

# 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

## II. Kingsbury-Clark法による尿蛋白測定法の吟味

金沢大学医学部衛生学教室 (主任 石崎有信教授)

福 島 匡 昭

坂 元 倫 子

(昭和49年7月17日受付)

これまでに数多くの尿蛋白検査法が案出され、臨床検査や集団検診に利用されて来ている。集団検診におけるスクリーニングとしては、Sulfosalicyl 酸法、Purdy 法、試験紙法等があげられている<sup>1)</sup>。これらのうち、3% Sulfosalicyl 酸を用いる Turbidity method<sup>2)</sup> は半定量が出来る利点を有するので、濁度の判定を比色計を用いて客観的に行なうこととして検討を加えた。Cd によって引起される蛋白尿は腎炎など一般によくみられるものと性質が異なること<sup>3-8)</sup> が知られているが、この種の蛋白尿 (Tubular Proteinuria) に対しても、本法が充分役立つことを見た。ただし、本法による測定値は、蛋白濃度を正確に示すものではなく、ことに Tubular Proteinuria の場合にはより正確な測定法による蛋白濃度より低い値を与える傾向のあることが観察されたので、その成績を報告する。

### 測定法および尿試料

#### 1. Kingsbury-Clark 法<sup>2)</sup> K-C法による尿蛋白定量

尿 (混濁のある場合はろ過する。) 1.0ml に 3 g/dl スルフォサリチル酸溶液 3.0ml を混合、30分間室温放置した後、蒸留水を対照として波長 620m $\mu$  の吸光度を測定した。測定にはスペクトロニック 20 を用いた。同じ被検尿 1.0ml に蒸留水 3.0ml を混合したものの蒸留水に対する吸光度を同様に測定し、スルフォサリチル酸を加えた場合の吸光度からこれを差引いて、検量線から尿蛋白濃度を求めた。検量線は、健康人血清蛋白を生理食塩水で希釈したもので作製した。尿蛋白濃度

が 100mg/dl をこえる場合は、尿を生理食塩水で適宜希釈した後測定を行なった。

#### 2. Biuret 法による尿蛋白定量

Piscator<sup>6)</sup> の報告した方法によった。すなわち、尿に同容量の Tsuchiya 試薬 (リンタンングステン酸 15g、濃塩酸 60g、95% エチルアルコール 770ml、蒸留水 60ml) を加え、15分間放置する。沈澱を遠心分離後 (3500rpm, 15分) 95% エチルアルコールで洗滌し遠心分離した後、沈澱を 4.0ml の 3% NaOH 溶液に溶解する。Goa<sup>9)</sup> の Biuret 試薬 0.2ml を加え、15分後に 330m $\mu$  で吸光度を測定する。(日立分光光度計 124型使用) 基準には Protein Standard (Human Crystallized albumin, Dade Reagents Inc., Miami, 8.0g/dl) を用いた。

#### 3. 試験紙法

Albustix (Ames) を用いた。判定は容器の色調表に従い -,  $\pm$  (Trace), + (30mg/dl), ++ (100mg/dl) 等と表示した。このほか、Trace といえる程の明確な変色はみられないが、蒸留水に浸したものと比較すると多少の変色が認められる場合を  $\pm$  と表示した。

#### 4. 尿試料

尿蛋白測定法の検討に用いた尿試料は、住民検診によるものは早朝尿であるが、それ以外は 24 時間尿である。

### 成 績

#### 1. 比色計比濁による Kingsbury-Clark 法の検討

Studies on some urinary screening tests for renal dysfunction induced by cadmium exposure. 2. Examination of the urinary protein determination by Kingsbury-Clark's turbidity method. MASAOKI FUKUSHIMA and MICHIKO SAKAMOTO Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University.

生理食塩水で各段階の濃度に希釈した健康人血清についてスルフォサリチル酸による濁度を波長620m $\mu$ における吸光度で測定した結果は図1の(A)に示す通りで、蛋白濃度100mg/dl以下では蛋白濃度と吸光度とはよく比例していた。また、健康人尿に健康人血清蛋白を添加して回収試験を行った成績は表1の通りで、回収率は92~103% (平均99%) を示し、実用的には十分な成績であった。

ヒト結晶アルブミンの生理食塩水溶液では、スルフォサリチル酸により生ずる濁濁は血清蛋白の場合より著しく強く、しかも蛋白濃度と吸光度との比例関係は完全でなかった。(図1の(B)) また、アルブミンを健康人尿で希釈した場合は生理食塩水で希釈した場合より低い吸光度を示した。(図1の(C))

本法の再現性をみるため実際の蛋白尿について二重測定を行った結果は、表2に示した。尿蛋白の電気泳動像がいわゆる Tubular Pattern の場合も Glomerular pattern の場合も、二回の測定値はよく一致していた。

2. Biuret 法との比較

1) 非汚染地の健康人尿

金沢大学に勤務する50才以上の健康女子4名の尿蛋白濃度をK-C法と Biuret 法とで測定した成績は表3に示す通りで、K-C法では平均1.8mg/dl, Biuret 法では平均5.2mg/dlであった。

2) Cd汚染地住民尿

a) 神通川流域住民尿

イタイイタイ病患者11名の尿15試料と、住民検診での要観察者20名の尿20試料についてK-C法と Biuret 法で尿蛋白濃度を測定した。患者尿の尿蛋白電気泳動像は全て Tubular pattern を示した。要観察者尿は20試料のうち無作為に5試料をえらび電気泳動を行ったが、いずれも Tubular Pattern を示した。これら35試料についての両法による尿蛋白濃度測定結果は

表3に示した通りで、Biuret 法による測定値はK-C法に比し15.3 $\pm$ 8.4mg/dl高い値であった。また、これらの尿試料の Biuret 法による蛋白濃度は20mg/dl以上であった。

b) 市川流域住民尿

兵庫県市川流域の住民26名の早期尿26試料と、そのうち5名の24時間尿10試料、合計36試料についてK-C法と Biuret 法とで尿蛋白濃度を測定した。両法測定値の関係は図2に示す通りで、神通流域住民の場合と同様 Tubular pattern を示す蛋白尿では、その蛋白濃度は Biuret 法で20mg/dl以上、K-C法で10mg/dl以上を示し、K-C法の値はBiuret 法より約15mg/dl 低い値であった。また、Biuret 法で同一濃度を示す尿でも、K-C法による測定値にかなりの差がみられる点も神通川流域の場合と同様であった。

図1 K-C 法における蛋白濃度と濁度の関係

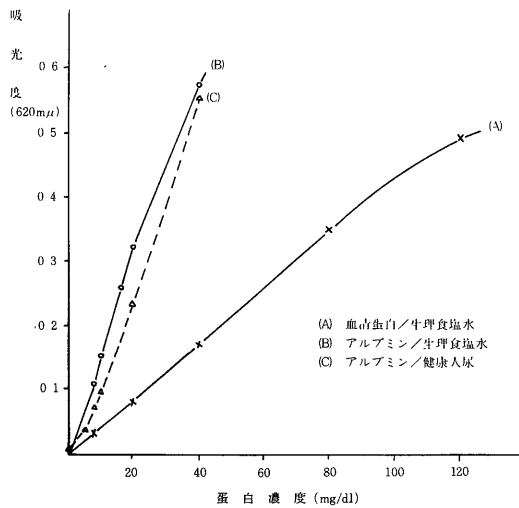


表1 添加回収試験成績 (K-C法)

尿試料	尿蛋白濃度 (mg/dl)	添加濃度 (mg/dl)	計算値 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)	添加回収率 (%)
A	1.0	21.4	22.4	20.7	92
A	1.0	42.9	43.9	45.2	103
B	0.5	20.0	20.5	20.0	98
B	0.5	40.0	40.5	41.7	103
平均					99

表2 二重測定成績 (K-C法)

試料	測定値 (mg/dl)		差 (mg/dl)	電気泳動像
稀釈血清 A	43.3	42.9	1.6	平均 0.9
稀釈血清 B	39.8	40.0	0.2	
尿 P-11 <sup>4)</sup>	52.9	54.5	1.6	T <sup>2)</sup>
尿 P-12	17.9	17.9	0.0	
尿 P-13	99.0	99.6	0.6	平均 1.0
尿 P-14	53.1	49.8	3.3	
尿 P-15	105.0	104.8	0.2	T
尿 P-16	30.0	29.5	0.5	T
尿 K-1	29.0	28.1	0.9	G <sup>3)</sup>
尿 K-3	17.1	17.6	0.5	
尿 K-14	6.7	6.9	0.2	G
尿 K-17	43.1	44.8	1.7	T
尿 K-24	14.8	12.9	1.9	T
尿 K-27	9.0	9.0	0.0	T
尿 K-50	59.5	57.6	1.9	T

1) P-11~P-16はイタイイタイ病患者の尿

2) Tubular pattern

3) Glomerular pattern

表3 Biuret法とK-C法の比較 (単位 mg/dl)

試料	尿 No.	Albustix	Biuret法 (A)	K-C法 (B)	差 (A-B)
健(金沢市住民)	C-3	—	3.4	1.0	2.4
	C-2	—	3.8	1.5	2.3
	C-1	—	5.7	1.5	4.2
	C-4	—	7.8	3.0	4.8
	Mean ± S.D.		5.2 ± 2.0	1.8 ± 0.9	3.4 ± 1.3
要	O-5	±	22.0	9	13.0
	O-18	±	25.5	15	10.5
	O-16	±	27.3	16	11.3
観	O-8	±	28.8	17	11.8
	O-7	±	30.3	14	16.3
察	O-2	±	30.8	12	18.8

者 ( 神 通 川 流 域 住 民)	O-14	±	31.9	9	22.9
	O-10	±	34.9	10	24.9
	O-15	±	40.1	21	19.1
	O-9	+	42.1	24	18.1
	O-3	±	42.5	26	16.5
	O-20	±	44.1	27	17.1
	O-17	+	44.1	46	- 1.9
	O-19	+	45.4	35	10.4
	O-12	±	46.5	31	15.5
	O-6	+	47.6	27	20.6
	O-13	±	50.6	23	27.6
	O-1	±	54.1	27	27.1
	O-4	+	65.9	40	25.9
O-11	+	72.0	45	27.0	
	Mean ± S. D.		41.3±13.0	23.7±11.4	17.6± 7.3
イ タ イ イ タ イ 病 患 者 ( 神 通 川 流 域 住 民)	P-1	±	23.6	15	8.6
	P-23	±	29.8	7	22.9
	P-7	±	37.6	24	13.6
	P-26	±	43.3	30	13.3
	P-6'	±	52.2	35	17.2
	P-6	±	61.6	51	10.6
	P-2	±	63.6	32	31.6
	P-2'	±	66.3	46	20.3
	P-3	+	66.0	60	6.0
	P-3'	±	68.0	53	15.0
	P-27	±	68.0	51	17.0
	P-4	+	78.8	72	6.8
	P-8	+	83.6	80	3.6
P-8'	+	85.4	85	0.4	
P-5	+	97.8	101	- 3.2	
	Mean ± S. D.		61.7±21.1	49.5±26.8	12.2± 9.1

(注) P-1~P-8 昭和44年5月採尿  
P-2'~P-8', P-23~P-27 昭和45年5月採尿  
P-2とP-2'は同1人の尿であることを示す

3. Albustix との比較

表3および図4に示したCd汚染地住民尿の尿蛋白検査ではK-C法, Biuret 法その他, Albustix を併用しているので, その成績から, K-C法及びBiuret法による尿蛋白濃度と Albustix 反応との関係を図示したのが図3である. Albustix 反応が±(10mg/dl)を示すのは尿蛋白濃度が Biuret 法で20mg/dl以上, K-C法で約10mg/dl以上であり, Albustix +(30mg/dl)を示すのは, それぞれ40mg/dl以上, 25mg/dl以上であった. 実際の集団検診における Albustix とK-C法測定値との関係は, 梯川流域住民検診の成績では, 表4に示す通りで, Albustix(-)と判定された尿のK-C法測定値は平均2.4±2.2mg/dl, (±)と判定された尿では9.5±7.4mg/dl, (+)と判定された尿では26.6±18.1mg/dlであった. Albustix(±)の9.5mg/dl, 同(+ )の26.6mg/dlは, 図3に示し

たそれぞれの Albustix 反応のK-C法下限濃度値にほぼ一致している.

考 察

一般に集団検診における尿蛋白検査の判定は肉眼により主観的に行なわれている. 尿蛋白濃度が高く, 明確な反応がみられる場合はよいが尿蛋白濃度が低い場合は, 肉眼的な判定は甚だ難かしい. 著者らは, 集団検診に際して Albustix による判定の再現性を検討したが, 同一尿を2名の検査者が判定した結果は表5に示す如くであった. 2名の判定が一致しているのは91.1%であって, 全体としての一致率は決して悪くないが, これは多数をしめる陰性尿での一致がよいためであって, 陽性尿での一致の程度はあまりよくない. 特に± (Trace) の判定は不一致が目立っている. 中島<sup>10)</sup>は Albustix ±以上を陽性とするとき, 同一人が2回同一の尿を判定した際9.9%の尿で陽性-陰性の判定が異っていたことを報告している.

呈色よりも主観に左右され易いとされている<sup>11)</sup>濁度により肉眼的に判定を行なう尿蛋白検査法では再現性の確保が一層困難である. 神通川流域のイタイイタイ

図2 ビューレット法と K-C 法による尿蛋白濃度 (市川流域住民尿)

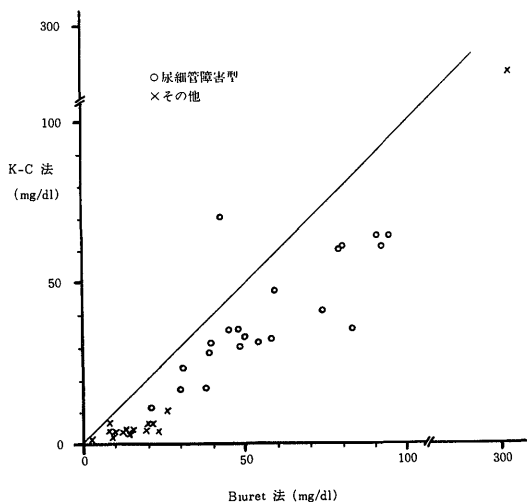


図3 尿蛋白濃度 (K-C 法, Biuret 法) と Albustix 反応の関係

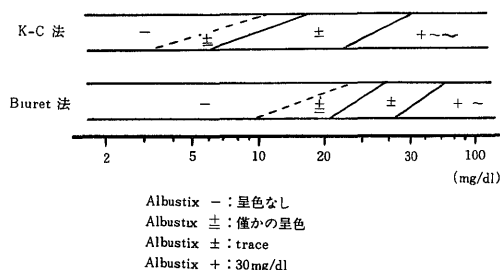


表4 Albustix 反応別にみたK-C法測定値 (梯川流域住民検診尿)

Albustix	試料数	平均値±標準偏差 (mg/dl)	範囲 (min.~max.)
-~±	348	2.4± 2.2	0~13
±	35	9.5± 7.4	2~36
+	25	26.6±18.1	1~73
++	1	81	

表5 Albustix による判定の再現性

—	±	±	+	++	計
—	373	20	1	0	394
±	11	12	2	0	25
+	1	3	11	1	16
++	0	0	0	2	2
	385	35	14	3	437

$$\gamma_K=0.632$$

一致 398 (91.1%)

病検診に際して著者ら<sup>12)</sup>は、3%スルフォサリチル酸を用いる尿蛋白検査法<sup>2)</sup>を採用したが、肉眼で濁度の程度を判定することが甚だ困難だったため、スクリーニングのための集団検診ではあったが光電光度計を用いて判定を行なうことにした。Cd汚染地における標準的な尿蛋白検査法としては、20%スルフォサリチル酸法と35%トリクロル酢酸法を併用するのがよいとされている<sup>13)</sup>。野見山<sup>14)</sup>は両尿蛋白検査法を比較し、対照群、Cd作業群ともスルフォサリチル酸法の尿蛋白検出率が明かにすぐれていたことを報告しているが、イタイイタイ病発生地住民と対照地住民の尿で両検査法を実施した福山<sup>15)</sup>は、イタイイタイ病発生地の尿蛋白検出率はスルフォサリチル酸法24.2%で、トリクロル酢酸法の22.4%より僅かに高かったのに対し、対照地ではそれぞれ3.1%、11.1%の検出率で、トリクロル酢酸法による検出率がスルフォサリチル酸法よりかなり高かったことを観察している。福井県のCd汚染地住民検診で保健所が実施した結果では、スルフォサリチル酸法陽性9.0%に対し、トリクロル酢酸法では35.2%を示していた<sup>16)</sup>。このように両尿蛋白検査法による検出率の関係がいろいろに変動するのは、スルフォサリチル酸とトリクロル酢酸の蛋白に対する反応の違いや、対象の違いにもよるであろうが、濁度の判定が主観的になされていることも大きな要因と考えられる。

3%スルフォサリチル酸を用いるK-C法<sup>2)</sup>は、従来定量法として利用されているものであるが、血清を基準とする時、蛋白濃度と濁度(光電光度計による吸光度)とはよく比例しており、再現性もよく、尿に添加

した場合も十分な回収率を示した。しかしながら蛋白溶液にスルフォサリチル酸を加えた際生ずる混濁の程度は蛋白の種類により異なることが知られており<sup>17)</sup>、イタイイタイ病患者ではいわゆる Tubular Proteinuria を示し、腎炎などの場合と著しく異った蛋白構成を示すので、Piscator<sup>6)</sup>の報告した Biuret 法による測定値との比較を行なった。その結果は表3、図2の如くでイタイイタイ病患者尿など Tubular Proteinuria の場合、K-C法による測定値は Biuret 法より低い値を与える傾向のあることが明かであった。福山<sup>18,19)</sup>はイタイイタイ病患者や Cd 曝露者にみられる尿蛋白がスルフォサリチル酸によって沈澱し難く、K-C法測定値は特に低濃度試料で蛋白濃度を示すものとはいえないことを報告しているが、著者らの Biuret 法との比較と一致した成績であると考えられる。

健康人の尿蛋白量は種々の方法で測定され、1日排泄量として24~133mgの値が報告されている<sup>20~26)</sup>。Tsuchiya 試薬を用いる Biuret 法では、24時間尿の蛋白濃度は10mg/dl以下であったと Piscator<sup>6)</sup>は報告している。著者らが測定した50才以上の女子(イタイイタイ病患者は殆んど50才以上の女子であるから、その対照として50才以上の健康女子をえらんだ)。4名の尿も10mg/dl未満の値を示した。これに対し、イタイイタイ病患者尿や、Cd汚染地住民で尿蛋白電気泳動像が Tubular Pattern を示す尿では、この Biuret 法による尿蛋白濃度は20mg/dl以上を示していた。Cd工場労働者について調査した Piscator<sup>2)</sup>は、明かな病的尿蛋白泳動像を示すのは24時間排泄量が160mg以上の者であったと報告している。K-C法による蛋白検出限界はおおよそ5mg/dlであるが<sup>1)</sup>、これは Tubular Proteinuria では表3にみるとおり Biuret 法の20mg/dlに相当するから、K-C法はこの種の検出を主目的とした集団検診においても充分実用性があるといえよう。この検出限界以下のK-C法測定値については、図2からも明かなように蛋白濃度を示すとはいえないから、K-C法陰性として扱った方がよいように思われる。また濁度の判定に透過率を測定することで代用しているためもあって、健康者でも稀に5mg/dl以上10mg/dl未満の値を示す場合のあることが観察される。

Cd汚染地における集団検診では、尿蛋白陽性者をスクリーニングすると同時に、陽性者が高率に出現しているかどうかを地区診断の上で重要であるが、定性検査では同一判定条件を維持することは、実際問題としては困難であろう。尿蛋白検査のための数多くの方

法が報告されているけれども、イタイイタイ病患者尿やその分画などで、K-C法を含むいくつかの尿蛋白定量法を比較検討した久保田ら<sup>27)</sup>は、特によい方法はなく集団検診では簡便なものを用いるのがよいと述べている。K-C法は集団検診には適するが、すでに述べた如く正しい尿蛋白濃度を示すとはいえないので、そのことを考慮して利用する必要がある。

### 結 論

Cd 汚染地住民の集団検診における尿蛋白検査法としての Kingsbury-Clark 法について二三の検討を加えた。

血清蛋白を基準とする時、3%スルフォサリチル酸により生ずる濁濁は蛋白濃度と比例しており、尿への添加回収率と再現性は充分満足出来るものであった。

けれども、Cd によって引起される Tubular Proteinuria の場合には Biuret 法による測定値と比較するとこの方法は低い値を与える傾向がみられた。したがって本法は半定量的な尿蛋白検査法と考えた方がよい。しかしながら本法は比較的濃度の低い Tubular Proteinuria のスクリーニングのための尿蛋白検査法として、実用的には十分な感度が期待出来ると結論してよいであろう。

稿を終るに当り、御校閲を賜った恩師石崎有信教授に心から感謝いたします。

### 文 献

- 1) 齊藤正行・田中恒男：公衆衛生集団検診法（勝沼・西川・田中・小泉編），179頁，東京，医歯薬出版，1960.
- 2) Kingsbury, F. B., Clark, C. P., Williams, G. and Post, A. L. : J. Lab. & Clin. Med., **11**, 981, (1926).
- 3) Friberg, L. : Acta med. Scand., suppl. 240, (1950).
- 4) Kekwick, R. A. : Brit. J. Ind. Med., **12**, 196 (1955).
- 5) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, **4**, 607 (1962).
- 6) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, **5**, 325 (1962).
- 7) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, **12**, 335 (1966).
- 8) Piscator, M. : Arch. Environm. Health, **12**, 345 (1966).
- 9) Goa, J. : Scand. J. Clin. Lab. Invest., **5**, 218 (1953).
- 10) 中島義司：日本公衛誌, **17**, 151 (1970).
- 11) 齊藤正行・他：臨床検査, **6**, 159 (1962).
- 12) 福島匡昭・石崎有信・坂元倫子・小林悦子：日本公衛誌, **21**, 65 (1974).
- 13) カドミウム中毒症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, 8頁, 日本公衆衛生協会, 1971.
- 14) 野見山一生：イタイイタイ病およびカドミウム中毒の発症機序と早期診断に関する研究, 78頁, 日本公衆衛生協会, 1972.
- 15) 福山裕三・城石和子・久保田憲太郎：医学と生物学, **83**, 85 (1971).
- 16) 未発表資料
- 17) 阿部 裕・浦壁重治・杉田 実・杉田かう：臨床科学, **1**, 251 (1965).
- 18) 福山裕三：医学と生物学, **84**, 41 (1972).
- 19) 福山裕三・穴山道子・石本美穂子・久保田憲太郎：医学と生物学, **86**, 109 (1973).
- 20) McGarry, E., Sehon, A. H. and Rose, B. : J. Clin. Invest., **30**, 832 (1951).
- 21) Rigas, D. A. and Heller, C. G. : J. Clin. Invest. **30**, 853 (1951).
- 22) Boyce, W. H., Garvey, F. K. and Norfleet, Jr. C. M. : J. Clin. Invest., **33**, 1287 (1954).
- 23) Schrade, W., Boehle, E. and Heupke, G. : Klin. Wschr., **34**, 903 (1956).
- 24) Webb, T., Rose, B. and Sehon, A. H. : Can. J. Biochem. Physiol., **36**, 1159 (1958).
- 25) Poortmans, J. et Van Kerchove, E. : Clin. Chim. Acta, **8**, 485 (1963).
- 26) Saifer, A. and Gerstenfeld, S. : Clin. Chem., **10**, 321 (1964).
- 27) 久保田憲太郎・城石和子：カドミウムの人体影響に関する基礎的研究, 87頁, 日本公衆衛生協会, 1973.

## Abstract

It is known that proteinuria is one of the manifestations in cadmium intoxication and that it is of tubular proteinuria. The applicability of the method of protein determination in urine reported by Kingsbury and Clark for the demonstration of cadmium proteinuria was examined using urine specimens collected from inhabitants living in cadmium-polluted areas.

It was found that method was semiquantitative and gave a result about 15 mg/dl lower compared with that by the Biuret method modified by Piscator. However, by the Kingsbury-Clark's method proteinuria of tubular type in low concentration proved detective. The method is simple and reproducible, and therefore it seems to be applicable as a screening test to detect cadmium proteinuria.

---