# 尿中の蛋白質の定量の検討

## 第 1 報

## ゲル濾過を用いる尿中微量蛋白質の定量について

岡山大学医学部公衆衛生（指導：緒方正名教授）

田　中　由紀子

（昭和56年7月3日受稿）

Key words：アルブミン，尿蛋白，ゲル濾過，
トネイン，バイオラッド

### 緒　言

尿中に排泄される蛋白質の量は正常ではわずかであるが，ある種の腎疾患では可成り多量に排泄され，また，一般に運動性蛋白尿と呼ばれる一過性に多量の蛋白質が検出される起立性の蛋白尿がある[1]．なお，はげしい労働負荷のあとでもわずかに蛋白質の排泄に増量がみられるので，尿中に存在する総蛋白質量を正確に測定することは，腎機能を知る上での意義が大きい．特に微量の蛋白質増加は運動負荷量と平行しているので[2]，スポーツ時の疲労，産業現場の肉体労働の判定や，Cd[3]及び Hg[3)4)]による産業中毒の早期発見など，手近な手段として重要な意義を持つと考える．

すでに運動尿や疲労尿についての詳細な研究報告はなされているが[5)~12)]，正常尿における微量蛋白については余り報告されていない[13]．すなわち尿中の蛋白質の定量は血清蛋白の定量の場合とはちがって，その含有量が少く共存物質の妨害も多い[14]．また溶存する無機物質のために pH の緩衝性も大であり，したがって簡便，かつ正確に定量することは比較的困難である．そこで著者はまず尿中の蛋白質以外の分子量の小さい物質を除去して後，再現性が良く，正確に微量の蛋白質が測定できる方法を検討した．

すなわち，簡便で感度が高く妨害される物質が少いとされる Bio-Rad 試薬[15]を用いる方法とゲル濾過法[16)17)18)]とを組合わせる事によって上記の目的を達することが可能であるかどうかをしらべた．更にこの方法を用いて正常尿及び調理作業現場における作業前，作業中，作業後の尿中の蛋白質量を実際に比較測定したので，その定量結果もあわせて報告する．また簡易法として別に作業者の尿について Meulman's 法[14]の改良法およびトネイン—TP 試薬[19]による正常尿の測定比較も試みた．以上を要約して，本研究の目的は作業者の作業負担及びスポーツ疲労の実態の把握と，その疲労管理を行うための一方法等として，尿中の微量の蛋白質をより正確に簡便に測定しようとする測定法の検討にある．

### 実験材料と実験方法

1．実験材料；尿

健康者の尿；25才から60才までの男子6名と，女子3名の尿を用いた．

作業者の尿；40才から50才までの男子2名，女子7名の某事業所二ヶ所で炊事に従事する人達9名の朝，昼，夕方の尿を比較測定のための定量に使用した．

2．試薬溶液

1）Bio-Rad 法の試薬溶液

Dye-Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratory 製の Bio-Rad Protein Assay Kit) をそのまゝ使用した．

2）Folin-Lawry 法の試薬溶液[20]

A；2％炭酸ナトリウムの0.1N－苛性ナトリウム溶液（$Na_2CO_3$ 及び NaOH は和光純薬試薬特級を用いた.）

B；①0.5％硫酸ナトリウム溶液
（$Na_2SO_4 \cdot 5H_2O$ は和光純薬試薬特級）
②1％の酒石酸カリウムナトリウム溶液
（セニエット塩は片山化学工業の試薬特級を用いた.）

C；使用前にA液50mℓにB液①1mℓ及びB液②1mℓを混合して用いる.

D；フェノール試薬（半井化学製1.8N）の液そのまゝを使用した.

3）Meuleman's 法[14]（改良法）の試薬溶液

A；27g/dℓ スルホサリチル酸水溶液
（$C_6H_3(OH)(SO_3H)COOH \cdot 2H_2O$ 和光純薬の試薬特級を用いた.）

B；13.2g/dℓ の硫酸ソーダ溶液
（$Na_2SO_4$ は和光純薬試薬特級を用いた.）

（A液1容をB液9容に攪拌しながら加えよく混和して保存する.）

C；2mg/dℓポリエチレングリコール－6000水溶液（PEG-6000（片山化学））

4）トネイン－TP 法試薬液[19)21)]

トネイン－TP試薬液（OTSUKA ASSAY LABORATORIES 製造）をそのまゝ用いた.

5）Albumin 標準液

人血清 Albumin Fraction V を用いて20mg/dℓの生理食塩水溶液を作り，これを必要に応じてうすめて標準液とした.

（人血清 Albumin は，Miles Laboratories の Pentax Human Albumin Fraction V を用いた．NaCl は和光純試薬特級を用いた.）

たゞしトネイン－TP 法の場合はトネイン－TP 試薬に添付された標準品としての Human Serum Albumin 4mg/vialを用いた.

6）抗原希釈ゲル単純免疫拡散法用[22)23)]の薬品

A；Agar；DiFCO Laboratories 製の Special Agar-Noble を用いた.

B；抗体1）Anti-Transfevrin-serum
2）Anti-Human-Zn $\alpha_2$-Glycoprotein-serum
3）Anti-$\alpha_2$-HS-Glycoprotein-serum
4）Anti-Human $\alpha_1$-Acid Glycoprotein-serum
5）Anti-Human-Albumin-serum
6）Anti-$\alpha$-Antitripsin-serum
7）Anti-$\alpha_1$-Anticlrymotripsin-serum
8）Anti-$\gamma$-Globlin-serum
9）Anti-Human-Hemoglobin-serum
10）$\beta_2$-Microgloblin
以上は Miles Laboratories 社製品

C；Barbital Buffer（pH 8.6 M＝0.05）
バルビタールナトリウム10.3gとバルビタール1.84gを蒸留水にとかし1000mℓとした.
（バルビタールナトリウムは和光純薬特級，バルビタールは Merck 製特級を用いた。）

2．装置

1）吸光度の測定器具

a）分光光度計（HITACHI-PERKINER-MER 139型及び100－20型）

b）セル（ガラス）必要に応じて光路長5㎜のものと10㎜を用いた.

2）ゲル濾過用カラム及びゲル[18)]

（Sephadex G-50 fine は Pharmacia Fine Chemical 製を用いた.）

a）充塡剤は Sephadex G-50 fine を用い蒸留水中で充分膨潤させた後（約24時間以上）用意したカラムに充塡した.

b）カラムはエルマのポリエチレン製で直径11㎜長さ65㎜のものを用い60㎜の高さまで Sephadex を充塡した．ゲル濾過を行う際には，カラムの上部に更にポリエチレン製のカラムロートを装着した.

c）展開溶媒は蒸留水を用いた.

3）比重測定；D.Z.型蛋白計　共栄製作所製

3．測定方法

A；尿中蛋白質の確認反応

抗体抗原希釈ゲル単純免疫拡散法（逆一次元拡散法による抗体抗原反応）

寺田ら[19)]の方法を参考として pH 8.6 のバルビタール緩衝液にとかして作った3％アガロース溶液に，同量のゲル濾過した尿試料を55℃で混合し，55㎜×75㎜，厚さ約1㎜の Agar plate を作成し，3㎜φにあけた穴の中へ，それぞれの抗体5μlづゝを入れた．48時間後に観測し，常法にしたがって洗滌，染色，乾燥を行なって

処理した.

B；尿蛋白の定量法

a）ゲル濾過後発色させる方法(Fil-Col 法)；ゲルベットの上部に残存する水分を除去したのち，試料溶液0.5mℓをカラムの上部に静かに注入し，カラムの上部に試料が沈着したのを確かめてから，直ちに蒸留水10.0mℓを静かに注ぐ．最初の留液1.5mℓをのぞき，その後の留液1.6mℓを採り，これにBio-Rad試薬0.4mℓを加えてよく振りまぜ，約10分後に595nmで試薬ブランクを対照として，光路長0.5mmのガラスセルを用いて，吸光度を測定した．一方標準液を用い，同様の方法で測定して得た検量線より総蛋白量を算出した．

b）ゲル濾過後Folin-Lawry試薬を用いる方法（Fil-Lawry法）；上と同様にしてゲル濾過した液について，その液0.5mℓにC液3mℓを加えてたゞちによく振盪した。30分間以上放置したのち，750nmで吸光度測定をした．同様にして測定した標準液の検量線から試料の蛋白量を算出した．しかし，Fig. 1に示すようにFil-Col法と比較して感度も悪く，検量線の傾斜がゆるく，測定誤差が大きく，更に測定までに要する時間も長いので実用には適しないと考えられる．

c）直接発色法（Col法）

ゲル濾過をしないで直接試料を1.6mℓとりBio-Rad試薬0.4mℓを加えてよく振りまぜ，10分後に595nmで試薬ブランクを対照として，吸光度測定を行なった．同様にして標準液を測定して得た検量線から蛋白量を算出した．

d）発色させて後ゲル濾過をする方法（Col-Fil法）

上に掲げたC法と同様の方法で，直接試料にBio-Rad試薬を加え，よく振りまぜてから10分後に，その0.5mℓをとってゲル濾過をして，その留液について595nmで吸光度測定を行なった．同様にして標準液を測定して得られた検量線から，試料の蛋白量を算出した．

以上の四つの方法で得られた検量線をまとめてFig. 1に示した。

e）Meuleman's の改良法

試料を3.0mℓとりPEG-6000 2％液0.1mℓを加えてよく混合した後，スルホサリチル酸液2.0mℓを加えて更によく振盪し，正確に10分後に660nmで，光路長10mmのガラスセルを用いて，水を対照として吸光度測定をした．同様に標準液を測定して得られた検量線から試料の蛋白量を算出した．

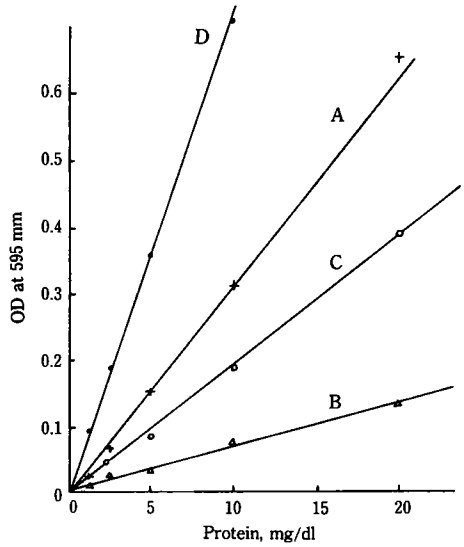


Fig. 1 Calibration curve of minute amount of protein
A; Fil-Col method B; Folin-Lawry method
C; Col-Fil method D; Col-metod

f）トネイン−TP試薬による定量法

トネイン−TP試薬3.0mℓに試料0.05mℓを加えてよく振りまぜてから約10分後に595nmで試薬ブランクを対照として，光路長，10mmのガラスセルを用いて吸光度を測定した．同様にして標準液を測定して得られた検量線から蛋白量を算出した．

## 実験結果

A．ゲル濾過した正常蛋白尿の組成について

Fil-Col法による尿蛋白の定量を行なうに先立って，ゲル濾過をした正常尿の蛋白組成を知る目的で，ゲル濾過をして得た留液を用いて逆一次元拡散法による抗体抗原反応を試みた[23,24]．勿論，その各々の抗原量が異るので定量的な観測の根拠はないが，定性的には反応結果から，Albumin, γ-Globlinがみとめられた．抗体が多量に存在する場合にはその反応が認められない

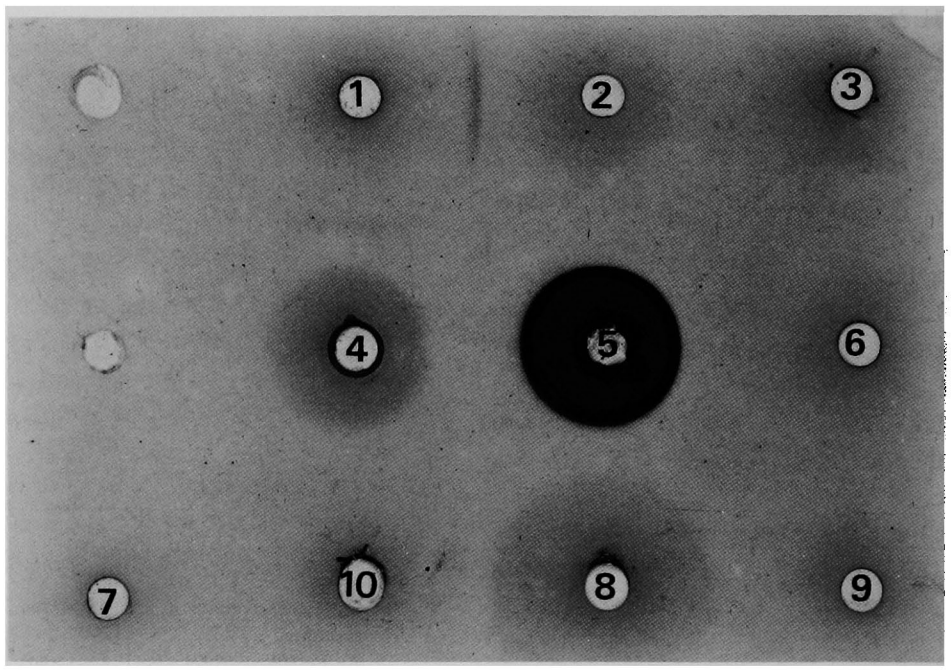


Fig. 2 Patterns of single radial immunodiffusion of urinary protein using human-plasma protein-antisera
1) Anti-Transferrin-serum
2) Anti-Human-Zn-$\alpha_2$-Glycoprotein-serum
3) Anti-$\alpha_2$ HS-Glycoprotein-serum
4) Anti-Human $\alpha_1$-acid-Glycoprotein-serum
5) Anti-Human-Albumin-serum
6) Anti-$\alpha_1$-Antitripsin-serum
7) Anti-$\alpha_1$-Antichymotrypsin-serum
8) Anti-$\gamma$-Globlin-serum
9) Anti-Human-Haemoglobin A-serum
10) Anti-$\beta_2$-Microgloblin-serum

場合もあるが，以上の他に，Zn-$\alpha_2$-Glycoprotein, $\alpha_1$-acid-Glycoprotein, Transferrin の存在が推察された．しかし，その他の蛋白質については判定が出来なかった．すなわち，これらについてはあらわれたリングがうすく，かつ，拡散しているので，存在するかどうかを決定するには今後の検討が必要である．参考のために，反応後染色処理をしたプレートの写真(Fig. 2)を示す．

その他，ゲル濾過をする事によって除かれると考えられる分子量の小さいものについて検討した．

すなわち，正常尿に9倍量のアルコールを加え，沈澱物を除去したのちの上澄液について，アルコール分を完全に除いた残渣に，Coomasie Brilliant Blue G-250でわずかに変色するものがある事を確認した。また，ダイアフローメンブレン YM5及びUM10を用いて濾過した尿試料についても，同様に，呈色するものがある事を確認した．

以上の結果から，ゲル濾過によって得られる尿中の蛋白質の主なものは，albumin と$\gamma$-Globlin であるとして測定し，血液の細分画である Zn-$\alpha_2$-Glycoprotein, $\alpha_1$-acid-Glycoprotein, Transferrin 等については検討の余地があり，将来の課題とした．したがって以下の定量法に用いた検量線は Human albumin を標準としたものである．後述したが，$\gamma$-Globlin はalbumin と近似の値が出るものとして扱った．(Table 6

参照)

B. Fil-Col 法と他の方法との比較

1. Fil-Col 法及び Fil-Lawry 法との比較

標準液を用いこれらの方法で得られた検量線は，Fig. 1 に示したとおり何れも原点を通る良好な直線となった．しかし Fig. 1 に見られるとおり Fil-Col 法と Fil-Lawry 法との比較の結果，前者の方が 4 倍もの感度を持ち，また，20mg/dℓ の蛋白量について 5 回繰返しによる変動係数は 2.6%と小さく，再現性も非常に良好であった．なお回収率は Table 1 に示したように98.8%～113.2%と良好であった．

Table 1. Recovery of total protein by Fil-Col method

| Sample | Absorbance | Total protein (mg/dℓ) | Recovery (%) |
|---|---|---|---|
| Urine (u) | 0.1135 | 3.61 | |
| (u+20mg/dℓ)/2 | 0.3575 | 11.38 | 98.8 |
| (u+10mg/dℓ)/2 | 0.2147 | 6.83 | 100.6 |
| (u+ 5mg/dℓ)/2 | 0.1457 | 4.63 | 113.2 |

Table 2 Determination of urinary total protein by three methods

| Sample | Fil-Col method | Direct Col method | Col-Fil method |
|---|---|---|---|
| a | 5.01 mg/dℓ | 8.16 mg/dℓ | 2.94 mg/dℓ |
| b | 0.41 | 1.93 | 2.65 |
| c | 5.60 | 9.17 | 2.67 |
| d | 1.38 | 4.10 | 1.02 |
| e | 3.05 | 5.76 | 2.76 |
| f | 1.45 | 6.04 | 1.25 |
| g | 2.74 | 9.50 | 3.30 |
| h | 1.38 | 4.95 | 2.75 |
| i | 1.61 | 5.15 | 3.02 |
| j | 4.73 | 9.44 | 7.56 |
| k | 0.30 | 4.10 | |
| l | 1.94 | 4.35 | |
| m | 1.13 | 7.95 | |
| n | 1.70 | 5.29 | |
| | (X) | (Y) | |

$Y = 3.61 + 1.11X$
Correlation coefficient = 0.78

2. Fil-Col 法，Col-Fil 法，Direct col 法の3方法による同一試料の測定結果の比較

Table 2 に Fil-Col 法による測定結果と，Bio-Rad試薬を直接尿に加えて発色させ吸光度を測定する直接 Col 法及び，直接 Col 法で呈色した試料をゲル濾過した後，吸光度を測定した(Col-Fil 法) 結果とを表記した．本表からも明らかであるが，Fil-Col 法より直接 Col 法は大きな値が得られた．これは尿中の低分子物質による試薬の呈色結果であろうと考えられる．したがって実際に存在する蛋白量より高く値が出ると考えられる物質を除く目的で，直接 Col 法で呈色させた試料をゲル濾過すれば，試薬で呈色したまゝの低分子物質が除去出来ると考えた．また，呈色したまゝ蛋白質だけがゲル濾過する事によって純粋に採取する事が出来たら好都合だと考えた．そこで，前述の呈色した試料をゲル濾過し，留液の1.6mℓ(呈色した液)を採り595nm で吸光度測定をした．その結果は Table 2 に示す通りで，Fil-Col 法と近い値は得られたが，5mg/dℓの溶液について 5 回繰返しによる変動係数は，13.3%と大きく，再現性も悪いので，この方法で得た測定結果に対する信頼性は低いと云える．また，Fil-Col 法との相関係数は0.48であり，直接法との相関係数も0.50と非常に悪い．

なお，直接 Col 法による障害物質として考えられるものとしては，尿中の常成分である尿酸，尿素，フェノール類，クレアチニン等を通常尿に存在する濃度で，Bio-Rad 試薬により，呈色する事を確認した．

Table 3 にはこれらの方法による検量線と各についての回帰式及び相関係数を示す．

Table 3 Regression equation between protein concentration (x) and optical dencity (y) at 595 nm and correlation coefficient (r) with normal urine

$y = ax + b$

| | Fil-Col method | Col-method | Col-Fil method |
|---|---|---|---|
| a | 0.031 | 0.071 | 0.020 |
| b | -0.007 | 0.011 | -0.020 |
| r | 1.000 | 0.991 | 0.999 |

3. Fil-Col 法とトネイン-TP 法による正常尿の測定結果の比較

トネイン-TP 試薬は，Coomasie Brilliant Blue を用いた試薬であるが，界面活性剤メチル

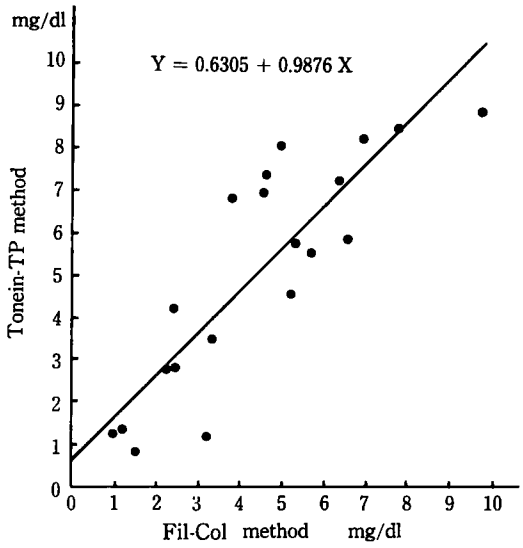


Fig. 3 Correlation of two methods
Coefficient of correlation: 0.857

4mg/dℓ（1：1）では109.0%で，再現性は8 mg/dℓ 5回測定で変動係数5.91%であった．

Table 4に，今回検討したFil-Col法を含めて尿中の微量蛋白質の定量法で，実用に向くと考えられる方法3種の簡易度，定量性，必要時間的比較及び特異性について，相対的な比較を示した．

C．Fil-Col法を中心とした事業所での測定成績

Fil-Col法及びMeuleman's法改良法による事業所での測定結果

Fil-Col法を用いて事業所二ヶ所の給食施設で炊事作業にたづさわっている人達の尿を，作業前，作業中，作業後の三回に分けて採取し，尿中の蛋白量を測定した．その結果をTable 5に示す．また比較の目的でMeuleman's法の改良法による測定も同時に行なったので，その結果も併記した．一名を除いては高濃度の蛋白が出現する程の作業とは認められなかったが，中にはや丶多目の蛋白量がすでに作業前にみられ，作業中に減少した者と，や丶多目のま丶終始したが，別に疲労を訴える事もなかった．この表からも明らかであるがMeuleman's法改良法による測定値が，Fil-Col法によるよりも，や丶少な目の値が出る傾向が見られた．

Table 4 Comparison of the property among three methods

| | Simplicity | Sensitivity | Time | Speciality | Reproducibility |
|---|---|---|---|---|---|
| Fil-Col method | + | +++ | + | +++ | ++ |
| Col method | +++ | ++ | +++ | + | + |
| Tonein-TP | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ |

セルロースを用いて，直接尿蛋白中の測定に障害する物質を除外する事が出来るように考えられているが，著者は更に，Fil-Col法とトネイン−TP法による測定結果を比較する目的で，正常尿20検体を測定し，得た結果をFig. 3に示す．両者の測定結果には良好な相関関係が見出され，相関係数は，0.857であったが，後者がや丶高い値を示す傾向にある．これは分子量の小さい物質がやはり呈色を示す結果であると考えている．事実，試料尿をゲル濾過し，初留液より順次0.5mℓずつ分取し，その各液についてトネイン−TP液による呈色の結果，標準タンパク液では4本目から6本目までしか呈色しないが，尿の場合は7本目以下でもわづかに呈色する部分がある事を確かめた．これは分子量の小さいもので，なおトネイン−TPで呈色するものがある事を示している．

なお，トネイン−TP法測定による微量蛋白についての回収率はU+6mg/dℓ（1：1）で94.8%，U+

## 考 案

Bio-Rad試薬はCoomasie Brilliant Blue-G-250が蛋白質と結合して赤から青へと変色する性質を利用したもので[14]溶液の最大吸収は465 nmから595 nmへと移動する．したがって波長595nmで吸光度測定をすれば，蛋白量を測定することができ，感度も高く各種の蛋白質間の変動も少い．呈色は安定で試薬添加後5分〜1時間まで一定の吸光度を示し，厳密な測定時間を必要としない利点がある．

Table 5 Determination of urinary protein of cooking workers in two companies

| | | Morning | | | Noon | | | Evening | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Method | Fil-Col | Meul | | Fil-Col | Meul | | Fil-Col | Meul |
| | pH | mg/dℓ | mg/dℓ | pH | mg/dℓ | mg/dℓ | pH | mg/dℓ | mg/dℓ |
| A | 1 6 | 13.88 | 12.41 | 6 | 14.83 | 12.54 | 6 | 11.84 | 11.24 |
| | 2 6 | 12.95 | 16.21 | 6 | 5.66 | 4.29 | 6.5 | 5.95 | 4.82 |
| | 3 6 | 4.61 | 4.16 | 6 | 35.43 | 30.00 | 6 | 31.96 | 30.00 |
| | 4 6 | 4.26 | 3.51 | 7 | 4.04 | 4.16 | 7 | 3.15 | 2.46 |
| | 5 6.5 | 5.79 | 4.16 | 7 | 6.20 | 6.13 | 7.5 | 6.68 | 4.42 |
| | m | 8.30 | 8.09 | | 13.23 | 11.42 | | 11.92 | 10.59 |
| | u | 4.72 | 5.84 | | 13.10 | 10.93 | | 11.61 | 11.34 |
| B | 6 | 4.36 | 3.15 | | 4.87 | 3.01 | | 4.71 | 3.28 |
| | 7 | 3.82 | 4.22 | | 3.40 | 3.42 | | 3.15 | 3.15 |
| | 8 | 4.03 | 3.28 | | 4.29 | 3.42 | | 3.59 | 3.42 |
| | 9 | 1.56 | 2.34 | | 2.77 | 3.01 | | 4.20 | 4.63 |
| | m | 3.44 | 3.25 | | 3.83 | 3.22 | | 3.91 | 3.62 |
| | u | 1.27 | 0.77 | | 0.93 | 0.24 | | 0.68 | 0.64 |
| R | | 0.953 | | | 0.997 | | | 0.996 | |

Table 6 Absorbance of albumin and γ-globrin by Bio-Rad method

| mg/dℓ | Albumin | γ-Globrin B | Ratio |
|---|---|---|---|
| 10 | 0.801 | 0.660 | 1.2 : 1 |
| 5 | 0.552 | 0.394 | 1.3 : 1 |
| 2.5 | 0.318 | 0.220 | 1.4 : 1 |
| 1.25 | 0.171 | 0.105 | 1.6 : 1 |

また，Bio-Rad試薬はTable 6に示す通りalbuminと α-GlobulinとのOD差が比較的少いので，標準物質としてはHuman serum-albuuminを用いた．しかし，先にも述べたが，正常尿ではalbuminと γ-Globulinが主な蛋白質であるが，その他の存在が推定される微量なものについては検討していないし，作業後や運動後の尿では蛋白質の種類や組成が異ると[25]云われているので，追ってそれらの試薬による発色を詳細に検討する計画である．

直接尿試料にBio-Rad試薬を用いて，呈色による吸光度測定したものは，これら尿中の蛋白質すべてにBio-Rad試薬が反応したと考えて，尿中の総蛋白量のscreeningには簡便で有効な手段であると考えるが，こゝで問題になるのは，共存する低分子物質による呈色である．すなわち，これらによって，測定値がやゝ過大となる恐れがある事を見逃す訳には行かない．したがって正確な測定にはFil-Col法が有効である．

また，尿試料にBio-Rad試薬を加えて呈色させた後，ゲル濾過をして低分子物質を除く方法は，結果にバラつきが大きく，再現性も悪いので定量方法としては不適当であると考える．しかし，試料をまずゲル濾過したあと，試薬で発色させる方法は再現性もよく，しかも感度が高く従来のFolin-Lawryの4倍に達し正常尿中の微量の蛋白質を簡易にかつ正確に定量する事が出来た．したがって本法は尿中の微量の蛋白質の定量法としてはすぐれた方法であると考える．たゞ，カラムにSephadex G-50をつめるのに，何れのカラムにも均一にロットを揃える事が難点である．したがって，ロット毎に検量線を作り直す方が好ましい．

なおゲル濾過を行う条件を検討する際の参考として，K. DotschがSephadex G-50 fineを用いて分子量4000以上のものを得たと報告しているので[18]，この方法を利用した．先にのべた通りに用意したカラムに，albumin標準液を加え，ゲルの上部に沈着させてから，蒸留水で展開した．展開した留液をはじめから0.5mℓづゝ採取し

て，その各々の液についてタンパク量を測定した結果，第1番目から第3番目までの留液にはほとんど蛋白質の存在はみとめられなかったが第4番目から第6番目までの留液に蛋白質の殆んどがみとめられた．その含量はこれら後半の3つの留液の合計が回収率として20mg/dℓと10mg/dℓの場合何れも100%に近い収率であった．したがって初留液1.5mℓ（45滴）を捨てゝ，次の1.6（48滴）を試料として扱うのは合理的であると考えた．1.6mℓを採る理由は，試薬の量的な割合がSampleの1/4としたかったからである．

一方，Sephadex G-50を用いて尿を濾過し，分子量約4000以下の低分子物質が含まれると考えられる液について，トネイン−TP試薬での発色が約1～2%見られた．なお，トネイン−TP法におけるA/G比の影響は少くA/G 0.38はA/G 2.53の91%の発色率を示し，同時再現性についても，4症例の尿，それぞれ12回測定で求めた変動係数は何れも3%以下であると報告されている[21]．

前にも述べたが，著者はFil-Col法による測定結果と比較する目的で，正常尿20検体について，同時にトネイン−TP法による測定を行なった．しかし，5mg/dℓ以下の蛋白質量では感度がおちる傾向がある．したがって，事業所やスポーツ現場で，作業負荷が大きく尿蛋白が多く出るものや，蓄積疲労者を作業やスポーツを行う前に見出すためには，トネイン−TP法で充分目的を果す事が出来ると考えるが，正確な尿中の蛋白質の定量が必要な場合には，Fil-Col法が有効である．ちなみに，通常尿中の蛋白質測定に用いられているテステープの確認限度は30mg/dℓであるが，Fil-Col法では2mg/dℓ以上，トネイン−TP法では5mg/dℓ以上である．

さらに，Fil-Col法による実際的応用として，事業所の炊事作業にたずさわっている人々の尿を採取し，朝，昼，夕方の尿中の蛋白質量を測定したが，その結果は先に示した通りである．対照が各1名ずつ50才近い男性が含まれてはいるものゝ，他は40才～50才の女性であり，作業にとりかゝる前の通勤の状況や，朝の家事労働の程度，その他の条件も考慮して結果の検定を行う必要があると考える．したがって，この事については更に例数をふやし，生活条件を考慮した検定をする事を考えている．たゞ，A事業所の方がB事業所より蛋白質量の増加率が多い傾向にある事がわかった．なおA事業所の3の人については蛋白質量の増加が目立ったので，その旨を雇用者側に注意を伝えた．また，1と2の人については通勤前に可成りの家事労働をしたとの事である．これらの成績から尿中の微量蛋白質を正確に測定するためには，Fil-Col法が最も有効であると考える．しかし，欲を云えば更により一層簡便な操作で測定が可能であるように検討する必要がある．

なお，比較の目的でMeuleman's法の改良法による測定も同時に行なったが，Table 3に示すようにこの方法ではFil-Col法よりやゝ小さい値が出た．これは改良法として用いた界面活性剤の量に，まだ検討の余地が残されている．しかしこれら2つの方法による測定結果の相関は非常に良好であった．この事業所における尿のトネイン−TP法による測定は実施しなかった．

なお，Meuleman'sの改良法及びトネイン−TP法による測定結果の検討の詳細，その他については次の機会にゆずる．

## 結　　論

作業およびスポーツにおける肉体負担をしらべ，保健管理に役立たせる一つの方法として，尿中の微量蛋白質の定量法を考案した．さらに，これを作業場に応用して以下の成績を得た．

1．ゲル濾過をした正常尿中の蛋白組成は，抗原希釈ゲル単純免疫拡散法によって，albumin，と$\gamma$-Globlinがみとめられ，その他にZn-$\alpha_2$-Glycoprotein，$\alpha_1$-Acid glycoprotein，Transferrin等の存在が推察されたが，その他の蛋白質については判定が出来なかった．

2．Bio-Rad試薬は呈色が安定であり，感度が高く，測定時間があまり厳密に要求されない．一方，ゲル濾過をする事によって，尿中の低分子物質が除去されるので，この二つの方法を組み合わせて分子量4,000以上の蛋白質のみを正確に，比較的簡便に尿中の蛋白質を測定する事が可能である．（Fil-Col法とする．）

3．Fil-Col法とトネイン−TP法による正常尿の測定結果から，両者は良好な相関関係を示し

た．たゞ後者の方がやゝ高い値を示す傾向がある．また，炊事にたづさわる人々の尿について，Fil-Col 法及び Meuleman's の改良法による同時測定を行なった結果，両者は良好な相関関係を示したが，後者がやゝ低い値を示した．

4．以上の結果から，尿中の正確な蛋白質の定量を行うには Fil-Col 法が有効であるが，作業者やスポーツをする人達の健康管理をする目的であれば，トネイン−TP 法は簡便な方法であると考える．

## 謝　　辞

本論文を作製するに当って，多大なるご指導，ご鞭撻を，また，ご稿閲を賜わった恩師緒方正名教授に心より謝辞を申し上げます．なお，試料を頂くに当ってご高配を頂いた方々や，試料を提供して下さった方々にも深く感謝いたします．

## 文　　献

1．木下康民，平沢由平：蛋白質とその臨床，(C)蛋白質の発生機序，金原出版，pp. 10—21
2．松井義典：Donaggio 反応及び尿微量蛋白定量法に関する研究，岡山医学会雑誌，**92**，981—988，989—993，995—998，1980．
3．Piscator, M.: Proteinuria in chronic cadmium poisoning. *Arch. Environ. Health* **5**，335—355，1962．
4．Clinton, H., Hienes, C.H. and Haley, T.J.: *Clinical Toxicology,* 5th edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 1972.
5．小郷克敏，井本岳秋，野見山俊一，沢田芳男：運動性尿蛋白の尿中酵素活性による評価，体力科学，**27**，73−80，1978．
6．大森祥夫：運動後尿の Donaggio 反応陽性物質の同定，体力科学，**27**，117—123，1978．
7．Poortman, J. and Jeanloz, R.W.: Quantitative Immunological determination of 12 plasma proteins excretd in human urine collected befor and after exercise. *J. Clin. Invest.* **47**，386−393，1968．
8．緒方正名：濾紙 BPB 染色法による疲労尿蛋白測定法に関する研究，岡山医学会雑誌，**74**，68−71，1962．
9．緒方正名，望月義夫，那須昭三：サッカー試合における尿疲労反応の研究（特に尿微量蛋白測定法，ドナジオ反応，ズルフオサリチル酸反応の相関に関する推計学的考案，岡山医学会雑誌，**69**，179−184，1957．
10．緒方正名，松田　昭：濾紙 BPB 染色法による某造船工場に於ける疲労調査並びに疲労管理の研究，岡山医学会雑誌，**74**，1−6，1962．
11．緒方正名，松田　昭：尿微量蛋白の新定量法およびエネルギー代謝と尿蛋白排泄量との関係，労動科学，**42**，794−798，1966．
12．緒方正名：濾紙 BPB 染色法による某紡績工場作業員疲労調査成績，岡山医学会雑誌，**74**，1−3，1962．
13．Savory, J., Pu, P.H. and Sunderman, F.W. Jr.: A biuret method for determination of protein in normal Urin. *Clin. Chem.* **14**，1160−1170，1968．
14．北村元任：総タンパク，尿，髄液の総タンパク質，実験臨床化学，医歯薬出版，pp. 197−198，1976．
15．Bradford, M.M.: M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micogram of quantities protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**，248−254，1976．
16．Doetsch, K. and Richard H. Gadsden: Determination of total urinary protein combining lowry sensitive and biuret specificity. *Clin. Chem.* **19**，1170−1178，1973．
17．Doetsch'K.: Determination of total urinary protein by combined gel-filtration and automated biuret reaction. *Clin. Chem.* **18**，296−298，1973．
18．Doetsch, K. More on urinary protein determination technique. *Clin. Chem.* **23**，1186−1187，1977．
19．伊藤機一，上野信男，笹田哲生，加藤和義：色素 CBB-G250を用いた尿蛋白および髄液蛋白定量法の検討，

臨床検査機器・試薬，第3巻，第3号，株式会社ラボサービス，pp. 256－261，1980.

20. 菅原 潔，副島正美：蛋白質の定量法，生物化学実験法7，学会出版，p. 99，1979.

21. 勝田祐年：Coomasie Brilliant Blue G-250を用いる尿蛋白定量法の検討，Biomedical Journal **4**，563－579，1980.

22. StGroth, S.F., Webster, B.G. and Datyner, A.: Two staining procedure for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochem. Biophys. Acta* **71**, 377－391, 1963.

23. 寺野由剛，西沢喜久子，前田謙次：ヒト血清蛋白の総括定量法の開発 第一報，生物物理化学，**16**，234－239，1972.

24. 寺野由剛，新発田杏子，市橋治雄：抗体ゲル単純拡散法と抗原ゲル単純拡散法の進歩，臨床化学，**2**，28－55，1973.

25. Pootmans J.R.: Influence of physical exercise on proteins in biological fluids. *Biochem. Exercise Med. Sports* **3**, 312－327, 1969.

# Studies on determination of urinary protein

## Part I. The determination of minute amounts of protein in urine

Yukiko TANAKA

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama Japan

(Director: Prof. M. Ogata)

Physical loading can be monitored by measurement of the amounts of urinary protein. The Bio-Rad method in combination with gelfiltration gave the following results.

1. The presence of albumin and $\gamma$-globulin in proteinuria was recognized by immunodiffusion in antigen-containing gel. The presence of $\alpha_1$-Acid-Glycoprotein, Transferrin and Zn-$\alpha_2$-Glyco-protein was also demonstrated. However, other proteins need to be confirmed.

2. With the direct Bio-Rad method, some low molecular substances other than protein showed coloration. Urinary protein over 4000 molecular weight could be measured by removing lower molecular weight substances by gelfiltration. (Fil-Col method).

3. Small amounts of urinary protein could be determined by the modified turbidimetric method of Meuleman. Good correlation was obtained between the Fil-Col method and the turbidimetric method, and between the Fil-Col method and the TONEIN-TP method.

4. From the above results, it was concluded that the Fil-Col method is useful for the exact quantitative determination of minute amounts of urinary protein, and that the TONEIN-TP method is useful for screening of minute amounts of urinary protein.