

ノ ー ト

酸解離指数が大きい pH 指示薬のヒト血清アルブミンとの反応及び
その血清アルブミン定量への応用鈴木 優 治¹Reaction between pH indicators with a large pK_a value and human
serum albumin and its application to the determination of the
serum albumin concentrationYuji SUZUKI¹¹ Department of Medical Technology, Saitama Prefectural University Junior College, 820, Sannomiya,
Koshigaya-shi, Saitama 343-8540

(Received 9 May 2003, Accepted 7 July 2003)

The reaction between four pH indicators with a large pK_a value and human serum albumin and its application to the determination of the serum albumin concentration were studied. In the reaction of Bromothymol Blue (BTB), Phenol Red, Cresol Red and Thymol Blue with serum albumin, although a change in the color shade did not occur, the absorbance of the reaction mixture decreased. Since this absorbance decrease was largest in the reaction of BTB (the molar absorbance decrease at pH 7.4 was $7.59 \times 10^4 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), which was sufficiently sensitive to measure the serum albumin concentration, the BTB color reagent at pH 7.4 was applied to its determination. The measurement values by the BTB method correlated with those by the dye-binding method using the Bromocresol Green method ($r = 0.965$, $y = 1.21x - 4.25$, $n = 90$) and with those by a method using Bromocresol Purple ($r = 0.953$, $y = 1.04x + 3.56$, $n = 90$). The mean value of the BTB method (41.8 g/l) was higher than those of the Bromocresol Green method (38.1 g/l) and the Bromocresol Purple method (36.6 g/l). Since the reaction of BTB was carried out at pH 7.4, where serum protein does not precipitate, the addition of a detergent for preventing the precipitation of serum protein is not required. Therefore, the use of this color reagent contributes to decreasing water pollution by the detergent and acid used in the conventional methods.

Keywords : serum albumin ; determination method ; dye-binding method ; Bromothymol Blue.

1 緒 言

pH 指示薬がタンパク質存在下で示す、タンパク誤差と呼ばれる色調変化は、血清などのヒト体液中のタンパク質の測定に広く応用され、これまでにメチルオレンジ (MO)¹⁾²⁾、ブロムフェノールブルー (BPB)³⁾、ブロムクレゾールグリーン (BCG)⁴⁾⁵⁾、ブロムクレゾールパープル

(BCP)⁶⁾⁷⁾などの色素を用いた色素結合法が実用化されている。これらの色素の酸解離指数は BCP が $pK_a = 6.3$ で最も大きく、他の色素は BCG 4.67, BPB 3.98, MO 3.46 である。タンパク誤差の色調変化による吸光度増加は色素の pK_a の上昇とともに低下し、酸解離指数がおおむね $pK_a = 7$ を超える色素においてはほとんどなくなり、タンパク質添加による色調変化は出現しなくなる^{8)~10)}。しかし、 pK_a の大きい色素においてもタンパク質存在下では、 pK_a 付近を超える pH 領域で色素溶液の吸光度が著しく低下する現

¹ 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

象が観察される。このように pK_a の小さい色素と大きい色素では、タンパク質存在下における分光学的な特性に著しい差異が見られる。本論文では、 pK_a が 7.0 以上の pH 指示薬であるブロムチモールブルー (BTB)、フェノールレッド (PR)、クレゾールレッド (CR) 及びチモールブルー (TB) とタンパク質との反応の特性及びこれらの色素のうち検討により選定された BTB の血清アルブミン定量法への応用について検討した結果を報告する。

2 実験方法

2.1 試薬

試薬は和光純薬製のものを使用した。

緩衝溶液: 緩衝溶液は pH 1.04~2.28 が 0.1 mol/l HCl 溶液と 0.1 mol/l グリシン (NaCl を 0.1 mol/l の濃度で含む) 溶液で、pH 2.40~7.80 が 0.1 mol/l クエン酸溶液と 0.2 mol/l Na_2HPO_4 溶液で、pH 8.53~12.90 が 0.1 mol/l NaOH 溶液と 0.1 mol/l グリシン (NaCl を 0.1 mol/l の濃度で含む) 溶液で調製した。

1 mmol/l 色素溶液: BTB (Wako code no.029-03051) 0.670 g, PR (Wako code no.165-01121) 0.354 g, CR (Wako code no.033-04731) 0.540 g 及び TB (Wako code no.203-01451) 0.624 g を取り、それぞれにエチルアルコール 10 ml を加え、よく混和後、精製水を加え 1000 ml とした。

発色試薬: pH 1.04~12.90 の緩衝溶液 100 ml に色素溶液 5.0 ml (PR の場合には 2.5 ml) を加え、よく混和し調製した。

BTB 発色試薬 (血清アルブミン定量用): pH 7.4 のクエン酸- Na_2HPO_4 緩衝溶液 20 ml に 1 mmol/l BTB 溶液 12.0 ml 及び精製水 68 ml を加え、よく混和し調製した。

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

2.2 色素とヒトアルブミンとの反応に関する測定操作

試験溶液はタンパク質溶液 0.5 ml に発色試薬 2.0 ml を加え室温において数分間反応させ、精製水を対照に BTB 615 nm, PR 560 nm, CR 575 nm 及び TB 595 nm で吸光度を測定した。空試験溶液は精製水 0.5 ml に発色試薬 2.0 ml を加え調製し、吸光度は精製水を対照として測定した。血清の測定は血清 0.01 ml に水 0.49 ml と発色試薬 2.0 ml を加え、以後タンパク質溶液の測定と同様の操作で測定した。見掛けの吸光度は試験溶液の吸光度から空試験溶液の吸光度を差し引き算出した。吸光度の測定は日立製臨床検査用分光光度計 7011 で行った。

2.3 BTB による血清アルブミン定量法の測定操作

血清 0.01 ml に精製水 0.49 ml 及び BTB 発色試薬 2.0 ml を加え、よく混和し、25℃ において 10 分間反応させた。

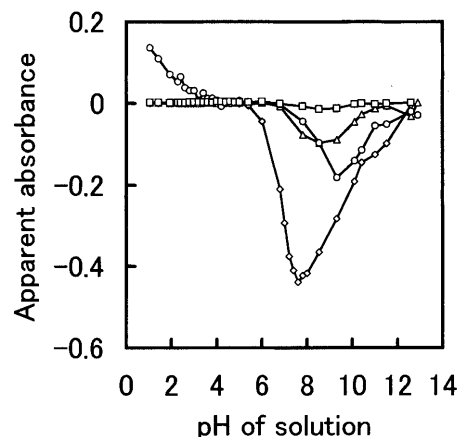


Fig. 1 Effect of the pH on the reaction of the four dyes with human serum albumin

The apparent absorbance was calculated by subtracting the absorbance of a reagent blank from that of a test solution. The reaction of these dyes indicated the absorbance decrease without changing color shade. ◇: Bromothymol Blue (at 615 nm), □: Phenol Red (at 560 nm), △: Cresol Red (at 575 nm), ○: Thymol Blue (at 595 nm)

次いで、この反応溶液及び空試験溶液の吸光度を精製水を対照として 615 nm において測定し、空試験溶液の吸光度から血清の吸光度を差し引き、反応の吸光度低下度を算出した。

検量線は 2 g/l ヒトアルブミン溶液を 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 及び 0.5 ml を取り、全量が 0.5 ml になるように精製水を加え、これらに BTB 試薬 2.0 ml を加え、よく混和し、25℃ において 10 分間反応させ、以後血清と同様に操作した。検量線は空試験溶液の吸光度から各アルブミン溶液の吸光度を差し引き、得られた吸光度低下度とアルブミン濃度との関係を図示した。血清アルブミン濃度は反応の吸光度低下度をこの検量線に照合して求めた。

3 実験結果

3.1 色素とタンパク質との反応の pH による変化

Fig. 1 はヒトアルブミンと BTB ($pK_a = 7.0$), PR ($pK_a = 7.9$), CR ($pK_a = 8.3$) 及び TB ($pK_a = 9.8$) との反応における見掛けの吸光度と pH との関係を示している。低 pH 領域と高 pH 領域の 2 領域に変色域をもつ TB はアルブミンの添加により pH 1~3 付近で赤色→黄色の色調変化を示したが、これ以外の pH 領域では明りょうな色調変化は観測されなかった。また、BTB, PR 及び CR でも黄色→青, 黄色→赤及び黄色→赤の色調変化は観測されなかった。しかし、各色素の pK_a 付近を超える pH 領域では、Fig. 2 に示した吸収スペクトルに見られるように色素溶液へのタンパク質添加はタンパク質添加前の色素溶液の吸光度を減少させ、見掛けの吸光度は負値となった。タンパク質添加

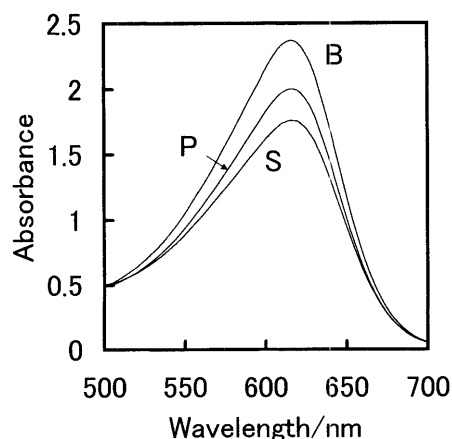


Fig. 2 Absorption spectra of the reaction mixture containing BTB

The absorbance was measured against distilled water. The absorbance of the reagent blank decreased by adding human serum albumin and patients' serum. S: 100 g/l human serum albumin, P: patients' serum, B: reagent blank

Table 1 The pH where the absorbance decrease is maximum and the degree of the molar absorbance decrease in the reaction of the four dyes with the serum albumin

Dye	pH	Molar absorbance decrease/ $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$	pK_a
BTB	7.4	7.59×10^4	7.0
PR	8.5	2.42×10^3	7.9
CR	8.5	1.67×10^4	8.3
TB	9.3	3.12×10^4	9.8

による吸光度低下度は $\text{BTB} > \text{TB} > \text{CR} > \text{PR}$ の順であり、色素の吸光度低下度と色素の pK_a に相関は見られなかった。

Table 1 はタンパク質との反応において各色素の見掛けの吸光度が最小になる pH 及びこの pH におけるヒトアルブミン 1 モル当たりの吸光度低下度を示している。ここで、血清アルブミン定量法の設定に際し、その測定の精密度を維持するため、アルブミン濃度が基準範囲の下限にある血清の測定における吸光度低下度が 0.1 以上になることを用いる色素の選定条件としてみた。血清アルブミンの基準範囲は $38 \sim 52 \text{ g/l}$ ($5.5 \times 10^{-4} \sim 7.5 \times 10^{-4} \text{ mol/l}$) であるので、アルブミン濃度が基準範囲の下限値にある血清を測定操作に従って測定すると、各色素とヒトアルブミンとの反応で得られる吸光度低下度は BTB 0.167, PR 0.005, CR 0.037, TB 0.067 となる。このように検討した色素の中では BTB のみが選定条件を満たしており、この色素の血清アルブミン定量への応用について検討を進めた。

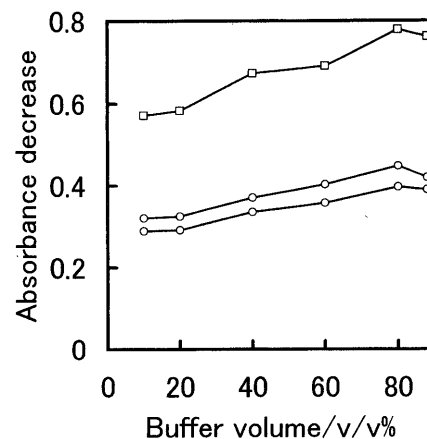


Fig. 3 Effect of the buffer concentration in the BTB color reagent on the absorbance decrease

The absorbance decrease was calculated by subtracting the absorbance of a test solution from that of a reagent blank. The absorbance decrease increased with an increase in the buffer concentration in the color reagent. $\square$: 100 g/l human serum albumin, $\circ$: patients' serum

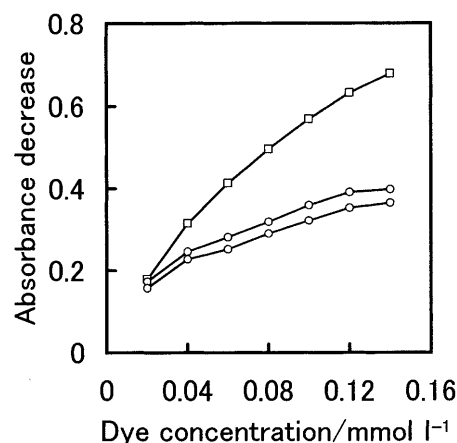


Fig. 4 Effect of the dye concentration in the BTB color reagent on the absorbance decrease

The absorbance decrease was calculated by subtracting the absorbance of a test solution from that of a reagent blank. The absorbance decrease increased with an increase in the dye concentration in the color reagent. $\square$: 100 g/l human serum albumin, $\circ$: patients' serum

3・2 吸光度低下度と緩衝液濃度との関係

pH 指示薬を用いた色素結合法では、タンパク質と色素との反応における発色強度は発色試薬中の緩衝溶液濃度により著しく変化することが報告されている¹¹⁾¹²⁾。そこで、BTB とタンパク質との反応に対する緩衝溶液濃度の影響について検討した。Fig. 3 は pH 7.4 の BTB 発色試薬中の緩衝溶液容量とタンパク質による BTB の吸光度低下度との関係を示している。吸光度低下度は緩衝溶液濃度の増加

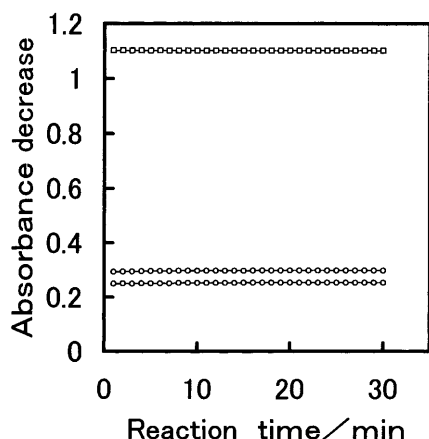


Fig. 5 Time course of the reaction of BTB

The absorbance decrease was calculated by subtracting the absorbance of a test solution from that of a reagent blank. The absorbance readily reached a plateau, and became constant. $\square$: 100 g/l human serum albumin, $\circ$: patients' serum

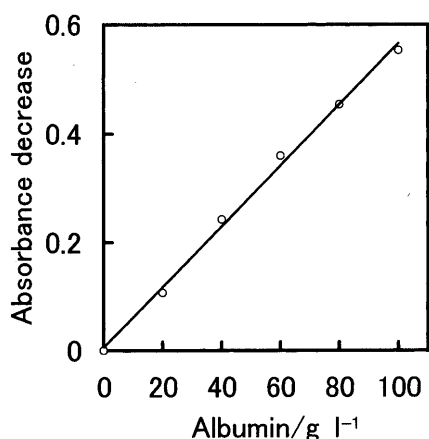


Fig. 6 Calibration curve of the reaction of BTB

The absorbance decrease was calculated by subtracting the absorbance of a test solution from that of a reagent blank. The calibration curve was approximately linear.

とともに上昇したが、いずれの緩衝溶液濃度においても吸光度低下度は前述の色素の選定条件を十分に満たしているため、発色試薬中の緩衝溶液容量は 20 v/v% を選定した。

3.3 吸光度低下度と色素濃度との関係

Fig. 4 は発色試薬中の BTB 濃度と吸光度低下度との関係を示している。吸光度低下度は BTB 濃度の増加とともに大きくなった。この結果から発色試薬中の BTB 濃度は 0.12 mmol/l を選定した。

3.4 反応の経時変化

Fig. 5 はヒトアルブミン及び血清の反応における経時変

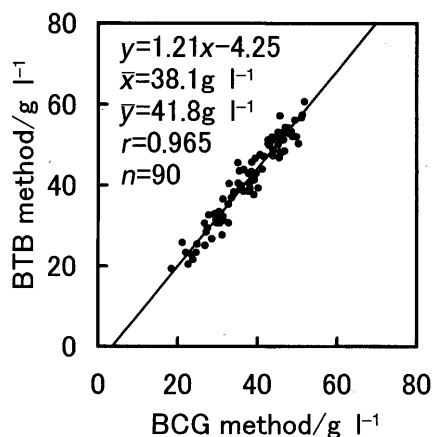


Fig. 7 Correlation of the BTB method with the dye-binding method using Bromocresol Green (BCG method)

化を示している。吸光度低下度は BTB 発色試薬の添加直後から急激に増加し、いずれの試料においても 25℃ では 10 分程度で一定値に達し、その後は安定であった。この結果から、反応時間は 25℃ 10 分間を選定した。

3.5 吸光度低下度の直線性

Fig. 6 は吸光度低下度とアルブミン濃度との関係を示している。吸光度低下度はアルブミン濃度の増加とともに大きくなり、両者には直線に近い関係が認められた。

3.6 共存物質の反応

γ -グロブリン、 α -グロブリン、クレアチニン、グルコース、トリプトファン、フェニルアラニン、ビリルビン、尿素の反応について検討した。いずれの物質も色素溶液の吸光度を増加、あるいは低下させることはほとんどなかった。

3.7 再現性及び回収率

血清アルブミン濃度が 30～50 g/l の血清 5 種類における同時再現性 ($n = 10$) は $RSD = 1.5\%$ 以内であった。また、これらの血清にヒトアルブミンを 50 g/l 添加したときの回収率は平均 95.4% (範囲 94.5～101.3%) であった。一方、 γ -グロブリンを 25 g/l 添加したときの回収率は平均 0.1% (0～0.2%) であり、この物質は血清中でも BTB と反応することはない。

3.8 従来法との比較

前述の検討結果に基づき測定試薬を調製し、血清 90 例を用いて血清アルブミンの測定を行った。Fig. 7 及び Fig. 8 は BCG 法 (A/G B-テストワコー) 及び BCP 法 (アルブミン-HA テストワコー) と BTB 法により得られた測定値との相関関係を示している。標準物質は BCG 法及び BCP

法がキット添付標準血清、BTB 法がヒト血清アルブミンを用いた。BTB 法の測定値と従来法の測定値には、 $r=0.953\sim0.965$ の相関が認められ、測定平均値は BTB 法 41.8 g/l、BCG 法 38.1 g/l、BCP 法 36.8 g/l であり、BTB 法の測定平均値は BCG 法に比べ 9.7%、BCP 法に比べ 13.6% だけ高値であった。

3・9 血清グロブリン濃度の影響

Table 2 は血清総グロブリン値により血清を層別し、各階級内の血清アルブミン値の測定平均値及び BTB 法と BCG 法及び BCP 法の測定平均値比を求めた結果を示している。測定平均値には有意差が認められ、測定値平均値比は 1.0 を超えていた。血清総グロブリン濃度が 20 g/l 未満の血清群を別とすれば、BTB 法と BCP 法の測定平均値比の血清総グロブリン値による変化は BTB 法と BCG 法の測定平均値比の変化に比べ小さかった。血清グロブリンに対する反応性は BCG 法では測定上無視できない大きさであるが¹³⁾¹⁴⁾、BCP 法ではわずかであることから⁶⁾⁷⁾¹³⁾¹⁴⁾、血清総グロブリン濃度の変化に伴う BTB 法と BCP 法の測定平均値比の変化がわずかであった事実は BTB 法が血清グロブリンの影響を受けにくいことを示すものと考えられた。

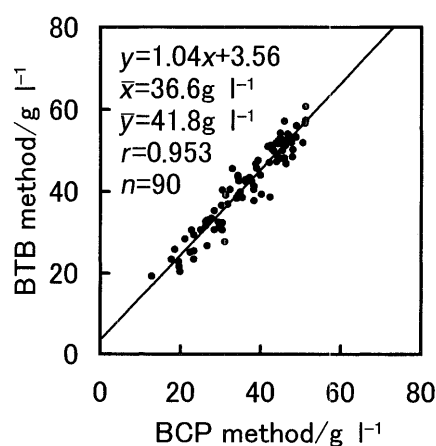


Fig. 8 Correlation of the BTB method with the dye-binding method using Bromocresol Purple (BCP method)

4 考 察

色素結合法によるタンパク質定量は BCG 法、BCP 法などの方法に見られるようにほとんどの場合、色素溶液へのタンパク質の添加で増加する吸光度の測定に基づいている。BCG 法は血清アルブミン定量法に応用された当初は、pH 7 においてタンパク質の添加で生じる吸光度の低下を測定し⁴⁾、タンパク質を定量していた。しかし、酸性領域の測定で問題となるタンパク質の沈殿が界面活性剤の発色試薬への処方により解決され⁵⁾、今日行われている吸光度の増加をとらえる測定法が確立されてきた。BCG、BCP などの酸性領域に変色域を有する pH 指示薬はタンパク質の存在下でタンパク誤差による色調変化を示すが、BTB などの中性からアルカリ性領域に変色域をもつ色素では、タンパク質添加によっても色調変化はわずかに起こるか、あるいは全く起こらなかった。しかし、これらの色素でも色調変化を示す BCG や BCP の反応と同様に、 pK_a 付近を超える pH 領域においてはタンパク質の添加で色素溶液の吸光度が低下する現象が認められた。このことは色調変化の非出現下であっても、これらの色素がタンパク質と相互作用していることを示している。このような pK_a 付近を超える pH 領域において、タンパク質添加により色素溶液の吸光度が低下する現象は、反応で生成する色素タンパク質複合体の分子吸光係数 (ϵ_{PA}) が解離型色素の分子吸光係数 (ϵ_A) に比べ小さい ($\epsilon_{PA} < \epsilon_A$) 条件下で起こることが色素とタンパク質との反応における化学平衡の解析から明らかにされている^{8)~10)}。

検討した 4 種類の色素のうち、血清アルブミン定量に応用できる吸光度低下度を示す色素は BTB のみであり、この色素を用いた血清アルブミン定量法を設定した。BTB 法の測定値は従来法の BCG 法及び BCP 法の測定値と良好な相関を示したが、その測定平均値は従来法よりも 9.7~13.6% だけ高値であった。Table 2 に示した、血清総グロブリン値で層別した血清アルブミン値における BTB 法と BCP 法の測定平均値比が、血清総グロブリン濃度によらず一定傾向にあった事実は、BTB 法が血清グロブリンの影響を受けにくいことを示しており、血清グロブリンが

Table 2 Effect of the total globulin concentration in the patients' sera on the measurement value

Serum total globulin/g l ⁻¹	Serum albumin/g l ⁻¹			Measurement value ratio		N
	①	②	③	③/①	③/②	
~<20	31.8	29.7	36.5	1.14	1.22	12
20≤~<25	39.9	38.9	44.7	1.12	1.14	35
25≤~<30	39.2	38.0	42.5	1.08	1.11	26
30≤~<35	37.9	35.7	39.6	1.04	1.10	13
35≤~	34.3	31.4	36.0	1.05	1.10	4

The total globulin in the patients' sera was measured by the method combining the biuret method and the BCG method. ① The BCG method(A/G B Test Wako), ② The BCP method(Albumin-HA Test Wako), ③ The BTB method

BTB 法に高値をもたらす要因ではないことは明らかである。また、血清共存物質である γ -グロブリン、 α -グロブリン、クレアチニンなど、8 種類の物質を用いた検討でも、これらの物質の反応への影響は見いだせなかった。このことから、BTB 法が従来法よりも高値になる原因は、血清共存成分によるものではなく、他の要因、特に検量物質に BCG 法及び BCP 法でキット添付標準血清、BTB 法でヒト血清アルブミンを用いたことが可能性の一つとして考えられる。

色素溶液の吸光度低下度を測定するタンパク質定量法では、検体ごとに水を対照として測定した空試験溶液の吸光度から試験溶液の吸光度を差し引き、吸光度低下度を求めなければならない。このように測定操作は空試験溶液を対照として試験溶液の吸光度増加度を測定するタンパク質定量法に比べ煩雑になる。しかし、自動分析装置の普及した今日では、測定操作の煩雑性の問題は臨床応用に際して容易に解決できると考えられる。BTB の吸光度低下度を測定する定量法の利点としては、測定が中性領域で実施できることが挙げられる。中性領域の測定では、試薬による測定機器の腐食の問題や廃液の pH 調整を避けることができる。また、血清タンパク質が沈殿する可能性はほとんどないことから¹¹⁾、タンパク質の溶解能をもつが、水質汚染物

質となる界面活性剤を発色試薬に添加する必要がない。そのため、発色試薬の組成は単純になり、使用後の廃液排出に伴う環境負荷は軽減される。

(2002 年 5 月, 第 51 回日本医学検査学会及び 2002 年 9 月, 日本分析化学会第 51 年会において一部発表)

文 献

- 1) J. S. Bracken, I. M. Klotz: *Am. J. Clin. Pathol.*, **23**, 1055 (1953).
- 2) L. V. Crowley: *Clin. Chem.*, **10**, 1131 (1964).
- 3) P. G. Scheurlen: *Clin. Chim. Acta*, **4**, 760 (1959).
- 4) F. L. Rodkey: *Clin. Chem.*, **11**, 478 (1965).
- 5) B. T. Doumas, W. A. Watson, H. G. Biggs: *Clin. Chim. Acta*, **31**, 87 (1971).
- 6) 岡村研太郎: 臨床検査, **18**, 646 (1974).
- 7) 村本良三, 松下 誠, 入野 勤: 臨床化学, **26**, 38 (1997).
- 8) Y. Suzuki: *J. Anal. Bio-Sc.*, **24**, 150 (2001).
- 9) Y. Suzuki: *Anal. Sci.*, **17**, 1263 (2001).
- 10) 鈴木優治: 医学検査, **52**, 20 (2003).
- 11) 鈴木優治: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **52**, 269 (2003).
- 12) 鈴木優治: 医学検査, **52**, 444 (2003).
- 13) 吉田真理子, 浅井正樹, 中根清司: 衛生検査, **27**, 1059 (1978).
- 14) 村上恵美子, 村本良三, 櫛下町醇, 芝紀代子: 衛生検査, **39**, 31 (1990).