

尿タンパク質検査と目視分析への展望

金子 恵美子

1 はじめに

臨床検査の分野では、近年 point of care testing への急速な潮流が生じており、集団検診等における早期診断ならびに患者の病態モニタリングのために迅速・安価なテスト法が求められている。最先端機器を用いる精密検査が既に顕著な進展を見ている中、両極にあって補充し合う方法として、スクリーニングテストは人の健康を守るために必要不可欠な位置にある。

尿中タンパク質は、各種疾患の早期発見のために重要な臨床検査項目の一つである。疾病に伴い腎機能が有するサイズバリアとチャージバリアを通過して、高濃度あるいは異常組成を持つ病的なタンパク質の排泄が起こる。尿は被験者に苦痛を与えない非侵襲性の試料であるためマイクロ分析の必要性は高くないが、その検出に関しては、分析化学の永遠の課題とも言える「感度と選択性」の問題が山積している。

筆者らのグループは、これまで高感度目視分析法の開発に携わり、環境、工業、医療分析の各分野における実用ニーズに応じて重要課題の解決にあたってきた¹⁾。その一環として、尿中タンパク質に関する研究を行い、目視検出法の基盤となる二、三の成果を得ている^{2)~5)}。最新の成果は論文発表に譲るが、本稿ではこの分野の現状と今後の展望に焦点を当てて若干の紹介を試みる。

2 尿タンパク試験紙

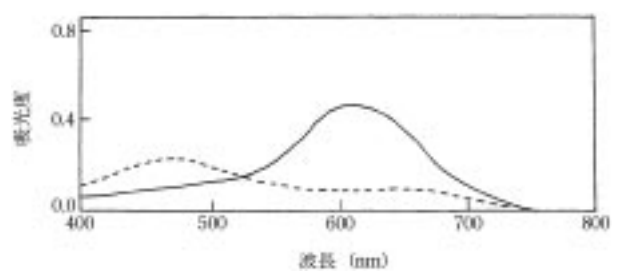
pH 指示薬とタンパク質との相互作用（いわゆるタンパク誤差）から派生して尿中タンパク質の試験紙法が生まれ、dip and read 方式による簡易テスト法の代表例として集団検診や来院時検査に広く用いられている。しかし、色素と pH 緩衝剤を染み込ませて作製される試験紙の感度は、メーカーにもよるが 100 ~ 200 mg/l であり、一般的なカットオフ値 30 mg/l に及ばないため疾病の早期発見には不十分である。この矛盾を解決するためには、簡便性とコストパフォーマンスにおいて試験紙に匹敵し、しかも数倍高感度なテスト法を開発するほかはない。すなわち、尿中の主要タンパク質であるアルブミンを対象として 30 mg/l 前後での閾値判定を可能とし、価格は 1 検体につき 10 円前後が望ましい。この場合、スクリーニングの目的は、溶液吸光度法やゲル電気泳動等による精密検査へ進むかどうかの判定にあるので、定量性は必ずしも必要ではない。診断のための通常のステップとして、「来週もう一度精密検査に来て下さい。」という過程が「社会常識」として認められているからである。しかし、現状では試験紙陰性の時点で既に疾病が深刻化していることを考えると、分析化学にとって大きな未解決課題の一つがここにある。

3 溶液吸光度法

色素結合に基づくタンパク質の吸光度定量は、試験紙と同一の反応に基づき、図 1 に一例を示すように、タンパク質が有する正荷電部位や芳香族アミノ酸側鎖との相互作用による色素あるいは金属錯体のスペクトルシフトを利用する方法である⁶⁾⁷⁾。試験紙とは用途が異なり、自動分析器へ適用されて多数の検体の測定を可能としている。表 1 に各方式によるタンパク質の定量下限を示したが、特に代表的な試薬系としては、クマシーブリリアントブルー G (CBB) とピロガロールレッド-モリブデン (V) 錯体が挙げられる。我が国では、藤田の開発による後者の方法が、感度が高くセルへの吸着が少ない等の利点を有するために、現在最も広く用いられている⁷⁾。

溶液吸光度法に関する今後の課題としては、タンパク質の種類による反応性の差異が挙げられる。一般にアルブミンと比較して、グロブリンや小分子量タンパク質は色素に対する反応性が乏しいため、著しく低感度である。一方、疾患マーカーとなる特定の微量タンパク質検出に際しては、選択性の付与が重要な課題とされている。また、図 1 のスペクトルから予想されるとおり、溶液系の色変わりをそのまま微量タンパク質の目視比色に適用することは感度的に不可能である。

蛇足に過ぎるが研究上留意すべき事項として、臨床化学の分



実線：人血清アルブミン 220 mg/l；点線：試薬ブランク；色素溶液：タンパク質アッセイ用市販 CBB キット使用

図 1 CBB タンパク質溶液の吸収スペクトル

表 1 タンパク質量法の感度の比較⁸⁾

方 法	検出限界 (mg/l)
Biuret	100
Bradford	30
Lowry	25
ピロガロールレッド-Mo	50

検出限界は尿中濃度として表示

野では dl が体積単位として繁用されているため濃度換算に注意を要すること、論文によって感度の表記が最終溶液中の濃度が試料中濃度か、さらには μg などの絶対量で表示されることもあって、時として不明確であること、が挙げられる。感度表示の統一は、尿試料の場合マトリックスの干渉を回避するために通常数十倍の希釈が行われるので、特に重大である。単純な水溶液中で得られる感度は、複雑なマトリックスの臨床試料ではほとんど意味を持たない。前述の尿中濃度 30 mg/l を溶液吸光光度法で測定するためには、最終水溶液中濃度としてはさらに 2 桁近い高感度を達成した上で実試料への応用に臨まなければならない。

4 ベンスジョーンズタンパク質

ベンスジョーンズタンパク質(BJP)は、多発性骨髄腫に伴って過剰に産生されるモノクローナル免疫グロブリンの L 鎖(light chain)であり、腫瘍マーカーとして診断に有用である⁹⁾。1847年に英国の医師 H. Bence-Jones によって、 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ で凝固し $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ で再溶解する特異的なタンパク質として患者の尿中に発見されたが¹⁰⁾、発見以来 150 年以上にわたって簡便なテスト法に欠け、早期スクリーニングは全く不可能な現状にある。煮沸法の感度は g/l レベルに過ぎず、また、モノマー分子量 23000 の BJP は色素との反応性が極めて低いために、試験紙法や溶液吸光光度法の適用も不可能である。患者に対してはイムノアッセイや濃縮尿のゲル電気泳動が用いられているが、コストと長時間を要するためにテスト法としての要件には遠く及ばない。

筆者らは最近、この課題に対して固相抽出と新しい概念の色素結合法に基づく迅速・簡便な BJP 目視検出法を開発した⁴⁾⁵⁾。全操作に要する時間は 1 時間程度であり、装置を全く用いずに多検体を迅速に測定できるため、潜伏期間 20 年程度とされる多発性骨髄腫に対して、早期発見のためのマススクリーニングならびに患者の臨床モニタリング法としての実用化を期している。

5 おわりに

本特集タイトルといささか逆方向になるが、社会的ニーズから分析化学を見れば、人の健康と地球の未来を守るために成すべき仕事はまだ数多く残され、なおかつ次々に新しい課題が生まれている。本稿で取り上げた尿中タンパク質分析の問題は氷山の一角にしか過ぎない。point of care testing に代表される迅速・簡便な技術への今日の要求に応えるためには、分析化学が培ってきたウエットケミストリー本来のパワーに立ち帰って、新しい概念に基づく方法を開発し、従来法を打破して行くことが唯一の道である。

文 献

- 1) 金子恵美子, 磯江準一: ぶんせき, 2002, 360.
- 2) K. Yoshimoto, E. Kaneko, and T. Yotsuyanagi: Chem. Lett., 2000, 6.
- 3) 吉本敬太郎, 金子恵美子, 四ツ柳隆夫: 分析化学, 49, 429 (2000).
- 4) 四ツ柳隆夫, 金子恵美子, 倉澤 隆: 特許(特願 2000-273092).
- 5) 金子恵美子, 北田将久, 齋藤伸吾, 星 座, 赤塚邦彦: 第 63 回分析化学討論会講演要旨集, 1010 (2002).
- 6) 金子恵美子: ぶんせき, 1996, 554.
- 7) 藤田芳一: ぶんせき, 1997, 486.
- 8) I. Sperlingova, L. Dabrowska, M. Tichy, J. Kucera: Fresenius' J. Anal. Chem., 331, 756 (1998).
- 9) 伊藤喜久: 検査と技術, 28 (6), 555 (2000).
- 10) H. Bence Jones, Lancet, 2, 88 (1847).



金子恵美子 (Emiko KANEKO)
北見工業大学工学部化学システム工学科非常勤 (〒090-8507 北見市公園町 165)。室蘭工業大学工学部卒。工学博士(東北大学)。現在の研究テーマ 微量成分の高感度目視分析, 早期診断スクリーニングテスト, 微量金属イオンの HPLC。主な著書 “分析化学反応の基礎 演習と実験改訂版”(共著)(培風館)。趣味 小旅行, 裁縫。

原 稿 募 集

話題欄の原稿を募集しています

内容: 読者に分析化学・分析技術及びその関連分野の話題を提供するもので、分析に関係ある技術、化合物、装置、公的な基準や標準に関すること、又それらに関連する提案、時評的な記事などを分かりやすく述べたもの。

但し、他誌に未発表のものに限ります。

執筆上の注意: 1) 広い読者層を対象とするので、用語、略語などは分かりやすく記述すること。2) 啓蒙的であること。3) 図表は適宜用いてもよい。4) 図表を含めて 4000 字以内(原則として

図・表は 1 枚 500 字に換算)とする。

なお、執筆者自身の研究紹介の場合とすることのないよう御留意ください。

採用の可否は編集委員会にご一任ください。採用分については規定の原稿料をお支払いします。原稿の送付先及び問い合わせは下記へ。

〒141-0031 東京都品川区西五反田 1-26-2

五反田サンハイツ 304 号

(社)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

[電話: 03-3490-3537]