洗浄能に優れた界面活性剤

<sup>1</sup> 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

が添加されている。しかし、界面活性剤は河川の水質汚濁物質の一つとして近年の環境問題の中で取り上げられている<sup>7)</sup>。また、ごく最近では、河川中に排出された界面活性剤の分解産物に環境ホルモン作用が確認され、河川中濃度が微量であっても生物に壊滅的な影響を与える物質の存在が明らかにされつつある<sup>8)~10)</sup>。したがって、臨床検査試薬も環境汚染を引き起こさない検出反応を用いること、測定に用いる物質量をできるだけ少なくすることや、測定目的物質の検出に不要な物質を含まない測定試薬の調製、あるいは有害物質の回収方式の確立<sup>11)</sup>など、環境負荷を少なくする努力が必要である。

血清アルブミンは臨床的には全身栄養状態やタンパク質の体外への喪失状態の把握、肝機能状態の把握などを目的として、色素結合法による測定が頻繁に行われている。そのため、この物質の測定では多量の界面活性剤が消費され、環境中に排出されるものと推測される。そこで、血清アルブミンの測定法として最もよく普及している BCG 法と、普及率は小さいが特異性に優れた方法として知られている BCP 法<sup>5)6)</sup>を対象に発色試薬への界面活性剤の添加がこの物質の定量に必須であるかどうかについて検討した。その結果、BCG 及び BCP を用いる色素結合法による血清アルブミン定量法は、界面活性剤を添加することなく設定できることが分かったので、その結果について報告する。

## 2 実験方法

### 2.1 試薬

試薬は和光純薬製を使用した。

緩衝溶液：緩衝溶液は 0.1 mol/l クエン酸溶液と 0.2 mol/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  溶液を混合して pH 2.4~6.0 のものを調製した。

1 mmol/l 色素溶液：BCG 0.698 g 及び BCP 0.540 g を取り、それぞれにエタノール 10 ml を加えて溶解後、精製水を加え 1000 ml とした。

発色試薬：BCG 発色試薬は pH 3.4 の緩衝溶液 20 ml 及び色素溶液 10.0 ml を取り、精製水を加え全量を 100 ml とした。BCP 発色試薬は pH 5.2 の緩衝溶液 20 ml 及び色素溶液 10.0 ml を取り、精製水を加え全量を 100 ml とした。

2 g/l タンパク質溶液：ヒトアルブミン 200 mg を取り、精製水に溶解し 100 ml とした。

### 2.2 測定操作

血清 0.01 ml に精製水 0.5 ml 及び発色試薬 2.0 ml を加え 25℃ において 15 分間反応させ、空試験溶液を対照に BCG では 620 nm、BCP では 590 nm で吸光度を測定した。検量線はコントロール血清 I ワコー (アルブミンの表示値 45.0 g/l) を精製水で 21 倍希釈し、アルブミン濃度を 2

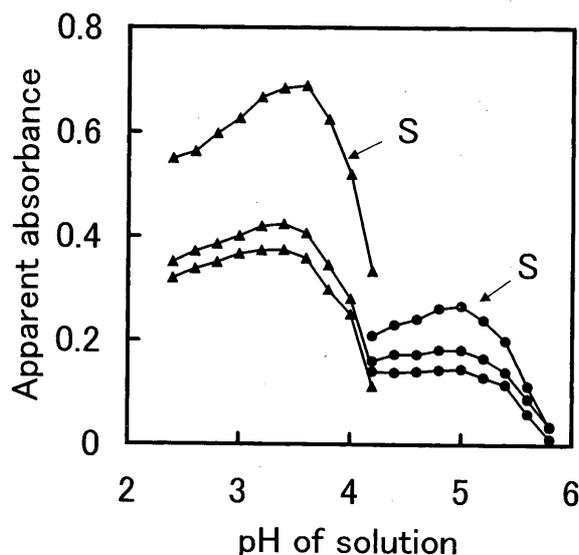


Fig. 1 Relationship between the color intensity and pH of solution

●: the color reaction of BCP with human albumin(S) and patients' sera; ▲: the color reaction of BCG with human albumin(S) and patients' sera

g/l 程度にした希釈標準血清を 0~0.5 ml の範囲で取り、精製水を加え全量を 0.51 ml とし、更に発色試薬 2.0 ml ずつを加え、以下血清試料と同様に操作した。空試験溶液は精製水 0.51 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。

## 3 結果

### 3.1 発色強度と pH との関係

Fig. 1 は BCG 及び BCP におけるアルブミン及び血清の発色強度と反応溶液 pH との関係を示している。両色素による発色強度は BCG では pH 3.4 付近において、BCP では pH 5.0 付近において最大に達したが、アルブミンと血清では発色の至適 pH にわずかの違いが見られた。アルブミンの反応はすべての pH 領域において混濁を生じることはなかったが、血清の反応は BCG が pH 3.8~4.2、BCP が pH 4.2~4.6 においてわずかな混濁を生じた。この結果から、BCG 及び BCP の発色試薬 pH はそれぞれタンパク質の濁りが生成しない pH 3.4 及び 5.2 を選定した。

### 3.2 発色強度と緩衝溶液濃度

Fig. 2 は発色試薬中の緩衝溶液量とアルブミン及び血清の発色強度との関係を示している。発色強度は緩衝溶液濃度の増加により低下した。この結果から、発色試薬中の緩衝溶液量は測定感度及び空試験溶液の吸光度を考慮し、BCG 及び BCP 共に 20 v/v% を選定した。

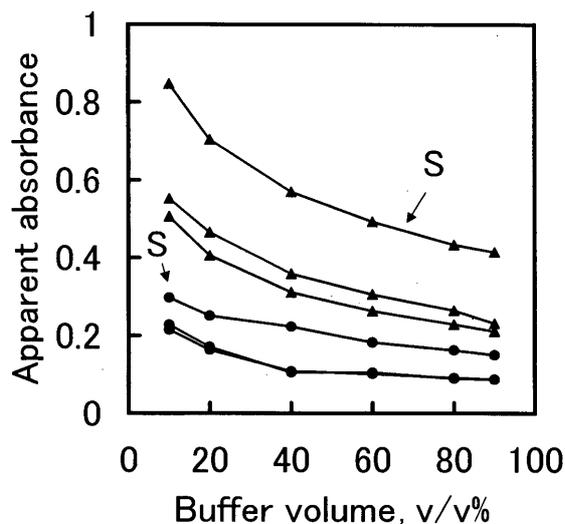


Fig. 2 Relationship between the color intensity and the buffer concentration in the color reagent

●: the color reaction of BCP with human albumin(S) and patients' sera; ▲: the color reaction of BCG with human albumin(S) and patients' sera

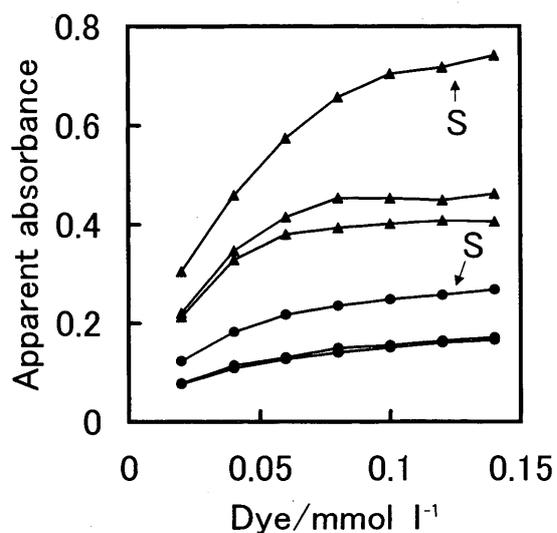


Fig. 3 Relationship between the color intensity and the dye concentration in the color reagent

●: the color reaction of BCP with human albumin(S) and patients' sera; ▲: the color reaction of BCG with human albumin(S) and patients' sera

### 3.3 発色強度と色素濃度

Fig. 3は発色試薬中の色素濃度とアルブミン及び血清の発色強度との関係を示している。発色強度は色素濃度の増加とともに高まったが、同時に空試験溶液の吸光度も増加した。この結果から、発色試薬中の色素濃度は測定感度と空試験溶液の吸光度を考慮し、BCG及びBCP共に0.1 mmol/lを選定した。

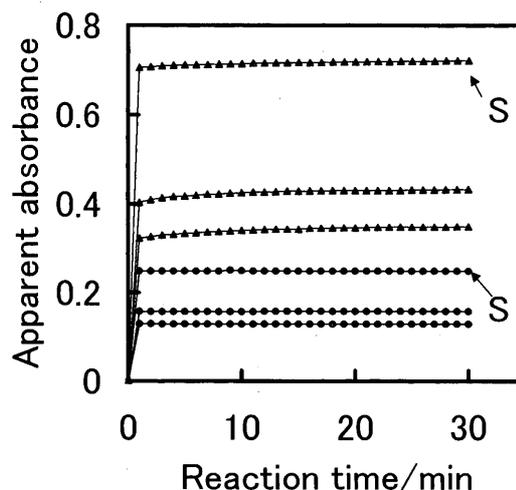


Fig. 4 Time course of the color reaction

●: the color reaction of BCP with human albumin(S) and patients' sera; ▲: the color reaction of BCG with human albumin(S) and patients' sera

### 3.4 発色のタイムコース

Fig. 4はアルブミン及び血清の発色の経時変化を示している。アルブミン及び血清の発色は発色試薬添加後に急激に増加し、BCPでは10分程度ではほぼ一定になった。BCGでは発色はその後わずかに高まったが、任意の反応時間におけるアルブミンと患者血清の吸光度比はほぼ一定であった。この結果から、反応時間はいずれの方法も15分を選定した。なお、15分間の反応で10 g/l  $\gamma$ -グロブリン溶液はBCGでは0.6 g/lアルブミン、BCPでは0.2 g/lアルブミンに相当する発色を示した。

### 3.5 検量線の直線性

Fig. 5は管理血清を希釈し作成した検量線を示している。検量線はBCG法では50 g/l付近まで、BCP法では100 g/lまで直線性を示した。

### 3.6 再現性及び回収率

50 g/lアルブミン及び血清アルブミンが38~46 g/lの血清4例の同時再現性は、BCG法でRSD = 0.69~1.18%、BCP法でRSD = 0.83~1.33%であった。

血清5例にアルブミンを40 g/l添加したときの平均回収率(範囲)は、BCG法97.1% (96.0~97.6%)、BCP法107.7% (107.3~109.4%)であった。

### 3.7 相関関係

従来法である界面活性剤添加BCG法(A/Gテストワゴン)及びBCP法(アルブミン-HAテストワゴン)と、界面活性剤非添加BCG法及びBCP法との相関関係について血清90例を用いて検討した。

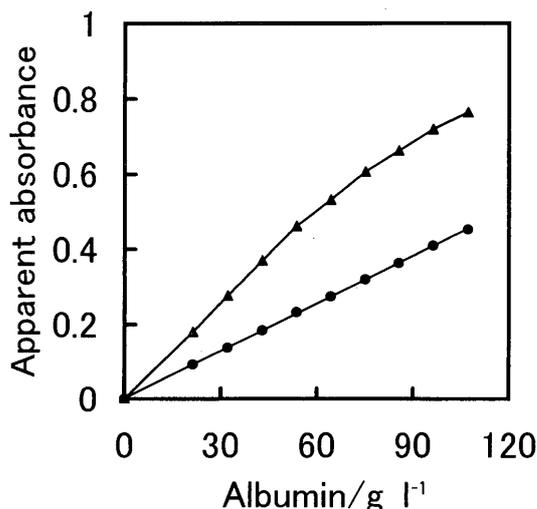


Fig. 5 Proportionality of the color intensity

●: the color reaction of BCP; ▲: the color reaction of BCG

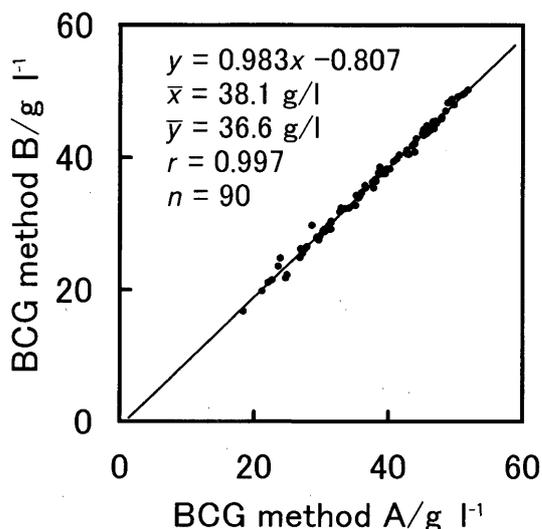


Fig. 6 Correlation of the serum albumin concentrations obtained by the proposed BCG method B(y) using no detergent with those obtained by the conventional BCG method A(x) using detergent

界面活性剤非添加 BCG 法は界面活性剤添加 BCG 法と Fig. 6 のように  $r = 0.997$  の相関を示し、回帰式の回りの標準偏差は  $S_{yx} = 0.66$  g/l であった。測定平均値は界面活性剤非添加 BCG 法 (36.6 g/l) が界面活性剤添加 BCG 法 (38.1 g/l) に比べわずかに低く、回帰式は  $y = 0.983x - 0.807$  であり、 $y = x$  からのずれは小さかった。また、界面活性剤添加 BCP 法とは  $r = 0.984$  の相関を示し、回帰式の回りの標準偏差は  $S_{yx} = 1.48$  g/l であり、界面活性剤添加 BCG 法との相関に比べ大きかった。測定平均値は界面活性剤添加 BCP 法 (36.6 g/l) と一致していたが、回帰式は  $y =$

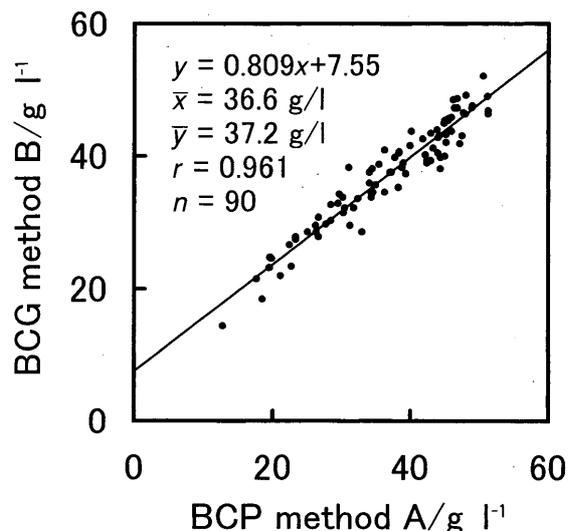


Fig. 7 Correlation of the serum albumin concentrations obtained by the proposed BCP method B(y) using no detergent with those obtained by the conventional BCP method A(x) using detergent

$0.849x + 5.58$  となり、 $y = x$  からのずれは大きかった。

界面活性剤非添加 BCP 法は界面活性剤添加 BCP 法と Fig. 7 のように  $r = 0.961$  の相関を示し、回帰式の回りの標準偏差は  $S_{yx} = 2.23$  g/l であった。測定平均値は界面活性剤非添加 BCP 法 (37.2 g/l) が界面活性剤添加 BCP 法 (36.6 g/l) に比べわずかに高く、回帰式は  $y = 0.809x + 7.55$  であり、 $y = x$  からのずれが認められた。また、界面活性剤添加 BCG 法とは  $r = 0.948$  の相関を示し、回帰式の回りの標準偏差は  $S_{yx} = 2.54$  g/l であり、界面活性剤添加 BCP 法との相関に比べ大きかった。測定平均値は界面活性剤添加 BCG 法 (38.1 g/l) に比べわずかに低く、回帰式は  $y = 0.913x + 2.39$  であった。

以上の界面活性剤非添加色素結合法による測定において、血清タンパク質の混濁生成は観察されなかった。また、この検討で行った数百回の測定では、血清の測定終了後に数回吸入した精製水の吸光度はゼロを示し、色素の測定セルへの付着は認められなかった。

### 3.8 層別化試料の測定平均値の比較

相関関係の検討に用いた血清を血清グロブリン濃度で層別し、界面活性剤添加法と界面活性剤非添加法の測定平均値及び両測定法の測定平均値の比について調べた。Table 1 のように界面活性剤非添加法の測定平均値と界面活性剤添加法の測定平均値には差が認められたが、両者の比は血清グロブリン濃度が増加してもほぼ一定値を示していた。このように、界面活性剤非添加法は血清タンパク質に対して界面活性剤添加法と同様の反応特性を示していた。

Table 1 Effect of the total globulin concentration in the patients' sera on the measurement value

Serum total globulin/g l <sup>-1</sup>	Serum albumin/g l <sup>-1</sup>				Measurement value ratio		N
	①	②	③	④	③/①	④/②	
~<20	31.8	29.7	30.6	30.3	0.962	1.020	12
20 ≤ ~<25	39.9	38.9	38.3	38.6	0.960	0.992	35
25 ≤ ~<30	39.2	38.0	37.7	38.6	0.962	1.016	26
30 ≤ ~<35	37.9	35.7	36.9	38.2	0.974	1.085	13
35 ≤ ~	34.3	31.4	32.9	33.1	0.959	1.054	4

The total globulin in the patients' sera was measured by the method combining the biuret method and the BCG method A. ①: The BCG method A using detergent, ②: The BCP method A using detergent, ③: The BCG method B using no detergent, ④: The BCP method B using no detergent

#### 4 考 察

血清アルブミン測定法として繁用されている BCG 及び BCP を用いる色素結合法において、発色試薬への界面活性剤の添加が測定に必要なかどうかについて述べた。

血清タンパク質は界面活性剤非存在下では pH 3.8~4.6 の範囲で濁りを生じたことから、発色試薬は BCG では pH 3.4, BCP では pH 5.2 を選定し調製した。界面活性剤非添加 BCG 法により得られた測定値は界面活性剤添加 BCG 法の測定値と  $y = x$  に近似した相関を示し、従来法の測定値と著しく異なる解離例を生じなかった。一方、界面活性剤非添加 BCP 法により得られた測定値は従来法と相関し、測定平均値はほぼ一致するものの、回帰式は  $y = x$  からの偏りを示していた。しかし、界面活性剤非添加 BCG 法の場合と同様に従来法の測定値と著しく異なる解離例は生じなかった。これらの結果は血清の測定においても、正誤差を引き起こすタンパク質の混濁が生じなかったことを裏付けるとともに、選定した pH においては界面活性剤非存在下であってもタンパク質が凝集し、混濁を生じることが通常では非常に起こり難いことを示唆している。界面活性剤の添加はタンパク質の溶解性を高めるほか、検量線の直線性を改善し、空試験溶液の吸光度を低下させ、色素の測定セルへの付着を防ぐ利点がある<sup>3)</sup>。界面活性剤の非添加条件下では、検量線は BCP 法では 100 g/l まで直線性を示したが、BCG 法では 50 g/l 付近までしか直線性を示さなかった。しかし、検量線の非直線性は多機能の自動分析装置の普及により、測定値の算出に際しての問題にはならな

いと考えられる。一方、界面活性剤の非添加により色素の測定セル等への付着は起こりやすくなると考えられるが、今回行った測定頻度では色素の付着による吸光度の上昇は生じなかった。しかし、測定終了後の測定セルの洗浄はこれまで以上に留意する必要があると思われる。以上のように、界面活性剤の発色試薬への添加はアルブミン定量に必須ではなく、この物質の未処方発色試薬によっても血清アルブミン定量は可能であると判断された。

(2002年5月, 第63回分析化学討論会において一部報告)

#### 文 献

- 1) 栢森裕三, 片山善章: 生物試料分析, **24**, 85 (2001).
- 2) 鈴木優治, 入野 勤, 前畑英介: 衛生検査, **26**, 846 (1977).
- 3) B. T. Doumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971).
- 4) 水田 亘, 山道 宏: 臨床化学, **1**, 354 (1972).
- 5) 岡村研太郎: 臨床検査, **18**, 646 (1974).
- 6) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 臨床化学, **26**, 38 (1997).
- 7) 都築俊文, 伊藤八十男, 上田祥久: “水と水質汚染”, p. 59 (1997), (三共出版).
- 8) 香山不二雄: “ダイオキシンと環境ホルモン”, 日本化学会編, p. 149 (1998), (東京化学同人).
- 9) 山下成人, 及川伸二, 川西正祐: 臨床検査, **43**, 1375 (1999).
- 10) 泉 邦彦: “化学汚染のしるしによる健康障害”, p. 94 (1999), (新日本新書).
- 11) 野畑真奈美, 村山正行, 稲葉好則, 山田義広, 中根昌洋, 中井美恵子, 田井憲一: 医学検査, **51**, 250 (2002).