

I-(1) 尿蛋白測定の勧告法

(JCCLS BB1-P1(2002))

Recommended Method for Determination of Protein in Urine by HPLC

(社) 日本臨床衛生検査技師会
尿蛋白測定標準化ワーキンググループ
Working group on Standardization for Determination of Protein in Urine
Japanese Association of Medical Technologists

Summary

Recommended method for the determination of urinary proteins was described. The method is based on the gel permeation in high performance liquid chromatography (HPLC). Twenty μ l of 5 fold diluted urine was applied to a column (Asahipak GS-220H, 7.6mm/ID-250mm/L, Asahi Kasei, Japan), eluted with 0.13mol/l phosphate buffer (pH7.0) at a flow rate of 1.0ml/min at 35°C and monitored at 220 nm. The fraction eluted in void volume was quantified for urinary protein. Human serum albumin (99%, fat-free and globulin-free, Sigma) was used as the standard after standardizing with NIST 7% bovine serum albumin (SRM 927). The linear range of the assay was 10 to 5,000 mg/l, the precision of the repetitive measurements was CV of less than 1.5% and the recovery rate was 96 to 104%. The assay was not interfered with several low molecular weight substances such as glucose, ascorbic acid and bilirubin and satisfactorily applied to a variety of proteins regardless of their nature or molecular weights (>12.4kDa) including β_2 -microglobulin and Bence-Jones proteins. Survey studies in 5 clinical laboratories, employing the different types of HPLC apparatus with the same type of column, showed a satisfactory precision (CV < 2.1%) of the measurements in three urine samples of the different protein concentrations.

Key Words : 尿蛋白 標準化 実用基準法 HPLC法

本法は日本臨床衛生検査技師会(日臨技)の尿蛋白測定標準化ワーキンググループによって作成されたものである。尿蛋白定量標準法の提唱は歴史的に古く、数多くの方法が考案されてきた。国際的な方法としては1975年に American Association for Clinical Chemistry(AACC) が蛋白をミニカラムで分離後、Biuret 反応による蛋白結合銅イオンをキレート反応によって測定す

る方法を selected method として勧告し、本邦では今井ら²⁾によって一部改良した方法が追試報告された。しかし、ゲル濾過操作が二度も必要のため操作が繁雑となり、その結果精密性に問題が生じ、また、尿中干渉物質の影響も完全に除去されないなど標準法としては致命的な欠点が指摘された。このような背景下、国際的に測定法の正確さを確認し利用できる標準法が存在しないために、

日常一般法を評価する方法が求められていた。臨床化学分析の正確さを伝達する測定体系³⁾として、International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) は、最も正確に分析できる方法を基準法 definitive method とし、この方法により値付けした一次標準物質 primary reference material で正確さを保証し、実用的に利用できる方法が実用基準法 reference method であるとする測定法の基準体系を提唱している。この実用基準法は一次標準物質を用い、二次標準物質(常用標準尿)の評定や日常一般法の評価を目的としている。このような観点から標準化を考える場合、測定方法と標準物質の設定が重要である。

血清蛋白測定的一次標準物質には、National Institute of Standards and Technology (NIST) から提供されている7%ウシ血清アルブミン bovine serum albumin (BSA) の Standard Reference Materials-SRM927がある。しかし、尿蛋白測定の実用基準法と一次標準物質は報告されていない。

このような現状において、1994年に伊瀬、大澤らは実用基準法として、高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography (HPLC・紫外部検出)法を、標準物質には純度99%ヒトアルブミン human serum albumin (HSA:無脂肪酸・無グロブリン)を提唱⁴⁾した。さらに、第42回日本臨床衛生検査学会シンポジウム(1993年北海道)では標準化に向けた論議がなされ、第43回日本臨床衛生検査学会パネルディスカッション(1994年愛媛)⁵⁻⁹⁾では実用基準法と一次標準物質の討議が行われた。日臨技標準化委員会はこれらの動向から、同年7月に一般検査研究班と臨床化学研究班の委員によって尿蛋白測定標準化ワーキンググループを発足させた。その後、尿蛋白測定標準化ワーキンググループはそれぞれの分担作業を進めた結果、実用基準法にHPLC・紫外部検出法を選定し、カラムはゲル浸透を原理とし、分子量1万以上の蛋白とそれ以下の低分子成分を分離できるカラムを選出した。

また、一次標準物質については、HSAは減圧下で恒量になるまで乾燥させても約4%の水分を

含有することから、重量法では濃度を正確に定めることはできないと判断された。そこで原理的にペプチド由来の吸収で蛋白を検出するHPLC・紫外部検出法で検討した結果、HSAとBSAに対する紫外部吸収は同一であった。したがって、一次標準物質は測定体系およびトレーサビリティを考慮し、NIST 7% BSA-SRM927で濃度検出された純度99% HSAを一次標準物質とする結論に達した。

I 測定原理

ゲル浸透(分子ふるい)クロマトグラフィー gel permeation chromatography (GPC)の原理に基づいて、尿中蛋白と他の成分を分子の大きさで分離した後に測定する方法である。すなわち、高分子である蛋白はゲルの中に浸透せずに最初にカラムより溶出し、その後他の低分子成分が溶出される。これを蛋白の基本構造であるペプチド由来の吸収(220nm)で検出する。蛋白濃度は得られたクロマトグラムのピークの高さからHSAを標準として定量する。標準液はNIST 7% BSA-SRM927で評定された純度99% HSAを一次標準物質として用いる。

II 測定操作法

1 試料の前処理

試料は2000G以上で10分間遠心分離した上清を用いる。なお、細菌などを除去するためにポアサイズ0.22 μmのメンブランフィルターを用いて濾過した後、使用することが望ましい。ただし、その際には蛋白を吸着しないフィルターを用いる。

2 試料の希釈操作

容量が10ml以上の試験管を用いて、評定された純度99% HSAおよび試料1.0mlをホールピペットを用いて正確に各試験管に採取し、それぞれに8.5g/l塩化ナトリウム溶液4.0mlをホールピペットで加え、測定用試料(5倍希釈)とする。実施に際しては、試料用および試薬用には検定済みホールピペットを用いる。

表1 試薬規格

試薬	化学式	分子量	規格
リン酸2水素ナトリウム・2水和物	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	156.01	JIS K 9009 純度 99 % 以上
リン酸水素2ナトリウム・12水和物	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	358.17	JIS K 9019 純度 99 % 以上
塩化ナトリウム	NaCl	58.44	JIS K 8005 純度 99.98 % 以上
アジ化ナトリウム	NaN_3	65.01	

3 測定

カラムと溶離液が規定の温度と流速に到達した後、クロマトグラムのベースラインの安定性を確認する。サンプルカップに希釈済みの標準液および尿試料を入れ、オートインジェクターまたはループ式インジェクターを用いて、サンプルループ内を試料でよく共洗いした後に 20 μl を注入する。

1回の連続測定は 20 本以内とし、標準液を測定検体の先頭、中間および最後の 3 カ所で二重測定する。標準液の再現性は CV2.0 % 以下であることを確認する。

4 機器の測定条件

溶離液流量は 1.0ml/min、検出波長は 220nm、カラム温度は 35 $^{\circ}\text{C}$ とする。また、検出器の測光レンジは約 0.64ABU/FS (フルスケール) とする。

III 計算および検量域

1 検量範囲の確認

NIST7 % BSA-SRM927 で評定された純度 99 % HSA 標準液 (1000mg/l) を、8.5g/l 塩化ナトリウム溶液で倍々希釈して 7 本の系列を作製し、この希釈系列の原液をそのまま測定して直線性を確認する。

2 計算法

クロマトグラムから求めた各試料のピークの高さと、先頭、中間および最後に測定した HSA 標準液の合計 6 回のピークの高さの平均値から、下記の計算式で濃度を求める。

$$\text{試料濃度 (mg/l)} = \frac{\text{尿試料ピークの高さ}}{\text{HSA標準液ピークの高さ}} \times \text{HSA標準液濃度}$$

IV 試薬の規格および調整法

本法で用いられる試薬規格を表 1 に示した。試薬の調整法を以下に示す。

1 溶離液 (pH7.0、0.13mol/l リン酸緩衝液)

1) A 液

リン酸 2 水素ナトリウム・2 水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MW = 156.01) 20.28g をメスフラスコに入れ、精製水で溶解し 1l とする。

2) B 液

リン酸水素 2 ナトリウム・12 水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, MW = 358.17) 93.12g を、メスフラスコに入れ、精製水で溶解し 2l とする。

2 溶離液の pH 調整

pH の調整は 25 $^{\circ}\text{C}$ 下で実施する。B 液 2l に A 液を徐々に加え、pH メーターにて pH を 7.0 に調整する。使用に際しては、ポアサイズ 0.22 μm のメンブランフィルターを用いて濾過し、脱気した後使用する。

3 8.5g//塩化ナトリウム溶液

塩化ナトリウム 8.5g をメスフラスコに入れ精製水で溶解し 1l とする。ガラス瓶に入れて室温で保存する。

4 純度 99 % HSA 標準液 (一次標準物質)

調整は 25 $^{\circ}\text{C}$ 下で実施する。NIST 7 % BSA-SRM927 標準液 1.0ml をホールピペットを用いて正確に採取し、8.5g/l 塩化ナトリウム溶液で溶解し 100ml とする。次に、純度 99 % の HSA 粉末を約 110ml 秤量してメスフラスコに採り、これに 0.1g のアジ化ナトリウムを加え、8.5g/l 塩化ナトリウム溶液で溶解し 100ml とする。この純度 99 % HSA 標準液は、NIST 7 % BSA-SRM927 を基準とし、HPLC・紫外外部検出法で濃度の評定を行う。評定された純度 99 % HSA 標準液は密栓して 2 ~ 5 $^{\circ}\text{C}$ 保存で 1 年間は安定で

ある。

V 測定機器および器具の性能

1 測定装置

測定装置は送液ポンプ、インジェクター、カラム、カラム恒温装置、紫外部検出器およびデータ処理装置から構成される。機器の性能および取り扱いや単位は、高速液体クロマトグラフ分析のための通則¹⁰⁾ (JIS K0124-1983) および高速液体クロマトグラフの性能表示方法¹¹⁾ (JAIMAS 0005-1984) を参照。

1) 送液ポンプ

流量の正確さは 0.1 ~ 5.0ml/min にて ± 2 %、流量の安定性は 0.1 ~ 5.0ml/min にて ± 0.5 % であること。

2) インジェクター

ループ式インジェクター、または CV 値が 1.0 % 以内の精密度を有するオートインジェクターを用いる。

3) カラム恒温装置

温度制御の精密さは 35 °C にて ± 0.1 % 以内であること。

4) 紫外部検出器

検出器のバンド幅は 8nm 以下、波長精度は ± 0.5nm 以下であること。ノイズレベルは 250nm にて ± 1.5 × 10⁻⁶ABU/S 以下、ドリフトは 250nm にて ± 1 × 10⁻³ABU/h 以下の性能をもつ装置を使用する。

5) データ処理装置

クロマトグラムのピークの高さを測定できる機能を持ち、分画した位置を確認できること。

2 カラム

カラムはゲル浸透を原理とし、分子量 1 万以上の蛋白とそれ以下の低分子成分を分離できる能力をもち、通常の使用条件で蛋白吸着を認めないカラムであること。

〔カラムの規格〕

ここでは Asahipak GS-220H (昭和電工) を用いた。カラムサイズは内径が 7.6mm、長さは 250mm である。充填剤平均粒子は 9 ± 0.5 μm

の球形、排除限界分子量は 3000、耐圧力は 32 kg/cm²、基材は合成高分子系ハードゲルで構成される。この規定のカラム以外でも同等の性能を有するカラムであれば使用可能である。

3 器具および天秤

1) 標準液調整用器具

標準液を調整する計量器はその容量を JIS の方法でチェックする (JIS K0050-1983 “化学分析法通則”¹²⁾、JIS K3505-1983 “ガラス製化学用体積計”¹³⁾ を参照)。

2) 精密天秤

1 mg を正確に秤量できる “化学はかり” を準備する。使用前に 1 級分銅でチェックする。

VI 解 説

尿中蛋白排泄量の測定についてはアルブミン、トランスフェリン、α₁-マイクログロブリンおよび β₂-マイクログロブリンなど個々の蛋白について行うべきとの意見もある。しかし、臨床においては、尿中蛋白の総排泄量が腎疾患における糸球体および尿管障害の存在を示唆する重要な所見の 1 つとして、診断基準および経過観察に広く利用されている。このような状況において、測定法および標準物質の違いによって測定値が大きく異なる現状は無視できない。

日本臨床衛生検査技師会 (日臨技) 一般検査研究班は、1978 年第 27 回日本臨床衛生検査学会 (京都) において、当時 Kingsbury-Clark (K-C) 法¹⁴⁾ の採用率が 82 % であったことを根拠として標準法に K-C 法を選定し、標準物質にウシアルブミンを用いることを推奨した¹⁵⁾。しかし、その後この方法は薬剤干渉を受けやすいことや、アルブミン以外の各種蛋白にはほとんど反応しないなどの問題点が指摘された。また、島袋¹⁶⁾ は第 42 回日本臨床衛生検査学会シンポジウム (北海道) の精度管理調査結果報告において、K-C 法の利用率が減少してきたことと、施設間差の変動係数が 20 ~ 40 % あり、18 年経過した現在 (1993 年) でもほとんど改善されていないことを報告した。これに対し、色素結合法や色素錯体法による測定法

は施設間差が小さい現状を示し、標準法の見直しの必要性を論じている。事実、K-C法の採用率は平成7年度日臨技精度管理調査⁷⁾によると9.3%に減少している。臨床化学分析における測定体系のなかでは、日常一般法であるK-C法を標準化することはもはや現状にそぐわなくなり、施設間差の原因である正確度を正当に評価することのできる新しい実用基準法を設定することが急務である。

1 測定法の選択

下記の事項を考慮して測定法を選択した。

- ①蛋白を他成分から分離し、特異的に検出できること
- ②蛋白種や分子量の違いによって検出感度に差異が少ないこと
- ③分子量1万以上の蛋白を測定対象とすること
- ④最低検出感度は10mg/lを有すること
- ⑤精密性が優れていること
- ⑥測定法に普遍性があること
- ⑦日常一般法の評価や二次標準物質の評定として利用できること

測定法の選択に先立って国内外の reference method を含めた各種測定法の調査を行った。蛋白の分子量やその種類に影響を受けない検出法にはペプチド由来を利用した測定法があり、Biuret法¹⁸⁾や紫外外部吸収法^{19~21)}が知られている。また国際的には American Association for Clinical Chemistry (AACC) が selected method として勧告¹⁾しているのみである。そこでこの方法を含めた各種測定法について、文献および実験の両面から検討を加えた。

測定方法を大別すると、物理学的性質と化学的性質を利用した方法に分類することができる。

物理学的性質による方法は紫外外部吸収法、化学的性質を利用した方法は窒素定量法、比色法および比濁法などに分類される。

1) 紫外外部吸収法

紫外外部吸収法は、試料溶液を直接紫外外部で測定する方法で、芳香族アミノ酸の吸収(280nm)により検出する方法と、蛋白の基本構造であるペプ

チド由来の吸収(190~240nm)を検出する方法に分類される。蛋白の芳香族アミノ酸の吸収(280nm)を検出する方法²¹⁾は、蛋白の種類によって芳香族アミノ酸(トリプトファン、チロシンおよびフェニルアラニン)の含量が異なることや、検出感度が低いために測定値に大きな差が生じる。また、蛋白の基本構造であるペプチド由来の吸収(190~240nm)を検出する方法²²⁾は、蛋白の種類や分子量による分光学的な吸収に差が少ない。しかし、これらの紫外外部吸収法は、蛋白成分をあらかじめ他の成分から分離した後に測定する必要がある。

2) 窒素定量法

窒素定量法には Kjeldahl 法があり、微量蛋白定量法として評価されているが、分子量の違いやその種類に影響を受けない反面、複雑な操作と熟練した手技が要求される。

3) 比色法

比色法は① Lowry 法、② Biuret 法、③色素結合法、および④色素錯体法に分類される。

① Lowry 法

Lowry 法は尿中の還元物質の影響を受け、尿蛋白定量法としてはそのまま使用することはできない。

② Biuret 法

Biuret 法は理論的根拠が明確であるが、尿中には蛋白以外の Biuret 反応陽性物質が存在する。また、蛋白沈殿剤として強酸が用いられることから酸可溶性蛋白を測定できない。さらに測定感度が低いなどの問題点がある。そこで、これらの問題点を回避するために種々の方法が考案された。そのうち Micro-Biuret 法²³⁾は、Biuret 反応で生成した錯化合物に 263nm あるいは 310nm において紫外外部吸収性があることを利用して蛋白を測定する。本法は Biuret 反応の特徴を生かし、かつ高感度であるが、強アルカリを使用するという問題がある。また、AACC は 1975 年に selected method¹⁾として、蛋白をミニカラムで分離した後に Biuret 反応で測定を行う方法を勧告し、本邦では今井²⁴⁾によって一部改良した方法が追試報告された。しかし、ゲル濾過操作が 2 度も必要

なため操作が繁雑となり、その結果精密性に問題が生じた。また、尿中の干渉物質の影響も完全に除去されないなど、標準法としては致命的な欠点が指摘され普及には至らなかった。本法が発表されたのは約20年前であり当時としては最も優れた方法であったが、現在その有用性は薄らいできた。

③ 色素結合法

色素結合法は1970年代から開発され、Coomassie Brilliant Blue G-250 (CBB) 法^{24,25)}やCBB-SDS法^{26,27)}、TCA Ponceau-S法²⁸⁾、クロマズロール B-complex 法²⁹⁾および Acid Green 3 法³⁰⁾ などがある。これらの方法は尿蛋白測定に利用した場合、蛋白の種類と含量が一定でないために低分子蛋白や Bence Jones protein (BJP) の呈色度が弱いことが難点である³¹⁾。しかし、比濁法と比較するとその影響は少ない。CBB法の採用率は平成7年度日臨技精度管理調査報告書¹⁷⁾によると12.8%であった。

④ 色素錯体法

色素錯体法は、蛋白と錯体色素を結合させ金属イオンで錯化合物を形成することを利用している。この原理に基づく方法には、pyrogallol red-molybdenum (IV) 錯体 (PR) 法³²⁾やPR法の改良法^{33,34)}などがある。本法は色素結合法と同様、蛋白種差が比濁法より少なく、CBB法でみられるようなキュベットやチューブ類への色素付着も少なく、自動分析機器への適応が容易で精密度が優れているなどの利点がある。しかし、低分子蛋白やBJPの呈色度が弱いことに難点がある³¹⁾。PR法の採用率は平成7年度日臨技精度管理調査報告書¹⁷⁾によると70.5%であった。

4) 比濁法

比濁法は歴史的に古く、数多くの方法が考察された。代表的な方法としては K-C 法¹⁴⁾、Meulemans 法⁵⁾、trichloroacetic acid (TCA) 法³⁶⁾ および岩田らの benzethonium chloride (BC) 法³⁷⁾ などがある。K-C 法は広く日常一般法として利用されていたが、前述のように問題点が数多く指摘されている。また、これらの比濁の程度は溶液の

pH やイオン強度、用いる分光光度計の測光構造によって影響されるなど問題点の多い測定法である。

以上のことから、現時点では日常一般法として色素結合法および色素錯体法が推奨されるが、前述の問題点を考慮すると、これらのなかから実用基準法を選択することは困難である。

そこで伊瀬、大澤らはこれらの問題点を考慮し、より正確に測定する方法としてゲル浸透(分子ふるい)クロマトグラフィーの原理に基づいて、尿中蛋白を他成分と分子の大きさで分ける HPLC・紫外部検出法を報告⁴⁾した。この方法は AACC の selected method¹⁾に基づいており、カラムによる他成分からの蛋白の分離操作が行われるため、蛋白を特異的に測定できる利点がある。この HPLC を用いる方法はわが国の尿酸³⁸⁾やクレアチニン³⁹⁾の勧告法に利用されており、その評価はすでに確立されている。また、尿蛋白測定標準化ワーキンググループは分離機構の異なるカラムによる蛋白の分離操作を比較検討した結果、ゲル浸透を原理とした方法が最も優れた分離能を有するという結論に達した。

なお、本法を用いて測定できる施設は限られており、日常一般法ではなく実用基準法であることを明記しておく。したがって、本法を実用基準法として提案し、その主要目的は日常一般法の正確性の評価、二次標準物質の評定に利用することを目的として勧告するものである。

2 標準物質の選択

下記の事項を考慮して標準物質を選択した。

- ① 正確な純度と濃度の保証があること
- ② 安定であること
- ③ 入手が容易であること
- ④ 簡便に利用できること
- ⑤ 各種の測定方法に適応が可能であること
- ⑥ 安定供給が可能であること

標準物質の選択に先立って国内外の標準物質の調査を行い、各種標準物質について文献および実験の両面から検討を加えた。標準物質を大別する

表2 純度99% HSAの水分測定
(n=3)

No.	平均値±SD (%)	CV (%)
1	3.93±0.18	4.6
2	7.32±0.28	3.8
3	10.82±0.68	6.3
4	9.67±0.23	2.4
5	10.30±0.29	2.8

水分気化装置 EV-7 (平沼社) と微量水分測定装置 AQ-6 (平沼社) による水分測定
測定温度は 105°C

No.1 : 減圧乾燥下の HSA

No.2 : 常圧(シリカゲル)乾燥下の HSA

No.3~5 : 4°C保存下の HSA

と、ヒトアルブミン human serum albumin (HSA)、ウシアルブミン bovine serum albumin (BSA) およびヒト血清由来蛋白などに分類することができる。

血清蛋白測定用としては National Institute for Standards and Technology (NIST) が、College of American Pathologists (CAP) の 7 % BSA 水溶液を NIST/SRM927 として、Biuret 法で蛋白濃度を決定し、一次標準物質としている。しかし、尿蛋白測定の標準物質には一次標準物質^{4,41,42)}に相当するものが存在しない。日臨技一般検査研究班は 1978 年に BSA を推奨した¹⁵⁾が、その純度や濃度および検定方法に対する規定を定めていない。その他、正常ヒト血清、プール血清および管理血清なども利用できるが、蛋白組成と濃度が一定でないために純度と濃度の保証が困難である。また、HSA は減圧下で恒量になるまで乾燥させても約 4 % の水分を含有することから、重量法では濃度を定めることはできない。そこで原理的にペプチド由来の吸収で検出する HPLC・紫外部検出法によって HSA と BSA を検討した結果、紫外部吸収は同一であった。したがって、一次標準物質は測定体系およびトレーサビリティを考慮すると、HPLC・紫外部検出法により NIST 7 % BSA-SRM927 で評定された純度 99 % HSA を一次標準物質とする結論に達した。

【標準物質の規定】

現在、尿蛋白測定の標準物質は国内外を通して公認されたものが存在しない。そこで下記にその

一次標準物質の純度や濃度、検定方法、形状および安定性に対する規定を定めた。

1) 標準液 (一次標準物質)

一次標準物質としては、純度 99 % HSA (無脂肪酸・無グロブリン: シグマ社) を用いる。

2) 濃度の評定

純度 99 % HSA 粉末 (無脂肪酸・無グロブリン: シグマ社) は、減圧下で恒量になるまで乾燥させても約 4 % の水分を含有する。水分気化装置 EV-7 (平沼社) と微量水分測定装置 AQ-6 (平沼社) による純度 99 % HSA の水分測定を表 2 に示した。したがって、純度 99 % HSA 標準液の評定は、血清蛋白測定の一次標準物質である NIST 7 % BSA-SRM927 を 100 倍希釈した溶液を基準とし、HPLC・紫外部検出法で濃度の設定を行う。NIST 7 % BSA-SRM927 は、ロット No.によって濃度変更があるので濃度の確認は必ず行う。評定された純度 99 % HSA の再現性は CV2.0 % 以下であることを確認する。

3) 一次標準物質純度の確認方法

HSA は免疫電気泳動法においてアルブミン以外の蛋白を認めないもの、確認方法としては 20g/l 蛋白濃度の試料を調製し、サンプル量 2.0 μl を用いて免疫電気泳動法を実施して確認する。

4) 標準液の形状

形状は水溶液である。

5) 標準液の安定性

標準液は、冷蔵保存 (4°C) において 1 年以上安定でなければならない。測定するには室温に戻して使用する。防腐剤は 0.1 % アジ化ナトリウムを用いる。

6) 標準液の調製方法

本法で使用する標準液調製用器具は、V 測定機器および機器の性能の項で示した 4 の条件を満たす性能をもった測定機器を使用する。詳細は JIS K0050-1983 “化学分析法通則”¹²⁾、JIS K3505-1983 “ガラス製化学用体積計”¹³⁾を参照。濃度の確認は、IV 試薬の規格および調製法の項 4 を参照。

3 測定条件

本項では、①試薬の規格および溶離液、②カラムの選定、③測定条件の設定、④測定法の性能お

表3 溶離液のモル濃度と緩衝効果

緩衝液濃度 (mol/l)	緩衝液 pH	塩酸添加尿 pH 2.1	患者酸性尿 pH 4.0	患者アルカリ尿 pH 8.7
0.01	5.0	4.4	4.8	5.8
	8.0	7.5	7.5	7.7
0.05	5.0	5.1	5.1	5.1
	8.0	8.0	7.9	8.0
0.10	5.0	5.1	5.1	5.1
	8.0	8.0	8.0	8.0

測定条件：生理食塩水 5 倍希釈尿 20 μ l に緩衝液 1 ml を加えて測定

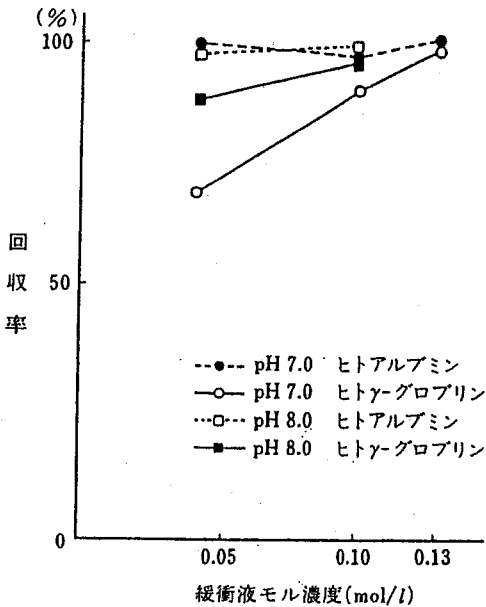


図1 各pHにおけるカラムからの蛋白回収試験

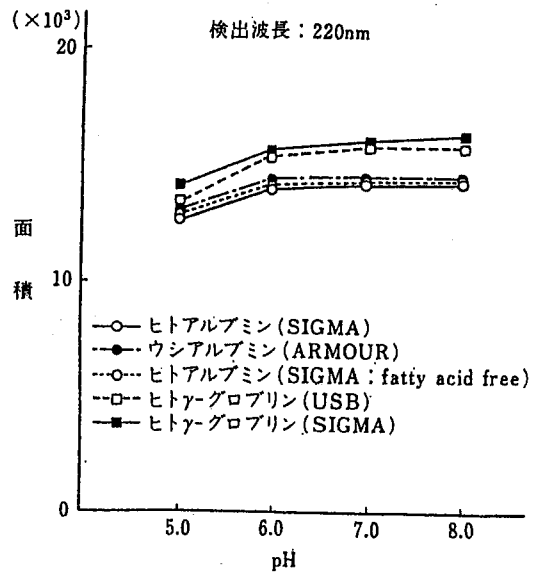


図2 pHと各種蛋白のピーク変化

および測定装置の性能について明記する。ここでは Asahipak GS-220H(昭和電工) のカラムを使用した場合の条件について解説する。

1) 試薬の規格および溶離液

(1) 8.5 g/l 塩化ナトリウム溶液

国内外の特級製品であれば使用することができる。

(2) 溶離液

調整後の溶離液はポアサイズ 0.22 μ m のメンブラン・フィルターで濾過し、冷蔵保存が望ましい。

2) カラムの選定^{4, 31, 40}と取り扱い方法

(1) 選定

蛋白の分離機構として報告された方法は、ゲル浸透クロマトグラフィー^{4, 31}、サイズ排除クロマトグラフィー⁴⁰の2種類がある。この2種類の方法における尿蛋白の特異的な分離能力を比較検討した。その結果、ゲル浸透クロマトグラフィーが蛋白と夾雑物質とを分離する点で優れていた。そのカラムは Asahipak GS-220H (昭和電工) であった。特徴としてはポリマー系カラムであり、使用可能な pH 範囲が広い (pH2 ~ 9) ため、カラムのアルカリ洗浄が可能であることやカラムの寿命が長いことなどの特徴を有する。その他のカラムであっても、同等の分離能を有するものであれ

表4 ヒトアルブミンを基準としたときのpHと検出波長の違いによる各種蛋白の測定値比較

pH	波長 (nm)	ヒトアルブミン	ヒトアルブミン	ヒトγ-グロブリン	ヒトγ-グロブリン	ウシアアルブミン	平均	CV (%)
		SIGMA*	SIGMA	SIGMA	UBS	ARMOUR		
5.0	220	100.0	98.9	109.0	102.4	100.4	102.1	4.0
	210	100.0	99.0	106.9	105.2	97.3	101.7	4.1
	200	100.0	99.1	105.6	105.1	97.9	101.5	3.5
6.0	220	100.0	99.6	109.9	107.5	100.6	103.5	4.7
	210	100.0	98.2	105.5	104.7	97.8	101.2	3.6
	200	100.0	100.2	105.1	104.1	99.6	101.8	2.5
7.0	220	100.0	100.1	112.2	111.7	100.7	104.9	6.1
	210	100.0	99.5	107.5	105.0	98.3	102.1	3.9
	200	100.0	99.9	104.9	104.0	99.2	101.6	2.6
8.0	220	100.0	99.3	112.2	108.0	99.4	103.8	5.8
	210	100.0	98.1	105.6	104.0	97.0	100.9	3.7
	200	100.0	99.1	104.2	103.0	98.7	101.0	2.4

*ヒトアルブミン(無脂肪酸)の1000 mg/l 溶液を基準とし、各種1000 mg/l 蛋白溶液を比較(%)

ば使用することができる。

(2) 取り扱い方法

使用するカラムの説明書に従って取り扱う。特にカラム耐圧力と使用温度に留意すること。カラムの洗浄方法の例を示す。試料を20回連続測定した後は、流量を0.5ml/minに落とし、30%アセトニトリルを30分間流す。次に精製水に置き換えて5分間流した後、0.4mol/l 硫酸ナトリウム溶液に置き換えて30分間流す。その後、精製水に置き換え5分間流し、最後に規定の溶離液に戻して10分間流し洗浄を終える。他のカラムの場合はその説明書に従う。

3) 測定条件の設定

(1) 試料の前処理^{4,31)}

試料の前処理としては、2000G以上で10分間遠心した上清を用いる。この操作で尿沈渣成分のほとんどを沈殿させることができる。なお、細菌などの除去には、0.22 μmのメンブラン・フィルターで濾過した後を使用することが望ましい。フィルターは蛋白低吸着性のもの(たとえば、MILLEX-GV; デュラポア: ミリポア社など)を用いる。使用する際には用いるフィルターが、測定に影響を及ぼさないことを確認した後に使用する。試料の希釈率は原尿ではペプチド由来の紫外部における吸収が大きく、また、再現性や妨害物質の影響を考慮すると5倍希釈が妥当である。

(2) カラム温度⁴⁾

カラム内の温度を高くすると液体の粘度が低く

なり、カラム内の抵抗が減少する。その結果カラム内圧力が低減され、高い理論段数を得ることができ分離能が向上する。カラムの温度は蛋白の変性、カラムの仕様およびカラムオープンの能力などを考慮して35℃と設定した。ただし、正確な温度制御のためには室温を30℃以下に保つ必要がある。

(3) 移動相の流量⁴⁾

カラムの耐圧、分析時間などを考慮して1.0ml/minとした。カラムの種類に応じて流量を検討する必要がある。

(4) 溶離液の選択^{4,31)}

蛋白はpHや温度によってその構造に変化を来し、紫外部での吸収も変化することが知られている。表3に示したように強酸性またはアルカリ性尿を実試料とした場合、緩衝効果を一定にするためには加えるリン酸緩衝液濃度を0.05mol/l以上にすることが必要であった。また、pH7.0と8.0の緩衝液でヒトアルブミンとヒトγ-グロブリンを試料とし、緩衝液のモル濃度を変化させて回収率を調べると、図1に示したようにpH8.0では0.10mol/l、pH7.0では0.13mol/lで、両者の蛋白回収率はほぼ100%の値を得た。カラムへの蛋白吸着性をなくすためには0.10mol/l以上のリン酸緩衝液濃度が必要であった。

RosenheckとDoty⁴³⁾によればpH4~8では蛋白に分光学的な変化はみられないとしている。しかし、図2および表4に示したようにヒトアル

ブミンとヒト γ -グロブリンについて、pH5.0～8.0における検出波長 220nm での相対測定感度を比較したところ、pH6.0 以下では感度の低下がみられたが、pH6.0～8.0の間ではほぼ一定の測定値を示した。リン酸緩衝液のpKa、蛋白変性およびカラムの耐久性を考慮すると pH7.0 付近が妥当であった。

以上の検討成績から、pH7.0、0.13mol/l リン酸緩衝液を採用した。この条件下では蛋白の種類による検出特性は、Biuret 法と同じく差はみられないが、検出感度は Biuret 法の 100 倍以上、また 280nm での検出法の 15 倍以上と高感度である。

(5) 測定波長⁴⁾

ヒトアルブミンを基準にヒト γ -グロブリンおよびウシアルブミン試料を比較した場合、表 4 に示したように緩衝液の pH に関係なく CV 値は 200nm で 2.4～3.5% と最小値を示した。しかしながら、200 や 210nm では緩衝液の吸収が大きいこと、検出時のベースラインが不安定であること、また測定感度を考慮して 220nm を選択した。

4) 測定法の性能

ここでは本勧告法に基づいて、Asahipak GS-220H カラムを用いた場合の同時再現性、添加回収試験、妨害物質の影響、蛋白以外の高分子成分の影響、蛋白の分離同定、分子量の違いによる溶出時間と測定値の比較、各測定法に対する蛋白種間の検出感度の比較、多発性骨髄腫患者尿の反応性、各測定方法における低分子蛋白の検出比較、他法との相関および施設間差を記述する。なお、HPLC での測定は試料の安定性などを考慮して 24 時間以内に実施した。

(1) 同時再現性⁴⁾

尿中蛋白濃度 364mg/l、452mg/l、926mg/l、1496mg/l および 4477mg/l での同時再現性 (n=5) は、CV 値 (%) でそれぞれ 1.5、1.0、1.0、0.4、0.1 と良好な精密度が得られ、AACC の selected method より優れていた。

(2) 添加回収試験⁴⁾

ヒトアルブミン、ヒト血清およびヒト γ -グロ

ブリンを患者尿に添加してその回収率を求めたところ、96～104%の回収率が得られた。

(3) 妨害物質の影響

通常尿中に排泄される緩衝物質として以下の成分が考えられる。アスコルビン酸 5000mg/l、ブドウ糖 20000mg/l、クレアチニン 4000mg/l、クレアチン 500mg/l、ビリルビン 500mg/l およびヘモグロビン 900mg/l の各終濃度において、その測定への影響について検討した。その結果、ヘモグロビンを除いた各成分における妨害率は -4.8～+5.8% であった。しかし、溶血についてはヘモグロビン自体が蛋白であることから正誤差を認めた。

(4) 蛋白以外の高分子成分の影響

本法はゲル浸透クロマトグラフィーを測定原理とし、分子量 1 万以上を蛋白成分と考えて測定を実施している。そこで、尿中に排泄される分子量 1 万以上の蛋白成分以外の物質について、生体成分および投与薬剤に関して分子量の調査を行った。その結果、大部分の成分は分子量 1 万以下であったが、一部の多糖類に属する薬剤で分子量 1 万以上の未変化体が尿中に排泄されることが考えられる。そこで、ヘパリン (分子量：4000～400000 の不均一な構造) とデキストラン (分子量：40000 または 70000) を用い、その測定値の影響について検討を行った。その結果、多糖類の両物質とも未変化体の最高尿中排泄予測濃度ではその影響を認めなかった。しかし、今後、尿中に排泄される蛋白以外の物質で分子量 1 万以上の成分が確認された際には、測定値への影響を確認する必要がある。

(5) 蛋白の分離同定⁴⁾

患者尿の限界濾過膜処理前後におけるクロマトグラムを図 3 に示した。上段は最初にカラムを素通りした蛋白が 4.2 分付近に溶出され、その後各種の尿中低分子成分が溶出される。下段は同一尿を分子量カットオフ値 1 万の限外濾過膜 (ウルトラフリー C3LGC) で処理した濾液のクロマトグラムで、分子量 1 万以上に相当する蛋白分画は消失している。また、各種標準蛋白もこの位置に溶出されることより、このピークは蛋白に

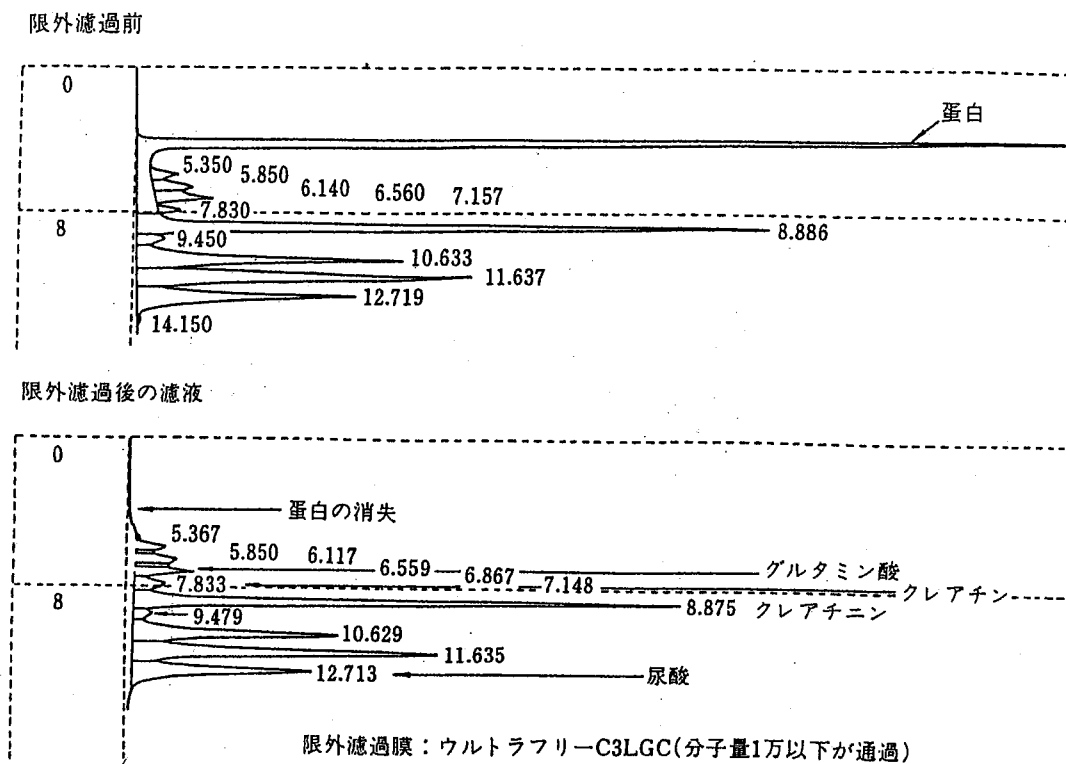


図3 患者尿の限外濾過膜処理前後におけるクロマトグラムの比較

表5 分子量マーカを用いた溶出時間と測定値比較

No	分子量マーカ	分子量	HPLC・紫外部検出法			
			溶出時間 (min)	蛋白濃度 (mg/l)	錯体比色法 PR法 (mg/l)	色素結合法 CBB法 (mg/l)
1	DNP-L-Alanine	255	—	—	50	50
2	Cytochrome C	12 400	4.5	5 189	3 410	1 250
3	Ribonuclease C	13 700	4.5	484	1 580	130
4	Myoglobin	17 800	4.4	8 650	7 460	1 560
5	Chymotrypsinogen A	25 000	4.3	11 350	6 180	3 610
6	Albumin (egg)	45 000	4.3	1 344	490	710
7	Albumin (bovine)	67 000	4.3	1 518	1 220	1 280
8	Aldolase (rabbit)	160 000	4.3	1 183	1 010	700
9	Catalase (bovine)	240 000	4.3	1 022	1 310	760
10	Ferritin (horse)	450 000	4.3	453	380	190

分子量マーカ: Dalton Standard MS-II (セルバ社)

相当することが確認された。

(6) 分子量の違いによる溶出時間との測定値の比較^{4,31)}

分子量マーカを用いた溶出時間と測定値の比較を表5に示した。分子量12400のチトクロ

ムCは4.5分に、分子量17800のミオグロビンから分子量450000のフェリチンでは4.3～4.4分に溶出された。尿中に排泄される低分子蛋白のうち最も臨床的に重要視されているβ₂-マイクログロブリン(分子量11800)の溶出時間は高分

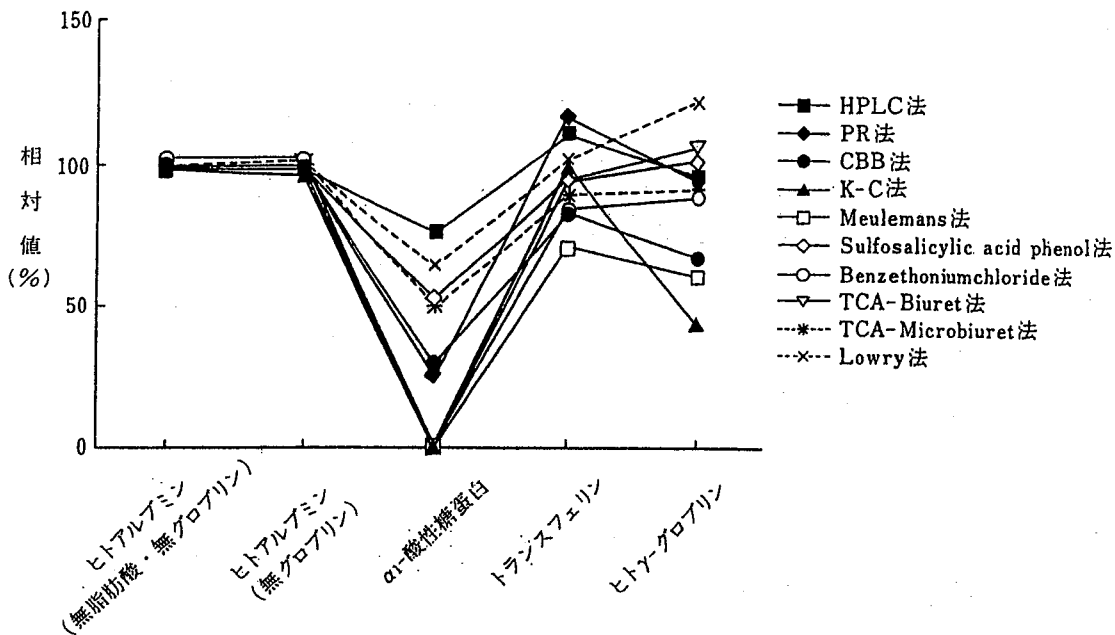


図4 各測定法に対する蛋白種間の検出感度比較

表6 各測定法における低分子蛋白の検出比較

No	疾患名	A/G	HPLC・紫外部検出法			PR法			CBB法					
			原尿	分子量 20 000 以下	分子量 10 000 以下	分子量 5 000 以下	原尿	分子量 20 000 以下	分子量 10 000 以下	分子量 5 000 以下	原尿	分子量 20 000 以下	分子量 10 000 以下	分子量 5 000 以下
1	慢性腎不全	1.7	3 262	5	0	0	3 122	0	0	0	3 082	0	0	0
2	慢性腎炎	0.9	6 324	3	0	0	6 322	0	0	0	6 273	0	0	0
3	腎移植後	0.7	373	25	0	0	305	0	0	0	421	0	0	0
4	慢性糸球体腎炎	1.8	225	13	8	0	224	0	0	0	239	0	0	0
5	急性腎不全	2.0	802	7	0	0	752	0	0	0	801	0	0	0
6	妊娠中毒症	2.8	1 776	0	0	0	1 785	0	0	0	1 691	0	0	0
7	転移性副腎腫瘍	0.1	402	18	0	0	353	0	0	0	386	0	0	0
8	慢性腎炎	1.6	5 756	19	7	0	5 575	0	0	0	5 331	0	0	0
9	腎移植後	0.7	478	0	0	0	392	0	0	0	362	0	0	0
10	膠原病	1.5	1 810	30	0	0	1 683	0	0	0	1 704	0	0	0
11	糖尿病性腎症	0.8	3 333	46	0	0	3 133	0	0	0	2 966	0	0	0
12	腎機能低下	0.6	637	0	0	0	541	0	0	0	473	0	0	0
13	慢性腎不全	0.5	522	0	0	0	360	0	0	0	385	0	0	0

限外濾過膜(Sartorius)：MW cut off値 20 000 以下、10 000 以下および 5 000 以下のものを使用

A/G：総蛋白を Asahipak GS-220 H で測定しアルブミンは免疫比濁法で測定した後、グロブリンを算出

子蛋白とほとんど差を認めなかった。また、本法は PR 法や CBB 法と比較すると低分子蛋白に対して高い検出感度を示した。

(7) 各測定法に対する蛋白種間の検出感度の比較³¹⁾

ヒトアルブミン(無脂肪酸・無グロブリン)を基準として、ヒトアルブミン(無グロブリン)、 α_1 -酸性糖蛋白、トランスフェリン、ヒト γ -グロブリンの各測定法に対する蛋白種間の検出感度比較を図4に示した。比較対象法として、PR法

表7 各測定法における多発性骨髄腫患者尿の検出比較 (mg/l)

	アルブ ミン 含量	HPLC・紫外部検出法			PR法			CBB法					
		原尿	分子量 20 000 以下	分子量 10 000 以下	分子量 5 000 以下	原尿	分子量 20 000 以下	分子量 10 000 以下	分子量 5 000 以下	原尿	分子量 20 000 以下	分子量 10 000 以下	分子量 5 000 以下
		1 BJP-λ	76	1 004	39	15	0	582	0	0	0	791	0
2 BJP-κ, IgG-κ	41	181	19	0	0	130	0	0	0	119	0	0	0
3 BJP-κ	55	2 246	30	0	0	1 585	0	0	0	1 392	0	0	0
4 BJP-λ	43	4 311	38	10	0	1 750	0	0	0	2 312	0	0	0
5 BJP-λ	15	1 882	34	0	0	1 230	0	0	0	1 030	0	0	0
6 BJP-λ	1	3 665	97	41	22	2 195	0	0	0	1 844	0	0	0

限外濾過膜(Sartorius) : MW cut off 値 20 000 以下, 10 000 以下および 5 000 以下のものを使用
アルブミンは免疫比濁法で測定

(マイクロ TP-AP : 和光純薬工業)、CBB 法 (トネイン TP : 大塚アッセイ)、K-C 法、Meulemans 法、Sulfosalicylic acid phenol 法、Benzethonium chloride 法、TCA-Biuret 法、TCA-microbiuret 法および Lowry 法の 9 法を用いた。ヒトアルブミンはすべての方法でほぼ 100 % を示した。しかし、 α_1 -酸性糖蛋白は 0 ~ 84 %、トランスフェリンは 64 ~ 105 %、ヒトアグロブリンでは 44 ~ 105 % と各種蛋白の測定方法に対する反応性に大きな差を認めたが、本法は蛋白種間での検出差異は最も小さかった。

(8) 多発性骨髄腫患者尿の反応性³¹⁾

8 例の多発性骨髄腫患者尿を用いて、本法と日常一般法との関係を検討した。本法の定量値を 100 % とした相対値比較では、PR 法 4.3 ~ 76.0 %、CBB 法 8.6 ~ 78.5 %、K-C 法 0 ~ 41.9 %、Meulemans 法 0 ~ 53.4 %、Sulfosalicylic acid phenol 法 24.7 ~ 98.5 %、Benzethonium chloride 法 41.0 ~ 99.4 %、TCA-Microbiuret 法 18.2 ~ 84.6 % であり、日常一般法はすべての患者尿において低値に測定された。一方、本法は日常一般法と比較すると、BJP λ , λ 型に対する反応性に差を認めなかった。特に、このような疾患は排泄される蛋白が低濃度でも臨床的意義が高いことから、より確実に検出することが必要である。

(9) 各測定方法における低分子蛋白の

検出比較³¹⁾

A/G 比が 2.8 以下のグロブリン領域蛋白が排泄されている患者尿 13 例について、限外濾過膜で、

表8 施設でのミニサーベイ成績 (mg/l)

施設	試料 1	試料 2	試料 3
A	382	1 113	2 751
B	399	1 079	2 777
C	387	1 117	2 792
D	384	1 067	2 822
E	383	1 074	2 813
平均値	387.0	1 090.0	2 791.0
SD	7.0	23.3	28.5
CV (%)	1.8	2.1	1.0

分子量 20000 以下、10000 以下および 5000 以下に分取した試料を用いて、各測定法における低分子蛋白の検出比較を表 6 に示した。同様に、多発性骨髄腫患者尿 6 例の検出比較を表 7 に示した。その結果、多発性骨髄腫患者尿を含めたほとんどの患者尿において、本法は分子量 20000 以下の蛋白を検出したが、日常一般法の PR 法および CBB 法ではこれらの蛋白は検出されなかった。

(10) 他法との相関⁴⁾

本法と日常一般法との関係を調べるため、患者尿 45 例について検討した。Meulemans 法 (y) と本法 (x) との関係は $r = 0.976$ 、 $y = 0.967x - 98$ 、CBB 法 (y) と本法 (x) との関係は $r = 0.993$ 、 $y = 0.913x - 20$ であり、PR 法 (y) と本法 (x) との関係は $r = 0.993$ 、 $y = 0.957x - 33$ であった。比較した 3 法の日常一般法は本法に比べ、負の系統誤差と固有誤差を示した。

(11) 施設間差³¹⁾

尿蛋白標準化ワーキンググループにおいて、同一カラム (Asahipak GS-220H) を用い、測定機器の種類 (島津、東ソー、ウォーターズ) の異なる 5 施設で、387.0 ~ 2791.0 mg/l の濃度範囲に

ある患者尿3検体を用いて、ミニサーベイを行った成績を表8に示した。尿蛋白濃度はそれぞれ387.0mg/l、1090.0mg/l、2791.0mg/lが得られ、CV値(%)は1.8、2.1、1.0と施設間差が小さく、本法は測定法に普遍性があることを確認した。

5) 測定装置の性能

本法で使用する測定装置の性能は、勧告法に示した性能とV.測定機器および機器の性能の項で示した1の1)~5)までの条件を満たす性能をもった測定機器を使用する。詳細は「高速液体クロマトグラフ分析のための通則」(JIS K0124-1983)¹⁰⁾および「高速液体クロマトグラフの性能表示方法」(JAIMAS 0005-1984)¹¹⁾を参照。

4 測定の準備

本法の測定の準備、カラム性能特性、直線性と検出感度、測定の精密さを記述する。

1) 測定の準備と確認

本法は以下の確認実験を行い、これが満たされたとき実施可能とする。

2) カラム性能特性の確認

(1) 蛋白分離能の確認

蛋白陽性患者尿を分子量1万カットオフ値の限外濾過膜で処理した前後のクロマトグラムを比較する。処理後では蛋白溶出時間に成分のピークが認められず、平坦であることを確認する。また、患者尿の蛋白溶出時間と蛋白標準液の溶出時間が一致していることを確認する。

3) 直線性と検出感度

最低検出感度は10mg/lであり、その直線性は少なくとも5000mg/lまでを確認をする。直線性は用いるカラムと測定機器の種類によって異なることがあるので注意を要する。

4) 測定の精密さ

尿蛋白濃度が300mg/l、1000mg/l前後の尿(プール尿または管理尿)を用いて、全操作を含めた精密さを尿蛋白測定標準化ワーキンググループで検討した結果、表9の許容範囲内であることを確認した。使用に際しては、表9の許容範囲内であることを確認した後に測定する。もし、満たされない場合はその原因を調べて改善した後に測

表9 測定精密さの誤差容認範囲

	濃度 (mg/l)	CV (%)
同時再現性	300	2.0以下
	1000	1.5以下
日差再現性	300	3.0以下
	1000	2.0以下

定する。

5) その他

実用基準法と評価被検法(日常一般法)との比較およびデータ解析と評価は『血清グルコース測定勧告法』⁴⁴⁾、または日臨技の『定量検査の精密さ・正確さの評価法指針(案)』⁴⁵⁾に準じて実施する。

謝辞：本研究の遂行のためご協力いただいたHPLC装置、カラムおよび試薬の各メーカーに感謝申し上げます。

文 献

- 1) Doetsch K, Gadsden RH: Determination of urinary total protein by use of gel filtration and a modified biuret method. *Clin Chem* 21: 778 ~ 781, 1975
- 2) 今井宣子ほか: AACC法による尿たん白定量法のレファレンス法としての評価・衛生検査 36: 1515 ~ 1518, 1987
- 3) Uriano GA, Gravatt CC: The role of reference materials and reference method in clinical chemistry. *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* October: 361 ~ 411, 1977
- 4) 伊瀬恵子ほか: 高速液体クロマトグラフィーを用いた尿中蛋白測定法の開発。医学検査 43: 994 ~ 1002, 1994
- 5) 伊瀬恵子ほか: 「パネルディスカッション」尿蛋白定量法の標準化にむけて その(2); 尿タンパク測定のアプローチ。医学検査 43: 286, 1994
- 6) 越智正昭ほか: 「パネルディスカッション」尿蛋白定量法の標準化にむけてその(2); HPLC法を用いたサーベイ解析。医学検査 43: 287, 1994

- 7) 金森きよ子、飯島史朗：「パネルディスカッション」尿蛋白定量法の標準化にむけて その(2)；HPLC法と比色法との比較。医学検査 43：288,1994
- 8) 今井宣子：「パネルディスカッション」尿蛋白定量法の標準化にむけて その(2)：アメリカ臨床化学会推奨法。医学検査 43：289, 1994
- 9) 内藤昭智：「パネルディスカッション」尿蛋白定量法の標準化にむけて その(2)；尿蛋白定量法の標準物質。医学検査 43：290, 1994
- 10) 日本工業規格 (JIS K 0124-1983) 高速液体クロマトグラフ分析のための通則。
- 11) 日本分析機器工業会 (JAIMAS 0005-1984) 高速液体クロマトグラフの性能表示方法。
- 12) 日本工業規格 (JIS K 0050-1983) 化学分析法通則。
- 13) 日本工業規格 (JIS K 3505-1983) ガラス製化学用体積計。
- 14) Kingsbury FB, Clark CP : The rapid determination of albumin in urine. *J Lab Clin Med* 11 : 981 ~ 989, 1926
- 15) 日本臨床衛生検査技師会一般検査研究班：一般検査事業報告。衛生検査 27 : 1213 ~ 1221, 1978
- 16) 島袋宏明：シンポジウム、尿蛋白定量法の統一に向けて；コントロールサーベイの現状から。医学検査 42 : 800, 1993
- 17) 平成7年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書：一般検査、日本臨床衛生検査技師会 282 ~ 325, 1996
- 18) Gornall AG : Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem* 177 : 751 ~ 766, 1949
- 19) Waddell WJ, Hill C : A simple ultra violet spectrophotometric method for the determination of protein. *J Lab Clin Met* 48 : 311 ~ 314, 1956
- 20) 菅原 潔、副島正美：蛋白質の定量法、生物化学実験法シリーズ、爪谷郁三、他編、No.7: 131 ~ 144、学会出版センター、東京、1990
- 21) Layne E : Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in enzymology* vol. 3, 447, Academic press, New York, 1980
- 22) Mayer MM, Miller JA : Photometric analysis of proteins and peptides at 191-194 μm . *Anal Biochem* 36 : 91 ~ 100, 1970
- 23) Itzhaki RF, Gill DM : A microbiuret method for estimating proteins. *Anal Biochem* 9:401 ~ 410, 1964
- 24) Bradford MM : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 : 248 ~ 254, 1976
- 25) 金森きよ子、佐野紀代子：Coomassie Brilliant Blue G-250による蛋白定量法。臨床病理 28 : 235 ~ 237, 1980
- 26) Macart M, Gerbaut L : Evaluation of an improved coomassie dye binding method for urinary protein assay. *Clinica Chimica Acta* 41 : 77 ~ 84, 1984
- 27) Wimsatt DK, Lott A : Improved measurement of urinary total protein (including lightchain proteins) with a Coomassie Brilliant Blue G-250-sodium dodecyl sulfate reagent. *Clin Chem* 33 : 2100 ~ 2106, 1987
- 28) 北川伸江ほか：色素結合法 (TCA ボンソーS)による尿中たん白の定量。衛生検査 30 : 932 ~ 935, 1981
- 29) 千葉正志ほか：クロマズロール B-complex を利用した尿たん白測定法。衛生検査 36 : 694 ~ 699, 1987
- 30) 酒井伸江、鈴木優治：トリフェニルメタン系色素による尿中総蛋白量の測定法。臨床検査 33 : 830 ~ 834, 1989
- 31) 越智正昭ほか：シンポジウム 高速液体クロマトグラフィーを用いた尿蛋白測定の実用基準化への試み。日本臨床化学会四国支部会誌 12 : 1996 (投稿中)
- 32) Fujita Y *et al.* : Color reaction between pyrogallol red-molybdenum (IV) complex

- and protein. *Bunseki kagaku* 32:379 ~ 386, 1983
- 33) Watanabe N *et al.*: Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin Chem* 32:1551 ~ 1554, 1986
- 34) 吉崎英清、大沢 進: 金属キレート化合物を用いた新しい尿中たん白測定法の検討。衛生検査 35:1171 ~ 1176, 1986
- 35) Meulemans O: Determination of total protein in spinal fluid with sulfosalicylic acid and trichloroacetic acid. *Clin Chim Acta* 5:757 ~ 761, 1960
- 36) Bossak HN *et al.*: A quantitative turbidimetric method for the determination of spinal fluid protein. *J Gene Dis Info*: 100 ~ 103, 1949
- 37) 岩田治平、西風 脩: 髄液および尿中蛋白の新微量定量法。臨床病理 29:497 ~ 501, 1981
- 38) 日本臨床化学会試薬専門委員会: HPLC を用いる血清尿酸の測定勧告法。臨床化学 22:300 ~ 307, 1993
- 39) 日本臨床化学界試薬専門委員会: HPLC を用いる血清クレアチニンの測定勧告法。臨床化学 23:326 ~ 334, 1994
- 40) 伊瀬恵子ほか: 高速液体クロマトグラフィーを用いた尿中蛋白測定法の開発と評価。医学検査 45:693 ~ 697, 1996
- 41) 越智正昭: 尿蛋白測定の問題点とこれからの動向。—標準化を目指して—。愛媛県臨床検査技師会 14:3 ~ 11, 1994
- 42) 今井宣子: 尿蛋白定量。検査と技術 23:295 ~ 300, 1995
- 43) Rosenheck K, Doty P: The far ultraviolet absorption spectra of polypeptide and protein solutions and their dependence on conformation. *Proc Natl Acad Sci US* 47:1775 ~ 1785, 1961
- 44) 日本臨床化学会試薬専門委員会: 血清グルコース測定勧告法。臨床化学 20:247 ~ 254, 1991
- 45) 日臨技: 定量検査の精密さ・正確さの評価法指針(案)。JAMT-HGM1-96
- 「尿蛋白測定標準化の確立」協力メンバー(順不同)
青木千鶴(誠心会吉田病院)、藤野真治(自治医科大学付属大宮医療センター)、清宮正徳(千葉大学医学部付属病院)、飯島史朗(共立薬科大学)、徳永賢治、西宮達也(愛媛大学医学部付属病院)、河野淳子、宮崎美幸(熊本市医師会熊本地域医療センター)、徳田邦明、塩尻雅子(和光純薬工業株式会社)、数見文彦、旭 英俊(栄研化学株式会社)
- 「検討経緯」
第1回:平成6年11月11日
第2回:平成7年5月11日
第3回:平成7年9月23日
第4回:平成7年11月10日
第5回:平成8年2月16日

(社) 日本臨床衛生検査技師会
尿蛋白測定標準化ワーキンググループ

越智正昭 (愛媛大学医学部附属病院)・委員長
芝生俊明 (市立旭川病院)
佐久間信弘 (東北大学医学部附属病院)
島田 勇 (自治医科大学附属病院)
大門正博 (自治医科大学附属大宮医療センター)
大澤 進 (千葉大学医学部附属病院)
伊瀬恵子 (千葉大学医学部附属病院)
金森きよ子 (東京医科歯科大学医学部附属病院)
千葉正志 (東京都立八王子小児病院)
内藤昭智 (近畿大学医学部附属病院)
坂本伸哉 (熊本市医師会熊本地域医療センター)