

## 臨床化学定量標準法の検討

## 残余窒素, 総蛋白質

東京女子医科大学大学生化学教室 附属病院中央検査室化学部 (主任 松村義寛教授)

藤野 冷子・工藤 智子・重光 裕子  
フジ ノ レイ コ ク ドウ トモ コ シゲ ミツ ヒロ コ

(受付 昭和35年12月5日)

臨床化学的定量検査法は各検査室により方法、手技が異なるため同一検体についての定量結果は必ずしも一致した値が得られず、正常値、病状の判断などの検討の上にも不便がある。同一検体について幾つかの病院検査室で測定した結果を集めた所、高値と低値との間に3倍もの相異の生じたことが報告されており、また時としては5倍の相異の見られることもあるといわれている<sup>2)</sup>。

この問題の一部は標準操作法の採用により解決せられるであろうし、一部は標準液の中央補給により解決せられる点もあろう。我々は同一検体に対して各方面で広く行われている定量法について、その測定法による値の異同を観察しようと考えた。

まず第一に残余窒素についてケルダール法による蒸溜滴定とケルダールネスレル法による比色を行い、次いで総蛋白質についてケルダール法による蒸溜滴定とピウレット法による比色を行い、夫々の定量による結果を比較したのでここに報告する。

## A) 残余窒素

## 定量法

## 1) ケルダール法による蒸溜滴定

## 試薬

5 g/dl トリクロル酢酸

1 : 1 H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>

銅カリ試薬 (結晶硫酸銅 1, 硫酸カリウム 10)

0.01N H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> (力価の規整については後述する)

4 g/dl ホウ酸

アンモニア標準液 (0.1mg/ml N) 第一化学製品  
濃水酸化ナトリウム (75 g/dl)

## 実施法

100ml 三角フラスコに血清 1.0ml をオストワルドピペットにて加え、これに 5g/ml トリクロル酢酸 9.0 ml をメスピペットで加え、よく混和し室温に約 15 分間放置後、無灰濾紙 (東洋 No. 5 B, 9 cm) を用いて濾過する。濾液 5.0ml をマイクロケルダール用酸化フラスコにとり、1 : 1 H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 2ml と銅カリ試薬 0.5g を加え、酸化炉で加熱酸化する。白煙が生じ、やがて酸化フラスコ内容は黒化してから無色透明となるから更に 5 分間加熱を続ける。総加熱時間約 20 分で酸化を打切つた。フラスコを室温に暫時放置後、蒸留水を約 5ml 加える。この内容をパルナス蒸溜装置を用いて蒸溜する。受器中には 4 g/dl ホウ酸に指示薬としてメチル赤とプロムクレゾール緑を混じたもの 5.0ml を入れておく。ホウ酸はアンモニアを吸収するから、それを 0.01N H<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> でマイクロピレットを用いて滴定する。

## 標準液

アンモニア標準液 (0.1mg N/ml) をパルナス蒸溜装置を用いて蒸溜し、滴定する。この標準液は比色用標準液の一部を使用して、これにより 0.01N 硫酸のファクターを求めて、規準を等しくした。

## 盲験

血清の代りに蒸留水 1.0ml を用いて同様に操作を行つた。

## 2) ケルダールネスレル法による比色

## 試薬

除蛋白剤 5 g/dl トリクロル酢酸

Reiko FUJINO, Tomoko KUDO, Hiroko SHIGEMITSU (Department of Biochemistry, Central Clinical Laboratory, University Hospital, Tokyo Women's Medical College) Some critiques on the standard methods used in clinical quantitative analysis. Report I. Non-protein nitrogen, Total protein.

酸化剤 Natelson 法<sup>3)</sup>

Hg O	25mg
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	100ml

水を加えて全量 1ℓ とする。

## 発色剤 Folin-Wu 法によるネスレル試薬

## 原液

KI	75g	} 水 50ml によく溶かす。
I <sub>2</sub>	55g	

Hg 70g を加えて I<sub>2</sub> の褪色寸前に上清をメスフラスコに入れ、全量 1ℓ とする。

## 使用液

原液	375ml
水	375ml
10% NaOH	1750ml

## 標準液 0.1mg N/ml

10mg/ml 硫酸アンモニウム (第一化学) を正確に 100倍に稀釈

## 実施法

## 1. 除蛋白

血清 (漿) 0.5ml に 5g/dl トリクロル酢酸 4.5ml を加え、混和後 5分放置して濾過又は遠心沈澱 (2000 rpm, 5~10分) する。

## 2. 酸化

濾液 (上清) 1.0ml に酸化剤 1.0ml を酸化フラスコに入れ加熱、盲験は酸化剤 1.0ml を酸化フラスコに入れて加熱する。約 30分 で液が無色透明になり白煙が出なくなる。更に 1時間加熱し、総計 1時間 30分の後に加熱をやめ、室温に放冷する。

## 3. 発色

酸化フラスコの内容を完全に目盛り試験管に移す。約 2ml ずつの水で 5~6回洗い込み、約 15ml とする。この際の水は冷蔵庫内に冷却しておいた蒸留水を用いる。

標準は 0.1ml N/ml 溶液を 0.3, 0.4, 0.5ml とり、各々に酸化剤 1.0ml を加え、冷水を加えて約 15ml とする。

検体、盲験、標準液各々にネスレル試薬 (使用直前迄冷蔵庫内保存) 3.0ml ずつ加え、最後に冷水を加えて正確に 20ml とする。

## 4. 比色

混和後、室温に 5~10分放置してから日立 EPO-B 型光電光度計で比色する。フィルターは S47, キュベット光路長 10mm を使用

尚標準液 0.3, 0.4, 0.5ml は夫々 30, 40, 50mg/dl に相当する。

## 実験結果

実験例数 153例

蒸溜滴定法平均値 28.00±8.52mg/dl

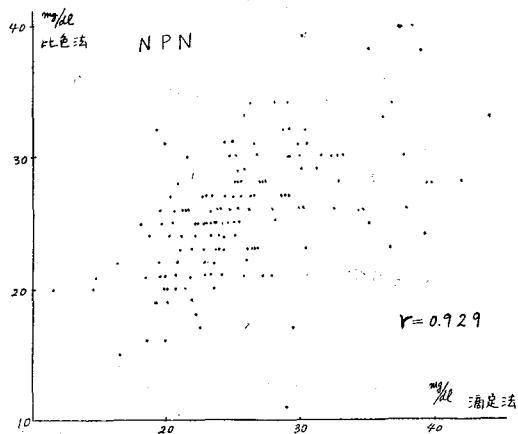
比色法平均値 28±5.47mg/dl

相関係数  $r=0.929$

なお図 1 に示した。

## 考 察

残余窒素の定量測定法は従来数多くの変法が知られている。ケルダール法を用いて蒸溜滴定を行うものが最も信頼度が高いとされているが、検査室で蒸溜を行うのは技術的にも時間的にも、その運営上に大きな支障を伴う。そこで酸化した検体を直接ネスレル化する試みは広く行われているが、屢々被検液が濁りを生じ易いものである。酸化時間を長く且つ発色を低温で行うとこの混濁はさけられ、しかも標準法との相関係数は殆んど 1 に近い値を示した本法は、臨床検査室における測定法として採用可能と思われる。従来の酸化剤として用いられているオキシ塩化セレン<sup>5)</sup>の代りに酸化水銀を用い、またネスレル試薬を水銀より作製した方法を用いた場合の組合せにおいては如何なる場合も混濁を生ずることなく測定出来た。測定例 153 例中、測定値の大差なかつたのは約半数で、他の半数は蒸溜滴定法の方が大部分僅かに高値を示した。(第一図参照) 平均値によつて比較



第 1 図

すれば滴定法が約 5mg/dl 高値をあたえている。これは比色法の酸化時間を長くしたために窒素の損失を招いたものと考えられる。しかしながら標準曲線を描く場合に標準液を全く同じ酸化方法で処理すればこの誤差はさけられるものと考えられる。

## B) 総蛋白質

## 定量法

## 1) ケルダール法による蒸溜滴定

## 試薬

5g/dl トリクロル酢酸  
 1:1 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 銅カリ試薬  
 0.01N. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 4g/dl ホウ酸  
 アンモニア標準液 (0.1mg N/ml) 第一化学製品  
 濃水酸化ナトリウム (75g/dl)

実施法

(a) 総窒素定量

マイクロケルダール用酸化フラスコに蒸留水 1 ml を入れ、オストワルドピベットより血清 0.1ml を加え、ピベット内を一度蒸留水で洗い血清を完全にフラスコ内に入れる。1:1 硫酸 2ml と銅カリ試薬 0.5g を加えて酸化炉で加熱酸化する。約 1 時間で酸化を打切る。フラスコを室温に暫時放置後、蒸留水を約 5ml 加える。この内容をパルナスの蒸溜装置を用いて蒸溜する。受器中には 4g/dl ホウ酸に指示薬としてメチル赤とプロムクレゾール緑を混じたもの 5.0ml を入れておく。ホウ酸はアンモニアを吸収するからそれを 0.01N 硫酸でマイクロピレットを用いて滴定する。

(b) 残余窒素の定量

残余窒素の項と同一に行つた。

計算

$$\begin{aligned} & (\text{総窒素(g/dl)} - \text{残余窒素(g/dl)}) \times 6.25 \\ & = \text{総蛋白質(g/dl)} \end{aligned}$$

1) ビウレット比色法

試薬

生理的食塩水 (0.9g/dl)

ビウレット試薬 Gornall等<sup>5)</sup>の処方

CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	1.5g
Na. K. C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> · 4H <sub>2</sub> O	6g
2.5N NaOH	300ml
KI	1g

水に溶解して全量 1<sup>l</sup> とする。

標準液

0.5g/dl 牛血清アルブミン (第一化学製品)  
 但しケルダール法による蒸溜滴定で総蛋白質測定の結果 0.511g/dl であつた。

実施法

血清 0.1ml を試験管中にとり、生理的食塩水 1.9ml を加えて稀釈しこれにビウレット試薬 8.0ml を混和する。37°C 恒温槽中に 30 分放置する。盲験は生理的食塩水 2.0ml にビウレット試薬 8.0ml を混和する。標準は標準液 (0.5g/dl) 1.0ml に生理的食塩水 1.0ml, ビウレット試薬 8.0ml を混じた。

光電光度計 (日立 E P O—B 型) のフィルター S<sub>53</sub> でキュベットの光路長 10mm を用いて、盲験を吸光度の 0 に合わせて血清及び標準の吸光度を求めた。

血清 0.1ml の採取について全実験数 91 例中、ビウレット比色法の場合に 1ml メスピペットで示差法により 0.1ml の血清採取 55 例、他の 36 例は予め試験管中に生理的食塩水 1ml をとり、0.1ml オストワルドピベットで採取した血清をその中に洗い込んで行つた。

実験結果

55 例平均

滴定法 7.87±0.31 (洗い込み)

比色法 7.78±0.25 (示差法)

相関係数 0.618

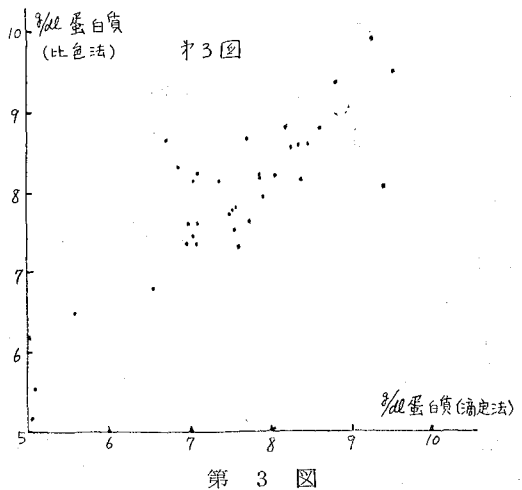
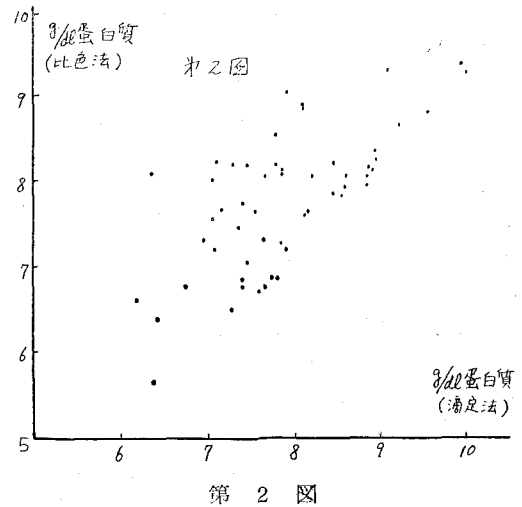
36 例平均

滴定法 7.48±1.16 (洗い込み)

比色法 7.82±0.31 (洗い込み)

相関係数 8.71

なお第 2, 3 図に示した。



考察

ケルダール法とビウレット法は測定機作が本質

的に異つている。すなわち蛋白質のケルダール法で測定できる窒素含量は蛋白質の種類が異ると共に変ずるものであり、ピウレット発色度はペプチド結合の数や側鎖の種類によつても異るとされているから相関係数が 0.87 程度になるのは止むを得ないものであろう。

メスピペットによる採取は相当手技の熟練を要するものと考えられる。むしろオストワルドピペットを用いる洗い込み法が信頼性の高い結果を与える。この場合においてもそれぞれの方法によつて平均値は相異したが、これはピウレット法の標準液として牛血清アルブミンを用いたため検体の A/G 比の変動にもとづく発色度の相異も考慮されるべきで、この変動による誤差を少なくするためにはむしろケルダール法で規整した正常人血清を標準液として用いた方が、かかる理由による誤差を軽減するであろう。

平均値に見られる差異も上の理由によるものと考えられる。

#### 総 括

同一検査材料に対して臨床化学検査に広く用い

られる方法のうち、残余窒素および総蛋白質定量法についてそれぞれ二種の定量法を用いた結果、得られる値に相異のあることを知り、その理由について考察を行つた。

本研究を御指導下さいました松村教授並びに実験を示唆して下さいました宮川講師に深甚なる感謝を捧げます。

本論文の要旨は第7回日本臨床病理学会総会（昭和35年11月18日、於福岡）において発表した。

#### 参 考 文 献

- 1) 樫田良精他：臨床検査 4 (9) 554~569(1960)
- 2) 齊藤正行他：臨床検査 4 (2) 106~118(1960)
- 3) Samuel Natelson : Microtechniques of Clinical Chemistry for the Routine Laboratory, Charles C. Thomas Publisher, Springfield Illinois, V.S. A. 1957, 272~276p.
- 4) Sumner J. B. and Sommers G. F. : Laboratory Experiments in Biological Chemistry, 2nd Edition, 1949, 70p.
- 5) 齊藤正行：光電比色計による臨床化学検査，改訂第3版，南山堂，1952，119頁