

# 尿微量蛋白測定法による産業疲労の研究

## 第 1 編

### 微量蛋白のスクリーニング法について

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

専攻生 松 田 昭

〔昭和42年4月17日受稿〕

#### 緒 言

従来より生化学的な疲労測定法として、尿 Donaggio 反応<sup>1)</sup>、及び、OH-Chemocorticoid<sup>2)</sup>、尿中乳酸<sup>3)</sup>の定量等が用いられて来たが、何れもその操作が複雑で事業場に於いて多人数を一度に短時間で測定することは困難であった。然し乍ら、事業場に於いては、作業員全員の産業疲労を測定し、比較的労働量の多い人や、疲労症状を現わした人を Check し、これを管理して、災害や疾病を未然に予防すれば、直接には作業員の健康を守り、一方においては、労働力を有効に生産に直結させることが出来る。此の目的の爲には、疲労の簡単な Screening 法が必要である。

此の Screening 法の一つとして、緒方氏<sup>4)5)</sup>は、尿微量蛋白を測定する方法として、濾紙 B. P. B. 染色法 (濾紙 Spot. Test) を考案し、これを疲労測定法に利用して、スポーツ疲労や産業疲労の測定を行った。

著者は、この目的に合致した疲労尿蛋白の Screening 法として、従来の濾紙 B. P. B. 染色法に改良を加えて、予め濾紙を染色した上に尿を Spot すると言う簡便な方法を案出したので、ここに発表する。

#### 実験材料並びに実験方法

実験材料: 25才~35才の健康な成人男子30名について、作業直後の尿を採集して直ちに実験に使用した。

実験方法: 従来の濾紙 B. P. B. 染色法 (以下、これを原法と略称する。) を改良して、B. P. B. 染色濾紙スポット法 (以下これを簡便法と略称する。)、B. P. B. 染色濾紙滲透法 (以下、これを短冊法と略

称する。) を案出した。その方法の詳細は、以下の如くである。

#### イ) 簡便法

検査方法: 原法は、被検尿 0.02ml を東洋濾紙 No. 50 に滴下 (スポット) し染色していたが、本法では、先ず、予め B. P. B 染色液 (Brom Phenol Blue 0.5 gr, 昇汞 0.1 gr を蒸留水で溶解して、1dl としたもの。) で、濾紙を染色して自然乾燥する。この濾紙の上に、被検尿 0.02 ml をスポットして乾燥後、3.5% 醋酸で数回洗滌し、染色された尿蛋白のスポットを出現させる方法である。

検査判定: 以上の方法により現われたスポットの濃度及び面積を、標準色度系列と比較して、尿蛋白濃度を定める。

標準色度系列は、日立製蛋白計または Folin 氏の Tyrosine 法で予め人血清の蛋白濃度を測定し、これを稀釈して 4% (mg/cc.) 液を作り、これを染倍数稀釈して系列を作成し、被検尿と同じ方法で、色濾紙上にスポットし脱色して作製する。

また、尿蛋白時間排泄量は [尿蛋白濃度] × [尿量] ÷ [前回排尿よりの時間 (分)] によつて算出する。

#### ロ) 短冊法

検査方法: 東洋濾紙 No. 50. を、B. P. B. 染色液 (Brom Phenol Blue, 0.05gr, 昇汞 0.1gr を蒸留水で溶かし 1dl としたもの。) に1分間2~3回繰返し浸けて染色し、自然乾燥する。この濾紙を [図1(A)], の如く、短冊ように一定の長さに切つておく。此の短冊を被検尿に、末端より 10mm の線である BB' の線まで浸し、尿が、末端より 16mm の CC' の線まで浸透したときに、尿中より短冊形濾紙を引き上げて自然乾燥する。次に濾紙を、3.5% 醋酸溶液に15分間位浸して充分洗滌し、自然乾燥

図1(A) B.P.B 染色濾紙滲透法 (短冊法) の模型図 (濾紙の模型図)

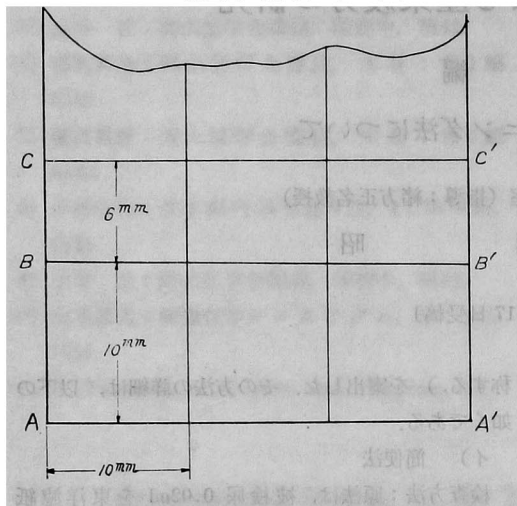
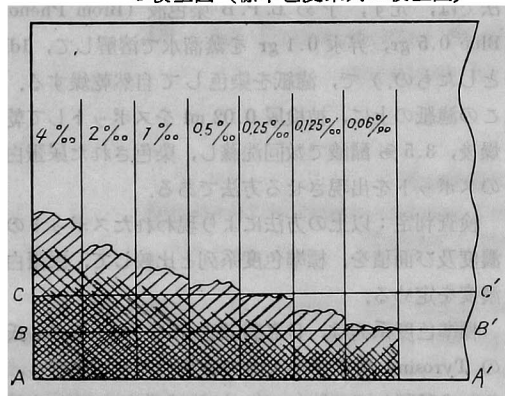


図1(B) B.P.B 染色濾紙滲透法 (短冊法) の模型図 (標準色度系列の模型図)



して尿蛋白を短冊濾紙上に染色する方法である。

検査判定：染色された濾紙上の尿蛋白量を、血清を稀釈して同様に染色、脱色して作成した標準色度系列〔図1(B)〕、と呈色度を比較して尿蛋白量を決定する。また、呈色部の長さも蛋白量の測定の一助となる。即ち〔図1(B)〕に於いて、末端より16mmの線CC'を基準として考えれば、0.25%以上の蛋白量があるときは、CC'の線以上に染色され、それ以下になることはない。

この0.25%は、後編に述べる如く、某船造工場に於ける尿蛋白による疲労の Screening Level である。

実験成績

健康男子30名について、原法、簡便法と短冊法の3法で尿蛋白を染色し各々の比較を行なった。その成績は、〔表1〕、に示す如くである。この、原法と

表1. B.P.B：原法、簡便法、短冊法による尿微量蛋白定量値 (%o, mg/ml)

被検者番号	原法	簡便法	短冊法
1	0.06	0.125	0.06
2	0.06	0.06	0.06
3	0.06	0.125	0.06
4	0.06	0.06	0.03
5	0.06	0.06	0.125
6	0.06	0.125	0.125
7	0.06	0.06	0.125
8 ~ 14	0.06	0.06	0.06
15	0.125	0.06	0.125
16	0.125	0.125	0.06
17 ~ 25	0.125	0.125	0.125
26	0.25	0.25	0.125
27 ~ 29	0.25	0.25	0.25
30	0.50	0.50	0.50

簡便法の相関図は、〔図2〕、に示し、原法と短冊法では、〔図3〕、に示される。そして、何れの点も、 $x = y$  の線の上に殆んど並んでいることが認められた。即ち、簡便法、短冊法、何れも原法とはほぼ等しい値を得ることが出来、微量尿蛋白の測定には充分

図2 原法と簡便法による尿微量蛋白定量値の比較図

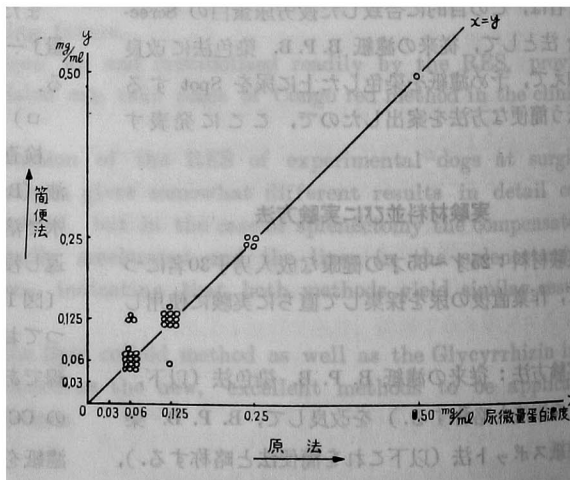
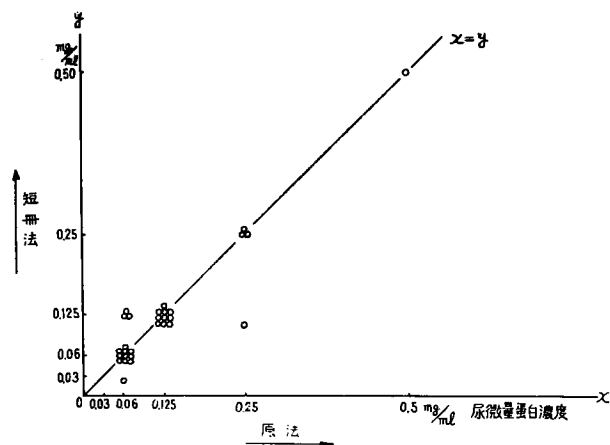


図3 原法と短冊法による尿微量蛋白定量値の比較図



使用出来ると思われる。

次に、定量感度について、3法共に同じ程度の鋭敏さを有し、テスト、テープが 30 mg/100 ml であるのに対して、6 mg/100 ml の感度を有している。それ故、原法は勿論、簡便法、短冊法何れも生理的範囲内の尿微量蛋白測定が可能であり、原法と同様に、充分、Screening に使用してもその精度をそこなわぬ。

### 考 案

過激な運動または作業による疲労乃至過労時に、一時的に蛋白尿が出現すると云うことは、古くより、よく知られている事<sup>7)-10)</sup>であつて、疲労を蛋白尿より測定しようとする試みは、Exton 氏法<sup>11)</sup>、Kingsbury 氏法<sup>12)</sup>を応用した例<sup>13)</sup>、石川氏法<sup>14)</sup>、等といろいろ実施されて来たが、何れも感度の点で、産業疲労の如き尿微量蛋白の測定には、不十分であつた。緒方氏等<sup>15)</sup>は、人血清抗体の上に疲労尿を重層する方法を創案し、スポーツによる疲労<sup>16)-18)</sup>を測定している。この方法は極めて高感度であるが、測定操作が複雑で、事業場の Screening 法として使用するのに、多少の不便を感じていた。

緒方正名氏<sup>4)</sup>は、濾紙 B. P. B. 染色法により疲労尿の微量蛋白の定量を行つているが、産業疲労の測定の際、問題となるような尿中微量蛋白量は、前述の如く、テスト、テープでは(±)であつて定量出来ないが、濾紙 B. P. B. 染色法の定量感度では、

テスト、テープの約5倍である故、テスト、テープに於いて(±)の蛋白量でも充分定量出来、作業前、中、後、の微量尿蛋白の定量が可能である。この点が、濾紙 B. P. B. 染色法の利点であり、且、今回の改良法は、他の測定方法に比較して、特に測定操作が簡単なので、作業員全員の測定を行つて、Screening に利用することが出来ると思われる。尚、産業疲労以外の疲労測定的应用として、南氏<sup>19-22)</sup>は、原法を用いて各種スポーツ疲労を測定し、その後の回復状態について研究を行なつており、疲労測定法として、濾紙

B. P. B. 染色法は極めて敏感に反応を示すと述べている。

### 結 論

濾紙 B. P. B. 染色法を、Screening 法として応用し得る如く改良を行い、この改良法、即ち、B. P. B. 染色濾紙スポット法及び B. P. B. 染色濾紙滲透法の定量値と原法の定量値について、比較検討を行つた。

原法と B. P. B. 染色濾紙スポット法(簡便法)、原法と B. P. B. 染色濾紙滲透法(短冊法)との測定値は、ほぼ一致した。

また、その定量感度は、3法共 6 mg/dl であり、極めて鋭敏であつて、簡便法及び短冊法何れも、Screening の目的には、充分使用出来ると思われる。

稿を終るに当たり、終始、御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた、恩師緒方正名教授に深甚なる謝意を表します。

(本論文の要旨は、昭和39年11月29日、米子に於ける、第8回中国四国合同産業医学会及び昭和40年11月19日、高松に於ける、第9回中国四国合同産業医学会において発表した。)

- 1) 産業衛生協会産業疲労委員会編；疲労判定のための機能検査法, 121, 同文書院, 東京, 1962.
- 2) 産業衛生協会産業疲労委員会編；同誌, 91, 同文書院, 東京, 1962.
- 3) 吉本弘満；岡山医学会雑誌, 72 (1), 395, 1959.
- 4) 緒方正名；日本衛生学雑誌, 13 (5), 68, 1958.
- 5) 緒方正名；産業医学, 3 (3), 156, 1961.
- 6) 緒方正名；岡山医学会雑誌, 74 (1, 2, 3), 219, 1962.
- 7) 膳所正俊；鉄道医協会雑誌, 17 (3), 129, 1931.
- 8) W. Leube；Virchow's Archives, f. Path, Anat., 72, 145, 1878.
- 9) 金子五策, 福島東作, 村上功；日本内科学会雑誌, 7, 83, 1919.
- 10) 島藺順次郎；臨床医学, 9, 607, 1921.
- 11) Exton；J. Lab. Clin. Med., 10, 722, 1925.
- 12) Kingsbury-clark；J. Lab. Clin. Med., 11, 981, 1926.
- 13) 緒方正名, 望月義夫, 那須昭三；体力科学, 7 (64), 179, 1959.
- 14) 石川知福；疲労判定法, 72, 学術会議疲労研究会編, 創元社, 1947.
- 15) 緒方益雄, 大田原一祥, 岡村岩男；疲労判定法, 61, 学術会議疲労研究会編, 創元社, 1947.
- 16) 古谷善平；岡山医学会雑誌, 60 (1~2), 89, 1948.
- 17) 柚木賢；岡山医学会雑誌, 61 (3), 78, 1949.
- 18) 西崎道生；岡山医学会雑誌, 68 (8), 1277, 1956.
- 19) 南勝一；岡山大学教育学部研究集録, 7, 29, 1959.
- 20) 南勝一；同誌, 9; 47, 1960.
- 21) 南勝一；同誌, 10; 45, 1960.
- 22) 南勝一；同誌, 11; 60, 1961.

## Studies on Industrial Fatigue by Microquantitative Determination of Urinary Protein

### Part 1. A Screening Method of the Microquantitative Determination of Urinary Protein in Workers

By

Akira MATSUDA

Department of Public Health, Okayama University Medical School.

(Director : Prof. Masana Ogata)

The author has improved the method of Brom-phenol-blue (BPB) staining on filter paper (original method), and devised the spot method on filter paper pre-stained with BPB (simplified method), and the dipping method of the filter paper pre-stained with BPB (test paper method).

The author has compared the quantities of minute urinary proteins by the original method on one hand, and those by the simplified and the test paper methods on the other.

The quantities of the urinary protein by the simplified method coincide with those by the original method. Also, the quantities of the urinary protein by the test paper method coincide with those by the original method.

The analytical sensitivity of these improved methods was 6 mg/dl of urinary protein. As the improved methods are quite simple and have a quite excellent sensitivity, it is considered to be applicable to the screening of fatigued workers.