

血清アルブミン定量に関する研究

中村 紀士子, 奥田 貴代*
川井 俊子*, 富田 仁**

Studies on Quantitative Determination of Serum Albumin

Kishiko NAKAMURA, Takayo OKUDA*, Toshiko KAWAI* and Sinobu TOMITA**

ABSTRACT: Although the dye-binding methods using bromcresol green and bromcresol purple, or cellulose acetate electrophoresis are widely used for the determination of albumin, there have been some problems in application to the clinical analysis of serum albumin.

Therefore, more accurate determination of serum albumin is necessary for the clinical laboratory. We studied on the immunological methods (single radial immunodiffusion and immunochemical system) for the determination of serum albumin, in order to compare with the dye-binding methods.

The results of the determination of purified human albumin and serum albumin in normal subjects and patients with nephrotic syndrom indicated that the immunological methods gave more reliable value of serum albumin than the dye-binding methods.

はじめに

血清アルブミン (以下 Alb と略記) は肝において産生され、血清総蛋白の約60%を占め、膠質浸透圧を維持し、ビリルビン、脂肪酸、アミノ酸や薬剤など種々の物質の運搬に重要な役割を持っている。そして血清 Alb 量は肝硬変で代表されるような体内合成低下、ネフローゼで代

表されるような体外への漏出増加、栄養失調で代表されるような合成素材の低下などのときに著明に低下するのをはじめ、一般的には体内蛋白代謝異常の指標としてその測定は重要である。

血清 Alb の測定法は¹⁾ かつては直接測定法はなく、粘度と屈折率による物理的方法や塩折法 (硫酸アンモニウム、亜硫酸ナトリウムなど) などにより、A/G 比を求めその量を推定していたが、精度は著しく悪かった。チゼリウス型電気泳動法が出現してから、精度もよくなった感がしたが、その後、セルロースアセテート膜電気泳動法 (以下 CAE と略記) が日常検査法となってから、チゼリウス法との不一致の主な原因が、色素結合能にあることが判明したが^{2,3)}

京都大学医療技術短期大学部衛生技術学科
Division of Medical Technology, College of Medical Technology, Kyoto University

* 京都大学医学部附属病院検査部
Department of Clinical Science, Faculty of Medicine, Kyoto University

** 京都博愛会病院
Kyoto Hakuai Hospital
1982年9月受付, 同年10月受領

放置されている。その後、色素結合による血清 Alb の直接測定法が開発された。色素としては、メチルオレンジ、2-(4'-ヒドロキシベンゼンアゾ)ベンゼン酸 (HABA)、4'-ヒドロキシアゾベンゼン-2-カルボン酸 (HABCA) などのアゾ色素、フェノールレッド、ブロムクレゾールグリーン (BCG)、ブロムクレゾールパープル (BCP) などのフタレイン系色素がでてきたが、現在のところ、HABCA 法より、殆んど BCG 法に変遷し、一部 BCP 法が採用されている現状である。これらの色素結合法は、日常検査として自動化にも適して精密度はよいが、正確度に問題を残している。このような時に、抗原抗体反応を利用した免疫学的方法が、日常検査としての血清 Alb 定量法として最も信頼できるものとの考えに至った⁴⁾。

著者らは⁵⁾、一元免疫拡散法 (以下 SRID と略記) を基準として、レーザーネフェロメーターによる免疫学的方法 (以下 LIA と略記)、CAE 法、BCG 法を検討して問題点のあることを指摘した。今回は、更に詳細に血清 Alb 定量法を検討するために、純 Alb と純 γ -グロブリン (以下 γ -Glb と略記) との等量混合液を用いた。CAE 法で正常パターン血清、ネフローゼパターン血清、並びに高ビリルビン血清などを用いて、電気泳動法として CAE と総蛋白量 (エルマ屈折法またはビューレット法) による Alb 定量値、色素結合法として BCG 法および BCP 法による Alb 定量値、免疫学的方法として SRID 法および Beckman Immunochemistry System (以下 ICS と略記)^{6,7)} による Alb 定量値とを比較検討した。

実験材料と方法

1. 被検材料

1) ヒト血清 Alb とヒト血清 γ -Glb 等量混液

ヒト血清 Alb としては NBC chon F-V012-12 を、 γ -Glb としては NBC γ -Glb 167-16 を用いた。各々を 4.0, 3.5, 2.5, 1.5, 0.5 g ずつ精秤し、pH 8.6 ベロナール緩衝液にて等量

溶解して、総蛋白量として 8, 7, 5, 3, 1 g/dl の溶液を作った。

2) 患者血清

京大病院検査部電気泳動室に提出された血清のうち、CAE 法で正常パターンを示したもの、ネフローゼパターンを示したものおよび高ビリルビン血清を任意に選んで測定した。

2. 測定方法

1) CAE 法

常光の泳動槽および定電圧装置、コスモデシトメーター707型、Macherey Nagle 社のセルローズアセテート膜、pH 8.6 ($\mu=0.06$) のペロナール緩衝液、ボンソー 3R を用いて型通り行った⁸⁾。

2) BCG 法

和光純薬 BCG 試薬 Lot. DPG 8547 を用いて型通り行った⁹⁾。

3) BCP 法

小野薬品ダイヤカラー AB Lot. 1420 を用いて説明書通り行った。

4) SRID 法

Behring の M-Partigen Albumin プレート Lot. 050226 と Standard Human Serum (Behring) Lot. 041007 N を用いて説明書通り行った。

5) ICS 法

著者ら⁶⁾が血清 CRP 定量に用いたと同じ Beckman Immunochemistry Analyzer (Rate Nephelometer) を用いた。

試薬は

Anti-Albumin (Beckman) Lot: No. C 202045	
Dilution	Lot: No. C 102161
Buffer	Lot: No. C 102261
Calibration Serum I	Lot: No. C 202188

上記を用い、説明書の通り行った⁷⁾。

結 果

1. ヒト血清 Alb とヒト血清 γ -Glb 等量混液を用いての実験

ヒト血清 Alb とヒト血清 γ -Glb 等量混液の総蛋白量の理論値は 8, 7, 5, 3, 1 g/dl であ

表1 ヒト血清アルブミン, γ-グロブリン等量混合液を用いて総蛋白 (ビューレット法) と各法との比較

総蛋白 (T. P.)			Albumin 量							
ビューレット		屈折計	CAE	屈折計値 ×CAE	BCG	BCG ビューレット	SRID	SRID ビューレット	ICS	ICS ビューレット
g/dl	g/dl	g/dl	%	g/dl	g/dl	%	g/dl	%	g/dl	%
8	6.9	6.7	55.4	3.8	3.7	53.6	3.4	49.3	3.4	48.6
7	6.3	6.0	55.8	3.5	3.6	57.1	3.0	47.6	3.2	50.3
5	4.5	4.4	57.3	2.5	2.4	53.3	2.3	51.1	2.4	52.9
3	2.6	2.7	57.0	1.5	1.6	61.5	1.4	53.9	1.4	54.2
1	0.9	1.0	59.5	0.5	0.5	55.6	0.5	55.6	0.5	56.6

CAE : Cellulose acetate electrophoresis

BCG : Bromcresol green

SRID : Single radial immunodiffusion

ICS : Immunochemistry system

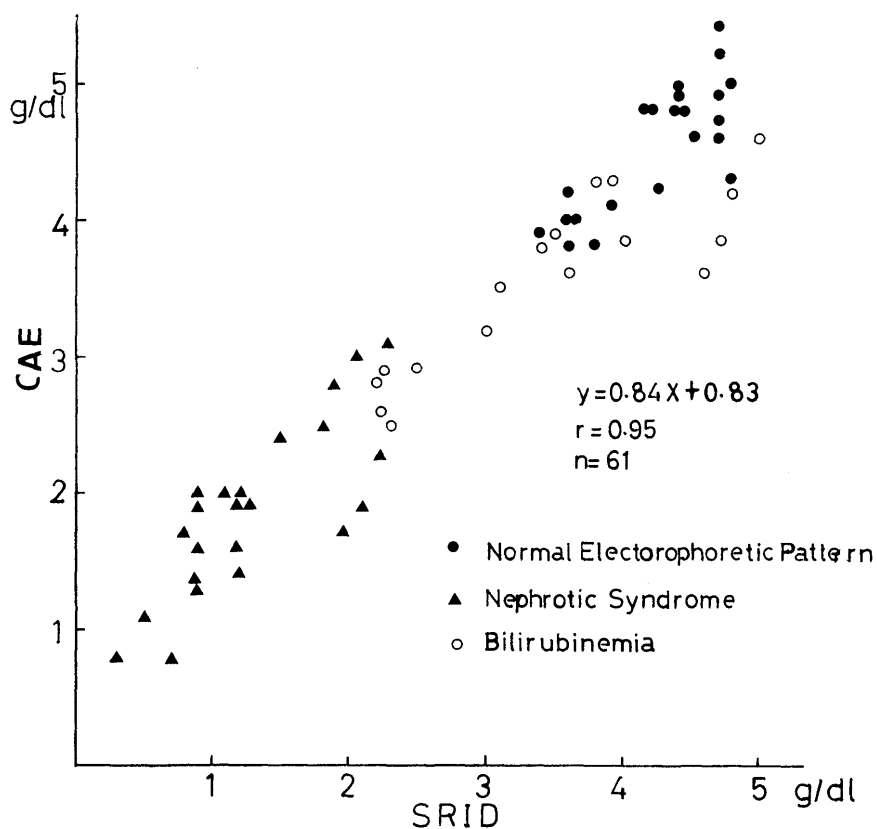


図1 SRID と CAE との相関

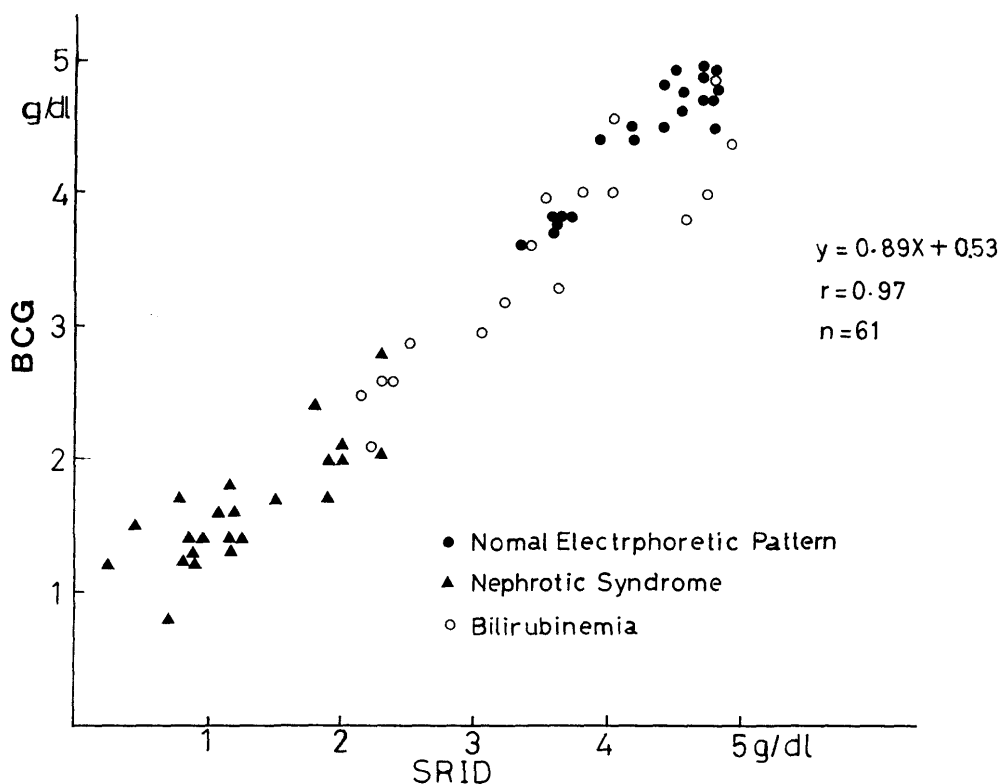


図2 SRID と BCG との相関

ったが、実測値は屈折計で6.7, 6.0, 4.4, 2.7, 1.0 g/dl, ビュレット法で6.9, 6.3, 4.5, 2.6 0.9 g/dl で大差なかったので、ビューレット法による値を用いた。

この等量液を用いて CAE 法で, Alb, γ -Glb の%を求めると, 50%, 50%になる筈であるが, 実際には表1に示すように, 6.9 g/dl 液にて Alb 55.4%, γ -Glb 44.6%となり, ポンソー 3R による色素結合能が Alb の方が高いことを示した。この傾向は, 蛋白濃度が低くなる程著明で, 総蛋白 0.9 g/dl 液にては, Alb 59.5%, γ -Glb 40.5%でより著明になった。

更に, BCG 法, SRID 法, Beckman ICS 法による Alb 実測値とビューレット法による総蛋白濃度とにより百分比を計算したものを表1に示す。色素結合法である BCG 法では, CAE 法の値に近いが, SRID 法や ICS 法のような免疫学的方法では, Alb 2.7 g/dl 以下の低濃度

領域を除いては50%前後で, 理論値に近似である。つまり色素結合法より免疫学的方法の方がより正確であると言える。

2. 患者血清を用いての実験

患者血清を, CAE 法で正常パターンを示した群, ネフローゼパターンを示した群, 高ビリルビン血清群の3群に分けて, SRID 法を基準にして, CAE 法, BCG 法, BCP 法, ICS 法の相関を検索した。

1) SRID 法と CAE 法との相関 (図1)

全例61例, $r=0.95$, $y=0.84x+0.83$ で相関はよいが, Alb 低値域では, CEA 法の方が全体として高値であった。更に正常パターン群, ネフローゼパターン群, 高ビリルビン血清群の3群に分けてみると, 正常パターン群では, CAE 法の方が高く, ネフローゼパターン群ではより CAE 法の値が高い。一方, 高ビリルビン血清群では Alb 正常域で CAE 法の方が低く出るも

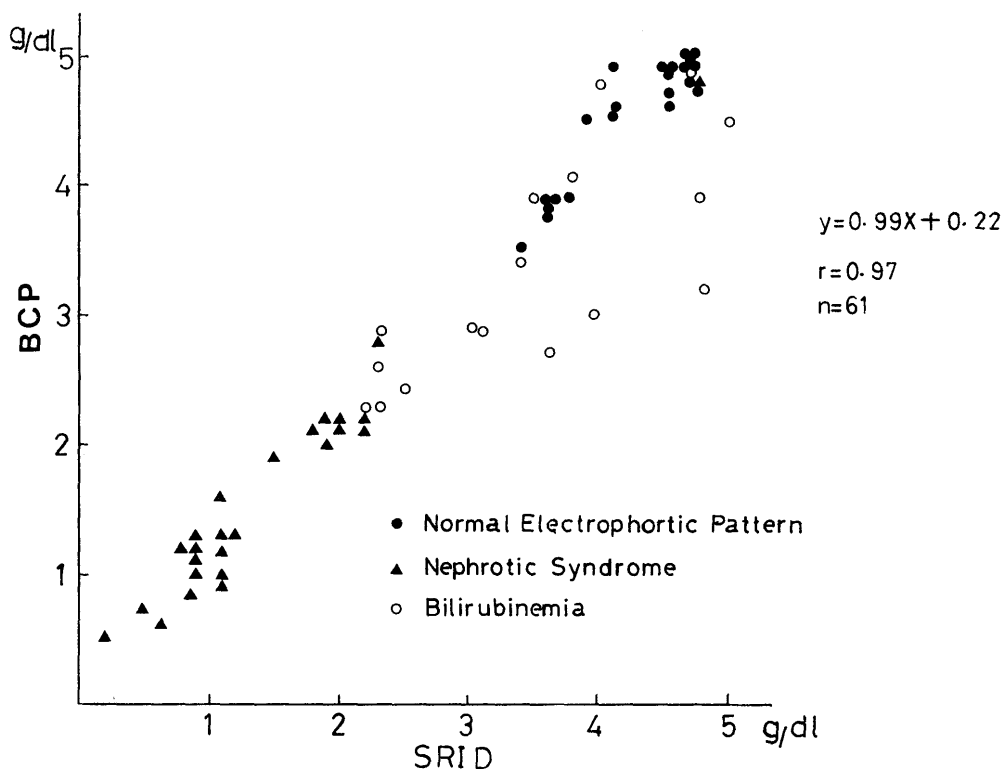


図3 SRID と BCP との相関

のが目立った。

2) SRID 法と BCG 法との相関 (図2)

全例61例, $r=0.97$, $y=0.89x+0.53$ で全体としてよく相関するが, 正常パターン群では, BCG 法の方が若干高く, ネフローゼ群では, 明らかに BCG 法の方が高値に出る。高ビリルビン血清群では一定の影響はないが, Alb 正常域で BCG 法で低く出るものがある。

3) SRID 法と BCP 法との相関 (図3)

全例61例中, $r=0.97$, $y=0.99x+0.22$ で非常によく相関した。しかし正常パターン群で BCP 法の方が高く, ネフローゼパターン群でも若干 BCP 法の方が高い。高ビリルビン血清群ではデータが動揺し, 特に Alb 正常域で BCP 法が低値を示すものが目立った。

4) SRID 法と ICS 法との相関 (図4)

全例61例, $r=0.96$, $y=0.95x+0.07$ で全体としてよく相関し, 正常パターン群, ネフロー

ゼパターン群, 高ビリルビン血清群の3群とも, 特にどちらが高値ということにはなかった。これは SRID 法も ICS 法も何れも免疫血清学的測定法であるからであろう。

考 按

血清 Alb の定量法は, やさしいようで実際は難しい。現在, 正確で異論のない方法はないと言ってよい。それは血清 Alb の遺伝的要因や薬剤¹⁰⁾, 脂肪酸¹¹⁾, ビリルビン¹²⁾, などによる変化は勿論のこと, Alb 代謝の亢進, 低下などによる Alb の質的变化によっても色素結合法などの測定法によっては, 異常測定値を示す¹³⁾。その上, 測定の際に使用する Alb 標準物質による差¹⁴⁾, また最近では主として自動分析に使用されている界面活性剤の種類と量によって, 同一測定法でも著しい差を示す。しかし主として色素結合法によって行われている自動分析^{15,16)}

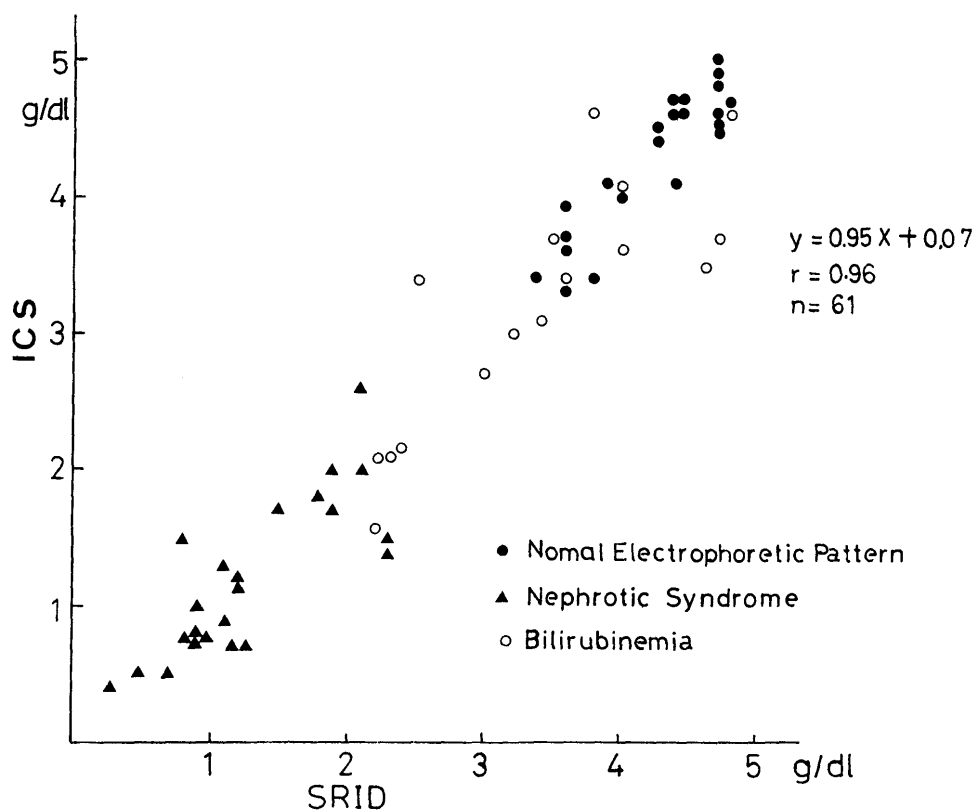


図4 SRID と ICS との相関

における精密度は大変よいので、日常診療にはまずまずであるが、正確度を欠くので、critical のときには問題が生じてくる。

そこで、現在最も多く行われている血清 Alb 測定法である CAE 法と総蛋白量による方法、色素結合法である BCG 法、BCP 法、および免疫学的測定法の SRID 法、Beckman ICS 法を用いて、純血清 Alb, γ -Glb 等量混液、ならびに最も Alb の質的变化が考えられるネフローゼ、高ビリルビン血清、正常パターン血清について、各測定法を検討した。

とくに、最近出現した ICS 法は抗原抗体反応の濁度の endpoint ではなく、Rate assay であるため、1 検体あたり 1 分間で測定できるので自動化が可能である。

色素結合法は、自動化によいので大量処理が出来るが、使用する色素によって差があり、現

在では HABA, HABCA, BCG より BCP がよいようである^{17,18)} しかしネフローゼのような Alb 代謝の亢進しているものでは、著者らの実験でも文献でも¹⁶⁾免疫学的方法が現在のところ最もよいようであるが、SRID 法は時間がかかり大量処理に不適當であるし、低濃度領域が不正確である。LIA 法は、大量処理にはよいが、混濁血清にプラスの誤差が出て正確性を欠き余りよくない⁵⁾。Beckman ICS 法は光散乱強度の peak rate を測定して、濃度換算する。この方法は 0.77 mg/dl から検体を希釈することにより 56,000 mg/dl の広範囲に亘り測定可能であり、精密度もよくしかも 1 分間で測定出来る。しかも自動化も可能であるので、今後の臨床検査として採用されていく方法となるであろう。

む す び

血清アルブミンの定量は、現今、セルローズアセテート膜電気泳動法により分離し、ポンソ-3Rで染色し百分率を求め屈折計法またはビューレット法で総蛋白を定量し、乗じて求める方法と、BCG または BCP 色素を用いる色素結合法により定量するのが、最も一般的である。とくに色素結合法は、自動分析にも容易に組み入れられ精密度もよいので、最もよく普及している。しかし、色素結合法は Alb への結合の強弱が病態によりみられたり、Alb 以外の血清蛋白分画にも結合したりして、正確度を欠く場合がしばしばみられる。そこで、SRID 法の免疫学的方法だけでなく、最近出現した Beckman ICS 法による免疫学的方法でも血清 Alb を測定し、比較検討した。

被検材料として、純品のヒト血清 Alb, γ -Glb 等量混液の各種濃度液ならびに電気泳動法で正常パターン、ネフローゼパターン及び黄疸血清を示す患者血清を用いて、上記の Alb 測定法を検討して次の結果を得た。

1) ヒトの血清 Alb, γ -Glb 等量液を用いての実験では CAE 総蛋白量法、BCG 法よりも SRID 法、ICS 法の方がより正確な値を得ることが出来た。ただし低濃度では SRID 法も ICS 法も色素法と同様 Alb 高値に出た。

2) 患者血清では、SRID 法を基準にして、CAE 総蛋白量法、BCG 法、BCP 法、ICS 法を検討した。しかも正常パターン、ネフローゼパターン、黄疸血清の3群に分けて観察した。

SRID 法を基準にして、血清 Alb 値を見ると CAE 法、BCG 法、BCP 法どれも高値に出る傾向にあるが、特にネフローゼにおける血清は CAE 法、BCG 法において著明である。黄疸血清では測定値が動揺するが、SRID 法より低値になる場合が目立つ。

色素結合法では BCP 法が最もよい。最近出現した Beckman ICS 法では、SRID 法と最もよく相関する。これは、SRID 法と同じく免疫学的測定法であるからであろう。

以上より、血清 Alb の正確な測定法は、免疫学的方法である。免疫学的方法のうち、日常検査として少数検体のときは SRID 法がよく、検体数の多いときは Beckman ICS 法のような Rate Nephelometer がよい。Rate Nephelometer の今後の発達が期待される。

文 献

- 1) 佐野紀代子：血清アルブミン定量法の歩み。Clin. Lab. 21: 9-14, 1980.
- 2) 富田 仁：血清蛋白分画値について。Clin. Lab. 1: 42, 1975.
- 3) 富田 仁：蛋白分画と生化学検査における A/G 比の相関。臨床検査 26: 860-862, 1982.
- 4) Keyser, J. W., Fifield, R. & Watkins, G. L.: Standardization of immunochemical determinations of serum albumin. Clin. Chem. 27: 736-738, 1981.
- 5) 中村紀士子・松本保子・富田 仁・奥田貴代・川井俊子・清本倫子・鈴木智子：正確度の管理—血清アルブミンの定量。臨床病理 28 (補冊): 134, 1980.
- 6) 富田仁・中村紀士子・稲本キヨ：ベックマン免疫化学分析システム (Beckman Immunochemistry System: ICS) による血清 CRP の定量。臨床検査機器・試薬 5: 329-338, 1982.
- 7) 中村紀士子・松本保子・池本正生・富田 仁・川井俊子・奥田貴代：Rate-Immunonephelometry (Beckman ICS) による Albumin 測定について。臨床病理 30 (補冊): 300, 1982.
- 8) 河合 忠：血清蛋白分画，セルローズアセテート電気泳動法による泳動技術と分画像のよみ方，第3版，p. 35~44，宇宙堂八木書店，東京，1979.
- 9) 金井 泉・金井正光：BCG による アルブミン定量法。「臨床検査提要，改訂28版」，VII-17~18，金原出版，東京，1978.
- 10) Tárnoky, A. L.: Genetic and drug-induced variation in serum albumin. In Advances in Clinical Chemistry 21, ed. Latner, A. L. & Schwartz, M. K., p. 101-146, Academic Press, New York, 1980.
- 11) Odell, G. B., Cukier, J. O., Ostrea, E. M. Jr., Maglalang, A. C. & Poland, R. L.: The influence of fatty acids on the binding of bilirubin to albumin. J. Lab. Clin. Med. 89: 259-307, 1977.

中村紀士子, 他: 血清アルブミン定量

- 12) 富田 仁: 血清蛋白測定上の問題点. 臨床病理 23: 873-877, 1975.
- 13) 富田 仁・福田 稔・岩井一義・齋明寺央・楠川 礼三・沢田真治・高木康史: 血清アルブミンの機能検査. 臨床病理 8: 503, 1960.
- 14) 松田信義・高橋 浩: アルブミン測定における標準物質. 臨床病理 23: 889-894, 1975.
- 15) Gustafsson, J. E. C. : Automated serum albumin determination by use of the immediate reaction with bromcresol green reagent. Clin. Chem. 24: 369-373, 1978.
- 16) Cederblad, G., Hickey, B. E., Hollender, A. & Åkerlund, G. : Improved continuous flow(SMAC) determination of serum albumin. Clin. Chem. 24: 1191-1193, 1978.
- 17) 水田 亘・熊田 至・福田勝弘・山道 宏: セルローズアセテート膜電気泳動法のスクリーニングとしての血清アルブミンの色素定量法. 臨床病理 23: 884-888, 1975.
- 18) Vatassery, G. T., Krezowski, A. M. & Sheridan, M. A : Comparison of manual methods of determination of albumin in human cerebrospinal fluid by the bromcresol green and immunoprecipitation methods. Clin. Biochem. 13: 78-80, 1980.