

カドミウム汚染地住民検診のための 尿検査方法に関する研究

〔IV〕 2, 4, 6-Trinitro benzene sulfonic acid 法 (TNBS法) による
尿中アミノ酸定量について

金沢大学医学部衛生学教室 (主任: 石崎有信教授)

福 島 匡 昭

小 林 悦 子

(昭和50年1月8日受付)

Cd作業者ではアミノ酸尿のみられることが報告されており^{1)~3)}, Cd汚染地住民については神通川流域のイタイタイ病患者でアミノ酸尿のみられることが患者発見の初期から報告されている⁴⁾, 著者らの研究室でははじめ銅錯塩法⁵⁾による尿アミノ窒素の測定を行っていたが, 集団検診への適用は困難であったため, 神通川流域の検診⁶⁾では測定を行えなかった. その後 Szentirmai ら⁷⁾のアルカリろ紙法を検討し, この方法を利用してきた. TNBS 法⁸⁾⁹⁾を尿中アミノ酸の測定に利用出来ることが野見山¹⁰⁾によって提案され, 著者もこれに検討を加えるとともにCd汚染地住民で見られるイミノ酸尿との関連についても観察を行ったのでその成績を報告する.

実験方法

1. TNBS 法による尿アミノ窒素の測定

1) 試 薬

i) TNBS 試薬

0.5Mリン酸緩衝液 (pH7.5), Sodium 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonate (東京化成) の 0.1% 水溶液 (用時溶解) 及び蒸留水を使用直前に 2 : 2 : 1 の割合で混合した.

ii) 2N-HCl

iii) 基準アミノ酸溶液

グリシン (和光純薬) 200mgを0.01N-HClに溶解し100mlとした. (α -アミノN 37.32mg/dl), 冷暗所保存で約1ヶ月使用可能.

2) 操作 (図1参照)

尿試料50 μ lに TNBS 試薬5.0mlを加え1夜暗所に放置した後, 2N-HCl 5.0mlを加え反応を停止する. 蒸留水50 μ lおよびグリシン溶液 (20~200mg/dl) 50 μ lを同時に操作し, 蒸留水の場合を対照として波長340 μ mの吸光度を測定する. (光電光度計日立124型, Sequential Cell 使用) 塩酸添加後暗所に保存すれば, 発色は長時間安定である.

発色は放置時間と温度により異なるが, 検量線の例を図2に示す.

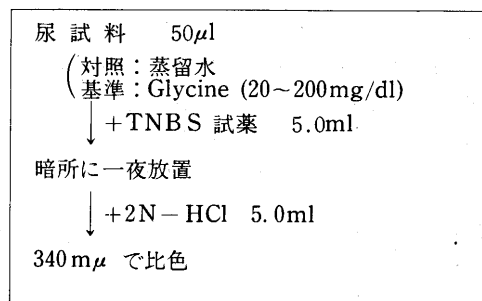
2. アルカリろ紙法による α -アミノ窒素の測定

Szentirmai ら⁷⁾の報告した方法に準じた. したがって基準アミノ酸としてグルタミン酸を用いている.

3. プロリンとヒドロキシプロリンの測定

尿中遊離プロリン濃度は TNBS 処理後ニンヒドリンで発色する方法¹¹⁾, 尿中遊離ヒドロキシプロリン濃度は Prockop 変法¹²⁾ (福山ら¹³⁾の操作法によ

図1 測定操作



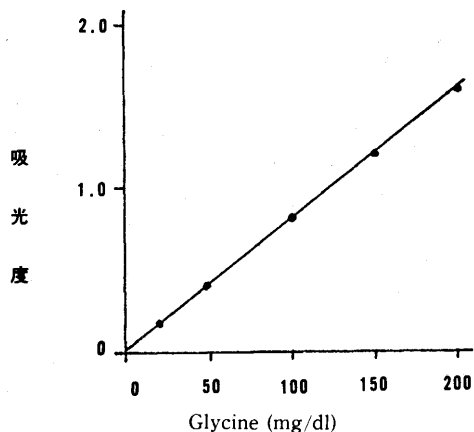
Studies on some urinary screening tests for renal dysfunction induced by cadmium exposure. 4. Determination of free amino acid in urine by 2, 4, 6-trinitrobenzene 1-sulfonic acid method. Masaaki Fukushima and Etsuko Kobayashi, Department of Hygiene (Director: prof. A. Ishizaki), School of Medicine, Kanazawa University.

る)で測定した。

4. 尿試料

尿は早朝尿を用いた。年余に亘る凍結保存では測定値が著しく増減する場合があります。長期保存は好ましくなかったため凍結保存の場合は出来るだけ短期間とした。

図2 検量線



成 績

1. 添加回収試験

蛋白尿、糖尿を含む各種の尿にグリシンを添加して回収試験を行った。成績は表1に示したが、平均回収率は100.2% (93.2~105.0%)であり、蛋白尿、糖尿が回収率に影響を与える様子はみられなかった。

2. 二重測定成績

同一試料についての二回の測定値の差はアミノ窒素濃度として平均0.24mg/dl (1.5%) でよい再現性を示した。

3. 尿蛋白の影響

尿中蛋白による影響を観察するため除蛋白を行って検討した。

尿10試料について Tsuchiya 試薬¹⁴⁾による除蛋白を行ったところ、この操作によって平均4%高い測定値が得られた。Tsuchiya 試薬がアルコール溶液であるため、遠心操作中に濃縮すること、Tsuchiya試薬によって各アミノ酸の発色程度が変化する¹⁵⁾ことが考えられる。そこで、限外ろ過 (Diaflo UM2, Amicon Corp. を使用) により除蛋白を行った結果が表

表1 添加回収試験 (アミノN mg/dl)

尿 №	尿中濃度	添加濃度	測定値	添加回収率
T - 4	25.2	9.33	34.0	94.3 (%)
T - 5	4.8	9.33	14.3	101.8
K - 44	20.9	9.33	30.2	99.7
K - 19	11.3	9.33	21.0	104.0
K - 32	7.7	9.33	17.1	100.8
T - 31 ¹⁾	9.3	9.33	19.0	104.0
T - 32 ²⁾	15.6	9.33	24.8	98.6
T - 37 ²⁾	13.3	9.33	22.6	99.7
T - 8 ³⁾	12.3	9.33	21.8	101.8
T - 9 ³⁾	14.1	9.33	23.5	100.8
T - 14 ³⁾	17.1	9.33	27.0	105.0
T - 10 ³⁾	21.0	9.33	30.2	98.6
K - 21 ¹⁾	33.8	9.33	42.5	93.2
平均				100.2 ± 3.4

- 1) 糖尿
- 2) 糸球体性蛋白尿
- 3) 尿細管性蛋白尿

2である。限外ろ過による除蛋白では、平均4%低い測定値が得られた。しかし表2にみる通り、蛋白尿で特に著しく低下している様子はみられなかった。通常みられる程度の蛋白尿では特に除蛋白の必要性はないようである。

4. アルカリろ紙法との比較

TNBS法による測定値をアルカリろ紙法による測定値と比較した成績は図3に示した。両測定値間の相関係数は0.947とよく一致しているが、TNBS法の値はアルカリろ紙法に比してやや低値を示す傾向がみられた。

5. 非汚染地住民の尿中アミノ窒素排泄

本学公衆衛生学教室の健康管理家庭（金沢市住民）の30才以上の男女69名の早朝尿についてTNBS法でアミノ窒素濃度を測定した。成績は表3に示す通りであるが、図4に示す通り、尿クレアチニン濃度との比例関係が明かであった。（相関係数 $r=0.80$ ）そこで

クレアチニン当りの排泄量として観察したのが表4である。クレアチニン当りの排泄量でみると、成人では年齢による差は見られず、男女差も僅かに女の方が高い値を示すだけで、実用的には無視出来る程度の違いしかみられない。男女合計69名の排泄量は平均156mg/gクレアチニンであり、全体の96%は80~240mg/gクレアチニンを示した。（図5）

6. Cd汚染地住民で Tubular proteinuria を示す者のアミノ窒素排泄量ならびにイミノ酸排泄との関係

兵庫県市川流域⁽⁶⁾⁽⁷⁾および福井県のCd汚染地⁽⁸⁾の尿検査で、Tubular proteinuria を示した尿について尿アミノ酸排泄量と尿中遊離プロリン濃度との関係を観察したのが図6である。一部の尿についてはヒドロキシプロリン濃度も測定しているその値もこ

表2 除蛋白¹⁾の影響
(アミノN mg/dl)

尿 №	原尿 (A)	除蛋白後 (B)	B/A×100
T-4	25.2	23.9	94.8
T-5	4.8	4.8	100.0
T-31	9.3	9.0	96.8
T-3	15.6	14.7	94.2
T-37	13.3	13.1	98.5
T-8	12.3	11.9	96.7
T-9	14.1	13.2	93.6
T-14	17.2	16.1	93.6
平均			96.0±2.2

- 1) Diaflo UM-2 による限外ろ過
2) 蛋白尿・糖尿については表1参照。

図3 TNBS法とアルカリろ紙法の比較
アミノN (mg/dl)

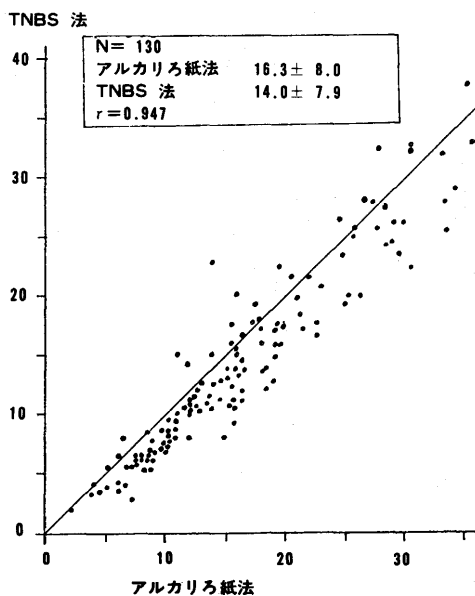


表3 非汚染地住民尿のアミノN濃度 (mg/dl)

	30 ~ 49 才		50 才 ~		計	
	N	M±S.D.	N	M±S.D.	N	M±S.D.
男	18	14.8±6.2	14	14.6±5.0	32	14.7±5.8
女	17	13.2±8.2	20	7.3±3.1	37	10.0±6.7
計	35	14.1±7.3	34	10.3±5.4	69	12.2±6.7

表4 非汚染地住民の尿中アミノN排泄量 (mg/g クレアチニン)

	30 ~ 49 才		50 才 ~		計	
	N	M ± S. D.	N	M ± S. D.	N	M ± S. D.
男	18	152 ± 41	14	142 ± 60	32	147 ± 50
女	17	162 ± 46	20	164 ± 44	37	163 ± 45
計	35	157 ± 44	34	155 ± 52	69	156 ± 48

図4 非汚染地住民尿のアミノN濃度とクレアチニン濃度

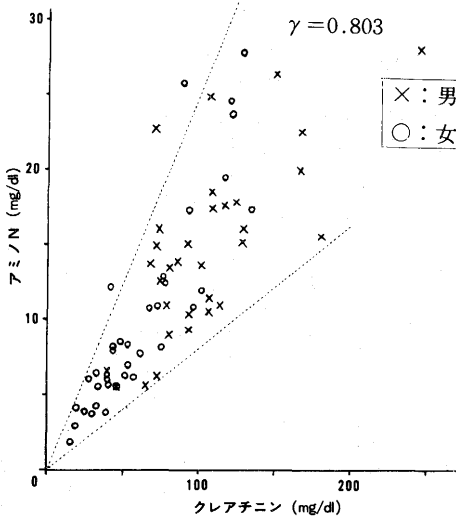


図5 Cd 汚染地住民のアミノN排泄量の分布

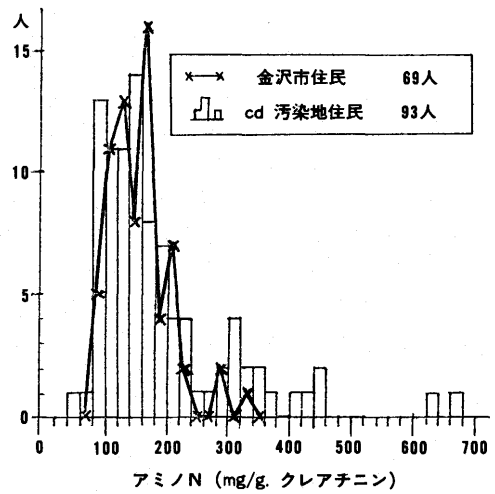
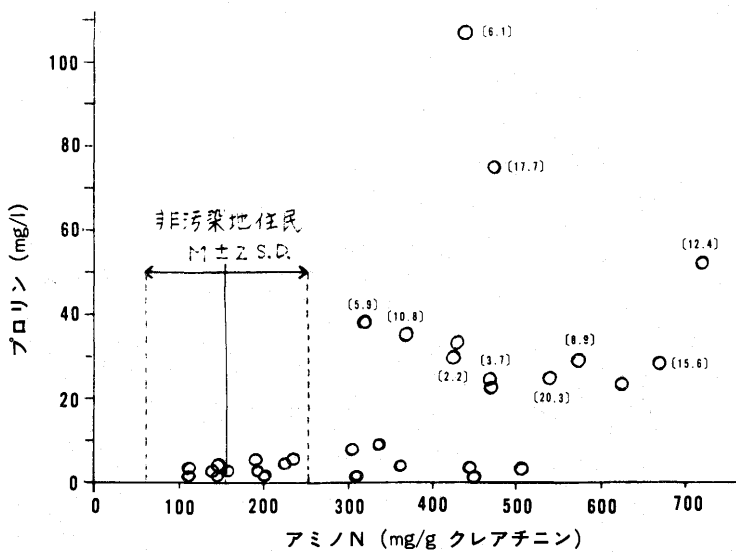


図6 Tubular proteinuria を示す Cd 汚染地住民尿でのアミノ酸排泄とイミノ酸排泄



[] はヒドロキシプロリン濃度 (mg/l) を示す。

の図の中に記してある。これら Tubular proteinuria を示す尿でのアミノ窒素排泄量は、前述の金沢市住民尿に比し高いものが多いが、アミノ窒素排泄量が 300mg/gクレアチニンをこえる尿ではプロリンの排泄増加を示すものがみられ、同時にヒドロキシプロリンの増加（正常値 2mg/day以下¹³⁾もみられる。これに対しアミノ窒素の排泄が増加していない Tubular proteinuria ではプロリンの増加はみられなかった。

考 察

尿アミノ酸の観察には Paper chromatography と Column chromatography が多用されているが、これらの方法は集団検診におけるスクリーニングとしては実用的ではない。generalized amino-aciduria に対するスクリーニングテストとしては、総アミノ窒素の測定がより实际的と考えられ、1907年の Sørensen¹⁹⁾以降多くの方法が提案され利用されてきた²⁰⁾。最近 2, 4, 6-TNBS をアミノ酸定量に利用することが考えられ、石井ら⁹⁾は血清アミノ酸の迅速定量法として提案している。尿中アミノ酸測定への利用は野見山ら¹⁰⁾¹⁵⁾により行われている。著者らの検討では Glomerular proteinuria, Tubular proteinuria, Glycosuria を含む各種の尿でのグリシン添加回収試験成績は 100.2±3.4% であって、尿蛋白、尿糖の存在による影響は観察されなかった。TNBS はほぼ中性の条件下ではアンモニアや尿素とほとんど反応しないが、蛋白とは反応する¹⁵⁾。そこで除蛋白を行なってその前後の発色の程度を比較したが蛋白尿のみで特に著しく発色が低下する様子はみられず、蛋白による発色の影響は大きくないことが判った。通常の集団検診におけるスクリーニングとしては除蛋白操作は必ずしも必要ではないと考えられる。Szentirmai らのニンヒドリン発色による方法との比較では、TNBS 法の方が僅かに低値を与える傾向がみられたが、両測定値間の相関係数は 0.947 とよく一致していた。基準にしたアミノ酸が異なる上、各アミノ酸の相対的発色程度はそれぞれ多少異っているであろうが、両法はよく似た測定値を与えるようである。

非汚染地住民の尿中アミノ窒素濃度は尿のクレアチニン濃度に比例していたのでクレアチニン当りの排泄量として観察を行なった。非汚染地住民男女のアミノ窒素排泄量は、今回の成績では 156±48mg/gクレアチニンであり、男女差も余り大きくはなかった。健康人の尿アミノ窒素排泄量については Jagenburg²⁰⁾ が種々の定量法で測定された成績をまとめているが、

Ion exchange chromatography による α -アミノ窒素値（約 120mg/day²¹⁾）に比して他の方法による値は高いものが多い。TNBS 法による値も Ion exchange chromatography によるものより高い値を与える。TNBS 法では α -アミノ窒素のみでなく全ての第 1 アミノ窒素が測定され、アミン、ペプチドとも同様に反応する²²⁾ためであろう。

Cd汚染地における尿アミノ酸排泄増加のスクリーニングレベルとしては上記非汚染地の成績から判断すると 250mg/gクレアチニンないし 300mg/gクレアチニンが採用されてよいように思われる。Cd汚染地住民にみられるアミノ酸尿では、プロリン、ヒドロキシプロリンの排泄増加が特徴的であった²³⁾。そこでプロリンの排泄増加との関係を、Cd汚染地住民の Tubular proteinuria 試料について検討した。アミノ窒素排泄量 300mg/gクレアチニン以上を示す尿では、プロリン排泄の増加しているものがみられ、同時にヒドロキシプロリンの排泄もみられた。したがって Cd汚染地住民のアミノ酸尿スクリーニングレベルとしては 300mg/gクレアチニンが実用的なレベルとして意義を持つものと考えられる。

結 論

Cd汚染地住民におけるアミノ酸尿のスクリーニングテストとして、TNBS 法について検討を加え以下の結論をえた。

1) 本法は操作が簡単で再現性もよく、通常は尿中の蛋白や糖、アンモニアなどにより殆んど影響を受けないので前処理も不要であり、容易に多数の試料について測定を行うことができる。

2) 非汚染地の 30才以上の男女 69名での本法による尿アミノ窒素測定値はクレアチニン当りで観察すると平均 156mg/gクレアチニンであり、大多数が 80~240mg/gクレアチニンを示した。また、年齢による差は観察されず、性差も小さかった。したがって集団についても個人についてもクレアチニン当りで見れば性・年齢構成による影響を特に考慮しないで判定することが出来る。

3) Cd汚染地住民の尿異常所見者のスクリーニングレベルとしては、実用的には 300mg/gクレアチニンを採用してよいと考える。

恩師石崎有信教授の御校閲に感謝する。本論文の要旨は第 2 回北陸公衆衛生学会で報告した。

文 献

- 1) Clarkon, T. W. and Kench, J. E. : *Biochem. J.*, **62**, 361 (1956).
- 2) Adams, R. G., Harrison, J. F. and Scott, P. : *Quart. J. Med., N. S.*, **38**, 425 (1969).
- 豊島 滋・星野忠夫・土屋健三郎 : カドミウム中毒症等に関する分析法の標準化に関する研究, 昭和46年度研究報告, 34頁, 日本公衆衛生協会, 1972.
- 4) 中川昭忠 : 金沢医理学叢書, **56**, 1 (1960).
- 5) 柴田 進・高橋 浩 : 臨床化学の技術, 第1版, 105頁, 東京, 金原出版, 1960.
- 6) 福島匡昭・石崎有信・能川浩二・坂元倫子・小林悦子 : 日本公衛誌, **21**, 65 (1974).
- 7) Szentirmai, A., Braun, P., Horvath, I. and Hauk, M. : *Clin. Chim. Acta*, **7**, 459 (1962).
- 8) 佐竹一夫・奥山典生 : 生化学領域における光電比色法, 各論2, (関根・笹川・森田・木村・倉富編), 化学の領域増刊34, 63頁, 東京, 南江堂, 1960.
- 9) 石井耀子・畑下敏行・浅田敏雄 : *臨床病理*, **16**, 308 (1968).
- 10) 野見山一生 : カドミウム中毒症等に関する分析法の標準化に関する研究, 昭和45年度研究報告, 41頁, 日本公衆衛生協会, 1971.
- 11) 福島匡昭 : 日本公衛誌, **20**, 659 (1973).
- 12) Kivirikko, K. I., Laitinen, O. and Prockop, D. J. : *Anal. Biochem.*, **19**, 249 (1967).
- 13) 福山富太郎・山田美恵子・鈴木妙子 : 公衆衛生院報告, **20**, 99 (1971).
- 14) Tsuchiya, I. : *Zbl. Inn. Med.*, **29**, 105 (1908).
- 15) 山本昭子・野見山一生・菅田安男 : 第45回日本産業衛生学会講演集, 348頁, 1972.
- 16) 石崎有信・福島匡昭・能川浩二・小林悦子 : 日本公衛誌, **19** (10, 附録), 404 (1972).
- 17) 石崎有信・福島匡昭・能川浩二・小林悦子 : 日本公衛誌, **20** (10, 附録), 462 (1973).
- 18) 福島匡昭・能川浩二・坂元倫子・小林悦子・石崎有信 : 日本公衛誌, **21** (10, 附録), 350 (1974).
- 19) Sorensen, S. P. L. : *Biochem. Z.*, **7**, 45 (1908).
- 20) Jagenburg, O. R. : *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **11**, suppl. 43, 1 (1959).
- 21) Milne, M. D. : *Biochemical disorders in human disease*, 3rd. ed. p. 554, (Ed. by R. H. S. Thompson & I. D. P. Wootton) London, J. & A. Churchill, 1970.
- 22) Satake, K., Okuyama, T., Ohashi, M. and Shinoda, T. : *J. Biochem.*, **47**, 654 (1960).
- 23) 福島匡昭・小林悦子・坂元倫子 : 環境保健レポート, No24, 53 (1973).

Abstract

The determination of free amino acid using 2, 4, 6 trinitrobenzene sulfonic acid reported by Satake et al. was applied to the urine from inhabitants living in Cd-polluted areas.

The method was modified to simplify the procedure for the mass-screening test. The values obtained by the method were reproducible and the recovery of added glycine to the urine was complete, and moreover the values by the method was not influenced significantly by protein and glucose in the usually encountered concentration.

Normal excretion of free amino nitrogen in urine was 156mg./g. of creatinine, ranging 80 to 240 for adult men and women.

The inhabitants with tubular proteinuria living in Cd-polluted areas showed increased urinary excretion of free amino nitrogen, and free proline and hydroxyproline were excreted in urine from those excreting over 300mg./g. of creatinine of free amino nitrogen.